

Multispecies probiotics and antibiotic-associated side effects : pathophysiological and clinical evidence

Citation for published version (APA):

Koning, C. J. A. (2010). *Multispecies probiotics and antibiotic-associated side effects : pathophysiological and clinical evidence*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20100604ck>

Document status and date:

Published: 01/01/2010

DOI:

[10.26481/dis.20100604ck](https://doi.org/10.26481/dis.20100604ck)

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

The human intestinal microbiota is composed of more than 1000 different species and contains approximately hundred times as many genes as the human genome. Adaptive co-evolution has led to a symbiotic interrelationship between this complex microbiota and the host, which plays an important role in maintaining human health. The intestinal microbiota provides colonization resistance, is involved in several metabolic processes, influences the intestinal barrier function and modulates the immune system (**Chapter 1**), all working in concert to maintain homeostasis.

Though marked variations are present between individuals, under normal conditions the intestinal microbiota is relatively stable over time. However, this intestinal microbiota homeostasis can be markedly affected by external factors, such as antibiotic treatment, which can clinically result in antibiotic-associated diarrhea (AAD). Probiotics can affect the composition of the intestinal microbiota and there is a vast body of evidence on their beneficial effects in the prevention of AAD. However, most studies focus mainly on clinical outcome and the potential mechanisms of action underlying these effects remain largely unexplored.

The present thesis describes the effect of a multispecies probiotic on bacteriological, immunological and clinical parameters during as well as after antibiotic treatment in healthy volunteers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

There is much variation in the efficacy of the different species and strains of microorganisms used as probiotics. It is clear that probiotics can have several modes of action and that properties that apply for one probiotic strain do not necessarily apply for another. In **Chapter 2** the literature was reviewed to compare functionality and efficacy between different types (monostrain, multistrain and multispecies) of probiotics. A monostrain probiotic is defined as containing one strain of a certain species. Multistrain probiotics contain more than one strain of the same species or the same genus, such as *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium lactis*. The term multispecies probiotics is used for preparations containing strains that belong to more genera, for instance a *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Enterococcus faecium*. From this review it can be concluded that multispecies preparations have advantages compared to monostrain probiotics and, to a lesser extent, multistrain probiotics. In addition, possible mechanisms underlying the enhanced effects of probiotic mixtures are discussed. In a multispecies probiotic the bacterial strains may complement each others' effect through synergism and/or symbiosis, thereby maximizing the chance of providing clinically more effective probiotics. Furthermore, it is noted that special attention should be paid to avoid combinations of probiotic strains showing mutual inhibitory properties.

Chapter 3 describes the effect of a specially designed multispecies probiotic on the composition of the intestinal microbiota in healthy volunteers during and after

amoxicillin intake. In addition, the effect on the metabolic activity of the intestinal microbiota and on bowel habits was studied. The study showed that the intake of a multispecies probiotic significantly reduced diarrhoea-like bowel movements in healthy volunteers receiving amoxicillin. In addition, intake of the multispecies probiotic was able to affect the composition of the faecal microbiota using conventional bacterial culture. Changes over time were present in both groups and differed between the probiotic and the placebo group. Such changes were also observed for the studied parameters of metabolic activity. Although, the observed changes separately were small, altogether the sum of the changes may have contributed to the clinical improvement observed in the probiotic group.

The human gastrointestinal tract harbours a large and diverse microbiota of which many microbial species can not be cultured optimally with the currently available methods.

Therefore, in **Chapter 4** the effect of amoxicillin on the diversity and temporal stability of the dominant faecal microbiota and a potential restoration by the multispecies probiotics in healthy volunteers was assessed using DGGE profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments. The low similarity indices (SIs) and the low band number indicated that the stability and richness of the predominant faecal microbiota were markedly affected by amoxicillin intake and two months after cessation had not yet returned to its initial profile. In addition, an association between the disruption of the intestinal microbiota and the development of diarrhoea-like bowel movements was found, supporting the hypothesis that a lower stability of the dominant microbiota is related to a higher chance of developing AAD. Interestingly, when a multispecies probiotic was given during and after amoxicillin intake, a significantly better restoration of the microbiota was achieved after one month. Thereby, this could be one of the mechanisms in which probiotics contribute to the prevention and/or treatment of antibiotic associated diarrhoea.

