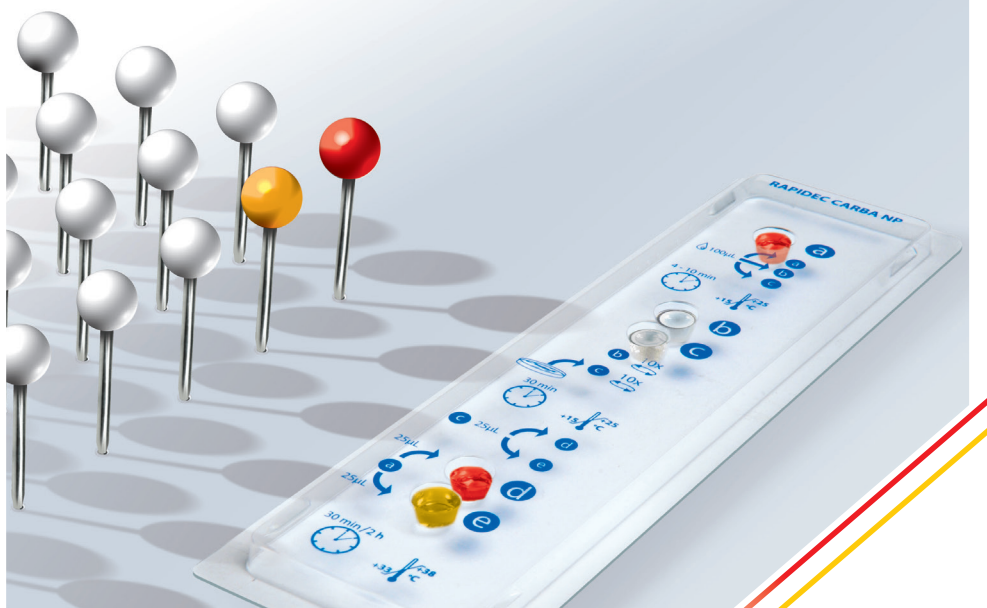


#71  
kwiecień 2015

# aktualności bioMérieux





**RAPIDEC® CARBA NP**  
**Lider w wykrywaniu**  
**karbapenemaz**

w tym numerze:

**Redakcja**

**wydawca:** bioMérieux Polska Sp. z o.o.

**Osoba odpowiedzialna:** Ireneusz Popławski

**Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 71:**

Marcin Iszkuło  
Alicja Rusinek  
Piotr Szczegółow  
Konrad Klimek  
Marta Warowny-Krawczykowska  
Aneta Lesiuk (korekta)

**Adres redakcji i wydawcy:**

**bioMérieux Polska**  
01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajęczka 9  
tel. (22) 569 85 00 • fax (22) 569 85 54  
**www.biomerieux.pl**

**opracowanie graficzne:**

Mariusz Glejzer  
**www.glejzer.com**

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

**3**

List Dr Elżbiety Wójcik

**4-7**

Immunologia: ŻChZZ

**8-12**

Program FORUMVITEK2

**13-14**

Monitorowanie temperatury i innych parametrów fizycznych w laboratorium

**16-21**

Mikrobiologia. Preparaty bezpośrednie z materiału klinicznego – wartość nie do przecenienia

**22**

Nowość w ofercie. chromID CARBA SMART

**23-28**

Biologia molekularna. Molekularna diagnostyka zakażeń wirusem cytomegalii

**29**

Nowe informacje na stronie [www.biomerieux.pl](http://www.biomerieux.pl)

Szanowni Państwo,

Po 23 latach pracy dla firmy bioMerieux Polska podjęłam decyzję o przejściu na emeryturę i zrezygnowanie z funkcji Dyrektora Generalnego bioMerieux Polska z dniem 31 marca 2015 r. Funkcję tę pełniłam przez ostatnie 14 lat.

Ten szczególny moment skłania mnie do wielu wspomnień i refleksji.

Pracowałam w sektorze diagnostyki laboratoryjnej w sumie 26 lat. Zmiany, które nastąpiły w tym czasie w diagnostyce IVD są olbrzymie. Początek mojej pracy to diagnostyka z wiodącą rolą chemii klinicznej i immunoserologii, z niewielkim udziałem mikrobiologii oraz niewielką rolą biologii molekularnej. To również okres stosowania, w większości, metod manualnych i początków automatyzacji w biochemii. To czas systemów otwartych pozwalających na aplikację odczynników różnych firm do różnych aparatów.

Potem nastąpił rozkwit immunoserologii, pojawiły się metody automatyczne i systemy zamknięte. To również zmiany kaskadowe w metodach stosowanych w diagnostyce. Dążenie do upraszczania metod i zastosowania odczynników gotowych do użycia.

W związku z nowymi wyzwaniami w mikrobiologii – rosnącą lekoopornością nastąpił wzrost udziału mikrobiologii w diagnostyce IVD. Ostatnie lata to wzrost znaczenia biologii molekularnej, technologii która wnosi nową jakość w diagnostyce IVD.

Zmiany w diagnostyce to także informatyzacja, zmiany organizacyjne oraz coraz większe znaczenie jakości w stosowanych procedurach diagnostycznych. To również wzrost wymagań laboratoriów w stosunku do dostawców – czasu dostawy, serwisu technicznego oraz merytorycznego, a także coraz wyższych kompetencji przedstawicieli handlowych.

Te wszystkie lata stworzyły mi wyjątkową możliwość poznania wielu osób związanych z diagnostyką IVD. Wszystkie spotkania z Państwem były dla mnie wyjątkowe. Wiele nauczyłam się od Państwa. Z mojej strony starałam się wykorzystać swoje doświadczenia w rozwoju współpracy z Państwem.

Zyskaliśmy Państwa zaufanie, zaakceptowaliście nasze produkty i usług. Dzięki temu staliśmy się czołową firmą diagnostyczną na polskim rynku.

Nieustannie staramy się spełniać Państwa oczekiwania. Wprowadziliśmy wiele nowych produktów, które przyczyniły się do zmian w organizacji pracy w laboratoriach. Nasze aparaty – Vitek, Vidas, BactAlert i Konelab są doskonale Państwu znane. Podobnie jak nasze testy.

Dziękuję Państwu za te wszystkie lata, za zaufanie i owocną współpracę. Dzięki pracy w firmie bioMerieux Polska poznałam wiele wspaniałych Osób, które przyczyniły się do rozwoju diagnostyki laboratoryjnej w Polsce. Był to bardzo dobry czas dla Firmy i dla mnie osobiście.

Chciałabym podziękować Pracownikom firmy bioMerieux Polska za niezwykle zaangażowanie i profesjonalizm, które przyczyniły się do rozwoju firmy. Było dla mnie wielką przyjemnością i zaszczytem kierowanie takim zespołem.

Firma bioMerieux Polska pozostaje nadal w dobrych rękach. Będą pracować z Państwem menadżerowie, którzy pracowali ze mną od wielu lat i brali udział w tworzeniu i rozwoju firmy bioMerieux w Polsce.

Mam nadzieję, że nadal współpraca Państwa z Firmą będzie rozwijała się pomyślnie i będziecie Państwo zadowoleni z proponowanych nowych produktów oraz świadczonych przez nas usług.

Życzę Państwu satysfakcji ze współpracy z firmą bioMerieux Polska.

Z okazji zbliżających się Świąt Wielkanocnych w imieniu Wszystkich Pracowników oraz własnym chciałabym złożyć Państwu najlepsze życzenia zdrowych i Wesołych Świąt.

*Pozdrawiam serdecznie*

*Dr Elżbieta Wójcik*



# Zależna od wieku wartość odcięcia dla D-dimeru

## – nowe perspektywy w wykluczaniu zatorowości płucnej u osób starszych?

prof. dr hab. n. med. Anna Fijałkowska  
Zakład Kardiologii  
Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

Dyskusja na temat specyfiki medycyny populacji w starszym wieku nie omija problemu trudności diagnostycznych zatorowości płucnej w tej grupie, a w tym kluczowa wydaje się rola D-dimeru.

Objawy kliniczne żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ), zarówno zatorowości płucnej (ZP), jak i zakrzepicy żyłnej (ZZ) są na tyle niecharakterystyczne, że ostateczne potwierdzenie rozpoznania stawia się tylko u 10-20% pacjentów. W wykluczaniu ŻChZZ, poza klasycznymi metodami obrazowania: ultrasonografią żylną, tomografią komputerową i scyntyografią perfuzyjną płuc, bardzo przydatne okazało się oznaczanie stężenia D-dimeru. Jeśli we wstępnej ocenie klinicznej prawdopodobieństwo rozpoznania ZP, która przebiega bez wstrząsu czy istotnego spadku ciśnienia tętniczego, określa się jako „niewysokie” czy „mało prawdopodobne”, to negatywny wynik testu D-dimer upoważnia do zaprzestania dalszej diagnostyki. W takich przypadkach można bezpiecznie odstąpić od leczenia przeciwkrzepliwego u blisko 1/3 pacjentów.

Stężenie D-dimeru jest podwyższone u pacjentów z ZP z powodu wzmożonej aktywności fibrynolitycznej stymulowanej procesami zakrzepowo-zatorowymi. Jednak podwyższone stężenie D-dimeru stwierdza się również w przypadku infekcji, stanów zapalnych, nowotworów złośliwych, u pacjentek w ciąży i innych stanach klinicznych. W wielu obserwacjach podkreślano też wzrost stężenia D-dimeru z wiekiem. Oszacowano, że swoistość D-dimeru w diagnostyce ŻChZZ u pacjentów powyżej 80 roku życia nie przekracza 10%. Dane opublikowane w ostatnich latach sugerują, że podwyższenie wartości odcięcia testu dla starszych osób może wyraźnie poprawić swoistość D-dimeru w diagnostyce ZP w takiej populacji. Silnym dowodem dla tej tezy było opublikowanie wyników badania ADJUST-PE. Wskazują one, że obliczenie wartości odcięcia D-dimeru jako  $\text{wiek} \times 10 \mu\text{g/L}$  dla osób powyżej 50 roku życia zamiast klasycznych 500  $\mu\text{g/L}$  zwiększa istotnie swoistość testu bez wpływu na bezpieczeństwo wykluczania ZP. Badanie cytowane jest w „Wytucznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2014r diagnostyki i leczenia ostrej zatorowości płucnej”, co podkreśla jego wartość kliniczną.

### Metody oznaczania stężenia D-dimeru.

D-dimer to specyficzny produkt rozpadu fibryny stabilizowanej przez czynnik XIII. Składa się z dwóch

fragmentów D połączonych podwójnym kowalencyjnym wiązaniem, opornym na działania plazminy. Właśnie jego obecność została wykorzystana przy opracowaniu metod oznaczania stężenia D-dimeru, w których zastosowano przeciwciała monoklonalne. Przeciwciała rozpoznające D-dimer wiążą się z epitopami, których nie ma na cząsteczce fibrynogenu i nieusieciowanej fibrynie. Testy określające stężenie D-dimeru nie dają więc wyników fałszywie dodatnich nawet, gdy w osoczu znajduje się duża ilość pojedynczych fragmentów D pochodzących z rozpadu fibrynogenu bądź fibryny niestabilnej.

W praktyce klinicznej obecnie wykorzystywane są przede wszystkim testy immunoenzymatyczne typu ELISA i drugiej generacji testy lateksowe-immunoturbidymetryczne. Dostępne testy różnią się metodą wykonania, sposobem odczytu oraz czułością i swoistością. Testy ELISA i pochodne mają 95% i wyższą czułość diagnostyczną i dlatego mogą być wykorzystywane u pacjentów z niskim i pośrednim klinicznym prawdopodobieństwem rozpoznania ZP. Badania z obserwacją odległą, zwykle 3-miesięczną potwierdziły, że częstość incydentów zakrzepowo-zatorowych u pacjentów pozostawionych bez leczenia przeciwzakrzepowego na podstawie negatywnych wyników tych testów była niższa niż 1%.

Stężenie D-dimeru jest średnio 8 razy wyższe u pacjentów z ostrym epizodem ŻChZZ niż u osób zdrowych. Poziom D-dimeru wzrasta z wiekiem, a, jak już wspomniano, we wszystkich stanach związanych ze zwiększonym wytwarzaniem fibryny, takich jak: nowotwory, infekcje, stany zapalne, zabiegi operacyjne, urazy, udary mózgu, rozsiane krzepnięcie śródnaczyniowe, tętniaki aorty, ostre zespoły wieńcowe, migotanie przedsionków i przewlekła niewydolność serca. U kobiet w ciąży jego wartości są wyraźnie wyższe szczególnie w III trymestrze.

Dla wykluczenia ŻChZZ bierze się pod uwagę tak zwaną wartość odcięcia (cut-off), określaną przez producenta dla danego testu. Stężenia poniżej wartości odcięcia mają wykluczać ostrą ŻChZZ.

Trudno jest porównywać stężenia D-dimeru oznaczone różnymi testami, ponieważ brak jest standaryzacji tych metod. Niemniej jednak, niewątpliwie w diagnostyce szczególnie ZP powinno wykorzystywać się tylko te testy, których wartość potwierdzono w badaniach z obserwacją odległą.

Podstawowymi parametrami oceniającymi wartość metody w wykluczaniu ZP są jej czułość i negatywna

wartość predykcyjna (negative predictive value (NPV)) czyli stopień pewności, że pacjenci z prawidłowym stężeniem D-dimeru oznaczanym danym testem nie mają ZP.

**D-dimer w diagnostyce zatorowości płucnej przebiegającej bez wstrząsu i spadku ciśnienia tętniczego.**

Obserwacja Perrier i wsp. z 1999r wykazała, że wśród 918 pacjentów diagnozowanych na izbie przyjęć z podejrzeniem ZP, chorobę wykluczono w 31% przypadków, gdy stężenie D-dimeru (VIDAS D-dimer) było < 500 µg/L. U tych pacjentów nie włączano leczenia przeciwkrzepliwego. Taka strategia miało bardzo wysoką NPV wynoszącą 99.3% dla 3-miesięcznego ryzyka ŻChZZ.

W kolejnych latach oceniano strategie diagnostyczne łączące wstępną ocenę klinicznego prawdopodobieństwa (KP) rozpoznania ZP z pomiarem stężenia D-dimeru. Publikowane następnie wyniki pojedynczych obserwacji, ich systematycznych przeglądów i metaanaliz wykazały, że kombinacja niskiego KP ocenianego w 3-stopniowych skalach i stężenia D-dimeru poniżej wartości odcięcia bezpiecznie, bo z mniejszym niż 0,5% ryzykiem incydentów zakrzepowo-zatorowych w 3-miesięcznej obserwacji, identyfikuje pacjentów, których można nie leczyć przeciwkrzepliwie. Jeśli zamiast 3-stopniowej skali KP, kategoryzowano chorych według skali Wells'a na ZP „prawdopodobną” lub „mało prawdopodobną”, to przy poziomie D-dimeru poniżej wartości odcięcia, możliwe było wykluczenie ZP u większej liczby pacjentów z zachowaniem bezpiecznego poziomu NPV 99,7%. Opublikowane podsumowanie badań z testem VIDAS D-dimer w diagnostyce ZP obejmuje 5622 pacjentów, u których KP określano w różnych konfiguracjach 2- i 3-stopniowych

skal Wellsa i Genewskiej. ZP wykluczono u 2249(40%) pacjentów, gdy KP oceniano jako niewysokie/ mało prawdopodobne przy stężeniu D-dimeru poniżej wartości odcięcia 500µg/l. Objawy ŻChZZ wystąpiły tylko u 3 chorych w 3-miesięcznej obserwacji.

Obecnie w ocenie KP można wykorzystywać uproszczone wersje skal Wellsa i zmodyfikowanej Genewskiej (Tab. 1 i 2), których wartość kliniczna została potwierdzona w odpowiednich obserwacjach.

D-dimery są stałym elementem w strategiach rozpoznawania ŻChZZ w obowiązujących wytycznych i zaleceniach. Postępowania diagnostyczne u chorego z niewysokim KP przy podejrzeniu ZP niewysokiego ryzyka i prawidłowym stężeniu D-dimeru zaznaczono na ryc.1, która oparta jest o schemat diagnostyczny zawarty w „Wytycznych postępowania w ostrej zatorowości płucnej Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) z 2014r”. Eksperti ESC podkreślają, aby wykorzystywany test był testem wysokiej czułości. Dla testów o niższej czułości dopuszczają ich stosowanie tylko u chorych z niskim poziomem KP ZP.

