

EEN STUDIE OVER MUIZEN MET EEN AUTOCHTONE EN EEN HUMANE DARMFLORA

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
PROF. DR. J. SPERNA WEILAND
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP
WOENSDAG 28 NOVEMBER 1979 DES NAMIDDAGS
TE 4.15 UUR

DOOR

MARTINUS PETRUS HAZENBERG

GEBOREN TE AMSTERDAM

1979

BRONDER-OFFSET B.V. - ROTTERDAM

PROMOTOR : PROF. DR. F. WENSINCK
CO-REFERENTEN: PROF. DR. D. VAN DER WAAIJ
PROF. DR. M. FRENKEL

*De foto's op de omslag stellen voor:
clostridium-flora (boven).
anaerobe humane darmflora (onder).*

INHOUD

Hoofdstuk 1	Inleiding	1
Hoofdstuk 2	Materiaal en methoden	5
Hoofdstuk 3	Normalisatie van kiemvrije muizen door sporen van clostridia	17
Hoofdstuk 4	De clostridium-flora van conventionele muizen	24
Hoofdstuk 5	Besmetting van kiemvrije muizen met een menselijke darmflora	30
Hoofdstuk 6	Het gedrag van de humane darmflora in muizen met een verlaagde weerstand	38
Hoofdstuk 7	De invloed van sulfasalazine (Salazopyrine) op de menselijke darmflora en op de humane flora in de muis	47
	Tabellen en figuren	55
	Literatuur	75
	Samenvatting	85
	Summary	88
	Curriculum vitae	91

H O O F D S T U K I

INLEIDING

Planten en dieren leven in een zeer nauw contact met micro-organismen. Vaak werden deze contacten als onbetekenend voor de gastheer beschouwd (commensalisme) of werd zelfs gedacht dat ze schadelijk zijn (parasitisme). Meestal kon echter het nut van de relatie met micro-organismen voor de gastheer worden aangetoond. Voorbeelden hiervan uit het plantenrijk zijn het belang van *Rhizobium* voor de stikstoffixatie van de vlinderbloemigen (zie De Geus, 1977) en de associaties van schimmels met de wortels van allerlei planten (mycorrhiza's), waardoor de opname van mineralen wordt begunstigd (zie Sanders & Tinkler, 1976). Vooral in het dierenrijk komt vaak symbiose voor van een gastheer met grote aantallen en vele soorten van micro-organismen. Als wij ons beperken tot de zoogdieren dan kan worden opgemerkt dat in het maagdarmkanaal van deze klasse, voor zover onderzocht, altijd micro-organismen voorkomen (zie Clarke, 1977). Uit allerlei onderzoek is gebleken hoezeer deze van belang zijn voor de gastheer. Herkauwers betrekken hun energie uit plantaardig materiaal, dat door micro-organismen in de maag (een populatie van ongeveer 10^{10} bacteriën en 10^6 protozoën per ml maagsap) wordt gefermenteerd met behulp van enzymen die de gastheer niet bezit. De zich vermenigvuldigende populatie van micro-organismen blijft qua aantal constant doordat een deel doorstroomt naar de darm en daar wordt gelyseerd waarbij splitsingsprodukten zoals aminozuren worden opgenomen (zie Bauchop, 1977). Bij andere herbivore zoogdieren vindt de fermentatie door micro-organismen voornamelijk plaats in het coecum en de

dikke darm. Door coprofagie benutten veel knaagdieren de fermentatieproducten en vitaminen, afkomstig van micro-organismen, die anders met de faeces verloren zouden gaan (zie McBee, 1977). Minder duidelijk is het voordeel van de grote populaties van bacteriën in het maagdarmkanaal van carnivoren, omnivoren en sommige knaagdieren bij wie de betekenis van de microbiële fermentatie voor de energielevering gering is. De bijdrage die de bacteriepopulatie in deze groepen levert tot de homeostase kan dan ook niet gemakkelijk worden geschat. De voordelen van het bezit van een residente flora bij de mens zijn eigenlijk nauwelijks onderzocht. De nadelen van het voorkomen van potentieel pathogene bacteriën in de residente flora zijn reeds jarenlang een veld van studie (zie bv. Drasar & Hill, 1974 en Marples, 1974). Een indirecte methode om de functie van de residente flora, in casu de darmflora, na te gaan is dieren zonder deze te bestuderen. Het is mogelijk, allerlei diersoorten kiemvrij te fokken en lange tijd in leven te houden zonder dat ze door micro-organismen worden gekoloniseerd. Uit de vele studies op dit gebied is duidelijk geworden dat het kiemvrije dier afwijkt van zijn conventionele soortgenoot. Deze fysiologische veranderingen kunnen van soort tot soort verschillend zijn. Bij de kiemvrije muis zijn deze o.a.: verminderde peristaltiek, gewijzigde waterhuishouding in de darm, verminderde ontwikkeling van het immuunapparaat, dunnere darmwand (in verband met de vorige afwijking), lager metabolisme en nog andere, die uitvoerig zijn beschreven (zie Coates & Fuller, 1977). Als de fysiologische veranderingen inderdaad worden veroorzaakt door de afwezigheid van een darmflora dan moeten de dieren normaal (genormaliseerd) worden wanneer de flora wordt geïnstalleerd. Dit is inderdaad het geval, waarbij wordt opgemerkt dat ook de strikt anaerobe bacteriën, die in aantal het belangrijkste deel vormen van de darmflora, hiertoe, alleen, in staat zijn (Van der Waaij et al., 1971). Dat hier sprake is van symbiose wordt duidelijk uit het feit dat de gastheer voor zijn homeostase afhankelijk is van de anaeroben en dat deze op hun beurt afhankelijk zijn van de gastheer omdat daarbuiten het milieu niet geschikt is voor strikt anaeroben met een temperatuuroptimum van 38°C. Voor zover bekend bestaat een dergelijke symbiose bij alle zoogdieren. Nader onderzoek naar de samenstelling van de anaerobe flora heeft aangetoond dat deze voor de soort zeer specifiek is en dat er zelfs van individuele verschillen binnen de soort sprake kan zijn (Holdeman et al., 1976).

Dubos et al. (1965) zochten naar een ecologische benadering van dit probleem. Zij stelden dat de darmflora van knaagdieren, die ze "indigenous flora" noemden, voor verreweg het grootste deel bestaat uit anaeroben, die in symbiose leven met de gastheer, gedurende het hele leven aanwezig zijn, binnen de soort steeds worden overgedragen en vaak zo zijn aangepast dat ze buiten de soort niet voorkomen. Dit deel van de flora noemden zij autochtone micro-flora. Het andere deel bestaat uit micro-organismen die voor de symbiose niet essentieel zijn, in lage aantallen aanwezig zijn, vaak bestaan uit facultatieve anaeroben die potentieel pathogeen en niet bijzonder soort-specifiek zijn. Het feit dat deze groep in de "indigenous flora" slechts in lage aantallen voorkomt wordt mede veroorzaakt doordat de autochtone flora praktisch alle niche's van het ecosysteem opvult.

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven naar de autochtone flora van de muis. Over deze flora is betrekkelijk weinig onderzoek verricht o.a. omdat de anaeroben van deze flora extreem gevoelig zijn voor zuurstof. Een reden voor dergelijk onderzoek is, dat kennis over de flora die het meest gebruikte proefdier zo sterk beïnvloedt van belang kan zijn voor de interpretatie van allerlei experimenten. Algemeen wordt immers gestreefd naar een standaardisering van de bacteriële flora opdat in een bepaald proefdiermodel alle dieren dezelfde flora hebben.

Wij hebben voorts een onderzoek naar het gedrag van de humane flora in de muis gedaan omdat bleek dat deze flora kiemvrije muizen normaliseerde. Onder meer is nagegaan of alleen de anaerobe humane darmflora normaliserende eigenschappen heeft. Een dergelijke flora kan misschien worden gebruikt voor de reconventionalisatie van gedecontamineerde patiënten (Van der Waaij et al., 1977). Anaerobe flora's hebben de voorkeur omdat daarin de aerobe en facultatieve anaerobe soorten ontbreken die bij verlaagde weerstand vaak infecties veroorzaken. Wij hebben bij dit gedeelte van ons onderzoek ook gebruik gemaakt van muizen met een door chemotherapeutica of bestraling verlaagde weerstand.

Muizen met een humane flora kunnen ook een hulpmiddel zijn om de invloed van bepaalde farmaca op de darmflora na te gaan. Sulfasalazine (Salazopyrine) bv. is een geneesmiddel dat reeds jaren wordt gebruikt voor de behandeling van patiënten met colitis ulcerosa terwijl het

werkingsmechanisme onbekend is (Azad Khan et al., 1977). Mogelijk berust de werking op een antibacterieel effect van het sulfonamide deel van de verbinding en de invloed hiervan op de darmflora is bij genoemde muizen met een humane darmflora nagegaan.

In de hoofdstukken 3 en 4 wordt het onderzoek over de anaerobe flora van de muis beschreven. De overige hoofdstukken behandelen het gedrag van de menselijke darmflora in de muis waarbij het normaliserende effect van deze flora (hoofdstuk 5), het ziekmakende vermogen bij weerstandsverlaging (hoofdstuk 6) en de invloed van Salazopyrine op de flora (hoofdstuk 7) worden besproken.

H O O F D S T U K 2

MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Proefpersonen

2.1.1. Gezonde proefpersonen werden uit medewerkers van de afdeling Medische Microbiologie van de Medische Faculteit te Rotterdam gekozen.

2.1.2. Patiënten met colitis ulcerosa of de ziekte van Crohn waren onder behandeling op de afdeling Inwendige Geneeskunde II (hoofd: Prof. Dr. M. Frenkel), Academisch Ziekenhuis Dijkzigt, Rotterdam. De diagnoses werden gesteld door de internisten J. Dees en M. van Blankenstein, die wij zeer erkentelijk zijn voor de verstrekte informatie. De colitis ulcerosa-patiënten gebruikten gedurende meer dan een half jaar 4 - 6 gram sulfasalazine per dag.

Faecesmonsters werden na het defaeceren zo snel mogelijk en in ieder geval binnen twee uur gekweekt of als suspensies aan kiemvrije muizen gevoerd.

2.2. Proefdieren

2.2.1. Kiemvrije muizen

Kiemvrije muizen, ND2/Rij, werden verkregen uit eigen fok. De dieren waren gehuisvest in plastic isolatoren (Trexler & Reynolds, 1957). Het voer bestond uit vier delen AM2 korrels met één deel SPF suppletiekorrels van Hope Farms B.V., Woerden.

2.2.2. Ex-kiemvrije muizen besmet met een murine flora

2.2.2.1. Dignotobionten met clostridium-soorten, geïsoleerd uit de mui-

zeflora, werden verkregen door aan ex-kiemvrije muizen die met *E. coli* waren besmet een reïncultuur van de desbetreffende micro-organismen toe te dienen. Door *E. coli* werd de redoxpotentiaal van de darminhoud verlaagd zodat extreem gevoelige anaeroben konden aanslaan (Ruseler-van Embden, 1975). Twee weken nadat een clostridium-soort was gegeven, werd in preparaten van de faeces door gram-kleuring en sporekleuring de aanwezigheid van het desbetreffende micro-organisme nagegaan.

- 2.2.2.2. Polygnotobionten met clostridium-soorten, geïsoleerd uit de muizeflora, werden verkregen door een aantal dignotobionten die elk met een verschillende clostridium-soort waren besmet bij elkaar te plaatsen.
- 2.2.2.3. Muizen met een clostridium-flora werden verkregen door kiemvrije muizen te besmetten met een suspensie die uitsluitend clostridium-sporen bevatte (zie ook 2.4.).
- 2.2.2.4. Muizen, ND2/Rij, met een CRF flora ("Colonization Resistance Factor", Van der Waaij et al., 1971) werden verstrekt door het Radiobiologisch Instituut TNO te Rijswijk.

2.2.3. Ex-kiemvrije muizen besmet met een humane flora

- 2.2.3.1. Monognotobionten met *Bacteroides fragilis* (ATCC 12290), met *Eubacterium* sp., met *Escherichia coli* of met *Pseudomonas aeruginosa* werden verkregen door kiemvrije muizen te besmetten met een reïncultuur van het desbetreffende micro-organisme.
- 2.2.3.2. Dignotobionten met anaeroben uit de humane darmflora werden verkregen door aan ex-kiemvrije muizen die met *E. coli* waren besmet een stam van de desbetreffende micro-organismen toe te dienen. Twee weken nadat de stam was gegeven, werd in preparaten van de faeces door gram-kleuring de aanwezigheid van het desbetreffende micro-organisme nagegaan.
- 2.2.3.3. Polygnotobionten met anaeroben uit de humane darmflora werden verkregen door een aantal dignotobionten die met verschillende humane anaeroben waren besmet bij elkaar te plaatsen.
- 2.2.3.4. Muizen met een anaerobe humane flora werden verkregen door kiemvrije muizen te besmetten met een suspensie van humane anaeroben. Het mengsel van anaerobe bacteriën werd gemaakt door een faeces-suspensie zo te verdunnen dat na enting

op anaerobe flessen (zie ook 2.8.) en incubatie gedurende 48 uur 100 tot 400 kolonies opkwamen die met 15 ml verdunningsvloeistof (zie ook 2.8.2.) van de fles werden gespoeld. De besmetting met de verkregen suspensie, die uit een mengsel van de in de faeces meest frequent voorkomende anaeroben bestond, werd na een week herhaald met een verse suspensie omdat veel-eisende anaeroben soms pas aanslaan wanneer de redoxpotentiaal voldoende is gedaald door de groei van minder veeleisende anaeroben (Ruseler-van Embden, 1975).

2.2.3.5. Muizen met een HDF flora werden verkregen door kiemvrije muizen met deze flora te besmetten. De HDF flora ("Human Donor Flora", Vossen & Van der Waaij, 1973) was afkomstig van het Radiobiologisch Instituut TNO te Rijswijk. Capsules met coecuminhoud van muizen met een HDF flora werden bij -20°C bewaard. De coecuminhoud (ongeveer 0,3 gram) werd gesuspenseerd in 10 ml verdunningsvloeistof met 5 gram glaspereels (3,0 mm ϕ) door te schudden op een "Whirlimixer" (Fisons Sci. App.). Kiemvrije muizen werden 5 dagen achtereen met 1 tot 2 ml suspensie gevoerd (voor de reconventionalisatie van patiënten wordt de HDF flora eveneens 5 dagen achter elkaar toegediend).

2.2.3.6. Muizen met een complete humane flora werden verkregen door kiemvrije muizen te besmetten met faecessuspensies. Als uitgangsmateriaal diende faeces van gezonde proefpersonen en Crohn-patiënten. Eén tot twee gram faeces werd gesuspenseerd in een injectiefles met 100 ml verdunningsvloeistof en 10 gram glaspereels (3,0 mm ϕ) door 5 min. te schudden op een "Whirlimixer". Van deze suspensie werd 1 tot 2 ml aan de muizen toegediend. Na 1 week werden ze nogmaals besmet.

2.2.4. Conventionele muizen

Conventionele muizen, ND2/Rij, werden uit eigen fok verkregen. De muizen werden gevoerd met AM2 pellets van Hope Farms B.V. te Woerden.

Tijdens de experimenten werden de muizen geplaatst in polycarbonaat kooien in een "laminar flow cabinet" (stofvrije werkbank, Pielkenrood Vinitex B.V.) of in separatiebakken ("isolation cages", Van der Waaij, 1968).

De in de proefopstellingen gebruikte muizen waren 3 tot 6 maanden oud en wogen 25 tot 40 gram. In één proefopstelling werd zoveel mogelijk gezorgd dat muizen van een zelfde geslacht en een zelfde gewichtsklasse werden gebruikt.

2.3. Besmetting van kiemvrije muizen

De spore-, bacterie-, of faecessuspensie werd bij de muizen ingebracht met een maagsonde, bestaande uit een injectiespuit met een 3 cm lange teflonslang (\varnothing 0,7 mm) aan de naald. Om doorbijten van de slang te voorkomen werd deze beschermd door een bot afgeslepen vleugelnaald. Alle materialen waren gesteriliseerd.

2.4. Bereiding van spore-suspensies

Als uitgangsmateriaal voor deze suspensies dienden faeces van conventionele muizen, die gedurende 3 weken op roosters waren gehouden en steriel water en voer hadden gekregen. Na deze periode waren bacillus-soorten niet meer in de faeces aan te tonen. Van dit materiaal werden 3 typen van spore-preparaten gemaakt.

2.4.1. Spore-suspensies bereid door eliminatie van niet-sporevormers d.m.v. verhitten

Gewogen faeces van conventionele muizen werden fijngegreven in een mortier en met fysiologisch zout via een hydrofiel gaasje in een injectiefles gegoten zodat een faeces-suspensie ontstond van 100 ml. Alle gebruikte materialen waren gesteriliseerd. De suspensie werd geheel ondergedompeld in een waterbad en op de gewenste temperatuur verhit. Een fles met een thermometer en een zelfde volume water als de suspensie diende om het temperatuurverloop in de faeces-suspensie te volgen.

2.4.2. Spore-suspensies bereid door eliminatie van niet-sporevormers d.m.v. ethanol

De gewogen faeces van conventionele muizen werden fijngegreven in een mortier. Met 96% ethanol en fysiologisch zout werden de faeces via een hydrofiel gaasje in een injectiefles gespoeld, zodat uiteindelijk een faeces-suspensie ontstond in 100 ml 80% ethanol (vol %). Na vier uur staan werd de suspensie gecen-

trifugeerd gedurende 20 minuten bij $2000 \times g$ in een Christ UJ3. De bovenstaande vloeistof werd afgegoten en het pellet werd gesuspenseerd in 100 ml fysiologisch zout. Alle materialen en oplossingen waren gesteriliseerd.

2.4.3. Gedroogd spore-preparaat

Het met ethanol behandelde pellet werd gesuspenseerd in aceton. Na schudden en centrifugeren gedurende 20 min. bij $2000 \times g$, werd het pellet in 50 ml aceton geresuspenseerd; de suspensie werd nu overgegoten in een injectieflesje van 60 ml, dat bij dezelfde snelheid werd gecentrifugeerd. Na afgieten werd het flesje in een afzuigkolf geplaatst en werd de aceton afgezogen met een waterstraalpompe, waardoor een droog poeder ontstond. Dit droge spore-preparaat werd voor gebruik gesuspenseerd in fysiologisch zout. Alle materialen en oplossingen waren gesteriliseerd.

2.5. Bepaling van de antagonistische werking van de darmflora t.o.v.

Escherichia coli

Om de antagonistische werking van een darmflora na te gaan werden muizen met de desbetreffende flora tezamen met *E. coli*-monognotobionten in een separatiebak geplaatst. Bij dergelijke monognotobionten bedroeg het aantal coli-bacteriën ongeveer 10^7 (\log_{10} van het aantal per gram faeces). Door coprofagie stonden de muizen met de te testen darmflora voortdurend bloot aan besmetting met *E. coli*. De monognotobionten met *E. coli* konden door coprofagie de darmflora van de muizen waarmee ze in contact stonden overnemen. Door *E. coli* in de faeces te tellen kon worden vastgesteld wanneer zich een evenwicht in het coli-niveau had ingesteld. De antagonistische werking t.o.v. *Bacteroides fragilis* en *Eubacterium* sp. werd op vergelijkbare manier nagegaan.

2.6. Verlaging van de weerstand tegen infecties

- 2.6.1. Azathioprine werd welwillend ter beschikking gesteld door J.J. Kuneman, hoofd medische informatie afdeling Wellcome Nederland B.V. Het werd aan muizen via het drinkwater verstrekt. Om azathioprine op te lossen werd 1 M NaOH toegevoegd waarna

met 1 M HCl werd teruggetitreerd tot pH 8,4. Sterilisatie vond plaats door filtratie door een Sartorius membraanfilter, 0,2 µm poriegrootte. De oplossingen werden elke 2 dagen vernieuwd omdat bleek dat azathioprine door licht werd afgebroken (na 5 dagen ongeveer 50%, bepaald bij abs. max. 285 nm in spectrofotometer PMQ Zeiss).

2.6.2. Totale lichaamsbestraling werd uitgevoerd door de muizen bloot te stellen aan een dosis van 6,5 Gy (= 650 rad) afgegeven bij 300 kV, 10 mA door een Philips röntgen-apparaat, met een koperfilter van 3 mm. De bestraling werd uitgevoerd op het Radiobiologisch Instituut te Rijswijk met de medewerking van P. Heidt. Een dergelijke dosis heeft tot gevolg dat 50% van de kiemvrije ND2 muizen sterven in een periode van 30 dagen (Van der Waaij, 1979). Door Van der Waaij (1978) werd beschreven dat door een dosis van 7,0 Gy bij dit type muizen (een letale beenmergdosis) het darmepitheel slechts weinig werd beschadigd.

2.7. Toedienen van sulfasalazine (SASP) aan de muizen

Sulfasalazine (welwillend ter beschikking gesteld door Brocades-Stheeman & Pharmacia, Delft) werd via het drinkwater verstrekt. Op deze manier werd dagelijks contact met de muizen vermeden waardoor de besmettingskans werd verkleind. De dieren kregen een oplossing die 2 of 3 gram SASP per liter bevatte. Om SASP op te lossen werd 1 M NaOH toegevoegd waarna met 1 M HCl werd getitreerd totdat de eind-pH 8,0 was. Hierna werd de oplossing gesteriliseerd door middel van filtratie door een Seitz-filter. Afbraak van de verbinding bij bewaren kon spectrofotometrisch niet worden aangetoond.

