

# Strategimøte 2006: Kvalitetssikring i bakteriologi

Redaktører:  
Pål A Jenum  
Fredrik Müller  
Yngvar Tveten

Hovedredaktører:  
Jørgen Lassen og Per Sandven

**EKSTERNE KVALITETSVURDERINGER I BAKTERIOLOGI, MYKOLOGI OG  
PARASITTOLOGI**

**Rapport fra strategimøte**

**Hovedredaktører: Jørgen Lassen og Per Sandven**

Strategimøte nr 20, 2006

# **Kvalitetssikring i bakteriologi**

Redaktører:

**Pål A Jenum, Fredrik Müller og Yngvar Tveten**

Rapport fra strategimøte nr 20, 2006  
ISBN 978-82-8082-194-2 trykt utgave  
ISBN 978-82-8082-195-9 elektronisk utgave

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b>	<b>3</b>	
<b>PROGRAM FOR MØTET</b>	<b>4</b>	
<b>DELTAKERE OG OBSERVATØRER</b>	<b>5</b>	
<b><u>1</u></b>	<b><u>OPPSUMMERING .....</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b>1.1</b>	<b>FORSKRIFT OM INTERNKONTROLL I SOSIAL- OG HELSETJENESTEN. KONSEKVENSER FOR MEDISINSK MIKROBIOLOGISKE LABORATORIER</b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>AKKREDITERING – AKTUELLE STANDARDER</b>	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>OPPLÆRING OG VEDLIKEHOLD AV KOMPETANSE</b>	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>TOLKNING OG VURDERINGER.</b>	<b>8</b>
<b>1.5</b>	<b>INTERNE REVISJONER OG SYSTEMGJENNOMGANG</b>	<b>8</b>
<b>1.6</b>	<b>AVVIKS- OG KLAGEHÅNDTERING</b>	<b>9</b>
<b>1.7</b>	<b>LABORATORIEDATASYSTEMER HJELPESYSTEMER, VALIDERING, SVARRAPPORTERING</b>	<b>9</b>
<b>1.8</b>	<b>VALG AV METODER</b>	<b>10</b>
<b>1.9</b>	<b>MEDIER</b>	<b>11</b>
<b>1.10</b>	<b>BAKTERIELT REFERANSEMATERIALE</b>	<b>12</b>
<b>1.11</b>	<b>KVALITETSKONTROLL AV BLODKULTUR</b>	<b>14</b>
<b>1.12</b>	<b>KOMMERSIELLE IDENTIFIKASJONSSYSTEMER, HJELPETESTER OG HURTIGTESTER</b>	<b>14</b>
<b>1.13</b>	<b>KVALITATIVE NUKLEINSYREAMPLIFIKASJONSTEKNIKKER</b>	<b>15</b>
<b>1.14</b>	<b>SAMMENLIKLENDE LABORATORIEPRØVING</b>	<b>17</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>SAMMENDRAG AV INNLEGGENE .....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b>2.1</b>	<b>FORSKRIFT OM INTERNKONTROLL I SOSIAL- OG HELSETJENESTEN KONSEKVENSER FOR MEDISINSK MIKROBIOLOGISKE LABORATORIER</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>AKKREDITERING – AKTUELLE STANDARDER OPPLÆRING OG VEDLIKEHOLD AV KOMPETANSE TOLKNING OG VURDERING</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>LABORATORIETS EGENKONTROLL</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>LABORATORIEDATASYSTEMER SVARRAPPORTERING</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>NA DOK. NR. 51 KVALITETSSIKRING AV IT-SYSTEMER PÅ AKKREDITERTE LABORATORIER. VALG AV METODER – VALIDERING – USIKKERHET</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>HVORDAN KVALITETSSIKRES MEDIER?</b>	<b>34</b>
<b>2.7</b>	<b>BAKTERIELT REFERANSEMATERIALE</b>	<b>56</b>
<b>2.8</b>	<b>KVALITETSKONTROLL AV BLODKULTUR</b>	<b>61</b>
<b>2.9</b>	<b>KOMMERSIELLE ID-SYSTEMER. HJELPETESTER. HURTIGTESTER.</b>	<b>64</b>
<b>2.10</b>	<b>NUKLEINSYREAMPLIFIKASJONSTEKNIKKER - INTERNE PROSESSKONTROLLER OG UAVHENGIGE KONTROLLER</b>	<b>67</b>
<b>2.11</b>	<b>SAMMENLIGNENDE LABORATORIEPRØVING KOMMERSIELLE TILBUD, LABORATORIEAVTALER OG HÅNDTERING AV RAPPORTER OG AVVIK I LABORATORIET.</b>	<b>75</b>

## **FORORD**

Referansegruppen for programmet ”Eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi” arrangerte 03.11.2006 det 20. strategimøtet for programmets deltagere. Møtets tema var ”Kvalitetssikring i bakteriologi”. Ansvarlig programkomité har vært Pål A. Jenum (leder), Fredrik Müller og Yngvar Tveten som også har hatt det redaksjonelle ansvaret for denne rapporten.

Helsevesenet har, i likhet med store deler av samfunnet for øvrig, de siste tiårene gjennomlevd en rivende utvikling med henblikk på kompleksiteten i sine funksjoner og utøvelse – samtidig som kravet om transparens, åpenhet og muligheter for innsyn av så vel publikum som offentlige myndigheter i de samme funksjoner og utøvelser nå har slått gjennom til fulle.

På denne bakgrunnen ble helsetjenesten i ”Lov om statlig tilsyn med helsetjenesten” fra 1994 pålagt å etablere et system for internkontroll. Det ble her forutsatt at alle som yter helsetjenester skulle ha etablert internkontrollsystem – som omhandler virksomhetens interne styring og egen kontroll - for hele virksomheten innen år 2000.

I tillegg til kravet om internkontroll, som er obligatorisk for alle helseinstitusjoner, har mange virksomheter, herunder også medisinsk-mikrobiologiske laboratorier, iverksatt arbeid med å innfri spesifiserte akkrediteringskrav. Dette er krav som er mer spesifikt rettet mot selve analysene og hvor det legges stor vekt på at alle ledd i en prosedyre skal ha en dokumentert sporbarhet.

Kravet om akkreditering er ikke obligatorisk, men man kan forutse at brukerne i stadig større grad vil etterspørre, eventuelt kreve, at laboratoriene kan dokumentere denne type dokumentert kvalitetssikring.

Det er en møysommelig oppgave å innfri, og ressurskrevende å vedlikeholde, alle krav som ligger til grunn for akkreditering. Per i dag er bare en liten håndfull norske medisinsk-mikrobiologiske laboratorier akkreditert i henhold til krav fra Norsk Akkreditering. Men flere er i gang med dette arbeidet og i løpet av få år vil sannsynligvis et betydelig antall av våre laboratorier søke om akkreditering.

Vi håper at nærværende rapport, som gjennomgår prinsippene som skal ligge til grunn for laboratorienes kvalitetssikring, vil være til hjelp for laboratoriene i dette arbeidet. Rapporten er som vanlig inndelt i en innledende, oppsummerende del, ført i pennen av programkomitéen, og en del to hvor de enkelte innleggene på møtet fremkommer, eventuelt lett endret i henhold til diskusjonen på møtet. De enkelte forfatterne har ansvaret for disse innleggene. Noen innlegg presenteres bare i form av lysbildene som ble vist på møtet.

Med dette presenteres møtets sluttrapport

*Oslo, februar 2007*

*For Referansegruppen*

*Jørgen Lassen*

*Per Sandven*

## PROGRAM FOR MØTET

<b>Velkommen og introduksjon</b>		<b>Nils Hermansen, Pål A. Jenum</b>
<b>TEMA: Kvalitetssikring Generell del</b>		<b>moderator: Fredrik Müller</b>
09:40 – 09:55	”Forskrift om internkontroll i sosial- og helsetjenesten” Konsekvenser for medisinsk mikrobiologiske laboratorier	Aud F. Åsprang Helsetilsynet
09:55 – 10:30	Akkreditering Aktuelle Standarder Opplæring og vedlikehold av kompetanse Tolkning og vurdering	Roald K. Nilsen Norsk Akkreditering
10:30 – 10:50	Interne revisjoner og systemgjennomgang Avvik- og klagehåndtering	Jørild Theie AS Telelab
10:50 – 11:10	Laboratedatasystemer Hjelpesystemer, validering, svarrapportering	Erik Figenschou Norsk Akkreditering
Pause		
11:25 – 11:45	Valg av metoder Validering av ny metode og metodeendring Usikkerhet	Pål A. Jenum Sykehuset Asker og Bærum
<b>TEMA: Kvalitetssikring Spesiell del I Basisfunksjoner</b>		<b>moderator: Yngvar Tveten</b>
11:45 – 12:15	Hvordan kvalitetssikres medier? Produksjonsbetingelser, råstoff, autoklave, sterilkontroll, funksjonskontroll, kommersielle medier	Anne Grændsen Norsk Akkreditering
12:15 – 12:30	Bakterielt referansemateriale - stammebank Begrunnelse, sporbarhet, organisering, vedlikehold, anvendelse, begrensninger, praktisk oppskrift	Jørgen Lassen / Trine-Lise Stavenes Folkehelseinstituttet
Lunch		
<b>TEMA: Kvalitetssikring Spesiell del II Metoder</b>		<b>moderator: Pål A. Jenum</b>
13:30 – 13:45	Kvalitetskontroll av blodkultur Kontrollsystemer, uavhengig kontroll	Fredrik Müller Rikshospitalet
13:45 – 14:10	Kommersielle ID-systemer. Hjelpetester. Hurtigtester Bruk av referansemateriale som uavhengige kontroller Hvilke? Hvor ofte? Testeksempler	Yngvar Tveten AS Telelab
14:10 – 14:40	Nukleinsyreamplifikasjonsteknikker Interne prosesskontroller, uavhengige kontroller	Tom Øystein Jonassen Ullevål universitets- sykehus
Pause		
<b>TEMA: Kvalitetssikring Spesiell del III Ekstern kontroll</b>		<b>moderator: Pål A. Jenum</b>
14:55 – 15:15	Sammenlignende laboratorieprøving Kommersielle tilbud Laboratorieavtaler Håndtering av rapporter og konklusjoner i laboratoriet	Anne-Lise Bruu Sykehuset i Vestfold, Tønsberg
15:15 – 15:30	Oppsummering	

## DELTAKERE OG OBSERVATØRER

Annette Alestrøm  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Bente Borgen  
Capio Mikrobiologi  
Pilestredet Park 7  
0176 Oslo

Anne-Lise Bruu  
Mikrobiologisk laboratorium  
Sykehuset i Vestfold HF  
3117 Tønsberg

Andreas Christensen  
Mikrobiologisk avdeling  
St Olavs Hospital HF  
7030 Trondheim

Erik Figenschou  
Norsk Akkreditering  
Fetveien 99  
2007 Kjeller

Peter Gaustad  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Carola Grub  
Avdeling for mikrobiologi  
Sykehuset Innlandet HF Lillehammer  
2629 Lillehammer

Anne Grændsen  
Norsk Akkreditering  
Fetveien 99  
2007 Kjeller

Dorothea Hagen  
Avd. for mikrobiologi og immunologi  
Helse Bergen HF, Haukeland Sykehus  
5021 Bergen

Viggo Hasseltvedt  
Avdeling for mikrobiologi  
Sykehuset Innlandet HF Lillehammer  
2629 Lillehammer

Hanne Husom Haukland  
Avd. for mikrobiologi og smittevern  
Universitetssykehuset Nord-Norge  
Postboks 56  
9038 Tromsø

Nils Olav Hermansen  
Mikrobiologisk avdeling  
Ullevål universitetssykehus  
0407 OSLO

Reidar Hjetland  
Mikrobiologisk avdeling  
Helse Førde HF, Sentralsjukehuset  
6800 Førde

Marin Hoffmann-Vold  
Mikrobiologisk avdeling  
Ullevål universitetssykehus  
0407 OSLO

Arne Høyby  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Elisebet Haarr  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Stavanger HF  
4011 Stavanger

Lise Jelstad  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Pål A. Jenum  
Mikrobiologisk seksjon,  
Sentrallaboratoriet  
Sykehuset Asker og Bærum HF  
1306 Bærum postterminal

Tom Øystein Jonassen  
Mikrobiologisk avdeling  
Ullevål universitetssykehus  
0407 OSLO

Hilde Kaasa  
Mikrobiologisk laboratorium  
Sykehuset i Vestfold HF  
3117 Tønsberg

Jørgen Lassen  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Liisa Mortensen  
Mikrobiologisk avdeling  
Nordlandssykehuset HF  
8092 Bodø

Fredrik Müller  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Roald K. Nilsen  
Norsk Akkreditering  
Fetveien 99  
2007 Kjeller

Sølvi Noraas  
Mikrobiologisk avdeling  
Sørlandet sykehus HF  
4604 Kristiansand S

Eivind Ragnhildstveit  
Mikrobiologisk avdeling  
Sykehuset Østfold HF, Fredrikstad  
1603 Fredrikstad

Trond Ranheim  
Mikrobiologisk avdeling  
Akershus Universitetssykehus HF  
1474 Nordbyhagen

Helvi Holm Samdal  
Mikrobiologisk avdeling  
Sykehuset Buskerud HF  
3004 Drammen

Per Sandven  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Dag Harald Skutlaberg  
Avd. for mikrobiologi og immunologi  
Helse Bergen HF, Haukeland Sykehus  
5021 Bergen

Dagfinn Skaare  
Mikrobiologisk laboratorium  
Sykehuset i Vestfold HF  
3117 Tønsberg

Gunn Stabbetorp  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Trine-Lise Stavenes  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Gaute Syversen  
Mikrobiologisk avdeling  
Ullevål universitetssykehus  
0407 OSLO

Liv Jorunn Sønsteby  
Mikrobiologisk laboratorium  
Haugesund sykehus  
Postboks 2170  
5504 Haugesund

Jørild Theie  
AS Telelab  
P.b. 1868 Gulset,  
3703 Skien

Yngvar Tveten  
AS Telelab  
P.b. 1868 Gulset,  
3703 Skien

Didrik Vestrheim  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Einar Vik  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Nordmøre og Romsdal HF  
6400 Molde

Ingun Ytterhaug  
Bakteriologisk laboratorium  
Aker universitetssykehus HF  
0514 Oslo

Wibecke Aasnes  
Cappio Mikrobiologi  
Pilestredet Park 7  
0176 Oslo

Aud F. Åsprang  
Statens helsetilsyn  
Postboks 8128 Dep,  
0032 Oslo

# 1 OPPSUMMERING

---

## 1.1 Forskrift om internkontroll i sosial- og helsetjenesten. Konsekvenser for medisinsk mikrobiologiske laboratorier

Innlegg: Se side 18

Helsetjenesten ble i Lov om statlig tilsyn med helsetjenesten fra og med 01.01.94 pålagt å etablere system for internkontroll. Alle som yter helsetjenester skulle ha etablert internkontrollsystem for hele virksomheten innen år 2000. Veilederen er ment som et hjelpemiddel til å oppnå dette ([http://www.shdir.no/vp/multimedia/archive/00001/IS-1183\\_1061a.pdf](http://www.shdir.no/vp/multimedia/archive/00001/IS-1183_1061a.pdf)).

Internkontrollen handler om virksomhetens interne styring og egen kontroll. Det er et ledelsesverktøy – et hjelpemiddel for styring og utvikling av den daglige drift.

Hensikten med internkontroll er å oppnå kvalitetsforbedring. Internkontrollen skal bidra til at daglige arbeidsoppgaver blir utført, styrt og forbedret i henhold til lovens krav. Dette er særlig viktig på områder hvor svikt kan få alvorlige følger. Den som har ansvar for virksomheten har også ansvar for internkontrollen. Vedkommende skal sikre at de ansatte har tilstrekkelige kunnskaper og ferdigheter og samtidig involvere og nyttiggjøre seg arbeidstakernes og pasientenes/brukernes kompetanse og erfaring. Det er et krav om systematisk overvåkning av internkontrollen slik at en vet at den fungerer som forutsatt og bidrar til kontinuerlig forbedring.

Statens helsetilsyn vil gjennom tilsyn undersøke om sosial- og helsetjenestene har en fungerende internkontroll som sikrer at deres tjenester er i tråd med sosial- og helsetjenestelovgivningen. Forskriften om internkontroll har mange fellestrekk med akkrediteringskravene, men er ikke identisk idet akkrediteringskravene er mer spesifikt rettet mot selve analysene og i mindre grad mot HMS-forhold.

## 1.2 Akkreditering – aktuelle standarder

Innlegg: Se side 19

Medisinske laboratorier kan velge mellom NS-EN ISO/IEC 17025-Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriers kompetanse og NS-EN ISO 15189- Medisinske laboratorier – Særskilte krav til kvalitet og kompetanse. Sistnevnte er av relativt ny dato.

De to standardene har litt ulike fokus: ISO 17025 har analyseresultatet som hovedfokus og kan brukes av alle typer laboratorier, mens ISO 15189 har bruken av analyseresultatet i pasientbehandling som hovedfokus og er laget for (human)-medisinske laboratorier.

De aller fleste medisinske laboratorier er akkreditert etter NS-EN ISO/IEC 17025.

Alle relevante dokumenter i akkrediteringsprosessen er angitt i Roald K. Nilsens innlegg.

Noen punkter for sammenligning av ISO 15189 og ISO 17025:

ISO 15189 har et tydelig fokus på at analyseresultatene skal brukes i behandling av pasienter. Den er lettere å bruke og forstå, dvs. krever mindre tolkning enn ISO 17025. Den inneholder



mange detaljerte krav, dvs. er mer styrende, men er litt ”umoderne” når det gjelder krav til analyserapporter. Preanalytiske prosedyrer (prøvetaking) skal inkluderes dersom de utføres av laboratoriets ansatte og postanalytisk (vurdering/fortolkning) skal være del av akkrediteringen. Tolkning og vurdering krever spesiell søknad i relasjon til ISO 17025 (se pkt. 1.4). Krav om medisinsk spesialistkompetanse kan være en utfordring for en del laboratorier.

### 1.3 Opplæring og vedlikehold av kompetanse

Innlegg: Se side 19

Laboratorieleidelsen skal ha dokumentert oversikt over personalets kompetanse (utdanning, kvalifikasjoner, erfaring). Opplæring og vedlikehold av kompetanse i laboratoriet skal også være dokumentert. Personalet skal ha spesifikk opplæring i kvalitetssikring og skal delta regelmessig i faglig utvikling og samarbeid.

Hvilke objektive kriterier eller subjektive vurderinger som benyttes for å godkjenne opplæringen, skal være beskrevet i prosedyrer.

NA krever jevnlig praktisering for vedlikehold av kompetanse. Laboratoriet må derfor kunne dokumentere personalets løpende erfaring med de enkelte metoder og teknikker.

### 1.4 Tolkning og vurderinger.

Innlegg: Se side 19

I relasjon til ISO 17025 må man søke spesielt om akkreditering for faglige vurderinger og fortolkninger (fagområdet P32). Dokumentasjon av grunnlag for vurdering og fortolkning må beskrives i styringssystemet og kan for eksempel være lærebøker, vitenskapelige artikler, nasjonale retningslinjer o.l. Standardkommentarer kan brukes og anbefales brukt for å harmonisere svarrutinene, men de må være angitt i styringssystemene. Personell som er kvalifisert til å gjøre faglig vurdering skal være autorisert av ledelsen etter på forhånd fastsatte kriterier. Vurderingen skal være dokumentert.

For ISO 15189 må faglige fortolkninger og vurderinger være inkludert i akkrediteringen. Autorisert personell skal systematisk gjennomgå resultatene av analyser, evaluere dem i samsvar med den tilgjengelige kliniske informasjonen om pasienten og gi tillatelse til frigivelse av resultatene.

### 1.5 Interne revisjoner og systemgjennomgang

Innlegg: Se side 23

Interne revisjoner benyttes til en systematisk, stikkprøvebasert kontroll for å bekrefte at alle deler av driften skjer i henhold til kravene i kvalitetssystemet og standarden. Det må utarbeides årlig revisjonsplan, prosedyre for gjennomføring, standard skjema for innkalling, spørsmål, avvik og sluttrapport.

Revisjoner skal utføres av personell innen egen virksomhet som har gjennomgått opplæring, men som ikke er direkte involvert i området som skal revideres.

Revisjonen kan utføres på to måter (kan også kombineres):

- Horisontal revisjon: Fullstendig gjennomgang av alle sider ved et definert område.  
Eksempelvis med utgangspunkt i en metode eller metodegruppe: Reagenser, produksjon og oppbevaring, opplæring, utførelse (event under observasjon), dokumentasjon, utstyrskontroll etc.
- Vertikal revisjon: En eller flere utvalgte prøver følges fra ankomst laboratoriet til avsluttet rapportering eller, med utgangspunkt i en svarrapport, motsatt vei.  
Eksempelvis: Registrering, kompetanse involvert personell, rutiner valgte prosedyrer, dokumentasjon, rapportering, sporbarhet i systemet (hvem gjorde hva når?)

Laboratoriets øverste ledelse skal periodisk gjennomgå styringssystemet og aktiviteter for prøving (analysing). Forhold som bør tas opp i slike sammenhenger er om styringssystemet fortsatt er hensiktsmessige og om det er behov for endringer/forbedringer. Gjennomgangen utføres eksempelvis ved månedlige kvalitetsutvalgsmøter (øverste ledelse møter) og et årlig formelt møte, såkalt ”Ledelsens gjennomgang” (fra øverste ledelse til seksjonsledernivå). Agendaen på sistnevnte møte er angitt i ISO 17025. Beslutninger skal også her dokumenteres følges opp etter gitt tidsplan.

## 1.6 Avviks- og klagehåndtering

Innlegg: Se side 23

Avviks- og klagebehandling skal være en del av laboratoriets kvalitetssystem. Følgende punkter er viktige i diskusjon når avviksbehandlingen skal implementeres: Hva skal meldes, av hvem og på hvilke måte? På sammen måte når det gjelder oppfølging av avviket: Hva er konsekvensen av avviket, og hvem skal vurdere dette? Hvem skal følge opp med korrigerende eller forebyggende tiltak, og hvem skal avslutte (lukke)? Nedenfor følger eksempler på ulike avvikskategorier:

- Avvik: Fra prosedyrer, fra NA, fra interne revisjoner. Alvorlige avvik som medfører risiko for personskade skal meldes til tilsynsmyndigheter
- Observasjoner: Registrert med hensikt å drøfte mulige forbedringer
- Klager: Fra rekvirenter eller andre parter
- Forespørsler: Henvendelser, f.eks. vedrørende IT problematikk (ikke prøvesvar, råd og behandlingsveiledning)
- Fravik: ”Tillatt” avvik

Generelt kan en si at klager, avvik og fravik skal føre til korrigerende tiltak (retter opp feil eller suboptimale betingelser), mens observasjoner og henvendelser kan føre til forebyggende tiltak (hindre at feil oppstår).

## 1.7 Laboratoriedatasystemer Hjelpesystemer, validering, svarrapportering

Innlegg: Se side 26

Enten et laboratorium velger å akkreditere seg etter ISO 15189 eller 17025 stilles det krav til validering av IT systemer. Alle systemer som kan påvirke det endelige resultatet skal være validert. Eksempler på dette er regneark, LIS, elektronisk rapportering, programvare tilknyttet analyseinstrumenter og overføring fra analyseinstrument til LIS. Validering betyr å dokumentere at systemet fungerer etter hensikten. Det er viktig å utrede hva som skal valideres. Alle benyttede funksjoner må inkluderes, kritiske funksjoner bør vektlegges. De vanlige

prosessene bør simuleres. Laboratoriet må sikre at analyseresultatet kommer fram til rette vedkommende og at resultatet er lesbart hos mottaker. Bemerk at leverandørtesting ikke er validering.

Et problem i valideringen for laboratoriene kan være at IT-avdelingen må involveres. Forøvrig viser erfaring at omprogrammeringer i IT-systemet relativt ofte medfører uventede endringer i andre deler av programvaren.

Elektronisk svarrapportering skal også tilfredsstillende standardens krav, men forenklet rapportering benyttes ofte. Forenklet rapportering omtales ikke i ISO 15189, men aksepteres av NA. En slik rapporteringsform skal avtales skriftlig med oppdragsgiver

Rapporten skal være autorisert (undertegnet av faglig ansvarlig), den må kunne hentes fram fra arkivet og endringsrapporter må kunne dokumenteres.

## 1.8 Valg av metoder

Innlegg: Se side 28

Valg av en metode med kombinasjon av optimal sensitivitet og spesifisitet er det øverste målet, men ikke alltid tilgjengelig eller gjennomførbart. Utfordringen er i stor grad knyttet til å definere hva som er ”godt nok”, ikke nødvendigvis hva som er ”best”. Erfaring om metodens svake og sterke sider er uansett viktig og av stor betydning for at det resultat som oppnås skal tolkes riktig i den aktuelle kliniske sammenheng. Kollegialt utarbeidete anbefalinger bør være førende (eksempelvis Strategirapporter, AFA-anbefalinger).

Generelt skal metoden være ”hensiktsmessig” og det er en forutsetning at det foreligger et medisinsk begrunnet behov. En annen forutsetning for å etablere en ny metode er at laboratoriet er i besittelse av tilstrekkelig faglig kompetanse, og at de innehar det utstyr og de kontrollrutiner som er nødvendig for gjennomføring.

### Validering

Innlegg: Se side 29

Validering er bekreftelsen fra en undersøkelse og fremskaffing av objektivt bevis på at de spesielle kravene for en bestemt tiltenkt anvendelse tilfredsstilles. Det vil kort si dokumentasjon på at analysen fungerer etter hensikten. Etablering av ny metode eller vesentlig endring av en eksisterende metode bør forutgå av en valideringsplan som beskriver hva man vil gjøre og hvor resultater, vurderinger og en endelig konklusjon føyes til gjennom prosessen og derved blir til en ”Valideringsrapport”. Hva valideringen skal omfatte vil imidlertid kunne variere mye fra metode til metode.

