

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138625> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Munckhof, E.H.A. van den

Title: 16S rRNA gene profiling: Direct and indirect applications for clinical microbiology

Issue Date: 2020-12-08

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Alle oppervlaktes van het menselijk lichaam zijn bedekt met een enorm aantal micro-organismen, waaronder bacteriën, schimmels en virussen. De samenstelling van deze microbiële gemeenschap wordt de 'microbiota' genoemd. Deze microbiële gemeenschappen zijn biochemisch van groot belang voor het menselijk lichaam. Om deze reden wordt de microbiota van verschillende lichaamslocaties intensief bestudeerd en probeert men de invloed van de microbiota op onze gezondheid vast te stellen. De bacteriële samenstelling van de microbiota wordt veelal in kaart gebracht door het 16S ribosomale RNA (rRNA) gen te onderzoeken. Het 16S rRNA gen heeft de eigenschap dat het aanwezig is in alle bacteriën. Tevens bevat dit gen naast geconserveerde DNA-gebieden ook variabele DNA-gebieden die uniek zijn per bacteriegeslacht en dus gebruikt kunnen worden voor bacteriële identificatie. Daarvoor worden één of meerdere variabele DNA-gebieden eerst vermeerderd met behulp van PCR-technieken om vervolgens de volgorde van de bouwstenen van het DNA te bepalen middels high-throughput sequencing technieken. De verkregen informatie kan gebruikt worden om alle bacteriegeslachten aanwezig in een klinisch monster te identificeren en de relatieve verhoudingen te bepalen d.w.z. het bepalen van het aantal 16S rRNA genen van een specifieke bacteriegeslacht ten opzichte van het totaal aantal 16S rRNA genen aanwezig in een klinisch monster. Deze werkwijze, bekend als '16S rRNA gene profiling', zou ook waardevol kunnen zijn voor de klinische microbiologie omdat het men in staat stelt om een theoretisch onbeperkt aantal bacteriegeslachten in een klinisch monster te identificeren zonder de afzonderlijke bacteriën te hoeven kweken. Dit laatste is een belangrijk gegeven aangezien de meeste bacteriën lastig te kweken zijn in een laboratorium. De bruikbaarheid van 16S rRNA gene profiling zou beperkt kunnen zijn doordat verschillende bacteriesoorten (species level) onder eenzelfde bacteriegeslacht (genus level) vallen. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is dan ook het evalueren van de klinische bruikbaarheid van 16S rRNA gene profiling. **Hoofdstuk 1** fungeert als een algemene inleiding waarin de term microbiota en zijn associatie met ziekten wordt uitgelegd. Daarnaast worden de verschillende high-throughput sequencing methoden voor identificatie van bacteriën beschreven. Tenslotte wordt de mogelijke waarde van 16S rRNA gene profiling voor de klinische microbiologie besproken.

In het eerste deel van dit proefschrift onderzochten we de bruikbaarheid van 16S rRNA gene profiling voor de identificatie van ziekteverwekkende bacteriën. In de routine klinische microbiologie, identificatie van ziekteverwekkers wordt standaard gedaan door het opkweken van bacteriën uit een klinisch monster, waarna de bacteriesoort en de antibioticagevoeligheid bepaald kan worden. In **Hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of een combinatie van 16S rRNA gene profiling met andere technieken potentie heeft om gebruikt te worden in de routine diagnostiek. Hiervoor hebben we 62 sputum monsters