2.8. Kweekmethoden

2.8.1. Anaerobe culturen. Niet langer dan twee uur na defaeceren werd van faecesmonsters ong. 1,5 gram in een injectieflles met ong. 8,5 ml fysiologisch zout en 5 gram glaspereels (3 mm ϕ) gebracht en werd gedurende 5 minuten met een "Whirlimixer" getrild. De faeces-suspensie werd overgebracht in een injectieflles met 90 ml verdunningsmedium en na mengen werd in 3 stappen van 100 x in hetzelfde medium doorverdund. Van de laatste verdunning

werd 0,5 tot 0,1 ml uitgestreken op een vast, prereduced, niet-selektief medium in een anaerobe fles (Wensinck & Ruseler-van Embden, 1971). Na ongeveer 48 uur bebroeden bij 37°C was het maximale aantal kolonies bereikt. Steeds werd van de laatste verdunning zoveel op het anaerobe medium gebracht dat 100 tot 200 kolonies konden worden verwacht. Het aantal kolonies werd geteld en van 100 hiervan werden gram-preparaten gemaakt.

2.8.2. Verdunningsmedium. Het medium bevatte per liter gedestilleerd water; casiton (Difco), 5 g; trypton (Oxoid), 5 g; glucose, 5 g; NaCl, 5 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3 g; cysteine-HCl, 0,5 g. Injectieflessen met 100 ml medium, waaraan 0,0002% resazurine werd toegevoegd als indicator om te zien of anaerobiose gehandhaafd bleef, werden nadat het medium op pH 7,2 was gebracht gedurende 10 min. op 120°C geautoclaveerd. De autoclaaf werd bij een geringe overdruk geopend waarna de doppen met rubbering op de injectieflessen stevig werden aangedraaid. Het verdunningsmedium kon zo zeker 2 weken anaeroob worden gehouden.

2.8.3. Niet-selektierend medium (B-super). Schapebloed werd 10 x verdund met gedestilleerd water. Na zwenken werd de pH op 6,8 gesteld. Het verdunde bloed werd 15 min. op 100°C verhit waarna werd gefiltreerd. Met 1 liter filtraat werd het volgende medium gemaakt: trypton (Oxoid), 15 g; gistextract (Difco), 3 g; vleesextract (Oxoid), 10 g; NaCl, 5 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; cysteine-HCl, 0,5 g; glucose, 5 g; amyllum (oplosbaar) 1 g. Het medium waaraan 0,0002% resazurine als indicator werd toegevoegd werd op pH 7,2 gebracht. Anaerobe kweekflessen met 75 ml medium en 1,5 g agar (Difco) werden gedurende 10 min. op 120°C geautoclaveerd. Aan het gesteriliseerde medium werd 0,75 ml vitamine-oplossing toegevoegd, die per liter gedestilleerd water bevatte: p-aminobenzoëzuur, 100 mg; biotine, 0,03 mg; calciumpantothenaat, 1,2 g; folinezuur, 100 mg; niacine, 100 mg; pyridoxalfosfaat, 100 mg; riboflavine, 100 mg; thiamine-HCl, 100 mg. Deze oplossing werd op pH 6,8 gebracht en gesteriliseerd door filtratie. Voor details van de anaerobe kweekmethode zie men Wensinck en Ruseler-van Embden (1971).

Aan het medium werd sulfasalazine (SASP), sulfapyridine (SP)

(apothek, Academisch Ziekenhuis Dijkzigt, Rotterdam) en 5-aminosalicylzuur (5-ASA) (Merck) toegevoegd door de stoffen op te lossen in 1 M NaOH en daarna de pH van het medium op 7,4 te stellen. Verandering van de pH door steriliseren (bij 120°C) had niet plaats. Met de in 2.12. beschreven methode werd nagegaan of de concentratie SASP, SP en 5-ASA van $3,7 \times 10^{-3}$ M in het medium bleef gehandhaafd. In de media met 5-ASA kon afbraak door steriliseren niet worden aangetoond. In de media met SP werd na sterilisatie 10% afbraak van SP gevonden. SASP werd door het steriliseren voor ongeveer 20% gesplitst in de media, vermoedelijk omdat de azo-verbinding bij de lage redoxpotentiaal in het medium werd gereduceerd.

- 2.8.4. Aerobe culturen. De faecale flora's of hartebleed (0,1 ml) werden gekweekt op bloedplaten. De kolonies werden afgeënt en reingekweekt. De gram-negatieve staven werden geïdentificeerd met het Api-systeem voor *Enterobacteriaceae* (Api-Benelux B.V., 's-Hertogenbosch). Gram-positieve kokken werden als ze katalase-negatief (5% H₂O₂) en thermoresistent (30 min. op 60°C) waren en aesculine omzetten, geklassificeerd als *Streptococcus faecalis* (verkorte Sherman reeks). Andere gram-positieve kokken die katalase-negatief waren maar niet tot de soort *Str. faecalis* behoorden werden opgegeven als *Streptococcus sp.*
- 2.8.5. MIC bepaling. De "minimum inhibitory concentration" van SP en van sulfamethoxazol (SM) (welwillend ter beschikking gesteld door Hoffman-La Roche) voor aeroben uit de humane flora werd als volgt bepaald. De stoffen werden opgelost in 1 M NaOH en toegevoegd aan het "isosensitest" medium (Oxoid) zodat dit 25, 50, 100, 150, 200 en 500 µg SP of SM per ml bevatte, waarna de eind-pH op 7,2 werd gesteld en werd gesteriliseerd. Reinculturen (op bouillon) van aeroben geïsoleerd uit de humane flora werden verdund waardoor de gram-negatieve staven in aantallen van 5,0 en de gram-positieve kokken in aantallen van 6,0 per ml aanwezig waren. Van deze cultures werd een entoog op de platen met SP of SM geënt. Na 24 uur werd afgelezen bij welke concentratie SP of SM groei niet werd waargenomen.
- 2.8.6. Kweken van reinculturen. De reinculturen van clostridia werden verkregen door suspensies van met ethanol behandelde faeces

van muizen met een clostridium-flora te kweken in anaerobe flessen met het B-super medium. De geïsoleerde micro-organismen werden op hetzelfde medium aangehouden, zo mogelijk in hoge buizen met 0,3% agar. Sommige soorten groeiden beter op een medium met xylose i.p.v. glucose en werden daarop aangehouden.

De anaeroben die uit de humane faecale flora waren geïsoleerd werden aangehouden op het B-super medium in hoge buizen met 0,3% agar.

2.9. Identificatie van anaeroben

- 2.9.1. Koolhydraatfermentaties en diverse biochemische testen. Deze werden uitgevoerd zoals beschreven door Wensinck en Ruseler-van Embden (1971).
- 2.9.2. Bepaling fermentatie-eindproducten. Fermentatie-eindproducten werden bepaald in culturen die 5 dagen waren gegroeid op het B-super medium met 1% glucose. De vetzuren en alcoholen werden bepaald volgens de methode van Carlsson (1973) met een Pye Unicam gaschromatograaf.
D-Melkzuur, L-melkzuur en pyruvaat werden respectievelijk bepaald met de methode van Gawehn en Bergmeyer (1970), Hohorst (1970) en van Czok en Lamprecht (1970). De methode van Lang en Lang (1972) werd gebruikt voor bepaling van mierzuur.
- 2.9.3. Bepaling DNA-base-samenstelling. Een gewassen bacterie-suspensie werd met een french press (druk 500 kg/cm^2) zoals beschreven door Hughes (1971) gedisintegreerd. Na extractie van het DNA (Marmur, 1963; De Ley, 1971) werd het gezuiverd over een hydroxyapatiet-kolom (Benardi, 1971). De DNA-fractie werd gedurende een nacht gedialyseerd tegen 0,15 M NaCl - 0,015 M natriumcitraat (pH 7,0). Het percentage G + C werd berekend uit het smeltpunt van het DNA (Marmur & Doty, 1962) waarbij gebruik werd gemaakt van een Unicam SP 500 spectrofotometer met automatische recorder (Mandel & Marmur, 1968).
- 2.9.4. Identificatie. Om de geïsoleerde clostridia te identificeren werden de schema's van Bergey's Manual (Buchanan & Gibbons, 1974) en van Holdeman et al. (1977) gebruikt. Als de eigenschappen niet overeenkwamen met een van de soorten in deze

schema's dan werd het organisme als tot nog toe niet beschreven beschouwd.

2.10. Bepaling van de samenstelling van de darmflora

2.10.1. Cultureel. Bij de globale inventarisatie van de faecale flora van gezonde proefpersonen en van Crohn-patiënten deelde Wensinck (1976) de bacteriën in op grond van de morfologie en het gram-karakter. Vijf groepen werden onderscheiden: anaerobe gram-negatieve staven, anaerobe gram-positieve staven, kokken, gram-positieve kokkoïde staven en aeroben. De anaerobe gram-positieve staven werden weer onderscheiden in eubacterium-soorten, bifidobacterium-soorten en overige gram-positieve staven (lactobacillen, propionzuurbacteriën, clostridia). Het verschil in samenstelling van de anaerobe faecale flora van patiënten en gezonde proefpersonen werd weergegeven in de percentages gram-negatieve staven, gram-positieve staven en kokkoïde staven t.o.v. het totale aantal. Met de term kokkoïde staven werden anaerobe gram-positieve staafjes aangeduid met ovale of ruitvormige cellen, die in paren of in korte ketens liggen; ze zijn duidelijk te onderscheiden van kokken en behoren tot het geslacht *Peptostreptococcus* en wellicht ook tot *Eubacterium*. Van de anaeroob gekweekte faeces van kiemvrije muizen besmet met een menselijke darmflora werden de hiervoor genoemde percentages bepaald plus het percentage kokken t.o.v. het totale aantal. Uit de onderlinge verhouding van de 4 groepen van anaeroben t.o.v. het totaal kon worden opgemaakt in hoeverre de menselijke flora zich in de muis in stand kon houden.

2.10.2. Standaardpreparaten. Monsters van faeces van ongeveer 100 mg werden in injectieflesjes met 10 ml fysiologisch zout en 5 gram glasparels (3 mm \emptyset) gewogen en gedurende 5 min. met een "Whirlimixer" gesuspendeerd. Eén standaarddruppel (1/40 ml) werd zorgvuldig over 4 cm² op een objektglaasje uitgestreken. Na fixatie werd het preparaat volgens gram gekleurd. Met een dekglas en Depexmount (Gurr) kon het preparaat worden ingesloten. De standaardpreparaten van de autochtone muizeflora werden vooral gekenmerkt door de gram-positieve en gram-labele "tapered rods" (clostridia) en de in spiraalvormige ketens liggende *Clostri-*

diium ramosum met daartussen gram-negatieve staven, vermoedelijk bacteroides-soorten. De standaardpreparaten van de menselijke flora werden gekenmerkt door gram-positieve en gram-negatieve staven en de numeriek niet de overhand hebbende maar zeer opvallende, vaak in duplo of in ketens van drie of vier liggende kokkote staven (anaerobe kokkote staafjes) en *Streptococcus faecalis*. De "tapered rods" werden in de standaardpreparaten van de menselijke flora niet gevonden, terwijl kokkote staven niet in de preparaten van de autochtone muizeflora aanwezig waren.

2.11. Bepaling van SP en SASP in faeces

- 2.11.1. Vrij SP. De bepaling werd uitgevoerd zoals beschreven door Hansson en Sandberg (1973). Faecesmonsters van 1 gram werden 1 op 10 verdund. Aan 1 ml van deze verdunningen werd 1 ml 1 M acetaatbuffer toegevoegd waarna werd uitgeschud met 5 ml isobutylmethylketon. Na 5 min. centrifugeren ($600 \times g$) werd van de bovenste laag 3 ml afgepipetteerd en uitgeschud met 3 ml 4 M HCl. Na weer 5 min. centrifugeren werd op de waterfase de kleurreactie van Bratton en Marshall (1939) toegepast. De concentraties werden gemeten met een spectrofotometer bij $\lambda = 540$ nm.
- 2.11.2. SASP. De bepaling werd uitgevoerd door in faeces het aan SASP gebonden SP te bepalen volgens de methode van Sandberg en Hansson (1973). Faecesmonsters werden 1 op 20 verdund. Aan 1 ml werd 50 μ l $TiCl_3$ (15% oplossing, Merck) toegevoegd waarna gedurende 15 min. op $56^\circ C$ werd verwarmd. Na afkoelen werd 50 μ l 1 M NaOH toegevoegd om te neutraliseren. Hierna werd de suspensie bewerkt zoals onder 2.11.1. is beschreven.
- #### 2.12. Bepaling van SASP, SP en 5-ASA in bacteriologische media
- 2.12.1. SASP. Het medium werd 10 keer verdund en de concentratie werd direkt spectrofotometrisch bepaald bij $\lambda = 455$ nm.
- 2.12.2. SP. Het medium werd 200 keer verdund. Aan 1 ml hiervan werd 1 druppel 4 M HCl toegevoegd. Daarna werd de kleurreactie van Bratton en Marshall toegepast.
- 2.12.3. 5-ASA. Het medium werd 100 keer verdund. Aan 1 ml werd 1 druppel 4 M HCl toegevoegd. Daarna werd de kleurreactie van Bratton

en Marshall toegepast en na 1,5 uur werd de concentratie bepaald bij $\lambda = 560$ nm zoals door Pieniassek en Bates (1975) is aangegeven.

2.13. Statistische bewerking

Voor de berekening van de statistische significantie tussen de verschillen in resultaten werd de Mann-Whitney U-test gebruikt. De P-waarden werden opgegeven bij tweezijdige overschrijdingskans. De sterfte in groepen muizen werd beoordeeld met de toets van Fisher (De Jonge, 1963), waarbij gebruik werd gemaakt van de 2×2 tabellen van Diem en Lentner (1968).

De lineaire regressiecoëfficiënt werd berekend volgens de methode van de kleinste kwadraten (De Jonge, 1963).

2.14. Aantallen micro-organismen

Aantallen micro-organismen (anaeroob en aeroob) werden opgegeven als de \log_{10} van het aantal per gram faeces (nat gewicht) of coecuminhoud. Dit geldt zowel voor de tekst als voor de tabellen.

H O O F D S T U K 3

NORMALISATIE VAN KIEMVRIJE MUIZEN DOOR SPOREN VAN CLOSTRIDIA

Inleiding

Kiemvrije muizen die worden besmet met darminhoud of faeces van conventionele muizen krijgen een normale darmflora, het coecum wordt gereduceerd tot een normaal gewicht en de histologische afwijkingen van de darm verdwijnen. Gezien het belang van een proefdier met een volledig bekende darmflora is herhaaldelijk getracht, kiemvrije muizen door besmetting met uit de darmflora geïsoleerde micro-organismen te normaliseren. Daar de strikt anaeroben numeriek overheersen (Schaedler et al., 1965; Savage et al., 1968; Lee et al., 1971) lag het voor de hand te veronderstellen dat anaeroben voor het normaliseren van de grootste betekenis zijn, doch het isoleren, identificeren en aanhouden stelt grote problemen. Syed et al. (1970) en Freter en Abrams (1972) konden bij kiemvrije muizen een coecumverkleining bewerkstelligen door besmetting met 45 stammen van strikt anaeroben en 14 facultatief anaeroben doch de muizen moesten wel met een speciaal dieet worden gevoerd. Iwai et al. (1973) normaliseerden kiemvrije muizen door besmetting met 1 clostridium-soort, 12 niet-geïdentificeerde anaeroben en 4 bekende facultatief anaeroben. Het voeren van een semi-synthetisch dieet en associatie met 6 reïnculturen van anaeroben, die van ratten afkomstig waren, leidden bij kiemvrije muizen tot een duidelijke coecumreductie (Sacquet et al., 1973). Lee et al. (1971) toonden aan dat waarschijnlijk alleen de strikt anaeroben verantwoordelijk zijn voor het hebben of krijgen van een klein coecum en hetzelfde bleek ook uit de experimenten van Van der Waaij et al. (1971), die kleine coeca verkregen bij

muizen die waren besmet met de darminhoud van een met antibiotica behandelde conventionele muis. De darmflora van deze muizen bestond uitsluitend uit anaeroben, waarvan er 5 werden geïsoleerd en beschreven (Wensing & Ruseler-van Embden, 1971). Van de 5 soorten waren er drie clostridia en daarvan behoorden er 2 tot de voor de muis zo karakteristieke "tapered rods" (Gordon & Dubos, 1971; Lee et al., 1971; Lee & Gemell, 1972; Savage et al., 1968; Savage & Dubos, 1968; Savage, 1970; Savage & McAllister, 1971; Savage et al., 1971). Daar een normaliserende flora door de lucht wordt overgebracht (D. van der Waaij, persoonlijke mededeling; J.G.H. Ruseler-van Embden, persoonlijke mededeling) en clostridia in grote aantallen in de residente flora van de muis voorkomen, werd ervan uitgegaan dat de murine flora uit sporevormers bestaat.

Daarom werd de coecuminhoud van conventionele muizen zodanig behandeld dat niet-sporevormende micro-organismen werden geëlimineerd en sporen zoveel mogelijk werden gespaard. De coecuminhoud werd daarbij blootgesteld aan verhitting of aan behandeling met ethanol (Johnston et al., 1964). Met de behandelde coecuminhoud werden kiemvrije muizen besmet en na verloop van tijd werd het coecumgewicht bepaald en nagegaan of er een antagonistische werking bestond van de darmflora t.o.v. *Escherichia coli*. Met dit laatste wordt bedoeld dat na besmetting van monognotobionten met *E. coli* met een normaliserende flora (bv. de conventionele) de aantallen *E. coli* dalen van 9,0 - 10,0 per gram coecuminhoud tot 5,0 - 7,0 (\log_{10} van de aantallen) (Schaedler et al., 1965; Freter & Abrams, 1972; Lee & Gemell, 1972).

Met de term kolonisatie-resistentie van de darmflora zoals door Van der Waaij (1971) werd beschreven wordt iets anders bedoeld nl. dat de aanwezigheid van een normaliserende flora verhindert dat micro-organismen die in een bepaalde orale dosis worden toegediend zich langdurig vestigen. De mate van kolonisatie-resistentie kan worden uitgedrukt als de \log_{10} van de toegediende orale dosis van micro-organismen die over een lange periode aanwezig blijven in de flora van 50% van de besmette dieren.

In onze proefopzet is gekozen voor bepaling van de antagonistische werking van de darmflora omdat voor deze bepaling veel minder proefdieren nodig zijn.

Materiaal en methoden

Voor de gebruikte materialen en toegepaste methoden wordt verwezen naar de paragrafen 2.2., 2.3., 2.4., 2.5., 2.7. en 2.13 van Hoofdstuk 2.

Resultaten

3.1. Coecumgewicht na besmetting van kiemvrije muizen met faecessuspensies

De resultaten van het besmetten van kiemvrije muizen met op verschillende manieren behandelde faecessuspensies van conventionele muizen zijn weergegeven in tabel 1. Hieruit blijkt allereerst het grote verschil in coecumgewicht van kiemvrije en conventionele muizen. Voorts is duidelijk dat de besmetting met faeces die met alcohol waren behandeld een vermindering van het coecumgewicht tot conventionele waarden tot gevolg had. De enige aerobe bacteriën die nog in de flora werden gevonden waren bacillus-soorten. De resultaten met verhitte faecessuspensies van conventionele muizen waren iets minder goed; de coecumgewichten waren hoger dan in de groep conventionele muizen ($P < 0,02$) en in de flora waren behalve de bacillus-soorten ook gram-positieve kokken aanwezig. Het gebruik van alcohol om vegetatieve bacteriën te doden werd daarom verkozen boven verhitting. De volgende stap was het uit de darmflora van conventionele muizen elimineren van de bacillus-soorten, die in aantallen van 2,0 tot 3,0 per gram faeces voorkwamen. Kweken van het niet-steriele voer toonde aan dat zich hierin ca. 4,0 per gram aerobe sporevormers bevonden. Mede op grond van hun lage aantallen in de flora werden de bacillus-soorten als transiënten beschouwd. Het bleek dan ook dat als conventionele muizen in steriele kooien op roosters werden gehouden om coprofagie te voorkomen en steriel water en voer kregen toegediend, de bacillus-soorten in een paar weken uit de faeces verdwenen. Na behandeling met ethanol bevatten de faecessuspensies van deze muizen alleen nog levende sporen van clostridium-soorten. Kiemvrije muizen werden besmet met door aceton behandeling gedroogde sedimenten van deze suspensies en de gegevens van tabel 1 tonen aan dat de coecumgewichten van deze muizen aanzienlijk waren gereduceerd door de clostridium-flora. Het coecumgewicht-reducerende effect van met ethanol behandelde faeces bleef dus na drogen met aceton onaangetast. De gegevens van de conventio-

nele muizen laten zien dat het type dieet geen invloed had op het coecumgewicht.

3.2. Coecumgewicht van muizen besmet met een beperkt aantal clostridium-sporen

Een faecessuspensie van conventionele muizen die met ethanol was behandeld, werd zodanig verdund dat zij ongeveer 1300 levende sporen per ml bevatte. Van deze suspensie werden 16 honderdvoudige verdunningen gemaakt. Paren van kiemvrije muizen die in 16 verschillende kooien werden gehouden, werden met één van deze verdunningen besmet. Na 2 weken werd het coecumgewicht van een muis van elk paar bepaald. Als dit groter dan 2% van het lichaamsgewicht was dan werd de koppelgenoot ook gedood. De resultaten zijn weergegeven in tabel 2. Klaarblijkelijk bevatten de meeste suspensies niet die groep van sporevormers noodzakelijk voor vermindering van het coecumgewicht tot normale waarden; slechts bij drie was dat het geval (suspensie 3, 15 en 11). In kooi 3, 15 en 11 werden bij de overgebleven muis twee kiemvrije muizen geplaatst. Deze dieren werden na 2 weken gedood. Hun coecumgewicht varieerde van 1,4 tot 1,9% van het lichaamsgewicht met een mediaan van 1,6%. Gram-preparaten van het coecum toonden aan dat de clostridium-flora voornamelijk uit "tapered rods" bestond. Dit betekende dat de normaliserende flora effectief was overgedragen. De muis uit kooi 11 werd gebruikt als bron voor besmetting van een grote groep te normaliseren kiemvrije muizen met een beperkte clostridium-flora.

