

CAT Titel:	Het gebruik van vloeibare aanrijkingsbodems in de bacteriologie
Author	Dr Heidi Castryck
Supervisor	Dr Johan Frans
Search verified by	Dr Johan Frans
Date	28/07/2004
Expiry date	28/07/2006
Clinical bottom line	
<p>Het routinematig enten van een tryptic soy broth (TSB), naast een thioglycolaat medium, voor het in cultuur brengen van steriele lichaamsvochten, wondvochten en etters mag achterwege gelaten worden. Thioglycolaat medium, meer specifiek thioglycolaat aangerijkt met vitamine K en hemine, blijkt superieur te zijn aan TSB voor de recuperatie van anaërobe organismen en verdient dus de voorkeur.</p> <p>Voorlopig wordt het enten van een thioglycolaat medium wel behouden voor de cultuur van etters, wondvochten en steriele lichaamsvochten (niet voor urine), ook al wordt ook dit door verscheidene auteurs in vraag gesteld. Enkel wanneer de gramkleuring van de thioglycolaat óf de primaire gramkleuring niet overeenkomen met de groei op de primaire platen, moet het medium aëroob en anaëroob uitgewerkt worden. Wanneer een eventuele anaërobe incubatie zou mislukt zijn kan de groei in de thioglycolaat bodem als back-up dienst doen.</p> <p>Bij vermoeden van spontane bacteriële peritonitis in het kader van levercirrose, wordt ascites direct geïncubeerd in hemocultuurflessen en geïncubeerd op 37°C gedurende 5 dagen, overeenkomstig bloed. Deze werkwijze wordt reeds routinematig toegepast in ons ziekenhuis. Het direct enten van een anaëroob geïncubeerde bloedplaat is superieur aan de thioglycolaat en zou routinematig moeten gebeuren voor punctievochten (galvocht, peritoneaalvocht, pleuravocht, niet voor cerebrospinaalvocht), weefselbiopsies, BAL-vochten en abscessen/diepe wondes.</p>	
Clinical/ Diagnostic scenario	
<p>In ons laboratorium werd tot voor kort routinematig zowel een thioglycolaat bodem (zonder aanrijking met vitamine K en hemine), als een TSB geënt als aanrijkingsmedium voor de cultuur van etters/wondvochten, steriele lichaamsvochten (niet urine), inclusief cerebrospinaal vocht. Indien deze vloeibare media troebel blijken, wat op groei wijst, wordt een gramkleuring uitgevoerd. Het resultaat van deze gramkleuring én de primaire gramkleuring worden vergeleken met de groei op de primaire platen en wanneer deze overeenkomen wordt niet verdergewerkt met de vloeibare media. Enkel indien ze niet overeenkomen wordt het betreffende vloeibare medium verder uitgeplaat naargelang wat de gramkleuring toonde en volgt identificatie.</p> <p>Het primair enten van een bloedplaat voor anaërobe cultuur wordt slechts gedaan 'indien klinisch relevant'. In de praktijk is dit bij abdominale specimens en bij verdachte (slechtriëkend, gasvorming) stalen. Weefselbiopsies worden in BHI in cultuur gebracht. Wanneer er ook maar de minste verdenking op groei is, wordt het medium zowel aëroob als anaëroob uitgeplaat.</p>	
Three-part question	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Is het enten van een TSB naast een thioglycolaat bodem nuttig voor cultuur van steriele lichaamsvochten (CSV, pleuravocht, ascitesvocht, synoviaalvocht), wondvochten en etters? 2. Is het enten van een vloeibaar aanrijkingsmedium nog nodig? 3. Wanneer is het primair enten van een anaëroob geïncubeerd agarmedium geïndiceerd? 	
Search terms	
Pubmed: broth	

Mesh database: "bacteria, anaerobic", "culture media", "thioglycolates"

