

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			УП-10-016
<i>Интерна контрола квалитета у Служби за микробиологију са паразитологијом</i>				
Страна 1 од 8	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	2	2025-02-03	др Санда Лазић руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. ПРЕДМЕТ И ПОДРУЧЈЕ ПРИМЈЕНЕ

1.1 Предмет упутства

Овим упутством дефинише се начин спровођења интерне контроле квалитета у Служби за микробиологију са паразитологијом, ЈЗУ Болница“ Свети Врачеви“ Бијељина.

1.2 Подручје примјене

Ово упутство су обавезни да примјењују сви запослени у Служби за микробиологију са паразитологијом, ЈЗУ Болница“ Свети Врачеви“ Бијељина.

1.3 Надлежности за примјену

За досљедну примјену упутства надлежан је руководиоца Службе за микробиологију са паразитологијом, ЈЗУ Болница“ Свети Врачеви“ Бијељина.

1.4 Искључења

- Нема.

2. Веза с другим документима

2.1 Референтни документи

- Стандард за сертификацију и акредитацију болница;
- ISO 15189;
- EUCAST SOPs and Guidance documents.

2.2 Остали документи

- ПР-10-042: Обезбјеђење квалитета у резултате испитивања;
- ПР-10-012: Поступак спровођења корективних мјера;
- ПР-10-030: Управљање неусаглашеностима у процесу испитивања.

3. ТЕРМИНИ И СКРАЋЕНИЦЕ

3.1 Термини

- Референтни сој (QC сој)-сој дефинисаних особина за контролу квалитета испитивања у лабораторији.

3.2 Скраћенице

- QC сој-референтни сој;
- EUCAST-a (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing);
- CAESAR (Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance network);
- ATCC (American Type Culture Collection);
- NCTC (National Collection of Type Cultures, England);
- DSM (German Collection of Microorganisms and Cell Culture);
- CCUG (Culture Collection University of Gothenburg);
- CECT (Spanish Type Culture Collection);
- (CIP) Collection of the Institut Pasteur;

Болница Бијељина	Страна 2 од 8	Издање:	Важи од:	УП-10-016
		2	2025-02-03	

- (RFP). („релативне флуоресцентне вриједности“)

4. ОПИС ПОСТУПКА (ПРОЦЕСА)

У лабораторији спроводимо интерну и екстерну контролу квалитета.

Интерна контрола квалитета

Интерна контрола квалитета се спроводи континуирано, према доступности контролних материјала. О обављеној интерној контроли морају да се воде записи, како би се уочили негативни трендови и помаци, те да се исти прате. Резултати испитивања клиничких узорака не могу бити валидирани, нити налаз издат, ако вриједност контроле излази из опсега очекиваних вриједности. Резултати узорака пацијената који су испитани након последњег валидне интерне контроле се морају преиспитати. За сва одступања од очекиваног у резултатима интерне контроле мора бити обавијештен руководилац службе, који ће одобрити даља поступања.

Интерна контрола квалитета реагенаса, тестова, хемикалија и подлога се евидентира на обрасцу ОБ-10-339: *Контрола реагенаса, тестова, хемикалија и подлога*.

4.1.1. Квантитативна испитивања

Мјерење количине супстанце у узорку тачно и прецизно, резултат се изражава бројчано/мјерна јединица (ЕЛИСА тест, тестови испитивања осјетљивости на антибиотике).

Видас имуноанализатор

Принцип теста је ЕЛФА (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*)-комбиновани имуноесеј у 2 корака: имуноесеј сендвич метод са завршном флуоресцентном детекцијом.

Видас протокол убацивања података:

- При извођењу анализе први пут, скенирати бар код на крају упутства у кутији са тестовима како би се унијели неопходни подаци о том тесту у софтвер.
- При отварању новог лота тестова, неопходно је унијети податке са МЛЕ картице тог лота према упутству произвођача (мануелно или аутоматизовано).
- Калибрација (са стандардима који се налазе у свакој кутији тестова), мора се урадити при отварању сваког новог лота тестова и она важи 14 или 28 дана. Стандард, означен са C1, мора бити тестиран у дупликату или трипликату, у зависности од теста, заједно са позитивном и негативном контролом (C1 и C2), који су саставни дио кита.

