



CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Optimalisatie van entbodems voor automatische inoculatie

Author: van Dievoet Marie-Astrid

Supervisor: Prof Dr. J. Verhaegen

Date: 20/05/2014

CLINICAL BOTTOM LINE

In deze CAT hebben we nagegaan of we het huidige entschema, namelijk welke bacteriologische bodems geënt worden voor welke stalen, kunnen vereenvoudigen. Deze oefening werd gedaan met het oog op automatisatie in het bacteriologie lab. Met de implementatie van de MALDI-TOF MS in 2010 kunnen we een aantal historisch gegroeide praktijken in vraag stellen. We hebben het entschema van de volgende staalsoorten in het Universitair Ziekenhuis (UZ) te Leuven van naderbij bekeken: hemoculturen, respiratoire stalen, variastalen en coproculturen. Kort wordt nog een klein luik gisten/schimmel-culturen besproken. De MSA (Mannitol Salt Agar) en de gal-eskuline bij de hemoculturen bleken overbodig en kunnen geëlimineerd worden. McC (MacConkey) agar werd te belangrijk geacht bij de bloedculturen. Bij de respiratoire stalen onderzochten we de selectieve bodems, MSA en McC. Deze bleken beide nuttig en kunnen we aan de hand van onze bevindingen niet elimineren. Verschillende soorten wondvocht/etter-stalen werden geëvalueerd. De MSA bleek hier overbodig. McC en thioglycolaat waren onmisbaar bij de interpretatie van de culturen die wij bestudeerd hebben. Bij de coproculturen lanceerden we de vraag of het eventueel mogelijk is afname van coproculturen na de derde hospitalisatiedag te beperken. Dit bleek zeer moeilijk te zijn aangezien we dan een aantal enteropathogenen zouden missen, tenzij wanneer bepaalde triggers of regels in de labogids zouden geïmplementeerd worden. Het enten van Rappaport-Salmonella aanrijking op BGA (Brilliant Green Agar) gaf geen meerwaarde. De CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) agar kunnen we verder in vraag stellen bij de routinematige enting van faeces. Tenslotte is het bij de enting van Sabouraud voor vagina-en SAM (selectieve antibiotica modulatie)-stalen voldoende een petrischaal te enten in plaats van een buis. De routinematige enting van een chromogene agar voor gisten, naast een Sabouraud, bij bijvoorbeeld bronchoalveolaire lavage vochten en SAM-stalen is ook overbodig.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Op het microbiologie lab kunnen we slechts spreken van een gedeeltelijke automatisatie in vergelijking met bijvoorbeeld de scheikunde platformen. De Vitek (Biomérieux), Microscan (Siemens) en Phoenix (Becton Dickinson) zijn voorbeelden van dergelijke semi-automatisatie, alsook de incubatoren die de hemoculturen automatisch scannen op groei. Het evolueren naar automatische entsystemen zou het verminderen/uitschakelen van repetitieve handelingen betekenen. Jaarlijks zien we een lichte toename van het aantal stalen in UZ Leuven (312970 en 316157 stalen in 2012/2013 respectievelijk). Deze toename kunnen we enerzijds toeschrijven aan het frequenter screenen van patiënten op multi-resistente bacteriën. Anderzijds kan dit liggen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën waarbij er meer en meer vreemd materiaal, dat kan geïnfecteerd raken, ingeplant wordt (5). Er wordt ook een toename gezien van het aantal sterk immuungecompromitteerde patiënten.

Tegelijk of na de implementatie van de entsystemen kan er nagedacht worden over de implementatie van 'Total Lab Automatisatie' (TLA), waarbij de entsystemen aan een camera en een incubator geschakeld worden. Een dergelijk automatische enter bestaat eigenlijk al langer. De Isoplater (Vista Technology Inc.) werd ontwikkeld in 1989 en is een voorbeeld van

semi-automatisatie (6). Het specimen moet echter eerst vooraf aangebracht worden op de agar. Een beperkt voorbeeld in ons lab is de spiraalenter (Autoplate 4000) waarmee de katheters na sonicatie geënt worden. Hierbij moet men echter manueel zowel het vloeibaar staal als de entplaat aanbieden. Op dit moment zijn er vier meer gesofisticeerde, automatische entsystemen op de markt van drie verschillende firma's. Het gaat om Innova (BD), Inoqula (BD Kiestra), Walk-Away Specimen Processor (WASP; Copan Diagnostics) en PREVI Isola (Biomérieux) (6). Elk van deze systemen hebben verschillende eigenschappen wat betreft methode van inoculatie, verwerkingssnelheid, mogelijkheid van 'decappen' van het staal, etc. Sommige systemen hebben ook een aparte module voor het maken en gramkleuren van uitstrijkjes. Bij de WASP is dit zelfs volledig geautomatiseerd.

Naast het uitschakelen van manueel enten, zijn er nog andere mogelijke voordelen van de automatische systemen. Zo bekomt men een standaardisatie wat betreft entpatroon en is er een zekere traceability (5). Het staal wordt gescand aan de hand van een barcode en de agars worden correct gelabeld. Volgens Greub et al (7) worden er met een automatische enter tevens veel meer geïsoleerde kolonies bekomen. Een studie van Bourbeau (14) et al toonde aan dat er geen cross-contaminatie plaatsvindt tussen verschillende stalen. Een voordeel van de TLA is dat er bij discordantie van resultaten foto's heropgeroepen kunnen worden van agarbodems die al weggegooid zijn. Meerdere culturen van één patient kunnen tegelijkertijd op het computerscherm opgeroepen worden, waardoor er een meer geïntegreerde benadering mogelijk is. Ook zijn deze geheugensystemen mogelijks een motivatie tot het maken van leermodules voor nieuwe werknemers. Mogelijke nadelen zijn het eventueel ontstaan van wachttijden bij het tegelijk oproepen van platen uit de incubatoren. Medisch laboratoriumtechnologen en microbiologen zullen ook een nieuwe leercurve moeten ondergaan voor het aflezen van culturen op een computerscherm. Aangezien deze systemen nog niet lang op de markt zijn, zijn er nog niet veel data voorhanden wat betreft 'mean time to failure'. In veel artikels (8) wordt aangehaald dat de turn-around-time of TAT zou afnemen met automatisatie, al moeten we dit kritisch bekijken (5). De afname van het aantal laboratoriumtechnologen wordt vaak als argument richting automatisatie aangehaald. Echter, is dit in België nog steeds een knelpuntberoep? Een andere vraag is hoe de semi-automatisatie die al voorhanden is (bijvoorbeeld Vitek) hierin past en of er een zekere flexibiliteit is van deze systemen. Met andere woorden, zit je bij aankoop van een TLA van een bepaalde firma uitsluitend vast aan haar producten? De hoge kostprijs, de onderhoudskosten en de verbouwingswerken die uitgevoerd moeten worden, zijn een bijkomend nadeel. Wat een hele vooruitgang zou zijn, maar nu nog toekomstmuziek is, is het automatisch aanbrengen van kolonies op de draagplaatjes van de MALDI-TOF MS. Het automatisch detecteren en verwijderen van negatieve culturen is reeds mogelijk.

Elk laboratorium moet zelf de oefening maken, namelijk de voor- en nadelen van elk entsysteem afwegen. Zo moet het systeem gekozen worden dat het best past bij de noden van het laboratorium en het meest kostenefficiënt is. Een lab met veel verschillende staalsoorten, zoals in UZ Leuven, heeft andere prioriteiten dan een lab met een kleinere variatie aan staalsoorten. Met moet er ook bij stilstaan dat niet alle stalen automatiseerbaar zijn (hemoculturen, biopsies, lage volume stalen, katheters, haar/nagels,...) en dat er steeds een deel manuele handelingen zal blijven bestaan. Faeces en sputa moeten eerst vloeibaar gemaakt en gehomogeniseerd worden. Het kiezen van een bepaald systeem is een zeer complexe opdracht aangezien het niet mogelijk is het toestel te testen op de werkvloer. Daarbij komt dat het hele systeem moet afgestemd worden op het laboratorium werkstation (LWS). Het is dus zeer belangrijk de verschillende aspecten af te wegen en na te streven zo 'lean' mogelijk te werken.

Met de komst van de MALDI-TOF MS in 2009/2010 zijn een aantal entbodems of agars mogelijks overbodig geworden in het routine microbiologie laboratorium. MALDI-TOF MS zorgt voor een gestandaardiseerde, snelle en relatief goedkope identificatie van een heel aantal

micro-organismen. Ondanks de snelheid van deze techniek, is de MALDI-TOF echter afhankelijk van het kweken van bacteriën en genereren van geïsoleerde kolonies, wat wel een tijdrovend proces is (5). De huidige selectie aan entbodems per staalsoort is historisch gegroeid met het oog op de volgende aspecten. Ten eerste is het uiterst belangrijk pathogene kiemen niet te missen: bijvoorbeeld *Haemophilus influenzae* in respiratoire stalen. Ten tweede zijn deze bodems reeds een eerste stap naar identificatie. Hier denken we ondermeer aan Mannitol Salt Agar (MSA) voor stafylokokken en McConkey Agar (McC) voor gramnegatieven. Ten derde hebben we selectieve bodems soms nodig om wegwijs te geraken in mengculturen. Dit is vooral zo bij niet-steriele specimens. Ten slotte kunnen we de nood aan (toch wel arbeidsintensieve) microscopie beperken door selectieve bodems te enten.

