

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29301> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Bauer, Martijn Philippe

**Title:** Clostridium difficile infection : epidemiology, complications and recurrences

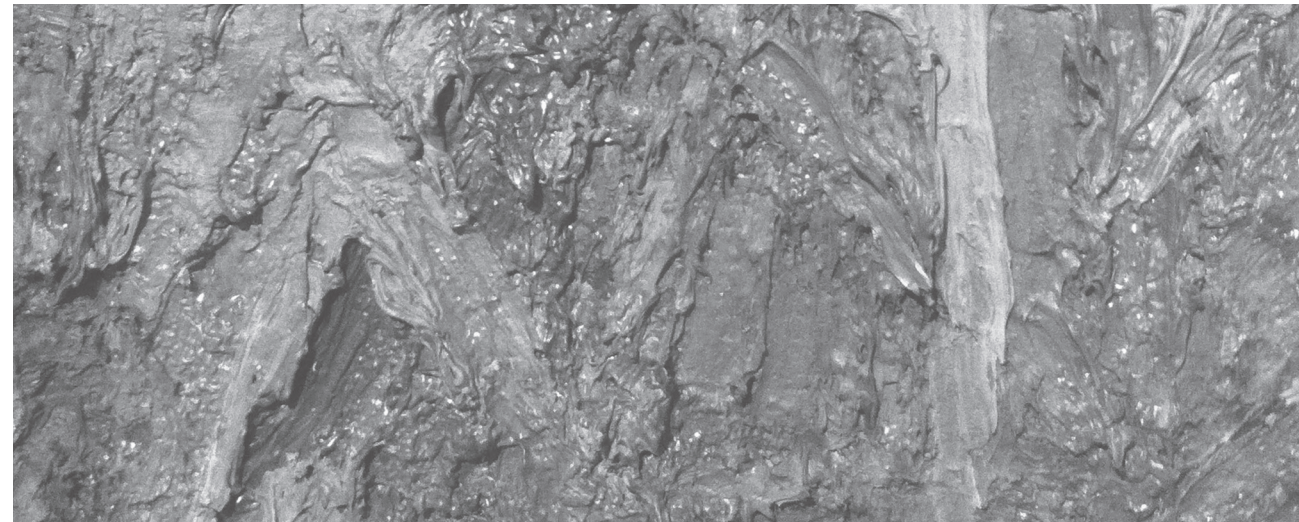
**Issue Date:** 2014-10-22

**Summary and general discussion**

**Nederlandse samenvatting**

**List of publications**

**Curriculum Vitae**



## Summary and general discussion

*Clostridium difficile*, originally named after the difficulty in isolating and characterizing it [1], has proved to be a difficult pathogen indeed, because it has posed us for a number of problems, even more so during the past decade. The importance of various possible sources and transmission routes and the role of asymptomatic carriers are unclear as yet, as are the driving forces behind the emergence and spread of new strains. Some of these strains seem capable of spreading more efficiently, which may in part overlap with a higher virulence. Higher virulence may offer an evolutionary advantage to the bacterium if it results in more cases of refractory disease or recurrences, with ongoing shedding of large amounts of the bacterium and inherent infectiousness. Furthermore, it is currently difficult to identify those patients with a high risk of recurrence and modify management strategies accordingly. The studies described in the preceding chapters aimed to contribute to solving these problems.

In the following paragraphs, the chapters will be summarized in numerical order, with a discussion after the summary of each chapter. Chapters 1, 2, 3 and 4 concern the epidemiology of *C. difficile* strains. Chapters 5 and 6 concern the prediction of an unfavorable outcome of CDI, particularly recurrence. Chapters 7, 8 and 9 concern the treatment of CDI.

Although *C. difficile* is a ubiquitous microorganism, which may be found in the environment, animals and food, its prevalence is thought to be so much higher in healthcare facilities that for a long time, acquisition of CDI was thought to occur almost exclusively during or shortly after admission to such facilities. The high incidence of CDI in healthcare facilities as compared to the community presumably results from the high density of individuals prone to CDI, typically elderly patients with comorbidity, who may serve as a reservoir in which *C. difficile* can multiply. However, it is increasingly realized that CDI may be acquired outside of healthcare facilities. **Chapters 1 and 2** concern community-onset CDI. In chapter 2, we describe a study that investigated how often one of the large clostridial toxins was found in feces collected from diarrheic patients and submitted to regional diagnostic microbiological laboratories by general practitioners. These feces were submitted for various microbiological diagnostics, most often parasitological testing according to the Dutch general practitioners' guidelines. We demonstrated toxin in the feces of 1.5% of patients. The study was not designed for optimal recovery of the bacterium itself from the feces, but in a large majority of cases, culture was positive as well. Many different strains were encountered, but not – strikingly – the epidemic PCR ribotype 027, in spite of the fact that hospital outbreaks with this strain had occurred in these regions

[2]. Some of the other PCR ribotypes may be considered highly endemic in hospitals or emerging, notably PCR ribotype 078 which was found in four patients, but other strains were rare and not linked to hospitals. The latter finding was supported by the finding that a large number of cases could not be linked to healthcare facilities. Enzyme immunoassays were used to demonstrate the toxin, which had the disadvantage of suboptimal sensitivity, but the advantage of a higher chance that these findings represented CDI and not asymptomatic carriage. This was especially important, since other enteropathogens were not systematically ruled out. Another weakness of this study was selection bias introduced because only feces submitted by general practitioners for testing were investigated. The general practitioners' guideline recommends testing when diarrhea is severe or long-lasting. This may mean that mild community-onset CDI cases were missed. These cases are probably mostly self-limited if they are incited by antibiotics that are subsequently stopped [3].

Several studies have shown a varying proportion of CDI cases to be community-acquired, but the definitions of community acquisition differ. Some studies [4-8] did not systematically examine previous admissions to healthcare facilities. Other studies include a certain period that the patient has not been admitted to a healthcare facility in the definition. The Ad Hoc *C. difficile* Surveillance Working Group [9, 10] advocated a division of CDI into healthcare-associated and community-associated CDI. The latter is defined as CDI with onset in the community (or in a healthcare facility within 48 hours after admission) in a patient who has not been discharged from a healthcare facility in the previous 12 weeks. If the patient was discharged between four and 12 weeks ago, such a case should be classified as being of indeterminate association. A further difficulty concerning studies on community-acquired CDI is patient selection. The studied patient population may strongly influence the proportion of community-acquired CDI and the extrapolated incidence in the community. Estimation of incidences may also be hampered by uncertainty of the size of the population from which stool samples were collected, e.g. a hospital's catchment area. Lastly, *C. difficile* cannot always be assumed to be the cause of the diarrhea, since other enteropathogens are usually not ruled out systematically and asymptomatic carriage is a possibility. In 1995, Karlström et al. [11] found 28% of 1888 CDI cases, defined as unique patients with toxin-positive stool samples, from 13 of Sweden's 31 microbiological laboratories, to be community-acquired, defined as community-onset without hospitalization in the preceding four weeks. In the same year, a study in an Irish tertiary hospital [12] showed 11% of 73 subsequent new CDI cases (diarrhea with positive stool cytotoxicity test) to be community-acquired, which was defined as occurring on or within 72 hours of admission without hospitalization in the previous 60 days. In 1999, a Swedish study [13] found 22% of 267 cases of first episodes of CDI to be community-acquired, i.e. without hospitalization in the previous 60 days. A year later a similar proportion of community-acquired CDI was found in another

Swedish study [14]. A hospital-based study in The Netherlands [15], conducted in 2005, found 20% of 81 CDI cases to be community-onset without hospitalization in the preceding four weeks. After the implementation of a state-wide surveillance system in Connecticut in 2006, 60% of 400 evaluable community-onset CDI cases reported that year by acute-care hospitals met the definition of community-acquisition, i.e. no admissions to healthcare facilities in the previous three months [16]. Because of the above-mentioned methodological problems, it is difficult to calculate incidence rates from these figures. A study based on the United Kingdom General Practice Research Database [17] evaluated the incidence of community-acquired CDI (not hospitalized the previous year), using the number of inhabitants registered with general practitioners providing data for this database as a denominator. From 1994 to 2004, the incidence rose from 0 to 18 per 100,000 persons per year. However, the fundamental problem of selection bias remains. When do GPs decide to perform diagnostics for a case of diarrhea and when do they specifically test for CDI? Two studies tried to address the latter problem by testing stool samples submitted by general practitioners irrespective of the requested diagnostic test. The first study [18] showed 9.2% of 703 stool samples from individual patients to be toxin EIA-positive; 53% of these patients had not been hospitalized in the previous four weeks. In the second study [19], stool samples submitted by GPs to two microbiological labs were randomly selected for testing with cytotoxicity assay. Of 2000 samples, 2.1% were cytotoxin-positive and 45% of the corresponding patients had been hospitalized in the previous six months. The findings of this last study were remarkably similar to those of our study.