van patiënten met een lagere luchtweginfectie geanalyseerd. Met 16S rRNA gene profiling vonden we 110 mogelijke ziekteverwekkers. Door de routine klinische microbiologie waren er 37 ziekteverwekkers gevonden. Dit verschil wordt veroorzaakt doordat 16S rRNA gene profiling geen onderscheid kan maken tussen ziekteverwekkende en onschuldige bacteriesoorten binnen een bacteriegeslachten, terwijl de routine klinische microbiologie zich focust op een kleine groep ziekteverwekkers. Vandaar dat het belangrijk is om te bepalen welke relatieve hoeveelheid van een bacteriegeslacht klinisch relevant is, d.w.z. wijzen op betrokkenheid bij een infectie. Dit bleek een uitdaging. Hierop hebben we gebaseerd dat 16S rRNA gene profiling een beter overzicht geeft van de bacteriële samenstelling van een sputum monster en dat het potentie heeft om ziekteverwekkers te identificeren maar alleen in combinatie met een test die onderscheid maakt tussen ziekteverwekkende en onschuldige bacteriesoorten. Daarnaast adviseren wij om kweek toe te voegen aan deze combinatie van testen om, wanneer wenselijk, de antibioticagevoeligheid van een ziekteverwekker te kunnen bepalen. Wel zullen eerst uitdagingen zoals klinische relevantie van relatieve hoeveelheden van verschillende bacteriegeslachten, tijdsduur van sample afname tot uitslag met 16S rRNA gene profiling en kosten overwonnen dienen te worden.

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we onderzocht of 16S rRNA gene profiling voor de evaluatie van diagnostisch methoden en behandelingen gebruikt zou kunnen worden. Hiervoor hebben we ons eerst gericht op het vaginale microbiota. Onder gezonde vaginale microbiota verstaan wij dominantie van het bacteriegeslacht *Lactobacillus*. Wanneer vrouwen afwijkende vaginale afscheiding hebben, is het mogelijk dat de balans van de vaginale microbiota is verstoord. Bij een verschuiving van vaginale microbiota gedomineerd door *Lactobacillus* naar een meer gevarieerd microbiota met vooral bacteriën die zonder zuurstof kunnen leven (anaerobe bacteriën), spreken we van bacteriële vaginose (BV). In **Hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of 16S rRNA gene profiling als een alternatieve referentie test voor het evalueren van bestaande diagnostische testen gebruikt zou kunnen worden. Voor dit doel werden voor 115 vaginale swabs/vrouwen de resultaten van vijf verschillende diagnostische testen vergeleken met 16S rRNA gene profiling. Voor 16S rRNA gene profiling hebben we daarbij gebruik gemaakt van een gepubliceerde afkapwaarde voor de relatieve hoeveelheid van *Lactobacillus* om onderscheid te maken tussen gezonde vaginale microbiota en BV. Iedere diagnostische test was in minimaal 92% van de swabs het eens met de BV negatieve uitslag van 16S rRNA gene profiling. Dit suggereert dat de gebruikte afkapwaarde voor *Lactobacillus* erg accuraat is om BV negatieve vrouwen mee te identificeren. Van de swabs die BV positief waren met 16S rRNA gene profiling was iedere diagnostische test het eens in 39%-82% van de swabs. De diagnostische methodes waren het vaak niet met elkaar eens wat suggereert dat het lastig is om vrouwen met BV te identificeren. Deze onenigheid lijkt te worden veroorzaakt door de onduidelijke symptomen, de hoge variatie aan bacteriën die met BV worden geassocieerd en de beperkte aantal

bacteriën die gedetecteerd kunnen worden met een diagnostische test. Hier heeft 16S rRNA gene profiling geen last van. Hierop hebben we gebaseerd dat 16S rRNA gene profiling een goede alternatieve referentie test zou zijn voor het evalueren van diagnostische testen.

