



CAT Critically Appraised Topic

Microbiologische uitwerking en rapportering van niet-steriele stalen

Author: Apr. Christine Van Laer

Supervisor: Dr. Hans De Beenhouwer, Dr. Kristien Van Vaerenbergh, Apr. An Boel

Search/methodology verified by: Dr. Hans De Beenhouwer

Date: 20 maart 2012

CLINICAL BOTTOM LINE

De microbiologische analyse van niet-steriele stalen is afhankelijk van talrijke factoren. Zowel de uitwerking als interpretatie van de routinecultuur worden hierdoor beïnvloed. Het is zeer belangrijk dat er naar gestreefd wordt dat wat men rapporteert klinisch significant is. Wij zullen ons hierbij beperken tot genitale en respiratoire stalen.

Bij genitale stalen zijn bacteriële vaginose en candidiasis de meest gediagnosticeerde infecties bij vrouwen. Het microscopisch onderzoek is vooral belangrijk in het kader van de diagnose van bacteriële vaginose. Bij de aanwezigheid van gisten wordt vaak slechts onderscheid gemaakt tussen *C. albicans* en *Candida non-albicans*. Routine cultuur is niet steeds aangewezen, maar indien uitgevoerd worden een aantal pathogenen steeds opgespoord, terwijl andere potentiële pathogenen uitgewerkt worden afhankelijk van de context. De leeftijd van de patiënt speelt een belangrijk rol, doordat de samenstelling van de vaginale flora verandert met de leeftijd. Extra aandacht voor stalen van kinderen is nodig. Urethrale stalen afgenomen bij mannen zijn hoofdzakelijk gericht op het opsporen van *N. gonorrhoeae* en *C. trachomatis*. Het klinisch belang van *Ureaplasma* spp. en *Mycoplasma* spp. staat ter discussie.

De microbiële cultuur van respiratoire stalen is sterk afhankelijk van de wijze van staalafname. Een goede staalafname is belangrijk om de aanwezigheid van contaminerende commensale flora tot een minimum te beperken. Het microscopisch onderzoek geeft belangrijke informatie over de kwaliteit van het staal. Het is belangrijk de aanwezige epitheelcellen in de Gramkleuring te specificeren (bronchus- vs. plaveiselepitheel) en de aanwezigheid van PMN te rapporteren. Stalen van bovenste luchtwegen zijn per definitie gecontamineerd met flora van de bovenste luchtwegen. Deze worden geanalyseerd ter detectie van specifieke pathogenen, zoals *S. pyogenes*. Microbiologische diagnose van diepere respiratoire infecties is afhankelijk van een aantal factoren waaronder staaltype, aanwezigheid van mondflora, microscopisch onderzoek, Een goede interpretatie van de cultuur is zeer belangrijk: een overinterpretatie door het laboratorium moet vermeden worden. Een negatieve respiratoire cultuur sluit een infectie niet uit. De afzonderlijke rapportering van gisten geeft geen extra, nuttige informatie, maar leidt eerder tot misleidende resultaten.

Het is zeer belangrijk om enkel organismen op te sporen die pathogeen (kunnen) zijn voor een bepaalde plaats in of op het lichaam. De eerste stap bij de invoering van rejectie- of optimaliseringscriteria bestaat uit het maken van een overeenkomst en beslissing van welke criteria toegepast zullen worden.

Goede laboratoriumdiagnostiek steunt enerzijds op het gericht en correct aanvragen van laboratoriumanalyses door de behandelende artsen, maar anderzijds op goede richtlijnen en strategieën vanuit het laboratorium zelf voor zowel het aanvragen, uitwerken als het rapporteren⁴.

“If you report it, you must think it is significant”⁵

Deze stelling lijkt evident, maar is het in de praktijk niet steeds. Aangezien het rapporteren van micro-organismen vaak ook aanleiding geeft tot behandeling ervan, is het zeer belangrijk om een onderscheid te maken tussen commensale flora en kolonisatoren enerzijds en (mogelijke) pathogenen anderzijds. Een correcte uitwerking en rapportering van dergelijk niet-steriele stalen is daarom zeer belangrijk om over- en onderbehandeling te vermijden, maar niet altijd even eenvoudig in praktijk om te zetten. Vooreerst is er vanuit het laboratorium vaak weinig informatie betreffende de staalafname en evenzo geen beeld van de symptomen of kliniek van de patiënt⁵. Ten tweede is er een groot verschil tussen de cultuur van stalen vanuit plaatsen van het lichaam die normaal steriel zouden zijn of de cultuur van stalen waarbij commensale flora of koloniserende micro-organismen aanwezig zijn of kunnen zijn.

De cultuur van respiratoire en genitale stalen in het OLV ziekenhuis in Aalst zal in kaart gebracht worden. Hierbij wordt extra aandacht geschonken aan de uitwerking en rapportering van de resultaten. Aan de hand van literatuurgegevens en beschreven richtlijnen zal er nagegaan worden of er aanpassingen nodig zijn voor de workflow en procedures van de cultuur van deze niet-steriele stalen. Niet alleen de uitvoering en uitwerking van de cultuur van niet-steriele stalen moet optimaal gebeuren, maar ook de manier van klinisch relevante rapportering is minstens even belangrijk. Naast het al dan niet rapporteren van de aanwezige micro-organismen of pathogenen, is ook het al dan niet uitvoeren van gevoeligheidsbepaling zeer belangrijk. Studies tonen aan dat de rapportering van een antibiogram klinici aanzet tot antibioticatherapie of therapieaanpassing²⁰.

De nadruk van deze CAT zal liggen op de routine microbiële kweek van de hierboven vermelde staalsoorten. Er zal niet verder ingegaan worden op de verschillende pathogenen die naast conventionele bacteriële kweek, met behulp van specifieke analyses en technieken opgespoord en geïdentificeerd kunnen worden.

QUESTION(S)

- 1) Hoe worden in het OLVZ Aalst de cultuur van niet-steriele stalen (respiratoire en genitale) aangepakt en de resultaten gerapporteerd?
- 2) Wat zijn de literatuurgegevens, guidelines betreffende de uitwerking en rapportering van culturen van vooropgestelde stalen?
- 3) Zijn er aanpassingen, veranderingen nodig in de huidige workflow van het OLVZ Aalst?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "bacterial vaginosis", "vulvovaginitis", "genital tract cultures", "urethritis men", "children vaginitis", "aspiration pneumonia", "interpretation Gram stain", "diagnosis pneumonia", "rejection criteria", "faryngitis",
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews;
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>)
- 4) UpToDate Online version 19.3 (2012)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) Guidelines and Recommendations

- ¹ Waites K. et al, Cumitech 10A Laboratory Diagnosis of Upper Respiratory Tract Infections, ASM press 2006
- ² Sharp S. et al, Cumitech 7B, Lower Respiratory Tract Infections, ASM press 2004
- ³ Busno A., Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis, IDSA guidelines, Clinical infectious Diseases 2002, 35: 113-125

2) Reviews

- ⁴ Lo T. et al, Avoiding laboratory pitfalls in infectious diseases, Postgrad Med Journal 2004, 80: 660-662
- ⁵ York M. et al, Managing Microbiology Specimen Workups: Top 10 list off Do's and Don't, Clinical microbiology newsletter 2006, 28 (11): 81-87
- ⁶ Barenfanger J. et al, Quality Assurances: Decreasing Clinically Irrelevant Testing from Clinical Microbiology Laboratories, part I, Clinical Microbiology Newsletter 2006, 28 (3): 17-24
- ⁷ Barenfanger J. et al, Quality Assurances: Decreasing Clinically Irrelevant Testing from Clinical Microbiology Laboratories, Part II, Clinical Microbiology Newsletter 2006, 28 (4): 25-297
- ⁸ Larsen B., Understanding the Bacterial Flora of the Female Genital Tract, Clinical Infectious Diseases 2001, 32: 69-77
- ⁹ Ilkit M., The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective, Critical Reviews in Microbiology 2011, 37 (3): 250-261
- ¹⁰ Sobel J, Vaginitis, New England Journal of Medicine 1997, 337: 1896-1903
- ¹¹ Granato P., Vaginitis: Clinical and Laboratory Aspects for Diagnosis, Clinical Microbiology Newsletter 2010, 32 (15): 111-116
- ¹² Donders G., Definition and classification of abnormal vaginal flora, Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology 2007, 21 (3): 355-373
- ¹³ Sobel J, Vulvovaginal candidosis, The Lancet 2007, 369: 1961-1971
- ¹⁴ Mylonas I. et al, Diagnosis of Vaginal Discharge by Wet Mount Microscopy: A simple and Underrated Method, Obstetrical and Gynecological Survey 2011, 66 (6): 359-368
- ¹⁵ Ishihara S., Mycoplasma genitalium urethritis in men, International Journal of Antimicrobial Agents 2004, 24S: 23-27
- ¹⁶ Bartlett J., Diagnostic Tests for Agents of Community-Acquired Pneumonia, Clinical Infectious Diseases 2011: 52 (suppl 4): 296-304
- ¹⁷ Barenfanger J. et al, Quality In, Quality out: Rejection Criteria and Guidelines for Commonly (Mis)Used Tests, Clinical Microbiology Newsletter 2000, 22 (9): 65-72
- ¹⁸ Campbell S. et al, The Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections, Journal of Clinical Microbiology 2011, 49 (9): 30-33
- ¹⁹ Robinson A. et al, Assessing Microbiology Test Orders and Specimen Quality, Clinical Microbiology Newsletter 2005, 27 (10): 78-82

3) Original Articles

- ²⁰Cunney R. et al, Interpretative reporting and selective antimicrobial susceptibility release in non-critical microbiology results, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000, 45: 705-708
- ²¹Nugent R. et al, Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation, *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29 (2): 297-301
- ²²Geisler W. et al, Vaginal leucocyte counts in women, with bacterial vaginosis: relation to vaginal and cervical infections, *Sexually Transmitted Infections* 2004, 80: 401-405
- ²³Kennedy M. et al, Vulvovaginal candidiasis Caused by Non-albicans Species: New Insights, *Current Infectious diseases reports* 2010, 12 (6): 465-470
- ²⁴Dennerstein G. et al, Pathogenicity of Non-albicans yeasts in the Vagina, *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2011, 15 (1): 33-36
- ²⁵Goldacre M. et al, Vaginal microbial flora in normal young women, *British Medical Journal* 1979, 1: 1450-1453
- ²⁶Cuadros J. et al, The aetiology of paediatric inflammatory vulvovaginitis, *European Journal of Pediatrics* 2004, 163: 105-107
- ²⁷Carroll K., Laboratory Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections: Controversy and Conundrums, *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40 (9): 3115-3120
- ²⁸Bowie W., Comparison of Gram stain and first-voided urine sediment in the diagnosis of urethritis, *Sexually Transmitted Diseases* 1978, 5 (2): 39
- ²⁹Janier M. et al, Male Urethritis with and Without Discharge: A Clinical and Microbiological Study, *Sexually Transmitted Diseases* 1995, 22 (4): 244-252
- ³⁰Zaoutis T. et al, The role of group C and group G streptococci in acute pharyngitis in children, *Clinical Microbiology and Infection* 2004, 10: 37-40
- ³¹Fox K. et al, Role of Beta-Hemolytic Group C Streptococci in Pharyngitis: Incidence and Biochemical Characteristics of *Streptococcus equisimilis* and *Streptococcus anginosus* in Patients and Healthy Controls, *Journal of Clinical Microbiology* 1993: 31 (4): 804-807
- ³²Bisno A. et al, Diagnosis of Strep Throat in Adults: Are Clinical Criteria Really Good Enough, *Clinical infectious Diseases* 2002, 35: 126-129
- ³³Barenfanger J. et al, Improved Outcomes Associated with Limiting identification of *Candida* spp. in Respiratory Specimens, *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41 (12): 5645-5649
- ³⁴Meersseman W. et al, Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study, *Intensive Care Medicine* 2009, 35: 1526-1531
- ³⁵Orellana M. et al, Sensitivity of Gram stain in the diagnosis of urethritis in men, *Sexually Transmitted infections* 2012: 1-4
- ⁴²Lourenco MC. Et al, Subclinical Infection of The Genital Tract With *Neisseria Meningitidis*, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2006, 10 (2): 154-155

4) Reference Works, Handbooks and Databases

- ³⁶Verhaegen J, Lagrou K. en Pyckavet M., *Medische microbiologie voor laboratoriumtechnologen*, deel 2, Uitgeverij Acco Leuven 2010, p 76-111
- ³⁷Garcia L. et al, *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3th ed 2007. p 1.1.1-4.13.3
- ³⁸Versalovic et al, *Manual of Clinical Microbiology Volume 1*, 10th ed 2011. p 253 - 260

5) Posters, "grey literature", presentations

- ³⁹Up to date online, 2012 - *Candida* vulvovaginitis
- ⁴⁰Up to date online, 2012 - Vulvovaginal complaints in the prepubertal child
- ⁴¹Up to date online, 2012 - Infectious causes of dysuria in adult men

ABBREVIATIONS

AST	antimicrobial susceptibility testing
BAL	broncho-alveolaire lavage
BV	bacteriële vaginose
CAP	community acquired pneumonia
CFU	colony-forming units
EBV	Epstein-Barr virus
GAS	groep A streptokokken
GBS	groep B streptokokken
HAP	hospital acquired pneumonia
HSV	Herpes Simplex Virus
ID	identificatie
MRSA	methicilline-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NGU	nongonococcal urethritis
PCR	polymerase chain reaction
PMN	polymorfonucleaire cellen
HPF	high-powered field (x1000)
LPF	low-powered field (x100)
VVC	vulvovaginale candidiasis

I. Inleiding

Rationale voor staalkeuze van type stalen die in deze CAT bestudeerd en besproken worden. Tot niet-steriele stalen behoren stalen afgenomen van plaatsen van het lichaam waarbij steeds commensale flora aanwezig is, of waarbij contaminatie met commensale flora vaak niet vermeden kan worden. Hiertoe behoren genitale stalen, respiratoire stalen, feces culturen, etters en urineculturen.

