



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Towards understanding *Clostridioides difficile* colonization**

Crobach, M.J.T.

### **Citation**

Crobach, M. J. T. (2024, February 14). *Towards understanding Clostridioides difficile* colonization. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3717585>

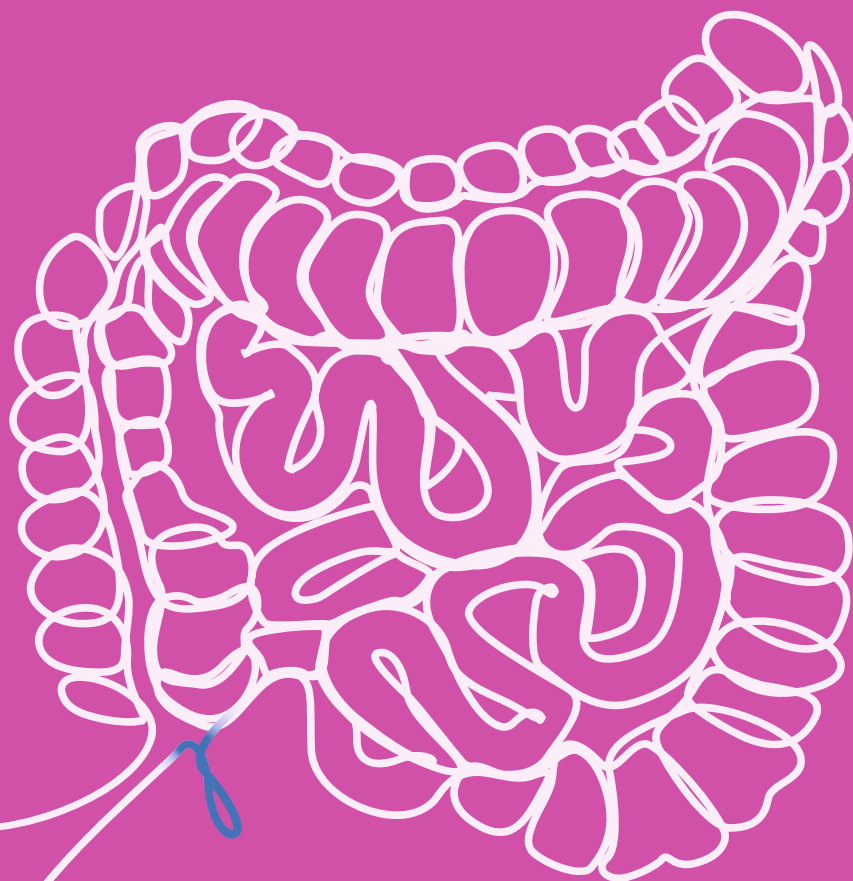
Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3717585>

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

# Appendices





## Nederlandse samenvatting

Van alle micro-organismen die zich in en op het menselijk lichaam bevinden, herbergt de dikke darm er veruit de meeste. Deze darmmicrobiota vervult verschillende functies voor de menselijke gastheer. Zo biedt de microbiota bijvoorbeeld weerstand tegen ziekteverwekkers door concurrentie om voedingsstoffen en plaats (de zogenaamde kolonisatie resistentie). Een verstoring van de darmmicrobiota kan leiden tot een afname van deze kolonisatie resistentie en een verhoogde gevoeligheid voor infecties. Het bekendste voorbeeld hiervan is een infectie met de darmbacterie *Clostridoides difficile* die kan ontstaan na verstoring van de darmmicrobiota door antibioticagebruik. Terwijl bij gezonde mensen de groei van deze bacterie onderdrukt zou worden door een ingewikkeld samenspel van hun darmmicrobiota, kan *C. difficile* zich in een verstoorde darmmicrobiota flink gaan vermeerderen en toxines (gifstoffen) gaan produceren. Deze toxines zorgen voor de klinische symptomen van een *C. difficile* infectie (CDI), welke kunnen variëren van milde diarree tot soms een levensbedreigende darmontsteking. Ook zijn er mensen waarbij *C. difficile* zich wel weet te nestelen in de darm, maar (nog) geen symptomen veroorzaakt. Deze mensen noemen we asymptomatische dragers van *C. difficile*.

