

Bachelorproef

Positieve hemoculturen - casusbespreking
An Roelandt

Karina Kabiran

Departement GDT

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Medische Laboratoriumtechnologie

2023-2024

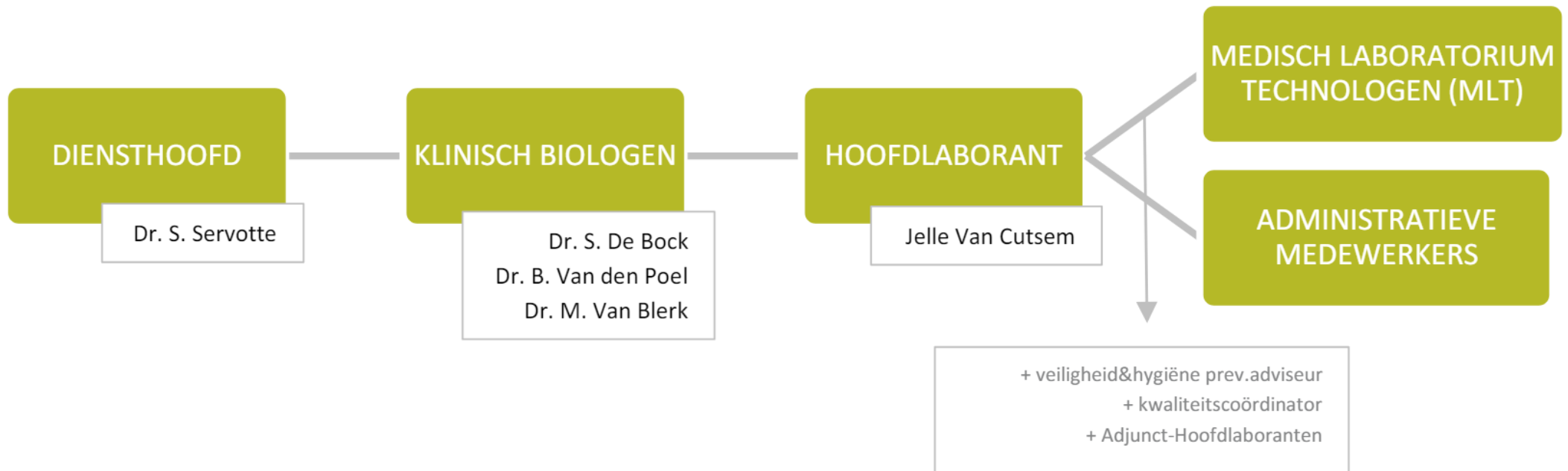
Voorwoord

Gedurende een periode van twaalf weken kreeg ik de kans om stage te lopen in het klinisch laboratorium van AZ Jan Portaels in Vilvoorde. Deze ervaring heeft niet alleen mijn kennis aangescherpt maar heeft ook mijn zelfvertrouwen in zelfstandig handelen laten groeien. Met dit voorwoord wil ik dus mijn oprechte dankbaarheid uiten aan de toegewijde laboranten die voor deze leerrijke en aangename stage hebben gezorgd. Hun persoonlijke begeleiding en bereidwilligheid hebben een waardevolle bijdrage geleverd aan mijn toekomstig beroepsleven als medisch laboratoriumtechnoloog.

Mijn dank gaat uit naar dr. Bea Van den Poel die mij heeft voorzien van dit leerzame en boeiende onderwerp, mijn vragen heeft beantwoord en eindwerk heeft nagelezen. Ook ben ik enorm dankbaar voor de microbiologen die mij geholpen hebben in het verzamelen van informatie, het beantwoorden van talloze vragen en het kritisch nalezen van dit eindwerk. Zonder hun expertise en hulp zou ik niet in staat geweest zijn om deze bachelorproef tot een goed einde te brengen.

Verder wil ik mijn waardering uitspreken voor mijn promotor, An Roelandt, voor de behulpzame tips, feedback en de begeleiding in het schrijfproces. Tevens ben ik dankbaar voor de docenten die de afgelopen jaren hun kennis en expertise hebben gedeeld.

Organigram



Inhoudstafel

Inhoudstafel	4
Lijst van afkortingen	6
Abstract NL	7
Abstract ENG	8
Inleiding en probleemstelling	9
1 Literatuurstudie	10
1.1 Bacteriëmie	10
1.2 Klinische manifestaties in persistente bacteriëmie	10
1.3 Etiologie	10
1.4 Incidentie	11
1.5 Pathogenese van bacteriëmie	12
1.5.1 Opname van bacteriën via de portals of entry	12
1.5.2 Bacteriële adhesie	12
1.5.3 Bacteriële invasie	13
1.6 De immunologische afweer tegen pathogenen	14
1.6.1 Virulentiefactoren in de ontwikkeling van het immuunsysteem	15
1.6.1.1 Complement evasie	15
1.6.1.2 Toxines: endotoxines en superantigenen met het effect op immuunrespons	16
1.7 Antibacteriële therapie in bacteriëmie	18
2 Casusbespreking	19
2.1 De routine van positieve hemoculturen	19
2.1.1 Principe BacT/Alert 3D™ BioMérieux	20
2.1.1.1 Kwaliteitscontrole BacT/Alert 3D™ BioMérieux	20
2.1.2 Principe Aerospray gram series 2	20
2.1.3 Principe MALDI-TOF MS Bruker	21
2.1.4 Principe VITEK 2 Compact Systeem BioMérieux	21
2.1.4.1 Kwaliteitscontrole VITEK 2 Compact Systeem BioMérieux	22
2.1.4.2 Kwaliteitscontrole Densichek™ Plus BioMérieux	23

2.1.5 Principe manuele antibioticagevoeligheidsbepaling	23
2.2 Positieve hemocultuur - <i>Salmonella</i> Enteritidis	24
2.2.1 Achtergrond en probleemstelling	24
2.2.2 Materiaal en methode	25
2.2.3 Resultaten en bespreking	26
2.2.4 Conclusie	28
2.3 Positieve hemocultuur - <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	29
2.3.1 Achtergrond en probleemstelling	29
2.3.2 Materiaal en methoden	29
2.3.3 Resultaten en bespreking	30
2.3.4 Conclusie	33
2.4 Positieve hemocultuur - <i>Campylobacter jejuni</i>	34
2.4.1 Achtergrond en probleemstelling	34
2.4.2 Materiaal en methoden	34
2.4.3 Resultaten en bespreking	35
2.4.4 Conclusie	36
2.5 Positieve hemocultuur - <i>Staphylococcus</i> species	37
2.5.1 Achtergrond en probleemstelling	37
2.5.2 Materiaal en methoden	37
2.5.3 Resultaten en bespreking	37
2.5.4 Conclusie	39
2.6 Positieve hemocultuur - <i>Escherichia coli</i>	40
2.6.1 Achtergrond en probleemstelling	40
2.6.2 Materiaal en methode	40
2.6.3 Resultaten en bespreking	41
2.6.4 Conclusie	43
Literatuurlijst	44

Lijst van afkortingen

AST	Antibiotic Susceptibility Test
ATCC	American Type Culture Collection
BSI	Bloedstroominfectie
CD	Cluster of Differentiation
CLABSI	Central line-Associated Bloodstream Infection
CRBSI	Catheter-Related Bloodstream Infection
CRP	C-reactief proteïne
ECM	Extracellulaire Matrix
HABSI	Hospital-Associated Bloodstream Infection
IL	Interleukine
LBP	Lipopolysaccharide-bindende proteïne
LPS	Lipopolysacchariden
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIC	Minimale Inhibitorische Concentratie
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PRR	Pattern-Recognition Receptors
QC	Kwaliteitscontrole
SS	<i>Salmonella & Shigella</i>
TCR	T-Cell Receptor
TNF	Tumornecrosefactor
TSA	Trypticase Soy Agar
UTI	Urineweginfectie

Positieve hemoculturen – casusbespreking

Naam: Karina Kabiran

Naam promotor: An Roelandt

Introductie: Bloedbaaninfecties evolueren snel naar een septicemie. Een septicemie omvat minstens twee tekenen van een systemisch inflammatoir respons als reactie op infectie. Onbehandeld kan dit leiden tot shock en sterfte. Een accurate behandeling steunt op de resultaten van het microbiologisch onderzoek van hemoculturen. In deze studie worden de specifieke handelingen voor positieve hemoculturen beschreven gevolgd door de uitwerking van vijf positief gevestigde hemoculturen met als doel de infecterende kiem te identificeren en de gevoeligheid aan antibiotica te bepalen.

Methoden: De positief gevestigde hemocultuurflessen werden uit de BacT/Alert 3D™ (BioMérieux) broedstoof ontladen voor isolatie, identificatie en antibioticumgevoeligheidsbepaling. De isolatie gebeurde door middel van voedingsbodems. De gebruikte media werden ingezet in functie van het resultaat van de gramkleuring. De identificatie werd uitgevoerd met behulp van de MALDI-TOF MS (Bruker). Indien nodig werd de identificatie ingezet op VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) met de bijbehorende identificatiekaarten. De gevoeligheid aan antibiotica werd bepaald op VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux), gebruik makend van de geschikte antibiogramkaarten. Bij micro-aerofielen werd dit manueel uitgevoerd volgens de schijfjes-diffusie methode.

Resultaten: Op basis van de kweken en identificaties zijn bacteriëmieën met *Salmonella enterica enterica* Enteritidis, *Streptococcus dysgalactiae*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus hominis* en *Staphylococcus pettenkoferi* vastgesteld. *S. Enteritidis* veroorzaakt niet-tyfeuze gastro-enteritis en in een klein aantal gevallen bacteriëmie. *S. dysgalactiae* bacteriëmie is het gevolg van een laat behandelde cellulitis. *C. jejuni* veroorzaakt een campylobacteriose en in zeldzame gevallen een bacteriëmie. De bacteriëmie met *E. coli* is geëvolueerd uit een urineweginfectie. *S. pettenkoferi* en *S. hominis* zijn onderdeel van de huidmicrobiota en werden afzonderlijk geïsoleerd uit de aerobe hemocultuurflessen van de twee afgenomen sets en duiden op contaminatie.

Conclusie: Bacteriëmieën met *S. Enteritidis*, *S. dysgalactiae*, *C. jejuni* en *E. coli* zijn secundair aan andere infecties. *S. hominis* en *S. pettenkoferi* maken deel uit van de huidmicrobiota en zijn geassocieerd met contaminatie ten gevolge van inadequate hemocultuurverzameling.

Positive blood cultures – case presentation

Name: Karina Kabiran

Name promotor: An Roelandt

Introduction: Bloodstream infections rapidly evolve into septicemia. Septicemia entails at least two signs of a systemic inflammatory response to infection. Left untreated, it could lead to septic shock and death. Accurate treatment relies on the microbiological diagnostics of blood cultures. This study describes specific procedures for positive blood cultures followed by the analysis of five positive flagged blood cultures aiming to identify the infecting microorganism and determine antibiotic susceptibility.

Methods: The positively flagged blood culture bottles were unloaded from the BacT/Alert 3D™ microbial detecting system (BioMérieux) for isolation, identification and antibiotic susceptibility testing. Isolation was performed using nutrient media. Depending on the outcome of Gram staining, selective and differential media were inoculated. Identification was conducted by using MALDI-TOF MS (Bruker). If necessary, identification was confirmed by using VITEK 2 Compact System (BioMérieux) with corresponding identification cards. Antibiotic susceptibility testing was performed by using VITEK 2 Compact System (BioMérieux) and appropriate antibiogram cards. For microaerophilic microorganisms, this test was manually performed by using the disk-diffusion method.

Results: Based on cultures and identifications, bacteremia with *Salmonella enterica enterica* Enteritidis, *Streptococcus dysgalactiae*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus pettenkoferi* were detected. *S. Enteritidis* causes non-typhoidal gastroenteritis and, in a small number of cases, bacteremia. *S. dysgalactiae* bacteremia results from late-treated cellulitis. *C. jejuni* causes campylobacteriosis and, in rare cases, bacteremia. Bacteremia with *E. coli* evolved from a urinary tract infection. *S. pettenkoferi* and *S. hominis* are part of the skin microbiota and were individually isolated from two aerobic blood culture bottles of two different sets, indicating contamination.

Conclusion: Bacteremia with *S. Enteritidis*, *S. dysgalactiae*, *C. jejuni* and *E. coli* are secondary to other infections. *S. hominis* and *S. pettenkoferi* are part of the skin microbiota and are associated with contamination due to inadequate blood culture collection.

Inleiding en probleemstelling

Een bacteriëmie duidt op de aanwezigheid van bacteriën in het bloed. Bacteriëmie kan het gevolg zijn van dagelijkse handelingen zoals tandenpoetsen en flossen. In die gevallen verloopt bacteriëmie meestal asymptomatisch en elimineert het immuunsysteem de binnengedrongen bacterie. Wanneer het immuunsysteem hierin faalt, evolueert bacteriëmie naar een septicemie dat een systemisch inflammatoir respons en infectie omvat. Onbehandeld leidt dit septische shock en mogelijks sterfte. Deze infecties zijn ziekenhuis-geassocieerd of community-acquired en gaan gepaard met hoge morbiditeit en mortaliteit. Preventieve maatregelen en een tijdige behandeling zijn noodzakelijk. In dit laatste vervult het microbiologische labo een onontbeerlijke rol (Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2014; Smith & Nehring, 2023).

In het literatuurgedeelte van dit eindwerk worden bacteriëmie en septicemie algemeen besproken. Er wordt gestart met een introductie van bacteriëmie gevolgd door de klinische verschijnselen. In het deel etiologie wordt omschreven welke criteria bepalen of de bacteriëmie primair of secundair is, alsook ziekenhuis-geassocieerd of community-acquired. De meest frequente oorzaken worden eveneens aangehaald. In het deel incidentie wordt omschreven welke micro-organismen regelmatig geïsoleerd worden bij nosocomiale infecties en met welke hulpmiddelen deze infecties geassocieerd zijn. Hierna volgt de algemene pathogenese van bacteriëmie. De verschillende stappen van het infectieproces en daarbij gebruikte virulentiefactoren worden besproken. Vervolgens wordt de rol van het immuunsysteem in bacteriëmie beschreven. Dit deel start met de immunologische afweermechanismen, gevolgd door de bacteriële virulentiefactoren ter evasie en triggering van het immuunsysteem. De literatuurstudie wordt afgesloten met de antibacteriële therapie in bacteriëmie. In dit deel worden de neveneffecten van breed spectrum antibiotica omschreven en het belang van de terugschroefing tot smalspectrum antibiotica.

In het deel van de casusbespreking worden vijf positieve hemoculturen uitgewerkt. Dit deel start met de omschrijving van de algemene procedure voor de verwerking van positieve hemoculturen. Nadien volgt het principe van de gebruikte toestellen en analyses tijdens het routinewerk. Daarna volgen de uitwerkingen van hemoculturen. Elke casus start met een korte achtergrond en probleemstelling waarin de patiënt zich bevindt. Vervolgens worden de gebruikte materialen en methoden omschreven. Hierna volgen de verkregen resultaten en besprekingen. In de conclusie worden de belangrijkste bevindingen kort aangehaald.

1 Literatuurstudie

1.1 Bacteriëmie

Een bloedstroominfectie (BSI) duidt op de aanwezigheid van micro-organismen in de bloedbaan en wordt bevestigd door een positieve bloedkweek. Indien bacteriën in het bloed aanwezig zijn, wordt gesproken van een bacteriëmie die naargelang de verblijfsperiode van het organisme in het bloed transiënt, intermitterend of persistent is. Transiënte bacteriëmie treedt op sporadisch. Deze vorm van bacteriëmie verschijnt na handelingen of procedures in en op niet-steriele lichaamsoppervlakken en die geassocieerd zijn met slijmembraantrauma. Hiertoe behoren tandenpoetsen, flossen, tandextracties, gastro-intestinale biopsies of percutane katheterisatie van het vasculair systeem of de blaas (Seifert, 2009; Viscoli, 2016).

Intermittente bacteriëmie duidt op de periodieke aanwezigheid van éénzelfde bacterie en wordt geassocieerd met onvolledige drainage van abscessen gelegen in de buikholte, infecties van de huid en het onderliggende zachte weefsel, focale infecties, pneumonie en spondylodiscitis (Seifert, 2009). Persistente bacteriëmie wordt gekenmerkt door de volhardende aanwezigheid van bacteriën in het bloed en wordt waargenomen bij patiënten opgenomen in het ziekenhuis. Deze vorm van bacteriëmie is het gevolg van lokale infecties zoals urineweginfectie, endocarditis of pneumonie maar kan eveneens hiermee gepaard gaan of hierdoor gevolgd worden (Viscoli, 2016). Mensen met lage weerstand omwille van ouderdom of ziekte lopen het grootste risico op bloedstroominfecties. Onbehandeld kunnen deze infecties leiden tot sepsis en septische shock gevolgd door sterfte (Sciensano, z.d.).