3.3. Effect van de clostridium-flora op de aantallen *E. coli*

Muizen met een darmflora die alleen uit clostridium-soorten bestond werden bij kiemvrije muizen besmet met *E. coli* geplaatst. De uitwisseling van de darmbacteriën had tot gevolg dat na 3 weken stabiele aantallen *E. coli* in de faeces werden gevonden. De dieren werden afgemaakt; het coecumgewicht en de aantallen *E. coli* in de darm werden bepaald. Dit experiment werd ook gedaan met *E. coli* monognotobionten waarbij conventionele en CRF muizen werden geplaatst (tabel 3). De populatie van *E. coli* in de muizen met de CRF- en de clostridium-flora was groter dan in conventionele muizen ($P < 0,02$) maar veel kleiner dan in kiemvrije muizen ($P < 0,001$).

3.4. Effect van de clostridium-flora op *Bacteroides fragilis*, op *Eubacterium sp.* en op *E. coli*

Muizen met een darmflora die alleen uit clostridium-soorten bestond werden geplaatst bij 3 groepen van 5 monocontaminanten: één groep met alleen *Bacteroides fragilis* (10,3 per gram faeces), één groep met alleen *Eubacterium sp.* (9,7 per gram faeces) en één groep met alleen *E. coli* (9,7 per gram faeces). De gevolgen van het besmet raken van de monognotobionten met de clostridium-flora werden, voor de drie soorten bacteriën, nagegaan. In de faeces van de drie groepen ex-monognotobionten werden gedurende 10 dagen de aantallen van de desbetreffende bacteriën anaeroob (*Bacteroides* en *Eubacterium*) en aeroob (*E. coli*) bepaald. De gegevens zijn in Fig. 1 weergegeven. De eubacterium-soort werd in korte tijd geheel verdrongen door de clostridium-flora. Na 8 dagen waren de aantallen zo laag dat ze op de voedingsbodem niet tussen de clostridia konden worden herkend. In gram-preparaten van faeces kon dit micro-organisme, dat morfologisch sterk verschilt van de "tapered rods", niet meer worden waargenomen. Ook *E. coli* werd zeer snel teruggedrongen door de anaerobe flora; na 10 dagen varieerden de aantallen tussen de 6,0 en 7,0 per gram faeces. *Bacteroides fragilis* daarentegen werd weliswaar beïnvloed door de clostridium-flora - de aantallen lagen ongeveer 10 x lager dan in de monognotobionten - maar het micro-organisme bleef een belangrijke darmresident.

Uit deze experimenten kan worden geconcludeerd dat anaeroben zoals de eubacterium-soort die niet tot de muizeflora behoren door een autochtone flora vrijwel volledig worden verdrongen. *Bacteroides* waarvan bekend is dat deze een belangrijke resident van de muizeflora kan zijn, blijft dit ook na confrontatie met de clostridium-flora. *E. coli* wordt teruggedrongen tot het niveau waarop in conventionele flora's facultatieve anaeroben worden gevonden.

Bespreking van de resultaten

Uit de experimenten (3.1.) is gebleken dat na behandeling van de faeces van conventionele muizen met 80% ethanol een flora overblijft die uitsluitend uit clostridia bestaat. Dit kan door de volgende argumenten aannemelijk worden gemaakt.

1. Behandeling van faeces met 80% ethanol gedurende vier uur doodt alle

vegetatieve stadia van bacteriën en alleen sporen blijven over. Op vergelijkbare manier wist Johnston (1964) *Clostridium botulinum* uit besmet voedsel te isoleren.

2. Het gedroogde sporepreparaat kan aan de lucht worden bewaard. Vegetatieve stadia van strikt anaerobe bacteriën sterven aan de lucht onherroepelijk af, doch sporen van clostridia niet.
3. Wordt een met ethanol bewerkte faecessuspensie op een anaerobe fles gekweekt, dan worden pas na vier dagen kolonies waargenomen. Anaerob gekweekte suspensies van verse faeces laten al na één dag kolonies zien. De reden hiervan is dat de anaerobe bacteriën (ook clostridia) in het vegetatieve stadium direct na enten gaan groeien terwijl sporen eerst moeten ontkiemen.
4. In het gram-preparaat van een faeces-uitstrijk van muizen met de zeer beperkte strikt anaerobe flora zijn micro-organismen waar te nemen die op grond van hun karakteristieke microscopische beeld kunnen worden ondergebracht bij een bepaalde soort zoals *Clostridium ramosum*, soort E (Wensinck & Ruseler-van Embden, 1971) en de groep van "tapered rods" (Gordon & Dubos, 1971). In een aantal representanten van elk van deze soorten worden sporen gezien.

Uit de resultaten (3.3.) bleek dat de normaliserende werking van de clostridium-flora vergelijkbaar is met die van de conventionele flora en met die van een anaerobe flora zoals de CRF flora, waarvan de samenstelling niet bekend is (Van der Waaij et al., 1971). De conventionele flora en ook de CRF flora bevatten micro-organismen die voor de normalisatie niet belangrijk zijn zoals bacteroides-soorten en *Propionibacterium acnes* terwijl de clostridium-flora alleen die groep van "tapered rods" bevat die nodig is voor normalisatie. Deze flora is autochtoon en omdat alle micro-organismen tot de anaerobe sporevormers behoren kan worden gesteld dat de clostridium-flora een bijdrage is om tot een standaardisatie van de darmflora van de muis te komen. Van een echte standaardisatie kan pas sprake zijn als alle soorten micro-organismen van de flora zijn geïdentificeerd en kunnen worden gekweekt (Koopman, 1977).

Standaardisering van de darmflora van de muis, het meest gebruikte proefdier, is belangrijk omdat de invloed ervan op het dier bijzonder groot is. Voor veel experimenten worden SPF (specific pathogen free) muizen gebruikt o.a. omdat bij verlaging van de weerstand de aanwezig-

heid van potentieel pathogene micro-organismen de sterftekans sterk verhoogt. Wil men echter meer zekerheid hebben over de uniformiteit van het proefdier dan moet niet alleen de afwezigheid van een bepaalde groep micro-organismen vaststaan maar is kennis over de aanwezige flora noodzakelijk. Dit is bv. het geval bij muizen met een clostridium-flora. Het feit dat de normaliserende flora in de vorm van een gedroogd preparaat kan worden bewaard, biedt grote voordelen. Men kan te allen tijde over deze flora beschikken en is niet aangewezen op het aanhouden van deze flora in proefdieren of in culturen hetgeen altijd risico's van afsterven en besmetting met zich meebrengt.

Uit experimenten van anderen is gebleken dat het dieet van belang is voor het coecumgewicht (Freter & Abrams, 1972; Sacquet et al., 1973). In onze proefopstelling (3.1.) heeft het dieet geen invloed op het coecumgewicht. Dit blijkt uit het feit dat conventionele muizen onder steriele en normale omstandigheden niet verschillen wat betreft coecumgewicht; bij het onder steriele omstandigheden aanhouden van de muizen werd immers een suppletiekorrel toegediend.

De in dit hoofdstuk vermelde resultaten werden door Hazenberg & Custers-van Lieshout (1976) beschreven. Later werd ook door anderen (Celesk et al., 1976; Ducluzeau et al., 1977) aangetoond dat het elimineren van de niet-sporevormers in de murine flora resulteert in een flora die bestaat uit "tapered rods" met normaliserende eigenschappen. De door deze onderzoekers gebruikte methode (verhitten) werd door ons echter minder effectief gevonden dan de selectie d.m.v. ethanol.

Koransky et al. (1978) beschreven dat de behandeling van faeces van patiënten gedurende 1 uur met ethanol een eenvoudige methode is om sporevormende bacteriën te isoleren en ondersteunden daarmee onze bevindingen. Koopman et al. (1977) stelden dat reductie van het coecum tot een normaal gewicht en het antagonisme van de darmflora t.o.v. *E. coli* bruikbare parameters zijn om de mate van normalisatie vast te stellen. Andere parameters zoals de pH en redoxpotentiaal voldoen minder goed.

H O O F D S T U K 4

DE CLOSTRIDIUM-FLORA VAN CONVENTIONELE MUIZEN

Inleiding

In het vorige hoofdstuk werd aangetoond dat een mengsel van clostridiumsporen verkregen door behandeling van faeces van conventionele muizen met ethanol, in staat was, kiemvrije muizen te normaliseren (Hazenberg & Custers-van Lieshout, 1976). Hoewel het aantal clostridium-soorten in het mengsel niet bekend was werd aangenomen dat het klein was. In de hier beschreven experimenten werd getracht, een aantal van deze soorten te identificeren en werd het effect van de reïnculturen op het coecumgewicht van kiemvrije muizen nagegaan. Bovendien werden muizen besmet met de gecombineerde groep van reïnculturen.

Materiaal en methoden

Voor de gebruikte materialen en toegepaste methoden wordt verwezen naar de paragrafen 2.2., 2.3., 2.8., 2.9., 2.13. en 2.14. van Hoofdstuk 2.

Resultaten

Uit de faeces van muizen met een strikt anaerobe darmflora werden 7 soorten geïsoleerd, die alle tot het geslacht *Clostridium* bleken te behoren. Sporevorming was slechts zelden zichtbaar in *in vitro* culturen doch in alle gevallen duidelijk te zien in preparaten van *in vivo* culturen i.e. in preparaten van de darminhoud en faeces van muizen die met *E. coli* en één van de clostridium-soorten waren besmet. Ook voor het vaststellen van het gram-karakter waren *in vivo* culturen veel betrouwbaarder dan *in vitro* culturen. Alle soorten bleken gram-positief te zijn

doch zo gram-labiel dat zij zich in *in vitro* culturen vrijwel steeds als gram-negatief voordeden.

De algemene kenmerken van de soorten worden hieronder beschreven, de uitkomsten van fermentatiereacties zijn samengevat in tabel 4 en de fermentatie-eindprodukten zijn aangegeven in tabel 5. Daarna wordt het effect van de 7 clostridium-soorten op het coecumgewicht besproken.

4.1. Algemene kenmerken van de geïsoleerde clostridium-soorten

Soort 1:

Morfologie

Gram-positieve, halfcirkelvormige staafjes die vaak in massa's bijeen liggen. Subterminale sporen, die alleen zichtbaar zijn in preparaten van *in vivo* culturen. Geen zweepdraden.

Fysiologie

Vorming van zuur maar niet van gas uit koolhydraten (tabel 4).

Vorming van gelatinase, indol en nitriet negatief. H₂S gevormd.

Eind pH in culturen met fermenteerbaar koolhydraat: 5,3. Fermentatie-eindprodukten: melkzuur, mierzuur, azijnzuur en ethanol (tabel 5).

DNA-base-samenstelling

29,5% G + C.

Identificatie

De soort komt overeen met soort A, beschreven door Wensinck & Ruseler-van Embden (1971), die als *Clostridium ramosum* werd geïdentificeerd.

Soort 2:

Morfologie

Grote, gram-positieve (gram-labele) sigaarvormige staven met subterminale sporen. Peritriche flagellen.

Fysiologie

Vorming van zuur maar niet van gas uit koolhydraten (tabel 4).

Vorming van gelatinase, indol en nitriet negatief. H₂S gevormd.

Eind pH in media met fermenteerbare koolhydraat: 6,0. Fermentatie-eindprodukten: boterzuur en kleine hoeveelheden van azijnzuur en pyrodruivenzuur (tabel 5).

DNA-base-samenstelling

34,9% G + C.

Identificatie

De soort komt overeen met soort E beschreven door Wensinck & Ruseler-van Embden (1971) en is ook door T. Wilkins (persoonlijke mededeling) uit de muizedarm geïsoleerd. Deze soort komt niet voor in Bergey's Manual (Buchanan & Gibbons, 1974) en bij Holdeman et al. (1977).

Soort 3:

Morfologie

Gram-positieve (gram-labiele), slanke, spoelvormige staafjes, los en in paren liggend. Subterminale sporen. Peritriche flagellen.

Fysiologie

Vorming van zuur en gas uit koolhydraten (tabel 4). Eind pH 5,3. Fermentatie-eindproducten: boterzuur en azijnzuur (tabel 5).

DNA-base-samenstelling

56,1% G + C.

Identificatie

De soort komt overeen met soort D beschreven door Wensinck en Ruseler-van Embden (1971). Deze soort komt niet voor in Bergey's Manual (Buchanan & Gibbons, 1974) en bij Holdeman et al. (1977).

Soorten 4 en 5:

Deze soorten vormen spoelvormige, middelgrote staafjes die in *in vitro* culturen gram-negatief zijn doch in *in vivo* culturen onmiskenbaar gram-positief. De sporen liggen subterminaal en worden alleen in *in vivo* culturen gevormd. Vorming van indol, gelatinase en nitriet negatief, H₂S wordt gevormd. Vorming van zuur doch niet van gas uit fermenteerbare koolhydraten. De DNA-base-samenstelling van de twee soorten komt overeen (44,7% G + C). De soorten worden op grond van de volgende kenmerken onderscheiden: de fermentatie-eindproducten (tabel 5) zijn verschillend (soort 4: azijnzuur; soort 5: azijnzuur, propionzuur en ethanol), de koolhydraten die worden gefermenteerd zijn verschillend (tabel 4) en soort 4 is atrich doch soort 5 heeft peritriche flagellen.

Identificatie

De soorten komen niet overeen met bekende clostridium-soorten.

Soort 6:

Morfologie

Gram-positieve (gram-labiele) slanke, spoelvormige staafjes die

sterk gelijken op soort 3. Subterminale sporen, die alleen *in vivo* worden gevormd. Geen flagellen.

Fysiologie

Vorming van zuur en een weinig gas uit koolhydraten (tabel 4). Gelatinase, indol en nitriet niet gevormd. H₂S gevormd. Eind pH in culturen met fermenteerbaar koolhydraat 5,5. Fermentatie-eindproducten azijnzuur en ethanol (tabel 5).

DNA-base-samenstelling

47,6% G + C.

Identificatie

Deze soort komt niet overeen met bekende clostridium-soorten.

Soort 7:

Morfologie

Deze soort lijkt sterk op de soorten 4 en 5 en bezit peritriche flagellen en subterminale sporen.

Fysiologie

Vorming van zuur doch niet van gas uit koolhydraten (tabel 4). Eind pH 6,3. Fermentatie-eindproduct: boterzuur (tabel 5).

DNA-base-samenstelling

41,2% G + C.

Identificatie

Deze soort komt niet overeen met bekende clostridium-soorten.

4.2. Invloed van de clostridia op het coecumgewicht

Het samenbrengen van zeven muizen met *E. coli* plus telkens één van de verschillende clostridium-soorten had als resultaat dat de micro-organismen onderling werden uitgewisseld en muizen ontstonden met een darmflora bestaande uit zeven clostridium-soorten en *E. coli*. Uit de gegevens van tabel 6 kan worden geconcludeerd dat de coecumgewichtspercentages in ex-kiemvrije muizen besmet met *E. coli* en zeven clostridium-soorten wel kleiner waren dan die van de kiemvrije controle-groep maar niet waren gedaald tot de conventionele waarden.

Bespreking van de resultaten

Van de zeven geïsoleerde soorten uit de darm van muizen met een clostridium-flora kwam slechts één en wel soort 1 overeen met een bekende clostridium-soort, nl. *Clostridium ramosum*. Dit micro-organisme werd geïsoleerd uit het coecum van ratten (Fitzgerald et al., 1965) en muizen (Wensinck & Ruseler-van Embden, 1971) en is ook gevonden in de humane darmflora (Holdeman et al., 1977). De andere 6 soorten behoren tot de "tapered rods", die domineren in de darmflora van muizen (Gordon & Dubos, 1971). Twee van deze werden reeds beschreven door Wensinck en Ruseler-van Embden (1971) en op de eigenschappen werd in deze studie dieper ingegaan. Voor zover bekend werden de andere soorten (4 - 7) nog niet beschreven. Het lijkt aannemelijk dat de gram-negatieve "tapered rods" die door anderen (bv. Syed, 1972) bij het geslacht *Fusobacterium* werden ondergebracht in feite clostridia waren. Ons onderzoek toont aan dat *in vitro* cultures te onbetrouwbaar zijn om het gram-karakter en de sporevorming van de "tapered rods" na te gaan. Het blijkt dat de identificatie van bepaalde anaeroben veel eenvoudiger zou zijn wanneer fundamentele eigenschappen zoals gram-karakter, morfologie en sporevorming bestudeerd werden in *in vivo* cultures. Het feit dat dan over kiemvrije of met *E. coli* besmette muizen moet kunnen worden beschikt is een onderdeel van deze methode.

Uit gegevens over de DNA-base-samenstelling van soorten die tot het geslacht *Clostridium* worden gerekend (zie bv. Bergey's Manual) kan onmiddellijk worden geconcludeerd dat sommige van deze soorten in dit geslacht niet thuishoren. Het G + C percentage van de meeste soorten ligt tussen 21 en 29 percent doch voor sommige wordt 40 tot 45 percent opgegeven. Van de bij ons onderzoek geïsoleerde soorten komt het G + C percentage van soort 1 overeen met het percentage dat voor *Cl. ramosum* wordt opgegeven. Het G + C percentage van drie andere soorten (4, 5 en 7) valt in het ook in Bergey genoemde gebied van 41 tot 44% en de drie overige soorten 2, 3 en 6 behoren kennelijk tot weer andere geslachten. Het is duidelijk dat de anaerobe sporevormers onmogelijk in slechts één geslacht, *Clostridium*, kunnen worden ondergebracht.

Uit het feit dat besmetting van monognotobionten met *E. coli* met de zeven anaerobe sporevormers slechts tot een gedeeltelijke coecumverkleining leidt (tabel 6) wordt de conclusie getrokken dat het samenstel van anaerobe sporevormers dat voor een volledige normalisatie van de darm

verantwoordelijk is, uit meer dan de 7 beschreven soorten moet bestaan. Er behoeft geen twijfel aan te bestaan dat de ontbrekende micro-organismen anaerobe sporevormers zijn want volledige normalisatie wordt tot stand gebracht door besmetting van monognotobionten met *E. coli* met coecuminhoud of faeces die zodanig zijn behandeld dat alleen sporevormers kunnen overleven (Hazenberg & Custers-van Lieshout, 1976). De gegevens van dit hoofdstuk zijn beschreven door Hazenberg et al. (1977).

H O O F D S T U K 5

BESMETTING VAN KIEMVRIJE MUIZEN MET EEN MENSELIJKE DARMFLOORA

Inleiding

De gegevens over de samenstelling van de menselijke darmflora variëren nogal sterk hetgeen grotendeels op rekening komt van verschillen in de toegepaste kweektechniek, met name de handhaving van anaerobiose en de aard der voedingsbodems. Deze verschillen komen onder meer tot uitdrukking in de totale aantallen anaeroben die men kweekt en men kan als norm stellen dat deze aantallen 10,0 tot 11,1 (\log_{10} van het aantal) per gram faeces moeten bedragen met mediane waarden van tenminste 10,6 (Gossling & Slack, 1974; Moore & Holdeman, 1974; Wensinck, 1976; Mitsuoka & Ohno, 1977). Algemeen wordt gevonden dat de totale aantallen aeroben aanzienlijk kleiner zijn en variëren van 6,0 tot 8,0 per gram faeces. Bij een globale inventarisatie van de flora vindt men dat ongeveer 90% wordt gevormd door anaerobe gram-negatieve en gram-positieve staafjes (behorende tot resp. *Bacteroides* en *Bifidobacterium* en *Eubacterium*) waarvan de aantallen ongeveer overeenkomen. Anaerobe kokken vormen een minderheid doch wanneer men van speciale voedingsbodems gebruik maakt kunnen hoge aantallen van bv. *Ruminococcus* worden gevonden (Moore, Cato & Holdeman, 1972; Herbeck & Bryant, 1974). De darmflora van de muis lijkt in het geheel niet op die van de mens daar zij overwegend bestaat uit zogenaamde "tapered rods" (Gordon & Dubos, 1971), die bij de mens niet worden aangetroffen. Deze autochtone flora ontwikkelt zich bij de muis onder natuurlijke omstandigheden en ook bij kiemvrije muizen wanneer zij aan besmetting vanuit de omgeving worden blootgesteld. Het doel van het huidige onderzoek was, na te gaan of kiemvrije

muizen met een menselijke darmflora konden worden besmet en of er een flora tot ontwikkeling komt die in grote trekken met die van de "donor" overeenstemt. Bij deze experimenten werd gebruik gemaakt van faeces van donoren waarvan de samenstelling van de darmflora verschillend was; één van de verschillen was de verhouding tussen het aantal anaerobe gram-negatieve staven en het totale aantal anaeroben. De autochtone flora van de muis is ervoor verantwoordelijk, dat het coecum klein blijft en niet meer dan ongeveer 1,5% van het totale lichaamsgewicht weegt. Van de autochtone flora zijn het de "tapered rods" (clostridia) die voor dit effect verantwoordelijk zijn (Hazenberg & Custers-van Lieshout, 1976). Deze "tapered anaerobes" oefenen eveneens een antagonistische werking uit op facultatief anaeroben zoals *Escherichia coli*. Nagegaan werd of reductie van het coecumgewicht ook plaatsvindt wanneer kiemvrije muizen met een menselijke darmflora worden besmet en of deze flora antagonistisch werkt op *E. coli*.

Materiaal en methoden

Voor de gebruikte materialen en toegepaste methoden wordt verwezen naar de paragrafen 2.1., 2.2., 2.3., 2.8., 2.10., 2.1.3. en 2.14. van Hoofdstuk 2.