A. Genitale stalen

De huid en slijmvlies van de genitale tractus zijn sterk gekoloniseerd met commensale flora. De interpretatie van de routine cultuur van genitale stalen is afhankelijk van verschillende factoren en is voor een groot deel gebaseerd op een correcte interpretatie van resultaten van de cultuur. Dit is van toepassing op zowel genitale stalen afgenomen bij vrouwen, als bij urethrale stalen afgenomen bij mannen. De microbiologische analyse van genitale stalen vereist voldoende klinische inlichtingen, maar ook de aanvraag naar specifieke pathogenen is sterk aangeraden. Ten eerste is de cultuur van genitale stalen met het oog op het routinematig opsporen van alle mogelijke pathogenen of micro-organismen niet mogelijk. In deze stalen spoort men één specifiek pathogeen of een beperkt aantal pathogenen op⁶. Ten tweede leidt de aanwezigheid van een bepaald micro-organisme niet altijd tot de ontwikkeling van een ziekte/infectie. Zo zal de aanwezigheid van groep B streptokokken niet suggestief zijn voor een genitale infectie bij de vrouw in kwestie, maar kan de aanwezigheid belangrijke implicaties hebben op de foetus bij de bevalling^{6,7}. Richtlijnen en literatuurgegevens worden samengebracht om de uitwerking en interpretatie van genitale stalen te optimaliseren.

B. Respiratoire stalen

Een diverse en dense microbiële flora met zowel aerobe als anaerobe micro-organismen is aanwezig op de nasale en orale slijmvlies in aantallen van meer dan 10^{12} CFU/mL. Bij de interpretatie van respiratoire stalen moet men steeds een onderscheid proberen te maken tussen pathogenen, kolonisatoren en aanwezige commensale flora. Tabel 7 (attachment III) geeft de meest voorkomende oorzaken voor verschillende respiratoire infecties weer.

Er wordt een onderscheid gemaakt tussen de bovenste en de onderste luchtwegen. Bij de bovenste luchtwegen worden keelwissers, nasale afscheidingen of neuswissers en nasofaryngeale wissers of aspiraten beschreven. Deze kunnen eenvoudig afgenomen worden, maar zijn per definitie steeds gecontamineerd met mondflora. Stalen die afgenomen worden voor de diagnose van sinusitis, otitis externa en otitis media worden niet beschreven. De lage luchtwegen beneden glottis zijn normaal steriel of bevatten slechts schaarse commensalen uit de mond- en keelholte³⁶. Sputum stalen en meer en meer invasief afgenomen stalen (bronchiale en tracheale aspiraten en broncho-alveolaire lavages) worden in acht genomen. Ondanks het frequent voorkomen van diepere respiratoire infecties zijn diagnostische studies voor de detectie en identificatie van oorzakelijke organismen moeilijk³⁷.

'The culture of lower respiratory specimens may result in more unnecessary microbiologic effort than any other type of specimen' R.C. Bartlett, 1974

De uitwerking en interpretatie van de cultuur van deze stalen is afhankelijk van een aantal verschillende factoren. Literatuurgegevens en richtlijnen in het kader van routine bacteriële cultuur worden samengebracht. Op deze manier wordt de routine cultuur zoals deze in OLVZ in kaart gebracht en geoptimaliseerd.

C. Feces

De commensale darmflora bevat ongeveer 10^{11} bacteriën per gram feces en bestaat uit zowel aeroben als anaeroben³⁶. Gastro-enteritis heeft meestal een virale oorzaak, maar kan ook veroorzaakt worden door bacteriën en parasieten^{36,37}. Laboratoriumanalyses van feces kunnen het etiologische organisme voor diarree detecteren. Bij een routine cultuur worden steeds de volgende pathogenen opgespoord: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. en in specifieke omstandigheden toxine producerende *Clostridium difficile*. Bij aanwezigheid van witte bloedcellen wordt *Yersinia enterocolitica* opgespoord, bij aanwezigheid van rode bloedcellen Enterohemorragische *E. coli* (EHEC). Voor epidemiologisch onderzoek worden feces stalen in het OLVZ steeds gescreend voor de aanwezigheid van MRSA.

Bij de cultuur van feces stalen is relatief weinig interpretatie nodig, omdat bij feces cultuur enkel specifieke pathogenen opgespoord worden, onafhankelijk van de andere aanwezige micro-organismen. Bij aanwezigheid van één van bovenstaande pathogenen worden deze geïdentificeerd en gerapporteerd ongeacht de aanwezige hoeveelheid. Door deze beperkte interpretatie, wordt de routine bacteriële cultuur van fecesstalen niet in deze CAT opgenomen.

D. Etter / wissers

De interpretatie van culturen afgenomen op wissers is uitgebreid en is afhankelijk van zeer veel verschillende factoren. Parameters die een invloed hebben uitwerking en rapportering zijn onder meer: oorsprong van het staal, oppervlakkige vs. diepe staalafname, correcte staalafname, antibiotica gebruik, context van de patiënt, etc. De interpretatie van deze stalen, met een zeer uiteenlopend bereik van indicaties voor staalafname, is zeer divers en uitgebreid en wordt niet in deze CAT bekeken en besproken. Hiervoor is een afzonderlijke studie nodig om een goede uitwerking en rapportering in kaart te brengen en te optimaliseren.

E. Urines

De microbiologische uitwerking van urineculturen is zeer uitgebreid. Urine stalen zijn vaak gecontamineerd met urogenitale flora. Urinecultuur wordt in een afzonderlijke studie uitgewerkt op initiatief van de Bilulu groep (door Dr. Britt Van Meensel en Apr. Deborah Steensels).

Steriele stalen

Ook bij de microbiële cultuur van normaal steriele stalen is significante rapportering zeer belangrijk: aanwezige organismen kunnen het gevolg zijn van contaminatie, niet elke groei is steeds klinisch significant. Hemoculturen en vochten waaronder pleuravocht zijn hiervan een belangrijk voorbeeld. Bij de uitwerking en interpretatie van positieve hemoculturen moet een onderscheid gemaakt worden tussen kiemen die steeds significant zijn en als pathogeen beschouwd moeten worden en kiemen die potentiële contaminanten kunnen zijn of waarvan de aanwezigheid niet klinisch significant is⁶. Meer dan 60% van de aanwezige coagulase negatieve stafylokokken zijn contaminanten⁶. De interpretatie en rapportering van steriele stalen is zeer specifiek en valt buiten het bereik van deze CAT.

2. Genitale stalen

Algemeen

Genitale bacteriële infecties presenteren zich onder verschillende klinische syndromen. Bij vrouwen zijn dit voornamelijk vulvovaginitis, bacteriële vaginose (BV), urethritis, cervicitis, endometritis en ovariumabcessen³⁸. Bij de man kan dit zich uiten als prostatitis, urethritis, epididymitis of genitale zweren.

In de meeste stalen is normale flora van de huid en mucosale membranen aanwezig. Daarom is het belangrijk om voor een correcte diagnose van genitale infecties een onderscheid te maken tussen microbiologische pathogenen en normale genitale flora. Verder is een klinische interpretatie van de resultaten zeer belangrijk, want de aanwezigheid van een of meerdere potentiële pathogenen, leidt niet noodzakelijk tot klinische symptomen.

Bij cervicale en vaginale wissers is er steeds aanwezigheid van vaginale flora. Andere, meer invasief afgenomen, stalen die normaal steriel moeten zijn, worden strenger beoordeeld en afhankelijk van de kliniek en Gramkleuring anders uitgewerkt.

De microbiologische flora van de vrouwelijke genitale tractus is zeer complex en dynamisch¹³. De vaginale flora bestaat bij volwassen vrouwen voornamelijk uit lactobacillen. Naast lactobacillen, kunnen de genitaliën van de vrouw gekoloniseerd worden door onder andere *Corynebacterium* spp., *Gardnerella vaginalis*, coagulase negatieve stafylokokken, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus* spp., *E. coli*, peptostreptokokken en andere anaeroben en gisten³⁷. De normale vaginale bacteriële flora, met vnl. lactobacillen, heeft een belangrijke rol in de preventie van bacteriële vaginale infecties en de transmissie van pathogenen⁹. De samenstelling van de genitale flora is afhankelijk van de leeftijd. Bij kinderen tot voor de vruchtbare periode bestaat de flora voornamelijk uit coagulase negatieve stafylokokken en *Corynebacterium* spp., terwijl bij menopauzale vrouwen het aantal *Enterobacteriaceae* toeneemt³⁷.

De urethra bij de man bevat normaal relatief weinig flora. Tot deze flora kunnen coagulase negatieve stafylokokken, microkokken, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium* spp. en viridans streptokokken behoren.

Genitale infecties bij vrouwen worden vaak veroorzaakt door commensale endogene micro-organismen, zoals *Gardnerella vaginalis* en groep B streptokokken⁸. Onder andere gastheerfactoren kunnen ertoe bijdragen dat deze commensalen pathogeen worden. De verschillende pathogenen zijn alle geassocieerd met specifieke klinische vormen van genitale infecties, waardoor de aanvragende arts in functie van het type en de locatie van infectie bepaalde analyses kan/zal aanvragen.

Eén van de meest voorkomende klinische beelden is infectieuze vaginitis. De klinische symptomen van vaginitis zijn aspecifiek en kunnen ook niet-infectieuze oorzaken hebben, waardoor voor een correcte diagnose een microbiologische onderzoek vereist is^{10,11}. Infectieuze vaginitis wordt in 90% van de gevallen veroorzaakt door één (of soms door een combinatie) van volgende drie microbiële pathogenen: *Trichomonas vaginalis*, overgroei van gisten, vnl. *Candida* spp. of bacteriële vaginose (BV), veroorzaakt door *Gardnerella vaginalis* in combinatie met verschillende anaeroben ten nadele van lactobacillen^{9,10,11}. De andere 5 tot 10% van de infecties omvatten HSV 1 en 2, urogenitale *Mycoplasma* spp., anaeroben, maar ook occasioneel andere micro-organismen¹¹. Tabel 1 geeft een algemeen overzicht van de differentiële diagnose van vaginitis veroorzaakt door BV, candidiasis en *Trichomonas vaginalis*.

TABLE 2. DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF VAGINITIS.*

VARIABLE	NORMAL	VULVOVAGINAL CANDIDIASIS	BACTERIAL VAGINOSIS†	TRICHOMONIASIS	ATROPHIC VAGINITIS
Symptoms	None or mild, transient	Pruritus, soreness, change in discharge, dyspareunia	Malodorous discharge, no dyspareunia	Malodorous, purulent discharge; dyspareunia	Dyspareunia, vaginal dryness
Signs	—	Vulvar erythema, edema, fissure	Adherent discharge	Purulent discharge, vulvo-vaginal erythema	Vestibular and vaginal thinning
pH	4.0–4.5	4.0–4.5	>4.5	5–6.0	>6.0
Amine test	Negative	Negative	Positive (~70–80%)	Often positive	Negative
Saline microscopy	PMN:EC ratio <1; rods dominate; squames +++	PMN:EC <1; rods dominate; squames +++; pseudohyphae (~40%)	PMN:EC <1; loss of rods; increased coccobacilli; clue cells (>90%)	PMN ++++; mixed flora; motile trichomonads (60%)	PMN + to ++; loss of rods; increased cocci and coliforms; parabasal cells
10% potassium hydroxide examination	Negative	Pseudohyphae (~70%)	Negative	Negative	Negative
Miscellaneous	—	Culture if microscopy negative	Culture of no value	Culture if microscopy negative	—
Differential diagnosis	Physiologic leukorrhea	Contact irritant or allergic vulvitis, chemical irritation, focal vulvitis (vulvodynia)		Purulent vaginitis, desquamative inflammatory vaginitis, atrophic vaginitis plus secondary infection, erosive lichen planus	

*PMN denotes polymorphonuclear leukocytes, and EC vaginal epithelial cells.