Few other studies into community-associated CDI used typing strategies. Contrary to our findings, the Swedish studies [13, 14] found similar distributions of PCR ribotypes among nosocomial and community-acquired cases. Farm animals are obvious candidates for a reservoir, since *C. difficile* may be a commensal and pathogen in animals and farm animals are often exposed to antibiotics. Spores might be spread either by direct contact with animals and their stools or by consumption of contaminated meat. Several studies have demonstrated the presence of *C. difficile* in animal faeces and meat. Evidence for farm animals as a reservoir may come from epidemiological associations and typing studies. Wilcox et al. [19] found the incidence of community-onset CDI to be slightly higher in the urban area that was investigated than in the semi-rural area, whereas in our study, the proportion of positive stool samples was highest in the more rural part. In both an earlier Australian study [6] and our study, there were no patients who reported contact with farm animals. However, in the more rural part of the Netherlands, four out of 10 infections in which PCR ribotyping could be performed were caused by PCR ribotype 078, whereas this ribotype was found in neither of the other regions. This ribotype is frequently found in farm animals and has been associated with community-associated CDI in another

Dutch study [20]. Multilocus variable number tandem repeat analysis of PCR-ribotype 078 isolates in this study revealed four clonal complexes to which both porcine and human strains belonged.

Infants, who have been shown to be frequent asymptomatic carriers [21-23], have also been suggested as a community reservoir for *C. difficile*. Interestingly, Wilcox et al [19] showed contact with infants up to two years of age to be significantly associated with community-onset CDI, when cases were compared to age-matched controls with community-onset diarrhea due to other causes (crude OR 8.2).

Although many patients with community-acquired CDI fulfill the classical risk profile, some appear to be younger with less comorbidity and, strikingly, without recent antibiotic use. Dial et al. [24] found that, of 836 patients of 65 years or older without admission to a healthcare facility in the previous 90 days who were hospitalized with CDI as the primary diagnosis, 46% had not used antibiotics in the previous 90 days. Nevertheless, antibiotic use was still a major risk factor when these patients were compared to patients admitted with other diagnoses (RR 10.6, 95%CI 8.9 – 12.8). Other studies, including ours, found similar proportions of patients without prior antibiotic use. This is a striking difference with studies into nosocomial CDI, which usually show that a large majority of patients have used antibiotics.

From the existing literature and our findings (and partly also those described in chapter 3), we conclude that numerous different strains of *C. difficile* circulate in the community and intermittently colonize humans, which may lead to disease under the right circumstances. These circumstances are discussed later in this discussion. New strains are probably introduced into healthcare facilities by asymptomatic carriers admitted from the community, as evidenced by a typing study that could not link several nosocomial CDI cases to other cases in the same hospital [25]. It seems likely that humans and animals both act as reservoirs. In order to understand more about the spread of *C. difficile* strains we need large cohorts both inside and outside of the hospital with regular surveillance for *C. difficile* carriage and typing of cultured strains.

In **Chapter 3**, we report a study into asymptomatic carriage by patients with cystic fibrosis (CF). CF, caused by loss-of-function mutations in the gene that encodes the chloride channel, CFTR, leads to a higher viscosity of airway secretions. This in turn leads to stasis, microbial colonization of the airways with chronic inflammation, and bronchiectasis. Depending on the severity of CF, these patients regularly experience respiratory tract infections and therefore are frequently treated with antibiotics and often admitted to hospital. This should make them prone to CDI, but they are thought to seldom develop CDI. Asymptomatic carriage of *C. difficile* has frequently been observed in CF patients who were taking antibiotics [26-28]. No studies on CDI in CF patients have been published since these studies from the early 1980s. Therefore, it

was unclear whether this observation is still valid in our era of emerging epidemic *C. difficile* strains. Furthermore, no typing studies have ever been performed and no risk factors for *C. difficile* carriage in CF carriage have been investigated. Interestingly, a number of cases of severe colitis due to *C. difficile* without diarrhea have been described in CF patients in recent years [29-31]. In our sample of CF patients from one of the CF centers in The Netherlands, we found a high rate of carriage of *C. difficile*, but strikingly, predominantly non-toxigenic strains. Carriage was associated with younger age and more-severe CF. PCR ribotypes were multiple and mostly non-epidemic.

The studies from the 1980s found similarly high rates of *C. difficile* carriage, but only one study found a similarly low proportion of non-toxigenic strains (27%). In two of these studies, carriage was strongly associated with antibiotics. In our study, antibiotics were associated with carriage, but the association was not statistically significant. The majority of CF patients were taking maintenance antibiotics and even more had recently received antibiotic therapy, which probably limited statistical power to detect an association.

Carriage of non-toxigenic *C. difficile* strains probably protects against colonization with toxigenic strains and CDI [32, 33]. These strains circulate in the community [34], but carriage was much rarer among the control group of non-CF patients admitted to an internal medicine ward. A study aiming to colonize healthy volunteers with non-toxigenic *C. difficile* found that it was only possible to establish enduring colonization after administration of antibiotics and repeated doses of non-toxigenic *C. difficile* [35]. This may mean that non-toxigenic strains are able to colonize CF patients more efficiently than they do non-CF patients and thus protect CF patients against CDI. This might be related to a different composition of colonic mucus or microbiome [36]. It may also mean that toxigenic strains have no selective advantage over non-toxigenic strains with respect to colonizing the intestines of CF patients, because the toxins have less effect in CF patients. This latter theory is supported by two of the earlier studies that did find a high proportion of asymptomatic carriage of toxigenic strains in CF patients. If CF patients are protected against large clostridial toxins, could this, too, be related to the composition of their mucus? Or could CFTR be involved in cell entry or cell intoxication by the toxins? A more speculative hypothesis is that due to a presumed higher pH in endosomes of CF patients than that of non-CF patients [37], the conformational change TcdB needs to make in order to cleave itself is inhibited. Elevating the pH of cell organelles protects cells against the effect of large clostridial toxins *in vitro* [38, 39], a finding that we have replicated with 3T3 cells and chloroquine (unpublished data). The fact that CF patients are protected against secretory diarrhea (e.g., caused by *Vibrio cholerae* or enterotoxigenic *E. coli*) by their defective CFTR [40] seems insufficient to explain their low incidence of CDI, as secretion plays only a minor role in the pathophysiology of CDI,

compared to inflammation. Studies to elucidate the mechanism by which CF might protect against CDI could focus on characterizing the microbiome of CF patients, investigating the interaction between colonic mucus from CF patients and *C. difficile* spores, vegetative stages and toxins, studying the effect of clostridial toxins on CFTR knockout cell lines or animals, and studying the prophylactic and therapeutic effect of CFTR inhibitors in CDI in animal models and, if effective and safe, in human CDI.

After the emergence of epidemic PCR ribotype 027 in North America, the UK and The Netherlands, this strain was expected to gain a strong foothold in the rest of Europe. To investigate the distribution of *C. difficile* strains across Europe and morbidity and mortality associated with them, we conducted a study in a selection of European hospitals, described in **Chapter 4**. We found the incidence of CDI to vary widely across European hospitals. Evidently, the small sample size and non-random selection of hospitals do not warrant generalization of the findings to the level of whole countries. However, some findings were striking and led to a number of cautious conclusions. First, PCR ribotype 027 had not become highly prevalent in the hospitals that were studied, and PCR ribotype 078, conspicuously absent in an earlier European survey [41], had become the third most prevalent strain, although the earlier study's different methodology and smaller sample size should be taken into account.

