



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Exploring the role of the microbiota: in defence against *Clostridioides difficile* and multidrug resistant Gram-negatives

Terveer, E.M.

### Citation

Terveer, E. M. (2021, June 17). *Exploring the role of the microbiota: in defence against Clostridioides difficile and multidrug resistant Gram-negatives*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3188577>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3188577>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3188577> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Terveer, E.M.

**Title:** Exploring the role of the microbiota: in defence against *Clostridioides difficile* and multidrug resistant Gram-negatives

**Issue Date:** 2021-06-17

## Nederlandse samenvatting

Antibiotica hebben de mensheid een ongekende slagkracht tegen bacteriële infecties geboden. Hierdoor veranderde het beloop van vele infectieziekten, en worden jaarlijks miljoenen levens gered. De opkomst van antibiotica is misschien wel één van de meest belangrijke ontwikkelingen geweest die onze huidige hoogwaardige geneeskunde mogelijk heeft gemaakt. Zonder antibiotica is een open-hart operatie of beenmergtransplantatie bijvoorbeeld een stuk risicovoller, zo niet onmogelijk. De andere kant van de medaille is een verstoring en verarming van de menselijke bacteriële darmflora (dammicrobiota), en het ontstaan van bacteriën met antimicrobiële resistentie. Een verstoring in de microbiota resulteert in een verhoogde vatbaarheid voor een darminfectie met *Clostridioides difficile* en mogelijk voor diverse Westerse, levensstijlgeassocieerde ziekten zoals suikerziekte, kanker of inflammatoire darmziekten (colitis ulcerosa). De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) verklaarde antimicrobiële resistentie als één van de grootste uitdagingen voor de volksgezondheid van dit tijdperk, omdat het een goede behandeling van veelvoorkomende bacteriële infecties belemmerd. Naast multiresistente *Neisseria gonorrhoea* en *Candida auris* worden multiresistente Gram-negatieve bacteriën (carbapenem resistente Enterobacterales) en *C. difficile* door het Centers for Disease Control and Prevention (CDC) als meest urgente bedreigingen bestempeld.

*C. difficile* en multiresistente Gram-negatieve bacteriën (BRMO: bijzonder resistente micro-organismen) gedijen goed in een samenleving waar breed spectrum antibiotica frequent gegeven wordt. Voor beide micro-organismen speelt dragerschap in het maag-darmkanaal een belangrijke rol in de ontstaanswijze van infectie, oftewel pathogenese. Een aanzienlijk deel van gezonde mensen (2-10%) is asymptomatisch drager van *C. difficile* en/of een BRMO, maar bij slechts een beperkt gedeelte leidt dit tot ziekte. Bij gezonde asymptomatische dragers onderdrukt een complex samenspel van de darmmicrobiota, door competitie om voedsel en plaats, de uitgroei van *C. difficile* of BRMO. Dit mechanisme staat bekend als kolonisatie resistentie. Na antibioticagebruik kan de microbiota tijdelijk ernstig verstoord zijn, waardoor de kolonisatie resistentie afneemt en *C. difficile* kan uitgroeien tot grote hoeveelheden en toxines produceren die leiden tot een ontstekingsrespons met diarree en soms ernstige ontsteking van de darm (pseudomembraneuze colitis of zelfs toxisch megacolon).

Het doel van dit proefschrift is beter inzicht te verschaffen in de rol van de microbiota in verdediging tegen infecties met multiresistente Gram-negatieven en *C. difficile*. Het eerste deel beschrijft de epidemiologie (het vóórkomen), en de detectie van *C. difficile* en BRMO dragerschap in verschillende populaties. Het tweede deel richt zich op de behandeling van dragerschap of infectie met deze micro-organismen, middels herstel van de verstoorde darmmicrobiota door transplantatie met gezonde donormicrobiota, oftewel fecale microbiota transplantatie (FMT).