†For bacterial vaginosis the criteria of Amsel et al.⁸ require the presence of three of four clinical signs for diagnosis: homogeneous discharge, a positive whiff-amine test, pH >4.5, and the presence of clue cells.

Tabel 1: Differentiële diagnose van vaginitis¹⁰

Bij de kweek van genitale stalen behoren volgende staalsoorten: vulva – cervix – urethra. De verschillende stalen worden op gelijkaardige manier uitgewerkt. De screening naar groep B streptokokken (GBS) bij zwangere vrouwen wordt uitgevoerd op een gecombineerd vulvo-anaal staal. Deze screening wordt in een geheel verschillende context aangevraagd: niet omwille van vaginale klachten bij de vrouw, maar omwille van preventie van een perinatale besmetting van de neonatus. Hierbij wordt uitsluitend de aanwezigheid van groep B streptokokken opgespoord.

Microscopisch onderzoek

Microscopisch onderzoek, zowel Gramkleuring als rechtstreeks onderzoek, is van groot belang voor de volledige analyse en interpretatie van genitale culturen, voornamelijk in de diagnostiek van bacteriële vaginose (zie verder)²¹. Bij genitale stalen wordt steeds een Gramkleuring gemaakt. De resultaten van de cultuur moeten steeds geïnterpreteerd worden samen met de resultaten van het rechtstreeks onderzoek en Gramkleuring. Het rechtstreeks microscopisch onderzoek geeft informatie over de aanwezigheid van gisten, *Trichomonas vaginalis*, maar ook 'Clue cells' kunnen hierin herkend worden.

OLVZ

Bij elk genitaal staal wordt een microscopisch onderzoek, zowel rechtstreeks als Gramkleuring uitgevoerd. De aanwezigheid van polymorfonucleaire cellen (PMN) en epitheelcellen wordt steeds gerapporteerd met daarbij een specifieke vermelding voor de aanwezigheid van 'Clue cells'. Zowel de aan- als afwezigheid van lactobacillen wordt gerapporteerd. Andere micro-organismen, zoals Gramnegatieve staven, Grampositieve kokken, Gramvariabele staven, etc. worden vermeld als deze duidelijk aanwezig zijn. Elke aanwezigheid van gisten wordt weergegeven. Hiervoor wordt best gescreend met een kleinere vergroting (10x50).

Bacteriële vaginose

Bacteriële vaginose is de belangrijkste oorzaak van vaginitis en is verantwoordelijk voor 40 tot 50% van de infecties. Bacteriële vaginose is een complexe verandering in vaginale flora en wordt niet veroorzaakt door de aanwezigheid van één micro-organisme. Er is een shift van normale vaginale flora met lactobacillen naar een gemengde flora met o.a. *Gardnerella vaginalis*, anaeroben zoals *Mobiluncus* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., ...^{8,37}. BV wordt gekenmerkt door een verhoogde, adherente witte, vaginale afscheiding met een verhoogde pH (>4.5). Het microscopisch

onderzoek toont de aanwezigheid van 'Clue cells'²¹. Dit zijn vaginale epitheelcellen die beladen zijn met bacteriën, zodat de randen niet meer zichtbaar zijn. Opmerkelijk bij BV is dat er geen inflammatie is, waardoor er nauwelijks aanwezigheid van PMN is. De Gramkleuring van vaginale secreties voor BV heeft een sensitiviteit van 93% en specificiteit van 70%¹⁰. De cultuur van genitale stalen is positief voor *G. vaginalis* voor bijna alle BV, maar niet elke cultuur waarin *G. vaginalis* aanwezig is, wijst op BV. *Gardnerella vaginalis* wordt ook gedetecteerd bij 50 tot 60% van de gezonde, asymptomatische vrouwen (6). Om deze reden is het zeer belangrijk om de aanwezigheid van *G. vaginalis* steeds te interpreteren in functie van het geheel van de Gramkleuring.

Voor de cultuur van *G. vaginalis* stelt Garcia et al de volgende richtlijnen op³⁷:

- geen gebruik van selectieve cultuur media om *G. vaginalis* te isoleren, het belang van de aanwezigheid wordt steeds geïnterpreteerd in vergelijking met de kwantitatieve hoeveelheid lactobacillen
- minder sterke aanwezigheid van *G. vaginalis* dan normale microbiële flora: beschouw aanwezigheid van *G. vaginalis* als normale vaginale flora
- *G. vaginalis* aanwezig in cultuur als dominant micro-organisme en een semikwantitatieve groei van ++/+++ : rapporteer aanwezigheid
- bij kinderen wordt de aanwezigheid van *G. vaginalis*, ongeacht de aanwezige hoeveelheid, steeds gerapporteerd

De resultaten van de cultuur moeten steeds geïnterpreteerd worden samen met de resultaten van het microscopisch onderzoek. Zowel Gramkleuring als rechtstreeks onderzoek van genitale stalen kent voornamelijk zijn belang in de diagnostiek van bacteriële vaginose²¹. Zowel de aanwezigheid van 'Clue cells' als de verstoorde vaginale flora met aanwezigheid van Gramvariabele, fijne staafjes draagt bij tot de laboratoriumdiagnose van bacteriële vaginose.

Het is belangrijk de aanwezigheid van epitheelcellen in de Gramkleuring weer te geven, omdat bij afwezigheid van epitheelcellen er sprake is van een mindere of slechte kwaliteit van het genitaal staal. Om op een gestandaardiseerde manier de interpretatie van de Gramkleuring in het kader van bacteriële vaginose te rapporteren, kunnen Nugent's criteria toegepast worden²¹. Hierbij wordt rekening gehouden met de aanwezige morfotypes micro-organismen in de Gramkleuring. Dit scoresysteem wordt weergegeven in tabel 2. Een Nugent score van ≥ 7 wijst op BV, een score van ≤ 3 op normale flora, terwijl een intermediaire score (4-6) wijst op een verstoorde flora¹². Er dient opgemerkt te worden dat dit score systeem slechts toegepast mag worden op stalen van patiënten met een leeftijd van 12 tot 55 jaar.

Score ^b	Lactobacillus morphotypes	<i>Gardnerella</i> and <i>Bacteroides</i> spp. morphotypes	Curved gram-variable rods
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ or 2+
2	2+	2+	3+ or 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

^a Morphotypes are scored as the average number seen per oil immersion field. Note that less weight is given to curved gram-variable rods. Total score = lactobacilli + *G. vaginalis* and *Bacteroides* spp. + curved rods.
^b 0, No morphotypes present; 1, <1 morphotype present; 2, 1 to 4 morphotypes present; 3, 5 to 30 morphotypes present; 4, 30 or more morphotypes present.

Tabel 2: Nugent et al, Score systeem voor Gramkleuring voor vaginale stalen²¹

Bij BV wordt de term vaginose gebruikt in plaats van vaginitis om de infectie te beschrijven, omdat de inflammatoire respons milder is in BV in vergelijking met infecties veroorzaakt door o.a. *Candida* spp. De aanwezigheid van vaginale inflammatie bij BV kan wijzen op een andere geassocieerde vaginale of cervicale infectie²². De aanwezigheid van PMN ($>10/HPF$) bij microscopisch onderzoek, bij afwezigheid van *Trichomonas vaginalis*, is soms indicatief voor endocervicale inflammatie ten gevolge van een infectie met *Chlamydia trachomatis* of *Neisseria gonorrhoeae*^{21,22}. Genitale stalen die afgenomen worden bij afwezigheid van een abnormale vaginale afscheiding zijn niet waardevol.

OLVZ

Bij routine cultuur wordt steeds gekeken naar de aanwezigheid van *G. vaginalis* in de cultuur. Deze aanwezigheid wordt zoals in de literatuur beschreven gerapporteerd in functie van de aanwezige hoeveelheid lactobacillen. Bij de aanwezigheid van 'Clue cells' in het microscopisch onderzoek samen met de detectie van *G. vaginalis* in de cultuur, wordt de vermelding "Bacteriële vaginose" toegevoegd. Wanneer een significante hoeveelheid *G. vaginalis* aanwezig is, maar de Gramkleuring geen typisch beeld van BV geeft, door onder andere geen detectie van 'Clue cells', wordt de aanwezigheid semikwantitatief vermeld, maar zonder vermelding "Bacteriële vaginose".

➔ Wat is de invloed van het gebruik van de Nugent's score?

Om de huidige rapportering van de Gramkleuring in het kader van BV te herevalueren, zal worden nagegaan wat de invloed is, indien de rapportering van de Gramkleuring aan de hand van de Nugent's score uitgevoerd zou worden.

Candida vaginitis

Candida vaginitis, gekenmerkt door vaginale jeuk, irritatie en dysurie, wordt veroorzaakt door een overgroei van *Candida* spp⁹. Vulvovaginale candidiasis is een frequent voorkomende aandoening: meer dan 75% van de premenopauzale vrouwen heeft minstens een episode, 40 tot 50% heeft een tweede episode en 5-8% heeft last van recurrenente episodes¹⁰.

De kolonisatie van de vagina door gisten vereist een goede adhesie van gisten aan de vaginale epitheelcellen. *C. albicans* heeft een sterker adherent vermogen dan de andere non-albicans spp, waardoor 85 en 95% van de geïsoleerde gisten *C. albicans* is^{10,13}. Bij de overige non-albicans *Candida* spp. is *C. glabrata* de meest voorkomende. Ook deze laatste kan onder andere de oorzaak zijn van recurrenente vulvovaginale candidiasis. De incidentie van vulvovaginale candidiasis veroorzaakt door non-albicans stammen lijkt toe te nemen¹³. Dit zou kunnen toegeschreven worden aan het gebruik van azolederivaten. Toch zijn er verschillende studies die deze stijgende prevalentie niet kunnen bevestigen.

Candida spp. aanwezig in lagere genitale tractus verschillen onderling in epidemiologie, virulentie en vaginale pathogeniciteit^{23,24}. Klinische ervaring duidt op een lagere virulentie van non-albicans gisten ter hoogte van de lagere genitale tractus^{13,23}. Infecties met *C. glabrata* en *C. parapsilosis* zijn milder of soms asymptomatisch¹³. Omdat de tekens en symptomen van vulvovaginale candidiasis niet specifiek zijn, is cultuur voor het stellen van een correcte diagnose aangewezen. In de richtlijnen van Garcia et al wordt er o.w.v het verschil in pathogeniciteit een onderscheid gemaakt tussen *C. albicans* en *Candida* non-albicans³⁷. *C. albicans* moet, ongeacht de aanwezige hoeveelheid, steeds gerapporteerd worden. Voor andere gisten is minimale vermelding, zonder volledige identificatie, voldoende. Er is een identificatie nodig die onderscheid kan maken tussen *C. albicans* en *Candida* non-albicans.

Candida spp. behoren tot commensale flora van de lagere genitale tractus bij 20 tot 50% van gezonde, asymptomatische vrouwen^{25,39}. Een positieve cultuur wijst niet noodzakelijk op gisten als oorzakelijk micro-organisme voor de vaginale symptomen.

Wat is de rol van het microscopisch onderzoek en de correlatie met de mycologische kweek? De Gramkleuring heeft slechts een sensitiviteit van 50% zodat meer dan de helft van de patiënten met een symptomatische vulvovaginale candidiasis en een positieve cultuur, een negatieve microscopie heeft²⁰. Routine kweek is niet noodzakelijk voor genitale stalen met een positieve microscopie. Voor stalen met een negatieve microscopie moet mycologische cultuur uitgevoerd worden¹³.

Een cultuur met een klein aantal gisten (<10 kolonies), wijst eerder op *Candida* kolonisatie dan op symptomatische infectie. Het blijft daarom zeer belangrijk dat de diagnose van vulvovaginale candidiasis steeds een correlatie maakt van klinische bevindingen, vaginale cultuur en microscopie (Gramkleuring).

OLVZ

De cultuur van genitale stalen bevat steeds een mycologisch cultuur. Bij aanwezigheid, ongeacht van de hoeveelheid, wordt dit semikwantitatief gerapporteerd. Door middel van een kiembuistest wordt onderscheid gemaakt tussen *C. albicans* en non-albicans *Candida* spp. Een positieve kiembuistest geeft

de identificatie van *C. albicans*. Gisten met een negatieve kiembuistest worden niet verder tot op species niveau geïdentificeerd, maar worden gerapporteerd als *Candida non-albicans*.