For kommersielle metoder (kits) er det ikke krav om full validering dersom tilfredsstillende dokumentasjon fra leverandør og/eller uavhengige kilder kan fremskaffes. Laboratoriet må likevel foreta behovsvurdering og dokumentere at metoden fungerer i eget laboratorium, og etablere en uavhengig løpende kvalitetskontroll for metoden.

Etablering av ny eller endring i eksisterende metode vil nesten alltid medføre endringer i andre deler av laboratoriets rutiner og dokumenter, og skape et opplæringsbehov. Dette bør gjennomgå, styres og dokumenteres.

## Usikkerhet

Innlegg: Se side 31

I akkrediteringssammenheng er det et krav at usikkerhet skal estimeres, og hvis en ren måling av usikkerhet ikke er mulig, skal det gis en oversikt over kilder til usikkerhet og betydningen av disse skal vektet. I relasjon til den endelige klinisk-diagnostiske konklusjon kan den totale usikkerhet deles inn i pre-analytisk usikkerhet, ren analyse- eller måleusikkerhet, og post-analytisk usikkerhet.

Det skilles mellom usikkerhet og feil. Kort kan forskjellen mellom disse uttrykkes som følger:

- Målefeil er forskjellen på målt verdi og sann verdi.
- Måleusikkerhet er et samlet uttrykk for spredning i underliggende parametre som analysen er basert på

Ved metoder som benytter kvantitative måleparametre bestemmes total usikkerhet ved repetitive målinger av uavhengige kontroller. Verdiene av kontrollene bør ligge ved de kliniske beslutningsgrensene (f.eks. cut-off (positiv/negativ grense) eller innen et definert beslutningsområde (f.eks. i S-sonen ved agardiffusjons resistensbestemmelse)).

For dyrkningsmetoder vil en rekke av usikkerhetsfaktorene være identiske. Det er mulig å utarbeide et generelt dokument som omhandler slike gjennomgående feilkilder som mulige årsaker til usikkerhet, og som den enkelte metode kan henviser til. Likevel bør det for den enkelte metode angis hva som vurderes å innebære de største risikoer for usikkerhet.

Se også Rapport fra Norsk Akkrediterings Sektorkomiteé Nr.: P9 ”Måleusikkerhet ved mikrobiologiske analyser”

## 1.9 Medier

Innlegg: Se side 34

Dyrkningsmedier kan være

- Innkjøpt bruksklare
- Tillaget av innkjøpt dehydrerte medier
- Tillaget av enkeltkomponenter

Kvaliteten på mediet bestemmes av

- Valg av produksjonsutstyr (mediereparator bedre enn autoklaver)
- Råvarene
  - Vann (kvalitet ISO 7218: max 50 CFU/ml, ledningsevne  $<25 \mu\text{S/ml}$ , motstand  $>4 \times 10^5 \Omega\text{cm}$ )
  - Enkeltkomponenter
- Sammensetning (formulering)
- Tilberedning (prosedyre, OBS fare ved overoppheting)
- Emballering, merking og oppbevaring

Kvaliteten på innkjøpte bruksklare medier kontrolleres ved

- Merking (navn, lot, dato holdbarhet, datablad, kvalitetskontrollsertifikat)
- Inspeksjon (ytre skader, utfellinger, fargeavvik)
- Endring i formular (se neste avsnitt)
- Endring i leverandør (se neste avsnitt)

Kvaliteten på hver batch egenprodusert medium kontrolleres ved følgende parametre

- Inspeksjon (ytre skader, utfellinger, fargeavvik)
- pH-kontroll (måles etter 2 timer, max  $\pm 0,2$  pH-enheter fra oppgitt verdi)
- Volum kontroll (medietykkelse  $4 \pm 0,5$  med mer oppnås ved hhv 25ml i 9cm skål og 60 ml i 14 cm skål, veiing av flytende medier dersom volum er av betydning for analysen)
- Sterilkontroll (Ved mediets aktuelle inkuberingsstemperatur og tid, dog minst 3 døgn. Antall skåler og maksimalt tillatt kontaminasjon skal defineres – optimalt  $< 5\%$ )
- Vekstkontroll (non-selektive medier minst én stamme, selektive medier ”positiv” og ”negativ” stamme, spesifikke diagnostiske egenskaper ”positiv” stamme)

#### Oppbevaring av medier

- Ved kjøleskapstemperatur (2-8°C, OBS Unngå oppbevaring i kjøleskap som åpnes og lukkes ofte på grunn av store svingninger i temperaturen)
- Beskyttet mot lys
- Holdbarhetstid. (Pragmatisk holdning. Avhengig av type medium og emballering)
  - Innkjøpte medier i henhold til angivelse
  - Egenproduserte vanligvis minst 2 uker (4 uker i plastomslag). Lengre holdbarhet må dokumenteres med funksjonstesting i henhold til anvendelse

#### Når feil ved mediet

- Avviksanalyse (se Anne Grændsen: Vedlegg 2. Mulige feil ved tillaging av mikrobiologiske dyrkningsmedier)
- Korreksjon (i henhold til avviksanalysen)
- Kontroll av at korreksjonen har ønsket virkning

## 1.10 Bakterielt referansemateriale

Innlegg: Se side 56

- ”Referansestammer” Stammer som spores tilbake til en anerkjent nasjonal eller internasjonal stammebank
- ”Referansekultur” 1. gangs utsæd av en referansestamme.
- ”Arbeidskultur” Subkultur avledet av en referansekultur. Definerert holdbarhetstid. Benyttes normalt i det daglige arbeidet.
- ”Brukskultur” Kultur avledet av en arbeidskultur. Kastes etter hver gangs bruk. Anvendes dersom man er avhengig av fersk kultur.

### Referansestammer

#### Internasjonale stammebanker

Registrert i ECCO	European Culture Collections Organization
ATCC	American Type Culture Collection
CCUG	Culture Collection, University of Gotenburg
NCTC	National Collection of Type Cultures

Institut Pasteur, Paris

Health Protection Agency (HPA), Colindale, London

#### Nasjonale stammebanker

Godt karakteriserte stammer fra nasjonale referanselaboratorier for aktuelle stammer.

Må vedlegges dokumentasjon som beskriver stammens egenskaper (i relasjon til aktuelt anvendelsesområde).

### **Valg av referansestammer**

- Eget for formålet
- Om mulig sjelden forekommende i rutinemateriale
- Om mulig samme stamme til mange ulike formål

### **Anvendelse**

- Sammenligne og validere metoder
- Verifisere resultatets riktighet i det enkelte analyseoppsett og over tid
- Verifisere korrekt gjennomføring av standardmetoder (Standardmetoder er lite aktuelt i medisinsk mikrobiologi)
- Validere og kontrollere mikrobiologiske dyrkningsmedier
- Overvåke korrigerende tiltak

### **Mottak, verifisering, oppbevaring**

- Registrering i laboratoriets stammebankregister
- Etablering av driftsjournal for hver stamme (alt arbeid med stammen skal dokumenteres)
- Kontroll av renhet på referansekulturen
- Etablering av referansekulturlager
  - Frysetørreampuller
  - Nedfrosset ved  $-70^{\circ}\text{C}$  i cryorør med eksempelvis Microbank-kuler eller i Greaves medium (sikre med temperatur-alarm)

Arbeid i sikkerhetsbenk klasse II

### **Bruk av referansekulturlager**

- Arbeidskultur anlegges på medium egnet for videre formål
- Selektive medier bør ikke benyttes
- Sikre renkultur
- Kan oppbevares på benk eller i kjøleskap
- Kan subkultiveres (sekundære arbeidskulturer) et definert maximum antall ganger
- Holdbarhet "på benk" skal defineres for den enkelte stamme.
- Oppbevares eller subkultiveres stammen lenger enn angitt må brukbarhet til anvendt funksjon dokumenteres
- Fra arbeidskultur kan subkultur over på annet medium (brukskultur) etableres. Kastes etter bruk.

### **Holdbarhet av stammer**

- Fremgår av leverandørens produktbeskrivelse og skal i prinsippet overholdes.
- Laboratoriet står ansvarlig for at stammen fungerer etter hensikten i eget laboratorium
- Ved korrekt lagring kan holdbarheten for de aktuelle funksjoner ofte være lenger enn produsentens angivelse, men kan være avhengig av anvendelse.
- Dette må laboratoriet i så fall dokumentere

**Det skal ikke etableres nytt lager fra allerede lagret kultur!**

## 1.11 Kvalitetskontroll av blodkultur

Innlegg: Se side 61

Kontroll av blodkulturflasker har to formål.

- Hver batch av blodkulturflasker skal oppfylle definerte krav (leveransekontroll),
- Blodkultursystemet (instrument og flasker) skal oppfylle definerte krav (systemkontroll).

Det anbefales månedlig testing med referansestammer slik at begge formål dekkes.

Et minimumsoppsett bør bestå av en aerob og en anaerob bakteriestamme samt en gjærsoppstamme. Egnete stammer velges som regel blant de som anbefales av produsentene. For enkelte stammers vedkommende kan det være nødvendig med tilsats av blod i flasken. Ved manglende vekst innen definert tid gjentas den aktuelle kontrollen. Dersom feil gjentar seg må dette avviksbehandles med feilsøking av blodkultursystemet.

Definerte krav for inokulat er ikke gitt, men vær oppmerksom på at produsentenes anbefalinger vedrørende inokulatets størrelse varierer betydelig, fra  $1,5 \times 10^8$  (Becton-Dickinson) til 400 bakterier (BioMerieux), mens Swedac anbefaler 50 bakterier (se forslag på 100 bakterier)

Når det gjelder blodkulturinstrument, bør det gjennomføres forebyggende vedlikehold i henhold til produsentens retningslinjer. Det anbefales daglige temperaturmålinger med regelmessig kontroll av termometer mot kalibrert kontrolltermometer. I tillegg testes lamper og alarmsystemer.

## 1.12 Kommersielle identifikasjonssystemer, hjelpetester og hurtigtester

Innlegg: Se side 64

Som ledd i identifikasjon av mikroorganismer anvendes en rekke tester. En kan skille mellom

- Nøkkelmetoder, (enkelttester som er vesentlige for endelig identifikasjon, f eks koagulase, optokin)
- Enkelttester (Hjelpetester som inngår i et bredere identifikasjonssystem, kommersielt eller egenprodusert).

Kritiske kontrollpunkter i kvalitetskontrollen er

- Referansestammer håndtert etter gjeldende anbefalinger
- Renkultur av aktuelle stamme dyrket på et ikke-selektivt medium som sikrer at de aktuelle fenotypiske karakteristika uttrykkes
- Kvalitetskontrollerte medier og reagenser
- Kontroll av testbetingelser, inkubasjonsatmosfære, temperatur og tid
- Bruk av positive og negative kontrollstammer. Dette kan være vanskelig å oppfylle, men bør benyttes på nøkkeltester

## Anbefalinger

- Kvalitetskontrollen må være beskrevet i en prosedyre.
- Alle diagnostiske tester, kits mv kontrolleres ved mottak av ny lot. Et lagersystem må være etablert der det går frem hva som er godkjent.
- For nøkkelmetoder kan det være aktuelt med løpende kontroll, f eks ukentlig.
- Når det gjelder tester som benyttes sjelden, kan det være mest hensiktsmessig å utføre kontroll ved hvert oppsett.

## 1.13 Kvalitative nukleinsyreamplifikasjonsteknikker

Innlegg: Se side 67

Innen bakteriologi anvendes nukleinsyreamplifikasjonsteknikker (NAT) hovedsakelig som kvalitativ mikrobiologisk diagnostikk. I tillegg til validering av en metode ved etablering, er det behov for løpende kontroll av metoden ved hjelp av ulike typer av kontroller:

### Negativ kontroll

Dette er et materiale som skal imitere en negativ prøve.  
Negativ kontroll sjekker for avvik i analytisk spesifisitet.

### Positive kontroller

Positive kontroller er en kjent standard av det aktuelle smittestoffet.  
Positiv kontroll sjekker primært for avvik i analytisk sensitivitet.  
En kan skille mellom ”kit-uavhengige” og ”kit-avhengige” positive kontroller.  
Kit-uavhengige kontroller bør alltid anvendes. Det bør tilstrebes at disse kontrollene er så like det virkelige prøvematerialet som mulig. Slike kontroller bør dekke eventuelle varianter av det smittestoffet som skal påvises, de bør prepareres i større batch’er som lagres under optimale betingelser og være titrert slik at de ikke er for sterke, men inneholder minst 10x mer enn svarende til deteksjonsgrensen.  
Kit-avhengige kontroller leveres som del av kommersielle kits og bør brukes i henhold til produsentens anbefalinger.

### Internkontroll

Internkontroll er kontrollnukleinsyre i hver enkelt prøve, som amplifiseres parallelt med smittestoffnukleinsyre og sjekker for analytisk sensitivitet for hver enkelt prøve.  
Internkontroll kan være inkludert (f eks prøvemateriale som alltid skal inneholde humant DNA) eller være tilsatt. Når internkontroll tilsettes før ekstraksjon oppnås kontroll av ekstraksjon i tillegg til kontroll av amplifikasjon.

### For hver metode bør det gjøres en risikovurdering:

- Sannsynlighet for feil
  - Falske positive
  - Falske negative
- Konsekvenser av feil
- Kontrollenes innvirkning på metodens ”ytelse”



På basis av risikovurderingen (valideringen?) bør (bør eller må?) det etableres et kontrollregime der følgende bestemmes:

- Typer av kontroller?
- Hvor mange av hver type?
- Konsentrasjon av kontrollreagens?
- Plassering i oppsett?

På hvilke trinn i prosedyren? Videre må det etableres regler for hvilke kontrollverdier som er akseptable og regler for tiltak ved avvik fra akseptable kontrollverdier. Det må føres protokoll over positive kontroller og avvik fra akseptable kontrollverdier samt avvik vedrørende negative kontroller og internkontroller.

Tabellen viser algoritme for konklusjon ved ulike kontroll/prøve resultatkombinasjoner.

<b>Kontroller:</b>	<b>PRØVEN:</b>	
	<b>Smittestoff positiv</b>	<b>Smittestoff negativ</b>
<b>Internkontroll positiv</b>	Positiv	Negativ
<b>Internkontroll negativ</b>	Positiv	Inkonklusiv prøve
<b>Neg. kontroll positiv</b>	Inkonklusiv for alle positive prøver	Negativ
<b>Neg. kontroll negativ</b>	Positiv	Negativ
<b>Pos. kontroll positiv</b>	Positiv	Negativ
<b>Pos. kontroll negativ</b>	Positiv	Inkonklusiv for alle negative prøver

## 1.14 Sammenliknende laboratorieprøving

Innlegg: Se side 75

Sammenliknende laboratorieprøving (SLP) kan defineres som en eller flere kontrollprøver som en uavhengig institusjon sender ut til flere laboratorier for å sammenlikne de deltakende laboratorienes prestasjoner. SLP omtales også som ”ringtest” eller ”proficiency testing” og er en form for ekstern kvalitetskontroll. SLP bidrar til å etablere sporbarhet for mikrobiologiske analyser, hvor andre sporbarhetskriterier ikke kan oppfylles.

Ekstern kontroll kan inndeles i:

1. Deltakelse i kommersielle opplegg eller den nasjonale utsendelsen fra Folkehelseinstituttet.  
Det finnes en rekke SLP-produsenter, konferer liste i Anne-Lise Bruu’s innlegg.
2. Samarbeid mellom laboratorier  
Testpaneler blir distribuert til de deltakende laboratoriene.
3. Utveksling av enkeltprøver mellom laboratorier.  
Gi støtte til, supplere eller verifisere egne analyseresultater

Alternativ 2 kan være aktuelt der det ikke foreligger annet tilbud.

Alternativ 3 kan ikke vurderes som noen fullgod kvalitetskontroll for en analyse, men kan gi antydning om analysekvaliteten.

### Håndtering av SLP i laboratoriet

Det er viktig å etablere et system knyttet til utførelse, oppfølging og besvarelse. Prinsipielt skal all ekstern kvalitetskontroll behandles som vanlige kliniske prøver.

Når laboratoriet mottar rapport fra SLP-arrangøren, må laboratoriets resultater sammenholdes med fasit og eventuelle avvik behandles i avdelingens avvikssystem. Det er viktig at alle involverte informeres om laboratoriets prestasjoner og eventuelle avvik, f eks på et avdelingsmøte

Dokumentasjon fra gjennomført SLP er viktig og skal oppbevares i minst 3 år

## 2 SAMMENDRAG AV INNLEGGENE

---

### 2.1 Forskrift om internkontroll i sosial- og helsetjenesten Konsekvenser for medisinsk mikrobiologiske laboratorier

Aud F. Åsprang, Helsetilsynet

#### Referanser:

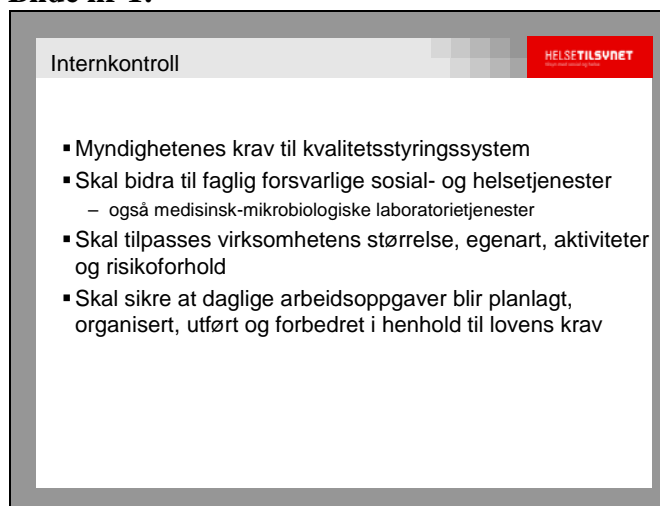
Veileder: "Hvordan holde orden i eget hus". Internkontroll i sosial- og helsetjenesten. Sosial- og helsedirektoratet. IS 1182, 12/2004 (ISBN 82-8081-043-9)

"Forskrift om internkontroll i sosial- og helsetjenesten"

[http://www.shdir.no/vp/multimedia/archive/00001/IS-1183\\_1061a.pdf](http://www.shdir.no/vp/multimedia/archive/00001/IS-1183_1061a.pdf)

#### Lysbilder vist på møtet:

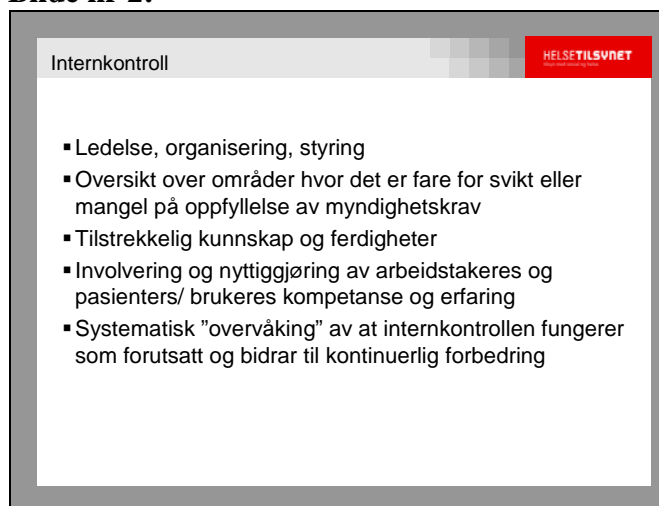
##### Bilde nr 1:



Slide 1: Internkontroll

- Myndighetenes krav til kvalitetsstyringsystem
- Skal bidra til faglig forsvarlige sosial- og helsetjenester
  - også medisinsk-mikrobiologiske laboratorietjenester
- Skal tilpasses virksomhetens størrelse, egenart, aktiviteter og risikoforhold
- Skal sikre at daglige arbeidsoppgaver blir planlagt, organisert, utført og forbedret i henhold til lovens krav

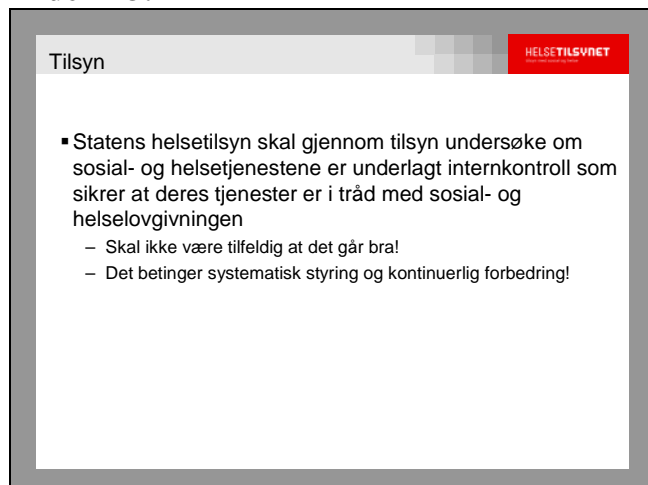
##### Bilde nr 2:



Slide 2: Internkontroll

- Ledelse, organisering, styring
- Oversikt over områder hvor det er fare for svikt eller mangel på oppfyllelse av myndighetskrav
- Tilstrekkelig kunnskap og ferdigheter
- Involvering og nyttiggjøring av arbeidstakeres og pasienters/ brukeres kompetanse og erfaring
- Systematisk "overvåking" av at internkontrollen fungerer som forutsatt og bidrar til kontinuerlig forbedring

##### Bilde nr 3:



Slide 3: Tilsyn

- Statens helsetilsyn skal gjennom tilsyn undersøke om sosial- og helsetjenestene er underlagt internkontroll som sikrer at deres tjenester er i tråd med sosial- og helselovgivningen
  - Skal ikke være tilfeldig at det går bra!
  - Det betinger systematisk styring og kontinuerlig forbedring!

## 2.2 Akkreditering – aktuelle standarder Opplæring og vedlikehold av kompetanse Tolkning og vurdering

Roald K. Nilsen, Norsk Akkreditering

### Referanser

NS-EN ISO/IEC 17025 (2005) Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriers kompetanse.

NS-EN ISO 15189 (2003) Medisinske laboratorier. Særskilte krav til kvalitet og kompetanse.

NA Dok. 25/31 Akkrediteringsvilkår

NA Dok. 9 Veiledning til akkrediteringsvilkår for laboratorier

NA Dok. 48b Medisinsk mikrobiologi

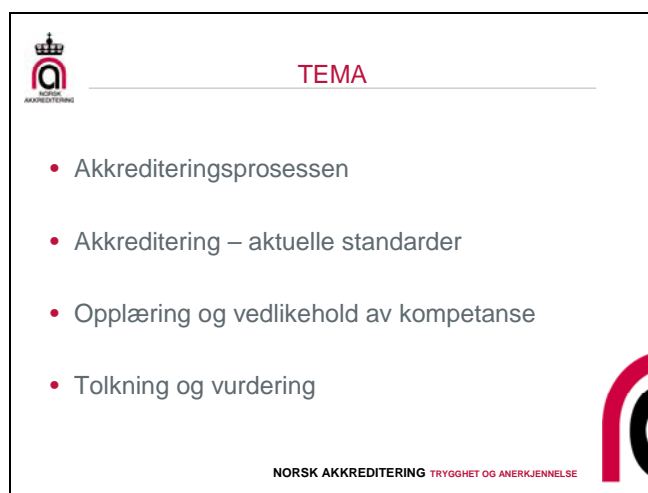
NA-S10 Sjekkliste for laboratorier (ISO 17025)

NA-S10 Sjekkliste for laboratorier (ISO 15189)

NA Dok 9 og NA-S10 (ISO 17025) er for øyeblikket under revidering. NA-S10 (ISO 15189) er snart klar for utgivelse. Gjeldende utgave av alle NA-S og NA Dok. finnes på [WWW.akkreditert.no](http://WWW.akkreditert.no). NS-standarder kan kjøpes hos Pronorm ([WWW.pronorm.no](http://WWW.pronorm.no)).

### Lysbilder vist på møtet:

#### Bilde nr 1:



Slide 1: TEMA

- Akkrediteringsprosessen
- Akkreditering – aktuelle standarder
- Opplæring og vedlikehold av kompetanse
- Tolkning og vurdering

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

#### Bilde nr 2:




Slide 2: Akkreditering av medisinske laboratorier

- Medisinske laboratorier kan velge –
  - NS-EN ISO/IEC 17025 (2005) Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriers kompetanse og/eller
  - NS-EN ISO 15189 (2003) Medisinske laboratorier – Særskilte krav til kvalitet og kompetanse
- De to standardene har litt ulik fokus:
  - ISO 17025 har analyseresultatet som hovedfokus og skal kunne brukes av alle typer laboratorier
  - ISO 15189 har bruken av analyseresultatet i pasientbehandling som hovedfokus og er laget for (human)-medisinske laboratorier

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

### Bilde nr 3:




#### Akkrediteringsprosessen

- Laboratoriet forbereder seg:
  - Utpeking av kvalitetsleder/personell, motivering av medarbeidere, utarbeiding og implementering av styringssystemet, innsending av søknad.
- Formøte med NA.
- Bedømmelse på stedet/avviksregistrering/anbefaling.
  - Ledende og tekniske bedømmere
- Laboratoriet korrigerer avvik/sender inn dokumentasjon.
- Bedømmerne vurderer gjennomførte korrigerende tiltak.
- Akkreditering innvilges.
- Oppfølgingsplan utarbeides:
  - Årlige oppfølgingsbesøk i første akkrediteringsperiode
  - Fornyelse etter 5 år
  - Individuelle oppfølgingsplaner.