1.2 Klinische manifestaties in persistente bacteriëmie

Bacteriëmie is een bacteriële infectie van de bloedbaan. Tegen deze infectie reageert het immuunsysteem systemisch. De immunoreactie die plaatsgrijpt is een systemische inflammatoire respons (SIRS) en omvat minstens twee tekenen: koorts ($>38^{\circ}\text{C}$) of hypothermie ($<36^{\circ}\text{C}$), tachycardie (hartslag >90 slagen per minuut), tachypneu (ademhaling >20 per minuut) en leukocytose (witte bloedcellen $>120 \times 10^9$ per mL bloed) of leukopenie (witte bloedcellen $<4 \times 10^9$ per mL bloed). De combinatie van SIRS én de infectie duiden op sepsis. Indien sepsis niet tijdig wordt aangepakt, evolueert het snel naar een ernstige sepsis die gekenmerkt wordt door oligurie, hypotensie, hypoxemie en acidose. Een aanhoudende ernstige hypotensie veroorzaakt hypoperfusie van hersenen en organen. Door de onvoldoende zuurstoftoevoer treedt orgaandysfunctie en -falen op. Deze shock kan leiden tot sterfte (Ellis & Ong, 2014; Patel et al., 2011).

1.3 Etiologie

Afhankelijk van de wijze waarop micro-organismen de bloedstroom zijn binnengedrongen, wordt een bloedstroominfectie gecategoriseerd als primair of secundair. Een primaire bloedbaaninfectie is het gevolg van rechtstreeks contact van micro-organismen met de bloedstroom, meestal veroorzaakt door katheterisatie, gebruik van invasieve hulpmiddelen of drugsinjectie. Een bloedbaaninfectie ten gevolge van een infectie elders in of op het lichaam zoals pneumonie, urineweg- of wondinfectie, infectie van de huid en onderliggend zacht weefsel, is secundair (Seifert, 2009).

Naargelang de omgeving waarin de patiënt zich bevindt en een bloedbaaninfectie heeft opgelopen, is deze infectie ziekenhuis-geassocieerd of community-acquired. Om hiertussen een onderscheid te maken, wordt gekeken naar de datum waarop het labo de bloedcultuur positief heeft bevestigd (bloedstroominfectiedatum) en de datum van het ziekenhuisopname of blootstelling aan ambulante zorg. Van zodra het aantal dagen tussen de twee data groter of gelijk is aan twee, is er sprake van een ziekenhuis-geassocieerde bloedstroominfectie oftewel hospital-associated bloodstream infection (HABSI). Naast opgenomen patiënten kan een HABSI dus ook voorkomen bij ambulante patiënten of patiënten die woonzorg krijgen. Als het verschil tussen de twee data kleiner is dan 48 uur, is er sprake van een community-acquired infectie oftewel non-hospital associated bloodstream infection (non-HABSI).

Wanneer vastgesteld is dat de bloedstroominfectie nosocomiaal is, wordt getracht te achterhalen of de infectie geassocieerd is met een centraal veneuze katheter of invasief hulpmiddel. Een centraal veneuze katheter is een infuus dat in een vene wordt gebracht en in een groot bloedvat of het hart eindigt. Deze katheters worden gebruikt voor toediening van medicatie, bloedafnames en hemodynamische bloedbeelden om behandelingen te evalueren. Indien het geïdentificeerde micro-organisme in hemocultuur identiek is aan dat op de centraal veneuze katheter, is er sprake van een confirmed central line-associated bloodstream infection (CLABSI). Dit geldt tevens voor overige katheters waarbij dan sprake is van catheter-related bloodstream infections (CRBSI). Indien er geen microbiologische bevestiging is maar wel een vermoeden dat de katheter de infectieoorzaak is, is er sprake van probable CLABSI. Test een hemocultuur positief op de aanwezigheid van micro-organismen maar niet ten gevolge van een infectie, dan wordt gekeken naar het moment van katheterisatie en de positieve vaststelling. Een katheterisatie die plaats heeft gevonden twee dagen voorafgaand aan een positieve hemocultuur, duidt op een possible CLABSI. Onder invasief hulpmiddel wordt verstaan intubatie en verblijfskatheter. Wanneer een positieve hemocultuur wordt bekomen na gebruik van een invasief hulpmiddel binnen 48 uur, wordt gesproken van een device-associated HABSI (Duysburgh, 2019). Een positieve hemocultuur kan ook het resultaat zijn van aseptische technieken bij bloedcollectie. In dat geval wordt er gesproken van pseudo-bacteriëmie (Laupland & Church, 2014).

1.4 Incidentie

Uit het rapport van Sciensano met betrekking tot de nationale hospital-wide nosocomiale bloedstroominfecties in 2022 (Mertens et al., 2022) blijkt dat centraal veneuze katheters de hoofdoorzaak waren. Hierna volgden urineweginfecties waarvan eveneens bevestigd is dat 86% katheter-gerelateerd was. Ook op de intensieve afdeling vormden centraal veneuze katheters de belangrijkste bron van bloedbaaninfecties met 38,7% gevolgd door pulmonaire infecties met 25,5% waarvan 32% geassocieerd was met een endotracheale tube (Vercruyce et al., 2023).

Daarnaast geeft de surveillance van nationale bloedbaaninfecties in België de meest frequent geïsoleerde micro-organismen in geval van een ziekenhuis-geassocieerd bloedbaaninfectie weer. Deze waren in 2022 *E. coli*, *S. aureus* en *K. pneumoniae* gevolgd door *E. faecium*, *E. faecalis* en *P. aeruginosa*. *S. epidermidis* en *S. aureus* zijn het meest gekweekt bij hospital-wide CLABSI en CRBSI. Ook in het geval van intensive care unit-geassocieerde

CLABSI en CRBSI wordt *S. epidermidis* veelvuldig teruggevonden als BSI veroorzakende micro-organisme, gevolgd door *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* en *C. albicans*. In 90% van alle HABSI wordt één soort micro-organisme geïsoleerd, in 10% meerdere (Vercruyce et al., 2023).

1.5 Pathogenese van bacteriëmie

Een bloedbaaninfectie wordt veroorzaakt door micro-organismen die al dan niet rechte de bloedstroom zijn binnengeraakt (Santella et al., 2020). Tijdens de verschillende fasen van een bacteriële infectieproces (opname, adhesie, invasie en infectie) worden bacteriën geconfronteerd met de verschillende verdedigingsmechanismen van de gastheer. Om deze te weerstaan en de bloedstroom te bereiken, zijn bacteriën in het bezit van virulentiefactoren. Dit zijn pathogene moleculen zoals enzymen, toxines en celwandstructuren die het infectieproces bevorderen (Ramachandran, 2014).

1.5.1 Opname van bacteriën via de portals of entry

Een eerste belangrijke portal of entry oftewel toegangsweg zijn slijmvliezen van het ademhalingsstelsel, urogenitaal stelsel of gastro-intestinaal stelsel waarlangs micro-organismen het lichaam kunnen binnentreden. Deze slijmvliezen vormen echter een eerste natuurlijke barrière tegen adhesie en invasie van pathogene kiemen. Ze vormen meerlagige epitheelcellen bedekt met slijm en secreteren antimicrobiële componenten ter bescherming van pathogenen. Bovendien wordt de buitenste laag epitheelcellen regelmatig vervangen door nieuwe waardoor kiemen mechanisch worden verwijderd. Ook peristaltiek, blaaslediging en cilia in de luchtwegen behoren tot het mechanische verdedigingsmechanisme van de gastheer tegen vreemde kiemen.

Daarnaast wordt het lichaam gekoloniseerd door micro-organismen die deel uitmaken van de normale flora. Deze residente kiemen treden in competitie met vreemde indringers door kolonisatieresistentie. De toegankelijkheid tot nutriënten en gastheerreceptoren wordt ontnomen en de omgevingsfactoren worden ongunstig gemaakt. In sommige gevallen raakt het microbiom verstoord en overheerst een (opportunistisch) pathogeen waardoor ziekte ontstaat. Een beschadigde huidbarrière ten gevolge van snede, wonde of katheterisatie vormt eveneens een toegangsweg tot het lichaam of rechtstreeks de bloedbaan (Carroll et al., 2016; Bush, 2022).

1.5.2 Bacteriële adhesie

Nadat micro-organismen het lichaam zijn binnengetrokken via de portals of entry vindt adhesie aan epitheelcellen plaats. Deze aanhechting kan op verschillende manieren gebeuren maar de meest voorkomende wijze is de receptor-ligand binding. Een receptor-ligand binding duidt op de interactie tussen het bacteriële ligand en de receptor op de gastheercel. Deze receptoren vormen een specifiek doelwit voor bacteriën en bestaan uit proteïnen, polysachariden, glycolipiden en glycoproteïnen. Tot de bacteriële adhesieliganden behoren structuren die multifunctioneel zijn zoals flagellen en kapsels. Veelal zijn bacteriën in het bezit van speciale oppervlaktemoleculen, de zogenoemde fimbriae en pili. Dit zijn haarachtige rechte aanhangsels die opgebouwd zijn uit één of meerdere soorten fibrillin- of pili-eiwitten met op het uiteinde adhesinen. Adhesinen zijn kleine eiwitten die instaan voor de eigenlijke adhesie aan epitheelcellen. Wanneer deze eiwitten een binding aangaan met specifieke koolhydraatstructuren van glycoproteïnen of -lipiden op de gastheercel, worden adhesinen als lectine beschouwd. Verder zijn bacteriën, na invasie, in staat zich te hechten aan componenten van de

extracellulaire matrix (ECM) zoals fibronectine, fibrine, collageen, proteoglycanen en heparine. Grampositieve bacteriën zoals stafylokokken dienen hiertoe eerst speciale oppervlakteproteïnen tot expressie te brengen, de zogeheten *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs). Deze moleculen functioneren als adhesinen en maken adhesie aan ECM moleculen mogelijk (di Martino, 2018; Wilson et al., 2002)

Daarenboven kunnen bacteriën zich hechten aan oppervlakken van materialen die in het lichaam al dan niet tijdelijk worden geplaatst zoals katheters en kunstmatige hartkleppen. Na adhesie aan deze materialen volgt binaire deling waardoor het oppervlak bedekt raakt met micro-organismen. Er ontstaat een gemeenschap van kiemen dat zichzelf omgeeft door een extracellulaire laag polysachariden, de glycocalix. De glycocalix vervult een rol in de instandhouding van de microbiële gemeenschap en biedt bescherming tegen fagocyten van de gastheer (Wilson et al., 2002; Carroll et al., 2016).

1.5.3 Bacteriële invasie

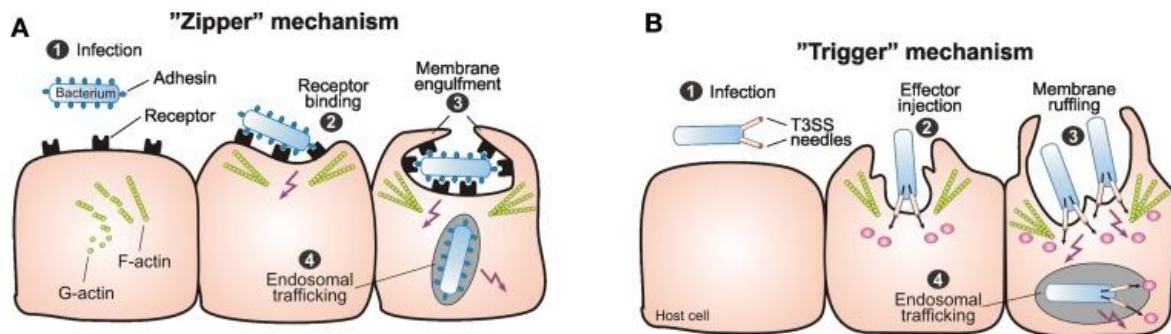
Na adhesie dringen pathogenen de epitheel- en endotheelcellen van de gastheer binnen. Deze invasie kan op twee manieren gebeuren: endocytose door cytoskeletwijziging of celschade door enzymen (Wilson et al., 2002). Tot de enzymen behoren onder andere hyaluronidase, coagulase en streptokinase. Hyaluronidase breekt hyaluronzuur af, een component die overvloedig aanwezig is in de ECM van bindweefsels. Samen met proteoglycanen vormt het grote structuren die instaan voor de structurele integriteit. Afbraak van hyaluronzuur bevordert dus het invasief proces. Hyaluronidase wordt geproduceerd door grampositieve bacteriën zoals *Streptococcus* en *Staphylococcus* species (Dicker et al., 2014).

Coagulase activeert protrombine en katalyseert de omzetting van fibrinogeen naar fibrine dat op zijn beurt bijdraagt aan de vorming van een bloedstolsel. Enkele *Staphylococcus* species zoals *S. aureus* produceren dit enzym als virulentiefactor. Het gevormde stolsel fungeert als een kapsel en beschermt de bacterie tegen het afweersysteem van de gastheer. Op die manier kunnen stafylokokken zich verder verspreiden en infecties zoals abscessen, bacteriëmie en endocarditis veroorzaken. Tot de coagulase-negatieve stafylokokken behoren onder andere *S. epidermidis* en *S. saprophyticus* (Patel et al., 2011).

Streptokinasen zijn enzymen die geproduceerd worden door groep A streptokokken. Deze enzymen zijn belangrijk in het invasief proces en de verspreiding van *S. pyogenes*. Streptokinase activeert plasminogeen dat wordt omgezet naar plasmine. De plasmine breekt fibrine af in stolsels waardoor het oplost en de bacterie zich verder kan verspreiden (McArthur et al., 2012). Streptokinase is één van de virulentiefactoren van *S. pyogenes* die naast milde infecties ook bijdraagt aan ernstige infecties zoals necrotiserende fasciitis en septische shock (Bläckberg et al., 2022).

Gastro-intestinale pathogenen invaderen gastheercellen vaak door wijzigingen aan te brengen in het cytoskelet van de cel. De meerderheid van deze bacteriën gebruikt hiervoor één van de twee mechanismen, het zipper of het trigger mechanisme (figuur 1). Het zipper mechanisme wordt in gang gezet door de binding van bacteriële oppervlakteproteïnen, zoals adhesinen en invasinen, aan gastheercelreceptoren waarna een endocytotische opname van de bacterie volgt. Het trigger mechanisme omvat bacteriële secretiesystemen die effectoreiwitten in de gastheercel injecteren. Deze eiwitten kapen vervolgens de celmachinerie en brengen wijzigingen aan in het

cytoskelet van de cel. Dit veroorzaakt membraanrimpeling oftewel *membrane ruffling* dat het invasief proces bevordert. Terwijl *Yersinia* species het zipper mechanisme gebruiken, invaderen *Salmonella* en *Shigella* species darmcellen via het trigger mechanisme (O Cróinín & Backert, 2012).



Figuur 1. Endocytotische opname van gastro-intestinale pathogenen via het zipper (A) of trigger (B) mechanisme. (O Cróinín & Backert, 2012).

1.6 De immunologische afweer tegen pathogenen

Bij een goede immuniteit vallen de aangeboren immuuncellen de invaderende kiem aan. Tot de eerstelijnsdefensie behoren onder andere C-reactief proteïne en complementsysteem. C-reactief proteïne is een acute fase-eiwit die tijdens infecties in grote hoeveelheden geproduceerd worden door levercellen. Deze eiwitten opsoniseren bacteriële antigenen voor een snelle herkenning door fagocyten en het complementsysteem (Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2014; van Engelen et al., 2018).

Het complementsysteem is een verzameling van eiwitten die in het serum circuleren als inactieve enzymen. Naargelang de soort trigger wordt een ander complementroute geactiveerd: klassiek, lectine of alternatief. De klassieke route treedt op wanneer het onderdeel C1q van de C1 proteïne bindt aan antigeen-antilichaam (IgG of IgM) complex, aan polyanionen zoals DNA en RNA uit apoptotische cellen of C-reactief proteïne. De alternatieve route wordt geactiveerd door herkenning van bacteriële oppervlaktestructuren zonder opsonisatie met antilichamen. De lectineroute start wanneer de mannose-lectine bindende complementeiwit bindt aan bacteriële mannose residu's. De drie complementroutes hebben dus elk een eigen trigger en start maar komen samen bij C3 convertase dat C3 proteïnen klieft in C3a, C5a en C3b. C3a en C5a zijn anafylatoxines doordat ze mestcellen activeren en de vasculaire permeabiliteit verhogen resulterend in een bloeddruk daling. Samen met C4a zijn deze eiwitten ook ontstekingsmediatoren die chemotaxis fagocyten aantrekken. C3b proteïnen opsoniseren pathogenen voor efficiënte herkenning door fagocyten en dragen bij tot de vorming van membrane attack complex dat bacteriën rechteerds doodt (Delves, 2024; Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2014). Een schematisch overzicht van de drie complementroutes is zichtbaar op figuur 2.

Geopsoniseerde bacteriën en ontstekingsmediatoren trekken neutrofielen en macrofagen aan. Deze aangeboren fagocyten bezitten speciale oppervlaktereceptoren, de zogeheten Pattern-Recognition Receptors (PRRs). Deze receptoren herkennen en binden Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) oftewel typische bacteriële

celwandstructuren zoals lipoteichoïnezuur in grampositieven, lipopolysachariden in gramnegatieven, peptidoglycaan en flagellen. De PAMP-PPR complex stimuleert fagocytose en activeert transcriptiefactoren voor de genexpressie van pro-inflammatoire cytokines IL-1 en IL-6 (stimuleren de lever voor de productie van acute-fase eiwit en induceren koorts), IL-8 (activatie en aantrekking van neutrofielen via chemotaxis), IL-12 (activatie en aantrekking van natural-killer cells) en TNF α (inductie koorts en celdood) (Zhang & An, 2007; Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2014; van Engelen et al., 2018). Deze cytokines zijn kleine eiwitten die een rol vervullen in de activering van het immuunrespons door activatie en aantrekking van andere immuuncellen en secretie van verdere cytokines. Ze worden geproduceerd door zowel aangeboren als verworven immuuncellen maar eveneens door endotheel- en epitheelcellen. Een vrijstelling van pro-inflammatoire cytokines gaat normaliter gelijktijdig gepaard met de afgifte van anti-inflammatoire cytokines (Kany et al., 2019; Zhang & An, 2007).