Sinds het veelvuldig gebruik van antibiotica is CDI uitgegroeid tot de meest voorkomende ziekenhuis-geassocieerde infectie in Europa en Noord-Amerika. Lange tijd werd gedacht dat de overdracht met name plaatsvond binnen ziekenhuizen via symptomatische patiënten. Aan het begin van deze eeuw kwam deze zienswijze in een ander daglicht te staan doordat nieuwe typeringstechnieken het mogelijk maakten om de overdracht van *C. difficile* vele malen beter in kaart te brengen. Een groot deel van de CDI gevallen bleek niet verklaard te kunnen worden door onderlinge overdracht tussen symptomatische patiënten. Daarmee begon de zoektocht naar andere mogelijke *C. difficile* bronnen, en realiseerde men zich dat ook asymptomatische *C. difficile* dragers een bron kunnen zijn voor verdere verspreiding. Met name asymptomatische dragers die opgenomen worden in een ziekenhuis zouden de bacterie het ziekenhuis binnen kunnen brengen en vervolgens verspreiden onder vatbare patiënten.

Het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift had tot doel om beter inzicht te krijgen in asymptomatisch *C. difficile* dragerschap. De uitdagingen die er zijn bij het detecteren van *C. difficile* dragerschap en het onderscheid maken tussen dragerschap en infectie worden beschreven. Daarnaast werden de verschillen tussen de darmmicrobiota van dragers en CDI patiënten onderzocht om beter te kunnen begrijpen welke factoren

bepalen of zich dragerschap of infectie ontwikkeld. Een andere onderzoeksvraag betrof het nut van het screenen op *C. difficile* dragerschap bij opname in het ziekenhuis. Hiertoe werd in een viertal Nederlandse ziekenhuizen onderzocht hoeveel patiënten bij opname in het ziekenhuis dragers zijn en wat hun betekenis is bij het ontstaan van nieuwe CDI gevallen.

### **C. difficile** dragerschap: definitie en detectie

In **hoofdstuk 2** wordt de reeds bestaande literatuur omtrent *C. difficile* dragerschap gestructureerd samengevat.

Onderzoek doen naar *C. difficile* dragerschap begint bij een heldere definitie van wat hiermee bedoeld wordt. De criteria die gebruikt worden om *C. difficile* dragerschap te definiëren blijken in de literatuur echter aanzienlijk te verschillen, zoals wij in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift beschrijven. Wij definiëren *C. difficile* dragerschap als de detectie van de bacterie in afwezigheid van CDI symptomen. Er kan onderscheid gemaakt worden in dragerschap van een toxinogene stam (een *C. difficile* stam die in staat is om toxines te produceren en dus ziekte kan veroorzaken) en dragerschap van een niet-toxinogene stam (een *C. difficile* stam die niet in staat is om toxines te produceren en dus geen ziekte veroorzaakt). Verder kunnen we dragerschap opsplitsen in voorbijgaand dragerschap, waarbij op één moment in de tijd dragerschap aangetoond wordt, en persisterend dragerschap, waarbij *C. difficile* op meerdere momenten in de tijd wordt aangetoond. Deze laatste opsplitsing is van belang omdat de risicofactoren en onderliggende mechanismen voor persisterend dragerschap anders kunnen zijn dan voor voorbijgaand dragerschap. Ook de kans dat dragerschap zich ontwikkelt tot een daadwerkelijke infectie kan verschillend zijn tussen deze groepen, en beide groepen spelen mogelijk een andere rol in de verdere verspreiding van *C. difficile*.