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

### Bilde nr 4:



#### Andre relevante NA dokumenter

- NA Dok 25/31 Akkrediteringsvilkår
- NA Dok 26a Krav til vekter
- NA Dok 26b Krav til termometre
- NA Dok 14 Bruk av akkrediteringsmerket
- NA Dok 9 Veiledningsdokument til ISO 17025

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

### Bilde nr 5:




#### Søknad

- ISO 17025 (2005)
  - Søknadsskjema NA-S20a
  - Angivelse av søknadsomfang – NA-S5
  - Sjekkliste – NA-S10
- ISO 15189 (2003)
  - Søknadsskjema NA-S20m
  - Angivelse av søknadsomfang (metoder) – NA-S5m
  - Sjekkliste – NA-S10m
- [www.akkreditert.no](http://www.akkreditert.no)

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

### Bilde nr 6:




#### Status – medisinske laboratorier

- ISO 15189
  - 1 akkreditert laboratorium
  - 1 søker
  - Mange interesserte
- ISO 17025
  - 15 akkrediterte laboratorier
  - 3 søkere

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

### Bilde nr 7:




#### ISO 15189 kontra ISO 17025

- ISO 15189:
  - Har et tydelig fokus: bruke av analyseresultatet i behandling av pasienter
  - Er lettere å bruke og å forstå, dvs. krever mindre tolkning enn ISO 17025
  - Inneholder mange detaljerte krav, dvs. er mer styrende
  - Er litt "umoderne" når det gjelder krav til analyserapporter

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

### Bilde nr 8:




#### ISO 15189 kontra ISO 17025

- ISO 15189:
  - Pre-analytisk (prøvetaking) skal inkluderes dersom den utføres av laboratoriet
  - Post-analytisk (vurdering/fortolkning) skal være del av akkrediteringen
- Medisinsk spesialistkompetanse: utfordring for en del laboratorier (5.1)

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

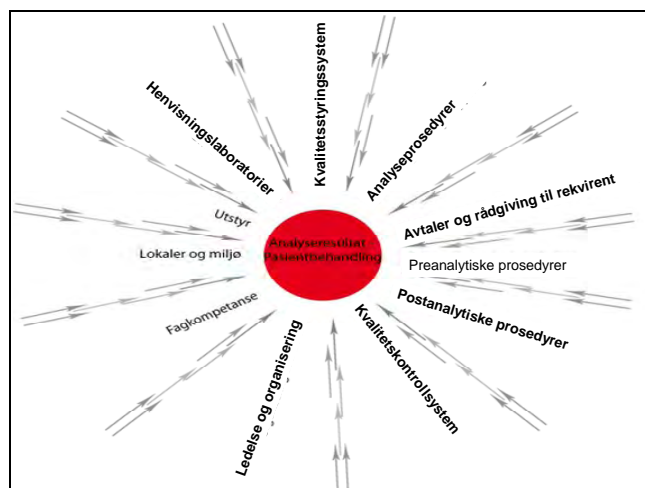
Bilde nr 9:

 **ISO 15189 - utfordringer slik NA ser det**


- Prøvetaking skjer i større grad av personell som er "utenfor" laboratoriet, for eksempel sykepleiere
- Sporbarhet til personen som har tatt en prøve (5.4.7)
- Bruk av henvisningslaboratorier (4.5)
- Leselighet av endrede rapporter (5.8.15)
- Etablering av svartider for alle analyser og varsling ved forsinkelser (5.8.11)
- Kvalitetsindikatorer for systematisk overvåking og evaluering av laboratoriets bidrag til pasientbehandling (4.12.4)

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

Bilde nr 10:




Bilde nr 11:

 **Veiledning mikrobiologi**

- **NA Dok. 48b:** Veiledningsdokument til kravene i ISO 17025 (1999): Utarbeidet i 2002 etter råd fra NAs sektorkomite P8
  - Behov for revidering?
  - 2005-utgaven?
  - Veilede også i forhold til ISO 15189?
- Rapport fra sektorkomite P9: Krav til måleusikkerhet
  - Tas inn i NA Dok. 48b ved eventuell revisjon

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE


Bilde nr 12:

 **Opplæring – ISO 15189 (pkt. 5.1)**

- Laboratorieledeelsen skal
  - ha oversikt over personalets erfaring, utdanning, opplæring, kvalifikasjoner og kompetanse
  - sørge for utdanningsprogram
- Opplæring og erfaring skal være dokumentert
- Personalet skal ha spesifikk opplæring i kvalitetssikring
- Kompetansen til hver enkelt person skal vurderes etter opplæring og deretter med jevne mellomrom. Ny opplæring ved behov
- Personalet skal delta i regelmessig faglig utvikling og samarbeid

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE


Bilde nr 13:

 **Opplæring – ISO 17025 (pkt. 5.2)**

- Laboratorieledeelsen skal
  - Sikre at personalet er kvalifisert/kompetent på grunnlag av erfaring, utdanning, opplæring og ferdigheter
  - Formulere mål for utdanning, opplæring og ferdigheter
  - Identifisere opplæringsbehov og gi opplæring
  - Evaluere effekten av opplæringstiltak
- Opplæring, ferdigheter, utdanning og erfaring skal være dokumentert
- Godkjenning av personell skal være datert

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE


Bilde nr 14:

 **Dokumentasjon for opplæring**

- Plan/program
- Opplæringsperiode
- Sporbarhet
- Godkjenning/autorisering
  - - dato
  - - grunnlag
  - - objektive kriterier
  - - subjektive vurderinger

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 15:**



### Vedlikehold av kompetanse

- En god mikrobiologi er en som vedlikeholder:
  - Teknikk/håndarbeid
  - Observasjonsevne
  - Kunnskap/fagkompetansen sin i praksis
- NA krever jevnlig praktisering
- Mikrobiologiske laboratorier skal ha krav til, og plan for, vedlikehold av kompetanse
- Laboratoriet må kunne dokumentere personalets erfaring med de enkelte teknikker/metoder/medier

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 16:**




### Tolkning og vurdering - ISO 17025

- ISO 17025: Må søkes spesielt om akkreditering for faglige vurderinger og fortolkninger (fagområdet P32)
  - Medisinske utsagn knyttet til analyseresultat
    - Støtte for klinisk tilstand
    - Støtte for en diagnose
    - Anbefaling for videre utredning
    - Anbefaling for videre behandling
- Dokumentasjon av grunnlag for vurdering og fortolkning:
  - Beskrives i styringssystemet, kan for eksempel være lærebøker, vitenskapelige artikler, nasjonale retningslinjer o. l.
  - Standardutsagn kan brukes, eksempler skal gis i styringssystemet
- Personell som er kvalifisert til å gjøre faglig vurdering skal være autorisert av ledelsen etter på forhånd fastsatte kriterier. Vurderingen skal være dokumentert.
- ISO 15189:

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 17:**



### Tolkning og vurdering – ISO 15189


**Må** inkluderes i akkrediteringen !

Postanalytiske prosedyrer (pkt. 5.7.1):

- **Autorisert personell** skal systematisk gjennomgå resultatene av analyser, evaluere dem i samsvar med den tilgjengelige kliniske informasjonen om pasienten og gi tillatelse til frigivelse av resultatene

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 18:**



### Oppsummering - akkrediteringsstandarder

Medisinske laboratorier kan velge mellom:

- **ISO 17025:** som gir fleksibilitet og valgfrihet, men som krever mer veiledning

og

- **ISO 15189:** som er mer spesifikk i kravene, bruker et medisinsk språk og fokuserer på analyseresultatet til bruk i pasientbehandlingen

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

## 2.3 Laboratoriets egenkontroll

Jørild Theie, A/S Telelab, Skien

### 2.3.1 Innledning

Laboratorier som har etablert et kvalitetssystem bør jevnlig kontrollere at driften skjer i henhold til gjeldende krav i systemet, det være seg myndighetskrav, akkrediteringskrav eller egne målsettinger. I tillegg bør rutiner for å avdekke feil og mangler og for å forbedre/utvikle systemet forefinnes. Egnede virkemidler i denne sammenheng er

- AVVIKS- OG KLAGEBEHANDLING
- INTERN REVISJON
- LEDELSENS GJENNOMGANG AV KVALITETSSYSTEMET

Akkreditering forutsetter overnevnte punkter.

### 2.3.2 Planlegging og gjennomføring

**AVVIKS- OG KLAGEBEHANDLING** skal sikre at beslutninger kan fattes i forbindelse med arbeid med avvik og uregelmessigheter, og i forbindelse med mottatte klager fra oppdragsgivere eller andre. Sentralt i avviks- og klagehåndtering er ansvarsfordeling og registrering. Politikk og prosedyrer for gjennomføring må foreligge; hva skal meldes, av hvem og på hvilken måte, hvem skal følge opp og hvem skal avslutte saken ?

En prosedyre for avviks-/klagehåndtering må minst angi

- rapporteringsform og -vei
- retningslinjer for iverksetting av strakstiltak
- ansvarsfordeling og registrering/arkivering av opplysninger
- retningslinjer for årsaks- og konsekvensanalyse
- iverksetting av korrigerende tiltak for å eliminere avvik
- overvåkning av korrigerende tiltak
- retningslinjer for lukking

Det kan være praktisk å integrere ulike typer hendelser (avvik, klager, observasjoner, mm.) i et og samme behandlingssystem i laboratoriet. Det er hensiktsmessig å utarbeide standard skjema som kan anvendes ved registrering og oppfølging. Skjema bør minimum inneholde følgende punkter

- Når hendelsen skjedde og hvem registrerte den
- Hendelsestype
- Beskrivelse av hendelsen
- Strakstiltak utført
- Årsaksanalyse/merknad
- Korrigerende tiltak med ansvarsfordeling
- Datofrist for gjennomføring
- Verifisering av gjennomførte tiltak
- Dato for lukking



Dersom elektronisk hendelsesbehandling benyttes vil skjema oftest være predefinert, men kan også brukerstyres ut ifra virksomhetens behov.

Dokumentasjon fra hendelsesbehandling skal arkiveres i hht. kravene i kvalitetssystemet (3 år i akkreditert sammenheng).

**INTERN REVISJON** er en systematisk og uavhengig undersøkelse av alle elementene i et kvalitetssystem og skal gjennomføres i løpet av året. Revisjoner skal planlegges formelt og derfor må politikk og prosedyrer/plan for gjennomføring foreligge (se tredje avsnitt).

Kvalitetsleder (den som kjenner kravene) bør i samarbeid med andre kvalifiserte medarbeidere tilrettelegge og utføre revisjon. Personellet skal helst ikke revidere egne aktiviteter og ved å benytte medarbeidere fra ulike områder i virksomheten unngår man å revidere egne ansvars-/arbeidsområder. Ledende revisor bør kurses eksternt. Det Norske Veritas og Norsk Akkreditering har gode kurstilbud.

Plan for gjennomføring bør utarbeides og denne må omfatte alle elementene i systemet samt revisjonstyper og hyppighet. Revisjoner kan med fordel utføres månedlig og planen bør inneholde ulike revisjonsmetoder;

**Horisontal revisjon**

hvor man gjør en fullstendig gjennomgang av et spesifikt område, f.eks. metoder, personell eller utstyr.

**Vertikal revisjon**

hvor man følger en eller flere prøvers gang i laboratoriet fra ankomst til utsendelse av svarrapport.

Dersom revisjonsplanen fravikes, skal dette registreres.

Det kan være nyttig å utarbeide standard skjema som kan anvendes ved hver revisjon; innkalling, sjekklister for spørsmål, avvik/observasjoner og sluttrapport.

Revisjonen utføres ved dokumentgjennomgang, intervju og befaring. Resultatet av revisjonen presenteres i en rapport fra ledende revisor hvor detaljer beskrives. Selve oppsummeringen bør inneholde positive tilbakemeldinger i tillegg til presentasjon av avvik og forbedringsmuligheter. Funn ved interne revisjoner (avvik og observasjoner) skal følges opp med korrigerende eller forebyggende tiltak som skal dokumenteres og gjennomføres innen en avtalt tidsfrist.

Dokumentasjon fra intern revisjon skal arkiveres i hht. kravene i kvalitetssystemet (3 år i akkreditert sammenheng)

**LEDELSENS GJENNOMGANG** av kvalitetssystemet skal omfatte en rekke sjekkpunkter hvor hensikten er å skaffe seg et godt nok grunnlag for å vurdere systemets tilstrekkelighet, og for å treffe beslutninger om endring/utvikling av dette. Resultatet fra gjennomgangen skal dokumenteres og eventuelle nødvendige tiltak gjennomføres innen en avtalt tidsfrist.

Ledelsens gjennomgang bør utføres årlig. Kvalitetslederen kan planlegge dette sammen med øverste leder, sende møteinnkalling med sakliste, lede møtet og skrive referat fra dette. Hvem som omfattes av "ledelsen" bestemmes internt, men bør beskrives i politikken.

Følgende punkter bør gjennomgås systematisk:

- saker fra forrige gjennomgang
- rapporter fra bedømming og oppfølging av akkrediteringsmyndigheten
- rapporter fra revisjoner utført av eksterne parter
- resultater fra nylig gjennomførte interne revisjoner
- rapporter fra ledere i stab og drift
- resultater fra deltagelse i sammenlignende laboratorieprøvinger, avklare eventuelle behov for utvidelse av disse
- resultater fra interne kvalitetskontroller, avklare ev. behov for utvidelse av disse
- hendelsesregistrering (inkluderer tilbakemeldinger og klager fra oppdragsgivere)
- korrigerende og forebyggende tiltak
- endringer i volum og type arbeid
- ressurstildeling (personell, teknisk utstyr )
- driftsmålsetting, eventuell godkjenning av endrede mål
- behov for endringer i kvalitetssystemet inkludert kvalitetshåndboken
- eventuelt andre aktuelle forhold
- plan for endring av kvalitetssystemet med tidsfrister

Også her kan det være nyttig å utarbeide standard skjema for innkalling/saksliste, planlagte tiltak, møtereferat.

Resultater fra gjennomgangen skal dokumenteres og kan følges opp f.eks. via laboratoriets hendelsesbehandlingssystem

Dokumentasjon fra ledelsens gjennomgang arkiveres i hht. kravene i kvalitetssystemet (3 år i akkreditert sammenheng).

### 2.3.3 Avslutning

Laboratoriets egenkontroll av kvalitetssystemet er ressurskrevende, men **helt nødvendig** for å opprettholde og utvikle systemet. Den viktigste faktoren for å lykkes med virkemidlene er imidlertid ikke bare gode, tilgjengelige skjemaer og prosedyrer, men holdninger og kultur internt, ikke minst fra ledelsens side. Man skal tore å melde fra om ting, ledelsen må ha en åpen holdning til at alle kan gjøre feil, og medarbeiderne må oppfordres og oppmuntres til å tenke forbedring.

Avviks- og klagebehandling kan iverksettes tidlig i opparbeidelsen av et kvalitetssystem, intern revisjon og ledelsens gjennomgang er mer naturlig gjennomførbart når systemet i all hovedsak er på plass.

### Referanser

1. Norsk standard NS-EN ISO/IEC 17025. Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriers kompetanse. November 2005.

## 2.4 Laboratoriedatasystemer Svarrapportering

Erik Figenschou, Norsk Akkreditering

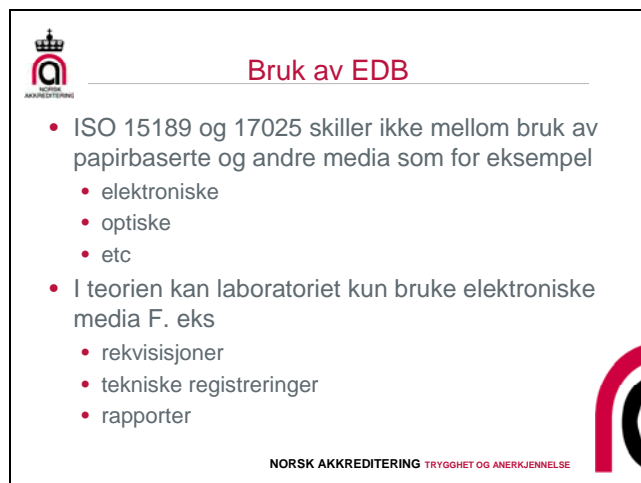
Bruk av datasystemer på laboratorier blir stadig mer utbredt. Disse systemene varierer fra enkle egenutviklede regneark via integrerte datasystemer i analyseinstrumenter til avanserte datasystemer som for eksempel LIS. Enten et laboratorium velger å akkreditere seg etter ISO 15189 eller ISO 17025 stilles det krav til validering av IT systemer. Omfanget av valideringen vil variere med kompleksiteten av systemet, samt hvilke konsekvenser en feil vil få for analyseresultatet. Under innlegget vil validering av ulike systemer bli diskutert.

### Referanser

- NS-EN ISO 15189:2003 Medisinske laboratorier. Særskilte krav til kvalitet og kompetanse.
- NS-EN ISO/IEC 17025:2005 Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriers kompetanse.

### Lysbilder vist på møtet:

#### Bilde nr 1:

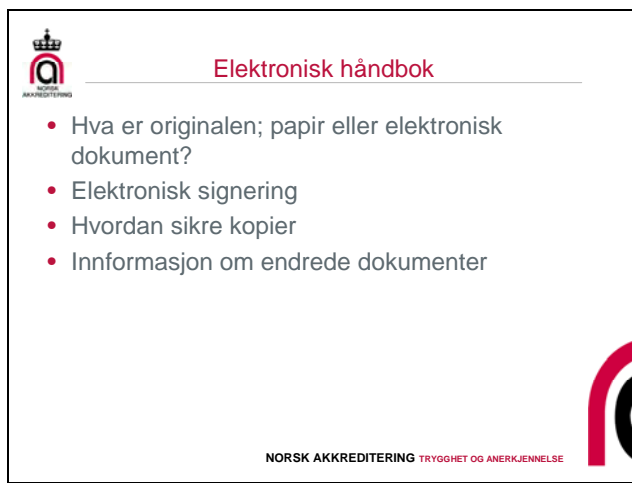


**Bruk av EDB**

- ISO 15189 og 17025 skiller ikke mellom bruk av papirbaserte og andre media som for eksempel
  - elektroniske
  - optiske
  - etc
- I teorien kan laboratoriet kun bruke elektroniske media F. eks
  - rekvisisjoner
  - tekniske registreringer
  - rapporter

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

#### Bilde nr 2:

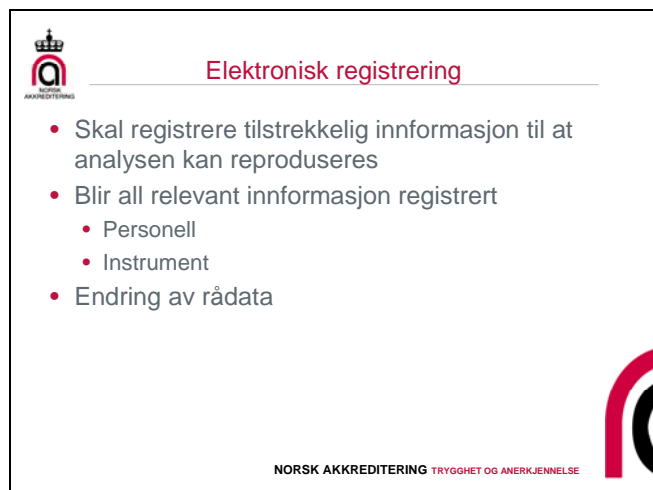


**Elektronisk håndbok**

- Hva er originalen; papir eller elektronisk dokument?
- Elektronisk signering
- Hvordan sikre kopier
- Innformasjon om endrede dokumenter

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

#### Bilde nr 3:

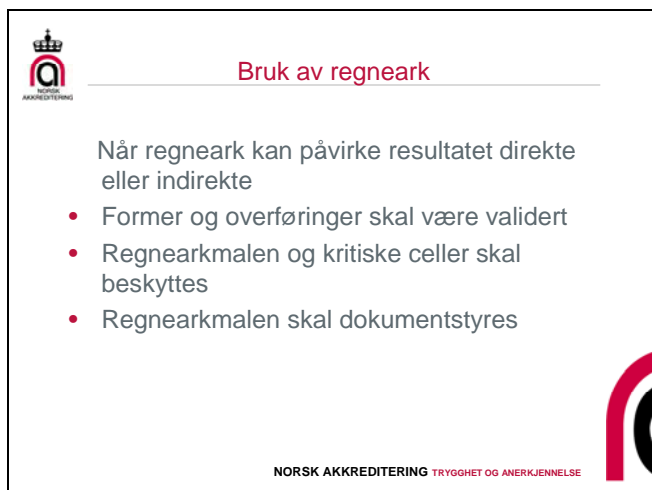


**Elektronisk registrering**

- Skal registrere tilstrekkelig informasjon til at analysen kan reproduseres
- Blir all relevant informasjon registrert
  - Personell
  - Instrument
- Endring av rådata

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

#### Bilde nr 4:




**Bruk av regneark**

Når regneark kan påvirke resultatet direkte eller indirekte

- Former og overføringer skal være validert
- Regnearkmalen og kritiske celler skal beskyttes
- Regnearkmalen skal dokumentstyres

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 5:**




### Validering (I)

- Alle systemer som kan påvirke resultatet skal være validert
  - Regneark
  - LIS
  - Elektronisk rapportering
  - Programvare tilknyttet analyseinstrumenter
  - Overføring fra analyseinstrument til LIS
  - Etc
- Validering er å dokumentere at systemet fungerer etter hensikten

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 6:**



### Validering (II)


Validering er en styrt prosess

- 1. Utrede hva som skal valideres**
2. Utarbeide en valideringsplan
3. Gjennomføre praktisk arbeid
- 4. Dokumentere resultatet av valideringen (valideringsrapport)**

Problem: Validering involverer ofte IT-avdelingen

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 7:**




### Utrede hva som skal valideres

- Leverandørtesting er ikke validering
- Alle benyttede funksjoner må inkluderes
- Vektlegging av det kritiske
- Simulere vanlige prosesser (Black Box)

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 8:**



### Forenklet rapportering

- Rapport avviker fra kravene i standarden
- Problem: Omtales ikke i ISO 15189
  - NA aksepterer forenklet rapportering for ISO 15189
- Skal avtales skriftlig med oppdragsgiver
- Ikke rapportert informasjon skal være tilgjengelig for oppdragsgiver

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

**Bilde nr 9:**



### Elektronisk rapportering

- Skal tilfredsstill standardens krav, men
  - ofte forenklet rapportering
- Må ha et system for å sikre at rapporten kun mottas av "autorisert person".
- Autorisasjon av rapporten, når mulig
- Arkivering
  - Må kunne hente opp den rapporten som ble sendt
- Endringsrapporter

NORSK AKKREDITERING TRYGGHET OG ANERKJENNELSE

## 2.5 NA Dok. nr. 51 Kvalitetssikring av IT-systemer på akkrediterte laboratorier. Valg av metoder – validering – usikkerhet

Pål A. Jenum, Sykehuset Asker og Bærum

Innen mikrobiologisk diagnostikk kan det for en gitt problemstilling være ulike veier til målet. Det resultatet man ender opp med kan i stor grad være avhengig av hvilken vei man velger. Valg av en metode med optimal kombinasjon av sensitivitet og spesifisitet, klinisk diagnostisk bedømt, er det øverste målet, men ikke alltid tilgjengelig eller gjennomførbart.

I klinisk sammenheng vil også tiden det tar før svar foreligger og kostnadene knyttet til metoden værre av betydning for hva som velges i rutinediagnostisk virksomhet. Utfordringen er i stor grad knyttet til å definere hva som er ”godt nok”, ikke nødvendigvis hva som er ”best”. Kunnskap om metodens svake og sterke sider er uansett viktig og av stor betydning for at det resultat som oppnås, tolkes riktig i den aktuelle kliniske sammenheng.

I det følgende beskrives elementer av betydning for valg av metode og for evnen til å tolke resultatet riktig (1-3)

### 2.5.1 Valg av metode

#### Behov

Beslutning om å etablere en ny eller endre en eksisterende metode, og valg av metode knyttet til dette, baseres på flere forhold. Generelt skal metoden være ”hensiktsmessig” [5.4.1]<sup>1</sup>(1). Det er en forutsetning at det foreligger et medisinsk begrunnet behov. Dette kan være som følge av

- Uttrykt ønske fra rekvirent
- Endret epidemiologisk situasjon
- Ny kunnskap om nye og eksisterende metoder
- Endret tilgjengelighet av nye og eksisterende metoder

Andre ikke-medisinske hensyn kan også initiere behov for metodeendring

- Laboratoriets politikk hva gjelder diagnostisk ”nivå” (Primær- versus referanselaboratorium)
- Utstyrsmessige endringer i laboratoriet
- Kapasitetsmessige hensyn
- Kostnader

Behovet for en bestemt analysemetode er derfor å anse som en dynamisk prosess, hvor behovet må antas å kunne endres over tid. Det påligger laboratoriet en faglig plikt til å holde seg rimelig orientert om de til enhver tid aktuelle behov og tilgjengelige metoder for derved, uten unødvendig forsinkelse, å kunne tilpasse virksomheten slik at den løpende er ”god nok”.

#### Gjennomførbarhet

En forutsetning for å etablere en ny metode er at laboratoriet er i besittelse av tilstrekkelig faglig kompetanse, og det utstyr og de kontrollrutiner som er nødvendig for gjennomføring. Metoden må kunne fungere i laboratoriet.

---

<sup>1</sup> Tall i hakeparentes henviser til punkt i NS-EN ISO/IEC 17025:2005 (1)

## 2.5.2 Validering

### Definisjon

Validering er bekreftelsen fra en undersøkelse og fremskaffing av objektivt bevis på at de spesielle kravene for en bestemt tiltenkt anvendelse tilfredsstilles [5.4.5.1].

Det vil kort si bekrefte at en analyse fungerer etter hensikten. Det betyr igjen at en hensikt og et ”minstekrav” til ytelse må være definert på forhånd. Innen mikrobiologi vil imidlertid ofte testens ytelse belyses ved valideringen og så vil man deretter, ut fra resultatene, vurdere om dette er ”godt nok” i relasjon til hensikten.

