

Vanjska i unutarnja kontrola kvalitete rada u mikrobiološkom laboratoriju

Mr sc Maja Ostojić

Kontrola kvalitete

- ◆ Koncept koji uključuje procjenu rezultata rada
- ◆ Uspoređuje dobivene rezultate sa zadanim ciljevima
- ◆ Poduzima potrebne korake, ukoliko rezultati rada nisu u redu
- ◆ Praktična, ostvariva, dostupna
- ◆ Unutarnja i vanjska

Unutarnja kontrola kvalitete

- Program koji provodi svaki laboratorij, kojim provjerava kvalitet svojih testova
- Provjera svih stupnjeva u procesu rada
- Apsolutna osnova za dobru standardnu operativnu proceduru (SOP)

SOP

- Detaljne procedure za pregled svih uzoraka
- Tehnike bojenja
- Aseptične tehnike i sigurno rukovanje infektivnim materijalom
- Pripremanje hranjivih podloga i kontrolnih sojeva
- Inokulaciju na krute i tekuće podloge
- Očitavanje i interpretacija nalaza

SOP

- Tehnike koje se koriste za identifikaciju patogena
- Izrada i očitavanje antibiograma
- Imunološke tehnike
- Čišćenje, dezinfekcija i sterilizacija, te njihova kontrola
- Odlaganje otpada
- Sigurnost u laboratoriju

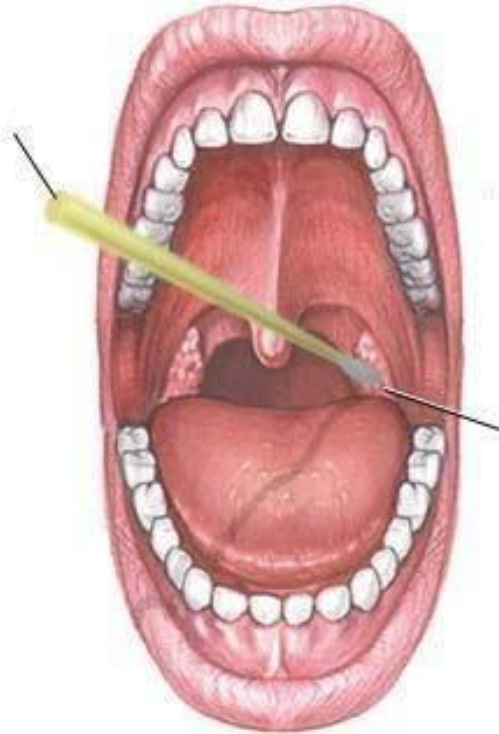
Vanjska kontrola kvalitete

- U nekim zemljama je obavezna (regulirana vladinim zakonima) i potrebna za akreditaciju laboratorija
- Podrazumijeva periodični monitoring kvaliteta testova, provjeru nasumice odabranih testova, a ponekad i tehniku izolacije, osigurava kontrolu liječnika i općeniti kvalitet dijagnostike laboratorija
- Rad u laboratoriju kontrolira neka vanjska, neovisna agencija – procjena kvalitete

Unutarnja kontrola kvalitete

- Uzorak (propisna uputnica)
- Sojevi
- Hranjive podloge
- Reagensi
- Diskovi
- Boje
- Aparati
- Komercijalni sistemi
- Osoblje

Uzorak



- Kvalitet i kvantitet uzorka
- Adekvatnost
- Propisno uzimanje
- Pravilan transport
- Pravilna označenost

Referentni sojevi

- Izvori:
- ATCC (American Type Culture Collection)
- NTSS (National Type Culture Collection)
UK
- CIP (Pasteur Institute Collection) Francuska
- Vlastiti sojevi
- Predvidivi

Referentni sojevi

- originalno se dobiju od ATCC kao liofilizirane kulture (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853)
- potrebno ih je oživjeti
- jedanput oživljene, čuvati na trostrukom šećeru, ili nekoj drugoj podlozi, na temperaturi 4-8°C, presađivati svaki mjesec
- prije uporabe subkultivirati

Hranjive podloge



- Testiranje sterilnosti
- Mogućnost porasta test sojeva
- Selektivnost
- Inhibicija
- Biokemijske osobine

Hranjive podloge

- Komercijalno dostupne podloge
- Provjeriti: pakovanje, petri-ploče, rok trajanja, skladištenje
- Vizualna inspekcija podloge: promjena boje, pojava precipitata, hemoliza krvi, suhoća podloge, kristaliće na površini podloge (smrzavanje) kontaminacija

Procedure za podloge pripremljene u laboratoriju

- Vizualna inspekcija
- Provjera pH; nakon hlađenja podloge
- Provjera krvi: kap na krvni agar, na 37°C, 48 sati
- Provjera sterilnosti, sve podloge inkubirati na 37°C, 48 sati

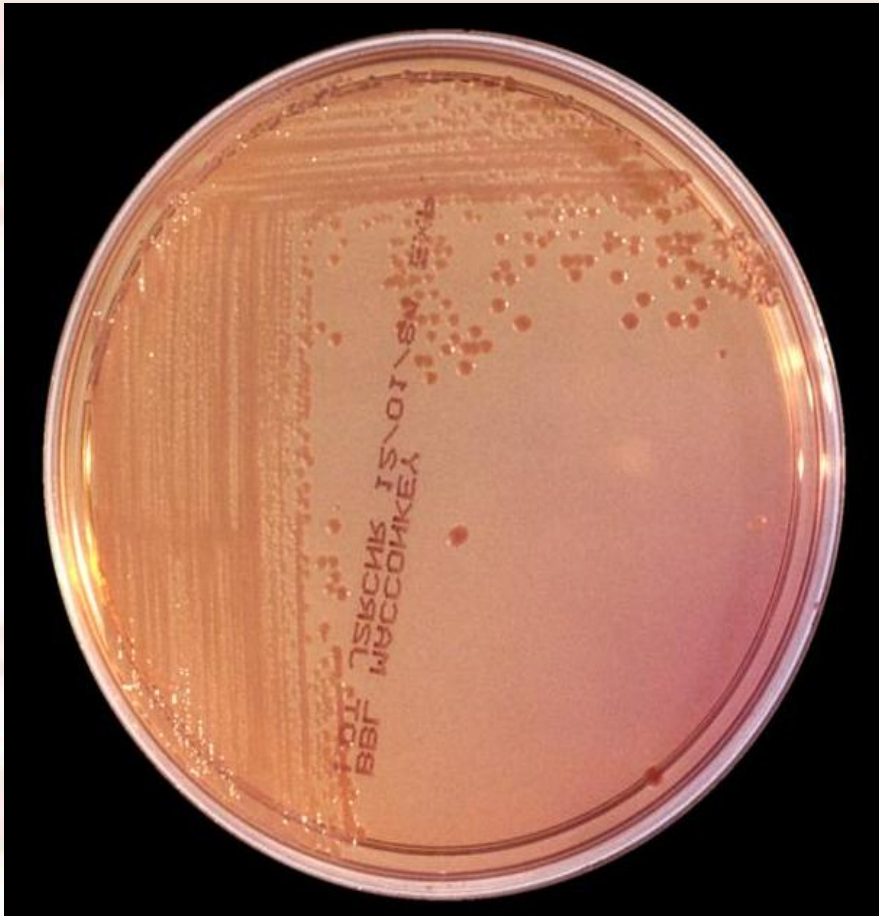
datum	podloga	lot	boja	prozirnost	gel	pH	sterilnost	potpis
xx.xx. 10	Krvni agar	#	OK	OK	OK	OK	OK	MO
xx.xx. 10	McConkey agar	#	OK	OK	OK	OK	OK	MO

