

## Ogólnopolski Zewnątrzlaboratoryjny Sprawdzenie Wiarygodności Badań w Diagnostyce Mikrobiologicznej – POLMICRO 2017

### The Polish National External Quality Assessment Scheme in Microbiological Diagnostics – POLMICRO 2017

Ewa Młodzińska, Karolina Bosacka, Anna Mikołajczyk, Joanna Rybicka, Elżbieta Stefaniuk, Waleria Hryniewicz

Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Warszawa

#### Streszczenie

Ogólnopolski Sprawdzenie Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych – Program POLMICRO organizowany jest przez Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (COBJwDM). Celem Programu POLMICRO 2017 była ocena biegłości laboratoriów w identyfikacji drobnoustrojów, oznaczaniu wrażliwości na antybiotyki, wykrywaniu mechanizmów oporności i interpretacji preparatów mikroskopowych barwionych metodą Grama. Przesyłane w ramach Programu izolaty bakteryjne różniły się wrażliwością na antybiotyki oraz obecnością różnych mechanizmów oporności. Praca przedstawia wyniki XXIV edycji – POLMICRO 2017.

#### Abstract

The Polish National External Quality Assessment Scheme in Microbiological Diagnostics – POLMICRO programme is organized by the Centre of Quality Control in Microbiology (CQCM). The aim of the POLMICRO 2017 Programme was to evaluate proficiency of laboratories in the identification of microorganisms, determination of susceptibility to antibiotics, detection of resistance mechanisms and interpretation of Gram slides. Bacterial isolates distributed within the Programme differed in their susceptibility to antibiotics and presence of various resistance mechanisms. The paper presents the results of the XXIV edition – POLMICRO 2017.

**Słowa kluczowe:** POLMICRO, zewnątrzlaboratoryjny sprawdzenie wiarygodności, identyfikacja, lekowrażliwość, mechanizmy oporności  
**Key words:** POLMICRO, external quality assessment scheme, identification, susceptibility to antimicrobials, resistance mechanisms

#### Wstęp

Wiarygodna diagnostyka mikrobiologiczna jest podstawą terapii zakażeń i stanowi istotne źródło wiedzy epidemiologicznej. Prowadzenie wewnętrznej kontroli jakości pozwala na stałe monitorowanie jakości oznaczeń, a jej uzupełnieniem jest kontrola zewnętrzna, która pozwala na ocenę jakości badań rutynowo wykonywanych w laboratorium. Ogólnopolski Zewnątrzlaboratoryjny Sprawdzenie Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych – POLMICRO umożliwia laboratoriom poddawanie kontroli zewnętrznej różnych etapów diagnostyki mikrobiologicznej. Kolejne, coroczne edycje Programu poświęcane są wstępnemu etapowi diagnostyki – preparatom bezpośrednim, identyfikacji i oznaczaniu fenotypów wrażliwości na leki różnych gatunków bakteryjnych, jak i wykrywaniu mechanizmów oporności.

Od roku 1997 Program POLMICRO prowadzi Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (COBJwDM). Celem Programu jest ocena kompetencji laboratoriów mikro-

biologicznych w zakresie identyfikacji, oznaczania wrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności na leki czynników etiologicznych najczęstszych zakażeń człowieka. W roku 2017 odbyła się XXIV edycja Programu POLMICRO. Na podstawie ustalonego na początku roku harmonogramu badań biegłości na rok 2017 COBJwDM zorganizował sześć rund sprawdzianów obejmujących różne obiekty badań, metody i techniki badawcze. Przedmiotem przeprowadzonych sprawdzianów była: ocena preparatów mikroskopowych, identyfikacja do gatunku różnych izolatów, w tym gatunków, które do tej pory nie były obiektem badań w Programie; oznaczenie różnych fenotypów wrażliwości i mechanizmów oporności na leki oraz ocena znajomości zasad odczytu, interpretacji testów lekowrażliwości i zgodność z obowiązującymi zaleceniami.

#### Materiały i metody

Wszystkie obiekty badań pochodziły z kolekcji COBJwDM i zostały przygotowane na potrzeby Programu badań biegłości POLMICRO.

Wykorzystane izolaty bakteryjne należące do różnych gatunków, o różnych fenotypach wrażliwości na leki przeciwdrobnoustrojowe przedstawiono w tabeli I.

Pierwsza runda była sprawdzianem praktycznym w wersji elektronicznej a zadaniem laboratoriów było udzielenie odpowiedzi na piętnaście pytań, zawartych w siedmiu zadaniach, które zostały

Tabela I. Obiekty badań wykorzystane w poszczególnych rundach Programu POLMICRO 2017 (edycja XXIV).

