



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Evaluating the potential of novel antimicrobial strategies in a multimodal treatment model for implant-related infections: antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriophages, induction heating

Verheul, M.

Citation

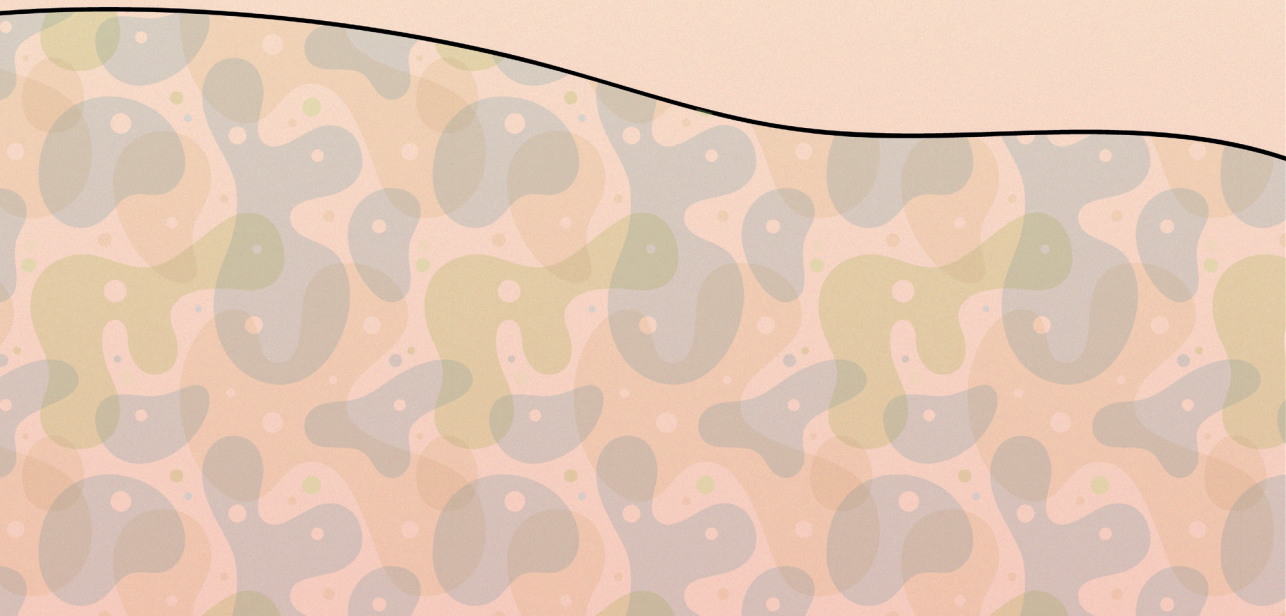
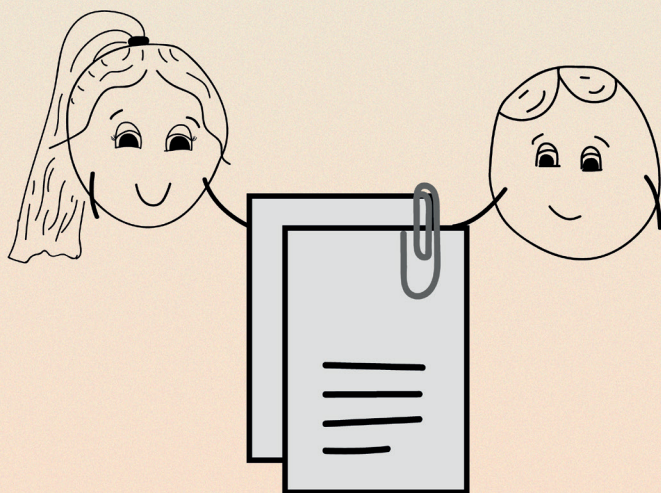
Verheul, M. (2026, September 2). *Evaluating the potential of novel antimicrobial strategies in a multimodal treatment model for implant-related infections: antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriophages, induction heating*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4309098>

