



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular characterization of pathogenic *Clostridium difficile* strains

Bakker, D.

Citation

Bakker, D. (2014, November 5). *Molecular characterization of pathogenic Clostridium difficile strains*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29641>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/29641>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29641> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Bakker, Dennis

Title: Molecular characterization of pathogenic *Clostridium difficile* strains

Issue Date: 2014-11-05

Dutch summary
Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift beslaat vele facetten van onderzoek aan *Clostridium difficile*, van toegepast tot fundamenteel. Deze Gram-positieve, sporevormende bacterie kan een darminfectie veroorzaken, ook wel *Clostridium difficile* infectie (CDI) genoemd. De symptomen van CDI worden veroorzaakt door toxinen die de darm beschadigen. CDI wordt tegenwoordig erkend als de belangrijkste oorzaak van infectieuze nosocomiale diarree. In het laatste decennium is de incidentie en ernst van CDI toegenomen. Deze toename heeft wereldwijd belangrijke financiële en medische gevolgen voor de gezondheidszorg en patiënten. Dit proefschrift kan onderverdeeld worden in 4 onderdelen: i) een algemene inleiding over het toegepaste en fundamentele onderzoek naar CDI; ii) een beschrijving van de ontwikkeling van diagnostische en typering methoden voor *Clostridium difficile*; iii) een deel over onderzoek naar de regulatie van (mogelijke) virulente factoren; en iv) een discussie over de bevindingen van dit proefschrift.

Inleiding

Clostridium difficile werd bijna tachtig jaar geleden voor het eerst beschreven door Hall en O'Toole. De bacterie werd voor het eerst geïsoleerd uit faeces van pasgeborenen en beschreven als een zeer beweeglijke, Gram-positieve staaf met sub-terminale sporen. Gezonde individuen zijn meestal beschermd door de commensale flora in het colon. Echter, een antibiotica behandeling kan leiden tot de overgroei van de commensale flora door *C. difficile*, wat uiteindelijk kan leiden tot CDI. De klinische symptomen van CDI kunnen variëren van diarree tot aan ernstige colitis. Naast het gebruik van antibiotica zijn gevorderde leeftijd (>60 jaar), onderliggende ziekten en infectiedruk andere risicofactoren voor CDI.

In het laatste decennium is de epidemiologie van CDI radicaal veranderd. Sinds 2002 worden grote uitbraken in Noord-Amerika en Europa van CDI gerapporteerd die gekarakteriseerd worden door een ernstiger verloop van de ziekte en verhoogde sterftecijfers. Deze toename heeft grote implicaties voor de patiënten en de gezondheidszorg, en heeft daarnaast ook financiële gevolgen voor het zorgstelsel. Op basis van de huidige incidentie cijfers en de verwachte vergrijzing zal deze financiële last in de toekomst alleen maar verder toenemen.

Om de bovenstaande gevolgen van CDI te verminderen is het van het grootste belang de verspreiding van CDI te beperken en nieuwe behandelopties voor de ziekte te onderzoeken. Deze doelen kunnen bereikt worden door in te grijpen op meerdere niveaus. Ten eerste zijn een snelle en accurate diagnose van CDI patiënten en moleculaire typering essentiële instrumenten om infecties en uitbraken te herkennen en onder controle te krijgen. Ten tweede kan het bestuderen en begrijpen van de mechanismen die belangrijk zijn voor kolonisatie leiden tot nieuwe therapeutische opties, die gericht zijn op het voorkomen van kolonisatie.

Tot slot kan het begrijpen van mechanismen van toxine-regulatie leiden tot de ontwikkeling van effectieve behandelmethodes om de klinische symptomen van CDI te verminderen.

