



**Universiteit
Leiden**

The Netherlands

"Driver or passenger" : an integrated epidemiological and experimental perspective on the association between nontyphoidal salmonella infection and colon cancer

Duijster, J.W.

Citation

Duijster, J. W. (2022, October 12). *"Driver or passenger" : an integrated epidemiological and experimental perspective on the association between nontyphoidal salmonella infection and colon cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3479752>

Version: 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/1887/3479752>

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

Samenvatting

Dikkedarmkanker (hierna 'darmkanker' genoemd) is de op twee na meest voorkomende vorm van kanker wereldwijd. In Nederland wordt jaarlijks bij meer dan 8,000 personen darmkanker vastgesteld. Hoewel de incidentie van darmkanker in de oudere leeftijdsgroepen al daalt mede door de invoering van darmkankerscreening bij personen 55-75 jaar (sinds 2014), stijgt de incidentie in jongere leeftijdsgroepen (<50 jaar). Een klein deel van de gediagnosticeerde darmkankers ($\leq 5\%$) heeft een erfelijke oorzaak. Naast de bekende risicofactoren zoals overgewicht, consumptie van rood en bewerkt vlees, een tekort aan lichaamsbeweging, alcoholgebruik, roken en een lage inname van voedingsvezels en calcium, spelen mogelijk andere nog onbekende risicofactoren een rol in de ontwikkeling van darmkanker. Een toenemend aantal micro-organismen wordt geassocieerd met de inductie en ontwikkeling van kanker. Enkele bekende voorbeelden zijn de associatie tussen het humaan papillomavirus en hepatitis virus en de ontwikkeling van respectievelijk baarmoederhalskanker en leverkanker. In tegenstelling tot virussen laten bacteriën geen genetische afdruk achter in cellen waardoor het causale verband tussen bacteriële infectie en kanker lange tijd is onderkend. Tijdens infectie manipuleren bacteriën de bestaande processen/routes van cellulaire communicatie in de gastheer wat mogelijk aantasting van de integriteit van de gastheercel tot gevolg heeft. Dit heeft voor de bacterie als doel om overleving en replicatie in de gastheer te waarborgen en te optimaliseren, echter het kan als nevenschade ook kwaadaardige transformatie van cellen en daarmee het ontstaan van kanker teweegbrengen. De best onderzochte associaties tussen bacteriële infectie en kanker zijn op dit moment *Helicobacter pylori* als veroorzaker van maagkanker en chronische *Salmonella* Typhi infectie als oorzaak van galblaaskanker. Daarnaast wijst experimenteel en epidemiologisch onderzoek op een verband tussen niet-tyfeuze *Salmonella* en darmkanker. Niet-tyfeuze *Salmonella* is een van de meest voorkomende oorzaken van gastro-enteritis wereldwijd en infectie heeft veelal een mild, zelflimiterend beloop. Het bewijs voor een mogelijke associatie tussen niet-tyfeuze *Salmonella* en kanker is slechts gebaseerd op enkele onderzoeken en veel is nog onbekend over de mechanismen en condities voor het mogelijke verband tussen *Salmonella* en darmkanker en mogelijke andere vormen van kanker in het spijsverteringskanaal. Daarom heeft deze thesis als hoofddoel de bestaande kennis over de mogelijke associatie tussen niet-tyfeuze *Salmonella* infectie en kanker in het spijsverteringskanaal verder uit te diepen, met een focus op darmkanker. Hiervoor hebben we een geïntegreerde epidemiologische en experimentele aanpak gebruikt.

In **hoofdstukken 2, 3 en 4** onderzoeken we of frequente blootstelling aan zoönotische pathogenen zoals *Salmonella* een verhoogd risico op darmkanker tot gevolg heeft. Een van de

