

SAMENVATTING

Een nauwkeurige en tijdige identificatie van pathogenen en hun antimicrobiële gevoeligheid is essentieel voor het opstarten van gerichte therapie. De huidige microbiële diagnostiek berust echter grotendeels op kweek in conventionele groeimedia die de infectieuze micro-omgeving, dewelke bijdraagt tot de vorming van biofilms en antimicrobiële tolerantie, niet nabootsen. Als gevolg weerspiegelen diagnostische uitkomsten niet altijd volledig de microbiologische complexiteit van infecties, met name wanneer biofilms betrokken zijn. Dit proefschrift onderzoekt of de integratie van *in vivo*-achtige omstandigheden in *in vitro* testen zich kan vertalen in uitkomsten met een hogere predictieve waarde in de context van biofilm-geassocieerde infecties, met het oog op mucoviscidose of cystische fibrose (CF) longinfecties en periprosthetische gewrichtsinfecties (PJI).

In de context van CF-longinfecties werd een *high throughput* antimicrobiële gevoeligheidstest ontwikkeld voor *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, gebruikmakend van een synthetisch CF-sputum medium (SCFM2) gekoppeld aan een resazurine-gebaseerde levensvatbaarheidstest. De biofilm preventie concentraties (BPCs) van klinisch relevante antibiotica werden bepaald voor een selectie van referentie en klinische *P. aeruginosa* isolaten in SCFM2. Deze waarden werden vervolgens vergeleken met respectievelijke conventionele gevoeligheidsparameters (minimale inhiberende concentraties (MICs) en minimale bactericide concentraties (MBCs)) bepaald in Mueller Hinton Broth (MHB). De BPCs waren steeds hoger dan de MICs en de mate van dit verschil was antibiotica afhankelijk. Dit suggereert dat SCFM2 de tolerantie ervaren door *P. aeruginosa* biofilms *in vivo* beter weerspiegelt. Bovendien correleerde de resazurine afgeleide fluorescentie sterk met kolonievormende eenheid (CFU) tellingen, wat de methode valideert als een snel en betrouwbaar alternatief voor uitplating.

In het kader van PJI werd een synthetisch synoviaal vocht medium (SSF2) ontwikkeld, gebaseerd op humaan synoviaal vocht van PJI-patiënten en gevalideerd aan de hand van 18 PJI isolaten behorend tot verschillende micro-organismen. SSF2 ondersteunde zowel groei als aggregaat vorming van al deze isolaten, wat werd bevestigd via lichtmicroscopie en confocale laser scanning microscopie. Antimicrobiële gevoeligheidstesten toonden

aan dat het merendeel van de BPCs en minimale biofilm inhiberende concentraties (MBICs) in SSF2 hoger waren dan de conventionele MICs en MBCs bepaald in MHB. Deze resultaten wijzen erop dat SSF2 een waardevolle aanvulling kan zijn voor het bepalen van de antimicrobiële gevoeligheid van biofilm aggregaten in PJI.

Om de invloed van kweek in SSF2 op het gedrag van bacteriën verder te onderzoeken, werd RNA sequencing uitgevoerd op een *Staphylococcus aureus* isolaat (afkomstig van een patiënt met acute PJI) dat werd opgekweekt in SSF2 en in het conventioneel Luria Bertani (LB) medium. Transcriptoom analyse toonde aan dat ongeveer de helft van de eiwit-coderende genen verschillend tot expressie kwam. Functionele analyse toonde aan dat SSF2 de expressie van virulentie- en biofilm-gerelateerde genen induceert. Deze trend kwam overeen met *in vivo* genexpressie data, verkregen vanuit RNA sequencing op diezelfde stam na directe isolatie uit de patiënt leidend aan acute PJI. Deze bevindingen benadrukken het potentieel van SSF2 om de *in vivo* condities tijdens PJI na te bootsen.

Ten slotte werd aan de hand van 79 synoviaal vocht stalen, afgenomen van patiënten met een vermoedelijke PJI, de diagnostische uitkomst na kweek in SSF2 en isotherme microcalorimetrie (IMC) vergeleken met deze na conventionele kweek. Kweek in SSF2 leverde het meest aantal pathogenen en de hoogste microbiële diversiteit op in vergelijking met conventionele kweek, terwijl IMC snelle detectie van microbiële activiteit (< 16h) mogelijk maakte. Deze resultaten illustreren het potentieel van alternatieve kweek- en detectiebenaderingen voor het al dan niet sneller opsporen van een groter aantal pathogenen in PJI.

Over het algemeen benadrukt dit werk het potentieel van *in vivo*-achtige modellen in de microbiële diagnostiek. Toekomstig onderzoek dient zich te richten op grootschalige multicenterstudies die gebruik maken van gestandaardiseerde protocollen om klinisch te valideren of behandelingen gebaseerd op deze modellen zich ook vertalen in betere patiëntuitkomsten in patiënten met biofilm-geassocieerde infecties.