



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Microbiome-mediated colonization resistance: defense against enteropathogens and multi-drug resistant organisms

Ducarmon, Q.R.

Citation

Ducarmon, Q. R. (2022, March 23). *Microbiome-mediated colonization resistance: defense against enteropathogens and multi-drug resistant organisms*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3280022>

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/1887/3280022>

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

Nederlandse samenvatting
Acknowledgements
List of publications
PhD Portfolio
Curriculum vitae

Nederlandse samenvatting

Onderzoek naar het darmmicrobioom, de verzameling van micro-organismen in de darmen, is de afgelopen jaren enorm toegenomen door de vele ontdekkingen die de cruciale rol van het microbioom op de menselijke gezondheid benadrukken. Het darmmicrobioom is bijvoorbeeld belangrijk voor het produceren van bepaalde essentiële vitamines, het fermenteren van voedingsvezels die door de mens zelf niet kunnen worden afgebroken en het trainen van het immuunsysteem. Bovendien is het verlenen van kolonisatieresistentie een zeer belangrijke functie die het microbioom kan vervullen. Microbioom-gemedieerde kolonisatieresistentie houdt in dat het microbioom voorkomt dat potentiële pathogenen of exogene micro-organismen zich in de darm vestigen en een infectie veroorzaken. Er zijn vele mechanismen bekend waarmee het microbioom kolonisatieresistentie kan verlenen. Voorbeelden hiervan zijn competitie om plaats en nutriënten, het produceren van antimicrobiële stoffen en de interactie met het immuunsysteem. Echter, deze mechanismen, en daarmee de beschermende rol van het microbioom tegen pathogenen, kunnen negatief worden beïnvloed door verschillende factoren, waaronder het gebruik van antibiotica. Hoewel antibioticagebruik miljoenen levens heeft gered door het succesvol bestrijden van bacteriële infecties, heeft het een keerzijde vanwege mogelijk ernstige beschadiging van het darmmicrobioom.

Door het veelvuldige gebruik van antibiotica in de afgelopen decennia komt er ook steeds meer aandacht voor het gevaar van bijzonder resistente micro-organismen (BRMO). Dit uit zich ook in de vorm van speciale onderzoeksprogramma's met het thema antibioticaresistentie die nationale onderzoeksinstituten momenteel hebben. Behalve dat BRMO's ernstige en moeilijk te behandelen infecties kunnen veroorzaken, is er ook een grote groep mensen die asymptomatisch gekoloniseerd is met een BRMO en daarmee niet alleen bijdraagt aan ongemerkte verspreiding, maar ook een verhoogd risico loopt op het ontwikkelen van een infectie veroorzaakt door de BRMO. Een mogelijke verklaring voor het feit dat het grootste deel van de asymptomatisch gekoloniseerde mensen geen infectie oploopt, is dat het microbioom in deze situatie voorkomt dat de BRMO kan uitgroeien, hoewel andere factoren, zoals het immuunsysteem, tenminste even belangrijk zijn. Het is van belang meer inzicht te krijgen in dit proces. Idealiter zou men begrijpen welke micro-organismen of welke functies in het microbioom van asymptomatisch gekoloniseerde mensen ervoor zorgen dat zij geen infectie ontwikkelen, terwijl dat bij anderen wel gebeurt. Dit zou op termijn kunnen leiden tot de ontwikkeling van specifieke microbioom-gebaseerde medicijnen die zulke infecties, of zelfs asymptomatische kolonisatie, kunnen genezen of voorkomen.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is uitgevoerd met als doel darmbacteriën te identificeren die een rol kunnen spelen in het verlenen van kolonisatieresistentie tegen

potentiële pathogenen en BRMO's in het maag-darmkanaal. Dit proefschrift bestaat uit drie delen. In deel 1 van dit proefschrift wordt microbioom-gemedieerde kolonisatieresistentie besproken vanuit een theoretisch perspectief en wordt samengevat wat momenteel de uitdagingen en mogelijkheden zijn voor het ontwikkelen van microbioom-gebaseerde therapieën. In deel 2 wordt dieper ingegaan op de methodiek voor zowel laboratorium-gebaseerde als computer-gebaseerde technieken om microbioomanalyses optimaal uit te kunnen voeren. Ten slotte worden in deel 3 verschillende klinische studies beschreven die zijn uitgevoerd om mogelijk beschermende darmbacteriën te identificeren.