Relevant Article(s)/ References

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D Isenberg, 1997
2. Manual of Clinical Microbiology, Patrick R Murray, 8th edition, 2003
3. Medische microbiologie voor laboratoriumtechnologen, J Verhaegen, L Verbist, M Pyckavet, 2000
4. DJ Stokely, JT Kwan, MR Bending, AT Chin, AJ Eisinger, Isolation of Organisms in CAPD Peritonitis: Use of Nutrient Broth Cultures and Bactec Blood Culture Media, J Hosp Infect, 1988, 11(1): 77-81
5. M Bobadilla, J Sifuentes, G Garcia-Tsao, Improved Method for Bacteriological Diagnosis of Spontaneous Bacterial Peritonitis, J Clin Microb, 1989, 27(10): 2145-2147
6. EJ Goldstein, DM Citron, RJ Goldman, National Hospital Survey of Anaerobic Culture and Susceptibility Testing Method: Results and Recommendations for Improvement, J Clin Microb, 1992, 30(6): 1529-1534
7. DM Citron, PC Appelbaum, How Far Should a Clinical Laboratory go in Identifying Anaerobic Isolates, and Who Should Pay, Clin Infect Dis, 1993, 16(4): 435-438
8. AJ Morris, SJ Wilson, CE Marx, ML Wilson, S Mirrett, LB Reller, Clinical Impact of Bacteria and Fungi Recovered Only from Broth Cultures, J Clin Microb, 1995, 33(1): 161-165
9. MC Claros, DM Citron, EJ Goldstein, Survival of Anaerobic Bacteria in Various Thioglycolate and Chopped Meat Broth Formulations, J Clin Microb, 1995, 33(9): 2505-2507
10. KD Scythes, M Louie, AE Simor, Evaluation of Nutritive Capacities of 10 Broth Media, J Clin Microb, 1996, 34(7): 1804-1807
11. JE Hay, FR Cockerill III, D Kaese, Clinical Comparison of Isolator, Septi-Check, Nonvented Tryptic Soy Broth, and Direct Agar Plating Combined with Thioglycolate Broth for Diagnosing Spontaneous Bacterial Peritonitis, J Clin Microb, 1996, 34(1): 34-37
12. MP Lessing, IC Bowler, The Value of Cerebrospinal Fluid Enrichment Culture in the Diagnosis of Acute Bacterial Meningitis, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996, 15(1): 79-82
13. CD Sturgis, LR Peterson, JR Warren, Cerebrospinal Fluid Broth Culture Isolates: Their Significance for Antibiotic Treatment, 1997, 108(2): 217-221
14. P Derby, R Davies, S Oliver, The Value of Including Broth Cultures as Part of a Routine Culture Protocol, J Clin Microb, 1997, 35(5): 1101-1102
15. FT Meredith, HK Phillips, LB Reller, Clinical Utility of Broth Cultures of Cerebrospinal Fluid from Patients at Risk for Shunt Infections, J Clin Microb, 1997, 35(12): 3109-3111
16. RP Silletti, E Ailey, S Sun, D Tang, Microbiologic and Clinical Value of Primary Broth Cultures of Wound Specimens Collected with Swabs, J Clin Microb, 1997, 35(8): 2003-2006
17. P Bourbeau, J Riley, BJ Heiter, R Master, C Young, C Pierson, Use of the BacT/Alert Blood Culture System for Culture of Sterile Body Fluids Other than Blood, J Clin Microb, 1998, 36(11): 3273-3277

Appraisal

1 Is het enten van een TSB naast een thioglycolaat bodem nuttig voor cultuur van steriele lichaamsvochten (CSV, pleuravocht, ascitesvocht, synoviaalvocht), wondvochten en etters?
Thioglycolaat is een algemene aanrijkingsbodem, geschikt voor de groei van de meeste anaëroben. Volgens Isenberg moeten alle media bedoeld voor de isolatie van anaëroben

aangerijkt worden met vitamine K en hemine. In de Murray wordt thioglycolaat medium met hemine en vitamine K omschreven als een aangerijkt vloeibaar medium dat gebruikt wordt voor de groei van microaërofiële en anaërobe organismen, fastidious organismen inbegrepen. TSB wordt als een algemene voedingsbodem beschouwd. Deze wordt door de NCCLS aanbevolen als inoculum voor de Kirby Bauer disk diffusie gevoeligheidsbepaling en als steriliteitstest.