Moleculaire methoden voor de diagnose en typering van *C. difficile*

Om de verspreiding van *C. difficile* te beperken is het van belang dat het ziekenhuispersoneel op de hoogte is van het voorkomen van CDI. Verder zijn (goede) hygiëne voorzorgsmaatregelen, vroegtijdige diagnose en het monitoren van CDI essentieel. De diagnose van CDI is nog steeds gebaseerd op de typische klinische kenmerken, in combinatie met laboratoriumtesten. Echter, de testen die momenteel het meest gebruikt worden zijn tijdrovend of hebben een gebrek aan sensitiviteit en specificiteit voor nauwkeurige en snelle diagnose van CDI. Deze beperkingen hebben ertoe geleid dat meerdere monsters per patiënt getest worden en dat voor de diagnose van CDI twee-stap algoritmes gebruikt worden. Echter, voor preventie van de verspreiding van CDI zijn snellere en meer accurate testen essentieel.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de evaluatie van drie snelle, binnen het instituut ontwikkelde, moleculaire testen voor de diagnose van CDI. Alle drie geëvalueerde moleculaire testen voldeden door de hoge prevalentie van CDI in de gebruikte monster collectie (20 %) bijna aan de criteria die gedefinieerd zijn voor het gebruik als zelfstandige test. Echter, de berekende positieve voorspellende waarde daalde aanzienlijk bij een meer realistische prevalentie van CDI in een klinische omgeving (10 %) en in de gemeenschap (2 %). Daarom hebben wij geconcludeerd dat de moleculaire testen niet gebruikt kunnen worden als een snelle zelfstandige test voor de diagnose van CDI.

Een nadeel van een moleculaire test is het onvermogen om onderscheid te kunnen maken tussen asymptomatisch dragerschap en CDI. Een onlangs gepubliceerde studie heeft aangetoond dat alleen de detectie van toxinen positief correleert met klinisch verloop van de ziekte en niet de aanwezigheid van *C. difficile* per se. Niettemin kan asymptomatisch dragerschap een belangrijke bron van verspreiding binnen ziekenhuizen zijn. Door de hoge negatieve voorspellende waarden van de geëvalueerde moleculaire testen (**hoofdstuk 2**), zullen deze zeer waardevol zijn als een eerste screening test in een twee-stap algoritme, gevolgd door een snelle fenotypische toxine-detectie methode (bijvoorbeeld een Enzyme Immuno-Assay) voor de diagnose van CDI. Het grootste voordeel van dit tweestaps algoritme boven de tot nu toe gebruikte tweestaps algoritmes is de snelle diagnose van CDI met bijbehorende gevoeligheid en specificiteit.

Een andere belangrijke methode in de bestrijding van CDI is om uitbraken binnen zorginstellingen in kaart te brengen met moleculaire (sub-) typeringsmethoden. De

Multi Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) is momenteel een van de meest onderscheidende en reproduceerbare typeringsmethoden. De MLVA kan onderscheid maken tussen stammen van hetzelfde PCR-Ribotype (RT) en hierdoor is het mogelijk om transmissie routes te identificeren. In **hoofdstuk 3** beschrijven we de toepassing van een geoptimaliseerde MLVA op een collectie van RT 078 *C. difficile* stammen, geïsoleerd van mensen en varkens. Ondanks het ontbreken van een rechtstreeks epidemiologisch verband, concludeerden we dat er een grote verwantschap bestaat tussen de menselijke en varkensstammen. Deze hoge verwantschap kan een indicatie zijn van een gemeenschappelijke bron of transmissie. In **hoofdstuk 3** beschrijven we ook dat de MLVA enkele zwakke punten heeft. Vooral de lage variabiliteit van enkele loci in sommige RTs, de afwezigheid van een locus in RT 078 en de benodigde optimalisatie voor de PCRs voor drie loci in RT 078 zijn de tekortkomingen van de MLVA als (sub-)typerings methode. Samen met de mogelijke aanwezigheid van meerdere MLVA types binnen een fecaal monster zou dit kunnen leiden tot het missen van epidemiologische verbanden. Het gebruik van Whole Genome Sequencing (WGS) als typerings methode zou op termijn wellicht een alternatief kunnen zijn dat veel van deze nadelen ondervangt.

Non-toxinogene virulentiefactoren van *C. difficile*

De transmissie van CDI verloopt via de fecaal-orale route. Het voorkomen van kolonisatie is een van de beste manieren om in te grijpen in de verspreiding en overdracht van *C. difficile*. Sporen spelen een belangrijke rol in de transmissie en kolonisatie van een gastheer. Na inname ontkiemen de sporen en groeien uit tot vegetatieve cellen die zich kunnen hechten aan de epitheelcellen in de dikke darm. Succesvolle kolonisatie is naast sporulatie afhankelijk van het vermogen van *C. difficile* om te kunnen omgaan met het veranderende milieu en gastheer-geïnduceerde stressfactoren, zoals antibiotica en zuurstofradicalen. De aanwezigheid van mobiele elementen die resistentiegenen bevatten of nieuwe metabole routes mogelijk maken is hierop van grote invloed.

