



DARMFLOORA EN ATOPISCHE MANIFESTATIES BIJ KINDEREN

Auteur J. Penders

Trefwoorden atopische aandoening, bacteriën, darmflora, KOALA

Samenvatting

Op 30 maart jl. promoveerde drs. J. Penders aan de Universiteit Maastricht op zijn proefschrift, getiteld 'Gut microbiota and atopic manifestations in infancy'. Zijn promotor was

prof. dr. ir. P.A. van den Brandt en copromotoren waren dr. C. Thijs en dr. E.E. Stobberingh. Deze bijdrage is een samenvatting van zijn proefschrift.

(*Ned Tijdschr Allergie* 2007;7:144-6)

Inleiding

De prevalentie van atopische aandoeningen in de westerse samenleving is de afgelopen jaren sterk gestegen. Een van de mogelijke verklaringen hiervoor is de afgenomen microbiële stimulatie van het zich ontwikkelende immuunsysteem bij jonge kinderen. De humane darmflora bestaat uit ongeveer 10^{14} bacteriën, die onderverdeeld kunnen worden in meer dan 500 verschillende soorten. De darmflora is kwantitatief gezien de belangrijkste bron van microbiële stimulatie en draagt mogelijk bij aan de postnatale ontwikkeling van het immuunsysteem en met name de tolerantie-inductie. De darmflora-hypothese oppert dan ook dat een verandering in de samenstelling van de darmflora van westerse kinderen (mede)verantwoordelijk is voor de stijging van atopische aandoeningen.^{1,2}

De onderzoeken die in dit proefschrift worden beschreven, hadden als doel de samenstelling van de darmflora van kinderen in kaart te brengen, om vervolgens te bestuderen welke externe factoren de darmflora beïnvloeden en wat de rol van de darmflora is bij het ontstaan van atopische aandoeningen.

KOALA-onderzoek

Alle onderzoeken waren ingebed in het Kind, Ouder en gezondheid: Aandacht voor Leefwijze en Aanleg (KOALA)-geboortecohortonderzoek, een longitudinale cohortstudie naar het ontstaan van

atopische aandoeningen.³ In totaal zijn 2.834 zwangere vrouwen geworven. Door middel van herhaalde vragenlijsten zijn gegevens verzameld gedurende de zwangerschap en de eerste 2 levensjaren van het kind. Aan een subgroep van de deelnemers werd toestemming gevraagd om lichaamsmateriaal af te nemen, waaronder ontlasting van het kind op de leeftijd van 1 maand en bloed op de leeftijd van 1 en 2 jaar. Verder werd toestemming gevraagd om het kind op 2-jarige leeftijd te onderzoeken op de aanwezigheid van atopisch eczeem.

Kweekonafhankelijke karakterisering van darmflora

Met kweekonafhankelijke moleculaire technieken kunnen ook niet-kweekbare bacteriën worden gedetecteerd. Bovendien is het niet nodig om de ontlasting anaëroob te verzamelen en te verwerken en kunnen de monsters worden ingevroren alvorens ze worden geanalyseerd.

Voor de kwantitatieve bepaling van *Bifidobacterium* spp., *Clostridium difficile* en species van de *Bacteroides fragilis*-groep in de ontlasting, zijn 16S rDNA-gebaseerde real-time PCR's ontwikkeld en gevalideerd. Daarnaast zijn ook de fecale concentraties van *Escherichia coli* en *Lactobacillus* spp. met behulp van deze techniek bepaald. De geëvalueerde PCR's bleken zeer specifiek en gevoelig, en leverden betrouwbaardere resultaten op dan de traditionele kweekmethoden.⁴

Factoren die van invloed zijn op de darmflorasamenstelling

In de eerste levensfase vinden grote veranderingen in de darmflorasamenstelling plaats. De totstandkoming van de darmflora begint direct na de geboorte, wanneer de darmen van het kind gekoloniseerd worden door bacteriën die afkomstig zijn van de moeder en de omgeving. We hebben de invloed van een breed scala aan externe factoren op de darmflorasamenstelling van 1.032 jonge kinderen onderzocht.

Kinderen die geboren zijn in het ziekenhuis, en met name via een keizersnede, hadden een minder gunstige darmflora (lagere aantallen gezondheidsbevorderende bifidobacteriën en hogere aantallen van de potentieel pathogene *C. difficile*) dan kinderen die op natuurlijke wijze (vaginaal) thuis waren geboren. Ook premature kinderen hadden een minder gunstige darmflora dan voldragen kinderen. Daarnaast hadden ook flesvoeding, antibioticagebruik en ziekenhuisopname een negatieve invloed op de darmflorasamenstelling.⁵

Darmflora en allergie

In 2 verschillende studies werd, met verschillende moleculaire technieken, de rol van de darmflora op de ontwikkeling van atopie bestudeerd. De eerste studie betrof een patiënt-controleonderzoek dat genest was in het KOALA-cohort. In dit onderzoek werd de samenstelling van de darmflora op de leeftijd van 1 maand vergeleken van 26 kinderen die tijdens hun eerste levensjaar werden gesensitiseerd en bovendien eczeem ontwikkelden (atopisch eczeem) met de darmflora van 52 niet-gesensitiseerde kinderen zonder eczeem.⁶ Door de ontlastingmonsters te analyseren met behulp van PCR gecombineerd met 'denaturing gradient gel electrophoreses' (PCR-DGGE), werd een bandenpatroon van de microbiële genetische diversiteit verkregen. Een associatie werd niet gevonden tussen de ontwikkeling van IgE-geassocieerd eczeem en de darmflorasamenstelling in zijn geheel (totale bacteriële bandenpatronen). Ook werd geen associatie gevonden tussen atopisch eczeem en de verschillende soorten en proportie van bifidobacteriën. Één specifiek bandje bleek echter vaker voor te komen bij kinderen met atopisch eczeem dan bij de kinderen zonder atopisch eczeem. Identificatie onthulde dat dit bandje *E. coli* representeerde.

