Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 28:

Management kvality, elektronická evidence vzorků, jiná než klinická mikrobiologie

Ondřej Zahradníček 777 031 969
zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Co nás dnes čeká

- Povídání o **QM v klinické mikrobiologii**
- Povídání o **laboratorních elektronických systémech v mikrobiologii**
- Povídání o **mikrobiologii jiné než klinické**

QM a klinická mikrobiologie

Management kvality – QM

- Diagnostika nejen v mikrobiologii je stále komplikovanější. To přináší i problémy: je čím dál složitější pro kohokoli **zkontrolovat, že se diagnostika provádí správně**
- Laboratoře jsou také pod **ekonomickým tlakem** a je nutno zabezpečit, aby tento tlak **neznamenal zhoršení kvality vyšetřování**
- I pro možnost mezinárodního srovnávání se uplatňuje **mezinárodní systém managementu kvality (QM),** opírající se o evropské normy, které mají platnost i pro Česko

Akreditace laboratoří

- Laboratoře mohou mít **různé typy certifikátů o poskytovaných službách**
- Čím dál více je však požadována **akreditace podle mezinárodních kritérií**
- **Obecné principy akreditace** jsou společné nejen pro mikrobiologické, biochemické, hematologické a jiné laboratoře, ale např. i pro laboratoře analytické chemie, metrologické ústavy a nejrůznější další zkušební instituce
- V Česku je národní certifikační autoritou **Český institut pro akreditaci (ČIA)**

Akreditační normy

- Všechny laboratoře (zdravotnické i ostatní) se mohou akreditovat podle **obecné normy ČSN EN ISO/IEC 17025 : 2005** (za dvojtečkou je rok vydání aktualizované podoby této normy)
- Zdravotnické laboratoře mají nověji též možnost zvolit si akreditaci podle normy platné pro zdravotnické laboratoře, která je specifičtější. Jde o **normu ČSN EN ISO 15186 : 2002**.
- Obě normy mají ovšem **společné základní rysy**, a v obou případech je nutná neustálá kontrola dodržování podmínek udělení akreditace

Hlavní rysy akreditované laboratoře

- Akreditovaná laboratoř pracuje podle **standardních operačních postupů.** Tyto postupy se zabývají všemi fázemi vyšetření (pro které se zde zpravidla používá pojem „zkouška“) – tedy od příjmu materiálu až po formát výsledku a způsob jeho zaslání
- Akreditovaná laboratoř musí **dokumentovat** „papírově“ či elektronicky **celý průběh** „zkoušky“, včetně dokumentace použitých šarží chemikálií či evidence toho, kteří pracovníci se na „zkoušce“ podíleli

Zajištění odborné kvality

- Někdy to vypadá, že to podstatné je „mít papíry v pořádku“. Takto by však akreditace vypadat neměla. **Základem musí být odbornost.**
- Součástí akreditace je proto i **dokumentace vzdělávání a zaškolování** jednotlivých pracovníků pro konkrétní úkoly
- Správné fungování přístrojů kontroluje **ústavní metrolog**, který je pravidelně školen. Na celý systém pak dohlíží **manažer kvality**.
- Laboratoř pravidelně prochází **externím hodnocením kvality** (EHK)

Standardní operační postupy (SOP)

- SOP je soupis všeho, co je potřeba k tomu, aby mohla být provedena určitá zkouška. Každý SOP nutně obsahuje především
  - **účel zkoušky** a situace, kdy se použije
  - **soupis osob**, které se na zkoušce mohou podílet
  - **soupis materiálu**, který je potřeba
  - **popis jednotlivých kroků** postupu
  - **související dokumentace**
  - **zápis o všech změnách a doplňcích SOP**

Příručka kvality

Příručka kvality má stejný význam jako SOP, ne však ve vztahu ke konkrétní zkoušce, ale k **celému vyšetřovacímu postupu**. Zabývá se všemi řídícími procesy, které v laboratoři probíhají, včetně vnějších vztahů laboratoře (ve vztahu např. k vedení nemocnice, jíž je částí)

Manažer kvality

Manažer kvality **sleduje celý proces**, připravuje příručku kvality a její nové verze, koordinuje tvorbu SOP, komunikuje s ČIA a podobně

Používané přístroje (včetně např. automatických pipet!)

