

# On the production of staphylocoagulase by staphylococcus aureus

## Citation for published version (APA):

Engels, W. (1981). *On the production of staphylocoagulase by staphylococcus aureus*. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19811218we>

## Document status and date:

Published: 01/01/1981

## DOI:

[10.26481/dis.19811218we](https://doi.org/10.26481/dis.19811218we)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## GENERAL DISCUSSION AND SUMMARY

Staphylococcus aureus is a commensal micro-organism of low virulence which usually causes severe infections only when the normal defences of the host are impaired. The acute inflammatory response and the activity of phagocytic cells are the most important defence mechanisms against staphylococcal infection. On the other hand, S. aureus has the disposal of a variety of virulence factors such as cell-wall components and extracellular proteins which can interfere strongly with the defence mechanisms of the host. Although our present knowledge of the interaction between antigenetic structure, opsonins and phagocytic cells has been enriched considerably by the work of Verbrugh and co-workers, the role of extracellular proteins in the pathogenesis of S. aureus is still not well understood. It has to be noted that generally, studies concerning the virulence of S. aureus have been greatly hampered by the lack of availability of an appropriate animal model. Not only do relatively high doses of micro-organisms have to be applied but also the type of S. aureus strain, the route of administration and the animal species play an important role in the persistence of S. aureus during the infection process. Experimental staphylococcal infections of the human skin pose great difficulties since a balance has to be found between a failure to produce any infection, and a spreading and severe infection, which is therefore unacceptable.

For these reasons, it was proposed by Musher to choose animals with an underlying disease or an impaired host defence mechanism as subjects for a study of the pathogenesis of S. aureus.

Although this approach might be successful, the number of variables in the infection process will be still considerable. An alternative model can be found probably in the assay system, described by Verhoef et al. This assay employs tritiated thymidine labeled staphylococci and permits a quantitative study of the separate steps of bacterial opsonization, attachment, ingestion and intracellular killing. In a similar model the physiological importance of exoproteins of S. aureus could be investigated.

Since there is substantial evidence indicating that

changes in the growth conditions of S. aureus induce major alterations in antigenic structure, production of exoproteins and biochemical properties of S. aureus, due to phenotypical variations, it is progressively becoming recognized that the virulence of S. aureus varies according to the environment in which the staphylococci grow.

In the last decades much attention has been paid to the production and the characterization of the exoproteins of S. aureus. However, very little is known about the influence of growth conditions and medium composition on exoprotein production. Moreover, the regulation of the synthesis and the mechanisms of secretion of these exoproteins are generally obscure. One of the exoproteins produced by S. aureus is staphylocoagulase. Although its precise role in the pathogenesis has not been established, staphylocoagulase is still considered as one of the most important virulence factors of pathogenic staphylococci. Furthermore, the ability of staphylococci to produce staphylocoagulase is a major criterion for the identification of S. aureus.

In Chapter 1, a review has been given of the mode of action of staphylocoagulase and its possible roles in the pathogenesis of S. aureus. Since the composition of the cell-wall and the production of exoproteins is strongly influenced by the growth environment of S. aureus, it was of interest to study several aspects of the production of staphylocoagulase in relation to the growth conditions.

The purpose of the investigations presented in this thesis was therefore to assess the influence of medium composition and growth conditions on the production of staphylocoagulase. Furthermore, the mechanism of secretion of this protein was studied by means of various inhibitors. Spontaneous staphylocoagulase-negative mutants were used to study their competitive ability towards their wild type strains and to elucidate the regulation of the synthesis of staphylocoagulase and of exoproteins in general. Because of the enormous capacity of S. aureus to vary phenotypically in response to changes in the growth environment, the majority of growth experiments were performed using a chemostat; in this way the micro-organisms could grow under steady-state conditions in a constant and reproducible environment.