## Deel I: Nieuwe inzichten in de epidemiologie van *Clostridioides difficile* en multiresistente Gram-negatieve bacteriën

Lang werd gedacht dat infecties met *C. difficile* verworven werden in het ziekenhuis door (nosocomiale) overdracht via symptomatische patiënten. Recent verschenen er enkele publicaties waarin werd beschreven dat de overdracht van *C. difficile* naar de ziekenhuisomgeving, gezondheidsmedewerkers en andere patiënten ook wordt gefaciliteerd door patiënten die *C. difficile* asymptomatisch met zich mee dragen. Herkenning van deze asymptomatische dragers is daarom essentieel om de omvang van *C. difficile* verspreiding te bepalen en mogelijk te verminderen. De laboratorium-technieken om asymptomatisch gekoloniseerde patiënten te herkennen, zijn onderzocht in **hoofdstuk 2**. In de feces van patiënten zonder klachten van diarree en afgenomen bij opname in één van drie grote ziekenhuizen in Nederland, werden drie verschillende diagnostische *C. difficile* testen vergeleken met de toxigene kweek als gouden standaard. De feces werd getest met een enzym-linked fluorescent assay (ELISA) gericht op glutamaat dehydrogenase (GDH) en twee moleculaire testen gericht op het toxine gen (de commerciële artus PCR gericht op toxine A en B, en een *in-house* PCR enkel gericht op toxine B). Uit deze studie bleek dat 5.1% van de patiënten bij opname in het ziekenhuis een *C. difficile* bij zich droeg; 3.1% was drager van een toxine producerende *C. difficile*. In deze laag endemische setting van *C. difficile* dragerschap kunnen alle drie de testen worden gebruikt als eerste screeningstest, gelet op de hoge negatief voorspellende waarde. Net als bij de diagnose van patiënten met een *C. difficile* infectie (CDI), is de positief voorspellende waarde bij lage prevalentie (weinig vóórkomen) niet optimaal. Een discrepantieanalyse liet zien dat het merendeel van het relatief kleine aantal fout-positieve testen niet kon worden bevestigd na herhaling. Nu we weten dat *C. difficile* dragers goed gedetecteerd kunnen worden, rijst de vraag wat te

doen met een positieve bevinding. Alhoewel dragers een bron voor verspreiding van *C. difficile* kunnen zijn, en in een Canadese studie het isoleren van dragers leidde tot een vermindering van in het ziekenhuis ontstane CDI, werd dit voordeel in een Nederlandse studie (2016-2018) niet bevestigd. In Nederland worden *C. difficile* dragers niet actief opgespoord. Indien dragerschap wordt gevonden in patiënten met diarree door een andere oorzaak dan CDI zal de patiënt echter wel in isolatie worden gelegd.

Ook voor BRMO's speelt nosocomiale transmissie door asymptomatisch dragers een significante rol. Preventie van BRMO-transmissie binnen ziekenhuizen wordt nagestreefd door geselecteerde patiëntgroepen met een hoog risico op dragerschap te screenen en zo nodig te isoleren. Eind 2015 werd in China een nieuw soort colistine resistentie (*mcr-1*) bij Enterobacterales ontdekt in dier en mens. Colistine is een reserve-antibioticum dat ingezet kan worden ter behandeling van BRMO's. Nieuw aan deze vorm van resistentie is dat het plasmide gemedieerd is. Dit betekent dat de overdracht van de resistentie tussen verschillende bacteriën veel gemakkelijker zal gaan. Momenteel zijn tien *mcr*-genen (*mcr-1* tot *mcr-10*) ontdekt in verschillende Enterobacterales. Om het risico van introductie van *mcr* door asymptomatisch dragers in ons academisch ziekenhuis in kaart te brengen, werd in **hoofdstuk 3** de prevalentie van dragerschap bepaald van patiënten die opgenomen werden in ons ziekenhuis. Twee van de 576 (0,35%) patiënten werden positief getest op *mcr-1*. *Mcr-2* werd niet gevonden. Ten tijde van het uitvoeren van deze studie waren epidemiologische gegevens over de prevalentie van dragerschap bij gezonde individuen niet beschikbaar, maar enkele recente onderzoeken van het RIVM bevestigden het lage percentage dragerschap (0,5%) van *mcr-1* positieve bacteriën bij gezonde mensen. De verspreiding van *mcr* vanuit de samenleving naar de ziekenhuisomgeving in Nederland is dus laag. In ons onderzoek werd een fenotypisch colistine gevoelige *mcr-1* bevattende *Escherichia coli* gekweekt. De discrepantie tussen de fenotypische en moleculaire bepaling bleek te berusten op een defect *mcr-1* gen (1329kb transposon in het *mcr-1* gen). Het resistentiegen kwam hierdoor niet tot uiting, waardoor de bacterie gevoelig bleef voor colistine. Dit onderstreept het belang van fenotypische bevestiging na moleculaire screening op een resistentietargetgen.

