

Meetodite verifitseerimine kliinilises mikrobioloogias versioon 2 (märts 2018)

Antud dokument on üldine juhend kliinilise mikrobioloogia laboritele laboris kasutatavate meetodite verifitseerimiseks. Kuna kliinilise mikrobioloogia meetodite verifitseerimine pole Euroopa Liidus reglementeeritud, võib näidistena kasutada Ameerika Ühendriikides välja töötatud CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) ja ASM (American Society for Microbiology) dokumente.

Kliinilise mikrobioloogia alla kuulub nakkustekitajate laboratoorne diagnoosimine erinevatel meetoditel sh külv koos mikroobi samastamise ja antibiogrammi määramisega, mikroskoopia, antigeeni määramise meetodid, antikehade määramine, mikroobi DNA/RNA määramine.

Mikrobioloogilise diagnostika eripära (meetodid enamasti kvalitatiivsed või poolkvantitatiivsed, mis nõuavad subjektiivset interpretatsiooni; mikroobide bioloogiline variatsioon) tõttu on verifitseerimise nõuded paindlikud. Samuti puuduvad mitmetel juhtudel referentsmeetodid ning verifitseeritava meetod võib olla põhimõtteliselt teistsugune ning parem kui traditsiooniliselt kasutatav.

Verifitseerimine – on ühekordne protsess enne uue kommertsiaalse meetodi kasutuselevõttu laboris, mille käigus selgitatakse, kas meetodi eeldatav tulemus on laboris saavutatav

Uue meetodi sisseviimise etapid kliinilise mikrobioloogia laboris

1. Uue meetodi eesmärgi kindlakstegemine (skriining, diagnostiline, kinnitav)
2. Uue meetodi omaduste hindamine ilmunud teaduspublikatsioonide põhjal
3. Vastavalt meetodi omadustele hindab labori juhtiv valdkonna spetsialist uue meetodi verifitseerimise vajadust ja ulatust kinnitades verifitseerimise plaani ja aktsepteeritava tulemuse.

Verifitseerimise eesmärgid

1. Tõendada, et testsüsteem toimib tootja spetsifikatsioonile vastavalt
2. Tõendada labori suutlikust saada täpseid ja korratavaid tulemusi
3. Regulatsioonidest, standarditest tulenevate nõuete täitmine (näiteks akrediteerimiseks, sertifitseerimiseks, tööloa saamiseks, kehtivate seadusandlike aktide täitmiseks etc)

Verifitseerimise parameetrid

1. Mõõtmise tõesus (võrdlemine referents-meetodiga, selle puudumisel katsed simuleeritud või eelnevalt kirjeldatud proove kasutades). Hinnatakse vastavust saavutatud ja oodatud tulemuse vahel.
2. Mõõtmise täpsus ja kordustäpsus. Hinnatakse ühe katse jooksul, erinevate katsete käigus (erinevatel päevadel) ja erinevate töötajate (vähemalt kaks) poolt teostatuna. Igas katses kasutatakse mitmeid erinevaid proove (positiivsed ja negatiivsed)

Verifitseerimise näidustused

Verifitseerimine on soovitatav järgnevatel juhtudel:

- Kommertsiaalsete meetodite sisseviimine, mille töö põhimõte erineb varem kasutatud meetodist. Eelkõige on soovitatav verifitseerida automatiseeritud tundlikkuse määramise, mikroobide samastamise ja verekülvi süsteemid. Nimetatud süsteemide verifitseerimiseks on väljatöötatud ka spetsiifilised nõuded.

- Muudatused kommertsiaalsete meetodite rakendamisel, mille käigus muudetakse töö põhimõtet

Verifitseerimine **pole üldjuhul vajalik** järgnevatel juhtudel:

- Söötmed, reagendid (mida kasutatakse komponendina diagnostilises protsessis)
- Meetodi ühe osa/etapi asendamine põhimõttelt sarnase osaga/etapiga

Spetsiifilised verifitseerimise näidustused/näited:

- Kui antibiootikumtundlikkuse paneeli lisatakse uued antibiootikumid, siis verifitseerimisele kuuluvad vaid need (mitte kogu paneel uuesti)
- Interpreteerimis- ja ekspert tarkvara muutuste korral kuuluvad testimisele ainult konkreetsete muudatustega seotud komponendid/testid. Taksonoomiliste muutuste tegemine pole näidustus verifitseerimiseks.
- Kui antibiootikumi paneeli lisatakse uued lahjendused pole verifitseerimine vajalik juhul kui interpreteerimiskriteeriume ei muudetud.
- Verifitseerimine pole vajalik peale rutiinset seadme hooldust, parandamist ning seadme või tarkvara uuendamist (kui testpaneel jäi samaks). Rutiinne kvaliteedi kontroll 1-5 päeva on piisav peale seadme remonti.
- Kui seade teiseldatakse teise asukohta on piisav ühekordne kvaliteedikontroll enne patsiendi proovide testimist.

Igal konkreetsel juhul otsustab verifikatsiooni vajaduse ja ulatuse kliinilises mikrobioloogias pädev vastutav arst/spetsialist/labori juht, arvestades nii **meetodi** (teiste laborite kogemused meetodi kasutamisel), **labori** (testimisele kuluv aeg, raha, tööjõukulu) kui **patsiendi** (testi ebakorrekse tulemuse mõju patsiendile) poolseid faktoreid. Vajadusel saab pöörduda ELMÜ Kliinilise mikrobioloogia sektsiooni poole ekspertarvamuse saamiseks.