Вриједност стандарда мора бити у оквиру RFP вриједности опсега. Ако није, калибрацију поновити.

Испитивања осјетљивости на антибиотике

Интерну контролу квалитета вршимо помоћу доступних контролних референтних микроорганизама из колекција (ATCC, NCTC), према смјерницама **EUCAST-a** (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Резултати мјерења осетљивости на антибиотике референтних микроорганизама уносимо у контролне карте.

Културе контролних микроорганизама

Колекције контролних микроорганизама са очекиваним реакцијама служе за интерну контролу квалитета у процесима идентификације микроорганизама до испитивања осјетљивости на антибиотике. Користимо референтне културе (ATCC, NTCC, CIP, CCM) или „in house“ културе. Културе морају бити вијабилне, чисте и да задржавају главне карактеристике и очекивану реакцију у контроли боја, подлога, реагенаса, тестова. Штокове и радне растворе контролних култура чувати према упутству произвођача.

Болница Бијељина	Страна 3 од 8	Издање:	Важи од:	УП-10-016
		2	2025-02-03	

У табели 1. су наведени препоручени контролни сојеви за праћење перформанси теста. У принципу, препоручени контролни сојеви су типични осјетљиви сојеви, али могу да се користе и резистентни сојеви да би се потврдило да ће испитивани метод да детектује резистенцију посредовану познатим механизмима резистенције (Проширена контрола квалитета, Табела 2).

За контролисање инхибиторне компоненте комбинованих дискова β -лактам+инхибитор, препоручују се одређени сојеви продуктори β -лактамаза (Табела 1). Активна компонента се провјерава осетљивим QC сојем.

Контролне сојеве чувати под условима који ће обезбиједити очување вијабилности и карактеристика микроорганизама, према препоруци произвођача. Погодан метод је чување у виду куглица у глицерол бујону на -70°C (или еквивалентној комерцијалној подлози). Двије бочице сваког контролног соја треба да буду складиштене, једна за употребу, а друга као архива.

Сваке недеље супкултивисати једну куглицу из бочице за употребу на прикладну неселективну подлогу и провјерити чистоћу. Од ове чисте културе припремати нову супкултуру сваког дана у недељи. За микроорганизме пробираче, који неће преживјети недељу дана на плочи, серијски супкултивисати сој из дана у дан. QC сојеви могу највише да се супкултивишу 6 дана, након чега треба одбацити плоче и припремити нове чисте културе из замрзнуте бочице за употребу. Када се потроши бочица за употребу, супкултивисање вршити из архиве, а од супкултуре припремити нову бочицу за употребу.

При супкултивисању контролног соја користити неколико колонија, да би се избјегла селекција мутантног соја.

Провјерити да ли су резултати за контролне сојеве у прихватљивом опсегу у EUCAST QC табелама на <http://www.eucast.org>.

У EUCAST контролним табелама су наведени и опсег и циљна вриједност. Понављање тестирања EUCAST QC сојева треба да вриједности пречника зоне насумично распоређене унутар препорученог опсега. Ако је број тестирања ≥ 10 , средња вриједност пречника зоне треба да буде близу циљне вриједности (оптимално $\pm 1\text{ mm}$ у односу на циљну вриједност).

Користити културу QC соја која је стајала преко ноћи и пратити исте процедуре извођења теста као и за клиничке изолате.