Vervolgens hebben we onze aandacht verschoven van evaluatie van diagnostische testen naar de evaluatie van behandelingen. Van de vrouwen die behandeld worden voor BV, keer 40% terug bij de arts met dezelfde klachten als voor de behandeling. In **Hoofdstuk 4** hebben we eerst bepaald of deze blijvende klachten het resultaat waren van een falende behandeling of dat de vrouwen verkeerd waren gediagnostiseerd en daardoor een verkeerde behandeling hadden gekregen. Hiervoor werd de vastgestelde diagnose van de arts vergeleken met de test resultaten van 16S rRNA gene profiling en diagnostische testen voor vaginale schimmelinfecties en seksuele overdraagbare aandoeningen. Van de 27 vrouwen die terugkeerde bij de arts met dezelfde klachten, bleek dat 30% een verkeerde diagnose had gehad en dat in een andere 30% van de vrouwen de behandeling niet werkte of ze hadden een andere vaginale infectie opgelopen na de behandeling. Deze data toonde aan dat 16S rRNA gene profiling niet altijd voldoende is als onafhankelijke test, omdat het alleen informatie geeft over bacteriën en niet over de aanwezigheid van andere organismen. De volgende stap was om te begrijpen waarom behandeling van BV faalt voor sommige vrouwen. In **Hoofdstuk 5** hebben we uitgebreide analyses uitgevoerd op de 16S rRNA gene profiling data van 21 vrouwen met BV waarvan 9 klachten hielden na de behandeling. Voor en na behandeling konden we twee verschillende microbiota onderscheiden. Voor behandeling werden de microbiota gekarakteriseerd door de aanwezigheid van de bacteriegeslachten *Lactobacillus*, *Gardnerella* en *Atopobium* of door *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella* en *Sneathia*. Na behandeling werd de microbiota gekarakteriseerd door de dominantie van *Lactobacillus* of de aanwezigheid van verschillende bacteriën. Helaas vonden we geen associatie tussen de microbiota samenstelling voor of na behandeling en blijvende klachten. Het is mogelijk dat specifieke bacteriestammen met hoog ziekmakend vermogen betrokken zijn bij het falen van de behandeling. Deze kunnen helaas met 16S rRNA gene profiling niet onderscheiden worden van bacteriestammen met een lager ziekmakend vermogen. Samengevat, 16S rRNA gene profiling is een handige tool voor het beter begrijpen waarom sommige vrouwen terugkeren bij de arts met dezelfde klachten als voor de behandeling van BV, maar het niet kunnen onderscheiden van bacteriestammen met hoog en laag ziekmakend vermogen vormt een tekortkoming van deze methode.

In **Hoofdstuk 6** hebben we verder gekeken naar de bruikbaarheid van 16S rRNA gene profiling voor het bepalen van de impact van een behandeling op de microbiota. Deze keer hebben we onderzocht hoe 16S rRNA gene profiling toegepast zou kunnen worden in klinische studies voor het evalueren van de effectiviteit van nieuwe medicijnen in patiënten met atopisch dermatitis (AD) oftewel atopisch eczema. Voor deze klinische studies is de huid microbiota interessant, omdat AD geassocieerd is met kolonisatie van de huid met de bacterie *Staphylococcus aureus* en verminderde microbiota diversiteit. De microbiota

compositie van gezonde huid kan erg verschillen tussen individuen (inter-individuele variatie) en over tijd bij eenzelfde individu (intra-individuele variatie) door gastheer- en omgevingsfactoren, zoals antibioticagebruik, hygiëne en levensstijl. Het is waarschijnlijk dat de aangedane huid van patiënten met AD een nog grotere inter- en intra-individuele variatie vertoont. Dit zou betekenen dat het nodig is om regelmatig huid swabs af te nemen voor het evalueren van de impact van een behandeling op de huid microbiota. Om deze reden hebben we de inter- en intra-individuele variatie van de huid microbiota bepaald bij 20 patiënten met AD bij wie wekelijks, over een periode van 42 weken, huid swabs waren afgenomen. In vergelijking met de niet aangedane huid vonden we een erge hoge variatie in microbiota diversiteit tussen patiënten en een erg variabele microbiota diversiteit over tijd. Vergelijkbare resultaten vonden we voor de relatieve hoeveelheid van het bacteriegeslacht *Staphylococcus* en concentratie van het bacteriesoort *Staphylococcus aureus*. Daarnaast konden we de personen in drie groepen indelen op basis van de microbiota diversiteit, hoeveelheid *Staphylococcus aureus* en microbiota stabiliteit over tijd. Deze resultaten bevestigen dat het regelmatig afnemen van huid swabs nodig is om goede conclusies te kunnen trekken over de impact van een behandeling op de aangedane huid microbiota van patiënten met AD.