Bij de routine kweek van genitale stalen gedurende 14 maanden (1/1/2011 – 29/2/2012) was er in 475 van de 2717 (17.5%) stalen *Candida* spp. aanwezig. In 85% van de stalen (404/475) was dit *C. albicans*, in 15% (71/475) is dit *Candida non-albicans*. Deze verdeling stemt overeen met de beschreven percentages in de literatuur.

➔ **Geeft onderscheid tussen *C. albicans* en *Candida non-albicans* een klinische meerwaarde?**

De vraag wordt gesteld of het klinisch relevant is om een onderscheid te maken tussen *C. albicans* en *Candida non-albicans*, ondanks het groter pathogeen vermogen dat toegeschreven wordt aan *C. albicans*: geeft een onderscheid een echte klinische meerwaarde?

Trichomonas vaginalis

In 10% van de gevallen kan *Trichomonas vaginalis* toegeschreven worden als de oorzaak van vaginitis¹⁴. Meer dan de helft tot 70% van de trichomoniasis infecties zijn asymptomatisch. De identificatie van *Trichomonas vaginalis* is gebaseerd op fase-contrast microscopisch onderzoek van een nat preparaat van vaginale of urethrale afscheidingen. Het rechtstreeks onderzoek heeft een sensitiviteit van 60 tot 70%, met een specificiteit van nagenoeg 100%. Er wordt niet verder ingegaan op de diagnostiek van *T. vaginalis*.

Routine bacteriële cultuur

Bij de routine bacteriële cultuur wordt steeds rekening gehouden met de aanwezigheid van genitale flora. Belangrijk is dat niet alle aanwezige micro-organismen uitgewerkt en gerapporteerd moeten worden³⁷. De normale genitale flora, zoals lactobacillen, Gramnegatieven, enterokokken, ... moeten niet routinematig gerapporteerd worden. In de procedures van Garcia *et al* wordt een duidelijk onderscheid gemaakt tussen pathogenen die steeds geïdentificeerd en gerapporteerd moeten worden en andere potentiële pathogenen die slechts in specifieke omstandigheden uitgewerkt worden³⁷.

De aanwezigheid van *Haemophilus ducreyi*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* is altijd klinisch significant³⁸. Andere organismen, die tot de vaginale flora kunnen behoren, zoals *S. aureus*, β -hemolytische streptokokken en anaeroben zijn slechts pathogeen in bepaalde omstandigheden.

De aanwezigheid van volgende kiemen vereist steeds identificatie en rapportering³⁷

- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Listeria monocytogenes*
- *Candida albicans*. Voor andere gisten is vermelding van *Candida* spp. voldoende.

Naast organismen die steeds uitgewerkt worden, zijn er micro-organismen waarvoor identificatie en rapportering slechts in bepaalde omstandigheden noodzakelijk is. Dit houdt in dat er een significante groei moet zijn met aanwezigheid van PMN in het microscopisch onderzoek of wanneer het een invasief afgenomen staal betreft:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus* spp.
- Gram negatieve staven
 - Uitz.: *Enterobacteriaceae* behoren tot de normale flora: geen rapportering
 - *Pseudomonas* spp.
 - *Pasteurella* spp.
 - *Capnocytophaga* spp.

Hoewel ze niet tot de normale genitale flora behoren, kunnen de organismen die als pathogeen beschouwd worden, zoals *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* en *Trichomonas vaginalis*, aanwezig zijn zonder symptomen of klachten te veroorzaken. Een correlatie van de resultaten van de cultuur met de klinische symptomen blijft bij deze kiemen zeer belangrijk. Bij aanwezigheid van *S. aureus* wordt in het OLVZ steeds gescreend op aanwezigheid van MRSA.

Recent werden ook *N. meningitidis* beschreven in genitale stalen vermoedelijk toegeschreven aan orogenitaal seksueel contact⁴². De aanwezigheid mag gerapporteerd worden indien de klinische context duidelijk is.

De vermelding van de aanwezigheid van *Streptococcus agalactiae* of streptokokken van groep B heeft voornamelijk belang bij vrouwen van vruchtbare leeftijd. Afhankelijk van de gebruikte cultuurmedia en staaltype heeft 14-25% van de vrouwen GBS in de vaginale flora⁸.

De screening op aanwezigheid van GBS bij zwangere vrouwen wordt best uitgevoerd op stalen afgenomen ter hoogte van het rectum en de vagina, de zogenaamde vulvo-anele stalen. Cervicale stalen zijn het minst sensitief voor de detectie van GBS¹³. Bij screening voor groep B streptokokken, wordt enkel de aanwezigheid van GBS gerapporteerd. Andere pathogenen zullen niet opgespoord en bijgevolg niet gerapporteerd worden.

Bij het aflezen van genitale stalen wordt geen inventarisatie gemaakt van de kiemen die aanwezig zijn. Indien geen pathogenen geïsoleerd worden, maar een normale genitale flora aanwezig is wordt dit ook zo gerapporteerd: "Normale genitale flora aanwezig" bij vaginale en cervicale stalen, "Normale urethrale flora aanwezig" voor urethrale stalen bij mannen³⁷. Bij de vraag naar specifieke pathogenen, zoals *Neisseria gonorrhoeae* met een specifieke cultuur, moet het resultaat specifiek gerapporteerd worden, zoals "Geen *N. gonorrhoeae* aanwezig"³⁷.

De interpretatie samen met het al dan niet uitwerken van aanwezige kiemen is sterk afhankelijk van het beeld van de Gramkleuring. Hierin is onder andere het aantal PMN zeer belangrijk. Bij aanwezigheid van een *significante* (>10) hoeveelheid PMF moet gezocht worden naar een mogelijke pathogeen. Hiervoor kan een specifieke cultuur voor opsporing van *Neisseria* spp. aangewezen zijn. Door middel van PCR kan *Chlamydia trachomatis* of eventueel *Herpes simplex virus* gedetecteerd worden. Dit is belangrijk zodat niet-pathogene kiemen geen onverdiende aandacht krijgen (en dus geïdentificeerd en gerapporteerd worden) bij aanwezigheid van PMN.

(Bv. Gramkleuring met aanwezigheid van een significant aantal neutrofielen, routine cultuur toont de aanwezigheid van enterokokken, maar PCR detecteert *Herpes simplex virus*: behandel HSV, maar niet de enterokokken)

OLVZ

Bij de analyse van genitale stalen wordt steeds een Gramkleuring van het staal bekeken. Bij de Gramkleuring worden alle significant aanwezige micro-organismen semi-kwantitatief gerapporteerd. Ook zal de afwezigheid van lactobacillen weergegeven worden. Naast de micro-organismen is de aanwezigheid van cellen belangrijk: epitheelcellen en neutrofielen worden altijd semi-kwantitatief weergegeven. Deze resultaten worden steeds gecorreleerd met de bacteriële en mycologische kweek.

De routine cultuur van genitale stalen houdt niet in dat alle aanwezige micro-organismen uitgewerkt en gerapporteerd worden. Slechts een aantal pathogenen of mogelijks pathogenen worden geïdentificeerd en semi-kwantitatief gerapporteerd. Een eventuele gevoeligheidsbepaling wordt uitgevoerd: zie tabel 3.

Indien er geen pathogenen gedetecteerd worden, wordt een standaardcommentaar gerapporteerd: "geen pathogene kiemen geïsoleerd". Er wordt geen onderscheid gemaakt tussen vaginale of cervicale stalen en urethrale stalen, zoals beschreven door Garcia et al³⁷. Bij specifieke culturen zoals *N. gonorrhoeae*, *mycoplasma* en *ureaplasma* waarbij het aangevraagde pathogeen niet gedetecteerd wordt, worden "negatief" geantwoord. Bij een sterk verstoorde flora, maar zonder aanwezigheid van pathogenen wordt in het OLVZ een standaard commentaar gerapporteerd: "Verstoorde flora, geen pathogene kiemen geïsoleerd". Deze situatie geeft aan dat er eventueel naar een onderliggende oorzaak van een verstoorde flora moet gezocht worden. Er zijn geen concrete afspraken betreffende de rapportering van deze commentaar.

kiem	ID	invloed Gramkleuring	AST	rapportering
<i>S. agalactiae</i>	steeds	Geen	neen*	semikwantitatief**
<i>S. pyogenes</i>	steeds	aanwezigheid PMN	ja	semikwantitatief**
<i>G. vaginalis</i>	significante hoeveelheid, verstoorde normale flora: gedaalde aanwezigheid lactobacillen,	- <i>Clue cells</i> , - aanwezigheid van pleomorfe, gram variabele staafjes/coccobacillen/ gekromde staafjes	neen	semikwantitatief bacteriële vaginose - duidelijk beeld in de Gramkleuring - ↓ lactobacillen of afwezigheid
<i>Candida spp.</i>	steeds (<i>C. albicans</i> / non-albicans)	-	neen	<i>C. albicans</i> / <i>Candida</i> non-albicans
<i>N. gonorrhoeae</i>	- op aanvraag - verdachte Gramkleuring	PMN en Gramnegatieve diplokokken	steeds	semikwantitatief**
<i>S. aureus</i>	- steeds screening naar MRSA - massale aanwezigheid	- / - PMN	screening MRSA	semikwantitatief** rapportering MRSA / massale aanw. <i>S. aureus</i>
<i>Haemophilus spp.</i> andere ...	- massale aanwezigheid	aanwezigheid PMN	beta-lact	semikwantitatief**

Tabel 3. Uitwerking genitale stalen OLVZ

*indien vulvo-anaale screening voor GBS: AST bij penicilline allergie / **zie fig 3, attachment I

➔ **Afspraken betreffende de rapportering: “Verstoorde flora, geen pathogene kiemen geïsoleerd.”**

Antibiogram

Tot op heden werd nog geen resistentie van GBS voor penicilline, het eerste keuze antibioticum, beschreven³⁷. Hierdoor is een gevoeligheidsbepaling voor penicilline overbodig. Er is echter wel een toenemende mate van resistentie voor macroliden en clindamycine bij groep B streptokokken. Het routinematig uitvoeren van een gevoeligheidsbepaling bij GBS is niet aangewezen en moet enkel uitgevoerd worden op specifieke vraag bij patiënten met een penicilline allergie⁷. Garcia *et al* beschrijft deze gevoeligheidsbepaling voornamelijk in het kader van GBS screening bij zwangeren³⁷.

De richtlijnen van Garcia *et al* vereisen een gevoeligheidsbepaling voor de volgende pathogenen³⁷:

- alle *N. gonorrhoeae*
- ‘fastidious’ Gramnegatieve coccobacillen of staven (die niet op MacConkey groeien), zoals *Haemophilus spp.*: β-lactamase test

OLVZ

Bij de aanwezigheid van GBS in een routine cultuur wordt geen gevoeligheidsbepaling uitgevoerd. Wanneer het een specifieke screening is voor GBS in het kader van het einde van de zwangerschap, is het uitvoeren van een gevoeligheidsbepaling afhankelijk van de penicilline allergie van de zwangere vrouw. Hiervoor is er op het aanvraagformulier een vraag naar penicilline allergie bij de patiënt, wat zeer goed ingevuld wordt door de klinici. Bij vrouwen zonder allergie wordt geen gevoeligheidsbepaling uitgevoerd, bij vrouwen met penicilline allergie wordt dit wel uitgevoerd en gerapporteerd. De andere meest voorkomende pathogenen worden beschreven in tabel 3. Bij aanwezigheid van *N. gonorrhoeae* wordt steeds een AST uitgevoerd, terwijl dit bij de aanwezigheid van

andere kiemen varieert. Wanneer een potentiële pathogeen sterk aanwezig is en geïdentificeerd wordt, in de meeste gevallen simultaan een AST uitgevoerd.

Steriele stalen of 'dieper' afgenomen stalen

Voor 'invasief' afgenomen stalen of stalen die normaal als steriel beschouwd worden, gelden andere uitwerkingsregels van mogelijke pathogenen. Er worden sneller potentiële pathogenen geïdentificeerd en gerapporteerd³⁷. Hierbij is een eventuele onderliggende pathologie belangrijk (bv. sectio) en heeft het aantal PMN in het microscopisch onderzoek een groot belang.

Leeftijd van de patiënt - kinderen

Bij de interpretatie van de cultuur van genitale stalen dient rekening gehouden te worden met de leeftijd van de patiënt. Genitale stalen van kinderen moeten anders geïnterpreteerd worden dan deze van volwassenen met als voornaamste reden dat bij kinderen nog geen vaginale flora zoals bij volwassen vrouwen aanwezig is. Bij kinderen is er eerder sprake van een huidflora met coagulase negatieve stafylokokken en *Corynebacterium* spp.. *S. pyogenes* en *Haemophilus influenzae* worden beschreven als verwekkers van genitale infecties bij deze leeftijdscategorie²⁶. In zeldzame gevallen kunnen *Salmonella* spp. en *Shigella* spp. de oorzaak zijn van vaginitis bij kinderen. Daarom wordt aangeraden om bij kinderen met purulente vaginale secreties een dominante of zuivere groei van niet-lactose fermenterende *Enterobacteriaceae* uit te werken³⁷.