**Kiedy nie wykorzystywać D-dimeru w diagnostyce ŻChZZ?**

D-dimer nie jest przydatny w diagnostyce pacjentów z ZP wysokiego ryzyka, kiedy należy szybko podejmować decyzję o wdrożeniu swoistej terapii reperfuzyjnej tętnic płucnych. Nie jest również uzasadniony pomiar stężenia D-dimeru u pacjentów, których dane z wywiadu i objawy silnie wskazują na podejrzenie ZP i w ocenie prawdopodobieństwa klinicznego zakwalifikowano ich do grupy z „prawdopodobnym” ZP niewysokiego ryzyka, bez względu na rodzaj wykorzystywanej

**Ocena klinicznego prawdopodobieństwa rozpoznania ZP (uproszczona „Skala Genewska”)**

<b>wywiad</b>	Objaw	
	Wiek > 65 lat	+1
	Wywiad ŻChZZ	+1
	Operacja lub złamanie < 1 mies.	+1
<b>podmiot.</b>	Nowotwór złośliwy	+1
	Ból kończyny dolnej jednostronny	+1
	Krwiopłucie	+1
<b>przedmiot.</b>	Częstość serca	
	75 - 94/min.	+1
	≥95/min.	+2
	Ból na przebiegu żyły głębokiej niesymetryczny obrzęk kończyny dolnej	+1

**Prawdopodobieństwo kliniczne ZP:**  
**ZP mało prawdopodobne 0-2 pkt**      **ZP prawdopodobne ≥3 pkt**

**Ocena klinicznego prawdopodobieństwa rozpoznania ZP „Skala Wellsa”**

Objaw:	klasyczna	uproszczona
przebyty epizod ŻChZZ	+1.5	1
tętno >100/min.	+1.5	1
niedawna operacja/unieruchomienie	+1.5	1
objawy kliniczne ŻŻG	+3.0	1
krwiopłucie	+1.0	1
nowotwór	+1.0	1
inna niż ZP przyczyna mniej prawdopodobna	+3.0	1
<b>Prawdopodobieństwi kliniczne ZP:</b>		
<b>3-stopniowe:</b>		
Niskie	0-1	ND
Pośrednie	2-6	ND
Wysokie	≥7	ND
<b>2-stopniowe:</b>		
ZP mało prawdopodobne	0-4	0-1
ZP prawdopodobne	≥5	≥2

Wells et al Thromb Haemost, 2000 Konstantinides, Torbicki et al., Eur Heart J 2014

skali oceny prawdopodobieństwa. W takich przypadkach należy od razu wykonać TK z obrazowaniem tętnic płucnych.

Nie powinno się opierać decyzji terapeutycznych o prawidłowe wyniki D-dimeru u pacjentów, u których objawy ŻChZZ trwają dłużej niż tydzień. Po 1-2 tygodniach od początku objawów stężenie D-dimerów może się obniżyć nawet do ¼ wartości wyjściowej. Sugeruje się nawet, aby nie brać pod uwagę negatywnych wyników, jeśli stężenie D-dimeru było oznaczane później niż tydzień od ostrych objawów ŻChZZ.

### Bezpieczeństwo metody

Istotne znaczenie ma wybór rodzaju testu oznaczającego stężenie D-dimeru. Kryterium oceny testu powinno opierać się na jego bezpieczeństwie i być potwierdzone w prospektywnych badaniach klinicznych. Tylko metody gwarantujące czułość i NPV bliską 100% pozwalają na podejmowanie decyzji o zaniechaniu leczenia przeciwkrzepliwego. Wartość testu powinna być potwierdzona oceną częstości epizodów ŻChZZ zwykle w okresie 3-miesięcznej obserwacji, gdy wykluczono chorobę na podstawie prawidłowego wyniku D-dimeru i odstąpiono od leczenia przeciwkrzepliwego. Bezpieczeństwo diagnostyki gwarantuje również dobór metody wstępnej oceny KP do rodzaju wykorzystywanego testu D-dimer.

### D-dimer w różnych populacjach pacjentów

Głównym ograniczeniem D-dimerów jest ich niska swoistość. Podwyższone stężenia D-dimerów, obserwowane są bowiem w wielu sytuacjach klinicznych związanych ze wzmożoną produkcją fibryny, jak opisano powyżej. Dlatego D-dimery wykorzystuje się dla wykluczenia ŻChZZ, a nie jej potwierdzenia. Chociaż swoistość D-dimerów jest wyraźnie niższa przy podejrzeniu ŻChZZ w zaostrzeniu niewydolności serca, nowotworach złośliwych, u chorych powyżej 75 roku życia, u kobiet powyżej 30-tego tygodnia ciąży, to czułość i NPV testu pozostają w tych grupach wysokie.

### D-dimer w ocenie ryzyka nawrotu i jako czynnik rokowniczy ZP.

W ostatnich latach wskazania do oznaczania stężenia D-dimeru w ŻChZZ rozszerzono jeszcze o ocenę ryzyka nawrotu ŻChZZ po zaprzestaniu przewlekłego leczenia przeciwkrzepliwego. Stwierdzono również, że bardzo wysokie stężenia D-dimeru w ostrej fazie ZP korelują z wyższą śmiertelnością we wczesnym okresie obserwacji. D-dimer może więc najprawdopodobniej być wykorzystywany również jako marker rokowniczy w ostrej ZP.

### Zatorowość płucna u osób w starszym wieku.

Osoby w starszym wieku mają najwyższe ryzyko zachorowania na ŻChZZ ocenianą na 1%/rok. Diagnostyka ŻChZZ, a szczególnie ZP w tej grupie jest szczególnie trudna, bowiem na pytanie, czy powinniśmy u osoby na przykład po 80 roku życia podejrzewać ZP, zawsze odpowiemy „tak”. Wiek zaawansowany kojarzy się też z częstszym występowaniem współistniejących chorób płuc i serca, co bardzo utrudnia zróżnicowanie pochodzenia takich

objawów jak duszność czy ból w klatce piersiowej, które mogłyby sugerować ZP. W małych, retrospektywnych obserwacjach pacjentów starszych z potwierdzonym ZP, objawy kliniczne wyraźnie różniły się w porównaniu z osobami młodymi. Okazało się, że zasnęnięcie było w tej grupie wyraźnie częstszym objawem towarzyszącym, natomiast ból opłucnowy występował zdecydowanie rzadziej niż u pacjentów młodszych.

Ogólna dostępność TK mogłaby pozwalać na traktowanie tego badania jako podstawowego narzędzia diagnostycznego u starszych osób w przypadku podejrzenia ZP. Jednak poza ograniczeniem związanym z wysokimi kosztami, należy wziąć pod uwagę potencjalną nefrotoksyczność kontrastu stosowanego w czasie obrazowania tętnic płucnych w TK, co ma szczególne znaczenie u pacjentów w wieku zaawansowanym. Wykorzystanie strategii diagnostycznej ZP nie-wysokiego ryzyka z wstępną oceną klinicznego prawdopodobieństwa i oznaczeniem stężenia D-dimeru u osób starszych jest więc niezwykle przydatne. Problemem pozostaje niska swoistość D-dimeru w tej grupie wiekowej.

### Dostosowana do wieku wartość odcięcia dla D-dimeru w diagnostyce ZP

W ostatnich latach toczy się żywa dyskusja, czy zasadne jest wprowadzenie zależnej od wieku wartości odcięcia dla D-dimeru (age-adjusted cut-off value) dla pacjentów z podejrzeniem ZP po 50-tym roku życia, aby poprawić swoistość tej metody. W opublikowanej w 2013r metaanalizie obejmującej 12 497 pacjentów z niewysokim klinicznym prawdopodobieństwem ZP z 13 kohort zastosowanie dostosowanej do wieku wartości odcięcia (wiek x 10 µg/L) pozwoliło zwiększyć swoistość testu do 34-46% zachowując czułość na poziomie 97% dla osób powyżej 50 roku życia.

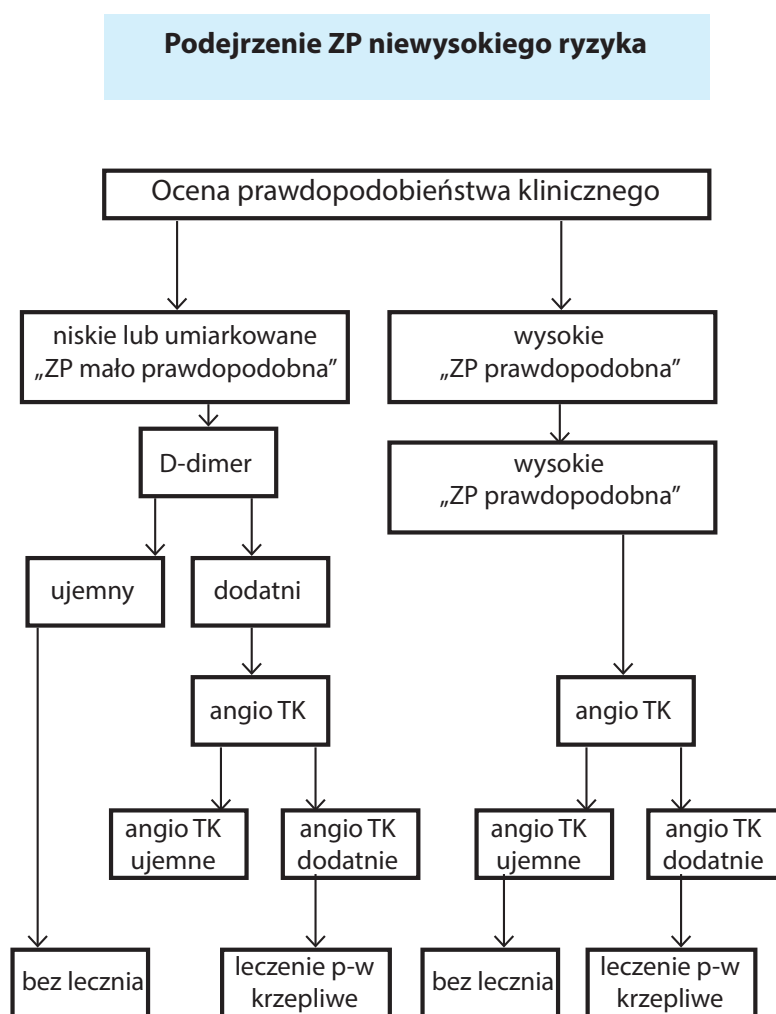
We wspomnianym już wieloośrodkowym, prospektywnym badaniu ADJUST-PE uczestniczyło 3346 pacjentów. Pacjenci z prawidłowym, dostosowanym do wieku, stężeniem D-dimeru, nie byli kierowani na TK tętnic płucnych i nie otrzymywali leczenia przeciwkrzepliwego, ale poddawano ich 3-miesięcznej obserwacji. Wśród 766 pacjentów powyżej 75 roku życia, u 673 oceniono kliniczne prawdopodobieństwo ZP na nie-wysokie. Przy zastosowaniu wartości odcięcia dla D-dimeru dostosowanej do wieku zamiast klasycznej < 500 µg/L ilość pacjentów, u których można było wykluczyć ZP wzrosła z 43 (6.4%; 95% CI 4.8–8.5%) do 200 (29.7%; 95% CI 26.4–33.3%) bez żadnych przypadków fałszywie ujemnych. W 3-miesięcznej obserwacji u pacjentów ze stężeniem D-dimeru powyżej 500 µg/L ale poniżej wartości odcięcia dostosowanej do wieku ZP wystąpiła u 1 z 331 pacjentów (0.3% [95% CI, 0.1%-1.7%]). Chociaż brak jednoznacznych zaleceń w aktualnych wytycznych ESC dotyczących możliwości stosowania wartości odcięcia dla D-dimeru dostosowanej do wieku, to wyniki badania ADJUST-PE są bardzo obiecujące. W ustnym komentarzu, w trakcie prezentacji tych wytycznych, autorzy sugerowali, że wyniki ADJUST-PE ukazały się zbyt późno, aby można było je poddać pełnej procedurze wymaganej w formułowaniu zaleceń ESC i ich modyfikacji.

Chociaż wartość prospektywnej obserwacji jest niewątpliwie bardzo wysoka, to należy też wziąć pod uwagę wyniki obserwacji retrospektywnej opublikowanej już po ADJUST-PE. Woller i wsp. zanalizowali opisany uprzednio materiał 3500 pacjentów z podejrzeniem ZP. Wśród nich zidentyfikowali 934 pacjentów powyżej 50 roku życia z niskim klinicznym prawdopodobieństwem rozpoznania ZP. U wszystkich pacjentów wykonano TK. Spośród 934 pacjentów, 273 (29%) miało stężenie D-dimeru poniżej wartości odcięcia dostosowanej do wieku. W 90-dniowej obserwacji, u 4 (1,5%, 95% CI 0,4%-3,7%) pacjentów rozpoznano ZP. Jeśli zastosować dla tej grupy klasyczne wartości odcięcia, to tylko 104 (11%) miałyby prawidłową wartość D-dimeru, ale nie było wśród nich żadnego przypadku ZP. Natomiast stosowanie wartości odcięcia dostosowanej do wieku powodowało 20% redukcję ilości wykonywanych badań TK. Ostatecznie na pytanie, czy stosowanie wartości odcięcia dostosowanej do wieku, co pozwala istotnie zmniejszyć częstość wykonywania TK u starszych pacjentów, będzie rekomendowane w wytycznych towarzystw naukowych, dałyby odpowiedź badania randomizowane. Niemniej jednak, wydaje się to dobrym kierunkiem postępowania w optymalizacji diagnostyki ZP u osób po 50-tym roku życia.

*PS Minęło ponad 15 lat moich zawodowych kontaktów z firmą bioMérieux Polska. Wiodącym ich tematem były D-dimery, bo takiego sformułowania używaliśmy od lat 90-tych. Chciałabym serdecznie podziękować i pogratulować wszystkim pracownikom firmy, ale przede wszystkim Pani Prezes dr n.farm. Elżbiecie Wójcik tych lat bardzo merytorycznej współpracy, zawsze z zachowaniem najwyższych standardów i po ludzku, bardzo miłej. Życzę dalszych sukcesów, z korzyścią przede wszystkim dla naszych pacjentów.*

Anna Fijałkowska

**Ryc. 1. Strategia diagnostyki zatorowości płucnej niewysokiego ryzyka (bez wstrząsu i hipotensji) według „Wytycznych dotyczących diagnostyki i leczenia ostrej zatorowości płucnej” Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2014 r.** (Torbicki, Konstantinides et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism, Eur Heart J. 2014, 35(43):3033-69.



wg Konstantinides, Torbicki et al., Eur Heart J 2014, 35,3033-3073

# Program FORUM VITEK 2

## – Międzylaboratoryjna Platforma Wymiany Doświadczeń Zaawansowanych Użytkowników Systemów VITEK 2 - Edycja 2014

**dr Elżbieta Stefaniuk**

*Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Warszawa  
Narodowy Instytut Leków, Warszawa*

Międzylaboratoryjna Platforma Wymiany Doświadczeń Zaawansowanych Użytkowników Systemów VITEK 2 – Program FORUM VITEK 2 (FV2) w roku 2014 funkcjonowała już po raz siódmy. FV2 powołane zostało przez firmę bioMérieux Polska we współpracy z Centralnym Ośrodkiem Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej i stanowi platformę wymiany doświadczeń i rozważań na temat możliwości diagnostycznych i interpretacyjnych tych systemów.

Pierwsze edycje FV2 miały miejsce w roku 2008 (edycja pilotażowa) i od tamtej pory odnotowano zmiany w profilu uczestników, regule i częstotliwości poszczególnych edycji, a przede wszystkim, modyfikacji uległ sposób wzajemnej komunikacji respondentów Forum z organizatorem, jak również wprowadzono możliwość elektronicznej wymiany doświadczeń i uwag pomiędzy uczestnikami. W roku 2009 zorganizowano dwie tury programu, natomiast od roku 2010 są przeprowadzane trzy tury rocznie. Zgodnie z ustaleniami poczynionymi na spotkaniu podsumowującym FV2-2013, w roku 2014 zorganizowano także 3 edycje programu, ale każda z nich składała się z dwóch części: laboratoryjnej oraz quizu złożonego z 5 pytań. W roku 2014 do Platformy dołączyli nowi użytkownicy systemu Vitek 2 i w związku z tym, edycje FV2-2014 adresowane były już nie do dziewięciu, a siedemnastu laboratoriów mikrobiologicznych. Są to medyczne laboratoria mikrobiologiczne działające na terenie różnych województw (kujawsko-pomorskie, łódzkie, małopolskie, mazowieckie, opolskie, podkarpackie, podlaskie, pomorskie, wielkopolskie), będące jednostkami organizacyjnymi szpitali wojewódzkich, specjalistycznych lub uniwersyteckich, instytutów medycznych, trzech największych firm diagnostycznych funkcjonujących na rynku polskim oraz laboratorium firmy bioMérieux Polska. Wszystkie laboratoria zostały zaproszone do udziału w Platformie FV2 przez firmę bioMérieux Polska, a wspólnym mianownikiem tych jednostek było doświadczenie i wysokie kompetencje w obsłudze systemu Vitek 2 i pozytywne wyniki w Ogólnopolskim Sprawdzianie Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych POLMICRO.

Założeniem Platformy FV2 jest poruszanie zagadnień trudnych i ciekawych pod względem diagnostycznym, a od 2014 roku także podstawowych zasad technik mikrobiologicznych, kontroli jakości oraz reguł interpretacyjnych. Celem FV2 jest natomiast integracja użytkowników systemów Vitek 2. Od kilku lat firma bioMérieux Polska zwraca się z apelem do członków FV2 o sygnalizowanie napotykanym problemów diagnostycznych, w szczególności napotykanym podczas pracy z automatycznym systemem do identyfikacji i lekowrażliwości - Vitek 2, oraz przekazywanie ciekawych izolatów drobnoustrojów tj. nowych, niespotykanych dotąd w macierzystym laboratorium, bądź sprawiających problemy diagnostycznie. Izolaty te następnie miały być przekazywane wszystkim członkom FV2 w celu dyskusji i poszukiwania rozwiązania problemu. Niestety, w ciągu kilku lat funkcjonowania Programu, tylko pojedyncze laboratoria podzieliły się z innymi uczestnikami FV2 wyhodowanymi i wyizolowanymi u siebie szczepami bakteryjnymi. W związku z tym, dobór izolatów leży w gestii Centralnego Ośrodka, który następnie przeprowadza szczegółową charakterystykę izolatów, opracowuje ankietę i przygotowuje izobaty do przekazania uczestnikom FV2. Dystrybucją przygotowanych zestawów zajmuje się firma bioMérieux.