Both probiotics and antibiotics can influence the immune system directly or indirectly by affecting the intestinal microbiota. Therefore, not only the effect of antibiotic and probiotic intake on bacteriological and clinical parameters but also on immune parameters was determined. **Chapter 5** addresses the influence of the multispecies probiotic on components of both the systemic and the mucosal immune system in healthy volunteers taking amoxicillin. The study showed that intake of the multispecies probiotic did not alter the analyzed systemic and mucosal biomarkers apart from a significant increase of serum secretory IgA two months after cessation of amoxicillin intake. In addition, amoxicillin intake was able to induce *in/ex vivo* immunological changes consisting mainly of a decreased sputum sIgA production and a decreased IL-4, IL-6, IL-13 and IFN- γ and an enhanced IL-10 production capacity in stimulated whole blood. Although no differences were observed in the probiotic group versus the placebo group, the intake of a multispecies probiotic resulted in an

even further decreased production of IL-4 and IL-13 and a less pronounced increase in IL-10 production. This implies that intake of amoxicillin has immunomodulating effects, which was further affected by probiotic intake. In addition, during and/or shortly after amoxicillin intake an association between the disruption of the intestinal microbiota and IL-8 and IL-10 was observed. However, the overall clinical relevance of the observed immunological changes still needs to be unravelled.

The study in healthy volunteers has demonstrated that short-term antibiotic use can cause long-term disturbances of the intestinal microbiota. However, the effect of frequent antibiotic use on the intestinal microbiota is not known. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients often suffer from acute exacerbations for which antibiotic therapy is frequently prescribed.

In **Chapter 6** the disturbance of the dominant faecal microbiota and the possible restoration by a multispecies probiotic in COPD patients treated with antibiotics for an acute exacerbation is assessed. Moreover, the effect on specific bacterial groups using both culture and molecular based techniques and on bowel habits was studied. In contrast to the results in healthy volunteers, the dominant faecal microbiota was not affected upon antibiotic intake in this COPD population as both similarity indices and band richness remained stable during and after antibiotic treatment. The PCR-DGGE results indicated that the prolonged antibiotic pressure seemed to have caused a long-term imbalance of the dominant faecal microbiota. As antibiotics only affect sensitive strains, extensive antibiotic use could have caused a prolonged narrowing of the diversity into a dominant faecal microbiota consisting of microbial populations insensitive to the given antibiotics. Furthermore, the study demonstrated that the short-term intake of the multispecies probiotic had a modest effect on the intestinal microbiota, albeit much smaller than was previously observed for healthy adults. Nevertheless, this did not result in a restoration of the microbiota imbalance and no reduction in diarrhoea-like bowel movements was found. However, as the dominant microbiota seemed to be profoundly and long lastingly altered by the frequent prior antibiotic use, it is speculated that a longer probiotic treatment is needed to restore such an effect.

Chapter 7 describes the effect of the multispecies probiotic on immune biomarkers during and after antibiotic intake in these COPD patients with a history of frequent antibiotic use. Furthermore, the association between the disruption of the intestinal microbiota and the immune biomarkers was assessed. Intake of the multispecies probiotic had a limited effect on biomarkers of the immune system in COPD patients treated with antibiotics for an acute exacerbation. In addition, the observed antibiotic effect on the immune biomarkers was possibly attributed to the resolution of the exacerbation and could not be linked to perturbations in the dominant faecal microbiota.

In conclusion, the studies described in this thesis support the rationale for the use of a multispecies probiotic in the prevention and treatment of antibiotic associated side effects. Intake of the specially designed multispecies probiotic significantly reduced diarrhoea-like bowel movements in healthy volunteers probably due to the observed restoration of the dominant faecal microbiota towards to the pre-antibiotic state. In addition, multispecies probiotic intake was able to affect antibiotic induced changes in *ex vivo* cytokine production and resulted in a significant increase in serum sIgA. However, no such effects were observed in COPD patients with a history of frequent antibiotic use. It is speculated that this was probably due to a profound and long-term imbalance of the intestinal microbiota caused by the frequent prior antibiotic use. Large prospective human intervention trial are needed to determine to what extent antibiotic induced disturbances of the intestinal microbiota are permanent, what their clinical implications are and if probiotic supplementation is able to either prevent or with prolonged use reverse such an imbalance. In addition, it would be interesting to identify host-related, microbiota-related or environmental risk factors to characterize subjects at risk and who would benefit from probiotic intake.