Resultaten

5.1. Besmetting van kiemvrije muizen met menselijke faeces

Kiemvrije muizen werden besmet met suspensies van faeces van vier personen van wie de samenstelling van de darmflora (voor zover het de reeds genoemde hoofdgroepen van micro-organismen betreft) bekend was. De darmflora's van deze proefpersonen verschilden niet van elkaar in totale aantallen anaeroben maar wel in samenstelling. Proefpersonen 1 en 2 (gezonden) hadden lage percentages gram-negatieve staafjes en geen of bijna geen kokkoïde staafjes in tegenstelling tot proefpersonen 3 en 4 (patiënten met de ziekte van Crohn) die deze beide groepen in hogere aantallen in hun darmflora hadden ($P < 0,001$).

Uit de gegevens van tabel 7 kan worden geconcludeerd dat de totale aantallen anaeroben van de menselijke darmflora's in de muizen overeenkwamen met die van de proefpersonen. Ook de samenstelling van de flora's in de muis kwam in grote trekken die van de donors

overeen, waarbij het numerieke overwicht van de staafjes over de kokken en kokkoïde staafjes werd gehandhaafd.

De muizen met de darmflora van de gezonde proefpersonen (1 en 2) hadden een lager percentage gram-negatieve staven in hun flora dan de muizen met de flora's van Crohn-patiënten ($P < 0,01$).

De menselijke darmflora bleek zich over een periode van vijf weken in eenzelfde samenstelling te kunnen handhaven.

De aantallen aeroben in muizen met een menselijke darmflora werden niet in tabel 7 opgenomen daar deze evenals bij de proefpersonen zelf niet hoger waren dan 1% van het totale aantal bacteriën.

De menselijke darmflora was net als de conventionele darmflora in staat de ex-kiemvrije muizen te normaliseren. Het coecumgewicht als percentage van het lichaamsgewicht was niet hoger dan 2%; in kiemvrije muizen werd ongeveer 5% gevonden.

5.2. Besmetting van kiemvrije muizen met anaeroob gekweekte verdunningen van menselijke faeces

Uit de gegevens van tabel 8 kan worden geconcludeerd dat zich in de met anaeroob gekweekte verdunningen van menselijke faeces besmette kiemvrije muizen een darmflora ontwikkelde die wat betreft totale aantallen en procentuele samenstelling overeenkomsten had met die van de muizen besmet met de gehele menselijke faecale flora.

De coeca van de muizen met een anaerobe menselijke darmflora werden gereduceerd tot dezelfde normale waarden als de coeca van de muizen besmet met de gehele menselijke faecale flora. Zoals verwacht konden aeroben niet uit de faeces van de muizen met een anaerobe humane flora worden gekweekt.

5.3. Antagonistische werking van drie typen van anaerobe darmflora's in muizen t.o.v. *Escherichia coli*

Groepen kiemvrije muizen werden besmet met a) een clostridium-flora afkomstig van conventionele muizen, b) anaeroob gekweekte verdunningen van menselijke faeces en c) een menselijke anaerobe flora, de HDF flora. Daarna werd elke groep samengebracht met monognotobionten met *E. coli*. Na drie weken werd nagegaan in welke mate een uitwisseling van de flora's had plaatsgevonden. Met name werd nagegaan welke aantallen *E. coli* in muizen met een oorspronkelijke

anaerobe flora werden gevonden en ook of in monognotobionten het aantal *E. coli* door besmetting met anaeroben was afgenomen. Eveneens werd bepaald of de flora's het coecum reduceerden. Uit de gegevens van tabel 9 kan worden geconcludeerd dat de drie typen van anaerobe flora's een antagonistische werking hadden t.o.v. *E. coli* en de coecumgewichten tot normale waarden reduceerden. De antagonistische werking van de clostridium-flora en van de uit anaeroob gekweekte verdunningen van menselijke faeces verkregen flora was in staat, het aantal *E. coli* terug te dringen met een factor van meer dan 200 t.o.v. de monognotobionten met *E. coli*; de HDF flora was eveneens antagonistisch t.o.v. *E. coli* maar minder sterk dan de twee andere flora's (reductie van het aantal colibacteriën ongeveer 50 maal). De aantallen anaeroben in de coeca van muizen met de clostridium-flora lagen lager dan die in muizen met de beide humane flora's. De clostridium-soorten van deze murine flora zijn moeilijk te kweken; kwamen er kolonies op dan waren dit gram-negatieve "tapered rods" en *Clostridium ramosum*; zoals beschreven door Hazenberg et al. (1977).

5.4. Het verdringen van de menselijke darmflora in muizen door de autochtone darmflora

De in ex-kiemvrije muizen na besmetting met menselijke faeces ontstane "menselijke" darmflora werd door de darmflora van conventionele muizen verdrongen. Dit was aan te tonen door enkele muizen met een menselijke darmflora samen met conventionele muizen in een kooi te plaatsen. Als van de faeces van de muizen met een menselijke darmflora dagelijks gram-preparaten werden gemaakt dan zag men daarin na ongeveer 4 dagen de voor de conventionele muizen zo karakteristieke "tapered anaerobes" verschijnen. Na een week was de menselijke darmflora volledig verdrongen door de conventionele muizeflora. Nagegaan werd of de conventionele muizeflora ook in staat was, een menselijke darmflora die reeds van de geboorte af in de muizen aanwezig was, te verdringen. Een zwangere kiemvrije muis werd besmet met menselijke faeces. De jongen namen na de geboorte de menselijke flora van de moeder over. Na 8 weken werden 2 groepen van elk 5-jong-volwassen muizen in een kooi geplaatst met conventionele muizen van dezelfde leeftijd. Om de drie tot vier

dagen werd een standaardpreparaat van de faeces gemaakt.

Na drie weken waren in de standaardpreparaten de voor de menselijke darmflora kenmerkende gram-positieve staafjes en grote gram-positieve kokkotte staafjes verdwenen en werd het microscopisch beeld bepaald door de gram-positieve en gram-negatieve "tapered rods".

Voor het bij elkaar plaatsen van de twee groepen muizen werden de flora's anaerob gekweekt. In de menselijke flora werden hoge aantallen anaeroben gevonden met een samenstelling als die van de donor; van de conventionele flora konden op het voor "tapered anaerobes" ongeschikte medium slechts lage aantallen anaeroben worden gevonden.

Drie weken na het bij elkaar plaatsen van de 2 groepen muizen kon uit anaerobe culturen worden vastgesteld dat de menselijke flora was verdwenen en dat evenals uit de conventionele flora slechts relatief lage aantallen anaeroben werden gekweekt.

5.5. Besmetting van kiemvrije muizen met reinculturen van anaeroben uit de humane darmflora

Nagegaan werd of het mogelijk was, kiemvrije muizen te normaliseren met reinculturen van anaeroben uit de humane darmflora of met een clostridium-flora afkomstig van deze flora.

Verdunningen van menselijke faeces werden gekweekt op anaerobe media. De diverse kolonietypen werden afgeënt op hoge buizen die 2 x per week werden overgeënt. Op deze manier werden 11 verschillende anaerobe staven aangehouden, t.w. 9 gram-positieve staven en 2 gram-negatieve staven. Met deze reinculturen werden 11 monognotobionten met *E. coli* besmet. De *E. coli* diende om de redoxpotentiaal in de darm te verlagen waardoor de anaeroben gemakkelijker zouden aanslaan. Na één week werd nagegaan, zowel cultureel als d.m.v. gram-preparaten van faeces, of het anaerobe micro-organisme was aangeslagen. Dit bleek in alle 11 de gevallen zo te zijn. Hierna werden de 11 gnotobionten bij elkaar geplaatst. Na drie weken werden de aantallen *E. coli* en de coecumgewichtpercentages van de muizen met een flora van 11 anaeroben en *E. coli* bepaald. Uit de gegevens van tabel 10 kan worden geconcludeerd dat muizen met een dergelijke flora een klein coecum krijgen (alhoewel groter dan de

hiervoor beschreven muizen met een anaerobe humane flora (5.3.), maar dat er van antagonisme t.o.v. *E. coli* geen sprake is.

De experimenten werden voortgezet met 19 anaerobe stammen geïsoleerd uit humane faeces. Deze werden i.t.t. de anaeroben van het vorige experiment aangehouden op anaerobe flessen. De anaeroben bestonden uit 10 stammen van gram-positieve en 9 van gram-negatieve staven. Het experiment werd op gelijke wijze uitgevoerd. Uit de gegevens van tabel 10 kan worden geconcludeerd dat de resultaten voor de normalisatie van het coecumgewicht iets ongunstiger en voor het antagonisme wat gunstiger waren dan het vorige experiment met de 11 anaeroben. Besmetting van een combinatie van de twee flora's (in totaal 30 anaerobe stammen) resulteerde niet in een lager coecumgewicht of sterker antagonisme t.o.v. *E. coli*. Uit deze experimenten moet worden geconcludeerd dat besmetting van kiemvrije muizen met een groot aantal humane anaerobe reïnculturen niet leidt tot een normalisatie die vergelijkbaar is met die door de totale anaerobe humane flora (5.3.).

Vervolgens werd nagegaan welke effecten besmetting met clostridia uit menselijke faeces op coecumgewicht en coli-antagonisme had. Menselijke faeces werd behandeld met ethanol (2.4.2.) en 1000 maal verdund. In de suspensie konden aerobe sporevormers niet worden aangetoond. Ex-kiemvrije muizen met *E. coli* werden besmet met deze suspensie en het bleek op grond van anaerobe culturen en gram-preparaten van de faeces dat zich een complexe anaerobe flora ontwikkelde. Uit de gegevens van tabel 10 kan worden geconcludeerd dat de muizen door de flora een klein coecum kregen en een beperkt antagonisme t.o.v. *E. coli*.

Als laatste werden alle drie de beschreven flora's gecombineerd door muizen bij elkaar te plaatsen. Deze flora bestaande uit 30 anaeroben, een groep clostridia en *E. coli* normaliseerde de muizen-coeca en had een antagonisme t.o.v. *E. coli* dat echter aanzienlijk geringer was dan dat van de hiervoor beschreven anaerobe humane flora (5.3.).

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat de humane anaerobe flora met normaliserende eigenschappen een complexe samenstelling heeft, daar zelfs een grote groep van geïsoleerde stammen waaronder ook clostridia niet een effect heeft dat even krachtig is als dat van de totale anaerobe flora.

Bespreking van de resultaten

De totale aantallen anaeroben per gram darminhoud van de muis met een menselijke darmflora komen overeen met aantallen die voor de menselijke darmflora worden opgegeven (Gossling & Slack, 1974; Moore & Holdeman, 1974; Wensinck, 1976; Mitsuoka & Ohno, 1977).

Muizen besmet met faeces of met anaeroben gekweekt uit de menselijke faeces hebben een darmflora waarvan de samenstelling over een periode van vijf weken in grote trekken constant blijft. De opbouw van de flora van deze muizen is globaal conform die van de donor.

Hoewel de anaerobe menselijke flora zich uitstekend in kiemvrije muizen kan handhaven en fysiologisch vele eigenschappen heeft van de autochtone murine flora, treft men de menselijke flora nooit aan in conventionele muizen. De autochtone darmflora van muizen verdringt de menselijke flora in muizen in zeer korte tijd, ook wanneer deze flora vanaf de geboorte in de muis aanwezig is. Klaarblijkelijk heeft elke diersoort een voorkeur voor zijn autochtone flora, waarvan de samenstelling mogelijk door een genetische predispositie wordt bepaald (Berg & Savage, 1975). Het feit dat anaeroben van de menselijke darmflora een kiemvrije muis volledig kunnen normaliseren biedt voordelen. Het is mogelijk, patiënten die om welke reden dan ook geheel worden gedecontamineerd, voor beëindiging van de steriele verpleging te besmetten met een uit anaeroben bestaande menselijke darmflora die reconventionaliserende eigenschappen heeft (Van der Waaij et al., 1977). Dit kan als resultaat hebben dat 1) storingen in darmfuncties zoals diarree en te geringe darmpéristaltiek verdwijnen (Abrams & Bishop, 1967; Gordon & Pesti, 1971; Guiot & Van Furth, 1977), 2) door de antagonistische werking van de anaerobe flora infectiegevaar wordt verminderd en 3) het afweersysteem door de anaerobe flora in belangrijke mate kan worden gestimuleerd (Gordon & Pesti, 1971).

Reconventionalisatie van gedecontamineerde patiënten gebeurt in Nederland met een in muizen opgeslagen anaerobe flora, de HDF flora (Van der Waaij et al., 1977). Deze darmflora werd verkregen door kiemvrije muizen te besmetten met menselijke faeces, waarin van de facultatieve anaeroben alleen *E. coli* aanwezig was. Het bleek dat de dieren *E. coli* verloren tijdens de isolatie (Vossen & Van der Waaij, 1973). Wird deze methode door ons toegepast dan bleek dat wanneer kiemvrije muizen werden besmet met humane faeces in alle gevallen een flora ontstond waarin fa-

cultatieve anaeroben blijvend aanwezig waren.

De door ons beschreven selectie van de anaerobe humane flora met conventionaliserende eigenschappen heeft als voordeel dat elke humane faecale flora hiervoor als uitgangsmateriaal kan dienen (mits het aantal facultatieve anaeroben niet al te hoog is). Voor reconventionalisatie kan de anaerobe flora eventueel afkomstig zijn van de patiënt zelf. Omdat gastheer en micro-organismen aan elkaar zijn geadapteerd o.a. door een grotere tolerantie voor de residente flora dan voor niet-residenten (Berg & Savage, 1975), kan het toedienen van de eigen anaerobe darmflora de voorkeur verdienen boven het aanbieden van een vreemde flora al is die van een soortgenoot.

Voor de reconventionalisatie van patiënten zal behoefte gaan bestaan aan een gestandaardiseerde humane darmflora samengesteld uit geïdentificeerde soorten. De anaeroben waaruit deze flora bestaat kunnen als vriesdroogstammen aangehouden worden zodat altijd over een flora beschikt kan worden waarvan de samenstelling bekend is. Uit het hier beschreven onderzoek bleek dat het isoleren van een aantal stammen uit de humane flora niet resulteerde in een flora met normaliserende eigenschappen. Moore et al. (1978) gaven op dat 70% van de humane flora bestaat uit ongeveer 20 soorten terwijl de overige 30% is samengesteld uit 400 soorten. Daar de vele pogingen die zijn verricht om normalisatie met mengsels van reïnculturen te verkrijgen nooit een bevredigend resultaat hebben opgeleverd, zal men niet anders kunnen doen dan met flora's van grotendeels onbekende samenstelling werken.

H O O F D S T U K 6

HET GEDRAG VAN DE HUMANE DARMFLOORA IN MUIZEN MET EEN VERLAAGDE WEERSTAND

Inleiding

Patiënten met maligne aandoeningen zijn vaak gevoeliger voor infecties, enerzijds door de ziekte zelf, anderzijds door de anti-neoplastische therapie (Bodey, 1975). Bij patiënten met een acute leukemie bleek neutropenie en/of granulocytopenie (o.a. door behandeling) direkt te zijn gecorreleerd met een verhoogde kans op infectie met gram-negatieve staven zoals *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* en *Escherichia coli* (Bodey, 1975; Grose et al., 1978; EORTC, 1978; Hahn et al., 1978; Schimpff & Aisner, 1978; Winston et al., 1978). De micro-organismen die deze infecties veroorzaakten zijn voornamelijk afkomstig uit de residente flora, waarbij opgemerkt wordt dat veel verwekkers pas in het ziekenhuis tot deze flora gaan behoren (Hahn et al., 1978; Schimpff et al., 1972). Infecties vanuit de residente flora kunnen worden voorkomen door de patiënten volledig te decontamineren en daarna geïsoleerd en steriel te verplegen (Dankert et al., 1978). Een andere procedure is, de potentieel pathogene aerobe bacteriën en gisten selectief uit de residente flora te elimineren waarbij de anaerobe flora zoveel mogelijk wordt gespaard (Guiot & Van Furth, 1977; EORTC (protocol), 1978). Het voordeel van de laatste methode t.o.v. totale decontaminatie is dat de anaerobe flora die blijft bestaan de vestiging van potentieel pathogene micro-organismen kan verhinderen waardoor de kans op infectie vermindert (Van der Waaij et al., 1977). Van der Waaij et al. (1971) noemden deze invloed van de darmflora de kolonisatie-resistentie (zie ook inleiding van hoofdstuk 3). In het geval van volledige decontaminatie zal het de bedoeling zijn, de patiënt aan het einde van de behandeling te reconventionaliseren met een niet ziekte-verwekkende humane (anaerobe)

darmflora. Hierdoor kan worden voorkomen dat geconditioneerd pathogenen zich in grote aantallen in de darm vestigen; de diarree, een van de complicaties van decontaminatie, kan verdwijnen. Reconventionalisatie is niet nodig na selectieve decontaminatie. Wel bestaat de mogelijkheid dat de patiënt tijdens de therapie toch besmet en geïnfecteerd raakt met een geconditioneerd pathogene bacterie. Om de infectie snel te bestrijden kan het nodig zijn antibiotica te gebruiken die de anaerobe flora en daarmee de kolonisatie-resistentie ongunstig kunnen beïnvloeden. Repopulatie met een anaerobe flora kan dit effect ongedaan maken. Een anaerobe flora met conventionaliserende eigenschappen werd beschreven door Vossen en Van der Waaij (1973). Deze zgn. HDF flora werd gebruikt voor conventionalisatie (Van der Waaij, 1977) en wordt aangehouden in kiemvrije muizen. De methode van Dietrich en Fliedner (1973) waarbij eerst stammen van anaeroben werden gegeven en daarna een complete humane flora had als bezwaar dat van de anaeroben niet bekend was of ze normaliserende eigenschappen hadden (hetgeen op grond van onze waarnemingen onwaarschijnlijk is, zie hoofdstuk 5) en dat van de complete flora niet bekend was of zij geconditioneerd pathogenen bevatte. Raibaud et al. (1975) reconventionaliseerden geïsoleerd-verpleegde kinderen 10 dagen na de geboorte met een humane flora opgeslagen in ex-kiemvrije muizen. Deze flora bevatte diverse aeroben en van antagonisme van de flora t.o.v. deze aeroben was geen sprake. Op ons laboratorium werden kiemvrije muizen besmet met een humane anaerobe darmflora en deze flora had een normaliserend effect. De methode van kweken en in kiemvrije muizen overbrengen van de humane anaerobe darmflora had als voordelen dat ze reproduceerbaar was waardoor na onbedoelde besmetting vrij gemakkelijk een nieuwe kolonie muizen met een anaerobe humane darmflora kon worden opgezet en dat de samenstelling van de flora globaal als die van de donor was. Als een dergelijke anaerobe darmflora wordt gebruikt voor reconventionalisatie van patiënten dan moet ze wel (evenals de HDF flora) worden getest op ziekmakend vermogen.

In de hier beschreven experimenten is gekozen voor twee modellen waarin de weerstand van muizen werd verlaagd nl. door toedienen van een immuunsuppressieve stof (azathioprine) of door totale lichaamsbestraling. In deze modellen werd nagegaan wat het effect was van de aanwezigheid of het toedienen van een anaerobe humane flora of een complete humane flora op de overleving van de muizen. Eveneens werd de door de anaerobe flora

veroorzaakte kolonisatie-resistentie tegen *Pseudomonas aeruginosa* bij muizen met een verlaagde weerstand onderzocht.

Materiaal en methoden

Voor de gebruikte materialen en toegepaste methoden wordt verwezen naar de paragrafen 2.1., 2.2., 2.6., 2.8., 2.13. en 2.14. van Hoofdstuk 2.

Resultaten

6.1. Weerstandsverlaging van conventionele muizen door azathioprine

Of de weerstandsverlaging van conventionele muizen door azathioprine het beoogde doel had, nl. verhoogde gevoeligheid voor infecties met gram-negatieve staven werd nagegaan m.b.v. *Pseudomonas aeruginosa*, Wahba's type 14 (afkomstig van R.J. Jones MRC, Industrial Injuries and Burns Research Unit, Birmingham). Deze stam was destijds gebleken invasief te zijn bij letaal bestraalde muizen (F. Wensinck, persoonlijke mededeling). De besmetting geschiedde met een neuswat daar pseudomonas-bacteriëmieën bij muizen hun oorsprong hebben in de nasofarynx (Wensinck, 1961).

Negen groepen van twaalf muizen kregen azathioprine in een concentratie van respectievelijk 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 en 1,0 gram per liter drinkwater gedurende 10 dagen aangeboden. Hierna werden ze op de neus besmet met een pseudomonas-suspensie die 8,0 (\log_{10} van het aantal) bacteriën per ml bevatte. De sterfte gedurende 1 week werd nagegaan. Uit de gegevens van figuur 2 blijkt dat de sterfte per groep lineair correleerde met de opgenomen dosis azathioprine (lineaire regressiecoëfficiënt 0,91 en $P = 0,01$). De opgenomen dosis werd berekend uit de hoeveelheid per groep opgenomen drinkwater en de concentratie azathioprine. Wel moet worden opgemerkt dat naarmate de concentratie azathioprine groter was de dieren minder dronken.

Uit dit experiment kan worden geconcludeerd dat de gebruikte pseudomonas-stam invasief is en geschikt om de weerstandsverlaging aan te tonen terwijl de mate van weerstandsverlaging afhangt van de opgenomen hoeveelheid azathioprine.

Eveneens werd nagegaan of groepen muizen waaraan eenzelfde concentratie azathioprine werd verstrekt een vergelijkbare dosis azathioprine opnamen. Hiertoe kregen vijf groepen van twaalf muizen

azathioprine in een concentratie van 0,8 gram per liter gedurende 10 dagen aangeboden. Het bleek dat de groepen in deze periode 525, 534, 546, 563 en 577 mg per kg lichaamsgewicht hadden opgenomen. Dit betekende een gemiddelde van 549 mg met een variatie-coëfficiënt van 3,8%. Uit dit experiment kan worden geconcludeerd dat muizen van eenzelfde leeftijdsklasse in een bepaalde periode ongeveer dezelfde hoeveelheid azathioprine opnemen.

