

Gut microbiota and atopic manifestations in infancy

Citation for published version (APA):

Penders, J. (2006). *Gut microbiota and atopic manifestations in infancy*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2006

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

Eczema, food allergy, hay fever (and other airway allergies) and allergic asthma are collectively known as 'atopic disorders', chronic inflammatory disorders associated with an aberrant T helper 2 (Th2)-type immune response and IgE mediated hypersensitivity against common 'innocuous' environmental antigens (allergens). Examples of such allergens are antigens from (grass) pollen, house dust mite, cat, dog, hen's egg or cow's milk. A largely unexplained increase in the prevalence of these diseases was noted during the past decades, prominently in westernized countries. Many now consider atopic disorders a result of an immature immune system, possibly caused by insufficient microbial stimulation of the immune system as a result of westernization.

The human gut microbiota consists of approximately 10^{14} (100 billion) bacteria, which can be subdivided in over 500 different species. The gut microbiota is thereby the quantitatively most important source of microbial stimulation and may provide a primary signal for driving the postnatal maturation of the immune system and the induction of a balanced immunity. The microbiota hypothesis postulates that an altered normal intestinal colonisation pattern in western infants is (partly) responsible for the increase in atopic disorders.

The aims of the studies described in this thesis were to investigate the gut microbiota composition of infants in order to subsequently examine the external factors influencing the composition of this gut microbiota and to examine the role of the gut microbiota in the development of atopic diseases.

The studies described in this thesis were carried out within the framework of the KOALA Birth Cohort Study. This prospective cohort study on the aetiology of atopic diseases was initiated in October 2000 by the recruitment of pregnant women ($n = 2834$). Data was collected during pregnancy and early childhood by repeated questionnaires.

A subgroup of participants was asked to consent to sampling of maternal blood ($n = 1355$), breast milk ($n = 317$) and faeces of the infant at 1 month post-partum ($n = 1176$), capillary blood at age 1 year ($n = 956$), venous blood at the age of 2 years ($n = 829$), and buccal swabs for DNA isolation from child-parent trios. Furthermore parents were asked to consent to a physical examination of their child on manifestation of atopic dermatitis at the age of two years ($n = 826$).

In chapter 2, we review the observational studies conducted thus far on the association between the gut microbiota and atopic diseases. Eleven out of the 13 observational studies indicated an association between the gut microbiota composition and atopic sensitisation or symptoms. Although the microbiota hypothesis thus seems a promising hypothesis, no specific harmful or protective microbes were however identified yet. The available studies on the gut microbiota and atopy appeared to be heterogeneous and therefore difficult to compare. Several methodological issues that have to be considered when interpreting these studies are: the microbiological methods used (traditional culture vs. molecular techniques); the timing of examining the gut microbiota; the definition of atopic outcomes and the possibility of reverse causation. The best way to gain more insight into the association between the gut microbiota and atopic disorders is to conduct large-scale prospective birth cohort studies, in which the gut microbiota can be studied in early infancy and infants can be followed up for the subsequent development of atopic symptoms and sensitisation.

Such a study is now possible by culture-independent molecular techniques to investigate ecological microbial communities. This has provided the microbiologist with a vast array of new techniques to study the human intestinal microbiota. With these techniques, unculturable species are detectable, anaerobic handling and expertise is not required and samples can be kept frozen for later analysis.

Chapter 3 describes the development and validation of 16S rDNA-based real-time PCR assays for the quantification of *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium difficile* and *Escherichia coli*, and the application of these assays on faecal samples of 50 exclusively breastfed and 50 exclusively formula-fed infants. The evaluated assays were found to be highly specific and sensitive and provided more accurate data on intestinal microbiota composition than traditional culture techniques.

The prevalence and counts of *C. difficile* as well as *E. coli* were significantly lower in the gut microbiota of breastfed infants than formula-fed infants, whereas the prevalence and counts of *Bifidobacterium spp.* was similar among both groups.