Samenvatting

Samenvatting

In het maag-darmkanaal bevindt zich een complex bacterieel ecosysteem (de intestinale microbiota), dat ongeveer honderd keer meer genen bevat dan het humane genoom. Deze intestinale microbiota bevat maar liefst 10^{14} micro-organismen en meer dan 1000 verschillende soorten waarvan het grootste deel anaëroob is (99%). Deze complexe microbiota en de gastheer leven in symbiose met elkaar, hetgeen belangrijk is voor het behoud van een goede gezondheid. De intestinale microbiota kan de gezondheid van de gastheer op drie niveaus beïnvloeden. Allereerst zorgt de microbiota zowel voor de digestie van onverteerbare koolhydraten en de aanmaak van vitamines (B en K), als voor de bescherming tegen potentieel pathogene micro-organismen door de productie van antimicrobiële stoffen en de competitie voor bindingsplaatsen en nutriënten. Dit laatste wordt ook wel kolonisatieresistentie genoemd. Ten tweede beïnvloedt de microbiota het darmepitheel en diens barrièrefunctie, waardoor bacteriën en andere schadelijke stoffen het lichaam niet kunnen binnendringen. Ten derde kan de microbiota het immuunsysteem beïnvloeden (**Hoofdstuk 1**).

De samenstelling van de microbiota verschilt van persoon tot persoon en is onder normale omstandigheden bij een gezonde volwassen persoon relatief stabiel. De microbiota kan door externe factoren zoals het gebruik van antibiotica echter worden verstoord, wat kan resulteren in antibioticum geassocieerde diarree (AAD). Probiotica (meestal melkzuurbacteriën) worden door de World Health Organisation (WHO) gedefinieerd als “levende micro-organismen die, wanneer toegediend in voldoende hoeveelheid, een gezondheidsbevorderend effect hebben voor de gastheer”. Probiotica kunnen de microbiota samenstelling (en metabole activiteit) moduleren en er is toenemend bewijs dat ze een gunstige effect hebben in de preventie van AAD. De meeste studies richten zich echter vooral op het klinisch effect (preventie van diarree), terwijl de mogelijke werkingsmechanismen waarop dit effect berust nog grotendeels onbekend zijn.

In dit proefschrift wordt het effect van een multispecies probioticum op bacteriologische, immunologische en klinische parameters tijdens en na antibioticumgebruik beschreven, in zowel gezonde vrijwilligers als patiënten met ‘chronic obstructive pulmonary disease’ (COPD), een chronische obstructieve longziekte.

Er is veel variatie in de effectiviteit van de verschillende soorten en stammen van micro-organismen. Het is bekend dat probiotica verschillende werkingsmechanismen hebben en dat eigenschappen die gelden voor één bepaalde stam niet noodzakelijkerwijs ook gelden voor andere stammen. **Hoofdstuk 2** beschrijft de resultaten een literatuurstudie over de functionaliteit en effectiviteit van verschillende soorten (monostain, multistain en multispecies) probiotica. Een

monostrain probioticum bestaat uit één enkele stam afkomstig van een bepaalde bacteriesoort. Multistrain probiotica bestaan uit meer dan één stam van dezelfde soort, zoals bijvoorbeeld een *Bifidobacterium bifidum* en een *Bifidobacterium lactis*. De term multispecies probiotica wordt gebruikt voor producten die bacteriën bevatten van meer dan één bacteriegeslacht, zoals *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* en *Enterococcus faecium*. Uit de literatuurstudie bleek dat multispecies probiotica voordelen hebben ten opzichte van monostrain probiotica en in mindere mate, multistrain probiotica. Dit is ook te verwachten: verschillende soorten (micro-organismen) kunnen, door verschillende eigenschappen, elkaars effect versterken waardoor er synergie optreedt. Ook kunnen ze een symbiose aangaan en elkaars groei versterken. Dit vergroot de kans op een klinisch succesvol probioticum. Hierbij is het wel van belang om te controleren of de bacteriën in een multispecies probioticum elkaar niet negatief beïnvloeden.