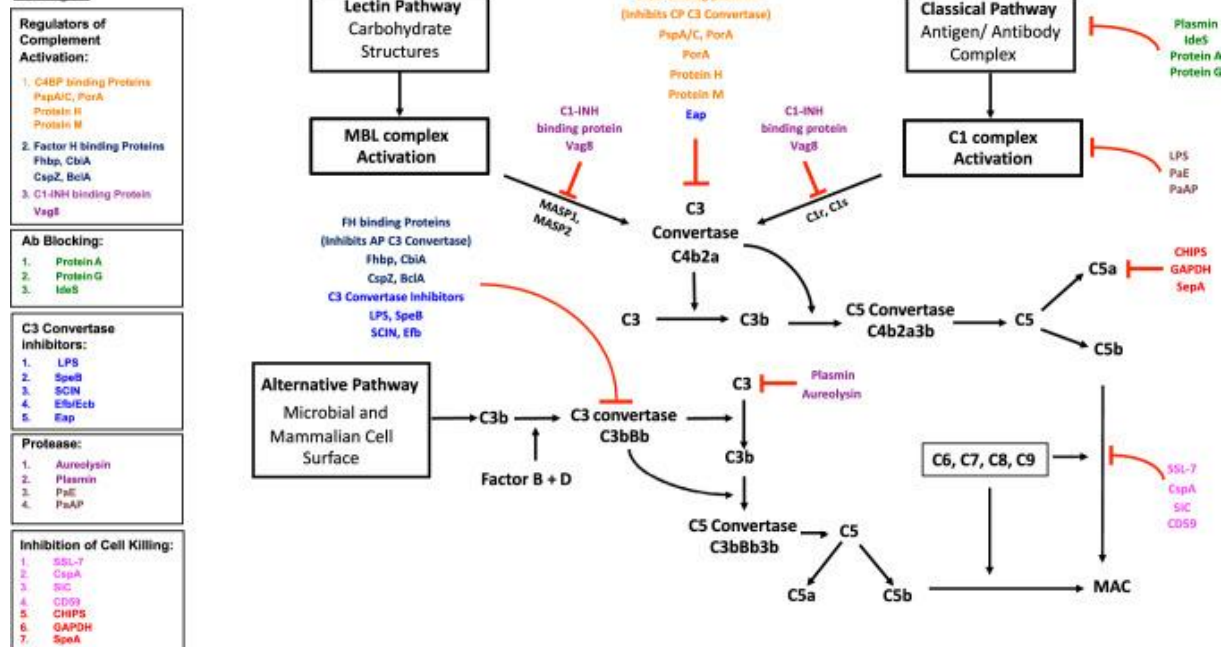
Bepaalde aangeboren immuuncellen hebben een belangrijke rol in de activatie van de adaptieve immuniteit, namelijk de macrofagen en dendritische cellen. Deze cellen zijn in het bezit van Major Histocompatibility Complex II (MHC-II) moleculen, speciale eiwitten die verteerde microbiële peptiden aan het celoppervlak presenteren. Het gevormde complex wordt herkend door Inflammatoire T-cellen (TH1) en T-helpercellen (TH2) door oppervlaktemoleculen die als co-receptor fungeren, de cluster of differentiation 4. Deze herkenning leidt tot een binding tussen de T-celreceptoren en het MHC-II-peptide complex en activeert uiteindelijk de cellulaire en humorale immuniteit. TH1-cellen produceren interferon-gamma dat macrofagen aanzet tot het doden van microbe-bevattende fagosoom door fusie met lysosomen. Verder secreteren ze cytokines die het beenmerg stimuleren tot macrofaagproductie en de endotheelcellen aanzetten tot expressie van adhesiemoleculen voor fagocyten. Ook worden chemokines geproduceerd als chemotaxis voor macrofagen tot de infectieplek (Alberts et al, 2002; Janeway et al., 2001). TH2-cellen zetten B-cellen aan tot antilichaamproductie die gericht is tegen extracellulaire pathogenen. De antilichamen helpen in de eliminatie van bacteriën door antigeenneutralisatie, pathogeenopsonisatie en complementactivatie (Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2014). Patiënten met neutropenie, een falend complementsysteem door aangeboren complementafwijking of nefrotisch syndroom, immunosuppressieve therapieën en AIDS zijn immuungecompromitteerd en lopen het grootste risico op bacteriëmie gevolgd door septicemie (Ellis & Ong, 2014).

1.6.1 Virulentiefactoren in de ontwikkeling van het immuunsysteem

1.6.1.1 Complement evasie

Naargelang de bacteriële virulentiefactoren zijn er verschillende strategieën om het complementsysteem af te weren (figuur 2). Een vaak toegepaste strategie is het gebruik van complement regulatorproteïnen, eiwitten die voorkomen dat het complementsysteem zich richt tot eigen cellen. Sommige bacteriën brengen oppervlakte-eiwitten tot expressie die interageren met één van de regulatoreiwitten (C1-INH, C4BP of factor H) en op die manier complementactivatie vermijden. Andere oppervlakteproteïnen zorgen voor een omgekeerde antilichaam-antigeen binding en verhinderen zo antilichaam-gemedieerde complementactivatie oftewel de klassieke complementroute. Verder kunnen bacteriën C3 convertase inhibitoren produceren. Dit zijn eiwitten op gramnegatieve bacteriële celwandstructuren zoals lipopolysachariden die de activiteit van C3 convertase inhiberen.

Complement Evasion Strategies

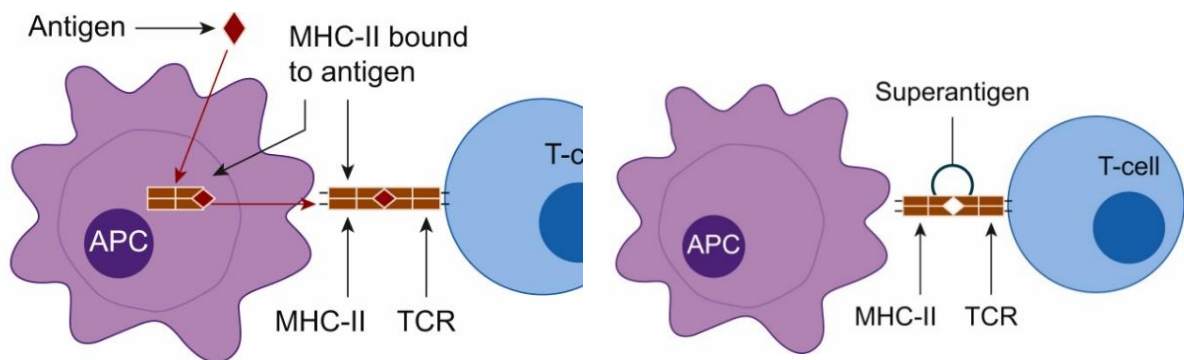


1.6.1.2 Toxines: endotoxines en superantigenen met het effect op immuunrespons

Endotoxines zijn onderdelen van de buitenste membraan van de celwand van gramnegatieve bacteriën. De buitenste membraan bestaat uit onder andere lipopolysacharide (LPS) dat op zijn beurt de componenten lipide-A, kernpolysachariden en O-antigenen omvat. Het onderdeel lipide-A is verantwoordelijk voor de toxische eigenschappen van LPS. Aangezien het onderdeel is van de bacteriële celwand, wordt dit endotoxine enkel vrijgesteld tijdens binaire fisie of bacteriële celdood door het immuunsysteem of antibioticatherapie (Ellis & Ong, 2014). De vrijgekomen LPS wordt herkend door receptoren op lipopolysacharide-bindende proteïnen (LBP). LBP zijn acute-fase eiwitten van het aangeboren immuunsysteem. Ze circuleren in lage concentraties in plasma maar stijgen snel tijdens een acute-fase respons. Na binding presenteert LBP de LPS aan de CD14 co-receptoren op macrofagen. CD14 brengt vervolgens de LPS over naar myeloïde differentiatie proteïne 2 (MD2) waarna dit LPS-MD2 complex zich associeert met TLR4. TLR4 herkent de LPS en wordt geactiveerd wat leidt tot een intracellulaire reactiecascade in macrofagen. Het resultaat is een vrijstelling van pro-inflammatoire cytokines. Lipoteichoïnezuur

in grampositieve bacteriën en de gemeenschappelijke celwandstructuur peptidoglycaan geven een gelijkaardige immuunreactie (Ramachandran, 2014; Ellis & Ong, 2014).

Superantigenen zijn exotoxines, eiwitten die gesecreteerd worden door zowel gramnegatieve als -positieve bacteriën. Bacteriën die hiertoe in staat zijn veroorzaken immense immuunreacties. Superantigenen hechten zich aan de MHC II moleculen op APC en T-cell receptor (TCR) op T-lymfocyten en vormen als het ware een brug die deze immuuncellen samenbindt (figuur 3). Deze binding stimuleert de lymfocyt tot een continue cytokineproductie. Dit activeert en trekt fagocyten aan die op hun beurt verschillende pro-inflammatoire cytokines produceren. Deze overproductie resulteert in koorts, hypotensie ten gevolge van vasodilatatie en uiteindelijk shock (Ellis & Ong, 2014; Sheehan et al., 2022).



Figuur 3. Rechts de normale antigeenpresentatie van antigeenpresenterende cel (APC) aan T-cel. Het antigeen wordt gepresenteerd op de MHC-II molecule van de APC aan de TCR van de T-cel. Links het superantigeen dat de MHC-II molecule en TCR met elkaar contact laat maken van buitenaf. (Ellis & Ong, 2014).

1.7 Antibacteriële therapie in bacteriëmie

Omwille van de hoge morbiditeit en mortaliteit van bloedbaaninfecties en septicemie (Seifert, 2009) is het noodzakelijk een empirisch breedspectrum antimicrobiële behandeling te starten (van kasteren et al., 1999). Dit houdt in dat een antibiotische behandeling wordt opgestart tegen een breed spectrum aan micro-organismen zolang de pathogeen en de gevoeligheid ongekend zijn. Deze therapie laat toe de infectie te behandelen in afwachting van microbiologisch laboresultaten en de mortaliteit te verlagen maar veroorzaakt tevens schade bij ongeschikte keuze (Melandar et al, 2018). Eén van de meest zorgwekkende gevolgen van ongepaste breedspectrum antibioticatherapie is antimicrobiële resistentie. Dit is de ongevoeligheid van een micro-organisme aan één of meerdere antimicrobiële stoffen en wordt veroorzaakt door langdurig gebruik en lage doseringen. Doseringen lager dan de minimale inhibitorische concentratie, oftewel de laagste concentratie aan een antimicrobiële stof die groei van een micro-organisme na overnacht incubatie inhibeert, tasten de gevoelige darmflora aan zonder de mogelijks aanwezige pathogenen af te remmen. Deze kiemen krijgen dan de mogelijkheid om enerzijds te koloniseren en anderzijds resistent te worden. De twee algemene mechanismen waarop resistentie verworven wordt, zijn spontane mutaties of horizontale gentransfer (Sciensano, z.d.; Čižman & Srovin, 2018).

Daarnaast leggen steeds meer studies de nadruk op de langdurige en nadelige gevolgen van overbodig en foutief gebruik van breedspectrum antibiotica op het humane darmmicrobioom dat een essentiële rol vervult in metabolisme, kolonieresistentie en de ontwikkeling van het immuunsysteem in jonge kinderen. Ongepaste antibioticatherapie kan leiden tot een verstoorde darmflora die geassocieerd is met verhoogde vatbaarheid voor darminfecties met onder andere *C. difficile*, metabolische stoornissen zoals obesitas en diabetes, prikkelbare darmsyndroom en allergieën (Paharaik et al., 2017; Melandar et al, 2018). Om deze redenen is het belangrijk de antibiotische therapie te versmallen zodra uit microbiologisch onderzoek de identiteit van de pathogeen gekend is (van kasteren et al., 1999).

2 Casusbespreking

2.1 De routine van positieve hemoculturen

De microbiologische diagnostiek van septicemie start bij de verzameling van hemocultuurflessen. Per volwassen patiënt met koorts en tekenen van septicemie worden minstens twee en maximaal drie sets afgenomen waarbij één set een aerobe en een anaerobe fles omvat. Deze afnames gebeuren voor de opstart van antibioticatherapie gezien deze anders mogelijks negatief zijn. Antibiotica hebben immers een bacteriocide of -statische werking. In de aerobe flessen van het type BacT/Alert® 3D FA Plus (BioMérieux) groeien aerobe en facultatief anaerobe kiemen. De anaerobe flessen van het type BacT/Alert® 3D SN (BioMérieux) laten de kweek van strikt anaeroben toe. In dit flestype kunnen ook facultatief anaeroben en aeroben groeien. Bij kinderen met septicemie wordt één pediatrische fles van het type BacT/Alert® PF (BioMérieux) afgenomen. Bij de afname van hemocultuurflessen dient rekening gehouden te worden met het bloedvolume. Bij de flestypen BacT/Alert® 3D FA Plus en BacT/Alert® 3D SN bedraagt dit 10 mL. Bij het flestype BacT/Alert® PF bedraagt dit 4 mL. Een groter volume kan leiden tot vals positieve hemoculturen doordat er meer bloedcellen aanwezig zijn die CO₂ produceren.

De afgenomen hemocultuurflessen worden in de broedstoof BacT/Alert 3D™ (BioMérieux) geplaatst bij 35°C voor maximaal 5 dagen. Flessen waarin micro-organismen zijn gedetecteerd, worden verwerkt voor isolatie, identificatie en antibioticagevoeligheidsbepaling van de kiem. Hiertoe wordt gestart met het overenten van de hemocultuur op Trypticase Soy Agar II (TSA) platen met 5% schapebloed (Becton Dickinson) en het maken van een gramkleuring met de Aerospray gram series 2. In de massieve zone van beide bloedplaten wordt een antibioticumschijfje geplaatst. Voor de aerobe bloedplaat is dit chloramfenicol 30 µg (c30) ter uitsluiting van fungemie. Voor de anaerobe bloedplaat is dit een kanamycine 500 µg (KA500). Dit antibioticumschijfje wordt gebruikt om de aanwezigheid van strikt anaerobe gramnegatieve kiemen te onderscheiden van facultatief anaerobe en aerobe kiemen gezien ook deze groeien in de anaerobe BacT/Alert® 3D SN fles. De platen worden in de namiddag reeds gecontroleerd op groei. Indien er geen groei is, wordt de plaat teruggezet en nagekeken de volgende ochtend.

Trypticase Soy Agar II platen met 5% schapebloed zijn aselectieve bloedagarplaten die gebruikt worden voor de isolatie en groei van bacteriën uit klinische monsters. Een bloedagarplaat is differentieel voor hemolytische eigenschappen door de verrijking met schapebloed. Bacteriën die het bloed volledig afbreken zijn bèta-hemolytisch en herkenbaar aan de heldere zones rondom de kolonies. Alfa-hemolyse duidt op een gedeeltelijke bloedafbraak en is herkenbaar aan groengrijze zones rondom de kolonies. Gamma-hemolytische kiemen zijn niet-hemolytische bacteriën. De zone rondom deze kolonies hebben de kleur van de bloedplaat (Lammert, 2007).

Tijdens microscopie van de gramkleuring worden de morfologie en gramaffiniteit van de kiem onderzocht. Naargelang het resultaat worden ook andere voedingsbodems geënt. De temperatuur, de atmosfeer en incubatieperiode verschillen van plaat tot plaat maar de voedingsbodems worden dagelijks gecontroleerd op groei. Na isolatie gebeurt de identificatie met Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker) en de bepaling van antibioticagevoeligheid met VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux). Wanneer hemoculturen in de loop van de dag positief worden gevestigd, wordt een

rechtstreeks manueel antibiogram ingezet volgens de schijfjes-diffusie methode op een bloedagarplaat. Na incubatie wordt vanuit deze plaat een antibiogram op VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) ingezet.

2.1.1 Principe BacT/Alert 3D™ BioMérieux

Het principe van dit detectiesysteem is gebaseerd op de colorimetrische bepaling van CO₂. De hemocultuurflessen bevatten tryptische sojabouillon die verrijkt is met aminozuren en carbohydraten. Micro-organismen die aanwezig zijn in een steriel lichaamsvocht verbruiken deze nutriënten om te groeien en produceren CO₂ als metabooliet. Om het geproduceerde CO₂ te detecteren, is de bodem voorzien van een CO₂-gevoelige sensor. De sensor en het medium zijn van elkaar gescheiden door een semipermeabele membraan dat doordrenkt is met waterdamp en enkel permeabel is voor CO₂. Het geproduceerde koolstofdioxide diffundeert doorheen het membraan en lost op met de waterdamp in de sensor. Het zwakke zuur diwaterstofcarbonaat wordt gevormd en dissocieert onmiddellijk in waterstof- en waterstofcarbonationen. De waterstofionen veroorzaken een pH-daling waardoor de sensor gradueel van donkergroen naar geel verkleurt. Bij deze kleuromslag wordt het rood licht, dat tijdens de incubatie continu geëmitteerd wordt op de sensor, weerkaatst op de rood-licht absorberende fotodiode. Deze diode produceert een elektrisch signaal dat recht evenredig is met het weerkaatste licht en dus de bacteriële CO₂-productie. Wanneer groei gedetecteerd is, kan een lijst van positief gevestigde hemocultuurflessen opgevraagd worden. Op dat moment worden de indicatorlichten van alle lades en cellen waarin positieve hemoculturen zich bevinden groen. De flessen worden ontladen en verwerkt voor isolatie, identificatie en antibioticumgevoeligheidsbepaling van het micro-organisme (BioMérieux, 2010; Thorpe et al., 1990).