HRANJIVA PODLOGA	KONTROLNI MIKROORGANIZAM	OČEKIVANI PORAST
Krvni agar	<i>Streptococcus</i> β-hemolitički	dobar porast, β-hemoliza
	<i>S.pneumoniae</i>	dobar porast, α-hemoliza
Čokoladni agar	<i>H.influenzae</i>	dobar porast
	<i>N.gonorrhoeae</i>	dobar porast
ŽES (žuč-eskulin) agar	<i>Enterococcus spp</i>	dobar porast
	ostali β-hemolitički streptokoki	nema porasta
Simmons citrat agar	<i>K.pneumoniae</i>	plava boja (pozitivna)
	<i>E.coli</i>	zelena boja (negativna)
DN-aza agar	<i>S.aureus</i>	čista zona (dodati 1N Hcl)
	<i>Enterobacter spp.</i>	nema zone
Mc Conkey agar	<i>E.coli</i>	laktoza pozitivne (pink)
	<i>Proteus spp.</i>	laktoza negativne (bezbojne)
Christensen urea agar	<i>P.mirabilis</i>	pink (pozitivna)
	<i>K.pneumoniae</i>	pink kosina (djelomično poz.)
Pokretljivost	<i>E.coli</i>	zamućena podloga (pozitivna)
	<i>K.pneumoniae</i>	bistra podloga (negativna)
SS agar	<i>Salmonella spp.</i>	bezbojne kolonije s crnom sredinom
	<i>E.coli</i>	nema porasta
XLD agar	<i>Salmonella spp</i>	crvene kolonije
	<i>E.coli</i>	žute kolonije
	<i>Shigella spp.</i>	bezbojne kolonije
ONPG	<i>Serratia marcescens</i>	žuta (pozitivna)
	<i>Salmonella spp.</i>	bezbojna (negativna)