- Препорука је да се контролни тестови изводе свакодневно, најмање једном недељно за антимикробне агенсе који се испитују рутински. Контролне тестове треба очитати и оцијенити прије извјештавања резултата испитивања антимикробне осјетљивости за клиничке изолате. У даљем тексту је наведен начин преласка са дневног на недељни начин контроле.
- За сваки дан када се изводи тест, прегледати резултате бар 20 претходних узастопних тестова и испитати појаву трендова и зона које се доследно налазе изван циљне вриједности.
- Ако се два узастопна теста налазе изван опсега са исте стране циљне вриједности, резултати испитивања осјетљивости за клиничке изолате могу да се извјесте, али је неопходно спровести истрагу.
- Ако су два узастопна теста изван опсега, или ако је више дискова изван опсега у једном дану, потребно је истражити узроке прије извјештавања резултата испитивања осјетљивости за клиничке изолате. Испитивања се у том случају можда морају поновити.
- Ако се резистенција код резистентних сојева не детектује, зауставити испитивање осјетљивости за клиничке изолате, истражити и поновити тестирање.

При истраживању могућих извора грешака у диск дифузији, размотрити проблеме везане за антимикробне дискове, подлоге, услове тестирања и сојеве за контролу квалитета.

Болница Бијељина	Страна 4 од 8	Издање:	Важи од:	УП-10-016
		2	2025-02-03	

Поред рутинске контроле квалитета, препорука је да се тестира свака нова тура Муеллер-Хинтон агара да би се осигурало да су све зоне унутар дозвољеног опсега. За сваку новутуру агара мјерити и дебљину агара, која мора бити у прихватљивим границама.

Аминогликозиди могу открити неприхватљиве варијације дивалентних катјона у медијуму, тигециклин може показати варијације у магнезијуму, триметхоприм-сулфаметоксазол ће открити проблеме у садржају тимина и тимидина, а еритромицин неприхватљив рН. Дебљина агара већа или мања од дозвољених граница ће резултовати мањим односно већим пречницима зона.

На високу или ниску концентрацију дивалентних катјона (Ca^{2+} , Mg^{2+}) могу указати зоне инхибиције за аминогликозиде изнад или испод граничних контролних вриједности са *P. aeruginosa* ATCC 27853.

На тимин и тимидин у вишку могу указати зоне инхибиције за SXT испод граничне контролне вриједности код *E. faecalis* ATCC 29212.

Табела 1–Организми за контролу квалитета за рутинско тестирање		
Организам	Сој	Карактеристике
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 76.24 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	Осјетљив, дивљи тип
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5923 CCUG 30600 CECT 943	TEM-1 β -лактамаза, ампициллин резистентан (за контролу инхибиторне компоненте β -лактама+инхибитор комбинованих дискова)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	ЕСБЛ-производејући сој (СХВ-18) (за контролу инхибиторне компоненте β -лактама+инхибитор комбинованих дискова)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2814	KPC-3, SHV-11 и TEM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12903 CIP 76.110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108	Осјетљив, дивљи тип
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429	Слаб продуцент β -лактамаза

Болница Бијелина	Страна 5 од 8	Издање:	Важи од:	УП-10-016
		2	2025-02-03	

	DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794	
Enterococcus faecalis	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795	Осјетљив, дивљи тип
Streptococcus pneumoniae	ATCC 49619 NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638	Смањена осјетљивост на бензилпеницилин
Haemophilus influenzae	ATCC 49766 NCTC 12975 CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539	Осјетљив, дивљи тип
Campylobacter jejuni	ATCC 33560 NCTC 11351 CIP 70.2T DSM 4688 CCUG 11284	Осетљив, дивљи тип. За услове испитивања видети Апендикс А.

Табела 2–Додатни организми за контролу квалитета за детекцију специфичних механизма резистенције (проширена QC)

Организам	Сој	Карактеристике
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	ЕСБЛ-производећи сој (SHV-18)
Staphylococcus aureus	NCTC 12493 CCUG 67181	mecA позитиван, метицилин резистентан(MRSA)
Enterococcus faecalis	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Резистенција на високе дозе аминогликозида (HLAR) и ванкомицин-резистентан (vanB позитиван)

Болница Бијељина	Страна 6 од 8	Издање:	Важи од:	УП-10-016
		2	2025-02-03	

Haemophilus influenzae	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	Смањена осјетљивост на β -лактамске агенсе због ПБП мутација
------------------------	--	--

Фреквенција извођења теста контроле квалитета

• Дневно тестирање

Извођење дневног тестирања контроле квалитета одговара захтјевима када не више од 3 (од 30 узастопних резултата за сваку антимикробну супстанцу/комбинацију микроорганизама), излази изван прихватљивог лимита. Када је овај број већи, захтјевају се лабораторијске корективне акције.