2.1.1.1 Kwaliteitscontrole BacT/Alert 3D™ BioMérieux

De kwaliteitscontrole (QC) van de BacT/Alert 3D™ wordt uitgevoerd door de firma BioMérieux bij een nieuwe generatie aan flessen. Hiertoe wordt een 0,5 McFarland bacteriële suspensie in Tryptic Soy Broth (TSB) gemaakt vanuit een 18-24 uur oude kweek op vaste cultuurmedium. Vanuit deze suspensie wordt een drievoudige seriële verdunningsreeks bereid in TSB. De eerste twee verdunningen zijn 1:100 en worden gemaakt door 0,5 mL uit de vorige suspensie in een 9,5 mL TSB over te brengen. De derde verdunning is 1:10 en wordt verkregen door 1 mL uit de tweede verdunning te pipetteren in 9,0 mL TSB. Vanuit deze verdunning wordt 0,4 mL overgebracht in een aerobe en anaerobe hemocultuurfles met 1 tot 2 mL vers humaan bloed waarna de flessen geïncubeerd worden in de BacT/Alert 3D™. Aerobe kiemen dienen positief gevestigd te worden binnen 48 uur en anaerobe kiemen binnen 72 uur (BioMérieux, 2010).

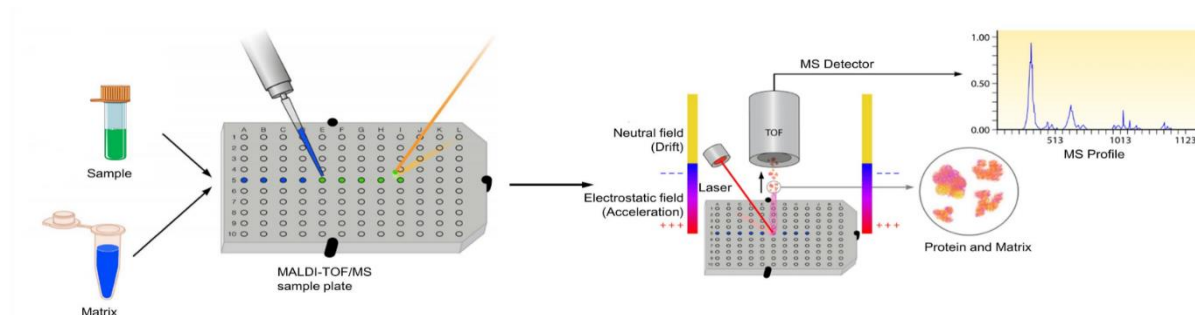
2.1.2 Principe Aerospray gram series 2

De Aerospray gram series 2 is een toestel dat gramkleuringen automatiseert. De preparaten worden in een 12-slide carousel geplaatst waarna de kleuring kan starten. Het principe van deze geautomatiseerde gramkleuring is hetzelfde als de manuele. De eerste stap in het gramkleuringsproces bestaat uit een methanolfixatie van de gemaakte uitstrijkjes. Dit voorkomt dat het staal, en dus de micro-organismen, worden weggespoeld tijdens het kleuringsproces. Nadien volgt de eigenlijke kleuring waarbij gestart wordt met kristalviolet. Deze kleurstof penetreert de celwand van zowel gramnegatieven als -positieven waardoor initieel alle micro-organismen paars

kleuren. Deze paarse kleur wordt verankerd in de microbiële celwanden door bespraying met jodine. Iodine complexeert kristalviolet en verhindert dat de paarse kleur verdwijnt tijdens de ontkleuring. De ontkleuring gebeurt met aceton en is noodzakelijk in de onderscheiding tussen gramnegatieven en -positieven. In tegenstelling tot grampositieven, is een gramnegatieve celwand opgebouwd uit slechts enkele lagen peptidoglycaan die daarenboven omgeven zijn door een buitenste membraan. Dit membraan bestaat uit lipopolysachariden en wordt volledig opgelost in contact met aceton. De dunne laag paarsgekleurde peptidoglycaan komt tevoorschijn maar krimpt in en verdwijnt als het ware waardoor deze micro-organismen de paarse kleur verliezen. De grampositieve peptidoglycaanlaag krimpt eveneens in maar blijft bestaan omwille van de meerdere lagen. Deze micro-organismen behouden de paarse kleur. Voor de visualisatie van gramnegatieve bacteriën wordt een tegenkleuring uitgevoerd met de rode kleurstof safranine. Deze micro-organismen kleuren bijgevolg roos. De gramgekleurde preparaten worden in enkele seconden gedroogd door het hoge toerental van de carrousel (De Deyn, 2020; Tripathi & Sapra, 2024).

2.1.3 Principe MALDI-TOF MS Bruker

Het principe is gebaseerd op massaspectrometrie, een analytische techniek waarbij biomoleculen geïoniseerd worden tot geladen molecuuldeeltjes die vervolgens van elkaar gescheiden worden op basis van massa-lading verhouding. Hiertoe wordt een kolonie op de monsterspot van de targetplaat aangebracht en bedekt met de UV-absorberende matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. Deze organische matrix sluit het monster in en kristalliseert waarna het precipitaat kort bestraald wordt met een laser. De matrix absorbeert de hoogenergetische straling waarna het verdampt, ioniseert en protonen overdraagt aan het ingesloten monster. Vervolgens worden de gevormde ionen versneld in een elektrisch veld waarna ze terechtkomen in een Time Of Flight analyzer (vacuümbuis met op het einde een detector) en gescheiden worden op basis van de massa-lading verhouding (figuur 4). Hoe groter deze ratio, hoe meer tijd nodig is om de detector te bereiken. Het resultaat is een eiwitspectrum van een bepaald micro-organisme waarvan de identiteit achterhaald wordt door te vergelijken met gekende referentiespectra uit de databank (Creative Proteomics, 2024, z.d.).



Figuur 4. Het proces van de MALDI-TOF MS. (Creative Proteomics, z.d.).

2.1.4 Principe VITEK 2 Compact Systeem BioMérieux

Het VITEK 2 Compact Systeem van BioMérieux is een systeem dat op een geautomatiseerde en gestandaardiseerde wijze de identificatie en antibioticumgevoeligheid van de meest voorkomende grampositieve en -negatieve bacteriën, alsook gisten, bepaalt. De daarbij horende testkaarten zijn samengesteld uit 64 transparante meetcellen. Afhankelijk van de type testkaart, identificatiekaart of antibiotic susceptibility (AST)

kaart, zijn deze cellen gevuld met biochemische substraten of verschillende antibioticaconcentraties. Voor de juiste kaartkeuze wordt gekeken naar de uit te voeren analyse en de te onderzoeken kiem. Zo worden GN-identificatiekaarten gebruikt voor de identiteitsbepaling van gramnegatieve bacillen terwijl grampositieve kiemen geïdentificeerd worden met GP-kaarten. Groei in de meetcellen van deze kaarten uit zich in kleurontwikkeling. Naargelang het biochemische kenmerk dat getest wordt met al dan niet een kleurontwikkeling, gebeurt de groeimeting colorimetrisch bij verschillende golflengtes van het zichtbaar licht. Het eindresultaat is een combinatie van positieve en negatieve reacties die omgezet worden in een bionummer dat vergeleken wordt met gegevens uit de databank van de VITEK 2 Compact Systeem. Op basis van de overeenkomsten wordt met zo'n groot mogelijke waarschijnlijkheid de meest overeenstemmende genus en species gegeven.

De antibioticumgevoeligheidsbepaling gebeurt door middel van AST-kaarten die andere antibiotica bevatten naargelang de soort kiem. Zo is de AST-N366 kaart van toepassing op gramnegatieve bacillen terwijl dit voor stafylokokken, enterokokken, strepto- en pneumokokken respectievelijk AST-P652, AST-P655 en AST-ST03 zijn. De gevoeligheid aan verschillende antibioticaconcentraties in de meetcellen van deze kaarten worden turbidimetrisch opgevolgd en vergeleken met de antibioticumvrije controlecel. Uit de verkregen resultaten voor elk getest antibioticum wordt de minimale inhibitorische concentratie (MIC) van de onderzochte kiem bepaald.

De kaarten worden geplaatst in buisjes met 0,5 tot en met maximaal 0,63 McFarland suspensie, bestaande uit saline en kolonies van de te onderzoeken kiem. Om een McFarland te genereren die in dit bereik ligt, wordt gebruik gemaakt van de Densichek Plus™ (BioMérieux). Dit toestel meet de turbiditeit van de suspensie bij 580 nm. Hoe troebeler de suspensie, hoe groter de lichtverstrooiing en de gegenereerde McFarland. De rek gevuld met de buisjes wordt dan geladen in het vulstation van de VITEK waar de suspensie wordt opgezogen en terecht komt in de meetcellen. Hierna wordt de rek overgebracht naar het laadstation waarachter zich het optisch systeem en de incubator met het transportsysteem bevinden. In dit deel van de VITEK 2 Compact Systeem worden de testkaarten geïncubeerd bij 35,5°C en om de 15 minuten optisch gemeten voor groei (De Deyn, 2020; BioMérieux, 2008).

2.1.4.1 Kwaliteitscontrole VITEK 2 Compact Systeem BioMérieux

De QC van identificatie- en antibioticumgevoeligheidstesten op de VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) wordt maandelijks uitgevoerd met American Type Culture Collection (ATCC) stammen (MicroBioLogics). ATCC-stammen zijn kiemen met gekende identiteit en gevoeligheid aan de meest relevante antibiotica. Ze worden geleverd in het KWIK-STIK systeem, een tweeledige huls met een wisser. In het gedeelte boven de wisser is een hydratatie ampul aanwezig terwijl onderaan de wisser zich een gevriesdroogd ATCC-stam in de vorm van een pellet bevindt. Alvorens de kwaliteitscontrole uit te voeren dient de stam in kweek gebracht te worden. Hiertoe wordt de pellet bevochtigd met de hydratatievloeistof uit de ampul zodat een suspensie ontstaat dat grondig gehomogeniseerd dient te worden. Door het omzwinken raakt de wisser doordrenkt met de oplossing waarna het materiaal in een rollende beweging aangebracht kan worden op een stuk randoppervlakte van de bloedplaat. Van hieruit wordt met behulp van een steriel entnaald de volledige plaat geënt via de verdunningsenting. De bloedplaat wordt geïncubeerd bij 35°C in 5% CO₂ gedurende 18 tot 24 uur.

De gekweekte ATCC-kiemen worden op een aseptische wijze bewaard op pareltjes in MicroBank™ buisjes. Tijdens de QC wordt voor elke te testen ATCC-stam een parel genomen uit de tube en geïncubeerd in TSB bij 35°C gedurende 18 tot 24 uur in 5% CO₂. Deze TSB wordt dan overgeënt op een bloedplaat en geïncubeerd gedurende bij 35°C gedurende 18 tot 24 uur in 5% CO₂. Vanuit deze plaat wordt vervolgens een kolonie aangetikt en overgeënt op een nieuwe bloedplaat die geïncubeerd wordt bij 35°C gedurende 18 tot 24 uur in 5% CO₂. Vanuit deze plaat wordt de QC van de identiteits- en antibiogrambepalingen uitgevoerd. De parels met ATCC-kiemen *S. pneumoniae* en *H. influenza* worden niet geïncubeerd in TSB maar rechtstreeks uitgerold over een randoppervlakte van respectievelijk de bloedplaat of chocolade agarplaat met een bacitracineschijfje. Dit omdat deze bacteriën niet of zeer moeilijk in TSB groeien. Nadat de suspensie gelijkmatig is verdeeld over een stuk oppervlakte, wordt het aangebrachte materiaal over de volledige plaat uitgestreken via de verdunningsenting. Vanuit de laatst geënte platen wordt de QC van identificatie- en antibioticumgevoeligheidstesten uitgevoerd. Het inzetten van deze testen op de VITEK® 2 Compact Systeem gebeurt op dezelfde wijze als kiemen van routinekweken (De Deyn, 2022).

2.1.4.2 Kwaliteitscontrole Densichek™ Plus BioMérieux

Wekelijks wordt een kwaliteitscontrole van de Densichek™ Plus (BioMérieux) uitgevoerd gebruik makend van de daarbij horende Densichek Calibration Standards. Dit zijn 4 standaarden met McFarlands 0,0; 0,5; 2,0 en 3,0 in glazen buisjes. Elke standaard wordt gemeten, startend met 0,0 McFarland. Hiertoe wordt het toestel ingesteld op 'Glass' en de buitenkant van de buis gereinigd met papier. De standaard dient gehomogeniseerd te worden door enkele keren te zwenken waarna de tube in de meetopening wordt geplaatst. Voor deze eerste meting wordt gedrukt op 'Zero'. Tijdens de meting dient de tube 360° omwenteld te worden. De gegeneerde McFarland voor deze standaard moet 0,00 bedragen. Hierna worden de volgende standaarden op dezelfde wijze gemeten, behalve dat er niets ingedrukt moet worden. De acceptabele bereiken van McFarland standaarden 0,0; 0,5; 2,0 en 3,0 dienen respectievelijk binnen 0,44 - 0,56; 1,85 - 2,15 en 2,79 - 3,21 te liggen (De Deyn, 2020).

2.1.5 Principe manuele antibioticagevoeligheidsbepaling

Bij de manuele antibioticumgevoeligheidsbepaling wordt de gevoeligheid voor een micro-organisme aan antibiotica bepaald door middel van antibioticumschijfjes, de schijfjes-diffusie test. Deze test wordt uitgevoerd bij hemocultuurflessen die in de namiddag positief gevlagd zijn en kiemen zoals anaeroben en micro-aerofielen waarvoor antibioticakaarten niet van toepassing zijn.

De schijfjes-diffusie test wordt uitgevoerd op de aselectieve voedingsbodem Mueller Hinton, aangerijkt met 5% schapebloed als nutriënt voor kieskeurige bacteriën uit klinische stalen. De plaat wordt eerst confluent geënt uitgaande van drie bloeddruppels uit steriel spuit en naald. Daarna worden antibioticumschijfjes geplaatst en diffunderen de antibacteriële componenten in de agar. De schijfjeskeuze hangt af van de kiemsoort. Na incubatie wordt de diameter van de inhibitiezone rondom de schijfjes gemeten en vergeleken met de breekpunten voor de gevoeligheidscategorieën sensitief (S), intermediair (I) en resistent (R), die afhankelijk zijn van de kiemsoort en het gebruikte antibioticumschijfje (De Deyn, 2020; Hudzicki, 2009). Voor de manuele bepaling van de minimale inhibitorische concentratie (MIC) wordt gebruik gemaakt van de E-test (BioMérieux). Een E-test is een strip met verschillende antibioticumconcentraties die centraal geplaatst wordt op een confluent geënte Mueller Hinton

plaat met 5% schapenbloed voor hemoculturen. De MIC wordt bepaald door de concentratie af te lezen waarbij het uiteinde van de opgeklaarde zone de strip raakt (BioMérieux, z.d.).

2.2 Positieve hemocultuur - *Salmonella* Enteritidis

2.2.1 Achtergrond en probleemstelling

Een 51-jarige man is opgenomen op de intensieve zorgen naar aanleiding van ernstige dehydratie en hypokaliëmie wegens diarree sinds 8 tot 10 dagen. Het laboratoriumonderzoek rapporteerde een sterk verhoogde CRP-waarde en een coprocultuur die op *Salmonella* wees. De man behoorde tot de risicogroep voor *Salmonella*-infecties omwille van een Mini-Gastric Bypass en leeftijd ouder dan 50 jaar. Deze tekenen en risicofactoren gaven het vermoeden van septicemie waarvoor hemocultuurflessen werden verzameld.

Een Mini-Gastric Bypass is een procedure waarbij een deel van de bovenste maag wordt afgesloten met behulp van nietjes waardoor een klein maagzakje ontstaat dat verbonden wordt met de dunne darm. Het voedsel dat ingenomen wordt komt op deze manier onmiddellijk terecht in de dunne darm. De oude maag en een groot deel van de dunne darm worden overbrugd waardoor de spijsvertering wordt verkort en er minder tijd is voor voedselopname. Deze ingreep wordt uitgevoerd bij patiënten met morbide obesitas waarbij niet-operatieve behandelingen faalden (Nijs, 2021).

Een kleine maagzak gaat gepaard met een verminderde maagzuurinhoud. Het maagzuur vervult echter een rol in de preventie van gastro-intestinale infecties door vernietiging van een groot deel opgenomen bacteriën. Bacteriën die de zure maaginhoud overleven komen terecht in het darmlumen en dringen intestinale M-cellen binnen die in contact staan met de immuuncellen. Vanuit deze cellen verspreiden bacteriën zich naar het lymfoïde weefsel in de darmwand en bereiken ze de bloedbaan. Een gastro-intestinale infectie met niet-tyfeuze *Salmonella* species gevolgd door bacteriëmie is zeldzaam maar een verhoogde kans bestaat bij mensen ouder dan 50 jaar, jonger dan 3 maanden, immuungecompromitteerden, afwijkingen aan de gal- en urinewegen etc. (Siddiqui et al., 2017; Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, 2022).

