

## QUALITY ASSURANCE IN THE MEDICAL MICROBIOLOGY LABORATORY

Ewa Młodzińska<sup>1\*</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre of Quality Control in Microbiology; <sup>2</sup>National Medicines Institute

Received in March, accepted in May 2019

**Abstract:** In each laboratory, a quality assurance program should be developed in order to obtain reliable results and to fulfil the requirements of quality standards in the field of microbiological laboratory tests. Microbiological diagnostics makes it possible to determine the etiological agent of infection and allow the selection of an appropriate therapy. The quality of test results are affected by pre-laboratory, laboratory and post-laboratory steps, which should be checked regularly. Constant internal quality control of performance in the laboratory and participation in external quality control programmes may ensure the quality of results. Internal quality control of the tests at all stages of routine microbiological diagnostics in the laboratory facilitates constant monitoring of the quality of results. Participation in inter-laboratory external quality control programmes permits the quality of performance of tests routinely used in a laboratory to be assessed.

1. Introduction. 2. Quality assurance programme. 2.1. Factors affecting quality. 3. Internal quality control. 3.1. Quality control of identification tests. 3.2. Internal quality control of antimicrobial susceptibility testing and detecting resistance mechanisms. 3.3. Internal quality control of automated systems for identification and susceptibility testing. 4. External quality control. 4.1. External quality assurance programme participation rules. 5. Summary

### ZAPEWNIENIE JAKOŚCI W MEDYCZNYM LABORATORIUM MIKROBIOLOGICZNYM

**Streszczenie:** W każdym laboratorium powinien być opracowany program zapewnienia jakości w celu uzyskiwania przez nie wiarygodnych wyników badań oraz spełnienia wymogów standardów jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych. Diagnostyka mikrobiologiczna umożliwia ustalenie czynnika etiologicznego zakażenia i pozwala na dobór odpowiedniej terapii. Na jakość wyników badań mają wpływ czynności przedlaboratoryjne, laboratoryjne i polaboratoryjne, które powinny być poddawane regularnej kontroli. Prowadzenie w laboratorium stałej wewnętrznej kontroli jakości badań i uczestnictwo w programach kontroli zewnątrzlaboratoryjnej umożliwia zapewnienie jakości wyników. Wewnętrzna kontrola jakości badań to kontrola wszystkich etapów rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej w laboratorium, która pozwala na stałe monitorowanie jakości oznaczeń. Udział w programach międzylaboratoryjnej kontroli zewnętrznej pozwala na ocenę jakości badań rutynowo wykonywanych w laboratorium.

1. Wprowadzenie. 2. Program zapewnienia jakości. 2.1. Czynniki wpływające na jakość. 3. Kontrola wewnątrzlaboratoryjna. 3.1. Kontrola testów identyfikacyjnych. 3.2. Wewnętrzna kontrola jakości oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności. 3.3. Kontrola wewnętrzna systemów automatycznych do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości. 4. Kontrola zewnątrzlaboratoryjna. 4.1. Zasady uczestnictwa w programie kontroli zewnętrznej. 5. Podsumowanie

**Key words:** accreditation, antimicrobial susceptibility testing, external quality control, internal quality control, quality assurance

**Słowa kluczowe:** akredytacja, lekowrażliwość, wewnętrzna kontrola jakości, kontrola zewnątrzlaboratoryjna, zapewnienie jakości

### 1. Introduction

Quality assurance in microbiological diagnostics is the sum of all activities in a laboratory in order to guarantee the reliability of the obtained results. The World Health Organization (WHO) has defined quality assurance as “the total process thanks to which the quality of laboratory results may be guaranteed.” This means the right result, at the right time, on the right and properly collected material, from the right patient, interpreted

in accordance with the current guidelines and obtained at the right price [20].

In accordance with Good Laboratory Practice (GLP), all activities in a laboratory should be performed in the best possible way, so that the results are as accurate as possible. Conducting a microbiological test serves to determine an infection’s aetiological factor and allows for the selection of optimal treatment. It also enables the collection and subsequent analysis of data for epidemiological purposes. Obtaining

\* Corresponding author: Ewa Młodzińska, Centre of Quality Control in Microbiology, Rydygiera Street 8, 01-793 Warsaw; phone: +48 22 841 58 34; e-mail: emlodzinska@palmicro.edu.pl

reliable, reproducible results of diagnostic tests carried out in the shortest possible time also allows one to make appropriate decisions in the field of targeted therapy and prevention, in addition to contributing to the optimization of empirical therapy (microbiological map). Providing high-quality laboratory services guarantees good quality medicine.

Guidelines on quality standards for medical diagnostic and microbiological laboratories contained in Regulation of the Minister of Health from 23 March 2006 (Journal of Laws of 2016, item 1665, as amended) in Annex no. 2 to the Regulation outline quality standards in the field of microbiological laboratory tests, the assessment of their quality and diagnostic value, as well as laboratory interpretation and authorization of test results. Point 7 of Annex no. 2 contains requirements with regard to ensuring the quality of laboratory tests [18, 19]. A laboratory is required to constantly conduct internal quality control in relation to the quality of tests in accordance with knowledge based on scientific evidence, using modern control tools for all the types of tests performed in the laboratory. In accordance with the provisions, a laboratory is also obliged to participate in an external assessment programme at all times as part of inter-laboratory quality control with regard to tests.

Laboratories performing microbiological tests may apply for accreditation. In accordance with the PN-EN ISO 15189:2012 standard, accreditation is a procedure as a result of which an authorized body formally confirms that an organization possesses the competencies to perform specific tasks [12]. Aim of accreditation is to build and strengthen confidence in the results of calibrations, tests, certified products and services, the qualifications of certified individuals, and certified management systems. The Polish Centre for Accreditation (PCA) is the national accreditation body. PCA leads accreditation processes and supervises various institutions, including research and calibration laboratories, as well as medical laboratories [9, 17].

The basis for accrediting medical diagnostic laboratories are two major standards: PN-EN ISO 17025: "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories" – a standard for testing and calibration laboratories (regardless of their profile) and PN-EN ISO 15189:2012 "Medical laboratories – Requirements for quality and competence" – a standard for medical laboratories [11, 12]. One of the key requirements of the standards is to ensure the quality of test results in a laboratory by prosecute internal quality control programme and participation in extra-laboratory assessment programmes. Laboratories applying for accreditation must fulfil all the requirements of a standard. According to the PCA document "Akredytacja Laboratoriów Medycznych" (Accreditation of Medical Laboratories) DAM-01

3<sup>rd</sup> edition from 16.07.2015, the assessment of a laboratory in the accreditation process consists of a review of the documentation and an on-site assessment of the laboratory's competencies to carry out the activities submitted for accreditation. Observation of the activities submitted for accreditation concerns the performance of tests conducted on real objects and in actual conditions, as well as the completion of pre-analytical processes. The laboratory's competencies in the scope of completing pre-analytical processes are also verified during the assessment [9, 16].

## 2. Quality assurance programme

A laboratory should develop an appropriate quality assurance programme in order to obtain accurate and reliable test results and meet the requirements of quality standards in the scope of microbiological laboratory tests. A quality assurance programme is an essential element of a laboratory's management system. According to the PN-EN ISO 9000 standard, quality management means: "coordinated activities with regard to managing an organization and supervising it, which determine the quality policy, objectives and responsibilities, as well as their achievement by means such as: quality planning, quality control, quality assurance and quality improvement" [15]. A quality management system is an individual solution for a given laboratory. It comprises many components, but it is particularly important to determine the responsibility of the staff, to develop a code of conduct and to validate diagnostic procedures and their performance, as well as to observe the principles of health and safety at work. A laboratory must comply with the requirements of normative and legal acts, guidelines and recommendations, as well as the requirements and needs of the laboratory's clients. Ensuring the quality of tests also means leading internal quality control with regard to tests at a laboratory and participating in external quality control programmes which enable the constant monitoring of the laboratory's work and maintaining the high quality of routine diagnostics [1, 8].

