

# VU Research Portal

## Microbiota and Flatography in Pediatric Gastrointestinal Disease

de Meij, T.G.J.

2017

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

de Meij, T. G. J. (2017). *Microbiota and Flatography in Pediatric Gastrointestinal Disease*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **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

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Nederlandse samenvatting



In dit proefschrift wordt de samenstelling en dynamiek van het intestinale microbioom (darmbacteriën) bij kinderen onderzocht, zowel bij gezonde kinderen als bij aandoeningen van het maagdarmkanaal. Juist bij darmaandoeningen wordt namelijk verondersteld dat microbiële veranderingen een belangrijke oorzakelijke rol spelen. Kennis over de samenstelling van het microbioom in gezondheid, vanaf de geboorte tot aan de volwassenheid, is noodzakelijk om de rol ervan bij ziekte beter te kunnen begrijpen. Deze kennis kan vervolgens worden gebruikt voor de toepassing van microbioomanalyse als diagnostische test in de klinische praktijk, voor het vervolgen van ziekteactiviteit en het voorspellen van opvlammingen van chronische ontstekingsziekten van de darm. Bovendien kan deze kennis leiden tot de ontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën die gericht zijn op beïnvloeding van het microbioom en het beloop van ziekte. Bij de studies beschreven in dit proefschrift werden twee relatief nieuwe analytische technieken toegepast voor de identificatie van microbioomprofielen. De IS-pro techniek maakt het mogelijk om de samenstelling van het microbioom nauwkeurig in kaart te brengen. Deze moleculaire techniek is gebaseerd op het bepalen van de lengte van een fragment bacterieel ribosomaal DNA, de 16S-23S interspacer-regio. Deze lengte, uitgedrukt in aantal nucleotiden, is uniek voor de verschillende bacteriestammen. Daarnaast werd een elektronische neus (eNose) gebruikt om te onderzoeken of geurprofielen van ontlasting van kinderen met darmziekten te onderscheiden zijn van gezonde kinderen. De eNose is oorspronkelijk ontwikkeld door het Amerikaanse leger voor het opsporen van biochemische wapens en wordt vooralsnog sporadisch toegepast in de geneeskunde, vrijwel uitsluitend in onderzoekverband. De geur van een gasmengsel wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van vluchtige organische componenten (VOCs). VOCs worden geproduceerd door darmbacteriën en reflecteren dus de samenstelling van het microbioom, maar ook de functie en interactie met de gastheer. De IS-pro en eNose technologie zijn dus complementair; IS-pro geeft informatie over de samenstelling van darmbacteriën, terwijl VOC analyse inzicht geeft in de functie van deze darmbacteriën.

## Deel 1. Microbioom in ziekte en gezondheid

In deel een van dit proefschrift werd het microbioom van zowel gezonde kinderen als van kinderen met verschillende darmziekten onderzocht met de IS-pro techniek en met elkaar vergeleken. Het doel van **hoofdstuk twee** was om te onderzoeken wat de samenstelling en variatie van het microbioom is bij een cohort van Nederlandse kinderen. In totaal werd bij ruim 60 kinderen, van drie tot achttien jaar oud, op verschillende tijdstippen, wekelijks

gedurende zes weken en na drie maanden en anderhalf jaar, het microbioom geanalyseerd. We zagen dat er een aanzienlijke fluctuatie in samenstelling was over het verloop van enkele weken, vermoedelijk als gevolg van dieet en andere omgevingsfactoren. Op de lange termijn bleek de samenstelling van het microbioom bij kinderen redelijk stabiel, vergelijkbaar met die van volwassenen. Een opvallende bevinding was dat hoe hoger de diversiteit van het microbioom was, hoe stabiel het geheel zich over de tijd gedroeg. Het is bekend dat de diversiteit van het microbioom verlaagd is bij tal van ziekten, zoals ontstekingsziekten van de darm, obesitas en afweerstoornissen. Deze studie bevestigde dat een 'gezond microbioom' gekenmerkt wordt door een hoge diversiteit en stabiliteit, wat beschermend is tegen innesteling van potentieel ziekmakende bacteriën. Een andere opvallende bevinding was dat binnen het gezonde microbioom een groep kernbacteriën kon worden geïdentificeerd, die in grote getallen aanwezig waren bij vrijwel alle deelnemende kinderen, die we gezamenlijk geduid hebben als het kernmicrobiom (*core microbiome*). Of verandering van dit kernmicrobiom geassocieerd is met ziekte werd onderzocht in de volgende studies van dit proefschrift.