- Všechny přístroje musí mít **doklad svého původu** s uvedením, jakým způsobem a za jakých podmínek mají být používány
- Přístroje musí mít také svůj **přístrojový deník**, kam se zapisují ti, kteří je používají a udržují
- U přístrojů, jako jsou ledničky a termostaty, musí být **pravidelně zapisována teplota** či jiné parametry (tenze CO_2 apod.)
- Přístroje musí být občas **servisním technikem zkontrolovány** a potvrzena jejich funkčnost

Externí hodnocení kvality (EHK)

- Ve stanovených intervalech (zpravidla jednou až čtyřikrát ročně) organizuje SZÚ **rozesílání „vzorků“, které jsou laboratořemi vyšetřeny** a výsledky odeslány zpět do SZÚ
- Následně jsou **výsledky vyhodnoceny a laboratoř je informována o tom, zda uspěla či neuspěla**. Není nutná stoprocentní úspěšnost, ale úspěšnost nad stanoveným limitem, který je dán výsledky všech laboratoří
- Odborní hodnotitelé v SZÚ hodnotí výsledky laboratoří **anonymně (pod číslem)**

Audity

Jelikož EHK samozřejmě neřeší veškeré aspekty správné práce v mikrobiologické laboratoři, je důležitý také **systém auditů.**

- **Interní audit** je proces, který probíhá v rámci laboratoře. Zajišťují ho pověření auditoři z řad pracovníků laboratoře (obvykle však audit vede někdo z jiného oddělení či úseku).
- **Externí audit** se koná v určených intervalech a provádějí ho pracovníci ČIA či jiného dozorčího orgánu

Horizontální audit mapuje fungování např. jedné laboratoře. **Vertikální audit** naopak sleduje průchod jednoho vzorku různými fázemi (příjem, vlastní zpracování, výsledek apod.)

Neshody

- V příručce kvality je také definována tzv. **neshodná práce**, a řízení neshodné práce je také zpravidla věnován celý jeden SOP.
- Neshodná práce je taková která se není ve shodě s tím, co je popsáno v příručce kvality a jednotlivých SOP. Např. chybně popsaný vzorek, znehodnocená zkumavka, ale např. i neúspěch laboratoře v EHK. O každé neshodě musí být sepsán **protokol o neshodě**, jehož součástí je **návrh opatření k nápravě**. Posléze je kontrolováno, zda byla opatření uskutečněna.

Zvláštnosti mikrobiologických laboratoří v rámci QM

- U **serologických a většiny virologických zkoušek** (včetně průkazu virových antigenů) je přístup **podobný jako v biochemii**, ale i např. analytické chemii: vzorek je přijat, zpracován více méně automaticky, a výsledkem je určitá hodnota (absorbance, množství něčeho atd.)
- U jiných mikrobiologických zkoušek je však zpravidla **větší podíl „lidského faktoru“,** zkouška probíhá algoritmicky, není možno předem říci, co všechno bude potřeba

Jak řídit mikrobiologické zkoušky

- S ohledem na charakter práce je trochu jiný způsob ošetření správných postupů
- **Základní SOP** (např. Vyšetření moče, Vyšetření stolice) stanoví základní postupy, které jsou provedeny u všech vzorků
- Případné následné kroky jsou již zpravidla ve **speciálních SOP**, např. Bližší určení mikrobů, kde je popsáno, jakými diagnostickými postupy lze pátrat po jednotlivém druhu bakterie, kvasinky apod.

Standardizace v rámci Česka a EU

- Základem QM je, aby každá laboratoř měla zpracována svůj obhajitelný **systém operačních postupů**, použitelný v jejím konkrétním případě (s ohledem na typy vzorků)
- Na druhou stranu je žádoucí i **postupné sjednocování přístupů mezi laboratořemi navzájem,** např. i kvůli stanovení ceny zkoušky v systému zdravotních pojišťoven
- Na rozdíl od např. biochemie zatím přes určité snahy odborných společností **standardizace v mikrobiologii příliš nepokročila**

Příklad malé standardizace

- V naší laboratoři probíhá kvasinek na Sabouraudově agaru **ve zkumavce**. Negativní výsledky se expedují za **4–5 dní** (podle laboratoře).
- V mikrobiologické laboratoři Nemocnice na Homolce probíhá kultivace kvasinek na Sabouraudově agaru **v Petriho misce**. Negativní výsledky se expedují za 2 dny. Kolegové jsou toho názoru, že klinicky významný nález kvasinky se do 48 h projeví.