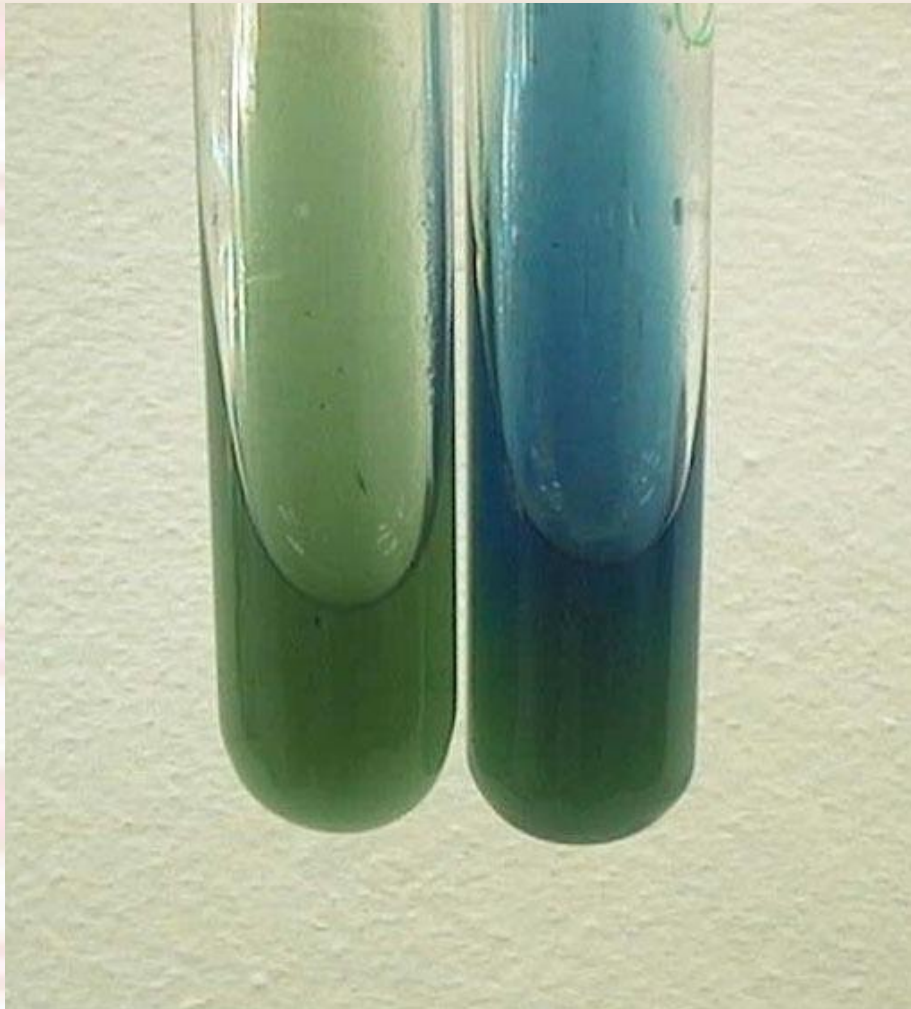
Podloge



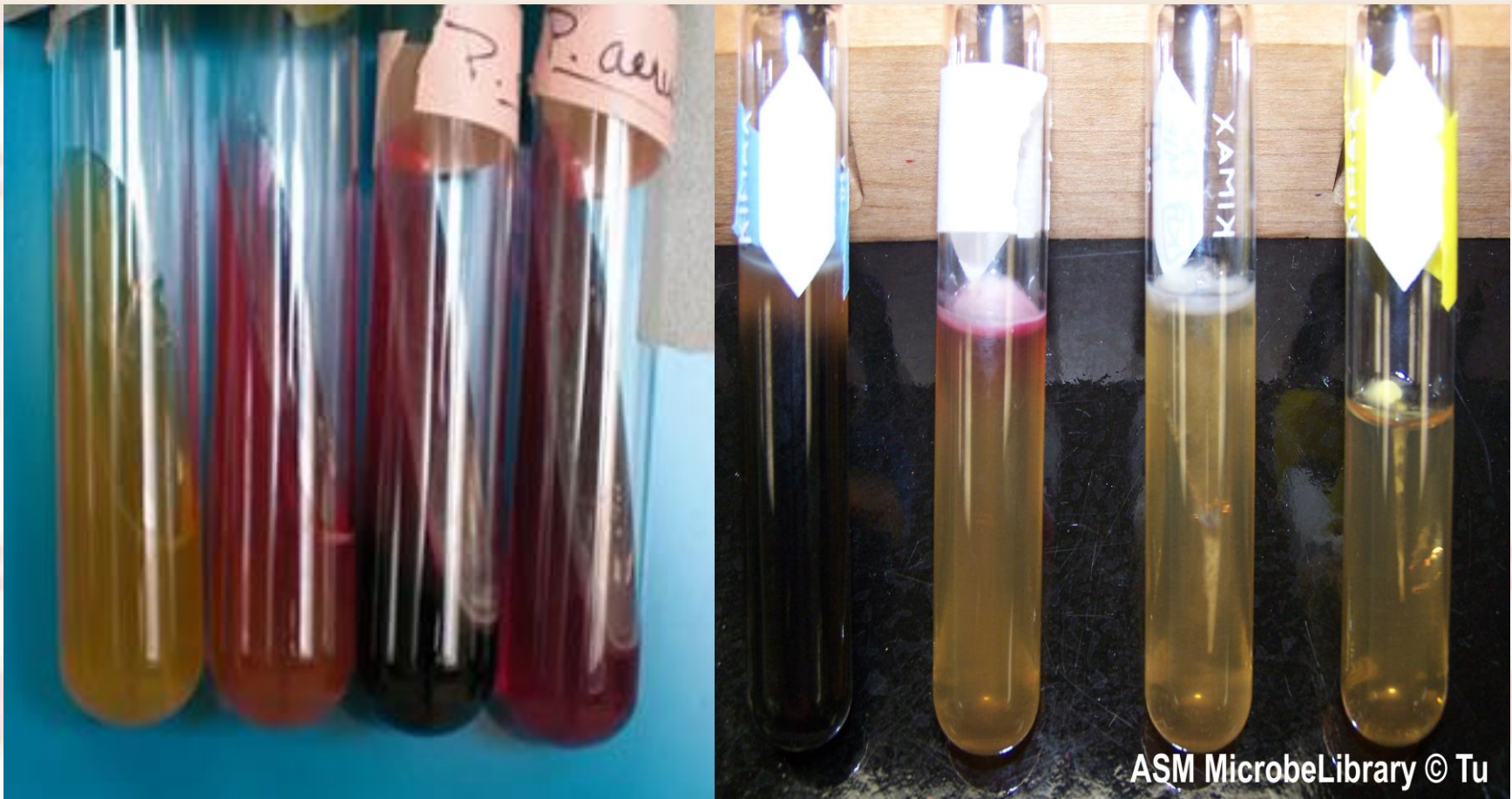
Podloge



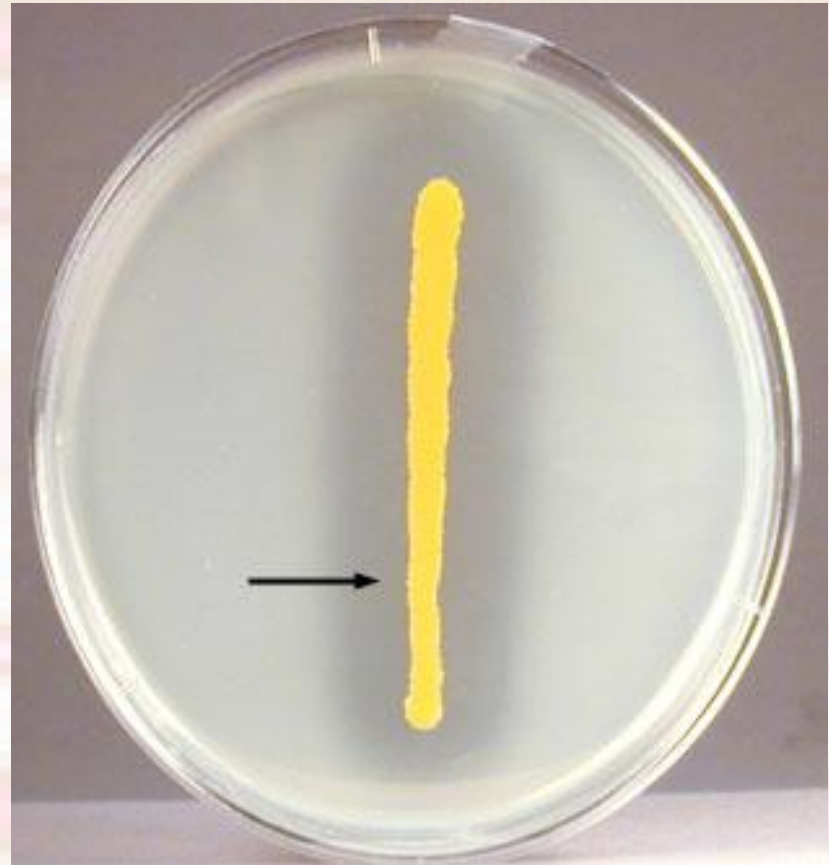
Podloge



Podloge



Podloge



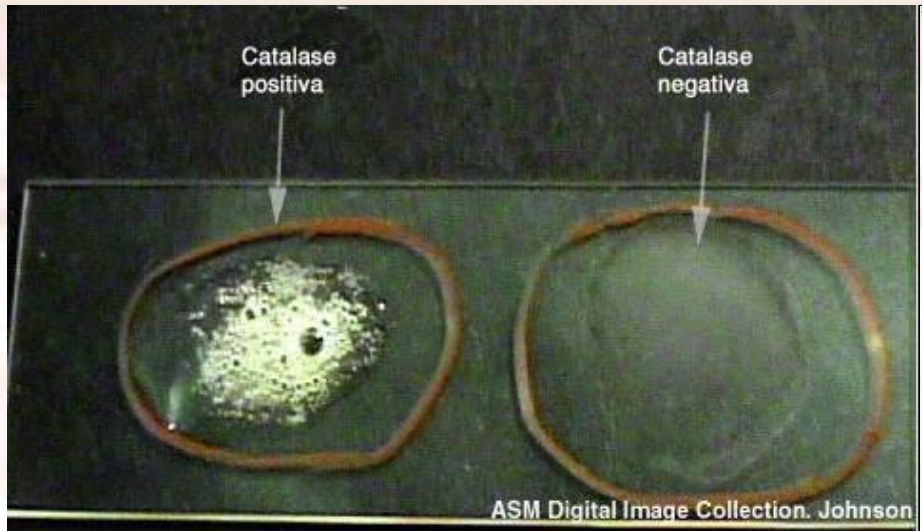
Reagensi i boje

- Reagensi, boje, antiserumi
- Provjeriti datum proizvodnje
- Kod otvaranja zabilježiti datum
- Slijediti upute proizvođača
- Učestalost: dnevno, tjedno

Reagensi

- Reagense treba testirati, koristeći pozitivnu i negativnu kontrolu
- Čuvati ih u hladnjaku preko noći, po danu, na sobnoj temperaturi
- Dnevno provjeravati: katalazu, oksidazu, staph latex, CAMP
- Tjedno provjeravati: optohin, bacitracin, reagense za API sisteme
- Po prijemu provjeravati: streptokit, novobiocin