In de Isenberg wordt voor een routine aërobe cultuur een vloeibare voedingsbodem aanbevolen, er staat niet gespecificeerd dewelke. Voor anaërobe cultuur wordt een thioglycolaat met hemine en vitamine K of chopped meat bodem aanbevolen. Per staaltipe wordt voor steriele lichaamsvochten, uitgezonderd urine en CSV, specifiek een thioglycolaat aanbevolen, voor CSV wordt de keuze gelaten tussen thioglycolaat en TSB.

Verschillende auteurs gaan echter nog een stap verder en stellen het gebruik van een vloeibaar medium als aanrijkingsbodem bij cultuur van steriele lichaamsvochten en etters in vraag.

2. Is het enten van een vloeibaar aanrijkingsmedium nog nodig?

De oorsprong van het gebruik van een vloeibaar medium in de bacteriologie is onzeker. Er wordt verondersteld dat slechtgroeiende bacteriën, anaërobe bacteriën en bacteriën in heel klein aantal beter zouden gerecupereerd worden in een vloeibaar aanrijkingsmedium. Daarnaast wordt ook verondersteld dat mogelijks aanwezige antibiotica zouden verdund worden in het vloeibare medium en bijgevolg minder antibiotische remming zouden bewerkstelligen. Een studie van Morris and Wilson kon het effect van een antibioticaverdunning niet aantonen.

In een studie van Siletti et al werden 520 wondspecimens in een vloeibaar medium in cultuur gebracht naast het enten van primaire agarplaten. In 462 specimens (88.8%) kwam de groei op de primaire platen en in het vloeibaar aanrijkingsmedium volledig overeen. In 45 van de 520 (8.7%) werden organismen geïsoleerd die niet op de primaire agarplaten werden aangetoond. Van deze 45 patiënten werd het medisch dossier nagekeken en slechts in 3 (0.6%) gevallen leidde de recuperatie van een organisme uit de vloeibare medium dat niet op de primaire platen werd teruggevonden tot een effectieve verandering van therapie. Slechts in 26 van 520 specimens groeiden organismen andere dan staphylococcus epidermidis, viridans streptokokken of corynebacterium, die microbiologisch als niet relevant werden beschouwd. Geen enkele van de anaërobe organismen die enkel van de vloeibare medium werden gerecupereerd werden als klinische relevant beschouwd. Er werd geen correlatie gevonden tussen een specifiek merk van transportmedium, noch tussen de verschillende vloeibare media, behalve dat de anaëroben enkel uit de thioglycolaat werden gekweekt.

Het direct enten van een anaëroob geïncubeerd agarmedium blijkt beter te zijn voor de recuperatie van anaëroben. Het vloeibaar medium kan wel als back-up dienst doen wanneer de anaërobe incubatie van het agarmedium zou mislukt zijn. De beperkingen van de thioglycolaatbodem zijn dat de anaërobe organismen kunnen overgroeid zijn door sneller groeiende facultatieve organismen. De anaërobe organismen kunnen ook geïnhibeerd zijn door metaboliëten of zuren geproduceerd door de sneller groeiende facultatief anaërobe organismen. In Isenberg wordt afgeraden om enkel op vloeibare aanrijkingsmedia te steunen voor de isolatie van anaërobe organismen.