Na druhou stranu ale…

- Nebylo by účelné, kdyby laboratoře vždy postupovaly podle jednotných standardů. Určité normy a postupy musí být jednotné, ale existují i logické odchylky, plynoucí například
  - z odlišného **přístrojového vybavení** laboratoří
  - z různého **personálního vybavení** laboratoře
  - z různého **spektra zasílajících klientů**

Například: ***laboratoř A*** *vyšetřuje pro obvodní lékaře a ambulantní specialisty. Výtěry z krku kultivuje jen na krevním agaru, výsledky na Endu by byly s největší pravděpodobností pouhé náhodné nálezy.* ***Laboratoř B*** *vyšetřuje pro nemocnici včetně ARO a JIP. Endova půda je tu nezbytná, zejména s ohledem na enterobakterie jako nozokomiální patogeny*

Laboratorní informační systémy pro mikrobiologii

Co je to laboratorní informační systém (LIS)

LIS je dnes už nepostradatelný systém evidence vzorků, popř. i kmenů, a výsledků zkoušek jednotlivých vyšetření

- **Dříve se výsledky zapisovaly do protokolů, a odtud přepisovaly na žádanky**, což bylo pracné, neslo to s sebou riziko chyb a velmi obtížně se vyhledávala zpracovaná data pro statistiky, výzkumné účely apod.
- LIS navíc dává možnost **automatického převedení do NIS** (nemocničního informačního systému), takže klinik má výsledek elektronicky dříve než papírově, a navíc i on ho může statisticky zpracovávat.

LIS v biochemii a serologii

- Pro biochemické, ale i serologické účely je ideální **LIS se systémem požadavků na jednotlivých řádcích**, kde vlevo je uveden požadavek (metoda, vyšetření) a vpravo se zapíše výsledek (kvantitativně – číselně, případně kvalitativně – nález ano/ne)
- Pro bakteriologické účely **lze tento typ LIS adaptovat, avšak jeho použití není ideální**
- Při bakteriologickém vyšetření se do „požadavkové“ části **průběžně dopisují další metody**, které však nejsou logicky setříděny

Zjednodušená ukázka – nepřehledné

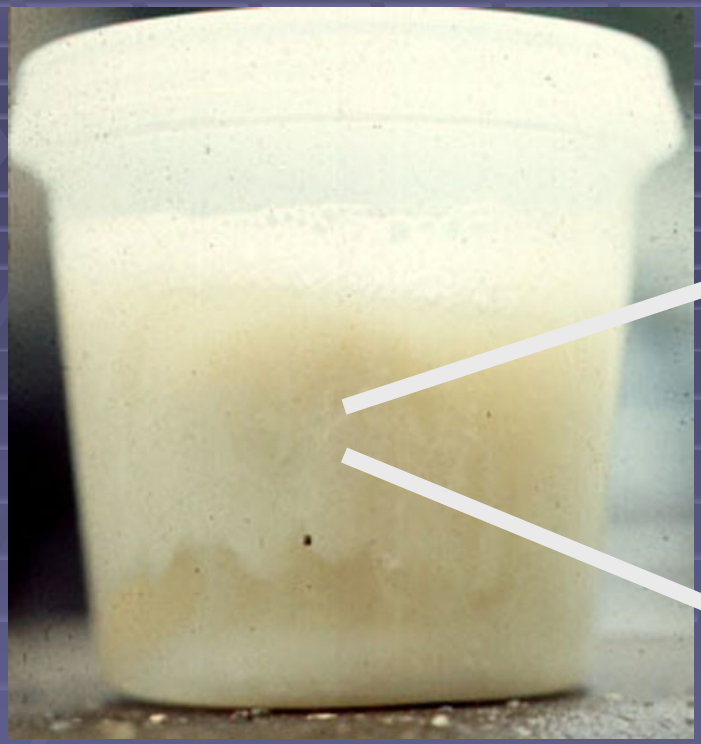
Vopička Ferdinand, 352413/7890, diagnosa: Z01.7, pojišťovna: 111: IČZ 72 012 345, Klinika Dýchací, MUDr. Stáleožralý. Vzorek: sputum Číslo: X-01234