Reagenssi



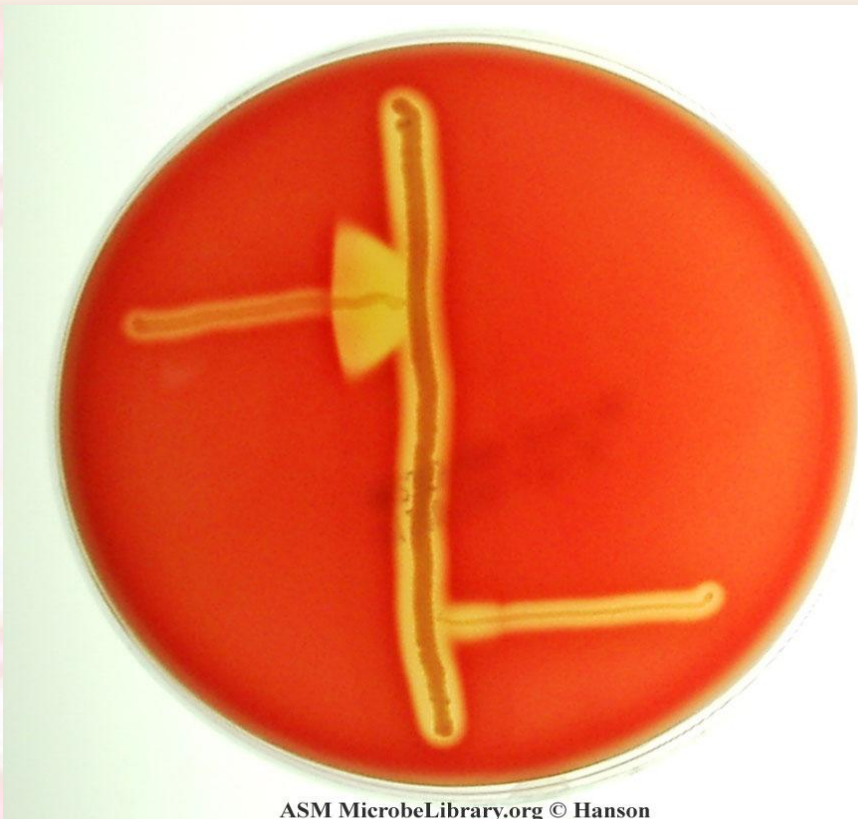
Kontrola identifikacijskih kitova



Kontrola identifikacijskih kitova

- Provjeriti uvijek datum proizvodnje identifikacijskog kita
- Provjeravati reagense koji dolaze uz kit
- Testirati kit standardnim sojevima, prilikom otvaranja novog pakovanja