Met het oog op automatisatie en 'lean' werken zou het nuttig zijn deze historisch gegroeide praktijk van selectie van cultuurmedia voor een aantal staalsoorten opnieuw in vraag te stellen. Dit om het aantal bodems, dat geënt wordt, eventueel te beperken. Ik wil even kort wijzen op het feit dat het hier gaat over routine enting, namelijk datgene dat sowieso geënt wordt op dag één voor een bepaalde staalsoort. Indien bijvoorbeeld naar aanleiding van klinische context en/of gramkleuring aan een bepaalde bacterie wordt gedacht, kan een selectieve plaat onmiddellijk of in tweede instantie worden bijgeënt. Vooral staalsoorten, die veel aangevraagd worden en waarvoor een uitgebreide 'work-up' nodig is, zijn hier dus van belang. Wat hieronder volgt, is geen exhaustieve lijst van alle staalsoorten, maar legt de focus op een aantal historisch gegroeide en soms intuïtief overbodig aanvoelende praktijken. Werkposten waar een minimum aan bodems geënt wordt, zoals urine en screeningsstalen, zullen niet besproken worden. Beperking van het aantal bodems is nuttig bij TLA omdat stalen op piekmomenten dikwijls massaal toekomen. Bodems in buizen, bijvoorbeeld thioglycolaat, stellen eveneens een probleem voor de meeste automaten. Door beperking van een aantal cultuurmedia zal er eveneens meer tijd vrijkomen in de bacteriologie keuken voor andere activiteiten (denk maar aan serotheek, absorptie en digestie, etc.).

De werkwijze in het UZ Leuven zal ook vergeleken worden met de richtlijnen volgens Garcia et al (21) en waar mogelijk met de Cumitech (1, 3, 4).

QUESTION(S)

1. *Huidige praktijk in UZ Leuven en richtlijnen?*
2. *Welke veranderingen kunnen we doorvoeren in de dagelijkse praktijk om het aantal agars dat wordt aangeboden aan de TLA te beperken?*
3. *Wat is het effect hiervan op workload en interpretatie van culturen?*

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "automation, laboratory", "bacteriology", "Clinical laboratory Information Systems/Instrumentation", "laboratories", "microbiology", "agar", Salmonella enterical/isolation & purification", "humans"*
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)*
- 3) *Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>, Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/hta.htm>))*
- 4) *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; <http://diabetes.niddk.nih.gov/>), Westgard QC (<http://www.westgard.com>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clial>)*
- 5) *UpToDate Online version 12.2 (2004)*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*
 1. Sharp, S. E., A. Robinson, M. Saubolle, M. Santa Cruz, K. Carroll, and V. Baselski. 2004. *Cumitech 7B, Lower Respiratory Tract Infections*. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, D.C.
 2. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 331-351.
 3. Gilligan, P.H., J.M. Janda, M.A. Carmali, and J.M. Miller. 1992. *Cumitech 12A, Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea*. Coordinating ed., F.S. Nolte. ASM Press, Washington, D.C.
 4. Simor, A.E., F.J. Roberts, J.A. Smith. 1988. *Cumitech 23, Infections of the skin and subcutaneous tissues*. Coordinating ed., J.A. Smith. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 2) *Reviews*
 5. Ledebor NA, Dallas SD. Point-counterpoint: The automated clinical microbiology laboratory: fact or fantasy? *J Clin Microbiol*. 2014; Mar 19. [Epub ahead of print]
 6. Novak SM, Marlowe EM. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clin Lab Med* 2013; 33: 567-588
 7. Greub G, Prod'hom. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 655-660.
 8. Burnham CA, Dunne WM Jr, Greub G et al. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clin Chem* 2013; 59:1696-702.
 9. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 35-51.

10. York M. Managing microbiology specimens workups: Top 10 list of do's and don'ts. *Clinical Microbiology Newsletter* 2006; 28 (11): 81-87
11. Miller JM. Cost-saving strategies for diagnostic microbiology laboratories. *Clin. Microbial. Newsl.* 2013; 35: 24.
12. Thielman NM, Guerrant RL. Acute infectious diarrhea. *N Engl J Med* 2004; 350: 38-47.
13. Polage CR, Solnick JV en Cohen SH. Nosomial diarrhea: evaluation and treatment of causes other than *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2012; 55(7): 982-9.

3) Original Articles

14. Bourbeau PP, Swartz BL. First evaluation of the WASP, a new automated microbiology plating instrument. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1101-1106.
15. Nagendra S, Bourbeau P, Brechter S, et al. Sampling variability in the microbiological evaluation of expectorated sputa and endotracheal aspirates. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 2344-2347.
16. Silletti RP, Ailey E, Sun S, et al. Microbiologic and clinical value of primary broth cultures of wound specimens collected with swabs. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2003-2006.
17. Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. Comparison of the Copan ESwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1655-1658.
18. Saegeman V, Flamaing J en Muller J. Clinical evaluation of the Copan ESwab for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection and culture of wounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30: 943-949.
19. Bauer TM, Lalvani A, Fehrenbach J. Derivation and validation of guidelines for stool cultures for enterpathogenic bacteria other than *clostridium difficile* in hospitalized adults. *JAMA.* 2001; 285: 313-319.
20. Kelly S, Cormican M, Parke L, et al. Cost-effective methods for isolation of *Salmonella enterica* in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (10): 3369.
21. Dunn C, Martin WJ. Comparison of media for isolation of *Salmonellae* and *Shigellae* from fecal specimens. *Appl Microbiol.* 1971; 22: 17-22.
22. Altorfer R, Altwegg M, Zollinger-Iten J, et al. Growth of *Aeromonas spp.* on cefsulodin-irgasan-novobiocin agar selective for *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:478-480.

4) Reference Works, Handbooks and Databases

23. Garcia L. et al. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3th ed 2007, 3.4.1; 3.8; 3.11.2; 3.13.
24. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al. *Manual of Clinical Microbiology Volume I*, 10th ed 2011.
25. Verhaegen J, Lagrou K, Vandeven J en Pyckavet M. *Medische microbiologie voor laboratoriumtechnologen*, deel 2. Uitgeverij Acco Leuven 2013, p93-98, p102-104, p106-122 .

5) Posters, "grey literature", presentations

26. Kieffer D., Verhaegen J. Gebruik van selectieve bodem voor *Burkholderia cepacia* complex bij mucoviscidose. CAT 2009-UZ Leuven
27. Van Laer C, De Beenhouwer H. Microbiologische uitwerking en rapportering van niet-steriele stalen. CAT 2012-OLVZ Aalst

ABBREVIATIONS

BBE	Bacteroides Bile Esculine agar
BG	Brilliant Green Agar
CHOC	Chocolate agar
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
EIA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EMB	Eosin Methylene Blue agar
GN	Gram Negatief
HEK	HEKtoen enteric agar
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry
McC	MacConkey agar
MH	Mueller Hinton agar
MLT	Medisch Laboratorium Technoloog
MSA	Mannitol Salt Agar
CNA	Colistine Nalidixine agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEA	Phenylethyl Alcohol Agar
PEG-sonde	Percutane Endoscopische Gastrostomiesonde
SS	Salmonella-Shigella agar
TLA	Total Lab Automation
TSI	Triple Sugar Iron
WASP	Walk Away Specimen Processor
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate agar

Hieronder zal het entschema van de volgende staalsoorten van naderbij bekeken worden: hemoculturen, respiratoire stalen, variastalen en coproculturen. Kort wordt nog een klein luik gisten/schimmel-culturen besproken.

Hemoculturen

1. Huidige praktijk in UZ leuven:

Afhankelijk van de gramkleuring worden de volgende cultuurmedia routinematig geënt:

- Bloedagar: (universele bodem) (eventueel + optochine)
- Mannitol salt agar: (selectieve bodem voor *Staphylococcus spp.*)
- MacConkey agar: (selectieve bodem voor gramnegatieve bacteriën)
- Chocolate agar: bij negatieve gramkleuring
- MH-agar : voor rechtstreeks antibiogram streptokokken
- Gal-eskuline: bij streptokokken

Indien dit geïndiceerd is, wordt tevens een bloedagar + amikacine anaëroob geënt.

2. Wat zeggen de richtlijnen?

De richtlijnen volgens Garcia et al (23, tabel 3.4.1-2) verschillen in dat opzicht dat zij, met uitzondering voor stafylokokken, steeds een CHOC enten. Zij enten ook vaker een anaërobe bloedplaat en werken met verschillende soorten disks op de bloedplaat (optochine, colistine, oxacilline, etc.). Testen zoals de CAMP-test en coagulase tube test staan ook nog vermeld. Dit kunnen we verklaren vanuit een pre-MALDI TOF tijdperk. Ons routinematig entschema is in vergelijking redelijk eenvoudig.

3. Welke veranderingen kunnen we doorvoeren in de dagelijkse praktijk om het aantal agars dat wordt aangeboden aan de TLA te beperken?