Deel 1: Mechanismen van microbioom-gemedieerde kolonisatieresistentie en hoe microbioom-gebaseerde therapieën te ontwikkelen

Het concept dat het darmmicrobioom belangrijk is ter verdediging tegen darminfecties met enteropathogene micro-organismen is al lange tijd bekend. In **hoofdstuk 2** worden de verschillende mechanismen die bijdragen aan microbioom-gemedieerde kolonisatieresistentie in detail besproken, zoals de productie van antimicrobiële stoffen en competitie om nutriënten. Een belangrijk nieuw deel van het microbioomonderzoeksveld is het effect van medicijnen op de werking van het microbioom (en andersom ook het effect van het microbioom op de effectiviteit van medicijnen). Dit nog zeer nieuwe onderzoeksveld wordt *pharmacomicrobiomics* genoemd. Om deze redenen worden de effecten van verschillende, veelgebruikte medicijnen, zoals metformine en maagzuurremmers, op kolonisatieresistentie beschreven. Hoewel het belangrijk is om, vanuit het perspectief van het microbioom, onderliggende werkingsmechanismen die leiden tot kolonisatieresistentie te begrijpen, is het ook cruciaal om te weten hoe enteropathogenen deze mechanismen kunnen omzeilen. Om deze reden wordt voor acht veel voorkomende enteropathogene bacteriën uitgebreid beschreven hoe zij deze verdedigingsmechanismen ontwijken.

In **hoofdstuk 3** wordt ingegaan op wat er nodig is voor het ontwikkelen en produceren van microbioom-gebaseerde therapieën, met de nadruk op consortia van levende bacteriën (*live biotherapeutic products*; LBP's). Hiervoor is samengewerkt met één van de leiders in dit veld, het Amerikaanse biotechbedrijf Vedanta Biosciences. Met dit bedrijf heeft de afdeling Medische Microbiologie een wetenschappelijk samenwerking om een optimaal LBP voor patiënten met recidiverende *Clostridioides difficile* infectie te ontwikkelen die de feces microbioom transplantatie (FMT) kan vervangen. Er is een product ontwikkeld van acht bacteriesoorten die op dit moment (2021) in een fase 2/3 onderzoek wordt getest. De twee voornaamste voordelen van het potentieel gebruik van LBP's ten opzichte van FMT is geen risico van overdracht van ongewenste, onbekende en potentieel schadelijke bacteriën met metabole producten en de toediening van een goed omschreven en gekarakteriseerd product. Met name de overdracht van multiresistente en (entero)pathogene bacteriën zijn door de Amerikaanse FDA herkend

en vereisen speciaal ingerichte en gespecialiseerde centra (zoals de Nederlandse Donor Feces Bank; NDFB) die deze behandeling zonder risico's kunnen aanbieden.

Deel 2: Optimaliseren en standaardiseren van computationele en laboratorium-technieken voor microbioomonderzoek

In de afgelopen jaren is gebleken dat de technieken die worden gebruikt voor microbioomanalyses, zowel laboratorium- als computer-gebaseerde technieken, het uiteindelijke microbioomprofiel sterk kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 4** wordt beschreven wat het effect is van verschillende DNA-extractiemethoden en verschillende analysesoftware op het microbioomprofiel. Hoewel de analyseprogramma's ongeveer gelijk presteerden, werden er wel verschillen in prestatie gevonden tussen DNA-extractiemethoden. Deze studie heeft geleid tot een standaard DNA-extractiemethode die nog steeds in onze onderzoeksgroep wordt gebruikt. Een nog enigszins onderbelicht probleem is het includeren van negatieve controles wanneer de microbioomsamenstelling van weefsels of vloeistoffen onderzocht wordt waarin weinig bacteriën aanwezig zijn, zoals bijvoorbeeld urine en tumorweefsel. Er bestaat hierdoor een risico dat het verkregen microbioomprofiel bestaat uit een mix van contaminatie (bijvoorbeeld door DNA-moleculen die op reagentia aanwezig zijn, maar niet in het monster zelf) en biologisch signaal. Zonder negatieve controles zijn deze microbioomprofielen lastig te interpreteren. In dit hoofdstuk tonen wij het cruciale belang aan van negatieve controles, omdat enkele van de onderzochte weefsels geen biologisch microbioom bevatte, maar zo goed als identiek waren aan het microbioomprofiel verkregen uit negatieve controles. In **hoofdstuk 5** wordt de ontwikkeling van nieuwe analysesoftware beschreven waarvan het doel is om koolhydraat-actieve enzymen (CAZymes) te karakteriseren uit complexe sequentiedata (waarbij al het DNA in een monster wordt afgelezen). Ten eerste zijn er *machine learning*-technieken toegepast om deze CAZymes zo betrouwbaar mogelijk te kunnen detecteren uit sequentiedata en vervolgens zijn analysemethoden toegepast om die CAZymes uit een metagenoom te kunnen kwantificeren. Ten tweede is er een nieuw annotatieschema ontwikkeld waarin de substraten van CAZymes zijn gegroepeerd in functioneel informatievere groepen, zoals bijvoorbeeld een groep CAZymes die voedingsvezels kunnen afbreken. Tot slot hebben wij deze nieuw ontwikkelde tool toegepast op beschikbare data van verschillende cohorten waarin het microbioom van darmkankerpatiënten vergeleken is met controlepersonen. Hierin konden wij aantonen dat het microbioom van darmkankerpatiënten meer CAZymes bevat die een substraat van dierlijke oorsprong verwerken (glycosaminoglycanen) en minder CAZymes bevat die een rol spelen bij het verwerken van voedingsvezels.