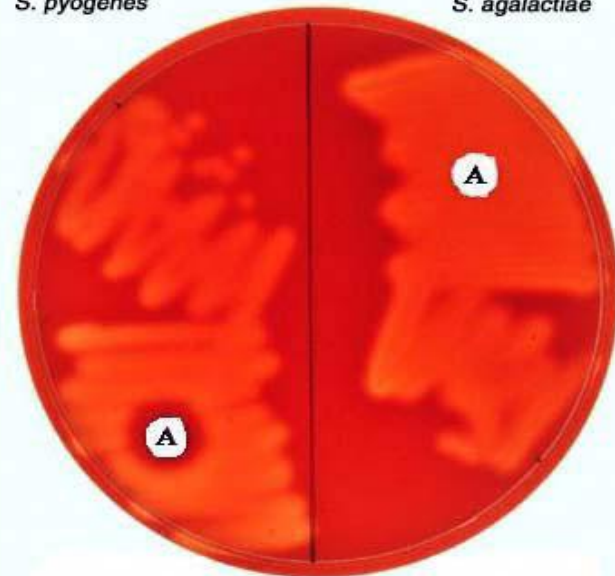
Reagenssi



ASM MicrobeLibrary.org © Hanson

S. pyogenes

S. agalactiae



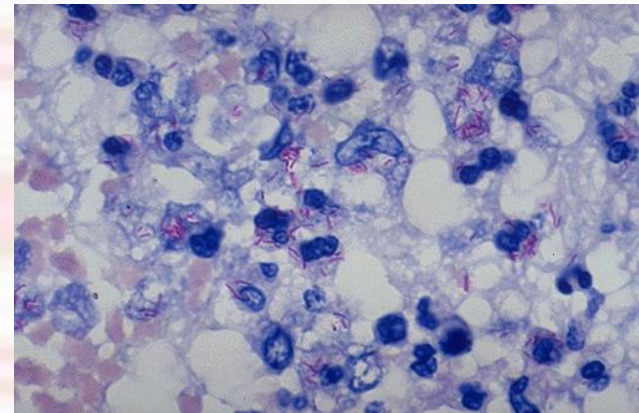
ASM MicrobeLibrary.org © Chamberlain

Boje

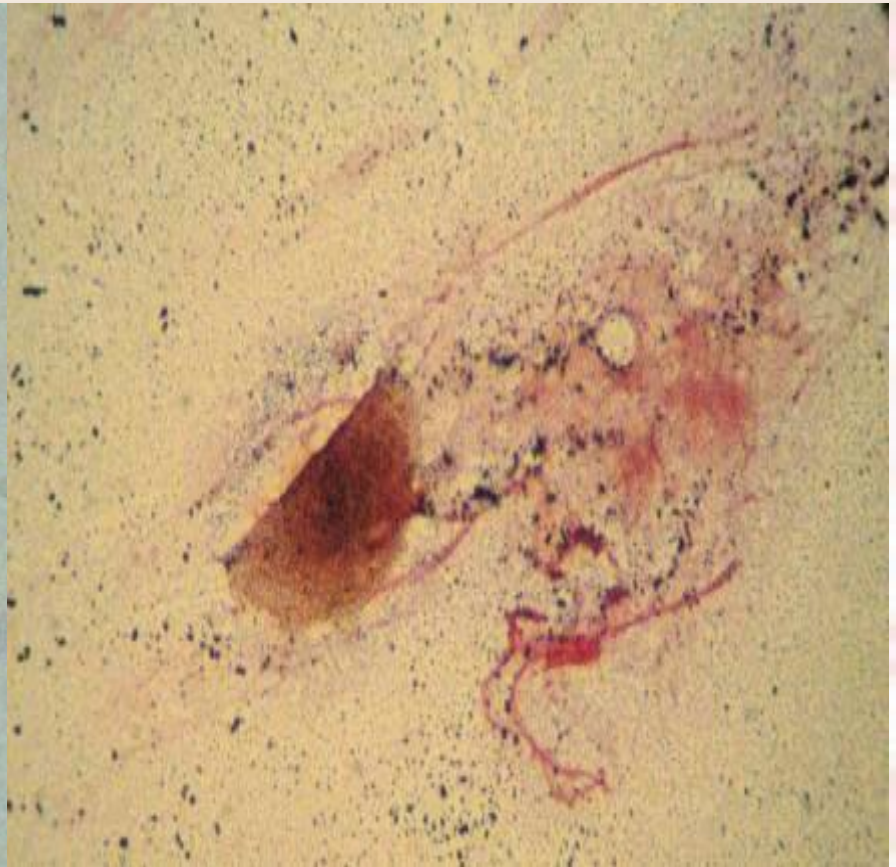
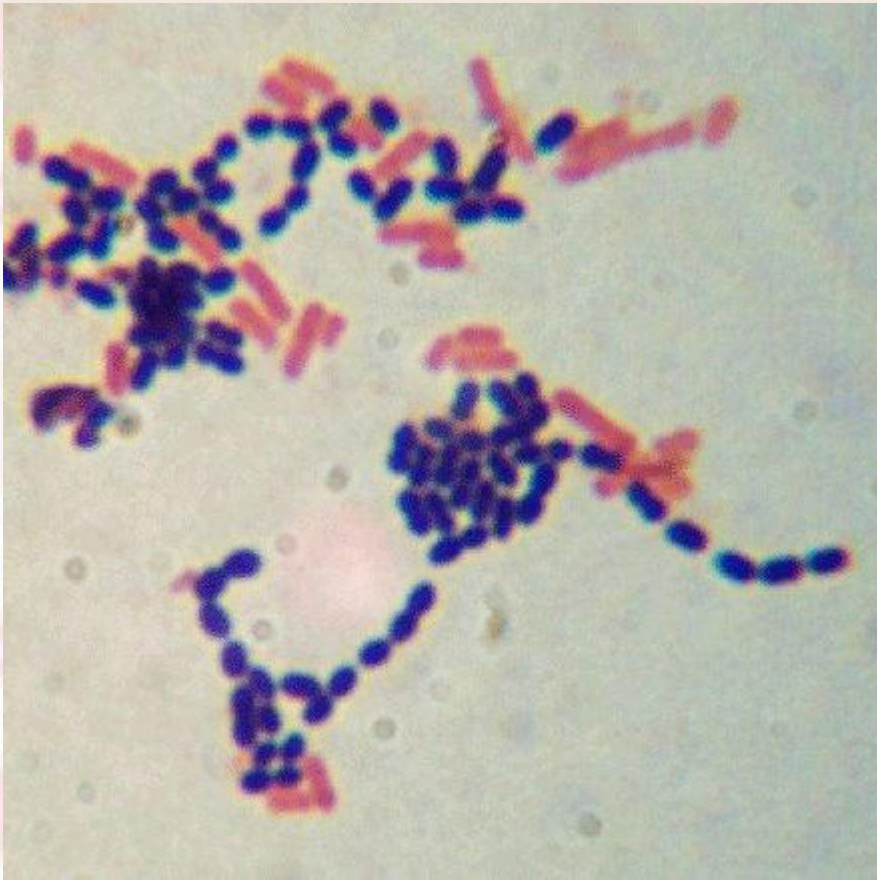
- Koristiti gotove boje, provjeravati datum proizvodnje, te datum otvaranja
- Ukoliko su pripremljene u laboratoriju, obratiti pažnju na pravilnu pripremu i otapanje
- Na etiketi označiti sadržaj, datum pripremanja, koncentraciju, ime osobe koja je pripremila
- Pravilno skladištiti

Boje

- Gram - tjedno kontrolirati bojenjem pripremljenog razmaza, najbolje miješanih kultura *S.aureus* i *E.coli*
- Ziehl-Neelsen – tjedno kontrolirati pozitivne uzorke
- Ostala bojenja: po potrebi

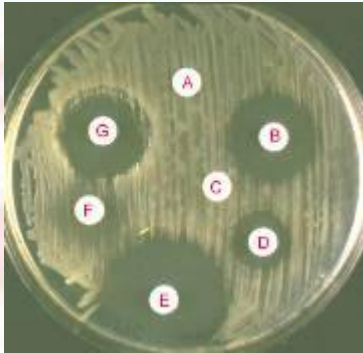


Boje



Antibiogrami

- Disk-difuzija
- Mikrodilucijska metoda
- E-test



Na što obratiti pažnju

- Podloga
- Diskovi
- Inokulum
- Inkubacija
- Oprema
- Interpretacija

Disk-difuzija

podloga	Müller-Hinton agar	4mm debljine pH 7.2-7.4
diskovi	Temperatura čuvanja	4°C - 20°C(min.)
inokulum	McFarland 0.5	(10 ⁸ bakt/ml)
inkubacija	temperatura atmosfera	35°C zrak

Disk-difuzija

- Kontrola Müller-Hinton agara – s kontrolnim sojevima, svaka novonapravljena serija
- Svaki novi lot diskova testirati prije nego se počne koristiti
- Sve dokumentirati
- Ukoliko je ijedan promjer izvan dozvoljenih propisanim standardima (CLSI), potrebno ih je svaki dan kontrolirati dok se problem ne riješi

	<i>S.aureus</i> ATCC 25923
eritromicin	22-30
oksacilin	18-24
klindamicin	24-30
vankomicin	17-21
gentamicin	19-27
penicilin	26-37
trimetoprim- sulfametoksazol	24-32
cefazolin	29-35

	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
ampicilin	16-22	
gentamicin	19-26	16-21
ceftriakson	29-35	
Sulfametoksazol - trimetoprim	24-32	
tetraciklin	18-25	
kloramfenikol	21-27	
tobramicin	18-26	19--25
ceftazidim	25-32	22-29
ciprofloksacin	30-40	25-33