Second, a strikingly high incidence was found in many hospitals in countries bordering the Baltic Sea and North Sea. In Scandinavian countries, consumption of antibiotics per capita is not high, even in the winter months, when respiratory tract infections may lead to more antibiotic use [42]. A lower threshold for testing for CDI might be suggested as an explanation for a higher incidence of CDI, and certainly differences in testing rates were found to correlate with CDI incidence. However, if this difference in testing should account for all of the differences between the various hospitals, this would mean that many cases of hospital-acquired diarrhea were not tested for CDI, contrary to study protocol. Moreover, it would mean that many CDI cases were not noticed, suggesting that these cases were all self-limiting, which is unlikely in hospital-associated CDI. Therefore, the differences in testing rates could also have arisen because there simply were fewer cases of diarrhea due to CDI. If the differences in CDI incidences are true, then they might be explained by differences in patient characteristics between countries, such as severity of comorbidity. The threshold to admit patients to hospital may be higher in countries with well-functioning state-sponsored home care. More speculatively, there may be an association between high CDI incidence and cold or temperate climates. This is especially interesting because the first outbreaks due to PCR ribotype 027 were described in Canada and the northern United States [43]. Also, a seasonal variation of CDI with peaks in late winter - early spring has been described [44-46]. Seasonal variation was

not dependent on antibiotic consumption in one study [44]. One may further speculate that circulation of *C. difficile* is somehow increased by low temperatures. The spores can survive high temperatures and prolonged desiccation [47, 48], but it is still possible that they survive longer and in greater numbers in a cold environment. Alternatively, prolonged survival of vegetative bacteria plays a role or more efficient transmission, e.g. because of crowding of humans or animals.

Third, PCR ribotypes 015 and 018 were associated with complications of CDI, mainly mortality for which CDI was judged to be at least partially responsible. It must be stressed that attributability of mortality to CDI is often somewhat subjective - unless patients die of a perforated colon or a toxic megacolon - and mortality due to comorbidities is high in CDI patients. Attributability was therefore left to the judgment of the treating physician, so the associations must be regarded with some caution. PCR ribotype 056 was also associated with a complicated course, but the odds ratio had a wide confidence interval and was only statistically significant after correction for potential confounders. Although this was not indicated by the local hospitals, it is conceivable that some of the cases due to these PCR ribotypes were part of an outbreak, in which mortality due to a specific strain may be higher than in an endemic setting. Especially PCR ribotype 018 was conspicuously present in the Italian hospitals, suggesting rapid spread due to an outbreak. The predominance of PCR ribotype 018 in Italian hospitals was later confirmed by others [49]. Not surprisingly, recurrences were mainly associated with previous recurrences.

In conclusion, predominating *C. difficile* strains in hospitals change over time. What makes a strain outcompete other strains is not entirely clear as yet. The explanation may lie in more efficient transmission due to increased sporulation frequency and spore resistance, differences in germination conditions, lower infectious dose, larger volumes of diarrhea, longer shedding, or differences in antibiotic or disinfectant resistance. Strains may acquire virulence factors and other properties leading to their emergence, as is illustrated by differences between historical and epidemic PCR ribotype 027 [50]. In addition, some strains may be better adapted to patients with certain deficiencies. Coordinated international surveillance may shed more light on the dynamics of the circulation of *C. difficile* strains.

Chapters 5 and 6 describe studies into predictors of the course of CDI, especially a recurrent course. Gaining more insight in the epidemiology of complications and recurrences is important because of two reasons. First, we need predictors of the clinical course of CDI, especially because the prognosis may influence management, such as choice of treatment modality or of alternatives within a specific treatment modality, such as fidaxomicin and vancomycin. These predictors may include epidemiological, clinical, biochemical, radiological and microbiological parameters. Second, such association studies may help to elucidate the pathogenesis of CDI.

The study described in **Chapter 5** investigates the association between one clinical marker (temperature) and two biomarkers (blood leukocyte count and serum creatinine level) with failure of initial therapy for CDI, persistence of diarrhea and recurrence after initially successful therapy for CDI. The data were derived from two large clinical trials that compared fidaxomicin to vancomycin for the treatment of CDI [51, 52]. Failure of initial therapy was partially based on the treating physician's judgment of whether additional therapy was necessary, and therefore less objective than persistence of diarrhea, which was based on the number of unformed bowel movements per day. Failure of therapy was associated with fever, leukocytosis and renal failure, whereas only renal failure was associated with a lower probability of resolution of diarrhea and longer duration of diarrhea. An explanation may be that the treating physician felt a need to start additional therapy for CDI more often when there was fever or leukocytosis. Also, recurrence was only associated with renal failure and not with fever or leukocytosis. The prognostic value of renal failure as a predictor of unfavorable outcome of CDI has been shown previously [53, 54]. Acute renal failure is a common complication of CDI, which is interesting because the volume of diarrhea is not typically large nor is the systemic inflammatory response typically so strong that septic shock with organ hypoperfusion develops. Could there be a direct effect of CDI on renal function? Toxemia has been demonstrated in two children with fatal CDI [55] and in animal models [56]. However, toxemia does not appear to be a common occurrence in human disease.

In this study, we have also shown that leukocyte counts and serum creatinine levels fluctuate around the time of diagnosis of CDI. Follow-up of these parameters after diagnosis of CDI may therefore be important if values are around the upper limit of normal.

In the study described in **Chapter 6**, serum levels of antibodies directed against the large clostridial toxins and other antigens, measured directly after 10 days of antibiotic therapy and three weeks later, were investigated in relation with recurrences during a 60 day follow-up. Also, the relation between recurrences and the neutralizing effect of serum on TcdB was studied. Low serum levels of antibodies against TcdA and TcdB were associated with recurrence, whereas antibodies against other antigens were not, nor was serum neutralizing effect a strong predictor. The main drawback of the study was the fact that sera were taken from patients receiving passive immunotherapy for CDI, and the small number of participants, both of which may have limited the power to detect an association between antibody levels and recurrence. Strikingly, antibody levels often decreased during the three weeks between the two blood samples, which is strange for an immune response directly after an infection and raises the question whether fecal protein loss may have played a role.

Since there was significant overlap in antibody levels between patients who went on to suffer a recurrence and those with a single episode, the conclusion may be

drawn that recurrences are not entirely explained by an inadequate humoral immune response. Serious comorbidity was associated with recurrence, but not a specific comorbidity. A possible explanation is that serious comorbidity is associated with changes in the intestinal microbiome, predisposing to recurrences of CDI. Studies that investigate age, comorbidity, antibiotic consumption (measured carefully in defined daily doses, preferably over an extended period), immune response (using the best correlate of mucosal immune response) and microbiome have never been performed. These studies might clarify which of these parameters is associated most strongly with recurrence. The result may have implications for etiological theories of CDI, but also directly for management. The intestinal microbiome may very well be the strongest predictor of recurrence. If so, finding a set of characteristics of the microbiome that can be measured relatively simply in clinical practice would be a worthwhile objective of future studies.

Since antibodies may play a role in the pathogenesis of CDI, the administration of antibodies against *C. difficile* may be an effective strategy to influence the course of the disease. Preferably, these antibodies should be administered enterally, since parenterally administered antibodies may not reach the intestinal lumen, where *C. difficile* resides and produces its toxins. **Chapter 7** reports on a cohort study in which participants who had just recovered from CDI after antibiotic treatment were given an experimental product, derived from milk from cows immunized with toxoid and killed whole-cell *C. difficile*, in order to prevent recurrences. Some of the participants were infected with PCR ribotype 027. Compared to historical controls, participants had a lower recurrence rate, but this is of course no definite proof that the product works. Nonetheless, it seems plausible that passive immunotherapy in the intestinal lumen may be effective by neutralizing toxins and hindering mucosal attachment and cell-cell interactions by the pathogen. Intravenously administered monoclonal antibodies directed against large clostridial toxins were shown to prevent recurrences in one randomized trial [57]. The next step in studying the effectiveness of the milk product should be a randomized placebo-controlled trial. An additional finding of our study was that persistence or reappearance of clostridial toxin in feces after initially successful treatment is associated with relapse. Fecal toxin might be a useful parameter to guide dosage of the experimental product.

For a full overview of all currently available treatment options for CDI, the reader is referred to **Chapters 8 and 9**, which are the first CDI treatment guidance document issued by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, and a recent update. Currently, the biggest challenge is to find a treatment modality that is as effective in preventing recurrences as fecal transplant, but less cumbersome. Possibly, a mix of bacterial strains may be found as the core component of fecal transplant. This should have the same effect as fecal transplant, but without the

potential for transmission of pathogens, and could be less expensive because there would be no need for screening donors.