De tweede studie betrof een onderzoek naar de samenstelling van de darmflora (met behulp van realtime PCR) van bijna 1.000 kinderen en de ontwikkeling van atopische symptomen en sensitisatie in de eerste 2 levensjaren.⁷

Bifidobacterium spp., *Lactobacillus spp.*, en bacteriën

behorende tot de *B. fragilis*-groep waren niet geassocieerd met de ontwikkeling van atopie. De aanwezigheid van *E. coli* in de darmflora was geassocieerd met een groter risico op het ontwikkelen van eczeem. Dit risico nam toe naarmate de aantallen *E. coli* in de ontlasting hoger waren. Kinderen die waren gekoloniseerd met *C. difficile* hadden een toegenomen risico op het ontwikkelen van eczeem, piepen op de borst en allergische sensitisatie. Verder bleek de aanwezigheid van *C. difficile* in de darmflora ook geassocieerd te zijn met een klinische diagnose van atopisch eczeem ('UK Working Party' criteria).

Conclusie

Het KOALA-onderzoek is het eerste prospectieve geboortecohort, waarin moleculaire methoden zijn toegepast om de microbiële samenstelling van een groot aantal ontlastingmonsters te bepalen. Door het uitvoeren van een longitudinale studie en het analyseren van de darmflora van kinderen op zeer jonge leeftijd, kon aangetoond worden dat verschillen in de samenstelling van de darmflora voorafgingen aan de ontwikkeling van atopische manifestaties. Hierdoor kon de mogelijkheid van omgekeerde oorzakelijkheid worden uitgesloten.

De bevindingen in dit proefschrift ondersteunen de hypothese dat de darmflora een rol speelt bij de ontwikkeling van atopische aandoeningen. De etiologie van atopische aandoeningen lijkt echter multifactorieel en veranderingen in de samenstelling van de darmflora zijn waarschijnlijk slechts één van de factoren die een rol spelen bij de toename van atopische aandoeningen. Toch is de darmflora een interessant en geschikt doelwit voor interventie. Wanneer meer inzicht verkregen kan worden in de manier waarop bacteriën en hun producten ons immuunsysteem helpen te ontwikkelen, zou dit wellicht na kunnen worden gebootst (bijvoorbeeld met pro- en/of prebiotica) zonder dat onze hygiënische westerse levensstijl opgegeven hoeft te worden.

De ontwikkeling van atopische aandoeningen is niet alleen van omgevingsfactoren (zoals de darmflora), maar ook van genetische factoren afhankelijk. Waarschijnlijk is het een wisselwerking tussen genetische en omgevingsfactoren vroeg in het leven, die de atopische status van iemand bepaalt. Afhankelijk van de genetische gevoeligheid van een persoon kan het dus zijn dat het effect van darmbacteriën op de ontwikkeling van atopie verschilt. Gen-omgevingsinteracties zijn dan ook de volgende stap in het onderzoek naar de rol van de darmflora bij het ontstaan van atopische aandoeningen.⁸



Referenties

1. Wold AE. *The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora?* *Allergy* 1998;53:20-5.
2. Rook GA, Brunet LR. *Microbes, immunoregulation, and the gut.* *Gut* 2005;54:317-20.
3. Kummeling I, Thijs C, Penders J, Snijders BEP, Stelma F, Reimerink J, et al. *Etiology of atopy in infancy: the KOALA Birth Cohort Study.* *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:679-84.
4. Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh E. *Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR.* *FEMS Microbiol Lett* 2005;243:141-7.
5. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma F, Snijders B, Kummeling I, et al. *Factors influencing the intestinal microbiota in early infancy.* *Pediatrics* 2006;118:511-21.
6. Penders J, Stobberingh E, Thijs C, Adams H, Vink C, Van Ree R, et al. *Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing.* *Clinical and Experimental Allergy* 2006;36:1602-8.
7. Penders J, Thijs C, Van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, et al. *Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA birth cohort study.* *Gut* 2007;56:661-7.
8. Koppelman GH. *Gene by environment interaction in asthma.* *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6:103-11.

Ontvangen 10 april 2007, geaccepteerd 25 april 2007.

Correspondentieadres

Dr. J. Penders, post-doc

Universiteit Maastricht
 Capaciteitsgroep Epidemiologie
 Postbus 616
 6200 MD Maastricht
 Tel.: 043 388 23 85
 E-mailadres: j.penders@epid.unimaas.nl

Belangenconflict: geen gemeld.
 Financiële ondersteuning: dit onderzoek is mede gefinancierd door het Astma Fonds en Royal Friesland Foods.