### 2.1. Factors affecting quality

A reliable diagnostics of infections enables making appropriate decisions with regard to the therapy and actions related to controlling infections and constitutes an important element in ensuring the safety of patients. All the tests performed in a laboratory should be subject to permanent, daily control aimed at assessing their quality. This is achieved, among others, by implementing a quality assurance programme at a laboratory. Characterizing particular stages of a test is an important element: from collecting the sample, conducting

Table I  
Requirements for the preparation, implementation and application of procedures included in the regulation on quality standards

Procedure	Stage of the test
1. Ordering a laboratory test 2. Collecting the material for laboratory tests 3. Transporting the material for laboratory tests 4. Accepting the material for laboratory tests 5. Storing the material for laboratory tests	Pre-laboratory phase
6. Testing methods 6.1. The laboratory uses testing methods which are in line with the current state of medical knowledge 6.2. The testing methods used at the laboratory have been validated 6.3. The laboratory compiles a list the performed tests and makes it available to the ordering entity 6.4. The laboratory develops, implements and observes the procedures pursuant to the testing methods used 6.5. Storing strains of microorganisms as well as model strains and other ones treated as reference strains upon the completion of testing 7. Ensuring the quality of laboratory tests 7.1. The laboratory conducts a permanent internal control of the tests' quality 7.8. The laboratory is permanently enrolled in an inter-laboratory control of the tests' quality	Laboratory phase
8. Presenting and issuing reports from laboratory tests	Post-laboratory phase

the test, interpreting the result to issuing the test report [7]. The regulation on quality standards for microbiological laboratory tests contains specific requirements for the development, implementation and application of procedures, which have been collected in Table I [18].

The pre-laboratory phase encompasses the responsibility of the laboratory for the preparation of appropriate procedures regarding the methods of collecting, marking and transporting samples to the laboratory, as well as training the staff tasked with collecting samples and transporting clinical material, in accordance with the principles of safely handling infectious material.

In the laboratory phase, the laboratory checks whether the test complies with the order, i.e. the type of sample and its marking, evaluates the suitability of the material for testing, selects the appropriate testing method, develops detailed testing procedures for various materials, including materials ordered in the "CITO" mode (as promptly as possible), which enable the achievement of a reliable result. The laboratory also prepares procedures for the internal quality control of tests, including staff training and the latest diagnostic recommendations.

The post-laboratory phase covers the interpretation of the results, drafting the test report, preparing the test report in the correct form, which must be understandable to the client (a doctor, a hospital infection team etc.). It is also important that the test result is released at a time that allows for it to be used optimally.

Pre-laboratory, laboratory and post-laboratory activities affect the quality of test results and should be subject to regular quality control both an internal one, as well as an external one. Leading internal quality control allows for the quality of markings to be monitored constantly and it is complemented by an external control,

which makes it possible to assess the quality of test routinely performed in the laboratory.

### 3. Internal quality control

The fundamental element of a quality assurance programme consists of the intra-laboratory test control. When creating an internal quality control programme, a laboratory should take into account all the stages of tests which together form microbiological diagnostics, namely, the isolation and identification of microorganisms, testing the microorganisms' susceptibility to antimicrobials, as well as detecting and interpreting their resistance mechanisms. For this purpose, appropriate control materials as well as control strain (reference strains and model strains), originating from respectable national and international culture collections, should be used. In the guidelines of the European Committee on Susceptibility Testing (EUCAST), in addition to control strains originating from the American Type Culture Collection (ATCC), strains from other collections are also listed:

- the ATCC collection (American Type Culture Collection) <http://www.atcc.org>
- the English collection - NCTC (National Collection of Type Cultures) <http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc>
- the French collection - CIP (Collection de Institut Pasteur) <http://www.pasteur.fr/en/public-health/crbip/collections/collection-institut-pasteur-cip>
- the German collection - DSM (Bacterial cultures from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ) <https://www.dsmz.de>
- the Swedish collection - CCUG (Culture Collection University of Gothenburg) <http://www.ccug.se>

– the Spanish collection – CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) <http://www.cect.org>. Control strains in particular collections are given numbers that may have their counterparts in different collections. In the EUCAST guidelines “Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion” (Version 9.0, 2019) for the routine and extended internal quality control of antimicrobial susceptibility testing, the recommended control strains are with numbers from particular collections, e.g.: *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434) [5].

The set of control strains for internal quality control should match the scope of diagnostics carried out by a laboratory, it should enable control of all stages of a laboratory’s routine work. The laboratory should have reference strains for quality control of identification tests, microscopic slides, microbiological media, antimicrobial susceptibility testing, identification and detection of resistance mechanisms, automatic systems for the identification and microorganisms’ antimicrobial susceptibility testing. The preparation of procedures specifying the rules of handling quality control strains, appointing people responsible for the observance of these rules and keeping records which serve as evidence of supervising them are also vital.

### 3.1. Quality control of identification tests

Preparing a universal programme of the internal control of identification tests is not an easy task. Identification procedures may vary significantly between laboratories and their scope depends on the needs, capacity and experience of a laboratory in terms of diagnostics. Identification patterns may contain various available manual methods (isolation and selection plates, chromogenic media, biochemical tests), microscopic tests, biochemical examinations, serological tests, standardized commercial sets, automatic identification methods, as well as modern identification technologies (mass spectrometry) or advanced techniques using molecular methods.

In the identification of microorganisms, basic tests for particular properties may be used as screening tests (e.g. urea hydrolysis, catalase, indole, oxidase) or as key tests (e.g. coagulase). In order to confirm the reliability of a single test result, positive and negative control should be used. The microorganisms recommended for quality control of particular tests should be indicated by their manufacturer. The condition that is most difficult to be met is the simultaneous use of the appropriate organisms for the purposes of positive and negative control along with the tested strains. The lack of quality control of the performed marking poses a threat to obtaining the correct identification result.

### 3.2. Internal quality control of antimicrobial susceptibility testing and detecting resistance mechanisms

Antimicrobial susceptibility testing is an important stage in routine microbiological diagnostics and it is usually carried out in order to identify the etiological factors of infections; one exception is the recently approved method of marking antimicrobial susceptibility directly from positive blood cultures [4]. The result of this method always has to be verified using the test’s settings for the isolated strain (see below). Testing susceptibility to antimicrobials necessitates the observance of standardized procedures. Various methods are used when testing antimicrobial susceptibility – both quantitative and qualitative ones. The fundamental and commonly used qualitative method is the disk diffusion method, developed at the beginning of the 1960s. This method takes advantage of a concentration gradient forming in the process of diffusing the substance in the medium and the end result is the determination whether a strain is susceptible or resistant to a given antimicrobial agent. The disk-diffusion method, along with the quality control requirements, is presented on the EUCAST website, in the document “Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method” (Version 7.0, 2019) [2, 10].

Quantitative methods allow to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of a antimicrobial agent (mg/L). These are dilution methods in stock or in agar, where a bacterial suspension of a specific density is poured onto an antibiotic medium in incrementally smaller concentrations. The microdilution method in a liquid medium is a reference method for determining the activity of antibacterial agents *in vitro* against rapidly growing aerobic bacteria which cause infectious diseases (PN-EN ISO 20776-1: 2007) [14]. The determination of MIC values of antimicrobial agent used for treatment, especially in the case of invasive infections, enables the selection of the appropriate dose of an antimicrobial agent, one which takes into account the pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. In the case of some antimicrobial agents (e.g. vancomycin), determining the MIC value is the only reliable method of marking susceptibility. On the basis of a antimicrobial’s MIC value, it is possible to assign the appropriate category of susceptibility to a given antimicrobial agent to a strain. In 2019, in the EUCAST recommendations “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.” definitions of particular categories were modified and currently there are three susceptibility categories:

S – Susceptible. A microorganism is categorised as susceptible, standard dosing regimen, when there is



a high likelihood of therapeutic success using a standard dosing regimen of the agent.