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/1887/4309098>

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



Appendices

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

Portfolio

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Metalen biomaterialen worden veel gebruikt in de chirurgie, met name bij het vervangen van gewrichten en bij het vastzetten van botten na trauma. Het gebruik van deze materialen zal in de toekomst verder toenemen door vergrijzing, obesitas en de wereldwijde toegankelijkheid van deze operaties. Hoewel deze medische hulpmiddelen onmiskenbaar bijdragen aan het verminderen van pijn, het verbeteren van beweeglijkheid en het verhogen van de kwaliteit van leven, treedt bij ongeveer 2 – 31% van de patiënten na deze operaties een infectie op. Infecties rondom metalen kunstgewrichten en botbreuk-gerelateerde metalen materialen worden voornamelijk veroorzaakt door *Staphylococcus*-bacteriën, zoals *Staphylococcus aureus*.

De huidige behandeling voor acute infecties bestaat uit het grondig schoonmaken van het implantaat en het operatief verwijderen van geïnfecteerd en dood weefsel daaromheen, gevolgd door minimaal 6 weken behandeling met antibiotica. Deze procedure, bekend als DAIR, is in ongeveer 70% van de gevallen succesvol. Wanneer DAIR niet effectief is, kan worden besloten de procedure te herhalen of het geïnfecteerde implantaat te vervangen door een nieuw implantaat. Helaas zijn deze laatstgenoemde operaties in circa 14% van de gevallen niet succesvol, waardoor patiënten langdurig – soms jarenlang – antibiotica moeten gebruiken, met alle bijwerkingen van dien. Bovendien zijn vaak meerdere operaties noodzakelijk en is in zeldzame gevallen zelfs amputatie nodig om de infectie te bestrijden. Deze aanvullende ingrepen gaan gepaard met verminderde beweeglijkheid evenals meer pijn en psychische klachten, wat leidt tot een aanzienlijke afname van de kwaliteit van leven.

Implantaat-geassocieerde infecties zijn moeilijk te behandelen doordat bacteriën zoals *Staphylococcus aureus* zich aan het metalen oppervlak kunnen hechten. Op het implantaat vermenigvuldigen zij zich, waarbij ze een beschermende laag van suikers, eiwitten, vetten en DNA om zich heen vormen (**hoofdstuk 1**). Deze zogenoemde biofilm vormt een compacte structuur die zowel voor antibiotica als voor cellen en factoren van het afweersysteem slecht doordringbaar is. Daarnaast zijn biofilms slecht zichtbaar en bevinden zij zich vaak op plaatsen die voor de chirurg lastig bereikbaar zijn, wat het reinigen van het implantaat bemoeilijkt. Binnen biofilms ontstaan bacteriële subpopulaties met uiteenlopende gevoeligheden voor antibiotica. Sommige bacteriën kunnen in een soort ‘winterslaap’ gaan, waardoor ze tijdelijk minder gevoelig zijn voor antibiotica. Tevens kunnen bacteriën – spontaan of onder invloed van bijvoorbeeld antibiotica – uit de biofilm vrijkomen en op een andere plek in het lichaam een nieuwe infectie veroorzaken.

Het falen van de antibiotica-behandeling als gevolg van de bovengenoemde processen tijdens de biofilm vorming draagt bij aan de ontwikkeling van ongevoeligheid voor antibiotica in bacteriën (antibioticaresistentie). Het is daarom noodzakelijk dat alternatieve strategieën worden ontwikkeld om deze infecties te bestrijden en de ontwikkeling van antibioticaresistentie te beperken. De studies in dit proefschrift richten zich op drie alternatieven voor antibiotica en hun combinaties in relatie tot biofilms: bacteriofagen, virussen die bacteriën doden (**hoofdstukken 2, 3, 4 en 6**), verhitting van de metalen onderdelen van het implantaat met behulp van inductie (inductieverhitting; **hoofdstukken 5 en 6**) en antimicrobiële peptiden (**hoofdstukken 5 en 6**).

Antimicrobiële peptiden (AMPs) zijn kleine moleculen die in de natuur (onder andere in het menselijke immuunsysteem) voorkomen en actief zijn tegen diverse ziekteverwekkers. AMPs kunnen de celwand van de bacterie kapotmaken, waardoor de bacterie als een ballon

leegloopt en doodgaat. Op basis van natuurlijke AMPs zijn synthetische varianten ontwikkeld. Een daarvan is SAAP-148, dat zeer effectief is tegen onder andere *Staphylococcus aureus*.