Obiekty badań	nr kolekcji POLMICRO	Mechanizmy oporności / fenotyp wrażliwości / opis obiektów badań	
<b>POLMICRO 2017 – runda I</b>			
<i>Neisseria meningitidis</i>	PM-302	-	Zdjęcie preparatu mikroskopowego z dodatniego posiewu krwi
<i>Enterococcus faecalis</i>	PM-303	-	Zdjęcie preparatu mikroskopowego z dodatniego posiewu krwi
<i>Yersinia enterocolitica</i>	PM-304	-	Zdjęcie preparatu mikroskopowego z dodatniego posiewu krwi
<i>Haemophilus influenzae</i>	PM-305	-	Zdjęcie preparatu mikroskopowego z bezpośredniego wymazu z worka spojówkowego
<b>POLMICRO 2017 – runda II</b>			
<i>Citrobacter freundii</i>	PM-306	-	Izolat tylko do identyfikacji
<i>Citrobacter koseri</i>	PM-307	-	Izolat tylko do identyfikacji
<i>Candida glabrata</i>	PM-308	-	Izolat tylko do identyfikacji
<i>Candida krusei</i>	PM-309	-	Izolat tylko do identyfikacji
<i>Enterococcus gallinarum</i>	PM-310	-	Izolat tylko do identyfikacji
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	PM-311	-	Izolat tylko do identyfikacji
<b>POLMICRO 2017 – runda III</b>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PM-312	MLS <sub>B</sub> konstytutywny	[P]=I (zakażenia inne niż ZOMR); [P]=R (zakażenia ZOMR), [E,CL]=R, [CTX; CRO]=I, [TET]=S
<i>Haemophilus influenzae</i>	PM-313	BLPACR	[AMP, AMC]=R, [TET]=S
<i>Haemophilus influenzae</i>	PM-314	BLNAR	[AMP, AMC, TET]=R
<i>Moraxella catarrhalis</i>	PM-315	-	[AMC, CTX, CRO, E, TET]=S
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PM-316	MLS <sub>B</sub> konstytutywny	[E, CL, TET]=R, [P]=S
<b>POLMICRO 2017 – runda IV</b>			
Preparaty mikroskopowe z dodatniej hodowli krwi	A	Pałeczki Gram-ujemne	Z posiewu krwi wyhodowano <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PM-317
	B	Ziarenkowce Gram-dodatnie	Z posiewu krwi wyhodowano <i>Staphylococcus aureus</i> PM-318
	C	Pałeczki Gram-dodatnie	Preparat z hodowli <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PM-319
Preparaty mikroskopowe z hodowli na podłożu stałym	D	Pałeczki Gram-ujemne	Preparat z hodowli <i>Campylobacter coli</i> PM-320
	E	Pałeczki Gram-dodatnie	Preparat z hodowli <i>Listeria monocytogenes</i> PM-321
	F	Komórki grzybów drożdżoidalnych	Preparat z hodowli <i>Geotrichum spp.</i> PM-322
<b>POLMICRO 2017 – runda V</b>			
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	PM-323	-	[TET]=R, [LZD, SXT, VA]=S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	PM-324	-	[AMP, CIP, SXT, F]=S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	PM-325	-	[AMP, CIP, SXT, F]=S
<b>POLMICRO 2017 – runda VI</b>			
<i>Enterobacter cloacae</i>	PM-326	-	Zdjęcie płytki z podłożem agarowym Mueller-Hinton – testy w kierunku MBL + pytanie testowe
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PM-327	-	Zdjęcie płytki z podłożem agarowym Mueller-Hinton – oznaczenie wrażliwości na makrolidy, linkozamidy i streptograminy + pytanie testowe
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PM-328	MS <sub>B</sub>	Zdjęcie płytki z podłożem agarowym Mueller-Hinton – oznaczenie wrażliwości na makrolidy, linkozamidy i streptograminy + pytanie testowe
<i>Enterobacter cloacae</i>	PM-329	-	Zdjęcie płytki z podłożem agarowym Mueller-Hinton – testy w kierunku MBL + pytanie testowe

Legenda: BLNAR – szczep niewytwarzający β-laktamazy, oporny na ampicylinę, BLPACR – szczep wytwarzający β-laktamazę, oporny na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, MBL – metalo-β-laktamaza, MLS<sub>B</sub> – oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy, MS<sub>B</sub> – oporność na erytromycynę, wrażliwość lub oporność na klindamycynę *in vitro*.

AMC – amoksycylina z kwasem klawulanowym, AMP – ampicylina, CIP – ciprofloksacyna, CL – klindamycyna, CRO – ceftriakson, CTX – cefotaksym, E – erytromycyna, F – nitrofurantoina, LZD – linezolid, MEM – meropenem, P – penicylina, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, TET – tetracyklina, VA – wankomycyna.

S (susceptible) – wrażliwy, I (intermediate) – średniowrażliwy, R (resistant) – oporny.

zamieszczone na stronie internetowej Programu. Pytania dotyczyły oceny preparatów mikroskopowych oraz zasad wykonywania i odczytu testów lekowrażliwości (metoda dyfuzyjno-krążkowa). Rundy praktyczne Programu od II do V zawierały różne obiekty badań i związane z nimi zadania. W II rundzie POLMICRO 2017 laboratoria otrzymały trzy szczepy bakteryjne do identyfikacji do poziomu gatunku, w III rundzie przedmiotem badań były drobnoustroje z grupy „wymagających” potrzebujące do wzrostu wzbogaconych podłoży oraz zapewnienia odpowiednich warunków (atmosfera 5-10% CO<sub>2</sub>). Wszyscy uczestnicy Programu otrzymali zestaw czterech izolatów do identyfikacji, oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności. IV runda była poświęcona wstępnej diagnostyce: laboratoria otrzymały pięć preparatów mikroskopowych – dwa pochodziły z dodatniej hodowli krwi na podłożu bulionowym, jeden z hodowli bulionowej szczepu bakteryjnego, a pozostałe dwa preparaty wykonano z jednorodnych hodowli drobnoustrojów na podłożu stałym. Zadaniem było zabarwienie preparatów metodą Grama oraz ich ocena pod mikroskopem. W rundzie V laboratoria otrzymały zestaw zawierający dwa szczepy z rodzaju *Staphylococcus* do identyfikacji i oznaczenia lekowrażliwości właściwej dla przedstawionego przypadku klinicznego. Pierwszy izolat wyhodowano z bioptatu tkanki podskórnej kończyny dolnej, a drugi wyizolowano z posiewu moczu od pacjentki z niepowikłanym zakażeniem układu moczowego. Zadaniem laboratoriów w rundzie VI POLMICRO 2017 było wypełnienie ankiety elektronicznej składającej się z trzynastu pytań testowych dotyczących zasad odczytu i interpretacji testów lekowrażliwości. Runda ta miała charakter edukacyjny i jej wyniki nie były brane pod uwagę w przyznawaniu Świadectw. Ocena wszystkich rund Programu POLMICRO przeprowadzona była zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17043:2011 „Ocena zgodno-

ści. Ogólne wymagania dotyczące badań biegłości” [1] i procedurą Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej PO-02 „Program Badań Biegłości POLMICRO”, gdzie na podstawie wyników uzyskanych przez laboratoria i wyliczonego wskaźnika „z” (z – score) przyznawano ocenę pozytywną lub negatywną.

