

**PROCEDURA DE EVALUARE A STANDARDELOR ȘI A CRITERIILOR DE
PERFORMANȚĂ ÎNDEPLINITE DE LABORATOARELE DE
MICOBACTERIOLOGIE**

Dr Daniela Homorodean, medic primar microbiologie, doctor în științe medicale, coordonator al rețelei naționale a laboratoarelor de micobacteriologie, șef Laboratorul Național de Referință Cluj Napoca, Spitalul Clinic de Pneumoftiziologie Leon Daniello Cluj Napoca.

Dr Roxana Mîndru, medic primar medicină de laborator, Laboratorul Național de Referință București, Institutul Național de Pneumoftiziologie Marius Nasta București.

Consultant tehnic din partea Organizației Mondiale a Sănătății - Emanuele Borroni, San Raffaele Scientific Institute, Milano

Cuprins

Lista fișelor	4
Abrevieri:.....	5
Introducere	6
Criterii de evaluare a laboratorului de micobacteriologie	6
Chestionar pentru autoevaluarea laboratorului de micobacteriologie	6
Asigurarea calității.....	12
Controlul intern al calității	12
A. Examenul microscopic.....	12
Prepararea frotiurilor pentru CIC-M.....	15
B. Cultura	15
a. Controlul sterilității mediului Lowenstein Jensen	16
b. Controlul calității nutritive a mediului	17
d. Controlul intern al calității mediului de cultură Middlebrook 7H9.....	18
Controlul extern al calității (CEC).....	18
Monitorizarea tendințelor	19
Volumul de lucru.....	20
Indicatori pentru înregistrări și relații cu clienții	23
Timpul de diagnostic.....	24
Indicatori de performanță pentru PNPSCT.....	26
APRECIEREA PERFORMANTELOR TESTELOR DE DIAGNOSTIC.....	30
Bibliografie	33

Lista fișelor

Fișa 1. Autoevaluarea laboratorului de micobacteriologie	7
Fișa 2. Controlul intern al calității pentru examenul microscopic	13
Fișa 3. Clasificarea erorilor pentru examenul microscopic ¹²	13
Fișa 4. Controlul intern al calității mediului de cultură Lowenstein Jensen	16
Fișa 5. Controlul intern al calității mediului de cultură Middlebrook 7H9.....	18
Fișa 6. Participarea la scheme de comparări interlaboratoare ^{3,6, 9,10}	19
Fișa 7. Volumul de lucru și rezultatele pentru examenul microscopic și culturi în mediul Lowenstein Jensen.....	21
Fișa 8. Volumul de lucru și rezultatele pentru examenul microscopic și culturi în mediul lichid Middlebrook 7H9*	22
Fișa 9. Indicatori pentru înregistrări. Relații cu clienții. Anul.	23
Fișa 10. Timpul de eliberare a rezultatelor pentru examenul microscopic ¹⁷ și rata de detecție a cazurilor noi prin microscopie și cultură.....	24
Fișa 11. Timpul de diagnostic pentru cultura în mediul Lowenstein Jensen. Ținte.	24
Fișa 12. Timpul de diagnostic pentru cultura în mediul Middlebrook 7H9 în sistemul.....	25
Fișa 13. Numărul persoanelor suspecte de TB cărora li s-au efectuat examene bacteriologice pentru diagnostic	27
Fișa 14. Numărul persoanelor cu TB cărora li s-au efectuat examene bacteriologice pentru monitorizarea tratamentului	29
Fișa 15 Indicatori de performanță pentru culturi.....	31
Fișa 16. Activități care trebuie investigate în funcție de valorile indicatorilor de performanță pentru culturi	32

Abrevieri:

ABG: Antibigramă
ATCC: American Type Culture Collection
CC: controlul calității
CEC: Controlul Extern al Calității
CIC: Controlul Intern al Calității
CIC-C: Controlul Intern al Calității pentru Cultură
CIC-M: Controlul Intern al Calității pentru examenul Microscopic
C-LJ: cultura în mediul Lowenstein Jensen
CN: bolnav caz nou
CPM: Cabinet de Protecție Microbiologică
FRC: forță relativă de centrifugare
HEPA: High Efficient Particulate Air, (tip de filtre cu mare putere de reținere a particulelor)
LJ: mediul de cultură Lowenstein Jensen
L2: substanțe anti-tuberculoase de linia a doua
LNR: Laborator Național de Referință
LRR: Laborator Regional de Referință
M: examen microscopic
MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
NTM: Non Tuberculous Mycobacteria, micobacterii netuberculoase
PC: computer
PNPSCT: Programul Național de Prevenire, Supraveghere și Control al Tuberculozei
S / R: sensibil / rezistent TB: tuberculoză
UV: ultra-violet, radiații

Introducere

Laboratoarele de micobacteriologie ale rețelei naționale ar trebui să ofere rezultate cu calitate asigurată și comparabile, astfel încât să nu existe diferențe calitative în privința susținerii de către acestea a programului național de control al TB. Este necesar să existe un sistem care să ne permită să apreciem în ce măsură performanțele realizate de laboratoare se conformează așteptărilor noastre. În modul de formulare și stabilire a indicatorilor, dar și a criteriilor de evaluare, trebuie să ținem seama de interesele domeniului în care își desfășoară laboratorul activitatea și deciziile care vor fi formulate în urma analizei. Ponderea indicatorilor de performanță în luarea deciziilor nu este egală, dar se ține seama de toate aspectele pentru armonizarea activităților. Impactul fiecărui indicator este diferit și din perspectiva din care este evaluat (laborator, beneficiarul serviciilor oferite de laborator, finanțator, organizatorul serviciilor de sănătate)^{1, 2}.

Lucrarea își propune să ofere informații atât pentru autoevaluarea performanțelor laboratorului, să constituie un instrument de lucru în ajutorul laboratorului, dar și al PNPSCT pentru identificarea deficiențelor și corectarea lor, stabilirea priorităților în luarea deciziilor pentru îmbunătățirea activităților la nivel local și național.

Indicatorii, care pot fi calitativi sau cantitativi, trebuie să acopere toate ariile de interes, începând cu recoltarea probelor de la pacienți, prelucrarea lor în laborator - cu toate activitățile necesare susținerii acestora, până la eliberarea rezultatelor³.

Indicatorii reprezintă măsurarea specifică a performanțelor PNPSCT, urmărite în timp. Ei trebuie să reflecte obiectivele Programului și să permită managerilor să urmărească progresul, raportat la referință.

Trebuie selectați și folosiți acei indicatori care sunt *specifci* (măsoară numai anumite condiții sau evenimente), *fiabili* (oferă același rezultat când sunt folosiți de mai multe ori pentru măsurarea acelorași condiții sau activități), *sensibili* (reflectă schimbările parametrilor observați), *operaționali* (măsurabili cu definițiile dezvoltate la nivel de program), *accesibili* (costuri de măsurare accesibile), *fezabili* (permit colectarea datelor propuse), *comparabili* (în timp și între laboratoarele de niveluri diferite, la un moment dat)⁴.

Înregistrările constau în chestionare pentru autoevaluare⁵, tabele (fișiere Excel) cu date care se analizează periodic (lunar la nivel local). Cu ocazia vizitelor de îndrumare (supervizare) se completează, de asemenea, chestionare de evaluare similare celor folosite pentru autoevaluare. Totodată se verifică imparțialitatea și obiectivitatea autoevaluării.

Pe baza datelor înregistrate pe parcursul anului în fiecare laborator, se întocmește raportul anual de activitate care se trimite, după centralizare, la laboratorul supraordonat, respectiv județean, apoi LRR, care centralizează la rândul său datele din județele arondate și le trimite la LNR în formatul solicitat de către acesta.