Genitale stalen van kinderen kunnen eventueel seksueel misbruik laten vermoeden. De aanwezigheid van *Gardnerella vaginalis* of seksueel overdraagbare aandoeningen, zoals *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, ... kan wijzen op seksueel misbruik. In dit kader is het zeer belangrijk, in tegenstelling tot bij volwassen vrouwen, om *Gardnerella vaginalis* steeds te rapporteren ongeacht de aanwezige hoeveelheid⁴⁰.

Een derde factor die invloed heeft op de interpretatie van genitale stalen bij kinderen is de verhoogde kans op vreemd-lichaam infecties, door bv. aanwezigheid van kleine voorwerpen.

OLVZ

Genitale stalen van kinderen moeten anders geïnterpreteerd worden dan deze van volwassenen. In het OLVZ worden er slechts zelden stalen van jonge kinderen geanalyseerd. Hierbij wordt nog eens gewezen dat stalen van kinderen met grote aandacht geïnterpreteerd moeten worden.

➔ Aandacht voor leeftijd van de patiënt, met extra aandacht voor kinderen

Urethrale wisser bij de man

Urethritis, één van de meest voorkomende seksueel overdraagbare aandoeningen, wordt onderverdeeld in gonokokken urethritis en niet-gonokokken urethritis (NGU) afhankelijk van de aanwezigheid van *N. gonorrhoeae*¹⁵. Urethritis bij mannen wordt gekenmerkt door mucopurulente urethrale afscheiding, dysurie en pijn²¹. Infectieuze urethritis wordt voornamelijk veroorzaakt *Chlamydia trachomatis* en *Neisseria gonorrhoeae*. Meer dan 25% van de mannen met een *N. gonorrhoeae* infectie heeft een concurrente infectie met *Chlamydia trachomatis*. Andere microbiologische oorzaken zijn onder meer *Trichomonas vaginalis* en virale infecties zoals HSV en adenovirus. *Mycoplasma genitalium* en *Ureaplasma urealyticum* worden beschreven als oorzakelijke organismen, hoewel hierover tegenstrijdige resultaten en bevindingen beschreven zijn¹⁵. In 20 tot 30% blijft de oorzaak van infectieuze urethritis ongekend.

Voor de diagnose kan een urethrale wisser geanalyseerd worden, waarbij bovenstaande pathogenen met routine en gespecialiseerde culturen gedetecteerd kunnen worden en waarbij via moleculaire technieken onder andere *Chlamydia trachomatis* gedetecteerd kan worden²¹. *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. en *Candida* spp. worden soms geïsoleerd bij patiënten met symptomen, maar zouden geen oorzakelijke micro-organismen zijn voor urethritis²⁹.

Een microscopisch onderzoek, zowel rechtstreeks of Gramkleuring, met aanwezigheid van vijf of meer PMN/HPF wordt beschouwd als urethritis^{27,28}. Bij 60 tot 90% van de patiënten met urethritis is er een aanwezigheid van minstens vijf PMN/HPF. Bij een verhoogd aantal PMN in het microscopisch onderzoek en de aanwezigheid van Gramnegatieve intracellulaire en extracellulaire diplokokken in het urethrale exsudaat is sterk indicatief voor de diagnose van gonokokken urethritis⁴¹. Bij aanwezigheid van PMN maar zonder zichtbaar aanwezige kiemen kan de diagnose van non-gonokokken urethritis gesteld worden en moet met andere analyses de pathogeen opgespoord worden.

OLVZ

Naast de routine cultuur van urethrale wissers, kan op aanvraag een specifieke cultuur voor *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* en *Ureaplasma urealyticum* aangevraagd worden. *M. genitalium* wordt in het OLVZ niet opgespoord.

Bij een verdachte Gramkleuring wordt een *N. gonorrhoeae* cultuur uitgevoerd. De cultuur en interpretatie zijn vergelijkbaar met deze van genitale stalen. Pathogenen, of potentiële pathogenen, worden geïdentificeerd en gerapporteerd. Aanwezige commensale worden niet vermeld. Indien geen pathogenen gedetecteerd zijn, wordt dit vermeld "Geen pathogene kiemen geïsoleerd".

➔ *Ureaplasma urealyticum* & *M. hominis* vs. *M. genitalium*?

Ureaplasma spp. en *Mycoplasma* spp. kunnen geïsoleerd worden uit de genitale-urethrale tractus bij gezonde asymptomatische volwassenen³⁸. Er is evidentie dat deze organismen een etiologische rol hebben in bepaalde genitale infecties: *Ureaplasma urealyticum* kan een oorzaak zijn van niet-gonokokken urethritis³⁸. Een verschil in pathogeniciteit tussen twee verschillende *U. urealyticum* spp. en correlatie met NGU is beschreven. Een aanwezigheid van minder dan 10^4 organismen in de mannelijke urethra is niet significant. *M. genitalium* werd met behulp van moleculaire diagnostiek significant meer gedetecteerd in urethrale stalen van mannen met acute NGU dan bij mannen zonder NGU. Deze evidentie werd niet beschreven voor *Mycoplasma hominis*^{17,38}. Bij vrouwen is er geen evidentie dat *M. hominis* een urethraal syndroom kan veroorzaken in tegenstelling tot *Ureaplasma* spp³⁸.

Zowel *M. hominis* als *M. genitalium* groeien op gespecialiseerde voedingsmedia. De kolonies hebben het uitzicht van een 'fried egg' met een dichtere centrale zone en een lichtere buitenste zone. *M. hominis* groeit na enkele dagen, terwijl *M. genitalium* een tot twee maanden nodig heeft om tot groei te komen. Cultuur voor *M. genitalium* is bijgevolg niet praktisch en gestandaardiseerde, commerciële moleculaire assays zijn nog niet beschikbaar.

3. Respiratoire stalen

De respiratoire flora is zeer divers en varieert van persoon tot persoon. Bij gezonde personen bestaat deze uit zowel aerobe als anaerobe micro-organismen. Speeksel bevat 10^9 tot 10^{10} bacteriën per mL^{16,26}. De commensale flora bestaat hoofdzakelijk uit Grampositieven. De belangrijkste organismen zijn alfa-hemolytische streptokokken of viridans streptokokken, stafylokokken, microkokken, enterokokken, commensale *Neisseria* spp., *Corynebacterium* (met uitzondering van *C. diphtheriae*), *Haemophilus* spp. en anaeroben zoals *Peptostreptococcus* spp. en *Prevotella* spp. Pathogene bacteriën zoals *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* en *Neisseria meningitidis* kunnen in kleine aantallen aanwezig zijn ter hoogte van de orofarynx en nasofarynx van gezonde personen²⁶. Ook Gramnegatieve bacteriën kunnen tot de normale flora behoren bij gezonde personen, hoewel deze kiemen vaker gehospitaliseerde patiënten onder antimicrobiële therapie koloniseren²⁶. Naast bacteriën behoren ook gisten zoals *Candida* spp. tot de commensale flora.

Voor een correcte interpretatie van respiratoire stalen moet steeds een onderscheid gemaakt worden tussen pathogenen, kolonisatoren en aanwezige commensale flora³⁷. Hiervoor moet men erop bedacht zijn dat mogelijke pathogene kiemen ook tot de mondflora kunnen behoren.

A. Bovenste luchtwegen

Stalen vanuit de bovenste luchtwegen kunnen gemakkelijk afgenomen worden, maar zijn per definitie steeds gecontamineerd met mondflora³⁷.

Keel

Faryngitis is een inflammatie en/of infectie van de orofarynx en/of nasofarynx²⁶. Faryngitis kent in de meeste gevallen, 70-95%, een virale oorzaak zoals EBV, rhino-, corona-, influenza virus, adenovirus, etc. Slechts bij 15-29% van de kinderen en bij 10% van de volwassenen kan er een bacteriële oorzaak gevonden worden³⁷.

De meeste vormen van acute bacteriële faryngitis worden veroorzaakt door β -hemolytische streptokokken van groep A (GAS) of *S. pyogenes*^{3,26}. Dit is de enige vorm van faryngitis, waarbij een behandeling met antibiotica geïndiceerd is³. De klinische symptomen van een groep A streptokokken faryngitis zijn aspecifiek en overlappen met deze van andere (meestal virale) faryngitiden, waardoor een diagnose gebaseerd op klinische symptomen alleen niet voldoende is. Cultuur is aangewezen voor het stellen van een goede diagnose en overmatig antibioticagebruik te vermijden^{3,32}. Een correcte behandeling is aangewezen bij ernstige klinische symptomen. Er is controversie of dit een daling in transmissie met zich zou meebrengen en of dit leidt tot het vermijden van ernstige complicaties zoals acute reumatische koorts en acute glomerulonefritis.

De cultuur van keelmonsters (keelwissers) moet voornamelijk gebaseerd zijn op de detectie van *S. pyogenes*. Bij de aanwezigheid van β -hemolytische streptokokken worden deze verder geïdentificeerd. Onder andere *Streptococcus pneumoniae* en *H. influenzae* kunnen soms aanwezig zijn in faryngeale stalen. In het kader van de relatief frequente aanwezigheid van deze kiemen in de commensale respiratoire flora en het feit dat deze organismen niet tot de etiologie van ongecompliceerde faryngitis behoren, is het niet aangewezen de aanwezigheid van deze kiemen te rapporteren^{6,26}. Rapportering van aanwezigheid van *S. pneumoniae* en *H. influenzae* zou verwarrende resultaten opleveren voor klinici en zou tot onnodige behandeling kunnen leiden²⁶. Tevens is het mogelijk, voornamelijk bij gehospitaliseerde patiënten, dat Gramnegatieven aanwezig zijn. Omdat ook deze kiemen geen veroorzaker zijn van faryngitis, maar de bovenste luchtwegen kunnen koloniseren, is een identificatie en rapportering niet nodig.

Wat bij aanwezigheid van andere β -hemolytische streptokokken? Groep B, D en F streptokokken zijn geen veroorzakers van faryngitis en worden bij aanwezigheid niet gerapporteerd³⁷. Voor streptokokken van groep C en G zijn er geen eenduidige resultaten. Enerzijds worden streptokokken van groep C en G, *large-colony* fenotypes, beschreven als potentiële oorzaak van faryngitis met klinische

symptomen die vergelijkbaar zijn met deze van GAS faryngitis^{1,26,30,37}. *Small-colony* fenotypes worden niet beschouwd als verwekkers van faryngitis³⁰. Anderzijds kunnen andere studies dit verband tussen aanwezigheid van *large-colony* streptokokken van groep C en G en faryngitis niet bevestigingen³¹. Niet-GAS beta-hemolytische streptokokken zijn niet geassocieerd met auto-immuun complicaties zoals reumatische koorts³². De richtlijnen van Cumitech geven dat de aanwezigheid van elke β -hemolytische streptokok moet nakeken worden op klinische relevantie: zowel groep A als *large-colony* fenotypes van groep C en G streptokokken moeten geïdentificeerd en gerapporteerd worden³². Eventueel mag de aanwezigheid van groep C of G streptokokken gerapporteerd worden als “aanwezigheid van β -hemolytische streptokokken, niet groep A”³². Garcia et al laat de identificatie en rapportering afhangen van de afspraken tussen het laboratorium en de klinici³⁷.

Rapportering van de aan- of afwezigheid van *S. pyogenes*, zonder beschrijving of vermelding van de andere aanwezige organismen, nl. de commensale flora, wordt beschreven als de duidelijkste rapportering²⁶. Analoog beschrijft Garcia et al een rapportering aan de hand van een commentaar die specifiek de pathogeen weergeeft die met de cultuur opgespoord wordt³⁷. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen de vermeldingen: “*S. pyogenes* geïsoleerd” of “Groep C of G streptokokken geïsoleerd” versus “Geen pathogenen streptokokken geïsoleerd” of “geen Groep A streptokokken geïsoleerd”, afhankelijk of ook steeds groep C of G streptokokken opgespoord worden of enkel GAS.

Laboratoriumresultaten moeten steeds geïnterpreteerd worden in functie van de kliniek van de patiënt, omdat een positieve cultuur voor *S. pyogenes* geen onderscheid maakt tussen een acute infectie of kolonisatie^{37,26}. De richtlijnen van Cumitech beschrijven dat het waardevol is om de aanwezigheid hoeveelheid *S. pyogenes* semikwantitatief te rapporteren.

Tot op heden is er nog geen penicilline resistentie bij groep A streptokokken^{26,37}. Een behandeling met penicilline blijft de eerste keuze. Antimicrobiële gevoeligheidsbepaling (AST) voor penicilline bij β -hemolytische streptokokken is niet geïndiceerd^{2,37}. Echter voor bepaalde omstandigheden zoals bij penicilline allergie, is AST voor erythromycine en clindamycine aangewezen³⁷.