### Valideringsplan, Valideringsrapport

Alle metoder som anvendes skal være validerte. Valideringen skal dokumenteres.

Standardmetoder som er ferdig validerte finnes knapt i medisinsk mikrobiologi. Derimot finnes en del metoder, spesielt dyrkningsmetoder, som har vært benyttet i mange år uten å være internasjonalt standardiserte, men som gjennom bruk over tid har vist seg hensiktsmessige. Generelle oppslagsverk innen medisinsk mikrobiologi gir retningslinjer og vil være tilstrekkelig som dokumentasjon for slike metoder (4,5).

Etablering av ny metode eller vesentlig endring av en eksisterende metode bør forutgå av en valideringsplan som beskriver hva man vil gjøre og hvor resultater, vurderinger og en endelig konklusjon føyes til gjennom prosessen og derved blir til en ”Valideringsrapport”.

Hva valideringen skal omfatte vil imidlertid kunne variere mye fra metode til metode.

Elementer som bør vurderes ved etablering av en valideringsplan er:

- Definerings av behov og hensikt
- Vurdering av gjennomførbarhet i laboratoriet
- Gjennomgang av litteratur
  - Foreligger nasjonale retningslinjer eller anbefalinger, for eksempel i form av Strategimøtekonklusjoner ?
  - Gjennomgang av dokumentasjon fra produsent
  - Gjennomgang av annen relevant faglitteratur
- Metodeegenskaper
  - Deteksjonsgrense og måleområde
  - Sensitivitet og spesifisitet
  - Linearitet, riktighet (accuracy) og presisjon
  - Repeterbarhet og reproduserbarhet
  - Interferenser, bruk av internkontroller
  - Usikkerhet
- Sporbarhet
  - Bruk av definerte referansematerialer, etablering av uavhengige kontroller
  - Sammenligning med eksisterende / etablert metode
  - Sammenligning med annet laboratorium
  - Plan for løpende kvalitetskontroll, f.eks. bruk av uavhengige kontroller og SLP-deltagelse
- Tolkning
  - Preanalytiske forhold
  - Analytisk versus diagnostisk ytelse
  - Forbehold
  - Usikkerhet

- Samlet vurdering og konklusjon
  - Kan metoden tas i bruk?
  - Er det betingelser knyttet til at metoden kan tas i bruk?
  - Skal de foretas revalidering på et senere tidspunkt?
- Dato og signatur av valideringsansvarlig / beslutningsansvarlig

For mikrobiologiske dyrkningsmetoder vil det oftest være spørsmål om evne til enten å påvise en hvilken som helst mikrobe i et normalt sterilt materiale, eller å påvise en eller flere definerte patogener, eller potensielt patogener, mikrobetyper i en flora av hva som kan tolkes som ”normal mikrobiell flora” for det aktuelle prøvetaksstedet. For slike rent kvalitativt rettede analyser er en rekke av punktene under metodeegenskaper oftest lite aktuelle som f.eks. deteksjonsgrense, sensitivitet, spesifisitet (NB: Viktig ved sekundær identifisering av isolat), måleområde, linearitet, riktighet, presisjon, repeterbarhet, internkontroller. I slike tilfelle vil en gjennomgang av andre elementer som interferenser, usikkerhet, sporbarhet, tolkning være desto viktigere.

For kommersielle metoder (kits) er det ikke krav om full validering dersom tilfredsstillende dokumentasjon fra leverandør og/eller uavhengige kilder kan fremskaffes. Laboratoriet må likevel foreta behovsvurdering og dokumentere at metoden fungerer i eget laboratorium, og etablere en uavhengig løpende kvalitetskontroll for metoden. For enkelte metoder kan dette siste ikke være praktisk mulig (metoden kan da ikke akkrediteres).

Ved kvantitative eller semikvantitative metoder må valideringen tilpasses dette i relasjon til kvantitetens betydning for den diagnostiske tolkningen av svaret. Dersom resultatene tillater det skal egnede statistiske metoder benyttes.

### **Endringsprotokoll**

Etablering av en ny metode eller endring av en eksisterende metode vedrører oftest flere forhold enn kun krav til validering av den aktuelle metode. Ved en ”endringsprotokoll”, hvor selve valideringen er ett av elementene, er det mulig å dokumentere at alle forhold i laboratoriet som berøres av metodeendringen, er vurdert og gjennomført. Slike tilleggselementer kan være:

- Kjøp, registrering og innkjøring av utstyr, reagenser
- Ombygninger, omrokeringer
- Endring i logistikken på laboratoriet
- Vurdering av aksjonsgrenser og tiltak i forbindelse med avvikende resultater.
- Oppdatering av laboratoriets EDB-system med analysekoder, svarkoder og alternative standard merknader/kommentarer
- Etablering av løpende system for kvalitetskontroll og SLP for den aktuelle metode, eventuelt samarbeid med andre laboratorier
- Allokering og opplæring av nøkkelpersonell og rutinepersonell
- Vurdering av sikkerhetsaspekter (HMS-krav)
- Oppdatering og godkjenning av alle metoder nedtegnet i laboratoriets kvalitetssystem, som berøres av endringen. Eksempelvis:
  - Prosedyre for aktuell metode
  - Prosedyrer for tilstøtende metoder hvor aktuell metode inngår eller er nevnt
  - Prosedyrer for tolkning
  - Ansvarsforhold
  - Opplæringsplaner
  - Lister over leverandører
  - Oversikt over uavhengige kontrollsystemer, SLP-deltagelse
- Melding til NA nødvendig (hvis akkreditert) ?

- ”Av-akkreditering” nødvendig? (hvis opprinnelig metode var akkreditert og laboratoriet ikke er godkjent for ”fleksibel akkreditering”)

### 2.5.3 Usikkerhet

Ethvert analyseresultat som utgis fra laboratoriet, er beheftet med usikkerhet.

I akkrediteringssammenheng er det et krav at usikkerhet skal estimeres, og hvis en ren måling av usikkerhet ikke er mulig, at det gis en oversikt over kilder til usikkerhet og vektede betydningen av disse [5.4.6.2]. I relasjon til den endelige klinisk-diagnostiske konklusjon kan den totale usikkerhet deles inn i preanalytisk usikkerhet, ren analyse- eller måleusikkerhet, og postanalytisk usikkerhet.

Det skiller mellom usikkerhet og feil. Kort kan forskjellen mellom disse uttrykkes som følger:

- Målefeil er forskjellen på målt verdi og sann verdi.
- Måleusikkerhet er et samlet uttrykk for spredning i underliggende parametre som analysen er basert på

#### Pre-analytisk usikkerhet

En rekke ulike pre-analytiske faktorer er av vesentlig betydning for om selve analysen skal kunne gi grunnlag for å konkludere med at pasienten faktisk er smittet med en aktuell mikroorganisme. Ikke sjelden representerer manglende kunnskap om og kontroll av disse faktorene, når prøven endelig når laboratoriet, den vesentligste kilde til usikkerhet knyttet til resultatet og tolkningen av dette. Særlig vil det ikke å ha påvist en mistenkt mikrobe, ikke kunne utelukke at den likevel er årsak til pasientens sykdom. Men også funn av potensielt patogen mikrobe kan være feil. Slike forhold skal ikke omtales i detalj her, men enkelte viktige faktorer i denne sammenheng skal listes opp:

- Valg av prøvemateriale
- Mengde prøvemateriale
- Valg av prøvetakingsmetode
- Prøvetakingsteknikk
- Kontaminasjonskontroll
- Tidspunkt for prøvetaking i relasjon til klinisk problemstilling
- Forsendelsesmåte, -tid, -atmosfære og –temperatur
- Antibiotikabehandling

#### Post-analytisk usikkerhet

Et endelig analysesvar kan være selvforklarende – vekst av *Neisseria meningitidis* i spinalvæsken taler overveiende sannsynlig for at pasienten har meningokokkmeningitt. Men ofte må et funn tolkes i relasjon til det totale epidemiologiske og kliniske bilde, øvrige laboratoriefunn og metodemessige begrensninger. En balansert eller ”riktig” tolkning er betinget i tilstrekkelig faglig kunnskap hos den som tolker. Tolkeren kan være laboratoriets fagfolk, men er som oftest rekvirenten. Til syvende og skal analyseresultat med tolkning formidles til pasienten slik at det oppfattes korrekt. Det er altså knyttet post-analytisk usikkerhet til ulike faktorer etter at selve analyseresultatet foreligger.

#### Måleusikkerhet

I Rapport fra Norsk Akkrediterings Sektorkomiteé Nr.: P9 ”Måleusikkerhet ved mikrobiologiske analyser” gjennomgås de fleste aspekter av usikkerhet og usikkerhetsberegning innen mikrobiologien. For kvantitative analyser konsentreres imidlertid teksten om usikkerhet ved påvisning av antall mikrober. Usikkerhet ved f.eks. påvisning av antistoff ved immunoassays er ikke omtalt. Det henvises i stedet til to andre internasjonale veiledninger (6,7). Heller ikke usikkerhet ved resistensbestemmelse er omtalt (resistensbestemmelse er ikke tema ved Bakteriologisk Strategimøte 2006).



### Kvantitative metoder

De fleste medisinske mikrobiologiske analyser som angis ved kvantitet er semikvantitative, enten ut fra tolkning av vekst (Rikelig, moderat, sparsomt) eller ved kvantitativ utsæd og semikvantitativ gruppering av oppvekstmengde (urin, BAL, CVK etc).

Innen bakteriologisk serologi benyttes oftest metoder som i natur er kvantitative (titerskala eller kontinuerlig OD-skala). Imidlertid fungerer også disse metodene nesten uten unntak som semikvantitative metoder når resultatene skal tolkes i klinisk sammenheng, hvor det gjennomgående viktigste brytningspunkt er cut-off verdien, det vil si måleverdien som skiller mellom positivt og negativt analyseresultat. Prinsipielt er det ingen forskjell i vurdering av usikkerhet mellom bakteriologisk og virologisk serologi. Kvalitetskontroll av serologiske analyser har vært behandlet i eget strategimøte i 2001 (8).

Totalusikkerheten omkring cut-off (eller andre kliniske relevante brytningspunkt) kan bestemmes ved repetitiv analyse av en kjent positiv kontroll med verdi nær brytningspunktet. Presisjonen uttrykkes i CV% (SD/snitt) og ”gråsonen” eller ”grenseområdet” kan uttrykkes ved Cut-off verdien  $\pm 2$  SD (95% konfidensintervall). For måleverdier i grenseområdet vil man ikke kunne si om analyseresultatet er positivt eller negativt.

Beregning av usikkerhet er også viktig ved kvantitativ sammenligning av to prøver av lik type tatt fra samme pasient ved ulike tidspunkt. Er den ene sikkert høyere eller lavere enn den andre? Kunnskap om presisjon i prøvenes aktuelle måleområder er avgjørende for å kunne trekke sikre konklusjoner i slik sammenheng.

Totalusikkerheten er en sum av ulike usikkerhetsbidrag knyttet til henholdsvis:

- 1) selve metoden (som igjen er en totalpakke med ulike usikkerhetsbidrag: forbehandling, pipettering, reagenser, temperatur etc.),
- 2) den anvendte uavhengige kontroll (referansematerialet) og
- 3) laboratoriets utførelse (operatør, temperatur, prøvebehandling etc.).

P9-rapporten anfører muligheten for å angi og estimere alle usikkerhetsbidrag, steg-for-steg, men ”stryke” de bidrag som åpenbart har liten innvirkning. Dette synes i medisinsk mikrobiologisk sammenheng ikke å være en praktisk tilnærming.

Måling av bakterieinnhold i vann og næringsmidler er aktuelle problemstillinger i næringsmiddelmikrobiologi, men ikke normalt i medisinsk mikrobiologi. Det henvises i denne forbindelse til NA Sektorkomiteé P9's rapport (3)

### Kvalitative og semikvantitative metoder

Enhver kvalitativ og semikvantitativ metode bør omfatte en usikkerhetsvurdering, som angir hvilke bidrag som anses å kunne ha påvirket resultatet i den ene eller andre retning. Vurderingen bør også fokusere på de usikkerhetsbidrag som anses ha størst betydning og angi disse. Målsetningen er å bringe de største kilder til usikkerhet under kontroll gjennom målrettede tiltak i laboratoriet. Eksempler på kilder til måleusikkerhet ved dyrkning av mikrober er (pre- og postanalytiske forhold kan være svært viktige, men er ikke tatt med her):

- variasjon i mediets ytelse
- Usikkerhet i pipetteringsvolum,
- Usikkerhet i utsædstetthet
- Usikkerhet i atmosfære
- Usikkerhet i inkuberingstemperatur
- Usikkerhet i inkuberingstid
- Variasjon i utførelse

- Variasjon i avlesning
- Variasjon i gramfarging
- Variasjon i reagensytelse (lotvariasjon, variasjon over tid)

Feil kan i mange tilfelle skyldes de samme faktorene, men er en følge av at metoden ikke er fulgt, for eksempel.

- feil medium benyttet
- feil ved mediers sammensetning og/eller produksjon
- kontaminering ved utsæd eller annen håndtering
- pipetteringsfeil
- feil atmosfære ved inkubering
- feil temperatur ved inkubering
- for kort inkuberingstid
- manglende opplæring i utførelse
- manglende harmonisert opplæring i avlesning
- kontaminasjon ved identifisering
- feil ved gramfarging
- utdaterte/svekkede reagenser og kit benyttet til identifikasjon
- for lave inokulat i ID-systemer

Dette er viktige elementer å gå igjennom dersom uavhengige kontroller eller SLP-resultater viser et analyseresultat som må karakteriseres som feil, det vil si ikke kan sies å omfattes av testesystemets iboende usikkerhet.

En rekke av usikkerhetsfaktorene vil være identiske for en rekke ulike dyrkningsmetoder. Det er mulig å utarbeide et generelt dokument som omhandler slike gjennomgående feilkilder som mulige årsaker til usikkerhet, og som den enkelte metode kan henvise til. Likevel bør det for den enkelte metode angis hva som vurderes å innebære de største risikoer for usikkerhet.

#### **2.5.4 Referanser**

1. Norsk standard NS-EN ISO/IEC 17025. Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriets kompetanse. November 2005.
2. NA dok. 48b. Medisinsk mikrobiologi. Norsk akkreditering. Januar 2004.
3. Rapport fra Norsk Akkrediterings sektorkomité nr.: 9. Måleusikkerhet ved mikrobiologiske analyser.
4. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Ed. Henry D. Isenberg. American Society of Microbiology. Washington D.C. (Last edition)
5. Manual of Clinical Microbiology. Ed. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. American Society of Microbiology. ASM Press, Washington D.C. 8<sup>th</sup> edition, 2003.
6. Introducing the Concept of Uncertainty of Measurement in Testing in Association with the Application of the Standard ISO/IEC 17025. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC): ILAC-G17:2002
7. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing. European cooperation for Accreditation (EA): EA-4/16:2003
8. Kvalitetskontroll av serologiske analyser. Ed. Jenum PA, Haukenes, Simonsen GS. Virologisk-serologisk strategimøte 1.11.2001.

## **2.6 Hvordan kvalitetssikres medier?**

Anne Grændsen, Norsk Akkreditering



## **INNHold**

<b>1</b>	<b>INNLEDNING .....</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>PRODUKSJON OG HÅNTERING AV DYRKNINGSMEDIER .....</b>	<b>37</b>
2.1	INNkjøp .....	37
2.2	HÅNTERING AV DEHYDRERTE DYRKNINGSMEDIER .....	38
2.3	PRODUKSJON AV DYRKNINGSMEDIER .....	38
2.3.1	Prosedyrer .....	38
2.3.2	Utstyr .....	38
2.4	HÅNTERING AV BRUKSKLARE DYRKNINGSMEDIER .....	39
<b>3</b>	<b>KONTROLLMETODER.....</b>	<b>40</b>
3.1	FYSIKALSK KONTROLLER .....	40
3.1.1	Visuell inspeksjon .....	40
3.1.2	pH-kontroll .....	40
3.1.3	Volumkontroll .....	41
3.2	MIKROBIOLOGISKE KONTROLLER .....	41
3.2.1	Generelt .....	41
3.2.2	Sterilkontroll .....	42
3.2.3	Kvalitativ kontroll .....	42
3.2.4	Kvantitativ/semikvantitativ kontroll .....	42
3.2.4.1	Faste agarmedier .....	42
3.2.4.1.1	Referansemateriale (referanseprøver) .....	43
3.2.4.1.2	Økometrisk metode .....	44
3.2.4.1.3	Modifisert strekmetode .....	46
3.2.4.1.4	Modifisert Miles og Misra metode .....	48
3.2.4.2	Flytende medier .....	49
<b>4</b>	<b>REFERANSER.....</b>	<b>51</b>
	<b>Vedlegg 1: Bruk av referansestammer (referansekulturer) .....</b>	<b>52</b>
	<b>Vedlegg 2: Mulige feil ved tillaging av mikrobiologiske dyrkningsmedier .....</b>	<b>53</b>
	<b>Vedlegg 3: Utvalgte MPN verdier og 95% konfidensintervall .....</b>	<b>55</b>

---

## **1 INNLEDNING**

I et mikrobiologisk laboratorium er mange analyser og prosedyrer avhengig ensartede dyrkningsmedier som gir reproduerbare resultater. Hundrevis av dyrkningsmedier er kommersielt tilgjengelige og i tillegg finnes mange flere som er beskrevet i litteraturen. For å kunne dokumentere at dyrkningsmediene har en tilfredstillende kvalitet må laboratoriene kunne vise til et etablert kvalitetskontrollprogram.

Denne veiledningen er et hjelpemiddel til fortolkning av kravene i NS-EN ISO/IEC 17025, og den bygger på veiledningsdokumenter som er utgitt av NMKL og ISO innenfor det næringsmiddelmikrobiologiske området.

Veilederen beskriver produksjon av dyrkningsmedier med tilhørende kontrollprogram og kontrollmetoder. Den omfatter både faste og flytende dyrkningsmedier innenfor følgende kategorier:

- Innkjøpte bruksklare dyrkningsmedier
- Dyrkningsmedier tillaget fra kommersielt tilgjengelige dehydrerte dyrkningsmedier
- Dyrkningsmedier tillaget fra enkeltkomponenter

## **2 PRODUKSJON OG HÅNDTERING AV DYRKNINGSMEDIER**

### **2.1 INNKJØP**

Dyrkningsmedier kan kjøpes inn bruksklare eller fremstilles fra enkeltkomponenter, gjennom blanding av dehydrerte komponenter eller gjennom rekonstituering av komplette dehydrerte medier. Ut fra kvalitetshensyn anbefales det å benytte komplette dehydrerte medier eller bruksklare medier. Kommersielle medieprodusentene har større muligheter til å minimere variasjonen mellom de ulike batchene enn et laboratorium som fremstiller dyrkningsmedier fra enkeltkomponenter. Det anbefales videre å kjøpe både bruksklare og dehydrerte dyrkningsmedier fra ISO-9000 godkjente produsenter. Laboratoriet må forsikre seg om at sertifiseringen dekker alle relevante aktiviteter som kan innvirke på kvaliteten av det ferdige produkt. Dette inkluderer også lagring og transport.

Fra leverandører av bruksklare og dehydrerte dyrkningsmedier skal følgende dokumentasjon kunne fremskaffes:

- Navn og produksjonskode på dyrkningsmedium
- Batchkode
- pH-verdi for partiet
- Lagringsinformasjon og holdbarhetstid
- Leverandørens program for kontroller, inkludert kvalitativ og kvantitativ kontroll
- Teknisk datablad som inkluderer området helse, miljø og sikkerhet
- Kvalitetskontrollsertifikat(er)

---

## **2.2 HÅNTERING AV DEHYDRERTE DYRKNINGSMEDIER**

Oppbevaring av dehydrerte dyrkningsmedier skal i hovedregel skje mørkt og tørt. Temperaturen skal ikke overstige 25°C. Kun de artikler som produsenten har merket med kjølevarer bør oppbevares i kjøleskap. Et dehydrert dyrkningsmedium som tas ofte ut fra kjøleskap vil absorbere vann på grunn av kondensdannelse dersom forpakningene ikke tempereres, og dette forkorter holdbarheten.

Dehydrerte dyrkningsmedier har begrenset holdbarhet. Produsentens holdbarhetsangivelse skal overholdes. Laboratoriet skal angi ankomstdag samt åpningsdag på den enkelte forpakning. Etter åpning av forpakningene kan holdbarheten påvirkes i negativ retning. Holdbarheten varierer beroende på dyrkningsmediets sammensetning og oppbevaringsforholdene. Ved bruk bør kvalitetsparametere som fargeendringer og klumpdannelser registreres. Dehydrerte dyrkningsmedier hvor synlige endringer er registrert, skal ikke anvendes.

Ved mottak skal laboratoriet også registrere eventuelle fysiske skader på forpakningene, og det skal kontrolleres at forpakningene er tilfredsstillende forseglet.

## **2.3 PRODUKSJON AV DYRKNINGSMEDIER**

### **2.3.1 Prosedyrer**

Ved tillaging av medier fra dehydrerte medier skal i hovedregel produsentens anvisning benyttes. Det kan forekomme forskjeller mellom beskrivelsen av tillaging av et ferdig medium i en metodestandard og i en produsents veiledning.

Ved fremstilling av medier kan det forekomme variasjoner i sluttproduktet på grunn av dårlig standardiserte tillagingsrutiner (innveiling, rekonstituering, varierende vannkvalitet, varmebehandling, pH-innstilling etc). Det er derfor viktig at laboratoriet har gode skriftlige prosedyrer som omfatter både tillagingsrutiner og kontrollmetoder. En rekke kjemikalier og dehydrerte pulvere som benyttes til medieproduksjon inneholder helseskadelige stoffer. Det er viktig at prosedyrene også inneholder opplysninger om nødvendig bruk av verne- og sikkerhetsutstyr.

### **2.3.2 Utstyr**

Alt utstyr (vekter, volumetrisk utstyr, mediepreparatorer, autoklaver og tørrsteriliseringsutstyr) som anvendes under tillaging må være tilfredsstillende kalibrert og kontrollert.

Glassutstyr skal være uskadd og rent. Det er videre ønskelig å benytte borsilikatglass fremfor sodaglass for å unngå alkalisk lekkasje fra glasset til løsningen/dyrkningsmediet.

Dersom metallbeholdere benyttes under fremstilling av dyrkningsmedier, skal disse være av rustfritt stål for å unngå å tilsette blant annet aluminium-ioner til mediet.

Til innveiling av dehydrerte dyrkningsmedier skal vektene ha en nøyaktighet på minimum  $\pm 0,1g$ . Når dyrkningsmedier fremstilles av enkeltkomponenter kan det være nødvendig å benytte vekter med høyere nøyaktighet.

Vannet som anvendes skal være destillert eller deionisert. Det skal være fritt for substanser som virker veksthemmende eller vekstfremmende. Ved behov for mellomlagring skal vannet fortrinnsvis lagres i beholdere av inert materiale (nøytralt glass, polyetylen og lignende) som også må være fri for hemmende substanser. Det anbefales å benytte nydestillert/nyrenset vann hvor pH ligger mellom 6,5 – 7,5. Det frarådes å benytte vann hvor pH er lavere enn 5,5. Lang henstandstid kan surgjøre vannet grunnet absorpsjon av atmosfærisk CO<sub>2</sub>. Springvann må ikke benyttes grunnet faren for innhold av tungmetaller som kan virke veksthemmende eller forårsake utfellingsproblemer. Det skal minimum føres ukentlig kontroll ledningsevnen til vann som benyttes til medieproduksjon. Ledningsevnen skal være mindre enn 25 µS/cm. Dersom vannet er produsert fra et ionebytte-anlegg eller mellomlagret i beholdere, bør bakterienivået kontrolleres minimum månedlig. Grenseverdi som ofte benyttes er 50 CFU/ml (dyrket ved 22±1°C).

Mediepreparatorer, autoklaver og tørrsteriliseringsutstyr må være utstyrt med tilfredsstillende temperaturregistreringsutstyr. I tillegg i skal temperatursyklusens effektivitet kontrolleres regelmessig med kjemiske eller biologiske indikatorer (sporettest). Autoklavtape og indikatorstrips gir et godt signal om at gods har gjennomgått en steriliseringsprosess, men det erstatter ikke kontroll med kjemiske og biologiske indikatorer.

## **2.4 HÅNTERING AV BRUKSKLARE DYRKNINGSMEDIER**

Alle ferdig partier med tillagd dyrkningsmedium skal være merket med holdbarhetsdato. Laboratoriets fastsatte holdbarhetstider skal kunne dokumenteres. Holdbarhetstider for kommersielt tilgjengelige, bruksklare dyrkningsmedier er normalt oppgitt fra leverandør. Holdbarhetstider for ferdig tillagde dyrkningsmedier varierer, og det er vanskelig å angi generelle tidsgrenser for oppbevaring. Opplysninger angående holdbarhetstider for dyrkningsmedier kan eksempelvis finnes i følgende publikasjoner:

- Metodestandarder
- Produsentmanualer fra leverandører av dehydrerte dyrkningsmedier
- ISO 7218
- ISO/TS 11133
- GLP – håndbøker (eks NMKL rapport nr 5, 1994)
- DIN – Taschenbuch, 222

Dersom laboratoriet ikke kan vise til publiserte data for holdbarhetstider, kan det være nødvendig å gjennomføre egne valideringer. Valideringene må inkludere kvantitative/semikvantitative gjenfinningsforsøk med kontrollstammer (punkt 3.2.4).