Bacteriofagen zijn natuurlijke vijanden van bacteriën en zijn zeer specifiek voor bepaalde bacteriesoorten en -stammen. Zodra deze virussen specifieke structuren op het oppervlak van de bacterie (celwand) herkennen, injecteren zij hun genetisch materiaal in de bacterie. Vervolgens nemen de bacteriofagen interne systemen van de bacterie over, waardoor de bacterie nieuwe bacteriofagen gaat produceren. In de laatste fase van deze virale cyclus barst de bacterie open, waardoor alle nieuw gevormde bacteriofagen vrijkomen en de bacterie doodgaat. Deze nakomelingen kunnen vervolgens andere gevoelige bacteriën infecteren en doden.

Momenteel wordt bacteriofaagtherapie in de westerse wereld uitsluitend als laatste redmiddel toegepast bij moeilijk behandelbare infecties. Mede hierdoor is er nog weinig bekend over de effectiviteit van bacteriofaagtherapie tegen bacteriën in de verschillende fasen van de biofilm. Om dit te onderzoeken zijn de verschillende fasen van de biofilm in het laboratorium nagebootst op kleine metalen schijfjes, gemaakt van hetzelfde materiaal als klinische implantaten. **Hoofdstuk 2** beschrijft het onderzoek naar de effecten van bacteriofaag ISP, die specifiek gericht is op *Staphylococcus aureus*. Hoewel ISP zeer effectief is tegen bacteriën in suspensie, neemt de effectiviteit af naarmate de bacteriën zich aan het metalen oppervlak hechten en een biofilm vormen. Desondanks blijkt ISP in staat de biofilm binnen te dringen en interacties aan te gaan met de aanwezige bacteriën. De hoeveelheid bacteriofagen in de biofilm is echter aanzienlijk lager dan aan welke de biofilm initieel is blootgesteld. Daarnaast is ISP minder effectief tegen bacteriën in 'slaaptoestand', evenals tegen bacteriën die spontaan uit biofilms vrijkomen. Bij deze bacteriën is de ongevoeligheid voor ISP slechts tijdelijk.

Het onderzoek dat in **hoofdstuk 3** is beschreven, had als doel de overlevingsmechanismen te identificeren van bacteriën die spontaan uit biofilms vrijkomen en worden blootgesteld aan bacteriofagen. De resultaten laten zien dat een subpopulatie van deze bacteriën tijdelijk ongevoelig is voor de bacteriofagen ISP en Sb-1 bij hoge doseringen. In het onderzoek werden alle eiwitten van de gevoelige en de ongevoelige bacteriën met elkaar vergeleken. Op basis hiervan zijn twee mogelijke overlevingsmechanismen geïdentificeerd: een versterkte celwand en een verlaagde stofwisseling. Ondanks de versterkte celwand kunnen bacteriofagen hun genetisch materiaal toch in deze bacteriën injecteren. Het is mogelijk dat bacteriofagen niet in staat zijn de celwand van de bacterie in de laatste fase te openen. Een verlaagd metabolisme zorgt er mogelijk ook voor dat er minder bacteriofagen worden geproduceerd, wat eveneens bijdraagt aan het overleven van de bacteriën als groep.

In de praktijk wordt bacteriofaagtherapie vaak gecombineerd met antibiotica, waarbij de keuze van deze combinaties afhangt van de gevoeligheid van de bacterie voor beide behandelingen. Bacteriofagen en antibiotica kunnen elkaars werking versterken of juist verzwakken, waardoor het selecteren van de juiste combinatie cruciaal is. Hiervoor moet de effectiviteit van bacteriofaag-antibioticacombinaties worden getest. Het is veel efficiënter om dit op losse bacteriën in suspensie te doen dan op volwassen biofilms, die minstens 5 dagen gekweekt moeten worden. In **hoofdstuk 4** is onderzocht of de resultaten van deze combinaties op bacteriën in suspensie voorspellend zijn voor hun effectiviteit tegen biofilms op metalen schijfjes. Uit de resultaten blijkt dat de verminderde effecten van bacteriofaag-antibioticacombinaties op biofilms goed kunnen worden voorspeld op