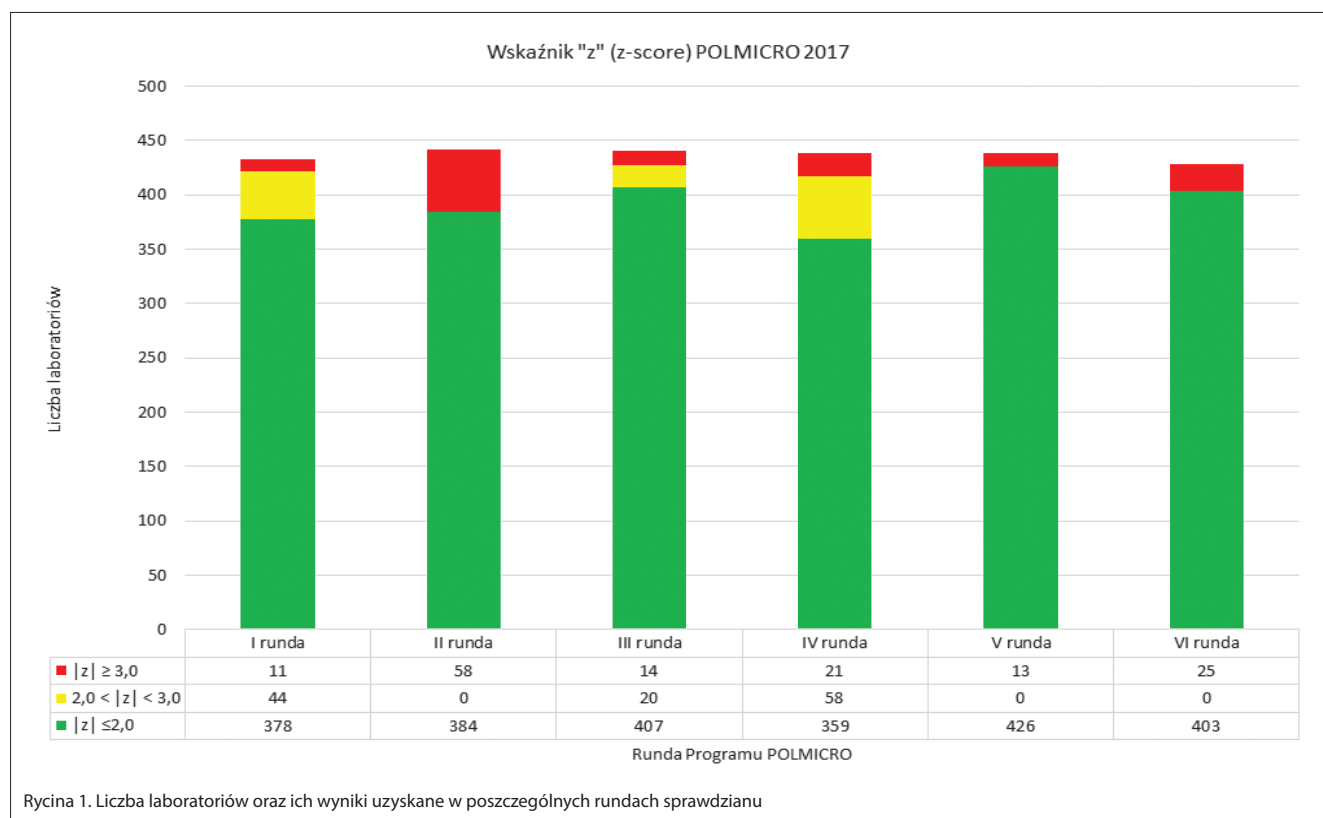
Laboratorium, które uczestniczyło we wszystkich rundach Programu POLMICRO 2017 i otrzymało wyniki pozytywne przyznano Świadectwa uzyskania pozytywnych wyników w Ogólnopolskim Sprawdzianie Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych POLMICRO. Laboratoria, które nie przystąpiły do wszystkich rund Programu POLMICRO w cyklu rocznym lub uzyskały co najmniej jedną ocenę negatywną otrzymały zaświadczenia o uczestnictwie i uzyskanych wynikach.

### Wyniki

Liczba laboratoriów mikrobiologicznych biorących udział w Programie POLMICRO 2017 była różna w zależności od rundy. Na rycinie 1 przedstawiono liczbę laboratoriów oraz ich wyniki uzyskane w poszczególnych rundach sprawdzianu. Zielonym kolorem zaznaczono wyniki pozytywne – wskaźnik  $|z| \leq 2$ . Wyniki warunkowo pozytywne zaznaczono kolorem żółtym ze wskaźnikiem „z-score” pomiędzy  $2 < |z| < 3$ . Oceny negatywne przyznano laboratoriom, które otrzymały  $|z| \geq 3$ , oznaczono kolorem czerwonym.