In Chapter 2 the development of a defined growth medium is described in which high yields of staphylocoagulase were obtained from S. aureus strain 104. Besides a simple salts mixture, this medium contained glycerol,

casein hydrolysate and three vitamins. This medium could replace the generally used Brain Heart Infusion medium and also facilitated the purification of staphylocoagulase since it was free of proteins and lipids. Casein hydrolysate could be substituted completely by a mixture of amino acids of an identical composition; removal of any of the amino acids from this mixture reduced the amount of staphylocoagulase. For practical reasons, casein hydrolysate was used in further experiments. It was demonstrated in batch cultures of S. aureus that conditions of oxygen- and magnesium-limitation were required for optimal yields of staphylocoagulase. When the glycerol concentration was raised above 0.2%, a considerable decrease in staphylocoagulase production took place, probably due to a decrease of the pH value of the culture. Therefore a practically constant pH (about 7.4) was another important factor in optimal staphylocoagulase production.

In Chapter 3, the production of staphylocoagulase was studied with continuous cultures of various S. aureus strains in the newly developed medium. One of the major problems in these studies was to minimize excessive foaming. Therefore, the baffles had to be removed from the culture vessel, the impeller speed kept at moderate values and air flushed over the surface. Particular attention was given to the type of antifoam to be used, since occasionally inhibitory effects on the staphylocoagulase production were observed. It was confirmed, that also in continuous culture, conditions of low oxygen availability and magnesium-limitation were required for optimal staphylocoagulase production. The specific rate of the production of staphylocoagulase was dependent on the growth rate. In two bovine strains, the production rate pattern was similar to that of an inducible enzyme sensitive to catabolite repression, although no specific inducer or repressor could be demonstrated. The human strain 104 on the other hand, produced staphylocoagulase constitutively. In all strains the specific rate of production of total extracellular protein was strictly proportional to the growth rate. These experiments clearly showed that the production of optimal amounts of staphylocoagulase was not always related to maximal production of biomass and total extracellular protein. Mannitol functioned as an energy source rather than as a carbon source because it was converted for a major part to acetate and for a minor part to lactate and not to new cell material. It could be demonstrated that the energy state of the cell is also of great importance in

the regulation of staphylocoagulase production. Catabolite repression of staphylocoagulase production by mannitol was not observed in chemostat cultures of S. aureus whereas in batch cultures a considerably inhibition of the staphylocoagulase production by mannitol occurred, indicating that the inhibitory effects of carbohydrates on the production of staphylocoagulase in batch cultures are a consequence of the interaction of the organisms with their environment in a closed system. The bovine strains produced six times more staphylocoagulase in chemostat culture as compared with batch cultures of the same organism. This indicates that chemostat culture by virtue of its ability to provide constant and specific environmental conditions may prove to be a better culture technique for the production of staphylocoagulase.

A cell-bound staphylocoagulase could be detected in chemostat cultures of S. aureus 104 under magnesium- and oxygen-limited growth conditions (Chapter 4). A distribution study revealed that 81% of this enzyme was membrane-bound and could be optimally released by Triton X-100. The remaining part was located in the periplasmic space and was released during protoplasting of the organism. The effects of cerulenin, quinacrine and lincomycin on the production of cell-bound and extracellular staphylocoagulase indicated that the hydrophobic cell-bound form was a precursor in the production of extracellular staphylocoagulase. When magnesium was added to the medium in large excess of the growth requirement, both the production of extracellular staphylocoagulase and the production of cell-bound staphylocoagulase was strongly inhibited to the same extent. Since magnesium influences the membrane phospholipid composition (particularly the content of positively charged lipids) in Gram-positive bacteria, it was concluded that the negative effect of magnesium on the production of extracellular staphylocoagulase was due to a decreased membrane permeability towards cell-bound staphylocoagulase, resulting in a diminished secretion of the protein. The precise mechanism of the secretion of staphylocoagulase could not be established since no detailed characterization of the cell-bound staphylocoagulase was performed. The involvement of a lipid intermediate/exoprotein releasing protease system could not be excluded; however, the effects of cerulenin and quinacrine allowed also another interpretation since no effect of these substances on the production of total extracellular protein was observed. Therefore, before any conclusion

can be drawn about the mechanism of the secretion system of staphylocoagulase and of exoproteins in general, a complete characterization of the cell-bound precursors and releasing protease(s) is essential, especially when signal-peptides are involved.