Beta-hemolytische streptokokken zijn de belangrijkste oorzaak van bacteriële faryngitis. Vals negatieve resultaten kunnen het gevolg zijn van een overgroei van de normale commensale flora (of geen beta-hemolyse). Andere bacteriën zoals *Arcanobacterium haemolyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphtheriae* werden beschreven in zeldzame gevallen van acute faryngitis^{26,37}. Indien *A. haemolyticum* gedetecteerd wordt, moet dit gerapporteerd worden³⁷. De detectie van *A. haemolyticum* kan verhinderd worden door sterkere groei (en hierdoor overgroei) van commensale mondflora.

Richtlijnen, zoals Cumitech en Garcia et al suggereren geen microscopische analyse van keelwissers. Door de aanwezigheid van talrijke commensale streptokokken, geeft de Gramkleuring geen bruikbare informatie²⁶.

OLVZ

Bij keelpreparaten wordt geen microscopisch onderzoek uitgevoerd. De cultuur van keelwissers is er op gericht te screenen naar de aanwezigheid van *S. pyogenes* of streptokokken van groep A. Indien *S. pyogenes* aanwezig is, wordt dit steeds semikwantitatief gerapporteerd (zie attachment I). Er wordt steeds een beperkte gevoeligheidsbepaling uitgevoerd, waarvan de resultaten gerapporteerd worden. Indien geen *S. pyogenes* gedetecteerd kan worden in de cultuur, wordt als standaard commentaar “Geen *S. pyogenes* aanwezig” gerapporteerd. Er wordt geen afzonderlijke informatie gegeven over de aanwezigheid van mondflora. Verder wordt de eventuele aanwezigheid van *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, etc. niet gerapporteerd. Over de aanwezigheid van andere beta-hemolytische streptokokken zijn er nog geen eenduidige afspraken. Bij massale aanwezigheid van groep C of G streptokokken worden deze gerapporteerd.

➔ **Zijn er afspraken nodig voor de rapportering van aanwezigheid van groep C of G streptokokken?**

Nasofarynx

Nasofaryngeale aspiraten of wissers zijn per definitie steeds gecontamineerd met commensale orale flora³⁷. Hiertoe behoren ook mogelijke pathogene zoals *S. pneumoniae* of *H. influenzae*, waardoor cultuur tot misleidende resultaten kan leiden. In het kader van diagnose van virale respiratoire infecties zijn deze stalen zeer belangrijk²⁷. Nasofaryngeale aspiraten worden niet verder besproken.

OLVZ

Er worden geen routine kweken uitgevoerd op nasofaryngeale stalen. Deze worden gebruikt voor PCR analyses ter detectie van aanwezigheid van virussen die respiratoire infecties kunnen veroorzaken. Wanneer er een nasofaryngeaal staal met een aanvraag voor bacteriële kweek in het laboratorium komt, wordt met de aanvragende arts gecontacteerd voor klinische informatie. Op deze manier kan een nieuw, correct afgenomen staal gevraagd worden of kunnen andere analyses op het aspiiraat uitgevoerd worden.

Neus

Cultuur van nasale wissers zijn niet informatief voor de etiologische oorzaken van infecties van de sinus, midden oor of lagere luchtwegen. Culturen van nasale wissers zijn enkel waardevol voor pathogeen gerichte analyses, zoals detectie van MRSA voor epidemiologische screeningen⁶.

OLVZ

Neuswissers worden in het laboratorium in cultuur gebracht ter screening op aanwezigheid van MRSA of op specifieke aanvraag op aanwezigheid van *S. aureus*. Andere aanwezige kiemen worden niet geïdentificeerd en gerapporteerd.

Indien MRSA of *S. aureus* gedetecteerd wordt, wordt alleen de aan- of afwezigheid gerapporteerd zonder informatie te geven over de aanwezige hoeveelheid. Bij aanwezigheid van *S. aureus* wordt steeds een beperkte gevoeligheidsbepaling uitgevoerd o.w.v. epidemiologische redenen voor screening naar MRSA.

B. Diepe luchtwegen

Infecties van de diepere luchtwegen kunnen ontstaan door aspiratie van orale en faryngeale flora, aerosolverbreiding met inhalatie van pathogenen, etc. Om infecties van de diepere luchtwegen te diagnosticeren zijn culturen van sputa en stalen vanuit de diepere luchtwegen vereist. Hiertoe behoren de meer invasieve bronchiale en tracheale aspiraten en de broncho-alveolaire lavages (BAL). Sputum stalen zijn per definitie steeds gecontamineerd met mondflora. BAL zouden in ideale omstandigheden met een correcte staalafname vrij van mondflora zijn.

Ondanks het frequent voorkomen van diepe respiratoire infecties, zijn diagnostische analyses voor het opsporen en identificeren van het infecterende micro-organisme arbeidsintensief³⁷. De complexe bacteriële flora vereist selectieve media en complexe protocollen voor de detectie en isolatie van mogelijke pathogenen¹⁸.

De cultuur van slechte of foutief afgenomen respiratoire stalen is niet nuttig³⁷. Dit kan leiden tot misleidende rapportering met als gevolg een eventuele incorrecte behandeling van de patiënt.

Microscopisch onderzoek (Gramkleuring)

De evaluatie van respiratoire stalen start bij de interpretatie van het microscopisch onderzoek, nl. de Gramkleuring^{18,37}. De Gramkleuring geeft belangrijke informatie over de staalkwaliteit, eventuele voorlopige en snelle diagnostische informatie voor het al dan niet opstarten van empirische therapie en geeft richtlijnen voor de uitwerking van de bacteriële cultuur. Enerzijds moeten de aanwezige cellen beschreven worden, anderzijds de aanwezige micro-organismen waaronder mondflora en/of dominant aanwezige micro-organismen kunnen hierdoor relatief snel doorgegeven worden². De aanwezigheid en de hoeveelheid aanwezige plaveiselepitheelcellen wijst op contaminatie met speeksel met orofaryngeale flora, terwijl het aantal PMF correleert met infectie. Een ideaal respiratoir staal bevat geen plaveiselepitheel, maar wel een significant aantal PMN.

Er zijn verschillende systemen om de kwaliteit van het respiratoire staal te beoordelen. Een aantal kwantitatieve criteria werden ontwikkeld om het staal microscopisch te screenen voor de kwaliteit. Elk systeem is gebaseerd op het feit dat de aanwezigheid van plaveiselepitheel indicatief is voor orofaryngeale contaminatie.

Bij de interpretatie moet steeds rekening gehouden worden met het feit dat bij neutropene patiënten geen PMN aanwezig zijn bij infectie.

Normale orale flora kan in de Gramkleuring bestaan uit onder andere: Grampositieve kokken, Grampositieve bacillen, Gramnegatieve diplokokken, Gramnegatieve coccobacillen, Gramnegatieve staven en gisten. Deze kiemen worden niet afzonderlijk beschreven, maar gerapporteerd onder de noemer: respiratoire flora. Bij dominante aanwezigheid van één of meerdere morfotypes wordt dit afzonderlijk vermeld.

Toepassing: Informatie over de sensitiviteit en specificiteit van microscopisch onderzoek kunnen nuttig zijn voor klinici voor het stellen van de diagnose. De gemiddelde gevoeligheid voor pneumokokkenpneumonie van een sputum cultuur is 57% met een specificiteit van 97%^{2,37}.

OLVZ

Elk respiratoir staal wordt microscopisch onderzocht door middel van een Gramkleuring. Enerzijds worden de aanwezige cellen beschreven, anderzijds de aanwezige micro-organismen. Aanwezigheid van PMN wordt steeds semikwantitatief vermeld, alsook de aanwezigheid van epitheelcellen. Er wordt niet steeds een onderscheid gemaakt tussen plaveisel- en bronchusepitheelcellen, maar zou in principe steeds moeten gebeuren. Indien duidelijke aanwezigheid van morfotypes zoals Gramnegatieve staven wordt dit semikwantitatief vermeld, waarnaast de aanwezige commensale flora gerapporteerd wordt.

➔ Belang onderscheid bronchiaal- vs. plaveiselepitheel

Aspiratiepneumonie

Bacteriële aspiratiepneumonie kent een moeilijke klinische diagnose en wordt slechts zelden microbiologisch geconfirmeerd². Aspiratie van orofaryngeale secreten wordt meestal door de verdedigingsmechanismen van de gastheer overwonnen, maar bij een grote hoeveelheid geaspireerd materiaal of bij een verminderde gastheerweerstand kan een bacteriële pulmonaire infectie ontstaan. Bij gehospitaliseerde patiënten zijn dit zowel anaeroben als aeroben waaronder nosocomiale pathogenen zoals *S. aureus*. De anaerobe kiemen worden meestal niet bevestigd door middel van cultuur omdat de stalen steeds gecontamineerd zijn met orofaryngeale flora.

De Gramkleuring levert voor aspiratie meer informatie op dan de cultuur. Aspiratie wordt gedefinieerd op basis van de Gramkleuring²:

- a) ≤ 10 plaveiselepitheelcellen per LPF
- b) ≥ 25 PMN per LPF
- c) toegenomen gemengde flora met ≥ 50 micro-organismen per HPF met intracellulaire meng van Gramnegatieve en Grampositieve organismen in tenminste één microscopisch veld

Wanneer microscopisch beeld van de Gramkleuring suggestief is voor aspiratie moet dit duidelijk bij de resultaten van de Gramkleuring weergegeven worden. Barenfanger et al geeft een voorstel voor rapportering: *“A variety of organisms (pleomorphic gram-negative rods and gram-positive cocci and rods) are present inside neutrophils. This is highly suggestive of aspiration pneumonia. Antibiotic coverage for anaerobic bacteria should be considered in addition to therapy for the standard pathogens”*⁶. Indien de patiënt niet onder antibiotherapie staat is een cultuur van dergelijke stalen in principe overbodig.

OLVZ

Bij de analyse van sputumstalen wordt alleen een aerobe cultuur uitgevoerd. Een anaerobe kweek wordt niet uitgevoerd. Bij de invoering van de microscopie resultaten is een optie “Beeld van aspiratie” beschikbaar. Wanneer bovenstaande criteria voldaan zijn, wordt de commentaar “Beeld van aspiratie” gerapporteerd.

➔ **Dit legt de nadruk op het belang van een goede interpretatie van het microscopisch onderzoek**

Rejectiecriteria

Sputa die sterk gecontamineerd zijn met speeksel, zouden verworpen moeten worden voor routine bacteriële cultuur^{15,18}. De Gramkleuring geeft hiervoor belangrijke informatie op basis van het aantal plaveiselepitheelcellen en eventueel de aanwezigheid van PMN (zie hierboven). De verwerping van de cultuur van respiratoire stalen heeft twee belangrijke functies: kosteneffectiviteit en het vermijden van de rapportering van misleidende informatie naar de klinici. Dit kan resulteren in een foutieve diagnose die een foutieve of onnodige therapie tot gevolg kan hebben.

De richtlijnen van Garcia et al geven rejectiecriteria voor cultuur van sputum en diepere respiratoire stalen op basis van microscopisch onderzoek:

- a) verwerp geen stalen waarop *Legionella* cultuur aangevraagd wordt
- b) verwerp volgende stalen o.w.v. van slechte afname of niet suggestief voor bacteriële infectie
 - a. Sputum: ≥ 10 plaveiselepitheelcellen/LPF
uitz.: het aantal PMN 10 maal groter dan het aantal epitheelcellen, met aanwezigheid van ‘+++’ bacteriën van eenzelfde morfologisch type: aanvaard het staal voor cultuur
 - b. Tracheaal aspiraats van volwassene: ≥ 10 plaveiselepitheelcellen/LPF of afwezigheid van micro-organismen
 - c. Tracheaal aspiraats van kinderen: afwezigheid van micro-organismen

Garcia et al geeft de opmerking dat verschillende beschreven rejectiecriteria de grens van 25 plaveiselepitheelcellen/LPF vooropstellen, maar met deze strategieën zouden te weinig sputa verworpen worden³⁷.