### Identyfikacja

Procent prawidłowych wyników identyfikacji był najniższy w II rundzie i wynosił 87,9%, w III rundzie – 99,3%, a w V – 97,7%. Wyniki identyfikacji szczepów uzyskane przez laboratoria uczestniczące w II rundzie POLMICRO 2017 przedstawiają się następująco – najwięcej błędów pojawiło się w identyfikacji gatunku



szczepu *Enterococcus gallinarum* PM-310: dwadzieścia siedem laboratoriów (12,1%) zidentyfikowało szczep jako *E. casseliflavus*. Identyfikacja gatunków grzybów drożdżopodobnych *Candida glabrata* PM-308 i *Candida krusei* PM-309, wysłanych do laboratoriów pierwszy raz w Programie, sprawiła trudność niewielkiej grupie laboratoriów – 13 laboratoriów popełniło błąd w identyfikacji PM-308, a 6 w oznaczaniu szczepu PM-309.

Czterysta trzydzieści osiem laboratoriów poprawnie zidentyfikowało wszystkie cztery szczepy stanowiące objekty badań rundy III. Tylko trzy laboratoria popełniły błędy w identyfikacji:

- jedno laboratorium *Haemophilus influenzae* PM-314 zidentyfikowało jako *Haemophilus parainfluenzae*;
- dwa laboratoria szczep *Streptococcus pyogenes* PM-316 zidentyfikowały jako *Streptococcus agalactiae*.

Sześć laboratoriów podało identyfikację szczepu *Moraxella catarrhalis* PM-315 jako *Branhamella catarrhalis* niezgodnie z obowiązującą nomenklaturą, jednak pomimo zastosowania nieaktualnej nazwy gatunku identyfikację uznano za poprawną i dopuszczono te izolaty do oceny wyników lekowności.

W V rundzie POLMICRO 2017 czterysta dwadzieścia dziewięć laboratoriów poprawnie zidentyfikowało obydwa szczepy. Siedem laboratoriów popełniło błąd w identyfikacji szczepu *Staphylococcus lugdunensis* PM-323 – trzy laboratoria zidentyfikowały szczep jako *Staphylococcus haemolyticus* i trzy jako *Staphylococcus aureus*, a jedno jako *Staphylococcus xylosus*.

Szczep *Staphylococcus saprophyticus* PM-324 nieprawidłowo zidentyfikowały dwa laboratoria; jedno jako *S. haemolyticus*, a drugie jako *S. aureus*.

Jedno laboratorium popełniło błąd w identyfikacji szczepu – *S. saprophyticus* PM-325 podało identyfikację *S. lugdunensis*.

#### Lekowrażliwość i mechanizmy oporności

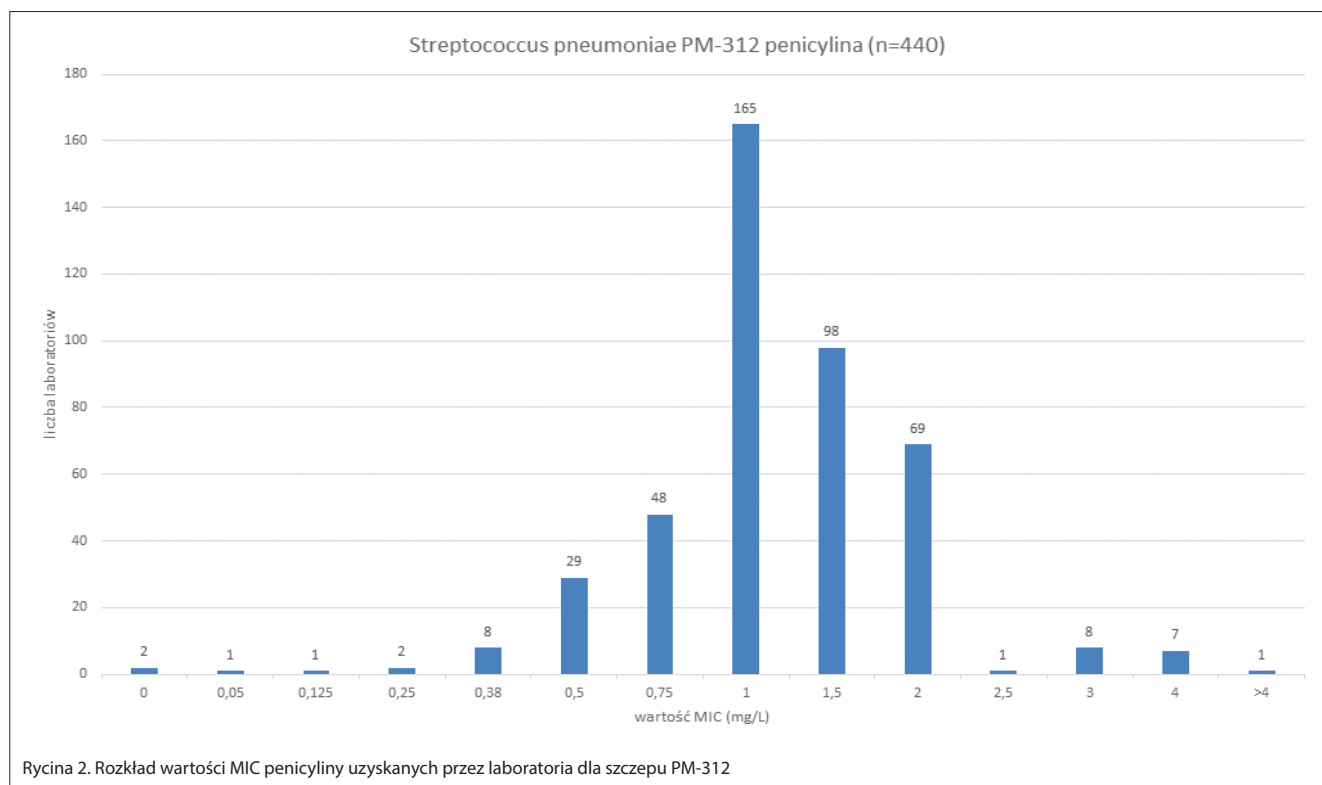
W III rundzie Programu POLMICRO laboratoria zajmowały się oceną lekowności poniższych drobnoustrojów „wymagających” i uzyskały następujące wyniki:

- Szczep *Streptococcus pneumoniae* PM-312 o obniżonej lekowności na penicylinę (MIC 1 mg/L) i cefalosporyny (MIC cefotaksymu 1 mg/L, MIC ceftriaksonu 0,75 mg/L). W zależności od miejsca zakażenia interpretacja kliniczna lekowności na penicylinę [2] to:
- kategoria „średniowrażliwy” – zakażenie inne niż zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – taką interpretację podało 409 laboratoriów (92,7%),
  - kategoria „oporny” – zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – taki wynik podało czterysta trzydzieści dziewięć (99,5%) uczestników.

Nieprawidłową interpretację kliniczną dla penicyliny – „oporny” zamiast „średniowrażliwy” – podało dziewiętnaście laboratoriów, natomiast dziewięć laboratoriów oznaczyło szczep jako „wrażliwy” zamiast „średniowrażliwy” dla zakażenia innego niż ZOMR. Jedno laboratorium popełniło błąd w interpretacji klinicznej ZOMR podając kategorię „wrażliwy” zamiast „oporny”.

Laboratoria, które uzyskały wartości MIC różniące się od wartości referencyjnej o więcej niż jedno rozcieńczenie, powinny przeanalizować procedury wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości oznaczeń, aby uniknąć błędów w rutynowej pracy laboratorium. Rozkład wartości MIC penicyliny dla *S. pneumoniae* PM-312 uzyskanych przez 440 laboratoria przedstawiono na rycinie 2.

Badanie lekowności szczepu na cefotaksym przeprowadziły trzysta trzy laboratoria (n=303/441; 68,7%) i dwieście sześćdziesiąt sześć z nich uzyskało wynik prawidłowy. Błędną interpretację



kliniczną podało trzydzieści laboratoriów oznaczając szczep jako „oporny”, a pięć jako „wrażliwy”.

Wrażliwość szczepu na ceftriakson zbadało stu trzydziestu ośmiu uczestników Programu (n=138/441; 31,3%) i stu piętnastu z nich uzyskało wynik prawidłowy. Dwadzieścia laboratoriów popełniło błąd – dziesięć oznaczyło szczep jako „wrażliwy” i dziesięć jako „oporny”.

Szczep *S. pneumoniae* PM-312 charakteryzował się obecnością mechanizmu oporności  $MLS_B$  konstytutywnego na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B – mechanizm został prawidłowo wykryty przez czterysta trzydzieści siedem laboratoriów (99,1%). Laboratoria nie miały trudności z uzyskaniem prawidłowych wyników oznaczeń pozostałych leków zawartych w Formularzu Odpowiedzi – „oporny” na erytromycynę (n=441/441) i klindamycynę (n=440/441) oraz „wrażliwy” na tetracyklinę (n=439/441).

Szczep *Haemophilus influenzae* PM-313 otrzymało 220 uczestników sprawdzianu, był to szczep  $\beta$ -laktamazo dodatni, oporny na ampicylinę i amoksyycynę z kwasem klawulanowym – fenotyp BLPACR. Wszystkie laboratoria wykryły oporność szczepu na ampicylinę. Siedem laboratoriów popełniło błąd w wykrywaniu oporności szczepu na amoksyycynę z kwasem klawulanowym. Fenotyp BLPACR prawidłowo określiło 92,7% (n=204/220) uczestników. Pozostałe laboratoria (n=16/7,3%) zamiast BLPACR oznaczyły fenotyp szczepu PM-313 jako szczep  $\beta$ -laktamazo – ujemny, oporny na ampicylinę – BLNAR (n=4) i jako szczep  $\beta$ -laktamazo dodatni, oporny na ampicylinę – BLPAR (n=10). Dwa laboratoria nie określiły fenotypu szczepu.

*Haemophilus influenzae* PM-314 – szczep niewytwarzający  $\beta$ -laktamazy, oporny na ampicylinę – fenotyp BLNAR, wrażliwy na tetracyklinę otrzymało 221 laboratoriów. Wszystkie laboratoria wykryły oporność szczepu na ampicylinę poza jednym, które określiło szczep jako „wrażliwy” na ampicylinę o fenotypie BLNAS. Fenotyp BLNAR poprawnie oznaczyło 94,6% uczestników (n=209/221). Jedenaście laboratoriów popełniło błąd w wykrywaniu obecności  $\beta$ -laktamazy w szczepie i zaznaczyło fenotyp BLPAR lub BLPACR.

*Moraxella catarrhalis* PM-315 – izolat wrażliwy na wszystkie antybiotyki i chemioterapeutyki zamieszczone w Formularzu Odpowiedzi. Laboratoria, w większości uzyskały prawidłowe wyniki, wyjątek stanowiło oznaczenie wrażliwości szczepu na amoksyycynę z kwasem klawulanowym – dziesięć laboratoriów (2,3%) błędnie określiło szczep jako „oporny”.

*Streptococcus pyogenes* PM-316 – szczep wrażliwy na penicylinę, oporny na erytromycynę, charakteryzował się obecnością konstytutywnego mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B,  $MLS_B$ . Mechanizm wykryło 98,9% (n=436) laboratoriów.

