P.MUTU INTERNAL PEMERIKSAAN PARASITOLOGI

- pemantapan Mutu Lab Mikroskopis Malaria adalah suatu kegiatan yang dirancang untuk meningkatkan dan menjamin mutu serta efisiensi pemeriksaan laboratorium, secara berkesinambungan sehingga hasilnya dapat dipercaya. Manfaat dari mempelajari Topik 2 ini adalah Anda dapat melaksanakan pemantapan mutu mikroskopis malaria dengan benar. Pemantapan Mutu Internal Mikroskopik Malaria bertujuan untuk memastikan seluruh proses di laboratorium berjalan sesuai standar. Sedangkan kompetensi yang akan Anda peroleh setelah mempelajari materi Topik 2 ini adalah Anda akan dapat melakukan pemantapan mutu mikroskopis malaria.

- Pemantapan Mutu Laboratorium meliputi hal-hal penting berikut, yaitu : 1. Pemantapan Mutu Internal : Pra analisis (SOP, Mutu Reagen, Pemeliharaan alat,), analisis (Memastikan cara kerja sesuai standar, Penyeliaan internal), pasca analisis (Pencatatan Pelaporan, Dokumentasi kegiatan PMI.), Analisis dan koreksi kinerja. 2. Pemantapan Mutu Eksternal : kegiatan yang diselenggarakan secara periodik oleh pihak lain di luar laboratorium yang bersangkutan untuk memantau dan menilai penampilan suatu laboratorium dalam pemeriksaan tertentu. Tespanel (proficiency testing), Supervisi/ bimbingan teknis, Uji silang mikroskopis (cross check). 3. Peningkatan Mutu : menganalisis setiap aspek teknis dalam pelayanan laboratorium ditindak lanjuti dengan upaya perbaikan untuk mencegah dan menghindari terulangnya kembali masalah yang sama. Tujuan Pemantapan Mutu adalah meningkatkan kemampuan,, menilai kinerja; mempertahankan kualitas; menjamin penerapan SOP; Menjamin kualitas bahan, reagen, alat; menjamin terselenggaranya pencatatan & pelaporan berjenjang; meningkatkan kepercayaan masyarakat terhadap mutu yan laboratorium

- ME (EQAS) adalah program untuk menilai penampilan pemeriksaan laboratorium pada saat tertentu, secara periodik, serentak, berkesinambungan yang dilakukan oleh pihak luar laboratorium, dengan jalan membandingkan hasil pemeriksaan laboratorium terhadap nilai rujukan. TUJUAN : informasi kinerja → data pembinaan, meningkatkan kualitas; membandingkan hasil antar laboratorium; menstimulasi perbaikan penampilan ; memberikan sertifikasi/kompetensi Pemantapan Mutu Eksternal Lab Mikroskopik Malaria meliputi kegiatan: 1. Uji silang /blinded rechecking 2. Uji silang dilakukan oleh lab di jenjang lebih tinggi 3. Dilakukan oleh tenaga terlatih , memiliki sertifikat sebagai cross-checker yang dikeluarkan oleh Tim Pemantapan Mutu Pusat. 4. Uji silang dilakukan secara blinded 5. Sediaan dikelompokkan dlm kotak slide tertutup, di ruangan 6. 100% sediaan positif dan 5 % acak sediaan negatif → oleh pengelola program 7. Setiap awal bulan , umpan balik 3 minggu 8. Yg dinilai : kualitas sediaan, kualitas pewarnaan, pembacaan 9. (sensitifitas, spesifisitas, akurasi spesies dan error rate) 10. Error rate baik, cukup, kurang 11. TL ER 5-10% berturut turut 4 bln dan ER10% → Supervisi / Bimtek , panel tes di tempat. 12. Tk kemampuan mikroskopis berdasarkan penilaian hasil pelatihan

Tabel 10.1. Level Akreditasi, sensitifitas,spesifitas,akurasi spesies malaria

LEVEL AKREDITASI	SENSITIFITAS	SPESIFISITAS	AKURASI SPESIES	HITUNG PARASIT
Level 1 (expert)	>90%	>90%	>90%	>50%
Level 2 (Refference)	80 - < 90%	80 - < 90%	80 - 90%	40 - 50%
Level 3 (Advance)	70 - < 80%	70 - < 80 %	70 - < 80%	30 - < 40%
Level 4 (Basic)	< 70%	< 70 %	< 70%	< 30%

- **SYARAT MENJADI *CROSS-CHECKER***

  Tingkat Kabupaten/Kota : Telah mengikuti pelatihan *cross-checker;* Dapat menilai kualitas sediaan darah; Memiliki sertifikat pelatihan minimal level *Advance* yang; dikeluarkan dari Tim Pemantapan Mutu Pusat; Dalam waktu minimal 2 tahun tetap mempunyai level *advance*.