The studies described in this thesis aimed to contribute to finding the answers to questions regarding the epidemiology of *C. difficile* strains and the prediction and treatment of CDI with a high risk of recurrence and complications. We feel that we have made a modest contribution by investigating the distribution of *C. difficile* strains in Dutch general practices, among CF patients and in European hospitals. Furthermore, we hope to have shed more light on the etiology and prediction of recurrences and how to minimize the risk of recurrence.

## Reference List

- Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* **1935**; 49:390-402.
- Goorhuis A, van der KT, Vaessen N, et al. Spread and epidemiology of Clostridium difficile polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. *Clin Infect Dis* **2007 Sep 15**; 45(6):695-703.
- Beaugerie L, Flahault A, Barbut F, et al. Antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile in the community. *Aliment Pharmacol Ther* **2003 Apr 1**; 17(7):905-12.
- Levy DG, Stergachis A, McFarland LV, et al. Antibiotics and Clostridium difficile diarrhea in the ambulatory care setting. *Clin Ther* **2000 Jan**; 22(1):91-102.
- Riley TV, Wymer V, Bamford VW, Bowman RA. Clostridium difficile in general practice and community health. *J Hyg (Lond)* **1986 Feb**; 96(1):13-7.
- Riley TV, Wetherall F, Bowman J, Mogyorosy J, Golledge CL. Diarrheal disease due to Clostridium difficile in general practice. *Pathology* **1991 Oct**; 23(4):346-9.
- Riley TV, Cooper M, Bell B, Golledge CL. Community-acquired Clostridium difficile-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* **1995 Jun**; 20 Suppl 2:S263-S265.
- Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *BMJ* **1999 Apr 17**; 318(7190):1046-50.
- Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* **2006 Oct**; 12 Suppl 6:2-18.
- McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, Song X, Horan T, Kutty PK. Recommendations for surveillance of Clostridium difficile-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2007 Feb**; 28(2):140-5.
- Karlstrom O, Fryklund B, Tullus K, Burman LG. A prospective nationwide study of Clostridium difficile-associated diarrhea in Sweden. The Swedish C. difficile Study Group. *Clin Infect Dis* **1998 Jan**; 26(1):141-5.
- Kyne L, Merry C, O'Connell B, Keane C, O'Neill D. Community-acquired Clostridium difficile infection. *J Infect* **1998 May**; 36(3):287-8.
- Noren T, Akerlund T, Back E, et al. Molecular epidemiology of hospital-associated and community-acquired Clostridium difficile infection in a Swedish county. *J Clin Microbiol* **2004 Aug**; 42(8):3635-43.
- Svenungsson B, Burman LG, Jalakas-Pornull K, Lagergren A, Struwe J, Akerlund T. Epidemiology and molecular characterization of Clostridium difficile strains from patients with diarrhea: low disease incidence and evidence of limited cross-infection in a Swedish teaching hospital. *J Clin Microbiol* **2003 Sep**; 41(9):4031-7.
- Paltansing S, van den Berg RJ, Guseinova RA, Visser CE, van d, V, Kuijper EJ. Characteristics and incidence of Clostridium difficile-associated disease in The Netherlands, 2005. *Clin Microbiol Infect* **2007 Nov**; 13(11):1058-64.
- Surveillance for community-associated Clostridium difficile--Connecticut, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2008 Apr 4**; 57(13):340-3.
- Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired Clostridium difficile-associated disease. *JAMA* **2005 Dec 21**; 294(23):2989-95.
- Weil HP, Fischer-Brugge U, Harmanus C, Mattner F, Gastmeier P, Kuijper EJ. High incidence of Clostridium difficile-associated diarrhea with a community onset in a hyperendemic region in Germany [abstract O329]. In: 17th ECCMID/25th ICC abstracts - abstracts of the 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, and 25th International Congress of Chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents* **2007**; 29:S69.
- Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN. A case-control study of community-associated Clostridium difficile infection. *J Antimicrob Chemother* **2008 Aug**; 62(2):388-96.
- Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of Clostridium difficile infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* **2008 Nov 1**; 47(9):1162-70.



21. Donta ST, Myers MG. Clostridium difficile toxin in asymptomatic neonates. *J Pediatr* **1982 Mar**; 100(3):431-4.
22. Holst E, Helin I, Mardh PA. Recovery of Clostridium difficile from children. *Scand J Infect Dis* **1981**; 13(1):41-5.
23. Matsuki S, Ozaki E, Shozu M, et al. Colonization by Clostridium difficile of neonates in a hospital, and infants and children in three day-care facilities of Kanazawa, Japan. *Int Microbiol* **2005 Mar**; 8(1):43-8.
24. Dial S, Kezouh A, Dascal A, Barkun A, Suissa S. Patterns of antibiotic use and risk of hospital admission because of Clostridium difficile infection. *CMAJ* **2008 Oct 7**; 179(8):767-72.
25. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH, et al. Characterisation of Clostridium difficile hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS Med* **2012 Feb**; 9(2):e1001172.
26. Peach SL, Borriello SP, Gaya H, Barclay FE, Welch AR. Asymptomatic carriage of Clostridium difficile in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* **1986 Sep**; 39(9):1013-8.
27. Welton CJ, Long SS, Thompson CM, Jr., Gilligan PH. Clostridium difficile in patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child* **1985 Aug**; 139(8):805-8.
28. Wu TC, McCarthy VP, Gill VJ. Isolation rate and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **1983 Jul**; 148(1):176.
29. Barker HC, Haworth CS, Williams D, Roberts P, Bilton D. Clostridium difficile pancolitis in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **2008 Sep**; 7(5):444-7.
30. Binkovitz LA, Allen E, Bloom D, et al. Atypical presentation of Clostridium difficile colitis in patients with cystic fibrosis. *AJR Am J Roentgenol* **1999 Feb**; 172(2):517-21.
31. Theunissen C, Knoop C, Nonhoff C, et al. Clostridium difficile colitis in cystic fibrosis patients with and without lung transplantation. *Transpl Infect Dis* **2008 Jul**; 10(4):240-4.
32. Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN. Primary symptomless colonisation by Clostridium difficile and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet* **1998 Feb 28**; 351(9103):633-6.
33. Wilson KH, Sheagren JN. Antagonism of toxigenic Clostridium difficile by nontoxigenic C. difficile. *J Infect Dis* **1983 Apr**; 147(4):733-6.
34. Natarajan M, Walk ST, Young VB, Aronoff DM. A clinical and epidemiological review of non-toxigenic Clostridium difficile. *Anaerobe* **2013 May 29**.
35. Villano SA, Seiberling M, Tatarowicz W, Monnot-Chase E, Gerding DN. Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic Clostridium difficile strain M3, in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **2012 Oct**; 56(10):5224-9.
36. Lynch SV, Goldfarb KC, Wild YK, Kong W, De Lisle RC, Brodie EL. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice exhibit aberrant gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* **2013 Jan**; 4(1):41-7.
37. Di A, Brown ME, Deriy LV, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* **2006 Sep**; 8(9):933-44.
38. Florin I, Thelestam M. Internalization of Clostridium difficile cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1983 Dec 19**; 763(4):383-92.
39. Henriques B, Florin I, Thelestam M. Cellular internalisation of Clostridium difficile toxin A. *Microb Pathog* **1987 Jun**; 2(6):455-63.
40. Thiagarajah JR, Verkman AS. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. *Curr Opin Pharmacol* **2003 Dec**; 3(6):594-9.
41. Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. Prospective study of Clostridium difficile infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* **2007 Nov**; 13(11):1048-57.
42. Goossens H, Ferech M, Vander SR, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* **2005 Feb 12**; 365(9459):579-87.
43. Clements AC, Magalhaes RJ, Tatem AJ, Paterson DL, Riley TV. Clostridium difficile PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis* **2010 Jun**; 10(6):395-404.
44. Gilca R, Fortin E, Frenette C, Longtin Y, Gourdeau M. Seasonal variations in Clostridium difficile infections are associated with influenza and respiratory syncytial virus activity independently of antibiotic prescriptions: a time series analysis in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* **2012 Feb**; 56(2):639-46.
45. McFarland LV, Clarridge JE, Beneda HW, Raugi GJ. Fluoroquinolone use and risk factors for Clostridium difficile-associated disease within a Veterans Administration health care system. *Clin Infect Dis* **2007 Nov 1**; 45(9):1141-51.
46. Reil M, Hensgens MP, Kuijper EJ, et al. Seasonality of Clostridium difficile infections in Southern Germany. *Epidemiol Infect* **2012 Oct**; 140(10):1787-93.
47. Gerding DN, Muto CA, Owens RC, Jr. Measures to control and prevent Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis* **2008 Jan 15**; 46 Suppl 1:S43-S49.
48. Rodriguez-Palacios A, LeJeune JT. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in Clostridium difficile. *Appl Environ Microbiol* **2011 May**; 77(9):3085-91.
49. Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM, Mastrantonio P. Clostridium difficile isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: emergence of PCR ribotype 018. *J Clin Microbiol* **2010 Aug**; 48(8):2892-6.
50. Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, et al. Comparative phylogenomics of Clostridium difficile reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *J Bacteriol* **2006 Oct**; 188(20):7297-305.
51. Cornely OA, Crook DW, Esposito R, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with Clostridium difficile in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* **2012 Apr**; 12(4):281-9.
52. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection. *N Engl J Med* **2011 Feb 3**; 364(5):422-31.
53. Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS. Clinical risk factors for severe Clostridium difficile-associated disease. *Emerg Infect Dis* **2009 Mar**; 15(3):415-22.
54. Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of Clostridium difficile colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* **2005 Jun 1**; 40(11):1591-7.
55. Qualman SJ, Petric M, Karmali MA, Smith CR, Hamilton SR. Clostridium difficile invasion and toxin circulation in fatal pediatric pseudomembranous colitis. *Am J Clin Pathol* **1990 Oct**; 94(4):410-6.
56. Steele J, Chen K, Sun X, et al. Systemic dissemination of Clostridium difficile toxins A and B is associated with severe, fatal disease in animal models. *J Infect Dis* **2012 Feb 1**; 205(3):384-91.
57. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, et al. Treatment with monoclonal antibodies against Clostridium difficile toxins. *N Engl J Med* **2010 Jan 21**; 362(3):197-205.