Niet alleen de definities, maar ook de methodes waarop *C. difficile* dragerschap gedetecteerd wordt verschillen aanzienlijk tussen gepubliceerde studies. In **hoofdstuk 2** wordt beschreven welke testen die normaliter gebruikt worden voor CDI diagnostiek ook ingezet kunnen worden voor de detectie van dragerschap. Omdat de bacterie-aantallen bij dragers lager kunnen zijn dan bij patiënten met een infectie, is het belangrijk om de meest sensitieve methodes te kiezen.

A

Verder is het van belang ons te realiseren dat CDI en dragerschap gemakkelijk met elkaar verward kunnen worden, omdat veel testen die gebruikt worden in de routine diagnostiek van CDI geen onderscheid kunnen maken tussen deze twee situaties. Om er zowel in de dagelijkse praktijk als in studies voor te zorgen dat CDI en dragerschap goed uit elkaar gehouden kunnen worden, is het van belang om de diagnostiek van CDI zo optimaal mogelijk te maken. Dat was het onderwerp van **hoofdstuk 3** en **hoofdstuk 4** van dit proefschrift.

Eén van de testen die veel gebruik wordt in de routine diagnostiek voor CDI is een toxine nucleic acid amplification assay (NAAT). Deze test detecteert in feite alleen de aanwezigheid van de genen die coderen voor de toxines, maar niet of deze toxines ook echt geproduceerd worden. Zowel bij dragerschap als bij CDI zal deze test dus een positieve uitslag geven en – indien gebruikt in de routine CDI diagnostiek- tot een overschatting van het aantal CDI gevallen en een onderschatting van het aantal dragers leiden. Een toxine enzyme immunoassay (EIA, een test gebaseerd op het aantonen van een antigeen, in dit geval het toxine) is de enige snelle test die vrije toxines detecteert en dus het beste correleert met een daadwerkelijke infectie, maar de suboptimale sensitiviteit van dit type testen is een groot nadeel. Om de diagnostiek van CDI te optimaliseren, werd in 2016 een literatuurreview en meta-analyse van de sensitiviteit en specificiteit van de beschikbare CDI testen verricht. Op basis hiervan werden nieuwe European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) aanbevelingen gedaan, welke beschreven worden in **hoofdstuk 3** van dit proefschrift. We concludeerden dat geen van de beschikbare snelle testen specifiek genoeg is om bij een lage voorafkans op CDI (zoals vaak het geval is in de ingezonden ontlastingsmonsters) nog een adequate positief voorspellende waarde te houden. Met andere woorden, als deze testen ingezet zouden worden als op zichzelf staande test om CDI te diagnosticeren zou dit tot veel fout-positieve resultaten leiden. Daarom adviseerden we – conform de vorige ESCMID aanbevelingen- het gebruik van een meerstaps algoritme. Zo'n algoritme zou moeten starten met een screeningstest met een hoge negatief voorspellende waarde (een zeer sensitieve test, zoals een EIA gericht op het enzym glutamaat dehydrogenase dat in alle *C. difficile* stammen voorkomt of een toxine NAAT) waardoor monsters met een negatieve testuitslag daadwerkelijk als negatief beschouwd kunnen worden. Alleen de monsters met een eerste positieve testuitslag zouden vervolgens opnieuw getest moeten worden met een tweede test. Omdat de voorafkans op CDI in deze geselecteerde groep monsters nu hoger is, wordt met een tweede specifieke test nu wel een voldoende hoge positief voorspellende waarde bereikt. Bij voorkeur wordt als tweede test een toxine EIA gebruikt,

omdat deze niet alleen specifiek is, maar ook het voordeel heeft van het detecteren van vrije toxines, die correleren met daadwerkelijke infectie.