Alhoewel we de hemoculturen hier even van naderbij bekijken, moeten we ons realiseren dat het niet mogelijk zal zijn deze met de automaten te enten. Deze worden namelijk aangeprikt met een naald. Technisch is dit haast onmogelijk met een automatisch enttoestel te realiseren. Daarnaast zou er een te groot gevaar zijn voor contaminatie. Het enten van de bodems zal dus een activiteit zijn die manueel op de werkpost gebeurt. Het incuberen van de cultuurmedia en het evalueren van groei kan wel met de automaten gebeuren.

Deze routinematige enting wordt voor elke hemocultuur gedaan, ook wanneer er meerdere hemoculturen van éénzelfde patiënt positief zijn. Zou het eventueel mogelijk zijn hier enkele te elimineren per patiënt wanneer het afnamemedium (aeroob/anaeroob) en de gramkleuring (microscopie) identiek zijn? In het Jessa ziekenhuis in Hasselt ent men slecht één koppel (aeroob+anaeroob) van dezelfde patiënt indien meerdere koppels, afgenomen binnen dezelfde 24 uur, positief zijn. Als tegenargument kunnen we hier vermelden dat hemoculturen veruit de belangrijkste staalsoorten zijn in het microbiologisch laboratorium en het toch steeds aangewezen is minstens een bloedagar te enten. Al is het om bepaalde mengsels en verschillende species niet te missen.

Aangezien we tegenwoordig alle gegroeide culturen met MALDI TOF-MS identificeren, kunnen we selectieve media, zoals McC-agar en MSA, in vraag stellen. Tevens levert de gal-eskuline, gebruikt voor de identificatie van enterokokken, geen extra informatie meer op. Om het huidige nut van deze bodems na te gaan, hebben we gedurende twee weken (periode van

24/03/14 tot en met 6/04/14) 371 positieve hemoculturen dubbel afgelezen. We lazen de gegroeide culturen eerst zonder het gebruik van MSA/McC/gal-eskuline af en daarna met de bijkomende informatie van deze selectieve media. Wat betreft identificatie zagen we geen extra voordeel van deze drie media. Echter, voor onzuivere culturen (mengsels van verschillende bacteriën), kwam vooral de McC en zeldzaam de MSA van pas. Tevens doet het feit dat een bacterie niet groeit op McC samen met de gramkleuring denken aan de HACEK groep, *Moraxella spp.*, *Haemophilus influenzae*,... In deze twee weken was de McC tweemaal nuttig voor het onderscheiden van gramnegatieve staven. Eenmaal ging dit om twee soorten *E. coli* (met verschillend antibiogram), die heel mooi waren te onderscheiden op de McC (coliform en lactose-negatief; zie figuur 1) en op de bloedagar als identieke kolonies groeiden. Het tweede staal was een mengsel van een *E. coli*, een *P. mirabilis* en een *E. faecalis*. Op de bloedplaat was de *E. coli* overzwermd door de *Proteus*. Vanaf de McC was er voldoende materiaal voor identificatie en antibiogram van de *E. coli*.



Figuur 1

De enige mogelijke indicatie voor de MSA berustte op een staal dat 's nachts positief was geworden. Deze worden in UZ Leuven 's nachts overgeënt op zowel bloedagar, McC, MSA en CHOC aangezien ze pas de volgende ochtend microscopisch bekeken worden. Bij deze hemocultuur ging het om een mengsel van een *P. mirabilis* met een *S. epidermidis*. Hiervoor werd de MSA gebruikt voor de identificatie van de *S. epidermidis*, omdat de bloedplaat volledig overgroeid was. Normaliter, wanneer microscopie enting voorafgaat, wordt reeds bij het vaststellen van een dergelijk mengsel op de gramkleuring, een CNA-plaat bijgeënt. Vanaf hier kunnen we dan zowel identificatie als antibiogram inzetten. De MSA is minder betrouwbaar voor antibiogram. Zonder MSA zou de identificatie dus een dag vertraging opgelopen hebben.

De gal-eskuline bleek binnen de periode van twee weken nooit nuttig te zijn. Deze zou nog van belang kunnen zijn wanneer men na 4 uur incubatie reeds een onderscheid zou willen maken tussen streptokokken en enterokokken. Enterokokken geven namelijk een zwarte verkleuring van dit medium.

4. Wat is het effect hiervan wat betreft interpretatie van culturen?

De MSA levert een zeer geringe bijdrage tot de interpretatie van bloedculturen. Meestal gaat het hier om een reincultuur. Deze selectieve bodem draagt ook niet meer bij tot de identificatie van de bacterie. Het afschaffen van de MSA kan bijgevolg geïmplementeerd worden. Het afschaffen van de McC is een moeilijkere zaak aangezien een dag vertraging bij hemoculturen een stap achteruit is. Volgens mij zal het tijdverlies dat we oplopen zonder McC doorwegen op de tijdwinst die we zullen hebben door deze plaat niet te enten.

Respiratoire stalen

1. Huidige praktijk in UZ leuven:

Elk respiratoir staal wordt geënt op 4 verschillende cultuurmedia:

- Bloedagar + optochine
- Haemophilus agar (selectieve bodem voor *Haemophilus spp.*) + chloro
- McC-agar
- MSA

Dit geldt zowel voor sputum, endotracheale aspiraten, bronchoalveolaire lavages als nasopharyngeale wissers van mucoviscidose patiënten. De Haemophilus agar is een met X - en V-factor aangerijkte bloedagar waaraan bacitracine en vancomycine worden toegevoegd. Voor muco-stalen wordt eveneens een BUCE-plaat geënt (een selectief medium voor Burkholderia spp., de introductie hiervan werd reeds besproken in de CAT van Dr. Kieffer, 26). Bij aanvraag voor gisten/schimmels wordt een sabouraud geënt en een C-plaat (chromogene agar voor gisten) in geval van bronchoalveolaire lavages.

2. Wat zeggen de richtlijnen?

Volgens Garcia et al (23, 3.11.2.7) moeten de volgende media geënt worden:

- Bloedagar + (optochine)
- Choc of horse blood agar met bacitracine
- McC of EMB

Bij Mucoviscidose stalen vermelden zij, naast deze hierboven vermeld, de volgende cultuurmedia:

- MSA
- McC
- CNA
- BCSEA (*Burkholderia cepacia* selective agar)

Volgens de Cumitech (1):

- Bloedagar
- Choc
- McC

Volgens Manual (24, p 255): analoog aan Garcia (bloedagar, choc en McC)

Opvallend is dat bij Garcia enkel een MSA geënt wordt bij muco-stalen. Dit kan verklaard worden door het feit dat de detectie van *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bij mucoviscidose patiënten steeds als significant wordt beschouwd ongeacht het aantal (23, 3.11.3.8)(9).

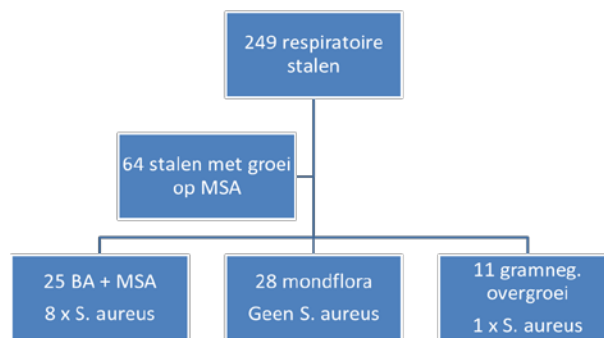
3. Welke veranderingen kunnen we doorvoeren in de dagelijkse praktijk om het aantal agars dat wordt aangeboden aan de TLA te beperken?

- MSA, retrospectief:

Over een periode van één week (18-24/01/2014) zijn we retrospectief nagegaan bij welke respiratoire stalen de MSA bijkomende informatie opleverde, dit zowel voor sputum,

endotracheale aspiraten als bronchoalveolaire lavages. Intuïtief kunnen we stellen dat deze bodem mogelijk een voordeel heeft wanneer er bijvoorbeeld overgroei is van gramnegatieve bacteriën op de bloedplaat. Zonder MSA missen we in deze situatie de aanwezige stafylokokken. Wanneer we zien dat de stafylokokken aanwezig op de bloedplaat mannitol negatief zijn, kunnen we nalaten deze op de MALDI-TOF MS te zetten. Dit aangezien niet-*aureus* stafylokokken in ieder geval niet verder worden uitgewerkt. Het nader identificeren van stafylokokken blijkt ook afhankelijk te zijn van de laboratoriumtechnoloog die afleest.

De retrospectieve analyse van respiratoire stalen leverde de volgende resultaten op:



Figuur 2

Van de 249 stalen werden er 64 weerhouden met groei op MSA. Van deze 64 stalen waren er 25 zowel duidelijk gegroeid op bloedagar als op MSA met 8 maal een (*S. aureus*). Enerzijds kan men met ervaring, afgaande op het morfologisch uitzicht op bloedagar, de *S. aureus* eruit halen en is de MSA overbodig. Anderzijds is de MSA een goed hulpmiddel voor het ongeïndeneerd oog om te weten welke kolonies op MALDI-TOF MS moeten geïdentificeerd worden en welke niet. Voor 28 stalen was er groei gezien op MSA (mannitol negatief) en werd er op de bloedagar een microbiële samenstelling gezien, overeenkomstig met monoflora. Dit wordt niet verder uitgewerkt. Tenslotte waren er 11 stalen met gramnegatieve overgroei op de bloedagar. Hiervan werd één staal weerhouden met groei van *S. aureus*, geïdentificeerd vanop MSA. Deze zouden we dus gemist hebben.

