

Kvalitetskontroll av resistensbestemmelse

AFA- kurs november 2017

Lise Hulløen-Orø
Avdeling for medisinsk mikrobiologi, SSHF Kristiansand



Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål og metoder for resistensbestemmelse (AFA)

Disposisjon

- Hvorfor utføre kvalitetskontroll?
- EUCASTs lappediffusjonsmetode- dokumenter
- Faktorer som påvirker resultatet av resistensbestemmelsen
- Intern kvalitetskontroll og oppfølging av disse
- Avvik og feilsøking
- Harmonisering
- Ekstern kvalitetskontroll (SLP)



Hvorfor utføre kvalitetskontroll?

- Krav i forbindelse med akkreditering
- Vi ønsker god **nøyaktighet** (evne til å treffe den sanne verdi) og **presisjon** (evne til å få samme verdi ved ulike oppsett) i den daglige rutinen.
- Vi ønsker å kunne påvise resistensmekanismer
- God kvalitet å svarene vi sender ut til rekvisenten
- **Pasienten har krav på best mulig behandling**



Norsk akkreditering

- **NS-EN ISO 15189**
 - 5.6.1: «Laboratoriet skal sikre kvaliteten på analysene ved å gjennomføre dem under definerte forhold»
 - 5.6.2.1: «Laboratoriet skal utforme kvalitetskontrollprosedyrer som bekrefter at den ønskede kvaliteten på resultatene er oppnådd.»
- **NA 48B 3.5.2**
 - «Kvalitetsovervåking av analyser og resultater er en vesentlig del av kvalitetssystemet og består av **intern kvalitetskontroll** og **ekstern kvalitetskontroll**.»
 - «Medisinsk mikrobiologiske laboratorier skal utforme og drive et løpende system for kvalitetskontroll som har til hensikt å overvåke laboratoriets rutiner, samt fange opp og dokumentere feil, avvik og mangler i rutinen.»
 - «Laboratoriet skal etablere hensiktsmessige kontrollrutiner som fører til kontinuerlig forbedring av laboratoriets tjenester.»



EUCAST lappediffusjonsmetode

- EUCAST: eucast.org
 - Disk diffusion – Manual v. 6.0
 - Disk diffusion – Slide Show
 - Disk diffusion – Reading guide
 - QC table v. 7.0
 - 5 instruksjonsvideoer
- NordicAST: nordicast.org
 - Metod beskrivelse – bildspel v. 6.0
 - Avlæsningsguide v. 5.0



The screenshot shows the EUCAST website interface. At the top, it says 'EUCAST EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING'. Below that, there's a navigation menu with options like 'Home', 'About EUCAST', 'Expert rules and methods resistance', 'Residence mechanisms', 'Guidance documents', 'Consultations', 'MC distribution and ECOFFs', 'AST of bacteria', and 'AST of mycobacteria'. The main content area is titled 'Quality control' and contains text about ensuring quality control for EUCAST disk diffusion methods. There's also a section for 'Reference histograms' with a link to 'Additional to routine quality control histograms on the EUCAST website'. In the bottom right corner of the screenshot, the AFA logo and name are displayed: 'Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål og metoder for resistensbestemmelse (AFA)'.



Faktorer som påvirker resultatet av resistensbestemmelsen

- Medium
- Antibiotikadepot (lapper og gradienttester)
- Praktisk gjennomføring:
 - Inokulum
 - Applikasjon av lapper
 - Inkubering
- Avlesning



Medium


- Mueller Hinton
 - Hurtigvoksende mikrober
- Mueller Hinton fastidious (MH-F)
 - Mueller Hinton tilsatt hesteblood og β -NAD
 - Langsomtvoksende, krevende mikrober



- Hver ny batch skal kontrolleres for alle relevante kombinasjoner av antibiotika og bakterier.



Medium

- PH 7,2-7,4
 - Lav PH kan gi for store og for små soner
- Agardybde $4 \pm 0,5$ mm 
- Divalente kationer (Ca^{2+} , Mg^{2+})
- Thymin og thymidin
- Forurensning
- Oppbevaring / holdbarhet



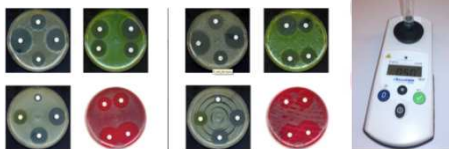
Antibiotikadepot

- Antibiotikalapper og gradienttester
- Oppbevaring
 - etter produsentens anbefalinger.
 - OBS! lys, fukt, temperatur og holdbarhetsdato.



Praktisk gjennomføring- Inokulum

- Plukk isolerte, døgnerfiske kolonier til 0,5 Mc Farland
- Konfluerende, jevn vekst



- Tykkelse på inokulat og tørr/våt pensel påvirker sonediameteren mye!