Een salmonellose is een voedselinfectie die gastro-enteritis veroorzaakt. Deze infectie is het gevolg van de consumptie van besmette dierlijke producten die onvoldoende verhit zijn. Bij de mens wordt salmonellose veroorzaakt door *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. Dit subtype wordt onderverdeeld in meer dan 2000 serotypes die bepaald worden op basis van antigeenspecificiteit. De meeste serotypes zijn niet-tyfeus en veroorzaken de gastro-intestinale klachten misselijkheid, braken, diarree, krampen en koorts die meestal spontaan na 4 tot 7 dagen verdwijnen. Tyfeuze *Salmonellae*, *S. Typhi* en *S. Paratyphi*, zijn invasief en veroorzaken naast deze klachten ook bacteriëmie. Een tyfeuze salmonellose treedt op na consumptie van water en voedingsmiddelen die gecontamineerd zijn met uitwerpselen van geïnfecteerde mensen (Sciensano, z.d.; Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, 2022).

2.2.2 Materiaal en methode

De positief gevlagde hemocultuurflessen werden ontladen uit de Bact/Alert 3D™ (BioMérieux). De doppen van de flessen werden ontsmet met antiseptische oplossing en doorprikt met steriele naald en spuit waarna 2 mL bloed werd opgezogen. Vanuit elke fles werd één bloeddruppel aangebracht op de overeenstemmende Trypticase Soy Agar II met 5% schapenbloed (Becton Dickinson) en microscoopglasje. De voedingsbodems werden uitgestreken via de verdunningsenting. Centraal in de massieve zone van de aerobe bloedplaat werd een chloramfenicol 30 µg schijfje geplaatst waarna de plaat geïncubeerd werd bij 35°C, omgevingsatmosfeer gedurende 24 uur. In het centrum van de massieve zone van de anaerobe bloedplaat werd een kanamycine 500 µg geplaatst. Deze bloedplaat werd in een anaerobe zakje gestoken en geïncubeerd bij 37°C voor 24 uur. De bloeddruppels op de microscoopglasjes werden in een trekbeweging uitgestreken met behulp van een uitstrijkglasje. De uitstrijkjes werden aan de lucht gedroogd en gramgekleurd met de Aerospray gram series 2. De gramaffiniteit en morfologie van de kiem werden microscopisch bestudeerd bij vergroting 10x100 met immersie olie.

In functie van het microscopisch resultaat werd een MacConkey plaat (Becton Dickinson) geënt via de verdunningsenting uitgaande van één bloeddruppel uit aerobe hemocultuurfles. Een MacConkey plaat is selectief voor gramnegatieven door kristalviolet en galzouten die grampositieven onderdrukken. Het medium is differentieel wegens lactose. Roze kolonies duiden op lactosefermentatie, kleurloze kolonies duiden op niet lactose fermenterende kiemen (Lammert, 2007). De MacConkey plaat werd geïncubeerd bij 35°C, omgevingsatmosfeer gedurende 24 uur.

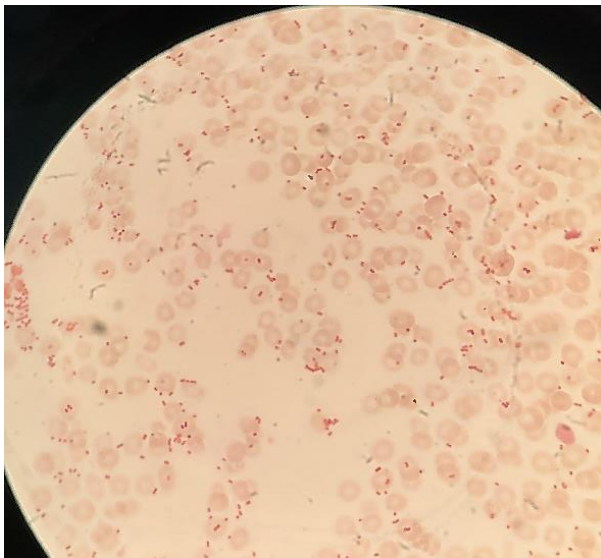
Vanwege het vermoeden van septicemie ten gevolge van salmonellose werd ook een *Salmonella Shigella* (SS) plaat (Becton Dickinson) geënt via de verdunningsenting met één bloeddruppel uit de aerobe hemocultuurfles. Een SS plaat is selectief voor gramnegatieven bacillen door galzout, briljant groen en natriumcitraat die de groei van grampositieven en coliformen inhiberen. Het onderscheid tussen *Salmonella* en *Shigella* en andere gramnegatieve bacillen wordt gemaakt op basis van lactosefermentatie. Kleurloze kolonies duiden op *Salmonella* en *Shigella* kiemen. Roze kolonies duiden op lactosefermentatie door andere gramnegatieve bacillen. Het onderscheid tussen *Salmonella* en *Shigella* wordt gemaakt op basis van thiosulfaatreductie. *Salmonella* reduceert thiosulfaat tot sulfietionen en waterstofsulfide dat met ijzerionen van ijzercitraat het zwarte neerslag ijzersulfide vormt. Kolonies met centraal een zwarte neerslag duiden op *Salmonella* kiemen terwijl kolonies zonder dit neerslag *Shigella* kiemen zijn (remel, 2010). De SS platen werd geïncubeerd bij 35°C, omgevingsatmosfeer gedurende 24 uur.

Na observatie van groei op de TSA-plaat met 5% schapenbloed en centraal in de massieve zone de chloramfenicol, werd vanuit deze bloedplaat een identificatie met MALDI-TOF MS (Bruker) uitgevoerd. Eén kolonie werd aangetikt en uitgesmeerd op de monsterspot van de targetplaat. Hieraan werd 1 µL UV-absorberende matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid toegevoegd waarna de plaat in de MALDI-TOF MS werd geplaatst. Na deze identificatie werd een identiteits- en antibiogrambepaling op VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) uitgevoerd. Er werden twee polystereenbuisjes genomen waarvan één werd gemerkt met een barcode. Het buisje zonder barcode werd gevuld met 3 mL steriele saline solution. Hierin werden kolonies van de te onderzoeken kiem, afkomstig van de

bloedplaat met chloramfenicol schijfje, opgelost gebruik makend van een steriele swab. Tijdens het oplossen werd enkele keren de McFarland gemeten door middel van de Densichek Plus™ (BioMérieux) tot deze tussen 0,50 en 0,63 lag. Vanuit deze suspensie werd vervolgens 145 µL overgebracht in het gemerkte buisje en een secondscreening uitgevoerd op een nieuwe bloedplaat. De antibiogrambepaling werd in deze suspensie uitgevoerd met de AST-N366 kaart. In het buisje zonder barcode werd de identificatie uitgevoerd met de GN-kaart. De buisjes met kaarten werden geladen in de VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) voor identificatie en antibiogrambepaling. De bloedplaat met secondscreening werd geïncubeerd bij 35°C, 5% CO₂, 24 uur. De *Salmonella* stam werd opgestuurd naar Sciensano voor de serotypering.

2.2.3 Resultaten en bespreking

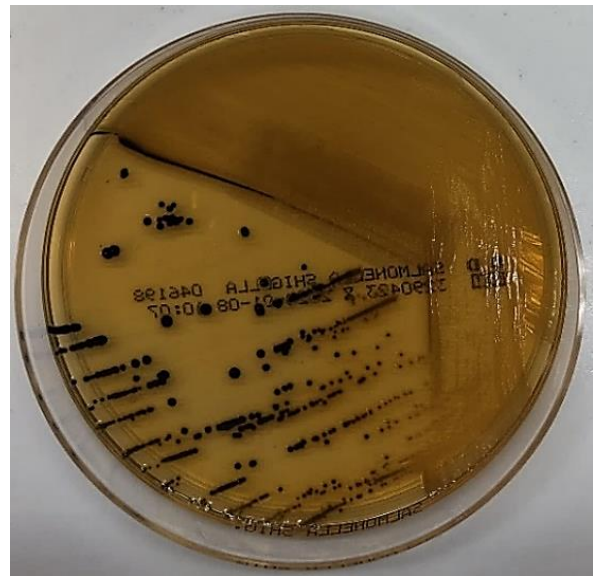
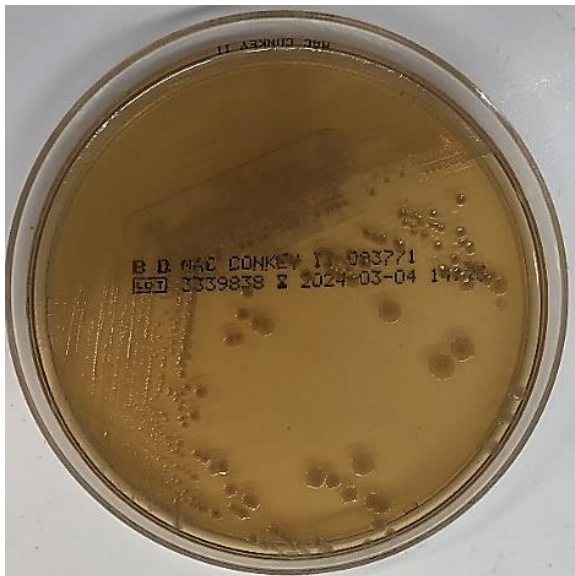
Zowel in de gramkleuring van de aerobe als anaerobe fles zijn bij vergroting 10x100 met immersie olie gramnegatieve bacillen te zien (figuur 5). Op de TSA-plaat met 5% schapenbloed en centraal in de massieve zone de chloramfenicol 30 µg is groei zichtbaar (figuur 6). De kolonies zijn grijs, rond, glad en gamma-hemolytisch. Rondom de chloramfenicol is een inhibitiezone aanwezig. Dit duidt op de gevoeligheid van de kiem aan het antibioticum. De afwezigheid van kolonies in deze zone en gisten in de gramkleuring duiden op de afwezigheid van gisten in de kweek. Dit resultaat werd verkregen na incubatie bij 35°C, omgevingsatmosfeer na 24 uur.



Figuur 5 (links). Gramkleuring vanuit aerobe fles. Gramnegatieve bacillen bij vergroting 10x100 met immersie olie (idem voor anaeroob). Figuur 6 (rechts). Verdunningsenting op bloedplaat vanuit aerobe fles. Grijs, ronde, gladde, gamma-hemolytische kolonies na incubatie bij 35°C, 5% CO₂ na 24 uur.

Figuur 7 is het resultaat van de verdunningsenting uitgaande van één bloeddruuppel uit de aerobe hemocultuurfles na incubatie bij 35°C, omgevingsatmosfeer na 24 uur. De gekweekte kiemen zijn kleurloos. Er heeft geen lactosefermentatie plaatsgevonden. Figuur 8 is het resultaat van de verdunningsenting van een bloeddruuppel uit de aerobe hemocultuurfles op een SS plaat. De kolonies zijn glad en transparant en hebben een zwart centrum. De afwezigheid van roze kolonies duidt op de afwezigheid van gramnegatieve lactose fermenterende kiemen. De kleurloze kolonies duiden dus op *Salmonella* of *Shigella* kiemen. De aanwezige zwarte neerslag is te verklaren

door de reductie van thiosulfaat tot sulfiet en waterstofsulfide die in aanwezigheid van ijzerionen uit ijzercitraat het zwarte complex ijzersulfide vormt. Deze eigenschap is kenmerkend voor *Salmonellae*.



Figuur 7 (links). Kleurloze, niet lactose fermenterende kolonies op MacConkey agar na incubatie bij 35°C, omgevingsatmosfeer gedurende 24 uur. Figuur 8 (Rechts). Transparante kolonies met neerslag in het centrum van de kolonies op een SS plaat na incubatie bij 35°C, omgevings-atmosfeer gedurende 24 uur.

Figuur 9 geeft de resultaten weer van de identiteitsbepaling met MALDI-TOF vanuit de bloedplaat met chloramfenicol schijfje. Op basis van de referentiespectra uit de databank van MALDI-TOF MS, komt het verkregen massaspectrum het meest overeen met een *Salmonella*. De scores zijn hoger dan 2 en wijzen op betrouwbare identificatie van de kiem. De species, subspecies en het serotype zijn niet identificeerbaar met de MALDI-TOF MS en staan bijgevolg tussen haakjes.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Salmonella sp (enteritidis) 25089078 (PX) MLD	2.41	590
2 (+++)	Salmonella sp (enterica st Anatum) 11 LAL	2.41	590
3 (+++)	Salmonella sp (enterica st Dublin) Sa05_188 VAB	2.33	590

Figuur 9. Resultaten identificatie met MALDI-TOF MS.

Figuur 10 geeft de resultaten van de identificatiebepaling met de GN-kaart op VITEK 2 Compact Systeem weer. De combinatie van de positieve en negatieve reactie is omgezet in het bionummer 0017610545166210 dat het meest overeenkomt met de reactieprofiel van *Salmonella enterica*. De serotypering in Sciensano leverde de serovars Enteritidis op.

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2412470103	Expires: Aug 31, 2024 13:00 CEST
	Status: Final	Analysis Time: 4.85 hours	
Organism Origin	VITEK 2		
Selected Organism	98% Probability	Salmonella group	
	Bionumber: 0017610545166210	Confidence: Excellent identification	
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Salmonella group			
Salmonella spp			
Salmonella ser.Paratyphi B			
Salmonella ser.Typhimurium			
Salmonella ser.Paratyphi C			
Salmonella ser.Enteritidis			
Salmonella enterica ssp enterica			
Analysis Messages:			
Confirm by serological tests			

Figuur 10. Resultaten identificatie met VITEK 2 Compact Systeem met GN-kaart.

Figuur 11 toont de resultaten van de geteste antibiotica met de AST-N366 kaart op VITEK 2 Compact Systeem voor de *Salmonella* kiem. Hieruit blijkt dat het micro-organisme gevoelig is aan de meeste geteste antibiotica met uitzondering ciprofloxacin waarvoor geen gevoeligheids categorie werd toegekend omdat het EUCAST breekpunt lager ligt dan het meetbereik van de antibiogramkaart. De MIC van de E-test met ciprofloxacin bedroeg 0,023 mg/L. Deze MIC is kleiner dan het opgestelde breekpunt voor gevoeligheid volgens EUCAST die 0,06 mg/L bedraagt. De *Salmonella* kiem is bijgevolg gevoelig aan ciprofloxacin. De patiënt werd gedurende 7 dagen behandeld met ceftriaxone.

Susceptibility Information	Card:	AST-N366	Lot Number:	8162657403	Expires:	Mar 6, 2025 12:00 CET
	Status:	Final	Analysis Time:	9.98 hours		

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Temocillin			Ertapenem	<= 0.12	S
Urine	<= 4	I	Meropenem		
Other	(-)	(-)	Meningitis	<= 0.25	S
Ampicillin	<= 2	S	Other	<= 0.25	S
Amoxicillin/Clavulanic Acid			Amikacin		
Urine	<= 2	S	Urine	<= 2	S
Other	<= 2	S	Other	<= 2	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Gentamicin		
Cefuroxime			Urine	<= 1	S
Cefuroxime Axetil			Other	<= 1	S
Cefotaxime			Ciprofloxacin	<= 0.25	
Meningitis	<= 0.25	S	Fosfomycin	<= 16	S
Other	<= 0.25	S	Nitrofurantoin		
Ceftazidime	0.25	S	Colistin	2	S
Cefepime	<= 0.12	S	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 20	S

Figuur 11. Resultaten antibiogrambepaling op VITEK 2 Compact Systeem met AST-N366 kaart.

2.2.4 Conclusie

De geïsoleerde kiem uit de bloedkweek is *Salmonella* Enteritidis. *S. Enteritidis* is gramnegatief, bacillair, negatief voor lactosefermentatie en positief voor H₂S productie. De bacteriëmie is secundair aan een niet-tyfeuze salmonellose. De bloedbaaninfectie is community-acquired.

2.3 Positieve hemocultuur - *Streptococcus dysgalactiae*

2.3.1 Achtergrond en probleemstelling

Een 84-jarige vrouw werd opgenomen via spoedgevallen wegens hoge koorts, kortademigheid en beenwonde. Bij huisbezoek van de huisarts was de patiënte in algemene slechte toestand met sinds enkele dagen een verminderde mobiliteit door beenwonde. In combinatie met roodheid, zwelling en pijn werd de diagnose cellulitis vastgesteld. Omwille van koorts werden hemocultuurflessen verzameld. De vrouw was risicopatiënt voor cellulitis wegens obesitas.

Cellulitis is een acute bacteriële huidinfectie die herkenbaar is aan roodheid, zwelling, warmte, gevoeligheid en blaarvorming van de geïnfecteerde huid. De infectie kan gepaard gaan met algemene malaise, koorts en vermoeidheid. Cellulitis treft voornamelijk de onderste ledematen en is in zeldzame gevallen bilateraal. De infectie wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door stafylokokken en streptokokken die de huid binnendringen via schaaf- en brandwonden, kleine snede of kloven. Risicofactoren voor cellulitis zijn huidaandoeningen zoals voetschimmel en eczema, verminderde bloedcirculatie door obesitas en verminderde weerstand omwille van chemotherapie of onderliggende chronische aandoeningen. Bij een niet-tijdige behandeling van cellulitis kunnen bacteriën de bloedbaan bereiken en ontstaat bacteriëmie. Bij de vaststelling van minsten twee criteria voor SIRS zoals hoge koorts, abnormale witte bloedcelformule, tachycardie en tachypneu wordt septicemie gediagnosticeerd. Ter bevestiging dienen bloedkweken te gebeuren. Onbehandeld kan cellulitis ook leiden tot osteomyelitis en endocarditis (Mayo Clinic Staff, 2022; Brown et al., 2023; NHS, 2024).