mogelijke manieren van blootstelling is via werk, bijvoorbeeld door contact met levend vee of (rauwe) producten van dierlijke oorsprong. In **hoofdstuk 2** hebben we in een landelijke registerstudie onderzocht of er een verband is tussen incidentie van gerapporteerde humane salmonellose en campylobacteriose en beroep in de Nederlandse bevolking, daarbij gebruikmakend van een internationaal beroepsclassificatiesysteem. Naast analyse van de incidenties in de verschillende beroepsgroepen in de totale dataset, hebben we drie risicogroepen gedefinieerd. Deze risicogroepen omvatten beroepen mogelijk geassocieerd met een frequente blootstelling aan (een lage dosis) *Salmonella* via 1) contact met levende dieren en dierlijke mest (bijv. veehouders, slachthuismedewerkers en dierenartsen), 2) dierlijke producten tijdens voedselproductie/-bereiding (bijv. koks) en 3) dierlijke producten tijdens verkoop (bijv. slagers en medewerkers van kaas-/delicatessenwinkels). De incidentie van salmonellose en campylobacteriose in de beroepsgroepen en risicogroepen werd vergeleken met de incidentie in de matchende groep (o.b.v. *Salmonella* serovar of *Campylobacter* species, geslacht en leeftijdsgroep van de mensen, en kalenderjaar) in de totale beroepsbevolking (de referentiepopulatie) in de periode 1999-2016. De uitkomstmaat was een gestandaardiseerde incidentie ratio (SIR). SIRs voor zowel salmonellose en campylobacteriose waren significant verhoogd in de risicogroep met blootstelling aan levende dieren of dierlijke mest en de verkoop van dierlijke producten (1,4-1,8 maal verhoogd). De incidentie van gerapporteerde salmonellose/ campylobacteriose was eveneens verhoogd in gezondheidszorg-gerelateerde beroepen en een aantal industriële beroepen.

Tevens hebben we in deze studie de *Salmonella*- en *Campylobacter*-seroincidentie vergeleken tussen verschillende beroepsgroepen in een subgroep van de beroepsbevolking. Gerapporteerde infecties geven het topje van de ijsberg weer, gezien met name infecties met ernstige of langdurige klachten worden gerapporteerd. Seroincidentie daarentegen is gebaseerd op de ontwikkeling van een immuunrespons in reactie op infectie ongeacht ziekteverschijnselen. Hiertoe hebben we gebruik gemaakt van serummonsters uit een eerdere seroprevalentiestudie. De anti-*Salmonella*-*Campylobacter* IgM, IgG en IgA antilichaamtiter in een individueel serum sample werden gebruikt als input om de periode sinds de laatste seroconversie (blootstelling aan pathogeen) te berekenen door middel van een Bayesiaans model. De periode sinds laatste seroconversie kon vervolgens worden geconverteerd naar een seroincidentie, gedefinieerd als het geschatte aantal infecties per persoonsjaar. De spreiding in seroincidentie van *Salmonella* en *Campylobacter* was slechts beperkt binnen verschillende beroepsgroepen en was niet significant hoger in de drie gecombineerde risicogroepen in vergelijking met de seroincidenties in niet-risicogroepen.

In **hoofdstuk 3** hebben we de associatie tussen darmkanker en beroep onderzocht in een landelijke registerstudie in de periode 2000-2016. Om de uitkomsten te kunnen vergelijken

met de eerdere beroepsstudie (hoofdstuk 2) hebben we gebruik gemaakt van dezelfde beroepsclassificatie en risicogroepen. De incidentie van darmkanker (proximaal noch distaal) was niet significant verhoogd in de drie risicogroepen vergeleken met de incidentie in matchende referentiegroep in de algemene Nederlandse bevolking. Over het algemeen waren de verschillen in darmkankerincidentie tussen de onderzochte beroepsgroepen klein. Ook bleek de seroincidentie van *Salmonella* in personen die een aantal jaar later werden gediagnosticeerd met proximale darmkanker niet significant hoger dan in gematchte controles die geen darmkanker ontwikkelden, behalve in de groep die een serummonster afstonden voor hun 60e levensjaar (**hoofdstuk 4**). In een experimentele setting is onderzocht of een herhaalde infectie van gepredisponeerde muizen met een lage dosis *S. Typhimurium* versus een enkele infectie met een hoge dosis eenzelfde tumorontwikkeling teweegbrengt. Dit bleek het geval te zijn, echter tumoren van muizen met een *Salmonella*-infectie waren groter en invasiever dan in de tumoren in de controle groep. Ook was *Salmonella* in hogere mate aanwezig in tumorweefsel in vergelijking met het omliggende weefsel. Dit werd bevestigd in een *in vitro* experiment waar gepredisponeerde embryonale muizenfibroblasten (MEFs) met een herhaalde blootstelling aan een lage dosis *S. Typhimurium* meer kolonies vormden in agar dan MEFs met een enkele hoge dosis infectie. Herhaalde blootstelling aan een hoge dosis *Salmonella* leidde echter tot een hoger aantal kolonies. Bovendien had *Salmonella* een voorkeur voor infectie van cellen met de hoogste mate van pretransformatie.