## Nederlandse samenvatting

### Inleiding

#### Ontstaan van ziekte en ziekteverschijnselen

*Clostridium difficile* is een bacterie die voorkomt in de bodem en in water, maar ook in het maagdarmkanaal van allerlei zoogdieren. De bacterie heeft als kenmerkende eigenschap dat ze in ongunstige omstandigheden over kan gaan in een sporevorm. Deze sporen kunnen jaren overleven onder ongunstige omstandigheden en weer ontkiemen als de omstandigheden gunstiger zijn. Ook de darm van de mens kan gekoloniseerd raken met deze bacterie. De sporen worden ingeslikt en ontkiemen onder invloed van gal in de darm. Als het aantal en de verscheidenheid van de bacteriën in de darm zijn afgenomen, wat vooral onder invloed van antibiotica gebeurt, krijgt *C. difficile* de kans zich te vestigen op het darmslijmvlies. *C. difficile* veroorzaakt ziekte door de toxines TcdA en TcdB te maken, die het darmslijmvlies aantasten. Er ontstaat een ontstekingsreactie waarbij pusvormende witte bloedcellen migreren naar het aangedane gebied in de darm. In het bloed is dit zichtbaar als een verhoging van het aantal witte bloedcellen (leukocytose). Aan het darmslijmvlies is dit met het blote oog te zien als plakken pus op het oppervlak, de zogenaamde pseudo-membranen. De patiënt krijgt diarree en in ernstige gevallen een zeer zieke darm, die doorlaatbaar is voor afbraakproducten van bacteriën met koorts tot gevolg. In uiterste gevallen moet de zieke darm operatief worden verwijderd. De ziekte is te behandelen met een aantal antibiotica, waarvan metronidazol en vancomycine (de vorm die oraal moet worden ingenomen) en sinds kort fidaxomicine het meest gebruikt worden. Deze antibiotica leiden tot een geleidelijke verbetering van de klachten, maar helaas is de sporevorm niet gevoelig voor antibiotica. Na de behandeling kunnen de sporen weer ontkiemen en opnieuw klachten geven, mede omdat de darmbacteriën verder zijn aangetast door deze laatste antibiotica. Zo kan de ziekte steeds weer terugkomen, soms vele keren achter elkaar. Dit leidt tot ernstige verzwakking van de patiënt en eiwitgebrek, omdat deze zieke darm eiwit lekt.

#### Diagnose

De diagnose is te stellen door de toxines of de toxineproducerende *C. difficile*-stam in de ontlasting aan te tonen. Niet alle methoden zijn even goed zijn in het aantonen van de infectie en het is niet altijd mogelijk onderscheid te maken tussen infectie en kolonisatie, waarbij *C. difficile* wel aanwezig is, maar de klachten veroorzaakt worden door iets anders.

## Verspreiding

De bacterie werd tot voor kort gezien als een typische ziekenhuisbacterie, omdat patiënten tijdens hun ziekenhuisopname een *C. difficile*-infectie kunnen krijgen. De verklaring daarvoor kan zijn dat de meest vatbare patiënten, ouderen met chronische ziekten die behandeld worden of zijn met antibiotica, in het ziekenhuis geconcentreerd zijn. De bacterie kan daar efficiënt worden overgedragen via voorwerpen en de handen van ziekenhuispersoneel, zich vermenigvuldigen en in sporevorm overleven. Daarbij komt nog dat de sporen niet gedood worden door veel gebruikte desinfectie-middelen, zoals alcohol. Vanaf de ingang van het nieuwe millennium werden ziekenhuizen in Canada, gevolgd door de VS, het Verenigd Koninkrijk, Nederland en veel andere Europese landen, getroffen door uitbraken van *C. difficile*-infectie met een hoge sterfte en veel recidieven. Deze uitbraken bleken veroorzaakt door een specifieke *C. difficile*-stam, volgens de meest gangbare typeringsmethode aangeduid als PCR-ribotype 027. Door deze ontwikkeling ontstond er opnieuw aandacht voor *C. difficile*-infectie en heeft het onderzoek ernaar een grote vlucht genomen. Inmiddels worden gemiddeld zo'n 15 wetenschappelijke artikelen per week gepubliceerd over het onderwerp. Het idee dat *C. difficile*-infectie voornamelijk in het ziekenhuis wordt opgelopen, wordt tegenwoordig in twijfel getrokken. Dit komt onder meer omdat typeringsstudies vaak geen verband tussen verschillende gevallen in het ziekenhuis kunnen leggen, tenzij er sprake is van een duidelijke ziekenhuisuitbraak.

## Behandeling

Er is nog geen behandeling voor *C. difficile*-infectie die de kans op recidieven tot nul reduceert. Antibiotica hebben het inherente nadeel dat ze de darmbacteriën ook aantasten en daarmee de kans op een recidief vergroten. Ook na behandeling met het nieuwe middel fidaxomicine, dat relatief selectief *C. difficile* doodt, treden recidieven op. Er is daarom gezocht naar niet-antibiotische behandelingen. Toxine-bindende harsen bleken onvoldoende werkzaam. Er is nog geen vaccin beschikbaar tegen *C. difficile*-infectie, hoewel er studies met een experimenteel vaccin worden uitgevoerd. Een andere optie is het toedienen van antistoffen, die de toxines van de bacterie onschadelijk maken of op andere wijze het functioneren van de bacterie hinderen. Men onderscheidt verschillende vormen van deze zogenaamde passieve immunotherapie. Ten eerste is er een gradatie in de selectiviteit van de antistoffen. Er zijn ongeselecteerde antistoffen van bloedbankdonoren (antistoffen tegen *C. difficile*-toxinen komen in de algemene bevolking voor). Meer selectief zijn mengsels van antistoffen afkomstig van dieren die gevaccineerd zijn tegen *C. difficile* en/of de toxinen. Het meest specifiek zijn zogenaamde monoclonale antistoffen, die in een laboratorium geproduceerd worden. Ten tweede kan de toedieningsweg verschillen: intraveneus of oraal. Een combinatie van twee intraveneus toegediende monoclonale

antistoffen tegen de toxines TcdA en TcdB bleek de kans op recidieven na antibiotische behandeling te verminderen. De wijze van analyse van de studie was alleen twijfelachtig, omdat de studie in eerste instantie was opgezet om aan te tonen dat de ziekte minder ernstig zou verlopen na toevoeging van deze antistoffen, maar de onderzoekers er later voor kozen te kijken naar recidieven bij die patiënten die diarreevrij waren geworden. Op die manier is er een selectie aangebracht die in het voordeel van de antistoffen kan werken, omdat patiënten die ondanks de antistoffen diarree hielden, niet werden meegenomen in de analyse. Naast immunotherapie is behandeling met micro-organismen geprobeerd. Bekend zijn de probiotica, de 'goede' bacteriën en gisten die tegenwoordig aan allerlei zuivelproducten worden toegevoegd. Deze hebben niet overtuigend aangetoond dat ze de uitkomst van *C. difficile*-infectie kunnen beïnvloeden. Een behandeling waarvoor het bewijs wel heel sterk is, is het toedienen van een heel ecosysteem van micro-organismen in de vorm van feces van een gezonde donor, de zogenaamde fecestransplantatie. Deze lijkt ook effectief bij patiënten die meerdere recidieven hebben gehad, een patiënten-categorie waarvoor tot nu toe geen enkele andere behandelwijze bewezen effectief is. Tot slot wordt onderzocht of toediening van *C. difficile*-stammen die géén toxines maken, van nut kan zijn om *C. difficile*-infectie te voorkomen of behandelen door competitie met de toxineproducerende stammen aan te gaan.