I – Susceptible, increased exposure. A microorganism is categorised as “susceptible, increased exposure” when there is a high likelihood of therapeutic success because exposure to the agent is increased by adjusting the dosing regimen or by its concentration at the site of infection.

R – Resistant. A microorganism is categorised as resistant when there is a high likelihood of therapeutic failure even when there is increased exposure [3].

Therefore, the proper assessment of a microorganism's susceptibility is of vital importance, and obtaining reliable results is impossible without an internal quality control with regard to the markings used in a laboratory. In accordance with EUCAST recommendations, quality control should be performed for each test of a bacterial strain's susceptibility to antimicrobial agent. Its basis lies in marking the susceptibility of the appropriate reference strains every day when the test was performed.

Control strains recommended for an internal quality control of susceptibility to antimicrobial agents, i.e. the routine and the extended one, along with the expected results and ranges (growth inhibition zones diameter and MIC values) are included in EUCAST guidelines (Version 9.0, 2019). In an extended quality control, the following control strains for detecting resistance mechanisms (ESBL, MRSA, VRE or HLGR) are recommended: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (NCTC 13368, CCUG 45421, CECT 7787), *Staphylococcus aureus* NCTC 12493 (CCUG 67181), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (NCTC 13379, CIP 104676, CCUG 34289) [5]. Control strains with known resistance mechanisms may also be used to confirm routine tests for marking susceptibility to agents, which allows for correct results to be obtained in a category different from susceptibility. Strains intended for a routine quality control of susceptibility markings are mostly wild strains with a sensitivity phenotype lacking resistance mechanisms.

The above-mentioned method of quickly marking the susceptibility to antimicrobial agent directly from positive blood cultures is also available – RAST (rapid antimicrobial susceptibility testing) EUCAST “Methodology – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles” [4]. This method is based on the disk diffusion method and has been validated for blood culture bottles in the BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) and VersaTREK (Thermo Fisher) systems. In the procedure, the way of preparing the suspension has been modified (100–150 µl of undiluted blood is collected from a positive bottle and poured onto an antibiogram medium), the incubation time has been shortened – a reading may be made

after 4, 6 or 8 hours at most, principles of interpreting the results have been changed and specific breakpoints along with quality control criteria for the RAST method have been prepared. “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles” [6]. Three quality control strains have been prepared for verifying the RAST procedure in EUCAST tables: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 and *S. pneumoniae* ATCC 49619 with ranges of growth inhibition zones diameter and breakpoints for different antibiotics after 4, 6 and 8-hour incubation [4, 6]. Performing quality control is important once this method is introduced into routine application in a laboratory in order to validate the method and train staff in this regard, as well as when the blood culture system is changed.

### 3.3. Internal quality control of automated systems for identification and susceptibility testing

Manufacturers of automatic systems are responsible for establishing and maintaining adequate quality control to ensure the safety and effectiveness of the identification system. This includes checking positive and negative results for each reagent or substrate in order to ensure the appropriate activity of all the components of a card or a panel for the identification of microorganisms. However, this does not absolve the user of the system from conducting an internal quality control. The manual for a system, panels or cards should contain information regarding quality control, along with an indication of the reference strains and the expected results of quality control, as well as recommendations to the frequency of performing controls.

The reference strains for a quality control of applying susceptibility to antimicrobial agents using automatic methods should be used in accordance with the manufacturer's guidelines, who is the entity responsible for the preparation and performance of an appropriate quality control – by checking the results for every antimicrobial agent in order to ensure the proper activity of all the components of a panel or an antibiogram card. The strains recommended for quality control are mostly common to all the methods of antimicrobial susceptibility testing. Additionally, kits for control panels/antibiogram cards may include other control microorganisms, whose properties enable fully controlling the antibiogram. A laboratory regardless makes the decision on the frequency of performing internal quality controls, quality control of a new batch or tests from a new delivery to the laboratory is most often recommended.

Issues regarding internal quality control at a microbiological laboratory are not limited exclusively to using control strains and the ways of handling them

in order to maintain and confirm their characteristic features. Internal quality control also means assessing the effectiveness of laboratory procedures, supervising the methods, equipment, tests and reagents used in a laboratory, ensuring storage conditions for reagents and tests, using them as intended in the manner recommended by the manufacturer. Supervising all the records kept at a laboratory with respect to the conducted tests, the applied media, the density of the suspension, the time and conditions of incubation and checking compliance with the current recommendations are also part of intra-laboratory control.

#### 4. External quality control

External quality control programmes enable checking the effectiveness of internal control procedures and maintaining the appropriate quality of a laboratory's work. All the tests performed at a laboratory should be assessed in an external quality control programme (the assessment should cover every stage of a test). Participation in an external control makes it possible to compare the diagnostic level of participants to the other laboratories participating in a given programme. The purpose of an external quality assessment is also to promote high standards of good laboratory practices, encourage the use of standardized methods, staff training, providing repair mechanisms for found errors and preventing them.

The quality standards for medical and microbiological diagnostic laboratories stipulate that it is the duty of a laboratory to regularly participate in inter-laboratory quality control programmes organized by, among others, Centre of Quality Control in Microbiology (CQCM) ([www.polmicro.edu.pl](http://www.polmicro.edu.pl)). For test which are not covered by Centre of Quality Control, a laboratory should participate in inter-laboratory quality assessment programmes organized by other national or by world-renowned institutions, e.g. the UK NEQAS, INSTAND or Labquality programmes. CQCM is the organizer of the Polish National External Quality Assessment Scheme in Microbiological Diagnostics – POLMICRO, whose advantage lies in adjusting control materials to the current epidemiological situation. The POLMICRO programme enables laboratories to subject various stages of microbiological diagnostics to an external quality control. Annual editions of the programme are dedicated to the preliminary stage of diagnostics which consists of the interpretation of microscopic slides, identification various isolates to the species level, as well as susceptibility testing to antimicrobial agents and detecting mechanisms of resistance. The aim of the programme is to educate microbiological laboratories and assess their competences

in identifying, marking susceptibility to antimicrobial agents as well as detecting resistance mechanisms. The evaluation of particular editions of the POLMICRO Programme is carried out in accordance with the standard entitled PN-EN ISO/IEC 17043:2011 "Conformity assessment. General requirements for proficiency testing" [13]. Based on the results obtained in all the rounds of the POLMICRO programme, a laboratory is granted a Certificate of passing the Polish National External Quality Assessment Scheme in Microbiological Diagnostics POLMICRO. Those laboratories that did not participate in all the rounds of the POLMICRO programme over the course of a year or those which have obtained at least one negative grade receive certificates confirming their participation and the obtained results [19, 21].

##### 4.1. External quality assurance programme participation rules

A laboratory should handle the received sample in the same way as it would handle routinely tested material received from patients, without using special methods, reagents, additional tests or entrusting it to more qualified staff. When handling the sample, a laboratory should take note of the instructions received from the centre that organizes the programme.

The results of an external laboratory control should always be analysed by a laboratory and discussed with the staff and every incorrect result should be investigated in order to verify what actions need to be taken to prevent discrepancies. In order to eliminate discrepancies a laboratory should introduce corrective actions.