  Tingkat Provinsi : Telah mengikuti pelatihan *cross-checker;* Memiliki sertifikat pelatihan minimal level *Reference* yang dikeluarkan dari Tim Pemantapan Mutu Pusat ; Dalam waktu minimal 2 tahun tetap mempunyai keterampilan *level Reference.*

  Tingkat Regional : mengikuti pelatihan *cross-checker* ; sertifikat minimal level *Reference* yg dikeluarkan; dari Tim Pemantapan Mutu Pusat ; Dalam waktu minimal 2 tahun tetap mempunyai keterampilan level *Reference*.

  Tingkat Pusat : Telah mengikuti pelatihan sebagai *cross-checker* ; Memiliki sertifikat minimal level *Expert* yg dikeluarkan dari Tim Pemantapan Mutu Pusat ; Dalam waktu minimal 2 tahun tetap mempunyai *keterampilan level expert.*

- Analisis dan interpretasi uji silang

  1. Sensitifitas = TP/(TP + FN) x 100%

  2. Spesifisitas = TN / (TN + FP) x 100%

  3. Akurasi Spesies = (Spesies Benar / Total Positif) x 100%

  4. Tingkat Kesalahan (*error rate*) = (Semua Salah / Total Slide) x 100%

  (TP=True Positif; FN=False Negatif; TN=True Negatif; FP=False Positif)

  Faktor yang dinilai : Kualitas pembuatan sediaan : makroskopik, mikroskopik; Kualitas pewarnaan sediaan darah; Pembacaan sediaan : sensitivitas, spesifisitas ; akurasi , error rate;

  Hasil uji silang

- **Hal-hal yang dinilai pada uji silang :**
  Kualitas Pembuatan Sediaan Darah : Makroskopik: Tetes tebal Diameter ± 1cm; Ketebalan: tulisan dapat dilihat diatas kertas; Tidak terfiksasi; *Tetes tipis 1 cm dari bagian ujung sediaan darah tipis berbentuk lidah.* Mikroskopik: Tetes tebal (Volume darah : 6 µl atau Untuk menilai sd darah negatif: minimal dapat dilihat 200 LPB atau setara dengan 3000-4000 leukosit, Ketebalan : baik : jumlah leukosit 15 -20/LPB, tebal : jumlah leukosit > 20/LPB) , tipis : jumlah leukosit <15 /LPB , Tetes tipis(Volume darah : 2 µl , Eritrosit tidak saling bertumpuk., Terfiksasi, Kualitas Pewarnaan Sediaan darah, Normal : inti leukosit berwarna ungu, inti parasit berwarna merah, sitoplasma berwarna biru, Asam: inti leukosit berwarna merah, Basa: inti leukosit berwarna biru, Kotor : banyak sisa-sisa/ endapan zat warna/ debu pada lapang pandang , Hasil uji silang: Hasil uji silang dari *cross-checker* disampaikan kepada penanggung jawab

- program/pemantapan mutu → dianalisis sensitivitas, spesifitas, akurasi spesies dan *error rate* (tingkat kesalahan) → dilaporkan ke Dinas Kesehatan setempat; Dinas Kesehatan setempat menyampaikan hasil uji silang kepada laboratorium yang diuji dan laboratorium rujukan uji silang melalui mekanisme umpan balik sebagai bahan evaluasi. Apabila terdapat perbedaan hasil pembacaan (*discordance*) maka harus dilakukan pembacaan/ penilaian ulang oleh lab rujukan di tingkat atasnya atau kepada *cross-checker* lain di wilayahnya. Analisis dan interpretasi Hasil Uji Silang → dengan menghitung tingkat kesalahan (error rate)
  1. ER < 5 % artinya kinerja laboratorium baik
  2. ER 5 % – 10 % artinya kinerja laboratorium cukup
  3. ER > 10 % artinya kinerja laboratorium kurang