Verpleeghuisbewoners hebben een aantal risicofactoren die kolonisatie en infectie met *C. difficile* en BRMO bevorderen. Veel bewoners komen veelvuldig in het zieken-

huis of hebben andere zorgcontacten. Daarnaast is er vaak intensief contact tussen de medebewoners en zijn sommige bewoners fecaal incontinent, waardoor verspreiding van BRMO's wordt vergemakkelijkt. In **hoofdstuk 4** wordt beschreven dat risicofactoren voor dragerschap en infectie frequent aanwezig zijn bij Nederlandse en Ierse verpleeghuisbewoners, maar dit leidde niet tot een hoge prevalentie van BRMO's; respectievelijk 9% en 11% van de Nederlandse en Ierse verpleeghuisbewoners was drager van een Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) producerende *E. coli*. Geen van de patiënten had een carbapenemase producerende Enterobacterales, vancomycine resistente enterokok of *C. difficile* in de ontlasting. Met behulp van de DNA-typingstechniek 'core-genome multi locus sequence typing' (cgMLST) werd kleinschalige verspreiding van BRMO's tussen verpleeghuisbewoners van eenzelfde afdeling binnen het Nederlandse verpleeghuis, en tussen verschillende afdelingen in het Ierse verpleeghuis aangetoond. Dit verschil in transmissie van BRMO's tussen beide landen zou een weerspiegeling kunnen zijn van verschillen in de werkwijze en de infrastructuur van de onderzochte verpleeghuizen in Ierland en Nederland, zoals bijvoorbeeld meerpersoonskamers en een andere invulling van de activiteiten in gemeenschappelijke ruimtes.

De hoofdstukken van deel I van dit proefschrift beschrijven dat asymptomatische kolonisatie van BRMO's en *C. difficile* een reservoir kan vormen voor nosocomiale transmissie. De prevalentie ervan is in Nederland echter (nog) laag, en de huidige praktijk van detectie en preventie in Nederland lijkt dus effectief.

## **Deel II: De oprichting van een Nederlandse Donor Feces Bank om microbiota transplantatie te faciliteren**

Het doel van feces microbiota transplantatie (FMT) als behandeling van terugkerende *Clostridioides difficile* infectie (rCDI) is het verbeteren van de microbiota samenstelling middels het inbrengen van gezonde donormicrobiota, waardoor de kolonisatie resistentie tegen *C. difficile* hersteld wordt. Hierdoor kan *C. difficile* niet opnieuw uitgroeien, toxinen produceren en de symptomen van een infectie veroorzaken. FMT is inmiddels in nationale en internationale richtlijnen als gevestigde behandeling voor mensen met rCDI opgenomen, en wordt ook veelvuldig onderzocht als behandeloptie voor andere ziekten. Fecesbanken die zich kunnen richten op zowel