#### 5. Summary

The information included in the present work indicates that microbiological laboratories are obliged to prepare and implement a quality assurance programme. The legal acts in force, current recommendations and guidelines clearly outline the duties of medical laboratories in the scope of ensuring the quality of microbiological tests while taking all the diagnostic stages into account, namely the pre-laboratory phase, the laboratory phase and the post-laboratory phase. The requirements apply to all laboratories not only the ones applying for accreditation.

Systematic quality control by means of observing the procedures of an internal quality control of tests routinely performed at a laboratory and assessment of the tests' quality by participating in external control programmes are the basis for obtaining reliable results of microbiological tests.

### Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

### References

1. Carey R.B., Bhattacharyya S., Kehl S.C., Matukas L.M., Penttella M.A., Salfinger M., Schuetz A.N.: Implementing a quality management system in the medical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00062-17 (2018)
2. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2019\\_manuals/Manual\\_v\\_7.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_2019.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf) (25.03.2019)
3. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf) (25.03.2019)
4. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Methodology – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/RAST/Methodology\\_EUCAST\\_RAST\\_v1\\_20181126.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf) (25.03.2019)
5. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion EUCAST, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/QC/v\\_9.0\\_EUCAST\\_QC\\_tables\\_routine\\_and\\_extended\\_QC.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_9.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf) (25.03.2019)
6. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. Version 1.0, 2018. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/RAST/EUCAST\\_RAST\\_Breakpoint\\_Table\\_v\\_1.0\\_final\\_PDF.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_Breakpoint_Table_v_1.0_final_PDF.pdf) (25.03.2019)
7. Heczko P., Wróblewska M., Pietrzyk A.: Diagnostyka zakażeń bakteryjnych (in) *Mikrobiologia Lekarska*, PZWL, Warsaw, 2014, p. 657–666
8. Leber Amy L., editor, Quality Assessment and Improvement (Quality Assurance) (in) *Clinical microbiology procedures handbook*, ASM Press, 2016, DOI: 10.1128/9781555818814.ch14.1
9. Eleftheriadou M. and Tsimillis K.C. (Eds), Eurachem guide: Accreditation for Microbiological Laboratories, Second edition, 2013
10. Matuschek E., Brown D. E., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O255–O256 (2014)
11. PN-EN ISO 17025:2018-02, Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących, Polski Komitet Normalizacyjny
12. PN-EN ISO 15189:2013-05, Laboratoria medyczne – Wymagania dotyczące jakości i kompetencji, Polski Komitet Normalizacyjny
13. PN-EN ISO/IEC 17043:2011, Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badań biegłości, Polski Komitet Normalizacyjny
14. PN-EN ISO 20776-1:2007, Kliniczne badania laboratoryjne i metody badań diagnostycznych in vitro. Oznaczanie wrażliwości drobnoustrojów i ocena przydatności gotowych testów do oznaczania wrażliwości na leki przeciwbakteryjne. Część 1: Referencyjna metoda oznaczania in vitro aktywności leków przeciwbakteryjnych wobec szybko rosnących tlenowych bakterii wywołujących choroby zakaźne, Polski Komitet Normalizacyjny
15. PN-EN ISO 9000:2015-10, Systemy zarządzania jakością – Podstawy i terminologia, Polski Komitet Normalizacyjny
16. Polskie Centrum Akredytacji: Akredytacja Laboratoriów Medycznych, dokument PCA DAM-01 wyd.3 z dnia 16.07.2015
17. Polskie Centrum Akredytacji: Rola akredytacji, <https://www.pca.gov.pl/akredytacja/akredytacja/rola-akredytacji/> (25.03.2019)
18. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r., Standardy jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych Załącznik 2: Standardy jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych, w tym badań technikami biologii molekularnej, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyniku badań, (Dz.U. z 2016 r. poz.1665),
19. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 grudnia 2017 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych, (Dz. U. z 2017 r. poz. 2394)
20. World Health Organization Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development -2nd ed., Chapter 2. Good Laboratory Practice Training, 9–56. ISBN 978 92 4 154755 0 (2009)
21. Zarządzenie Ministra Zdrowia z dnia 31 sierpnia 2017 r. zmieniające zarządzenie w sprawie Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (Dz. Urz. Min. Zdrow. z dnia 31 sierpnia 2017 r. Poz. 89)



## ZAPEWNIENIE JAKOŚCI W MEDYCZNYM LABORATORIUM MIKROBIOLOGICZNYM

Ewa Młodzińska<sup>1\*</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej

<sup>2</sup>Narodowy Instytut Leków

*Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w maju 2019 r.*

**Streszczenie:** W każdym laboratorium powinien być opracowany program zapewnienia jakości w celu uzyskiwania przez nie wiarygodnych wyników badań oraz spełnienia wymogów standardów jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych. Diagnostyka mikrobiologiczna umożliwia ustalenie czynnika etiologicznego zakażenia i pozwala na dobór odpowiedniej terapii. Na jakość wyników badań mają wpływ czynności przedlaboratoryjne, laboratoryjne i polaboratoryjne, które powinny być poddawane regularnej kontroli. Prowadzenie w laboratorium stałej wewnętrznej kontroli jakości badań i uczestnictwo w programach kontroli zewnątrzlaboratoryjnej umożliwia zapewnienie jakości wyników. Wewnętrzna kontrola jakości badań to kontrola wszystkich etapów rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej w laboratorium, która pozwala na stałe monitorowanie jakości oznaczeń. Udział w programach międzylaboratoryjnej kontroli zewnętrznej pozwala na ocenę jakości badań rutynowo wykonywanych w laboratorium.

1. Wprowadzenie. 2. Program zapewnienia jakości. 2.1. Czynniki wpływające na jakość. 3. Kontrola wewnątrzlaboratoryjna. 3.1. Kontrola testów identyfikacyjnych. 3.2. Wewnętrzna kontrola jakości oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności. 3.3. Kontrola wewnętrzna systemów automatycznych do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości. 4. Kontrola zewnątrzlaboratoryjna. 4.1. Zasady uczestnictwa w programie kontroli zewnętrznej. 5. Podsumowanie

### QUALITY ASSURANCE IN THE MEDICAL MICROBIOLOGY LABORATORY

**Abstract:** In each laboratory, a quality assurance programme should be developed in order to obtain reliable results and to fulfil the requirements of quality standards in the field of microbiological laboratory tests. Microbiological diagnostics makes it possible to determine the etiological agent of infection and allow the selection of appropriate therapy. The quality of test results are affected by pre-laboratory, laboratory and post-laboratory steps, which should be checked regularly. Permanent internal quality control of performance in the laboratory and participation in interlaboratory control programs allow ensuring the quality of results. Internal quality control of the tests at all stages of routine microbiological diagnostics in the laboratory which allows constant monitoring of the quality of results. Participation in inter-laboratory external quality control programs permits to assess the quality of performance of tests routinely used in a laboratory.

1. Introduction. 2. Quality assurance programme. 2.1. Factors affecting quality. 3. Internal quality control. 3.1. Quality control of identification tests. 3.2. Internal quality control of antimicrobial susceptibility testing and mechanism of resistance detecting. 3.3. Internal quality control of automated systems for identification and susceptibility testing. 4. External quality control. 4.1. External quality assurance programme participation rules. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** akredytacja, lekowrażliwość, wewnętrzna kontrola jakości, kontrola zewnątrzlaboratoryjna, zapewnienie jakości

**Key words:** accreditation, antimicrobial susceptibility testing, external quality control, internal quality control, quality assurance

### 1. Wprowadzenie

Zapewnienie jakości w diagnostyce mikrobiologicznej jest sumą wszystkich działań w laboratorium w celu zapewnienia wiarygodności uzyskiwanych wyników. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO World Health Organization) określiła zapewnienie jakości jako „całkowity proces, dzięki któremu można zagwarantować

jakość wyników laboratoryjnych”. Oznacza to właściwy wynik, we właściwym czasie, na właściwym i odpowiednio pobranym materiale, od właściwego pacjenta, zinterpretowany zgodnie z aktualnymi zaleceniami i uzyskany za odpowiednią cenę [20].