Cultivation of S. aureus strains 104 and NCTC 8178 in continuous culture gave rise to staphylocoagulase-negative cells which accumulated progressively by virtue of an apparent growth advantage of these staphylocoagulase-negative cells under the growth conditions used (Chapter 5). The loss of production of staphylocoagulase was accompanied by a simultaneous loss of the production of  $\alpha$ -haemolysin and leucocidin. Characterization of the strains revealed no further differences in biotype, exoenzymes, phage pattern and plasmid content. From competition experiments cultures at different dilution rates and cultivation temperatures, it was concluded that the accumulation of staphylocoagulase-negative mutants is based on differences in affinity for the limiting substrates rather than on differences in the production rates of total extracellular protein. Moreover, it was demonstrated that the mode of regulation of the production of exoproteins in S. aureus is incompatible with the generally proposed models. In connection with evidence presented in the literature, it was concluded that the observed mutation in these S. aureus strains was due probably to a transposable genetic element rather than to the loss of a plasmid or a prophage. Determination of the LD<sub>50</sub> value of these S. aureus strains by intracerebral injection into neonatal mice showed that the mutant strain of strain 104 was significantly less virulent than the parent strain whereas differences in virulence between parent and mutant of strain NCTC 8178 could not be demonstrated.

Chapter 6 describes a rapid and direct assay of staphylocoagulase for the routine identification of S. aureus. The assay is based on the limited proteolysis of the chromogenic substrate Chromozym TH by staphylo-thrombin. The great advantage of this method is that false-positive and false-negative reactions can be eliminated. A comparison of this method with three clotting assays has been made using recently isolated clinical strains of S. aureus. The new assay is specific, quantitative and easily automated. Therefore, it offers clinical laboratories a more reliable assay of staphylocoagulase and it enables an identification of S. aureus within one day. Furthermore, this assay method can be applied excellently for the typing of S. aureus

strains according to the eight different serotypes of staphylocoagulase, described by Dekio and Onimura.

The experiments described in this thesis demonstrate a close relationship between the production of staphylocoagulase by S. aureus and growth conditions. In addition, the secretion process of staphylocoagulase is influenced also by the growth environment. The data presented here are in accordance with present knowledge of the interaction between micro-organisms and their environment, and again demonstrate that the phenotypic variability of micro-organisms has far-reaching consequences for present-day research in medical microbiology. Therefore, data obtained with undefined cultures in undefined growth environments will have a very limited predictive value for the in vivo situation. Although the number of growth conditions studied in this thesis is limited, the results illustrate the importance of the growth environment on the production of staphylocoagulase by S. aureus. It is obvious that much more information is needed about the nature of the growth environment of S. aureus during the infection process. When more data are available about the natural environment of S. aureus which presumably will be severely nutrient-limited, a better insight can be obtained into the role of staphylocoagulase in the virulence and pathogenicity of this organism. It can be expected that investigations into these environmental parameters will provide a better strategy for the treatment and prevention of staphylococcal infections.

## SAMENVATTING

Staphylococcus aureus is een commensaal micro-organisme met een lage virulentie. Het veroorzaakt alleen dan ernstige infecties wanneer de normale verdedigingsmechanismen van de gastheer zijn verminderd. De acute ontstekingsreactie en de activiteit van fagocyterende cellen vormen de belangrijkste verdediging tegen stafylococceen-infecties. Anderzijds beschikt S. aureus over een verscheidenheid van virulentie factoren zoals celwand componenten en extracellulaire eiwitten die sterk interfereren met de verdedigingsmechanismen van de gastheer. Hoewel gedurende de laatste jaren onze kennis ten aanzien van de interacties tussen antigene structuur, opsoninen en fagocyterende cellen aanzienlijk is toegenomen, is de rol van extracellulaire eiwitten in de pathogenese van S. aureus nog altijd onduidelijk. Eén van de belangrijkste redenen hiervoor is het ontbreken van een geschikt proefdiermodel.

Sedert inmiddels overtuigend is aangetoond dat veranderingen in de groei-omstandigheden van S. aureus belangrijke veranderingen induceren in antigene structuur, productie van exoeiwitten en biochemische eigenschappen van S. aureus, ten gevolge van fenotypische variabiliteit, wordt men zich steeds meer bewust van het feit dat de virulentie van S. aureus varieert overeenkomstig het milieu waarin de stafylococceen groeien.