In **Hoofdstuk 3** wordt het effect beschreven van een speciaal samengesteld multispecies probioticum op de samenstelling van de fecale microbiota in gezonde vrijwilligers tijdens en na amoxicilline gebruik. Tevens is het effect op de metabole activiteit van de microbiota en op het ontlastingspatroon bestudeerd. De studie liet zien dat een diarreeachtig ontlastingspatroon minder vaak voorkwam in de groep die behandeld was met het multispecies probioticum. Daarnaast werd aangetoond dat gebruikmakend van conventionele kweekmethodes, inname van het multispecies probioticum een effect heeft op de samenstelling van de microbiota. Veranderingen in de microbiotasamenstelling over de tijd werden waargenomen in beide groepen, maar deze verschilden tussen de probioticum en de placebo groep. Dergelijke fluctuaties werden ook gezien in de bestudeerde parameters van de metabole activiteit. Hoewel de waargenomen veranderingen op zichzelf klein waren, kan de optelsom van al deze veranderingen toch hebben bijgedragen aan de klinische verbetering (minder diarreeachtige ontlasting) in de groep die behandeld werd met het multispecies probioticum.

Van de complexe en zeer diverse microbiota die aanwezig is in het maag-darmkanaal kunnen veel micro-organismen niet optimaal gekweekt worden met behulp van de huidige kweekmethodes. Daarom is in **Hoofdstuk 4** het effect van amoxicilline op de diversiteit en stabiliteit van de dominante fecale microbiota en een mogelijk herstel door inname van het multispecies probioticum in gezonde vrijwilligers bestudeerd met behulp van PCR-DGGE. PCR-DGGE is een op 16S rRNA gebaseerde kweek-onafhankelijke moleculaire techniek. Middels deze PCR-DGGE werd aangetoond dat amoxicilline inname leidt tot een duidelijke verstoring van de dominante fecale microbiota en dat deze verstoring 2 maanden na stoppen van amoxicilline nog niet hersteld is. Tevens werd aangetoond dat er een associatie is tussen de verstoring van de microbiota door amoxicilline gebruik en het voorkomen van een diarreeachtig ontlastingspatroon. Dit ondersteunt de hypothese dat de mate van verstoring van de microbiota gerelateerd is aan de kans op het ontwikkelen van AAD. Als laatste werd

aangetoond dat bij gezonde vrijwilligers die behandeld waren met het multispecies probioticum, vier weken na amoxicilline inname een significant beter herstel van de dominante fecale microbiota werd waargenomen. Dit duidt erop dat een herstel van de microbiota daadwerkelijk één van de mechanismen is achter het effect van probioticumgebruik ter preventie van AAD.

Zowel probiotica als antibiotica kunnen het immuunsysteem direct beïnvloeden of indirect via modulatie van de intestinale microbiota. Daarom is er in dit proefschrift niet alleen gekeken naar het effect van antibiotica en probiotica inname op bacteriologische en klinische parameters, maar ook op het immuunsysteem. Het effect van het multispecies probioticum op componenten van zowel het mucosale als het systemische immuunsysteem tijdens en na amoxicilline inname in gezonde vrijwilligers wordt beschreven in **Hoofdstuk 5**. De resultaten van deze studie laten zien dat inname van het multispecies probioticum geen invloed had op de geanalyseerde immunologische biomarkers, behalve een toename in serum secretair IgA twee maanden na amoxicilline inname. Daarnaast werd aangetoond dat amoxicilline inname *in* en *ex vivo* immunologische veranderingen kon induceren. Deze veranderingen bestonden voornamelijk uit een afname van sputum secretair IgA en een afname van IL-4, IL-6, IL-13 and IFN- γ productie en een toename van IL-10 productie in *ex vivo* gestimuleerd volbloed. Hoewel er geen verschil werd waargenomen tussen de probioticum en placebo groep, resulteerde inname van het multispecies probioticum in een verdere afname van IL-4 en IL-13 productie en een verminderde toename van IL-10 productie. Dit suggereert dat amoxicilline inname immuunmodulerende effecten heeft, welke beïnvloed kunnen worden door probiotica inname. Ook werd er een associatie gevonden tussen de verstoring van de microbiota en IL-8 en IL-10. De exacte klinische relevantie van deze immunologische veranderingen is echter nog niet duidelijk.