Praktisk gjennomføring- applikasjon av lapper og inkubering

- **15- 15- 15 minutters regelen gjelder**
- Max 6 lapper på hver skål
- Inkubasjon med bunnen opp
- Max 3-4 skåler i en stabel
- MH inkuberes i vanlig atmosfære ved $35 \pm 1^\circ\text{C}$ i 16-20 timer
- MH-F inkuberes i atmosfære med $5 \pm 1\%$ CO_2



Avlesning

- MH
 - Leses fra baksiden med mørk bakgrunn, med belysning mot platen på 30 cm avstand.
 - MH-F
 - Leses fra forsiden med lokket av med belysning mot platen på 30 cm avstand.
 - Leses ved full hemning
- Figur 2. Sonegrensene måles ved full hemning av vekst (100%) bedømt med det blåste øve
- 
- Kan leses med bruk av skyvelær, linjal eller automatisk soneavleser.



Avlesning



Med skyvelær/ linjal



Med automatisk soneavleser



Avlesning- unntak

Bakterie	Antibiotika	Avlesning
<i>Proteus</i> sp.	Alle	Se bort fra sverming og les sonen der veksten slutter.
Streptokokker sp.	Alle	Avles vekstsoner, ikke β -hemolyse (det er ofte vekst i områder med α -hemolyse).
Alle bakterier	Trimetoprim, trimetoprim-sulfamethoxazol	Mål den indre sonen ved tydelig dobbeltsoner, men overse svak vekst i den indre hemningssonen.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	trimetoprim-sulfamethoxazol	Se bort fra innvekst og mål den ytre sonen
<i>Enterococcus</i> spp.	Vankomycin	Hold skålen opp mot lyset og undersøk sonen. Utydelig sonekant og enkeltkolonier i sonen indikerer vankomycin resistens.



Avlesning- unntak

Bakterie	Antibiotika	Avlesning
Enterobacteriaceae	Ampicillin og amoxicillin-klavulansyre	Overse svak vekst som kan opptre som en indre sone.
<i>E. coli</i>	Mecillinam	Overse enkeltkolonier inne i sonen.
<i>E. coli</i>	Fosfomycin	Overse kolonier inne i sonen.
<i>S. aureus</i>	Benzylpenicillin	Hold skålen opp mot lyset og undersøk sonekanten. Dersom sonekanten er skarp (og ≥ 26 mm), rapporter som R.
<i>Staphylococcus</i> spp.	Linezolid	Hold skålen opp mot lyset og undersøk sonen.
<i>Staphylococcus</i> spp.	Cefoxitin	Undersøk sonen nøye for å detektere evt. kolonier inne i sonen.



God kvalitetskontroll avhenger av

- Anbefalt metode må benyttes
- God og systematisk opplæring av de ansatte
- Deltakelse i ekstern kvalitetskontroll
- Samarbeid mellom de mikrobiologiske fagmiljøene



Kvalitetskontroll- EUCAST anbefaler

- Regelmessig kvalitetskontroll
 - Kontroll av materiale, utstyr og utførelse.
- Utvidet kvalitetskontroll
 - Kontroll av evnen til å påvise resistensmekanismer.
- Kvalitetskontrollstammer kan kjøpes fra stammekolleksjoner.
 - En referansestamme er genetisk stabil og har en MIC-verdi innenfor det konsentrasjonsområdet som er aktuelt ved bruk av disk diffusjonsmetoden.
 - Viktig at stammene oppbevares og benyttes etter EUCAST anbefalinger.



Regelmessig kvalitetskontroll

- For lappediffusjon:
 - Bør utføres daglig (minst 4 ganger pr.uke) for antibiotika om benyttes regelmessig.
 - Bruk anbefalte referansestammer.
 - Kvalitetskontrollene skal behandles på samme måte som rutineprøvene.
 - Skal leses og vurderes opp mot referanseverdier før de kliniske isolatene leses.
- For gradienttester:
 - NordicAST anbefaler å teste gradienttester når «ny lot åpnes» og senere en gang pr måned.



Regelmessige kontroller- registrering av data

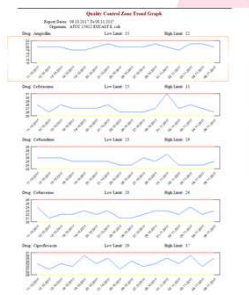
- Ulike måter å registrere resultatene på.
- Viktig å ha et system hvor avvik er lett synlig.

Drug Name	Lot #	Exp. Date	QC Status	QC Date	QC Result	QC Comment	Manufacturer	Lot #	Exp. Date
Amoxicillin	12345	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	12345	2018-12-31
Clarithromycin	67890	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		AstraZeneca	67890	2018-12-31
Clindamycin	11111	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	11111	2018-12-31
Doxycycline	22222	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	22222	2018-12-31
Erythromycin	33333	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	33333	2018-12-31
Fluoroquinolones	44444	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	44444	2018-12-31
Glycopeptides	55555	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	55555	2018-12-31
Macrolides	66666	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	66666	2018-12-31
Penicillins	77777	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	77777	2018-12-31
Tetracyclines	88888	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	88888	2018-12-31
Vancomycin	99999	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	99999	2018-12-31
Trimethoprim-sulfamethoxazole	00000	2018-12-31	OK	2017-11-10	100%		Roche	00000	2018-12-31



Kvalitetskontroller-oppfølgning

- Viktig å ha et system hvor en enkelt kan følge siste 20 dager.
- LIS-systemet, Excel, automatisk soneavleser og andre plattformer kan benyttes til oppfølging.
- Viktig å følge trender over en lenger periode.
- Viktig får å avdekke systematiske avvik.