Mikroskopie sputa	Epit ++, leu +, G+koky ve shlucích +
Kultivace sputa	Běžná flóra dutiny ústní
Další mikrob	Streptococcus pyogenes
Další mikrob	Escherichia coli ojediněle
PYR test	pozitivní
Atb test „STR“	SRPY: PNC + AMP + ERY 0 DOX +
Hajn – MIU	Escherichia coli

Lepší systém pro bakteriologii

- Pro bakteriologii je lepší takový systém, který **respektuje „algoritmický“ způsob práce bakteriologa** a umožňuje identifikaci nejen jednotlivých vzorků, ale i jednotlivých kmenů patogenních bakterií
- Takto **identifikované kmeny** jsou pak nezaměnitelné např. i pro další zpracování dat, statistické účely apod.
- Zároveň takový systém umožňuje přehledné znázornění, **která použitá metoda patří ke kterému kmeni**

Oč tedy jde:

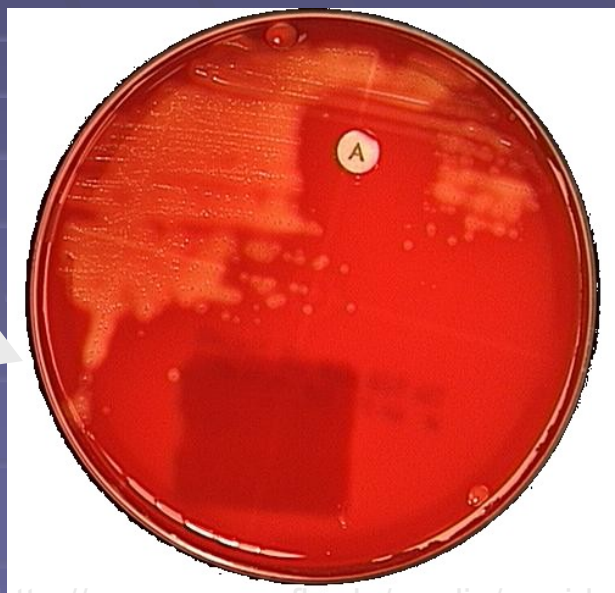


http://www.lumen.luc.edu/lumen/meded/mech/cases/case9/sputum1.jpg

Vzorek P-12345

www2.mf.uni-lj.si/~mil/bakt2/bakt2.htm

Kmen P-12345/1



http://www.mgm.ufl.edu/~gulig/mmid/mmid-lab/labimage/spy_a.jpg

Kmen P-12345/2

Ukázka takového LIS

Vopička Ferdinand, 352413/7890, diagnosa: Z01.7, pojišťovna: 111: IČZ 72 012 345, Klinika Dýchací, MUDr. Stáleožralý. Vzorek: sputum Číslo: X-01234

Sputum – mikroskopie

Epit ++ Leu + G+ koky ve shlucích +

Sputum – kultivace

X-01234/1

Escherichia coli ojediněle

Hajn – MIU: Escherichia coli

X-01234/2

Streptococcus pyogenes

PYR test: pozitivní

PNC + AMP + ERY 0 DOX +

Práce z LIS v praxi

- **Zapisování vzorků** (ruční, popř. automatizace pomocí čtečky čárových kódů)
- **Odečet výsledků** – odečítající hlásí, co vidí, laborant zapisuje po počítače, případně hlásí odečítajícímu údaje z anamnézy, předchozí nálezy apod. (u „opáček“ též z prvního dne)
- **Tisk pracovních listů** – např. u mikroskopií se vytiskne pracovní list, do něj se ručně zapíše výsledek a přepíše do počítače
- **Tisk nálezů** – po ukončení diagnostického procesu, pro klinika, popř. i pro hygienu apod.