Zgodnie z Dobrą Praktyką Laboratoryjną – GLP (Good Laboratory Practice) wszystkie czynności w laboratorium należy wykonywać w najlepszy możliwy

\* Autor korespondencyjny: Mgr Ewa Młodzińska, Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa; tel. 22 841 58 34; e-mail: emlodzinska@polmicro.edu.pl



sposób, tak aby uzyskane wyniki były możliwie jak najbardziej dokładne. Prowadzenie badania mikrobiologicznego służy ustaleniu czynnika etiologicznego zakażenia i pozwala na wybór optymalnego leczenia. Umożliwia także gromadzenie, a następnie analizowanie danych dla celów epidemiologicznych. Uzyskiwanie wiarygodnych, powtarzalnych wyników badań diagnostycznych przeprowadzonych w możliwie najkrótszym czasie, pozwala również na podejmowanie odpowiednich decyzji w zakresie terapii celowanej i profilaktyki, służy także optymalizacji terapii empirycznej (mapa mikrobiologiczna). Zapewnienie wysokiej jakości usług laboratoryjnych gwarantuje dobrej jakości medycynę.

Wytyczne w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych zawarte w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. (Dz. U. z 2016 r. poz. 1665 z późniejszymi zmianami) w załączniku numer 2 do rozporządzenia określają standardy jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyników badań. Punkt 7 załącznika nr 2 zawiera wymagania odnośnie zapewnienia jakości badań laboratoryjnych [18, 19]. Laboratorium jest zobowiązane do prowadzenia stałej wewnętrznej kontroli jakości badań, zgodnie z opartą na dowodach naukowych wiedzą, z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi kontrolnych dla wszystkich rodzajów badań wykonywanych w laboratorium. W myśl zapisów obowiązkiem laboratorium jest także stały udział w programie zewnętrznej oceny w ramach międzylaboratoryjnej kontroli jakości badań.

Laboratoria wykonujące badania mikrobiologiczne mogą ubiegać się o akredytację. Zgodnie z normą PN-EN ISO 15189:2012 akredytacja to procedura, w wyniku której upoważniona jednostka formalnie potwierdza, że organizacja jest kompetentna do wykonywania określonych zadań [12]. Akredytacja służy budowaniu i umacnianiu zaufania do wyników wzorcowań, badań, certyfikowanych wyrobów i usług, kwalifikacji certyfikowanych osób oraz certyfikowanych systemów zarządzania. Polskie Centrum Akredytacji (PCA) jest krajową jednostką akredytującą. PCA prowadzi procesy akredytacji i sprawuje nadzór nad różnymi jednostkami, w tym laboratoriami badawczymi i wzorcującymi oraz laboratoriami medycznymi [9, 17].

Podstawą do akredytacji medycznych laboratoriów diagnostycznych są dwie główne normy: PN-EN ISO 17025:2018 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących” norma dla laboratoriów badawczych i wzorcujących (bez względu na profil) i PN-EN ISO 15189:2013 „Laboratoria medyczne – Wymagania dotyczące jakości i kompetencji” norma dla laboratoriów medycznych [11, 12]. Jednym z kluczowych wymagań norm jest zapewnienie

jakości wyników badań w laboratorium poprzez prowadzenie programów wewnętrznej kontroli jakości i udziału w programach oceny zewnętrznej laboratoryjnej. Laboratoria występujące o akredytację muszą spełnić wszystkie wymagania normy. Zgodnie z dokumentem PCA „Akredytacja Laboratoriów Medycznych” DAM-01 wyd. 3 z dnia 16.07.2015, ocena laboratorium w procesie akredytacji polega na przeglądzie dokumentacji oraz ocenie na miejscu kompetencji laboratorium do realizacji działalności zgłoszonej do akredytacji. Obserwacja działalności zgłoszonej do akredytacji dotyczy realizacji badań wykonywanych na rzeczywistych obiektach i w rzeczywistych warunkach oraz realizacji procesów przedanalizacyjnych. Kompetencje laboratorium w zakresie realizacji procesów poanalizacyjnych są również sprawdzane w trakcie oceny [9, 16].

## 2. Program zapewnienia jakości

Laboratorium powinno opracować odpowiedni program zapewnienia jakości w celu uzyskiwania dokładnych i rzetelnych wyników badań oraz spełnienia wymogów standardów jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych. Program zapewnienia jakości jest istotnym elementem systemu zarządzania laboratorium. Wg normy PN-EN ISO 9000 zarządzanie jakością to: „skoordynowane działania dotyczące kierowania organizacją i jej nadzorowania, które decydują o polityce jakości, celach i odpowiedzialności, a także o ich realizacji za pomocą takich środków jak: planowanie jakości, sterowanie jakością, zapewnienie jakości i doskonalenie jakości” [15]. System zarządzania jakością to indywidualne rozwiązanie dla danego laboratorium. Zawiera on wiele składowych, ale szczególnie ważne jest ustalenie odpowiedzialności personelu, opracowanie zasad postępowania oraz zwalidowanie procedur diagnostycznych i ich realizacja, a także przestrzeganie zasad bezpieczeństwa i higieny pracy. Laboratorium musi zastosować się do wymogów aktów normatywnych i prawnych, zaleceń i rekomendacji oraz wymagań i potrzeb klientów laboratorium. Zapewnienie jakości badań to również prowadzenie w laboratorium wewnętrznej kontroli jakości badań i udział w zewnętrznych programach kontroli jakości pozwalające na stałe monitorowanie pracy laboratorium i utrzymywanie wysokiej jakości rutynowej diagnostyki [1, 8].

### 2.1. Czynniki wpływające na jakość

Wiarygodna diagnostyka zakażeń umożliwia podejmowanie odpowiednich decyzji terapeutycznych i działań związanych z kontrolą zakażeń i stanowi

ważny element zapewnienia bezpieczeństwa pacjentów. Wszystkie badania wykonywane w laboratorium powinny podlegać stałej codziennej kontroli oceniającej ich jakość. Służy temu m.in. wdrożenie w laboratorium programu zapewnienia jakości badań. Ważnym elementem jest charakterystyka poszczególnych etapów badania: od pobrania próbki, przeprowadzenia badania, interpretacji wyniku i wydania sprawozdania z badania [7]. W rozporządzeniu dotyczącym standardów jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych zawarto szczegółowe wymagania dotyczące opracowania, wdrażania i stosowania procedur, które zebrano w Tabeli I [18].

Faza przedlaboratoryjna obejmuje odpowiedzialność laboratorium za przygotowanie odpowiednich procedur dotyczących metod pobrania, oznakowania i transportu próbek do laboratorium oraz przeprowadzenia szkoleń personelu pobierającego i transportującego materiał kliniczny, zgodnie z zasadami bezpieczeństwa postępowania z materiałem zakaźnym.

W fazie laboratoryjnej laboratorium sprawdza zgodność ze zleceniem badania tj. rodzaj próbki i jej oznakowanie, ocenia przydatność materiału do badania, dokonuje wyboru właściwej metody badania, opracowuje szczegółowe procedury badania różnych materiałów z uwzględnieniem materiałów zleczanych w trybie „CITO”, pozwalające na osiągnięcie wiarygodnego wyniku. Laboratorium przygotowuje również procedury wewnętrznej kontroli jakości oznaczeń z uwzględnieniem szkoleń personelu i najnowszych rekomendacji diagnostycznych.

