TAKIBI

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Test Verifikasyonu

Dr. Cüneyt ÖZAKIN

Laboratuvar Uygulamalarında Kalite ve Akreditasyon Çalışma Grubu Üyesi

S1. Kan kültür sisteminde aşağıdaki durumlardan hangisinde verifikasyon uygulanmalıdır?

1. Halen kullanılmakta olan sistemin yazılımı aynı ama inkübasyon kapasitesi artırılmış kabinin kurulması
2. Kullanılan cihazın pozitifliği saptamaya yönelik sinyal saptama tekniğinde değişiklik olması
3. Farklı bir kan kültür sisteminin laboratuvara kuruluyor olması
4. Kullanıla gelen sistemde yeni bir besiyeri içerikli şişelerin kullanılmaya başlanması
5. Sistemin laboratuvar alanı içinde yerleşiminin değiştirilmesi durumunda

A. 1 ve 3 B. 1 ve 5 C. 2, 3 ve 4

D. Sadece 5 E. Hepsi

S1. Kan kültür sisteminde aşağıdaki durumlardan hangisinde verifikasyon uygulanmalıdır?

1. Halen kullanılmakta olan sistemin yazılımı aynı ama inkübasyon kapasitesi artırılmış kabinin kurulması
2. Kullanılan cihazın pozitifliği saptamaya yönelik sinyal saptama tekniğinde değişiklik olması
3. Farklı bir kan kültür sisteminin laboratuvara kuruluyor olması
4. Kullanıla gelen sistemde yeni bir besiyeri içerikli şişelerin kullanılmaya başlanması
5. Sistemin laboratuvar alanı içinde yerleşiminin değiştirilmesi durumunda

C. 2, 3 ve 4

Verifikasyonun zorunlu olmadığı durumlar?

- Halen kullanılmakta olan sistemin yeni versiyonu
- İki sistem arasında
  - Yazılım
  - Donanım
  - Besiyerinde

farklılık yoksa

Verifikasyon yapalım

- Yeni bir sistemin ise
- Kulanıla gelen sistemde
  - Yazılımda değişiklik var ise
  - Pozitifliği saptayacak teknikte değişiklik olması
  - Besiyeri içeriğinde veya yeni bir tür kültür şişesi kullanımı söz konusu ise

Kan Kültür Sistemi Verifikasyonu

- Verifikasyon planı
  - Yöntem seçimi ve protokolün belirlenmesi
  - Referans test / halen kullanımda olan yöntem
  - Örnek seçimi ve sayısı
  - Sonuçların değerlendirilmesi

Kan Kültürü Sistemlerinin Verifikasyonu

İki önemli soruya yanıt aranıyor

Kan kültür sistemi;

- Kullanılan besiyeri mikroroganizmaların üremesini destekliyor mu?

  (maya, güç üreyen anaerop mikroorganizmalar)

- Sistem kan kültürünün içerdiği patojen mikrorganizmaların zamanında saptıyor mu?

Verifikasyon yaklaşımları

- Ekimli kan kültür yöntemi
- Paralel kan kültür yöntemi

Ekimli kan kültür verifikasyon yaklaşımı

Suşların seçimi;

- En az 20 izolat
  - İyi tanımlanmış kan kültür izolatları (hastanenizde saptanan)
  - Aerop; gram pozitif /negatif, anaerop ve maya içermeli

Seçilen her izolat farklı her şişeye ekilmelidir.

- aerop
- anaerop
- pediyatri

S2. Ekimli kan kültür verifikasyon yaklaşımı için yanlış olan uygulamayı seçiniz.

A. Seçilen bakteri süspansiyonlarından dilüsyonlar hazırlanarak 5-30 CFU olarak şişeye eklenir

B. Hazırlanan dilüsyon aynı miktarda farklı kültür şişelerine eklenmelidir

C. Kültür şişesine eklenecek volüm steril serum fizyolojik ile tamamlanır

D. Çalışmada bir negatif kontrol şişesi eklenmelidir

E. Çalışmada bir sterilite kontrol şişesi eklenmelidir

S2. Ekimli kan kültür verifikasyon yaklaşımı için yanlış olan uygulamayı seçiniz.