Wanneer toch een vloeibaar medium behouden wordt, rijst de vraag hoe ver hiermee moet verdergewerkt worden. Er zijn 4 verschillende mogelijkheden:

1. er is geen groei op de primaire platen,
2. er is geen groei op de primaire platen of er zijn in de directe gramkleuring bacteriën gezien die niet met de groei op de primaire platen overeenkomen,
3. er is geen groei op de primaire platen of er zijn bacteriën gezien in de gramkleuring van het vloeibaar medium die niet overeenkomen met de groei op de primaire platen,

4. alle vloeibare media worden uitgeënt.

In een studie van Derby et al werden deze 4 methoden met elkaar vergeleken en bleek er geen significant verschil tussen de eerste 3 methoden. De enkele significante kiemen die door deze methoden gemist werden in vergelijking met methode 4, brachten geen wijziging van therapie met zich mee. Het hanteren van methode 4 is zeer duur zowel in materiaal als in arbeidstijd en gezien de geringe opbrengst niet aangewezen. In ons labo wordt eigenlijk een combinatie van methode 2 en 3 toegepast.

In het kader van een spontane bacteriële peritonitis wordt het bedside enten van hemocultuurflessen als routinemethode aanbevolen. Best worden ook gelijktijdig hemoculturen afgenomen. Ook voor andere steriele lichaamsvochten (synoviaal, peritoneaal, amnios, pericardiaal en pleuraal vocht) kan het enten van hemocultuurflessen worden aangewend. In een studie van Bourbeau et al worden de BacT/Alert klassieke standaard aërobe en anaërobe hemocultuurflessen, de BacT/Alert FAN aërobe en anaërobe hemocultuurflessen en cultuur op routine media met elkaar vergeleken. Er was geen significant verschil in de recuperatie van organismen tussen de standaard hemocultuurflessen en de routine media. De FAN aërobe en anaërobe hemocultuurflessen recupereerden significant meer organismen dan de standaard aërobe en anaërobe hemocultuurflessen. In ons ziekenhuis wordt de aërobe FAN fles en de anaërobe standaard fles gebruikt. Als we per specifiek specimen vergelijken, dan was de recuperatie van organismen voornamelijk in synoviaal vocht en CAPD vocht significant hoger.

3. Wanneer is het primair enten van een anaëroob geïncubeerd agarmedium geïndiceerd?

Volgens Isenberg zijn de specimens waarbij anaërobe cultuur aangewezen is de volgende: a) aspiraats van een abces of biopsie in het hoofd-hals gebied, abdomen, uterus, bot en hersenen, b) transtracheaal aspiraats, BAL vocht, c) percutane longpunctie, peritoneaal vocht, galvocht, suprapubisch gepuncteerde urine, d) weefselbiopsie (hersenen, bot, uterus, abdomen, zachte weefsel, long), e) peroperatieve anaërobe wisserafname in hersenen, longen, abdomen, uterus, bot en hoofd-halsgebied, f) IUD, g) aspiraats via sinustraject, h) diep aspiraats van open wonde of ulcus bekomen via gedecontamineerde huid, i) maag of dundarm specimens enkel in kader van blind-loop of malabsorptie, j) dikdarm enkel igv vermoeden van clostridium of andere specifieke kiemen. Deze onderverdeling is echter zeer complex en eenvoudigheidshalve reduceren we dit tot: punctievochten (galvocht, peritoneaalvocht, pleuravocht), weefselbiopsies, BAL-vochten en abscessen/diepe wondes. De punctievochten die reeds in hemocultuurflessen op het labo aankomen moeten niet meer op een anërobe agarplaat uitgeënt worden.

Er zijn meerdere mogelijkheden voor anaërobe media. De TSA bloedplaat, die in ons labo voor anaërobe incubatie wordt aangewend, is een primaire aanrijksbodem die de groei van alle klinische significante anaërobe en facultatief anaërobe organismen toelaat. De beperkingen zijn dat een gramkleuring en een aërotolerantietest nodig zijn, gezien de aërobe flora ook op dit medium zal groeien. De thioglycolaat bodem kan een backup cultuurbron vormen voor het geval de incubatie in anaëroob milieu zou gefaald zijn.