## Onbeantwoorde vragen

Er blijven veel onbeantwoorde vragen in het onderzoeksveld van *C. difficile*-infectie. Zo is het bijvoorbeeld niet duidelijk waar nieuwe stammen vandaan komen die zich vervolgens verspreiden en wat hun opkomst uitlokt en stimuleert. Verder is het niet goed te voorspellen welke patiënten na behandeling een recidief zullen krijgen. Dit is belangrijk, omdat de keuze van therapie kan afhangen van de inschatting of er een grote kans is op een recidief. Tot slot is er nog geen therapie die de kans op recidieven tot nul reduceert. De onderzoeken beschreven in dit proefschrift richten zich op diverse aspecten van *C. difficile*-infectie die gecompliceerd wordt door een ernstig zieke darm of door recidieven. Allereerst gaat het om de verspreiding van *C. difficile*-stammen die met zo'n ernstig of recidiverend beloop geassocieerd zijn, vervolgens over het voorspellen van zo'n beloop en tot slot over hoe behandeling de kans op zo'n beloop zou kunnen minimaliseren.

## Hoofdstuk 1

Hierin worden twee gevallen van *C. difficile*-infectie die optraden buiten het ziekenhuis beschreven. Het eerste geval lijkt ook echt opgelopen buiten het ziekenhuis door een patiënte die niet aan het klassieke risicoprofiel voldoet, het tweede blijkt waarschijnlijk wel opgelopen in het ziekenhuis. Naar aanleiding van deze gevallen wordt een overzicht gegeven van de wetenschappelijke literatuur over *C. difficile*-infectie

opgelopen buiten het ziekenhuis. Daaruit blijkt dat er grote verschillen in definitie van buiten het ziekenhuis opgelopen *C. difficile*-infectie zijn, maar dat er vaker patiënten worden beschreven zonder de gebruikelijke risicofactoren recent antibioticumgebruik, hoge leeftijd, chronische ziekte en frequent contact met zorginstellingen.

## Hoofdstuk 2

Dit hoofdstuk beschrijft een studie waarbij patiënten die zich meldden in de huisartspraktijk met diarree, werden getest op *C. difficile*-infectie, ongeacht de vraagstelling van de huisarts. Er werd bij 1,5% van de patiënten *C. difficile*-toxine gevonden. Drieëntwintig procent van deze patiënten was niet opgenomen geweest in een zorginstelling in het jaar daarvoor en had evenmin antibiotica gebruikt in het afgelopen halve jaar. Opvallend was dat de epidemische stam PCR-ribotype 027 niet werd aangetroffen, ondanks het feit dat in de drie regio's waar de studie werd uitgevoerd, Haarlem, Utrecht en Zwolle, ziekenhuisuitbraken waren geweest met deze stam. Ook werden verschillende zeldzame en niet eerder getypeerde stammen gevonden, die meestal niet gevonden worden in ziekenhuizen. Een zwakte van de studie was dat andere verwekkers van diarree niet stelselmatig werden uitgesloten, er werd alleen gekeken naar de ziekteverwekkers waarvoor de huisarts een test had aangevraagd. Onderzoek naar een andere verwekker was nooit positief als *C. difficile*-toxine werd aangetroffen. Onze conclusie was dat buiten het ziekenhuis veel verschillende *C. difficile*-stammen circuleren. Deze stammen koloniseren de menselijke darm onder bepaalde omstandigheden, zoals na aantasting van de darmbacteriën door antibiotica, en veroorzaken eventueel ziekte. Waarschijnlijk gaat een deel van deze ziekte-episoden vanzelf voorbij zonder behandeling, zeker als de diarree duidelijk uitgelokt is door antibiotica en deze antibiotica vervolgens weer gestopt worden.

## Hoofdstuk 3

Dit hoofdstuk beschrijft een studie naar dragerschap van *C. difficile* bij patiënten met cystic fibrosis, ook wel bekend als taaislijmziekte. Deze genetische ziekte leidt tot de vorming van veel dikker slijm in de luchtwegen dan bij gezonde mensen. Hierdoor worden bacteriën moeilijk verwijderd door de trilharen van de luchtwegen. Het gevolg is het herhaaldelijk optreden van bronchitis en longontsteking, waardoor de luchtwegen beschadigd raken. Logischerwijs worden deze patiënten vaak met antibiotica behandeld en komen ze regelmatig in ziekenhuizen. Je zou verwachten dat *C. difficile*-infectie veel voorkomt bij deze patiënten, maar studies uit de jaren '80 tonen aan dat ze vaak drager zijn van *C. difficile*, maar geen klachten hebben. We wilden deze oude waarneming bevestigen nu *C. difficile*-infectie frequenter voorkomt en er epidemische stammen zijn. We hebben hiervoor aan alle cystic fibrosis-patiënten van het Erasmus Medisch Centrum in Rotterdam gevraagd ontlasting in te leveren.

Ongeveer de helft van hen (55 patiënten) leverde ontlasting in. We vonden dat 47% van de patiënten drager was van *C. difficile*. Geen van deze patiënten had diarree. Opvallenderwijs bleek 77% van de gekweekte stammen geen toxine te produceren. Dit is een veel hoger percentage dan we aantreffen bij een controlegroep van patiënten opgenomen op een afdeling Interne Geneeskunde van het Ziekenhuis Bronovo in Den Haag. Dragerschap bij cystic fibrosis-patiënten was verrassenderwijs geassocieerd met een lagere leeftijd en - niet zo verrassend - met ernstiger cystic fibrosis. Er werden veel verschillende, deels zeldzame stammen gevonden, wat suggereert dat de patiënten de stammen niet van elkaar hadden gekregen en evenmin in het ziekenhuis hadden opgelopen. Ook deze bevinding sluit aan bij de conclusie van het vorige hoofdstuk dat er veel verschillende *C. difficile*-stammen buiten het ziekenhuis circuleren. Verder is het de vraag waarom er zoveel niet-toxineproducerende stammen worden gevonden bij patiënten met cystic fibrosis. Mogelijk circuleren deze stammen ook in de gemeenschap, maar kunnen ze de darmen van mensen zonder cystic fibrosis moeilijk koloniseren. De andere samenstelling van het darmslijm en/of de darmbacteriën bij cystic fibrosis-patiënten leidt er misschien toe, dat niet-toxineproducerende stammen hun darmen wel kunnen koloniseren. Ook hebben toxineproducerende stammen misschien geen voordeel ten opzichte van niet-toxineproducerende stammen bij de kolonisatie van de darm van cystic fibrosis-patiënten. Hiervoor zijn meerdere hypothesen te bedenken. De toxines dringen mogelijk moeilijk door de darmslijmlaag van cystic fibrosis-patiënten, of de toxines kunnen minder schade berokkenen, doordat het eiwit dat afwijkend is bij cystic fibrosis-patiënten een rol speelt bij de werking van de toxines. Dit laatste zou ook kunnen verklaren waarom cystic fibrosis-patiënten zo weinig klachten van toxineproducerende *C. difficile*-stammen hebben. Kolonisatie met niet-toxineproducerende *C. difficile*-stammen zou de cystic fibrosis-patiënten ook kunnen beschermen tegen ziekte door hun toxineproducerende verwanten. Zoals eerder vermeld wordt er zelfs onderzoek gedaan met niet-toxineproducerende stammen voor preventie en behandeling van *C. difficile*-infectie. Hierbij is een opvallende eerste bevinding dat kolonisatie met niet-toxineproducerende *C. difficile* alleen bereikt kan worden bij gezonde vrijwilligers als ze eerst 5 dagen met vancomycine behandeld worden en dan 14 dagen niet-toxineproducerende *C. difficile* toegediend krijgen.