Criterii de evaluare a laboratorului de micobacteriologie

Chestionar pentru autoevaluarea laboratorului de micobacteriologie

Se completează cel puțin anual (dar se poate completa și la fiecare 6 luni pentru aprecierea progresului), de către șeful de laborator și se trimite la LRR, care centralizează informația din județe și o trimite la LNR coordonator pentru monitorizarea și evaluarea situației⁶.

Dacă la aspectele care se referă la *biosiguranță* (marcat cu B în tabel) există răspunsuri negative (NU), aceasta semnifică deficiențe care *obligă la remedierea imediată sau suspendarea activității până la remediere*⁵.

Aspectele care se referă la *asigurarea calității* (marcat cu C în ultima coloană din tabel) *necesită remediere urgentă* dacă răspunsul este NU sau doar parțial realizat ^{5,7}. (Fișa 1).

Fișa 1. Autoevaluarea laboratorului de micobacteriologie

Laboratorul.....Data autoevaluării.....Perioada evaluată.....

Nr crt	Aspect analizat	Detaliiere	DA	NU	Comentarii (x=detaliiere)	B/C
1	Funcțiile si responsabilitățile laboratorului	Microscopie și cultură				
		Microscopie, cultură, ABG				
		Numai pentru TB				
2	Laboratorul deservește..	DAT		x		
		Spital PNF / secție PNF		x		
		Sanatoriul		x		
		Alte unități sanitare		x		
3	Programul de activitate	Expus la loc vizibil				
		Produse prelucrate zilnic		x		C
4	Numărul încăperilor și destinația lor	Spațiu: recepția produselor		x		B
		Spațiu numai pentru TB				B
		Cameră pentru personal				B
		Vestiar		x		
		Magazie chimicale				
		Magazie consumabile				C
		Grup sanitar propriu		x		
5	Personalul instruit în ultimele 12 luni, implicat în activitatea TB (nr total/nr instruit)	Medici		nr		C
		Biologi/chimiști/biotehnologi		nr		C
		Asistenți		nr		C
		Necesar personal, calificare		x		
		Îngrijitor curățenie		nr		
6	Registrul de laborator	Tipizat: PNPSCT revizia recentă		x		C
		Unic, pt toate prelevatele				C
	Completare registru	Corect				C
7	Biletele de trimitere, solicitare examinare	Tipizate: PNPSCT ultima revizuire		x		C
		Completate corect de solicitant				C
		Completate corect de laborator				C
8	Sistemul de notare pentru microscopie	Pozitiv BAAR 1-3 +, Negativ Nr exact de bacili (ex: 7 BAAR/100c) ?				C
9	Sistemul de notare pentru culturi în registru și în buletinul de rezultat	Pozitiv 1-3 +, Negativ, Numărul exact de colonii , cultura contaminată		x		C
		Se scrie explicit <i>M.tuberculosis</i>				C

Nr crt	Aspect analizat	Detaliiere	DA	NU	Comentarii (x=detaliiere)	B/C
10	Sistem de notare a rezultatelor ABG în registru și în buletinul de analiză	S / R			x	C
11	Volum de lucru anul anterior / cu rata de pozitivitate. Exclusiv pentru ce s-a lucrat în laborator	M pozitiv /total			x	C
		C LJ pozitiv/ total			x	C
		Contaminare culturi LJ (nr tuburi contaminate/ nr total tuburi folosite pentru cultivare)			x	C
		Cultura mediul lichid poz/total				C
		Contaminare culturi în mediul lichid (nr tuburi contaminate/ nr total tuburi folosite pentru cultivare)				C
		ABG LJ RH total			x	C
		ABG linia 1 mediul lichid				C
		Tulpini MDR trimise pt L2 la LNR			Lab: Nr	C
12	Examen microscopic	Frotiu direct			x	C
		Centrifugare după omogenizare			x	
		Prelucrează 2 spute pt diagnostic și 2 spute pt monitorizare				C
13	Frotiu- colorația pentru evidențierea BAAR	Ziehl- Neelsen				
		Auramina O				
		Alte colorații				C
14	Cultura- metoda de omogenizare / decontaminare	NaOH 4% + HCl 8%				
		NaOH 4%+ KH ₂ PO ₄ 15 %				
		NAOH/NALC				
		Altă metodă			x	C
		Însămânțează pe 2 sau pe 3 tuburi LJ (exclusiv cultura LJ)			x	
		Însămânțează pe 2 tuburi LJ și 1 tub mediul lichid				
15	Cultura- tehnica	Cu picătura			x	C
		După centrifugare/concentrare				
16	Mediul de cultură	Solid, Lowenstein –Jensen			Furnizor	
		Lichid Middlebrook 7H9			Furnizor	
17	Sistem automat de cultivare a micobacteriilor, funcțional	BACTEC MGIT 960				
		VersaTrek				
		Alt sistem :			x	
18	Teste de biologie moleculară efectuate	GenoType (LPA)	MTBDR plus		x	
			MTBDR sl		x	

Nr crt	Aspect analizat	Detaliiere		DA	NU	Comentarii (x=detaliere)	B/C
			CM			x	
			MTBC			x	
		GeneXpert MTB/ Rif				x	
19	Ghidurile naționale pentru metodele stadardizate	Disponibile în laborator					C
20	Procedurile de lucru standardizate, recomandate de PNPSCT	Expuse la punctele de lucru					C
21	Controlul intern al calității - microscopie	Neconformități la recepția prod.				x	C
		Lame corect identificate					C
		Soluții etichetate: substanță, conc, data prepar/expir					C
		Pot fi identificate persoanele care au efectuat/ colorat/citit frotiurile?					C
		Evidenta CIC pt Microscopie				x	C
22	Controlul intern al calității- cultura	Evidența CC pentru mediile de cultură folosite (LJ, lichid)					C
		Evidența loturilor de mediu pt culturi					C
		Controlul creșterii în mediul solid și în mediul lichid					C
		Tulpina <i>M. tuberculosis</i> ATCC					C
23	Controlul intern al calității- antibiograma	CIC ABG					C
		Etalon de turbiditate				Tip:	C
		Tulpina <i>M. tuberculosis</i> ATCC					C
24	Controlul intern al calității teste moleculare	GeneXpert					
		GenoType MTBDRplus/MTBDRsl					
		GenoType MTBC/CM					
25	Controlul extern al calității	CEC microscopie					C
		CEC cultură LJ					C
		CEC cultură mediul lichid					C
		Participare la CEC ABG LJ-anul curent					C
		Participare la CEC ABG mediul lichid. Anul curent					C
		CEC teste de biologie moleculară. Anul curent.					C
26	APARATURA (folosită exclusiv pentru TB)	Microscop optic				Nr. buc	
		Microscop LED-UV				Nr. buc	
		Microscop UV cu lampă de mercur				Nr. buc	