Volgens Isenberg moeten alle media die aangewend worden voor de isolatie van anaërobe organismen, aangerijkt zijn met vitamine K en hemine. In ons labo worden specifieke anaërobe agarplaten gebruikt voor de cultuur van anaërobe gramnegatieve bacillen, dit zijn de KV-platen (met kanamycine en vancomycine). Deze zijn eveneens aangerijkt met vitamine K en hemine, net als de Schaedler broth die gebruikt wordt voor het incuberen van weefselbiopsies.

Comments

- De TSB's werden in de eigen labokeuken bereid. De exacte kostprijs is moeilijk in te schatten, maar bij benadering is dit 0.10 euro per buis. De kostprijs van een

commercieel aangekochte thioglycolaat met hemine en vitamine K aanrijking is 0.13 euro goedkoper als de standaard thioglycolaat (de afzet van de aangerijkte thioglycolaat is wereldwijd aanzienlijk groter, in België echter wordt voornamelijk thioglycolaat zonder aanrijking gebruikt). De totale kostprijs van de basising per cultuur van etters, wondvochten en steriele lichaamsvochten wordt dus met minstens 0.23 euro gereduceerd. Het eventueel toegenomen aantal isolaten kan voorlopig nog niet in rekening gebracht worden.

- We hebben navraag in het labo microbiologie van een universitair ziekenhuis en daar wordt wel nog routinematig een TSB geënt. Enkel voor abdominale stalen wordt primair een anaërobe plaat geënt. Voor alle steriele vochten en wondvochten wordt een thioglycolaat zonder aanrijking geënt. Wanneer de macroscopische groei van de thioglycolaat overeenkomt met de primaire platen (vb pijpjes in de thioglycolaat en stafylokokken) wordt niet met het vloeibaar medium verder gewerkt. Wanneer dit niet overeenkomt, wordt een gramkleuring gemaakt van de thioglycolaat en enkel wanneer deze niet overeenstemt met de groei op de primaire platen wordt de vloeibare bodem verder uitgeënt.
- We hebben ook navraag gedaan in het labo microbiologie van een groot perifeer ziekenhuis en daar wordt ook nog routinematig een TSB geënt. Voor decubituswonden, wondinfecties, galvocht, BAL-vocht, weefsel en lumbaal vocht indien de cytose >10 cellen/ μ L (er wordt een thioglycolaat geënt die na 48u wordt overgeënt op een anaërobe plaat) wordt primair een anaërobe plaat met amikaszijfje geënt. Een thioglycolaat wordt geënt voor etters, steriele vochten, galvocht, weefsel, lumbaalvocht en steriliteitscontrole. Wanneer de gramkleuring niet overeenkomt met de groei op de primaire platen wordt de thioglycolaat aëroob en anaëroob uitgeplaat.

To do/ Actions

- Het primair enten van een TSB is reeds afgeschaft.
- De huidige thioglycolaat bodems moeten vervangen worden door de aangerijkte thioglycolaat bodems.
- Het primair enten van een anaërobe plaat moet met enkele extra indicaties uitgebreid worden. Deze wijzigingen moeten ook in de betreffende SOP's worden aangebracht. Er moet een memo worden geschreven om de MLT's die de stalen enten op de hoogte te brengen:
 - Een primair anaëroob geïncubeerde agarplaat moet worden geënt voor:
 - Punctievochten (galvocht, peritoneaalvocht, pleuravocht)
 - Weefselbiopsies (*dit is na aanrijking in de Schaedler broth met vitamine K en hemine en gebeurt op de werkpost Varia*)
 - BAL-vochten
 - Abscessen/diepe wondes

Modified from: Sackett DL. Evidence-based Medicine: How to Practice and Teach EBM: Churchill Livingstone, 2000