A. Seçilen bakteri süspansiyonlarından dilüsyonlar hazırlanarak 5-30 CFU olarak şişeye eklenir

B. Hazırlanan dilüsyon aynı miktarda farklı kültür şişelerine eklenmelidir

C. Kültür şişesine eklenecek volüm steril serum fizyolojik ile tamamlanır

D. Çalışmada bir negatif kontrol şişesi eklenmelidir

E. Çalışmada bir sterilite kontrol şişesi eklenmelidir

Ekimli kan kültür verifikasyon yaklaşımı

İnsan kanı inokülasyonu

- Üretici firmanın önerdiği minumum miktarda
- Antibiyotik içermeyen, steril insan kanı
- İzolatların konulacağı her şişe
- Negatif kontrol şişesi: insan kanı (+) – izolat Ø
- Sterilite kontrol şişesi

Ekimli kan kültür verifikasyon yaklaşımı

İnokülasyon hazırlanması:

- Her bir izolatın McFarland 1 dilüsyonu ~ $3x10^8$ CFU/ml
- McFarland 1 dilüsyon 1:100 x3 kez seri dilue edilir
- Final konsantrasyon: $3x10^2$ CFU/ml = 30 CFU / 0.1 ml
- Son dilüsyondan 0.1 ml alınıp şişeye ekim yapılır
- Şişede ~ 5 -30 CFU

Sonuçların Değerlendirilmesi

- **İzolatların saptanma zamanları**

- Tüm izolatların üretici firmanın belirttiği süre içinde saptanırsa
- Tüm izolatların %95'i 3 gün içinde saptanırsa

sistem yeterli kabul edilir

Paralel kan kültür verifikasyon yaklaşımı

- Her hastadan eşdeğer kan hacimleri 2 set halinde alınır
- Karşılaştırılan yeni ve diğer sistem şişelerine ekilir
- En az klinik anlamlı 20 pozitif sonuç alınıncaya kadar çalışmaya devam edilir
- Kontaminan değerlendirmeler dikkate alınmaz

- Yeni yöntem duyarlılığı referans yönteme göre >%95 doğrulandı kabul edilir.

Ekimli kan kültür

- Gerçek hasta yok
- Az rastlanan mikroorganizmaların saptanmasının değerlendirilmesi
- Emek yoğun bir çalışma
- Hızlı sonuç

Paralel kan kültür

- Gerçek hasta ve laboratuvar koşullarında değerlendirilme
- Hastane mikrorganizma profilinde değerlendirme
- Her hastadan ek kan
- Uygulama güçlüğü- Uzun çalışma zamanı

S3. Yeni kurulacak mikrobiyolojik tanımlama testleri/sistemi için hangisinde verifikasyon yapılmalıdır?

1. FDA onaylı mikrobiyolojik tanımlama testlerinin verifikasyonu
2. Laboratuvarda geliştirilmiş tanımlama testleri
3. FDA onaylı ama modifikasyon yapılmış tanımlama testlerisistemi
4. FDA onayı olmayan ticari tanımlama testler

A. Sadece 1 B. 2, 3 ve 4 C. Sadece 4
D. 2 ve 4 E. Hepsi

S3. Yeni kurulacak mikrobiyolojik tanımlama testleri/sistemi için hangisinde verifikasyon yapılmalıdır?

1. FDA onaylı mikrobiyolojik tanımlama testlerinin verifikasyonu
2. Laboratuvarda geliştirilmiş tanımlama testleri
3. FDA onaylı ama modifikasyon yapılmış tanımlama testlerisistemi
4. FDA onayı olmayan ticari tanımlama testleri

FDA ONAYLI MİKROBİYOLOJİK İDENTİFİKASYON TESTLERİNİN VERİFİKASYONU

- Minimum 20 izolat ile yapılmalıdır
- Kapsamı kuruma göre belirlenmelidir.
- Gram pozitif organizmalardan; *Staphylococcus aureus*, koagülaz-negatif stafilokok, enterokok ve *Streptococcus pneumoniae*
- Gram negatif organizmalardan; Enterobacteriaceae üyeleri ve laktozu kullanmayan organizmalar