Nr crt	Aspect analizat	Detaliere	DA	NU	Comentarii (x=detaliere)	B/C
		Centrifugă conformă, cu răcire, (FRC realizată: 3000 x g), cu protecție anti-aerosoli			Nr tuburi..... vol tub.....ml	B,C
		Autoclav vertical			x	B
		Termostat 37 ⁰ C (capacitate mc) cu temperatura verificată metrologic și termometru etalonat				C
		Balanța analitică sau tehnică			x	C
		Distilator pentru apă				
		Vortex-agitator				C
		Plită cu termostatare 65-75 ⁰ C pentru uscarea/fixarea frotiurilor				C
		Lămpi UV (fixă/mobilă, nr)				B
		CPM clasa II, sau clasa I				B
		Frigider – pt medii de cultură-			x	C
		Frigider- pt pelevate-capacitate				C
		Service pentru aparatură				B,C
		Centrifuga verificată metrologic				C
		Etalonare termostat, termometre, balanță, greutate, turbidimetru				C
27	Monitorizarea condițiilor de mediu	Temperaturi				C
		Umiditate				C
		Lămpi UV				B
		Încărcătura microbiană suprafețe				B
		Aeromicroflora				B,C
28	Evidența scrisă a controlului sterilizării	Autoclav: Test chimic / biologic				B
		Etuva cu aer cald (pupinel)			Testul:	B,C
		Teste de eficiență a sterilizării disponibile în laborator			x	B
29	APROVIZIONARE Continuă, fără întreruperi	Materiale pentru microscopie				C
		Materiale pentru cultură, stocuri				C
		Mediul solid				
		Mediul lichid				
		Teste de identificare pt cultură (test AgMPT64 disponibil?)				C
		Materiale pentru antibiogramă			Stoc medii	C
		Mediul solid			x	
		Mediul lichid			x	
		Chituri pentru testele genetice				C
		Materiale pentru protecția personalului- echipament (măști- FFP2, mănuși, halate)				B
		Substanțe dezinfectante (ce?)				B,C

Nr crt	Aspect analizat	Detaliiere	DA	NU	Comentarii (x=detaliere)	B/C
30	Decontaminarea materialului infecțios	În laborator				B
		În afara laboratorului, dar în același spital, aceeași adresă				B
		Transportul materialului infecțios la alt laborator (cum, ritm, cine?)				B
31	Condiții de protecție a personalului din laborator	Cabinet protecție microbiologică cu flux de aer laminar și filtru HEPA				B,C
		Lămpi UV funcționale				B
		Măști HEPA, FFP2, cu supapă				B
		Halate cu mâneci lungi				B
		Mănuși de protecție				B
		Norme de biosiguranță respectate				B
		Nici un fel de protecție				
32	Evidența scrisă a accidentelor și a intervențiilor tehnice	Accidente cu risc de contaminare				B
		Întreruperi de curent , apă, gaz				C
33	Evidența dezinfecției încăperilor, suprafețelor	Substanțe folosite			Suprafețe: Aer:	B
34	Monitorizarea stării de sănătate a personalului					B
	Nr persoanelor din laborator bolnave de TBC	în ultimul an / în ultimii 3 ani			/	
35	Circuitul informațional	PC cu imprimantă în lab				C
		Transmit rezultatele și în baza națională de date prin pagina WEB				C
		Transmit rezultate pe biletul de trimitere				C
		Transmit rezultatele prin fax sau telefon direct la medicul solicitant				
36	Timp de eliberare a rezultatelor microscopiei	aceeași zi				C
		după 24 ore				C
		după 48 ore				
37	Biosiguranță/ biosecuritate	Acces controlat în laborator				B
		Posibilitate de transport autorizat al probelor de la bolnavi sau al culturilor				B
		Culturile pozitive sunt în spații încuiate cu cheie				B și /bio-securitate

Nr crt	Aspect analizat	Detaliiere	DA	NU	Comentarii (x=detaliiere)	B/C
38	Autorizare	Autorizație de funcționare a laboratorului valabilă, eliberată fără nici o condiționare pentru activitatea de diagnostic a TB				B,C
39	Acreditare	Laborator acreditat conform ISO 15189			Data:	C

Note:

Rândul 18. Accesul la teste de biologie moleculară se poate realiza local sau prin trimiterea probelor la alt laborator. În evaluare se va face referire doar la testele care se efectuează în laborator, iar dacă nu există dotarea necesară realizării locale, se va menționa laboratorul cu care se colaborează pentru efectuarea acestora.

Rândul 24 și 25. Se va face referire doar la analizele pentru care există dotarea necesară în laborator.

Asigurarea calității

Controlul intern al calității

CIC este un proces complex de monitorizare internă efectivă și sistematică a performanțelor, care garantează că rezultatele oferite de laborator sunt corecte, de încredere și reproductibile^{3,8,9,10}.

Folosirea probelor de spută simulată este o metodă simplă pentru obținerea de informații referitoare la erorile posibile în timpul prelucrării probelor pentru examen microscopic și cultivare. Apreciem contaminarea încrucișată în laborator prin includerea de probe de spută artificială între probele de la pacienți, identificate/numerotate ca și când ar aparține unor pacienți. Probele vor fi prelucrate conform procedurilor de laborator. Se vor analiza rezultatele și se calculează proporția de probe fals pozitive pentru examen microscopic și pentru culturi.

Sputa simulată se prepară astfel: la un litru de soluție 1% de metilceluloză (folosește apă distilată sterilă) se adaugă un ou emulsionat. Soluția se autoclavează și se repartizează câte 25 ml în tuburi sterile pentru centrifugă. Acestea se păstrează la frigider și din fiecare se distribuie în câte 5 recipiente pentru colectarea sputei, identificate cu date fictive. Recipientele cu această „spută” se intercalează în zile succesive printre probele de la pacienți¹¹.

A. Examenul microscopic

Controlul intern al calității examenului microscopic (CIC-M) trebuie să cuprindă toate aspectele care ar putea influența calitatea rezultatelor finale. Este necesar să existe înregistrări care să ateste această activitate, cu rezultatele și măsurile corective dacă acestea au fost necesare, și să poată fi identificată participarea fiecărei persoane din laborator la etapele de lucru^{2,8}. Se realizează prin:

- aprecierea calității produselor patologice prelevate de la bolnavi, la recepția în laborator
- monitorizarea performanțelor tehnicii de colorare
- monitorizarea calității reactivilor

- monitorizarea performanțelor echipamentului
- monitorizarea tehnicii de citire și a corectitudinii rezultatelor.

Deși CIC-M nu se limitează doar la recitirea frotiurilor și verificarea colorației (a se vedea și F1-fișa de autoevaluare), prezentăm mai jos un model de fișă pentru consemnarea rezultatelor CIC pentru microscopie. (Fișa 2).

Fișa 2. Controlul intern al calității pentru examenul microscopic

Nr crt	Prima citire					Recitare				Observații
	Data	Colorația	Nr frotiu	Rezultat	Inițiale cititor	Data	Colorația	Rezultat	Inițiale cititor	
1										
2										
3										
4										
5										

La recitare se va completa dacă frotiul a fost recolorat ZN în situația în care colorația inițială a fost cu auramină O sau auramină-rodamină (F=fluorescentă). În coloana pentru numărul frotiului se scrie numărul din registru sau Control pozitiv/Control negativ, în funcție de situație. Semestrial se face analiza rezultatelor CIC-M cu încadrarea lor în categoriile de mai jos (Fișa 3).

Fișa 3. Clasificarea erorilor pentru examenul microscopic¹²

REZULTATE ORIGINALE	REZULTATELE RECITIRII				
	Negativ	1-9 BAAR/ 100 câmpuri microscopice	1+	2+	3+
Negativ	CORECT	SFN	IFN	IFN	IFN
1-9 BAAR/100 câmpuri microscopice	SFP	CORECT	CORECT	EN	EN
1+	IFP	CORECT	CORECT	CORECT	EN
2+	IFP	EN	CORECT	CORECT	CORECT
3+	IFP	EN	EN	CORECT	CORECT

CORECT = rezultat identic, sau diferențe la limita de încadrare în categoria de rezultat, care țin de inomogenitatea sputei, situație care se întâlnește mai ales în cazul examenului direct. Exemplu: prima citire 8 BAAR/100 câmpuri microscopice, iar la recitare 1+, prin vizualizarea a 12 BAAR/ 100 câmpuri microscopice; în aceste situații se scrie numărul exact de bacili sau unități formatore de colonii (UFC) vizualizate. În același exemplu, dacă la recitare se vizualizează însă peste 50 BAAR/100 câmpuri microscopice, este neceară atenționarea primului cititor deoarece în timp se poate ajunge la erori de numărare prin citirea unui număr insuficient de câmpuri.