Odabir kolonije



McFarland 0.5

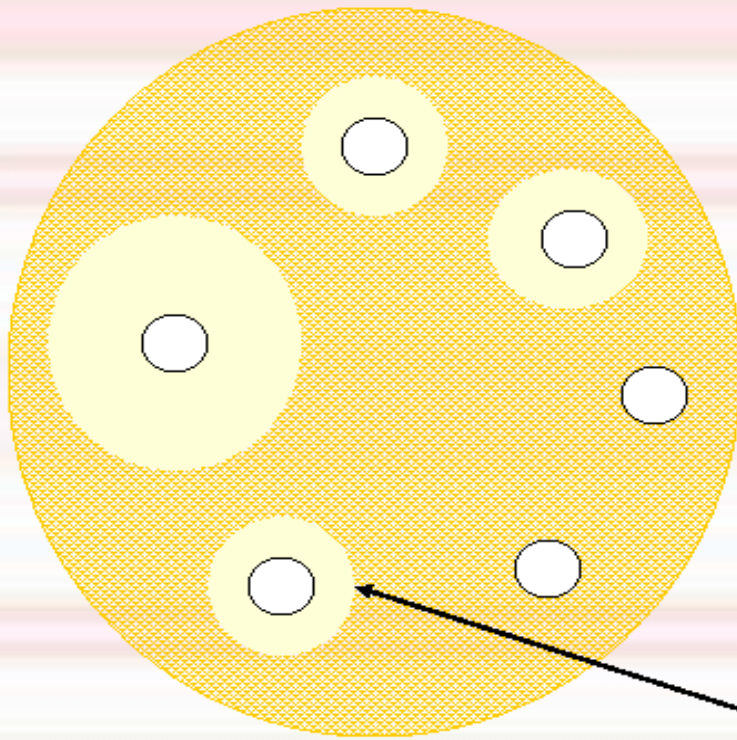


Upotreba dispenzora

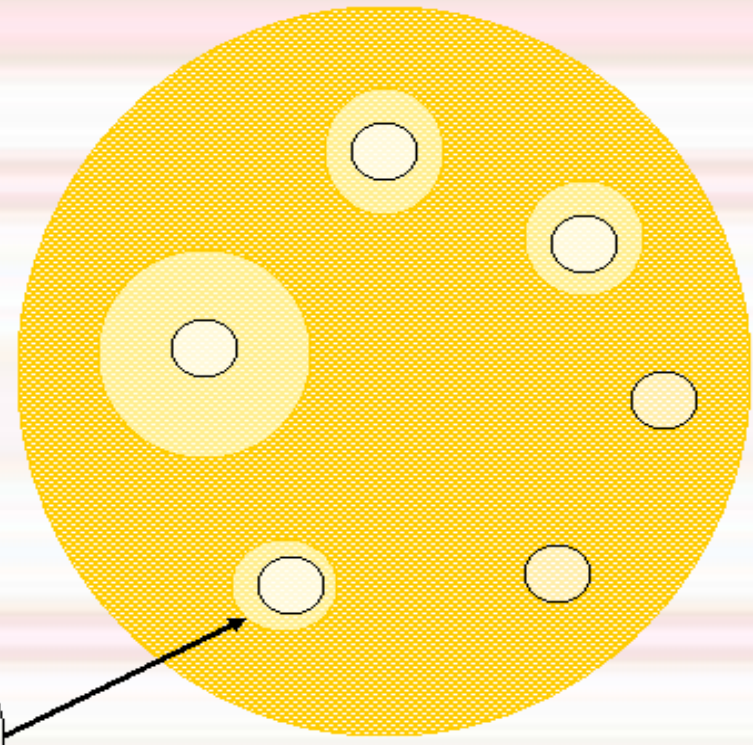


- Prednosti: praktični, brzi
- Nedostaci: kontaminacija

Pogreške kod disk difuzije

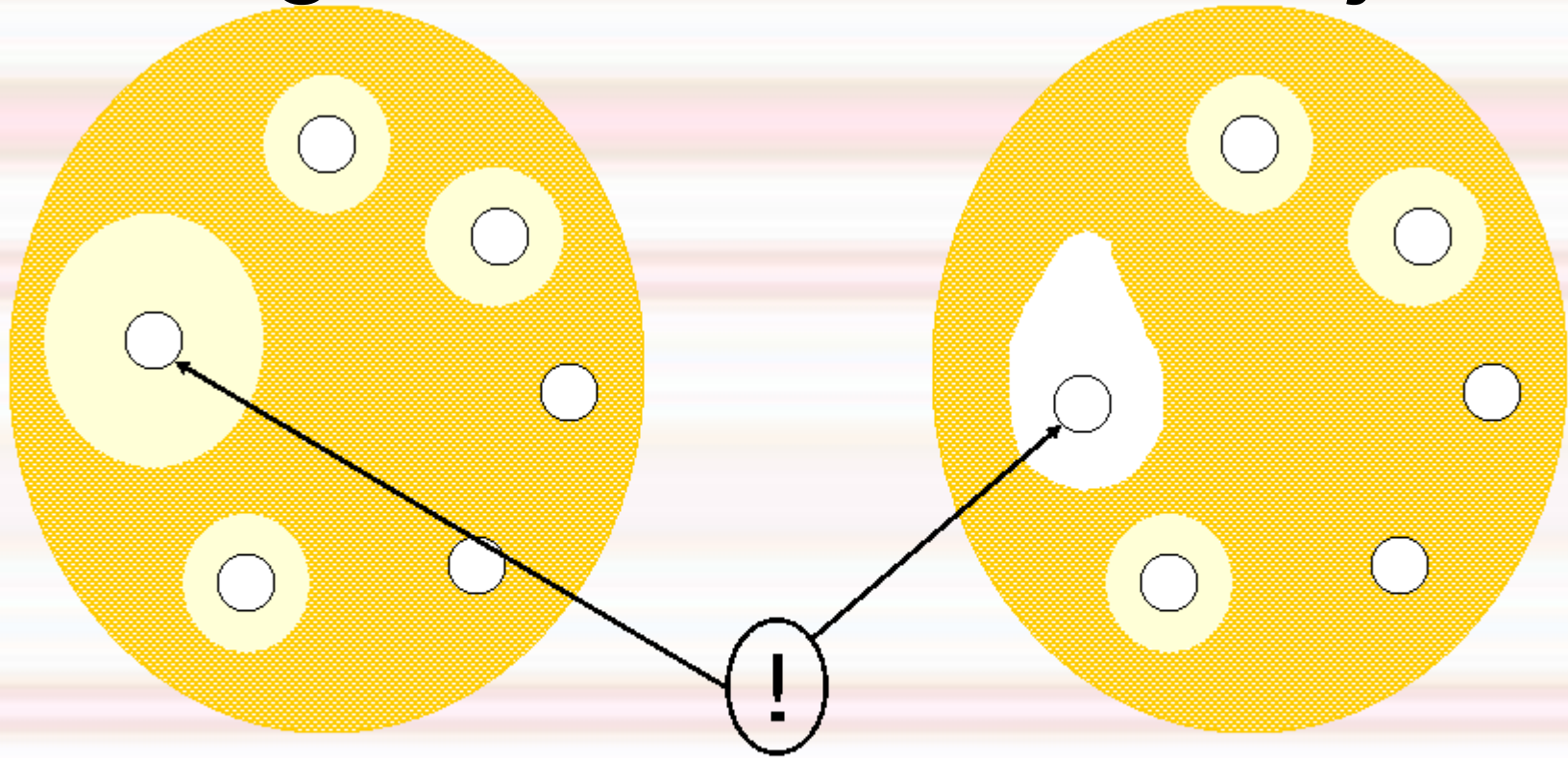


Disks Properly
Aligned and Spaced



Disks Aligned and Spaced
Inoculum too HEAVY

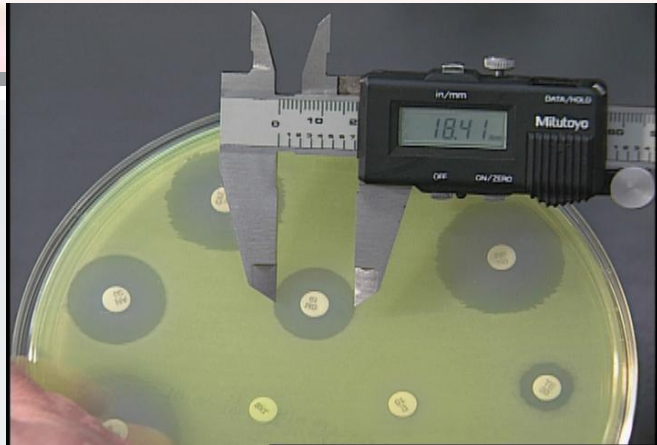
Pogreške kod disk difuzije



Disks Properly
Aligned and Spaced

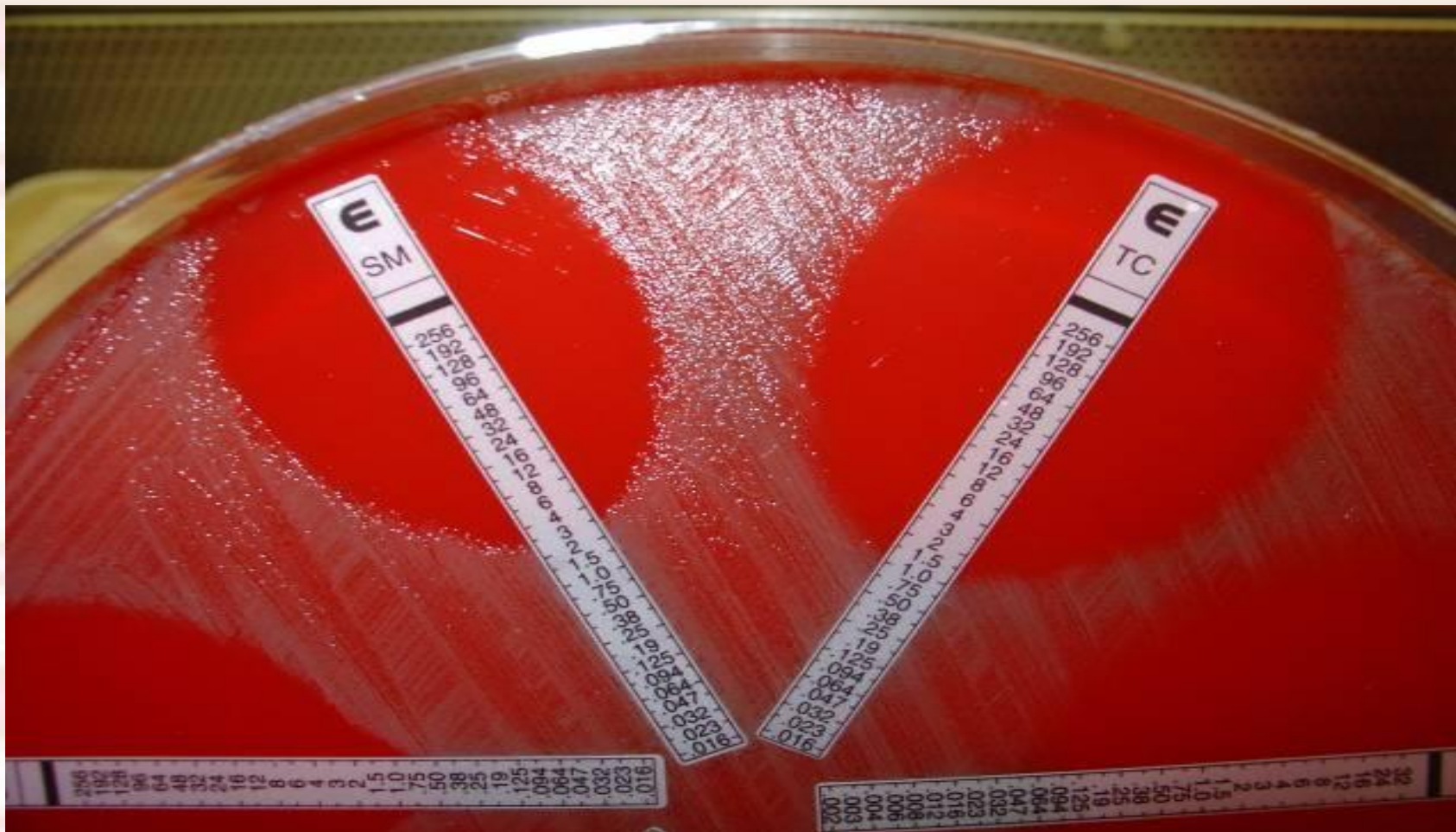
Zone space distorted
because disk not
properly applied

Mjerenje zone



- Pri dobrom osvjetljenju
- Sa stražnje strane ploče

E-test (MIC)



Kontrola E-testa

- Antibiotici: penicilin, ceftriakson, vankomicin
- Izolat: *S.aureus* ATCC 29213
- McFarland standard nije garancija za uspjeh metode
- Potrebno je napraviti suspenziju inokuluma u odnosu 1:1000, te subkultivirati 1 μ l na odgovarajuću podlogu

Organizam (grupa)	podloga	Inokulum suspenzija	Inokulum McFarland	Temp.	Atmosfera	Vrijeme (sati)
aerobi	Müller-Hinton agar	0.85% NaCl	0.5 1, ako je sluzavo	35°C	zrak	16-20
MRSA/ MRSE	M-H agar +2%NaCl	0.85% NaCl	0.5	35°C	zrak	24-MRSA 48-MRSE
anaerobi	Brucella krvni agar	Brucella bujon	1	35°C	anaerobni uvjeti	24-48-72
<i>H. influenzae</i>	Hemophilus agar	Hemofilus bujon ili M-H bujon	0.5 1, ako je sluzavo	35°C	5% CO ₂	20-24