In **hoofdstukken 5 en 6** hebben we de associatie tussen *Salmonella*-infectie geanalyseerd in twee retrospectieve cohortstudies. De studie in hoofdstuk 5 had als doel om de associatie tussen ernstige (d.w.z. gerapporteerde) salmonellose en darmkanker te onderzoeken d.m.v. een landelijke cohortstudie in de Deense populatie in de periode 1994-2016. Door data uit verschillende registratiesystemen op persoonsniveau te koppelen konden we de incidentie van darmkanker vergelijken tussen de groep personen met een gerapporteerde *Salmonella*-infectie in het verleden en de groep zonder gerapporteerde *Salmonella*-infectie (controle groep). Daarbij werd onderscheid gemaakt tussen darmkankerdiagnose <1 jaar na *Salmonella*-infectie en ≥ 1 jaar na infectie. In het algemeen was het risico op darmkanker niet hoger in de groep met *Salmonella*-infectie ≥ 1 jaar geleden ten opzichte van de controle groep, met uitzondering van de subgroep met gerapporteerde infectie door serovars anders dan Enteritidis en Typhimurium waar een 1,4 maal verhoogd risico op proximale darmkanker werd gevonden. Daarentegen was de incidentie van darmkanker in de groep met een recente infectie meer dan tweemaal hoger dan in de controle groep. In **hoofdstuk 6** hebben we een vergelijkbare studie uitgevoerd om het risico op galblaas- en galwegkanker na *Salmonella*- of *Campylobacter*-infectie vast te stellen in de Nederlandse populatie in

de periode 2000-2016. Galblaas-/galwegkanker is relatief zeldzaam in Nederland (~800 diagnoses/jaar), echter de overlevingskans is laag en diagnose kan in veel gevallen niet worden geattribueerd aan de bekende risicofactoren. Hoewel de associatie tussen *S. Typhi* en galblaascarcinoom inmiddels vaak onderwerp is van studie, is er nog weinig bekend over het risico op galblaas-/galwegkanker na niet-tyfeuze *Salmonella* infectie. Kankerdiagnoses <1 jaar na infectie werden geëxcludeerd in de analyse, evenals infecties voor de leeftijd van 20 jaar. Galblaas-/galwegkanker werd vastgesteld bij negen personen met een gerapporteerde *Salmonella*-infectie en zeven personen met een gerapporteerde *Campylobacter*-infectie. Deze aantallen waren te laag om statistische significantie te bereiken, echter voor *Salmonella* was er een indicatie voor een hogere kans op galblaas-/galwegkanker na infectie.

Het afgelopen decennium is het aantal gepubliceerde studies die het verband tussen micro-organismen (met name bacteriën) en kanker in het spijsverteringskanaal onderzoeken, substantieel toegenomen. Dit is onder andere te danken aan de snelle ontwikkeling van sequencing-methoden zoals '*whole-genome sequencing*' dat onderzoek naar onder andere het microbiom in relatie tot gezondheid en ziekte in een stroomversnelling heeft gebracht.

Hoofdstuk 7 bevat een reviewartikel van de epidemiologische studies die het verband onderzoeken tussen bacteriën/parasieten en kanker in de spijsverteringsorganen. *H. pylori* hebben we niet meegenomen in deze literatuurstudie omdat voor deze bacterie al veel reviewartikelen bestaan. Het artikel bevat een samenvatting van de belangrijkste methodologische aspecten en resultaten van 158 studies waarin het verband met kanker wordt onderzocht voor verschillende 10 bacteriën en 3 parasieten. Naast de Deense cohortstudie uit hoofdstuk 5, werd in vier andere studies de associatie tussen niet-tyfeuze *Salmonella* en colorectalkanker onderzocht. Eén daarvan was een Nederlandse registerstudie waarin een significant verhoogde incidentie van darmkanker werd gevonden in personen met een gerapporteerde *Salmonella*-infectie in de leeftijd 20-60 jaar. De incidentie van proximale darmkanker was bijna drie keer zo hoog na infectie met *S. Enteritidis* in vergelijking met de algemene bevolking. Deze resultaten konden niet worden bevestigd in zowel de Deense cohortstudie als een Taiwanese cohortstudie. Daarentegen werd in twee andere studies een significante associatie gevonden tussen *Salmonella* antilichaamtiter en colorectalkanker en tussen aanwezigheid van *Salmonella* AvrA eiwit in feces en colorectalkanker.