In de afgelopen decennia is veel aandacht geschonken aan de productie en karakterisering van exoeiwitten van S. aureus. Er is echter weinig bekend over de invloed van de groei-condities en medium-samenstelling op de productie van deze exoeiwitten. Bovendien is het in het algemeen onduidelijk hoe de regulatie van de synthese en het uitscheidingsmechanisme van exoeiwitten plaats vindt. Eén van de exoeiwitten, geproduceerd door S. aureus, is stafylocoagulase. Alhoewel een rol in de pathogenese niet is vastgesteld, wordt stafylocoagulase nog steeds beschouwd als één van de belangrijkste virulentie factoren van pathogene stafylococceen. Anderzijds is het stafylocoagulase-producerend vermogen van stafylococceen een belangrijk criterium voor de identificatie van S. aureus.

In Hoofdstuk 1 wordt een overzicht gegeven over het werkingsmechanisme van stafylocoagulase en de mogelijke rollen in de pathogenese van S. aureus. Omdat de samenstelling van de celwand en de productie van exoeiwitten sterk wordt beïnvloed door de groei-omstandigheden van S. aureus, was het interessant diverse aspecten van de



roersnelheid terug te brengen tot lagere waarden en lucht over het cultuur-oppervlak te leiden in plaats van door de cultuur. Bijzondere aandacht werd geschonken aan het type antischuim-middel dat moest worden gebruikt omdat geregeld remmende effecten hiervan op de stafylocoagulase productie werden waargenomen. Ook onder continue cultuur omstandigheden bleek een lage beschikbaarheid van zuurstof en een magnesium-limitatie een vereiste voor optimale stafylocoagulase productie. De specifieke productie-snelheid van stafylocoagulase was sterk afhankelijk van de groeisnelheid. In twee runderstammen was het productiepatroon identiek aan dat van een induceerbaar enzym, gevoelig voor kataboliet repressie, hoewel geen specifieke inductor of repressor kon worden aangetoond. Anderzijds produceerde de humane stam 104 stafylocoagulase constitutief. In alle stammen was de specifieke productie-snelheid van totaal extracellulair eiwit strikt evenredig met de groeisnelheid. Deze experimenten lieten duidelijk zien dat de productie van optimale hoeveelheden stafylocoagulase niet altijd gekoppeld was aan een maximale productie van biomassa en totaal extracellulair eiwit. Mannitol functioneerde meer als energiebron dan als koolstofbron omdat het grotendeels werd omgezet in acetaat en voor een klein gedeelte in lactaat, en niet in nieuw celmateriaal. Ook de energie status van de cel bleek van groot belang voor de regulatie van de stafylocoagulase productie. Kataboliet repressie van de stafylocoagulase productie door mannitol werd niet waargenomen in chemostaat culturen van S. aureus terwijl in batch culturen een aanzienlijke remming van de stafylocoagulase productie door mannitol optrad. Dit wijst erop dat de remmende effecten van koolhydraten op de productie van stafylocoagulase in batch culturen het gevolg waren van een interactie van de organismen met hun omgeving in een gesloten systeem. De runderstammen produceerden zes keer zoveel stafylocoagulase in chemostaat culturen dan in batch culturen van hetzelfde organisme. Dit geeft aan dat chemostaat culturen, door hun eigenschap constante en specifieke milieuomstandigheden te creëren, een betere kweektechniek kunnen zijn voor de productie van stafylocoagulase.

Een cel-gebonden stafylocoagulase kon worden aangetoond in chemostaat culturen van S. aureus 104 onder magnesium- en zuurstof-beperkende groei-omstandigheden. Een verdelingsstudie toonde aan dat 81% van dit enzym membraan-gebonden was en optimaal kon worden vrijgemaakt met behulp van Triton X-100. Het resterend gedeelte was gelocaliseerd in de periplasmatische ruimte en kwam vrij

productie van stafylocoagulase te bestuderen in relatie tot de groei-omstandigheden.