De sporen van *Clostridium spp* en *Bacillus spp* worden geproduceerd om ongunstige omstandigheden te overleven. Het sporulatie proces is in grote lijnen hetzelfde in *Clostridium spp* en *Bacillus subtilis*. Sporulatie van *C. difficile* wordt erkend als een persistentie- en transmissie-factor voor CDI. In **hoofdstuk 7** beschrijven we dat *C. difficile* Spo0A bindt aan DNA sequenties die lijken op de herkenningssequentie van *Bacillus subtilis* Spo0A. Daarnaast hebben we ook aangetoond dat Spo0A bindt aan de promotor van het toxine B gen. We vonden echter geen verlaagd toxineniveau in de Spo0A mutant, in tegenstelling tot een eerdere publicatie.

Naast sporulatie is hechting aan de epitheelcellen van de darm mogelijk een belangrijke stap in de succesvolle kolonisatie van de gastheer. Er is echter relatief

weinig bekend over de hechting van *C. difficile* aan de epitheelcellen en de rol van hechting in de pathogenese van CDI. Tot op heden zijn er slechts een aantal oppervlakte-eiwitten beschreven die een rol spelen in de hechting en kolonisatie. Van de expressie van hechting- en kolonisatie-factoren wordt verondersteld dat deze verhoogd is onder stressomstandigheden.

In **hoofdstuk 8** hebben we het gen dat codeert voor het HtrA protease, dat mogelijk betrokken is bij de reactie op stress, gemuteerd. De micro-array analyse van deze *htrA* mutant toonde verlaagde genexpressie aan van een aantal bekende hechting- en kolonisatie-factoren, zoals SlpA en flagellaire eiwitten. Verdere experimenten gaven aan dat de mutant minder sporuleerde en minder goed hechtte aan epitheelcellen in vergelijking met wild-type. Daarnaast vertoonde de *htrA* mutant ook een verhoogde toxine A productie. Dit, in combinatie met de hoge gevoeligheid van hamsters voor toxinen, verklaart mogelijk de verhoogde virulentie van de *htrA* mutant in het hamstermodel van CDI. Om te onderzoeken welke van de aangetoonde fenotypen (verminderde sporulatie, verminderde hechting of verhoogde toxine A productie) meer relevant is voor de ontwikkeling van de ziekte in mensen zullen *in vivo* experimenten gedaan moeten worden in een diermodel dat minder gevoelig is voor toxinen.

In veel micro-organismen kan resistentie tegen antibiotica verworven worden via incorporatie van mobiele elementen. Antibiotica resistentie kan resulteren in een groeivoordeel tijdens de kolonisatie en geeft de mogelijkheid om de commensale flora te overgroeien na een antibiotica behandeling. Naast resistentiegenen dragen mobiele elementen ook vaak virulentie factoren met zich mee. Daarom kan de verspreiding van mobiele elementen grote invloed hebben op de fitness van *C. difficile*. Daarnaast kan de aanwezigheid van mobiele elementen aanvullende informatie geven over mogelijke transmissie routes.

In **hoofdstuk 3 en 4** beschrijven we de aanwezigheid van twee mobiele elementen, die coderen voor antibiotica resistentie. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat stammen geïsoleerd uit varkens en mensen in hoge mate verwant zijn, en een gemeenschappelijke resistentie tegen tetracycline hebben die afkomstig is van een Tn916-achtig element. Interessant is dat tetracycline veelvuldig gebruikt wordt in de veterinaire sector, maar niet in de (Nederlandse) gezondheidszorg. Dit zou kunnen betekenen dat tetracycline resistentie wordt doorgegeven aan de bevolking vanuit de veterinaire industrie. De aanwezigheid van een Tn916-achtig element en tetracycline resistentie zou dus mogelijk extra informatie kunnen geven over transmissie routes tussen de veterinaire industrie en mensen.

In **hoofdstuk 4** beschrijven we het mobiele element Tn6164 dat naast diverse resistentie genen ook codeert voor (potentiële) virulentie factoren. De verhoogde mortaliteit van patiënten geïnfecteerd met RT 078 met Tn6164 suggereert

dat de aanwezigheid van dit element ervoor zorgt dat deze stammen virulenter worden. Echter, verder onderzoek is nodig om het mogelijke verband tussen de aanwezigheid van Tn6164 en verhoogde virulentie te bevestigen. Bij elkaar genomen ondersteunen onze resultaten het belang om resistentie tegen antibiotica te monitoren in *C. difficile* stammen, afkomstig van zowel mensen als dieren.