• Недељно тестирање

Демонстрирање задовољавајућег начина извођења за конверзију са дневног на недељно извођење контроле квалитета:

- Тестирати све доступне сојеве двадесет узастопних дана и документовати резултате.
- За пребацивање са дневног на недељно испитивање антимикробне осјетљивости контроле квалитета, не више од 1 од 20 пречника зона за сваку антимикробну супстанцу /комбинацију организма, могу бити изван прихватљивих ограничења пречника зоне.

• Примјена недељног тестирања контроле квалитета

- Недељно тестирање контроле квалитета може бити примјењено једино када се документују задовољавајући начини извођења.
- Изводити контролу квалитета једном недељно и увијек када је било који реагенс, који је компонента теста, промјењен.
- Ако је и један од резултата недељне контроле квалитета ван прихватљивог опсега, неопходне су корективне акције.
- Ако се користи нова антимикробна супстанца или се прелази на коришћење агара од другог произвођача, потребно их је тестирати у наредних 20 до 30 дана и документовати на задовољавајући начин извођења, прије него што се пређе на недељни начин тестирања.

Евиденција контроле квалитета диск дифузионог метода антибиограма се води на интерном обрасцу ОБ-10-341: *Контрола квалитета диск дифузионог метода антибиограма*.

4.1.2 Квалитативна испитивања

Квалитативним испитивањима утврђујемо присуство/одсуство супстанце/ћелија у узорку, утврђују морфолошке карактеристике ћелија у узорку, а резултат се изражава описно. Контролни материјали у семиквантитативним и квалитативним испитивањима могу бити:

Уграђене контроле у тесту, интегрисане у дизајн теста (трака, тачка), примјењују се код имунохроматографских китова за детекцију Аг/Ат у узорку. Налаз није валидан уколико нема контролне траке. Тиме контролишемо количину узорка и кретање узорка кроз стрип. Уколико је доступан спољни контролни материјал, карактеристика сличних узорку, набављен од произвођача теста, ради се контрола, према дефинисаним критеријумима за сваки тест (сваки нови лот, нова испорука, обука новог лаборанта, мјесечно (провјера услова чувања), уколико постоји уочен проблем у чувању теста, у резултатима тестирања.

Интерна контрола квалитета микробиолошких подлога

Болница Бијељина	Страна 7 од 8	Издање:	Важи од:	УП-10-016
		2	2025-02-03	

Провјера квалитета свих подлога (припремљене у лабораторији све серије зато што пролазе процесе растварања, стерилизације и додавање суплемената; готове подлоге: сваки лот испоручене подлоге).

Провјеравамо:

- Стерилност: 2 до 3 плоче из серије величине ≤ 100 или 10 насумично изабраних у већим серијама на температури на којој ће се користити 48 часова.
- Физичке особине—боја, чврстоћа, дебљина, замућеност, сувоћа, глаткоћа, хемолиза, мехурићи и дефекти на површини, величина дубине и косине.
- Контаминација.
- Раст и биохемијска реактивност контролних култура (фертилност подлоге).
- Пе-ха.

Процедура тестирања подлога контролним културама:

- Инокулум-суспензија 0.5 Mc Farland (3-5 колонија чисте свјеже културе).
- Методе инокулације подлога: А, Б, Ц, Д, Е.

Метод “А”-тестирање хранљивости

10 μ л инокулума 1:100 (0.1ml 0.5 McF + 9.9 ml 0.9% NaCl).