Een nadeel van het gebruik van een meerstaps algoritme is dat er meerdere testen uitgevoerd moeten worden voordat de diagnose gesteld kan worden, wat kan leiden tot uitstel van de behandeling. Derhalve onderzochten wij in **hoofdstuk 4** van dit proefschrift of bij het gebruik van een 2-staps algoritme (test 1 NAAT, test 2 toxine EIA) al een voorlopige diagnose gesteld kan worden op basis van het kwantitatieve resultaat van de eerste NAAT test. Een lagere quantification cycle ( $C_q$ ) waarde in de NAAT test (corresponderend met minder verdubbelingscycli die nodig zijn voordat het genetisch materiaal aangetoond kan worden) correspondeert met de aanwezigheid van een grotere hoeveelheid bacterie. Wij verwachtten dat samples met een lage  $C_q$  waarde overeen zouden komen met daadwerkelijk infectie/de aanwezigheid van toxines, en dus ook vaker positief zouden testten in de toxine EIA. Om dit onderzoeken voerden we een analyse uit op twee grote collecties ontlastingsmonsters ( $n=2669$  en  $n=1718$ ) die werden ingestuurd voor CDI diagnostiek naar de laboratoria van 2 Nederlandse ziekenhuizen. Beide ziekenhuizen gebruiken voor de diagnostiek van CDI een dergelijk 2-staps algoritme waarin monsters eerst getest worden met een NAAT en vervolgens met een toxine EIA. Van alle ontlastingsmonsters testten respectievelijk 208 en 113 positief met de NAAT. We vonden significant lagere  $C_q$  waarden in de monsters die ook positief testten in de toxine EIA dan in samples die negatief testten in de EIA (gemiddelde  $C_q$  waarde 24.4 versus 30.4 en 26.8 versus 32.2,  $p<0.001$  voor beide cohorten). Bij het optimale afkappunt zou in 78.9% (ziekenhuis 1) en 80.5% (ziekenhuis 2) van de gevallen op basis van de kwantitatieve NAAT uitslag al een juiste voorspelling van de toxinestatus gedaan kan worden. Omdat wij dit een suboptimale voorspelling vinden, concludeerden wij dat de tweede test van dit algoritme (de toxine EIA) echt noodzakelijk is en niet achterwege gelaten kan worden na de initiële positieve NAAT uitslag.

## De darmmicrobiota en *C. difficile* dragerschap

Het besef dat asymptomatisch dragerschap van *C. difficile* bestaat doet de vraag opkomen welke mechanismen mogelijk maken dat kolonisatie kan ontstaan, maar vervolgens wel bescherming bieden tegen het ontstaan van symptomatische ziekte. Naast het immuunsysteem lijkt vooral de samenstelling van de darmmicrobiota hier een belangrijke rol in te spelen. Verschillende processen in de levenscyclus van *C. difficile*, van de ontkieming van de sporen in het maagdarmkanaal en het ontstaan van kolonisatie tot

aan de productie van de toxines, worden immers beïnvloed door de darmmicrobiota. Het bestuderen van de verschillen in darmmicrobiota samenstelling van patiënten met CDI, met asymptomatisch *C. difficile* dragerschap of geen van deze beiden kan duidelijker maken welke veranderingen maken dat dragerschap of infectie kan ontstaan. In **hoofdstuk 5** van dit proefschrift vergeleken we de samenstelling van de darmmicrobiota van patiënten met dragerschap (n=41), met CDI (n=41) en zonder dragerschap of CDI (controles, n=43) door middel van 16S rRNA gene amplicon sequencing. In zowel dragers als CDI patiënten was de bacteriële diversiteit verlaagd in vergelijking met controles. De exacte samenstelling van de microbiota verschilde wel tussen CDI patiënten en dragers. Er werden verschillende bacteriegroepen geïdentificeerd die mogelijk geassocieerd zijn met gevoeligheid voor kolonisatie en infectie (*Veillonella*) of juist met resistentie tegen kolonisatie (*Eubacterium halii* en *Fusicatenibacter*), waar vervolgonderzoeken verder op in zouden kunnen gaan.