De aanwezigheid van mobiele elementen wordt op dit moment niet herkend door de vaak gebruikte “PCR ribotypering”-methode en wordt daarom niet meegenomen in de (moleculaire) epidemiologie van CDI. Bovendien worden mobiele elementen vanwege hun instabiele aard en locatie in het “aanvullende” genoom, niet herkend door de WGS Single Nucleotide Polymorphisme (SNP) typeringsmethode. Toch heeft WGS bewezen dat het een krachtig instrument kan zijn om antibioticaresistentie en mogelijke virulentie genen, gecodeerd op mobiele elementen, te herkennen (**hoofdstuk 4** en C.W. Knetsch, persoonlijke communicatie). Daarom zou WGS niet alleen gericht moeten zijn op de verschillen in het “kern” genoom, maar ook op de aanwezigheid van de mobiele elementen in het “aanvullende” genoom. Toepassing van WGS als typeringsmethode, in combinatie met een goed monitoring systeem, zou kunnen resulteren in een beter begrip van de rol die mobiele elementen spelen bij de verspreiding en virulentie van *C. difficile*.

Regulatie van toxine productie

Toxine A en toxine B zijn de twee belangrijkste virulentiefactoren van *C. difficile* en primair verantwoordelijk voor de symptomen van CDI. Het bestuderen van de regulatiemechanismen van toxineproductie zou kunnen leiden tot de ontwikkeling van effectieve maatregelen om het klinische verloop en de uitkomst van de ziekte te kunnen verbeteren. Beide toxine genen zijn gelegen op het Pathogenicity Locus (PaLoc), wat daarnaast ook een gen (*tcdC*) bevat dat codeert voor een veronderstelde negatieve regulator (TcdC) van toxineproductie. In de **hoofdstukken 5** en **6** hebben we verschillende aspecten van TcdC onderzocht.

In **hoofdstuk 5** onderzochten we de transcriptie niveaus van de toxine genen en de daadwerkelijke productie van toxines in een *tcdC* mutant en een wild type stam. We concludeerden dat TcdC geen belangrijke negatieve regulator van toxine productie is. Dit is in tegenspraak met eerdere rapporten die aantonen dat TcdC een belangrijke negatieve regulator is van toxinen productie. We kunnen echter niet uitsluiten dat TcdC onder andere omstandigheden en/of in fylogenetisch verschillende stammen toch een effect heeft op de productie van toxinen.

In **hoofdstuk 6** beschrijven we een tot nu toe onbekende functie voor TcdC. Bioinformatische analyse voorspelt dat de C-terminus van TcdC een Oligonucleotide Binding vouwing (OB-fold) heeft en mogelijk kan binden aan

DNA. Een biochemische analyse laat zien dat TcdC kan binden aan zogenaamde quadruplex structuren (QS) waarvan is aangetoond dat ze verscheidende *in vivo* processen (zoals transcriptie) kunnen beïnvloeden. Omdat er echter geen QS voorspeld worden in de PaLoc-regio, is het verband tussen QS-binding en toxine-regulatie vooralsnog onduidelijk. Verder onderzoek is nodig om meer inzicht te kunnen krijgen in de functie van TcdC.

Conclusie

In de afgelopen jaren is er grote voortuitgang geboekt op het gebied van moleculair en epidemiologisch onderzoek naar *C. difficile*. Ondanks deze vooruitgang, zijn de medische en financiële gevolgen voor patiënten en voor de gezondheidszorg nog niet afgenomen. Dit proefschrift toont aan dat de ontwikkeling van moleculaire technieken, gebaseerd op de detectie en typering van *C. difficile*, waardevol kunnen zijn in de signalering en preventie van CDI. Hetzelfde geldt ook voor de rol van de moleculaire biologie met betrekking tot het begrijpen van de virulentie van *C. difficile*. Echter, de voortdurende ontwikkeling van nieuwe technieken, voor zowel typering als genetische manipulatie, heeft ook geleid tot inzicht in de potentiële zwakheden van de momenteel veel gebruikte technieken. Daarom is het erg belangrijk om op de hoogte te blijven van de technische vooruitgang op het gebied van *C. difficile* onderzoek om de mechanismes van virulentie verder te kunnen ontrafelen.