De studie in gezonde vrijwilligers liet zien dat kortdurend antibioticagebruik kan leiden tot lange termijn verstoringen van de intestinale microbiota. Echter, het effect van frequent antibioticumgebruik op de intestinale microbiota is niet bekend. COPD patiënten hebben vaak last van een acute verergering (exacerbaties) van hun klachten waarvoor ze worden behandeld met antibiotica.

De verstoring van de dominante fecale microbiota en een mogelijk herstel hiervan door inname van het multispecies probioticum in COPD patiënten die behandeld worden met een antibioticum voor een acute exacerbatie wordt beschreven in **Hoofdstuk 6**. Tevens werd het effect op specifieke bacteriële subgroepen, met behulp van zowel kweekafhankelijke als kweekonafhankelijke technieken, en op het ontlastingspatroon geanalyseerd. In tegenstelling tot de bevindingen in gezonde vrijwilligers, bleek dat antibiotica inname niet leidt tot een verstoring van de dominante fecale microbiota in deze COPD patiënten. Deze bevinding suggereert dat het langdurig antibioticumgebruik heeft geleid tot een lange termijn verstoring van de

dominante fecale microbiota. Aangezien antibiotica alleen effect hebben op gevoelige bacteriële stammen, zou het goed mogelijk kunnen zijn dat het frequente antibioticumgebruik tot een versmalling van de microbiota heeft geleid, bestaande uit bacteriële populaties die ongevoelig zijn voor de voorgeschreven antibiotica. Tevens liet de studie zien dat kortdurende inname van het multispecies probioticum een bescheiden effect had op bepaalde bacteriële groepen, welke veel kleiner was dan het effect waargenomen bij de gezonde vrijwilligers. Desondanks resulteerde dit niet in een verandering van de microbiota samenstelling of in een afname van diarreeachtige ontlasting. Echter, aangezien de microbiota zo ernstig en langdurig verstoord lijkt door eerder antibioticumgebruik, denken wij dat het noodzakelijk is om probiotica veel langer in te nemen om herstel te bewerkstelligen.

Hoofdstuk 7 beschrijft het effect van het multispecies probioticum op immunologische biomarkers tijdens en na antibioticumbehandeling in deze COPD patiënten met een voorgeschiedenis van frequent antibioticumgebruik. Tevens is de associatie tussen de immunologische biomarkers en de verstoring van de microbiota bestudeerd. De studie liet zien dat inname van het multispecies probioticum slechts een gering effect had op de gemeten biomarkers. Het waargenomen antibioticum effect op de immunologische biomarkers leek toegeschreven te kunnen worden aan het herstel van de exacerbatie en kon niet gekoppeld worden aan veranderingen in de microbiota samenstelling.

Concluderend kan worden vastgesteld dat de in dit proefschrift beschreven studies de rationale voor het gebruik van probiotica voor de preventie en behandeling van antibioticum geassocieerde bijwerkingen ondersteunen. Inname van een speciaal ontwikkeld multispecies probioticum vermindert het voorkomen van een diarreeachtige ontlasting in gezonde vrijwilligers, wat waarschijnlijk toe te schrijven is aan het waargenomen herstel van de samenstelling van de intestinale microbiota. Daarnaast was het multispecies probioticum in staat de veranderingen in *ex vivo* cytokine productie die geïnduceerd werden door antibioticumgebruik te beïnvloeden en resulteerde het in een toename van serum secretair IgA. Dergelijke effecten werden echter niet waargenomen in de studie met COPD patiënten. Het frequent en langdurig antibioticumgebruik van deze patiënten, wat leidde tot een lange termijn verstoring van de dominante fecale microbiota, ligt hier mogelijk aan ten grondslag. In de toekomst zijn prospectieve interventie studies nodig om te onderzoeken in welke mate de antibioticum geïnduceerde veranderingen van de microbiota permanent zijn, wat de klinische implicatie hiervan is en of probioticuminname deze verstoring kan voorkomen dan wel kan herstellen. Door in toekomstig onderzoek ook aandacht te besteden aan het in kaart brengen van gastheer-, microbiota- en omgevingsfactoren, kunnen we tevens meer inzicht verkrijgen in welke personen gebaat zouden zijn bij probioticumgebruik.