Verifitseerimisel võib kasutada nii olemasolevaid mikroobide tüüptüvesid (ATCC jt) kui välise kvaliteedi kontrolli käigus omandatud mikroobitüvesid.

Kommertsiaalsete meetodite verifitseerimine

1. Antibakteriaalse tundlikkuse määramine analüsaatoriga

Mikroobitüved on soovitatav valida nii, et nad esindaksid antud laboris sagedamini esinevaid liike ja antibakteriaalse resistentsuse fenotüüpe. **Testitavate isolaatide arvu ja aktsepteeritava tulemuse otsustab labor** (*CLSI soovitus 30 isolaati antibiootikumipaneeli kohta s.h. tundlikud ja resistentsed. Kordustäpsuse jaoks soovitab CLSI soovitada kasutada 5 isolaati, millest vähemalt kaks on resistentsed; kolmes korduses vähemalt 3 päeva ning aktsepteeritav kordustulemus $\geq 95\%$*).

Mõõtmise täpsuse (kordustäpsuse) arvutamine antibiootikumi **minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni** (MIK) määramisel:

$$\frac{\text{Katsete arv, milles MIK väärtus } \pm 1 \text{ lahjendus, võrreldes referents MIK}}{\text{Katsete koguarv}} \times 100$$

Tulemust võib väljendada kõikide antibiootikumide ja mikroobiliikide kohta koos või eraldi

Mõõtmise täpsuse (kordustäpsuse) arvutamine antibiootikumi tundlikkuse määramise **interpreteeritava tulemuse** (tundlik, mõõdukalt tundlik, resistentne) korral:

Katsete arv, milles AB tundlikkuse interpretatsioon vastas referentsinterpretatsioonile

----- x 100

Katsete koguarv

Tulemust võib väljendada kõikide antibiootikumide ja mikroobiliikide kohta koos või eraldi.

Antibiootikumtundlikkuse EUCAST metoodika ja hindamiskriteeriumite sisseviimisel lähtuda vastavast dokumendist:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Check_list_for_implementation_of_EUCAST_susceptibility_testing_v1.0.pdf

2. Diagnostiline mikrobioloogia ja mikroobide identifitseerimine analüsaatoriga

Verifitseerimise protsess on sarnane nii diagnostilise mikrobioloogia meetodite (mikroobide, nende antigeenide, nukleiinhapete ja antikehade määramine) kui mikroobide identifitseerimise meetodite (antiseerumid, antigeenid, instrumendid, kitid jne) osas.

Diagnostiline mikrobioloogia. Mõõtmise tõesus: kommertsiaalsete meetodite verifitseerimiseks kasutatavate proovide arvu otsustab labor. *CLSI soovib kasutada 20 proovi (võrdselt positiivseid ja negatiivseid), mida määratakse paralleelselt uue ja vana või referentsmeetodiga ning soovituslik kokkulangevus vähemalt 90%.* Teostatakse mõõtmise täpsuse (kordustäpsuse) uuringud. Kvalitatiivse diagnostilise testi korral tuleks saavutada sarnased või võrreldavad tulemused. Kvantitatiivse (numbrilise) tulemuse korral arvutada variatsiooni protsent ühes katses, katsete vahel ja kokku.

Mikroobtüvede automaatne identifitseerimine. Meetodite verifitseerimiseks soovitatakse kasutada kliiniliselt olulist isolaate (*CLSI soovitus vähemalt 20 erinevat, soovituslik kokkulangevus vähemalt 90%*), lisaks tüüptüved ja välise kvaliteedi kontrolli süsteemi kaudu omandatud tüved.

3. Verekülvi süsteemid

Verifitseerimine on vajalik vaid juhtudel, kui uuel süsteemil on erinevat tüüpi verekülvi pudelid. Süsteemi riist- ja tarkvara muutuste korral piisab süsteemi töötamise tehnilisest tõestusest. Verifitseerimiseks soovitatakse kasutada ühte variantidest:

Verekülvipudelite inokuleerimine mikroobidega. Valitakse veres sagedamini esinevad mikroobid (*CLSI soovitus 20 tüve*) vastavalt konkreetsele laborile. Verekülvipudelis süstitakse tootja poolt minimaalselt nõutud kogus antibiootikumivaba steriilset inimese verd ja mikroobisuspensiooni 0,1 PMÜ/ml vere kohta (umbkaudne mikroobikontsentratsioon sepsise korral). Meetod on verifitseeritud, kui süsteemi tuvastab kõik organismid tootja poolt määratud aja jooksul.

Alternatiivse variandina võib kasutada paralleelset verekülvi uuringut. Patsiendilt võetud veri uuritakse paralleelselt uue ja vana verekülvi süsteemiga kuni saadakse soovituslikult 20 positiivset tulemust. Meetod on verifitseeritud kui tundlikkus võrreldes referentsmeetodiga on vähemalt 95% ja

ei esine olulisi erinevusi määramisele kulunud ajas. Nimetatud meetod on komplitseeritum, mistõttu ei sobi kõigile laboritele.

Kirjandus

1. Clark, R. B., M. A. Lewinski, M. J. Loeffelholz, and R. J. Tibbetts, 2009. Cumitech 31A, Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, DC.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22nd informational supplement. CLSI document M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems. CLSI document M52. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. CLSI document M58-Ed1, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
5. Tibbetts, R. J. Verification and Validation of Tests Used in the Clinical Microbiology Laboratory. Clinical Microbiology Newsletter, 2015; 37, 19