2.3.2 Materiaal en methoden

De positief gevlagde hemocultuurflessen werden ontladen uit de BacT/Alert 3D™ (BioMérieux). De flesdoppen werden ontsmet met antiseptische oplossing en doorprikt met steriele naald en spuit. 2 mL bloed werd opgezogen waarbij de eerste twee druppels verwijderd werden. Vanuit elke fles werd één bloeddruppel aangebracht op de overeenstemmende TSA-plaat met 5% schapenbloed (Becton Dickinson) en microscoopglasje. De voedingsbodems werden uitgestreken via de verdunningsenting en chloramfenicol 30 µg schijfjes werden centraal in de massieve zones geplaatst. De bloedplaten werd geïncubeerd bij temperatuur 35°C, atmosfeer 5% CO₂ gedurende 24 uur. De bloeddruppels op de microscoopglasjes werden in een trekbeweging uitgestreken met behulp van een uitstrijkglasje. De uitstrijkjes werden aan de lucht gedroogd en gramgekleurd met de Aerospray gram series 2. De gramaffiniteit en morfologie van de kiem werden microscopisch bestudeerd bij vergroting 10x100 met immersie olie.

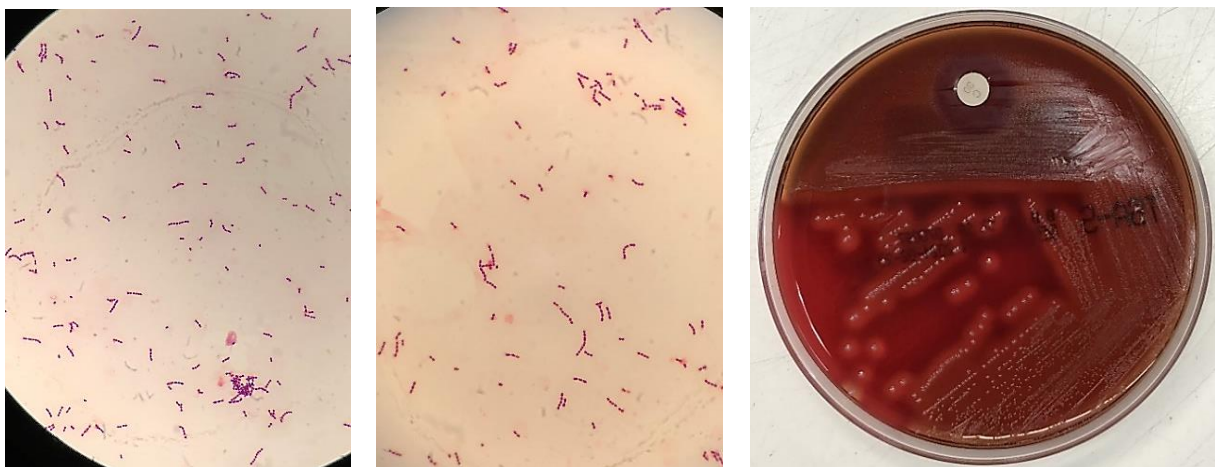
In functie van het microscopisch resultaat werd een enterokokken plaat (Becton Dickinson) en een tweede TSA-plaat met 5% schapenbloed (Becton Dickinson) geënt via de verdunningsenting uitgaande van één bloeddruppel uit de aerobe hemocultuurfles. In de massieve zone van de bloedplaat werd rechts een optochineschijfje geplaatst en links een bacitracine. Optichine maakt het onderscheid tussen de alfa-hemolytische *S. pneumoniae* en viridans streptokokken op basis optochinegevoeligheid. De aanwezigheid van alfa-hemolytische kolonies en een inhibitiezone rondom optochine duiden op *S. pneumoniae*. Viridans streptokokken groeien tot aan het schijfje. Bacitracine maakt het onderscheid tussen de bèta-hemolytische *S. pyogenes* en andere streptokokken

mogelijk op basis van bacitracinegevoeligheid. Een inhibitiezone duidt op *S. pyogenes*. Overige bèta-hemolytische streptokokken groeien tot aan bacitracine. Beide platen werden geïncubeerd bij 35°C, 5% CO₂ gedurende 24 uur.

Na een incubatieperiode van 24 uur werd vanuit de bloedplaat met chloramfenicol schijfje een identificatie uitgevoerd met de MALDI-TOF MS (Bruker). Eén kolonie werd aangetikt en aangebracht als een dunne film op de monsterspot van de targetplaat. Hieraan werd 1 µL UV-absorberende matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid toegevoegd waarna de plaat, na het drogen aan lucht, in de MALDI-TOF MS werd geplaatst. Na de betrouwbare identificatie en de observatie van één soort kiem in de gramkleuring, werd een antibiogram op VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) ingezet. Er werden twee polystereebuisjes genomen waarvan één gemerkt werd met een barcode. Het buisje zonder barcode werd gevuld met 3mL steriele saline solution. Hierin werden kolonies van de te onderzoeken kiem opgelost met behulp van een steriele swab. Tijdens het oplossen werd enkele keren de McFarland bepaald door middel van de Densitiek PlusTM (BioMérieux) tot deze tussen 0,50 en 0,63 lag. Vanuit deze suspensie werd 280 µL overgebracht in het polystereebuisje met barcode. In het polystereebuisje werd de antibiogramkaart AST-ST03 geplaatst. In het buisje zonder barcode werd de GP-kaart voor een betrouwbare identificatie op speciesniveau geplaatst.

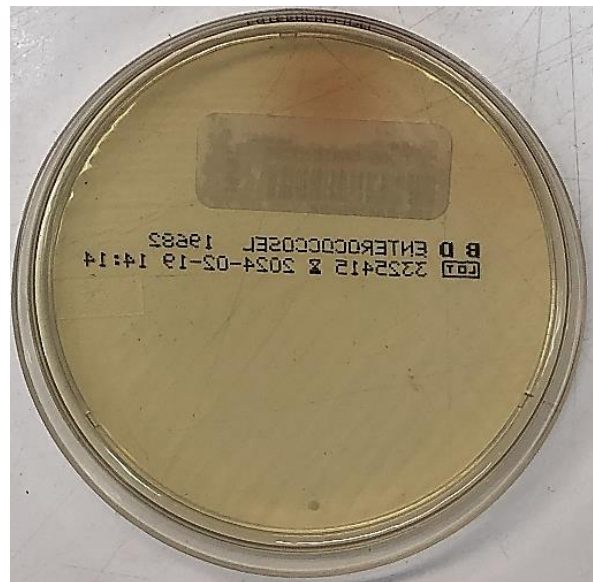
2.3.3 Resultaten en bespreking

Figuur 12 en 13 zijn microscopische beelden met vergroting 10x100 met immersie olie van de gramgekleurde uitstrijkjes van respectievelijk de aerobe en anaerobe hemocultuurfles. Zowel in de aerobe als anaerobe fles werden grampositieve streptokokken teruggevonden. Figuur 14 is het resultaat van de verdunningsenting van één bloeddruppel uit de aerobe hemocultuurfles op een TSA-plaat met 5% schapenbloed en chloramfenicol 30 µg schijfje na incubatie bij 35°C, 5% CO₂, 24 uur. Op de bloedplaat is groei aanwezig. De gekweekte kiem is bèta-hemolytisch wat te zien is aan de heldere zones rondom de kolonies. De afwezigheid van kolonies in de inhibitiezone rondom chloramfenicol en gisten in de gramkleuring duiden op de afwezigheid van gisten in de week.



Figuur 12 en 13 (links en centraal). Gramkleuringen uit respectievelijk de aerobe en anaerobe fles. Grampositieve streptokokken bij vergroting 10x100 met immersie olie. Figuur 14 (rechts). Verdunningsenting vanuit aerobe fles. Bèta-hemolytische kiemen met heldere inhibitiezone rondom chloramfenicol 30 µg na incubatie bij 35°C, 5% CO₂ gedurende 24 uur.

Figuur 15 is het resultaat van de verdunningsenting uitgaande van één bloeddruuppel uit aerobe hemocultuurfles op een TSA-plaat met 5% schapenbloed na incubatie bij 35°C, 5% CO₂, 24 uur. Op de bloedplaat is groei aanwezig. Rondom de kolonies zijn heldere opklaringen waarneembaar. Deze zones duiden op bèta-hemolyse door de gekweekte kiem. De afwezigheid van een inhibitiezone rondom bacitracine duidt op de afwezigheid van *S. pyogenes*. De afwezigheid van alfa-hemolytische kiemen en een inhibitiezone rondom optochine geven aan dat noch viridans streptokokken noch *S. pneumoniae* aanwezig zijn in de bloedkweek. Figuur 16 is het resultaat van de verdunningsenting uitgaande van één bloeddruuppel uit de aerobe hemocultuurfles op een enterokokken plaat na incubatie bij 35°C, 5% CO₂, 48 uur. Er is geen groei of zwarte neerslag te observeren. In de bloedkweek zijn groep D streptokokken en enterokokken afwezig.



Figuur 15 (links). Bèta-hemolytische kolonies op bloedplaat vanuit aerobe fles na incubatie bij 35°C, 5% CO₂, gedurende 24 uur. Geen *S. pyogenes* wegens de afwezigheid van een inhibitiezone rondom bacitracine. Geen *S. pneumoniae* of viridans streptokokken wegens de afwezigheid van alfa-hemolytische kiemen en inhibitiezone. Figuur 16 (rechts). Geen groei op enterokokken plaat na incubatie bij 35°C, 5% CO₂, gedurende 48 uur.

Figuur 17 geeft de resultaten weer van de identiteitsbepaling met MALDI-TOF MS vanuit de bloedplaat met chloramfenicol schijfje. Op basis van de referentiespectra uit de databank van MALDI-TOF MS, komt het verkregen massaspectrum het meest overeen met een *Streptococcus dysgalactiae*. De scores zijn hoger dan 2 en wijzen op betrouwbare identificatie van de kiem. Echter, het verschil met de volgende species is kleiner dan 0,20 waardoor het onderscheid tussen *S. dysgalactiae* en *S. canis* niet betrouwbaar is. Bijgevolg dient het resultaat van de identiteitsbepaling op VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) bekeken te worden.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Streptococcus dysgalactiae 504403 IMHM	2.17	1334
2 (+++)	Streptococcus canis LMG 22780 LMG	2.16	1329
3 (+++)	Streptococcus dysgalactiae RV BA 03 E LBK	2.16	1334
4 (+++)	Streptococcus dysgalactiae 100326 07 LDW	2.13	1334
5 (+++)	Streptococcus dysgalactiae ssp equisimilis DSM 6176 DSM	2.12	1334
6 (+++)	Streptococcus dysgalactiae VA20336 10 ERL	2.08	1334
7 (+++)	Streptococcus dysgalactiae ssp equisimilis GD67 GDD	2.05	1334
8 (+++)	Streptococcus canis CCUG 27668 CCUG	2.04	1329
9 (+++)	Streptococcus pyogenes DSM 2074 DSM 2	2.00	1314

Figuur 17. Resultaat identificatie met MALDI-TOF MS.

Figuur 18 toont het resultaat van de identificatiebepaling met GP-kaart op VITEK 2 Compact Systeem. De combinatie van de positieve en negatieve biochemische reacties is omgezet in het bionummer 0714543653227471 dat het meest overeenkomt met de reactieprofiel van *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*.

Identification Information	Card: GP	Lot Number: 2422541503	Expires: Nov 10, 2024 12:00 CET
	Status: Final	Analysis Time: 5.95 hours	
Organism Origin	VITEK 2		
Selected Organism	95% Probability <i>Streptococcus dysgalactiae ssp equisimilis</i>		
	Bionumber: 071454365327471 Confidence: Very good identification		

Figuur 18. Resultaten identificatie met GP-kaart op VITEK 2 Compact Systeem.

Figuur 19 is het resultaat van de antibiogrambepaling op VITEK 2 Compact Systeem met AST-N366 kaart. *S. dysgalactiae* is resistent tegen ampicilline. De MIC bedraagt 16 mg/L en overtreft het breekpunt voor gevoeligheid volgens EUCAST. *S. dysgalactiae* is ook resistent tegen amoxicilline/clavulaanzuur bij de behandeling van infecties die niet urineweg gerelateerd zijn. De MIC die hierbij bedraagt is 16 mg/L en overtreft het breekpunt voor gevoeligheid. De patiënt werd gedurende 7 dagen behandeld met amoxicilline clavulaanzuur omwille van streptokokkensepsis met complicatie nierinsufficiëntie. De wondzorg bestond uit het wassen van de benen met

isobetadine uniwash, spoeling met fysiologisch water, aanstippen met isobetadine en aanbrengen van isobetadine gel, gevolgd door afdekking met verband.

Susceptibility Information	Card:	AST-N366	Lot Number:	8162761103	Expires:	Jun 18, 2025 13:00 CEST
	Status:	Final	Analysis Time:	9.00 hours		
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation	
Temocillin			Ertapenem	<= 0.12	S	
Urine	<= 4	I	Meropenem			
Other	(-)	(-)	Meningitis	<= 0.25	S	
Ampicillin	> 16	R	Other	<= 0.25	S	
Amoxicillin/Clavulanic Acid			Amikacin			
Urine	16	S	Urine	<= 2	S	
Other	16	R	Other	<= 2	S	
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Gentamicin			
Cefuroxime	4	I	Urine	<= 1	S	
Cefuroxime Axetil			Other	<= 1	S	
Urine	4	S	Ciprofloxacin	<= 0.25	S	
Other	(-)	(-)	Fosfomycin	<= 16	S	
Cefotaxime			Nitrofurantoin			
Meningitis	<= 0.25	S	Urine	<= 16	S	
Other	<= 0.25	S	Other	<= 16		
Ceftazidime	<= 0.12	S	Colistin	<= 0.5	S	
Cefepime	<= 0.12	S	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 20	S	

Figuur 19. Resultaat antibiogrambepaling op VITEK 2 Compact Systeem met AST-N366 kaart.

2.3.4 Conclusie

De geïsoleerde kiem is *Streptococcus dysgalactiae*. *S. dysgalactiae* een grampositieve streptokok en bèta-hemolytisch. De bacteriëmie is secundair aan cellulitis. De huidinfectie en bacteriëmie zijn opgelopen buiten het ziekenhuis. De bloedbaaninfectie is bijgevolg community-acquired.

2.4 Positieve hemocultuur - *Campylobacter jejuni*

2.4.1 Achtergrond en probleemstelling

Een 3-jarige patiënt werd opgenomen wegens hoge koorts en waterige diarree sinds dag 1. De coprocultuur wees op campylobacteriose. Bij opname bedroeg de CRP-waarde 66,9 mg/L en de leukocytenwaarde $11,2 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Er werd een pediatrische hemocultuurfles verzameld.

Een infectie met *Campylobacter* veroorzaakt gastro-enteritis. Er zijn 15 soorten species maar *C. jejuni* (in veel diersoorten) en *C. coli* (in varkens en kippen) zijn de meest frequent geïsoleerde species bij gastro-intestinale infecties. *Campylobacter* species komen voor in de darmen van veel diersoorten en worden bijgevolg grotendeels overgedragen via consumptie van besmet vlees en gevogelte. Ook kruisbesmetting met rauw gegeten voedingsmiddelen kan leiden tot een campylobacteriose. De directe besmettingsweg is de feco-orale route door contact met besmette dieren en mensen met slechte handhygiëne. Er is een laag aantal kiemen nodig voor de verschijnselen van gastro-intestinale klachten. Koorts, buikkrampen, diarree, misselijkheid en braken treden op 1 tot 7 dagen na opname en verdwijnen meestal spontaan na 7 tot 10 dagen. In een klein aantal gevallen treedt bacteriëmie op. Vooral kinderen jonger dan 4 jaar, ouderen en mensen met immuundeficiëntie lopen het grootste risico op deze en andere complicaties zoals het Guillain-barré syndroom en gewrichtsproblemen (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, 2019; Sciensano, z.d.).