Het doel van het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, was daarom na te gaan welke de invloed is van medium-samenstelling en groei-omstandigheden op de productie van stafylocoagulase. Bovendien werd het uitscheidingsmechanisme van stafylocoagulase bestudeerd met behulp van diverse remmers. Spontane stafylocoagulase-negatieve mutanten werden gebruikt om hun competitief vermogen ten opzichte van de wilde stammen te bestuderen en de regulatie van de synthese op te helderen van stafylocoagulase en van exoeiwitten in het algemeen. Omdat S. aureus een zeer groot vermogen bezit om fenotypisch te variëren als reactie op veranderingen in het milieu, werd het merendeel der groei-experimenten uitgevoerd in een chemostaat (continue cultuur); op deze wijze konden de micro-organismen groeien in een dynamisch evenwicht in een constant en reproduceerbaar milieu.

In Hoofdstuk 2 wordt de ontwikkeling van een gedefinieerd kweekmedium beschreven waarin hoge opbrengsten van stafylocoagulase, geproduceerd door S. aureus stam 104, werden verkregen. Dit medium bevatte een mengsel van minerale zouten, glycerol, caseïne hydrolysaat en drie vitamines. Het bleek dat dit medium het veel gebruikte Brain Heart Infusion medium geheel kon vervangen; de zuivering van stafylocoagulase werd hierdoor vergemakkelijkt omdat het nieuwe medium geen eiwitten en lipiden bevatte. Het caseïne hydrolysaat kon op zijn beurt geheel worden vervangen door een mengsel van aminozuren in een identieke samenstelling; wanneer echter één van de aminozuren in dit mengsel werd weggelaten, verminderde de opbrengst aan stafylocoagulase. Uit praktische overwegingen werd het caseïne hydrolysaat gebruikt in de overige experimenten. In zogenaamde batch culturen van S. aureus bleek dat kweekomstandigheden, waarin zuurstof en magnesium beperkend waren, vereist waren voor een optimale stafylocoagulase productie. Glycerol concentraties hoger dan 0,2% remden de stafylocoagulase productie sterk, waarschijnlijk door een daling van de pH van de cultuur. Daarom was een nagenoeg constante pH (ongeveer 7,4) een andere belangrijke factor voor een optimale productie van stafylocoagulase.

In Hoofdstuk 3 werd de productie van stafylocoagulase bestudeerd in continue culturen van diverse S. aureus stammen in het nieuw ontwikkelde medium. Eén van de belangrijkste problemen in deze studies was het verminderen van overmatige schuimvorming. Daarom was het nodig de keerschotten te verwijderen uit het kweekvat, de

tijdens de bereiding van protoplasten van het organisme. De effecten van cerulenine, quinacrine en lincomycine op de productie van cel-gebonden en extracellulair stafylocoagulase gaven aan dat de hydrofobe cel-gebonden vorm een precursor was in de productie van extracellulair stafylocoagulase. Indien magnesium in overmaat aan het medium werd toegevoegd, werd de productie van cel-gebonden en extracellulair stafylocoagulase in gelijke mate sterk geremd. Omdat magnesium de fosfolipide samenstelling (met name het gehalte aan positief geladen lipiden) van de membraan in gram-positieve bacteriën beïnvloedt, werd geconcludeerd dat het negatieve effect van magnesium op de productie van extracellulair stafylocoagulase werd veroorzaakt door een afname in de membraan permeabiliteit voor cel-gebonden stafylocoagulase zodat de uitscheiding van het eiwit werd verminderd. Het juiste uitscheidingsmechanisme van stafylocoagulase kon niet worden vastgesteld omdat geen gedetailleerde karakterisering van het cel-gebonden stafylocoagulase werd uitgevoerd. De rol van een lipid intermediair/exoeiwit vrijmakend protease systeem kon niet worden uitgesloten hoewel de effecten van cerulenine en quinacrine ook op een andere manier konden worden geïnterpreteerd, mede gezien het feit dat geen van deze verbindingen een invloed hadden op de productie van totaal extracellulair eiwit. Voordat enige conclusie omtrent het uitscheidingsmechanisme van stafylocoagulase en dat van exoeiwitten in het algemeen kan worden getrokken, is een complete karakterisering van de cel-gebonden precursors noodzakelijk, vooral wanneer ook nog signaal-peptiden in dit proces zijn betrokken.

