

Ervaringen met faagtherapie in Nederland

Saskia Kuipers

Achtergrond

Bacteriofagen, ook wel de meest voorkomende microben op deze aardbol genoemd en vast onderdeel van het menselijk microbiom, zijn behoorlijk in het nieuws geweest de afgelopen jaren. De sterke toename van antibioticumresistentie sinds 2000 is hier mede debet aan. In de jaren vijftig van de vorige eeuw waren antibiotica volop beschikbaar in Europa en de Verenigde Staten, waardoor de noodzaak tot verder onderzoek naar bacteriofagen verdween. Inmiddels kijkt de wereld, geplaagd door multiresistente bacteriën en sombere toekomstscenario's met onbehandelbare infecties, met een bredere blik naar antimicrobiële mogelijkheden. De toegenomen aandacht blijkt uit publicaties over het gebruik van bacteriofagen bij infecties met ESKAPE-bacteriën (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, en *Enterobacter*-speciës).[1] Na het beschikbaar komen van antibiotica rond 1940 experimenteerden de instituten in Polen, Rusland en Georgië wel verder met bacteriofagen, al bleef de hoeveelheid bruikbare literatuur die daaruit voortkwam summier, zoals beschreven in het Feuilleton Faagtherapie in NTMM, september 2020. Dit artikel beschrijft een aantal klinische casussen en laboratoriumervaring met bacteriofagen.

Casusbeschrijvingen

In het Radboudumc in Nijmegen werden wij in de afgelopen jaren geconfronteerd met diverse patiënten die zelf voor bacteriofaagtherapie hadden gekozen vanwege chronische bacteriële infecties die niet goed reageerden op antibiotica. De ziektebeelden van deze patiënten liepen uiteen.

De eerste patiënt die vroeg of bacteriofagen toegediend mochten worden in het ziekenhuis leed aan *Pseudomonas aeruginosa*-bacteriëmie vanuit een met *P. aeruginosa* gekoloniseerde, 18

jaar bestaande Clagett-holte. De familie van deze patiënt had een bacteriofagenoplossing opgehaald bij het 93 jaar oude Eliava Instituut in Tbilisi, Georgië. De bacteriofagenoplossing met natuurlijk voorkomende lytische fagen wordt geleverd onder de naam 'Intestiphage' en zou werkzaam zijn tegen zeven verschillende grampositieve en gramnegatieve bacteriën, waaronder *Pseudomonas aeruginosa*. In ons laboratorium onderzochten we deze oplossing op werkzaamheid tegen drie verschillende stammen, een *P. aeruginosa*-stam uit bloed en twee stammen uit pus uit de Clagett-holte. De fagen vertoonden geen lytische werking tegen de pseudomonasstammen uit pus, zowel in vitro als in vivo. De holte werd diverse malen gespoeld met Intestiphage. De patiënt overleed uiteindelijk aan een aortale bloeding in de holte. Deze casus illustreert dat bacteriofagen sterk gespecialiseerd zijn en dat een onbekende bacteriofagenoplossing altijd op functionaliteit moet worden getest.

De tweede patiënt leed aan recidiverende *P. aeruginosa*-bacteriëmie vanwege een geïnfecteerd endovasculair focus (TIPS) in de levervenen die niet kon worden verwijderd. Voor deze casus kwamen halverwege 2019 infectioloog Jaap ten Oever, apotheker Roger Brügge-mann en arts-microbioloog Saskia Kuipers bijeen om voor de Inspectie een "Onderbouwing voor de afwezigheid van een adequaat medicamenteus alternatief" te schrijven, met als doel antipseudomonasbacteriofagen uit het Militair Hospitaal Koningin Astrid in Leuven (België) te importeren. Dat stuitte echter op twee bezwaren. De Inspectie (IGJ) had nog geen ervaring met dergelijke aanvragen. Ook de apotheker, die niet kon beloven dat het

Radboudumc Nijmegen, afd. Medische Microbiologie, dr. S. Kuipers, arts-microbioloog.
Correspondentieadres:
saskia.kuipers@radboudumc.nl

medicament steriel was, liep aan tegen grenzen die in de regels van de magistrale bereiding waren vastgelegd. De patiënt week uit naar België voor therapie met bacteriofagen in combinatie met twee antipseudomonale middelen, waardoor zijn infectieuze probleem verdween.