Karmaşık hasta popülasyonu ve çeşitli kliniği olan kurumlarda,

- Daha çok çeşitte tür
- 20'den fazla izolat değerlendirmeli

- Uygun kalite kontrol suşları da teste dahil edilebilir

Sadece bir analitin değerlendirileceği identifikasyon yöntemlerinde,

- Genelde analit için pozitif ve negatif eşit sayıda minimum 20 mikrobiyal izolat
- Mevcut test veya referans yöntemi ile paralel çalışılır

- Yeni bir yöntemin verifikasyonu için,

- Var olan sistem ya da referans yöntemi ile <u>en azından **% 90 uyumlu** </u>olması gerekir.

S4. Laboratuvarda geliştirilmiş, FDA onaylı ama modifikasyon yapılan veya FDA onaysız ticari tanımlama testlerinin verifikasyonu için çalışılacak izolat sayısı için düşünceniz?

A. Değerlendirme için 20 izolat yeterlidir
B. En az 20 olmalı tercihan 50 kadar izolat çalışılmalı
C. En az 200 izolat çalışılmalı
D. Sadece kalite kontrol suşları ile en az 20 izolat çalışılmalı
E. Yarısı kalite kontrol suşu olmak itibariyle 50 izolat çalışılmalı

S4. Laboratuvarda geliştirilmiş, FDA onaylı ama modifikasyon yapılan veya FDA onaysız ticari tanımlama testlerinin verifikasyonu için çalışılacak izolat sayısı için düşünceniz?

A. Değerlendirme için 20 izolat yeterlidir
B. En az 20 olmalı tercihan 50 kadar izolat çalışılmalı
C. En az 200 izolat çalışılmalı
D. Sadece kalite kontrol suşları ile en az 20 izolat çalışılmalı
E. Yarısı kalite kontrol suşu olmak itibariyle 50 izolat çalışılmalı

Laboratuvarda geliştirilmiş, FDA onaylı ama modifikasyon yapılan veya FDA onaysız ticari tanımlama testleri

- En az 200 izolat test edilmelidir
- Teste uygun çok çeşitte tür değerlendirilmelidir
- ≥ %90 uyum olmalıdır

- Eğer tek bir analit değerlendirilecek ise;
- Analiti içeren (pozitif) en az 50 izolat
- Analiti içermeyen (negatif) en az 50 izolat
- Referans metoda ve kullanıcı tarafından tanımlanmış metoda göre **sensitivite ve spesivite değerleri ≥ %95** olmalıdır

S5. Laboratuvara kabul edilen yeni duyarlılık test sistemi için verifikasyon açısından

A. Çalışma için kullanılacak organizma dağılımı ve direnç fenotipleri hastanede sıklıkla izole edilenlerle benzer olmalı
B. Standart olması açısından duyarlılığı bilinen kalite kontrol suşları da çalışılmalıdır
C. Çalışma kesinlik ve doğruluk kriterleri ile değerlendirilmelidir
D. Uygun diyebilmek için Kesinlik açısından ≥ %95 uyum olmalıdır
E. Hepsi

S5. Laboratuvara kabul edilen yeni duyarlılık test sistemi için verifikasyon açısından

A. Çalışma için kullanılacak organizma dağılımı ve direnç fenotipleri hastanede sıklıkla izole edilenlerle benzer olmalı
B. Standart olması açısından duyarlılığı bilinen kalite kontrol suşları da çalışılmalıdır
C. Çalışma kesinlik ve doğruluk kriterleri ile değerlendirilmelidir
D. Uygun diyebilmek için Kesinlik açısından ≥ %95 uyum olmalıdır
E. Hepsi

Örnek seçimi

- Çalışma için kullanılacak organizma dağılımı
  - Hastanede sıklıkla izole edilenlerle benzer olmalı
  - Hastanede sıklıkla görülen direnç fenotiplerini yansıtmalıdır
    - MRSA
    - VRE
    - GSBL, Karbapenemaz, AmpC üreten *Enterobacteriaceae*
    - D-test pozitif *S. aureus*
    - Koagulaz Negatif Stafilokoklar
    - Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp*.