LIS a automatizace

- Výhodou LIS je možnost **převedení dílčích výsledků přímo do počítače**. Např. je-li výsledek biochemického identifikačního testu odečítán pomocí spektrofotometru, lze výsledek přímo převést do LIS. Výhodou je, že v LISu jsou v tom případě uloženy i dílčí výsledky (např. fermentace jednotlivých cukrů) pro případnou budoucí kontrolu.
- Existují i přístroje na **automatické odečítání zón citlivosti**, opět s převáděním výsledků do LIS. Obecně je užitečné mít v LIS velikost zón.

Proč je užitečné mít v LIS velikost zón citlivosti

- Pokud laboratoř eviduje pouze citlivé (C) a rezistentní (R) kmeny, dostává se často do problémů.
  - **Například:** odborníci se sejdou a upraví referenční mez ze 20 mm na 18 mm, takže zóna 19 mm se nyní má interpretovat již jako citlivost.
  - **Laboratoř, která eviduje jen R/C, má problém** – nové statistiky se nedají srovnat s těmi starými, protože se liší kritérium.
  - Také u evidování jen R/C **nelze srovnat výsledky s jinou laboratoří**, která se třeba drží jiného doporučení a používá jinou mez jako referenční

Perspektivy automatizace u LIS

- Již nyní existují systémy, umožňující ukládat do LIS přímo např. **fotografie kolonií či mikroskopií**, test citlivosti s velikostmi, ale i tvary zón apod.
- Takové systémy jsou ideální pro **zpětné posouzení** a třeba i dokazování, že se nestala chyba, také lze optimálně porovnávat např. dva nálezy od stejného pacienta apod.
- Podobný systém také umožňuje vznik **„telemikrobiologie“,** tedy konzultace odborníků na dálku s využitím webkamer a jiné techniky (u rentgenů to takto již běžně funguje)

Jiná než klinická diagnostická mikrobiologie

Jsou různé mikrobiologie

- Zjednodušeně si mikrobiologie můžeme rozdělit zhruba takto:
  - **Badatelské mikrobiologie *zkoumají*** struktury a vlastnosti mikrobů a jejich vztahy jednak vzájemné, jednak vůči prostředí a hostitelům
  - **Technologické mikrobiologie *využívají*** mikroby (k vaření piva a mnoha jiných potravin, k odstraňování ropných skvrn, k výrobě chemikálií)
  - **Diagnostické mikrobiologie *hledají*** mikroby v různých vzorcích, případně stanovují jejich kvantitu a pokoušejí se jejich nálezy interpretovat

Úkoly mikrobiologických badatelů

- Mikrobiologický badatel v základním výzkumu je tvor, který sedí zavřený ve své laboratoři, umístěné obvykle na **mikrobiologickém pracovišti přírodovědecké fakulty či na sbírce mikrobů** *(v Brně jsou obě tyto instituce v jedné budově; v případě mikrobiologie jde o zrušení katedry o mikrobiologické oddělení Ústavu experimentální biologie)*, popřípadě v ústavu **Akademie věd aj.**
- Zabývá se **ověřením rodových a druhových příbuzností mikrobů, zkoumáním jejich genotypu, fenotypových vlastností, odolnosti vůči různým podmínkám apod.** v laboratorních podmínkách

Badatel je podivný tvor, je však užitečný. Bez něj by další (aplikovaní) mikrobiologové nemohli být.

Mikrobiologie v biotechnologii

- Velkou skupinou mikrobiologů jsou **aplikovaní biotechnologičtí mikrobiologové**
- O základních vlastnostech svých mikrobů vědí téměř vše, používají zásadně **nepatogenní mikroby**, popř. avirulentní kmeny mikrobů
- Mikroby využívají k **produkci potravin a chemikálií, případně k biodegradaci odpadů**. Jejich výzkumná práce spočívá v konkrétním prověření, který kmen a za jakých podmínek nejlépe splní zadaný úkol

Diagnostické mikrobiologie

- **Diagnostické mikrobiologie**, mezi které patří i humánní klinická mikrobiologie, se zabývají přítomností různých (obvykle škodlivých) mikrobů v různých typech vzorků
- Vedle humánní klinické mikrobiologie je to především
  - **veterinární klinická mikrobiologie** – její metody práce jsou velice blízké humánní
  - **rostlinolékařská mikrobiologie** – ta je již poněkud vzdálenější
  - **mikrobiologie vody, potravin, ovzduší** apod.