Een derde patiënt had na zijn niertransplantatie last van recidiverende urineweginfecties met hardnekkige urethritis door een ESBL-bevattende *Klebsiella pneumoniae*. Er was geen sprake van prostatitis. Vele kuren meropenem, later gecombineerd met amikacine blaasspoelingen, leidden niet tot genezing. De urineweginfectie recidiveerde keer op keer. Hierop stuurde deze patiënt zelf zijn urine naar het Eliava Instituut in Tbilisi in de hoop dat er werkzame bacteriofagen te vinden waren. Het pakket met ampullen met bacteriofagen uit Tbilisi werd door een Belgische kennis in ontvangst genomen, want de Nederlandse wet verbiedt bacteriofagen per post te verzenden.

Het lukte ons niet te achterhalen hoeveel verschillende anti-*Klebsiella pneumoniae*-bacteriofagen in de ampullen aanwezig waren. Wel konden we in ons laboratorium aantonen dat er lytische activiteit was tegen de *K. pneumoniae*-stam uit de urinewegen van onze niertransplantatiepatiënt. Hij diende zelf zijn bacteriofagen oraal en intravesicaal toe, want hij had al ervaring met blaasspoelingen met amikacine. Zijn urethritisklachten verminderden zodra de bacteriofagen intravesicaal waren ingebracht. Door ingestie van fagen verdween ook het darmdragerschap van ESBL-bevattende *Klebsiella pneumoniae* tot onder detecteerbare niveau. Hij genas van zijn chronische infectie met de combinatie van langdurig meropenem en bacteriofagen. De patiënt is in de daarop volgende 18 maanden klachtenvrij gebleven. Zijn succesverhaal werd getoond in de tv-uitzending van "Dokters van Morgen" van februari 2020 en is met zijn toestemming beschreven in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [2]

Bacteriofagegebruik in de literatuur

Bacteriofagentherapie is sporadisch beschreven bij *Pseudomonas aeruginosa*-sepsis en bij *P. aeruginosa*-pneumonie bij taaislijmziekte en na longtransplantatie, zowel met als zonder antibiotische behandeling en zowel intraveneus als via inhalatie. [3]

Op het gebied van urogenitale infecties verscheen er dit jaar een artikel over een klinische trial naar het gebruik van bacteriofagen bij urineweginfecties na TURP. Hierbij werd de gestandaardiseerde bacteriofagenoplossing Pyophage intravesicaal vergeleken met een orale antibioticumkuur. [4] De suspensie was werkzaam tegen zes verschillende bacteriën en werd zo nodig verrijkt met nieuwe fagen. Pyophage bevatte echter geen fagen gericht tegen *Klebsiella*-speciës. Pyophage werd in vitro getest tegen de verwekkers van de post-TURP-urineweginfecties bij de patiënten en kon veilig worden gebruikt maar leverde geen voordeel op ten opzichte van de antibioticumkuur. Het moet nog worden bewezen dat gepersonaliseerde therapie met grotere concentraties specifieke bacteriofagen gericht betere resultaten geeft. Op theoretische gronden zou een persoonlijke bacteriofaagtherapie - met een geconcentreerde cocktail van actieve fagen werkzaam tegen de specifieke verwekker van de chronische infectie - tot betere resultaten kunnen leiden dan een reeds bereid combinatieproduct. Voor de persoonlijke bacteriofaagtherapie is circa één tot twee weken tijd nodig naast de bacteriële verwekker van de chronische infectie en een reeds bestaande 'phage library'.

Laboratoriumonderzoek naar bacteriofagen

Welke diagnostiek voeren wij uit in ons microbiologische laboratorium als we een bacteriofagenoplossing uit Georgië aangeboden krijgen? We keken de kunst af van Stan Brouns bij de TU Delft, waar een van onze analisten stage kon lopen.