Faza polaboratoryjna obejmuje interpretację wyników, sporządzenie sprawozdania z badania, właściwe sformułowanie sprawozdania z badania, które musi być zrozumiałe dla zleceniodawcy (lekarz, zespół zaka-

żeń szpitalnych itp.). Ważne jest także, aby wynik badania był wydany w czasie, który pozwala go optymalnie wykorzystać.

Czynności przedlaboratoryjne, laboratoryjne i polaboratoryjne wpływają na jakość wyników badań i powinny być poddawane regularnej kontroli zarówno wewnątrzlaboratoryjnej jak i zewnątrzlaboratoryjnej. 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.

### 3. Kontrola wewnątrzlaboratoryjna

Podstawowym elementem programu zapewnienia jakości jest wewnątrzlaboratoryjna kontrola badań. Laboratorium tworząc program wewnętrznej kontroli jakości powinno uwzględnić wszystkie etapy badań składających się na diagnostykę mikrobiologiczną tj. izolację, identyfikację drobnoustrojów, oznaczanie lekowrażliwości drobnoustrojów oraz wykrywanie mechanizmów oporności i ich interpretację. Do tego celu należy stosować odpowiednie materiały kontrolne oraz szczepy kontrolne (szczepy referencyjne, odniesienia, wzorcowe) pochodzące z uznanych krajowych i międzynarodowych kolekcji kultur. W zaleceniach Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości – EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) oprócz szczepów kontrolnych pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych – ATCC wymienione są szczepy z innych kolekcji: – kolekcja ATCC (American Type Culture Collection) <http://www.atcc.org>

Tabela I

Wymagania dotyczące opracowania, wdrażania i stosowania procedur zawarte w rozporządzeniu dotyczącym standardów jakości

Procedura	Etap badania
1. Zlecenia badania laboratoryjnego 2. Pobieranie materiału do badań laboratoryjnych 3. Transport materiału do badań laboratoryjnych 4. Przyjmowanie materiału do badań laboratoryjnych 5. Przechowywanie materiału do badań laboratoryjnych	Faza przedlaboratoryjna
6. Metody badawcze 6.1. Laboratorium stosuje metody badawcze, które odpowiadają aktualnej wiedzy medycznej 6.2. Metody badawcze stosowane w laboratorium są zwalidowane 6.3. Laboratorium ustala listę wykonywanych badań i udostępnia ją zleceniodawcom 6.4. Laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedury stosowanych metod badawczych 6.5. Przechowywanie szczepów drobnoustrojów po zakończeniu badania oraz szczepów wzorcowych i innych traktowanych jako szczepy odniesienia 7. Zapewnienie jakości badań laboratoryjnych 7.1. Laboratorium prowadzi stałą wewnętrzną kontrolę jakości badań 7.8. Laboratorium bierze stały udział w programach międzylaboratoryjnej kontroli jakości badań	Faza laboratoryjna
8. Przedstawianie i wydawanie sprawozdań z badań laboratoryjnych	Faza polaboratoryjna

- kolekcja angielska – NCTC (National Collection of Type Cultures) <http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc>
- kolekcja francuska – CIP (Collection de Institut Pasteur) <http://www.pasteur.fr/en/public-health/crbip/collections/collection-institut-pasteur-cip>
- kolekcja niemiecka – DSM (Bacterial cultures from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ) <https://www.dsmz.de>
- kolekcja szwedzka – CCUG (Culture Collection University of Gothenburg) <http://www.ccug.se>
- kolekcja hiszpańska – CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) <http://www.cect.org>. Szczepy kontrolne w poszczególnych kolekcjach mają nadawane numery, które mogą mieć odpowiedniki w innych kolekcjach. W zaleceniach EUCAST „Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion” (Wersja 9.0, 2019) do rutynowej i rozszerzonej wewnętrznej kontroli jakości lekowrażliwości zalecane szczepy kontrolne mają wymienione numery poszczególnych kolekcji np.: *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434) [5].

Zestaw szczepów kontrolnych do kontroli wewnętrznej powinien być dopasowany do zakresu diagnostyki prowadzonej przez laboratorium, powinien umożliwiać przeprowadzenie kontroli jakości wszystkich etapów rutynowej pracy laboratorium. Laboratorium powinno posiadać szczepy referencyjne do kontroli jakości testów identyfikacyjnych, preparatów mikroskopowych, podłoży mikrobiologicznych, oznaczania lekowrażliwości, identyfikacji i wykrywania mechanizmów oporności, automatycznych systemów do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów. Bardzo ważne jest przygotowanie procedur określających zasady postępowania ze szczepami kontrolnymi, ustalenie osób odpowiedzialnych za przestrzeganie tych zasad i utrzymywanie zapisów potwierdzających ich nadzorowanie.

### 3.1. Kontrola testów identyfikacyjnych

Przygotowanie uniwersalnego programu kontroli wewnętrznej testów identyfikacyjnych nie jest proste. Procedury identyfikacyjne w laboratoriach mogą być bardzo różne, a ich zakres jest uzależniony od diagnostycznych potrzeb i możliwości oraz doświadczenia laboratorium. Schematy identyfikacji mogą wykorzystywać różne dostępne metody manualne (płytki izolacyjno-wybiórcze, podłoża chromogenne, szeregi biochemiczne), badania mikroskopowe, testy biochemiczne, testy serologiczne, standaryzowane zestawy komercyjne, automatyczne metody identyfikacyjne oraz nowoczesne technologie do identyfikacji (spektrometria mas) czy zaawansowane techniki z wykorzystaniem metod molekularnych.

W identyfikacji drobnoustrojów podstawowe testy dla pojedynczych cech mogą być stosowane jako badania przesiewowe (np. hydroliza mocznika, katalaza, indol, oksydaza) lub jako testy kluczowe (np. koagulaza). W celu potwierdzenia wiarygodności pojedynczego wyniku testu należy stosować kontrolę dodatnią i ujemną. Drobnoustroje zalecane do kontroli jakości poszczególnych testów powinny być wskazane przez ich producenta. Najtrudniejsze do spełnienia jest jednoczesne stosowanie odpowiednich organizmów do kontroli dodatniej i ujemnej wraz ze szczepami badanymi. Brak kontroli jakości wykonywanego oznaczenia jest zagrożeniem dla uzyskania prawidłowego wyniku identyfikacji.

### 3.2. Wewnętrzna kontrola jakości oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności

Oznaczanie lekowrażliwości jest ważnym etapem rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej i zwykle przeprowadza się je dla zidentyfikowanych czynników etiologicznych zakażeń, wyjątek stanowi dopuszczona niedawno metoda bezpośredniego oznaczania wrażliwości na leki z dodatnich hodowli krwi [4]. Wynik jej musi być zawsze zweryfikowany nastawieniem badań dla wyizolowanego szczepu (patrz poniżej). Badanie wrażliwości na leki wymaga stosowania wystandaryzowanych procedur. Do oznaczania lekowrażliwości stosuje się różne metody: ilościowe i jakościowe. Podstawową i powszechnie stosowaną metodą jakościową jest metoda dyfuzji antybiotyku z krążka w żelu agarowym opracowana na początku lat 60-tych. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko powstawania gradientu stężeń w trakcie dyfuzji substancji w podłożu, a ostatecznie uzyskiwany wynik to określenie szczepu jako wrażliwy lub oporny na dany lek. Metoda dyfuzyjno-krążkowa wraz z wymaganiami kontroli jakości przedstawiona jest na stronie internetowej EUCAST w dokumencie „Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method” (Wersja 7.0, 2019) [2, 10].