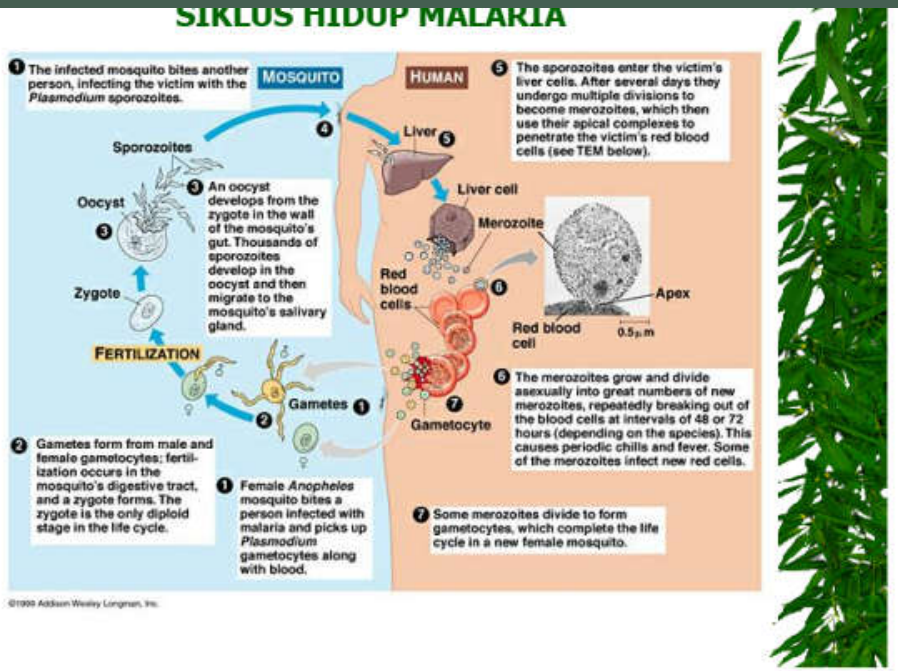
  ER 5-10% berturut 4 bulan dan ER >10% → supervisi/bimtek atau panel testing ditempat

- SUPERVISI : Monitoring langsung
  Tujuan : Peningkatan keterampilan, Perbaikan sikap,Peningkatan motivasi, Monitoring pasca pelatihan, Proses diklat yg, sbg on the job training Ideal : rutin, teratur, terencana → ceklist, supervisor kompeten, saran perbaikan, frekuensi kunjungan
  TES PANEL (tes Profisiensi)
  Tujuan : menilai kinerja Penyelenggara
  Mekanisme : pengiriman sediaan – interpretasi dan evaluasi hasil pemeriksaan – umpan balik
  Persiapan
  Jumlah sediaan : 20 SD (8 negatif, 5 Pf, 4 Pv,1 Po,1 Pm, 1 mix, sediaan pos dg density parasit 40-200par/uL darah); Frekuensi : 1 kali setahun ; Penilaian ; Pencatatan & pelaporan

- **PENGENALAN MALARIA**

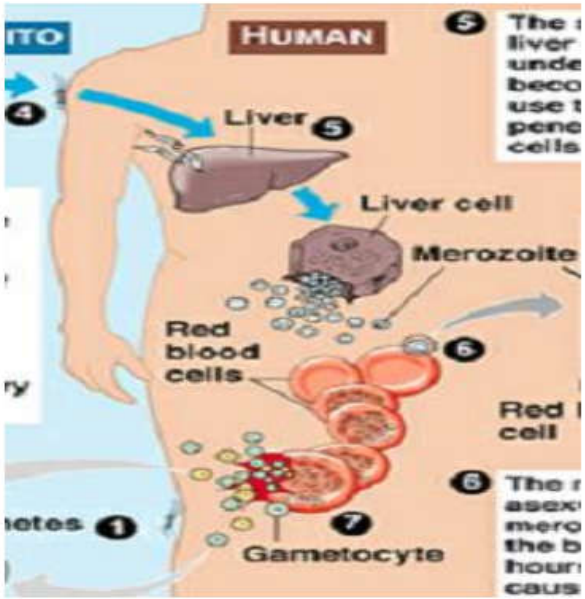
  Penyakit akut dan knonis yang disebabkan oleh protozoa genus Plasmodium; ditularkan nyamuk Anopheles betina. Gejala: panas tinggi, demam, menggigil, sakit kepala, anemia, pembesaran limfa, dsb. Empat spesies penyebab penyakit malaria pada manusia : *P. falciparum , P. vivax , P. malariae, P.ovale, P. knowlesii ?*