Uczestnicy FV2, z wykorzystaniem systemów VITEK 2 i VITEK 2 Compact i w razie konieczności innych metod rutynowo stosowanych w danym laboratorium, przeprowadzają identyfikację przesłanych izolatów, oznaczają ich lekowrażliwość i wykrywają mechanizmy oporności. Wyniki oznaczeń i ich interpretacja wprowadzane są do ankiety dostępnej na stronie internetowej <http://forumvitek2.pl>, która została utworzona na potrzeby Programu FV2. Do wyników oznaczeń uzyskanych przede wszystkim przy wykorzystaniu systemu Vitek 2, Laboratorium ma możliwość dołączenia wyników innych przeprowadzonych testów oraz interpretacji i komentarzy. Każde Laboratorium uczestniczące w Platformie FV2 posiada swój login oraz hasło, które umożliwiają dostęp do systemu.



## FORUM VITEK 2- 2014 – edycja VII

### CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

W części laboratoryjnej ubiegłorocznej edycji FV2 (2014) uczestnicy programu otrzymali 9 izolatów bakteryjnych, w tym: cztery szczepy Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, 2 izolaty *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*), 1 szczep pałeczki niefermentującej – *Pseudomonas aeruginosa* oraz 4 izolaty z grupy ziarenkowców Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *S. gallolyticus* oraz *S. sanguinis*.

Laboratoria w większości nie zgłaszały trudności w identyfikacji szczepów. Stosunkowo najwięcej trudności sprawiły izolaty z grupy paciorkowców: dwa spośród siedemnastu laboratoriów odnotowały problemy z identyfikacją szczepów *S. gallolyticus* oraz *S. sanguinis*.

Najczęściej stosowaną kartą do oznaczania lekowrażliwości pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* była karta przeznaczona do systemu Vitek2: AST-N259. Pojedyncze laboratoria badanie wykonywały z wykorzystaniem kart: AST-N260 oraz AST-N195. Lekowrażliwość *P. aeruginosa* oznaczano przede wszystkim stosując kartę AST-260, jedno laboratorium użyło karty AST-N258. Wrażliwość ziarenkowców Gram-dodatnich oznaczano z zastosowaniem kart Vitek2- AST-ST01 i Vitek2 AST-P-576. Karty te zawierają zestawy antybiotyków zgodne z zaleceniami EUCAST, umożliwiają określenie wrażliwości na leki, które mają istotne znaczenie kliniczne i epidemiologiczne.

**Szczep numer 1 – *Klebsiella pneumoniae*** - producent karbapenemazy klasy B (MBL, ang. metallo- $\beta$ -lactamase) z rodziny VIM, oporny na karbapenemy i pozostałe antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Szczep był wrażliwy na gentamicynę (MIC=1mg/L), średniowrażliwy na amikacynę (MIC=16mg/L) i oporny na tobramycynę (MIC=16mg/L), co jest charakterystyczne dla drobnoustroju produkującego enzym AAC(6')I. Wytwarzanie metallo- $\beta$ -laktamaz prawidłowo zidentyfikowało 14 z 17 laboratoriów

(82,3%). Wszystkie laboratoria zadeklarowały stosowanie dodatkowych testów oprócz kart antybiogramowych AST-Card – najczęściej były to testy fenotypowe w kierunku  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym tzw. ESBL (ang. extended spectrum  $\beta$ -lactamase) oraz karbapenemaz typu: MBL, KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) i OXA-48.

**Szczep nr 2 - *Serratia marcescens*** - typowy producent cefalosporynazy AmpC, wrażliwy in vitro na cefalosporyny III generacji. Zasada ekspercka EUCAST nr 9.2 zaleca odradzanie stosowania cefotaksymu, ceftriaksonu lub ceftazydymu w monoterapii zakażeń o takiej etiologii, gdyż może to pociągać za sobą ryzyko selekcjonowania szczepów opornych u producentów AmpC. Siedem laboratoriów dostawiło dodatkowo testy fenotypowe w kierunku ESBL i uzyskało prawidłowe wyniki – ESBL-ujemny.

Wszystkie szczepy *Serratia marcescens* produkują chromosomalny enzym AAC(6')-Ic, który ogranicza aktywność dostępnych aminoglikozydów, z wyjątkiem streptomycyny, gentamicyny i arbekacyny.

**Szczep nr 3 - *E. coli*** – szczep wrażliwy na leki, produkujący ESBL. Produkcję tych enzymów sugerował system Vitek 2. Dziewięć laboratoriów wykonało dodatkowe testy na obecność ESBL, tylko cztery z nich uzyskały prawidłowy wynik ESBL-dodatni. Identyfikacja ESBL metodą fenotypową mogła być trudna z uwagi na duże strefy zahamowania wzrostu wokół krążków antybiogramowych; dopiero po zwiększeniu odległości pomiędzy krążkami można w przypadku tego izolatu zaobserwować obraz charakterystyczny dla wytwarzania enzymów ESBL. Na zdjęciu nr 1. przedstawiono test fenotypowy w kierunku ESBL wykonany dla omawianego szczepu.

**Zdjęcie 1.** Test fenotypowy w kierunku ESBL – tzw. test dwóch krążków (ang. double-disk diffusion test) z wykorzystaniem krążków antybiogramowych: ceftazydym CAZ 30 $\mu$ g, cefotaksym CTX 30 $\mu$ g, amoksycylina/kwas klawulanowy AMC 30 $\mu$ g. Szczep *Escherichia coli* wytwarzający  $\beta$ -laktamazę o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) - widoczne rozszerzenie strefy zahamowania wzrostu wokół krążka CTX od strony krążka AMC.



**Szczep nr 4 – *Klebsiella pneumoniae*** – szczep oporny na karbapenemy, wytwarzający karbapenemazę typu OXA-48. Czternaście laboratoriów sugerowało, że szczep może być producentem OXA-48 na podstawie testu Carba-NP. oraz badania z zastosowaniem krążka z temocyliną 30µg.

**Szczep nr 5 – *Pseudomonas aeruginosa*** – izolat wielolekooporny, wrażliwy na amikacynę i kolistynę. Nie był producentem karbapenemaz. Laboratoria nie miały większych trudności z prawidłową oceną wyników testów w kierunku wytwarzania takich enzymów jak: ESBL, MBL, KPC. Niestety, aż 5 laboratoriów wykonywało także test w kierunku wytwarzania OXA-48, co jest niezgodne z Rekomendacjami KORLD.

**Szczep 6 – *Staphylococcus aureus*** – szczep oporny na metycylinę, tzw. MRSA (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Oporność na metycylinę związana jest z obecnością białka wiążącego penicylinę zwanego PBP2 lub PBP2' kodowanego przez gen *mecA* lub jego homolog *mecA*<sub>LGA251</sub> - nowy gen zlokalizowany w kasecie SCCmec typu XI, ostatecznie nazwany *mecC*. Opisujący szczep nr 6 posiada gen *mecC*. Ustalenie fenotypu wrażliwości tego izolatu wymagało zastosowania dodatkowych, stosowanych rutynowo metod, np. metody dyfuzyjno-krążkowej z krążkiem antybiogramowym cefoksytyna 30 µg (zalecenia EUCAST). Nie wszystkie laboratoria zastosowały się do tych zaleceń, a tylko jedno laboratorium zasugerowało w komentarzu do wyniku obecność genu *mecC*.

**Szczepy 7-9 - *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus sanguinis*** - szczepy wrażliwe na stosowane w terapii antybiotyki i chemioterapeutyki.

W przypadku ziarenkowców Gram-dodatnich klika laboratoriów (n=6/17) dodatkowo wykonało test fenotypowy pozwalający wykryć mechanizm MLSB. Jedno laboratorium przeprowadziło badanie wrażliwości na leki wszystkich trzech izolatów z grupy paciorkowców metodą dyfuzyjno-krążkową oraz pasków z gradientem stężeń antybiotyków, uzyskując prawidłowe wyniki.

Laboratoria podały wyniki testów lekowrażliwości poszczególnych szczepów wyłącznie w odniesieniu do leków zalecanych w Rekomendacjach ds. doboru testów wrażliwości bakterii na leki i chemioterapeutyki Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów oraz Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej. Uzyskane wyniki lekowrażliwości oraz interpretacja kliniczna były zgodne z oczekiwaniami.

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

W części teoretycznej Laboratoria każdorazowo otrzymywały zestaw 5 pytań (łącznie 15 pytań w trzech turach FV2-2014). Poniżej omówiono wybrane pytania z edycji FV2-2014.

### Quiz I

(Test wielokrotnego wyboru) zawierał pytania metodyczne dotyczące zasad interpretacji testów lekowrażliwości (wrażliwości na leki z grypy makrolidów, klindamycynę i streptograminy; sposobu wykrywania ESBL w przypadku pałeczek wytwarzających cefalosporynazy AmpC; wrażliwości szczepów *Enterococcus faecium* na ampicylinę) w oprogramowaniu VITEK 2 Systems oraz metod referencyjnych potwierdzania mechanizmu KPC oraz przynależności gatunkowej (*S. pneumoniae*).

O ile odpowiedzi na pytania o zasady interpretacyjne oprogramowania VITEK 2 Systems w znakomitej większości były prawidłowe, o tyle dwa pytania o metody referencyjne dostarczyły różnych odpowiedzi. Prawdopodobnie było to konsekwencją nieprecyzyjnie sformułowanych pytań. Otóż, jedno z pytań brzmiało: „Która z poniżej wymienionych metod jest metodą potwierdzenia do gatunku *Streptococcus pneumoniae*? A. MALDI-TOF, B. soli żółciowych, C. genetyczna, D. optochina, E. biochemiczna”. Jeśli autorowi pytania chodziło o wskazanie metod przydatnych do identyfikacji gatunku *S. pneumoniae*, to każda z wymienionych metod służy do identyfikacji tego gatunku: wrażliwość na optochinę, rozpuszczalność w solach żółci, testy biochemiczne, metoda spektrometrii masowej MALDI-TOF, jak również metody biologii molekularnej. Laboratoria udzielały różnych odpowiedzi, ale ani jedno laboratorium nie zaznaczyło wszystkich odpowiedzi. Z kolei, jeśli autor pytania miał na myśli metodę referencyjną identyfikacji gatunkowej pneumokoka, to jedyną poprawną odpowiedzią jest odpowiedź C. metoda genetyczna.

Drugie pytanie odnośnie technik diagnostycznych brzmiało: „Która z niżej wymienionych metod nie jest przeznaczona do potwierdzania fenotypu KPC? A. zmodyfikowany test Hoodg'a, B. Test Carba-NP, C. Metoda sekwencjonowania, a następnie Western-blot, D. wynik z Zaawansowanego Systemu Ekspertowego VITEK 2 Systems, E. MALDI-TOF”. Przy tak sformułowanym pytaniu, trudno było udzielić prawidłowej odpowiedzi. Wątpliwości nie budzą odpowiedzi A., C. i D. Technika MALDI-TOF pozwala wprawdzie na wykrycie enzymów KPC, ale nie jest to metoda potwierdzenia. Test Carba-NP jest testem przesiewowym, a nie potwierdzającym, wykorzystywanym w laboratorium do wykrywania karbapenemaz, w tym KPC. Natomiast, metodą potwierdzenia fenotypu KPC jest metoda molekularna tzw. PCR (ang. polymerase chain reaction), czyli metoda powielania (amplifikacji) łańcuchów DNA polegająca na łańcuchowej reakcji polimerazy DNA.

### Quiz II

Dotyczył morfologii, budowy, cech hodowlanych i różnicowania wybranych grup drobnoustrojów. Test rozwiązało szesnastu uczestników (94,1%), zaś bezbłędne odpowiedzi podało trzynaście laboratoriów (81,3%). Quiz był wielokrotnego wyboru co oznaczało, że w teście występowały pytania w których więcej niż jedna odpowiedź była prawidłowa.

Jedno z pytań dotyczyło morfologii gatunków *Neisseria spp.*; uczestnicy zostali poproszeni o wskazanie tych gatunków spośród wymienionych (*N. elongata*, *N. lactamica*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. weaveri*), które w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama występują często jako pałeczki Gram-ujemne. Są to gatunki odzwiercące: *N. elongata* i *N. weaveri*. Prawidłową odpowiedź udzieliło piętnaście (93,8%) ośrodków.

W innym pytaniu należało wybrać gatunki *Enterococcus spp.*, które nie rozkładają arabinozy. Zdolność rozkładu tego cukru jest jedną z podstawowych cech różnicujących między *E. faecalis* a *E. faecium*. Z wymienionych w zadaniu gatunków tylko *E. faecalis* i *E. durans* nie rozkładają arabinozy. Wszystkie laboratoria biorące udział w quizie prawidłowo odpowiedziały na to pytanie.

Kolejne zadanie polegało na wybraniu spośród wymienionych rodzajów bakterii Gram-ujemnych:

*Francisella spp.*, *Legionella spp.*, *Tatlockia spp.*, *Bartonella spp.*, *Fluoribacter spp.* tych, które w ścianie komórkowej zawierają kwasy tłuszczowe. Pytanie wymagało wiedzy z zakresu budowy bakterii oraz znajomości najnowszej systematyki drobnoustrojów. W obrębie rodziny *Legionellaceae* wyróżnia się obecnie 3 rodzaje: *Fluoribacter*, *Legionella*, *Tatlockia*. Cechą specyficzną tej rodziny pałeczek Gram-ujemnych jest występowanie kwasów tłuszczowych w ścianie komórkowej. Poprawną odpowiedź podały wszystkie laboratoria. Jeden ośrodek dodatkowo, poza wyborem, zaznaczył gatunek *Bartonella spp.* co także uznano za odpowiedź prawidłową, ponieważ kwasy tłuszczowe występują również w ścianie komórkowej tych drobnoustrojów.

W omawianym teście zamieszczono także informacje dotyczące *Bordetella pertussis*: człowiek jest jedynym rezerwuarem tego gatunku w przyrodzie; pałeczki krztuśca uważa się za nieinwazyjne (nie przedostają się do krwi). Wprawdzie pojawiają się doniesienia mówiące o izolacji *B. pertussis* z zakażeń łożyska krwi, ale są to pojedyncze przypadki i dotyczą tylko pacjentów w stanie głębokiej immunosupresji. Toksyna krztuścowa jest białkiem składającym się z podjednostek A i B i warunkuje cytotoksyczność szczepu. Podjednostka B toksyny rozpoznaje receptory zlokalizowane na komórkach gospodarza i wiąże się z nimi, natomiast podjednostka A ma za zadanie wnikać do komórki i zahamować aktywność cykazy adenylowej (wzrost cyklicznego AMP). Działanie toksyny jest wielokierunkowe: pobudza limfocytozę, zmniejsza aktywność makrofagów, wpływa na syntezę insuliny, wzmacnia wrażliwość organizmu na histaminę i serotoninę co może prowadzić do wstrząsu anafilaktycznego. Kolejnym, bardzo istotnym czynnikiem chorobotwórczości *Bordetella pertussis* jest cytotoksyna tchawicza, która paraliżuje ruch rzęsek nabłonka oddechowego powodując kaszel oraz stymuluje wydzielanie IL-1 co w rezulta-

cie prowadzi do wystąpienia gorączki. Pałeczki krztuśca mają duże wymagania wzrostowe - do hodowli stosuje się podłoża zawierające węgiel drzewny i krew końską - bakterie te nie rosną na podłożu Mac Conkeya. Trzy laboratoria nieprawidłowo określiły działanie toksyny krztuścowej, najważniejszego czynnika chorobotwórczości *Bordetella pertussis*.

**Quiz III** składał się pytań testowych dotyczących kontroli jakości, oznaczania oraz interpretacji lekowrażliwości, zgodnie z wytycznymi EUCAST. W przypadku dwóch pytań należało zaznaczyć więcej niż jedną odpowiedź. W quizie uczestniczyło piętnaście ośrodków z siedemnastu biorących udział w FORUM VITEK 2. Czternaście laboratoriów (93,3%) rozwiązało test bezbłędnie.

Jedno z pytań dotyczyło szczepu wzorcowego, który rekomenduje EUCAST wersja 4.0 z dnia 05.09.2014 wskazywały do kontroli jakości krążków antybiogramowych i pasków z gradientem stężeń służących do oznaczania lekowrażliwości m.in. *Haemophilus influenzae*. Zgodnie z wytycznymi, do kontroli jakości oznaczeń izolatów z rodzaju *Haemophilus* należało stosować szczepy: *H. influenzae* NCTC 8468 do kontroli jakości krążków oraz *H. influenzae* ATCC 49766 do kontroli oznaczania wartości MIC. Wykorzystywany dotychczas szczep *H. influenzae* NCTC 8468 często daje nietypowy wzrost na podłożach bakteriologicznych i w związku z tym od roku 2015 będzie zastępowany szczepem *H. influenzae* ATCC 49766. W obowiązujących obecnie, najnowszych tabelach dotyczących kontroli jakości EUCAST - wersja 5.0 z dn. 09.01.2015 roku, pojawiła się informacja, że w 2016 roku szczep *H. influenzae* NCTC 8468 zostanie wycofany z listy szczepów rutynowej QC (ang. quality control), a *H. influenzae* ATCC 49766 pozwoli skontrolować nie tylko krążki antybiogramowe, ale także paski z gradientem stężeń. Do końca 2015 roku, zgodnie z zaleceniami EUCAST, do QC testów lekowrażliwości można wykorzystywać oba szczepy. Jest to też czas dla laboratoriów na dostosowanie swoich procedur do aktualnych wymogów EUCAST. Wszystkie udzielone w tym zadaniu odpowiedzi zostały uznane za prawidłowe.