Het doel van **hoofdstuk drie** was om de samenstelling en dynamiek van het intestinale microbiom te beschrijven bij de chronische darmziekten ziekte van Crohn en colitis ulcerosa (samen IBD genoemd) op de kindertijd. De resultaten werden vergeleken met de uitkomsten van de gezonde controlegroep. Ook voor deze studie werden op verschillende tijdstippen ontlastingssamples verzameld en geanalyseerd. De eerste op het moment van diagnose, maar nog voorafgaand aan start van de medicatie, en vervolgens gedurende de eerste weken en maanden na start van de medicatie. Hierbij werd getracht individuele microbiële veranderingen door de tijd te koppelen aan ziekteactiviteit op deze verschillende tijdstippen. We zagen dat microbiomprofielen van kinderen met IBD bij diagnose met ongeveer 90% nauwkeurigheid te onderscheiden waren van gezonde controles. Opvallende bevinding was dat IBD gekarakteriseerd werd door verlies van bacteriën uit het kernmicrobiom, dat gezondheid kenmerkt. IBD lijkt dus een ziekte die vooral geassocieerd is met verlies van gezonde bacteriën en niet zozeer door invasie van ziekmakende bacteriën. Na enkele maanden therapie trad er bij deze groep enig, maar geen volledig, herstel op van deze kernbacteriën, onafhankelijk van de ziekteactiviteit. Dit suggereert dat veranderingen van het kernmicrobiom bij IBD min of meer structureel van aard zijn, wat een verklaring kan zijn voor het fluctuerende karakter van IBD. Wij concludeerden dat het kernmicrobiom een interessant aanknopingspunt is voor verdere studies naar de preventie en behandeling van IBD. In **hoofdstuk vier** beschrijven we het microbiom bij een groep Nederlandse kinderen

met ernstige, vaak therapieresistente, obstipatie. Kinderen met obstipatie konden op basis van de samenstelling van hun microbioom nauwkeurig worden onderscheiden van gezonde controles. Het onderscheid tussen beide groepen bleek te berusten op veranderingen in concentraties van een beperkt aantal verschillende bacteriesoorten, die overigens geen deel uitmaken van het kernmicrobiom. De aanwezigheid van microbiële verschillen betekent niet automatisch dat dit ook de oorzaak is van obstipatieklachten, deze kunnen ook het gevolg zijn van de obstipatie. In verschillende studies, met name in dierexperimenten, is aangetoond dat toediening van bepaalde bacteriesoorten de motiliteit van de darm positief kunnen beïnvloeden. Studies naar het effect van toediening van probioticapreparaten bij mensen hebben tot dusver echter teleurstellende resultaten opgeleverd. Of herstel van de in deze studie gevonden microbiële verschillen, bijvoorbeeld door toediening van gerichte probiotica of fecestransplantatie, verbetering van obstipatieklachten geeft, zal moeten blijken uit vervolgonderzoek. In **hoofdstuk vijf** onderzochten wij de samenstelling van bacteriën in de wand van de dunne darm bij kinderen met nieuw gediagnosticeerde, nog onbehandelde coeliakie. De uitkomsten werden vergeleken met die van een controlegroep. Wij zagen geen verschillen in microbiële samenstelling tussen beide groepen. In een aantal eerdere en latere studies werden wel verschillen in samenstelling beschreven, maar de uitkomsten van deze studies variëren aanzienlijk wat betreft onderscheidende bacteriën. Toekomstige studies met grotere aantallen hoog-risico kinderen, bij voorkeur longitudinaal van opzet, zijn noodzakelijk voor een definitief antwoord of het microbiom een rol speelt bij coeliakie. In **hoofdstuk zes** vergeleken wij het microbiom van kinderen met nieuw gediagnosticeerde juveniele idiopathische artritis (JIA) met een selectie gezonde kinderen beschreven in hoofdstuk twee. Net als bij IBD observeerden wij bij JIA voornamelijk een afname van kernbacteriën, die gezondheid kenmerken. JIA is een zeldzame aandoening, het aantal beschikbare samples was hierdoor beperkt. Grotere studies zijn nodig om te evalueren of er sprake is van een causaal verband tussen microbiom veranderingen en ziekte en of manipulatie van het microbiom van nut is in de preventie of in het beloop van JIA.