de standaardisatie, veiligheid, kwaliteitswaarborging, beperking van kosten én doelmatigheid zijn hierdoor in toenemende mate van belang. Fecesbanken leveren kant-en-klare fecessuspensies voor behandeling van rCDI patiënten in het eigen, lokale ziekenhuis. **Hoofdstuk 5**, 'How to run a stool bank' beschrijft de oprichting van de Nederlandse Donor Feces Bank (NDFB). Het geeft inzicht in de zeer strenge screening en selectieprocedure van donoren en de bereiding, opslag en toediening van fecessuspensies. De eerste patiëntengroep die met door NDFB uitgegeven fecessuspensies werd behandeld, is gevolgd om de kwaliteit van onze behandeling te evalueren. In vergelijking met andere fecesbanken of FMT-expert centra heeft de NDFB een relatief hoog rCDI genezingspercentage van bijna 90% na twee maanden en van meer dan 70% na een gemiddelde follow-up van 42 weken (**hoofdstuk 6**). Dit hoge succespercentage wordt waarschijnlijk mede verklaard door de inspanningen van ons multidisciplinaire FMT-expertpanel. Dit expertpanel bestaat uit een arts-microbioloog, maag-darm-leverarts en internist gespecialiseerd in infectieziekten, en bespreekt de indicatie van de patiënt aangemeld voor FMT, en adviseert tijdens de behandeling en follow-up van de patiënten. Deze strategie resulteert in een effectief, veilig en doelmatig gebruik van FMT voor de behandeling van rCDI.

Bij donorscreening zijn nog een aantal niet opgeloste microbiologische vraagstukken. Gezonde donoren die bijvoorbeeld drager zijn van de parasiet *Blastocystis* worden uitgesloten van FMT-donorschap. Dit resulteert in exclusie van een aanzienlijk deel van gezonde donoren (30-50%). Het is de vraag of dit gerechtvaardigd is omdat het ziekmakend vermogen (entero-pathogeniciteit) van *Blastocystis* niet overtuigend aangetoond is. De in het verleden veronderstelde entero-pathogeniciteit is gebaseerd op anekdotische casusbeschrijvingen en retrospectieve studies. Interessant is dat recente literatuur juist een lage prevalentie van intestinaal *Blastocystis* dragerschap laat zien bij diverse aandoeningen geassocieerd met een verminderde diversiteit van de darmmicrobiota, zoals inflammatoire (ontsteking) darmziekten of leverziekten (hepatische encefalopathie). Daarnaast lijkt de aanwezigheid van *Blastocystis* juist geassocieerd te zijn met het hebben van een diverse en gezonde darmmicrobiota. De donoren van de NDFB worden gescreend op *Blastocystis* middels microscopie en niet met de meer gevoelige PCR (polymerase chain reaction) techniek. Doordat twee donoren en hun fecessuspensies gebruikt voor fecestransplantatie achteraf *Blastocystis* PCR positief bleken te zijn, kon een eventuele overdracht van *Blastocystis* van donor

naar patiënt onderzoeken. Door een combinatie van DNA-technieken op ontlastingsmonsters afgenomen van patiënten vóór en na de FMT en hun respectievelijke donor, beschrijven wij de eerste mens op mens transmissie van *Blastocystis* in **hoofdstuk 7**. De helft van de patiënten die *Blastocystis* positieve donorontlasting ontvangt, draagt deze drie weken nadien nog steeds. Deze transmissie had geen invloed op het succespercentage van FMT voor de behandeling van rCDI. Belangrijker bovendien is dat de overdracht niet resulteerde in gastro-intestinale symptomatologie bij de patiënten. Deze studie is een belangrijke stap op weg naar het loslaten van de uitsluiting van *Blastocystis* bevattende donorfeces.