De klinische relevantie van de *S. aureus* in dit sputumstaal was niet duidelijk. De patiënt lag reeds langere tijd in het ziekenhuis en dit zou ook op louter kolonisatie kunnen wijzen. Men stelt zelfs dat kleine hoeveelheden *S. aureus* in een mengflora niet gerapporteerd dienen te worden, tenzij er methicilline resistentie gedetecteerd wordt (10, 27). Ook in de Garcia (23, tabel 3.11.2-1) vinden we terug dat wanneer de hoeveelheid *S. aureus* minder of gelijk is aan de monoflora dit enkel in geval van MRSA moet vermeld worden. In UZ Leuven hangt dit af van het staalsoort (sputum, endotracheaal aspiraats, BAL of PBS (protected brush specimen), zie bijlage 2). Bij duidelijke aanwezigheid van monoflora en afwezigheid van polymorfonucleairen wordt een *S. aureus* pas gerapporteerd vanaf een semikwantitatieve score van 2+ (tweede kwadrant van de streepenting) in een sputumstaal. In een BAL-vocht wordt daarentegen met elke *S. aureus* verdergewerkt. Bij nalezen van het verslag van de patiënt vond ik tevens geen therapie-aanpassing terug. Een bijkomend argument is het feit dat er steeds microscopisch onderzoek gebeurt. Wanneer er op de gramkleuring naast gramnegatieven ook in ruime mate stafylokokken aanwezig zijn (dus niet enkel als onderdeel van monoflora), kunnen we steeds nog een *S. aureus* identificatie agar (SAID) of een CNA (colistine nalidixine agar) bij-enten om deze in tweede instantie te identificeren en op antibiogram te zetten. In de Cumitech (1) wordt de gramkleuring zelfs belangrijker geacht dan de kweek. Bij deze patiënt werden er echter geen stafylokokken in de gramkleuring vermeld. Een tegenargument is dan weer dat microscopie een onderzoek is met een grote interindividuele variabiliteit en een slechte reproduceerbaarheid (15). Belangrijk ook bij het nagaan van de significantie van een geïsoleerde kiem, is het nagaan van de kwaliteit van het staal. De kwaliteit van het sputumstaal was goed; er werden namelijk veel neutrofielen in

teruggevonden en slechts zeldzame mondepitheelcellen. In UZ Leuven worden er geen rejectiecriteria gehanteerd voor respiratoire stalen. We kunnen besluiten, afgaande op deze retrospectieve analyse, dat er weinig nut van de MSA werd aangetoond.

- McC, retrospectief

Op dezelfde manier hebben we nagegaan wat het nut is van een McC agar. De McC is zeer nuttig bij mengsels van verschillende gramnegatieve staven op de bloed/Haemophilus agar en bij overgroei door mondflora op bloedagar. Op McC wordt een onderscheid gemaakt tussen lactose-negatieven en coliformen. Tevens wordt de uitzwerming van *P. mirabilis* geremd. Voor evaluatie van de McC bekeken we culturen op eenzelfde manier als hierboven vermeld voor de MSA. Volgens de richtlijnen (Garcia et al, 23) moeten enterobacteriaceae niet uitgewerkt worden wanneer ze in minder of evenveel aantal aanwezig zijn als mondflora, tenzij de cultuur afkomstig is van een immuungecompromitteerde patiënt. Non-fermenters moeten steeds uitgewerkt worden. De procedure in UZ Leuven voor uitwerken van enterobacteriaceae in sputum (bijlage 2) is hetzelfde als voor *S. aureus*. Kort samengevat zullen we zonder gebruik van McC in sommige gevallen gramnegatieve staven hetzij missen, hetzij pas een dag later zuiver hebben voor identificatie en antibiogram. Wederom is het hier belangrijk te kijken naar de klinische relevantie van de zaken die we eventueel missen.

4. Wat is het effect hiervan wat betreft interpretatie van culturen?

- MSA, prospectief

Met de voorgaande retrospectieve analyse, kreeg ik reeds een idee over mogelijke problemen bij het aflezen van sputumstalen zonder gebruik van de MSA. In de volgmap van de respiratoire stalen is het echter niet steeds duidelijk met welk medium er is verdergewerkt. Een dergelijke retrospectieve analyse is dus niet waterdicht. Daarom heb ik deze problemen prospectief nog eens getoetst, ook met de bedoeling andere mogelijke knelpunten te observeren. Er hangt ook veel af van de entingstechniek (bijvoorbeeld te dikke enting) en van de expertise van diegene die de gegroeide culturen interpreteert.

81 stalen werden dubbel afgelezen, namelijk met en zonder behulp van de MSA. Hiervan zouden zes stalen met groei van *S. aureus* gemist zijn. In totaal vonden we elf keer een *S. aureus* en zagen we groei op 25 MSA platen. Hierbij moet wel vermeld worden dat drie stalen van eenzelfde patiënt met een longtransplantatie waren, met steeds een gramnegatieve overgroei op de bloedplaat. Het ging hier om één bronchoalveolaire lavage en twee bronchusaspiraten. De kwaliteit van deze stalen was goed. Deze kweken moeten we als relevant beschouwen, al was één kweek genoeg voor het verder klinisch beleid. Verder waren er twee sputumculturen waarbij de relevantie van de isolatie van *S. aureus* minder eenduidig was. Bij beide patiënten was het respiratoire ongemak niet het hoofdprobleem, ze werden niet behandeld met antibioticatherapie. Bij microscopie werden eveneens meer mondepitheelcellen gezien dan neutrofielen. Tenslotte werd groei van *S. aureus* in het laatste sputumstaal, van goede kwaliteit, als relevant beschouwd en behandeld. Dit was een patiënt met een exacerbatie van COPD.

Het verschil in cijfers tussen het aantal gemiste *S. aureus* met de vorige paragraaf kan verklaard worden door het feit dat er variabiliteit is in diegene die de agars ent (dikke versus dunne enting) en diegene die de culturen interpreteert. Tevens werd er in het totaal relatief minder *S. aureus* gekweekt in het retrospectieve deel. Het gaat hier steeds over zeer kleine steekproeven, dus toeval speelt hier ook een rol. Afgaande op dit prospectief gedeelte kunnen we besluiten dat de MSA bodem bij respiratoire stalen toch zijn nut bewijst. We zouden hier 6 op 11 culturen met *S. aureus* gemist hebben. Wanneer we de duplicaten van die ene patiënt weglaten, zijn dit 4 op 9 culturen met *S. aureus* waarvan twee relevant voor het verder klinisch beleid.

- McC, prospectief

Met behulp van een kleine prospectieve analyse bekwamen we de volgende resultaten. Op 81 stalen werden er negen weerhouden waarbij de McC van pas kwam. In totaal waren er 26 culturen met groei van gramnegatieve staven op McC.

Op vijf bloed/Haemophilus agars was er groei van mondflora/gisten (mondflora wordt geïnhibeerd op de Haemophilus bodem) zodat herkenning, identificatie en antibiogram bemoeilijkt werden. Op één staal was er op de bloedagar een overgroei van stafylokokken en op de Haemophilus agar een mengsel van drie verschillende, moeilijk te onderscheiden gramnegatieve staven. Op één staal werd op de bloedagar overgroei gezien van stafylokokken en op de Haemophilusagar enkel gisten. Op de McC zagen we hier groei van *S. maltophilia*. Bij een andere cultuur was er op de McC reeds groei op dag één en zagen we op de bloedagar slechts groei op dag twee. Bij een laatste cultuur zagen we op zowel bloedagar als Haemophilusagar een reincultuur, maar op McC een mengsel van twee soorten gramnegatieve staven.

Wat was de klinische relevantie? Twee gegroeide culturen werden beschouwd als kolonisatie en niet behandeld. Vijf gegroeide culturen waren relevant (1 BAL en 4x sputum). De klinische context was tweemaal longtransplantatie, eenmaal muco-exacerbatie (*P. aeruginosa*), eenmaal muco-kolonisatie (*P. aeruginosa*) en tenslotte was er een patiënt die omwille van een pneumonie op intensieve zorgen lag. De twee overige sputumstalen waren van slechte kwaliteit. Het ging om twee patiënten die immuungecompromitteerd waren. De relevantie was hier echter minder duidelijk aangezien ze beiden ook al langer in het ziekenhuis verbleven. We kunnen hieruit besluiten dat ook het gebruik van McC nuttig is in het makkelijker isoleren van gramnegatieve staven. Op 26 culturen zouden we in totaal 9 gramnegatieve staven, waarvan 5 duidelijk relevante stalen, gemist hebben of zou er een dag vertraging opgelopen zijn.