Major changes in the intestinal microbial composition occur especially early in life. The establishment of the gut microbiota commences immediately after birth. The sterile newborn's intestinal tract becomes colonised with bacteria originating from the mother and the environment. In chapter 4, the contribution of a broad range of external influences on the gut microbiota composition in early infancy is investigated.

Infants born through caesarean section had lower numbers of bifidobacteria and bacteroides, whereas they were more often colonised with *C. difficile*,

compared with vaginally born infants. Exclusively formula-fed infants were more often colonised with *E. coli*, *C. difficile*, bacteroides and lactobacilli, compared with breastfed infants. Hospitalisation and prematurity were associated with a higher prevalence and counts of *C. difficile*. Infants' antibiotic use was associated with decreased numbers of bifidobacteria and bacteroides. Infants having older siblings had slightly higher numbers of bifidobacteria, compared with infants without siblings. Altogether vaginally home-born term infants who are exclusively breastfed seemed to have the most "beneficial" gut microbiota (highest numbers of bifidobacteria and lowest numbers of *C. difficile* and *E. coli*).

We performed two studies using different molecular approaches (PCR-DGGE and real-time PCRs respectively) to examine the potential role of the gut microbiota composition on the development of atopic manifestations (Chapter 5 and 6). In chapter 5 a case-control study nested within the KOALA cohort is presented, comparing the gut microbiota of 26 infants who became sensitised and developed eczema within the first year of life with that of 52 non-sensitised non-eczematous infants. A profile of the microbial genetic diversity in the faecal samples was provided by subjecting the samples to PCR combined with DGGE. No association was found between the development of IgE-associated eczema and the dominant gut microbiota as a whole (total bacterial profiles) or with the species composition and proportion of bifidobacteria. The prevalence of one specific band in total bacterial profiles was, however, significantly higher in infants with atopic eczema compared with controls. Identification of this band revealed that it represented *E. coli*. This association with *E. coli* indicates that differences in gut microbiota do precede the development of atopy.

Chapter 6 presents a study on the gut microbiota composition of nearly one thousand one-month-old infants participating in the KOALA study and the subsequent development of atopic manifestations and sensitisation within the first two years of life.

Bifidobacterium spp., *Lactobacillus spp.*, and members of the *Bacteroides fragilis*-group were not associated with the development of atopic manifestations. The presence of *E. coli* was associated with a higher risk of developing eczema, this risk being increased with increasing numbers of *E. coli*. Infants colonised with *C. difficile* were at higher risk of developing eczema, recurrent wheeze and allergic sensitisation. Furthermore, the presence of *C. difficile* was also associated with a higher risk of a clinical diagnosis of atopic dermatitis by a trained nurse.

This study again demonstrates that differences in the gut microbiota composition precede the atopic manifestations. Since *E. coli* was only associated with eczema, whereas *C. difficile* was associated with all atopic outcomes, the underlying mechanisms explaining these association may be different.

In chapter 7 the main findings from the studies described in this thesis are summarised and discussed in the light of methodological considerations.

The use of molecular techniques to examine the gut microbiota was one of the major strengths of our studies. In fact, this is the first large-scale prospective birth cohort study in which molecular approaches have been used to examine the microbial composition of a considerable number of faecal samples. The use of faecal samples can, however, be a limitation of studies on the gut microbiota composition, since it cannot unequivocally be established that analyzing microbiota composition in faeces is representative of important intestinal parameters.

By conducting a longitudinal study and analyzing the gut microbiota in early infancy, we were able to show that differences in the gut microbiota precede the development of atopic manifestations. Thereby we ruled out the possibility of reverse causation.

When atopic outcome data are based upon parentally reported symptoms, it is inevitable that misclassification occurs. However, it can be assumed that the misclassification of the outcome status is independent of the gut microbiota composition and thus non-differential. Due to the relatively short intervals between subsequent follow-up questionnaires and the high follow-up rates, it seems unlikely that the results were subject to extensive recall and differential bias.