2.4.2 Materiaal en methoden

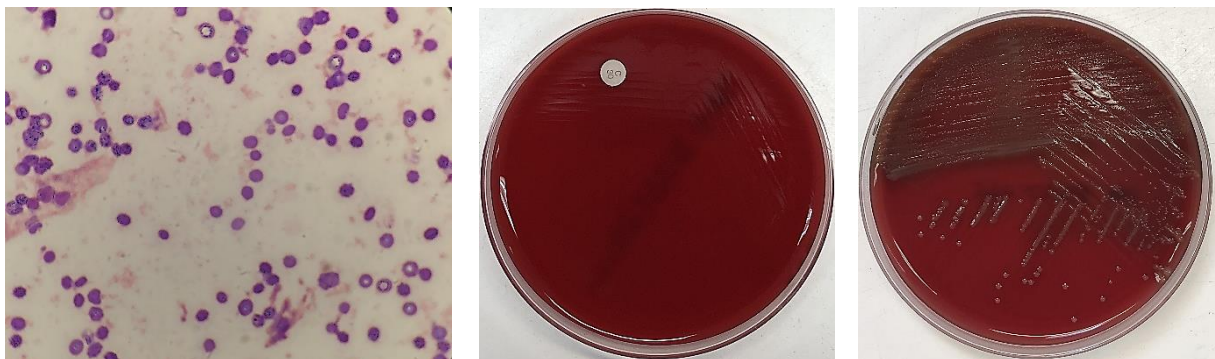
De positief gevlagde pediatrische hemocultuurfles van het type BacT/Alert® PF werd ontladen uit de BacT/Alert 3D™ (BioMérieux). De rubberen dop werd ontsmet met antiseptische oplossing en doorprikt met steriele naald en spuit waarna 2 mL bloed werd opgezogen. De eerste twee bloeddruppels werden verwijderd en één druppel werd aangebracht op een TSA-plaat aangerijkt met 5% schapenbloed (Becton Dickinson) en microscoopglasje. De bloedplaat werd geënt via de verdunningsenting waarna een chloramfenicol 30 µg schijfje centraal in de massieve zone werd geplaatst. De geïnoculeerde bodem werd geïncubeerd bij 35 °C, 5% CO₂, 42 tot 48 uur waarbij dagelijks gecontroleerd werd op groei. De bloeddruppel op het microscoopglasje werd in een trekbeweging uitgestreken met behulp van een uitstrijkglasje. Het uitstrijkje werd aan de lucht gedroogd en gramgekleurd met de Aerospray gram series 2. De gramaffiniteit en het morfologische type werden microscopisch bestudeerd bij vergroting 10x100 met immersie olie.

Op basis van het microscopisch resultaat werd een *Campylobacter* plaat (BioMérieux) geënt via de verdunningsenting, uitgaande van één bloeddruppel uit de steriele naald en spuit. De geënte bodem werd geïncubeerd bij 42 °C, micro-aerofiele omgeving, 42 tot 48 uur met dagelijkse controle op groei. Na 48 uur incubatie werd vanuit de *Campylobacter* plaat een identificatie uitgevoerd met de MALDI-TOF MS (Bruker). Er werd één kolonie aangetikt en aangebracht als een dunne film op de monsterspot van de targetplaat. Hieraan werd 1 µL UV-absorberende matrix α-cyano-4-hydroxycinnamic acid toegevoegd. De spot werd gedroogd aan de lucht en geplaatst in de MALDI-TOF MS (Bruker). Na de betrouwbare identificatie en observatie van één soort kiem in de gramkleuring, werd een manueel antibiogram volgens de schijfjes-diffusie methode ingezet. Hiertoe werd een 0,50 McFarland bereid, uitgaande van *Campylobacter* kolonies en 3 mL steriele saline solution. Met een

steriele swab werden kolonies vanuit de *Campylobacter* plaat aangetikt en opgelost in 3 mL saline solution. Tijdens het oplossen werd de McFarland enkele keren gemeten gebruik makend van de Densichek Plus™ (BioMérieux) tot McFarland 0,50. Met deze suspensie en een steriele wisser werd de Mueller Hinton plaat met 5% paardenbloed (Becton Dickinson) confluent geënt waarna de antibioticumschijfjes Tetracycline 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg en Erythromycine 15 µg werden geplaatst. De plaat werd geïncubeerd bij 42°C, micro-aerofiele atmosfeer gedurende 24 uur. Na incubatie werd de gevoeligheidscategorie bepaald door de diameter van de inhibitzone rondom elke antibioticum te meten en te vergelijken met de breekpunten volgens EUCAST (versie 12.0).

2.4.3 Resultaten en bespreking

Het microscopisch beeld van de gramkleuring bij vergroting 10x100 met immersie olie laat gramnegatieve spiraalvormige kiemen zien (figuur 20). Op de TSA-plaat met 5% schapebloed en centraal in de massieve zone is na 48 uur incubatie bij 35°C en 5% CO₂ geen groei zichtbaar. Rondom het chloramfenicol schijfje zijn geen kolonies aanwezig die op een mogelijke fungemie zouden kunnen duiden (figuur 21). Op de *Campylobacter* plaat is groei waarneembaar. De kolonies zijn grijs van kleur, slijmerig van uiterlijk en gamma-hemolytisch (figuur 22).



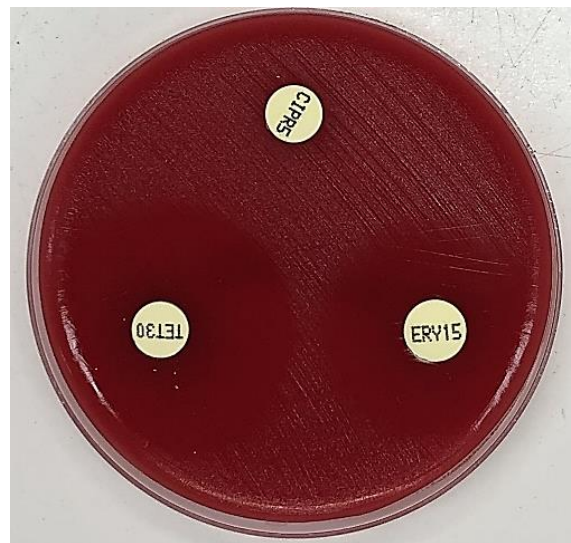
Figuur 20. (links). Resultaat gramkleuring. Gramnegatieve spiraalvormige kiemen op de achtergrond bij vergroting 10x100 met immersie olie. Figuur 21 (centraal). Geen groei op bloedplaat na inoculatie in incubatie bij 35°C, 5% CO₂ gedurende 48 uur. Figuur 22 (rechts). Grijs, slijmerige, gamma-hemolytische kolonies op *Campylobacter* plaat na incubatie bij 42°C, micro-aerofiele omgeving gedurende 48 uur.

Figuur 23 is het resultaat van de identificatie met behulp van de MALDI-TOF MS, vanuit de *Campylobacter* plaat. Op basis van gekende referentiespectra uit de databank van MALDI-TOF MS, komt het eiwitspectrum van de onderzochte kiem het meest overeen met *Campylobacter jejuni*, gevolgd door *C. jejuni* subspecies *jejuni* en *Campylobacter jejuni* met respectievelijk de scores 2,13; 2,09; 2,07.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Campylobacter jejuni MB_6111_05 THL	2.13	197
2 (+++)	Campylobacter jejuni ssp jejuni DSM 4688T DSM	2.09	197
3 (+++)	Campylobacter jejuni ATCC 29428 THL	2.07	197

Figuur 23. Resultaat identificatie met MALDI-TOF MS.

Figuur 24 is het resultaat van het manuele antibiogram volgens de schijfjes-diffusietest op een Mueller Hinton 5% schapenbloed vanuit McFarland suspensie 0,50. Na 24 uur incubatie werd een confluent laag aan bacteriële groei verkregen met inhibitiezones rondom 2 van de 3 geplaatste antibiotica-schijfjes. Er is geen inhibitiezone rondom Ciprofloxacin 5 µg. De gekweekte *Campylobacter* kiem is hiertegen resistent. De inhibitiezone rondom Tetracycline 30 µg bedraagt 44 mm en is groter dan 30 mm, het breekpunt volgens EUCAST (versie 12.0). De inhibitiezone rondom Erythromycine 15 µg bedraagt 36 mm en is groter dan 20 mm, het breekpunt volgens EUCAST (versie 12.0). *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* is gevoelig aan zowel Tetracycline 30 µg als Erythromycine 15 µg. Gezien *C. jejuni* subspecies *jejuni* gevoelig is aan Erythromycine, is het ook gevoelig aan Azithromycine en Clarithromycine (EUCAST, versie 12.0). De bacteriëmie ten gevolge van Campylobacteriose werd behandeld met Azithromycine gedurende 7 dagen met een gunstige evolutie.



Figuur 24. Schijfjes-diffusie test met Ciprofloxacin 5 µg, Erythromycine 15 µg en Tetracycline 40 µg op Mueller Hinton plaat met 5% schapenbloed na incubatie bij 42°C, micro-aerofiele omgeving gedurende 24 uur.

2.4.4 Conclusie

De geïdentificeerde kiem is *Campylobacter jejuni*. *C. jejuni* is een spiraalvormige, gramnegatieve, micro-aerofiele bacterie en veroorzaakt darminfecties. De bacteriëmie is secundair aan een darminfectie met *C. jejuni*. De bloedbaaninfectie is community-acquired.

2.5 Positieve hemocultuur - *Staphylococcus* species

2.5.1 Achtergrond en probleemstelling

Een 81-jarige patiënt werd opgenomen naar aanleiding van hematurie wegens verstopte blaassonde. Omwille van koorts werden twee sets hemocultuurflessen afgenomen.

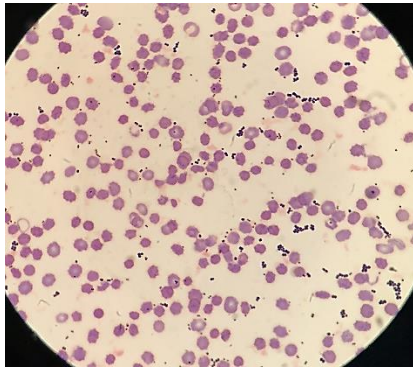
2.5.2 Materiaal en methoden

De positief gevestigde hemocultuurflessen van het type BacT/Alert® FA Plus werden ontladen uit de BacT/Alert 3D™ (BioMérieux). De rubberen doppen werden ontsmet met antiseptische oplossing en doorprikt met steriele naald en spuit. 2 mL bloed werd opgezogen waarna de eerste twee bloeddruppels werden verwijderd. Eén bloeddruppel werd aangebracht op een TSA-plaat met 5% schapenbloed (Becton Dickinson) en op een microscoopglasje. De bloedplaten werden geënt via de verdunningsenting waarna chloramfenicol 30 µg schijfjes centraal in de massieve zones werden geplaatst. De bodems werden geïncubeerd bij 35°C, 5% CO₂ gedurende 42 tot 48 uur met controle op groei na 24 uur. De bloeddruppels op de microscoopglasjes werden in een trekbeweging uitgestreken met een uitstrijkglasje. Nadat de uitstrijkjes aan de lucht werden gedroogd, werden ze gramgekleurd met de Aerospray gram series 2. De gramaffiniteit en kiemmorfologie werden microscopisch bestudeerd bij vergroting 10x100 met immersie olie.

Na incubatie werd vanuit de bloedplaten met chloramfenicol schijfjes een identificatie uitgevoerd met MALDI-TOF MS (Bruker). Hiertoe werd telkens één kolonie aangetikt en als een dunne film op afzonderlijke monsterspots aangebracht. Na het toevoegen van 1 µL UV-absorberende matrix α-cyano-4-hydroxycinnamic acid en het drogen aan lucht, werd de targetplaat in de MALDI-TOF MS geplaatst. Omwille van twee verschillende identificatieresultaten werden geen identificatie en antibioticagevoeligheidsbepaling op VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) ingezet.

2.5.3 Resultaten en bespreking

Het microscopisch beeld van de gramkleuringen uit beide hemocultuurflessen bij vergroting 10x100 met immersie olie toont grampositieve stafylokokken (figuur 25). Figuur 26 en 27 zijn resultaten van de verdunningsentingen vanuit de aerobe hemocultuurflessen van twee verschillende sets na een incubatieperiode van 24 uur bij 5% CO₂ en 35°C. Op beide bloedplaten zijn groei en een inhibitiezone rondom chloramfenicol 30 µg waarneembaar. De afwezigheid van kolonies in deze zone en gisten in de gramkleuring duiden op de afwezigheid van gisten in de bloedkweek. Op figuur 26 zijn de kolonies wit, rond en gamma-hemolytisch. Ook op figuur 27 zijn de kolonies wit, rond en gamma-hemolytisch.



Figuur 25. Resultaat gramkleuring. Grampositieve stafylokokken bij vergroting 10x100 met immersie olie.
Figuur 26 (links). Witte, ronde, gamma-hemolytische kolonies op TSA-plaat met 5% schapenbloed na incubatie bij 35°C, 5% CO₂ na 24 uur. Figuur 27 (rechts). Witte, ronde, gamma-hemolytische kolonies op TSA-plaat met 5% schapenbloed na incubatie bij 35°C, 5% CO₂ na 24 uur.

Figuur 28 is het resultaat van de identificatie met behulp van de MALDI-TOF MS vanuit de bloedplaat op figuur 26. Op basis van gekende referentiespectra uit de databank van MALDI-TOF MS, komt het eiwitspectrum van de onderzochte kiem het meest overeen met *Staphylococcus hominis*.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp novobiosepticus DSM 15614T DSM_dir	2.16	1290
2 (+++)	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp hominis DSM 20330 DSM_dir	2.08	1290
3 (+++)	<i>Staphylococcus hominis</i> DSM 30549 DSM_dir	2.08	1290
4 (+++)	<i>Staphylococcus hominis</i> Mb18788_1 CHB	2.03	1290

Figuur 28. Resultaat MALDI-TOF MS.

Figuur 29 is het resultaat van de identificatie met behulp van de MALDI-TOF MS vanuit de bloedplaat op figuur 27. Op basis van gekende referentiespectra uit de databank van MALDI-TOF MS, komt het eiwitspectrum van de onderzochte kiem het meest overeen met *Staphylococcus pettenkoferi*.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Staphylococcus pettenkoferi DSM 19554T DSM_dir	2.26	170573
2 (+++)	Staphylococcus pettenkoferi H59 MCRF_dir	2.25	170573
3 (+++)	Staphylococcus pettenkoferi 994600325 LBK_dir	2.18	170573
4 (+++)	Staphylococcus pettenkoferi KL906013_BK14723 UKH_dir	2.13	170573
5 (+++)	Staphylococcus pettenkoferi H288 MCRF_dir	2.10	170573
6 (+++)	Staphylococcus pettenkoferi CCUG 57156 CCUG_dir	2.05	170573

Figuur 29. Resultaat identificatie met MALDI-TOF MS.

2.5.4 Conclusie

Er is waarschijnlijk geen sprake van bacteriëmie. Het lijkt op contaminatie van het bloed door een onsteriele hemocultuurafname.

2.6 Positieve hemocultuur - *Escherichia coli*

2.6.1 Achtergrond en probleemstelling

Een 84-jarige patiënt werd opgenomen wegens koorts, rillingen en ademhalingsklachten. De diagnose longontsteking en urineweginfectie werd gesteld. Omwille van koorts werden hemocultuurflessen verzameld. De patiënt was risico voor infecties wegens Parkinson.

Parkinson is een neurologische aandoening en gaat gepaard met een verhoogd risico op infecties. Eén van deze infecties is een UTI ten gevolge van verminderde mobiliteit en dus zelfhygiëne, onsteriele katheterisatie of urineretentie. Een urineretentie is het onvermogen om de blaas te ledigen en wordt bij mensen met Parkinson veroorzaakt doordat de brein geen signalen ontvangt voor een blaaslediging. Dit heeft als gevolg een overvolle blaas die een broeihaard voor bacteriën vormt. In sommige gevallen voelen mensen met zenuwschade geen ongemak waardoor de urineretentie kan evolueren naar een UTI. Wanneer deze infectie onbehandeld blijft kan bacteriëmie ontstaan. Ook inadequate katheterisatie waarbij schade aan de blaas en urinewegen optreedt, veroorzaakt infecties die bij deze mensen onopgemerkt kunnen blijven met als ernstige complicatie bacteriëmie en septicemie (Yale Medicine, z.d.; Hogg et al., 2022).

2.6.2 Materiaal en methode

De positief gevlagde hemocultuurflessen werden ontladen uit de BacT/Alert 3D™ (BioMérieux). De flesdoppen werden ontsmet met antiseptische oplossing en doorprikt met steriele naald en spuit waarna 2 mL bloed werd opgezogen. Vanuit elke fles werd één bloeddruppel aangebracht op de overeenstemmende TSA-plaat met 5% schapenbloed (Becton Dickinson) en microscoopglasje. De voedingsbodems werden uitgestreken via de verdunningsenting en antibioticumschijfjes werden centraal in de massieve zones geplaatst: chloramfenicol 30 µg op de aerobe bloedplaat en kanamycine 500 µg op de anaerobe bloedplaat. De aerobe bloedplaat werd geïncubeerd bij 35°C, 5% CO₂, 42 tot 48 uur. De anaerobe bloedplaat werd geplaatst in een anaerobe zakje en geïncubeerd bij 35°C, omgevingsatmosfeer, 42 tot 48 uur. Beide platen werden in de namiddag gecontroleerd op groei. De bloeddruppels op de microscoopglasjes werden in een trekbeweging uitgestreken met behulp van uitstrijkglasjes. De uitstrijkjes werden aan de lucht gedroogd en gramgekleurd met de Aerospray gram series 2. De gramaffiniteit en morfologie van de kiem werd microscopisch bestudeerd bij vergroting 10x100 met immersie olie. Op basis van het microscopisch resultaat werd een MacConkey agarplaat (Becton Dickinson) geënt. De plaat werd uitgestreken via de verdunningsenting uitgaande van één bloeddruppel uit de aerobe hemocultuurfles en geïncubeerd bij 35°C, omgevingsatmosfeer tot in de namiddag.