Greșeli minore (atrag atenția asupra unui examen superficial și necesită reinstruire pentru corectarea la timp).

EN = eroare de numărare a BAAR

SFP = slab fals pozitiv

SFN = slab fals negativ

Este necesară recitirea de către un alt evaluator pentru identificarea cauzei diferenței de citire. De cele mai multe ori este vorba de citirea unui număr insuficient de câmpuri microscopice sau examinator neexperimentat.

Greșeli majore (necesită corectare imediată, prin reinstruire practică în laboratorul supraordonat).

IFP = înalt fals pozitiv

IFN = înalt fals negativ

Necesară recitirea de către alt evaluator pentru identificarea cauzei diferenței de citire.

*Scorul calității pentru microscopie*¹²

1. Se calculează acordând 10 puncte pentru fiecare rezultat corect, 0 puncte pentru rezultatele greșite și câte 5 puncte pentru erorile de numărare. La recitirea a 10 frotiuri, scorul acceptat este de cel puțin 90. De obicei acest mod de apreciere se folosește pentru CEC atunci când se recitesc 10 frotiuri.
2. Dacă în intervalul de evaluare (6 luni) se recitesc mai mult de 50 frotiuri, se calculează procentul de concordanță a rezultatelor: (total rezultate concordante pozitive și negative x100)/ total frotiuri examinate. Concordanța trebuie să fie mai mare de 90%¹². Concordanța mai mică de 90% impune analiza situației și aplicarea de măsuri corective, de cele mai multe ori fiind necesară reinstruirea personalului.

Indiferent de modul de calcul al scorului, se menționează erorile minore pentru aprecierea îmbunătățirii în timp a calității examenului microscopic.

Prepararea frotiurilor pentru CIC-M

Frotiurile pentru CIC se prepară în laborator, astfel⁸:

Frotiuri BAAR pozitiv

- Se rețin eșantioane de spută (se pot amesteca mai multe spute cu rezultat intens pozitiv BAAR) în care au fost evidențiați BAAR și se prepară după cum urmează, frotiuri pozitive pentru control, care se vor păstra după fixare în cutii închise, la întuneric, la temperatura camerei
- La 1 ml spută se adaugă 1 picătură (0,05 ml) formol 40%, se amestecă, se lasă 1 oră la temperatura camerei
- Se adaugă 1 ml NaOH 4%, se agită
- După 5 minute se adaugă apa distilată până la 20 ml
- Se amestecă
- Se incubează timp de o oră la 55-60⁰ C pe plita termostată, într-un vas cu apă
- Se adaugă apă distilată până la 40 ml, se agită
- Se centrifughează timp de 20 minute la 3000xg
- Se înlătură supernatantul
- Sedimentul se resuspendă în 3-5 ml apă distilată
- Se fac frotiuri subțiri, uniforme ca grosime și dimensiune, care se usucă și se fixează.
- Se marchează lamele: Control Pozitiv BAAR.
- Se păstrează la întuneric, în cutii speciale, marcate: Frotiuri BAAR pozitiv pentru CIC-M.

Frotiuri BAAR negativ

- Se procedează ca mai sus, prelucrând spute pentru care s-au obținut rezultate negativ BAAR.
- Singura diferență: incubarea la 55-60⁰ C este de 10 minute pentru produsul negativ, față de 1 oră pentru cel pozitiv BAAR.
- Se marchează lamele : Control Negativ BAAR. Se păstrează la întuneric, în cutii speciale, marcate: Frotiuri BAAR negativ pentru CIC-M.

Note:

Dată fiind sensibilitatea mică a examenului microscopic și a faptului că frotiurile de control sunt preparate din spută în care nu au fost vizualizați BAAR, nu este exclus ca unele frotiuri negative de control să conțină câțiva BAAR. În astfel de situații se va examina imediat câmpul respectiv și de alt examinator. Prezența unui BAAR pe un frotiu de control negativ la un moment dat nu semnifică neapărat deficiențe de tehnică. Rezultatele se analizează critic.

Chiar dacă sputele sunt inactivate iar frotiurile fixate, nu se poate garanta lipsa infecțiozității acestora, motiv pentru care lamele cu frotiurile de control, ca de altfel și lamele cu frotiurile preparate din produsele recoltate de la bolnavi, se vor mânui cu atenție.

B. Cultura

Este necesar să existe proceduri și înregistrări care să documenteze realizarea CIC pentru culturi³. Trebuie verificate atât mediile de cultură solide cât și cele lichide folosite în laborator. Vor fi prezentate în continuare modele (Fișa 4, Fișa 5) pentru acestea⁸.

a. Calitatea mediilor de cultură

- Se ține evidența datei intrării în laborator a mediilor de cultură
- Până la folosire, mediile solide se păstrează la frigider (4-8°C)
- Mediile lichide se păstrează la temperatura camerei sau respectând recomandările producătorului.
- Se notează pentru fiecare zi de lucru lotul de mediu folosit
- Înainte de numerotarea tuburilor se verifică aspectul macroscopic al mediului (culoare, aspect, grad de hidratare pentru mediul solid, respectiv prezența suspensiilor sau aspectul turbure al mediilor lichide), consemnând rezultatul în caietul de CIC- culturi

Se vor elimina tuburile care au mediul deshidratat, cu pete de culoare galbenă sau verde închis, cu aspect spongios, suprafața pantei anfractuoasă, respectiv tuburile fisurate sau cu mediul lichid turbure. Toate aspectele menționate se scriu în caietul de CIC-C.

În momentul ridicării tuburilor LJ însămânțate în poziție verticală se va face programarea citirii culturilor, cu fixarea unei etichete pe stativul cu tuburi. După terminarea perioadei de incubare toate aceste etichete se păstrează în ordine, îndosariate, iar pe baza lor se completează datele în Fișa 4, prezentată mai jos.

- b. **Controlul prelucrării probei** se face la schimbarea lotului de soluții folosite pentru decontaminare (NaOH 4 %, HCl 8% sau fosfat monopotasic 15 %, albastru de bromtimol; sau NaOH-NALC, tampon fosfat). Din produsul omogenizat rezultat după decontaminarea a 10 spute alese la întâmplare, după însămânțarea obișnuită pe tuburile cu mediu Lowenstein Jensen sau și în mediul lichid, se însămânțează câte 10 microlitri pe mediul geloză – sânge (cu câte o ansă de unică folosință). După incubare la 37° C, a doua zi se numără coloniile crescute.

Este acceptabil să crească 1-3 colonii. Se notează rezultatul în caietul de CIC-C, cu numărul culturii.

Rezultatele furnizate din analiza calității mediului se vor corela cu rezultatele citirii culturilor și cu rezultatele controlului decontaminării.