Under lagring må agarskåler være pakket på en slik måte at kontaminering og dehydrering unngås. Ferdig tillagde dyrkningsmedier bør i hovedregel oppbevares mørkt, kjølig (2-8°C). Visse dyrkningsmedier, for eksempel flytende medier med høyt galledaltinnhold, bør oppbevares ved høyere temperatur (10-15°C). For innkjøpte bruksklare dyrkningsmedier må leverandørens anviste lagringstemperatur benyttes. Påvirkning av sollys kan medføre både dannelse av peroksider som hemmer bakterieveksten og endringer i stabiliteten til indikatorfarger. Eksempler på medier som er ekstra ømfintlige er:

- Listeria-medier som inneholder acriflavin
- Mugg- og gjærmedier som inneholder Rose Bengal
- Medier for koliforme bakterier som inneholder basisk fuksin

---

Ved oppsmelting av dyrkningsmedier må dette skje på en mest mulig skånsom måte slik at overoppheting unngås. Videre skal dyrkningsmedier raskest mulig nedkjøles til  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Dyrkningsmediene bør ikke oppbevares ved denne temperaturen mer enn 4 timer etter nedkjøling.

### **3 KONTROLLMETODER**

Generelt skal alle data fra kontrollene som beskrives nedenfor dokumenteres i loggbok eller lignende.

For innkjøpte bruksklare dyrkningsmedier må laboratoriet foreta en mottakskontroll som minimum inkluderer:

- Kontroll av emballasje (eksempelvis fysiske skader og merking vedrørende lagringsforhold)
- Inspeksjon av medfølgende analysesertifikater
- Vurdering av eventuelle kontroller som laboratoriet må foreta

Hvert parti med dyrkningsmedium som fremstilles i eget laboratorium skal kontrolleres. Minimum 1 % av enhetene som produseres tas tilfeldig ut til kontroll for samtlige av de parametere som er beskrevet nedenfor. Ved produksjon av store partier skal prøvene tas ut på ulike stede, og som et minimum i partiets første og siste del.

Dersom kontrollene viser uventede resultater, skal det startes en feilsøkningsprosess. Gjennomgå alle faktorer som kan ha hatt innvirkning på det fremstilte dyrkningsmediet (innveining, pH, autoklivering, tilsetning av supplementer etc). Hjelp til feilsøking finnes i vedlegg 2 (Mulige feil ved tillaging av medier til mikrobiologisk bruk). Partier som ikke tilfredsstillter de krav som laboratoriet har fastsatt skal umiddelbart kasseres.

#### **3.1 FYSIKALSK KONTROLLER**

##### **3.1.1 Visuell inspeksjon**

Farge, homogenitet og overflate inspiseres visuelt. Gelstyrken kan kontrolleres ved et lett trykk mot agaroverflaten med en podeøse eller glasstav og dokumenteres med normal/ikke normal. Dersom uregelmessigheter påvises, forkastes hele partiet.

##### **3.1.2 pH-kontroll**

pH skal likeledes kontrolleres i hvert parti som fremstilles i eget laboratorium. En liten mengde medium tas ut etter autoklivering og pH måles når dyrkningsmediets temperatur har stabilisert seg ved  $20-25^{\circ}\text{C}$ . Enkelte leverandører av dehydrert medier anbefaler en henstandstid på 12-18 timer før pH-målingen. I praksis har det vist seg at en henstandstid på 30 minutter til 2 timer er tilstrekkelig (upubliserede data fra Eläinlääkintä- ja elintarvikelaitoksen (EELA) og Norsk Matanalyse). Både innstikks- og overflateelektroder kan benyttes til målingene.

Dersom ikke annet er spesifisert i metoden som anvendes, tillates et maksimalt et avvik på 0,2 pH-enheter fra den oppgitte verdi.



---

Etterjustering av pH foretas i hovedregel kun på dyrkningsmedier som laboratoriet har fremstilt fra enkeltkomponenter. Det er enklest å justere pH i dyrkningsmedier fremstilt av enkeltkomponenter før sterilisering. Selv om pH-målinger gjennomføres før autoklaving, skal mediet alltid pH-kontrolleres etter sterilisering. Dersom dyrkningsmedier fremstilles fra kommersielt tilgjengelig dehydrerte pulvere og vann/utstyr har en tilfredsstillende kvalitet, skal pH normalt ikke justeres. Dersom pH må justeres, foretas dette aseptisk med 1N NaOH eller 1N HCl.

### **3.1.3 Volumkontroll**

Volumkontroll skal utføres rutinemessig i de tilfeller hvor det er kritisk at volumet er korrekt. Dette gjelder eksempelvis fortynningsvæsker i flasker og rør og visse dyrkningsmedier som benyttes til kontroll av antibiotikarester. På grunn av avdamping under autoklaving må flasker og rør fylles med det aktuelle væskevolumet pluss den mengden væske som forventes å avdampe.

Kontrollen utføres ved at et gitt antall flasker eller rør med væske tas ut før autoklaving og merkes og veies. Disse autoklaveres så sammen med øvrige flasker og rør og veies igjen etter autoklaving. Sluttvolumet beregnes. Det må tas hensyn til væskens tetthet ved beregning av volumet (volum er lik vekt dividert med tetthet). Fysiologisk saltvann med 1 % pepton veier for eksempel 1,01 g/ml.

For flasker og rør som dispensereres etter autoklaving foretas kontrollen i prinsippet på samme måte. Innveilingen foretas først med tomme flasker og rør og deretter en kontrollveies de etter dispensering.

Normalt aksepteres det et maksimalt avvik på 2 %.

## **3.2 MIKROBIOLOGISKE KONTROLLER**

### **3.2.1 Generelt**

Til kvalitativ og kvantitativ mikrobiologisk kontroll trenger laboratoriet et sett med kontrollstammer. I akkrediterte laboratorier må kontrollstammene være sporbare til anerkjente kultursamlinger. Kontrollstammene må oppbevares og håndteres på en slik måte at de ikke endrer egenskaper (vedlegg 1).

Det tilstrekkelig å gjennomføre kontrollen med én kontrollstamme når det gjelder ikke selektive dyrkningsmedier. For selektive og indikative dyrkningsmedier skal det minimum benyttes en positiv og en negativ kontrollstamme. Den positive stammen skal være robust og vise typiske egenskaper. Den negative stammen bør vise middels til dårlig vekst, eventuelt ingen vekst ved sterkt selektive dyrkningsmedier. For selektive og indikative dyrkningsmedier kan det også være aktuelt å supplere med mer sensitive kontrollstammer og/eller biokjemisk utypiske kontrollstammer som viser annerledes fermenterings- eller fluorescensreaksjoner. Dette gjelder spesielt hvis det er innbygget flere selektive/indikative prinsipper i dyrkningsmediet. The International Committee for Food Microbiology and Hygiene's Working Party on Culture Media (WPCM) har foreslått en validert samling av kontrollstammer til kvalitativ og kvantitativ kontroll av dyrkningsmedier (Se Corry et al under avsnitt 5, referanser).

### **3.2.2 Sterilkontroll**

Petriskåler, flasker eller rør med dyrkningsmedium steriltestes ved å inkubere det ved den temperatur-/tidskombinasjonen som normalt benyttes for det gjeldende dyrkningsmedium.

Grenseverdier for av antall kontaminerte enheter som aksepteres i et parti må etableres for hver type medium eller konsistent gruppe av medier. Grenseverdier i forbindelse med sterilkontroller angis ofte som %.

### **3.2.3 Kvalitativ kontroll**

Kvalitativ kontroll skal utføres på hvert parti med dyrkningsmedium som produseres i eget laboratorium. Kontrollen kan utføres i forbindelse produksjonen eller i analyseserien.

Skåler tas tilfeldig ut fra partiet som tidligere beskrevet, og kontrollstammene strykes ut på disse. Mengde inokulum og utstryksteknikk standardiseres. Velg den inkuberingstid og temperatur som laboratoriet normalt benytter som standard metode. Etter inkubering beskrives:

- Stammenes vekst – god/tett, middels, dårlig
- Kolonimorfologi – utseende og størrelse
- Eventuelle reaksjoner i mediet – fargeskift, utfellinger, haemolyse og lignende

### **3.2.4 Kvantitativ/semikvantitativ kontroll**

Kvantitativ/semikvantitativ kontroll skal minst utføres etter følgende kriterier:

- **Bruksklare medier fra ISO-9000 godkjente produsenter og dyrkningsmedier fremstilt i eget laboratorium fra dehydrerte pulvere fra ISO-9000 godkjente produsenter:**  
Kontroll foretas når ny type dyrkningsmedium introduseres i laboratoriet og når man skifter produsent.
- **Bruksklare medier fra produsenter som ikke er ISO-9000 godkjente produsenter og dyrkningsmedier fremstilt i eget laboratorium fra dehydrerte pulvere fra produsenter som ikke er ISO-9000 godkjente:**  
Hver nye batch (én definert produksjon med det samme produksjonsnummeret) med medier/pulvere som mottas i laboratoriet kontrolleres.
- **Dyrkningsmedier fremstilt fra enkeltkomponenter:**  
Hvert parti medium som fremstilles i laboratoriet kontrolleres.

#### **3.2.4.1 Faste agarmedier**

Denne prosedyren beskriver fire metoder for gjennomføring av kvantitativ/semikvantitativ kontroll:

1. Bruk av referansmateriale
2. Økometrisk metode
3. Modifisert strekmetode
4. Modifisert Miles og Misra metode

Den økometriske metoden og den modifiserte strekmetoden er semikvantitative. Begge metodene er følsomme for operatørforskjeller. To laboranter som utfører analysene parallelt kan få forskjellig resultat. Det er derfor viktig at laboratoriet finner en egen standardisert rutine for utførelsen. Lite eller ikke trent personell bør ikke utføre kontrollene med disse metodene i laboratoriet.

Følgende punkter er generelle for alle metodene:

- Utføres den kvantitative/semikvantitative kontrollen på et helt nytt medium, bør kontrollen også omfatte et ikke selektivt medium som referansemedium. Trypton Soya Agar eller blodagar kan benyttes til dette formål.
- Referansemedium (ikke selektiv agar) må minimum benyttes de tre første gangen et dyrkningsmedium kontrolleres. Senere kan resultatene kontrolleres mot tidligere data, men vær da oppmerksom på faren å overestimere gjenfinningsprosenten (AGI eller PR)
- Foretas kontrollen av en kjent type medium, men fra en ny produsent, benyttes det tidligere kjente dyrkningsmedium som referansemedium.
- På kontrolltidspunktet må alderen på dyrkningsmediene være lik fra gang til gang. Med alderen på dyrkningsmediet menes den tid det er gått fra fremstilling av enheten til kontrollen utføres.
- Til alle fire metodene benyttes det petriskåler med en diameter på 9 cm.
- Kontrollstammene skal være ferske, ”over natt kultur” på TSA eller blodagar.

#### **3.2.4.1.1 Referansemateriale (referanseprøver)**

Referansemateriale eller referanseprøver som inneholder kjente mengder av mikroorganismer kan benyttes til kvantitativ kontroll. Det finnes i dag flere leverandører i markedet. Det leveres både sertifisert og ikke sertifisert materiale, og det leveres både som ren- og blandingskulturer.

Sertifikatene/brukerveiledninger som leveres med referansemateriale eller referanseprøver bør minimum inneholde følgende opplysninger:

- Produsentens navn og adresse
- Informasjon om emballasje
- Fysisk form
- Behandling av materialet
- Oppbevaring og holdbarhet
- Måleresultater med tilknyttet måleusikkerhet
- Informasjon om usikkerhetsberegninger
- Opplysninger om sertifiseringsprosessen
- Metoder som er anvendt under sertifiseringen
- Antall aksepterte målinger for beregning av sertifisert verdi og usikkerhet

#### **Prosedyre:**

1. Lag dyrkningsmediet som skal undersøkes i henhold til laboratoriets resept og slå det opp i skåler når det er passe temperert. La skålene stivne og overflaten tørke.
2. Referansemateriale eller referanseprøver slemmes opp som angitt i veiledning fra leverandør. Fortynninger velges ut fra den oppgitte bakteriekonsentrasjonen til materialet som benyttes. Så ut 0,1 ml av de valgte fortynninger og spre kulturen på overflaten med en steril glass- eller plaststav.
3. Velg den inkuberingstid og temperatur som laboratoriet normalt benytter som standard metode.

#### **Avlesning og tolkning av resultater:**

Etter inkubering registreres både antall kolonier og kolonimorfologien.

Det er viktig at det utarbeides egne grenseverdier på grunnlag av de opplysninger som følger med materialet og de resultater som laboratoriet oppnår. Det er viktig at resultatene følges opp med kontrollkort eller lignende slik at avvik raskt kan avdekkes.

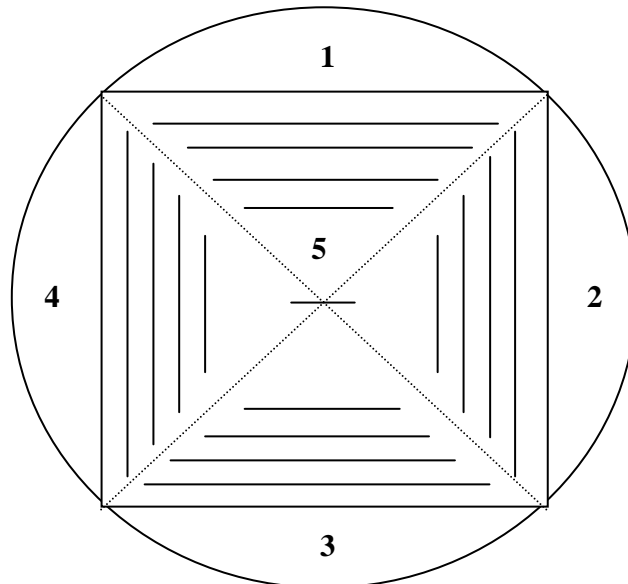
#### **3.2.4.1.2 Økometrisk metode**

Vurdering av produktivitet er basert på en absolutt vekstindeks (AGI = Absolute Growth Index).

##### **Prosedyre:**

1. Inokulere 10 ml ikke selektiv buljong med kontrollstammen(e). Trypton Soya Buljong eller Brain Heart Infusion Buljong kan anvendes. Inkuber stammene ved  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  i  $24\pm 3$  timer eller under andre inkuberingsforhold om nødvendig.
2. Juster celletallet til  $10^7 - 10^8$  CFU/ml (tilsvarende turbiditet standarden McFarland 0,5). Alternativt lages fortynnes "over natt" kulturen 1:10 for robuste bakterier.
3. Lag dyrkingsmediet som skal undersøkes i henhold til laboratoriets resept og slå det opp i skåler når det er passe temperert. La skålene stivne og overflaten tørke.
4. Buljong kulturen med kontrollstammene sås ut med  $1\mu\text{l}$  podenål. Bare løkken på podenålen dyppes i kulturen. Vær påpasselig med at den fylles helt med kultur. Fjern overskuddsvæsken ved å berøre podenålen forsiktig mot innsiden av kulturrøret 3 ganger.
5. Stryk ut tilfeldig utvalgte skåler som vist på figur 1. Skålene deles i fire kvadranter. Det trekkes 5 parallelle linjer i den angitte rekkefølge i hver kvadrant. Avslutningsvis trekkes 1 linje gjennom sentrum. Podenålen skal ikke skiftes (eller flamberes) mellom utstrykningene. Ved utstrykningen skal vinkelen mellom podenål og agaroverflate være ca 20-30 grader.
6. Velg den inkuberingsstid og temperatur som laboratoriet normalt benytter som standard metode.

Figur 1: Økometrisk metode



**Avlesning av resultater:**

Etter inkubering bestemmes vekstintensiteten og kolonimorfologien. Dersom det er vekst langs en hel linje, i en kvadrant gis det et vektall lik 0,2. Ingen vekst på en linje gis et vektall lik 0. Vekst i sentrumslinjen gir et vektall lik 1.

Vekttallene summeres opp for de 21 linjene. Maksimum poengsum for hele skålen er 5. Poengsummen er lik ”den absolutte vekstindeksen”. Vekstindeksen dokumenters sammen med annen relevant informasjon som kolonimorfologi (typisk/utypisk) og lignende.

**Tolkning av resultater:**

Generelt godkjennes dyrkningsmediet år AGI er innenfor følgende grenser:

Ikke selektive substrater	$AGI \geq 3,0$ <sup>1)</sup>
Selektive substrater	
Positive stammer	$AGI \geq 2,5$ <sup>2)</sup>
Negative stammer	$AGI \leq 2,0$ <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 80% av stammene skal ikke ha  $AGI < 4,0$

<sup>2)</sup> 80% av stammene skal ikke ha  $AGI < 3,0$

<sup>3)</sup> 80% av stammene skal ikke ha  $AGI > 1,0$

---

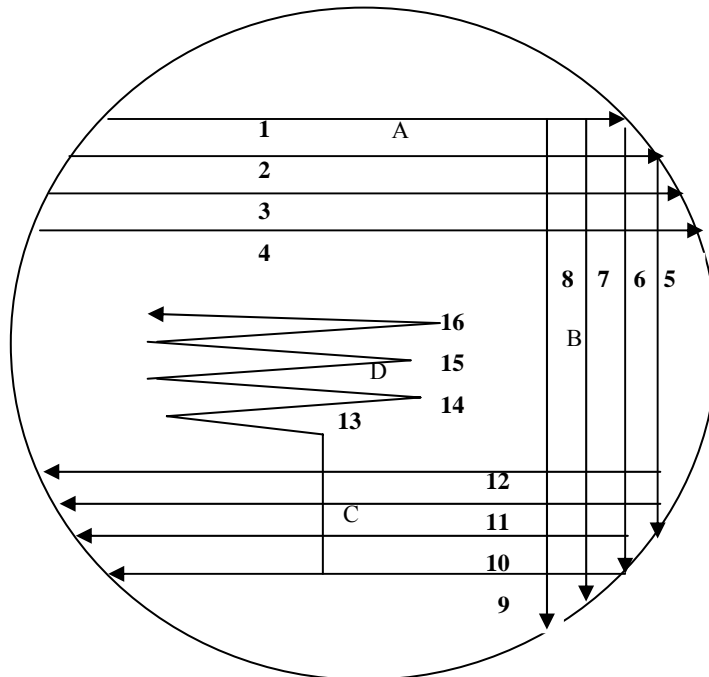
### **3.2.4.1.3 Modifisert strekmetode**

Vurdering av produktivitet og selektivitet er basert på en absolutt vekstindeks. Utstryksteknikken ligner den som benyttes til ordinær utsæd av bakteriemateriale. Mengden og tettheten på kontrollkulturene må være identisk hver gang kontrollen foretas.

#### **Prosedyre:**

1. Inokuleres 10 ml ikke selektiv buljong med kontrollstammen(e). Trypton Soya Buljong eller Brain Heart Infusion Buljong kan anvendes. Inokulum skal være lite. For bakterier som produserer små kolonier benyttes en koloni som inokulum. I de tilfellene bakteriene produserer større kolonier benyttes bare en del av en koloni som inokulum. Inkuber stammene ved  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  i 5 timer eller under andre inkuberingsforhold om nødvendig.
2. Juster celletallet til  $10^7 - 10^8$  CFU/ml (tilsvarer turbiditet standarden McFarland 0,5). Alternativt lages fortynnes "over natt" kulturen 1:10 for robuste bakterier.
3. Lag dyrkningsmediet som skal undersøkes i henhold til laboratoriets resept og slå det opp i skåler når det er passe temperert. La skålene stivne og overflaten tørke.
4. Bland forsiktig buljong kulturen med kontrollstammene og så den ut med 1µl podenål. Bare løkken på podenålen dyppes i kulturen. Vær påpasselig med at den fylles helt med kultur. Fjern overskuddsvæsken ved å berøre podenålens flate side forsiktig mot innsiden av kulturrøret.
5. Stryk ut tilfeldig utvalgte skåler som vist på figur 2. Trekk 4 parallelle linjer i sektor A. Linjene trekkes med en avstand på 0,5 cm. Bytt podenål (eller flamber) mellom sektor A og B. Den nye podenålen benyttes ti å stryke ut de gjenværende sektorene. Sektor B og C strykes ut som sektor A. Sektor D strykes ut som en sammenhengende linje.
6. Velg den inkuberingstid og temperatur som laboratoriet normalt benytter som standard metode.

Figur 2: Modifisert strekmetode



**Avlesning av resultater:**

Etter inkubering bestemmes vekstintensiteten og kolonimorfologien. Dersom det er vekst langs en hel linje, gis det et vektall lik 1. Likeledes gir vekst kun langs halve linjen et vektall lik 0,5 og ingen vekst et vektall lik 0.

Vekttallene summeres opp for de 16 strekene. Maksimum poengsum for hele skålen er 16. Poengsummen er lik "den absolutte vekstindeksen". Vekstindeksen dokumenteres sammen med annen relevant informasjon som kolonimorfologi (typisk/utypisk) og lignende.

**Tolkning av resultatene:**

Vekstindeksen til en positiv kontrollstamme skal normalt være minst 6 eller høyere. Siden metoden er semikvantitativ, vil vekstindeksen kun være indikativ og vil variere i forhold til dyrkningsmediet som kontrolleres. Vekstindeksen sammenlignes med tidligere data for å kontrollere at variasjonen ikke er for stor. Variasjonen for et medium kan bestemmes når laboratoriet har samlet tilstrekkelig antall vekstindekser. Kontrollstammens kolonimorfologi må også være typiske for mediet som undersøkes.

Når en negativ kontrollstamme benyttes på selektive dyrkningsmedier bør veksten være delvis eller helt inhibert.

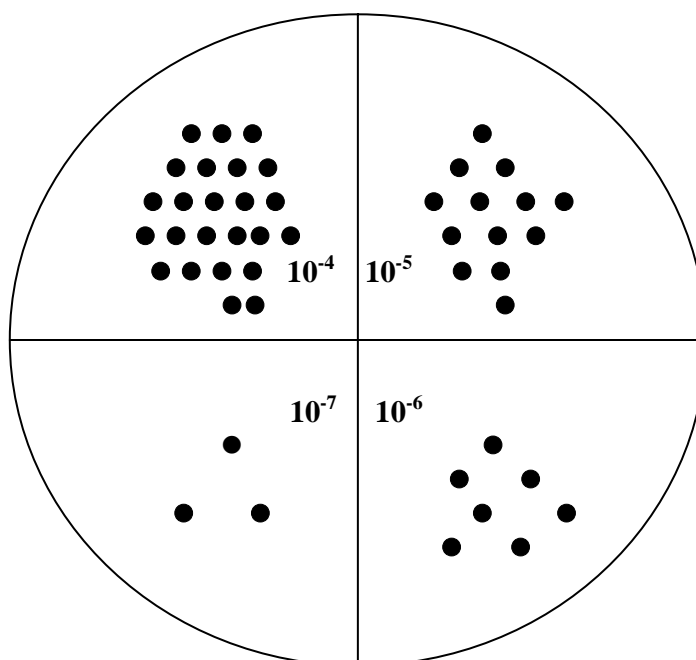
#### 3.2.4.1.4 Modifisert Miles og Misra metode

Fortynninger av kulturer med kontrollstammer sås ut på de medier som skal kontrolleres. Etter inkubering telles koloniene og produktivitetsforholdet (PR) bestemmes.

##### Prosedyre:

1. Inokuler 10 ml ikke selektiv buljong med kontrollstammen(e). Trypton Soya Buljong eller Brain Heart Infusion Buljong kan anvendes. Inkuber stammene ved  $37\pm 1^\circ\text{C}$  i  $18\pm 2$  timer eller under andre inkuberingsforhold om nødvendig.
2. Juster celledetallet til  $10^7 - 10^8$  CFU/ml (tilsvarer turbiditet standarden McFarland 0,5). Alternativt lages fortynnes "over natt" kulturen 1:10 for robuste bakterier.
3. Lag dyrkningsmediet som skal undersøkes i henhold til laboratoriets resept og slå det opp i skåler når det er passe temperert. La skålene stivne og overflaten tørke.
4. Bland buljongkulturen med kontrollstammen og lag en tifolds fortynningsrekke til  $10^{-8}$ .
5. Så ut tilfeldig utvalgte skåler som vist i figur 3. Så ut minimum to duplikater fra kontrollstamme. Til utsæden benyttes en kalibrert dråpepipette. Det dryppes en dråpe i hver av kvadrantene. Hvis man starter med den høyeste fortynningen, kan samme pipette benyttes til alle fire dråpene. Spre dråpen med en steril podenål eller steril glass- eller plaststav.
6. Velg den inkuberingstid og temperatur som laboratoriet normalt benytter som standard metode.

Figur 3: Modifisert Miles og Misra





**Avlesning av resultater:**

Etter inkubering bestemmes antall kolonier og kolonimorfologien. Velg den kvadranten som har den laveste fortyningen som gir lett avlesbare kolonier. Produktivitetsforholdet beregnes etter følgende formel:  $PR = N_s/N_0$  hvor  $N_0$  er gjennomsnittet av telte kolonier på referansemediet, og  $N_s$  er gjennomsnittet av telte kolonier på mediet som skal undersøkes. Antall kolonier og produktivitetsforholdet dokumenteres sammen med annen relevant informasjon som kolonimorfologi (typisk/utypisk) og lignende.

**Tolkning av resultater:**

Generelt godkjennes dyrkningsmediet år PR er innenfor følgende grenser:

Ikke selektive substrater	$PR \geq 0,7$
Selektive substrater	
Positive stammer	$PR \geq 0,5$ <sup>1)</sup>
Negative stammer	$PR \leq 0,00001$ <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 80% av stammene skal ikke ha  $PR < 0,3$

<sup>2)</sup> 80% av stammene skal ikke ha  $PR > 0,0001$

**3.2.4.2 Flytende medier**

Flytende dyrkningsmedier kan analyseres med noe forskjellige fortyningsmetoder. Man kan enten bestemme MPN-verdien eller den høyeste fortyningen som gir vekst i dyrkningsmediet som skal undersøkes og sammenligne dette med referansemediet.