Metody ilościowe pozwalają określić najmniejsze stężenie hamujące leku MIC (minimal inhibitory concentration) (mg/L). Są to metody rozcieńczeniowe w bulionie lub w agarze, gdzie na podłożu z antybiotykiem w malejących stężeniach posiewana jest zawiesina bakteryjna o określonej gęstości. Metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym jest metodą referencyjną oznaczania *in vitro* aktywności leków przeciwbakteryjnych wobec szybko rosnących tlenowych bakterii wywołujących choroby zakaźne (PN-EN ISO 20776-1: 2007) [14]. Oznaczenie wartości MIC leków stosowanych w terapii, szczególnie w przypadku zakażeń inwazyjnych, umożliwia dobranie odpowiedniej dawki leku uwzględniającej parametry farmakokinetyki i farmakodynamiki. W przypadku niektórych

leków (np. wankomycyna) określenie wartości MIC jest jedyną wiarygodną metodą oznaczania lekowrażliwości. Na podstawie MIC leku można przydzielić szczep do odpowiedniej kategorii wrażliwości na dany lek. W 2019 roku w rekomendacjach EUCAST „The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>” definicje poszczególnych kategorii zostały zmodyfikowane i aktualnie obowiązują trzy kategorie wrażliwości:

S – wrażliwy. Drobnoustroj oznaczany jest jako wrażliwy, co oznacza wrażliwość szczepu na standardowe dawki leku i wysokie prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego przy użyciu standardowego schematu dawkowania danego leku.

I – wrażliwy, zwiększona ekspozycja. Drobnoustroj oznaczany jest jako wrażliwy, zwiększona ekspozycja kiedy istnieje wysokie prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego przy zwiększeniu ekspozycji na dany lek poprzez dostosowania schematu dawkowania lub zwiększenie jego stężenia w miejscu zakażenia.

R – oporny. Drobnoustroj oznaczany jest jako oporny kiedy istnieje wysokie prawdopodobieństwo niepowodzenia terapeutycznego, nawet przy zastosowaniu wysokich dawek leku [3].

Prawidłowa ocena lekowrażliwości drobnoustroju jest zatem bardzo istotna, a uzyskanie wiarygodnych wyników nie jest możliwe bez wewnętrznej kontroli jakości oznaczeń w laboratorium. Zgodnie z rekomendacjami EUCAST należy przeprowadzać kontrolę jakości każdego badania wrażliwości szczepu bakteryjnego na leki. Podstawą jej jest każdorazowe oznaczenie wrażliwości odpowiednich szczepów wzorcowych w dniu, w którym przeprowadzamy badanie.

Szczepy kontrolne zalecane do wewnętrznej kontroli jakości lekowrażliwości tj. rutynowej i rozszerzonej wraz z oczekiwanymi wynikami i zakresami (strefy zahamowania wzrostu i wartości MIC) zawarte są w zaleceniach EUCAST (Wersja 9.0, 2019). W rozszerzonej kontroli jakości rekomendowane są szczepy kontrolne do wykrywania obecności mechanizmów oporności (ESBL, MRSA, VRE czy HLGR): *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (NCTC 13368, CCUG 45421, CECT 7787), *Staphylococcus aureus* NCTC 12493 (CCUG 67181), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (NCTC 13379, CIP 104676, CCUG 34289) [5]. Szczepy kontrolne ze znanymi mechanizmami oporności mogą również służyć do potwierdzania rutynowych testów oznaczania lekowrażliwości, co pozwala na uzyskiwanie prawidłowych wyników w kategorii innej niż wrażliwy. Szczepy przeznaczone do rutynowej kontroli jakości oznaczeń lekowrażliwości to w większości szczepy dzikie o fenotypie wrażliwości bez mechanizmów oporności.

Dostępna jest także powyżej wspomniana metoda szybkiego oznaczania lekowrażliwości bezpośrednio z dodatknych hodowli krwi – RAST (rapid antimicrobial susceptibility testing) EUCAST „Methodology – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles” [4]. Metoda ta jest oparta na metodzie dyfuzyjno-krajkowej i została zwalidowana dla butelek do hodowli krwi w systemach BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMerieux) i VersaTREK (Thermo Fisher). W procedurze zmodyfikowano sposób przygotowywania zawiesiny (pobiera się 100–150 µl nierozcieńczonej krwi z dodatknej butelki i nanosi na podłoże antybiogramowe), skrócono czas inkubacji – odczytu można dokonać po 4, 6 lub po 8 godzinach maksymalnie, zmieniono zasady odczytywania wyników i przygotowano specyficzne punkty odcięcia wraz z kryteriami kontroli jakości dla metody RAST. „The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles” [6]. Do sprawdzenia procedury RAST w tabelach EUCAST przygotowano trzy szczepy do kontroli jakości: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 i *S. pneumoniae* ATCC 49619 z zakresami stref zahamowania wzrostu i punktami odcięcia dla różnych antybiotyków po 4, 6 i 8 godzinnej inkubacji [4, 6]. Prowadzenie kontroli jakości jest istotne w momencie wprowadzania tej metody do rutynowego zastosowania w laboratorium do walidacji metody oraz do przeszkolenia personelu w tym zakresie, a także w momencie zmiany systemu do hodowli krwi.

### 3.3. Kontrola wewnętrzna systemów automatycznych do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości

Producenci systemów automatycznych są odpowiedzialni za stworzenie i prowadzenie odpowiedniej kontroli jakości, aby zapewnić bezpieczeństwo i skuteczność systemu do identyfikacji. Obejmuje to sprawdzenie pozytywnych i negatywnych wyników dla każdego odczynnika czy substratu w celu zapewnienia właściwej aktywności wszystkich komponentów danej karty czy panelu do identyfikacji drobnoustrojów. Nie zwalnia to jednak użytkownika systemu z przeprowadzania wewnętrznej kontroli jakości. W instrukcji użytkownika systemu, paneli czy kart powinna znaleźć się informacja o kontroli jakości, wraz ze wskazaniem szczepów kontrolnych i oczekiwanych wyników kontroli jakości oraz zalecenia dotyczące częstości prowadzenia kontroli.

Szczepy referencyjne do kontroli jakości oznaczania lekowrażliwości metodami automatycznymi powinny



być stosowane zgodnie z zaleceniami producenta, który jest odpowiedzialny za opracowanie i przeprowadzenie odpowiedniej kontroli jakości – poprzez sprawdzenie wyników dla każdego antybiotyku/chemioterapeutyku w celu zapewnienia właściwej aktywności wszystkich składników danego panelu czy karty antybiogramowej. Szczepy zalecane do kontroli jakości w większości są wspólne dla wszystkich metod oznaczania wrażliwości na leki. Dodatkowo w zestawach do kontroli paneli/kart antybiogramowych mogą znajdować się inne drobnoustroje kontrolne, których cechy pozwolą na pełną kontrolę antybiogramu. Laboratorium samo decyduje o częstotliwości kontroli wewnętrznej, najczęściej zalecana jest kontrola jakości nowej serii bądź testów z nowej dostawy do laboratorium.

Zagadnienia wewnętrznej kontroli jakości badań w laboratorium mikrobiologicznym nie są ograniczone wyłącznie do stosowania szczepów kontrolnych i sposobu postępowania z nimi w celu utrzymania i potwierdzania ich cech charakterystycznych. Kontrola wewnętrzna to także ocena skuteczności procedur laboratoryjnych, nadzór nad metodami, wyposażeniem, testami i odczynnikami stosowanymi w laboratorium, zapewnienie warunków przechowywania odczynników i testów, stosowanie ich zgodnie z przeznaczeniem w sposób zalecany przez producenta. Nadzorowanie wszelkich zapisów prowadzonych w laboratorium dotyczących przeprowadzanych badań, stosowane podłoża, gęstość zawiesiny, czas i warunki inkubacji i sprawdzanie zgodności z aktualnymi zaleceniami to również część kontroli wewnątrzlaboratoryjnej.