### *C. difficile* screening bij ziekenhuisopname in de Nederlandse situatie

Voorafgaand aan de start van het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven wordt, waren enkele publicaties verschenen die suggereerden dat asymptomatische dragers een belangrijke rol zouden kunnen spelen in de overdracht van *C. difficile*. Vooral dragers die opgenomen worden in het ziekenhuis lagen onder een loep, omdat dit een manier is waarop *C. difficile* in de ziekenhuisomgeving geïntroduceerd wordt en vervolgens verder verspreid kan worden. Ook zouden dragers tijdens ziekenhuisopname door verscheidene factoren die hun darmmicrobiota verstoren (zoals antibiotica gebruik) een grotere kans hebben dat hun dragerschap overgaat in een infectie. In **hoofdstuk 2** wordt besproken dat studies tonen dat 3 tot 21% van de patiënten bij opname in het ziekenhuis reeds drager is van *C. difficile*. Een meta-analyse van verschillende studies liet zien dat patiënten die bij opname drager zijn van een toxinogene stam inderdaad een hoger risico hebben op het ontwikkelen van CDI; voor hen geldt een relatief risico van 5.86. Indien asymptomatische dragers ook daadwerkelijk een belangrijke rol spelen in de overdracht van *C. difficile* zou het zinvol kunnen zijn om deze dragers te identificeren en isoleren zodat verdere verspreiding van *C. difficile* niet plaatsvindt. Een Canadees experiment had aangetoond dat deze aanpak inderdaad het aantal nieuwe CDI gevallen dat optreedt in het ziekenhuis kan verlagen. In Canada was op dat moment echter sprake van een hoge CDI incidentie en frequent voorkomen van een meer virulent *C. difficile* subtype (ribotype 027), een situatie niet vergelijkbaar met Nederland. Ook was niet duidelijk of de afname kwam doordat er minder overdracht was via dragers of doordat dragers minder vaak CDI ontwikkelden door meer alertheid op microbiota verstorende factoren. In Nederland is gedurende de laatste



jaren sprake van een stabiele lage CDI incidentie met slechts sporadische uitbraken. De meer virulente subtypes komen weinig voor. Omdat veel gegevens over dragerschap in een dergelijke situatie nog ontbraken, zetten wij de *Clostridioides difficile* dragerschap (CDD) studie op. De resultaten hiervan staan beschreven in **hoofdstuk 6**. Het doel van deze studie was om de waarde van *C. difficile* dragerschap screening bij opname in het ziekenhuis in een situatie met een lage CDI incidentie te bepalen. Hiertoe werd een multicenter onderzoek uitgevoerd in 4 ziekenhuizen verspreid door Nederland (Amphia Ziekenhuis te Breda, Radboud UMC te Nijmegen, Erasmus MC te Rotterdam en LUMC te Leiden). Nieuw opgenomen patiënten werden gescreend op *C. difficile* dragerschap door binnen 72 uur een ontlastingsmonster te verzamelen en te kweken op *C. difficile*. *C. difficile* dragerschap was aanwezig in 108/2211 (4.9%) van de opnames. Dragerschap van een toxigene stam werd gevonden in 68/2211 (3.1%) van de opnames. Het meer virulente subtype ribotype 027 kwam niet voor onder dragers. Geen van de dragers ontwikkelde CDI tijdens opname of tijdens de 1-jaars follow-up. Door middel van een specifieke typeringsmethode (core genome multilocus sequence typing, cgMLST) werden *C. difficile* stammen van dragers vergeleken met stammen van CDI gevallen die optraden tijdens de studieperiode in deze ziekenhuizen, met als doel om te kunnen bepalen of overdracht vanaf dragers had plaatsgevonden. Op deze manier werd één mogelijke overdracht van een drager naar CDI patiënt gevonden: deze twee patiënten met een genetisch identieke stam waren voorafgaand aan hun beider diagnoses opgenomen geweest op dezelfde afdeling. Een belangrijke beperking van ons onderzoek was de suboptimale inclusie van patiënten doordat het verzamelen van ontlastingsmonsters moeizaam verliep. De screening voor *C. difficile* dragerschap bij opname in het ziekenhuis was tijdrovend en belastend, terwijl wij geen patiënten detecteerden die vanuit hun dragerschap CDI ontwikkelden en hoogstens 1 patiënt die een stam had overgebracht op een CDI patiënt. Wij concludeerden derhalve dat screening in een situatie zoals die in Nederland niet zinvol is. Mogelijk dat de *C. difficile* subtypes die in Nederland circuleren minder overgedragen worden en/of minder vaak tot ziekte leiden. Dit wil overigens niet zeggen dat dragers helemaal geen rol spelen in de epidemiologie van CDI. Waarschijnlijk contamineren dragers toch in meer of mindere mate de (ziekenhuis)omgeving, van waaruit op enig moment weer overdracht plaatsvindt naar patiënten die vervolgens dragerschap danwel een infectie kunnen ontwikkelen. Een directe link zal op deze manier echter vaak ontbreken.