6.2. Overleving van met azathioprine behandelde kiemvrije muizen na contact met muizen met een anaerobe humane darmflora, met complete humane darmflora's en met *Pseudomonas aeruginosa*

Zeven groepen van 12 kiemvrije muizen kregen azathioprine in het drinkwater toegediend (1 g/l) om de weerstand te verlagen. Na 10 dagen hadden de dieren ca. 1000 mg per kg opgenomen (een veel hogere dosis dan de onder 6.1. genoemde conventionele muizen bij eenzelfde concentratie hadden opgenomen, veroorzaakt door het feit dat kiemvrije muizen veel meer drinken dan conventionele dieren). Hierna werden de groepen in contact gebracht met twee muizen met darmflora's van de hieronder aangegeven samenstelling:

<u>Groep kiemvrije muizen</u> <u>(azathioprine)</u>	<u>Flora bijgeplaatste muizen</u>
A	kiemvrij
B	anaerobe humane flora van donor 1
C	complete " " " " 1
D	" " " " " 2
E	" " " " " 3
F	" " " " " 4
G	monognotobionten met <i>Ps. aeruginosa</i>

In alle groepen (A t/m G) werd nagegaan hoeveel overlevende dieren er waren na vijf dagen contact met de diverse flora's, terwijl de azathioprine-toediening voortduurde.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 11. Uit de gegevens van deze tabel kan allereerst worden geconcludeerd dat de weerstand door azathioprine sterk was verlaagd. Alle kiemvrije muizen besmet met *Ps. aeruginosa* (groep G) stierven in vijf dagen aan een sepsis

met dit micro-organisme terwijl in de kiemvrij gebleven groep (A) slechts één muis doodging. De overleving in de 2 groepen verschilde significant van elkaar ($P < 0,002$) (N.B. Bij niet met azathioprine behandelde kiemvrije muizen is *Ps. aeruginosa* niet invasief). Wanneer de resultaten met de flora's van de vier donoren worden vergeleken, dan blijkt dat de flora van donor 1 (groep B en C) vrijwel niet doch die van de donor 2, 3 en 4 (groepen D, E en F) wel tot sterfte aanleiding geven. In deze groepen werd uit het hartebloed *E. coli* of *Kl. pneumoniae* gekweekt doch anaeroben werden niet geïsoleerd.

Uit deze experimenten blijkt dat de invasiviteit van de in de muis opgeslagen humane darmflora's van vier donoren verschillend is; de flora van één donor is niet en die van drie donoren wel invasief.

6.3. Overleving van met azathioprine behandelde kiemvrije muizen en muizen met een anaerobe humane darmflora na besmetting met *Pseudomonas aeruginosa*

Zoals uit de experimenten onder 6.2. is gebleken is *Ps. aeruginosa* bij kiemvrije muizen met een verlaagde weerstand door azathioprine invasief en veroorzaakt een hoge sterfte. De vraag is in hoeverre die ook plaatsvindt als een humane anaerobe flora aanwezig is en of de aantallen micro-organismen waarmee wordt besmet van invloed zijn. Dit werd nagegaan door twee groepen van twaalf kiemvrije en drie groepen van twaalf muizen met een anaerobe humane flora azathioprine met het drinkwater te verstrekken. In een periode van 10 tot 13 dagen hadden alle groepen 550 mg per kg opgenomen (met het feit dat kiemvrije muizen meer drinken dan conventionele werd rekening gehouden door de concentratie azathioprine in het drinkwater aan te passen). Daarna werden de kiemvrije muizen op de neus met een laag aantal en de muizen met de anaerobe humane flora met een laag en een hoog aantal pseudomonas-bacteriën besmet en na vier dagen werd de overleving bepaald.

De resultaten zijn vermeld in tabel 12. Uit deze tabel blijkt ten eerste dat de dosis azathioprine bij de controle-groepen (kiemvrije muizen en muizen met een humane flora die niet met *Pseudomonas* werden besmet) niet tot sterfte leidde. Bij besmetting met 3,5 pseudomonas-bacteriën (laag aantal) was er een groot verschil in

de overleving van kiemvrije muizen en muizen met een anaerobe humane flora ($P < 0,002$). De beschermende werking van de anaerobe humane flora was duidelijk minder sterk wanneer de dieren met een hoger aantal (7,5) bacteriën werden besmet ($P = 0,05$).

De overlevende dieren werden onderzocht op de aanwezigheid van *Pseudomonas* in de faeces. Bij de 11 overlevende dieren uit groep C werd *Pseudomonas* niet aangetroffen doch bij de dieren die met een groot aantal bacteriën waren besmet (groep D) werd *Pseudomonas* in alle faecesmonsters aangetoond.

Uit deze experimenten blijkt, dat de anaerobe humane darmflora in de muis in staat is, een beperkt aantal geconditioneerd pathogenen - in dit geval *Pseudomonas aeruginosa* - te elimineren onder condities waarin de weerstand van de gastheer kunstmatig sterk is verminderd.

6.4. Kolonisatie-resistentie door de anaerobe humane flora tegen *Pseudomonas aeruginosa*

Zoals uit de experimenten onder 6.3. bleek, is de humane anaerobe flora in staat, een beperkt aantal van een geconditioneerd pathogeen micro-organisme zoals *Pseudomonas aeruginosa* te elimineren. De mate van de kolonisatie-resistentie van de humane flora tegen dit micro-organisme werd nagegaan en vergeleken met die van kiemvrije muizen. Hiertoe werden groepen van vier kiemvrije muizen of muizen met een anaerobe humane darmflora besmet met aantallen *Pseudomonas aeruginosa* variërend van 2 tot 8. Daarna werd na vier en na zes dagen nagegaan of dit micro-organisme uit de faeces kon worden gekweekt.

Uit de gegevens van tabel 13 kan worden geconcludeerd dat de muizen met een anaerobe humane darmflora een aanzienlijke kolonisatie-resistentie tegen *Ps. aeruginosa* bezaten. Slechts een enkel dier raakte besmet, ook als een onverdunde cultuur werd gebruikt die 8,3 bacteriën per ml bevatte; in tegenstelling daarmee werden kiemvrije muizen, ook door lage aantallen, alle besmet. In de faeces van de 3 muizen (1 uit groep G, 1 uit groep H en 1 uit groep K) met een anaerobe flora die besmet raakten met *Pseudomonas* bereikte deze slechts aantallen van 4,0 tot 5,0 per gram, terwijl dat aantal in de besmet geraakte 15 kiemvrije muizen (3 uit groep A en

alle uit groep B, C en D) ongeveer 8,0 per gram faeces was. Uit dit laatste blijkt dat er naast een koloniatie-resistentie ook een sterke antagonistische werking van de anaerobe humane flora bestond.

Bij de kiemvrije muizen en de muizen met een anaerobe humane flora was, als *Ps. aeruginosa* uit de faeces werd gekweekt, dit micro-organisme ook in de nasofarynx aanwezig. Uit andere experimenten is gebleken dat na besmetting met *Ps. aeruginosa* d.m.v. een maagsonde of door een neuswat eenzelfde kolonisatie-resistentie werd gevonden. Als bij muizen met een anaerobe humane darmflora die met een neuswat werden besmet *Ps. aeruginosa* niet in de faeces werd gevonden dan was ook de nasofarynx negatief en omgekeerd.

Werd een uitstrijk uit de nasofarynx van de muizen met een anaerobe darmflora anaerob gekweekt dan bleek dat een complexe residentie keelflora aanwezig was. Mogelijk verhindert deze keelflora de vestiging van *Ps. aeruginosa* die bij kiemvrije muizen zo gemakkelijk plaatsvindt.

Ook op andere plaatsen bv. op de huid en in de vagina bleken zich bij muizen met een anaerobe humane darmflora anaeroben te bevinden.

6.5. Overleving van bestraalde muizen met een complete en een anaerobe humane flora

Uit de resultaten beschreven onder 6.2. (zie tabel 11) blijkt dat de complete en de anaerobe flora van donor 1 vrijwel niet tot sterfte leidden bij muizen met een door azathioprine verlaagde weerstand. Nagegaan werd, welke resultaten werden verkregen indien de weerstand van muizen met deze flora's door bestraling werd verminderd.

Hiertoe werden twee groepen van 12 muizen, één met een complete en de andere met een anaerobe humane flora van donor 1, blootgesteld aan een totale lichaamsbestraling met 6,5 Gy (= 650 rad) (Wensinck (1961) vond dat een dosis van 6,7 Gy de weerstand van CBA muizen zo verlaagde dat na besmetting op de neus met *Ps. aeruginosa* alle dieren in 3 dagen stierven). De overleving werd geregistreerd en het hartebloed van de gestorven dieren werd gekweekt. Alle muizen met een complete flora stierven in een periode van 14 dagen en bij alle dieren werden bacteriën uit het bloed gekweekt. *E. coli* werd

7 maal en streptokokkensoorten werden 9 maal geïsoleerd. Alle muizen met een anaerobe humane flora waren 14 dagen na bestraling nog in leven. Uit deze experimenten blijkt dat de anaerobe humane flora niet tot sepsis leidt wanneer de weerstand tegen infecties door een totale lichaamsbestraling zodanig is verlaagd dat sepsis door geconditioneerd facultatief anaerobe pathogenen onherroepelijk optreedt. Bovendien blijkt, als we de resultaten van 6.5. en 6.2. vergelijken, dat bij muizen bestraling een veel zwaardere beschadiging van de weerstand geeft dan het toedienen van azathioprine.

Bespreking van de resultaten

Zoals in de inleiding is opgemerkt is het noodzakelijk, een flora die men voor reconvalescentie van patiënten wil gebruiken, te testen op ziekmakend vermogen. In het hier beschreven onderzoek is dit gedaan met muizen waarvan de weerstand met azathioprine of door bestraling is verlaagd. Van de laatste methode is bekend dat deze voor dit doel bruikbaar is (Van der Waaij et al., 1978), de eerste is hiervoor niet eerder gebruikt. Uit de onder 6.1. beschreven resultaten is gebleken dat azathioprine de weerstand van conventionele muizen verlaagt hetgeen met een invasief micro-organisme als *Pseudomonas aeruginosa* kan worden aangetoond. Deze bevindingen komen voor een deel overeen met die van Otterness & Chang (1976) en van Scheetz et al. (1977). De eersten vonden dat bij BALB/c muizen de humorale en de cellulaire immunrespons volledig werd onderdrukt door 800 mg/kg azathioprine, toegediend in 10 dagen. De tweede groep constateerde dat HD4 muizen die in 10 dagen totaal 1000 mg azathioprine per kg kregen toegediend alle stierven na besmetting met *Pseudomonas aeruginosa*.

Uit het in 6.2. beschreven onderzoek blijkt dat 3 van de 4 complete humane flora's facultatieve anaeroben bevatten die bij muizen na weerstandsverlaging door azathioprine sepsis veroorzaken. Uit het hartebloed werden gram-negatieve staven zoals *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae* gekweekt. De enige complete humane flora die voor met azathioprine behandelde muizen niet ziekmakend was bleek dit wel te zijn voor bestraalde muizen (6.5.) en bevatte *E. coli* en streptokokken die invasief waren. De anaerobe flora van deze donor was voor muizen met een door bestraling of door azathioprine verlaagde weerstand niet ziekmakend en sepsis door anaeroben werden niet gevonden.

Gesteld kan worden dat muizen met een anaerobe humane darmflora na verlaagde weerstand een betere levensverwachting hebben dan muizen met een complete flora. Het bezit van een anaerobe humane flora biedt nog andere voordelen dan alleen de afwezigheid van potentieel pathogene micro-organismen. Uit onze studie blijkt dat de aanwezigheid van een dergelijke flora ook de kans op besmetting en/of sepsis door een invasief micro-organisme als *Pseudomonas* sterk vermindert (kolonisatie-resistentie), ook als de weerstand is verlaagd. Vond besmetting plaats dan verhinderde het antagonisme van de anaerobe humane flora dat dit micro-organisme hoge aantallen in de darm van de muizen bereikte. Dit betekent dat kolonisatie-resistentie en het antagonisme van een flora eigenschappen zijn die niet los van elkaar gezien kunnen worden: geen kolonisatie-resistentie dan ook geen antagonisme en omgekeerd.

Het zal duidelijk zijn dat met de door ons ontwikkelde methode (hoofdstuk 5) een anaerobe humane flora kan worden verkregen die geschikt is voor reconventionalisatie van patiënten. De flora werkt normaliserend, is niet ziekmakend en verhindert kolonisatie door geconditioneerd pathogene micro-organismen. Ook voor deze humane flora geldt echter, zoals trouwens ook voor andere zoals de HDF flora, dat de samenstelling slechts ten dele bekend is.

H O O F D S T U K 7

DE INVLOED VAN SULFASALAZINE (SALAZOPYRINE) OP DE MENSELIJKE DARMFLOORA EN OP DE HUMANE FLORA IN DE MUIS

Inleiding

Sulfasalazine (SASP) bleek van waarde te zijn bij de behandeling van patiënten met colitis ulcerosa; de perioden van remissie werden aanzienlijk verlengd (Cowan, 1977; Goldstein et al., 1975). In een "multicentre trial" (1977) kon een gunstige werking van SASP bij Crohn-patiënten niet worden aangetoond. Ook een literatuuroverzicht over 10 jaar klinische resultaten door Bárány (1976) maakte niet duidelijk of de stof een gunstig effect heeft op de ziekte van Crohn. Van Tongeren en Eekhout (1976) en Singleton (1977) vonden dat SASP wel effectief was hoewel de resultaten over een lange periode tegenvielen. Het werkingsmechanisme van SASP is onbekend. Men neemt in ieder geval aan dat de splitsing van de verbinding (reductie van een azo-groep) door darmbacteriën in sulfapyridine (SP) en 5-aminosalicylzuur (5-ASA) essentieel is. Hierdoor komen deze twee stoffen in het colon vrij. Worden SP en 5-ASA afzonderlijk gegeven dan vindt resorptie proximaal in de dunne darm plaats (Van Hees et al., 1976; Peppercorn & Goldman, 1972; Pieniaszek & Bates, 1976; Schröder & Gustafsson, 1973; West et al., 1974).

Aan beide splitsingsproducten werd therapeutische waarde toegeschreven, de laatste jaren vooral aan het 5-ASA. Azad Khan (1977) toonde bij patiënten aan dat 5-ASA de therapeutische werkzame verbinding is en dat SP alleen als drager fungeert. Sharon et al. (1978) vond in rectumbioten van patiënten met colitis ulcerosa een verhoogde productie van prostaglandine E_2 waarvan de werking werd geremd door 5-ASA en ook enig-

zins door SP. Gunstige invloed van 5-ASA op de ontstekingsreacties door remming van de prostaglandine-productie werd ook beschreven door Gould en Lennard-Jones (1976).

Hoult en Moore (1978) toonden daarentegen bij konijnneweefsel *in vitro* en ratten *in vivo* aan dat SASP het prostaglandine 15-hydroxydehydrogenase van het colon remt waardoor de inactivering van prostaglandines wordt verminderd. 5-ASA en SP hadden deze werking niet. Zij meenden dat bij patiënten met colitis ulcerosa de therapeutische werking van SASP op deze verminderde inactivering berust; ulcera veroorzaakt door een remming van de prostaglandine-synthese door salicylaten kunnen worden voorkomen door het anti-inflammatoire carbenoxolon, dat evenals SASP deze deficiëntie opheft.

Een antibacteriële werking van 5-ASA werd niet beschreven hoewel deze verbinding stereo-isomeer is met 4-aminosalicylzuur (PAS), dat bacteriostatisch werkt op mycobacteriën daar het een antagonist is van de foliumzuursynthese. De invloed van het SASP op de darmflora werd onderzocht door Cooke (1969) en West et al. (1974). Cooke vond geen steun voor de hypothese dat de werking van de stof bij colitis ulcerosa-patiënten berust op een antibacteriële werking van het SP-deel. West en medewerkers toonden aan dat SASP (of het SP-deel) bij colitis ulcerosa en Crohn-patiënten de aantallen clostridia, gram-negatieve aerobe staven en niet-sporulerende anaeroben verlaagde hoewel hier niet uit werd geconcludeerd dat dit de verklaring was van het gunstige effect. Voor beide studies geldt dat de anaerobe techniek gebrekkig was.

Hoewel dus over het werkingsmechanisme van SASP weinig duidelijkheid bestaat is dit anders gesteld met de nevenwerkingen. Het blijkt dat dit geneesmiddel niet zonder gevaar is, zeker daar het vaak in hoge doses en zeer langdurig wordt toegediend. In veel studies (Cowan et al., 1977; Bates et al., 1977; Das & Eastwood, 1975; Schröder & Campbell, 1972) wordt erop gewezen dat na splitsing van SASP in de darm het SP wordt geresorbeerd, in de lever wordt geacetyleerd en gehydroxyleerd en daarna wordt uitgescheiden met de urine. De snelheid waarmee deze acetylering plaatsvindt verschilt van individu tot individu. Worden bij een patiënt plasmaspiegels van SP gevonden die groter zijn dan 50 µg per ml dan heeft men te maken met een "langzame acetyleerder" en zijn bijverschijnselen te verwachten. Schröder en Price Evans (1972) gaven als bijverschijnselen misselijkheid, hoofdpijn en buikpijn op. Van Hees et al.

(1979) toonden aan dat bij 19 van 36 patiënten met Crohn of colitis ulcerosa die 4 tot 6 gram SASP gebruikten, hemolyse plaatsvond bij een hoge SP-spiegel in het serum en bij 4 een hemolytische anemie bestond met een serumspiegel hoger dan 55 µg SP per ml. In een overzichtsartikel van Das en Dubin (1976) over de farmakinetiek van SASP worden de bijwerkingen van SP uitgebreid besproken. Over nevenwerkingen van het 5-ASA deel van SASP wordt in de literatuur niet gesproken alhoewel deze van het stereo-isomere 4-ASA (PAS) wel bekend zijn. De in de Antibiotica-Fibel (1975) opgegeven bijverschijnselen van PAS komen voor een deel overeen met die welke door SP worden veroorzaakt. Het zou mogelijk kunnen zijn dat wat nu als bijwerking door gebruik van SASP op het conto van SP wordt geschreven in werkelijkheid wordt veroorzaakt door 5-ASA al wordt volgens Das en Dubin (1976) maar 30% van de verbinding gere-sorbeerd.

Ons onderzoek had tot doel, de invloed van SASP en van de splitsings-producten SP en 5-ASA op de humane darmflora na te gaan door de flora-samenstelling te bepalen bij patiënten met colitis ulcerosa die SASP gebruiken. Hun flora werd vergeleken met die van gezonde proefpersonen. Voorts werd nagegaan of langdurig gebruik van SASP leidt tot resistentie van de flora tegen SASP en SP. Door Cooke et al. (1974) werd beschre-dat *E. coli* afkomstig van patiënten die SASP gebruiken vrijwel altijd resistent was tegen SP terwijl dat bij gezonde proefpersonen veel minder frequent voorkwam. Gegevens over resistentie van de anaerobe flora tegen SP of SASP door gebruik van SASP zijn in de literatuur niet beschikbaar. Door ons werd tevens onderzocht of de aerobe flora door gebruik van SASP resistent werd tegen een sulfonamide dat in de kliniek veel wordt gebruikt. De keuze viel op sulfamethoxazole (SM) dat een belangrijk bestanddeel is van Bactrimel (Roche), Eusaprim (Wellcome) en Sulfotrim (Gea).

Omdat wij over muizen met een humane darmflora (hoofdstuk 5) kunnen beschikken waarvan de samenstelling over een lange periode constant bleef, werd een onderzoek verricht naar de invloed van SASP op de humane flora in een proefdiermodel. Hiermee werden individuele verschillen, verschillen in voeding en andere fen- en genotypische invloeden, die een onderzoek naar verschillen in de samenstelling van de darmflora van de mens zo ingewikkeld maken, uitgesloten.

Materiaal en methoden

Voor de gebruikte materialen en toegepaste methoden wordt verwezen naar de paragrafen 2.1., 2.2., 2.3., 2.7., 2.8., 2.11., 2.12., 2.13. en 2.14. van Hoofdstuk 2.

Resultaten

7.1. Invloed van SASP, SP en 5-ASA op het aantal kweekbare anaeroben uit de faeces van gezonde proefpersonen en van patiënten met colitis ulcerosa die SASP gebruiken

Faecesmonsters van gezonde proefpersonen en van patiënten met colitis ulcerosa die SASP gebruiken werden gekweekt op anaerobe media waarin zich SASP, SP of 5-ASA bevond en nagegaan werd of deze stoffen de groei van anaeroben beïnvloedden. De gegevens van deze bepalingen zijn weergegeven in tabel 14. Zij tonen duidelijk aan dat de groei van anaeroben bij de gezonde proefpersonen door SASP en SP sterk werd geremd doch door 5-ASA in het geheel niet. De anaerobe flora's van de patiënten werden niet geremd door SP en 5-ASA doch wel door SASP alhoewel minder dan die van de gezonde proefpersonen. Het feit, dat resistentie door het gebruik van SASP was ontstaan kon worden verklaard door de hoeveelheden SP die in de faeces van de patiënten aanwezig waren. Bij de gebruikers 1, 2 en 3 werd resp. 500, 200 en 1500 µg SP per gram faeces gevonden (mediaan van 3 bepalingen). De totale aantallen van de flora van gezonden en van de SASP gebruikers verschilden niet.