#### 4. Kontrola zewnątrzlaboratoryjna

Zewnętrzne programy kontroli jakości pozwalają na sprawdzenie skuteczności procedur kontroli wewnętrznej i utrzymanie odpowiedniej jakości pracy laboratorium. Wszystkie badania wykonywane w laboratorium powinny być podane ocenie w programie kontroli zewnętrznej (ocena każdego etapu badania). Udział w kontroli zewnętrznej umożliwia porównanie poziomu diagnostyki uczestnika względem innych laboratoriów uczestniczących w danym programie. Celem zewnętrznej oceny jakości jest także promowanie wysokich standardów dobrych praktyk laboratoryjnych, zachęcanie do korzystania z wystandaryzowanych metod, szkoleń personelu, zapewnienia mechanizmów naprawczych stwierdzonych błędów i ich zapobieganiu.

W standardach jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych określono, że obowiązkiem laboratorium jest stały udział w programach międzylaboratoryjnej kontroli jakości badań organizowanych przez m.in. Centralny Ośrodek Badań

Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej – COBJwDM ([www.polmicro.edu.pl](http://www.polmicro.edu.pl)). Dla badań nieobjętych programami Centralnego Ośrodka laboratorium powinno brać udział w programach międzylaboratoryjnej oceny jakości badań organizowanych przez inne krajowe lub renomowane instytucje na całym świecie np. programy UK NEQAS, INSTAND czy Labquality. COBJwDM jest organizatorem Ogólnopolskiego Sprawdzianu Wiarygodności Badań w Diagnostyce Mikrobiologicznej – POLMICRO, którego zaletą jest dostosowanie doboru materiałów kontrolnych do bieżącej sytuacji epidemiologicznej. Program POLMICRO umożliwia laboratorium poddawać kontroli zewnętrznej różne etapy diagnostyki mikrobiologicznej. Coroczne edycje programu poświęcane są wstępnemu etapowi diagnostyki jakim jest ocena preparatów mikroskopowych, identyfikacji do poziomu gatunku różnych izolatów i oznaczaniu fenotypów wrażliwości na leki, jak i wykrywaniu mechanizmów oporności na antybiotyki. Celem programu jest edukacja i ocena kompetencji laboratoriów mikrobiologicznych w zakresie identyfikacji, oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności. Ocena poszczególnych edycji Programu POLMICRO przeprowadzana jest zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17043:2011 „Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badań biegłości” [13]. Na podstawie wyników uzyskanych we wszystkich rundach programu POLMICRO laboratorium przyznawane są 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 otrzymują zaświadczenia o uczestnictwie i uzyskanych wynikach [19, 21].

##### 4.1. Zasady uczestnictwa w programie kontroli zewnętrznej

Laboratorium powinno postępować z otrzymaną próbką tak jak z materiałem diagnostycznym badanym rutynowo, otrzymywanym od pacjentów, bez stosowania szczególnych metod, odczynników, badań dodatkowych lub zaangażowania bardziej wykwalifikowanego personelu. W postępowaniu z próbką laboratorium powinno uwzględnić instrukcję otrzymaną z ośrodka organizującego program.

Wyniki kontroli zewnątrzlaboratoryjnej powinny być zawsze przeanalizowane przez laboratorium i omówione z personelem, a każdy nieprawidłowy wynik powinien być rozpatrzony w celu weryfikacji działań zapobiegających powstawaniu niezgodności. W celu wyeliminowania powstałych niezgodności laboratorium powinno wprowadzić działania korygujące.

## 5. Podsumowanie

Informacje przedstawione w niniejszym opracowaniu wskazują, że laboratoria mikrobiologiczne są zobowiązane do przygotowania i realizowania programu zapewnienia jakości. Obowiązujące akty prawne, aktualne rekomendacje i zalecenia jasno precyzują obowiązki medycznych laboratoriów w zakresie zapewnienia jakości badań mikrobiologicznych z uwzględnieniem wszystkich etapów diagnostyki tj. fazy przedlaboratoryjnej, laboratoryjnej i polaboratoryjnej. Wymagania dotyczą wszystkich laboratoriów, nie tylko tych starających się o akredytację.

Systematyczna kontrola jakości poprzez realizowanie procedur wewnętrznej kontroli jakości badań rutynowo przeprowadzanych w laboratorium i ocena jakości badań poprzez uczestnictwo w programach kontroli zewnętrznej jest podstawą do uzyskiwania wiarygodnych wyników badań mikrobiologicznych.

## Piśmiennictwo

- Carey R.B., Bhattacharyya S., Kehl S.C., Matukas L.M., Penttella M.A., Salfinger M., Schuetz A.N.: Implementing a quality management system in the medical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00062-17. (2018)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2019\\_manuals/Manual\\_v\\_7.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_2019.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf) (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf) (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Methodology – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/RAST/Methodology\\_EUCAST\\_RAST\\_v1\\_20181126.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf) (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion EUCAST, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/QC/v\\_9.0\\_EUCAST\\_QC\\_tables\\_routine\\_and\\_extended\\_QC.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_9.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf) (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. Version 1.0, 2018. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/RAST/EUCAST\\_RAST\\_Breakpoint\\_Table\\_v\\_1.0\\_final\\_PDF.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_Breakpoint_Table_v_1.0_final_PDF.pdf) (25.03.2019)
- Heczko P., Wróblewska M., Pietrzyk A.: Diagnostyka zakażeń bakteryjnych (w) Mikrobiologia Lekarska, PZWL, Warszawa, 2014, s. 657–666
- Leber Amy L., editor, Quality Assessment and Improvement (Quality Assurance) (w) Clinical microbiology procedures handbook, ASM Press, 2016, DOI: 10.1128/9781555818814.ch14.1
- Eleftheriadou M. Tsimillis K.C.: Eurachem guide: Accreditation for Microbiological Laboratories, wyd. 2, ISBN: 978-91-87017-92-6 (2013)
- Matuschek E., Brown D.E., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O255–O256 (2014)
- PN-EN ISO 17025:2018-02, Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO 15189:2013-05, Laboratoria medyczne – Wymagania dotyczące jakości i kompetencji, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO/IEC 17043:2011, Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badań biegłości, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO 20776-1:2007, Kliniczne badania laboratoryjne i metody badań diagnostycznych *in vitro*. Oznaczanie wrażliwości drobnoustrojów i ocena przydatności gotowych testów do oznaczania wrażliwości na leki przeciwbakteryjne. Część 1: Referencyjna metoda oznaczania *in vitro* aktywności leków przeciwbakteryjnych wobec szybko rosnących tlenowych bakterii wywołujących choroby zakaźne, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO 9000:2015-10, Systemy zarządzania jakością – Podstawy i terminologia, Polski Komitet Normalizacyjny
- Polskie Centrum Akredytacji: Akredytacja Laboratoriów Medycznych, dokument PCA DAM-01 wyd. 3 z dnia 16.07.2015
- Polskie Centrum Akredytacji: Rola akredytacji, <https://www.pca.gov.pl/akredytacja/akredytacja/rola-akredytacji/> (25.03.2019)
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r., Standardy jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych Załącznik 2: Standardy jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych, w tym badań technikami biologii molekularnej, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyniku badań, (Dz. U. z 2016 r. poz. 1665),
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 grudnia 2017 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych, (Dz. U. z 2017 r. poz. 2394)
- World Health Organization Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. Good Laboratory Practice Training wyd. 2., 2009, s. 9–56
- Zarządzenie Ministra Zdrowia z dnia 31 sierpnia 2017 r. zmieniające zarządzenie w sprawie Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (Dz. Urz. Min. Zdr. z dnia 31 sierpnia 2017 r. Poz. 89)