FMT is in verschillende onderzoeken gebuikt om BRMO uit het maag-darmkanaal te verwijderen, maar de resultaten zijn nog niet heel bemoedigend. In **hoofdstuk 8** wordt het potentieel van FMT voor de eradicatie van BRMO-dragerschap onderzocht bij een patiënt die leed aan recidiverende urineweginfectie met een BRMO (carbapenemase producerende *Pseudomonas aeruginosa*). De patiënt kwam hierdoor niet in aanmerking voor een nier-pancreastransplantatie. Een FMT aansluitend op een antibiotica voorbehandeling voorkwam een recidief van de BRMO *Pseudomonas* urineweginfectie en werd de *Pseudomonas* niet meer aangetroffen in het maag-darmkanaal van de patiënt. Hoewel de behandeling een klinisch succes was, werd een gedeeltelijk microbiologisch falen waargenomen aangezien darmkolonisatie met een ESBL-producerende *E. coli* (ook een BRMO) wel persisteerde. In tegenstelling tot de zeer verstoorde darmmicrobiota bij rCDI patiënten, werd middels microbiota analyse (16S rRNA analyse) bij deze patiënt een vrijwel intacte diversiteit en samenstelling van de darmmicrobiota aangetroffen vóór transplantatie. Dit suggereert dat een intacte microbiota van de patiënt mogelijk minder vatbaar is voor vervanging van ongewenste bacteriën, en vereist eradicatie van de BRMO *E. coli* andere, complexere microbiota interventies.

Met het toenemende aantal studies die wijzen op de mogelijk gunstige effecten van FMT bij patiënten met verschillende aandoeningen binnen en buiten het maag-darm kanaal, wordt in de nabije toekomst een toenemende vraag naar zorgvuldig gescreende en goed gekarakteriseerde fecessuspensie verwacht. In het gehele proces van onderzoek, implementatie en vervolgens langdurige monitoren van de uiteindelijke uitkomsten zullen fecesbanken kunnen faciliteren. De ervaringen van dit proef-



schrift kunnen bijdragen aan het opzetten, standaardiseren en verder ontwikkelen van fecesbanken en onderzoeksinstituten van microbiota modifierende therapieën.

## Toekomst microbiota modifierende therapieën

Bij de oprichting van de NDFB in 2015 werd algemeen aangenomen dat andere microbiota-modulerende therapieën (bijvoorbeeld next generation probiotics) FMT voor rCDI binnen vijf tot tien jaar zouden vervangen. Tot op heden is echter geen enkel microbiota-modulerend medicijn even effectief gebleken als FMT voor de behandeling van rCDI. Het samenstellen van een goed gekarakteriseerde bacteriële microbiota gemeenschap met het vermogen om de kolonisatie resistentie tegen *C. difficile* infectie te herstellen bij een patiënt, is veel moeilijker dan eerder werd aangenomen. Het lijkt erop dat de kracht van FMT bestaat uit de transplantatie van een compleet en werkend ecosysteem. Tegelijkertijd schuilt hierin ook het gevaar, namelijk het transplanteren van een compleet, maar ongecontroleerd, ongestandaardiseerd en niet volledig begrepen ecosysteem. Dit brengt theoretisch het risico mee op overdracht van een andere microbiota geassocieerde aandoening. Gelukkig blijken deze risico's tot nu toe verwaarloosbaar, al kunnen de langetermijnevolgen nog niet compleet worden overzien. Op dit moment blijft FMT als ruwe diamant de gouden standaard. Voor de ontwikkeling van meer geavanceerde precisie-microbiota therapieën, zal FMT de weg plaveien door mechanistische inzichten te verschaffen in de effecten van de getransplanteerde donor microbiota op de specifieke ziekte. In de toekomst staat bij voorkeur een arsenaal van verschillende microbiota-precisie therapieën tot onze beschikking voor diverse ziekten, welke afhankelijk van de specifieke verstoring van de microbiota op maat kunnen worden toegediend als gepersonaliseerde behandeling.