7.2. Gevoeligheid voor sulfapyridine (SP) en sulfamethoxazole (SM) van aeroben uit de darmflora van gezonde proefpersonen en patiënten met colitis ulcerosa die SASP gebruiken

In aansluiting op de vorige experimenten werd nagegaan of door gebruik van SASP ook het aerobe deel van de darmflora resistent wordt tegen SP. Daarbij werd eveneens resistentie tegen sulfamethoxazole (SM) getest. Dit laatste chemotherapeuticum wordt in combinatie met trimethoprim in de kliniek gebruikt o.a. voor de bestrijding van urineweginfecties. Verdunningen van de faeces van de gezonde proefpersonen en de patiënten uit de vorige proefopstelling werden aerob gekweekt op een isosensitest agar (Oxoid) met daarin SP of SM in de volgende concentraties: 25, 50, 100, 150 en 500

µg per ml. Na bepaling van het kolonie-type en het gram-karakter werden de verschillende micro-organismen afgeënt. De reïnculturen werden geïdentificeerd en de MIC werd bepaald. De gegevens van deze bepaling zijn weergegeven in tabel 15. Hieruit blijkt dat *E. coli* uit de darmflora van SASP gebruikers resistent was voor zowel SP als SM; bij de drie gezonden was *E. coli* gevoelig. Bij de gezonde proefpersoon 3 werd naast de gevoelige ook een ongevoelige (hemolytische) *E. coli* aangetroffen. De streptokokken waren zowel bij gezonde proefpersonen als bij de SASP gebruikers deels gevoelig en deels ongevoelig. De concentratie SP die zich ten tijde van de isolatie in de faeces van de 3 SASP gebruikers bevond was resp. 670, 240 en 390 µg per gram hetgeen in ieder geval ruim voldoende is om resistentie te verklaren.

7.3. Invloed van SASP op de humane darmflora in muizen

De samenstelling van de darmflora van muizen met een complete humane flora werd vóór en op verschillende dagen ná het begin van SASP toediening met het drinkwater bepaald. De concentratie was 2 gram per liter en de muizen namen ongeveer 200 mg per kg per dag op (maximale dosis voor een volwassene persoon is 100 mg/kg/dag). De resultaten zijn weergegeven in figuur 3. Hieruit blijkt dat de totale aantallen anaeroben en aeroben niet veranderen door het toedienen van SASP, te beginnen op dag 3. Opvallend was dat de totale aantallen aeroben nogal varieëerden (10 x was geen uitzondering) doch de aantallen anaeroben vrijwel niet.

Werd de samenstelling van de flora bepaald aan de hand van het hierin voorkomende percentage gram-negatieve staven (voornamelijk bacteroides en fusobacterium-soorten) t.o.v. het totale aantal anaeroben dan werd vóór het toedienen van SASP percentages van 50 tot 59 (mediaan 54) gevonden (5 bepalingen) en erná 54 tot 62 (mediaan 55, 9 bepalingen) en deze percentages verschillen uiteraard niet. De invloed van SASP op de samenstelling van de flora is dus, wat het percentage gram-negatieve staven betreft, nihil.

Het anaerobe deel van de darmflora van de muizen werd vóór en ná het toedienen van SASP onderzocht op resistentie tegen SASP, SP en 5-ASA. De resultaten zijn weergegeven in tabel 16. Zoals te verwachten, had 5-ASA geen invloed op de darmflora. De anaerobe flora

was vóór het toedienen van SASP voor meer dan 50% gevoelig voor SASP en SP. Door het gebruik van SASP werden de anaeroben resistent zowel voor SASP ($P < 0,005$) als voor SP ($P < 0,01$), alhoewel de indruk bestond dat de flora ongevoeliger werd voor SP dan voor SASP.

De streptokokken-soorten van de aerobe flora waren zowel vóór als ná het toedienen van SASP ongevoelig voor SP (MIC $> 500 \mu\text{g/ml}$). *E. coli* was ook na het verstrekken van SASP gevoelig voor SP (MIC $< 25 \mu\text{g/ml}$).

Een volledige resistentie voor SP zoals bij colitis ulcerosa-patiënten voorkwam werd niet gevonden, ook niet wanneer na 2 maanden SASP-gebruik de resistentie nogmaals werd bepaald. Werd in het coecum en de faeces van de muizen de concentratie SP bepaald dan bleek deze gering te zijn (in vergelijking met colitis ulcerosa-patiënten) nl. resp. 190 en 110 μg per gram (mediaan van 3 bepalingen), vermoedelijk wordt een groot deel van het SASP voor het coecum geresorbeerd.

Omdat het verstrekken van 2 gram SASP per liter drinkwater aan muizen met een complete humane flora geen volledige resistentie van de flora voor SP tot gevolg had werd het effect van 3 gram SASP per liter nagegaan. Een probleem hierbij was dat deze muizen de geconcentreerde SASP-oplossing nauwelijks dronken. Dit werd ondervangen door kiemvrije muizen, waarvan de drinkbehoefte groter is, deze dosis SASP te verstrekken en daarna de dieren te besmetten met een humane darmflora. De mate van resistentie van de flora voor SP en SASP werd gedurende een tiental weken bepaald. De muizen namen in deze periode 300 mg SASP per kg per dag op. De methode heeft als nadeel dat niet voor en na toedienen van SASP de verschillen in samenstelling van de flora kunnen worden bepaald.

De resultaten zijn weergegeven in figuur 4. Hieruit blijkt dat na vier weken slechts 10% van de anaerobe flora gevoelig was voor SP. De gevoeligheid van de flora voor SASP nam niet af.

De totale aantallen anaeroben werden door deze hoge dosis SASP niet beïnvloed en lagen in een gebied van 10,3 tot 11,0 per gram faeces (nat gewicht) met een mediaan van 10,9.

Werd de samenstelling van de flora bepaald aan de hand van het hierin voorkomende percentage gram-negatieve staven dan werd een

verandering door SASP niet gevonden (de percentages lagen in de 10 weken tussen de 50 en 60 met een mediaan van 53).

De aerobe flora, die alleen uit streptokokken-soorten bestond, was vanaf het begin ongevoelig voor SP (MIC > 500 µg/ml).

In het coecum werd 400 µg SP per gram inhoud gevonden (mediaan van drie bepalingen) hetgeen dus duidelijk meer is dan in het experiment met 2 g SASP en voldoende is om de resistentie te verklaren.

Bespreking van de resultaten

Uit ons onderzoek naar de samenstelling van de faecale flora van patiënten met colitis ulcerosa die SASP gebruiken is gebleken dat hun flora globaal overeenkomt met die van gezonde proefpersonen. Een opvallend verschil is echter dat de anaeroben (die het grootste deel van de flora vormen) geheel ongevoelig zijn voor SP terwijl de anaerobe flora van gezonde proefpersonen voor 50% werd geremd door SP. Dit bevestigt de bevindingen van Wüst en Wilkins (1978) die vonden dat 58% van 144 anaerobe humane stammen gevoelig waren voor SM en waarschijnlijk dus ook voor SP. *E. coli* van de aerobe flora van patiënten die SASP gebruiken bleken eveneens resistent tegen SP. Dit werd reeds beschreven door Cooke et al. (1974), die echter niet wezen op het feit dat deze gram-negatieve staven ook ongevoelig waren voor een sulfonamide als SM, dat in combinatie met trimethoprim vaak wordt gebruikt voor de behandeling van urineweginfecties. Het lijkt dan ook raadzaam om zich bij gebruik van SASP te realiseren dat infecties veroorzaakt door darmresidenten niet met sulfonamides kunnen worden bestreden. Ook uit de experimenten met de muizen met een humane flora bleek duidelijk dat de samenstelling van de darmflora niet wordt beïnvloed door een hoog SASP-gebruik. Het enige gevolg van het toedienen van een zeer hoge dosis SASP was dat de anaerobe flora resistent werd tegen SP. De flora werd in mindere mate ongevoelig voor SASP. Een verklaring voor dit feit zou kunnen zijn dat de darmflora van coecum en colon niet in contact komt met SASP omdat dit vrijwel direct door deze flora wordt gereduceerd tot SP en 5-ASA. Geconcludeerd kan worden dat van de antibacteriële eigenschap van SP een therapeutische werking niet kan worden verwacht omdat de residente flora, waar deze stof in hoge concentraties aanwezig is, snel resistent wordt. Er kan dus van het SP deel van SASP niets positiefs worden gezegd. Het verdient dan ook aanbeveling, onderzoek te doen naar een ver-

binding die wel het 5-ASA bevat dat waarschijnlijk wel van therapeutisch belang is maar niet het SP dat behalve voor het ontstaan van resistentie ook voor een aantal bijwerkingen van SASP verantwoordelijk is (Azad Khan et a., 1977). Deze verbinding moet dan wel zo worden samengesteld, dat ze pas in het colon wordt gesplitst, liefst door de reducerende werking van de darmflora, omdat dan een gelijkmatige dosering op de plaats van het ziekteproces mag worden verwacht.

Tabel 1. Coecumgewicht van kiemvrije en conventionele muizen en van kiemvrije muizen die waren besmet met faecessuspensies van conventionele muizen

Type en aantal muizen	Behandeling faecessuspensie	Coecumgewicht ^{x)}
kiemvrij 12		4,8 (3,0 - 5,6)
conventioneel 20		1,3 (0,8 - 1,8)
conventioneel met 8 kiemvrij dieet		1,4 (0,9 - 1,8)
kiemvrij besmet 20	30 min. op 60°C	1,7 (1,4 - 2,7)
kiemvrij besmet 7	ethanol 80%, 4 uur	1,3 (0,8 - 1,8)
kiemvrij besmet 7	ethanol, met aceton gedroogd	1,4 (1,0 - 1,9)

x) Mediaan en bereik van het percentage van het lichaamsgewicht.

Coecumgewichten werden 3 weken na besmetting bepaald.

Tabel 2. Coecumgewicht van paren van kiemvrije muizen besmet met faeces-suspensies die met ethanol waren behandeld en een klein aantal sporen bevatten

<u>Nummer van de suspensie (kooi) x)</u>	<u>Coecumgewicht xx)</u>
1	4,7 ; 4,3
6	4,5 ; 3,0
13	3,2 ; 2,8
5	3,3 ; 2,5
9	2,8 ; -
14	3,0 ; 2,5
8	2,8 ; 2,3
4	2,5 ; 2,2
10	2,3 ; 2,0
12	2,1 ; 2,0
2	2,1 ; -
16	2,2 ; 1,6
7	2,0 ; -
3	1,8
15	1,7
11	1,7

x) Gerangschikt naar het gemiddelde coecumgewicht van elk paar.

xx) Als percentage van het lichaamsgewicht, twee weken na besmetting bepaald. -: niet bepaald.

Tabel 3. Coecumgewicht en aantallen *E. coli* in de darm van muizen met verschillende typen darmflora, drie weken na het bij elkaar plaatsen van twee groepen

<u>Type flora</u>	<u>Aantal bij elkaar geplaatste muizen</u>	<u><i>E. coli</i>^{x)}</u>	<u>Coecumgewicht^{xx)}</u>
clostridium-flora <i>E. coli</i>	6 } 6	6 (1)	1,4 (1,0 - 1,8)
CRF flora <i>E. coli</i>	6 } 6	6 (1)	1,2 (0,9 - 1,5)
conventionele flora <i>E. coli</i>	6 } 6	5 (1)	1,3 (0,8 - 1,9)
<i>E. coli</i>	12	10 (1)	4,8 (3,0 - 5,6)

x) \log_{10} van het aantal per gram coecuminhoud. Standaarddeviatie tussen haakjes.

xx) Mediaan en bereik van het percentage van het lichaamsgewicht.

Tabel 4. Fermentatie van koolhydraten door 7 murine *Clostridium*-soorten

<i>Clostridium</i> -soort	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
arabinose	-	+	+	+	-	+	+
xylose	-	+	+	+	-	+	+
fructose	-	+	+	+	-	+	-
galactose	-	+	+	+	+	+	+
glucose	+	+	+	+	+	+	-
mannose	+	-	+	-	-	+	-
cellobiose	-	+	-	-	-	+	-
lactose	+	-	-	+	-	+	-
maltose	-	+	-	-	+	+	+
saccharose	+	-	-	+	-	+	-
trehalose	-	-	-	-	-	+	-
melezitose	-	-	-	-	-	-	-
raffinose	+	+	-	-	-	+	+
amylium	-	-	-	-	-	-	-
erythritol	-	-	-	-	-	-	-
glycerol	-	-	-	-	-	-	-
mannitol	-	+	-	+	-	+	-
sorbitol	-	+	-	+	-	-	-
amygdaline	-	-	-	-	-	+	-
esculine	+	-	+	+	-	+	-
salicine	+	+	-	-	-	+	-

+ = produktie van zuur.

- = pH minder dan een eenheid lager dan van het beënte medium zonder substraat.

Tabel 5. Fermentatie-eindprodukten van de 7 murine *Clostridium*-soorten

<i>Clostridium</i> -soort	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
Fermentatie-eind- produkten (mM/l)							
mierezuur	9	-	-	-	-	-	-
azijnzuur	6	1	6	16	10	28	1
propionzuur	-	-	-	-	14	-	-
i-boterzuur	-	-	-	-	-	-	-
n-boterzuur	-	13	30	-	6	-	13
i-valeriaanzuur	-	-	-	-	4	-	-
L-melkzuur	10	-	-	1,2	-	-	-
D-melkzuur	-	-	-	-	-	-	-
pyrodruivezuur	0,6	1,4	-	-	-	-	-
ethanol	7	-	-	-	21	18	-
butanol	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 6. Coecumgewichten van monognotobionten met *Escherichia coli*, ex-kiemvrije muizen met zeven *Clostridium*-soorten plus *E. coli* en conventionele muizen

<u>Type muis</u>	<u>Aantal dieren</u>	<u>Coecumgewicht^{x)}</u>
monognotobionten met <i>E. coli</i>	13	4,8 (3,0 - 5,6)
ex-kiemvrije muizen met <i>E. coli</i> en 7 <i>Clostridium</i> -soorten:		
groep 1	15	2,1 (1,7 - 3,4)
groep 2	11	1,7 (1,2 - 2,5)
groep 3	14	2,7 (1,6 - 3,1)
groep 4	12	2,7 (1,6 - 4,2)
conventionele muizen	20	1,3 (0,8 - 1,8)

x) Mediaan en bereik van de coecumgewichten als percentages van de lichaamsgewichten. De coecumgewichten van de besmette kiemvrije muizen werden twee weken na de besmetting bepaald. Het experiment werd vier maal verricht (groepen 1 - 4).

Tabel 7. Darmflora en coecumgewicht van kiemvrije muizen na besmetting met menselijke faeces

<u>Proefpersonen^{x)}</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
totale aantallen bacteriën	10,92	10,63	10,94	10,84
% gram-neg. staafjes	39	37	72	76
% gram-pos. staafjes	48	55	20	15
% kokken	10	6	5	5
% kokkoïde staafjes	1	<1	5	5
 <u>Muizen^{xx)}</u>				
<u>3 weken na besmetting</u>				
totale aantallen bacteriën	10,76	10,84	10,71	10,86
% gram-neg. staafjes	49	58	69	76
% gram-pos. staafjes	46	45	25	18
% kokken	3	0	0	0
% kokkoïde staafjes	2	7	6	6
coecumgewicht	1,7	1,5	1,5	1,2
<u>4 weken na besmetting</u>				
totale aantallen bacteriën	10,79	10,89	11,08	10,84
% gram-neg. staafjes	48	66	73	73
% gram-pos. staafjes	47	31	20	22
% kokken	3	0	1	0
% kokkoïde staafjes	2	3	6	5
coecumgewicht	1,9	1,6	1,5	1,5
<u>5 weken na besmetting</u>				
totale aantallen bacteriën	10,81	10,82	10,77	10,92
% gram-neg. staafjes	42	60	63	67
% gram-pos. staafjes	53	23	31	32
% kokken	2	2	0	0
% kokkoïde staafjes	3	15	6	1
coecumgewicht	1,9	1,9	1,9	1,5

x) Totale aantallen als \log_{10} van de mediaan van de aantallen per gram faeces in 5 monsters; % gram-neg. en gram-pos. staafjes, kokken en kokkoïde staafjes als mediaan van de percentages in 5 monsters.

xx) Aantal muizen per groep resp. 4 (proefpersoon 1) en 5 (proefpersoon 2, 3 en 4). Totale aantallen als \log_{10} van het aantal per g coecuminhoud (coeca van elke groep muizen zijn gepooled). Coecumgewicht als mediane waarde van de percentages van het lichaamsgewicht van resp. 4 en 5 muizen.

Tabel 8. Flora en gewicht van het coecum van kiemvrije muizen na besmetting met menselijke faeces en daaruit gekweekte anaeroben

	<u>Besmetting met</u>	
	<u>Faeces</u>	<u>Anaeroben uit faeces</u>
<u>3 weken na besmetting^{x)}</u>		
totale aantal anaeroob	10,72	10,87
% gram-negatieve staafjes	47	54
% gram-positieve staafjes	40	39
% kokken	4	5
% kokkoïde staafjes	9	2
coecumgewicht	1,6 (1,2 - 1,9)	1,5 (1,4 - 1,7)
<u>5 weken na besmetting^{x)}</u>		
totale aantal anaeroob	10,45	10,80
% gram-negatieve staafjes	56	60
% gram-positieve staafjes	34	29
% kokken	3	4
% kokkoïde staafjes	7	7
coecumgewicht	1,7 (1,3 - 2,0)	1,5 (1,3 - 1,7)

x) Vijf muizen in elk van de vier groepen. Totale aantallen als \log_{10} van het aantal per gram coecuminhoud (coeca gepooled). Coecumgewicht als mediaan met bereik van het percentage van het lichaamsgewicht van vijf muizen.

Tabel 9. De antagonistische werking van drie typen van anaerobe darmflora's t.o.v. *Escherichia coli*

Type muis ^{x)}	Aantal	<i>E. coli</i> ^{xx)}	3 weken na contact A - B, A - C en A - D		
			<i>E. coli</i> ^{xx)}	Anaeroob totaal ^{xx)}	Coecumgewicht ^{xxx)}
A	5	9,61	7,23	9,38	1,6 (1,3 - 1,8)
B	9	<4,00	7,04	9,19	1,6 (0,9 - 1,8)
A	6	9,59	7,28	10,78	1,8 (1,2 - 2,3)
C	7	<4,00	6,97	10,68	1,8 (1,7 - 2,1)
A	10	9,66	7,96	10,97	1,7 (1,3 - 2,1)
D	8	<4,00	8,04	11,00	1,8 (1,6 - 2,0)

x) A = monognotobionten met *E. coli*

B = muizen met een clostridium-flora

C = muizen met een flora van anaeroben uit menselijke faeces

D = muizen met de HDF flora

xx) Aantallen *E. coli* en anaeroben als log₁₀ per g coecuminhoud.

xxx) Mediaan en bereik van coecumgewicht als percentage van het lichaamsgewicht.

Tabel 10. Normaliserende eigenschappen van 3 groepen anaeroben uit de humane darmflora na besmetting van kiemvrije muizen

Type muis ^{x)}	Aantal muizen	<i>E. coli</i> ^{xxx)}	Anaeroob totaal ^{xxx)}	Coecumgewicht ^{xx)}
A	11	9,69	10,88	2,0 (1,2 - 2,6)
B	19	8,81	10,82	2,2 (2,0 - 2,5)
C	11	8,64	10,56	1,6 (1,3 - 2,0)
A + B	6	8,86	10,57	1,9 (1,7 - 2,2)
A + B + C	8	8,51	10,52	1,7 (1,5 - 2,6)

x) A = muizen met *E. coli* en 11 anaeroben

B = muizen met *E. coli* en 19 anaeroben

C = muizen met een humane clostridium-flora

xx) Mediaan en bereik van coecumgewicht als percentage van lichaamsgewicht.

xxx) Aantallen *E. coli* en anaeroben als \log_{10} per g coecuminhoud.

Tabel 11. Overleving van met azathioprine behandelde kiemvrije muizen na contact met een anaerobe humane darmflora, met complete humane darmflora's en met *Pseudomonas aeruginosa*

<u>Groep^{x)}</u>	<u>Type flora</u>	<u>Overleving^{xx)}</u>
A	kiemvrij	11/12
B	anaerobe humane flora 1	12/12
C	complete humane flora 1	11/12
D	complete humane flora 2	6/12
E	complete humane flora 3	6/12
F	complete humane flora 4	7/12
G	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/12

x) Alle muizen kregen gedurende 10 dagen voorafgaande aan de besmetting in totaal 1000 mg azathioprine per kg met het drinkwater toegediend. Elke groep bestond uit 12 muizen.

xx) Aantal overlevende muizen, 5 dagen na besmetting.

Tabel 12. Overleving van met azathioprine behandelde kiemvrije muizen en muizen met een anaerobe humane darmflora na besmetting met *Pseudomonas aeruginosa*

<u>Groep^{x)}</u>	<u>Type flora</u>	<u><i>Ps. aeruginosa</i>^{xx)}</u>	<u>Overleving^{xxx)}</u>
A	kiemvrij	-	12/12
B	kiemvrij	3,5	1/12
C	anaerobe humane flora	3,5	11/12
D	anaerobe humane flora	7,5	5/12
E	anaerobe humane flora	-	12/12

x) Alle muizen kregen gedurende 10 tot 13 dagen voorafgaande aan de besmetting met *Ps. aeruginosa* in totaal 550 mg azathioprine per kg met het drinkwater toegediend. Elke groep bestond uit 12 muizen.

xx) \log_{10} van het toegediende aantal.

xxx) Aantal overlevende muizen, 4 dagen na besmetting met *Ps. aeruginosa* in de faeces.