Wanneer rejectiecriteria toegepast zouden worden voor het al dan niet uitvoeren van cultuur, moet dit duidelijk gerapporteerd worden. Richtlijnen stellen volgende standaardcommentaren voor:

- Aanwezigheid van ≥ 10 plaveiselepitheelcellen/LPF, suggestief voor een slechte kwaliteit van het staal. Cultuur wordt niet uitgevoerd. Graag nieuw staal indien klinisch geïndiceerd. (Garcia et al³⁷)
- De Gramkleuring toont geen aanwezigheid van bacteriën. Cultuur wordt niet uitgevoerd. Contacteer het laboratorium indien verder onderzoek klinisch geïndiceerd is. (Garcia et al³⁷)
- De aanwezigheid van plaveiselepitheel in het staal wijst op de aanwezigheid van oppervlakkig materiaal dat contaminerende of koloniserende bacteriën bevat die niet gerelateerd zijn met infectie. Afname van een nieuw staal is wenselijk. (Cumitech 7B²)
- Niet representatief voor diepere respiratoire secreten, graag nieuw staal. (Cumitech 7B²)

Hierbij dient opgemerkt te worden dat er onder bepaalde omstandigheden antimicrobiële therapie opgestart wordt na de eerste staalafname, maar reeds voor de vermelding van slechte of verminderde staalkwaliteit waarbij er naar een tweede staal gevraagd wordt. Eventueel kan de opmerking toegevoegd worden: Graag een tweede afname van een nieuw staal indien klinisch relevant en indien nog geen antimicrobiële therapie gestart werd (Cumitech 7B²)

OLVZ

In het OLVZ worden geen rejectiecriteria toegepast op basis van de kwaliteit van het staal. Als eerste stap naar kwaliteitsverbetering of om artsen attent te maken op de gebrekkige staalkwaliteit van het respiratoir staal, zouden er commentaren aan de cultuur of bij de resultaten van Gramkleuring aangebracht kunnen worden. Als huidige vermelding kan de rapportering “weinig representatief” toegevoegd worden. Hiervoor zijn voorlopig geen concrete afspraken of criteria voor deze vermelding.

➔ Opstellen criteria voor vermelding slechte of verminderde staalkwaliteit?

Cultuur

Acute bronchitis heeft meestal een virale oorzaak. Dit wordt duidelijk weergegeven in tabel 8 (attachment III)²⁷. Een pneumonie echter kan naast virale ook bacteriële oorzaken hebben. Pneumonie kan veroorzaakt worden buiten (community acquired pneumoniae - CAP) of in het ziekenhuis (hospital acquired pneumonia - HAP). Dit heeft invloed op het oorzakelijk pathogeen van een bacteriële pneumonie, wat weergegeven wordt in tabel 4.

Community Acquired (CAP)	Healthcare Associated (HAP)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>M. catarrhalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>K. pneumoniae</i>	andere non-fermenters GNS
<i>Legionella</i> spp.	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Anaeroben	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

Tabel 4: potentiële pathogenen CAP en HAP

Enterobacteriaceae zijn in meer dan 50% de oorzaak van HAP, waarvan voornamelijk de volgende species geassocieerd zijn met diepere luchtweginfecties: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp. en *Citrobacter* spp.².

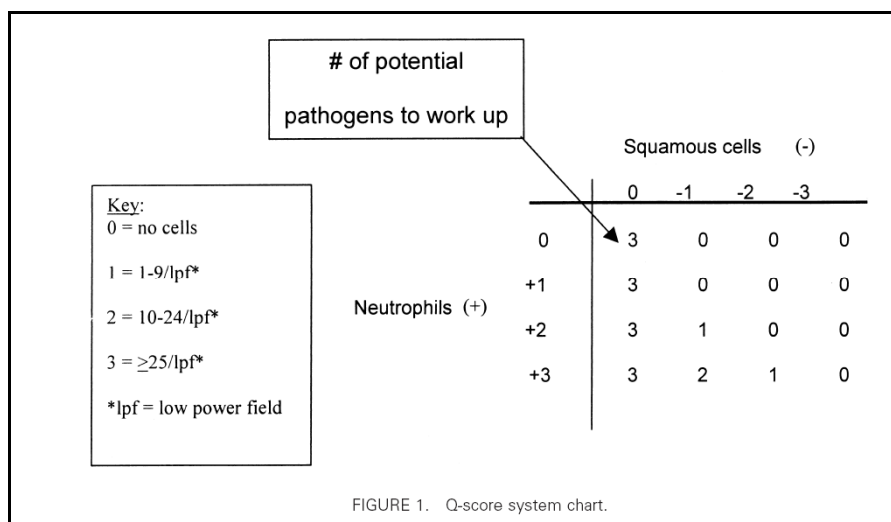
Pseudomonas aeruginosa kan de mucosale oppervlakten koloniseren, zoals de orofarynx of patiënten op intensieve zorgen met endotracheale tubes of met mechanische beademing. Onder deze omstandigheden is aanwezigheid van *P. aeruginosa* in een respiratoir staal niet steeds suggestief voor een echte infectie, zodat de aanwezigheid met voorzichtigheid geïnterpreteerd moet worden³⁸. *Stenotrophomonas maltophilia* is een opportunistische nosocomiale pathogeen².

De meerderheid van de isolaten koloniseren de respiratoire tractus eerder dan dat ze een infectie veroorzaken. Anaeroben komen voor bij aspiratie of bij patiënten met bestaande longafwijkingen zoals bronchiëctasieën.

S. aureus in sputum kan tot de normale respiratoire flora behoren. Bij aanwezigheid, zelfs in kleine aantallen, wordt steeds gescreend op de aanwezigheid van MRSA o.w.v. epidemiologische redenen. Indien significante hoeveelheid *S. aureus* aanwezig is, samen met een microscopisch onderzoek dat een inflammatoir beeld weergeeft, kan dit passen bij pneumonie. De aanwezigheid van kleine hoeveelheden *S. aureus* in een mengflora dient niet gerapporteerd te worden, tenzij methicilline resistentie gedetecteerd is⁵.

De uitwerking van respiratoire stalen is afhankelijk van verschillende factoren. De rapportering en uitwerking (volledige identiteit, ID, al dan niet met gevoeligheidsbepaling, AST) van diepe respiratoire stalen is afhankelijk van onder andere het staaltipe, het beeld in de Gramkleuring, purulentie van het staal, aanwezige hoeveelheid commensale flora, aantal aanwezige soorten, cultuurafname al dan niet onder gebruik van antibiotica, vorige resultaten van de patiënt, de dienst waarop de patiënt is opgenomen, enz. .

Eén van de richtlijnen die gebruikt kan worden voor de uitwerking van respiratoire stalen is de Q-score (tabel 5) (Bartlett RC 1974. Medical microbiology: quality, cost and clinical relevance, 24-31). Deze score geeft op een gestandaardiseerde wijze de kwaliteit van het respiratoir staal weer en geeft aan hoeveel pathogenen er voor een bepaald staal uitgewerkt moeten worden. Hoe hoger de Q-score, met een maximum van 3, hoe meer representatief het staal is voor diepere respiratoire secreties, hoe meer potentiële pathogenen uitgewerkt moeten worden. Indien het aantal potentiële pathogenen de Q-score niet overschrijdt, moeten alle aanwezige pathogenen uitgewerkt worden. In dit systeem worden als potentiële pathogenen beschouwd: *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, alle *Enterobacteriaceae*, andere aerobe en anaerobe Gramnegatieven, *M. catarrhalis* en *Neisseria meningitidis*. Bij een Q1 score wordt 1 pathogeen uitgewerkt (= ID/AST), bij Q2 twee pathogenen en bij een Q3 score drie pathogenen. Wanneer er meer pathogenen aanwezig zijn dan uitgewerkt kunnen worden, worden de morfotypes die in de Gramkleuring zichtbaar zijn uitgewerkt. Bij een Q0 score moeten de aanwezige potentiële pathogenen vermeld worden, maar zonder volledige identificatie en AST.



Tabel 5: Q-score: **Q0 & Q1** Not representative of lower respiratory tract secretions / **Q2** Process; report with comment "Evidence of superficial contamination"/ **Q3** Proper deep sputum

De Q-score is niet meer opgenomen in de recentste versie (3^{de} editie) van Garcia *et al.* Eenvoudigere systemen worden opgesteld waarbij ook rekening gehouden wordt met de aanwezige PMN en plaveiselepitheelcellen.

De globale uitwerkingscriteria van de richtlijnen Garcia *et al* worden weergegeven in tabel 7 (attachment II)³⁷. In deze richtlijn wordt beschreven om de organismen die in significante hoeveelheden aanwezig zijn, die al dan niet deel uit kunnen maken van de respiratoire flora, te identificeren. Onder significante aanwezigheid worden volgende situaties beschouwd:

- primaire pathogeen met een gemiddelde tot massale groei (++)/+++ die sterker is dan de aanwezige commensale flora
- kleinere aantallen kunnen klinisch belangrijk zijn wanneer ze als zuivere groei aanwezig zijn en waarvan het morfotype aanwezig is in de Gramkleuring met aanwezigheid van PMN

Op te merken is dat er geen specificering van het aantal PMN gegeven wordt. Dit kan verklaard worden doordat stalen van slechte of mindere kwaliteit reeds verworpen werden door de toepassing van staalrejectioncriteria.

ALGEMEEN

Elk gestandaardiseerd schema of richtlijnen voor uitwerking van diepere respiratoire stalen vertrekt vanuit de noodzaak van een goede staalafname². Algemeen geldt dat hoe lager de kwaliteit van het staal met een toenemend aantal aanwezige plaveiselepitheelcellen, hoe minder pathogenen uitgewerkt moeten worden. De resultaten van de cultuur moeten steeds vergeleken worden met deze van het microscopisch onderzoek:

- de primaire pathogeen moet in de Gramkleuring beschreven zijn
- bij groei van één of meerdere kiemen die microscopisch niet beschreven werden, wordt aangeraden de Gramkleuring een tweede maal te analyseren

Verder is er een verschil tussen het staaltipe: hoe dieper het staal, hoe meer pathogenen uitgewerkt worden. Een sputum met aanwezigheid van drie potentiële pathogenen wordt op een andere manier bekeken dan een BAL met aanwezigheid van drie potentiële pathogenen.

RAPPORTERING

Bij aanwezigheid van onder andere viridans streptokokken, microkokken, commensale *Neisseria* spp. of andere commensale kiemen worden deze niet afzonderlijk gerapporteerd, maar worden onder één noemer, nl. respiratoire flora, weergegeven. Soms, maar vooral bij gehospitaliseerde patiënten, kan door het gebruik van breed spectrum antibiotica de aanwezigheid van de normale viridans streptokokken vervangen zijn door coagulase negatieve stafylokokken en enterokokken⁵. Deze laatste zijn geen veroorzakers van respiratoire infecties, maar een individuele rapportering zou tot

misleidende resultaten kunnen leiden. Een voorbeeld voor een correcte, duidelijke rapportering is de volgende: “gemengde Grampositieve kiemen, geen gewone commensale flora aanwezig”⁵.

AST

Het uitvoeren van een gevoeligheidsbepaling wordt, zoals deze voorgesteld wordt in de richtlijnen van Garcia *et al*, wordt weergegeven in tabel 7 (attachment II)³⁷.

OLVZ

Zie tabel 7 (attachment II)

Gisten & schimmels

Gisten behoren tot de normale flora van de bovenste luchtwegen. Ondanks de frequente isolatie van *Candida* spp. uit respiratoire stalen, veroorzaken ze slechts uiterst zelden een pneumonie^{33,34}. De diagnose wordt niet gesteld door de aanwezigheid van *Candida* spp. in bacteriële kweek, maar door het aantonen van weefselinvasie door middel van histopathologisch onderzoek. Meersseman *et al* bestudeerde de eventuele aanwezigheid van *Candida* pneumonie bij 232 overleden patiënten door middel van autopsies³⁴. Bij 135 patiënten was er histopathologische evidentie voor pneumonie, waarvan er bij 57% *Candida* spp. aanwezig was in respiratoire aspiraten. Geen enkele *Candida* pneumonie kon histopathologisch aangetoond worden.

Een foutieve interpretatie van routinecultuur met aanwezigheid van gisten leidt tot overmatig gebruik van antifungale middelen. Hierdoor is een beperkte identificatie van de aanwezige gisten voldoende⁶. Dit houdt in dat er geen volledige identificatie vereist is voor snelgroeiende gisten, zoals *Candida* spp. Een uitzondering op deze beperkte identificatie is de aanwezigheid van *Cryptococcus neoformans*.

Barenfanger *et al* bestudeerde de invloed van het al dan niet vermelden van gisten met species naam. Wanneer deze niet vermeld wordt, is er een lager gebruik van antifungale middelen, een korter ziekenhuisverblijf en een verlaagde totale kost^{5,33}. Tabel 6 geeft een mogelijke correcte rapportering van de aanwezigheid van gisten. Bij de aanwezigheid van schimmels is het belangrijk *Aspergillus* spp. te identificeren en de aanwezigheid semi-kwantitatief te vermelden³⁷. *Penicillium* spp. kan het gevolg zijn van omgevingscontaminatie. De aanwezigheid dient niet gerapporteerd te worden. Indien deze toch gerapporteerd wordt, moet vermeld worden dat het wijst op omgevingscontaminatie³⁷.