In this thesis, we found support for the hypothesis that the gut microbiota is involved in the development of atopic manifestations. However, the aetiology of atopic diseases is likely to be multifactorial and perturbations in the gut microbiota alone will probably not be able to explain all of the increased prevalence in atopic diseases. Yet the gut microbiota is an interesting and feasible target for intervention. If we better understand how bacteria and their products educate our immune system perhaps we could learn to mimic its action and hence could target interventions to prevent atopic diseases.

The development of atopic diseases depends not only on environmental but also on genetic factors and it is likely to be an interaction of these, particularly in early life, which determines the atopic status of a person.

The effects of certain microbes on the development of atopy may therefore differ according to the genetic susceptibility of an individual.

Gene-environment interaction studies are therefore the next step in studying the aetiology of atopic diseases.

Samenvatting

Samenvatting

Eczeem, voedselallergie, hooikoorts (en andere luchtwegallergieën) en allergisch astma behoren tot de atopische aandoeningen. Dit zijn chronische ontstekingsziekten die veroorzaakt worden door een verstoorde T helper 2 (Th2)-type immuunrespons tegen alledaagse onschadelijke antigenen (allergenen). Voorbeelden van dergelijke allergenen, zijn (gras)pollen, huisstofmijt, kat, hond, kippenei en koemelk. In de afgelopen decennia is het voorkomen van atopische aandoeningen, vooral in westerse landen, sterk gestegen. Er is (nog) geen duidelijke verklaring voor deze stijging, maar veel onderzoekers beschouwen atopische aandoeningen als het gevolg van een onderontwikkeld immuunsysteem. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het immuunsysteem van mensen uit westerse ontwikkelde landen onvoldoende geprikkeld wordt door bacteriën en virussen, waardoor het immuunsysteem zich niet goed ontwikkelt.

De humane darmflora bestaat uit ongeveer 10^{14} (100 biljoen) bacteriën, die onderverdeeld kunnen worden in meer dan 500 verschillende soorten. De darmflora is kwantitatief gezien de belangrijkste bron van microbiële stimulatie van het immuunsysteem en draagt mogelijk bij aan de postnatale ontwikkeling van dit immuunsysteem.

De darmflora-hypothese of 'old friends' 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.

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.

Alle onderzoeken in dit proefschrift waren ingebed in het KOALA geboortecohort onderzoek, een longitudinale cohortstudie naar het ontstaan van atopische aandoeningen. Het KOALA onderzoek ging in oktober 2000 van start met de werving van 2834 zwangere vrouwen. De verzameling van gegevens vond plaats gedurende de zwangerschap en de eerste twee levensjaren van het kind door middel van herhaalde vragenlijsten. Aan een subgroep van deelnemers werd toestemming gevraagd om lichaamsmateriaal af te nemen: bloed van de moeder ($n = 1355$), moedermelk ($n = 317$) en een ontlastingmonster van het kind op de leeftijd van 1 maand ($n = 1176$), capillair bloed van het kind op de leeftijd van 1 jaar ($n = 956$), veneus bloed op de leeftijd van 2 jaar ($n = 829$) en wangslimvlies van zowel de ouders als het kind voor de isolatie van DNA. Verder werd toestemming gevraagd om

het kind op 2-jarige leeftijd te onderzoeken op de aanwezigheid van atopisch eczeem (n = 826).

In hoofdstuk 2 wordt een literatuuroverzicht gegeven van de observationele onderzoeken naar de associatie tussen de darmflora en atopische ziekten. Elf van de dertien onderzoeken rapporteerden een associatie tussen de samenstelling van de darmflora en atopische sensitisatie of symptomen. Hoewel de darmflora-hypothese dus een veelbelovende hypothese lijkt, heeft men tot op heden nog niet weten te achterhalen welke specifieke bacteriën mogelijk een rol spelen. De heterogeniteit van de verschillende onderzoeken bemoeilijkt de onderlinge vergelijking van de studieresultaten. Verschillende methodologische aspecten zijn van belang bij de interpretatie van de onderzoeken, onder andere: de gebruikte microbiologische methoden om de darmflora te karakteriseren (traditionele kweekmethoden versus moleculaire technieken), de leeftijd waarop de samenstelling van de darmflora wordt bepaald, de definiëring van de atopische uitkomstmaat en de mogelijkheid van "reverse causation" (omgekeerde oorzakelijkheid).