In de cgMLST analyse die we in de studie verrichtten bleek wel sprake van een groep CDI patiënten die allen geïnfecteerd waren met een genetische gerelateerde stam. Dit was een uitbraak die ook al opgevallen was in de CDI sentinel surveillance (een continue

surveillance om de incidentie van CDI en circulerende *C. difficile* subtypes te monitoren). Deze ongebruikelijke uitbraak wordt in nader detail beschreven in **hoofdstuk 7**. De uitbraak betrof 5 patiënten met in totaal 8 episodes van CDI op een afdeling gastro-enterologische chirurgie van een universitair ziekenhuis. In twee van de vijf patiënten was sprake van recidiverende en ernstige symptomen. Alle gevallen werden veroorzaakt door een uniek subtype dat niet bekend was in internationale referentie laboratoria en daarom het nieuwe PCR ribotype 826 (RT826) toegewezen kreeg. Het is een ribotype welke naast de gebruikelijke toxines A en B ook een derde toxine (het binaire toxine) bevat en lijkt op de virulente stam RT078. De bron voor deze nieuw stam kon niet achterhaald worden, maar gezien het ontbreken van deze stam in de humane internationale collecties en het feit dat RT078 en hiermee geassocieerde stammen vaak ook bij dieren gevonden worden deed ons speculeren dat er mogelijk sprake is geweest van overdracht vanuit een dierlijke bron. De eerste patiënt of een asymptomatische drager kan de stam geïntroduceerd hebben in het ziekenhuis, waarna verdere verspreiding plaatsvond. Sinds deze uitbraak is RT826 niet meer gevonden in de Nederlandse surveillance of bij ons bekende uitbraken.

CDI wordt de laatste jaren steeds vaker buiten het ziekenhuis gerapporteerd. De Nederlandse CDI sentinel surveillance richt zich alleen op in het ziekenhuis opgenomen patiënten. Bij een aanzienlijk deel van deze patiënten (40%) ontstaan de eerste klachten echter al buiten het ziekenhuis. In **hoofdstuk 8** werden gegevens van de CDI sentinel surveillance gebruikt om die gevallen van CDI beter te karakteriseren. Surveillance programma's die ook de CDI gevallen buiten het ziekenhuis includeren zouden niet alleen een completer beeld kunnen geven van de ware ziektelast van CDI, maar ook waardevolle informatie kunnen verschaffen over de manier waarop overdracht buiten de ziekenhuisomgeving plaatsvindt en wat – naast asymptomatische dragers- mogelijke andere bronnen van *C. difficile* zouden kunnen zijn. Echter, omdat de meeste patiënten met kortdurende diarree de huisarts niet bezoeken, danwel niet getest worden op CDI, zal een groot deel van de CDI gevallen buiten het ziekenhuis niet gedetecteerd worden. Daardoor zal de waarde van zo'n uitgebreidere surveillance te beperkt zijn.