Som for faste agarmedier, er det kun nødvendig å ta med referansemedium når en ny type buljong lages eller eventuelt ved skifte av medieleverandør. Senere sammenlignes resultatene mot tidligere verdier for samme dyrkningsmedium.

**Prosedyre:**

1. Inokulere 10 ml ikke selektiv buljong med kontrollstammen(e). Trypton Soya Buljong eller Brain Heart Infusion Buljong kan anvendes. Inkuber stammene ved  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  i  $18 \pm 2$  timer eller under andre inkuberingsforhold om nødvendig.
2. Lag mediet som skal undersøkes i henhold til laboratoriets resept, dispenser på 9 ml rør og la det bli passe temperert.
3. Bland buljongkulturen med kontrollstammen og lag en tifolds fortyningsrekke til  $10^{-12}$ .
4. Fra hver fortyning av kontrollstammene inokuleres 5 rør av mediet som skal undersøkes og 5 rør med referansemedium. Volumet som skal tilsettes er 1 ml.
5. Velg den inkuberingsstid og temperatur som laboratoriet normalt benytter som standard metode.

Mikrotitterplater kan benyttes istedenfor rør. Fortynningen utføres da direkte i dyrkningsmediet etter at det er dispensert på mikrotitterplaten. 150  $\mu\text{l}$  dyrkningsmedium pr brønn er tilstrekkelig for å oppnå vekst.

**Avlesning av resultater:**

Etter inkubering bestemmes antall rør med vekst. MPN-verdien bestemmes (vedlegg 3). Produktivitetsforholdet beregnes etter følgende formel:  $PR = N_S / N_0$  hvor  $N_0$  er MPN-verdien for referansemediet, og  $N_S$  er MPN-verdien for dyrkningsmediet som skal undersøkes. Antall positive rør og produktivitetsforholdet dokumenteres sammen med annen relevant informasjon som fargeomslag i buljong (typisk/utypisk) og lignende.

Dersom MPN-verdien ikke benyttes, kan man notere den høyeste fortynningen som gir vekst og beregne PR ut fra dette.

**Tolkning av resultater:**

Godkjenning av mediet utføres etter de samme PR-grensene som er oppgitt under metoden for modifisert Miles og Misra.

---

#### **4 REFERANSER**

AOAC International, 1998

Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 8<sup>th</sup> Edition

Australian Society for Microbiology; Culture Media Special Interest Group, August 2004

Guidelines for Assuring Quality of Food and Water Microbiological Culture Media

Corry J.E.L., Curtis G.D.W. and Baird R.M.,

Progress in Industrial Microbiology, Vol. 34 (1995)

Culture media for Food Microbiology

EA-04/10, 2002

Accreditation for Microbiological Laboratories

ISO/IEC 17025, 2005

Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriers kompetanse.

ISO/DIS 7218, 2005

Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations

ISO/TS 11133

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media

- Part 1, 2000: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- Part 2, 2003: Practical guidelines on performance testing of culture media

Merck, Darmstadt, 1990

Mikrobiologisk håndbok

NATA (National Association of Testing Authorities), Australia

Technical Note no 4: Guidelines for the Quality Management of Microbiological Media

Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler, 1994

Rapport nr.5: Håndledning i kvalitetssikring för mikrobiologiska laboratorier

Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler, 1998

Rapport nr.19: Harmonisering af mikrobiologiske metoder

Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler, 2001

Prosedyre nr.10: Kontroll av mikrobiologiske dyrkningsmedier

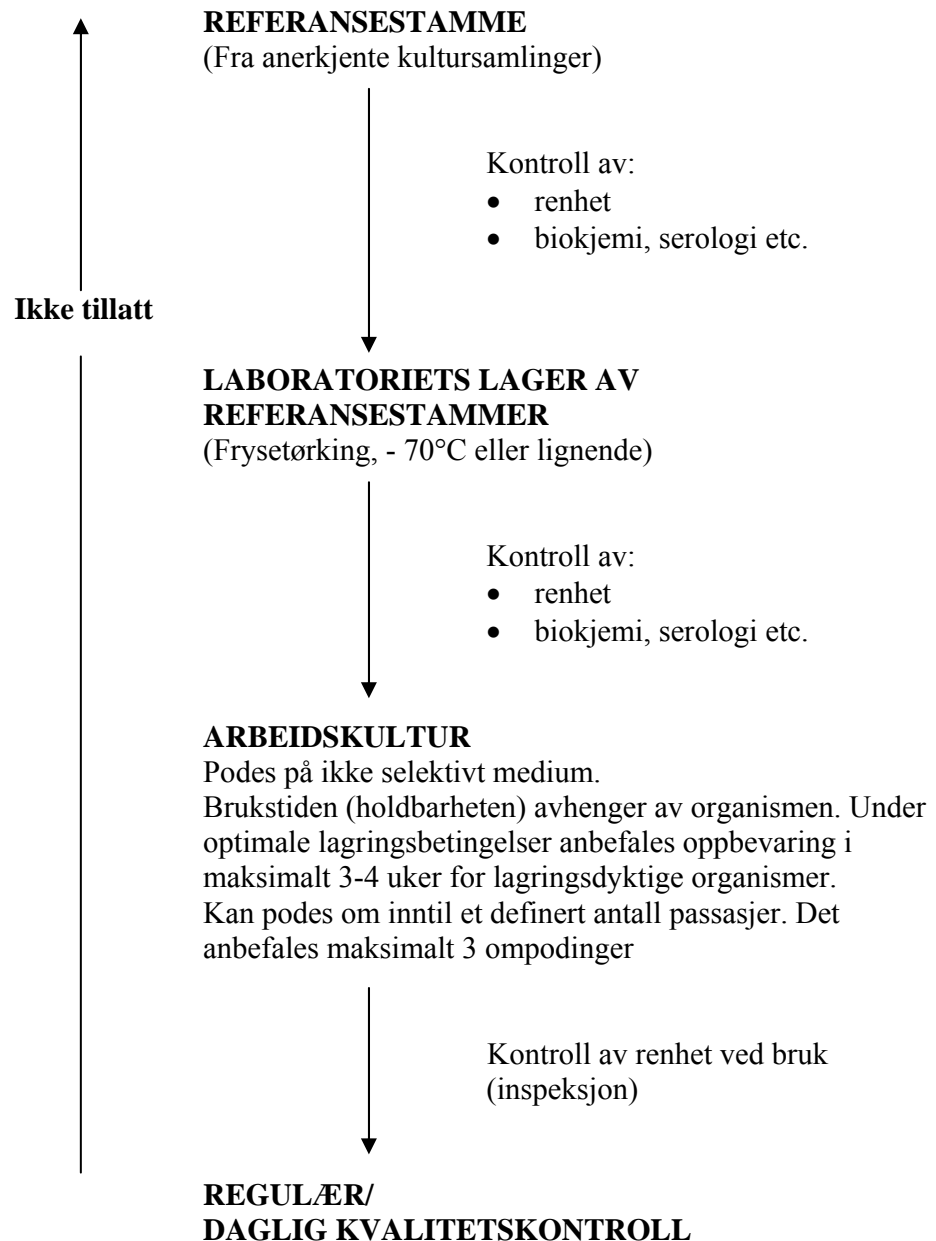
Tuula Johansson, Modified striking method in performance testing of microbiological culture media – experiences of National Veterinary and Food Research Institute (EELA).

The Finnish Veterinary Journal, 101:700-703

Veterinærdirektoratet i Danmark, 1991

Håndbog for mikrobiologiske laboratorier,

**VEDLEGG 1: Bruk av referansestammer (referansekulturer)**



Laboratoriet skal ha skriftlige prosedyrer for håndtering og oppbevaring av referansestammer. Laboratoriet bør i tillegg kunne dokumentere alle ledd i prosessen ved hjelp av loggbok eller lignende.

---

**VEDLEGG 2: Mulige feil ved tillaging av mikrobiologiske dyrkningsmedier**

**1. Klumper i dehydrert medium**

- Dehydrert medium er for gammelt
- Dehydrert medium er feil lagret (utsatt for fukt)
- Pakningen har ikke vært ordentlig lukket
- Pakningen har vært for lenge åpen

**2. pH avviker fra angitt verdi**

- Dehydrert medium er for gammelt
- Pakningen har ikke vært ordentlig lukket
- Feil innveining av dehydrert medium eller andre ingredienser
- Dårlig vannkvalitet
- Kjemisk forurensing
- Mediet har blitt utsatt for feil varmebehandling
- pH er målt ved for høy temperatur
- pH-meteret er feil kalibrert

**3. Mediet har utfellinger**

- Dårlig vannkvalitet
- Feil innveining av dehydrert medium eller andre ingredienser
- Feil pH i mediet
- Skittent utstyr ved tillaging
- Mediet har blitt utsatt for feil varmebehandling

**4. Mediet stivner ved for høy temperatur**

- Feil innveining av dehydrert medium eller andre ingredienser
- Endring av agarkvalitet

**5. Mediet har for lav gelstyrke**

- Feil innveining av dehydrert medium eller andre ingredienser
- Endring av agarkvalitet
- Ufullstendig oppløst dehydrert medium/agar
- Mediet har blitt utsatt for feil varmebehandling
- Feil pH i mediet (lav pH medfører syrehydrolyse av mediet)
- Mediet er ikke omrørt før tapping

**6. Feil farge**

- Feil innveining av dehydrert medium eller andre ingredienser
- Feil pH i mediet
- Mediet har blitt utsatt for feil varmebehandling
- Skittent utstyr ved tillaging
- Dårlig vannkvalitet

**7. Mediet er kontaminert**

- Mediet har blitt utsatt for feil (for lav) varmebehandling

- Kontaminering etter tillaging (dårlig luftkvalitet, skittent utstyr ved tapping, dårlig sterilteknikk ved tapping, kontaminerte petriskåler)

**8. For dårlig vekst**

- Veksthemmende stoffer fra vann eller utstyr som benyttes ved tillaging
- Feil innveiling av dehydrert medium eller andre ingredienser
- Feil pH i mediet
- Mediet har blitt utsatt for feil varmebehandling
- Agartemperaturen er for høy ved innstøping av kulturen
- Det ferdige mediet er for gammelt
- Det ferdige mediet har vært lagret under feil betingelser
- Feil dyrkningsbetingelser

**9. For kraftig vekst**

- Mediet har blitt utsatt for feil varmebehandling
- Feil innveiling av dehydrert medium eller andre ingredienser
- Det ferdige mediet har vært lagret under feil betingelser
- Feil dyrkningsbetingelser

**10. Koloniene flyter ut**

- Agaroverflaten er for fuktig
- For stor væskemengde er benyttet ved utsæd
- Mediet har blitt utsatt for feil varmebehandling

**11. Atypisk vekst**

- Dehydrert medium er for gammelt
- Feil tillaging av mediet
- Det ferdige mediet er for gammelt
- Det ferdige mediet har vært lagret under feil betingelser
- Feil dyrkningsbetingelser

**VEDLEGG 3: Utvalgte MPN verdier og 95% konfidensintervall**

Positive rør			MPN/g	95% konfidensgrenser	
1.0	0.1	0.01		Nedre	Øvre
0	0	0	<2,0	--	6,8
0	0	1	1,8	0,09	6,8
0	1	0	1,8	0,09	6,9
0	1	1	3,6	0,7	10,0
0	2	0	3,7	0,7	10,0
0	2	1	5,5	1,8	15,0
0	3	0	5,6	1,8	15,0
1	0	0	2,0	0,1	10,0
1	0	1	4,0	0,7	10,0
1	0	2	6,0	1,8	15,0
1	1	0	4,0	0,7	12,0
1	1	1	6,1	1,8	15,0
1	1	2	8,1	3,4	22,0
1	2	0	6,1	1,8	15,0
1	2	1	8,2	3,4	22,0
1	3	0	8,3	3,4	22,0
1	3	1	10,0	3,5	22,0
1	4	0	11,0	3,5	22,0
2	0	0	4,5	0,79	15,0
2	0	1	6,8	1,8	15,0
2	0	2	9,1	3,4	22,0
2	1	0	6,8	1,9	17,0
2	1	1	9,2	3,4	22,0
2	1	2	12,0	4,1	26,0
2	2	0	9,3	3,4	22,0
2	2	1	12,0	4,1	26,0
2	2	2	14,0	5,9	36,0
2	3	0	12	4,1	26,0
2	3	1	14,0	5,9	36,0
2	4	0	15,0	5,9	36,0
3	0	0	7,8	2,1	22,0
3	0	1	11,0	3,5	23,0
3	0	2	13,0	5,6	35,0
3	1	0	11,0	3,5	26,0
3	1	1	14,0	5,6	36,0
3	1	2	17,0	6,0	36,0
3	2	0	14,0	5,7	36,0
3	2	1	17,0	6,8	40,0
3	2	2	20,0	6,8	40,0
3	3	0	17,0	6,8	40,0
3	3	1	21,0	6,8	40,0
3	3	2	24,0	9,8	70,0
3	4	0	21,0	6,8	40,0
3	4	1	24,0	9,8	70,0
3	5	0	25,0	9,8	70,0
4	0	0	13,0	4,1	35,0

Positive rør			MPN/g	95% konfidensgrenser	
1.0	0.1	0.01		Nedre	Øvre
4	0	1	17,0	5,9	36,0
4	0	2	21,0	6,8	40,0
4	0	3	25,0	9,8	70,0
4	1	0	17,0	6,0	40,0
4	1	1	21,0	6,8	42,0
4	1	2	26,0	9,8	70,0
4	1	3	31,0	10,0	70,0
4	2	0	22,0	6,8	50,0
4	2	1	26,0	9,8	70,0
4	2	2	32,0	10,0	70,0
4	2	3	38,0	14,0	100,0
4	3	0	27,0	9,9	70,0
4	3	1	33,0	10,0	70,0
4	3	2	39,0	14,0	100,0
4	4	0	34,0	14,0	100,0
4	4	1	40,0	14,0	100,0
4	4	2	47,0	15,0	120,0
4	5	0	41,0	14,0	100,0
4	5	1	48,0	15,0	120,0
5	0	0	23,0	6,8	70,0
5	0	1	31,0	10,0	70,0
5	0	2	43,0	14,0	100,0
5	0	3	58,0	22,0	150,0
5	1	0	33,0	10,0	100,0
5	1	1	46,0	14,0	120,0
5	1	2	63,0	22,0	150,0
5	1	3	84,0	34,0	220,0
5	2	0	49,0	15,0	150,0
5	2	1	70,0	22,0	170,0
5	2	2	94,0	34,0	230,0
5	2	3	120,0	36,0	250,0
5	2	4	150,0	58,0	400,0
5	3	0	79,0	22,0	220,0
5	3	1	110,0	34,0	250,0
5	3	2	140,0	52,0	400,0
5	3	3	180,0	70,0	400,0
5	3	4	210,0	70,0	400,0
5	4	0	130,0	36,0	400,0
5	4	1	170,0	58,0	400,0
5	4	2	220,0	70,0	440,0
5	4	3	280,0	100,0	710,0
5	4	4	350,0	100,0	710,0
5	4	5	430,0	150,0	1.100,0
5	5	0	240,0	70,0	710,0
5	5	1	350,0	100,0	1.100,0
5	5	2	540,0	150,0	1.700,0
5	5	3	920,0	220,0	2.600,0
5	5	4	1.600,0	400,0	4.600,0
5	5	5	>1.600,0	700,0	--



## 2.7 Bakterielt referansemateriale

Jørgen Lassen og Trine-Lise Stavnes, Nasjonalt folkehelseinstitutt

### 2.7.1 Formål

Oppbevaring og vedlikehold av bakterielt referansemateriell som benyttes for å kontrollere og validere mikrobiologisk analysearbeid.

### 2.7.2 Definisjoner:

- ”Referansestammer”* er stammer som spores tilbake til en anerkjent nasjonal eller internasjonal stammebank
- ”Referansekultur”* representerer 1.gangs utsæd av en referansestamme.
- ”Arbeidskultur”* er en subkultur av mikroorganismer som er avledet av en referansekultur og som har en definert holdbarhetstid. Normalt benyttes arbeidskulturer i det daglige arbeidet.
- ”Brukskultur”* er en kultur avledet av en arbeidskultur. Dette er kulturer som kastes etter hver gangs bruk og som anvendes dersom man er avhengig av fersk kultur.

### 2.7.3 Krav til sporbarhet

For alle referansestammer skal det sikres sporbarhet tilbake til en nasjonal eller internasjonal stammebank registrert i ECCO (European Culture Collections Organization) eller som er registrert i WDCM (World Data Center on Microorganisms) og som utgir ajourførte stamme-kataloger. Vanligst anvendte internasjonale stammebanker er CCUG i Gøteborg, NCTC, England og ATCC i USA. Også stammer levert av WHO’s referanselaboratorier og andre aksepterte internasjonale ”spisskompetanselaboratorier” med stammebankfunksjon kan anvendes (for eksempel for tarmpatogene bakterier Institut Pasteur/Paris og HPA/Colindale, London)

NA bør utfordres til å vurdere aksept også av godt karakteriserte stammer fra akkrediterte nasjonale referanselaboratorier som referansestammer ved primærdiagnostiske laboratorier.

### 2.7.4 Valg av referansestammer

Referansestammer må være veldefinerte og egnet til formålet.

Det kan være gunstig å velge referansestammer som normalt forekommer sjelden eller aldri i laboratoriets rutinemateriale, alternativt stammer med en lett påvisbar spesifikk markør. Dette med tanke på lettest mulig å kunne identifisere en eventuell kontaminasjon med slike stammer. NB! for å redusere antall nødvendige referansestammer, er det en stor fordel å velge stammer som kan anvendes til ulike formål!

### 2.7.5 Anvendelsesområde

Anvendelsesområder og –metoder for referansekulturer (arbeids- og brukskulturer) skal fremgå av de enkelte metodebeskrivelsene. NA Dok nr. 48 b anfører bl.a. følgende anvendelsesområder:

- Sammenligne og validere metoder
- Verifisere resultatets riktighet i det enkelte analyseoppsett og over tid (kvalitetskontroll)

- Verifisere korrekt gjennomføring av standardmetoder
- Validere og kontrollere mikrobiologiske dyrkningsmedier
- Overvåke korrigerende tiltak

### 2.7.6 Prosedyre (Organisering)

Det skal finnes skriftlige prosedyrer for registrering, mottak, oppbevaring, bruk, vedlikehold og kontroll av referansestammer, referansekulturer og arbeidskulturer.

#### Mottak og verifisering

Referansestammer mottas normalt som frysetørret materiale, på stikkagar eller skråagar. Ved mottak av referansestamme subkultiveres denne normalt bare én gang for å etablere et lager av *referansekulturer* i laboratoriet.

Subkultivering skjer på et eller flere egnede medier. Minst et av mediene må være egnet for å vurdere hvorvidt stammen foreligger i renkultur (for store Gram-negative staver f. eks. en laktoseagar eller en differentialsål).

Inkubering skjer i henhold til vanlig rutine for den aktuelle bakteriearten. Etter oppvekst vurderes hvorvidt stammen foreligger i renkultur og identiteten verifiseres i henhold til laboratoriets rutinemetoder.

#### Registrering og dokumentasjon

Laboratoriet skal ha skriftlige prosedyrer for oppbevaring og bruk av referansekulturer og arbeidskulturer.

##### Datablad

For hver referansestamme skal det etableres et eget datablad hvor bl.a. følgende fremgår: Leverandørens originale stammenr., eget stammenr., bakterieart, når den er mottatt, hvordan identiteten er verifisert, hvordan og hvor den er oppbevart og i hvor mange ”eksemplarer”, evt. også anvendelsesområde.

##### Driftsjournal

I tilslutning til databladet skal det også for hver stamme foreligge en ”driftsjournal” hvor bruken av stammen fremgår (herunder når og av hvem arbeidskulturer etableres og hvor det holdes regnskap med lagerbeholdningen av referansekulturer).

#### Oppbevaring

Oppbevaring skjer vanligvis i form av frysetørreampuller eller dypfryst, da vanligvis ved -70°C. Det anbefales å anvende et system som tillater en å etablere et reelt og rimelig stort referansekulturlager, f. eks. ved å anvende et visst antall ”cryorør” med ”Microbank-kuler” (f.eks. 3-5 rør à 25 kuler), eventuelt et visst antall cryorør med egnet medium (f.eks. Greaves medium for *Campylobacter*).

Rørene plasseres i frysebokser i henhold til ”adressene” som er anført på databladet. Det anbefales å plassere minst et rør lett tilgjengelig for løpende bruk, de øvrige kan eventuelt plasseres ”på vent” i et fjernlager. Uansett vil det være gunstig at rørene er plassert i ulike fryser, som ikke er koblet på samme elektriske kurs, i tilfelle tekniske problemer skulle føre til at materialet i en fryser ødelegges.

## Anvendelse

Etablering av primære og sekundære arbeidskulturer og evt. brukskultur.

### 1. Primær arbeidskultur:

Fra Referansekulturlageret såes stammen ut på egnete rutinemedier.

Hvis lageret er ”microbank-kuler” plukker man med steril nål eller steril plastøse én kule fra røret.

Utsæd skjer på egnet medium og røret settes umiddelbart tilbake på sin opprinnelige adresse i fryseren.

Hvis det er frysetørreampuller skal åpning av ampullen skje i henhold til skrevet prosedyre.

Alt arbeid med ”Microbank-kuler” og frysetørreampuller skal foregå i sikkerhetsbenk kl.II.

Utsæd skjer på faste og eventuelt flytende medier som er egnet for den aktuelle bakteriearten. Man skal i prinsippet *ikke* anvende selektive medier, men der bør likevel anvendes minst ett medium som tillater vurdering av om kulturen foreligger i renkultur. Stammens identitet verifiseres i henhold til rutinemetoder.

Arbeidskulturen oppbevares i kjøleskap og kan anvendes over en definert tidsperiode.

### 2. Sekundære arbeidskulturer

Når den definerte bruksperioden for en arbeidskultur er utløpt, kan det på samme måte lages ytterligere arbeidskulturer fra den primære arbeidskulturen et definert antall ganger.

Når det er laget arbeidskulturer i henhold til det definerte antall ganger, kastes kulturen og det etableres en ny primær arbeidskultur fra referansekulturlageret.

Hvor lenge en arbeidskultur kan anvendes og hvor mange sekundærkulturer det kan lages av den, skal være tydelig angitt i laboratoriets prosedyrer. Holdbarhetsperioden vil være avhengig av hvor raskt stammene vokser og hvor ”robuste” de er. (Holdbarhetstiden for en mykobakterie kan være atskillig lenger enn for en lite kravfull Gram-negativ stavbakterie som på sin side kan være lenger enn for en kravfull Gram-negativ stavbakterie).

Med hensyn til oppbevaringstid og –temperatur, anbefales det som regel å følge instruksjoner gitt av leverandøren av referansestammen. Dersom referanse- eller arbeidskulturer unntaksvis oppbevares utover anbefalt tid må laboratoriet dokumentere at bruksegenskapene for det aktuelle anvendelsesområdet ikke er endret. Ved Referanselaboratoriet for tarmpatogene bakterier er holdbarheten for en arbeidskultur av Salmonella vanligvis satt til 4 uker. Fra en primær arbeidskultur er det her vanligvis tillatt å lage tre sekundære arbeidskulturer

### 3. Brukskultur

Hvis det er behov for fersk kultur, kan en ”brukskultur” etableres ved ordinær subkultur fra en arbeidskultur på medier som egnet for bakteriearten og som tillater vurdering av om den foreligger i renkultur. En slik kultur kastes etter hver gangs bruk. Denne type brukskulturer er bl.a. nødvendig ved den løpende kontroll av resistensbestemmelse.

## Vedlikehold:

Alle ledd i prosessen skal være dokumentert. Det skal foreligge skriftlige rutiner for alle prosedyrer som på sin side skal ivareta at stammene er levedyktige og at det ikke skjer morfologiske, biokjemiske, serologiske eller genetiske endringer som kan påvirke bruksegenskapene som er aktuelle for anvendelsesområdet.

**Holdbarhet:**

For stammer innkjøpt fra internasjonale stammebanker skal holdbarhet fremgå av leverandørens produktbeskrivelse. For øvrig er det i prinsippet laboratoriet selv som avgjør holdbarheten som i praksis er avhengig av bl.a. oppbevaringsmåte, laboratorienes egne kontrollmuligheter og bruksområde.

Ved lagring ved  $-70^{\circ}\text{C}$  eller lavere aksepteres en holdbarhet for de fleste species på minst 5 år, for frysetørrete stammer enda lenger (vanligvis minst 10 år). For species hvor det kan foreligge særskilte problemer knyttet til frysing og oppbevaring (f. eks. *Campylobacter*) kan holdbarheten være kortere.

Det forutsettes at stammene før de tas i bruk kontrolleres med henblikk på de egenskaper det skal kontrolleres for.

Generelt gjelder at man kan være noe mer "raus" med henblikk på holdbarhet når det gjelder enkle kontroller som f. eks. mediekontroller enn når det gjelder kontroller av mer sofistikerte analyser.

**Begrensninger**

Det er ikke tillatt å etablere et nytt lager fra en allerede lagret kultur

**Referanse:**

1. NA Dokument 48b. Medisinsk mikrobiologi. Veiledning for medisinsk-mikrobiologiske laboratorier. Norsk Akkreditering 2002
2. Norsk Standard NS EN ISO/IEC 17025



## 2.8 Kvalitetskontroll av blodkultur

Fredrik Müller, Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF

### 2.8.1 Bakgrunn

I Norge benyttes kommersielle, automatiske blodkultursystemer ved alle mikrobiologiske avdelinger (1). De aktuelle systemene omfatter BACTEC fra Becton-Dickinson Microbiology Systems og BacT/ALERT fra bioMerieux.

En rekke aspekter knyttet til indikasjon, prøvetaking, inkubering og viderearbeid med positive kulturer er omtalt i rapport fra Strategimøte nr 16; 2002, Blodkultur (1).