  Secara alami plasmodium ditularkan oleh vektor nyamuk Anopheles betina. dapat terjadi melalui - tranfusi darah, suntikan, transplasenta. 10 Species diantaranya diketahui sebagai vektor penting malaria ***:*** *An.sundaicus,An.subpictus, An.maculatus, An.aconitus, An.balabacensis, An.farauti ,An.koliensis ,An.punctulatus ,An.barbirostris , An.letifer*



Gambar 10.2.1. Siklus Hidup Malaria

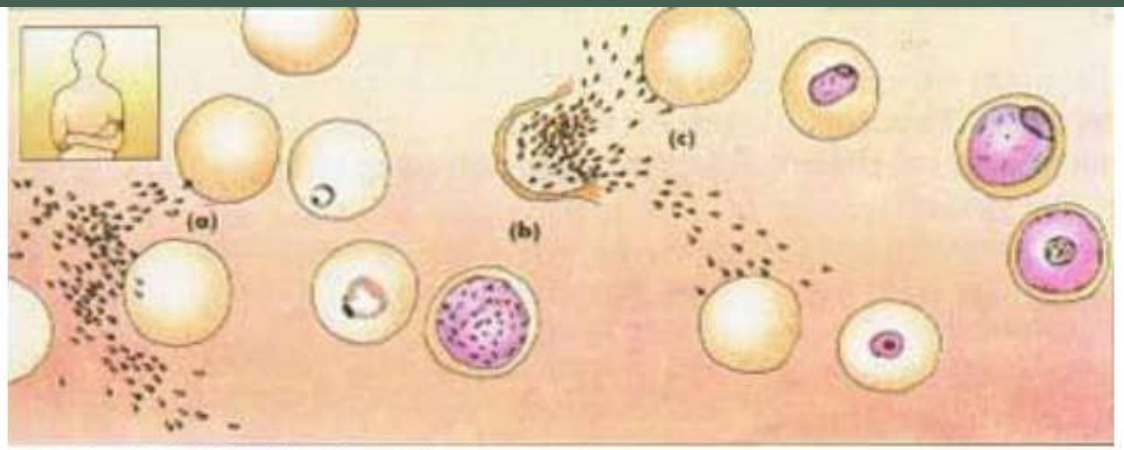
- **Fase Ekso-eritrositik**
  Nyamuk Anopheles betina mengeluarkan sporozoit ketika menghisap darah manusia. Sporozoit, dalam 30 menit masuk ke sel hati; mengadakan pembelahan sel secara aseksual (5-16 hari tergantung jenis plasmodium); hasil 40 000 merozoit Sel hati akan pecah; merozoit masuk ke dalam sistim peredaran darah. Merozoit akan menginfeksi sel-sel darah merah.



Gambar 10.2.2. Fase Ekso-eritrositik

- **Fase Hipnozoit atau Fase Dorman**
  Beberapa sporozoit *P. vivax* and *P. ovale,* di sel hati membentuk tropozoit yang dorman (hypnozoites). Suatu saat Hypnozoite "bangun" menjadi schizont. Peristiwa ini disebut → Relaps. P. vivax setelah 1- 18 bulan , P. ovale setelah 2 – 8 bulan , Relaps tidak sama dengan rekurens . rekurens= parasit resisten/kebal terhadap anti-malaria.