Wondvocht/etter stalen

Bij het retrospectief nagaan van de, zoals we in UZ Leuven noemen, variastalen, probeerden we de focus te leggen op die stalen die kwantitatief voor de grootste workload zorgen. We deden dit over een periode van 2 dagen (28/04/2014 en 30/04/2014). Op 216 stalen onderscheidde we de volgende drie grote groepen. Er waren 121 wondvocht/etter-stalen, 36 genitale stalen en 20 biopsie-stalen. De 39 overige stalen bestonden uit redonvochten, punctievochten, draintips, lumbaalvocht, stalen van keel, oor, etc. In deze CAT gaan we in op de eerste groep van wondvocht/etter-stalen. Bij oppervlakkige, open wonden en abscessen is het vaak moeilijk onderscheid te maken tussen echte pathogenen en koloniserende micro-organismen. Belangrijk is te differentiëren tussen wondvochten afgenomen met een wisser, etter bekomen door fijne naald aspiratie en etter bekomen door punctie en aspiratie door intacte huid. Bij deze laatste gaan we ervan uit dat elk micro-organisme dat gekweekt wordt van belang is. Een wisser is echter geen ideaal afname medium, daar er contaminatie kan plaatsvinden van commensale flora. Biopsies van patiënten worden overgebracht in een grote bouillon en elke dag nagekeken op troebelheid. Van een troebel staal wordt een gramkleuring uitgevoerd en aan de hand van de bevindingen worden de juiste bodems geënt. Het is nog niet mogelijk dit proces te automatiseren en hier zal ik ook niet over uitwijden.

1. Huidige praktijk in UZ Leuven

Voor een wondvocht/etter worden in UZ Leuven standaard de volgende media geënt:

- Bloedagar
- McC

- MSA
- Thioglycolaat: universele bodem
- (BBE): voor abdominale stalen
- (Anaërobe bloedagar)

De groep 'wondvocht/etter' is een heel ruim begrip. We kunnen hierin een verdere opdeling maken (zie tabel I).

wondvocht/etter	121
divers*	48
brandwonden	31
operatie, 240	15
operatie 905	10
abdominaal	8
huid	4
stuit	2
PEG-sonde	2
diabetische voet	1

Tabel I

*dit zijn vooral oppervlakkige wondes, insteekplaatsen/pockets van katheter, etc.

Uitzondering van dit klassieke entschema zijn de wondvocht/etters, afgenomen op een eSwab, die van de operatiezaal in Pellenberg (eenheid 240) komen. Deze worden enkel op bloedagar en in een thioglycolaat geënt aangezien het hier meestal om een steriliteitscontrole gaat (tenzij bij een etterig staal). Eenzelfde redenering wordt gemaakt voor oppervlakkige en diepe stalen afkomstig van het operatiekwartier in Gasthuisberg (eenheid 905).

Een groot aandeel van de wondvocht/etter-stalen is afkomstig van de afdeling brandwonden. Bij abdominale origine van een staal wordt steeds een BBE bodem bijgeënt. Voor PEG-sondes en stuiten wordt steeds contact opgenomen met de clinicus of verdere uitwerking hier zinvol is. Op de laatste vier groepen van tabel I gaan we niet verder in omdat dit een beperkt aantal stalen betreft.

2. Wat zeggen de richtlijnen?

Volgens Garcia et al (23, 3.13.1.7) moeten de volgende media geënt worden voor wonden/abcessen en weke delen:

- Bloedagar
- Choc bij peroperatieve stalen, biopsies, gesloten aspiraties en genitale stalen
- McC of EMB, niet bij zuiver chirurgische stalen
- NAC of PEA wanneer mogelijke overgroei door gramnegatieve staven
- Bouillon: biopsie of FNA (niet bij wisser) - staalsoort en transport
- (Thayer-Martin: *N. gonorrhoeae*)
- (Anaëroob medium)

De Cumitech (4) volgt voor de verscheidene entschemata een klinische classificatie. Ze maken een indeling volgens presentatie en de daarbij te verwachten pathogeen (bijvoorbeeld: erysipelas, cellulitis, furunkel, karbonkel, brandwonde, postoperatieve wonde, etc.). Het zou te omslachtig zijn de schemata in deze CAT uit te schrijven. Bij gebrek aan klinische aanvraaginfo op de bon is het in UZ Leuven echter vaak moeilijk duidelijkheid te scheppen over de aard van het staal en de klinische context. Een verbetering wat betreft communicatie zou de interpretatie van de culturen makkelijker maken en de kwaliteit verbeteren.

3. Welke veranderingen kunnen we doorvoeren in de dagelijkse praktijk om het aantal agars dat wordt aangeboden aan de TLA te beperken?

Analoog aan de sputumculturen hebben we nagegaan wat de opbrengst is van MSA, McC en thioglycolaat in de verschillende wondvocht/etter-stalen (tabel 2). Van de 98 wondvocht/etter-stalen (divers + abdominaal), konden we slechts één cultuur weerhouden waar de MSA nuttig was. Er was groei op 35 MSA-platen.

Analoog zagen we dat de McC nodig was in zes situaties. Er werden gramnegatieve staven geïsoleerd in 22 culturen. Bij vier stalen waren er mengsels van gramnegatieve staven met respectievelijk overgroei van *P. mirabilis* en driemaal *P. aeruginosa*. In een andere cultuur was het moeilijk de gramnegatieve staven te onderscheiden van een *S. aureus* en een aantal potentiële contaminanten (*Corynebacterium sp.*). De kwaliteit van dit staal was minder goed. De derde cultuur was een mengsel van drie soorten gramnegatieve staven.

Staalsoort	Totaal	STA	MSA nuttig	GNS	McC nuttig	thio nuttig	geen groei
divers	48	19	1	11	4	6	14
abdominaal	9	1	0	1	0	1	3
brandwonden	32	13	0	7	2	2	10
peroperatief	9	2	0	3	0	1	5
Totaal	98	35	1	22	6	10	32

Tabel 2

Thioglycolaat wordt vooral gebruikt om anaëroben te isoleren. Dit medium wordt ook geënt om kleine hoeveelheden bacteriën (vooral uit punctievochten en wissers) op te kweken, omdat in deze vloeibare bodem een groter inoculum kan gebracht worden (25). Deze vloeibare media in buizen kunnen heden echter nog niet door de automaten geënt worden. Hier wordt wel aan gewerkt. Bij sommige wissers, bijvoorbeeld van de afdelingen brandwonden, dermatologie, operatiezaal en Pellenberg, wordt geen gramkleuring uitgevoerd tenzij het een etterig staal betreft. Wanneer er een overgroei is van een bepaalde bacterie op de bloedagar of bij discordantie tussen de groei op de platen en de groei in de thio, wordt deze ook gekleurd en alsnog overgeënt op geschikte bodems afhankelijk van de gramkleuring. Op een totaal van 98 stalen, waarvan 32 culturen niet gegroeid waren, kwam de thio van pas bij 10 culturen. Bij één staal isoleerden we klinisch relevante anaëroben (groei onderaan + schuim op de thio). In 6 stalen groeiden bacteriën/gisten (2 x *E. faecalis*, 1 x *S. agalactiae*, 1 x *S. aureus*, 1 x *E. coli* en 1 x *C. albicans*) enkel in de thioglycolaat en was de initiële gramkleuring hetzij negatief, hetzij niet uitgevoerd. Drie culturen waren overgroeid met gramnegatieve staven waardoor telkens een *Enterococcus faecalis* zou gemist zijn, de gramkleuring was wederom hetzij negatief, hetzij niet uitgevoerd.

1. Wat is het effect hiervan wat betreft interpretatie van culturen?

De cultuur, waarin we een stafylokok gemist hebben, werd gekweekt vanaf een wisser. Deze werd afgenomen van een wonde ter hoogte van de top van de teen bij een onregelde diabeticus (niet aangevraagd met klinische info; diabeet) waarbij enkel lokale wondzorg werd toegepast. De bloedagar was volledig overgroeid met *P. aeruginosa* en in de gramkleuring werden enkel gramnegatieve staven gezien. De *S. aureus* (MRSA) zou zonder MSA moeilijker gedetecteerd zijn. Echter in de thioglycolaat zou deze duidelijk moeten groeien als pijpjes dieper in de bouillon, daar *P. aeruginosa* strikt aëroob is en enkel bovenaan in de thio groeit. De MSA afschaffen in de routinenting van wondvocht/etter stalen is volgens mij mogelijk. We hebben namelijk steeds de thioglycolaat die we grondig moeten aflezen om verschillende groeipatronen te herkennen. In geval van een duidelijke overgroei van een bepaalde bacterie op de bloedagar is het ook steeds aangewezen in eerste instantie het staal nogmaals te gramkleuren en in tweede lijn eventueel de thioglycolaat te kleuren.