Concluderend hebben wij in deel een getracht de samenstelling en variabiliteit van het microbiom van gezonde kinderen te beschrijven en vergelijken bij een aantal aandoeningen van het maag-darmstelsel. Wij hebben aangetoond dat het microbiom bij kinderen op korte termijn aanzienlijke fluctuaties vertoont, vermoedelijk door dieet en andere omgevingsfactoren, maar over de langere termijn stabiel is. Daarnaast zagen wij dat gezondheid gekenmerkt wordt door een vaste groep aan kernbacteriën. Bij IBD en JIA lijkt

dit kernmicrobioom aangetast. Of er een causaal verband is tussen deze veranderingen en ziekte, en of manipulatie van het kernmicrobioom het ontstaan en beloop van ziekte kan beïnvloeden, is onderwerp van vervolgonderzoek.

## Deel 2. Toepassing van de IS-pro techniek in de klinische praktijk

In deel twee van dit proefschrift worden enkele voorbeelden gegeven van de toepassing van de IS-pro techniek in de klinische praktijk. Aangezien ongeveer 80% van darmbacteriën niet kweekbaar is, schieten de traditionele kweektechnieken tekort om een compleet beeld te krijgen van de samenstelling van het microbioom. In **hoofdstuk zeven** wordt het ziektebeloop van twee kinderen met een ernstige slokdarm- en maagslijmvliesontsteking. Standaard kweken van slijmvliesbiopten toonden geen groei van bacteriën. Met de IS-pro techniek werd de aanwezigheid van de zeldzame bacterie *Sarcina vetriculi* aangetoond. Na gerichte behandeling met antibiotica verdwenen de klachten en was de bacterie niet langer detecteerbaar.

In **hoofdstuk acht** wordt het beloop van het microbioom door tijd na fecestransplantatie bij een kind met een ernstige, terugkerende *Clostridium difficile* infectie beschreven. Fecestransplantatie is een relatief nieuwe behandeling waarmee gepoogd wordt het microbioom en daarmee het beloop van ziekte te manipuleren. Diverse studies hebben een positief effect van fecestransplantatie aangetoond bij *Clostridium difficile* infecties, maar ook bij bijvoorbeeld chronische ontstekingen van de darm. Bij beschreven casus was de transplantatie zeer effectief, ze werd geheel klachtenvrij na een eenmalige behandeling. Opvallend was dat donorbacteriën slechts ten dele werden ingebouwd in het microbioom van de ontvanger, het microbioom na transplantatie was zeer stabiel en werd gekenmerkt door aanwezigheid van aanzienlijke hoeveelheden en soorten bacteriën die niet bij de donor werden gezien. Om inzicht te krijgen in optimale microbiële samenstelling van donors en ontvangers om een optimaal resultaat van fecestransplantatie te verkrijgen, zijn studies met grotere aantallen kinderen noodzakelijk.

## Deel 3. Flatografie

In deel drie van dit proefschrift vergelijken wij de samenstelling van fecale VOC-profielen van kinderen met een darmontsteking met een gezonde controlegroep. De VOC-profielen werden gemeten met een eNose. In **hoofdstuk negen** geven wij een overzicht