  3. Fase Eritrositik
  Merozoit menginvasi sel darah merah membentuk tropozoit. Setelah +48 jam, inti tropozoit membelah dan membentuk 8-24 inti (tropozoit ini disebut skizont; intinya disebut merozoit). Sel darah merah (skizont matang) akan pecah, merozoit dikeluarkan; merozoit menginfeksi sel darah merah lain. Peristiwa ini terus berulang-ulang (siklus); disebut fase eritrositik (eryrthrocytic schizogony). Gametosit terbentuk setelah 2-3 siklus

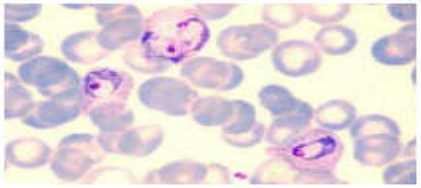


Breeding in the blood (erythrocytic schizogony).
The merozites invade the erythrocytes (a). Every 2 or 3 days a new cycle of growth and division is completed (b). The schizont ruptures (c).
Malaria by A. J. Knell for the Wellcome Trust

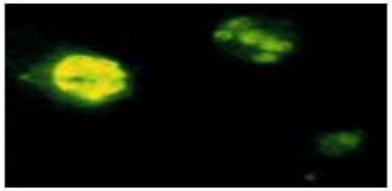
Gambar 10.2.3. Fase Eritrositik

- **Fase Vektor**
  Dalam lambung nyamuk: makrogametosit menjadi makrogamet. mikrogametosit jantan membelah menghasilkan 8 buah mikrogamet atau exflagelated. Makrogamet betina dan mikrogamet jantan saling membuahi Hasil pembuahan berupa sel zygote.

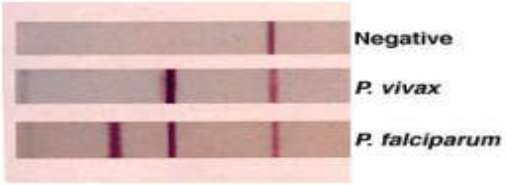
5. Beberapa Metoda Diagnosa Malaria Sekarang ini



Diagnosa Malaria menggunakan Mikroskop

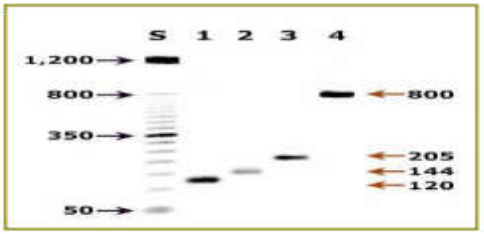


Diagnosa dengan menggunakan mikroskop



Metoda Immunochromatographi atau dikenal sebagai dipstik tes.

Diagnosa menggunakan asay antibody (Antibody detection by ELISA serology)



Polymerase Chain Reaction (PCR)

Gambar 10.2.6. Beberapa Metoda Diagnosa Malaria Sekarang ini

- Diagnosa malaria secara mikroskopi masih merupakan “gold standard” Keunggulan Diagnosa Malaria secara mikroskop SENSITIF. Teknisi lab yang terampil dapat mendeteksi parasit malaria dalam densitas yang rendah; INFORMATIF. Jika parasit malaria ditemukan, dapat dibedakan jenisnya spesiesnya (*P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale*) dan juga stadiumnya (Ring, Trophozoit, Shcizon, Gametosit); Relatif Tidak Mahal. Harga satu pemeriksaan diperkirakan Cuma Rp 1.200, bandingkan dengan dipstik seharga Rp 30.000 untuk satu pemeriksaan; UMUM. Penggunaan mikroskop adalah metoda yang umum di lab sehingga bisa berbagi dengan pemeriksaan TB, PMS dll; Spesies Baru. Memungkinkan untuk menemukan spesies baru yang menyerang manusia.

C. BAHAN DAN ALAT YANG DIPERLUKAN DALAM PEMBUATAN SPECIMEN APUS TIPIS DAN TEBAL UNTUK PEMERIKSAAN MALARIA

  - Slide
  - Lancet
  - Kapas alcohol
  - Pensil
  - Kapas kering
  - Tempat Slides
  - Perlengkapan staining
  - Mikroskop

Gambar 10.2.7. Alat Yang Diperlukan Dalam Pembuatan Specimen Apus Tipis Dan Tebal

- Syarat kaca sediaan :
  - Bersih, tidak berdebu dan bebas lemak atau tidak mengandung alkohol.
  - Jernih, tidak tergores dan tidak berjamur.
  - Tidak kusam / buram
  - Ketebalan Kaca Sediaan antara 1,1 – 1,3 mm
  - Yang terbaik adalah menggunakan object glass yang baru

