

<http://hdl.handle.net/1765/110422>



# Nederlandse samenvatting





Micro-organismen, zoals virussen, bacteriën, archaea en andere eencelligen, vormen complexe leefgemeenschappen die op alle denkbare plaatsen op aarde aanwezig zijn, van de diepzee tot onze darm en van de bosbodem tot onze huid. Ze zijn de oudste en meest uitbundige levensvorm op aarde, zowel in hoeveelheid als diversiteit, en vervullen vele belangrijke functies. Zo nemen micro-organismen deel aan biochemische processen die het leven op onze planeet mogelijk maken. Ook is het inmiddels algemeen bekend dat de microbiële gemeenschappen die in en op ons lichaam voorkomen biochemisch van groot belang zijn en cruciaal zijn voor onze gezondheid. Om deze reden wordt de microbiële samenstelling, die ook wel de 'microbiota' wordt genoemd, intensief bestudeerd. Onderzocht wordt wat de samenstelling van de microbiota van verschillende lichaamslocaties is en men probeert de invloed van de microbiota op onze gezondheid vast te stellen. De bacteriële samenstelling van de microbiota wordt veelal onderzocht door het 16S-rRNA-gen te onderzoeken. Het 16S-rRNA-gen heeft de unieke eigenschap dat het aanwezig is in alle bacteriën (en archaea). Tevens bevat dit gen naast geconserveerde DNA-gebieden ook variabele DNA-gebieden die uniek zijn per bacteriesoort en dus gebruikt kunnen worden voor bacteriële identificatie. De variabele DNA-gebieden worden veelal in kaart gebracht door ze eerst te vermeerderen (i.e. amplificeren) met behulp van PCR-technieken om vervolgens de volgorde van de bouwstenen van het DNA te bepalen middels next-generation sequencing (NGS) technieken. Deze werkwijze stelt men in staat om de microbiota in een monster te onderzoeken zonder de afzonderlijke bacteriën te kweken. Dit laatste is een belangrijk gegeven aangezien de meeste bacteriën niet kweekbaar zijn in een laboratorium. Echter, deze kweek-onafhankelijke technieken brengen weer andere beperkingen en valkuilen met zich mee die de rapportage van betrouwbare microbiota resultaten in de weg kan staan (**hoofdstukken 1 en 2**). Eén van de grootste uitdagingen is de standaardisatie van de 16S-rRNA-gen NGS-methoden in de verschillende laboratoria. Standaardisatie is essentieel, want alleen met gestandaardiseerde werkwijzen kunnen de data van verschillende laboratoria vergeleken worden waardoor er een overkoepelende kwaliteitsbewaking kan worden ingevoerd. Deze vorm van kwaliteitsbewaking is belangrijk voor research doeleinden, maar vooral ook voor de toepassing van microbiota onderzoek in routine (medisch) microbiologisch diagnostisch gebruik. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is dan ook om een gestandaardiseerde 16S-rRNA-gen NGS-methode te ontwikkelen en de toepasbaarheid van deze methode te onderzoeken in de routine (medisch) microbiologische diagnostiek.

De ontwikkeling van een gestandaardiseerde 16S-rRNA-gen NGS-methode vereist een verbetering van de nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van huidige 16S-rRNA-gen NGS-methoden. De veelgebruikte 16S-rRNA-gen NGS-methoden zijn afhankelijk van de PCR-techniek, waarbij (verschillende) 16S-rRNA-genen gezamenlijk, in één enkel reactievatje, geamplificeerd worden. Deze methode kent twee belangrijke nadelen: 1) het

ontstaan van chimeren en 2) PCR-competitie tussen verschillende 16S-rRNA-genen van verschillende bacteriën. Chimeren zijn samengesteld uit 16S-rRNA-genen, afkomstig van verschillende bacteriën, die leiden tot de foutieve detectie van niet-aanwezige of zelfs van niet-bestaande bacteriën. De PCR-competitie, waarbij het ene 16S-rRNA-gen sneller amplificeert dan het andere 16S-rRNA-gen, heeft een over- of onderschatting van bepaalde bacteriën als gevolg. Om deze PCR-artefacten (chimeren en PCR-competitie) te voorkomen is in **hoofdstuk 3** een nieuwe amplificatiemethode beschreven waarbij de 16S-rRNA-genen verdeeld worden over een groot aantal fysiek verschillende 'reactievaatjes' die gecreëerd worden door middel van water-in-olie emulsies. Tijdens deze 'micelle PCR' (micPCR) wordt vervolgens elk afzonderlijk DNA-molecuul met een 16S-rRNA-gen individueel geamplificeerd, elk molecuul in één druppel van de emulsie. In **hoofdstuk 3** wordt aangetoond dat deze benadering de kans op PCR-artefacten drastisch vermindert en de nauwkeurigheid van microbiota bepalingen sterk verbetert.

In **hoofdstuk 4** werd het micPCR/NGS-protocol verder uitgebreid met de toevoeging van een interne kalibrator die het mogelijk maakt om de hoeveelheid van de gedetecteerde bacteriën weer te geven als het aantal 16S-rRNA-genkopieën. Hiermee kan de micPCR/NGS-methode een weerbarstig probleem van microbiota studies oplossen, namelijk het probleem van het achtergrondsignaal van het al aanwezige bacterieel DNA uit de gebruikte reagentia. Het achtergrond signaal is met name belangrijk voor de analyse van monsters met een lage hoeveelheid bacteriën. De hoge nauwkeurigheid waarmee de gekalibreerde micPCR/NGS-methode de bacteriën kwantificeert maakt het nu mogelijk om het achtergrondsignaal te identificeren en te kwantificeren, waarmee de microbiota resultaten van het monster kunnen worden gecorrigeerd. De validatie-experimenten beschreven in **hoofdstuk 4** tonen aan dat deze correctie leidt tot de volledige verwijdering van het achtergrondsignaal van de microbiota resultaten van monsters met een bekende microbiële samenstelling. Deze strategie maakt het mogelijk om de microbiota van monsters met een erg lage biomassa nauwkeurig te kunnen bepalen. Bovendien zullen monsters die geen bacterieel DNA bevatten ook daadwerkelijk een negatief microbiota resultaat opleveren.