- Sonuçların ± 1 çiftli dilüsyon içinde olması metodlar arasında uyumu gösterir
- Direnç yorumlamada farklılık olmaması gereklidir

- İyi tanımlanmış klinik örnekler veya kültür suşları
- Kalite kontrol suşları ve/veya referans suşlar (ATCC vb) iyi örneklerdir. Fakat ilgili hastanedeki organizma ve direnç dağılımını yansıtmaz

Değişiklik veya uyarlama yapılmamış kurum onaylı testler için

- **Kesinlik (tekrarlanabilirlik) çalışmaları**
  - Kesinlik temel uyum (KTU)
  - Kesinlik kategorik uyum (KKU)
- **Doğruluk çalışmaları**
  - Küçük hata (KH)
  - Büyük hata (BH)
  - Çok büyük hata (ÇBH)
  - Temel uyum (TU)
  - Kategorik uyum (KU)

Kesinlik çalışmaları

- Beş suş 3’er kez, 3-5 gün test edilir.
- Antibiyotik duyarlılıkları iyi bilinen ATCC veya kalite kontrol suşları kullanılır
- En az iki suş dirençli olmalıdır (MRSA, GSBL gibi)
- Temel ve kategorik uyum ≥ %95 olmalıdır.

Kesinlik çalışmaları

- **Kesinlik temel uyum**: test edilen suşun antibiyotik MİK'nin ± 1 çift kat dilüsyon içindeki uyumu

- **Kesinlik kategorik uyum**: test suşunun CLSI v.b. kriterlere göre yorumlanan duyarlılık sonuçlarının (duyarlı, az duyarlı, dirençli) uyumu

- Toplam test: her bir antibiyotik veya tüm antibiyotik ve organizma kombinasyonu toplamı için hesap edilebilir

Doğruluk çalışmaları

- Büyük kapasiteli laboratuvarlar mevcut ADTS benzer bir referans metod (mikrodilüsyon, agar dilüsyon) ile test edilecek ADTS karşılaştırabilirler
  - Bu durumda 100 veya daha fazla suş her bir panel/kart veya disk için çalışılmalıdır.
- Ancak sınırlı kaynaklar yüzünden bir çok laboratuvar test edilecek ADTS'ni mevcut ADTS ile değerlendirir

Doğruluk çalışmaları

- Küçük Hata : Bir ADTS **az hassas** iken diğeri **duyarlı** veya **dirençli** sonuç verirse

- Büyük Hata : Bir ADTS **duyarlı** iken diğeri **dirençli** sonuç verirse

S6 Yeni sistemi mevcut sistem ile karşılaştırma durumunda kabul edilebilirlik açısından doğru olan hangisidir?

A. Büyük hata oranı %10'dan az
B. Küçük hata oranı %20'den az
C. Çok Büyük Hata oranı %5'den az
D. Büyük hata ve küçük hata oranları toplamı %10'dan az

S6 Yeni sistemi mevcut sistem ile karşılaştırma durumunda kabul edilebilirlik açısından doğru olan hangisidir?

A. Büyük hata oranı %10'dan az
B. Küçük hata oranı %20'den az
C. Çok Büyük Hata oranı %5'den az
D. Büyük hata ve küçük hata oranları toplamı %10'dan az

Doğruluk çalışmaları

- Mevcut çalışılan ADTS ile yeni sistem arasında karşılaştırmalar yapılacak ise
  - Toplamda en az 30 suş herbir antibiyotik panel/kart veya disk için test edilmelidir.
- Bu durumda test sonuçları uyumsuz olduğunda test edilen sistem hatalı olmayabilir.
- Mevcut sistemi tamamen doğru kabul edemeyiz
- Bu nedenle bu tip değerlendirmelerde test sistemi **duyarlı**, mevcut sistem **dirençli** verdiğinde **Çok Büyük Hatadan (ÇBH)** <u>bahsedemeyiz</u>

Doğruluk çalışmaları

- BH oranı % 5’ den daha az olmalıdır.
- BH + KH oranı %10’ dan az olmalıdır.