  Cara mencuci Kaca Sediaan (baru) :

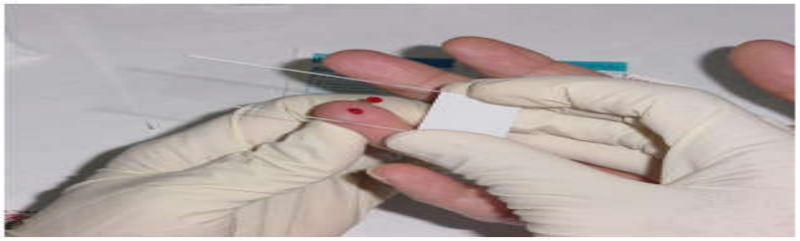
  Masukkan KS kedalam Waskom; Tuangkan larutan sabun detergen 0,5%, rendam KS selama 30 menit – 1 jam. Bersihkan/gosok KS dgn kain lembut, kemudian masukkan dalam Waskom, berisi air bersih dan bilas sampai bersih. Lap KS dengan kain lembut dan bersih. Keringkan KS dan bungkus dengan kertas tik tipis.

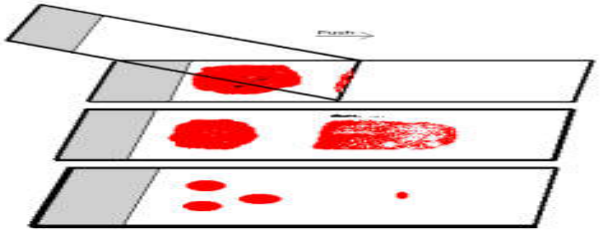
  Cara menyimpan KS

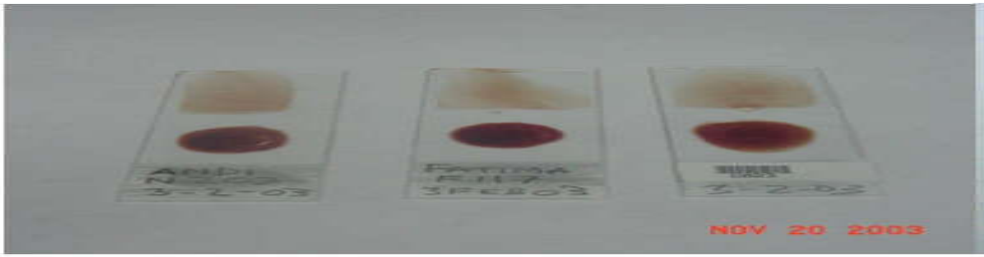
  KS yang sudah bersih dibungkus dengan kertas tik tipis agar terhindar dari debu , Setiap 10 KS diikat rapi, disimpan dalam box slide bekas KS baru. Simpat ditempat yang bersih dan kering

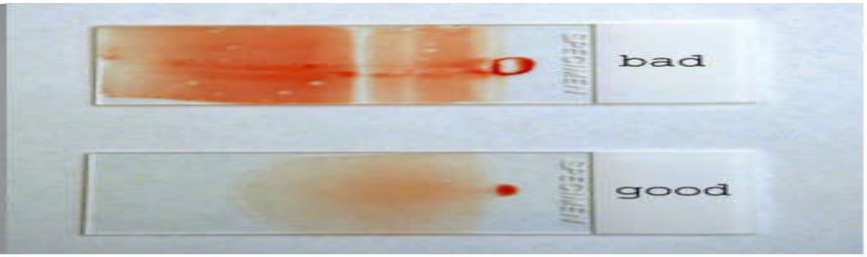
  Sediaan apus darah tebal dibuat dari 10-20ul darah.
  - Sediaan apus darah tipis dibuar dari 2ul darah.
  - *Apus darah tipis difiksasi dengan methanol untuk mencegah terjadinya hemolisis.*
  - Sediaan apus darah tebal dibuat dari 10-20ul darah.
  - Sediaan apus darah tipis dibuar dari 2ul darah.

Gambar 10.2.8.
Apus darah tipis difiksasi dengan methanol untuk mencegah terjadinya hemolisis.