Forhold knyttet til prøvetaking og transport er av stor betydning for å oppnå god kvalitet ved anvendelse av blodkultur. Vesentlige faktorer er bl.a. korrekt desinfeksjon før prøvetaking, optimalt blodvolum og riktig transport. Disse momentene ble gjennomgått i strategimøtet om blodkultur (1).

Dette innlegget tar opp kvalitetskontroll av blodkultur med vekt på momenter som ikke ble omtalt i strategimøtet fra 2002, spesielt rutiner for kontroll av blodkulturflasker og skap.

### 2.8.2 Kontroll av blodkulturflasker

### 2.8.3 Hvordan kontrollerer produsentene blodkulturflaskene?

Produsentene kvalitetskontrollerer hver batch av sine blodkulturflasker i henhold til standard fra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2).

To eksempler fra hhv. Becton-Dickinson og bioMerieux illustrerer hvordan denne kvalitetskontrollen utføres:

#### **Bactec Plus Aerobic/F medium (3):**

- pH 7,0-7,4
- Steriltest OK
- Undertrykk i flasker: trekker > 8 ml
- Tilfredsstillende vekst av:
  - Alcaligenes faecalis* ATCC 8750
  - Candida albicans* ATCC 18804
  - Escherichia coli* ATCC 25922
  - Haemophilus influenzae* ATCC 19418
  - Neisseria meningitidis* ATCC 13090
  - Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
  - Staphylococcus aureus* ATCC 25923
  - Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305
  - Streptococcus pyogenes* ATCC 19615
  
- ”Antimicrobial removal”: Tilfredsstillende

#### **BacT/ALERT FA medium (4):**

- pH 7,4-7,7
- Steriltest OK
- Tilfredsstillende vekst av:
  - Candida albicans* ATCC 14053

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212  
*Escherichia coli* ATCC 25922  
*Micrococcus luteus* ATCC 4698  
*Neisseria meningitidis* ATCC 13090  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
*Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637  
*Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305  
*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

#### **2.8.4 Laboratoriets kontroll av blodkulturflasker - hva anbefaler produsentene?**

Becton Dickinson (5):

“The laboratory should test each shipment of media for performance through the use of a positive and a negative vial test. The positive vial should be inoculated with 1.0 ml of a 0.5 McFarland standard of either *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* prepared from a fresh 18-24 h culture. This vial and an uninoculated vial should be logged into the instrument and tested. The inoculated vial should be detected as positive by the instrument within 72 hours. The negative control vial should remain negative throughout the entire testing protocol.”

BioMerieux (6):

“If desired, individual laboratories can perform quality control testing of BacT/Alert culture bottles: Use one or more organisms from ”Certificate of Conformance”” (som angitt ovenfor). Prepare from fresh 18-24 h culture: 0.5 McFarland should be diluted stepwise in tryptic soy broth. Add 0.4 ml (1000 cfu/ml) to each bottle + 1-2 ml fresh anticoagulated blood. Bottles with aerobic organisms should be positive within 48 h, while bottles with anaerobic organisms should be positive within 72 h.”

#### **2.8.5 Anbefalinger fra akkrediteringsorganer**

Det svenske akkrediteringsorganet SWEDAC angir følgende (7):

1. Leveransekontroll av blodkulturflasker utføres ved hver levering av blodkulturflasker. Kontrollen skal utgjøres av minst en aerob og en anaerob stamme med inokulat 50 cfu/blodkulturflaske.
2. Systemkontroll utføres en gang pr måned med minst en aerob og en anaerob stamme.
3. Temperaturkontroll uavhengig av instrumentets angivelse utføres daglig. Sporbar temperaturkalibrering av blodkulturinstrument utføres årlig.
4. Sporbar kalibrering av fotometri eller tilsvarende i instrumentet utføres årlig.

Ved norske akkrediterte laboratorier utføres regelmessig kvalitetskontroll av blodkultur ved anvendelse av et utvalg av ATCC-stammer som inokuleres i flaskene. Det er satt krav til vekst (positiv kultur) innen nærmere definerte tidsperioder.

#### **2.8.6 Forslag til anbefaling**

Kontroll av blodkulturflasker har to formål. For det første at hver batch av blodkulturflasker oppfyller definerte krav (leveransekontroll), for det annet at blodkultursystemet (instrument og flasker) oppfyller definerte krav (systemkontroll).

Det anbefales månedlig testing med referansestammer slik at begge formål dekkes.

Et minimumsoppsett bør bestå av en aerob og en anaerob bakteriestamme samt en gjærsoppstamme. Egnete stammer kan velges blant de som er anvendt av produsentene, evt fra (8). For enkelte stammers vedkommende kan det være nødvendig med tilsats av blod i flasken. Stammene suspenderes i isotont saltvann (kravfulle stammer i buljong) fra en fersk 18-24 timers kultur til 0,5 McF. Fra denne suspensjonen lages det fortyninger i saltvann (kravfulle stammer i buljong) til ca 100 cfu/ml. Det tilsettes 1 ml (ca 100 cfu) til blodkulturflasken. Merk at i bakteriesuspensjoner svarer 0,5 McF til ca  $1,5 \cdot 10^8$  cfu/ml (9), mens i gjærsoppsuspensjoner svarer 0,5 McF til ca  $10^6$  gjærceller/ml (10).

Vekst av aerobe bakterier i blodkulturflaskene forventes innen 48 timer. Vekst av anaerobe bakterier forventes innen 72 timer (11). Vekst av gjærsopp forventes innen 5 døgn.

Det gjøres utsæd på skål fra positive flasker for å kontrollere at det er renkultur i flaskene (obs mulighet for kontaminering under tillaging av inokulat).

Merk at laboratorier som anvender flere blodkulturskap må teste alle skapene.

Ved manglende vekst innen definert tid gjentas den aktuelle kontrollen. Dersom feil gjentar seg må dette avviksbehandles med feilsøking av blodkultursystemet.

Når det gjelder blodkulturinstrument, bør det gjennomføres forebyggende vedlikehold i henhold til produsentens retningslinjer. Det anbefales daglige temperaturmålinger med regelmessig kontroll av termometer mot kalibrert kontrolltermometer. I tillegg testes lamper og alarmsystemer.

## 2.8.7 Referanser

1. Blodkultur. Rapport fra strategimøte nr 16, 2002. ISSN: 0804-8444 ([http://www.legeforeningen.no/asset/24684/2/24684\\_2.pdf](http://www.legeforeningen.no/asset/24684/2/24684_2.pdf))
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Document M22-A3; Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard - Third Edition. 2004.
3. Quality Control certificate; BACTEC Plus Aerobic/F medium. Becton Dickinson, 2005.
4. Certificate of conformance; BacT/ALERT FA. BioMerieux, 2002.
5. Automated blood culture BACTEC 9240/9120/9050; Policy and Procedure. Becton Dickinson, 1998.
6. BacT/ALERT Operator Manual. BioMerieux.
7. Kontroll av blododling. SWEDAC Doc 01:51, 2005. ([http://www.swedac.se/\\_c125684900304be1.nsf/webDoc/MOLD-4Q8AMT/\\$File/DOC\\_01\\_51.pdf](http://www.swedac.se/_c125684900304be1.nsf/webDoc/MOLD-4Q8AMT/$File/DOC_01_51.pdf))
8. Jenkins SG. Quality Assurance, Quality Control, Laboratory records, and Water Quality. Section 14 i Clinical Microbiology Procedures Handbook, red. Isenberg HD, 2004.
9. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, 2003.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A2. NCCLS, Wayne, Pa; 2002.
11. Smyth R. Quality Control in Blood Culture. Innlegg på bioMerieux brukermøte, Göteborg, 2004.



## 2.9 Kommersielle ID-systemer. Hjelpetester. Hurtigtester.

Yngvar Tveten, A/S Telelab, Skien

Mikrobiologisk diagnostikk er fortsatt avhengig av isolering og identifikasjon av relevante mikroorganismer. I dette arbeidet benyttes tester hvis funksjon må kontrolleres i et kvalitetssystem.

I henhold til akkrediteringskrav er dette beskrevet i NS-EN ISO 17025<sup>1</sup> under p. 4.6 Kjøp av tjenester og materiell. P. 4.6.2 lyder som følger: Laboratoriet skal sikre at kjøpt materiell, reagenser og forbruksmateriell som innvirker på kvaliteten av prøvinger og/eller kalibreringer, ikke brukes før de er kontrollert .....

I den foreslåtte forskrift<sup>2</sup> om krav til medisinsk laboratorie- og radiologivirksomhet heter det bl.a. i p. 5 b at tjenester som ytes er faglig forsvarlig og i samsvar med gjeldende standarder, lover og regler, i p.5 f at de metoder som benyttes er riktige i forhold til den undersøkelse/diagnose/behandling som skal utføres og har den nødvendige nøyaktighet og presisjon og i p.5 h angis det at laboratoriet skal ha et dokumentert kvalitetssystem som er utarbeidet og i bruk for tjenestene som ytes.

Identifikasjonstestene benyttes som nøkkelmetoder (koagulase) eller som en del av et mindre eller større identifikasjonssystem utviklet lokalt eller kommersielt tilgjengelig (API, Crystal). Krav til kommersielle tester (IVD-direktiv, CE-merking) pålegger produsentene å fremlegge dokumentasjon vedrørende testenes egenskaper og holdbarhet, noe som reduserer brukernes behov for kvalitetskontroll. Laboratoriene kan, imidlertid, ikke anta at produksjonskontroll er tilstrekkelig slik at videre kontroll er unødvendig. I pakningsvedleggene til de fleste kommersielle identifikasjonstester finnes det anbefalinger om bruk av kontrollstammer til intern kvalitetskontroll. Av hensyn til laboratorienes stammebank (håndtering og utgifter) bør man forsøke å samordne bruk av referansestammer (medieproduksjonskontroll, kontroll av resistensbestemmelse og kontroll av identifikasjonstester).

Kritiske kontrollpunkter i kvalitetskontrollen av identifikasjonstester er<sup>3</sup>

- Referansestammer håndtert etter gjeldende anbefalinger<sup>4</sup>
- Renkultur av aktuelle stamme dyrket på et ikke-selektivt medium som sikrer at de aktuelle fenotypiske karakteristika uttrykkes
- Kvalitetskontrollerte medier og reagenser
- Kontroll av testbetingelser, inkubasjonsatmosfære, temperatur og tid
- Bruk av positive og negative kontrollstammer. Kan være vanskelig å oppfylle, men bør benyttes på nøkkeltester

Kvalitetskontrollen må være beskrevet i en prosedyre.

### 2.9.1 Kvalitetskontroll

(praktisk gjennomføring)

Alle diagnostiske lapper/tabletter, hurtigtester og identifikasjonsskit kontrolleres ved mottak av ny lot. Et lagersystem må være tilgjengelig hvor det fremgår hvilke lot som er godkjent og hvor

også holdbarhet er angitt. Hvis ikke kontrollen utføres ved mottak, bør det finnes en oversikt over lot som må kontrolleres før de tas i bruk.

For diagnostiske lapper/tabletter (lapper som medfører et endelig svar) har NA krevd at de testes ukentlig. Eksempler:

Navn metode	Stamme ATCC/CCUG-nr	Avlesning mm-sone	Frekvens	
			v/ny batch	Ukentlig
<b>Optochin</b>	<i>S. pneumoniae</i> 6305/33774  <i>S. mutans</i> 25175/11877	I CO <sub>2</sub> : > 18 Sensitiv  I CO <sub>2</sub> : < 16 Resistent		<b>x</b>
<b>Novobiocin 5 µg</b>	<i>S. epidermidis</i> 12228/21989  <i>S. saprophyticus</i> 15305	> 16 (Sensitiv)  ≤ 16 (Resistent)		<b>x</b>
<b>Bacitracin 40 µg</b>	<i>H. influenzae</i> 35039  <i>S. pneumonia</i> 6305/33774	Resistent  Sensitiv	<b>x</b>	
<b>Bacitracin low</b>	<i>S. pyogenes</i> 19615/33061	> 15 sensitiv		<b>x</b>

ID-tester/hurtigtester kontrolleres ved mottak, og det anbefales at det benyttes referansestammer som er anbefalt av produsent. Eksempler:

Kit	Stamme	ATCC/CCUG-nr	Avlesning	Frekvens
<b>Monostaph</b>	<i>S. aureus</i>	29213/15915	aggl. +	ny batch
	<i>S. epidermidis</i>	12228/21989	aggl. -	
<b>Agglutinasjon av streptokokker</b>	<i>S. pyogenes</i>	19615/33061	gr. A	ny batch
<b>C.difficile toxin A og B</b>	<i>C. difficile</i> Pos og neg ktr i kit	9018	positive pos/neg	ny batch
<b>Legionella ag i urin</b>	Egenprodusert antigen Ekstra kit kontroller tilgjengelig		Positiv +/-	ny batch

Strips			
API/ATB/BBL Crystal	Stamme	ATCC/CCUG-nr	Frekvens
ID Rapid 32 Strep	<i>S. equi ssp. equi</i>	33398/23255	ny batch
ID Rapid 32 E	<i>K. oxytoca</i>	43863/29298	"
ID Rapid 32 A	<i>C. sordellii</i>	9714/9284	"
ID 32 E	<i>K. ornithiolytica</i>	31898	"
ID Staph	<i>S. aureus</i>	29213/15915	"
BBL Crystal enteric	<i>K. pneumoniae</i>	33495	"
	<i>E. coli</i>	25922/17620	
BBL Crystal N/H	<i>M. catarrhalis</i>	25240/33778	"
BBL Crystal Anaerobic	<i>B. fragilis</i>	25285/38583	"

For kit som benyttes sjelden (PBP2a agglutinasjon, antigenest for spinalvæske, malaria hurtigtest) anses det mest hensiktsmessig å benytte referansestammer ved hvert oppsett. Eksempler:

Kit	Stamme ATCC/CCUG-nr	Avlesning	Frekvens
Welcogene bacterial antigen kit	<i>N. meningitidis</i> 13090/3270	positiv	hvert oppsett
	<i>S. pneumoniae</i> 6305/33774	positiv	hvert oppsett
	<i>H. influenzae</i> 49247/26214	positiv	hvert oppsett
	kit-kontroller	positiv negativ	hvert oppsett
Slidex MRSA Detection	<i>S. aureus</i> 43300/41586	Aggl. i test latex, ÷ aggl. i ktr. latex. ÷ aggl. i noen av reagensene	hvert oppsett
	<i>S. aureus</i> 29213/15915		
Malaria hurtigtest	Egenprodusert antigen	positiv	hvert oppsett

## 2.9.2 Referanser

1. Norsk standard NS-EN ISO/IEC 17025. Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriens kompetanse. Mai 2000.
2. Forskrift om krav til medisinsk laboratorie- og radiologivirksomhet. Helse- og omsorgsdepartementet desember 2004.
3. NA dok. 48b. Medisinsk mikrobiologi. Norsk akkreditering. Januar 2004.
4. Quality control of bacterial characterization tests. Kapittel 11 i Quality Assurance. Principles and practice in the microbiology laboratory. JJS Snell, DFJ Brown and C Roberts (red.). PHLS 1999.

## 2.10 Nukleinsyreamplifikasjonsteknikker - Interne prosesskontroller og uavhengige kontroller

Tom Øystein Jonassen. Mikrobiologisk avdeling, Ullevål universitetssykehus

### Bakgrunn

Nukleinsyreamplifikasjonstester (NAAT) blir i stadig større utstrekning brukt i mikrobiologisk diagnostikk. I NAAT blir nukleinsyre (NA) fra bestemte mikrober kopiert av NA polymeraser. Spesifisiteten i kopieringen bestemmes av sekvensen til oligonukleotid primere.

Kopieringsreaksjonen gjentas flere ganger, og kopiene brukes som original i senere kopieringer. I prinsippet skal bare NA fra det aktuelle smittestoffet kopieres, men i praksis må alltid kopiert NA identifiseres. Blant NAAT kan nevnes PCR, SDA, NASBA og TMA.

Innen bakteriologi brukes NAAT i hovedsak til kvalitativ påvisning av smittestoff i prøver. Dette dokumentet vil derfor ikke behandle kvantifiseringsstandarder og standarder for genotyping. Med kontroller menes i dette dokumentet: Reagenser for kontroll av avvikende sensitivitet og spesifisitet under bruk av NAAT i kvalitativ mikrobiologisk diagnostikk.

Som for andre metoder må en NAAT til bruk i diagnostikk valideres før den tas i bruk. Under valideringen sørges det for at metoden har tilfredsstillende sensitivitet, spesifisitet, selektivitet, reproduserbarhet og robusthet. Siden ingen metoder er 100% reproduserbare/robuste, er det behov for prosesskontroller som skal avdekke feil i resultatene. NAAT er meget sensitive og meget selektive metoder, men av flere grunner kan NAAT være mindre robuste enn andre diagnostiske metoder. Det er derfor spesielt viktig med prosesskontroller ved bruk av NAAT. Metodens iboende (kroniske) begrensning i sensitivitet og spesifisitet (både analytisk og diagnostisk) kan ikke forbedres vha. kontroller.

Det er få generelle og konkrete anbefalinger for bruk av kontroller i NAAT tilgjengelig. Antall og type kontroller som kreves, må bestemmes individuelt for hver metode. Det er tre typer kontroller som er aktuelle:

- **Positiv kontroll**  
er en kjent standard av det aktuelle smittestoffet som behandles parallelt med prøvene i hvert oppsett. Positiv kontroll sjekker primært for avvik i analytisk sensitivitet i oppsettet, men brukes også i enkelte metoder som standard for amplifikasjonsprodukt molekylvekt eller smeltetemperatur av amplifikasjonsprodukt eller amplifikasjonsprodukt/probe-hybrid (som spesifisitetskontroll).
- **Negativ kontroll**  
er et materiale som skal imitere en negativ prøve og behandles parallelt med prøvene i hvert oppsett. Negativ kontroll sjekker for avvik i analytisk spesifisitet i oppsettet.
- **Internkontroller**  
er kontroll-NA i hver enkelt prøve, som amplifiseres parallelt med smittestoff NA og sjekker for avvik i analytisk sensitivitet for hver enkelt prøve.

Antall og type kontroller som kreves i en metode, bestemmes ved å sette opp:

### **Risikobudsjett**

som er en funksjon av:

- Sannsynligheten for ulike typer feil (hvor reproduserbar og robust metoden er).
- Konsekvensene av eventuelle feil (Falsk negativ og falsk positiv kan ha ulik alvorlighetsgrad. Hvis falsk negativ er mest alvorlig, kan det være viktigere med flere positive kontroller enn mange negative kontroller.)
- Ulike kontrollers ev. innvirkning på metodens "ytelse" (Ulike kontrollers potensiale for å avsløre feil. På den annen side: Internkontroll NA kan konkurrere ut amplifikasjon av smittestoff NA. Altfor mange kontroller kan gjøre oppsettene så store at det kan øke risikoen for manuelle feil).

### **Ressursbudsjett**

som tar hensyn til:

- økonomi og arbeidsinnsats.

## **Momenter til risikobudsjettets punkt "Sannsynligheten for ulike typer feil"**

### **Falske positive kan skyldes:**

- Kontaminasjon
  - Amplifikasjonsproduktkontaminasjon. (Lavere risiko hvis rør ikke åpnes etter amplifikasjon og ved bruk av dUTP og uracil DNA glykosylase (UNG). Høyere risiko ved sølete post-amplifikasjons-arbeid (elektroforese, hybridisering etc.) og ved dårlig inneslutning av post-amplifikasjons-arbeid.)
  - Krysskontaminasjon. (Høyere risiko ved høy prevalens og hvis positive prøver inneholder mye av det aktuelle smittestoffet og ved bruk av nestet amplifikasjon.
  - Kontaminerende NA i reagenser. (Høyere risiko ved påvisning av smittestoffer som ofte finnes i miljøet eller brukes som kloningsvert. NB: ofte variasjon fra én reagens-lot til en annen.)
  - Fra annen lokalisasjon på samme pasient under prøvetaking. (f.eks. fra hud under blodprøvetaking.)
  - Kontaminasjon fra operatør (som f.eks. hoster i røret).
  - Kontaminasjon fra andre aktiviteter i samme lokale (f.eks. bakteriedyrking)
- Uspesifikk amplifikasjon/deteksjon
  - Amplifikasjon av annen NA i prøven. (Ikke tilstrekkelig selektive betingelser. Kan bare sjekkes med beslektet smittestoff som negativ kontroll.)
  - Reagensartefakter (f.eks. mistolking av positiv reaksjon i en annen fluoresenskanal ved multipleks sanntids NAAT eller primer-dimer-amplifikasjon.)
- Forbytting/feilmerking

### **Falske negative kan skyldes:**

- For lite materiale
  - Dårlig prøvetaking
  - Tap av NA under ekstraksjonen. (Hvis det er lite NA i prøvematerialet, kan bruk av carrier NA gi lavere risiko.)

- Degradering av NA
  - Før prøven kommer til laboratoriet. (Høyere risiko ved lang tid og høy temperatur og hvis det i utgangsmaterialet er mye nukleaser i forhold til NA.)
  - I laboratoriet (Lavere risiko ved bruk av f.eks. kort tid, lav temperatur, nukleasehemmer, carrier NA.)
- Suboptimale betingelser for amplifikasjon/deteksjon
  - Dårlige/gamle reagenser eller feil i tillaging
  - Feil på instrument (inkubering/deteksjon)
- Hemming
  - I primærmaterialet (f.eks. fra heme, glykoproteiner, polysakkarider, salt, proteaser). (Lavere risiko ved rene materialtyper og god NA ekstraksjon.) For mye NA i prøven. Enkelte materialtyper (f.eks. spinalvæsker) kan inneholde meget varierende mengde NA, og mer enn 500 ng kan hemme reaksjonen.
  - Introdusert under prosessen (f.eks. EDTA, heparin, etanol, phenol, fosfater)
  - Konkurransen fra annen amplifikasjon (internkontroll, artefakter, annen NA i prøven). (Lavere risiko hvis mengde internkontroll NA holdes lav.)
  - Forbytting/feilmerking

### **Kit-avhengige og kit-uavhengige kontroller**

For mange formål er ikke kommersielle NAAT kit tilgjengelig, og man må basere seg på mer eller mindre hjemmelagede metoder. Kravene til kontroll av prosessene er tilnærmet den samme for kommersielle og ikke-kommersielle NAAT. Med kommersielle kit, følger det kontrollmaterialer (kit-avhengige kontroller). Ved bruk av kommersielle kit bør medfølgende kontroller brukes som beskrevet av produsenten. Hvis ikke kan produsentens ansvar i forhold til *in vitro* diagnostika direktivet bortfalle. Informasjon om hva de kit-avhengige kontrollene inneholder, er imidlertid ofte sparsom.

Det anbefales å bruke kit-uavhengige kontroller fordi vi kan ønske:

- kontroll med i alle trinn i prosessen (ikke bare den delen hvor kitet brukes).
- å kontrollere med andre stammer enn dem produsenten bruker i sine kontroller.
- positive kontroller med andre egenskaper (f.eks. intakte bakterier istedenfor nakne plasmider og mer fortynnede kontroller)

Positive kontroller bør være så lik det virkelige prøvematerialet som mulig. Ofte brukes imidlertid kontroller som er naken NA og korte NA kjeder. Positive kontroller og internkontroller bør ha samme:

- stabilitet som smittestoff NA. Naken NA er ofte mer utsatt for degradering enn NA i intakte mikrober. Hvis det er RNA som skal påvises, bør kontrollene være RNA. Enkelte bruker mer stabile RNA-analoger, f.eks. armert RNA (Rosentraus et al., 1998), men da kan kontrollen bli mer stabil enn smittestoff RNA. Enkelte har foreslått å pakke kontroll NA i kunstige vesikler (Berg & Skaug, 2003) som skal beskytte kontroll NA på samme måte som i et smittestoff.
- utbytte under ekstraksjon som smittestoff NA. Kontroller som er naken NA avdekker ikke avvik ved lysis. Korte NA gir ikke samme bindingsstyrke til silica og lignende.
- amplifikasjonseffektivitet og deteksjonssensitivitet som smittestoff NA.

Kit-uavhengige kontroller kan i enkelte tilfeller kjøpes (både positive kontroller og internkontroll NA med tilhørende amplifikasjonsreagenser). Om kontrollene er fra en kommersiell leverandør eller ikke, må man tenke på at:

- suboptimale betingelser kan slå ulikt ut for ulike varianter av det smittestoffet man vil påvise. Positive kontroller bør dekke varianter som det er viktig å kontrollere (prevalente stammer, patogene stammer, stammer som avviker fra primer/probe sekvens). Selektiviteten skal være validert under etableringen, og det er vanligvis ikke mulig å inkludere alle varianter som positive kontroller.
- kontroller bør finnes i slike mengder at samme kontroll-batch kan brukes over lang tid. Kontroller bør være homogene løsninger som alikvoteres, fryses og ikke fryses/tines for mange ganger.
- kontrollmaterialer lagres på en optimal måte. Falske negative positive kontroller eller internkontroller pga ødelagt kontroll NA gir forsinkelser i besvarelse og store kostnader til repetisjon av analyser. Enkelte anbefaler å lagre RNA kontroller i nærvær av RNase-hemmer.
- kontroller bør ikke være for sterke for lettere å kunne avsløre suboptimale betingelser. Altfor sterke positive kontroller kan også øke risikoen for krysskontaminasjon. Det anbefales imidlertid at kontroller inneholder minst 10 ganger deteksjonsgrensen for at ikke naturlig variasjon skal gi negative kontroll-resultater.
- negative kontroller som inneholder beslektet smittestoff som metoden ikke skal påvises, kan være nyttig for kontroll av metodens selektivitet. Selektiviteten skal være validert under etableringen, og det er naturligvis ikke mulig å inkludere alle beslektede arter som negative kontroller.