## Hoofdstuk 4

Om beter in kaart te brengen welke *C. difficile*-stammen in Europese ziekenhuizen voorkomen na de opkomst van de epidemische stam PCR-ribotype 027, en of infecties door deze stammen leiden tot complicaties en recidieven, hebben we een netwerk opgezet van 106 laboratoria, verbonden aan Europese ziekenhuizen. Het vóórkomen van *C. difficile*-infectie in de ziekenhuizen bleek sterk te variëren. De ziekte kwam het meest voor in ziekenhuizen in noordelijke landen, waar het antibioticumgebruik in het

algemeen laag is. Misschien zijn er veel gevallen gemist in de Zuid-Europese ziekenhuizen. Als er echt een verschil is in het optreden van *C. difficile*-infectie tussen Noord- en Zuid-Europa, zijn mogelijke verklaringen hiervoor een verschil in de ernst van chronische ziekten van de opgenomen patiënten (misschien is de drempel tot opname hoger in landen met een goed georganiseerde eerstelijnszorg) of verschil in de efficiëntie van overdracht (misschien draagt een kouder klimaat bij aan efficiëntere overdracht, bijvoorbeeld doordat sporen langer overleven of mensen dichter op elkaar leven). PCR-ribotype 027 bleek niet het meest voorkomende type in de deelnemende Europese ziekenhuizen – het kwam op de zesde plaats. De top drie bestond uit PCR-ribotypes 014/020, 001 en 078. Het laatste type is interessant, omdat het eigenschappen deelt met PCR-ribotype 027, hoewel het wat minder schadelijk lijkt. Het werd in een kleinere Europese studie in 2005 nog vrijwel niet gevonden. Ook in Nederland is dit type inmiddels een van de meest voorkomende types geworden. Verder blijkt het ook bij boerderijdieren veel voor te komen. Dit roept de vraag op of het ribotype via vlees overgedragen wordt. Er zijn echter nooit uitbraken herleid tot een voedselbron.

Verder viel op dat na drie maanden 22% van de patiënten overleden was, wat illustreert dat *C. difficile*-infectie in ziekenhuizen nog steeds een ziekte is van oudere mensen met chronische ziekten. De behandelde artsen schatten in, dat *C. difficile* medeverantwoordelijk was voor een derde van deze sterfgevallen en zelfs direct verantwoordelijk voor 7%. Infecties door PCR-ribotypes 027, 015 en 018 hadden een ernstiger beloop dan de overige ribotypen.

## Hoofdstuk 5

Zoals vermeld in de inleiding, is het niet goed te voorspellen hoe het beloop van een *C. difficile*-infectie zal zijn en kan het verwachte beloop wel relevant zijn voor de keuze van behandeling. Er is geprobeerd goede voorspellers te vinden en er zijn diverse bevindingen, vooral bloedbepalingen, in verband gebracht met complicaties of recidieven. Het nut van die bloedbepalingen in relatie tot elkaar is niet duidelijk en de verbanden zijn gevonden in kleine studies. We hebben de databases van twee grote geneesmiddelenstudies voor de behandeling van *C. difficile*-infectie gebruikt om drie voorspellers van een ongunstig beloop te onderzoeken. Dit waren lichaamstemperatuur, aantal witte bloedcellen in het bloed en een bloedbepaling die de nierfunctie weerspiegelt (creatinine). De uitkomsten waren de duur van de diarree en het optreden van recidieven na verdwijnen van diarree. Vooral een slechte nierfunctie bij diagnose bleek samen te hangen met het voortbestaan van diarree en het optreden van recidieven. Verder bleek in deze studie dat de waarden van witte bloedcellen en nierfunctie per patiënt sterk varieerden rond het stellen van de diagnose *C. difficile*-infectie.

## Hoofdstuk 6

Een belangrijke andere vraag bij *C. difficile*-infectie is hoe groot de rol van het immuunsysteem is bij het beloop van de infectie, met name de antistoffen. Deze antistoffen, die worden geproduceerd door bepaalde witte bloedcellen, zijn heel specifiek gericht tegen een ziekteverwekker (bacterie, virus, schimmel, eencellige of worm) of een toxine. Ze kunnen de ziekteverwekker markeren om het opruimen van de ziekteverwekker door het immuunsysteem te vergemakkelijken, de ziekteverwekker hinderen in zijn functioneren, of toxines onschadelijk maken. Antistoffen worden niet van nature gemaakt - het afweersysteem moet namelijk 'leren' antistoffen te maken tegen de ziekteverwekkers of toxines waarmee het op dat moment geconfronteerd wordt. Voor de meeste infecties geldt, dat als eenmaal een antistofreactie op gang gekomen is, het afweersysteem vervolgens geheugen opbouwt en er bij een volgende confrontatie met deze ziekteverwekker sneller antistoffen worden aangemaakt dan bij de eerste confrontatie. Het ligt voor de hand bij *C. difficile*-infectie te kijken naar antistoffen, omdat de ziekteverschijnselen het gevolg zijn van toxines en toxines bij uitstek een goed doelwit zijn voor antistoffen.

Voor de studie beschreven in dit hoofdstuk hebben we gebruik gemaakt van opgeslagen serummonsters (bloed ontdaan van cellen en stollingsfactoren) van patiënten met *C. difficile*-infectie die hadden deelgenomen aan de studie die beschreven staat in het volgende hoofdstuk. We wilden de associatie tussen antistoffen en het optreden van recidieven onderzoeken. Die associatie is interessant voor het oorzakelijk denken over *C. difficile*-infectie (Welke rol speelt de antistofreactie bij het optreden van recidieven van *C. difficile*-infectie?) en het voorspellen van recidieven. Patiënten met hoge serum-concentraties van antistoffen tegen de toxines TcdA en TcdB bleken meestal geen recidieven te krijgen. Dit gold niet voor antistoffen tegen eiwitten op het oppervlak van *C. difficile*. Deze bevindingen ondersteunen de hypothese dat antistoffen een rol spelen bij het beloop van *C. difficile*-infectie. Ze vormen echter niet de hele verklaring voor het optreden van recidieven. Waarschijnlijk zijn andere factoren belangrijker, zoals de diversiteit en het aantal van de darmbacteriën. Verder was opvallend dat de concentraties antistoffen tijdens de infectie vaak daalden, wat merkwaardig is voor een antistofreactie tijdens en direct na een opgelopen infectie. Een mogelijke verklaring is dat er eiwitten, waaronder antistoffen, uit de zieke darm lekken naar de ontlasting en de antistoffen op die manier verdwijnen. Een nadeel van deze studie was het feit dat de patiënten allemaal een experimenteel middel namen, dat antistoffen tegen *C. difficile* afkomstig van koeien bevatte. De metingen van de menselijke antistoffen werden overigens niet verstoord door de aanwezigheid van de dierlijke antistoffen. Dit experimentele middel was bedoeld om recidieven te voorkomen. Daardoor zou de sterkte van de associatie tussen antistoffen en het optreden van recidieven kunnen zijn afgenomen.

## Hoofdstuk 7

Dit hoofdstuk beschrijft de studie die in de vorige paragraaf genoemd werd. Patiënten die zojuist tenminste 10 dagen succesvol behandeld waren voor *C. difficile*-infectie met antibiotica, namen een experimenteel product in om recidieven te voorkomen. Dit product was gemaakt van melk van koeien die gevaccineerd waren met gedode *C. difficile* en onschadelijk gemaakte *C. difficile*-toxines. Hierdoor bevatte de melk een hoge concentratie antistoffen tegen de bacterie en de toxines. De eiwitfractie van de wei van deze melk was vervolgens verwerkt tot een poeder, dat opgelost moest worden met water en drie maal per dag ingenomen. Bij proefdieren bleek het product effectief te zijn. In vergelijking met bekende recidiefpercentages hadden de studiepatiënten weinig recidieven: deze traden op bij 11 van de 109 ziekte-episoden (10%). Dit is echter geen bewijs dat het product werkt, want daarvoor zou een studie noodzakelijk zijn met een placebo-arm, waarbij het lot bepaalt of een patiënt placebo of het wei-eiwit krijgt en patiënt en onderzoekers tijdens de studie niet weten welk van beide de patiënt krijgt. Mits er voldoende patiënten in de studie zitten, is dit de beste garantie dat een verschil tussen beide studie-armen verklaard kan worden door het wei-eiwit en niet door verschillen in ziekte-ernst of andere factoren die moeilijk meetbaar zijn.