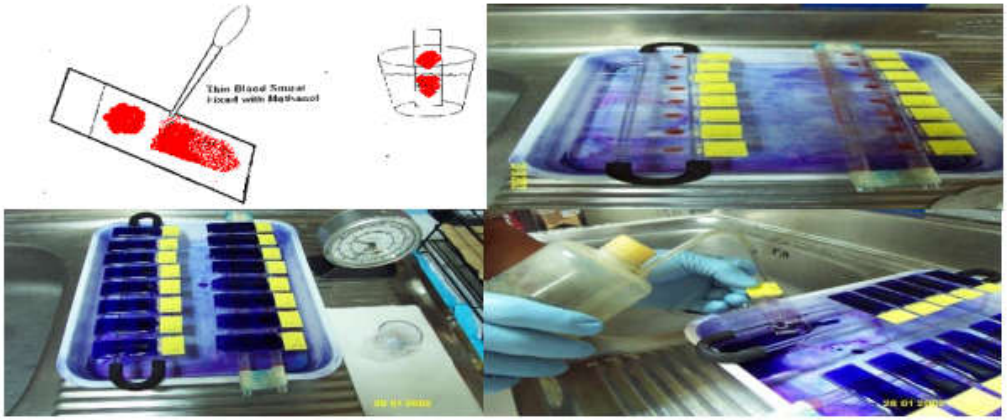
Gambar 10.2.9. Penyiapan Sediaan Apus Darah Tipis Dan Te

- Penyiapan Pewarnaan Giemsa
  1. Cairan pewarna Giemsa
  2. Methanol
  3. Mangkuk untuk fiksasi
  4. Rak pewarnaan Giemsa
  5. Cairan Buffer (pH 7 - 7.2) (can use mineral water)
  6. Rak slide untuk pengeringan

  Beberapa hal yang harus diperhatikan :

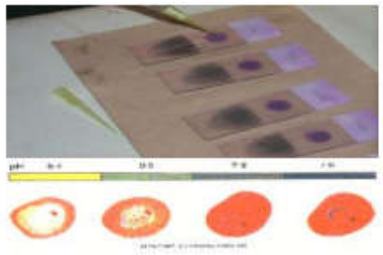
  Giemsa stock disimpan dalam botol coklat dan hindari sinar matahari langsung . Untuk menghindari rusaknya giemsa stok ==> disimpan dalam botol2 kecil, Giemsa stok tidak boleh dikocok/diaduk. Larutan giemsa yang sudak tercampur dengan larutan buffer jangan dimasukkan kembali ke dalam giemsa stok.

- **Menguji Mutu Giemsa :**
  Melakukan pewarnaan pada 1-2 SD , Hasil sesuai dengan std baik, giemsa bisa dipakai.
  Menggu na kan kertas whatman no.2 sebanyak1-2 tetes giemsa stock ditambah 3-4 tetes metil alkohol ab solut , terbentuk 3 lapisan : lingkaran biru, cincin ungu dan lingkaran tipis merah
  Penyiapan cairan pewarna Giemsa: **Pengenceran 10% (1:10)**
  1. Ambil 1 ml Giemsa Stock Solution;
  2. Tambahkan 9 ml air;
  3. Aduk hingga terlarut merata;
  4. Warnai specimen dengan pengenceran ini selama 25 menit.
  a. Isi bejana pewarnaan dengan Giemsa yang sudah diencerkan 10%;
  b. Letakkan sediaan darah pada rak pewarnaan selama 25 menit;
  c. Bilas dengan hati-hati menggunakan air bersih.
  Pengenceran 3% :
  1. Ambil 3ml giemsa stock solution
  2. Tambahkan 97ml larutan pengencer
  3. Aduk hingga larut dan merata
  4. Warnai sediaan darah dengan larutan tersebut selama 30 – 45 menit
  Larutan Buffer pH 7,2 :
  Dapat dibuat dengan 2 cara : 1 tablet buffer dalam 1 liter aquades , 0.7 gr KH_2PO_4 dan 1 gr Na_2HPO_4 dalam 1 liter aquades .
  Cara Pewarnaan Sediaan Darah
  1. FIKSASI
  a. Pastikan SD sudah kering sempurna
  b. SD tipis difixasi dengan methanol, dengan cara ditetes atau dicelupkan
  c. Methanol tidak boleh mengenai SD tebal
  d. Biarkan kering diudara sebelum diwarnai