Fișa 4. Controlul intern al calității mediului de cultură Lowenstein Jensen

LUNA.....anul.....ziua inițierii controlului.....
Lot de mediu.....produs data.....expiră data.....
Producător.....
Data recepției în laborator.....
Data intrării în lucru a lotului.....Data epuizării lotului.....

a. Controlul sterilității mediului Lowenstein Jensen

Număr total de tuburi verificate înainte de folosire în luna în curs	Număr tuburi corespunzătoare la verificarea preliminară	Nr tuburi infectate		Mediu spongios, deshidratat, dezlipit de pereții tubului
		Înainte de folosire	După incubare, pentru verificarea sterilității	
100%	%	%	%	%

b. Controlul calității nutritive a mediului

Control	Nr.colonii crescute pe fiecare tub, câte 0.2 ml ATCC <i>M.tuberculosis</i> din diluțiile:									
Zile	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
21 zile										
30 zile										

Se folosește tulpina *M tuberculosis* ATCC 25177, suspensie de 1 mg/ml, în diluții de 10⁻⁴ și 10⁻⁶, cu însămânțarea a câte 0,2 ml în 4-5 tuburi din fiecare diluție.

c. Timpul de creștere și contaminarea culturilor⁸.

Luna:.....Lotul de mediu.....

Total Nr culturi LJ	Total Nr tuburi LJ	Culturi pozitive la				Culturi Contam la			Tuburi Contam la		
		21	30	45	60	72h	21z	>30z	72h	21z	>30z
100 %	100%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%

Note: h: ore; z: zile

Se va completa câte o astfel de fișă pentru fiecare lună, indiferent cât timp se folosește un lot de mediu. Dacă în aceeași lună se folosesc mai multe medii de cultură, se va completa câte o fișă pentru fiecare lot, cu menționarea intervalului de timp. Controlul calității nutritive a mediului se verifică o singură dată pentru un lot de mediu, la începutul folosirii lui și doar suplimentar dacă este în apropierea perioadei de expirare.

Datele se pot înregistra în bază de date Excel, fiind posibilă analiza tendinței rezultatelor în timp.

d. Controlul intern al calității mediului de cultură Middlebrook 7H9

Fișa 5. Controlul intern al calității mediului de cultură Middlebrook 7H9

Sistemul automat de cultivare.....Data inițierii controlului.....

Timp de pozitivare Zile	0.5 ml ATCC <i>M.tuberculosis</i> din diluțiile:											
	Lot vechi.....			Lot nou.....			Lot vechi.....			Lot nou.....		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
<7												
7-14												
14-21												
>21 zile												
Media timpului realizat												

Se însămânțează câte 0,5 ml din diluțiile zecimale ale tulpinii de referință ATCC *M.tuberculosis* 25177 la schimbarea lotului de mediu, însămânțând câte 3 tuburi din lotul vechi și câte 3 tuburi din lotul nou din diluțiile 10⁻⁴ și 10⁻⁵ a suspensiei bacteriene etalonate la turbiditate de 1 unitate McFarland. Se vor compara rezultatele care se obțin pentru același lot de mediu la începutul folosirii și la terminarea lui. Rezultatele ar trebui să nu se modifice semnificativ statistic atâta timp cât mediul este în termen de valabilitate și a fost păstrat în condițiile recomandate de producător, iar controlul a fost efectuat de executant experimentat.

Datele se pot înregistra în bază de date Excel, fiind posibilă analiza tendinței rezultatelor în timp.

Controlul extern al calității (CEC)

Permite verificarea obiectivă a performanțelor laboratorului prin compararea rezultatelor proprii cu cele obținute în alte laboratoare. Evaluarea rezultatelor se poate face pentru o singură rundă de participare sau pentru mai multe participări, cu aprecierea evoluției în timp. Este parte indispensabilă a sistemului de management al laboratorului deoarece certifică rezultatele de calitate pe care acesta le oferă pentru analizele efectuate³. Evaluarea performanțelor (scorul) pentru rezultatele calitative, cum sunt cele oferite de laboratoarele de micobacteriologie, se face prin transformarea rezultatelor în date cuantificabile, conform unor criterii prestabilite¹³. Analiza rezultatelor CEC se poate face pentru o rundă de participare sau se poate face analiza evoluției rezultatelor în timp; în primul caz pot fi identificate probleme serioase de validare a metodelor sau în realizarea CIC; în timp ce analiza în timp identifică probleme potențiale datorate erorilor umane sau erorilor sistematice¹⁷. Participarea la scheme de CEC ajută la îmbunătățirea continuă a performanțelor laboratorului, care trebuie să păstreze înregistrările respective.

Concordanța rezultatelor trebuie să fie mai mare de 90% pentru examenul microscopic¹².

Se consideră rezultate acceptabile ale antibiogramelor în cadrul CEC atunci când concordanța rezultatelor este de cel puțin 90% pentru toate substanțele testate. Rezultate cu valori mai mici decât acestea necesită acțiuni corective imediate. Sunt inacceptabile valori ale concordanței mai mici de 80%.^{14,14b}. La aprecierea concordanței rezultatelor obținute trebuie să se țină seama și de

metoda de testare folosită în fiecare laborator, concentrațiile critice ale substanțelor anti-TB față de care s-a testat panelul de tulpini, criteriul de definire a rezistenței/sensibilității, substanțele anti-TB pentru care se face compararea rezultatelor.^{14a, 14b}

Fișa 6. Participarea la scheme de comparări interlaboratoare^{3,6, 9,10}

Data		Organizatorul de schemă de control	Procedura evaluată	Rezultate		Comentarii
Primirii probei	Primirii evaluării			De referință	Raportate de laborator	

Tabelul se completează pe măsura primirii rezultatelor de la organizatorul de schemă de comparare interlaboratoare. Întocmirea unui fișier Excel permite menținerea la zi a situației evaluărilor, cu tipărirea după fiecare înregistrare nouă. La comentarii se va nota succint dacă au fost necesare măsuri corective și în ce au constat.

Monitorizarea tendințelor

Este necesară în cadrul sistemului de asigurare a calității pentru a face posibilă evidențierea deviațiilor de la limitele stabilite și orientează aplicarea acțiunilor corective^{3,6,15}. (Fișele 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Populația deservită și nivelul endemiei în zonă determină nivelul de bază în jurul căruia vor varia rezultatele. Centralizarea datelor se face la sfârșitul anului și se comunică la LNR coordonator în formatul solicitat de către acesta.

Fiecare laborator își analizează lunar datele pentru volumul de lucru:

- Nr. total de probe procesate prin fiecare metodă
- Nr. total și % de probe pozitive pentru fiecare metodă folosită
- Nr. total și % de probe negative pentru fiecare metodă folosită
- Nr. total și % de contaminare bacteriană a tuburilor de cultură

Pentru culturile pozitive:

- Nr. total și % de culturi pozitive pentru Complex TB
- Numărul total și % de probe pozitive pentru Complex TB la cazurile noi
- Nr. total și % de culturi pozitive pentru NTM
- Durata medie de detectare Complex TB

Monitorizarea modificărilor sau devierilor de la modelul stabilit³:

- *Tendențe în scădere*: pot indica probleme de proceduri. Este necesară analiza și aplicarea de măsuri corective. Scăderea ratei pozitivității microscopiei poate indica erori la prelucrarea produsului, erori de colorare sau citire; scăderea ratei pozitivității culturilor se poate datora deficiențelor de prelucrare (decontaminare agresivă), calității mediului de cultură sau deficiențelor în instruirea personalului, cu nerespectarea procedurii de lucru.
- *Constante*: Uniformitate în procedurile de laborator. Nu necesită acțiuni.
- *Tendențe în creștere*: procedura s-a îmbunătățit. Stabilirea de noi standarde/indicatori țintă. Interpretarea trebuie să fie prudentă deoarece creșterea proporției rezultatelor

pozitive pentru microscopie se poate datora unor rezultate fals pozitive prin contaminarea reactivilor, contaminarea încrucișată a lamelor, erori la citirea frotiurilor¹¹; creșterea ratei pozitivității culturilor poate să fie datorată contaminării încrucișate¹¹ (rezultat fals pozitiv), a contaminării reactivilor sau contaminare în timpul recoltării. Creșterea ratei contaminării culturilor semnifică deficiențe de tehnică sau calitate necorespunzătoare a mediului, fiind necesară corelarea cu rezultatele CIC efectuate pentru mediul de cultură.