Inne pytanie dotyczyło wskazania gatunków, których wrażliwość na glikopeptydy oznacza się wyłącznie na podstawie określenia wartości MIC (mg/L). W przypadku tego pytania należało zakreślić dwie poprawne odpowiedzi (*Staphylococcus spp.* i *Clostridium difficile*). Wszyscy uczestnicy prawidłowo rozwiązali to zadanie.

Kolejne pytanie testowe FV2-2014 odwoływało się do znajomości eksperckich zasad interpretacji oznaczania wrażliwości pałeczek *Enterobacteriaceae* na aminoglikozydy. W tym zadaniu dwie odpowiedzi były prawidłowe i tylko jeden z uczestników FV2 wskazał jako prawidłową wyłącznie jedną z nich. Pozostali respondenci udzielili wyczerpującej i poprawnej odpowiedzi.

## PODSUMOWANIE

Międzylaboratoryjna Platforma Wymiany Doświadczeń Zaawansowanych Użytkowników Systemów VITEK 2 – Program FORUM VITEK 2 (FV2) wymaga od członków dużego zaangażowania i chęci ustawicznego rozwoju. Zarówno dobór szczepów bakteryjnych opracowywanych przez uczestników FV2, jak i dobór zagadnień poruszanych w częściach teoretycznych poszczególnych tur, mają na celu stałą aktualizację technik badawczych stosowanych w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych, a także podtrzymywanie i aktualizację ogólnej wiedzy mikrobiologicznej. FV2 nie ma charakteru kontroli zewnętrznej, jest programem niezwiązanym z Programem POLMICRO, a udział w nim jest dobrowolny i zależy od przyjęcia bądź odmowy przyjęcia zaproszenia od firmy bioMérieux Polska. Wszystkie laboratoria zaproszone do programu FORUM VITEK 2 potwierdziły po raz kolejny swoje kompetencje i gotowość do świadczenia mikrobiologicznych usług diagnostycznych na najwyższym poziomie; wykazały się wysokimi kompetencjami do stosowania różnorodnych testów w celu uzyskania wiarygodnych wyników, charakteryzujących się wysoką jakością. Potwierdziły także konieczność i zasadność utrzymywania w laboratoriach różnych technik diagnostycznych, co jest szczególnie istotne w sytuacji pojawiania się tzw. trudnych izolatów, a więc

charakteryzujących się szczególnymi czynnikami zjadliwości, w tym wielolekoopornością. Jak co roku, należy podkreślić fakt, że udział w Programie FORUM VITEK 2 stanowi niewątpliwie dodatkowe obciążenie dla wybranych laboratoriów, tym cenniejsze jest ich zaangażowanie.

Wnikliwa analiza podejmowanych działań w ramach FV2-2014 wskazała organizatorom szereg elementów wymagających usprawnienia lub skorygowania. Podejmowane w tym celu czynności ukierunkowane będą w szczególności na poprawę terminowości edycji, poprawę trybu przekazywania uczestnikom FV2 informacji zwrotnych o wynikach poszczególnych tur, a także uatrakcyjnienie zadań. Istotnym elementem przyszłych edycji FV2 nadal powinno być nawiązywanie do wszystkich metod diagnostycznych rutynowo stosowanych w laboratoriach, gdyż wyłącznie kompleksowe spojrzenie na opracowywany patogen daje szansę przedstawienia lekarzowi wiarygodnego wyniku badania mikrobiologicznego. Organizatorzy w dalszym ciągu oczekują od członków Międzylaboratoryjnej Platformy Wymiany Doświadczeń Zaawansowanych Użytkowników Systemów VITEK 2 – Programu FORUM VITEK 2 zgłaszania problemów diagnostycznych, które mogłyby być przeanalizowane w ramach omawianego programu.



# Monitorowanie temperatury i innych parametrów fizycznych w laboratorium

**mgr Marta Warowny-Krawczykowska**  
**bioMérieux Polska Sp. z o.o.**  
**Warszawa**



Labguard 3D to automatyczny system nowej generacji do monitorowania temperatury oraz innych parametrów fizycznych w laboratorium. System został zaprojektowany specjalnie z myślą o laboratoriach, tak aby ułatwić proces kontroli warunków w jakich przechowywane są odczynniki oraz materiały biologiczne. Bogata oferta sond pomiarowych oraz elastyczność oprogramowania sprawia, że system Labguard 3D znajduje zastosowanie nie tylko w wielu gałęziach przemysłu (przemysłe spożywcze, farmaceutycznym, kosmetycznym), ale również w laboratoriach klinicznych czy weterynaryjnych. System znajduje zastosowanie wszędzie tam, gdzie potrzebna jest kontrola parametrów fizycznych.

System Labguard 3D pomaga spełniać wszelkie wymagania zawarte w normach: ISO 17025 – *Wymagania dotyczące laboratoriów badawczych i wzorcujących*, ISO 15189 *Laboratoria medyczne, Szczególne wymagania dotyczące jakości i kompetencji* czy PN-EN ISO 7218 *Mikrobiologia żywności i pasz* – Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych a także wymagania FDA 21 CFR część 11. Posiadanie automatycznego systemu do monitorowania ułatwia procesy związane z akredytacją oraz audytami i kontrolami zewnętrznymi.

Cztery podstawowe funkcje systemu Labguard 3D to mierzenie parametrów fizycznych ich monitorowanie, zapisywanie oraz alarmowanie w trybie rzeczywistym. Funkcja alarmowania gwarantuje otrzymanie informacji w momencie kiedy doszło do awarii monitorowanego urządzenia. Dzięki temu użytkownik może wprowadzić działania naprawcze i zapobiec stracie odczynników czy materiałów biologicznych przechowywanych w monitorowanym urządzeniu.

Działanie systemu Labguard 3D opiera się na bezprzewodowej technologii radiowej przekazywania sygnału z nadajnika do odbiornika. Do nadajnika podłączone są sondy pomiarowe, które umieszczone są w komorze monitorowanego urządzenia. Odbiornik, który podłączony jest bezpośrednio do sieci internetowej przekazuje dane do komputera.

Nowoczesne nadajniki oferowane w systemie Labguard 3D posiadają wbudowany cyfrowy wyświetlacz. Dzięki czterem rodzajom nadajników: jedno-, dwu-, trzy- i czterokanałowym możliwe jest podłączenie od jednej do czterech różnych sond pomiarowych. Uniwersalność nadajników to istotna zaleta systemu. Dzięki niej możliwe jest podłączenie do jednego nadajnika sond różnego rodzaju np. do pomiaru temperatury, wilgotności względnej oraz stężenia CO<sub>2</sub>. Wyświetlacz cyfrowy nadajnika prezentuje szereg istotnych dla użytkownika informacji. Poza nazwą monitorowanego urządzenia, aktualną wartością danego parametru fizycznego wyświetlane są również informacje o stopniu zużycia baterii oraz jakości łączności radiowej. Nadajniki wyposażone są w kolorowe diody alarmowe z projekcją 360°. Do każdego rodzaju alarmu (przekroczenie wymaganej wartości parametru fizycznego, problem z łącznością, problem z zasilaniem) przypisany jest odpowiedni kolor. Poza alarmami, które wyświetlane są na obudowie nadajnika jest też alarm w postaci czerwonej diody z projekcją pionową, który umożliwia obserwowanie sygnału świetlnego na suficie. Zasilanie nadajników może odbywać się na trzy sposoby: klasyczny zasilacz elektryczny, kabel USB oraz baterie litowe.

Spośród bogatej oferty sond pomiarowych najbardziej popularne są sondy do pomiaru temperatury. Z systemem Labguard 3D możliwe jest jej monitorowanie w zakresie od -196°C do ponad 1000°C. Dwie najczęściej instalowane sondy to: sonda pracująca w zakresie -30°C do + 80°C oraz sonda PT100 pracująca w zakresie -90°C do 130°C. Umożliwiają one monitorowanie temperatury w praktycznie wszystkich urządzeniach laboratoryjnych: niskotemperaturowych zamrażarkach, zamrażarkach klasycznych, lodówkach, chłodniach, cieplarkach.

W ofercie systemu Labguard 3D są także sondy: monitorujące jednocześnie temperaturę i wilgotność względną oraz sondy mierzące stężenie CO<sub>2</sub>, ciśnienie oraz przetworniki umożliwiające podłączenie dowolnej sondy analogowej (przetworniki analogowo-cyfrowe 0-20mA i 0-10V).

W ofercie systemu Labguard 3D dostępne są także niezależne rejestratory danych, przeznaczone do monitorowania warunków transportu. Zapewniają kontrolę nad właściwymi warunkami przewożonych materiałów biologicznych, a raport z informacjami o warunkach transportu może być przekazywany automatycznie do systemu w momencie, w którym nadajnik będzie w zasięgu odbiornika. Raport taki jest idealnym dokumentem do przedstawienia w razie kontroli z zewnątrz.

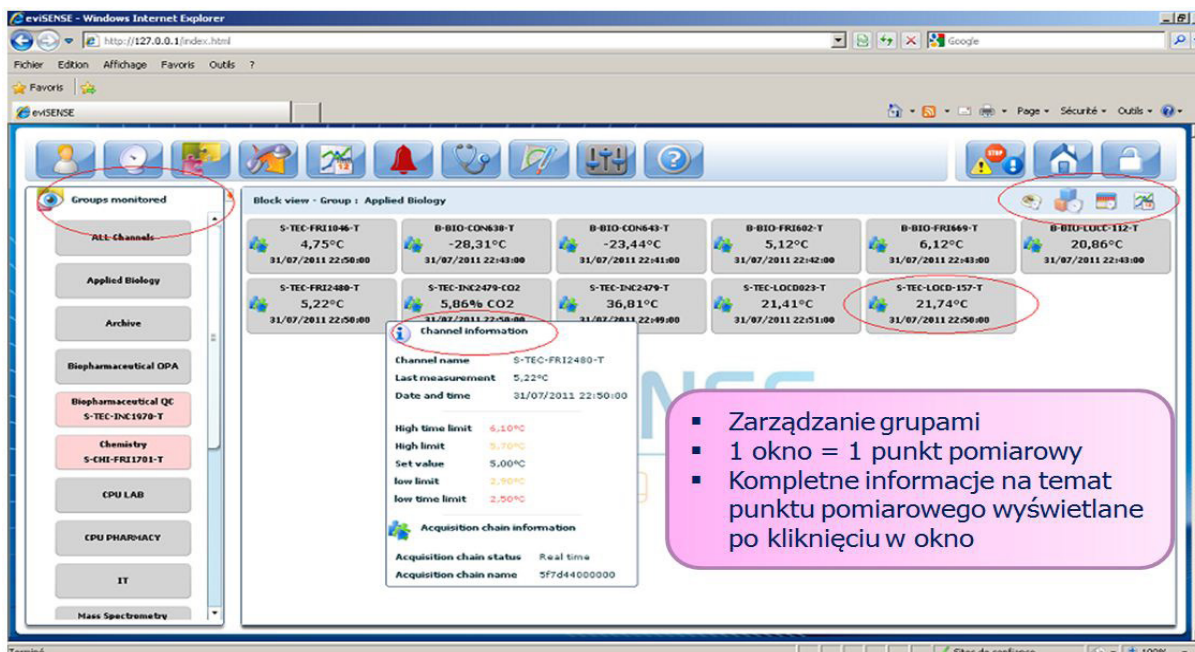
Kolejną zaletą systemu Labguard 3D jest fakt, że oprogramowanie instalowane jest na serwerze lub serwerze wirtualnym. Dzięki temu wszelkie aktualizacje wykonywane są w jednym miejscu, a dostęp do oprogramowania możliwy jest przez przeglądarkę internetową. W zależności od potrzeb dostępne są trzy wersje oprogramowania, które można rozbudowywać stopniowo uruchamiając poszczególne jego funkcje. Dostęp do oprogramowania mają tylko użytkownicy, którzy posiadają indywidualny login i hasło. Dodatkowo możliwe jest przypisanie użytkownikom wybranych poziomów dostępu m.in. użytkownika, który może analizować informacje o alarmach i odbierać alerty oraz administratora, który zarządza kontami innych użytkowników, może wprowadzać zmiany do konfiguracji oprogramowania, tak aby dopasować system do lokalnych potrzeb. Oprogramowanie systemu Labguard 3D umożliwia analizę graficzną oraz tabelaryczną gromadzonych danych. Możliwy jest także export danych do programu Microsoft Excel lub do formatu PDF. Dane można analizować retrospektywnie. W dowolnym momencie można wygenerować raport za wybrany okres z przeszłości dla konkretnego wybranego urządzenia lub grupy urządzeń. Dzięki temu ogranicza

się do minimum drukowanie zbędnych dokumentów oraz ich magazynowanie. Ponadto zainstalowanie automatycznego systemu do monitorowania środowiska w znacznym stopniu odciąża pracowników laboratorium. Obowiązek systematycznego spisywania temperatur z urządzeń laboratoryjnych może zostać wyeliminowany, a dzięki temu zyskają Państwo czas, który będzie można wykorzystać na inne zadania i obowiązki.

Kolejna zaleta systemu Labguard 3D to zapewnienie bezpieczeństwa dla przechowywanych odczynników i materiałów 24h na dobę, czyli także w nocy oraz w weekendy i dni wolne od pracy, kiedy nie ma personelu w laboratorium. Komunikowanie alarmów możliwe jest na wiele sposobów: mogą to być maile wysyłane na wybrane adresy, widget – „wyskakujące” kolorowe okienko na pulpicie komputera czy możliwość otrzymywania wiadomości SMS, faxu oraz wiadomości głosowych. Dzięki temu mogą Państwo „zapomnieć” o manualnej kontroli parametrów fizycznych. Pomiary oraz ich kontrola odbywają się w sposób automatyczny, a Państwo są informowani wyłącznie w przypadku zaistniałej awarii.

Dodatkowo odpowiednie moduły oprogramowania umożliwiają wykonanie samodzielnie kalibracji i mappowania. Na życzenie klienta z sondami dostarczamy świadectwa kalibracji producenta lub certyfikaty wzorcowania wydane przez laboratoria wzorcujące posiadające akredytację Polskiego Centrum Akredytacji (PCA). Możliwy jest także zakup urządzeń do przeprowadzania kalibracji na miejscu w Państwa laboratorium.

Warto zaznaczyć fakt, że Labguard 3D jest systemem modułowym. Oznacza to, że zakupioną dziś wersję systemu można rozbudować o kolejne sondy, nadajniki, odbiorniki. Możliwy jest również upgrade oprogramowania do wyższej wersji, uruchomienie dodatkowych jego funkcji, tak aby dopasować system Labguard 3D do zmieniających się potrzeb użytkownika.



- Zarządzanie grupami
- 1 okno = 1 punkt pomiarowy
- Kompletnie informacje na temat punktu pomiarowego wyświetlane po kliknięciu w okno



BIOMERIEUX PERFORMANCE SOLUTIONS™ • Quality & Compliance Services



Automatyczne monitorowanie  
i kontrola temperatury  
oraz innych parametrów  
fizycznych



# JAKOŚĆ ZAGWARANTOWANA



# Preparaty bezpośrednie z materiału klinicznego – wartość nie do przecenienia.

**mgr Małgorzata Szarata**  
Szpital Wojewódzki w Poznaniu

## Wprowadzenie

Ostatnie kilkadziesiąt lat to bardzo szybki rozwój różnorodnych technologii, które mają wpływ na niemalże każdą z dziedzin naszego życia - a więc także na diagnostykę laboratoryjną, w tym i mikrobiologiczną. Na rynku mamy dużo wyrafinowanych technik diagnostycznych opartych na metodach immunologicznych czy genetycznych. Do naszej dyspozycji są aparaty do automatycznej identyfikacji drobnoustrojów i oznaczania lekowrażliwości. Potrafimy identyfikować bakterie do gatunku używając metod genetycznych, a nawet identyfikować geny odpowiedzialne za różnego rodzaju mechanizmy oporności itp. W natłoku tych wszystkich nowości często zupełnie zapominamy o tym, że stare sprawdzone metody, wsparte nowymi zdobyczami techniki, takie jak preparaty bezpośrednie z materiałów klinicznych, mogą być nadal bardzo przydatne i dać wiele korzyści, zarówno dla samych mikrobiologów jak i lekarzy klinicystów

### Badania mikroskopowe:

- należą do metod klasycznych
- umożliwiają uzyskanie szybkich wyników
- pozwalają na stwierdzenie obecności bakterii w badanym materiale
- dostarczają informacji o morfologii komórek bakteryjnej (ziarniaki, pałeczki)
- stanowią pierwszy, wstępny etap identyfikacji drobnoustroju
- ukierunkowują dalsze etapy badania mikrobiologicznego

Wykonywanie preparatów daje nam dwojakiego rodzaju korzyści:

### 1. Kliniczne:

- krótki czas od momentu otrzymania materiału do uzyskania wstępnego wyniku
- weryfikacja materiału: diagnostyczny, niediagnostyczny (plwocina)
- ukierunkowanie antybiotykoterapii empirycznej - pałeczki, ziarniaki
- Płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) - szybkie wdrożenie odpowiedniej antybiotykoterapii (*N.meningitidis*)

### 2. Ekonomiczne:

- wykonanie preparatu jest tanie, co zmniejsza koszty diagnostyki
- preparaty można wykonać w każdej, nawet najmniejszej pracowni bakteriologicznej, wystarczające jest podstawowe wyposażenie - mikroskop świetlny, szkiełka podstawowe, zestaw do barwienia
- udzielenie pomocy klinicyście w podejmowaniu decyzji o wdrożeniu lub weryfikacji terapii, dzięki orientacyjnemu wynikowi otrzymanemu krótko po pobraniu materiału.