Deel 3: Het identificeren van micro-organismen die geassocieerd zijn met kolonisatieresistentie in klinische studies

Het laatste, en belangrijkste deel van dit proefschrift, bestaat uit klinische studies

waarin het doel was om bacteriën te identificeren die geassocieerd kunnen worden met kolonisatieresistentie. Dit zou op termijn kunnen leiden tot het gebruik van deze beschermende bacteriën in een LBP.

In **hoofdstuk 6** hebben wij het darmmicrobioom van drie patiëntgroepen vergeleken, een groep patiënten met *C. difficile*-infectie, een groep patiënten die asymptomatisch gekoloniseerd is met *C. difficile* en een controlegroep van patiënten die niet gekoloniseerd is door *C. difficile*. Zodoende hebben wij verschillende bacteriën (voornamelijk *Eubacterium hallii* en *Fusicatenibacter*) gevonden die mogelijk bescherming bieden tegen *C. difficile*-kolonisatie. Een andere belangrijke bevinding was dat asymptomatisch gekoloniseerde patiënten een lagere microbioomdiversiteit hadden ten opzichte van niet-gekoloniseerde patiënten. De mate waarin de twee eerdergenoemde bacteriesoorten ook echt beschermend zouden kunnen zijn tegen *C. difficile* zal nader onderzocht moeten worden, aangezien we met deze data alleen een associatie hebben aan kunnen tonen en geen oorzakelijk verband.

Hoofdstuk 7 beschrijft een studie waarin 20 gezonde vrijwilligers in het LUMC geïnfecteerd werden met *Necator americanus*, een mijnworm die voornamelijk in tropische gebieden voorkomt en die buikpijn, bloedarmoede en een eiwittekort kan veroorzaken. Door het microbioom voor en tijdens de infectie in kaart te brengen, konden wij de veranderingen over de tijd bestuderen. Eerder onderzoek liet wisselende resultaten zien op dit gebied. Hoewel er in onze studie geen consistente mijnworm-geïnduceerde effecten konden worden gedetecteerd, was er wel een verschil in de stabiliteit van het microbioom tussen patiënten met verschillende klinische symptomen na de besmetting. Deze resultaten tonen aan dat er wel een verband bestaat tussen mijnworm-geïnduceerde symptomen en de stabiliteit van het microbioom, maar er zijn geen specifieke bacteriën gevonden die mogelijk beschermen tegen besmetting en het ontstaan van symptomen.

Verpleeghuisbewoners hebben een verhoogd risico om in het darmstelsel gekoloniseerd te worden met een BRMO. Zo gebruiken zij veelvuldig antibiotica, wonen en leven in een relatief kleine ruimte met patiënten die uit ziekenhuizen overgeplaatst zijn en hebben intensief contact met verzorgend personeel en medebewoners. In **hoofdstuk 8** worden verschillende aspecten beschreven van de aanwezigheid van BRMO's in een Nederlands verpleeghuis, zoals de risicofactoren voor besmetting met een BRMO, de mogelijke verspreiding van BRMO's en de mogelijke rol van het darmmicrobioom op het verlenen van kolonisatie resistentie tegen BRMO's. Wij vonden dat antibioticagebruik in de twee maanden voor de monsterafname en een ziekenhuisopname in het voorafgaande jaar risicofactoren waren voor BRMO-dragerschap. Vervolgens hebben wij door het *sequenzen* van de genomen van de BRMO's kunnen aantonen dat de BRMO-genomen