## Hoofdstukken 8 en 9

Hierin staan de eerste en tweede richtlijn voor behandeling van *C. difficile*-infectie, die we hebben opgesteld in opdracht van de European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. We doen hierin aanbevelingen voor keuze van therapie op grond van de beschikbare wetenschappelijke literatuur.

Met de studies beschreven in de voorgaande hoofdstukken hopen we de kennis over *C. difficile*-infectie enigszins vergroot te hebben. Nieuwe bevindingen waren onder meer dat *C. difficile*-infectie in de Nederlandse huisartsenpraktijk voorkomt, soms zonder de gebruikelijke risicofactoren. Verder blijken Nederlandse patiënten met cystic fibrosis vaak asymptomatisch gekoloniseerd met *C. difficile*-stammen, die overwegend geen toxine produceren. Onze studie in Europese ziekenhuizen toonde aan dat de epidemische stam PCR-ribotype 027 niet de meest dominante stam geworden is. Tot slot bleken een slechte nierfunctie en lage serumconcentraties van antistoffen tegen *C. difficile*-toxines geassocieerd met een later recidief van *C. difficile*-infectie.

## Publications

- Bauer MP, Vliegen HW, Huisman MV. Massive pulmonary embolism with cardiac arrest after an intracardiac electrophysiological study: a strong case for venous thromboprophylaxis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17(1):57-8.
- Bauer MP, Brouwer PA, Smit VTHBM, Tamsma JT. The challenges of extrapulmonary presentations of sarcoidosis: a case report with review of diagnostic strategies. *Eur J Int Med*. 2007; 18(2):152-4.
- Bauer MP, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, Vandenbroucke JP, Briët E. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion* 2007; 47(11):2066-71.
- Bauer MP, Goorhuis A, Koster T, Numan-Ruberg SC, Hagen EC, Debast SB, Kuijper EJ, van Dissel JT. Community-onset Clostridium difficile-associated diarrhoea not associated with antibiotic usage--two case reports with review of the changing epidemiology of Clostridium difficile-associated diarrhoea. *Neth J Med* 2008; 66(5):207-11.
- Bauer MP, Numan-Ruberg SC, Bredewold OW, Kuijper EJ, Mooi-Kokenberg EA, Debast SB, van Dissel JT. Recidieven van Clostridium difficile-geassocieerde diarree voorkomen door toediening van een weiconcentraat van specifiek geïmmuniseerde koeien; prospectief onderzoek. *Ned Tijdschr Geneesk* 2008;152:1919-26.
- Bauer MP, van Dissel JT. Alternative strategies for Clostridium difficile infection. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33 Suppl 1:S51-6.
- Bauer MP, Veenendaal D, Verhoef L, Bloembergen P, van Dissel JT, Kuijper EJ. Clinical and microbiological characteristics of community-onset Clostridium difficile infection in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(12):1087-92.
- Bauer MP, van Dissel JT, Kuijper EJ. Clostridium difficile: controversies and approaches to management. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22(6):517-24.
- Bauer MP, van Burgel ND, Marijt EW, van Dissel JT, von dem Borne PA. Fever, shock, and pancytopenia in a patient treated with alemtuzumab. *Clin Infect Dis* 2009; 49(10): 1540.
- Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for Clostridium difficile infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15(12):1067-79.
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(3):529-549.
- Van Paassen J, Bauer MP, van Dissel JT, Visser LG, Vossen ACTM, Arbous SM. Viral haemorrhagic fever in returned travellers; a review on clinical symptoms, management, and outbreak prevention. *Neth J Crit Care* 2010;14(2):98-106.

- Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Wilcox MH, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ, ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011;377(9759):63-73.
- Bauer MP, van Paassen J, Arbous S, Visser LG, Schmidt-Chanasit J, Schilling S, Ölschläger S, Rieger T, Emmerich P, Schmetz C, van de Berkmortel F, van Hoek B, van Burgel ND, Vossen ACTM, Günther S, van Dissel JT. Multi-organ failure and cerebral edema associated with activation of pro- and anti-angiogenic factors in a case of Marburg hemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2012;12(8):635-42.
- Vingerhoets LMA, Bauer MP, Hamminga EA, Verweij JJ, Visser LG. Treatment and follow-up using microscopy and PCR in East African sleeping sickness: a case report. *Grand Rounds* 2011;11:12-16. DOI: 10.1102/1470-5206.2011.0003
- Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT. *Clostridium difficile*-infectie: nieuwe ontwikkelingen. *Tijdschr Infect* 2011;6:97-104.
- Bauer MP, Hensgens MPM, Miller M, Gerding DN, Wilcox MH, Dale AP, Fawley WN, Kuijper EJ, Gorbach SL. Renal failure and leukocytosis are predictors of a complicated course of *Clostridium difficile* infection if measured on day of diagnosis. *Clin Infect Dis* 2012;55:S149-53.
- Collini PJ, Bauer M, Kuijper E, Dockrell DH. *Clostridium difficile* in HIV-seropositive individuals and transplant recipients. *J Infect* 2012;64(2):131-47.
- Debast SB, Bauer MP, Wilcox MH, Sanders IMJG, Kuijper EJ, ECDIS Study Group. Antimicrobial activity of LFF571 and three treatment agents against *Clostridium difficile* isolates collected at a pan-European survey in 2008. Clinical and therapeutic implications. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(6):1305-11.
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, the Committee. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 Suppl 2::1-26.
- Bauer MP, Farid A, Bakker M, Hoek RA, Kuijper EJ, van Dissel JT. Patients with cystic fibrosis have a high carriage rate of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2013; doi: 10.1111/1469-0691.12439.
- Bauer MP, Marijt EW, Kroon FP. Combination antiretroviral therapy reverses hyposplenism in HIV1-infection. *J Acq Immunodef Syndr* 2014;65(2):e88-90.
- Bauer MP, Nibbering PH, Poxton IR, Kuijper EJ, van Dissel JT. Humoral immune response as predictor of recurrence in *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2014. doi: 10.1111/1469-0691.12769.
- Bauer MP, Timen A, Vossen AC, van Dissel JT. Marburg hemorrhagic fever in returning travellers: an overview aimed at clinicians. *Clin Microbiol Infect* 2014; doi: 10.1111/1469-0691.12673.

## Curriculum vitae

Martijn Philippe Bauer werd op 8 mei 1974 geboren in Leiden. Hij behaalde zijn eindexamen in 1992 aan het Erasmiaans Gymnasium in Rotterdam. Vervolgens studeerde hij geneeskunde in Groningen. Deze studie rondde hij af met een onderzoeksstage in het Kabale Hospital in Oeganda. Hij doorliep zijn co-assistentenschappen in het Medisch Spectrum Twente, Enschede, en het Diaconessenhuis Utrecht en behaalde zijn artsexamen cum laude in 1999. Na een jaar als arts-niet-in-opleiding in het Leids Universitair Medisch Centrum begon hij in 2001 aan zijn opleiding tot internist in hetzelfde ziekenhuis met prof. dr. A.E. Meinders als opleider, gevolgd door prof. dr. J.A. Romijn. Eén jaar van zijn opleiding bracht hij door in het Ziekenhuis Bronovo met dr. J.W. van t Wout als opleider. In 2006 rondde hij zijn opleiding tot internist af en in 2007 werd hij geregistreerd als internist-infectioloog en in 2012 ook als internist acute geneeskunde. In 2007 begon hij aan het promotie-onderzoek bij de afdeling infectieziekten van het Leids Universitair Medisch Centrum onder leiding van prof. dr. J.T. van Dissel en prof. dr. E.J. Kuijper, waarvan de resultaten in dit proefschrift beschreven worden. Vanaf diezelfde tijd werkt hij als internist-infectioloog in het Leids Universitair Medisch Centrum en vanaf 2010 ook als internist op de Spoedeisende Hulp en de Acute Opname-afdeling. Gedurende zijn studie, co-assistentenschappen, opleiding en de periode daarna ontplooidde hij verschillende nevenactiviteiten, onder meer als lid van het bestuur van de Stichting Werkgroep Antibioticabeleid en het bestuur van de Trainees Association van de European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases.