Grootschalige longitudinale geboortecohortonderzoeken zijn waarschijnlijk de beste manier om meer inzicht te krijgen in de associatie tussen de darmflora en atopische aandoeningen. In dit soort onderzoeken kan de darmflora op jonge leeftijd worden gekarakteriseerd en kunnen kinderen in de tijd gevolgd worden om te kijken of ze atopische sensitisatie of symptomen ontwikkelen.

De ontwikkeling van kweek-onafhankelijke moleculaire technieken biedt de microbioloog een breed scala aan nieuwe technieken om de darmflora te bestuderen. Met deze technieken kunnen ook niet-kweekbare bacteriën worden gedetecteerd. Bovendien is het niet nodig om de ontlastingmonsters anaeroob te verzamelen en verwerken en kunnen de monsters worden ingevroren alvorens ze worden geanalyseerd. Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling en validatie van 16S rDNA-gebaseerde real-time PCR's voor de kwantitatieve bepaling van *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium difficile* and *Escherichia coli*. De real-time PCR's werden vervolgens toegepast op ontlastingmonsters van 50 exclusief borstgevoede en 50 exclusief flesgevoede kinderen. De geëvalueerde PCR's bleken zeer specifiek en gevoelig en leverden betrouwbaardere resultaten over de darmflora samenstelling op dan de traditionele kweekmethoden.

C. difficile en *E. coli* kwamen minder vaak en in lagere aantallen voor in de darmflora van borstgevoede kinderen ten opzichte van flesgevoede kinderen. Bifidobacteriën kwamen even vaak en in vergelijkbare aantallen voor in de darmflora van borst- en flesgevoede kinderen.

Grote veranderingen in de samenstelling van de darmflora vinden voornamelijk in de eerste levensfase plaats. De totstandkoming van de

darmflora begint meteen na de geboorte, wanneer de darmen van het kind gekoloniseerd worden door bacteriën afkomstig van de moeder en de omgeving. In hoofdstuk 4 wordt de invloed van een breed scala aan externe factoren op de samenstelling van de darmflora van jonge kinderen onderzocht.

Kinderen geboren via een keizersnede hadden lagere aantallen bifidobacteriën en bacteroides, terwijl ze vaker gekoloniseerd waren met *C. difficile* dan kinderen die op de natuurlijke wijze (vaginaal) werden geboren.

Kinderen die uitsluitend flesvoeding kregen, waren in vergelijking met borstgevoede kinderen vaker gekoloniseerd met *E. coli*, *C. difficile*, bacteroides en lactobacillen. De ontlastingmonsters van kinderen die waren opgenomen in het ziekenhuis en van te vroeg geboren kinderen bevatten vaker en hogere aantallen *C. difficile*. Antibioticagebruik door het kind was geassocieerd met lagere aantallen bifidobacteriën en bacteroides. Kinderen met oudere broertjes of zusjes hadden iets hogere aantallen bifidobacteriën in hun ontlasting.

Samenvattend bleken voldragen kinderen die op natuurlijke wijze ter wereld waren gekomen en vervolgens uitsluitend borstvoeding kregen, de meest gunstige darmflorasamenstelling te hebben (hoogste aantallen bifidobacteriën en laagste aantallen *E. coli* en *C. difficile*)

We hebben twee studies uitgevoerd, met verschillende moleculaire technieken (respectievelijk PCR-DGGE en real-time PCR), om de rol van de darmflora op de ontwikkeling van atopie te onderzoeken (Hoofdstuk 5 en 6). In hoofdstuk 5 worden de resultaten van een patiënt-controle onderzoek genest in het KOALA cohort gepresenteerd. 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 (IgE-geassocieerd of atopisch eczeem) met de darmflora van 52 kinderen die niet werden gesensitiseerd en ook geen eczeem ontwikkelden.