Twee stalen met overgroei van *P. aeruginosa* op McC waren stalen afkomstig van het brandwondencentrum. Hier worden patiënten gescreend op koloniserende organismen om reeds richting te geven voor antibioticatherapie mocht de patiënt sepsis ontwikkelen. Het nut van de frequentie van het afnemen van deze 'screeningsstalen' (ongeveer tweemaal per week) is minder duidelijk. De McC elimineren is moeilijk aangezien het de uitvoering van identificatie en antibiogram moeilijker maakt en aangezien we bacteriën zullen missen. Dit merken we bij bijna de helft van de stalen met groei van gramnegatieve staven op McC. Vooral mengsels van verschillende soorten gramnegatieve staven vormen een probleem, daar deze ook niet in de thioglycolaat zullen opgemerkt worden. Mengsels kunnen echter, mits de nodige ervaring, ook soms op de bloedagar gedetecteerd worden. De MLT's gaven tevens aan dat afschaffen van de McC geen optie is. Zoals reeds voor de hemoculturen en respiratoire stalen aangehaald, weegt deze belemmering zwaarder dan het moeten enten van een extra selectieve plaat.

Hoewel het enten van een thioglycolaat voor een staal, afgenomen met een wisser, door de richtlijnen volgens Garcia (23) en volgens een artikel (11) over kostenefficiënt werken in het laboratorium wordt afgeraden, zagen wij toch een voordeel. Garcia et al baseert zich echter op een artikel van Silletti et al (16), waar aangetoond werd dat de enting van deze wissers in primaire bouillons zeer weinig significante, microbiologische informatie oplevert. Dit artikel en tevens ook de richtlijnen volgens Garcia, zijn echter niet gebaseerd op de 'nieuwere' generatie wissers, het gaat hier nog om de oudere dacron wissers. De nieuwe generatie wissers, zoals eSwab van Copan die in UZ Leuven gebruikt worden, zijn wel geschikt voor het transport van anaëroben en 'fastidious' micro-organismen (17), waarvoor we de thioglycolaat nodig hebben. Een studie van Saegeman et al (18) vergeleek de eSwab met een katoenen swab en een Amies gel wisser voor MRSA-detectie en voor cultuur van orthopedische- en brandwonden. De eSwab had een betere performantie wat betreft gramkleuring en een betere recovery van bacteriën. Hiernaast zagen we vaak dat ook niet-fastidious bacteriën in de thio gegroeid waren en niet op de andere cultuurmedia. Tevens bewees de thio zijn nut bij overgroei door gramnegatieve staven, al dient hier onderstreept te worden dat een controle gramkleuring rechtstreeks van het staal ook dient te gebeuren.

Coproculturen

1. Huidige praktijk in UZ Leuven:

Voor een routine faecescultuur worden in UZ Leuven routinematig 2 vloeibare aanrijkingsbodems en 5 vaste, selectieve cultuurmedia geënt:

Vloeibaar (aanrijking *Salmonella* spp.):

- Selenietbouillon
- Rappaport voor *Salmonella*

Vast:

- McC agar: kleurloze (lactose negatieve) kolonies
- XLD agar: rode kolonies, selectief medium voor *Salmonella*/*Shigella* spp.
- CIN (1/2): rode kolonies, selectief medium voor *Yersinia enterocolitica*/*Aeromonas* spp.
- BGA: rode kolonies, selectief medium voor *Salmonella* spp. (NIET *S. Typhi*/*Paratyphi*)
- *Campylobacter* agar

Een MSA of SAID wordt geënt wanneer op gramkleuring overwegend stafylokokken werden gezien ter opsporing van *S. aureus*.

2. Wat zeggen de richtlijnen?

Volgens Garcia et al (23, 3.8.1.5) moeten de volgende media geënt worden:

- Bloedagar
- McC
- HEK, XLD, CHROMagar Salmonella of SS
- Aanrijking: Selenietbouillon of GN broth

CIN en BGA worden hier slechts aangehaald als speciale, hoog selectieve media die geënt kunnen worden wanneer de prevalentie in een bepaalde regio hoog is van respectievelijk *Yersinia spp.* of *Salmonella spp.* of bij bijvoorbeeld epidemies.

Volgens Cumitech (3) moet er in de routine vooral gezocht worden naar *Salmonella*, *Shigella* en *Campylobacter spp.*. Daarnaast kunnen naargelang geografie en patiëntkarakteristieken andere enteropathogenen opgespoord worden. Zij stellen daarvoor de volgende entpraktijk voor:

- Bloedagar
- McC of EMB
- Hoog-selectief: vooral HEK en XLD
- Aanrijking
- *Campylobacter* agar

3. Welke veranderingen kunnen we doorvoeren in de dagelijkse praktijk om het aantal agars dat wordt aangeboden aan de TLA te beperken?

Het rendement van faecesstalen is zeer laag. Op alle aangevraagde culturen wordt er slechts bij een kleine hoeveelheid enteropathogenen gekweekt. In 2013 werden in UZ Leuven op 6674 aanvragen voor klassieke coprocultuur 180 enteropathogenen gekweekt (rendement van 2.7 %, waarvan 14 follow-up stalen). Dit ligt in de lijn met een artikel van Thielman et al (12, NEJM), waarin met een rendement van 1.5-5.6% geeft (resultaten van zes studies uitgevoerd in de VS tussen 1980-1997). Dit wordt deels toegeschreven aan het feit dat een groot deel van acute diarree gevallen viraal in origine is. Hier zal de bacteriële cultuur dus negatief zijn.

De belangrijkste bacteriële pathogenen zijn: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* en *Yersinia enterocolitica*. Bij patiënten die behandeld worden met breed spectrum antibiotica is *Clostridium difficile* een belangrijke verwekker van diarree. Deze laatste wordt in UZ Leuven echter niet meer opgespoord door middel van kweek, maar door middel van toxine - en glutamaatdehydrogenasedetectie met EIA en/of PCR. Op speciale aanvraag, bijvoorbeeld bij bloederige diarree of HUS, kan er ook geïnvesteerd worden naar enterohemorragische *Escherichia coli* (EHEC). De rol van *Aeromonas spp.* en *Plesiomonas spp.* als oorzaak van acute diarree is minder duidelijk. In de cursus 'Medische microbiologie voor laboratoriumtechnologen' (25) staat vermeld dat deze enkel moeten gerapporteerd worden bij acute diarree en monotone groei van deze potentiële pathogenen (zie ook infra).

Per dag werden er in 2013 in UZ Leuven gemiddeld 18 faecesstalen voor klassieke coprocultuur (gemiddeld 20,5 op weekdays en 13 op weekenddagen) verwerkt. Per monster worden er in totaal (dag 1 en dag 2) 5,5 vaste agarbodems en 2 aanrijkingen geënt. Dit zijn 99 agars en 36 aanrijkingen, wat toch een aanzienlijk aantal is dat per dag wordt verwerkt. Naar aanleiding van deze notie en op basis van een artikel over mogelijke kostenbesparingen in het laboratorium (11), heb ik nagegaan of er eventueel een mogelijkheid bestaat het rendement te verhogen. In de IDSA (Infectious Diseases Society of America) guidelines over infectieuze diarree (2), in het artikel van Thielman et al (12), in de richtlijnen volgens Garcia et al (23) en in de Cumitech (3) haalt men aan dat het niet nuttig is een klassieke coprocultuur aan te vragen bij patiënten die reeds drie dagen gehospitaliseerd zijn. De meest frequent geïsoleerde bacteriële veroorzakers van acute diarree, die in de cultuur worden opgespoord, loopt men meestal buiten het ziekenhuis op. Dit zijn patiënten die opgenomen worden in het ziekenhuis met acute diarree klachten en waarbij men normaliter een faecescultuur afneemt bij opname.

Het merendeel van de nosocomiale diarree gevallen berust op *Clostridium difficile* of een niet-infectieuze oorzaak (13). Denk hier bijvoorbeeld maar aan medicatie, onderliggende ziekte en enterale voeding als oorzaak van diarree. Het leek me zinvol dit criterium van 3 dagen te toetsen aan stalen die verwerkt worden in het UZ Leuven. Hoeveel van de aangevraagde faecesculturen zijn daadwerkelijk pas na de derde hospitalisatiedag afgenomen? Als dit percentage niet groot is, heeft het natuurlijk niet veel zin hierin beperkingen te stellen, aangezien we dan niet veel kunnen besparen op entbodems. Op een week tijd (januari 2014) bleken dit 72 stalen op een totaal van 132 stalen te zijn (54.3 %). Dit is slecht een steekproef, maar demonstreert wel dat het nuttig is dit verder te onderzoeken. Moesten we deze allemaal elimineren, dan zouden we het aantal agars ongeveer kunnen halveren.

Tevens hebben we nagegaan bij hoeveel patiënten met detectie van enteropathogenen of positieve faecescultuur in het jaar 2013, het staal positief werd, wanneer afgenomen na de derde hospitalisatiedag. Dit wordt verder besproken bij 'interpretatie van culturen', zie infra.