Laboratoria nie miały trudności z uzyskaniem prawidłowych wyników oznaczeń, a odsetek prawidłowych odpowiedzi wynosił: penicylina – 99,5% (n=439), erytromycyna – 99,8% (n=440), klindamycyna – 99,3% (n=438).

W rundzie V poświęconej gronkowcom koagulazo-ujemnym wyniki oznaczeń lekowrażliwości przedstawiają się następująco:

*Staphylococcus lugdunensis* PM-323 – szczep wrażliwy na metycylinę i antybiotyki zawarte w ankiecie V rundy Programu, oprócz tetracykliny, otrzymało 439 laboratoriów. Dwa z nich popełniły błąd w oznaczaniu metycylinowrażliwości i otrzymały oceny negatywne. Ocena wrażliwości na pozostałe leki nie sprawiła uczestnikom trudności, a procent poprawnych interpretacji klinicznych wynosił 99,8%.

*Staphylococcus saprophyticus* PM-324 – otrzymało 219 laboratoriów. Szczep był wrażliwy na antybiotyki zawarte w ankiecie. Wszystkie laboratoria poprawnie określiły wrażliwość na ciprofloksacynę, nitrofurantoinę i trimetoprim/sulfametoksazol. W ocenie wrażliwości szczepu na ampicylinę, siedem laboratoriów popełniło błąd i oznaczyło szczep jako oporny.

*Staphylococcus saprophyticus* PM-325 – otrzymało 220 laboratoriów, szczep był wrażliwy na antybiotyki zawarte w ankiecie. 100% laboratoriów prawidłowo oznaczyło wrażliwość na ciprofloksacynę i trimetoprim/sulfametoksazol. Dziewięciu uczestników niepoprawnie określiło szczep jako oporny na ampicylinę. Jedno laboratorium określiło szczep jako oporny, zamiast wrażliwy na nitrofurantoinę.

#### Ocena preparatów mikroskopowych

IV runda była poświęcona ocenie preparatów mikroskopowych. Laboratoria otrzymały pięć preparatów mikroskopowych A, B, C, D i E. Preparat A przygotowano z dodatniej hodowli krwi na podłożu bulionowym; w preparacie znajdowały się pałeczki Gram-ujemne. Ponad 92,2% (n=404) uczestników prawidłowo oceniło ten preparat. Trzydzieści trzy laboratoria (7,5%) niepoprawnie zinterpretowały barwienie metodą Grama.

Preparat B również przygotowano z dodatniej hodowli krwi. W preparacie znajdowały się ziarenkowce Gram-dodatnie; 99,5% (n=436) uczestników zaznaczyło prawidłową odpowiedź. Tylko dwa laboratoria niepoprawnie oceniły barwienie metodą Grama. Preparat mikroskopowy C był przygotowany z 24-godzinnej hodowli *Corynebacterium diphtheriae* PM-319 na podłożu stałym. Czterysta cztery laboratoria (92,2%) prawidłowo oceniły ten preparat, a najczęstsze błędy były związane z oceną barwienia (szesnaście laboratoriów – 3,7%) lub oceną morfologii (jedenaście laboratoriów – 2,5%).

Zestawy wysłane do laboratoriów w ramach IV rundy sprawdzianu POLMICRO różniły się preparatem D. W preparatach mikroskopowych przygotowanych do zestawu I (n=219) znajdowały się pałeczki Gram-ujemne, a w zestawie II (n=219) pałeczki Gram-dodatnie. Zestaw I – preparat D zawierał *Campylobacter coli* PM-320. Sto siedemdziesiąt cztery laboratoria (79,5%) podały prawidłową odpowiedź. Najwięcej błędnych odpowiedzi dotyczyło oceny barwienia i morfologii komórek jednocześnie, dwadzieścia dwa laboratoria (10,1%) zaznaczyły w formularzu, że w preparacie widoczne są Gram-dodatnie ziarenkowce.

Zestaw II – preparat D pochodził z hodowli *Listeria monocytogenes* PM-321 i tylko czterdziestu dwóch uczestników (19,2%) zaznaczyło prawidłową odpowiedź. Najwięcej błędów dotyczyło oceny morfologii komórek bakteryjnych – aż dziewięćdziesiąt laboratoriów (41,1%) błędnie podało, że w preparacie widoczne są Gram-dodatnie ziarenkowce.

Preparat E wykonano z hodowli *Geotrichum* spp. PM-322 na podłożu stałym. W preparacie widoczne były strzępki rozpadające się na artrokonidia. Uczestnicy nie mieli problemu z oceną tego preparatu – czterysta siedemnaście (95,2%) laboratoriów udzieliło prawidłowej odpowiedzi.

#### Sprawdziany teoretyczne w wersji elektronicznej

Pytania zawarte w ankiecie I rundy Programu POLMICRO dotyczyły oceny preparatów mikroskopowych oraz zasad wykonywania i odczytu testów lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową. Błędnych odpowiedzi udzieliły pojedyncze laboratoria.

W zadaniu 1. opisano przypadek piorunującej sepsy meningo-kokowej. Na zdjęciach preparatu bezpośredniego z dodatniej hodowli krwi widoczne były Gram-ujemne dwójki. Jedno laboratorium nieprawidłowo podało, że w preparacie znajdują się Gram-dodatnie ziarenkowce, a dwa, że to Gram-ujemne pałeczki. Zadanie 2. dotyczyło pacjentki z bakteryjnym zapaleniem wsierdzia o etiologii paciorkowcowej. Wszystkie laboratoria prawidłowo odpowiedziały na pytania znajdujące się w tym zadaniu.

Zadanie 3. polegało na wybraniu czynnika etiologicznego ropnego zapalenia stawów. Na przedstawionym zdjęciu widoczne były pojedyncze pałeczki Gram-ujemne – *Yersinia enterocolitica*. Cztery laboratoria udzieliły nieprawidłowej odpowiedzi.