Mikrobiologie vody

Voda a její kvalita

- Vody během uplynulých desetiletích zaznamenaly **několik změn třídění.** Nyní existuje voda kojenecká, pitná, pramenitá, pramenitá mineralizovaná apod. (určené na pití), a vedle nich další typy vod, určené ke koupání, k různých technologickým účelům aj.
- Pro každou vodu jsou definovány **požadavky, které musí být splněny,** a to především
  - **chemické, včetně např. radioaktivity**
  - **biologické (přítomnost nepatogenních prvoků)**
  - **mikrobiologické**

Mikrobiologické požadavky na pitnou vodu

- V případně pitné vody **není striktní požadavek absolutní nepřítomnosti mikroorganismů.**
- Voda však **nesmí obsahovat patogenní mikroby**, a také obsah nepatogenních mikrobů nesmí přesahovat určitou mez (protože je-li ve vodě příliš mnoho nepatogenních mikrobů, je zpravidla jen otázkou času, kdy se objeví i mikroby patogenní)
- Pro účely mikrobiologie vody se používá zpravidla **zvláštní třídění mikroorganismů**

Třídění bakterií v mikrobiologii vody

- **Psychrofilní bakterie** jsou takové, které rostou při teplotě vnějšího prostředí. Jsou to tedy vesměs nepatogenní druhy, které nejsou adaptované na tělesnou teplotu obratlovců. Proto je vůči nim norma nejtolerantnější
- **Mezofilní bakterie** jsou takové, které rostou při tělní teplotě obratlovců (přibližně). Mohou to být kožní symbionti člověka či zvířat, např. koaguláza negativní bakterie. Norma je vůči nim přísnější, ale malá množství jsou povolena
- **Koliformní bakterie, enterokoky** či jiné závažné patogeny ve vodě být nesmějí (znamenají jednoznačně znečištění zdroje)

Mikrobiologické vyšetření vzorku vody

- Vzorek musí být **odebrán do striktně sterilní nádoby**, popsán přesným místem odběru (případně označením odběrního kohoutu či stojanu), časem odběru a jménem odebírajícího
- Vzorek musí být **dopraven co nejrychleji do laboratoře**, která vyšetření vody provádí
- Vzorek se centrifuguje, sediment se **kultivuje na různých půdách za různých teplot** a hodnotí se kvantitativní zastoupení různých bakterií.
- Hodnotí se předepsaným způsobem, který má laboratoř definován ve své SOP, ale je uveden i v příslušných vyhláškách.

Mikrobiologie potravin

Mikrobiologie potravin a její význam

- Mikrobiologie potravin **souvisí s klinickou mikrobiologií**, zejména co se týče patogenů přenosných fekálně-orální cestou
- **Odesilateli vzorků jsou zpravidla pracovníci hygieny výživy**, kteří odebírají vzorky v terénu (továrny na potraviny, jídelny, restaurace)
  - v rámci běžného dohledu (preventivně)
  - při epidemických výskytech (např. salmonelóz)
- Vzorek se odebere **obdobným způsobem jako u vzorku vody a opět se co nejrychleji dopraví do laboratoře**

Mikrobiologické zpracování vzorků potravin

- Potravina se **homogenizuje**, její část hmotnostně či objemově definovaná se **přenese na vhodné kultivační půdy**
- **Zjišťuje se přítomnost patogenů podobným způsobem jako v klinické mikrobiologii**, více se tu však využívá kvantitativní hodnocení
- Častěji než v klinické mikrobiologii se využívá **chromogenních půd**. Testy založené na chromogenních půdách si v rámci vnitřní kontroly provádějí často i sami výrobci

Nashledanou u zkoušky nebo na podzim na praxi!

www.medmicro.info