In de namiddag van de dag dat de fles positief werd gevlagd, werd al een identificatie op MALDI-TOF MS (Bruker) ingezet. Hiertoe werd één kolonie aangetikt en als een dunne film uitgesmeerd op de monsterspot. Dan werd 1 µL UV-absorberende matrix α-cyano-4-hydroxycinnamic aan het monster toegevoegd. Na het drogen aan lucht werd de plaat in de MALDI-TOF MS geplaatst voor identificatie. Na een betrouwbare identificatie en de observatie van één soort kiem in de gramkleuring, werd omwille van de geïdentificeerde kiem ook al gekeken naar de kolonies op de MacConkey agar (Becton Dickinson) voor lactose fermentatie. In geval van lactose fermenterende kiemen is de identificatie op MALDI-TOF MS (Bruker) aanvaardbaar. In geval van niet lactose fermenterende

kiemen dient de identificatie ook te gebeuren met de VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux). Dit omdat de MALDI-TOF MS (Bruker) geen onderscheid kan maken tussen *E. coli* (lactose positief) en *Shigella* species (lactose negatief). Na de identificatie werd in de namiddag eveneens een antibiogrambepaling uitgevoerd. Hiervoor werden twee polystereenbuisjes genomen waarvan één gevuld werd met 3 mL saline solution en één gemerkt werd met barcode. In het eerste buisje werden de te onderzoeken kiemen opgelost met een steriele wisser. Tijdens het oplossen werd de McFarland van de suspensie enkele keren gemeten met behulp van de Densichek Plus™ (BioMérieux) tot deze tussen 0,50 en 0,63 lag. Vanuit deze suspensie werd 145 µL overgebracht in het gemerkte buisje waarin vervolgens de AST-N366 kaart voor antibiogrambepaling voor gramnegatieve bacillen werd geplaatst. De rek met gestandaardiseerde suspensie en antibiogramkaart werd geladen in de VITEK 2 Compact Systeem (BioMérieux) voor antibiogrambepaling.

2.6.3 Resultaten en bespreking

Het microscopisch beeld van de gramkleuring bij vergroting 10x100 met immersie olie toont gramnegatieve bacillaire kiemen (figuur 30). Op de TSA-plaat met 5% schapebloed is na incubatie bij 35°C, omgevingsatmosfeer na 24 uur zeer duidelijke groei aanwezig (figuur 31). De kolonies zijn rond, grijs van kleur, glad en gamma-hemolytisch. De gekweekte kiemen zijn dus niet in staat het aanwezige schapebloed te lyseren. Rondom de chloramfenicol is een inhibitiezone aanwezig wat duidt op de gevoeligheid van de kiem aan het antibioticum. De afwezigheid van kolonies in deze zone en in de gramkleuring duidt op de afwezigheid van gisten in de bloedkweek. Op de MacConkey agar is na incubatie bij 35°C, omgevingsatmosfeer na 24 uur eveneens duidelijke groei waarneembaar (figuur 32). De kolonies zijn rond, afgeplat, glad, roos en gramnegatief omwille van de selectiviteit van het medium. De roze kleur duidt op lactosefermentatie.



Figuur 30 (links). Resultaat gramkleuring. Gramnegatieve bacillen bij vergroting 10x100 met immersie olie (idem anaerobe fles). Figuur 31 (centraal). Grijs, ronde, gladde, gamma-hemolytische kolonies op bloedplaat vanuit aerobe fles na incubatie bij 35°C, 5% CO₂ gedurende 24 uur. Figuur 32 (rechts). Lactose fermenterende kiemen op MacConkey agar na incubatie bij 35°C, omgevingsatmosfeer gedurende 24 uur.

Figuur 33 is het resultaat van de identificatie met MALDI-TOF MS vanuit de aerobe TSA-plaat met 5% schapenbloed. Op basis van gekende referentiespectra uit de databank van MALDI-TOF MS komt het eiwitspectrum van de onderzochte kiem het meest overeen met *Escherichia coli*. De identificaties hebben een score hoger dan 2 en de kolonies op de MacConkey agar zijn positief voor lactosefermentatie. Bijgevolg is het identificatieresultaat betrouwbaar.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<u>Escherichia coli MB11464 1 CHB</u>	<u>2.39</u>	<u>562</u>
2 (+++)	<u>Escherichia coli RV412 A1 2010 06a LBK</u>	<u>2.38</u>	<u>562</u>
3 (+++)	<u>Escherichia coli Nissl-VML</u>	<u>2.34</u>	<u>562</u>
4 (+++)	<u>Escherichia coli DSM 1103_OC DSM</u>	<u>2.30</u>	<u>562</u>
5 (+++)	<u>Escherichia coli DSM 682 DSM</u>	<u>2.30</u>	<u>562</u>
6 (+++)	<u>Escherichia coli ATCC 25922 THL</u>	<u>2.29</u>	<u>562</u>
7 (+++)	<u>Escherichia coli DSM 1576 DSM</u>	<u>2.28</u>	<u>562</u>
8 (+++)	<u>Escherichia coli DSM 30083T HAM</u>	<u>2.27</u>	<u>562</u>
9 (+++)	<u>Escherichia coli DH5alpha BRL</u>	<u>2.25</u>	<u>562</u>
10 (+++)	<u>Escherichia coli ATCC 35218 CHB</u>	<u>2.25</u>	<u>562</u>

Figuur 33. Resultaat identificatie met MALDI-TOF MS.

Figuur 34 is het resultaat van de antibiogrambepaling op VITEK 2 Compact Systeem met AST-N366 kaart. *E. coli* is resistent tegen ampicilline. De bepaalde MIC bedraagt 16 mg/L wat groter is dan het breekpunt volgens EUCAST voor resistentie. Op basis van deze uitkomsten werd de patiënt behandeld met ciprofloxacin gedurende 7 dagen. De bepaalde MIC waarde voor dit antibioticum bedraagt 0,25 mg/L.

Susceptibility Information	Card: AST-N366	Lot Number: 8162761103	Expires: Jun 18, 2025 13:00 CEST		
	Status: Final	Analysis Time: 9.00 hours			
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Temocillin			Ertapenem	<= 0.12	S
Urine	<= 4	I	Meropenem		
Other	(-)	(-)	Meningitis	<= 0.25	S
Ampicillin	> 16	R	Other	<= 0.25	S
Amoxicillin/Clavulanic Acid			Amikacin		
Urine	16	S	Urine	<= 2	S
Other	16	R	Other	<= 2	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Gentamicin		
Cefuroxime	4	I	Urine	<= 1	S
Cefuroxime Axetil			Other	<= 1	S
Urine	4	S	Ciprofloxacin	<= 0.25	S
Other	(-)	(-)	Fosfomycin	<= 16	S
Cefotaxime			Nitrofurantoin		
Meningitis	<= 0.25	S	Urine	<= 16	S
Other	<= 0.25	S	Other	<= 16	
Ceftazidime	<= 0.12	S	Colistin	<= 0.5	S
Cefepime	<= 0.12	S	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 20	S

Figuur 34. Resultaat antibiogrambepaling op VITEK 2 Compact Systeem met AST-N366 kaart.

2.6.4 Conclusie

De geïsoleerde kiem is *Escherichia coli*. *E. coli* is gramnegatief, staafvormig en lactose fermenterend. De bacteriëmie met *E. coli* is secundair aan een urineweginfectie die opgelopen is buiten het ziekenhuis. Er is sprake van een community-acquired bloedbaaninfectie.

Literatuurlijst

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology Of The Cell* (4^{de} editie). Garland Science, New York.

BD. (2013). INSTRUCTIONS FOR USE – READY-TO-USE PLATED MEDIA BD™ Enterococcosel™ Agar.

BioMérieux. (z.d.). *ETEST®*. BioMérieux. Geraadpleegd op 2 april, <https://www.biomerieuxusa.com/clinical/etest>

BioMérieux. (2008). VITEK 2™ Instrument User Manual.

BioMérieux. (2010). BacT/Alert 3D User Manual.

Bläckberg, A., Svedevall, S., Lundberg, K., Nilson, B., Kahn, F., & Rasmussen, M. (2022). Time to Blood Culture Positivity: An Independent Predictor of Mortality in Streptococcus Pyogenes Bacteremia. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(6). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac163>

Brown, B. D., & Hood Watson, K. L. (2023, 7 augustus). *Cellulitis*. StatPearls - NCBI Bookshelf. Geraadpleegd op 30 maart 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549770/>

Bush, L. M. (2022). *Host defense mechanisms against infection*. MSD Manual Professional Edition. Geraadpleegd op 20 januari 2024. <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/biology-of-infectious-disease/host-defense-mechanisms-against-infection>

Carroll, K.C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. (2016). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology* (27ste editie). McGraw-Hill Education, New York.

Christaki, E., & Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2014). The complex pathogenesis of bacteremia: From antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host. In *Virulence* (Vol. 5, Issue 1, pp. 57 – 65). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.26514>

Cižman, M., & Srovin, T. P. (n.d.). Antibiotic consumption and resistance of gram-negative pathogens (collateral damage). *GMS Infectious Diseases*, 6, 1-9. 10.3205/id000040

Creative Proteomics. (z.d.). *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*. Creative Proteomics. Geraadpleegd op 16 maart 2023, <https://www.creative-proteomics.com/support/matrix-assisted-laser-desorption-ionization.htm>

Creative Proteomics. (2024). *MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Creative Proteomics. Geraadpleegd op 16 maart 2023, <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>

De Deyn, D. (2020). Standard Operating Procedure Aerospray gram series 2. Klinisch Laboratorium AZ Jan Portaels Vilvoorde.

De Deyn, D. (2020). Standard Operating Procedure VITEK® 2 Compact. Klinisch Laboratorium AZ Jan Portaels Vilvoorde.

De Deyn, D. (2022). Standard Operating Procedure ATCC stammen gebruik bij QC van gevoeligheidsbepalingen, isolatiebodem, identificatiebodem en -testen. Klinisch Laboratorium AZ Jan Portaels Vilvoorde.

Delves, P. J. (2024). *Complement System*. MSD Manual Professional Version. Geraadpleegd op 24 februari 2024, <https://www.msdmanuals.com/professional/immunology-allergic-disorders/biology-of-the-immune-system/complement-system>

di Martino, P. (2018). Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiology*, 4(3), 563–566. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.563>

Dicker, K. T., Gurski, L. A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2014). Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 10, Issue 4, pp. 1558–1570). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.019>

Duysburgh E. Surveillance bloedstroom infecties in Belgische ziekenhuizen - *Protocol 2019*. Brussel, België: Sciensano; 2019.

Ellis, S., & Ong, E. (2014). Disseminated Infections: A Clinical Overview. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 637–653). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00036-6>

Hogg, E., Frank, S., Oft, J., Benway, B., Rashid, M. H., & Lahiri, S. (2022). Urinary Tract Infection in Parkinson's Disease. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 12, Issue 3, pp. 743–757). IOS Press BV. <https://doi.org/10.3233/JPD-213103>

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*.

Hymes, J. P., & Klaenhammer, T. R. (2016). Stuck in the middle: Fibronectin-binding proteins in gram-positive bacteria. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01504>

Janeway, C. A., Travers, P. Jr, Walport, M. & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology The Immune System in Health and Disease* (5de editie). Garland Science, New York.

Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in inflammatory disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>

Lammert, J. M. (2007). *Techniques in Microbiology* (1^{ste} editie). Pearson Education.

Laupland, K. B., & Church, D. L. (2014). Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 647–664. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-14>

M. Vercruyce, L. Vaes, N. Shodu, K. Mertens. Surveillance of Bloodstream Infections in Belgian Hospitals: *Report 2023* (Catry B., Ed). Brussels, Belgium: Sciensano; 2023 84p.

Mayo Clinic Staff. (2022, 6 mei). *Cellulitis*. Mayo Clinic. Geraadpleegd op 30 maart 2024, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cellulitis/symptoms-causes/syc-20370762>

McArthur, J. D., Cook, S. M., Venturini, C. & Walker, M. J. (2012). The role of streptokinase as a virulence determinant of streptococcus pyogenes - potential for therapeutic targeting. *Current Drug Targets*, 13 (3), 297-307. 10.2174/138945012799424589

Melander, R. J., Zurawski, D. v., & Melander, C. (2018). Narrow-spectrum antibacterial agents. In *MedChemComm* (Vol. 9, Issue 1, pp. 12–21). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7md00528h>

NHS. (2024, 4 maart). *Cellulitis*. NHS. Geraadpleegd op 30 maart 2024, <https://www.nhs.uk/conditions/cellulitis/>

Nijs, Y. (2021, 1 maart). *Wat is het verschil tussen een bypass en een mini bypass?* Obesity Centre brussels. Geraadpleegd op 31 maart 2024, <https://obesitas-behandeling.be/bypass-minibypass-verschil/#:~:text=Gastric%20banding%20of%20een%20maagring,de%20rest%20van%20de%20maag>

O Cróinín, T., & Backert, S. (2012). Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? In *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 25). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00025>

Paharik, A. E., Schreiber, H. L., Spaulding, C. N., Dodson, K. W., & Hultgren, S. J. (2017). Narrowing the spectrum: The new frontier of precision antimicrobials. *In Genome Medicine* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0504-3>

Patel, G., Hawley, R., & Scheinfeld, N. (2011). BACTEREMIA, SEPSIS, SEPTIC SHOCK, AND TOXIC SHOCK SYNDROME. *In Emergency Dermatology* (pp. 98–108). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511778339.011>

Ramachandran, G. (2014). Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: A brief review. *In Virulence* (Vol. 5, Issue 1, pp. 213–218). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.27024>

Remel. (2010). Technical Manual of Microbiological Media Salmonella Shigella (SS) agar.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. (z.d.). *Campylobacter-infecties richtlijn*. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Geraadpleegd op 5 april 2024, <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/campylobacter-infecties>

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. (2022, juli). *Richtlijnen Salmonellose*. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Geraadpleegd op 31 maart 2024, <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/salmonellose>

Santella, B., Folliero, V., Pirofalo, G. M., Serretiello, E., Zannella, C., Moccia, G., Santoro, E., Sanna, G., Motta, O., Caro, F. de, Pagliano, P., Capunzo, M., Galdiero, M., Boccia, G., & Franci, G. (2020). Sepsis—A retrospective cohort study of bloodstream infections. *Antibiotics*, 9(12), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120851>

Sciensano (z.d.). *Antimicrobial resistance (AMR)*. Sciensano. Geraadpleegd op 27 januari 2024, <https://www.sciensano.be/en/health-topics/antimicrobial-resistance-amr>

Sciensano (z.d.). *Bloedstroominfecties*. Sciensano. Geraadpleegd op 20 januari 2023, <https://www.sciensano.be/nl/gezondheidsonderwerpen/bloedstroominfecties-0#wie-loopt-het-risico-op-een-bloedstroominfectie->

Sciensano. (z.d.). *Campylobacter*. Sciensano. Geraadpleegd op 5 april 2024, <https://www.sciensano.be/nl/gezondheidsonderwerpen/campylobacter#transmissie>

Sciensano. (z.d.). *Salmonellose*. Sciensano. Geraadpleegd op 31 maart 2024, [Salmonellose | sciensano.be](https://www.sciensano.be/nl/gezondheidsonderwerpen/salmonellose)

Seifert, H. (2009). The Clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clinical Infectious Diseases*, 48(SUPPL. 4). <https://doi.org/10.1086/598188>

Sharma, S., Bhatnagar, R., & Gaur, D. (2020). Complement Evasion Strategies of Human Pathogenic Bacteria. *In Indian Journal of Microbiology* (Vol. 60, Issue 3, pp. 283–296). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00872-9>

Sheehan, J. R., Sadlier, C., & O'Brien, B. (2022). Bacterial endotoxins and exotoxins in intensive care medicine. *In BJA Education* (Vol. 22, Issue 6, pp. 224–230). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bjae.2022.01.003>

Smith, D. A., & Nehring, S. M. (2023, 17 juli). *Bacteremia*. StatPearls – NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441979/>

Siddiqui, Z., Siddiqui, Z. A., Husain, F., & Siddiqui, M. (2017). A case of a chronic salmonella infection following Roux-en-Y gastric bypass surgery, treated successfully by a laparoscopic cholecystectomy. *BMJ Case Reports*, 2017. <https://doi.org/10.1136/bcr-2017-219395>

Thorpe, T. C., Wilson, M. L., Turner, J. E., Diguseppi, J. L., Willert, M., Mirrett, S., & Barth Reller, L. (1990). BacT/Alert: an Automated Colorimetric Microbial Detection System. *In JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 28, Issue 7). <https://journals.asm.org/journal/jcm>

Tripathi, N., & Sapra, A. (2023, August 14). *Gram staining*. StatPearls - NCBI Bookshelf. Geraadpleegd op 30 maart 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>

van Engelen, T. S. R., Wiersinga, W. J., & van der Poll, T. (2018). Pathogenesis of sepsis. In *Handbook of Sepsis* (pp. 31–43). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73506-1_3

van kasteren, m.e.e., stobbering, e.e., janknegt, r., wijnants, w.j.a., & van der mee, j.w.m. (1999). Optimaliseren van het antibioticabeleid in Nederland. IV. SWAB-richtlijnen voor antimicrobiële therapie in het ziekenhuis bij volwassenen met sepsis. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 12, 611-617.

Viscoli, C. (2016). Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. In *Virulence* (Vol. 7, Issue 3, pp. 248–251). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1152440>

Wilson, M., McNab, R., & Henderson, B. (2002). *Bacterial disease mechanisms an introduction to cellular microbiology* (1ste editie). Cambridge University Press.

Yale Medicine. (z.d.). *Urinary Retention*. Yale Medicine. Geraadpleegd op 7 april 2024, <https://www.yalemedicine.org/conditions/urinary-retention>

Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. In *International Anesthesiology Clinics* (Vol. 45, Issue 2, pp. 27–37). <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>