Aby móc wykonywać preparaty i poddawać je ocenie, tak naprawdę najdroższym sprzętem potrzebnym nam w tym procesie jest mikroskop. Na rynku mamy szeroką ofertę tego rodzaju sprzętu i w zależności od tego, z jakiego rodzaju preparatami będziemy mieli do czynienia, możemy wybrać z tej oferty ten najbardziej nam odpowiadający np. mikroskop świetlny, kontrastowo-fazowy, fluorescencyjny oraz cała gama mikroskopów elektronicznych. Dla pracowni mikrobiologicznej zupełnie wystarczający jest mikroskop świetlny, średniej klasy – powiększenie 1000x oraz obiektyw immersyjny. Jest to koszt około 7-12 tys. złotych, a przy właściwym użytkowaniu jest to wydatek na długie lata.

Procedurę rozpoczynamy od wykonania rozmazu z materiału klinicznego. Najczęściej dokonujemy tego metodą manualną:

- odtłuszczamy szkiełka podstawowe w alkoholu i 3x przeciągamy szkiełko nad płomieniem palnika
- na szkiełko nakładamy badany materiał i wykonujemy rozmaz
- suszymy preparat (najlepiej samoistnie, bez podgrzewania – aby zapobiec tworzeniu się artefaktów i obkurczaniu komórek)
- utrwalamy preparat w płomieniu palnika.

Możemy też wspomóc się nowościami, które nie omięły także tej części diagnostyki i wykonać preparat metodą automatyczną, używając do wykonania preparatu cytowirówki. Z zewnątrz cytowirówka wygląda podobnie do zwykłej wirówki, używanej w części analitycznej laboratorium.



Różnica polega na wnętrzu – zamiast rotora z gilzami na próbówki, cytowirówka ma rotor z zawieszkami, w których umieszczamy cyto-wkładki ze szkiełkami na preparat (Zdjęcie 1, 2, 3).

Cytowirówka służy głównie do wykonywania preparatów z materiałów płynnych takich jak płyn mózgowo – rdzeniowy, płyny z jam ciała: opłucnowy, otrzewnowy, z jamy brzusznej, materiałów ze spunktowanego ropnia.

Wykonanie preparatu przy użyciu cytowirówki:

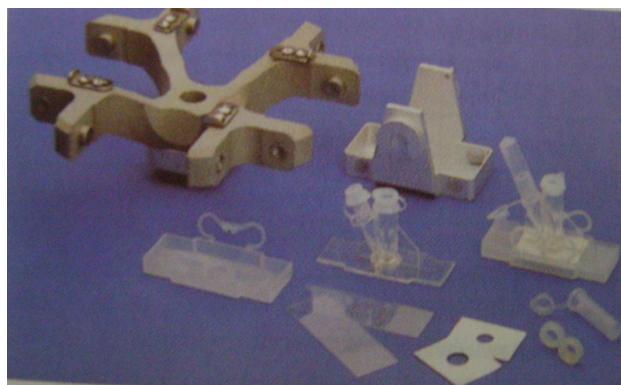
- szkiełko podstawowe opisujemy numerem badania
- wkładamy do plastikowej podstawy
- nakładamy bibułę filtracyjną z okrągłym otworem tak, aby otwór bibuły pokrył się z okręgiem zaznaczonym na szkiełku
- na bibułę nakładamy plastikową nakładkę, która posiada dwa okrągłe cylinderki jeden ustawiony pionowo w stosunku do szkiełka i przypadający dokładnie w miejscu otworu w bibule filtracyjnej, drugi ustawiony pod kątem i połączony z pierwszym - służy do odprowadzenia reszty płynu
- plastikową podstawę łączymy z górną plastikową nakładką za pomocą bocznych zapinek
- wlewamy płyn do centralnego cylinderka (max 2ml) - cylinderk zamykamy specjalnym korkiem
- wkładamy wkładki „cyto” do zawieszek rotora
- zamykamy wirówkę i wirujemy przez 10 minut przy 2 tys. obrotów
- po skończonym wirowaniu odsączamy nadsącz zbierający się w ukośnym cylinderku
- wkładki „cyto” wkładamy do ciepłarki w celu wysuszenia
- po wysuszeniu i utrwaleniu preparat barwimy

Używając cytowirówki możemy świetnie wykorzystać jej zalety takie jak:

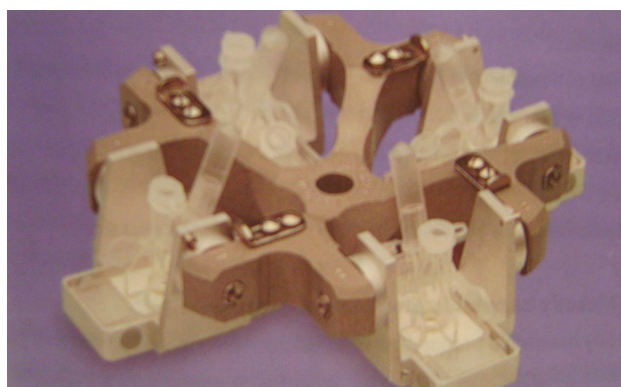
- uzyskanie osadu z niewielkiej ilości płynu
- komórki w czasie wirowania (siła odśrodkowa) osadzają się bezpośrednio na szkiełku
- komórki są niezniszczone i niezdeformowane
- mamy zagwarantowany krótki czas uzyskania preparatu gotowego do zabarwienia



**Zdjęcie 1** Cytowirówka-wygląd zewnętrzny



**Zdjęcie 2** Elementy składowe służące do wirowania w cytowirówce



**Zdjęcie 3** Wkładki „Cyto” załadowane i gotowe do wirowania

Kolejnym etapem naszej drogi ku uzyskaniu preparatów jest ich zabarwienie. Wykorzystuje się wiele metod barwienia preparatów np.: metoda Ziel-Neelsena - dla kwasoodpornych prątków gruźlicy, Schaffera-Fultona - dla wybarwiania form przetrwalnikowych, Manevala - do wybarwiania otoczek bakteryjnych, metoda Neissera dla uwidaczniania ziarnistości wolutynowych tzw. ciałek Ernsta-Babesa. Jednak w mikrobiologii podstawowym i najczęściej stosowanym barwieniem jest barwienie metodą Grama służące do różnicowania bakterii na dwie grupy – Gram-dodatnie (G(+)) i Gram-ujemne (G(-)) i ich wstępnej klasyfikacji. Zasada tego barwienia polega na wykorzystaniu różnic w budowie ściany komórkowej bakterii G(+) i G(-).

Bakterie Gram(+) mają grubą warstwę peptydoglikanu, a G(-) cienką i dodatkowo otoczoną lipidową błoną zewnętrzną.

Barwienie metodą Grama możemy wykonać metodą manualną:

- utrwalony preparat zalewamy fioletem na 2 – 3 min
- spłukujemy wodą i zalewamy płynem Lugola na 1,5 – 2 min
- odbarwiamy alkoholem i płuczemy wodą
- dobarwiamy fuksyną lub safraniną 20 -30 s
- po wysuszeniu preparat jest gotowy do obejrzenia w mikroskopie

lub używając metody automatycznej, bo i na tym etapie diagnostyki mamy do czynienia z nowością jaką jest aparat do automatycznego barwienia.



**Zdjęcie 4**

Aparat do barwienia – widok zewnętrzny

- po wykonaniu preparatu i utrwaleniu go w płomieniu palnika preparat umieszczamy
- w specjalnym zamykanym od góry talerzu (Zdjęcie 5), który następnie wkładamy do aparatu zamykamy go, uruchomiamy i automatycznie następuje cykl barwienia.
- po około 2-3 minutach preparaty są zabarwione i gotowe do oglądania pod mikroskopem.



**Zdjęcie 5**

Rotor na preparaty

Do aparatu można załadować od jednego do 12 preparatów – ich liczbę wybieramy z panelu umieszczonego na przedniej ścianie aparatu. Na panelu tym jest także możliwość ustawienia grubości preparatu i ilości napylanych barwników.

W najnowszej wersji aparatu do barwienia można już na stałe ustawić programy z parametrami do barwienia preparatów o różnej grubości - co skutkuje tym, że ilość napylanych barwników jest odpowiednia do wybranej grubości preparatu.

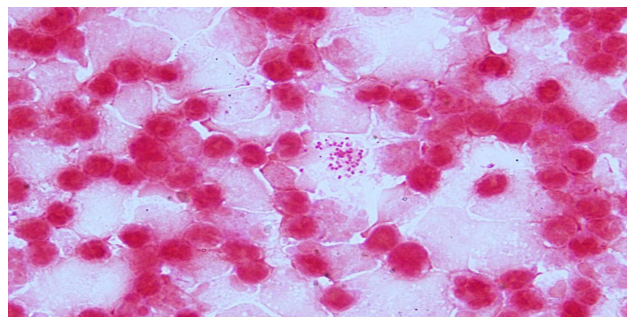
W momencie kiedy mamy wykonany preparat i zabarwiony, możemy przystąpić do jego oceny pod mikroskopem, używając obiektywu immersyjnego. Oglądając preparat skupiamy się głównie na ocenie elementów morfotycznych - leukocyty (limfocyty, granulocyty) i widocznych drobnoustrojach - jeśli takowe tam znajdziemy.

## Przeгляд preparatów z różnych materiałów klinicznych.

### Preparaty z płynu mózgowo-rdzeniowego

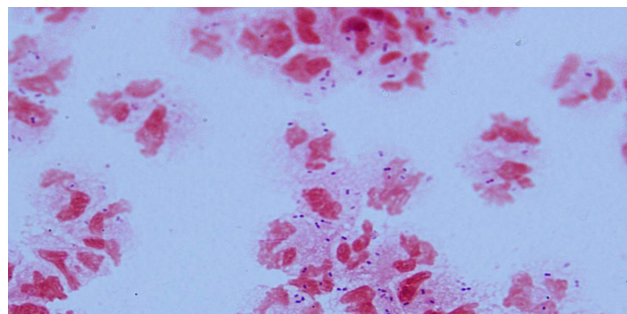
- Preparat wykonujemy metodą tradycyjną z osadu uzyskanego z odwirowania PMR - 10 min. przy 2 tys/obr lub w cytowirówce
- Preparat suszymy, utrwalamy i barwimy manualnie lub przy użyciu aparatu do barwienia

Oglądamy preparat zwracając główną uwagę na bakterie i elementy morfotyczne - leukocyty: granulocyty i/lub limfocyty. Obecność podwyższonej liczby komórek wielojądrzastych obserwujemy zazwyczaj w ostrych zakażeniach bakteryjnych, a limfocytów w zakażeniach wirusowych, grzybiczych, jak również gruźliczym. W interpretacji preparatu należy uwzględnić wyniki badania analitycznego PMR.



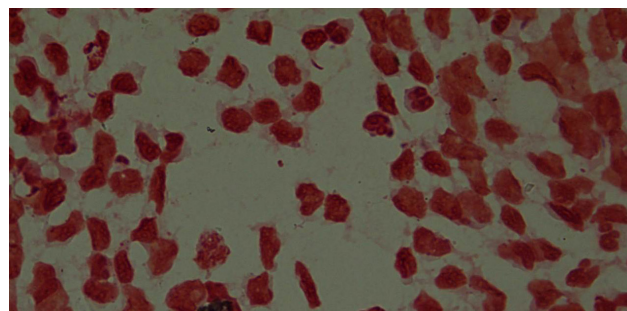
**Zdjęcie 6**

PMR - preparat z cytowirówki zabarwiony metodą Grama - widoczne skupiska *N.meningitidis* - wewnątrz leukocytów



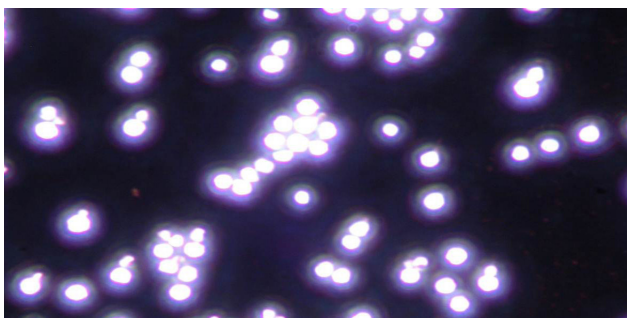
**Zdjęcie 7**

PMR- cytowirówka – *S.pneumoniae* - widoczne skupiska dwoinek Gram (+) w leukocytach - granulocytach



**Zdjęcie 8**

PMR - *N.meningitidis*



**Zdjęcie 9**  
PMR - *Cryptococcus neoformans* - tusz chiński

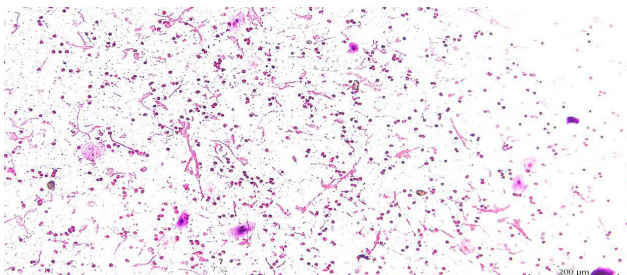
#### Preparaty z płwociny

- Wykonujemy preparat - rozmaz na szkiełku
- Preparat suszymy, następnie utrwalamy w płomieniu palnika
- Barwimy metodą Grama

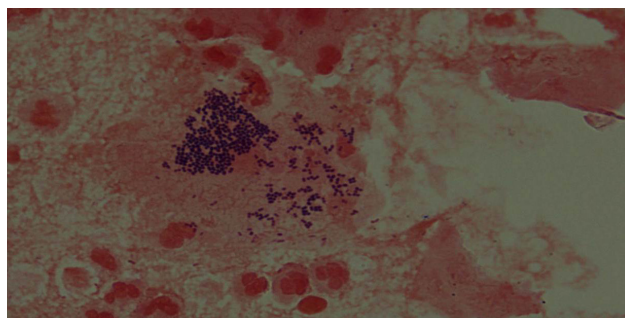
Ocena preparatu bezpośredniego z płwociny:

- Określamy liczby leukocytów i nabłonków w min. 10 polach widzenia (w powiększeniu 100-krotnym)
- Oceniamy półilościowo liczbę komórek bakteryjnych i ich morfologię (w powiększeniu 1000-krotnym - pałeczki Gram-ujemne, ziarenkowce Gram-dodatnie)
  - (+) -1komórka co kilka pól widzenia
  - (++) -do 10 komórek co kilka pól widzenia
  - (+++) -do 10 komórek w każdym polu widzenia
  - (++++) -powyżej 10 komórek w każdym polu widzenia

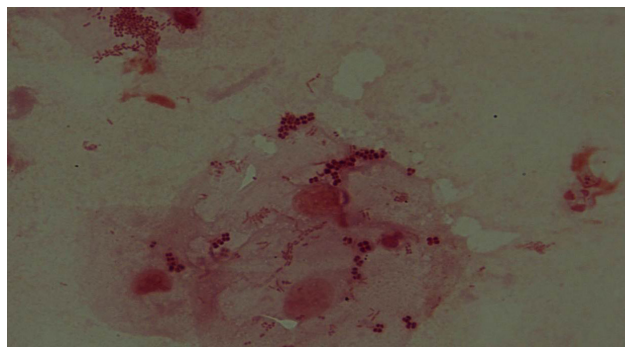
Ocena liczby i morfologii bakterii jest pomocna w określeniu dominującego czynnika etiologicznego (zwracamy uwagę na drobnoustroje wewnątrzkomórkowe, florę grzybiczą oraz obecność obfitej flory mieszanej – wskazującej na florę jamy ustnej. Stosunek 1:1 liczby leukocytów do nabłonków pozwala podejrzewać, że mamy do czynienia z próbką śliny. Materiał należy opracować także w przypadku, gdy w preparacie brak nabłonków, a ilość leukocytów jest mała, bądź nie stwierdza się żadnych komórek tzw. pusty preparat. Koniecznym jest również odnotowanie faktu, gdy widzimy duże ilości śluzu. Płwocina zawierająca >25 leukocytów i < 10 nabłonków w polu widzenia powinna zostać zakwalifikowana do dalszego badania mikrobiologicznego.