De studie in **hoofdstuk 8** had als doel meer inzicht te krijgen in mogelijke genetische factoren die verband houden met de vermeende oncogene rol van *Salmonella* alsmede mogelijke mechanismen die daarbij betrokken zijn. In een case-control studie hebben we 30 *Salmonella*-isolaten van mensen met een gerapporteerde *Salmonella*-infectie die een aantal jaar later werden gediagnosticeerd met darmkanker ('case-isolaten') vergeleken met 30

Salmonella-isolaten van mensen zonder darmkankerdiagnose ('control-isolaten'). De cases en controles werden gematched op basis van serotype, geslacht, leeftijd en jaar van infectie. De 60 *Salmonella*-isolaten werden vervolgens gebruikt voor verschillende experimenten. In een *in vitro* model bleek de mate waarin isolaten in staat waren MEFs te infecteren en cellulaire transformatie te induceren te verschillen. Een verschil in infectiviteit werd echter niet gevonden in een *in vitro* model systeem wat het humane spijsverteringskanaal nabootst. Ook werd in het genoom van de *Salmonella*-isolaten geen eenduidige aanwijzing gevonden voor betrokkenheid van specifieke genen of 'single-nucleotide polymorphisms' (SNPs) bij de capaciteit om transformatie te induceren. Wel bleken de isolaten met een hogere transformatie-efficiëntie beter in staat om een variëteit aan nutriënten te verbruiken, zoals aminozuren, peptiden en andere stikstof- en fosforbronnen, in tegenstelling tot de isolaten met een lagere transformatie-efficiëntie. In de studie werden er geen duidelijke verschillen tussen case-isolaten en control-isolaten gevonden op genotypisch en fenotypisch niveau.

Op basis van de uitkomsten van deze thesis kunnen we verschillende conclusies trekken. Allereerst, waren de resultaten van de epidemiologische analyses minder consistent en moeilijker te interpreteren in vergelijking met de experimentele analyses. Een mogelijke reden hiervoor is dat *Salmonella* waarschijnlijk een kleine rol speelt in darmkanker ontwikkeling ten opzichte van de bekende leefstijl-gerelateerde risicofactoren die het risico van *Salmonella* overschaduwden. Correctie voor deze risicofactoren die in tijd variëren is in veel epidemiologische studiedesigns niet mogelijk. Daarnaast wordt elk individu meermaals blootgesteld aan *Salmonella* gedurende zijn/haar leven. Een niet-blootgestelde populatie bestaat in feite niet. Gerapporteerde infecties omvatten slechts een klein deel van het werkelijke aantal infecties, waardoor de kans bestaat dat de associatie tussen *Salmonella* en darmkanker wordt onderschat. Op basis van de uitkomsten van de muisexperimenten en de *in vitro* analyses in deze thesis kunnen we concluderen dat *Salmonella* onder bepaalde omstandigheden (die in werkelijkheid voor kunnen komen) in staat is om de ontwikkeling van darmkanker te initiëren en daarmee een 'driver' rol kan innemen. Daarnaast blijkt uit de *in vivo* en *in vitro* analyses alsmede de observatie dat de darmkankerdiagnoses met name verhoogd zijn in het eerste jaar na *Salmonella* infectie, dat *Salmonella* een tropisme heeft voor het infecteren van gepretransformeerde cellen en kankercellen. Dit ondersteunt de hypothese dat *Salmonella* een 'passenger' is die profiteert van het veranderde microklimaat in/om de tumor en mogelijk de progressie van darmkanker stimuleert. Hoewel we in deze thesis geen causale link hebben kunnen vaststellen tussen *Salmonella* en darmkanker, biedt de geobserveerde variatie in cellulaire transformatie capaciteit en de correlatie met het gebruik van nutriënten mogelijkheden voor verder onderzoek naar de verstoring van cellulaire processen in de gastheer die leiden tot tumorontwikkeling.