Tijdens het kweken van S. aureus stam 104 en stam NCTC 8178 in continue cultuur, verschenen stafylocoagulase-negatieve cellen die konden worden waargenomen ten gevolge van een groei-voordeel van deze stafylocoagulase-negatieve cellen onder de gebruikte kweekomstandigheden (Hoofdstuk 5). Het verlies van stafylocoagulase productie ging gepaard met een gelijktijdig verlies van de productie van  $\alpha$ -haemolysine en leucocidine. Een karakterisering van deze stammen liet zien dat er geen verdere verschillen waren in biotype, exoenzymen, faagpatroon en plasmid-gehalte. Uit competitie experimenten bij verschillende verdunnings-snelheden en kweektemperaturen, werd geconcludeerd dat de ophoping van de stafylocoagulase-negatieve mutanten het gevolg was van verschillen in affiniteit voor de groei-beperkende substraten en niet het gevolg van verschillen in de productie-snelheid van totaal extracellulair eiwit.

Bovendien werd vastgesteld dat de regulatie van de productie van exoeiwitten onverenigbaar was met de algemeen voorgestelde modellen. Met behulp van literatuurgegevens werd geconcludeerd dat de opgetreden mutatie in deze S.aureus stammen vermoedelijk werd veroorzaakt door een transposon en niet door het verlies van een plasmid of een profaag. Bepaling van de LD<sub>50</sub> waarde van de S. aureus stammen door middel van intracerebrale injectie in neonatale muizen liet zien dat de mutant van stam 104 significant minder virulent was dan de wilde stam terwijl geen verschillen in virulentie tussen de wilde stam en de mutant van stam NCTC 8178 waren aan te tonen.

Hoofdstuk 6 beschrijft een snelle en directe bepalingmethode van stafylocoagulase ten behoeve van de routine identificatie van S. aureus. De bepalingmethode is gebaseerd op een beperkte proteolyse van het chromogene substraat Chromozym TH door stafylothrombine. Het grote voordeel van deze methode is dat vals-positieve en -negatieve reacties kunnen worden geëlimineerd. Een vergelijking van deze methode met drie stollingsmethoden werd gemaakt door gebruik te maken van recent geïsoleerde klinische S. aureus stammen. De nieuwe methode is specifiek, kwantitatief en gemakkelijk te automatiseren. Daarom biedt deze methode het klinisch laboratorium een betrouwbare bepalingmethode van stafylocoagulase en het maakt een identificatie van S. aureus binnen één dag mogelijk. Bovendien is de methode uitstekend te gebruiken voor het typeren van S. aureus stammen volgens de acht verschillende serotypen van stafylocoagulase zoals beschreven door Dekio en Onimura.

De experimenten beschreven in dit proefschrift laten zien dat er een nauwe relatie bestaat tussen de productie van stafylocoagulase door S. aureus en de groeiomstandigheden. Bovendien wordt ook het uitscheidingsproces van stafylocoagulase beïnvloed door het milieu. De weergegeven resultaten zijn in overeenstemming met de huidige kennis over de wisselwerking tussen micro-organismen en hun milieu en laten zien dat de fenotypische variabiliteit van micro-organismen verstrekkende gevolgen heeft voor het onderzoek op het gebied van de medische microbiologie heden ten dage. Daarom hebben gegevens, verkregen met ongedefinieerde culturen in ongedefinieerde groei-omstandigheden, een zeer beperkte voorspellende waarde voor de situatie in vivo. Hoewel het aantal groei-omstandigheden, onderzocht in dit proefschrift beperkt was, illustreren de resultaten het belang van het milieu op de productie van stafylocoagulase door S. aureus. Het is duidelijk dat veel meer

gegevens nodig zijn over de aard van de groei-omstandigheden van S. aureus tijdens het infectie-proces. Wanneer meer feitenmateriaal beschikbaar is over het natuurlijke milieu van S. aureus, dat ongetwijfeld sterk nutriënt-beperkend zal zijn, kan een beter inzicht worden verkregen in de rol van stafylocoagulase in de virulentie en pathogeniteit van dit organisme. Het is te verwachten dat onderzoek naar deze milieu parameters een betere strategie zullen verschaffen voor de behandeling en voorkoming van stafylococce infecties.