van bewoners op een bepaalde afdeling zo goed als identiek waren, wat sterk suggereert dat er binnen deze afdeling van het verpleeghuis zeer waarschijnlijk verspreiding van een BRMO heeft plaatsgevonden. Voor de microbioomanalyse hebben wij de bewoners opgesplitst in twee groepen: een groep die op ten minste één tijdstip was gekoloniseerd met een BRMO en een groep die nooit gekoloniseerd was. In de groep die nooit gekoloniseerd was, werden hogere relatieve hoeveelheden van *Dorea*, *Atopobiaceae* en *Lachnospiraceae* groep ND3007 aangetroffen. Deze bacteriële taxa zijn dus mogelijk geassocieerd met bescherming tegen BRMO-kolonisatie. Tot slot observeerden wij in het microbioom van de meerderheid van verpleeghuisbewoners een hoge hoeveelheid *Bifidobacterium*, een bacterieel genus dat normaal in hoge aantallen wordt aangetroffen in de ontlasting van baby's en zeer jonge kinderen. Om uit te sluiten dat deze bevinding terug te leiden was naar probioticagebruik, hebben wij d.m.v. *metagenomic sequencing* de genomen van *Bifidobacterium* species vergeleken tussen verschillende bewoners. De *Bifidobacterium* genomen verschilden duidelijk van elkaar. We concludeerden dat er geen duidelijke gemeenschappelijke bron of overdracht tussen de verpleeghuisbewoners bestond. Aangezien wij de eerste onderzoeksgroep zijn die zo'n hoge hoeveelheid *Bifidobacterium* in de darmen van verpleeghuisbewoners hebben gevonden en we hier nog geen goede verklaring voor hebben kunnen vinden, blijven de oorzaak en het gevolg hiervan voorlopig onbekend.

Als vervolg op **hoofdstuk 8** is in samenwerking met het RIVM een studie opgezet waarin is gekeken naar het darmmicrobiom en -metabool van mensen die asymptomatisch gekoloniseerd zijn met *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL)-producerende *Escherichia coli* (**hoofdstuk 9**), een antibioticumresistente bacterie die door de Amerikaanse Centers for Disease Control and Prevention als een bedreiging voor de volksgezondheid wordt bestempeld. Een groot voordeel van deze samenwerking is dat wij data konden gebruiken uit het Pienter cohort van het RIVM. In dit cohort zijn data verzameld van duizenden volwassenen, waardoor er strenge inclusiecriteria toegepast konden worden en veel factoren konden worden uitgesloten waarvan bekend is dat ze een groot effect te hebben op de samenstelling van het microbiom. Gecombineerd met de kweekdata van ESBL-producerende bacteriën uit ongeveer 2750 personen, konden wij gebalanceerde groepen maken van ESBL-producerende *E. coli*-gekoloniseerde en niet-gekoloniseerde mensen op basis van klinische en epidemiologische variabelen. Uiteindelijk konden wij geen verschillen aantonen tussen het microbiom en metabool van gekoloniseerde en niet-gekoloniseerde mensen, wat suggereert dat microbiom-gemedieerde kolonisatieresistentie geen rol speelt tegen ESBL-producerende *E. coli*. Dit impliceert vervolgens dat microbiom-modificerende therapieën misschien niet geschikt zijn om voor dekolonisatie van deze bacterie uit de darm te zorgen.

Toekomstige microbioom-modificerende therapieën

Het uiteindelijke doel van onderzoek naar microbioom-gemedieerde kolonisatieresistentie is het ontwikkelen van therapieën die middels modificatie van het microbioom infecties kunnen voorkomen of genezen. Na een revolutionaire studie die in 2013 werd gepubliceerd, waarin FMT zeer effectief bleek tegen recidiverende *C. difficile*-infectie, was de verwachting dat FMT relatief snel vervangen zou worden door een consortium van goed gedefinieerde bacteriën, een LBP. Het grote voordeel van het toedienen van een LBP is dat men exact weet wat de patiënt krijgt en risico's daarmee geminimaliseerd kunnen worden, terwijl er bij een FMT ook mogelijk schadelijke micro-organismen of andere stoffen kunnen worden getransplanteerd. Het ontwikkelen van LBP's is echter lastiger gebleken dan verwacht en momenteel zijn er nog geen goedgekeurde therapieën gebaseerd op zulke consortia, niet voor recidiverende *C. difficile*-infectie en niet voor andere ziektes. Verschillende redenen hiervoor zijn uitgebreid besproken in **hoofdstuk 3**. Andere potentiële microbioom-modificerende therapieën zijn prebiotica (stoffen en voeding die de groei van specifieke bacteriën kunnen bevorderen) en synbiotica (het combineren van gedefinieerde bacteriële consortia met prebiotica), hoewel de klinische implementatie van deze twee middelen voor het bestrijden van infecties nog ver weg lijkt. Echter, dankzij de steeds betere mechanistische inzichten in de werking van het microbioom en het verlenen van kolonisatieresistentie, verwacht ik dat in de komende jaren de eerste LBP's zullen worden gebruikt in de kliniek om infecties effectiever te kunnen voorkomen en bestrijden. Op langere termijn zou deze toenemende kennis zelfs kunnen leiden tot meer gepersonaliseerde behandelingen, waarbij op basis van het microbioom van de patiënt en de bijbehorende ziekte verschillende LBP's gebruikt zouden kunnen worden.