Gambar 10.2.10. Proses Pewarnaan

- Siapkan cairan giemsa yang telah dibuat pengenceran
  3. Letakkan sediaan darah pada rak pewarnaan
  4. Teteskan cairan giemsa menggunakan pipet sampai seluruh SD tebal dan tipis tertutup cairan
  5. Diamkan sesuai waktu yang ditentukan
  6. Bilas dengan air mengalir sampai bersih



Hasil Pewarnaan Giemsa

Gambar 10.2.11. Hasil Pewarnaan

- **Secara makroskopis**
  1. SD kelihatan jernih dan transparan
  2. warna SD merupakan kombinasi warna- warna merah,ungu dan biru.
  3. Penilaian ini hanya dapat menduga mutu pewarnaannya saja.

  Secara mikroskopis
  1. Latar belakang berwarna jernih,biru pucat atau pucat kemerah-merahan
  2. Benda-benda/sel-sel berwarna kontras/jelas: merah,ungu,biru,coklat,hitam dsb

Sebagian besar leukosit,dinding sel serta sitoplasmanya dapat dilihat dengan jelas
4. Bersih dari partikel-partikel giemsa

FAKTOR-FAKTOR YANG MENENTUKAN MUTU PEWARNAAN SEDIAAN DARAH

1. Kualitas Giemsa yang digunakan
2. Kualitas air pengencer Giemsa
3. Kepekatan larutan Giemsa
4. Lamanya reaksi pewarnaan
5. Kualitas Pembuatan SD
6. Kebersihan Sediaan Darah

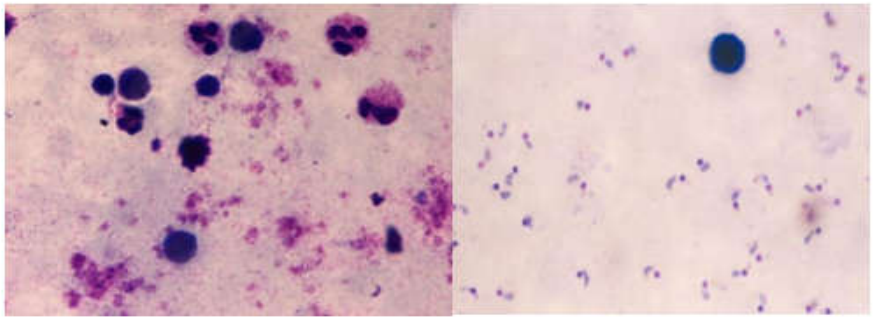
Interpretasi hasil

1. Pemeriksaan secara Kwalitatif pada sediaan darah tebal

a. Baca sediaan secara "zig-zag" menggunakan mikroskop cahaya (100x objective and 10x ocular) dan menggunakan minyak immersi.
b. Periksa minimal 200 lapang pandang besar.
c. Catat hasil dengan menuliskan jenis species dengan cara seperti ini:
+ + + + = Apabila ditemukan >10 parasit per lapang pandang
+ + + = Apabila ditemukan 1-10 parasit per lapang pandang
+ + = Apabila ditemukan >10 parasit per 100 lapang pandang
+ = Apabila ditemukan 1-10 parasit per 100 lapang pandang

Jumlah parasites x 8000 Jumlah leukosit	= Jumlah parasit per ml darah

Catat hasil dengan menuliskan jenis species dan stage serta jumlah parasit per 200 sel leukosit. Hasil tsb dapat dikonvesi menjadi:
Jika TIDAK ditemukan parasit malaria setelah pemeriksaan 200 LPB, maka laporkan sebagai Negatif atau Tidak Ditemukan Parasit.
Jika ditemukan parasit, maka catat jenis species, stage serta jumlah parasit nya
Contoh: Pv R12, Tr35, Sc5, G7



Gambar 10.2.12. Hasil Pewarnaan Secara Mikroskopis Tetes Tebal

Lihat kembali **Gambar 10.2.12. Hasil Pewarnaan.** Gambar-gambar berikut ini gambaran
stadium malaria pada sediaan darah tipis. Gambar-gambar ini merupakan kunci untuk
menentukan jenis plasmodium dan stadium malaria.