basis van testen met bacteriën in suspensie. Helaas worden de versterkte effecten van bacteriofaag-antibiotica combinaties in biofilms onderschat in testen met bacteriën in suspensie. Desondanks kan deze testmethode worden gebruikt om ineffectieve combinaties uit te sluiten voordat de behandeling van (biofilm-gerelateerde) infecties met bacteriofagen en antibiotica wordt gestart. Tevens bleek dat dagelijkse toediening van bacteriofaag-antibiotica combinaties gedurende twee of drie opeenvolgende dagen effectiever is dan een eenmalige behandeling van 24 uur.

Naast bacteriofagen richt dit proefschrift zich ook op inductieverhitting van implantaten en antimicrobiële peptiden als alternatieve therapieën. Inductieverhitting maakt gebruik van dezelfde technologie als inductiekookplaten, waarbij uitsluitend metalen objecten kunnen worden verhit. Op deze manier kunnen geïnfecteerde metalen implantaten contactloos en selectief worden opgewarmd door middel van een spoel die een wisselend magnetisch veld genereert. Het blootstellen van bacteriën in biofilms aan hitte kan effectief zijn, aangezien hoge temperaturen belangrijke bacteriële processen en structuren kunnen beschadigen. Hitte die wordt gegenereerd met inductieverhitting kan lokaal worden toegepast en nauwkeurig worden gecontroleerd via de frequentie en de sterkte van het magnetisch veld, waardoor schade aan omliggende weefsels beperkt blijft.

In **hoofdstuk 5** is aangetoond dat het zelfontwikkelde inductieverhittingsapparaat in staat is om binnen enkele minuten kleine metalen schijfjes te verhitten tot 80 °C. Verhitting van deze metalen met daarop biofilms resulteert in een sterke vermindering van levende bacteriën, waaronder bacteriën in 'slaaptoestand' die tijdelijk ongevoelig zijn voor antibiotica. Dit maakt inductieverhitting een veelbelovende strategie wanneer antibiotica onvoldoende effectief zijn. De combinatie van inductieverhitting met het antimicrobiële peptide SAAP-148 blijkt iets effectiever in het doden van deze bacteriën dan beide behandelingen afzonderlijk.

Hoewel met inductieverhitting specifiek het metalen implantaat wordt verhit, kan er warmte worden afgegeven aan de omliggende weefsels. Om weefselschade zoveel mogelijk te beperken, is het wenselijk om lagere temperaturen te gebruiken en inductieverhitting te combineren met andere behandelingen. In **hoofdstuk 6** is aangetoond dat inductieverhitting bij lagere temperaturen, gecombineerd met opeenvolgende blootstelling aan antibiotica of SAAP-148, de effectiviteit tegen biofilms op metalen schijfjes vergroot. Dit was echter niet het geval bij inductieverhitting in combinatie met bacteriofaag ISP. Daarnaast kan inductieverhitting bacteriën in biofilms gevoeliger maken voor antibiotica waar zij eerder resistent tegen waren.

In **hoofdstuk 7** worden de bevindingen van dit proefschrift samengevat en bediscussieerd. De belangrijkste conclusie is dat een combinatie van behandelingen, tezamen met het operatief reinigen en verwijderen van het geïnfecteerde en dode weefsel, een veelbelovende toevoeging kan zijn om de behandeling van implantaat-gerelateerde infecties te verbeteren. Bovendien worden aanbevelingen gedaan voor toekomstig onderzoek. Zo zou meer aandacht moeten worden besteed aan bacteriën die uit biofilms vrijkomen en aan bacteriën die (tijdelijk) ongevoelig worden voor behandelingen. Toekomstige studies kunnen klinisch relevanter worden gemaakt door de omgeving van de gastheer beter na te bootsen, bijvoorbeeld door het toevoegen van afweercellen en lichaamsvloeistoffen aan bestaande infectiemodellen.