### **Plassering av positive og negative kontroller i prøverekken**

Kontrollene skal utsettes for de samme risiki som prøvene, ikke behandles spesielt forsiktig (snarere tvert imot). Det kan være lurt å ha en negativ kontroll ved siden av en positiv kontroll for å imitere risiko for krysskontaminasjon.

Enkelte posisjoner i NA ekstraktor, NA amplifikasjonsinstrument, ELISA-vasker eller ELISA-leser kan avvike. Plasseringen av positive kontroller bør varieres i forhold til disse slik at slike avvik kan oppdages. Hvis det brukes internkontroll, vil denne kunne avsløre slike avvik.

### **På hvilket trinn i prosessen skal kontrollene inkluderes?**

I hovedsak bør negative og positive kontroller introduseres så tidlig som mulig for at disse på best mulig måte skal imitere negative og positive prøver. Det kan imidlertid være grunn til å introdusere negative og positive kontroller på ulike trinn for lettere å finne ut hvor i prosessen et ev. problem ligger.

### **Internkontroller**

Internkontroller sjekker for effektivitet i ekstraksjon, amplifikasjon og deteksjon individuelt for hver prøve. Internkontroller brukes primært for å kontrollere for amplifikasjonshemmere i ekstrahert NA. Dette er særlig viktig for materialtyper som ofte inneholder hemmere, og hvis det brukes en NA ekstraksjon som ikke fjerner disse hemmerne. Internkontroller kan også sjekke for manglende tilsetning av prøve NA eller reagenser. Det skjer av og til pipetteringsfeil både ved manuell og robotisert pipettering.

Mulige ulemper ved bruk av internkontroll

- Mulighet for samtidig påvisning av flere ulike smittetoffer (multipleksing) reduseres (antall forskjellige primere/prober kan gi mindre effektiv amplifikasjon/større fare for biprodukter, og antall ulike farger som kan påvises samtidig i sanntids NAAT er begrenset)
- Hemming av amplifikasjon av smittestoff NA. Ved ev. bruk av kit-uavhengige internkontroller i et kommersielt kit må metoden valideres på nytt, og produsentens ansvar i forhold til *in vitro* diagnostika direktivet kan bortfalle.

Enkelte anbefaler internkontroll i parallelt rør (to rør med smittestoff, men bare ett av dem med internkontroll NA eller internkontroll amplifikasjonsreagenser). Internkontroll-amplifikasjon i parallelt rør vil unngå konkurranse-problemet, men vil kunne overse manglende tilsetning av prøve NA til ett rør med amplifikasjonsmikros.

Det er to ulike typer av internkontroll:

- Inkludert internkontroll er NA som skal være naturlig tilstede i alle prøver, og som amplifiseres parallelt med smittestoff NA. Inkludert internkontroll sjekker for avvik i analytisk sensitivitet for hver enkelt prøve fra helt prøvetaking til deteksjon.
- Tilsatt internkontroll er kontroll-NA som tilsettes etter at prøven er tatt, og som amplifiseres parallelt med smittestoff NA. Tilsatt internkontroll sjekker for avvik i analytisk sensitivitet for hver enkelt prøve fra internkontrollen tilsettes til deteksjon.

### **Inkludert internkontroll**

Enkelte typer prøvematerialer skal inneholde en bestemt type NA (f.eks. human NA) enten de er smittestoff positive eller negative. I slike materialer kan det være gunstig å bruke amplifikasjon av et cellulært gen som internkontroll. I motsetning til andre kontroller, vil en slik internkontroll også sjekke for god prøvetaking og forsendelse/lagring. Mengden inkludert internkontroll NA vil ofte være variabel og ofte mye større enn smittestoff NA. Dette kan gi ulik grad av interferens med amplifikasjon av smittestoff NA. For å hindre konkurranse, er det noen som bruker mindre mengde primere for amplifikasjon av internkontroll NA enn optimalt. Det er også mulig å amplifisere inkludert internkontroll NA i parallelt rør.

### **Tilsatt internkontroll**

Det er ulike måter man kan tilsette internkontrollen på. Internkontroll NA kan settes til prøven før ekstraksjon,

- Individuelt i hvert rør. Vær forsiktig med å sette internkontroll NA direkte til prøvemateriale uten effektiv nuklease-hemming. (Smittestoff NA i prøven er oftest beskyttet av cellevegg før lysis. Ved blanding med lysisbuffer inaktiveres nukleasene i prøven). Tilsetning i hvert rør individuelt er mindre reproducerbart og mer arbeidskrevende.
- I eget kar i NA ekstraktor.
- Til lysisbuffer. Dette gir enkel og reproducerbar pipettering, men enkelte hevder at internkontroll NA kan ødelegges i uforynnnet lysisbuffer.

En lettvindt måte er å sette internkontroll NA til amplifikasjonsmiksen. Dette kontrollerer bare for hemming i prøve NA og ikke for f.eks. utbytte under ekstraksjon og heller ikke for om prøve NA ikke er tilsatt.

Internkontroll amplifikasjonsreagensene settes oftest til amplifikasjonsmiksen.

### **Design av internkontroll**

Når man velger internkontroll, må man selvfølgelig sørge for at man på en sikker måte kan skille et positivt internkontroll-resultat fra et positivt smittestoff-resultat. Amplifikasjonsproduktene kan skilles ved f.eks. prober med ulike flouororer, ulike amplifikasjons-produkt lengder eller smeltepunkt.

Internkontrollen skal i minst mulig grad interferere med amplifikasjon av smittestoff NA. Internkontroll som bruker samme primerpar som brukes for amplifikasjon av smittestoff NA kan gi mindre interferens.



### Registrering av kontrollresultater (sporbarhet)

Resultater av positive kontroller bør registreres i egne lister. Det bør være mulig å finne tilbake til hvor i oppsettene kontrollene har vært plassert. Avvik i internkontroller og negative kontroller bør også registreres samlet. Man bør alltid prøve å finne årsak til avvikende kontrollresultater og rapportere dette sammen med kontrollresultatene. I kvalitative NAAT får man ofte semikvantitative resultater. Det kan være grunn til å bruke de verdiene som positive kontroller og internkontroller gir, og ikke bare registrere om de er positive eller negative. Lot-ID på kontrollene og reagensene som er brukt bør registreres på en måte som gjør det enkelt å se sammenheng mellom skifte av lot og kontrollresultater.

Mange bruker sanntids amplifikasjon i kvalitative NAAT. Tallene for kontrollenes Ct kan danne basis for en mer sensitiv kontroll av testens ytelse til enhver tid. I tillegg til avdekking av sporadiske feil vil man også kunne beregne størrelsen på den naturlige variasjonen. Slike semikvantitative resultater kan også gi grunnlag for å sette alarmgrenser (det vil si grenser som indikerer at man bør være spesielt oppmerksom i fremtidige oppsett for å se om avvik representerer en trend) i tillegg til aksjonsgrensene som krever at prøver analyseres på nytt. I tillegg til Ct-verdiene bør man også følge med på fluoresens-intensiteten i de positive kontrollene og internkontrollene for å avdekke svakheter i deteksjonen.

Se James O. Westgard's regler (<http://www.westgard.com>) eller gjør et søk på "Shewhart Control Charts" for eksempler på algoritmer for registrering og godkjenning av kvantitative kontrollresultater. Til slik registrering kan det brukes elektroniske regneark eller man kan laste ned egnet programvare f.eks. MedLabQC fra <http://www.thehealthcarenet.com/shareware.htm>.

### Hva hvis en eller flere av kontrollene ikke går inn?

Enkelte anbefaler et tolkingsdiagram som vist i Tabell 1.

**Tabell 1.** Eksempel på algoritme for konklusjon ved ulike kontroll/prøve resultatkombinasjoner.

Kontrollresultat	Prøve Agens positiv	Prøve Agens negativ
Internkontroll positiv	Positiv	Negativ
Internkontroll negativ	Positiv	Inkonklusiv prøve
Neg ktr positiv	Inkonklusiv for alle positive prøver	Negativ
Neg ktr negativ	Positiv	Negativ
Pos ktr positiv	Positiv	Negativ
Pos ktr negativ	Positiv	Inkonklusiv for alle negative prøver

### Hvis en internkontroll blir negativ

Hvis prøveresultatet er positivt, er det vanlig å forklare et negativt internkontrollresultat som et resultat av konkurranse fra amplifisering av smittestoff NA og godkjenne det positive prøveresultatet.

Konsekvensen av negativ internkontroll og negativ smittestoff amplifikasjon blir:

- Hvis feilen ligger i et av trinnene fra prøve til deteksjon av amplifiseringsprodukt: Gjør analyse av denne prøven på nytt på samme måte (enten fra primærmaterialet eller fra et senere trinn hvis det er overveiende sannsynlig at avviket skyldes et senere trinn). Hvis internkontroll-resultatet nå er OK, kan det nye smittestoff-resultatet godkjennes.

- Hvis det var denne prøven som var spesielt vanskelig: Gjør analyse av denne prøven på en annen måte. Fortynning av primærmaterialet eller ekstrahert NA kan redusere effekten av hemmere, men samtidig fortynne et ev. smittestoff og redusere sensitiviteten. Hvis mer effektiv type prøvebehandling er tilgjengelig (f.eks. konsentrering av smittestoffet før fortynning, eller mer effektiv fjerning av hemmere), kan dette forsøkes. Hvis internkontrollresultatet nå OK, kan det nye smittestoff-resultatet godkjennes. Hvis ikke: Be om ny prøve?

### **Hvis en negativ kontroll blir positiv**

Det kan være flere årsaker til at en negativ kontroll blir positiv. Årsaken er ikke alltid lett å finne. Negative kontroller som introduseres på ulike trinn i prosessen, vi kunne være til hjelp for å lokalisere problemet.

Hvis en negativ kontroll blir positiv pga:

- kontaminasjon, må alle positive prøver på nytt fra begynnelsen.
- prøveforbytting, må alle prøvene på nytt fra begynnelsen (ikke bare de positive prøvene som beskrevet i Tabell 1).
- uspesifikk reaksjon, bør prosedyren endres og metoden valideres på nytt.

Hvis det ofte er negative kontroller som blir positive, må rutiner endres, laboratorier og utstyr dekontamineres, og det bør vurderes om det skal brukes flere negative kontroller.

### **Hvis en positiv kontroll blir negativ**

Det kan være flere årsaker til at en positiv kontroll blir negativ. Årsaken er ikke alltid lett å finne. Positive kontroller som introduseres på ulike trinn i prosessen, vi kunne være til hjelp for å lokalisere problemet.

Hvis en positiv kontroll blir negativ pga:

- suboptimale betingelser i dette oppsettet, må alle negative prøver på nytt fra begynnelsen.
- prøveforbytting, må alle prøvene på nytt fra begynnelsen (ikke bare de negative prøvene som beskrevet i Tabell 1).
- lite reproducerbar og/eller lite robust metode, bør prosedyren endres og metoden valideres på nytt.
- manglende tilsetning av positiv kontroll eller ustabil kontroll NA, bør rutiner endres.

### **Oppsummering**

Det bør:

1. gjøres en risikovurdering.
  2. etableres et kontrollregime basert på risikovurderingen.
  3. etableres regler for hvilke kontrollverdier som er akseptable.
  4. etableres regler for hvilke tiltak som skal settes i verk ved ulike typer avvik fra akseptable kontrollverdier.
  5. føres protokoll over positive kontroller og avvik fra akseptable kontrollverdier.
- Gjenta punktene 1-4 hvis ny kunnskap gjør det fornuftig.

## Litteratur

1. Berg ES, Skaug K. Liposome encapsulation of the internal control for whole process quality assurance of nucleic acid amplification-based assays. *J Microbiol Methods*. 2003;55:303-9.
2. DuBois DB, Brown JT. Laboratory controls and standards. In *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Ed by Pershing DH et al. 2004 ASM Press Washington DC:697-703.
3. In vitro diagnostic medical devices directive 98/79/EC.
4. Kalland KH, Myrmel H, Nordbø SA. Nukleinsyrediagnostikk i medisinsk mikrobiologi. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2005;125:3110-4.
5. Medisinske laboratorier. Særskilte krav til kvalitet og kompetanse, Norsk standard NS-EN ISO 15189 (2003).
6. *Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline - Second edition* "Clinical and Laboratory Standards Institute". MM3-A2 (Vol.26 No.8).
7. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3590-4.
8. Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, DeBonville D, Spadoro JP. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol*. 1998;36:191-7.
9. Smith DW, Tapsall JW, Lum G. Guidelines for the use and interpretation of nucleic acid detection tests for *Neisseria gonorrhoeae* in Australia: A position paper on behalf of the Public Health Laboratory Network. *Commun Dis Intell*. 2005;29:358-65.
10. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Inf Dis*. 2004;4:337-48.

## 2.11 Sammenlignende laboratorieprøving

### Kommersielle tilbud, laboratorieavtaler og håndtering av rapporter og avvik i laboratoriet.

Anne-Lise Bruu, Mikrobiologisk laboratorium, Sykehuset i Vestfold HF

Kjært barn har mange navn! Sammenlignende laboratorieprøvinger (SLP) kalles også av mange for ringtest, på dansk ”præstasjonsprøvinger” og på engelsk ”proficiency testing” og er en form for ekstern kvalitetskontroll. Det kan defineres som en eller flere kontrollprøver som en uavhengig institusjon sender ut til flere laboratorier for å sammenligne de deltagende laboratoriers prestasjoner. Det utsendte materialet kan ligne autentisk pasientmateriale.

Ekstern kvalitetskontroll av laboratorieanalyser kan for øvrig skje på 3 måter:

1. Deltagelse i et kommersielt opplegg, f.eks. UK NEQAS, EQUALIS eller den nasjonale utsendelsen fra Folkehelseinstituttet. Hensikten er at laboratoriet får anledning til å sammenligne sine analyseresultater med en sammenstilling av andre laboratoriers resultater. Faglige vurderinger og kommentarer kan også inngå i prøvingene, slik som tilfelle er med den nasjonale ringtesten. Mange produsenter har innført måling av resultater ved hjelp av scoresystem som også kan fungere som en kvalitetsindikator for laboratoriet, og følgelig for statistisk bearbeidelse.
2. Fordi det kommersielle tilbudet ikke dekker alle aktuelle analyser, kan laboratorier inngå avtaler om samarbeid. Det blir laget testpaneler som distribueres, ofte veksler de samarbeidende laboratoriene om å gjøre dette, og resultatene blir behandlet konfidensielt. F.eks. er det inngått slike avtaler mellom enkelte svenske og danske laboratorier som de respektive akkrediteringsmyndighetene har godkjent.
3. Utveksling av enkeltprøver mellom laboratorier for å gi støtte til, supplere eller verifisere egne analyseresultater. Bruk av regionale, nasjonale eller internasjonale laboratorier som referanselaboratorier i den pasientrettede diagnostikken fungerer etter dette prinsippet.

I alle fall er det slik at dersom man søker om akkreditering for en undersøkelse må man ha et opplegg for ekstern kvalitetskontroll på plass. I Norge er det foreløpig ingen kontroll med hvilke SLP-leverandører man kan velge, mens f.eks. i Danmark må laboratoriet velge opplegg som er godkjent av det danske akkrediteringsorganet DANAK. I enkelte land er det også krav om at produsenter av eksterne kvalitetskontroller skal være akkreditert eller sertifisert.

Det finnes mange SLP-produsenter. Tabell 1 gir oversikt over noen av de viktigste.

Mens utsendelsene fra Folkehelseinstituttet varierer med hensyn til hva de omfatter, sender de øvrige (mer eller mindre kommersielle) produsentene ut sine klart definerte tilbud med regelmessige intervaller. Fordelen med ringtester fra Folkehelseinstituttet er at de også omfatter en vurdering av resultatene, dvs. hvordan vi vil kommentere til rekvirenten, meldingsrutiner og også f.eks. opplysninger om hvilke medier og metoder for identifikasjon av bakterier som er benyttet.

Det er viktig å være klar over at opplegg for ekstern kvalitetskontroll koster mye, fordi det er nødvendig å kjøpe de fleste SLP-panelene. Produksjon av SLP-paneler har etter hvert blitt en

blomstrende virksomhet, slik at man må regne med betydelige SLP-kostnader når man har bestemt seg for å søke om akkreditering.

**Tabell 1 Oversikt over viktige leverandører av SLP**

PRODUSENT	Generell bakteriologi	Resistens-bestemmelse	Parasitologi	Mykobakterier	Virologi	Mykologi	Serologi	Immunologi	Nukleinsyre-påvisning
Nasjonalt folkehelseinstitutt	X	X	X	X		X	X		
UK NEQAS	X	X	X	X	X	X	X		X
QCMD									X
EQUALIS					X		X	X	X*
Immuno-Concepts								X	
Labquality	X				X		X	X	X
VQC							X*		X*
INSTAND	X		X	X		X	X	X	X

\*) foreløpig begrenset omfang

Dersom det mangler uavhengig program for SLP, må man vurdere andre alternativer (konfr. pkt. 2 og 3). Avtaler mellom to eller flere laboratorier om utveksling av paneler kan da bli aktuelt. Denne prøvingen må også foregå etter beskrevne retningslinjer med hensyn til hvilke laboratorier og metoder som er involvert, prøvemateriale, intervaller, presentasjon av resultater etc. Konfidensiell behandling av all informasjon må også sikres.

Utveksling og sammenligning av enkeltprøver i samarbeid med referanselaboratorier kan ikke uten videre vurderes som fullverdig kvalitetskontroll for en analyse, men det kan gi en antydning om analysekvaliteten og være et supplement til andre kontroller. Følgelig må den derfor ikke brukes alene som kvalitetskontroll.

Fordi alternativ 2) og 3) må betraktes som nødløsninger, er det viktig å følge med på det som uavhengige produsenter tilbyr, for tilbudene utvides stadig.

### 2.11.1 Håndtering av SLP i laboratoriet.

For å sikre god håndtering av SLP er det viktig at det utpekes personer som er ansvarlige for utførelse, oppfølging og besvarelse, enten på forhånd eller straks utsendelsen kommer, men i prinsippet skal all ekstern kvalitetskontroll behandles som vanlige kliniske prøver. Det bør også foreligge prosedyrer for håndtering og besvarelse, samt for oppbevaring dersom prøvene ikke kan undersøkes straks de ankommer laboratoriet. Alle prøver må forbehandles etter retningslinjer fra produsent/leverandør.

Ved Mikrobiologisk laboratorium i Tønsberg er to bioingeniører faste ansvarlige, men de kan delegere arbeidet helt eller delvis ved fravær. En lege er alltid ansvarlig for rapporteringen av resultatene. Vedkommende lege, som utpekes på forhånd, sørger også for at tidsfristen overholdes. Imidlertid er det viktig at alle legene blir involvert, slik at det som regel er flere leger som følger opp SLP-arbeidet. Det er utarbeidet spesielle flytskjemaer for det praktiske arbeidet og eget skjema for oppfølgingen vedrørende gjennomgang av resultater, og all dokumentasjon arkiveres i spesielle permer.

### 2.11.2 Rapportering av resultater.

Ved Mikrobiologisk laboratorium har vi som rutine at alle resultater fra en SLP blir meddelt på et avdelingsmøte hvor alle ansatte er til stede. Dersom alle resultatene er tilfredsstillende, blir det notert på oppfølgingskjemaet med dato og signatur av lege ansvarlig for rapporteringen. Hvis det forekommer avvik, involveres den eller de av leger/bioingeniører som var ansvarlige for utførelse og rapportering. Avviket og forslag til korrigerende tiltak noteres på oppfølgingskjemaet, og når årsaken er funnet, blir det gjennomgått på et nytt avdelingsmøte slik at alle kan lære av feil som er gjort. Som regel blir alle undersøkelser til prøven som har avvik gjentatt, ev. blir det bedt om en ny prøve eller et nytt panel.

Sentrale faktorer i vurderingen av avvik er:

- Om vi har foretatt en riktig vurdering av SLP-materialets sammensetning og beskaffenhet, og om vi har tatt hensyn til angitt holdbarhet i forhold til forsendelse, oppbevaring og analysedato.
- Ved kvalitative og ev. kvantitative undersøkelser vil vurderingen måtte baseres på hvilke *beslutningsgrenser* og hvilken analytisk sensitivitet og spesifisitet som gjelder for metoden som er brukt. Eksempel her er fastsatte brytningspunkter for E-test/resistensbestemmelse.
- Kommentarer og tolkninger i resultatrapporten kan bli gjenstand for ny diskusjon.
- Det er også viktig å sjekke om avviket kan representere en trend eller om det er en enkelthendelse. Kontroll av tilsvarende data i samme perioden kan derfor bli aktuelt, f.eks. overvåking av intern kvalitetskontroll.
- Vi bør også foreta en vurdering av om problemstillingen fra SLP-arrangøren er aktuell og dekkende for laboratoriet. Ev. kan man rette henvendelser til arrangøren.

Dokumentasjon fra gjennomført SLP er viktig, og bør oppbevares i minst 5 år. Ved søknad om akkreditering er det vanlig å oppgi hvilke programmer man deltar i og fremlegge resultater fra det siste året. Ved akkrediteringsbesøk blir all dokumentasjon fra SLP grundig gjennomgått.

### 2.11.3 Referanser

1. NA Dok. 48 b Medisinsk mikrobiologi. Veiledning for medisinsk-mikrobiologiske laboratorier. Utgitt av Norsk Akkreditering 23.04.02.
2. Norsk Standard NS-EN ISO/IEC 17025
3. Dansk Standard DS/EN ISO 15189

Tidligere rapporter fra:

- Strategimøte nr 1 (1987): *Fæcesdiagnostikk*
- Strategimøte nr 2 (1988): *Næringsmiddelinfeksjoner/intoksikasjoner og Parasittologi*
- Strategimøte nr 3 (1989): *Anaerob diagnostikk*
- Strategimøte nr 4 (1990): *Mykologi*
- Strategimøte nr 5 (1991): *Bakteriologiske og mykologiske undersøkelser i forbindelse med underlivsprøver*
- Strategimøte nr 6 (1992): *Resistensbestemmelse*
- Strategimøte nr 7 (1993): *Bakteriologisk diagnostikk ved urinveisinfeksjon*
- Strategimøte nr 8 (1994): *Mykobakterier*
- Strategimøte nr 9 (1995): *Bakteriologisk diagnostikk ved luftveisinfeksjoner*
- Strategimøte nr 10 (1996): *Bakteriologiske fæcesundersøkelser*
- Strategimøte nr 11 (1997): *Bakterielle infeksjoner i hud og bløtdeler*
- Strategimøte nr 12 (1998): *Kravfulle/uvanlige bakterier*
- Strategimøte nr 13 (1999): *Sikkerhetsregler og smitteforebygging i medisinsk mikrobiologiske laboratorier*
- Strategimøte nr 14 (2000): *Stafylokokker*
- Strategimøte nr 15 (2001): *Streptokokker*
- Strategimøte nr 16 (2002): *Blodkultur*
- Strategimøte nr 17 (2003): *Nedre luftveisinfeksjoner  
Spesielle kliniske og diagnostiske problemer*
- Strategimøte nr 18 (2004): *Resistensbestemmelse*
- Strategimøte nr 19 (2005): *Mikrobiologisk beredskap*

**Ringtester:**

Styremøtet for medisinsk-mikrobiologiske laboratorier i Norge etablerte i 1982 et program for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi ("ringtester") i Norge. Ansvar for programmet ble lagt til en Referansegruppe som idag består av 5 representanter for de deltagende laboratorier. Disse velges for 4 år om gangen.

Organiseringen og den praktiske gjennomføringen av programmet ble lagt til en arbeidsgruppe med permanent sete ved Avdeling for bakteriologi, Statens Institutt for Folkehelse.

Programmet består av 4 utsendelser pr år som hver vanligvis består av 4 simulerte kliniske materialer med tilhørende kliniske opplysninger. Prøvene sendes ut "åpent", dvs. at deltagerne vet at det dreier seg om en ringtest, men de skal likevel behandle materialene i størst mulig grad som ordinære kliniske prøver. I henhold til egen rutine skal de således gjennomføre isolering, identifikasjon og eventuelt resistensbestemmelse av mulige patogene agens samt vurdere den kliniske betydning av funnet.

Flertallet av materialene representerer vanlige diagnostiske problemer. Enkelte av problemene kan likevel være sjeldne eller vanskelige, idet de er valgt ut med tanke på å minne deltagerne om uvanlige, men likevel viktige kliniske situasjoner eller for å informere dem om f.eks. en aktuell epidemiologisk situasjon, ny viten o.l.

Hver utsendelse avsluttes med en oppsummerende rapport fra arbeidsgruppen.

**Strategimøter:**

Hvert år arrangeres det innen rammen av ringtestprogrammet et strategimøte (tidligere kalt konsensusmøte) hvor et spesifikt tema blir tatt opp til diskusjon.

Ansvarlig arrangør er Referansegruppen. Denne utpeker vanligvis for hvert enkelt møte en programkomitee blant deltagerne som blir ansvarlig for program og gjennomføring av møtet.

Deltagere på møtet er én representant for hvert laboratorium som er med i ringtestprogrammet samt enkelte fremtredende klinikere innen det aktuelle området som skal diskuteres. Alle mikrobiologisk relevante aspekter innen det aktuelle temaet diskuteres med tanke på å komme fram til felles aksepterte retningslinjer og prosedyrer.

Hvert strategimøte avsluttes med en rapport hvor premissene og konklusjonene fra diskusjonene nedfelles. Ansvarlig for rapporten er den aktuelle programkomiteen.



Utgitt av Nasjonalt folkehelseinstitutt  
Divisjon for smittevern

Bestilling:  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
Postboks 4404 Nydalen  
0403 Oslo  
Telefon: 23 40 82 00  
Telefax: 23 40 81 05

ISBN 978-82-8082-194-2 trykt utgave  
ISBN 978-82-8082-195-9 elektronisk utgave  
Opplag 60, mars 2007