W zadaniu 4. przedstawiono przypadek pacjenta z ostrym zapaleniem spojówki oka. W obrazie mikroskopowym (zdjęcie preparatu bezpośredniego) widoczne były Gram-ujemne pałeczki. Wszystkie laboratoria prawidłowo oceniły barwienie i morfologię komórek. Wybór czynnika etiologicznego odpowiedzialnego za to zakażenie także nie przysporzył uczestnikom problemu. Tylko trzy laboratoria nieprawidłowo podały, że jest to *Serratia odorifera*. Bakteria ta, może być odpowiedzialna za zakażenia szpitalne, ale to *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae* są najczęstszymi czynnikami etiologicznymi ostrego zapalenia spojówek.

W Zadaniu 5. należało wybrać prawidłową odpowiedź dotyczącą odczytu testu lekowrażliwości *Enterococcus faecalis* na glikopeptydy. Dwadzieścia jeden laboratoriów udzieliło błędnych odpowiedzi. Ostra strefa zahamowania wzrostu o średnicy 12 mm świadczy o wrażliwości szczepu (nieprawidłową odpowiedź zaznaczyły trzy laboratoria), natomiast rozmyta, lub podwójna strefa nawet > 12 mm może świadczyć o oporności szczepu na wankomycynę (osiemnastu uczestników wybrało nieprawidłową odpowiedź).

W pytaniu 6. zadaniem uczestników było wybranie odpowiedzi dotyczącej odstępów, w jakim należy umieścić krążki z erytromycyną 15 µg i klindamycyną 2 µg w celu wykrycia indukcyjnej oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy. Dla *Staphylococcus* spp. odległość ta wynosi 12-20 mm od krawędzi krążków, a dla *Streptococcus* spp. 12-16 mm. Dziewięć laboratoriów udzieliło błędnej odpowiedzi.

Pytanie 7. dotyczyło zasad odczytu strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z zawartością 25 µg trimetoprimu z sulfametoksazolem dla szczepu *Stenotrophomonas maltophilia*. W tym zadaniu pojawiło się aż dwadzieścia dziewięć nieprawidłowych odpowiedzi, pomimo że wytyczne Europejskiego Komitetu ds.

Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) [2] szczegółowo omawiają to zagadnienie.

Szósta runda Programu pełniła rolę edukacyjną, a jej wyniki nie były brane pod uwagę przy przyznawaniu świadectw. W tej rundzie sprawdzianu najwięcej błędnych odpowiedzi odnotowano w pytaniu dotyczącym wykrywania metalo-β-laktamaz (MBL), co wskazuje na konieczność dodatkowych szkoleń i kontroli w tym zakresie. Wykorzystanie w teście pytań, które pojawiły się w poprzednich rundach sprawdzianu potwierdziło rolę edukacyjną Programu, ale pokazuje także potrzebę regularnego przeglądania wytycznych i procedur laboratoryjnych, bowiem 7,7% laboratoriów nie stosowało aktualnych wytycznych EUCAST.

#### Wewnętrzna kontrola jakości

Zgodnie z rekomendacjami EUCAST [3], szczepem przeznaczonym do kontroli jakości lekowrażliwości *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes* jest szczep *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Czterysta dziewiętnaście laboratoriów (95%) zadeklarowało zastosowanie tego szczepu do kontroli jakości wykonywanych oznaczeń.

Do rutynowej kontroli jakości oznaczania lekowrażliwości *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* EUCAST zaleca szczep *H. influenzae* ATCC 49766 – zastosowanie tego szczepu zaznaczyło 369 laboratoriów (83,7%). 29 laboratoriów wskazało szczep *H. influenzae* ATCC 49247 przeznaczony do kontroli jakości wykrywania mechanizmów oporności.

Trzysta siedemnaście laboratoriów (71,9%) zaznaczyło także szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 stosowany do kontroli jakości β-laktamów w połączeniu z inhibitorem β-laktamaz.

Szczepem przeznaczonym do rutynowej kontroli jakości oznaczeń lekowrażliwości *Staphylococcus* spp. jest szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Czterysta dziewiętnaście laboratoriów (95%) zadeklarowało zastosowanie tego szczepu do kontroli jakości wykonywanych oznaczeń. Osiem zaznaczyło szczep *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, pięć *Escherichia coli* ATCC 25922, a cztery *S. aureus* NCTC 12493.

Laboratoria, które zastosowały szczepy niezgodne z zaleceniami, zostały poproszone o zweryfikowanie swoich procedur kontroli jakości.

#### **Dyskusja i podsumowanie**

Założeniem Programu POLMICRO jest ocena różnych etapów diagnostyki mikrobiologicznej. Szczególny nacisk położony jest na identyfikację, oznaczanie lekowrażliwości i wykrywanie mechanizmów oporności na leki czynników etiologicznych zakażeń. Ważnym elementem diagnostyki mikrobiologicznej, wskazującym kierunek dalszego postępowania, jest także ocena bezpośrednich preparatów mikroskopowych z materiałów klinicznych, jak również preparaty mikroskopowe z hodowli drobnoustrojów. Laboratoria doskonale poradziły sobie z preparatami bezpośrednimi z materiałów klinicznych (krew). Zdecydowanie najtrudniejszy w ocenie okazał się preparat z hodowli zawierający Gram-dodatnie pałeczki *Listeria monocytogenes* – ponad 40% uczestników błędnie oceniło morfologię komórek bakteryjnych. W praktyce

laboratoryjnej preparaty zawierające *L. monocytogenes* są bardzo trudne w ocenie. Pałeczki *Listeria* są bardzo małe i w preparatach z materiałów klinicznych często są widoczne wewnątrz komórek, mogą układać się parami i przypominać pneumokoki lub też tworzyć palisady, przez co mogą być mylone z maczugowcami. Listerioza jest chorobą o bardzo wysokiej śmiertelności, dlatego niezwykle ważna jest ich szybka i wiarygodna diagnostyka [4]. Zestawienie wyników rund Programu POLMICRO z lat 2015-2017 dotyczących oceny preparatów mikroskopowych pokazuje, że jakość wstępnego etapu diagnostyki mikrobiologicznej pozostaje na stałym poziomie, tj. 95% [5,6].