Door de ontlastingmonsters te analyseren met behulp van PCR-DGGE, werd een bandenpatroon van de microbiële genetische diversiteit verkregen. Er werd geen associatie gevonden tussen de ontwikkeling van IgE-geassocieerd eczeem en de darmflora-samenstelling in zijn geheel (totale bacteriële bandenpatronen). Ook werd er 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. Na identificatie bleek dat dit bandje *E. coli* representeerde. Deze associatie tussen *E. coli* en atopisch eczeem duidt erop dat verschillen in de darmflora voorafgaan aan de ontwikkeling van atopie.

Hoofdstuk 6 beschrijft een onderzoek naar de samenstelling van de darmflora van bijna duizend kinderen, die deelnamen aan het KOALA onderzoek, en de ontwikkeling van atopische symptomen en sensitisatie in de eerste twee levensjaren.

Bifidobacterium spp., *Lactobacillus spp.*, en bacteriën behorende tot de *Bacteroides fragilis*-groep waren niet geassocieerd met de ontwikkeling van atopie. De aanwezigheid van *E. coli* in de darmflora was geassocieerd met een hoger 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 verhoogd 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 met een hoger risico op atopisch eczeem, wanneer dit werd gediagnostiseerd door een speciaal opgeleide verpleegkundige.

Ook deze studie toont weer aan dat verschillen in de samenstelling van de darmflora voorafgaan aan de manifestatie van atopie. Aangezien *E. coli* alleen met eczeem was geassocieerd, terwijl *C. difficile* met alle atopische uitkomsten was geassocieerd, zijn de mechanismen die aan deze associaties ten grondslag liggen mogelijk verschillend.

In hoofdstuk 7 worden de belangrijkste resultaten van de onderzoeken die beschreven zijn in dit proefschrift samengevat en bediscussieerd in het licht van methodologische afwegingen. Het gebruik van moleculaire technieken om de samenstelling van de darmflora te karakteriseren was een van de voornaamste sterke punten van onze studies. Het KOALA onderzoek is zelfs het eerste prospectieve geboortecohort waarin moleculaire methoden zijn toegepast om de microbiële samenstelling van een groot aantal ontlastingmonsters te bepalen. Het gebruik van ontlastingmonsters kan echter een beperking in het darmflora-onderzoek zijn, aangezien het niet onomstotelijk is bewezen dat de microbiële samenstelling van ontlasting representatief is voor belangrijke intestinale parameters.

Door het uitvoeren van een longitudinale studie en het analyseren van de darmflora op zeer jonge leeftijd, waren we in staat om aan te tonen dat verschillen in de samenstelling van de darmflora vooraf gingen aan de ontwikkeling van atopische manifestaties. Hierdoor waren we in staat om de mogelijkheid van "reverse causation" uit te sluiten.

Wanneer de atopische uitkomsten van kinderen gebaseerd zijn op hetgeen de ouders rapporteren, dan is het onvermijdelijk dat er misclassificatie optreedt. Het is echter aannemelijk dat het hier non-differentiële misclassificatie betreft, aangezien de misclassificatie van uitkomsten onafhankelijk is van de samenstelling van de darmflora. Door de korte intervallen tussen de opeenvolgende vragenlijsten en de hoge follow-up percentages, lijkt het

onwaarschijnlijk dat de resultaten van onze onderzoeken sterk vertekend zijn door recall bias (vertekening door fouten in herinnering) en differentiële bias. De bevindingen in dit proefschrift ondersteunen de hypothesen 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 is waarschijnlijk slechts een van de factoren die een rol speelt bij de toename van atopische aandoeningen. Toch is de darmflora een interessant en geschikt doelwit voor interventie. Wanneer we meer inzicht weten te verschaffen in de manier waarop bacteriën en hun producten ons immuunsysteem helpen te ontwikkelen, zouden we dit wellicht na kunnen bootsen zonder dat we onze hygiënische westere levensstijl hoeven op te geven.

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.