Om de aanwezigheid van werkzame bacteriofagen tegen de pseudomonas- en klebsiellastammen te bestuderen voeren wij een zogeheten 'spot'-test uit. Deze test maakt gebruik van een dubbele laag agar, te weten een vaste voedingsbodem en een wat zachtere topagar. De vaste voedingsbodem is niet alleen een

voedingsstoffenleverancier voor de bacteriën maar ook een aanhechtingsmedium voor de topagar. De topagar bestaat uit 4 milliliter 0,6 procent 'cation-adjusted' Mueller Hintonagar, waaraan 100 microliter van de te onderzoeken bacteriestam in stationaire groeifase is toegevoegd. Boven op deze zachtere agar wordt een druppel bacteriofaagsuspensie gepipetteerd. Daarna wordt de plaat gedurende 18 uur bij 37 graden Celsius geïncubeerd. Dit geldt voor bacteriën die in 18 uur optimaal bij die temperatuur groeien, zoals de meeste stafylokokken, enterobacteriën en niet-fermentoren. Als er plaques zijn gevormd in de topagar daar waar de druppel met bacteriofagen is aangebracht, dan is er lyse (afbraak) van de bacterie oftewel lytische activiteit van de onderzochte fagen, en zijn de bacteriofagen in de plaques inzetbaar als therapie. Overigens lijkt de grootte van de plaques samen te hangen met de capsid-kop van de bacteriofaag. In 2016 beschreven Jurczak-Kurek *et al.* dat bacteriofagen met een kleinere capsidkop juist grotere plaques vormen dan die met een grote capsidkop, juist omdat de fagen met een kleinere kop makkelijker door de agar kunnen bewegen.[5]

De afzonderlijke bacteriofagen uit de Georgische Intestiphage-ampullen zijn verrijkt door ze te oogsten uit plaques met dezelfde morfologie met behulp van een steriele houten prikker. Deze prikker wordt vervolgens gestoken in een verse voedingsbodem met topagar geënt met een bacteriestam, om daarna de bacteriofagen over de hele plaat te verdelen met een geautoclaveerd papieren stripje. De geogste bacteriofagen worden opgelost en gestabiliseerd door een overnacht incubatiestap in een buffer bij 4° Celsius. Daarna wordt de inhoud vermengd met chloroform, gecentrifugeerd, gefilterd door een 0,22 micrometer filter om alle bacterieresten te verwijderen, en ingevroren tot verder gebruik.

Beschouwing

Bacteriofagen kunnen een aanvulling zijn in het therapeutisch arsenaal tegen bacteriële infecties, met als voordeel dat het microbioom van de gastheer niet wordt aangetast; maar kunnen bacteriofagen het antimicrobiële resistentieprobleem oplossen? Ook bij gebruik van bacteriofagen treedt resistentie op. Bacteriën kunnen zich op verschillende manieren ongevoeligheid ontwikkelen tegen bacteriofagen door hun oppervlak aan te passen, door hun extracellulaire matrix te gaan verdikken of door een eiwit aan te maken dat genetisch materiaal van de faag weert als dat door de celwand wordt geïnjecteerd. Om resistentievorming tegen te gaan dient men therapeutisch een cocktail aan bacteriofagen te gebruiken. Hopelijk zijn de praktische en juridische uitdagingen rondom bereiding en toediening van bacteriofagen op korte termijn overwonnen. Het spreekt voor zich dat een toe te dienen bacteriofagenoplossing vrij moet zijn van lipopolysachariden en andere contaminanten. Het geven van bacteriofagen waar mogelijk in combinatie met antibiotica kan veelbelovend zijn in de behandeling van chronische infecties, en onderzoek naar de werking van geïndividualiseerde fagentherapie verdient dan ook alle aandacht en financiële steun. Het onderwerp 'diagnostiek en behandeling met bacteriofagen' mogen wij als microbiologen absoluut niet laten liggen!

Met dank aan Mike Mientjes, Stan Brouns en Jakko van Ingen voor het mogelijk maken van dit werk.

Referenties

1. El Haddad L, Harb CP, Gebara MA, Stibich MA, Chemaly RF. A systematic and critical review of bacteriophage therapy against multidrug-resistant ESKAPE organisms in humans. *Clin Infect Dis.* 2019;69:167-78.
2. Kuipers S, Ruth MM, Mientjes M, de Sévaux RGL, van Ingen J. A Dutch case report of successful treatment of chronic relapsing urinary tract infection with bacteriophages in a renal transplant patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;64(1):e01281-19.
3. Aslam S. Bacteriophage therapy as a treatment option for transplant infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2020;33:298-303.
4. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Inf Dis* 2020;16:S1473-3099(20)30330-3.
5. Jurczak-Kurek A, Gaşior T, Nejman-Faleńczyk B, et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep.* 2016;6:34338.