Avvik og feilsøking

- Noen ganger vil sonediameter avvike fra referanseområdet
- Har ofte en opplagt forklaring
 - Lappen ikke nedpå ageren
 - Feil stamme
 - For tynt/ tykt inokulat
 - Forurensing
 - Feil inkubering
 - Feil lapp
- Dersom forklaringen ikke er åpenbar må en feilsøke videre.



Avvik og feilsøking

- 2 tilfeldige målinger blant siste 20 utenfor ref.omr. → Resultatene fra resistensbestemmelsen rapporteres. Feilsøk!
- 2 målinger etter hverandre blant siste 20 utenfor ref. omr. → Resultatene fra resistensbestemmelsen rapporteres ikke før feilsøking er utført. Det kan være behov for å gjøre resistensbestemmelsen på nytt.
- Flere antibiotikalapper (>2) ligger utenfor ref.omr. samme dag → feilsøking før resultatene rapporteres. Det kan være behov for å gjøre resistensbestemmelsen på nytt.
- Hvis den aktuelle resistensmekanismen ikke påvises hos en kontrollstamme skal resultat ikke rapporteres før feilsøking er utført.



Potensielle feilkilder

Medium	Oppbevaring av plater Ikke fulgt instruksjonene ved fylling av skåler Varianasjon mellom batcher eller bytte av leverandør Tilsetninger pH Agarddybde Utlepsdato
Utførelse	Ikke fulgt 15-15-15 minutters regelen Inkubering Inkubering Astering
Antibiotikalapper	Feil antibiotikalapp (feil antibiotika eller feil styrke) Antibiotikastørhet Ikke romtemperatur ved bruk For mange lapper på skålen
Kontrollstammer	Feil stamme Mutasjon Kontaminering For gammel kultur

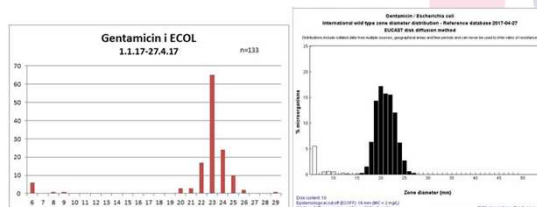


Utvidet kvalitetskontroll

- Resistensmekanismer:
 - Utvidet kvalitetskontroll utføres for å være sikker på at resistensmekanismer oppdages.
 - EUCAST har anbefalte kontrollstammer med kjente mekanismer som skal benyttes.
- Sammenligning av distribusjoner:
 - 50-100 kliniske isolater testes fortløpende en gang i året mot spesifikke antibiotika
 - Medianverdien av sonediameter skal ikke avvike mer enn ± 2 mm fra EUCASTs medianverdi



Utvidet kvalitetskontroll-distribusjoner



- Sammenligning av egne distribusjoner mot EUCASTs medianverdi er nyttig ved mistanke om metodeproblemer.



Harmonisering

- Harmonisering er viktig for å se at alle ansatte har en felles oppfatning av metoden.
- Alle på lab leser av de samme skålene.
- Kan velge ut antibiotika/mikrobe-kombinasjoner som man vet kan være vanskelige.
- Både lapper og MIC.
- Resultat gjennomgås etterpå og avvik/feilkilder diskuteres.
- En del av en kontinuerlig opplæring.
- Er veldig nyttig ved innføring av nye lapper.

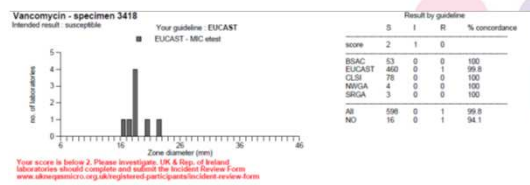


Ekstern kvalitetskontroll- SLP

- Ekstern kvalitetskontroll er et krav fra NA.
- SLP- Prøver blir tilsendt og disse skal behandles som en vanlig pasientprøve.
- Viktig å benytte SLP som kompetanseheving på avdelingen.
- Resultater må gjennomgås og diskuteres slik at alle kan lære av eventuelle avvik.



SLP- eksempel på avvik



- Undersøk om avvik har en opplagt forklaring.
- Hvis ikke må feilsøking utføres.



Utfordringer- kvalitetskontroll

- Lage ett opplegg som er gjennomførbart i laboratoriet
 - Tid
 - Økonomi
 - opplæring
- Ha nok kontroller til at feil oppdages raskt nok
- Ha et system som er enkelt å benytte og hvor avvik varsles.
- Feil/ avvik må tas tak i fortløpende for å unngå at det går utover pasientprøver.