## Discussie en vooruitblik

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift worden de resultaten van ons onderzoek samengevat. Ook wordt besproken welke uitdagingen spelen bij het uitvoeren of interpreteren van onderzoek naar *C. difficile* dragerschap. Zo blijft het belangrijk ons te

realiseren dat *C. difficile* dragerschap gemakkelijk verward kan worden met CDI, vooral als er geen optimale diagnostiek ingezet wordt voor CDI.

De resultaten van ons onderzoek werden in context geplaatst met de recente literatuur en er werd vooruit gekeken naar mogelijk toekomstige ontwikkelingen. Als we kijken naar de rol die dragers spelen in het ontstaan van nieuwe CDI gevallen dan lijkt in een situatie vergelijkbaar met die in Nederland (lage incidentie van CDI, weinig circulerende virulente subtypes) directe overdracht vanuit dragers geen belangrijke besmettingsroute te zijn. Ook hadden dragers geen hoog risico op het ontwikkelen van CDI. Het screenen op asymptomatisch dragerschap bij ziekenhuisopname zal in een dergelijke situatie niet veel bijdragen aan het voorkomen van nieuwe CDI gevallen. Wel kunnen dragers zorgen voor verdere verspreiding van *C. difficile* binnen maar ook buiten de ziekenhuisomgeving en we dienen ons te beseffen dat *C. difficile* sporen wijdverspreid zijn. Iedereen kan dus gemakkelijk in contact komen met *C. difficile* sporen. Het lijkt daarom logischer om te focussen op het verminderen van de vatbaarheid voor CDI (door bijvoorbeeld antibiotic stewardship programma's) in combinatie met algemene infectiepreventie maatregelen om nog verdere verspreiding van *C. difficile* te voorkomen, vooral op plekken waar veel vatbare patiënten komen, zoals ziekenhuizen.

*C. difficile* dragers vormen een interessante groep voor verder onderzoek. Zo zou nader onderzocht kunnen worden welke mechanismen (naast de microbiota samenstelling) ervoor zorgen dat dragers geen infectie ontwikkelen. Hierbij kan gedacht worden aan immunologische factoren, of de metabolieten (stofwisselingsproducten) die aanwezig zijn in de darm. Mogelijk zou dit kunnen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe CDI behandelmethodes of preventieve behandelingen ter voorkoming van CDI.

Aangezien *C. difficile* dragerschap gepaard gaat met een verstoorde darmmicrobiota, speculeerden wij of dragers ook meer risico hebben op het ontwikkelen van andere aandoeningen die geassocieerd worden met een verstoorde darmmicrobiota, zoals inflammatoire darmziekten (ziekte van Crohn en colitis ulcerosa), prikkelbare darm syndroom en metabool syndroom. Ook de effectiviteit van bepaalde medicatie wordt beïnvloed door de darmmicrobiota. Een voorbeeld hiervan is een verminderde activiteit van checkpoint remmers (immunotherapie voor de behandeling van kanker) bij patiënten die een verstoorde darmmicrobiota hebben door recent antibioticagebruik. Het zou interessant zijn om te bekijken of de effectiviteit van checkpoint inhibitors ook verminderd is in *C. difficile* dragers.

## Appendices

Het herstellen van een verstoorde darmmicrobiota (door bijvoorbeeld een fecestransplantatie) is inmiddels een effectieve behandeling gebleken voor patiënten met terugkerende CDI. Of het ook zinvol is de darmmicrobiota van *C. difficile* dragers te herstellen om het risico op het ontwikkelen van CDI (of andere aan een verstoorde microbiota gelinkte aandoeningen) te voorkomen is nog onbekend.