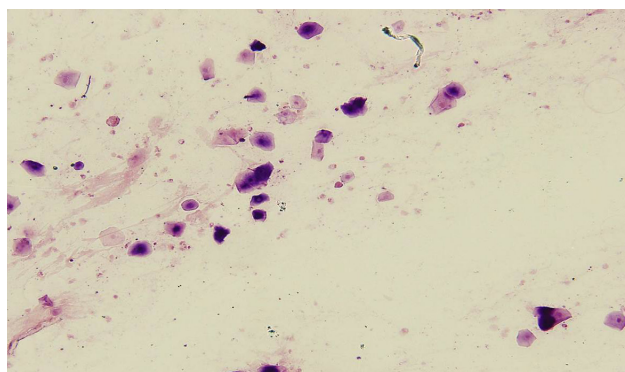
**Zdjęcie 10**  
Płwocina diagnostyczna - powiększenie 100x - widoczne liczne leukocyty i pojedyncze nabłonki



**Zdjęcie 11**  
Płwocina diagnostyczna - powiększenie 1000x - ziarniaki G(+)



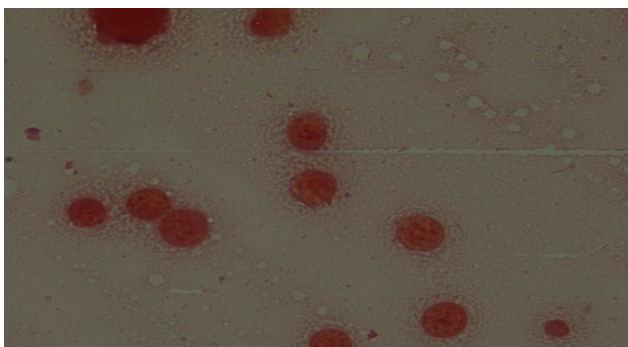
**Zdjęcie 12**  
Płwocina diagnostyczna - powiększenie 1000x - pałeczki G(-)



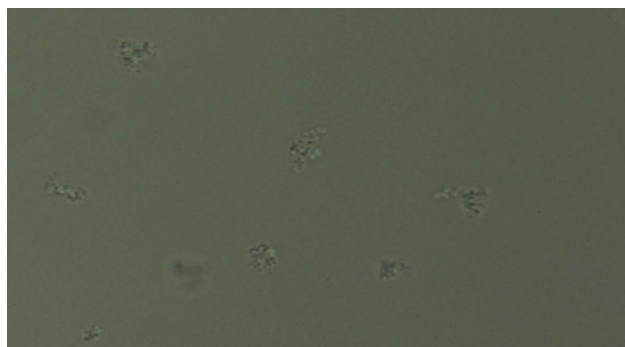
**Zdjęcie 13** Płwocina niediagnostyczna – powiększenie 100x - nabłonki, brak leukocytów

#### Preparaty z płynów z jam ciała:

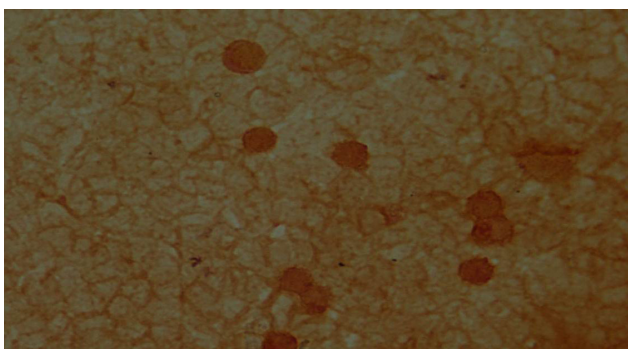
- materiał wirujemy tak jak PMR
- z osadu wykonujemy rozmaz na szkiełku podstawowym lub wykonujemy preparat przy użyciu cytowirówki
- suszymy i utrwalamy w płomieniu palnika
- barwimy metodą Grama
- oglądamy pod mikroskopem: drobnoustroje, leukocyty (limfocyty, granulocyty), nabłonki



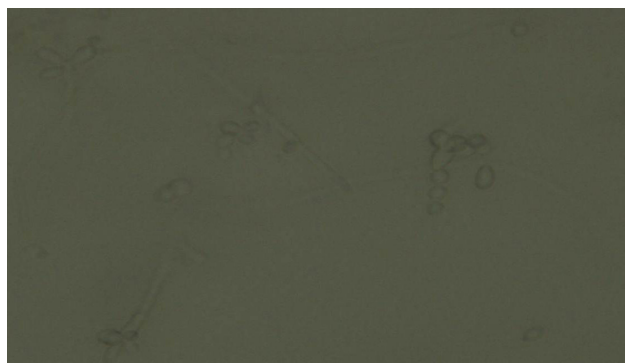
**Zdjęcie 14**  
Płyn z jamy otrzewnej (jałowy) - brak drobnoustrojów, limfocyty



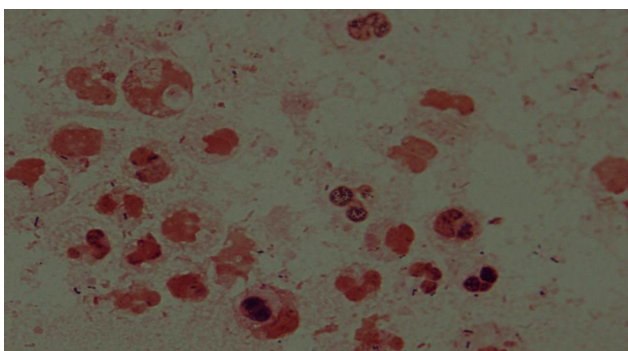
**Zdjęcie 17**  
Ziarniaki – preparat bezpośredni z krwi - bezbarwny



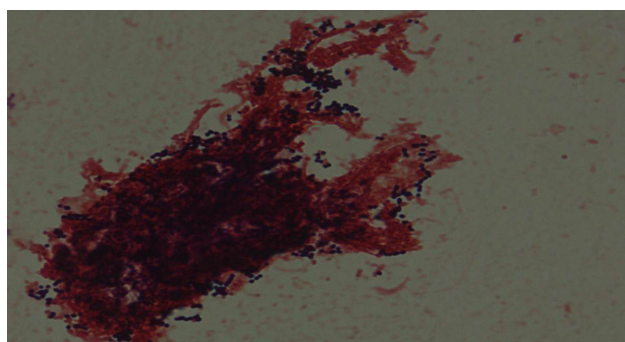
**Zdjęcie 15**  
Płyn z jamy opłucnowej (jałowy) – brak drobnoustrojów, limfocyty



**Zdjęcie 18**  
Preparat natywny z krwi - drożdżaki



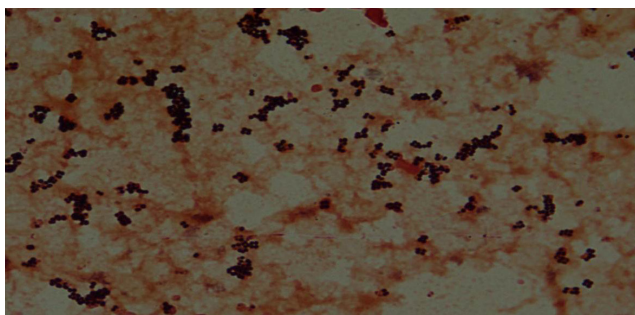
**Zdjęcie 16**  
Płyn z jamy otrzewnej - pałeczki G(-) - *E.coli*, ziarniaki G(+) - *E.faecalis*



**Zdjęcie 19**  
*Streptococcus agalactiae* – preparat bezpośredni z krwi „dodatniej” barwiony metodą Grama

#### Preparaty z posiewów krwi - bezpośrednio z dodatniej butelki

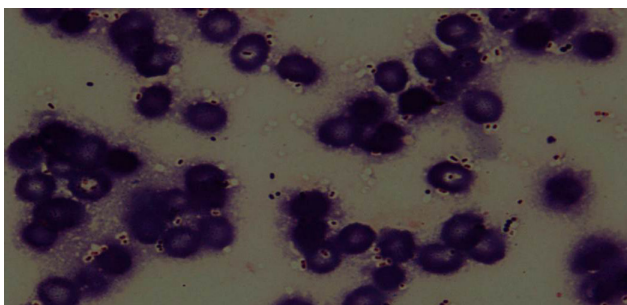
- z dodatniej butelki pobieramy jałowo strzykawką krew
- kroplę krwi nakrapiamy na szkiełko podstawowe, nakładamy szkiełko nakrywkowe,
- a na nie dajemy kroplę olejku imersyjnego, oglądamy pod mikroskopem
- wykonujemy także preparat barwiony metodą Grama
- o wstępnym wyniku informujemy lekarza



**Zdjęcie 20**  
*Staphylococcus spp.* – preparat bezpośredni z krwi „dodatniej” barwiony metodą Grama

**Zdjęcie 21**

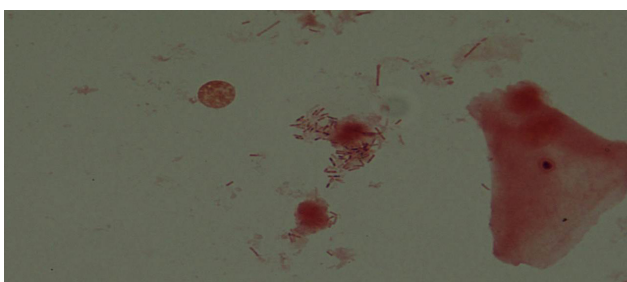
Drożdżaki – preparat bezpośredni z krwi „dodatniej” barwiony metodą Grama

**Zdjęcie 22**

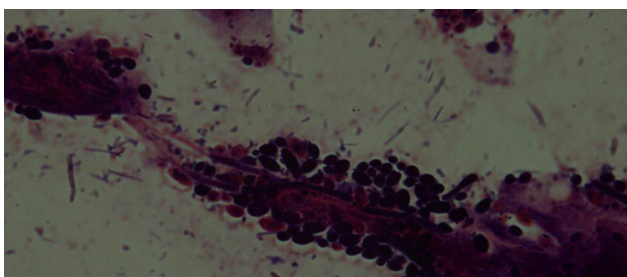
*Enterococcus faecium* i *Klebsiella pneumoniae* – preparat bezpośredni z krwi „dodatniej” barwiony metodą Grama

**Biocenoza pochwy:**

- rozmaz wykonujemy wymazówką na szkiełku podstawowym
- preparat suszymy i utrwalamy w płomieniu palnika
- barwimy metodą Grama
- oglądamy pod mikroskopem

**Zdjęcie 23**

Biocenoza pochwy - pojedyncze leukocyty, pałeczki Doderleina, nabłonki

**Zdjęcie 24**

Biocenoza pochwy – widoczne pseudostrzępki i blastocyty

**PODSUMOWANIE**

Wykonywanie preparatów daje istotne korzyści zarówno kliniczne, diagnostyczne jak i ekonomiczne.

Zastosowanie technik mikroskopowych stanowi doskonałe uzupełnienie innych metod w laboratorium, dając możliwość mikrobiologom ugruntowania i udoskonalania swojej wiedzy (morfologia kolonii bakteryjnych na różnych podłożach + preparat), zabezpieczając nas przed popełnieniem błędu diagnostycznego.

Jak zaznaczyłam na wstępie, preparaty mikrobiologiczne z materiałów bezpośrednich, jak również z hodowli, mimo, że znane od bardzo dawna, wsparte nowymi technikami, takimi jak cytowirówka, czy automatyczny aparat do barwienia, mogą nadal być bardzo przydatne. Dają wiele korzyści nam mikrobiologom i lekarzom klinicystom. Preparaty powinny być dla każdego mikrobiologa, a szczególnie dla młodych mikrobiologów podstawowym i pierwszym narzędziem diagnostycznym. Wykonywanie preparatów i ich oglądanie pod mikroskopem jest doskonałą nauką mikrobiologii. Często obserwujemy, że pod wpływem długotrwałej antybiotykoterapii drobnoustroje nie wyrastają na wszystkich, typowych dla nich podłożach np. brak jest wzrostu na podłożu dla pałeczek Gram-ujemnych, a na podłożach namnażających typu agar czekoladowy, czy płytka krwawa mogą one morfologią przypominać ziarniaki. Wtedy wystarczy zrobić preparat i w ten sposób rozwiązać problem, ustrzegając się przed popełnieniem błędu diagnostycznego. Dodatkowo przez wspomaganie się automatami typu cytowirówka, czy aparat do barwienia, bardzo ułatwiamy sobie pracę w porównaniu do metod manualnych, a także oszczędzamy czas, który możemy poświęcić na inne etapy diagnostyczne. Dużą korzyścią jest także fakt, że aparat do barwienia działa w systemie zamkniętym - ścieki są usuwane do specjalnego zamkniętego pojemnika. Działamy więc zgodnie z zaleceniami ekologii, co w dzisiejszych czasach jest bardzo cenne, gdyż w ten sposób chronimy środowisko, a z drugiej strony nie narażamy się na kontakt bezpośredni z barwnikami.

Mam nadzieję, że ten artykuł przekona mikrobiologów do tego, aby w swoich pracowniach pokusili się o częstsze sięganie po preparaty mikroskopowe. Przy użyciu niewielkiej ilości sprzętu praca przy preparatach staje się obecnie bardzo przyjazna dla mikrobiologa (czysta - co nie jest bez znaczenia) i daje, jak pokazuje ten artykuł i samo życie, naprawdę wiele wymiernych korzyści - mikrobiologom, lekarzom klinicystom, ale przede wszystkim pacjentowi, bo to on jest najważniejszy i właśnie jego dobro powinniśmy mieć przede wszystkim na względzie.

# chromID CARBA SMART – nowość w ofercie

dr n. med. **Alicja Rusinek**  
bioMérieux Polska Sp. z o.o.  
Warszawa

Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* występują powszechnie u ludzi m.in. jako flora przewodu pokarmowego. Stanowią one również duży problem zdrowia publicznego, gdyż są przyczyną licznych zakażeń zarówno w lecznictwie zamkniętym jak i otwartym. Stosunkowo łatwe w diagnostyce, na przestrzeni lat rozwijały różne mechanizmy oporności na dostępne chemioterapeutyki, co mimo określenia czynnika etiologicznego, w znacznym stopniu utrudniało leczenie infekcji. W związku z tym ważnym elementem walki z zakażeniami wywołanymi przez wielolekooporne *Enterobacteriaceae* jest aktywny nadzór epidemiologiczny m.in. z badaniami nosicielstwa, które umożliwiają zatrzymanie rozprzestrzeniania się niebezpiecznych patogenów poprzez zastosowanie odpowiednich procedur, w tym izolację pacjentów - nosicieli.

W wielu krajach europejskich ostatnie lata upłynęły na tworzeniu i wdrażaniu specjalnych zaleceń i procedur związanych z pojawianiem się ognisk zakażeń wywołanych przez kolejne typy karbapenemaz KPC, NDM-1, OXA-48.... Dotyczyło to również Polski, gdzie powstały rekomendowane przez Ministra Zdrowia „Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku zachorowań sporadycznych i ognisk epidemicznych wywołanych przez Gram ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku identyfikacji w podmiotach wykonujących działalność leczniczą szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy typu KPC, MBL lub OXA-48)”. Oporność na antybiotyki determinowana produkcją karbapenemaz jest obecnie uznawana za jeden z kluczowych problemów zdrowia publicznego w medycynie zakażeń, ponieważ dla wielu pacjentów taka oporność wyklucza z zastosowania leki „ostatniej szansy”. Tym istotniejsze wydaje się podjęcie wszelkich działań, które uniemożliwią rozprzestrzenianie się bakterii wytwarzających karbapenemazy. Jednym z nich jest wprowadzenie badań przesiewowych u pacjentów z grup ryzyka i poszukiwanie potencjalnych nosicieli.

Nowe podłoże **chromID CARBA SMART**, wprowadzane przez bioMérieux w Polsce, ma na celu ułatwienie prowadzenia badań skriningowych w kierunku *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy. Na jednej płytce zawarte są dwa podłoża chromID CARBA i chromID OXA-48, co w sumie daje unikalne rozwiązanie o wysokiej czułości i specyficzności w wykrywaniu karbapenemaz z wszystkich grup wg Ambler A, B i D. Ponieważ obie składowe podłoża są agarami chromogennymi, zawierają po 3 substraty, dzięki którym możliwa jest również identyfikacja pałeczek jelitowych, które najczęściej wytwarzają karbapenemazy. *E.coli* oporna na karbapenemy rośnie

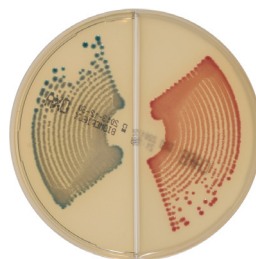
w postaci kolonii różowych do burgunda lub przezroczystych ale ze środkiem w kolorze różowym do burgunda. Kolonie bakterii z grupy KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) mają kolor niebieskawozielony do niebieskawoszarych lub są purpurowe. Posiewając materiał kliniczny kał lub wymaz z odbytu, po 18-24 godzinnej inkubacji uzyskuje się odpowiedź, czy pacjent jest potencjalnym nosicielem szczepu wytwarzającego karbapenemazy. Konieczne potwierdzenie mechanizmu oporności można wykonać wykorzystując nowy test produkcji bioMérieux – RAPIDEC CARBA NP, uzyskując ostateczny wynik po maksymalnie 2 godzinach.

Podłoże dwudzielne **chromID CARBA SMART** stanowi uzupełnienie oferty bioMérieux, w której już znajdują się agary chromID CARBA i chromID OXA-48 na odrębnych płytках. Użytkownik, w zależności od potrzeb i sytuacji epidemiologicznej placówki, może wybrać najbardziej korzystne dla siebie rozwiązanie. Jednakże zastosowanie podłoża dwudzielnych niesie wiele korzyści dla laboratorium. Zmniejsza się prawdopodobieństwo popełnienia błędu przy opisywaniu płytek i interpretacji wyniku podczas odczytywania. Łatwiej jest wyciągać wnioski i podejmować decyzję o dalszym postępowaniu przy równoczesnym odczycie dwóch podłoży na jednej płytce. Można uzyskać oszczędności wynikające z ograniczenia liczby stosowanych płytek, ich utylizacji, przechowywania itp.

Ponieważ **chromID CARBA SMART** jest jednym z elementów szerokiej oferty bioMérieux, firma dostarcza certyfikaty kompatybilności z innymi swoimi produktami, w których poświadczą możliwość wykonania innych testów diagnostycznych z zastosowaniem kolonii wyhodowanych na tym podłożu.