- Trebuie să existe concordanță între rata de pozitivitate a examenului microscopic și a culturilor.
- În cazul rezistenței detectate prin ABG, modificările de tendință pot indica deficiențe de tehnică, defecțiuni ale echipamentului folosit, calitatea necorespunzătoare a mediului folosit, erori de interpretare a rezultatelor.

Datele se pot centraliza în fișier Excel, fiind astfel ușurată analiza lor și reprezentarea grafică.

Volumul de lucru

Aprecierea necesarului de personal, a instruirilor necesare pe categorii de investigații, dar și calcularea cantităților de materiale de laborator necesare sunt posibile prin centralizarea datelor completate în Fișa 7 și, acolo unde este cazul, în fișa 8.

Fișa 7. Volumul de lucru și rezultatele pentru examenul microscopic și culturi în mediul Lowenstein Jensen

	Total M	Total rezultate Pozitiv BAAR	% rezultate BAAR pozitiv	Total bolnavi Cazuri noi (Suspect TB)	Total CN cu rezultat pozitiv BAAR	Total Cult LJ	Total rezultate Poz cult LJ	% rezultate pozitive Cult LJ	% tuburi LJ conta- minate	Total boln Cazuri noi cu Cult LJ	Total boln CN Cult LJ poz	% rezultate MTB pozitiv la CN
Ian												
Feb												
Mart												
Apr												
Mai												
Iun												
Iul												
Aug												
Sept												
Oct												
Nov												
Dec												
TOTAL												

Deoarece toate laboratoarele sunt obligate să continue efectuarea de examinări microscopice și culturi în mediul LJ la toți bolnavii, vor completa datele în Fișa 7.

Fișa 8. Volumul de lucru și rezultatele pentru examenul microscopic și culturi în mediul lichid Middlebrook 7H9*

	Total M	Total rezultate Pozitiv BAAR	% rezultate BAAR pozitiv	Total bolnavi Cazuri noi (Suspect TB)	Total CN cu rezultat pozitiv BAAR	Total Cult lichid	Total rezul- tate Poz cult lichid	% rezultate pozitive MTB Cult lichid	% rezultate NTM pozitiv în mediul lichid	% tuburi lichid conta- minate	Total boln Cazuri noi cu Cult lichid	Total boln CN Cult lichid poz	% rezultate MTB pozitiv în mediul lichid la CN
Ian													
Feb													
Mart													
Apr													
Mai													
Iun													
Iul													
Aug													
Sept													
Oct													
Nov													
Dec													
TOTAL													

*Fiecare laborator care efectuează cultivare în mediul lichid va completa datele pentru sistemul de cultivare pe care îl deține.

În Fișa 8 vor fi completate rezultatele pentru microscopie doar pentru cazurile și produsele care au efectuată cultura în mediul lichid. Dacă se folosesc mai multe sisteme de cultivare, se vor completa fișe diferite cu datele pentru fiecare sistem în parte.

La numărul de cazuri pozitive la examenul microscopic sau cultură se consideră *caz pozitiv* indiferent dacă același pacient are rezultat pozitiv la unul sau mai multe eșantioane recoltate, indiferent de tipul de produs prelucrat.

CN: caz nou, examinat ca suspect de TB.

Rata (%) de pozitivitate a examenului microscopic al sputei pentru suspecții de TB (examinați în categoria CN) ar trebui să fie în jur de 10%¹⁶.

Se va face analiza lunară separată pe tipuri de produse patologice prelucrate. Vor exista diferențe de confirmări bacteriologice prin microscopie și cultură atât pentru spută, dar mai ales pentru produsele patologice extrapulmonare.

Indicatori pentru înregistrări și relații cu clienții

Laboratorul trebuie să-și monitorizeze performanțele realizate și pentru activitățile pre și post examinare, să le exprime ca indicatori ai calității, să facă analiza periodică a lor și să aplice măsuri corective dacă este necesar³.

Fișa 9. Indicatori pentru înregistrări. Relații cu clienții. Anul.

Luna	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	TOTAL
Indicator realizat/ ținta													
Număr probe acceptate și prelucrate													
Probe respinse/ Max. 1% / an													
Erori la înregistrări preexaminare / Maxim 1% / an													
Erori la înregistrări la procese postexaminare/maxim 1%/an													
Număr buletine de analiză retrase/ Max 3 / an													
Număr reclamații/ < 10 /an													
Satisfacția clienților/ > 95% multumiți													

Indicatorii consemnați în înregistrări ne ajută să apreciem necesitățile de instruire a personalului (clinic și de laborator) și atenția sa la completarea documentelor, la recepția probelor și în timpul înregistrărilor. Ținta este orientativă și va fi stabilită de fiecare laborator în parte după o perioadă de observare.

Timpul de diagnostic

Fișa 10. Timpul de eliberare a rezultatelor pentru examenul microscopic¹⁷ și rata de detecție a cazurilor noi prin microscopie și cultură

Luna	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	TOTAL
Indicator realizat/ ținta													
Timpul de eliberare rezultat microscopie/ ≤ 24 h de la recepția probei , 85%													
Rata de pozitivitate pentru spută în microscopie la cazurile noi / $>6\%$													
Rata de pozitivitate în culturi LJ la cazuri noi / $>8\%$													

Este de dorit ca produsele recoltate de la pacienți să ajungă la laborator în aceeași zi, pentru a putea fi prelucrate.

Pentru *timpul de eliberare a rezultatelor microscopiei* (fișa 10) se calculează media timpului de la recepția probelor în laborator până la eliberarea rezultatelor, pentru toate probele prelucrate într-o lună.

Trebuie ca laboratorul să ofere rezultatul examenului microscopic cât mai repede posibil, chiar în aceeași zi¹⁷. Dezideratul este realizabil doar pentru probele care intră în laborator în intervalul de timp care permite prelucrarea lor în cadrul programului de activitate. Prelungirea intervalului datorită transportului întârziat la laborator necesită corectare prin colaborarea mai bună între clienți și laborator.

Fișa 11. Timpul de diagnostic pentru cultura în mediul Lowenstein Jensen. Ținte.

Luna	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	TOTAL
Indicator realizat/ ținta													
Total culturi pozitive													
la 21 zile/ $>65\%$													
la 22-30 zile/ $>15\%$													
la 45 zile/ $<10\%$													
la 60 zile/ $<10\%$													
Rata de contaminare (tuburi)/ $2-6\%$													

Ratele de pozitivitate, respectiv procentul de depistare a cazurilor pozitive între suspecții de TB, ne ajută la calcularea necesarului de materiale de laborator. Ele sunt diferite în zone geografice diferite, cu variații largi¹⁶, fiind necesar să cunoaștem rata pentru țara noastră.

Timpul de eliberare a rezultatelor pentru cultură (fișa 11) se extrage din fișa 4, punctul c.