In de richtlijnen volgens Garcia en Cumitech (23, 2) worden BGA en CIN niet routinematig geënt. In UZ Leuven wordt dit wel steeds gedaan. Is dit een nuttige praktijk? Zouden we *Salmonella spp.* en *Yersinia spp.* missen, moesten we dit niet meer doen? Bij het nagaan van de geïsoleerde *Salmonella spp.* in 2013/2014 (22 isolaten) vonden we dat deze allemaal groeiden op XLD. Sterker nog, 3 isolaten werden niet geïsoleerd op BGA. Dit was echter een kleine steekproef van 22 isolaten. De BGA had geen enkele meerwaarde ten opzichte van de XLD. In een artikel van Kelly et al (20) wordt dit bevestigd op een totaal van 312 *Salmonella spp.* isolaten. In een ouder artikel van Dunn et al (21) vond men dat XLD de grootste recovery had van *Salmonella* isolaten zowel bij primair enten als bij aanrijking ten opzichte van andere selectieve media, waaronder BGA. Deze bevindingen waren echter niet significant. Bij het nalezen van de referenties van de bijsluiters (BGA CM0329, Oxoid) vond ik geen artikel terug dat het nut van BGA bij humane faecesstalen aantoont. Tevens worden *S. Typhi* en *Paratyphi* geïnhibeerd op BGA. Het elimineren van de BGA, afgaande op deze kleine steekproef, de richtlijnen (Garcia et al) en de voorgaande artikels, zou ik doorvoeren.

In 2013 en begin 2014 hadden we slechts zes *Yersinia spp.* isolaten, waarvan twee pathogene *Y. enterocolitica* en één *Y. pseudotuberculosis*. Eén hiervan werd uit een variastaal geïsoleerd en dus niet op CIN geïdentificeerd. De overige 5 isolaten, afkomstig van coproculturen, werden uitsluitend vanaf de CIN gekweekt. Enerzijds kunnen we hieruit besluiten dat we met het afschaffen van de CIN agar enteropathogene *Yersinia spp.* zullen missen. Anderzijds kweekten we op een totaal van 6674 aanvragen in 2013 voor klassieke faecescultuur slechts één pathogene *Y. enterocolitica*.

In 2013 kweekten we 41 *Aeromonas spp.* waarvan 24 isolaten enkel op CIN geïsoleerd werden (van één isolaat hadden we geen informatie meer voorhanden). Deze stammen zouden we ook missen zonder enten van CIN. Echter, in het verleden werden deze ook gemist. Wanneer kleurloze kolonies werden gedetecteerd op McC of rode kolonies op CIN, werden deze op TSI overgeënt, uitsluitend voor het detecteren van *Shigella*, *Salmonella* en *Yersinia spp.*

4. Wat is het effect hiervan wat betreft interpretatie van culturen?

Op 180 positieve faecesculturen vonden we 25 patiënten waarbij enteropathogenen (niet *C. difficile*) geïsoleerd werden bij afname van het faecesstaal na de derde hospitalisatiedag (tabel 3). De enteropathogenen die geïsoleerd werden, bestonden uit 2 *Salmonella spp.*, 10 *Campylobacter spp.*, 12 *Aeromonas spp.* en 1 *S. aureus*. Deze patiënten zouden we dus gemist hebben met het invoeren van de drie-dagen-regel.

Positieve coproculturen 2013	Totaal (180)	≥ 3 -day-rule	modified-3-day-rule
<i>Campylobacter spp.</i>	113	10	5
<i>Aeromonas/Plesiomonas spp.</i>	42	12	4

<i>Salmonella spp.</i>	19	2	0
<i>Shigella spp.</i>	1	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0
<i>S. aureus</i>	1	1	0
<i>EHEC</i>	1	0	0
<i>ESCO</i>	1	0	0
<i>KLPN</i>	1	0	0

Tabel 3

In een artikel van Bauer et al (19), waarop de IDSA guidelines (2) zich baseren, spreekt men echter over de 'modified 3-day rule'. Sporadisch kan nosocomiale diarree voorkomen door blootstelling aan enteropathogenen in het ziekenhuis of door overgroei bij asymptomatische dragers. Dit artikel formuleert een genuanceerde vorm van de drie-dagen-regel. Zij identificeerden bepaalde omstandigheden en patiëntkarakteristieken waarbij een faecescultuur na drie dagen hospitalisatie toch nog aan de orde kan zijn (zie tabel 4). Neutropenie, HIV-infectie en patiënten ouder dan 65 jaar met comorbiditeiten zijn hiervan voorbeelden. De definitie van de termen in de tabel heb ik in bijlage toegevoegd. Immunosuppressie op zich wordt echter niet als uitzonderingsregel gebruikt omdat de kostenbesparing dan volledig wordt teniet gedaan, aangezien het leeuwendeel van de patiënten immuungecompromitteerd is (19).

Table 3. Proposed Guidelines for Stool Cultures in Hospitalized Adults (Modified 3-Day Rule)*

Obtain stool culture in the presence of:

- Community-acquired diarrhea (if onset \leq 72 h of admission)
- Nosocomial diarrhea (if onset $>$ 72 h of admission) AND at least 1 of the following:
 - Age \geq 65 years with preexisting comorbidity
 - HIV infection
 - Neutropenia
 - Suspected nosocomial outbreak
- Suspected nondiarrheal manifestations of enteric infections

Maximum of 2 repeat examinations in a given patient

*For definitions of preexisting comorbidity see the "Methods" section. For definitions of neutropenia and suspected nondiarrheal manifestations of enteric infections, see Table 2. HIV indicates human immunodeficiency virus.

Tabel 4

Deze 'modified 3-day rule' werd bekomen (derivatie cohorte) door retrospectief de karakteristieken na te gaan over een periode van 10 jaar van alle patiënten met een positieve faecescultuur na drie dagen hospitalisatie. Prospectief keek men gedurende 7 maanden de patiënthistoriek na op de dag van de aanvraag en paste men de criteria, bekomen in het retrospectieve deel, post hoc hierop toe. De bekomen 'modified 3-day rule' werd dan nog eens gevalideerd (validatie cohorte) in drie verschillende instituten: op 27000 stoelgangstalen weerhield men 65 culturen met groei van enteropathogenen (niet *C.difficile*) \geq 3 dagen hospitalisatie, waarvan 2 culturen zouden gemist zijn met de 'modified 3-day rule'. Voor deze twee patiënten was echter geen antibioticatherapie aangewezen.

Met de drie-dagen-regel zouden wij, zoals eerder vermeld, 25 patiënten met primo-isolatie van enteropathogenen (niet *C. difficile*) gemist hebben in het jaar 2013. Met deze resultaten is het volgens mij niet aangewezen deze regel toe te passen, omdat er toch een reële kans bestaat dat we enteropathogenen zullen missen. Moesten we een 5-dagen regel toepassen in

plaats van een 3-dagen regel, zouden we nog steeds 19 patiënten (in plaats van 25 patiënten) met een positieve coprocultuur gemist hebben, dit is dus ook geen oplossing. Bij 5 van de 25 gemiste patiënten, stelden we vast dat er tijdens hospitalisatie reeds een coprocultuur werd afgenomen, die negatief bleek te zijn. Missen we dan enteropathogenen met onze huidige kweekmethode? Het is ook mogelijk dat deze patiënten dragers waren, zodat de enteropathogeen slechts in lage concentraties aanwezig was. Het verschil in resultaten kan dan verklaard worden doordat bijvoorbeeld bij de eerste analyse een kleinere hoeveelheid faeces geënt werd dan bij de tweede analyse.

Nosocomiale diarree > 72h	Aantal patiënten
leeftijd ≥ 65 jaar + comorbiditeiten	12
HIV-infectie	1
neutropenie	3
vermoeden nosocomiale uitbraak	0
Gemist	9
Totaal	25

Tabel 5

Het leek me aangewezen de 'modified 3-day rule' op deze 25 patiënten toe te passen (zie tabel 5). Alhoewel het merendeel van de patiënten met nosocomiale diarree en een positieve faecescultuur immuungecompromitteerd was, misten we met de toepassing van de strenge regels, weergegeven in tabel 4, 9 patiënten. Wederom, dit is slechts een kleine steefproef. Wanneer we kijken naar de klinische relevantie zien we dat er bij 2 op 9 patiënten (1 met *Campylobacter spp.* en 1 met *Aeromonas spp.*) die gemist werden antibioticatherapie werd opgestart. Echter, voor de meeste enteritiden is hoe dan ook therapie met antibiotica niet noodzakelijk. Dit is eerder een argument voor toepassing van de 'modified-3-day rule'. De implementatie hiervan is echter niet gemakkelijk communiceerbaar naar het ziekenhuis. Zouden we dan best werken met een trigger-systeem bij aanvraag van cultuur of dit vermelden in de labogids?

Zoals reeds werd aangehaald, zouden ongeveer de helft van de *Aeromonas spp.* gemist worden bij afschaffen van CIN agar. De klinische relevantie van deze bacterie is echter niet duidelijk. Aangezien een heel aantal *Aeromonas spp.* niet met diarree geassocieerd zijn, raadt Cumitech (2) aan deze bacterie enkel te rapporteren wanneer ze in hoge aantallen op de agar groeien. Kleine aantallen kunnen louter op transiënte kolonisatie wijzen. Dit sluit aan bij wat in de cursus van professor Verhaegen (zie supra, 25) staat. Bij navraag van MLT's en assistenten, vonden we echter dat *Aeromonas spp.* in praktijk steeds gerapporteerd worden in UZ Leuven. Cumitech (2) geeft aan dat het enten van CIN agar in de routine niet verdedigbaar is aangezien de frequentie van *Y. enterocolitica* in de meeste centra laag is. Echter, ze geven tevens aan dat, daar met dit medium ook *Aeromonas spp.* worden geïsoleerd (22), het te overwegen is de CIN agar toch op te nemen in de routine-enting.