van de beschikbare literatuur over fecale VOC-analyse bij diverse aandoeningen op de kinderleeftijd, zoals leverziekten, chronische darmontstekingen, necrotiserende enterocolitis (NEC) bij prematuur geboren kinderen, en infectieuze diarree. Daarnaast gaven wij een overzicht van de verschillende technieken om VOC te meten. Wij concludeerden dat fecale VOC-analyse potentie heeft om diverse ziekten van gezonde controles te onderscheiden. Validatiestudies met grote aantallen kinderen en standaardisatie van de methode zijn noodzakelijk voordat fecale VOC-analyse als diagnostische biomarker kan worden geïmplementeerd in de klinische praktijk. De potentie van de eNose technologie lijkt met name te liggen in herkenning van ziekten die momenteel pas in een relatief laat stadium herkend kunnen worden, dus als het kind al ziek is. Hierbij valt te denken aan NEC en sepsis bij prematuren en opvlammingen van IBD. In **hoofdstuk tien** vergelijken wij fecale VOC-profielen van kinderen met nieuwe gediagnosticeerde IBD met die van gezonde controles. Zowel tijdens actieve ziekte als in klinische remissie konden de profielen van patiënten met IBD nauwkeurig worden onderscheiden van de controlegroep. Daarnaast bleken VOC-profielen van beide subtypen van IBD, ziekte van Crohn en colitis ulcerosa, van elkaar te onderscheiden, wat met de huidige beschikbare niet-invasieve technieken niet mogelijk is. Inmiddels heeft onze onderzoeksgroep de resultaten gevalideerd in een nieuw cohort. Wij concluderen derhalve dat eNose technologie potentie heeft als (aanvullende) diagnostische test voor IBD. Of ook opvlammingen van IBD tijdig te voorspellen door VIC-analyse zal moeten worden onderzocht in vervolgstudies. In **hoofdstuk elf** vergeleken wij fecale VOC-profielen van prematuur geboren kinderen, geboren bij een zwangerschapsduur < 30 weken, die NEC ontwikkelden met een groep kinderen zonder NEC. NEC is een ernstige ontstekingsziekte van de darm, die in de eerste levensweken optreedt bij 10% van deze kwetsbare groep, de mortaliteit ligt rond de 30%. Vroege herkenning van NEC is geassocieerd met een betere uitkomst. Momenteel bestaan er geen betrouwbare biomarkers voor het voorspellen van NEC. Wij observeerden dat tot drie dagen voorafgaand aan de klinische diagnose NEC de geurprofielen significant verschilden van kinderen zonder NEC. De verschillen namen toe richting het ontwikkelen van NEC. Een interessante observatie was verder dat het geurprofiel van kinderen die NEC ontwikkelden verschilde van kinderen die sepsis ontwikkelden. In de klinische praktijk is dit onderscheid vaak lastig. Vervolgonderzoek moet uitwijzen welke specifieke VOC verantwoordelijk zijn voor de gevonden verschillen tussen NEC en controles. Identificatie van NEC-specifieke VOC-moleculen maakt het mogelijk om getrainde sensoren te ontwikkelen om NEC in een vroeg stadium te kunnen detecteren. **Hoofdstuk twaalf** is gebaseerd op de eerdere bevindingen

uit de voorgaande studie. Recente studies hebben aangetoond dat sepsis geassocieerd is met vroege veranderingen in samenstelling van het intestinale microbioom, reeds enkele dagen voorafgaand aan de diagnose. In deze studie vergeleken wij fecale VOC-profielen van prematuren die sepsis ontwikkelden met kinderen zonder sepsis. Wij observeerden dat beide groepen van elkaar te onderscheiden waren vanaf drie dagen voordat de diagnose sepsis werd gesteld. In een vervolgstudie, uitgevoerd op negen intensive care afdelingen in Nederland en België, hebben wij recent aangetoond dat de verschillende verwekkers van sepsis een eigen VOC-profiel lijken te hebben. Vervolgstudies met grotere aantallen zijn noodzakelijk om deze bevindingen te valideren en om sepsis-specifieke VOC moleculen te identificeren met behulp van gas chromatografie-massa spectrometrie. Dit maakt het wellicht mogelijk om getrainde sepsis-specifieke sensoren te ontwikkelen. In **hoofdstuk dertien** wordt een literatuuroverzicht gegeven van diagnostische biomarkers voor NEC, met de focus op vroege microbiële veranderingen.

### Toekomstperspectieven

Diverse studies hebben aangetoond dat het microbioom potentie heeft als biomarker voor het meten van de ziekteactiviteit van diverse gastro-intestinale aandoeningen. Grote verschillen in toegepaste detectietechnieken en het gebrek aan standaardisatie bemoeilijken een goede vergelijking tussen studie-uitkomsten. Er bestaat een dringende noodzaak voor standaardisatie van methodologie in toekomstige studies voordat microbioom- en VOC analyse kan worden geïmplementeerd in de klinische praktijk. De meerderheid van het microbioom is niet te detecteren met traditionele kweektechnieken. Met behulp van IS-pro is het mogelijk om binnen enkele uren een gedetailleerd overzicht te verkrijgen van de microbiële samenstelling. Met eNose sensoren is het zelfs mogelijk om bed-side een VOC-profiel te analyseren. In toekomstige studies focussen wij ons op simultane analyse van het microbioom en fecale VOC-profielen, om zo volledig mogelijke informatie te verkrijgen over de samenstelling en functie van het microbioom en interactie ervan met de gastheer. Dit maakt het mogelijk diagnostische algoritmes met een hoge nauwkeurigheid te ontwikkelen. Toegenomen kennis over microbiële samenstelling maakt het bovendien mogelijk om nieuwe therapeutische interventies te ontwikkelen die gericht zijn op gepersonaliseerde manipulatie van het microbioom. Identificatie van ziekte-specifieke fecale VOC-profielen maakt het mogelijk om getrainde eNose sensoren te ontwikkelen voor toepassing in de klinische praktijk.