Rata de contaminare calculată pe număr de tuburi cu mediul LJ însămânțate ar trebui să fie cuprinsă între 2-6%. Totuși, dacă produsele nu sunt prelucrate în aceeași zi, chiar dacă sunt transportate și păstrate în condiții corespunzătoare, rata de contaminare poate ajunge până la 10%¹⁸. Valori < 2% indică decontaminare agresivă prin prelungirea timpului de contact a sputei cu substanțele folosite pentru decontaminare, folosirea de reactivi reci (luați din frigider, fără echilibrare termică prealabilă), centrifuga fără răcire.

Fișa 12. Timpul de diagnostic pentru cultura în mediul Middlebrook 7H9 în sistemul.....

Luna	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	TOTAL
Indicator realizat/ ținta													
Total tuburi însămânțate													
Total tuburi pozitive MTB													
Pozitiv la 1- 7 zile													
Pozitiv la 8-14 zile													
Pozitiv la 15-21 zile													
Pozitiv la 22-30 zile													
Pozitiv la 31-42 zile													
Tuburi contaminate													
Pozitiv NTM													

Media timpului de pozitivitate a culturilor pe mediul lichid ar trebui să se situeze în jurul a 17 zile¹⁹.

Rata de contaminare, calculată ca: (număr de tuburi contaminate x100) împărțit la totalul tuburilor însămânțate, ar trebui să se situeze între 3-10%¹⁶. Valori > 10% semnifică prelucrarea incompletă a specimenului, mediu sau reactivi contaminați, prelungirea intervalului dintre recoltare și prelucrare, păstrarea sau /și transportul probei la temperatură mai mare de 10°C. Valori < 3% indică decontaminare agresivă prin prelungirea timpului de contact al sputei cu substanțele folosite pentru decontaminare, folosirea de reactivi reci (luați din frigider, fără echilibrare termică prealabilă), centrifuga fără răcire.

Indicatori de performanță pentru PNPSCT

Aprecierea performanțelor PNPSCT este posibilă prin analiza indicatorilor din Ghidul metodologic de implementare a programului național de prevenire, supraveghere și control al tuberculozei²⁰. Se va completa la nivel județean, cu trimitere trimestrială la LNR atât Fișa 13, cât și fișa 14, pentru cazurile suspecte TB examinate, respectiv pentru pacienții examinați pentru monitorizarea tratamentului.

Fișa 13. Numărul persoanelor suspecte de TB cărora li s-au efectuat examene bacteriologice pentru diagnostic

Indicatorul	Luna												Total anual
A. Suspecți de TB	I	II	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
1.1.Nr persoane cărora li s-au efectuat examinări prin met convențională (microscopie și cultură LJ)													
1.2.Nr persoane cărora li s-a efectuat examen prin met convențională ABG-LJ linia I													
1.2.1. Număr personae cu ABG linia I depistate MDR													
1.3.Nr persoane cărora li s-au efectuat examinări prin met convențională ABG LJ linia I+ linia II													
1.3.1. Număr persoane cu ABG linia I+ linia II depistate MDR													
1.3.2. Număr persoane cu ABG linia I+ linia II depistate XDR													
2. Nr persoane cărora li s-au efectuat cultura și ABG folosind medii lichide													
2.1. Nr persoane cărora li s-a efectuat cultura folosind medii lichide													
2.2. Nr persoane cărora li s-a efectuat ABG folosind medii lichide													

Indicatorul	Luna												
A. Suspecți de TB	I	II	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Total anual
2.3. Nr persoane depistate MDR prin ABG folosind medii lichide													
3. Număr persoane cărora li s-au efectuat teste de biologie moleculară pentru diagnostic de TB													
3.1. Număr pers examinate prin metoda GeneXpert MTB/Rif													
3.1.1. Număr persoane examinate prin metoda GeneXpert MTB/Rif depistate cu MTBC													
3.1.2. Număr persoane examinate prin metoda GeneXpert MTB/Rif depistate cu rezistență RMP													
3.2. Număr persoane examinate prin metoda LPA (GenoType)													
3.2.1. Număr personae examinate prin LPA MTBDRplus, depistate MDR													

Fișa 14. Numărul persoanelor cu TB cărora li s-au efectuat examene bacteriologice pentru monitorizarea tratamentului

Indicatorul	Luna												
B. Monitorizare	I	II	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Total anual
1.1.Nr persoane cărora li s-au efectuat examinări prin met convențională (microscopie și cultură LJ)													
1.2.Nr persoane carora li s-a efectuat examen prin met convențională ABG-LJ linia I													
1.2.1. Număr persoane cu ABG linia I depistate MDR													
1.3.Nr persoane cărora li s-au efectuat examinări prin met convențională ABG LJ linia I+ linia II													
1.3.1. Număr persoane cu ABG linia I+ linia II depistate MDR													
1.3.2. Număr persoane cu ABG linia I+ linia II depistate XDR													
2. Nr persoane cărora li s-au efectuat cultura și ABG folosind medii lichide													
2.1. Nr persoane cărora li s-a efectuat cultura folosind medii lichide													
2.2. Nr persoane cărora li s-a efectuat ABG folosind medii lichide													

Indicatorul	Luna												
B. Monitorizare	I	II	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Total anual
2.3. Nr persoane depistate MDR prin ABG folosind medii lichide													
3. Număr persoane cărora li s-au efectuat teste de biologie moleculară indirecte pentru diagnostic de TB (din culturi)													
3.1. Număr persoane examinate prin metoda LPA (GenoType)													
3.1.1. Număr persoane examinate prin LPA GenoType MTBDRplus, depistate MDR													

APRECIEREA PERFORMANȚELOR TESTELOR DE DIAGNOSTIC

La introducerea de metode noi în practica de rutină, dar și pentru evaluarea periodică a impactului rezultatelor testelor diagnostice folosite în mod curent este utilă calcularea unor indicatori de performanță, cel puțin la nivelul laboratoarelor de referință.

Compararea rezultatelor examenului microscopic și al culturilor, la cazurile noi, investigate pentru diagnostic Analiza se va face separat pentru cultura în mediul solid și în mediul lichid, pentru fiecare sistem de cultivare.

Se vor analiza exclusiv rezultatele obținute pentru sputa emisă spontan, trimisă în scop diagnostic, la T0, de la pacienții adulți.

- a. Frotiu BAAR pozitiv- cultură pozitivă
- b. Frotiu BAAR pozitiv – cultură neefectuată
- c. Frotiu BAAR negativ- cultură pozitivă
- d. Frotiu BAAR pozitiv- cultură negativă
- e. Frotiu BAAR pozitiv- cultură contaminată
- f. Frotiu neefectuat și cultură pozitivă

Cultura este mai sensibilă decât microscopia și este de așteptat să contribuie cu cel puțin 20% la confirmarea bacteriologică a cazurilor de TB pulmonară la adulți.
--

Din datele colectate se calculează următorii indicatori:

- Contribuția culturii la diagnostic: $(c+f) \times 100 : (a + b + c + d + e + f)$
- Contribuția culturii la diagnostic, în plus față de microscopie: $c \times 100 : (a + c + d + e)$
- Procentul rezultatelor frotiu pozitiv BAAR și cultură negativă la momentul diagnostic (T0): $d \times 100 : (a + c + d + e)$
Acest procent ar trebui să fie extrem de scăzut, de până la 2-3 %. Pacienți cu rezultate persistente de frotiu pozitiv BAAR și cultură negativă la diagnostic sunt de obicei cazuri tratate deja, dar cu formulare de solicitare incorect completate, de aceea este necesară clarificarea situației pacientului. Procentul mai mare se poate datora procedurii agresive de decontaminare sau transportului necorespunzător, întârziat al produselor la laborator.

Semnale de alarmă

Indicatorii care urmează (fișa 15 și fișa 16) se aplică sputelor provenite de la cazurile suspecte de TB pulmonară la adulți, investigate pentru diagnostic, și nu se aplică pentru examinările din perioada de monitorizare.