Ако нема појединачних колонија поновити контролу са инокулумом 1:1000

Метод “Б”-тестирање селективности

10 μ л инокулума 1:10 (0.1ml 0.5 McF + 0.9 ml 0.9% NaCl).

Метод “Ц”-тестирање течних подлога

10 μ л инокулума 0.5 McF.

Метод “Д”-тестирање биохемијских особина

Инокулисати подлогу (косина/дубина).

- Инкубирати у условима као за клиничке узорке.
- Водити запис о резултатима контроле.

Резултати интерне контроле квалитета припремљених подлога се евидентирају у интерни образац ОБ-10-342: *Контрола стерилности и фертилности подлога*; ОБ-10-339: *Контрола реагенаса, тестова, хемикалија и подлога*.

Интерна контрола квалитета микробиолошких боја

У лабораторији користимо искључиво комерцијалне боје. Радимо дневне контроле, са сојевима дефинисаних карактеристика, упоредо са бојењем клиничких узорака. Резултате уносимо у образац ОБ-10-340: *Контрола квалитета боја*, ОБ-10-337: *Евиденција интерне контроле Ziehl-Neelsen бојења*.

Интерна контрола квалитета антисерума

- Контролисати нови лот антисерума контролним микроорганизмима (позитивни, негативни).
- Додатно их контролисати једном у шест мјесеци.
- Контролисати нови лот реагенаса контролним микроорганизмима (позитивни, негативни).
- Уз свако тестирање узорака користити позитивну и негативну контролу реагенаса

Интерна контрола квалитета у пи-си-ар лабораторији

Болница Бијељина	Страна 8 од 8	Издање:	Важи од:	УП-10-016
		2	2025-02-03	

За молекуларне методе је сам поступак интерне контроле квалитета описан посебно, у свакој методи испитивања.

4.2 Екстерна контрола квалитета

Редовно, према доступности, учествујемо у екстерној контроли испитивања осјетљивости бактерија на антибиотике у оквиру мреже CAESAR (Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance network).

Према расположивости, учествујемо у екстерној контроли квалитета дијагностике туберкулозе културом по Левенштајну, које организује Институт за јавно здравство Републике Српске.

Учествујемо у пи-ти (Proficiency Testing) шемама за пи-си –ар дијагностику.

Резултате анализирамо и планирамо потребне корективне мјере уколико је потребно.

5. ПРИЛОЗИ И ОБРАСЦИ

5.1 Прилози

- Нема.

5.2 Обрасци

- ОБ-10-339: Контрола реагенаса, тестова, хемикалија и подлога.
- ОБ-10-340: Контрола квалитета боја.
- ОБ-10-337: Евиденција интерне контроле Ziehl-Neelsen бојења.
- ОБ-10-342: Контрола стерилности и фертилности подлога.
- ОБ-10-341: Контрола квалитета диск дифузионог метода антибиограма.

6. ЗАПИСИ

Табела 1:

Назив документа	Ознака обрасца	Документ формира	Број примјерака	Рок чувања	Мјесто чувања	Евидентирање
Контрола квалитета диск дифузионог метода антибиограма	ОБ-10-341	Специјалиста медицинске микробиологије, Лабораторијски техничар,	1	6 мјесеци	Служба за микробиологију са паразитологијом	Не.
Евиденција интерне контроле Ziehl-Neelsen бојења	ОБ-10-337	Лабораторијски техничар	1	6 мјесеци	Служба за микробиологију са паразитологијом	Не.
Контрола квалитета боја	ОБ-10-340	Лабораторијски техничар	1	6 мјесеци	Служба за микробиологију са паразитологијом	Не.
Контрола реагенаса, тестова, хемикалија, подлога	ОБ-10-339	Специјалиста медицинске микробиологије, Лабораторијски техничар	1	6 мјесеци	Служба за микробиологију са паразитологијом	Не.
Контрола стерилности и фертилности подлога	ОБ-10-342	Специјалиста медицинске микробиологије, Лабораторијски техничар,	1	6 мјесеци	Служба за микробиологију са паразитологијом	Не.