streptokoki	M-H agar +5% ovčje krvi	M-H bujon	0.5 1, ako je sluzavo	35°C	5% CO ₂	20-24
<i>N. gonorrhoeae</i>	Thayer-Martin agar	M-H bujon	0.5	35°C	5% CO ₂	20-24

Kontrola E-testa

- Tjedno, ako je VITEK
- Očekivani rezultati:
 1. Penicilin MIC 0.25-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 2. Ceftriakson MIC 1.0-8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 3. Vankomicin MIC 0.5-2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Kontrola opreme

- Hladnjaci
- Zamrzivači
- Termostati
- Termo-blokovi (vodene kupelji)
- Centrifuge
- Autoklavi
- Sterilizatori
- Aparat za HK
- Aparat za serologiju
- Biosigurnosni kabinet
- PCR
- Kontrola pipeta

Hladnjaci i zamrzivači



- Svakodnevno mjeriti i bilježiti temperaturu
- Temp. koja se tolerira za hladnjake 2 do 8°C
- Temp. koja se tolerira za zamrzivače -8 do -20°C

Termostati



- Svakodnevno mjeriti i bilježiti temperaturu
- Temperatura koja se tolerira $35.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Termo-blokovi (vodene kupelji)

- Svakodnevno kontrolirati temperaturu



Centrifuge



- Mjesečno kontrolirati broj obrtaja s tahometrom
- Tolerira se do 5% od standardnih postavki
- Najmanje jednom tjedno očistiti i sterilizirati