Gisten/schimmel-aanvragen

Wanneer op een kweek schimmels en gisten worden aangevraagd, wordt hiervoor in de meeste gevallen een sabouraud agar geënt in een glazen buis. Deze zijn echter niet te behandelen met een automatische enter. Daarenboven zijn de kleine glazen buizen, die tot op heden vaak gebruikt worden, reeds moeilijk manueel hanteerbaar. Deze worden geënt omdat wissers te kort zijn om uitgestreken te worden in de langere buizen. Fungi zijn vaak traaggroeiend. Op een petrischaal met sabouraud agar bestaat het risico op uitdroging aangezien deze stalen voor een termijn van 3 weken bewaard worden. Is het echter nodig bij alle stalen een sabouraud in een glazen buis te enten voor een langere bewaartermijn? Voor gisten volstaat een sabouraudagar in petrischaal. Hiervoor heb ik ten eerste nagegaan voor

welke stalen vooral aanvraag van gisten en schimmels gebeurt. Ten tweede heb ik nagegaan hoe vaak in deze stalen effectief schimmels gekweekt worden. In januari 2014 werden er in totaal 1634 aanvragen uitgevoerd voor gisten/schimmel kweek. Hiervan namen de respiratoire stalen het grootste deel in beslag, namelijk 496 aanvragen. De tweede grote groep zijn de vaginaculturen, hiervoor waren er 321 aanvragen en de derde grote groep de SAM of 'selectieve antibiotica modulatie' stalen met in het totaal 216 aanvragen. Deze laatste groep is de groep van surveillance stalen van faeces/lies/perineum, mondholte/keel en neus. Hierin worden enkel gramnegatieven (facultatief anaëroben), *S. aureus* en gisten opgezocht. Wanneer we dan naar het aantal gegroeide schimmels kijken in deze laatste twee groepen, is dit zeer minimaal (in 2013 groeiden in totaal 2 schimmels uit vagina stalen en 11 schimmels uit SAM stalen). We kunnen ons tevens vragen stellen bij de relevantie van een gegroeide schimmel in een dergelijke cultuur. Dit zijn quasi altijd contaminanten. De overstap voor vagina-en SAM-stalen van sabouraud buizen naar agarplaten, kan zeker geïmplementeerd worden. Voor zowel BAL-vochten, als bijvoorbeeld SAM-stalen worden nog steeds zowel Sabouraud als chromogene agar voor gisten geënt. Het gebruik van deze chromogene agar is met de komst van MALDI-TOF MS niet meer nodig en kan volgens mij afgeschaft worden.

TO DO/ACTIONS

- 1) *Nut van een bodem nagaan voor een groot aantal stalen, zodat we meer significante uitspraken kunnen doen.*
- 2) *Cultuurmedia/staalsoorten, die hier niet zijn besproken, verder evalueren.*
- 3) *Een vergelijking maken tussen de protocols van verschillende ziekenhuizen.*

ATTACHMENTS

Attachment 1

Definitie comorbiditeit artikel Bauer et al (19):

Comorbidity was defined as any preexisting disease that resulted in permanently altered organ function, eg, cirrhosis, end-stage renal failure, chronic obstructive pulmonary disease, active inflammatory bowel disease, leukemia, or hemiparesis due to cerebrovascular accident.¹⁷ Immunosuppression was defined as human immunodeficiency virus (HIV) infection, leukemia, malignant lymphoma, plasmocytoma, cirrhosis, diabetes mellitus, end-stage renal failure, and use of cytotoxic or immunosuppressive drugs or corticosteroids at dosages equivalent to or greater than 20 mg/d of prednisone.¹⁸ Nosocomial diarrhea was defined as the onset of 3 or more soft or liquid bowel movements at least 72 hours after admission,¹⁹ and neutropenia as a peripheral neutrophil count of less than $0.5 \times 10^9/L$. The yield of stool culture was defined as the proportion of stool cultures growing enteropathogenic bacteria other than *C difficile* that had not been previously reported in that patient, ie, first positive reports

Attachment 2

SPUTUM		potentiële pathogenen		hoeveelheid		identificatie		AB	
macroscopisch	grankleurig	streptokokken							
mucoïd	wat vermelden - speciale aandacht voor:		-pneumokokken	elke		α-hemolytische kolonies, oploeiende S, kolonies met centrale afblating en verheven rand, sommige kapselvormen vormen mucoïde kolonies (SOP-038 Tabel 1)		AB op MH+bloed, resultaat (oxa, erythro, tetra) invullen op werklst "Abpneumokok"	
mucojulant	cellen:								
purulent	plavesepathische cellen								
bloederig	poly/nuclearen								
waterig									
	bacteriën: - vermield aanwezigheid van mondfloora (gevarieerde flora met o.a. grampositieve kokken, gramnegatieve diplokokken, gramnegatieve staven,...)		β-hemolytische streptokokken	duidelijke aanwezigheid		Maldibiotyper of Strep Mondiaal groep A= SRPY, groep B=SRAG, andere worden geantwoord met groepsletter. Groep D le beschouwen als mondfloora (uitzondering: indien reincultuur bij patiënten op intensieve diensten		In de regel gevoelig aan peni. AB op MH + bloed, resultaat voor erythro en clinda invullen op werklst "Afstreptokokken"	
	- vermield op semi-kwantitatieve manier overwegende flora van: grampositieve diplokokken (pneumokokken)	Moraxella catarrhalis		duidelijke aanwezigheid		witte (euru), niet hemolytische kolonies, schijnen over bodem, Maldibiotyper of hydrolyse van thioyltrine positief (SOP-038 Tabel 8)		β-lactamase test, indien +: AB dispenser "Moraxella catarrhalis" en resultaten invullen op werklst "Abmoraxella catarrhalis"	
	gramnegatieve diplokokken (M. catarrhalis)	Haemophilus influenzae		duidelijke aanwezigheid		gladde, niet-hemolytische kolonies (geur) op Haemophilusbodem. Maldibiotyper of groei op TSA enkel rond schijfje met X + V, ONPG test negatief (SOP-038 Tabel 6)		enkel β-lactamase test uitvoeren en antwoorden als H influenzae beta-lactamase positief of negatief	
	gramnegatieve staven (enterobacteriën, non-fermenters en H. influenzae)	gramnegatieve staven		indien rein of >+, indien gram geen PN en MFL +++ pas uitwerken bij groei vanaf ++					
	stafylokokken		-enterobacteriën	indien rein of >+, indien gram geen PN en MFL +++ pas uitwerken bij groei vanaf ++		Maldibiotyper of Vleek		Vleek	
			-non-fermenters	indien rein of >+, indien gram geen PN en MFL +++ pas uitwerken bij groei vanaf ++		Maldibiotyper of Vleek		Vleek	
			-cave Pasteurella	indien rein of >+		groeit NIET op MacConkey! Enkel groei op BA en Haemophilusbodem. Identificatie: Maldibiotyper of Vleek.		Vleek	
		stafylokokken		elke (bij duidelijke aanwezigheid van mondfloora: vanaf ++)		Maldibiotyper of coagulase tube test + DNase test		Vleek	
		giststen		enkel groei vermelden indien aangevraagd; bij rijke groei +++ ook cultuur antwoorden als niet aangevraagd nooit antwoorden indien ook groei van andere mondfloora (na uitsluiting van C, neoformans/gaati; zie SOP-031 Bijlage 2)				enkel op aanvraag. E-test op een RPMII-agar (SOP-034 Bijlage 2 'Manuele gevoeligheidsbepalingen'	
		fungi		elke		Schimmels doorgeven aan de werkpost identificaties.		nvt	

BRONCHUSLAVAGEBAL en PROTECTED SPECIMEN BRUSH (PSB)		potentiële pathogenen		hoeveelheid		identificatie		AB	
macroscopisch	gramkleuring								
mucoïd	wat vermelden - speciale aandacht voor	streptokokken							
purulent	cellen:	-pneumokokken	elke						
watrig	plaveseleptheelcellen								
bloederig	polynucleairen								
	bacteriën: - vermeld aanwezigheid van mondfloor (gevarieerde flora met o.a. grampositieve kokken, gramnegatieve diplokokken, gramnegatieve staven,...) - vermeld op semi-quantitatieve manier overwegende flora van: grampositieve diplokokken (pneumokokken) gramnegatieve diplokokken (M. catarrhalis) gramnegatieve staven (enterobacteriën, non-fermenters en H. influenzae) stafylokokken gisten	-β-hemolytische streptokokken	elke						
		enterokokken	indien reïncultuur (voor stalen van intensieve eenheden)						
		Moraxella catarrhalis	elke						
		Haemophilus influenzae	elke						
		gramnegatieven							
		-enterobacteriën	elke						
		-non-fermenters	elke						
		-cave Pasteurella	elke						
		stafylokokken							
		-STAU	elke						
		Legionella	enkel op aanvraag						
		gisten	zeldzaam, ++ of +++ (enkel indien aangevraagd, anders mondfloor tenzij +++) (na uitsluiting van C. neoformans/gatii; zie SOP-031 Bijlage 2)						
		fungi	elke						