In het derde deel van dit proefschrift hebben we 16S rRNA gene profiling als onderzoeksmethode gebruikt om de link tussen microbiota en ziektes te onderzoeken. Momenteel wordt dit type onderzoek veel uitgevoerd, maar wij geloven dat meer fundamenteel onderzoek nodig is voordat microbiota studies vertaald kunnen worden naar de kliniek. Om dit te illustreren hebben we in **Hoofdstuk 7** 16S rRNA gene profiling gebruikt om te onderzoeken of specifieke neus en/of keel microbiota profielen geassocieerd zijn met hogere leeftijd en luchtweginfecties. Hiervoor hebben we microbiota data van 152 controlepersonen en 152 patiënten met een bovenste of onderste luchtweginfectie geanalyseerd. In totaal hebben we 8 neus en 9 keel microbiota profielen kunnen onderscheiden. Helaas konden we niet aantonen waarom ouderen gevoeliger zijn voor luchtweginfecties ten opzichte van jongvolwassenen. Verrassend genoeg vonden we wel aanwijzingen voor een associatie tussen gezondheid en neus microbiota gedomineerd door de bacteriesoort *Moraxella nonliquefaciens* in de oudere populatie. Op basis van deze resultaten zou je kunnen zeggen dat de oudere populatie voordeel heeft bij kolonisatie met *Moraxella nonliquefaciens*. Toch is er voorzichtigheid geboden met het vertalen van dit onderzoek naar de kliniek. De resultaten zijn gebaseerd op een momentopname en om aan te kunnen tonen dat *Moraxella nonliquefaciens* echt geassocieerd is met gezondheid zou een grote populatie mensen over tijd gevolgd moeten worden. Daarnaast is fundamenteel onderzoek nodig om de beschermende eigenschappen van *Moraxella nonliquefaciens* te onderzoeken voordat we *Moraxella nonliquefaciens* gaan toedienen bij ouderen als probiotica. Een tweede studie die illustreert dat we voorzichtig moeten zijn met het direct

vertalen van microbiota onderzoek naar de kliniek is beschreven in **Hoofdstuk 8**. Hier hebben we onderzocht of er mogelijke associatie is tussen de penis en urine microbiota en een chronische inflammatoire, littekendermatose geassocieerd met peniskanker oftewel male genital lichen sclerosus (MGLSc). Voor dit doel hebben we microbiota data geanalyseerd van 40 controlepersonen en 40 mannen met MGLSc. We vonden een aantal verschillen tussen de penis microbiota van gezonde mannen en mannen met MGLSc. Een verschil daarvan was dat het de prevalentie en de relatieve hoeveelheid van het bacteriegeslacht *Fusobacterium* verhoogd leek te zijn in mannen met MGLSc ten opzichte van de controle populatie. Dit was met name interessant omdat de bacteriesoort *Fusobacterium nucleatum* geassocieerd wordt met verschillende inflammatoire ziektes en kanker. Bij het trekken van conclusies speelt hier opnieuw monster afname een rol. De monsters zijn verzameld op een enkel moment in tijd waardoor we niet kunnen bepalen of de verschillen in microbiota de oorzaak ofwel een gevolg van de ziekte zijn. Daarnaast zou de rol van de penis microbiota in het ontstaan van MGLSc bevestigd moeten worden in een diermodel. Daarna zou pas interventie onderzoek uitgevoerd kunnen worden om nieuwe behandelingen voor patiënten met MGLSc te kunnen onderzoeken. Kortom, resultaten van microbiota studies kunnen niet direct veilig en breed vertaald worden naar de kliniek.

In het laatste deel van dit proefschrift, **Hoofdstuk 9**, evalueren we de resultaten van de onderzoeken beschreven in dit proefschrift en bediscussiëren we toekomstige onderzoeken.