Autoklavi



- Testirati sa sporama *Bacillus stearothermophilus*, najmanje jednom tjedno

Sterilizatori



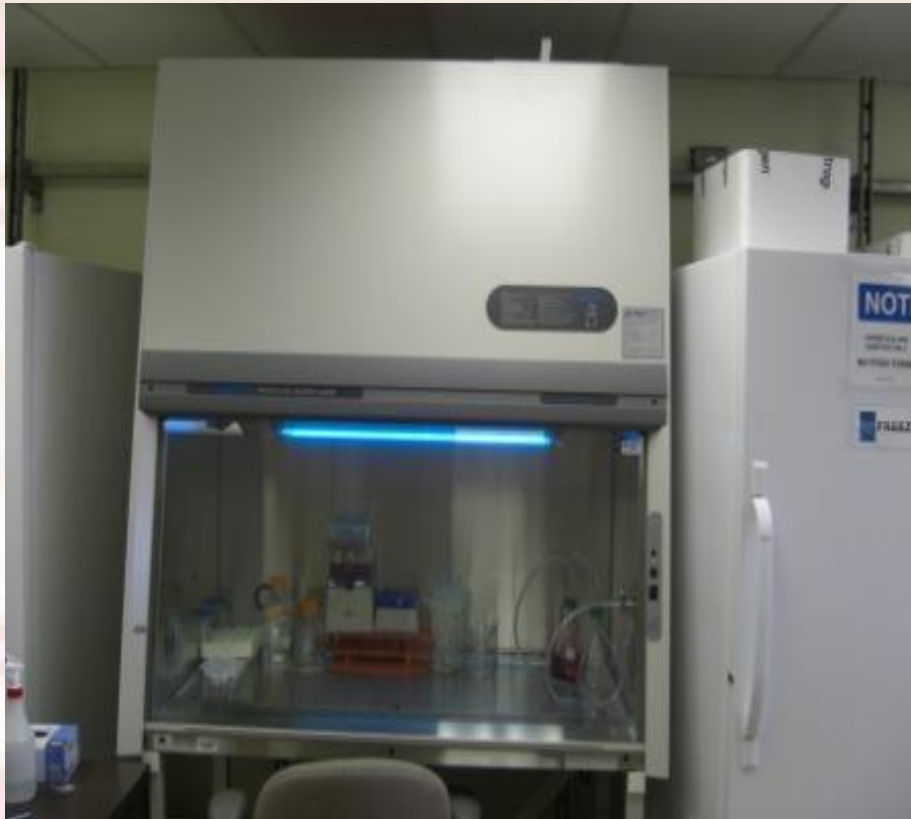
Kontrolirati najmanje jednom tjedno sa sporama *Bacillus subtilis*

Aparat za hemokulture



- Dnevno kontrolirati temperaturu aparata
- Zamijeniti aktivnu disketu
- Provjeriti jučerašnje izvješće (napomena da je aparat pretrpan, da je tu Brucella, dimorfne gljive...)

Biosigurnosni kabinet



- Zabilježiti tlak zraka svaki put kad se kabinet uključi
- Zabilježiti kada je očišćena i dezinficirana radna ploha
- Redovni servis svakih pola godine

Pipete



- Pipete se kalibriraju jedanput u pola godine, vanjska kontrola

PCR

- Kontrolirati uzimanje, transport i obradu uzorka (sačuvati nukl.kiselinu)
- Kontrolirati kontaminaciju (osigurati jednosmjerni tok od mjesta gdje se priprema uzorak do mjesta umnožavanja nukl.kiseline)
- Pozitivna i negativna kontrola

Mogućnost pogreške

- “primeri” su pripremljeni “in house”, pa nisu nužno optimizirani za test; pozitivna i negativna kontrola pripremljene “in house”
- Test treba interpretirati s velikom pažnjom

VITEK

- Kontrolirati svaki novi lot identifikacijskih kartica koje dođu u laboratorij; dalja kontrola nije obavezna, ukoliko se rezultati uklapaju
- U suprotnom, ponavljati kontrolu sljedećih 5 uzastopnih dana
- Kontrolirati svaki novi lot kartica za osjetljivost na antimikrobne lijekove kada dođe, kasnije svakodnevno kontrolirati

Serologija

- Svaki novootvoreni lot se testira, koristeći komercijalno dostupne referentne uzorke
- Svaki serološki test zahtijeva i pozitivnu i negativnu kontrolu, koja ide u isti run
- Zabilježiti sve rezultate
- Ukoliko dođe do pogreške izvijestiti nadležni servis

Kontrola osoblja

- Laboratoriji:
 1. mali: <50 pacijenata dnevno
 2. srednji: 51-500 pacijenata dnevno
 3. veliki: >500 pacijenata dnevno
- Superspecijalistički laboratoriji: ograničeni na jednu ili dvije discipline

Djelatnici laboratorija

- Mali i srednji laboratorij, treba voditi osoba s završenom specijalizacijom i mr sc
 - Veliki laboratorij vodi osoba koja ima dr sc
 - Osoblje: srednji i visoki kadar
 - Kontrola: - kontinuirana edukacija
- Ohrabriti osoblje da sudjeluje na lokalnim, regionalnim i drugim seminarima i radionicama
- Koristiti slijepo, nepoznate uzorke za povremenu provjeru

Vanjska kontrola

- Potrebno je laboratorij uključiti u vanjsku kontrolu glavnih patogena
- Ne bi smjeli biti skupi, previše komplicirani, niti da uzimaju previše vremena
- Treba osigurati liječnicima i široj zajednici dobar kvalitet laboratorijske dijagnostike, procijeniti pouzdanost laboratorijskog rada, identificirati češće greške, stimulirati implementaciju programa kontrole unutarnje kvalitete

Department of Microbiology
University Clinical Hospital Mostar

Mostar,
Bosnia and Herzegovina

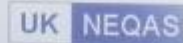
This laboratory is a member of the
European Antimicrobial Resistance
Surveillance System and
successfully participated in the
annual External Quality
Assessment exercise



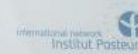
2009

Hajo Grundmann

Christine Walton



DTU Food
National Food
Institute



Certificate of Participation

This is to certify that

Clinical Hospital Mostar
represented by Maja Ostojic

actively participated in

WHO Global Salm Surv External Quality Assurance System 2008

Performance:

- ❖ 5 *Salmonella* isolates of 8 were correctly serogrouped
- ❖ 2 *Salmonella* isolates of 4 were correctly serotyped
- ❖ 65 antimicrobial susceptibility tests of 88 were in accordance with the expected for 8 test strains*
- ❖ 10 antimicrobial susceptibility tests of 13 were in accordance with the expected for *E. coli* ATCC 25922

* with reference to methods and breakpoints listed in the WHO Global Salm-Surv EQAS protocol

Prof. Frank Aarestrup
National Food Institute
Copenhagen, Denmark

Dr. Danilo M. A. Lo Fo Wong
World Health Organization
Geneva, Switzerland

Referentni laboratoriji

- Neke kategorije uzoraka se prosljeđuju u regionalni ili centralni laboratorij
- Trebaju osigurati referentne kulture za kontrolu kvaliteta i obuku osoblja, standardne serume i reagense
- Ukoliko nema vanjske kontrole treba osigurati slijepi uzorak i bakterijske kulture, tako da laboratorij koji je primio uzorak može testirati svoju proceduru izolacije i identifikacije

Literatura

1. Koneman EW, et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th edition. New York, Lippincott, 1997. (113-120)
2. Murray PR, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition. Washington, ASM Press, 2003.
3. Uzunović-Kamberović S, *Medicinska mikrobiologija*. Zenica, 2009. (21-36)