Observation	Report
For bacterial culture with few yeast	Include in respiratory microbiota
For bacterial culture with numerous yeast and no oral contamination	“Overgrown with yeast, culture lacks usual respiratory microbiota”
For fungal culture with few yeast	No pathogenic mould isolated
For fungal culture with numerous yeast	“Yeast overgrowth, culture terminated”

Tabel 6: Voorstel rapportering gisten, uitgezonderd *Cryptococcus neoformans*, in respiratoire stalen⁵

OLVZ

Bij de routine kweek van respiratoire stalen wordt slechts op aanvraag mycologische kweek uitgevoerd. De aanwezigheid van gisten wordt niet afzonderlijk vermeld, maar wordt opgenomen bij de aanwezige mondfloor door de vermelding “mondfloor met gist”. Zelfs wanneer er alleen gist aanwezig is, wordt dit ook vermeld als “mondfloor met gist”. Ook de resultaten van de Gramkleuring worden op deze manier gerapporteerd. De mycologische cultuur wordt afzonderlijk gerapporteerd: deze wordt ofwel negatief, ofwel positief voor gist en/of schimmels geantwoord. Aanwezigheid van schimmels wordt wel steeds semikwantitatief vermeld.

➔ **Aandacht voor het vermijden van afzonderlijke rapportering van de aanwezigheid van gisten**

Andere pathogenen

Naast de bacteriën beschreven in tabel 4, kunnen andere organismen pneumonie veroorzaken (tabel 8, attachment III). Voornamelijk virussen kunnen respiratoire infecties veroorzaken. Dit heeft groot belang bij de interpretatie van een cultuur met een significant aantal PMN, maar waarbij routine cultuur geen potentiële pathogenen kan aantonen.

Bewakingsstalen

Bij respiratoire stalen van kritisch zieke patiënten, zoals intensieve zorgen of neutropene patiënten, worden in het OLVZ de aanwezige, mogelijks pathogene micro-organismen geïdentificeerd. Voor de uitwerking van dergelijke stalen wordt minder rekening gehouden met de aanwezige hoeveelheid pathogeen en met de resultaten van de Gramkleuring. Deze zogenaamde inventarisatie stalen of bewakingsstalen leveren informatie over de koloniserende kiemen van de patiënt. Wanneer de algemene toestand van de patiënt achteruitgaat of wanneer de patiënt infectieus wordt, hebben de klinici reeds een idee over de mogelijke pathogeen. De informatie van de bewakingsstalen kan gebruikt worden voor het snel, deels empirisch opstarten van eventuele antimicrobiële therapie.

Interpretatie

Bij de interpretatie van de cultuur van respiratoire stalen moet men erop bedacht zijn dat een sputum niet naar het laboratorium gestuurd wordt voor de analyse en identificatie van alle aanwezige bacteriën, maar om de eventuele oorzaak van een pneumonie te diagnosticeren.

Bij 40-60% van de stalen kan er geen pathogeen gedetecteerd worden, waardoor een negatieve cultuur een respiratoire infectie niet uitsluit^{16,37}. Dit kan voornamelijk toegeschreven worden aan reeds antibioticagebruik voor staalafname en door niet-bacteriële oorzaken van pneumonie zoals virale oorzaken. Verder hebben de lage sensitiviteit van sputum kweek voor de detectie van *S. pneumoniae*, een slechte staalafname en overgroei van commensale flora invloed op de beperkte detectie van pathogenen. Ook zijn er een aantal bacteriën dat niet in een routine bacteriële kweek, maar slechts onder speciale omstandigheden tot groei komen, waarvoor andere analyses noodzakelijk zijn. Dit zijn *Legionella* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium* spp.

Hoewel een respiratoire infectie niet uitgesloten kan worden door een negatieve cultuur, is dit toch niet zonder betekenis¹⁶. Het niet detecteren van aanwezigheid van *S. aureus* of Gramnegatieven in een respiratoir staal van een goede kwaliteit, geeft sterke evidentie tegen de aanwezigheid van deze pathogenen. Een inhibitie van de groei door reeds bestaand antibiotica gebruik is minder groot voor deze organismen dan voor *S. pneumoniae*. Maar stalen afgenomen na de start van antibiotica gebruik zijn moeilijker te interpreteren door de mogelijke kolonisatie met Gramnegatieven.

Vals positieve resultaten kunnen het gevolg zijn van de over-interpretatie/over-rapportering door het laboratorium. Hierdoor worden er patiënten onnodig met antimicrobiële behandeld, met onder meer resistentietoename tot gevolg.

Op de aanbevelingen en aanpassingen voor routine analyses, zijn steeds uitzonderingen mogelijk. Deze uitzonderlijke situaties zullen voornamelijk aangevraagd worden na overleg tussen de klinici en microbiologen.

[OLVZ](#)

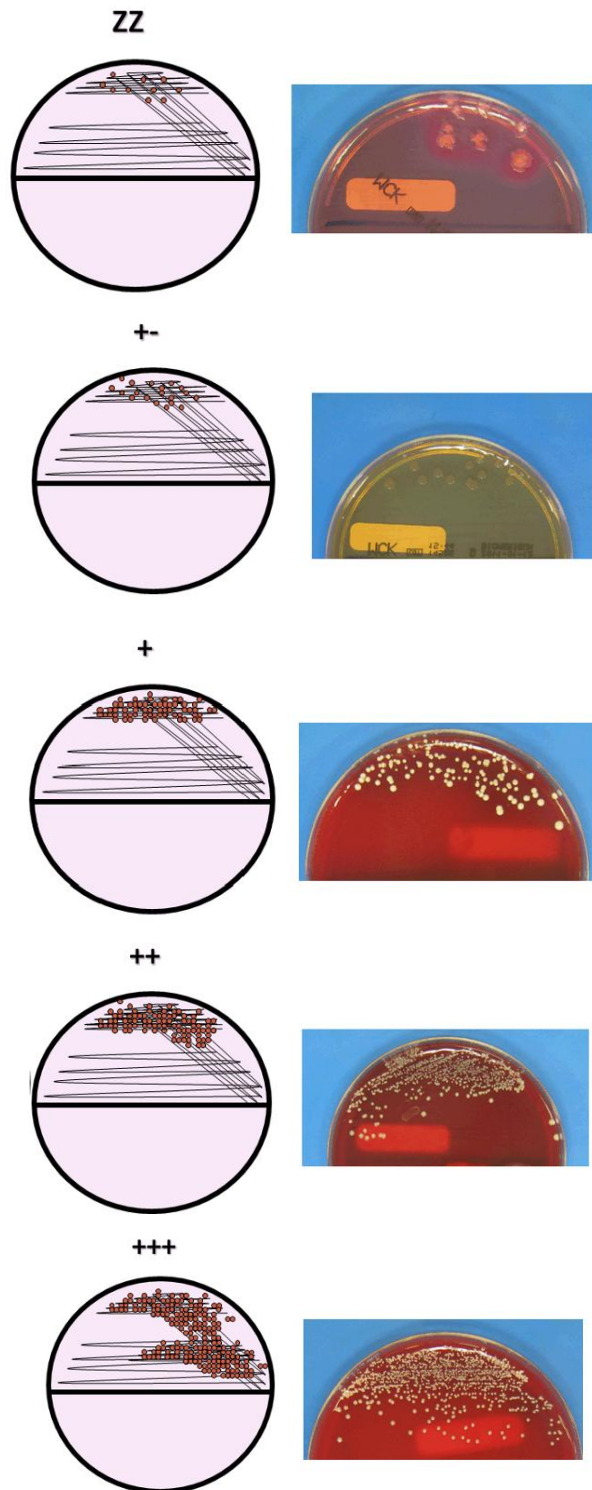
[Zie tabel 7 \(attachment II\)](#)

TO DO/ACTIONS

- 1) Opfrissing uitwerkingscriteria en rapportering van respiratoire, genitale, ... stalen aan MLT's.
- 2) Opvraging werkwijze andere centra en vergelijking.
- 3) Verdere uitwerking van beschreven besluiten bij verschillende topics

ATTACHMENTS

Attachment I: Fig 3: Semikwitatatieve interpretatie cultuur (zz / +/- / + / ++ / +++)



Attachment II

Organisme	Garcia et al (37) Semikwant. hh	Garcia et al (37) Actie	OLVZ
Micro-organismen die deel van MF kunnen uitmaken			
<i>s. pyogenes</i>	Steeds	ID/ geen AST (AST indien peni-all)	steeds ID/AST
<i>S. pneumoniae</i>	≤ MF significante groei + >MF	geen ID, rapporteer bij MF ID/AST	steeds ID/AST
<i>S. aureus</i>	≤ MF significante groei + >MF	screen MRSA, rapporteer bij MF indien geen MRSA ID/AST	sreen MRSA idem
<i>M. catarrhalis</i>	≤ MF significante groei + >MF	geen ID, rapporteer bij MF ID/AST	idem geen AST*
<i>H. influenzae</i>	≤ MF significante groei + >MF	geen ID, rapporteer bij MF ID/AST (beta-lact)	idem ID/beta-lact
<i>N. meningitidis</i>	≤ MF significante groei + >MF	geen ID, rapporteer bij MF ID/AST (beta-lact)	? ID/AST
groep B, C, G streptokokken	≤ MF significante groei + >MF	geen ID, rapporteer bij MF. Steeds bij neonaten ID/ geen AST (wel bij peni-all)	Strep B bij neonaten ID/steeds AST
andere normale flora	indien BAL: significante + zuivere groei	coag neg staf, enterokokken, ... ID/AST	vermelding aanwezigheid
Anaeroben	...		
Grampositieven			
<i>Corynebacterium</i> spp.	≤ MF significante, zuivere groei + >MF	geen ID, rapporteer bij MF ID/AST	idem ID
<i>Actinomyces</i> spp.	Steeds	AD/AST	idem
Gramnegatieven			
<i>P. aeruginosa</i>	Steeds	ID/AST	ID/AST (steeds bij eerste x isolatie)
<i>Enterobacteriaceae</i> 1 of 2 soorten	≤ MF significante groei + >MF	geen ID/AST (tenzij IZ, IG) ID/AST	rapportering bij MF ID/AST
GNS >2 soorten	≤ MF significante groei + >MF	geen ID/AST ** beperkte ID (tenzij IZ, IG)	rapportering bij MF
andere non-fermenters	≤ MF significante groei + >MF	ID/AST ID/AST	afhankelijk van aantal idem
Schimmels en gisten			
<i>Candida</i> spp.	Steeds	geen ID	mondflora met gist
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Steeds	ID	Idem
<i>Aspergillus</i> spp.	Steeds	ID	Idem

Tabel 7: MF (mondflora), ID (identificatie), AST (gevoeligheidsbepaling), IZ (intensieve zorgen), IG (immuungecompromiteerd), GNS (Gramnegatieve staven)

* Vermelding MORCAT: Therapie mogelijk met amoxicilline/clavulaanzuur, macrolide of cefuroxime

** Vermeld alle soorten GNS: bv. Meng van GNS, waaronder 2 lactose fermenters en 1 niet-lactose fermenter, geen *Pseudomonas aeruginosa*

TABLE 1. Most common pathogens implicated in lower respiratory tract syndromes and their relative contributions^a

Disease and pathogen	% of cases
Acute bronchitis	
Respiratory viruses ^b	90
<i>Bordetella pertussis</i> - <i>Bordetella parapertussis</i>	5–10 ^c
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5–10 ^c
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	5–10 ^c
Community-acquired pneumonia	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	66
<i>Haemophilus influenzae</i>	1–12
<i>Legionella</i> species.....	2–15
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2–14
<i>Klebsiella</i> species.....	3–14
Enteric gram-negative bacilli	6–9
<i>Staphylococcus aureus</i>	3–14
<i>Chlamydia</i> species.....	5–15
Influenza virus.....	5–12
Hantaviruses.....	<1–2
Other viruses.....	<1–12
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<1–10
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<1–2
Unknown	23–49
Hospital-acquired pneumonia	
Gram-negative bacilli	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
<i>Enterobacter</i> species.....	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
Other enteric gram-negative bacilli.....	9
<i>Acinetobacter</i>	3
<i>Legionella</i> species.....	0–2
<i>Haemophilus influenzae</i>	0–2
Other.....	0–10
Gram-positive cocci	
<i>Staphylococcus aureus</i>	17
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2–20
Other.....	2–5
Anaerobes.....	10–20
Fungi	0–10
Mixed	13–54

^a The information in this table is compiled from references 3, 10, 19, 20, 23, and 25.

^b Influenza A virus, Influenza B virus, parainfluenza virus type 3, respiratory syncytial virus, coronavirus, adenovirus, and rhinovirus.

^c The values represent the collective contribution of all four pathogens listed.

Tabel 8: meest voorkomende oorzaken van diepe respiratoire infecties ²⁷