Tabel 13. *Pseudomonas aeruginosa* in de faeces van kiemvrije muizen en muizen met een anaerobe humane flora na besmetting met *Pseudomonas* per maagsonde

Groep ^{x)}	Type flora	Aantal	<i>Pseudomonas</i> in faeces ^{xxx)}	
		<i>Ps. aer.</i> ^{xx)}	3 dagen	6 dagen
A	kiemvrij	2	3/4	3/4
B	"	3	4/4	4/4
C	"	4	4/4	4/4
D	"	5	4/4	4/4
E	anaerobe humane flora	2	0/4	0/4
F	" " "	3	0/4	0/4
G	" " "	4	0/4	1/4
H	" " "	5	0/4	1/4
I	" " "	6	0/4	0/4
J	" " "	7	0/4	0/4
K	" " "	8	0/4	1/4

x) Elke groep bestond uit 4 muizen.

xx) Log_{10} van het toegediende aantal.

xxx) Aan positieve muizen per groep.

Tabel 14. De invloed van sulfasalazine (SASP), sulfapyridine (SP) en 5-aminosalicylzuur (5-ASA) op het totale aantal anaeroben kweekbaar uit faeces van gezonden en van patiënten met colitis ulcerosa die SASP gebruiken

	<u>Percentage remming door toevoeging aan het medium van</u>							
	<u>Totaal anaeroob^{x)}</u>		<u>SASP^{xx)}</u>		<u>SP^{xx)}</u>		<u>5-ASA^{xx)}</u>	
<u>Gezonden</u>	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>
1	10,70	10,38 - 10,98	68	50 tot 78	58	33 tot 66	0	-8 tot 1
2	10,58	10,35 - 10,70	78	74 tot 83	43	36 tot 69	11	-2 tot 30
3	10,42	10,14 - 10,84	51	14 tot 73	41	29 tot 69	6	-28 tot 41
<u>Patiënten</u>								
1 (6 g/d)	10,33	10,17 - 10,44	32	-4 tot 45	0	-9 tot 3	0	-9 tot 19
2 (4 g/d)	10,78	10,61 - 10,92	21	12 tot 31	2	-2 tot 28	-2	-18 tot 31
3 (5 g/d)	10,62	10,53 - 10,76	18	12 tot 49	-2	-8 tot 45	-7	-15 tot 5

x) \log_{10} van de aantallen per gram faeces (nat gewicht) van tenminste vier monsters van verschillende dagen in duplo bepaald.

xx) De concentratie SASP, SP en 5-ASA in de media was $3,75 \times 10^{-3}$ M.

Tabel 15. Gevoeligheid voor sulfapyridine (SP) en sulfamethoxazol (SM) van aeroben uit de darmflora van gezonden en patiënten met colitis ulcerosa die SASP gebruiken

<u>Gezonden</u>	<u>Soort en aantallen^{x)}</u>	<u>MIC^{xx)}</u>	
		<u>SP</u>	<u>SM</u>
1	<i>E. coli</i> 5,4	< 25	< 25
	<i>Str. faecalis</i> 5,6	< 25	< 25
	<i>Streptococcus sp.</i> 4,7	> 500	> 500
2	<i>E. coli</i> 4,3	50	< 25
	<i>Str. faecalis</i> 5,3	< 25	< 25
	<i>Streptococcus sp.</i> 5,0	> 500	> 500
3	<i>E. coli</i> 7,2	< 25	< 25
	<i>E. coli</i> 6,1	> 500	> 500
<u>Patiënten</u>			
1 (6 g/d)	<i>E. coli</i> 5,6	> 500	> 500
	<i>Streptococcus sp.</i> 6,2	> 500	100
	<i>Streptococcus sp.</i> 6,8	50	100
2 (4 g/d)	<i>E. coli</i> 6,4	> 500	> 500
	<i>Str. faecalis</i> 5,3	< 25	< 25
3 (5 g/d)	<i>E. coli</i> 4,2	> 500	> 500

x) Log₁₀ van de aantallen per gram faeces.

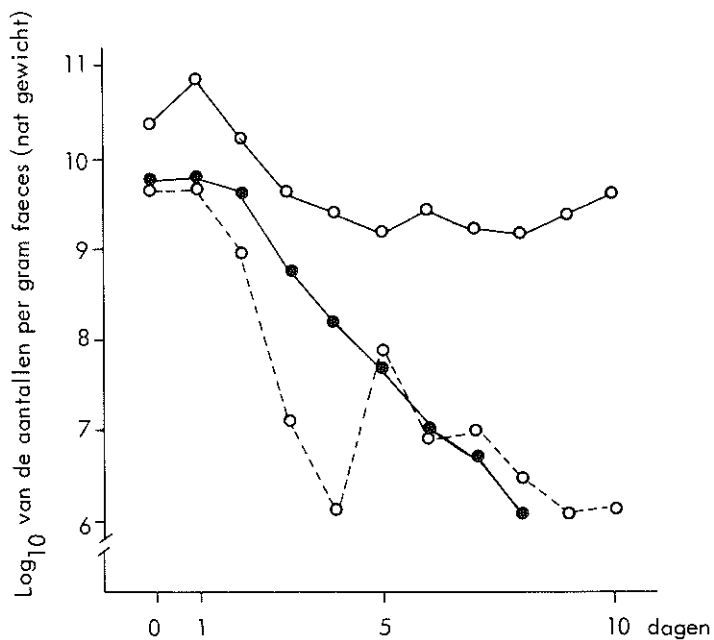
xx) MIC in µg per ml; de concentraties waarmee werd getest waren 25, 50, 100, 150 en 500.

Tabel 16. De invloed van sulfasalazine (SASP), sulfapyridine (SP) en 5-aminosalicylzuur (5-ASA) op de humane darmflora in muizen voor en tijdens het toedienen van SASP

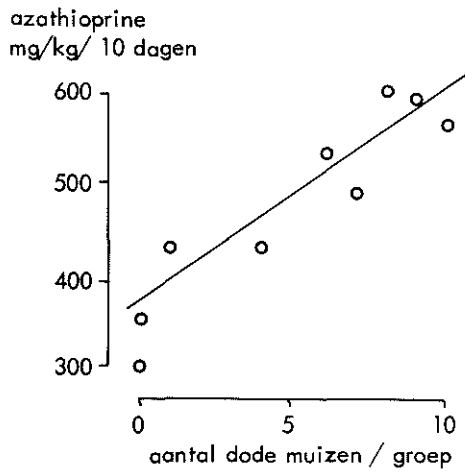
	<u>Percentage remming door toevoegen aan het medium van</u>							
	<u>Totaal anaeroob^{x)}</u>		<u>SASP^{xx)}</u>		<u>SP^{xx)}</u>		<u>5-ASA^{xx)}</u>	
	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>	<u>Mediaan</u>	<u>Bereik</u>
voor SASP	10,95	10,77 - 11,03	60	53 tot 76	55	47 tot 56	8	-2 tot 25
tijdens SASP	10,89	10,73 - 10,98	39	35 tot 48	25	-3 tot 47	-2	-8 tot 21

x) \log_{10} van de aantallen per gram faeces (nat gewicht) van tenminste vijf monsters.

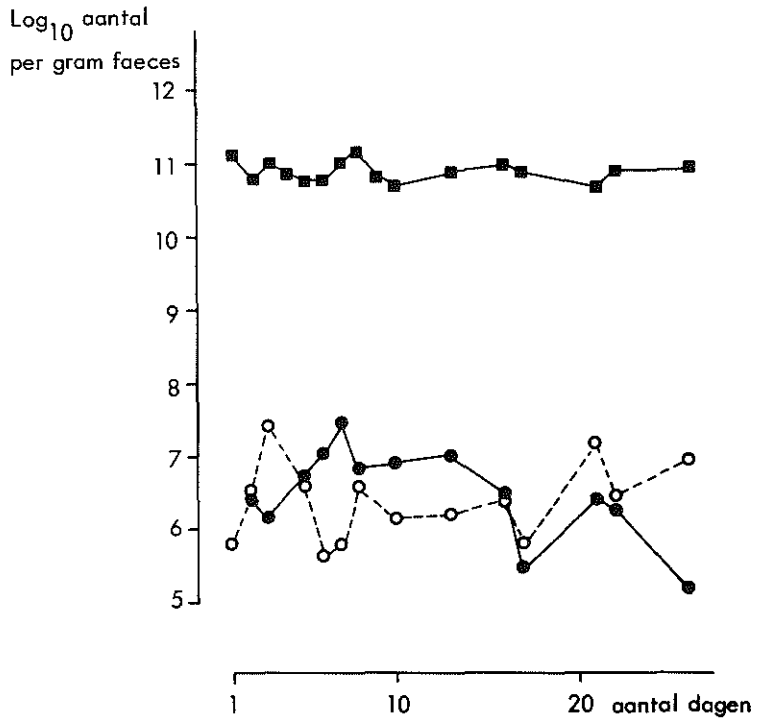
xx) De concentratie SASP, SP en 5-ASA in de media was $3,75 \times 10^{-3}$ M.



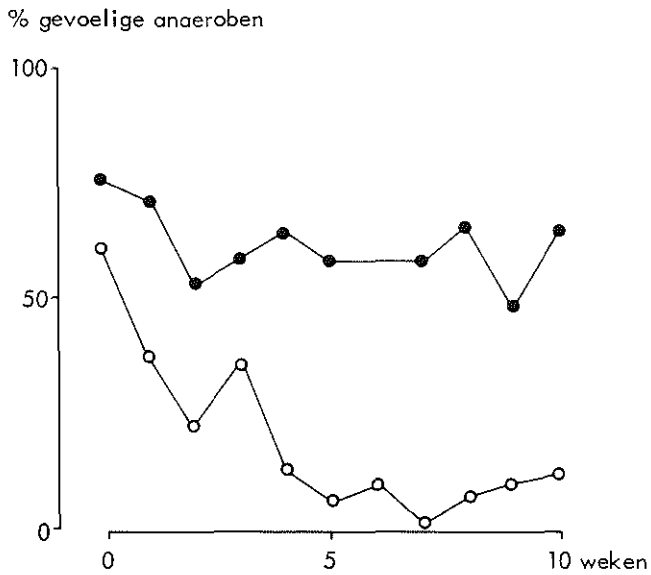
Figuur 1. Antagonisme van een clostridium-flora t.o.v. *E. coli* (o---o), een *Eubacterium* soort (●—●) en *Bacteroides fragilis* (o—o).
 De monognotobionten werden op dag 0 bij muizen met een clostridium-flora geplaatst.



Figuur 2. Verband tussen sterfte door besmetting met *Pseudomonas aeruginosa* en opgenomen hoeveelheid azathioprine in 9 groepen van 12 conventionele muizen.



Figuur 3. Invloed van sulfasalazine (2 g/l drinkwater) op de aantallen anaeroben (■—■), aerobe grampositieve kokken (○---○) en aerobe gramnegatieve staven (●—●) in de faecale flora van muizen met een humane darmflora. De sulfasalazine-toediening begon op dag 3.



Figuur 4. De gevoeligheid van anaeroben uit de humane darmflora van muizen voor sulfapyridine (○—○) en sulfasalazine (●—●) bij toediening van sulfasalazine gedurende een periode van 10 weken (3 g/l drinkwater).

LITERATUUR

- Abrams, G.D. & Bishop, J.E. (1967). Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 126, 301 - 304.
- Antibiotica Fibel (1975). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Azad Khan, A.K., Piris, J. & Truelove, S.C. (1977). An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. The Lancet 2-11, 892 - 895.
- Bárány, F.R. (1976). Salazosulphapyridine in the treatment of Crohn's disease. In: The management of Crohn's disease, p. 172 - 174, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Bates, T.R., Blumenthal, H.P. & Pieniaszek, H.J. (1977). Salivary excretion and pharmacokinetics of sulfapyridine after sulfasalazine. Clinical Pharmacology and Therapeutics 22, 917 - 927.
- Bauchop, T. (1977). Fore gut fermentation. In: Microbial Ecology of the Gut, p. 223 - 248, Academic Press, London.
- Benardi, G. (1971). Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite columns. In: Methods in enzymology 21, p. 95 - 139. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Academic Press, New York.
- Berg, R.D. & Savage, D.C. (1975). Immune response of specific pathogen-free and gnotobiotic mice to antigens of indigenous and nonindigenous micro-organisms. Infection and Immunity 11, 320 - 329.
- Bodey, G.P. (1975). Infections in cancer patients. Cancer Treatment Reviews 2, 89 - 128.
- Bratton, A.C. & Marshall, E.K. (1939). A new coupling component for sulfanilamide determination. Journal of Biological Chemistry 128, 537 - 550.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Carlsson, J. (1973). Simplified gas chromatographic procedure for identification of bacterial metabolic products. Applied Microbiology 25, 287 - 289.
- Celesk, R.A., Asano, T. & Wagner, M. (1976). The size, pH and redox potential of the cecum in mice associated with various microbial floras (39187). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 151, 260 - 263.

- Clarke, R.T.J. (1977). The gut and its micro-organisms. In: Microbial Ecology of the Gut, p. 36 - 65, Academic Press, London.
- Coates, M.E. & Fuller, R. (1977). The gnotobiotic animal in the study of gut microbiology. In: Medical Ecology of the Gut, p. 311 - 342, Academic Press, London.
- Cooke, E.M. (1969). Faecal flora of patients with ulcerative colitis during treatment with salicylazosulphapyridine. Gut 10, 565 - 568.
- Cooke, E.M., Ewins, S.P., Hywel-Jones, J. & Lennard-Jones, J.E. (1974). Properties of strains of *Escherichia coli* carried in different phases of ulcerative colitis. Gut 15, 143 - 146.
- Cowan, G., Das, K.M. & Eastwood, M.A. (1977). Further studies of sulphasalazine metabolism in the treatment of ulcerative colitis. British Medical Journal 2, 1057 - 1059.
- Czok, R. & Lamprecht, W. (1970). Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-Phosphat. In: Methoden der enzymatischen Analyse, p. 1407 - 1411, H.U. Bergmeyer Verlag Chemie, Weinheim.
- Dankert, J., Gaus, W., Gaya, H., Krieger, D., Linzenmeier, D. & Van der Waaij, D. (1978). Protective isolation and antimicrobial decontamination in patients with high susceptibility to infection. Infection 6, 175 - 191.
- Das, K.M. & Eastwood, M.A. (1975). Acetylation polymorphism of sulfapyridine in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Clinical Pharmacology and Therapeutics 18, 514 - 520.
- Das, K.M. & Dubin, R. (1976). Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine. Clinical Pharmacokinetics 1, 406 - 425.
- De Ley, J. (1971). Hybridisation of DNA. In: Methods in microbiology 5A, p. 311 - 329, Norris, J.R., Ribbons, D.W., Academic Press, New York.
- Diem, K. & Lentner, C. (1968). Wissenschaftliche Tabellen, Documenta Geigy, Basel.
- Dietrich, M. & Fliedner, T.M. (1973). Gnotobiotic care of patients with immunologic deficiency diseases. Transplantation Proceedings 5, 1271 - 1277.
- Drasar, B.S. & Hill, M.J. (1974). Human Intestinal Flora, Academic Press, London.
- Dubos, R., Russell, D., Schaedler, W., Costello, R. & Hoet, P. (1965). Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. Journal of Experimental Medicine 122, 67 - 77.

- Ducluzeau, R., Ladire, M., Callut, C., Raibaud, P. & Abrams, G.D. (1977). Antagonistic effect of extremely oxygen-sensitive clostridia from the microflora of conventional mice and of *Escherichia coli* against *Shigella flexneri* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Infection and Immunity* 17, 415 - 424.
- EORTC (1978). Selective decontamination of the digestive tract; a protocol for a prospectively randomized study for infection prevention and survival following remission induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. Protocol EORTC.
- EORTC (1978). Three antibiotic regimens in the treatment of infection in febrile granulocytopenic patients with cancer. *Journal of Infectious Diseases* 137, 14 - 29.
- Fitzgerald, R.J., McBride, J.A., Jordan, H.V. & Gustafsson, B.E. (1965). Helically coiled microorganism from caecum contents of the rat. *Nature* 205, 1133 - 1134.
- Freter, R. & Abrams, G.D. (1972). Function of various intestinal bacteria in converting germfree mice to the normal state. *Infection and Immunity* 6, 119 - 126.
- Gawehn, K. & Bergmeyer, H.U. (1970). D-(-)Lactat. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, p. 1450 - 1453, H.U. Bergmeyer Verlag Chemie, Weinheim.
- Geus, J.G. de (1977). De biologische stikstofbinding. *Natuur en Techniek* 45, 197 - 209.
- Goldstein, F., Thornton, J.J. & Abramson, J. (1975). Anti-inflammatory drug treatment in Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology* 66, 251 - 258.
- Gordon, H.A. & Pesti, L. (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriological Reviews* 35, 390 - 429.
- Gordon, J.H. & Dubos, R. (1971). The anaerobic bacterial flora of the mouse cecum. *Journal of Experimental Medicine* 132, 251 - 260.
- Gossling, J. & Slack, J.M. (1974). Predominant gram-positive bacteria in human feces: numbers, variety and persistence. *Infection and Immunity* 9, 719 - 729.
- Gould, S.R. & Lennard-Jones, J.E. (1976). Production of prostaglandines in ulcerative colitis and their inhibition by sulphasalazine. *Gut* 17, 828.

- Grose, W.E., Rodriguez, V., Norek, G., Luna, M. & Bodey, G.P. (1978). *Escherichia coli* bacteremia in patients with malignant diseases. *Archives of Internal Medicine* 138, 1230 - 1233.
- Guiot, H.F.L. & Furth, R. van (1977). Partial antibiotic decontamination. *British Medical Journal* 1, 800 - 802.
- Hahn, D.M., Schimpff, S.C., Fortner, C.L., Smyth, A.C., Young, V.M. & Wiernik, P.H. (1978). Infection in acute leukemia patients receiving oral non-absorbable antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 13, 958 - 964.
- Hansson, K. & Sandberg, M. (1973). Determination of sulphapyridine and its metabolites in biological materials after administration of salicylazosulphapyridine. *Acta Pharmaceutica Suecica* 10, 87 - 92.
- Hazenberg, M.P. & Custers-van Lieshout, L.M.C. (1976). Conversion of germfree mice to the normal state by Clostridia. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 18, 185 - 190.
- Hazenberg, M.P., Custers-van Lieshout, L.M.C., Engels, W. & Kock-van Dalen, A.C. (1977). The clostridial flora of conventional mice. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 19, 167 - 174.
- Hees, P.A. van, Elferen, L. van, Margry, R., Rossum, J.M. van & Tongeren, J.H. van (1976). Factors that may influence the effect of salazopyrin. In: *The management of Crohn's disease*, p. 175 - 182, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Hees, P.A. van, Elferen, L.W. van, Rossum, J.M. van & Tongeren, J.H. van (1979). Hemolysis during salicylazosulfapyridine therapy. *American Journal of Gastroenterology* 70, 501 - 505.
- Herbeck, J.L. & Bryant, M.P. (1974). Nutritional features of the intestinal anaerobe *Ruminococcus bromii*. *Applied Microbiology* 28, 1018 - 1022.
- Hohorst, H.J. (1970). L-(+)-Lactat-bestimmung mit Lactatdehydrogenase und NAD. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, p. 1425 - 1449, H.U. Bergmeyer Verlag Chemie, Weinheim.
- Holdeman, L.V., Good, I.J. & Moore, W.E.C. (1976). Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 359 - 375.
- Holdeman, L.V., Cato, E.P. & Moore, W.E.C. (1977). *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed., Virginia Polytechnic Institute and State University,

Blacksburg, Virginia.

- Hoult, J.R.S. & Moore, P.K. (1978). Sulphasalazine is a potent inhibitor of prostaglandin 15-hydroxydehydrogenase: possible basis for therapeutic action in ulcerative colitis. *British Journal of Pharmacology* 64, 6 - 8.
- Hughes, D.E., Wimpenny, J.W.T. & Lloyd, D. (1971). The disintegration of micro-organisms. In: *Methods in microbiology* 5B, p. 1 - 54, Norris, J.R. and Ribbons, D.W., Academic Press, New York.
- Iwai, H., Ishihara, Y., Yamanaka, J. & Ito, T. (1973). Effects of bacterial flora on cecal size and transit rate of intestinal contents in mice. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 43, 297 - 305.
- Johnston, R., Harmon, S. & Kauter, D. (1964). Method to facilitate the isolation of *Clostridium botulinum* type E. *Journal of Bacteriology* 88, 1521 - 1522.
- Jonge, H. de (1963). *Inleiding tot de medische statistiek*. Wolters - Noordhoff N.V., Groningen.
- Koopman, J. (1977). *Gastro-intestinal microflora of laboratory mice*. Thesis, Groningen.
- Koopman, J.P., Janssen, F.G.J. & Druten, J.A.M. van (1977). The relation between the intestinal microflora and intestinal parameters in mice. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 19, 54 - 61.
- Koransky, J.R., Allen, S.D. & Dowell, V.R. (1978). Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 762 - 765.
- Lang, E. & Lang, H. (1972). Specific color reaction for the direct identification of formic acid. *Zeitschrift für analytische Chemie* 260, 8 - 10.
- Lee, A., Gordon, J., Lee, C.J. & Dubos, R. (1971). The mouse intestinal microflora with emphasis on the strict anaerobes. *Journal of Experimental Medicine* 132, 339 - 352.
- Lee, A. & Gemell, E. (1972). Changes in the mouse intestinal microflora during weaning: role of volatile fatty acids. *Infection and Immunity* 5, 1 - 7.
- Mandel, M. & Marmur, J. (1968). Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In: *Methods in enzymology* 12B, p. 195 - 206, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Academic Press, New York.

- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid (DNA) from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* 5, 109 - 118.
- Marmur, J. (1963). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. In: *Methods in enzymology* 6, p. 726 - 738, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Academic Press, New York.
- Marples, M.J. (1974). The normal microflora of the skin. In: *The Normal Microbial Flora of Man*, p. 7 - 11, Academic Press, London.
- McBee, R.H. (1977). Fermentation in the hindgut. In: *Microbial Ecology of the gut*, p. 185 - 217, Academic Press, London.
- Mitsuoka, T. & Ohno, K. (1977). Die Faekalflora bei Menschen. V. Mitteilung: Die Schwankungen in der Zusammensetzung der Faekalflora gesunder Erwachsener. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 238, 228 - 236.
- Moore, W.E.C., Cato, E.P. & Holdeman, L.V. (1972). *Ruminococcus bromii* sp. n. and emendation of the description of *Ruminococcus Sijpestein*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 22, 78 - 80.
- Moore, W.E.C. & Holdeman, L.V. (1974). Human fecal flora: the normal state of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology* 27, 961 - 979.
- Moore, W.E.C., Cato, E.P. & Holdeman, L.V. (1978). Some current concepts in intestinal bacteriology. *American Journal of Clinical Nutrition* 31, 533 - 542.
- Multicentre Trial (1977). Sulphasalazine in asymptomatic Crohn's disease. *Gut* 18, 69 - 72.
- Otternes, J.G. & Chang, Y. (1976). Comparative study of cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, azathiopurine and methotrexate. *Clinical and Experimental Immunology* 26, 346 - 354.
- Peppercorn, M.A. & Goldman, P. (1972). The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 181, 555 - 562.
- Pieniassek, H.J. & Bates, T.R. (1975). Colorimetric determination of 5-aminosalicylic acid and its N-acetylated metabolite in urine and feces. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 12, 571 - 581.
- Pieniassek, H.J. & Bates, T.R. (1976). Cholestyramine-induced inhibition of salicylazosulfapyridine (sulfasalazine) metabolism by rat intestinal microflora. *Journal of Pharmacology and Experimental*

- Therapeutics 198, 240 - 245.
- Raibaud, P., Ducluzeau, R., Ghnassia, J.C., Criscelli, C., Lauvergeon, B. & Mocquot, G. (1975). Etablissement d'une flora microbienne dans le tube digestif d'enfants axéniques élevés en isolateur. *Revue Française de Gynecologie et d'Obstetrique* 70, 579 - 583.
- Ruseler-van Embden, J.G.H. (1975). Redoxpotentiaal en residente darmflora van de muis. Thesis, Rotterdam.
- Sacquet, E., Lachkar, M., Mathis, E. & Raibaud, P. (1973). Cecal reduction in gnotoxenic rats. In: *Germ-free Research*, Academic Press, New York.
- Sandberg, M. & Hansson, K. (1973). Determination of salicylazosulphapyridine in biological materials. *Acta Pharmaceutica Suecica* 10, 107 - 110.
- Sanders, F.E. & Tinkler, P.B. (1976). Mycorrhiza's. *Vakblad voor Biologen* 56, 2 - 6.
- Savage, D.C., Dubos, R. & Schaedler, R.W. (1968). The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *Journal of Experimental Medicine* 127, 67 - 75.
- Savage, D.C. & Dubos, R. (1968). Alterations in the mouse cecum and its flora produced by antibacterial drugs. *Journal of Experimental Medicine* 128, 97 - 110.
- Savage, D.C. (1970). Associations of indigenous microorganisms with gastrointestinal mucosal epithelia. *American Journal of Clinical Nutrition* 23, 1495 - 1501.
- Savage, D.C. & McAllister, J.S. (1971). Cecal enlargement and microbial flora in suckling mice given antibacterial drugs. *Infection and Immunity* 3, 342 - 349.
- Savage, D.C., McAllister, J.S. & Davis, P.C. (1971). Anaerobic bacteria on the mucosal epithelium of the murine large bowel. *Infection and Immunity* 4, 492 - 502.
- Schaedler, R.W., Dubos, R. & Costello, R. (1965). The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Experimental Medicine* 122, 59 - 66.
- Schaedler, R.W., Dubos, R. & Costello, R. (1965). Association of germ-free mice with bacteria isolated from normal mice. *Journal of Experimental Medicine* 122, 77 - 82.

- Scheetz II, M.E., Carlson, D.G. & Schinitsky, M.R. (1977). Frentisole, a novel immunosuppressive, and azathioprine: Their comparative effects on host resistance to *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, herpes simplex virus, and influenza (Ann Arbor) virus. *Infection and Immunity* 15, 145 - 148.
- Schimpff, S.C., Young, V.M., Greene, W.H., Vermeulen, G.D., Moody, M.R. & Wiernik, P.H. (1972). Origin of infection in acute nonlymphocytic leukemia. *Annals of Internal Medicine* 77, 707 - 714.
- Schimpff, S.C. & Aisner, J. (1978). Emperic antibiotic therapy. *Cancer Treatment Reports* 62, 673 - 680.
- Schröder, H. & Price Evans, D.A. (1972). Acetylator phenotype and adverse effects of sulphasalazine in healthy subjects. *Gut* 13, 278 - 284.
- Schröder, H. & Campbell, D.E.S. (1972). Absorption, metabolism, and excretion of salicylazosulfapyridine in man. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 13, 539 - 551.
- Schröder, H. & Gustafsson, B.E. (1973). Azo reduction of salicyl-azo-sulphapyridine in germ-free and conventional rats. *Xenobiotica* 3, 225 - 231.
- Sharon, P., Ligumsky, M. Rachmilewitz, D. & Zor, U. (1978). Role of prostaglandins in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 75, 638 - 640.
- Singleton, J.W. (1977). National cooperative Crohn's disease study (NCCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology* 72, 1133.
- Syed, S.A., Abrams, G.D. & Freter, R. (1970). Efficiency of various intestinal bacteria in assuming normal functions of enteric flora after association with germ-free mice. *Infection and Immunity* 2, 376 - 386.
- Syed, S.A. (1972). Biochemical characteristics of *Fusobacterium* and *Bacteroides* species from the mouse cecum. *Canadian Journal of Microbiology* 18, 169 - 174.
- Tongeren, J.H. van & Eekhout, A.L. (1976). Salazopyrine in Crohn's disease: a retrospective study. In: *The management of Crohn's disease*, p. 183 - 188, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Trexler, P.C. & Reynolds, L.J. (1957). Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Applied Microbiology* 5, 406 - 412.

- Vossen, J.M. & Waaij, D. van der (1973). Recolonization after decontamination: clinical experiences. In: Airborne Transmission and Airborne Infection, p. 549 - 553, Oosthoek, Utrecht.
- Waaij, D. van der (1968). The persistent absence of enterobacteriaceae from the intestinal flora of mice following antibiotic treatment. *Journal of Infectious Diseases* 118, 32 - 38.
- Waaij, D. van der, Berghuis-de Vries, J.M. & Lekkerkerk-van der Wees, J.E.C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *Journal of Hygiene* 69, 405 - 411.
- Waaij, D. van der, Vossen, J.M., Korthals Altes, C. & Hartgrink, C. (1977). Reconventionalization following antibiotic decontamination in man and animals. *American Journal of Clinical Nutrition* 30, 1887 - 1895.
- Waaij, D. van der, Tieleman-Speltie, T.M. & De Roeck-Houben, A.M.J. (1978). Relation between the faecal concentration of various pathogenic microorganisms and infection in individuals (mice) with severely decreased resistance to infection. *Antonie van Leeuwenhoek* 44, 395 - 405.
- Waaij, D. van der (1979). The colonization resistance of the digestive tract in experimental animals and its consequences for infection prevention, acquisition of new bacteria and the prevention of spread of bacteria between cage mates. In: New criteria for antimicrobial therapy: maintenance of digestive tract colonization resistance, p. 43 - 53, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Wensinck, F. (1961). The origin of induced *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in irradiated mice. *Journal of Pathology and Bacteriology* 81, 401 - 408.
- Wensinck, F. & Ruseler-van Embden, J.G.H. (1971). The intestinal flora of colonization-resistant mice. *Journal of Hygiene* 69, 413 - 421.
- Wensinck, F. (1976). Faecal flora of Crohn's patients. Serological differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. In: The management of Crohn's disease, p. 103 - 107, Excerpta Medica, Amsterdam.
- West, B., Lendrum, R., Hill, M.J. & Walker, G. (1974). Effects of sulphasalazine (salazopyrin) on faecal flora in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 15, 960 - 965.

- Winston, D.J., Meyer, D.V., Gale, R.P., Young, L.S. (1978). Further experience with infections in bone marrow transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 10, 247 - 254.
- Wüst, J. & Wilkins, T. (1978). Susceptibility of anaerobic bacteria to sulfamethoxazole / trimethoprim and routine susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 14, 384 - 390.

SAMENVATTING

In hoofdstuk 1 van dit proefschrift wordt aangegeven dat de aanwezigheid van een darmflora vaak essentieel is voor de homeostase van de gastheer. Bij kiemvrije dieren wordt waargenomen dat het ontbreken van een flora allerlei afwijkingen tot gevolg heeft. De samenstelling van de darmflora is vaak zeer soort-specifiek zoals onderzoek bij de verschillende zoogdiersoorten heeft geleerd. Ook voor de mens is dit van toepassing waarbij ook individuele verschillen binnen de soort worden waargenomen. Op grond van het feit dat veel zoogdieren zo sterk worden beïnvloed door hun flora moet worden aangenomen dat ook bij de mens sprake is van een symbiose tussen gastheer en de vele bacteriesoorten. Een van de meest gebruikte proefdieren voor allerlei studies is de muis. Als de darmflora het dier zo sterk zowel op fysiologisch als op immunologisch gebied beïnvloedt dan zal het duidelijk zijn dat een muis met een nauwkeurig omschreven darmflora van groot belang is voor de standaardisatie van experimenten. Aangezien de strikt anaerobe micro-organismen in de darmflora sterk domineren en deze vooral verantwoordelijk zijn voor de invloed op de gastheer is onderzoek naar anaeroben noodzakelijk, wil men over een gedefinieerde flora kunnen beschikken. In hoofdstuk 3 wordt beschreven dat het inderdaad mogelijk is, de darmflora van muizen door selectie zo te beperken dat slechts anaerobe sporevormers aanwezig zijn. De zgn. clostridium-flora normaliseert kiemvrije muizen even effectief als de conventionele flora en bestaat voornamelijk uit de zgn. "tapered rods", die representatief zijn voor de muizeflora. Deze flora heeft als voordeel dat ze als een droog preparaat kan worden opgeslagen zonder dat de normaliserende eigenschappen verloren gaan. De kenmerken van zeven uit deze flora geïsoleerde soorten worden beschreven in hoofdstuk 4. Het bleek dat ze alle tot het geslacht *Clostridium* behoren. Eén soort kon worden geïdentificeerd als *Clostridium ramosum*, twee andere soorten werden ook beschreven door Wensinck en Ruseiler-van Embden (1971) en vier soorten werden voor zover bekend niet beschreven. Het onderzoek toonde aan dat *in vitro* cultures te onbetrouwbaar zijn om het gram-karakter, de morfologie en de sporevorming van de "tapered rods" na te gaan. Deze fundamentele kenmerken kunnen alleen m.b.v. kiemvrije muizen worden vastgesteld. De set van zeven soorten kon kiemvrije muizen

niet normaliseren en het toevoegen van meer soorten zal noodzakelijk zijn om dit te bereiken.

In de hoofdstukken 5, 6 en 7 wordt een onderzoek beschreven over de humane darmflora in muizen. De menselijke faecale flora blijkt in staat te zijn, kiemvrije muizen te normaliseren. Alhoewel deze flora niet autochtoon is en snel wordt verdrongen door de muizeflora, is het mogelijk, door isolatie dieren met een humane darmflora aan te houden. De samenstelling van de flora is globaal als die van de donor en verschilt volledig van de murine flora o.a. door het ontbreken van de "tapered rods". Ook voor deze flora geldt dat de anaeroben numeriek domineren en verantwoordelijk zijn voor de normaliserende eigenschappen. Het is dan ook mogelijk, kiemvrije muizen te normaliseren uitsluitend met anaeroben, gekweekt uit de menselijke faeces. Een dergelijke humane flora kan worden gebruikt voor recontaminatie van gedecontamineerde patiënten. Gehele of partiële decontaminatie vindt plaats bij patiënten met een sterk verlaagde weerstand waarbij kans bestaat dat infecties ontstaan door micro-organismen afkomstig uit de eigen darmflora. Vooral de gram-negatieve aerobe staven zijn hiervoor verantwoordelijk. Omdat de afwezigheid van een flora de homeostase verstoort is na behandeling van de patiënt de aanwezigheid van een flora gewenst, bij voorkeur van een flora die wel micro-organismen met normaliserende eigenschappen bevat maar niet geconditioneerd pathogene bacteriën. Een anaerobe flora lijkt hiervoor het meest geschikt en het onderzoek zoals beschreven in hoofdstuk 6 wijst uit dat deze flora voor muizen met een door chemotherapeutica of bestraling verlaagde weerstand niet ziekteverwekkend is. Het bezit van een anaerobe humane darmflora maakt de kans dat muizen besmet raken met *Pseudomonas aeruginosa* veel geringer en als dat gebeurt bereikt dit micro-organisme in de flora slechts lage aantallen. Hiermee wordt nogeens gewezen op het feit dat een normaliserende flora naast een fysiologische invloed op de gastheer ook een beschermende werking heeft. Het gebruik van reïnculturen of het selecteren van groepen anaeroben om daarmee een geïdentificeerde humane flora samen te kunnen stellen met normaliserende eigenschappen is evenals bij de murine flora niet gelukt. Deze normaliserende flora is kennelijk zeer complex. Het in stand blijven van een humane flora in muizen biedt ook de mogelijkheid de invloed van bepaalde geneesmiddelen op de flora na te gaan. Sulfasalazine (Salazopyrine), een door patiënten met colitis ulcerosa

veel gebruikt geneesmiddel, wordt door de darmflora gesplitst in 5-amino-salicylzuur en sulfapyridine. De laatste stof heeft door zijn antibacteriële werking misschien een invloed op de darmflora waardoor de nog niet opgehelderde werking van Salazopyrine kan worden verklaard. Het in hoofdstuk 7 beschreven onderzoek maakt duidelijk dat van een duidelijke invloed op de samenstelling van de darmflora geen sprake is doch dat de flora van patiënten met colitis ulcerosa volledig resistent is tegen sulfapyridine. Een hoge dosis Salazopyrine heeft geen invloed op de samenstelling van de darmflora van muizen met een humane flora doch zij wordt resistent zij het in veel mindere mate dan bij de patiënten. Het is dan ook niet aannemelijk dat het sulfonamide deel van Salazopyrine enige therapeutische werking heeft en gezien de vele bijverschijnselen waarvoor het verantwoordelijk is lijkt het aanbevelenswaard te trachten, een preparaat te ontwikkelen waarin dit deel niet aanwezig is. Bij gebruik van Salazopyrine dient erop gewezen te worden dat infecties waarvan de verwekker afkomstig is uit de residente flora (bv. urineweginfecties) niet bestreden kunnen worden met sulfonamiden vanwege resistentie hiertegen. Uit ons onderzoek is namelijk gebleken dat de aerobe flora van patiënten die Salazopyrine gebruiken behalve tegen sulfapyridine ook resistent is tegen sulfamethoxazol dat een belangrijk bestanddeel is van Bactrimel (Roche), Eusaprim (Wellcome) en Sulfotrim (Gea), die voor de bestrijding van dergelijke infecties gewoonlijk worden gebruikt.

SUMMARY

In this thesis results are presented of a study on mice with two types of intestinal flora viz. the autochthonous murine flora and various floras from human donors.

In Chapter 1, the importance of the intestinal microflora for the homeostasis of the host is discussed. The effect of the flora is evident as germ-free and conventional animals differ markedly in several physiological and histological characteristics. The composition of the intestinal flora is characteristic for many mammalian species. This is also true for human beings in whom flora composition shows subtle individual variation. From the finding that many mammalian species are largely influenced by their resident flora it follows that homeostasis in man may also depend on symbiosis between host and numerous bacterial species. The mouse is one of the most frequently used laboratory animals. If the intestinal flora has such an effect on physiological and immunological behaviour, it is evident that mice with a well-defined intestinal flora are of great interest for the standardization of experiments. The flora consists for the greater part of strict anaerobes and the effects on the host are certainly due to this group of microorganisms.

In Chapter 3 experiments in which the effect of sporulating anaerobes on germ-free mice was investigated and the way in which they were isolated are described. The clostridial flora was found to normalize germ-free mice as effectively as the conventional flora. The clostridial flora consisted of "tapered rods", characteristic for the murine flora, and has the advantage that it can be stored as a dry powder without losing its normalizing potential.

The characteristics of seven anaerobic sporulating species are described in Chapter 4. They belonged to at least three genera because the DNA-base composition was markedly different. One species was identified as *Clostridium ramosum*, two had been described by Wensinck and Ruselervan Embden (1971) and, to the best of our knowledge, four had not been described so far. It was evident that *in vitro* cultures were unreliable for the study of gram-character, morphology and sporulation. These fundamental properties could only be determined by means of cells grown in gnotobionts. The combined seven species were unable to normalize germ-free mice and it is clear therefore that the normalizing flora is much

more complex.

Chapters 5, 6 and 7 deal with the composition of human intestinal floras introduced into germ-free mice and the effect on the murine host. It is possible to keep mice for long periods of time with the human flora provided, that they are protected from outside contamination. If this occurs, the human flora is quickly eliminated by the autochthonous flora which is apparently present as spores in the environment. The human flora is able to normalize germ-free mice. Anaerobes from the human flora which are completely different from the murine "tapered rods" are also effective (Chapter 5).

For the prevention of secondary infections by gram-negative intestinal facultative aerobes, total or partial decontamination is carried out in patients with a decreased resistance. These patients should be reconventionalized as soon as possible with a normalizing flora which for obvious reasons should be free of conditioned pathogens. The anaerobic part of the human intestinal flora appears to be suitable because it normalizes germ-free mice and does not give rise to infection when resistance is lowered by chemotherapeutics or X-irradiation. Furthermore, the flora reduces colonization of mice by the conditioned pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Like the murine clostridial flora, the normalizing human anaerobic flora is complex; experiments with a set of pure cultures of anaerobes showed that the normalizing effect was definitely smaller than with the anaerobic part of the flora which, evidently, is much more complex.

Because the human flora can be maintained in mice, it is possible to study the effect of therapeutics used for the treatment of human intestinal diseases in the murine model. Sulphasalazine (Salazopyrine) used for the treatment of ulcerative colitis is known to be split by the intestinal flora into 5-aminosalicylate and sulphapyridine. The mechanism of the therapeutic effect is unknown but may be due to antibacterial activity of the sulphapyridine moiety. Experiments reported in Chapter 7 show that sulphasalazine has no significant effect on the composition of the human flora in mice nor on the intestinal flora of patients with ulcerative colitis taking the drug for long periods of time. In patients the flora was found to be resistant to sulphapyridine. Though to a lesser degree this was also the case in mice. It seems, therefore, that the sulphapyridine moiety of sulphasalazine has no beneficial

effect and because it is responsible for many side-effects of sulphasalazine attempts would be worth-while to develop drugs containing 5-amino-salicylic acid coupled with other compounds than sulphapyridine to form a molecule that is split by the intestinal flora.

Intestinal aerobes from patients with ulcerative colitis treated with sulphasalazine were found to be resistant not only to sulphapyridine but also to sulphamethoxazole, a component of Bactrimel (Roche), Eusaprim (Wellcome), and Sulphotrim (Gea). It is pointed out that such therapeutics are unsuitable for the treatment of secondary infections e.g. urinary tract infections in patients taking sulphasalazine.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd in 1942 te Amsterdam geboren. Hij begon in 1965, na het behalen van het eindexamen HBS-b en het vervullen van de militaire dienstplicht, zijn biologiestudie te Amsterdam. In 1971 legde hij zijn doctoraal examen af. Vanaf 1972 tot heden is hij werkzaam als wetenschappelijk medewerker van de afdeling Medische Microbiologie van de Medische Faculteit van de Erasmus Universiteit te Rotterdam.

Aan dit proefschrift hebben veel mensen meegewerkt. Ik wil hen allen hartelijk bedanken en enkelen met name noemen.

Prof. Dr. F. Wensinck, mijn promotor, zette mij op het spoor van de gnotobiologie, een fascinerend terrein van de microbiologie, en was bovendien altijd bereid om verslagen van mijn werkzaamheden zowel op inhoud, als op stijl- en taalfouten kritisch te bekijken, hetgeen het schrijven van dit proefschrift gemakkelijker gemaakt heeft.

Mijn co-referenten, Prof. Dr. M. Frenkel en Prof. Dr. D. van der Waaij, leverden waardevolle kritiek op dit proefschrift.

Leo Custers-van Lieshout, Annie Verschoor-Burggraaf, Carla van der Kamp-Simons en Marga Bakker zijn een onmisbare hulp geweest bij het experimentele werk. Ik hoop dat ze hun aandeel hierin herkennen in dit proefschrift.

Rinus van Vliet zorgde ervoor dat de kiemvrije muizen kiemvrij bleven, dat met de fok van de dieren op tijd werd begonnen en de toevoer van steriel materiaal verzekerd was. Het is geen geringe opgave om gedurende 7 jaar voor een continue aanvoer van kiemvrije muizen te zorgen.

Ivonne Elgersma-Huizer assisteerde Van Vliet bij zijn werk, zorgde ervoor dat voor het experimentele werk steeds steriele materialen aanwezig waren en hielp met het besmetten van de dieren.

Hedy Both-Patoir, Johanneke Ruseler-van Embden en Alma Schröder kweekten de flora's van gezonden en van patiënten die Salazopyrine gebruikten. Wim Engels en Lida Kock-van Dalen bepaalden de fermentatie-eindproducten en de percentages G + C van de clostridiumsoorten.

Marianne Lamers zorgde er in al die jaren voor dat artikelen, verslagen etc. er puntgaaf verzorgd uitzagen. Een blik op dit proefschrift maakt duidelijk dat haar vaardigheid op dit gebied groot is.