Fișa 15 Indicatori de performanță pentru culturi

Indicator	Valori acceptate (%)	Valori mai mari, se verifică ^a :	Valori mai mici, se verifică ^a :
Contribuția culturii la diagnosticul bacteriologic al TB	20	A	B și C
Procentul rezultatelor frotiu pozitiv BAAR și cultură negativă	2-3	C și D	Nici o acțiune necesară
Procentul tuburilor cu contaminare	2-10	E	F

a: vezi explicațiile în Fișa 16.

Fișa 16. Activități care trebuie investigate în funcție de valorile indicatorilor de performanță pentru culturi

A	• Erori la citirea frotiurilor: fals negativ BAAR • Procent mare a cazurilor de TB pulmonară în fază incipientă sau spute de la copii
B	• Folosirea inadecvată a cultivării: examinarea unor pacienți care nu sunt suspecti de TB, mai degrabă decât forme incipiente de TB.
C	• Întârziere excesivă între colectarea sputei și prelucrarea ei, • Decontaminare agresivă (concentrație prea mare sau contact prelungit cu agentul decontaminant) • Forță relative de centrifugare prea mica sau supraîncălzirea rotorului centrifugii. • Mediu de cultură cu calitate inadecvată (LJ inomogen, coagulat la temperature prea mare, concentrație prea mare a verdelui malachit, pH prea acid), perioadă de expirare depășită. • Incubare la temperature prea mare sau variații ale temperaturii în cursul incubării. • Încadrarea greșită a pacientului în categoria de caz (monitorizare trimisă ca T0)
D	• Erori la citirea frotiurilor: fals pozitiv BAAR
E	• Păstrarea sputelor la temperatură neadecvată • Întârziere excesivă între colectarea și prelucrarea sputelor • Concentrație mică a substanței decontaminante • Timp de contact prea scurt între sputa și substanța decontaminantă • Deficiențe în procedura de sterilizare • Spațiu aglomerat, cu miscarea persoanelor în zona de lucru, generarea de curenți de aer prin fantele de aerisire sau sistemul de aer condiționat
F	• Concentrație prea mare a substanței decontaminante • Timp de contact prea lung între sputa și substanța decontaminantă • Neutralizare incorectă a produsului decontaminat • Concentrație prea mare a verdelui malachit în mediul LJ • Incubare la temperature prea mare sau variații ale temperaturii în cursul incubării.

Indicatorii sunt colectați la nivelul LNR și contribuie la evaluarea întregii rețele de laboratoare sub aspectul eficienței, acurateței activității de diagnostic și al cercetării operaționale.

Bibliografie

1. J. Zinn, A Zalokowski, L. Hunter. Identifying indicators of laboratory management performance: a multiple constituency approach. *Health Care Manage Rev*, 2001,26(1), 40-53.
2. TB laboratory quality management systems toward accreditation harmonized checklist. FIND. TB SLMTA/v1.0/00/ Introduction/ TB LQMS.
3. SR EN ISO 15189: 2013. Laboratoare medicale- cerințe pentru calitate și competență, ASRO.
4. Compendium of Indicators for Monitoring and Evaluating National Tuberculosis Programs.WHO/HTM/TB/2004.344
5. Phyllis Della-Latta , Ken Jost, Glenn D. Roberts, Dale Schwabb, Anthony Tran, Gail Woods, Loretta Gjeltene, Beverly Metchock, Max Salfinger, Julie Tans-Kersten, David Warshauer, Kelly Wroblewski. *Mycobacterium Tuberculosis: Assessing Your Laboratory*, 2009 Edition
6. A practical handbook for national TB laboratory strategic plan development. Febr.2014. TB care, USAID, KNCV, IUATLD, CDC, MSH, GLI.
7. TB CARE I –EQA Package <http://www.tbcare1.org/publications/tools> EQA Overview Module
8. Daniela Homorodean, Olga Moldovan, Daniela Diculencu, Grațîela Chiriac, Ionela Muntean, coord I.M.Popa. *Îndrumar de tehnici de laborator de bacteriologie BK-* București 2005, ISBN 973-0-04173-3
9. CLSI. 2007. GP27-A2 Using Proficiency Testing to Improve the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Second Edition. In M. Daniel W. Tholen (ed.). *American Association for Laboratory Accreditation*
10. CLSI. 2010. GP35-A Development and Use of Quality Indicators for Process Improvement and Monitoring of Laboratory Quality; Approved Guideline Clinical Laboratory Standards Institute, First Edition ed. University of British Columbia
11. A-M. Demers, A. Boulle, R. Warren, S. Verver, P. van Helden, M. A. Behr, D. Coetzee. Use of simulated sputum specimens to estimate the specificity of laboratory-diagnosed tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010,14(8):1016–1023
12. John Ridderhof, Rosemary Humes, Fadila Boulahbal. External quality assessment for AFB smear microscopy. 2000. PHL, CDC, IUATLD, KNCV, RIT, WHO.
13. Eurachem: Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes. Second edition 2011.
14. A. Laszlo, M. Rahman, M. Espinal, M. Raviglione. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994–1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002, 6(9):748–756
- 14a. Sayera Banu, S. M. Mazidur Rahman, M. Siddiqur Rahman Khan, Sara Sabrina Ferdous, Shahriar Ahmed, Jean Gratz, Suzanne Stroup, Suporn Pholwat, Scott K. Heysell, Eric R. Houptb. Discordance across Several Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Single Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, January 2014 Volume 52(1), 156–163 .
- 14b. David J.Horne, Lancelot M. Pinto, Matthew Arentz, S.Y. Grace Lin, Edward Desmond, Laura L. Flores, Karen R Steingart, Jessica Minion. Diagnostic accuracy and

- reproducibility of WHO endorsed phenotypic susceptibility testing methods for first-line and second line antituberculosis drugs. JCM, Febr 2013: 51(2), 393-401.
15. McCarthy, K., Metchock B., et al. 2008. Monitoring the performance of mycobacteriology laboratories: a proposal for standardized indicators. *Int J Tuberc Lung Dis* Sept 12:1015-1020.
 16. Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim SJ, Van Deun A, Trebuck A- The public Health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network, IUATLD, 1998.
 17. World Health Organization, 2011. Same-day diagnosis of tuberculosis by microscopy: policy statement. ISBN 978 92 4 150160 6
 18. Concepcion F. Ang, RMT, Myrna T. Mendoza, MD, Heidi R. Santos, Regina Celada-Ong, Carmela P. Enrile, Wilma C. Bulatao and Aileen M. Aguila. Isolation Rates of Mycobacterium tuberculosis from Smear-negative and Smear-positive Sputum Specimen Using the Ogawa Culture Technique and the Standard Lowenstein Jensen Culture Technique. www.researchgate.net, Sept 2014.
 19. Frances C. Tyrrell, Gary E. Budnick, Thor Elliott, Laura Gillim-Ross, Mary V. Hildred, Peggy Mahlmeister, Nicole Parrish, Michael Pentella, Jolene Vanneste, Yun F. (Wayne) Wang, Angela M. Starks . Probability of Negative Mycobacterium tuberculosis Complex Cultures Based on Time to Detection of Positive Cultures: a Multicenter Evaluation of Commercial-Broth-Based Culture Systems. *Journal of Clinical Microbiol.* October 2012 Volume 50(10): 3275–3282
 20. Ghid metodologic de implementare a programului național de prevenire, supraveghere și control al tuberculozei. București, 2015. ISBN 978-973-139-325-4.