De in **hoofdstukken 3** en **4** beschreven micPCR/NGS-methode vraagt het nodige rekenwerk voordat het eindresultaat verkregen wordt. Om de microbiota bepalingen toegankelijk te maken voor routine gebruik is in **hoofdstuk 5** de ontwikkeling van de 'Galaxy mothur Toolset (GmT)' beschreven. Deze GmT bevat meer dan 125 verschillende algoritmen, elk met vooraf ingestelde 'standaard' instellingen, waarmee de gebruiker zelf zijn eigen 16S-rRNA-gen NGS-data 'analyse-workflow' kan samenstellen middels een gebruiksvriendelijke webinterface. Daarnaast biedt GmT ondersteuning voor diverse visualisatie- en rapportagehulpmiddelen zodat de microbiota resultaten eenvoudig kunnen worden geïnterpreteerd, gedeeld en opgeslagen. Voor het verwerken van de gekalibreerde micPCR/NGS-data is er een aangepaste GmT analyse-workflow

ontwikkeld waarbij de ruwe NGS-data met één druk op de knop kan worden verwerkt tot kwantitatieve microbiota resultaten (**hoofdstuk 6**). Deze op maat gemaakte GmT analyse-workflow maakt samen met de gekalibreerde micPCR/NGS-methode deel uit van het gestandaardiseerde microbiota detectieplatform: 'MYcrobiota'.

In de **hoofdstukken 6** en **7** werd het gebruik van MYcrobiota in de routine medisch microbiologische diagnostiek geëvalueerd waarbij de MYcrobiota resultaten vergeleken werden met de resultaten van routine kweekmethoden. In **hoofdstuk 6** werden pus- en wondmonsters onderzocht en in **hoofdstuk 7** onderzochten we gewrichtsvochten van ontstoken heup-, schouder- en kniegewrichten. Deze studies toonden aan dat de meeste gekweekte pathogene bacteriën ook werden geïdentificeerd met MYcrobiota. Tevens kan met MYcrobiota de normale (niet-pathogene) flora en de niet- of moeilijk-kweekbare bacteriën in kaart gebracht worden. Onder de niet- of moeilijk-kweekbare bacteriën, werden vooral zuurstof intolerante (obligaat anaerobe) bacteriën aangetroffen. Aangezien MYcrobiota niet gevoelig is voor bacterie-specifieke kweekcondities kan dit platform dan ook een belangrijke rol spelen bij het aantonen van potentieel pathogene bacteriën in anaerobe infecties, of andere infecties veroorzaakt door niet- of moeilijk-kweekbare bacteriën, die niet worden gedetecteerd met routine kweekmethoden. Zo bleken 10 van de 23 gewrichtsvochten, waaruit geen bacteriën kon worden gekweekt, toch positief voor bacterieel DNA met MYcrobiota die het vermoeden van de arts op bacteriële septische artritis in deze patiënten bevestigde (**hoofdstuk 7**). Het moet echter wel opgemerkt worden dat de gedeeltelijke 16S-rRNA-genen, die momenteel gebruikt worden voor de microbiële identificatie middels MYcrobiota, niet voldoen om bacteriën te classificeren op het species niveau wat zeer wenselijk is voor de medische toepassing. Het gebruik van andere genen, zoals *rpoB* of *gyrB* die wel dit taxonomisch onderscheidt kunnen maken, zou uitkomst kunnen bieden, maar behoeft wel enkele (relatief eenvoudige) aanpassingen aan het MYcrobiota-platform.

Het MYcrobiota-platform is ontwikkeld voor toepassing in de medische microbiologie. In **hoofdstuk 8** wordt het universeel toepasbare karakter van het MYcrobiota-platform aangetoond door het bepalen van de bacteriële samenstelling van drinkwater. In dit onderzoek werden drinkwatermonsters geanalyseerd van zes opeenvolgende locaties binnen een operationeel drinkwater-distributiesysteem (DWDS). In tegenstelling tot de gangbare kweekmethode, was MYcrobiota in staat om (kleine) bacteriële variaties te detecteren tussen de verschillende locaties binnen het DWDS. Deze variaties konden worden verklaard als gevolg van de drinkwater-behandelingsstrategieën die aan het begin van het DWDS werden toegepast om de levering van veilig en hoogwaardig drinkwater te waarborgen. Het vermogen om dergelijke variaties te detecteren met behulp van MYcrobiota kan daarom van groot belang zijn voor de continue monitoring van de effecten van de toegepaste drinkwater-behandelingsstrategieën en biedt drink-

waterbedrijven de mogelijkheid om in te grijpen als de beoogde 'biologische stabiliteit' binnen het DWDS verstoord wordt.

Samenvattend, de ontwikkeling van het MYcrobiota-platform beschreven in dit proefschrift realiseert een gestandaardiseerde en gevalideerde bepaling van de microbiota. MYcrobiota is ontwikkeld voor de medische microbiologie, maar is veel breder toepasbaar zoals aangetoond in het drinkwateronderzoek. Verwacht wordt dat de implementatie van MYcrobiota een bijdrage kan leveren aan onze kennis van de complexe microbiële gemeenschappen die overal om ons heen te vinden zijn.