Kolejnym elementem o kluczowym znaczeniu jest identyfikacja czynnika etiologicznego zakażenia oraz prawidłowe oznaczenie wrażliwości na leki z uwzględnieniem mechanizmów oporności. Jedną z rund Programu POLMICRO była poświęcona wyłącznie identyfikacji drobnoustrojów i najwięcej błędów pojawiło się w identyfikacji gatunków z rodzaju *Enterococcus*. Dwadzieścia siedem laboratoriów szczep *E. gallinarum* PM-310: zidentyfikowało jako *E. casseliflavus*. Cechą różnicującą te dwa gatunki jest wytwarzanie barwnika. Szczepy *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* były już obiektem badań w sprawdzianach POLMICRO organizowanych w ubiegłych latach (2015, 2009) [5,7], prawidłowe wyniki uzyskało wtedy odpowiednio 85% i 81% laboratoriów. Obecnie poziom prawidłowych odpowiedzi jest wyższy i wskazuje na postęp w tym zakresie, jednak nadal są laboratoria, dla których szczepy należące do omawianych gatunków stanowią problem diagnostyczny. Biegłość laboratoriów w wykrywaniu i interpretacji mechanizmów oporności na antybiotyki umożliwia podejmowanie odpowiednich decyzji terapeutycznych i działań związanych z kontrolą i profilaktyką zakażeń. Ocena lekowrażliwości i identyfikacja mechanizmów oporności drobnoustrojów „wymagających” oraz koagulazo-ujemnych gronkowców w niniejszej edycji Programu POLMICRO 2017 była na bardzo dobrym poziomie, a odsetek prawidłowych odpowiedzi laboratoriów wynosił powyżej 90%. Na zakończenie każdej rundy Programu POLMICRO 2017 laboratoria otrzymywały ocenę wraz z komentarzem dotyczącym wyników badań oraz ze wskazówkami odnośnie stosowanych metod i technik diagnostycznych. Wyniki sprawdzianu w wersji elektronicznej wskazały na mało aktywne korzystanie przez uczestników z materiałów edukacyjnych oraz zaleceń dostępnych na stronie EUCAST. Zadaniem każdego diagnosty laboratoryjnego jest stosowanie aktualnych standardów, a dobrze zorganizowany system szkoleń wewnętrznych w laboratorium umożliwia podnoszenie kwalifikacji i kompetencji personelu.

Po podsumowaniu wyników Programu POLMICRO 2017 zostały przyznane Świadectwa. Świadectwa uzyskania pozytywnych wyników w Ogólnopolskim Sprawdzianie Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych POLMICRO przyznawane są laboratoriom uczestniczącym w Programie, które uzyskały wyniki pozytywne we wszystkich rundach Programu POLMICRO organizowanych w danym roku. Otrzymały je trzysta pięćdziesiąt trzy laboratoria (79,3%). Dziewięćdziesiąt dwa laboratoria (20,7%), które nie przystąpiły do wszystkich rund POLMICRO lub uzyskały co najmniej jedną ocenę negatywną, otrzymały zaświadczenia. Świadectwa i zaświadczenia o uczestnictwie i uzyskanych wynikach zostały

wysłane do laboratoriów zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia dotyczącego standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych z dnia 15 grudnia 2017 roku [9].

#### Piśmiennictwo:

1. Norma PN-EN ISO/IEC 17043:2011 Ocena zgodności – Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości.
2. Rekomendacje European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 7.1, 2017, www.eucast.org
3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST, Version 6.1, 2016, www.eucast.org
4. Szewczyk E. M. Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2013, 2.
5. Stefaniuk E, Bosacka K, Młodzińska E, et al. POLMICRO 2015 – Ogólnopolski Zewnętrzny Sprawdzian Wiarygodności Badań w Diagnostyce Mikrobiologicznej. *Diagn Lab.* 2016; 52 (1): 29-38.
6. Stefaniuk E, Bosacka K, Młodzińska E, et al. Program Badań Biegłości POLMICRO 2016 – Ogólnopolski Zewnętrzny Sprawdzian Wiarygodności Badań w Diagnostyce Mikrobiologicznej. *Diagn Lab.* 2017; 53 (1): 23-32.
7. Stefaniuk E, Młodzińska E, Chmylek B, et al. Ogólnopolski Sprawdzian Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych – POLMICRO 2009. *Diagn Lab.* 2010; 46: 41-52.
8. Eksperckie zasady interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów – zalecenia EUCAST, wersja 2.0, Polskie tłumaczenie pod red. prof. dr hab. n. med. Walerii Hryniewicz – www.korl.edu.pl
9. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 grudnia 2017 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. *Dz.U.* 2017, poz. 2394.

#### Autor do korespondencji:

mgr Ewa Młodzińska  
Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej  
01-793 Warszawa, ul. Rydygiera 8  
Tel. +48 22 8415834  
e-mail: emlodzińska@polmicro.edu.pl

Otrzymano: 27.09.2018

Akceptacja do druku: 10.10.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów