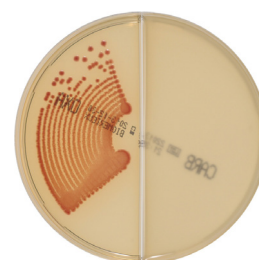
## chromID CARBA SMART

nr kat. 414685 – 20 płytek dwudzielnych



*E.coli* KPC i *K.pneumoniae* OXA-48

*E.coli* OXA-48



# Molekularna diagnostyka zakażeń wirusem cytomegalii

dr Maciej Przybylski  
dr hab. Tomasz Dzieciatkowski  
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM  
Warszawa

## Epidemiologia zakażeń wirusem cytomegalii

Wirus cytomegalii (CMV, określane także jako HHV-5 - *Human herpesvirus 5*), przedstawiciel podrodziny *Beta-herpesvirinae*, jest niezwykle szeroko rozpowszechniony w populacji na całym świecie. Zakażenia CMV są bardzo częste: na podstawie wyników badań seroepidemiologicznych szacuje się, że odsetek ludzi dorosłych posiadających przeciwciała w klasie IgG jako ślad po przebytych zakażeniach wynosi 80-100% w krajach rozwijających się, a w krajach rozwiniętych waha się w granicach 40-80%. Tak szerokie rozpowszechnienie wirusa w populacji spowodowane jest dwoma głównymi czynnikami: łatwym szerzeniem się zakażenia poprzez ślinę, mocz, nasienie i wydzielinę pochwy, gdzie wysokie miano wirusa może utrzymywać się tygodniami oraz tym, że ogromna większość pierwotnych zakażeń CMV przebiega bezobjawowo. Zakażenie pierwotne dotyczy przede wszystkim ludzi przed 16-20 rokiem życia, a czynniki sprzyjające to przełudnienie oraz złe warunki sanitarne. Oprócz naturalnych dróg szerzenia, do zakażenia może dojść także w wyniku przetoczeń krwi i preparatów krwiopochodnych oraz zabiegów przeszczepienia narządów unaczynionych lub komórek krwiotwórczych. Ponadto na uwagę zasługuje zjawisko, iż pierwotne zakażenie cytomegalowirusem, podobnie jak u pozostałych przedstawicieli *Herpesviridae*, zawsze przechodzi w zakażenie latentne, które utrzymuje się do końca życia. Możliwość przejścia zakażenia latentnego w zakażenie przetrwałe (persystentne), podczas którego dochodzi do stałej produkcji niewielkiej ilości wirionów potomnych bez towarzyszących objawów klinicznych, a także związane z tym utajone nosicielstwo, jest kolejną przyczyną skutecznego rozprzestrzeniania się CMV w populacji.

Do pierwotnego zakażenia cytomegalowirusem może dojść już w życiu płodowym, w wyniku jego przeniesienia z matki na płód, gdyż 50-70% kobiet w wieku rozrodczym jest latentnie zakażonych CMV. Z największym niebezpieczeństwem dla płodu wiąże się zakażenie pierwotne w okresie ciąży, bowiem obarczone jest ono ryzykiem wystąpienia u płodu małopłytkowości, zwapnień śródczaszkowych, zapalenia wątroby lub płuc oraz ciężkiej małopłytkowości. Do zakażenia płodu dochodzić może również u kobiet posiadających wysokie miano swoistych przeciwciał, co wynika prawdopodobnie z przenoszenia cząstek wirusowych wewnątrz leukocytów, które w pewnej mierze chronią wirusa przed działaniem immunoglobulin. W przypadku aktywnego zakażenia CMV u matki istnieje też wysokie ryzyko zakażenia



noworodka podczas akcji porodowej, ponieważ wydzielina dróg rodnych zawiera bardzo wysokie miano wirusa. W okresie postnatalnym noworodki narażone są na zakażenie za pośrednictwem siary lub mleka matki, gdyż przeciwciała w nich zawarte nie powodują skutecznej neutralizacji wirusa. Jak wspomniano, u niemowląt, starszych dzieci oraz dorosłych zakażenie pierwotne przybiera najczęściej formę bezobjawową. Objawy, o ile się pojawiają, przybierają formę zespołu znanego jako choroba cytomegalowirusowa lub „zespół podobny do mononukleozy” (klasyczna mononukleozą zakaźną wywołaną jest przez wirusa Epsteina-Barr; EBV). Typowe objawy choroby cytomegalowirusowej to gorączka, powiększenie śledziony, zaburzenia czynności wątroby oraz pojawienie się atypowych limfocytów we krwi, jednak nie obserwuje się charakterystycznego dla mononukleozy zakaźnej zapalenia gardła, a pojawiająca się niekiedy limfadenopatia ma raczej charakter uogólniony. Także zakażenia wynikające z reaktywacji wirusa endogennego przebiegają najczęściej w formie bezobjawowej, jednak w niewielkiej liczbie przypadków mogą manifestować się objawami o różnej postaci i nasileniu, z zasady bez poważnych skutków dla osób immunokompetentnych.

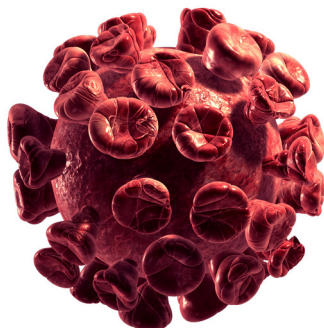
## Chorobotwórczość CMV w sytuacji niedoborów odporności

W odróżnieniu od ludzi z prawidłowymi funkcjami układu odpornościowego, pacjenci poddani immunosupresji związanej z transplantacją oraz osoby chore na AIDS stanowią grupę, w której zakażenia CMV przebiegają w formie ciężkiej, a nawet zagrażającej życiu.

W grupie osób poddanych immunosupresji związanej z transplantacją, co dotyczy zarówno biorców narządów unaczynionych, jak i komórek krwiotwórczych, najważniejszym bezpośrednim czynnikiem ryzyka wystąpienia objawowego zakażenia wirusem cytomegalii jest pojawienie się, nasilenie i czas trwania wirerii (antygenemii, DNAemii) CMV. Spośród szeregu zidentyfikowanych pośrednich czynników ryzyka, ważną rolę odgrywa wstępny status serologiczny dawcy i biorcy przeszczepu, określany w jednorazowym badaniu wykonanym przed zabiegiem przeszczepienia. Jeżeli dawca i biorca wykazują brak przeciwciał przeciw CMV, ryzyko infekcji objawowych jest znikome, jako związane głównie z możliwością zakażenia pierwotnego u poddanego immunosupresji biorcy w okresie potransplantacyjnym. Przeszczepienie wykonane od serododatniego dawcy do seronegatywnego lub serododatniego biorcy zazwyczaj pociąga za sobą znacznie większe ryzyko wystąpienia objawów klinicznych o podłożu CMV. W okresie potransplantacyjnym największe znaczenie ma wieloczynnikowa deregulacja układu odpornościowego związana z zabiegiem przeszczepienia. Pod tym względem na pierwszy plan wysuwa się rodzaj i intensywność leczenia immunosupresyjnego; z największym ryzykiem wiąże się stosowanie terapii niszczącej limfocyty T, a w szczególności azatiopiryny i cyklosporyny, czy też podawanie globuliny antytymocytarnej. Dodatkowe czynniki związane z kondycją immunologiczną, a przez to ze zwiększonym ryzykiem zakażenia objawowego CMV, obejmują wystąpienie choroby „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (GvHD, graft-versus-host disease), obniżoną liczbę komórek CD4+, niepełną zgodność antygenów HLA między dawcą a biorcą (HLA-AB, -DR1 lub -DR2), wykonanie zabiegu (bądź zabiegów) retransplantacji, dużą liczbę przetoczonych jednostek krwi, wiek pacjenta (podatność na atak wirusa wzrasta znacząco u osób powyżej 65 roku życia) oraz jego ogólny stan kliniczny. Przy stosowaniu profilaktyki przeciwwirusowej z użyciem gancyklowiru lub walgancyklowiru, ogólne ryzyko pojawienia się choroby cytomegalowirusowej, oceniane w ciągu pierwszych sześciu miesięcy po transplantacji, wynosi około 7-15%, przy czym obserwuje się tu znaczące różnice związane z występowaniem i nasileniem czynników ryzyka wymienionych powyżej.

W przypadku zakażeń cytomegalowirusowych w grupach ryzyka znaczenie mają także właściwości samego wirusa, bowiem jest to dodatkowy czynnik sprzyjający uszkodzeniu i odrzuceniu przeszczepionego narządu, jak też zwiększający ryzyko wystąpienia kolejnych zakażeń bakteryjnych i wirusowych.

Wśród biorców przeszczepów narządów unaczynionych oraz komórek krwiotwórczych, najczęściej występującą formą zakażenia objawowego jest ogólnoustrojowa choroba cytomegalowirusowa (syndrom CMV), której towarzyszy gorączka, uogólniona limfadenopatia,



brak łaknienia, bóle mięśni i stawów oraz leukopenia i małopłytkowość. Uznaje się, że w przebiegu tego schorzenia dochodzi do wystąpienia masywnej wirerii CMV, co przekłada się na zwiększone ryzyko zakażeń narządowych. Cytomegalowirus po transplantacji komórek krwiotwórczych atakuje wiele organów, co skutkować może śródmiąższowym zapaleniem płuc, zapaleniem mózgu (encephalitis), zapaleniem wątroby, reakcją mielosupresyjną, a także zapaleniem żołądka i jelit (gastroenteritis). Chorobie cytomegalowirusowej towarzyszy najczęściej rozwój GvHD, kontrolowany za pomocą terapii kortykosteroidowej. W późniejszym etapie obserwuje się rozwój gwałtownego zapalenia płuc, które doprowadza do występowania u pacjenta objawów hipoksji. U biorców narządów unaczynionych, zakażenie

CMV może ponadto prowadzić do odrzucenia przeszczepu, co dotyczy szczególnie biorców nerek. Określone genotypy CMV mają także zdolność do powodowania anemii aplastycznej.

Charakterystyczną postacią zakażenia CMV u osób współzakażonych HIV jest zapalenie siatkówki (*retinitis*), które praktycznie nie występuje w populacji o sprawnym układzie odpornościowym, a w grupie biorców przeszczepów jest zjawiskiem niezwykle rzadkim. Przy braku leczenia może ono prowadzić do poważnych zaburzeń i nieprawidłowości widzenia, a w konsekwencji do utraty wzroku. Profilaktyka polega głównie na monitorowaniu osób z HIV/AIDS w celu wykrycia wszelkich nieprawidłowości w strukturze i funkcjonowaniu narządu wzroku. Dodatkowo wykonuje się testy immunologiczne na obecność przeciwciał anti-CMV lub identyfikuje wirusa na podstawie molekularnej analizy próbek płynów ustrojowych. Dodatkowo cytomegalowirus u pacjentów z AIDS powodować może zapalenie błony śluzowej przełyku, nieżyt żołądka oraz zapalenie jelit. Manifestowane są one przez uciążliwe i przewlekłe bóle górnej części przewodu pokarmowego, którym dodatkowo towarzyszą wrzody, wykrywalne podczas przebiegu badania gastroscopowego lub radiograficznego. Diagnoza powinna być przeprowadzona na podstawie biopsji wycinków żołądka lub technik stosowanych dla identyfikacji zakażenia CMV w przebiegu zapalenia okrężnicy i błony śluzowej przełyku.

### Diagnostyka serologiczna zakażeń CMV

Do najpopularniejszych obecnie metod serologicznych zalicza się testy ELISA, umożliwiające określenie miana przeciwciał antywirusowych w klasach IgM i IgG. Do początkowego określenia statusu serologicznego dawców oraz biorców przeszczepów wykorzystuje się testy jakościowe wykrywające przeciwciała w klasie IgG. Ze względu na rozpowszechnienie CMV w populacji, badanie to ma nikłą wartość diagnostyczną w ocenie bieżącego zakażenia. W takiej sytuacji podstawowym badaniem serologicznym jest stwierdzenie obecności i poziomu przeciwciał klasy IgM, które choć są



wskaźnikiem świeżo przebytej infekcji wirusowej, to w badaniach biorców przeszczepów podlegają dwóm ograniczeniom: po pierwsze, nie umożliwiają odróżnienia zakażenia pierwotnego od reaktywacji ze stanu latencji, a po drugie, dynamika IgM często nie odzwierciedla przebiegu zakażenia (przeciwciała tej klasy mogą pojawiać się z dużym opóźnieniem oraz wykazywać wykrywalne miana długo po ustąpieniu zakażenia). Kliniką przydatność diagnostyki serologicznej CMV u biorców przeszczepów obniżyć może także niewydolność humoralnej odpowiedzi immunologicznej oraz obecność przeciwciał nabywanych wraz z przetaczaną krwią i produktami krwiopochodnymi.

### Bezpośrednie metody diagnostyczne

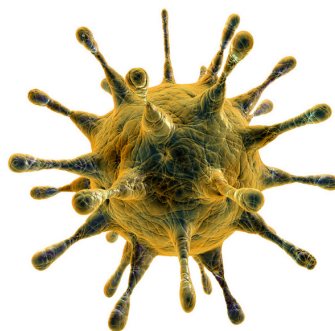
Ze względu na fakt, iż wirus cytomegalii stanowi potencjalnie niebezpieczny patogen dla osób z niedoborami immunologicznymi, konieczne stało się opracowanie szybkich i wiarygodnych technik diagnostycznych pozwalających wykryć patogen w badanym materiale biologicznym. W diagnostyce stosuje się izolację wirusa w hodowli komórkowej, wykrywanie antygenów CMV oraz wykrywanie kwasów nukleinowych w oparciu o techniki biologii molekularnej.

*Izolacja cytomegalowirusa w hodowli.* Klasyczną metodą wykrywania CMV jest izolacja wirusa w hodowlach komórkowych (najczęściej ludzkich fibroblastów; MRC-5 lub HEL). Wadą techniki jest długi okres oczekiwania na charakterystyczny efekt cytopatyczny, który pojawia się w hodowli komórkowej po upływie ok. 1-3 tygodni od momentu zakażenia. Co więcej, szybkość pojawienia się CPE zależy od liczby cząstek wirusa zakażającego hodowlę komórkową. Alternatywą dla powyższej metody jest technika „shell vial”, w której dzięki zastosowaniu etapu wirowania oraz znakowanych przeciwciał monoklonalnych można uzyskać wynik dodatni już po 16 godzinach inkubacji, co czyni tę technikę szybszą i bardziej czułą niż metoda klasycznej izolacji CMV. Wadami obu przytoczonych powyżej metod jest czas potrzebny na wykonanie badania, a także konieczność wykonania badania natychmiast po pobraniu materiału klinicznego, gdyż dłuższe przechowywanie izolowanych od pacjentów próbek wiąże się z inaktywacją zakaźnych wirionów, a w konsekwencji spadkiem czułości obu metod. Również uprzednio zastosowane leczenie farmakologiczne może fałszować wyniki.

*Oznaczenie antygenemii pp65.* Większą czułość i swoistość mają testy opierające się na wykrywaniu antygenów w komórkach wielojądrowych krwi obwodowej za pomocą wyznakowanych przeciwciał monoklonalnych rozpoznających wczesny antygen cytomegalowirusa - fosfoproteinę pp65 (produkt genu *UL83 CMV*). Mimo iż obecność pp65 w granulocytach nie jest skutkiem miejscowej replikacji CMV, lecz jego transferu z innych

komórek, ocena antygenemii jest stosowana z powodzeniem w diagnozowaniu zakażeń wirusem u biorców przeszczepów od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku. Technika ta nie wymaga skomplikowanej aparatury i pozwala uzyskać wyniki już po 5 godzinach od momentu rozpoczęcia wykonywania badania, a wyniki przedstawia się jako liczbę komórek zakażonych CMV w mililitrze krwi lub w stosunku do liczby komórek podanych ocenie. Do poważnych wad metody należy zaliczyć jej pracochłonność, subiektywność oceny wyników, konieczność natychmiastowego przygotowania próbki do badania, a także trudności w odczycie u pacjentów po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, wynikające ze zmniejszonej liczby granulocytów.

*Hybrydyzacja in-situ.* Ze względu na różnorodnie ograniczenia w badaniach serologicznych czy izolacji wirusa w hodowlach komórkowych, konieczne stało się opracowanie nowych technik diagnostycznych, które umożliwiają wykrywanie obecności CMV w organizmie pacjenta już na początkowych etapach zakażenia oraz pozwalają uzyskać jednoznaczny wynik. Technika hybrydyzacji in situ, w której wyznakowana sonda tworzy dwuniciową hybrydę z komplementarnym regionem genomu wirusa cytomegalii, pozwala na wykrycie poszukiwanej sekwencji wirusowego DNA, a także na określenie jej lokalizacji w badanej komórce. Hybrydyzacja in situ pozwala na wykrycie wirusa w niezmiennych morfologicznie komórkach oraz tam, gdzie zaszła niepełna replikacja genomu CMV. Modyfikacja tradycyjnej hybrydyzacji in situ, która podniosła czułość metody, polegała na wzmocnieniu sygnału sondy biotynylowaną tyraminą (ImmunoMax), co pozwoliło na wykrywanie w badanym materiale nawet pojedynczych zakażonych komórek. W zastosowaniu klinicznym hybrydyzacja in situ znajduje szczególną przydatność w badaniach histogenetycznych bioptatów pobranych z nerek, wątroby lub płuc przy podejrzeniu zakażeń narządowych wywołanych przez wirusa cytomegalii, jednak praktyczna możliwość wykonania takich badań jest ograniczona inwazyjnym charakterem pozyskania materiału oraz trudnością techniczną samej metody.



*Reakcja łańcuchowej polimeryzacji.* Na początku lat 90-tych XX wieku do diagnostyki zakażeń wirusem cytomegalii wprowadzono testy oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) lub też jej modyfikacji w postaci „zagnieżdżonej” PCR (ang. nested PCR, nPCR), w której namnażany jest krótszy fragment uprzednio powielonego odcinka. Technika nPCR jest obecnie stosunkowo rzadko wykorzystywana ze względu na zbyt duży odsetek wyników fałszywie dodatnich, natomiast klasyczna technika PCR – ze względu na niezadowalającą czułość, porównywalną z czułością oceny antygenemii pp65. Obie powyższe techniki nie umożliwiają także ilościowej oceny DNAemii CMV.

*PCR w czasie rzeczywistym.* Ze względu na dostępne opcje terapeutyczne zakażeń cytomegalowirusem niezbędne stało się określenie w sposób ilościowy poziomu wirerii. Pierwszymi testami, które pojawiły się pod koniec lat 90-tych, i umożliwiały podobne oznaczenia, były zestawy oparte na zasadzie PCR – hybrydacja – ELISA (PCR-ELHA), wkrótce wyparte przez metody PCR połączonej z jednoczesną analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR; qPCR). W metodzie tej wyznacznikiem ilości matrycowego DNA jest numer kolejnego cyklu, po którym kinetyka reakcji wchodzi w fazę logarytmicznego wzrostu ilości produktu. Jednym z pierwszych wariantów techniki real-time PCR była analiza przyrostu liczby amplikonów poprzez niespecyficzne znakowanie DNA fluorochromem SYBR Green I<sup>®</sup>, który emituje światło tylko w przypadku związania się z dwuniciowym DNA. Metoda powyższa jest prosta w zastosowaniu, lecz ze względu na brak swoistości wiązania fluorochrom-DNA, bardziej podatna na błędy. Z tego też powodu wymaga dodatkowego etapu analizy krzywej dysocjacji produktu (ang. melting curve analysis), w celu określenia specyficzności amplifikacji. Ze względu na wspomniany brak swoistej detekcji, technika nie może być też stosowana w komercyjnych testach diagnostycznych. Wariantem real-time PCR o podwyższonej swoistości jest reakcja z hydrolizującymi sondami typu TaqMan<sup>®</sup> lub SCORPIONS<sup>™</sup>, które na końcu 5' mają fluorescencyjny znacznik (R - reporter), a na końcu 3' wygaszacz (Q - quencher). Podczas wydłużania produktu reakcji sonda ulega degradacji przez zmodyfikowaną polimerazę Taq o własnościach 5'-egzonukleazy, w wyniku czego fluorochrom zostaje oddzielony od wygaszacza. Proces ten powoduje emisję fluorescencji, której natężenie mierzone jest po każdym cyklu reakcji. Odmienna metoda wykorzystująca specyficzne sondy oparta jest na dwóch krótkich sondach znakowanych fluorescencyjnie (ang. HybProbes<sup>®</sup>) i komplementarnych do amplifikowanej sekwencji. Pierwsza z sond znakowana jest na końcu 3' fluoresceiną (FITC), zaś druga na końcu 5' jednym z barwników z serii LightCycler Red. Sondy te są tak zaprojektowane, by podczas etapu wydłużania wiązały się z produktem PCR w niewielkiej odległości od siebie, dzięki czemu po wzbudzeniu FITC na końcu 3' pierwszej sondy energia fluorescencji jest przekazywana na fluorochrom końca 5' drugiej sondy. Zjawisko to, określane jako transfer energii fluorescencji (FRET), powoduje wzbudzenie barwnika LightCycler Red i emisję światła o innej długości fali, która następnie jest wykrywana przez detektor termocyklera. Sondy typu HybProbes<sup>®</sup> pozwalają na wyznaczenie krzywej topnienia amplifikowanego produktu i określenie jego temperatury topnienia, jednak ze względu na kłopotliwy proces optymalizacji warunków reakcji oraz ograniczenia patentowe są stosunkowo rzadko wykorzystywane w testach komercyjnych.

Technika real-time PCR odznacza się wyższą czułością niż tradycyjna reakcja łańcuchowej polimeryzacji;

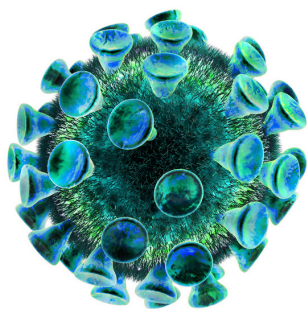
można ją także z powodzeniem stosować w przypadku dłużej przechowywanego materiału biologicznego. Dodatkowo na korzyść qPCR przemawia możliwość zautomatyzowania procedury i znacznego obniżenia kosztów analizy próbek. Należy jednak pamiętać, że zgodnie z załącznikiem II do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dn. 12.01.2011 (Dz.U. nr 16 poz. 75), wirus cytomegalii należy do patogenów z wykazu B, a więc wszystkie testy stosowane do diagnostyki zakażeń CMV u człowieka muszą posiadać znak CE/IVD. Obostrzenie to nie dotyczy oczywiście zestawów wykorzystywanych wyłącznie w celach naukowych.

### Zastosowanie kliniczne qPCR

Według zaleceń EBMT/ESH (European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation – European School of Haematology) z 2012 roku, u biorców komórek krwiotwórczych zaleca się monitorowanie DNAemii dwa razy w tygodniu, co najmniej do setnego dnia po zabiegu przeszczepienia; głównym celem jest tu wskazanie momentu rozpoczęcia przeciwwirusowej terapii wyprzedzającej. Dla biorców przeszczepów narządów unaczynionych nie ma w tym względzie ścisłych zaleceń, jednak proponowane jest podejście analogiczne, jak u biorców komórek krwiotwórczych, czyli monitorowanie DNAemii CMV we wczesnym okresie poprzyszczepowym, a zatem w czasie największego narażenia na objawowe zakażenie CMV.

Trzy podstawowe parametry, które ocenia się podczas monitorowania DNAemii CMV to liczba kopii DNA wirusa wykryta w pierwszej dodatniej pod tym względem próbce krwi (wyjściowy poziom DNAemii), maksymalna wykryta liczba kopii DNA CMV oraz ilościowy przyrost liczby kopii DNA CMV w konkretnym odstępie czasu (dynamika DNAemii). Wyniki wielu obserwacji dostarczyły dowodów na to, iż wszystkie te parametry są ważnym czynnikiem prognostycznym rozwoju choroby cytomegalowirusowej, wykazują silną korelację między sobą oraz dostarczają wartościowych informacji na temat klinicznej skuteczności leczenia przeciwwirusowego.

Ważnym zagadnieniem związanym z zastosowaniem ilościowego wariantu qPCR w diagnozowaniu zakażeń CMV u biorców przeszczepów jest określenie istotnej z klinicznego punktu widzenia liczby kopii DNA CMV, czyli wyznaczenie ilościowego punktu odcięcia, odróżniającego zakażenie o wysokim i niskim ryzyku rozwoju do postaci objawowej. O ile nie ulega wątpliwości sama korelacja między liczbą kopii wirusowego DNA (wyjściową i maksymalną) a ryzykiem rozwoju syndromu CMV lub zakażeń narządowych, o tyle nie udało się dotychczas jednoznacznie ustalić jaka wartość DNAemii może być uznana za bezpośrednie wskazanie do rozpoczęcia terapii przeciwwirusowej. Badania w tym kierunku prowadzone są od końca lat dziewięćdziesiątych; z początku



wysiłki badaczy skupiały się w większym stopniu na zakażeniach CMV u biorców narządów unaczynionych, podczas gdy od połowy pierwszej dekady nowego tysiąclecia zintensyfikowano także poszukiwania „terapeutycznego punktu odcięcia DNAemii CMV” u biorców komórek krwiotwórczych. Już w początkowym okresie badań (prowadzonych u biorców przeszczepów wątroby i nerek) stwierdzono, że ryzyko wystąpienia choroby cytomegalowirusowej u pacjentów, we krwi których nie wykrywa się DNA CMV jest kilkakrotnie niższe niż u pacjentów z epizodami niskokopijnej DNAemii (<3000 kopii/ml) i kilkadziesiąt razy niższe niż u biorców, u których obserwuje się dużą liczbę kopii DNA CMV (>3000 kopii/ml). Ta niemalże liniowa zależność została następnie potwierdzona w szeregu kolejnych badań, co stanowiło podstawę wprowadzenia przeciwwirusowej terapii wyprzedzającej u pacjentów z DNAemią CMV jako alternatywy dla profilaktyki z użyciem gancyklowiru, stosowanej u wszystkich biorców w okresie najwyższego narażenia na objawowe zakażenie CMV. Jednak przeprowadzone u biorców przeszczepów próby określenia liczby kopii CMV DNA/ml krwi (osocza, surowicy), która stanowi jednoznaczne wskazanie do rozpoczęcia terapii przeciwwirusowej dały bardzo rozbieżne wyniki. W zależności od użytej metodyki qPCR oraz grupy badanej (biocy narządów, biocy szpiku kostnego) proponowane wartości odcięcia zawierają się w granicach od 100 do 500 000 kopii DNA CMV w mililitrze krwi, przy czym większość badaczy proponuje wartości w zakresie od 3000 do 10 000 kopii/ml. Do najważniejszych postulowanych przyczyn takiej rozbieżności wyników należą:

- wykorzystanie różnej metodologii qPCR użytej do wykrywania CMV DNA
- różnice immunologiczne w zależności od statusu serologicznego biorcy i dawcy przeszczepu
- różnice pomiędzy grupami biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych i narządów unaczynionych

W grupie biorców przeszczepów określono także, że ryzyko wystąpienia objawów jest tym większe, im szybszy i bardziej gwałtowny jest wzrost liczby kopii DNA wirusa. Dotychczas nie dysponujemy niestety wynikami spójnych badań, które precyzyjnie określałyby, jak dynamika replikacji CMV *in vivo* przekłada się na zmiany ilościowe DNAemii w korelacji z ryzykiem objawowego zakażenia CMV. Poczynione obserwacje sugerują, że wartość prognostyczną ma gwałtowny wzrost liczby kopii wirusa w mililitrze, przewyższający 1 logarytm dziesiętny/dzień.

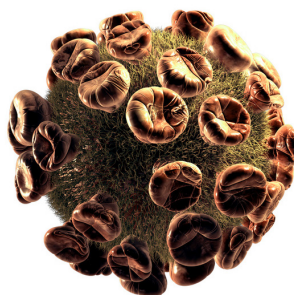
Z punktu widzenia patogenezy zakażeń CMV, rezerwuarem latentnego wirusa są limfocyty, monocyty, makrofagi oraz komórki śródbłonna. Podczas skutecznej reaktywacji wirusa mają miejsce dwa zjawiska o zasadniczym znaczeniu z punktu widzenia możliwości wykrycia DNA wirusa we krwi: po pierwsze, dochodzi do proliferacji

komórek zakażonych CMV, co prowadzi m.in. do zwiększenia ich liczby we krwi obwodowej, a po drugie, wirus zaczyna się w nich aktywnie replikować, czego skutkiem jest zakażenie kolejnych komórek oraz pojawienie się wolnych (tj. pozakomórkowych) wirionów we krwi. Zatem w przypadku zakażenia latentnego kontrolowanego skutecznie przez układ immunologiczny, wykrycie DNA CMV w bezkomórkowej frakcji krwi (osocze, surowica) jest bardzo mało prawdopodobne, natomiast we krwi pełnej, a zwłaszcza w warstwie leukocytarnej, występuje niewielka liczba komórek zawierających latentnego wirusa, co teoretycznie może prowadzić do wykrycia DNA CMV w tych materiałach mimo braku aktywnego zakażenia. W początkowych etapach reaktywacji CMV, we krwi obwodowej zwiększa się liczba komórek zawierających wirusa, a następnie zaczyna rosnąć liczba wirionów uwalnianych z aktywnie zakażonych komórek, przy czym głównym źródłem wirionów są wtedy pierwotne i wtórne ogniska replikacji wirusa w tkankach, a w mniejszym stopniu – zakażone komórki krwi obwodowej.

Jako że w diagnostyce zakażeń CMV wykorzystywane są różne frakcje krwi, w tym krew pełna, osocze, surowica oraz warstwa leukocytna, na przestrzeni ostatnich lat przeprowadzono szereg badań mających odpowiedzieć

na pytanie, który z tych materiałów jest optymalny do wykonywania rutynowych oznaczeń ilościowych DNA CMV. Uzyskane wyniki pozostają w pełnej zgodzie z przedstawionym powyżej modelem latencji i reaktywacji cytomegalowirusa. Wykrywając DNA CMV w warstwie leukocytarnej oraz krwi pełnej (w odniesieniu do osocza i surowicy) uzyskuje się większą czułość oznaczeń oraz możliwość wykrycia mniejszej liczby kopii DNA CMV, a w konsekwencji – wcześniejszego

wykrycia wirusa ulegającego reaktywacji. W praktyce przekłada się to na pewną liczbę badań (na poziomie kilkunastu procent), w których użycie surowicy lub osocza daje wynik ujemny, a użycie frakcji krwi zawierającej komórki – wynik dodatni, najczęściej niskokopijny. W związku z tym, część ekspertów zaleca stosowanie krwi pełnej, szczególnie że w porównaniu z warstwą leukocytarną krwi jest to materiał mało kłopotliwy w pozyskaniu. Z drugiej strony, uzyskane w ten sposób wyniki dodatnie, zwłaszcza o niskiej liczbie kopii CMV DNA, pozostają w niskiej korelacji z ryzykiem rozwoju choroby cytomegalowirusowej (w wyniku wykrywania DNA nieaktywnych form wirusa). Ponadto u części pacjentów dochodzi do przejściowych reaktywacji CMV, które mają tendencję do samoistnego wygaszenia, a w przypadku dodatniego wyniku badania mogą być traktowane jako wskazanie do niepotrzebnego leczenia przeciwwirusowego. Z tego też powodu, w kontekście aktywnej replikacji CMV, użycie surowicy lub osocza daje bardziej miarodajne wyniki, co zostało potwierdzone szeregiem badań porównujących ryzyko rozwoju choroby cytomegalowirusowej w zależności od frakcji krwi użytej do badania DNAemii CMV.



## Standaryzacja wyników

Wysoka czułość i swoistość PCR w czasie rzeczywistym, stosowanej do wykrywania DNA wirusa cytomegalii w materiałach klinicznych oraz możliwość dokładnego określenia liczby kopii wirusa w badanej próbce sprawiły, iż technika ta jest obecnie uznawana za standard w diagnostyce zakażeń CMV. W ostatnich latach opracowano szereg metod komercyjnych wykorzystujących technikę qPCR do wykrywania DNAemii CMV, a niektóre laboratoria stosują metody opracowane i walidowane samodzielnie. Jak wspomniano, technika qPCR wykorzystująca komplementarne sondy, niejako z natury posiada zaletę zadowalającej czułości i swoistości, jednak w zastosowaniu diagnostycznym powinna wykazywać dodatkowe atrybuty, takie jak zdolność do prawidłowego wykrycia i określenia zarówno bardzo niskiej, jak i bardzo wysokiej liczby kopii DNA CMV, utrzymanie prawidłowej liniowości w maksymalnie szerokim zakresie oznaczeń, możliwość wykonywania oznaczeń w różnych materiałach klinicznych oraz, co bardzo ważne, powinna prezentować uzyskane wyniki w ogólnie akceptowanych i porównywalnych jednostkach. Ta ostatnia cecha ma podstawowe znaczenie dla możliwości porównania wyników uzyskiwanych przez różne laboratoria, jak również w przypadku zmiany metodologii wykrywania DNAemii CMV w konkretnym laboratorium. Obecnie większość metod wykorzystuje zestawy kalibratorów obejmujące swym zakresem różne granice oznaczalności, a wyniki wyrażane są często w „lokalnym” układzie jednostek. I tak, ilość DNA CMV w dostępnych testach może zostać wyrażona jako liczba kopii DNA, liczba ekwiwalentów genomu lub liczba jednostek arbitralnych w mililitrze próbki klinicznej, bądź też w mikrolitrze lub w całości objętości mieszaniny reakcyjnej. Dodatkowo, stosowane kalibratory zawierają różne ilości wzorcowego ampikonu w formie plazmidu, liniowego fragmentu DNA lub nawet (co nie jest zalecane) całogenomowego DNA CMV. Innymi czynnikami o udowodnionym wpływie na uzyskane wyniki ilościowego określenia DNA CMV są:

- różny rodzaj materiału klinicznego poddanego ocenie: termin „liczba kopii DNA CMV we krwi” może reprezentować użycie krwi pełnej, osocza lub surowicy; oznaczeń dokonuje się niekiedy w warstwie leukocytarnej lub limfocytach izolowanych z krwi obwodowej,
- różna objętość materiału użytego do izolacji DNA oraz różna objętość matrycy użytej w reakcji,
- zróżnicowanie metod izolacji i oczyszczania DNA (stosowane są metody automatyczne, półautomatyczne i manualne),
- rozmaite systemy sond i znaczników fluorochromowych,
- różnice w wyborze regionu genomu CMV, który podlega powieleniu oraz wynikające stąd różnice w kinetyce reakcji, i wreszcie,
- różne platformy używane do amplifikacji i detekcji produktu qPCR.

Z przeprowadzonych dotychczas porównań międzylaboratoryjnych wiadomo, że kumulacja powyższych czynników w skrajnych warunkach skutkuje różnicą na

poziomie wartości 4,3 logarytmu dziesiętnego, co oznacza że w tej samej próbce krwi, badanej w dwóch laboratoriach, wykryto 100 i 2 000 000 kopii DNA CMV/ml. Jest to oczywiście ekstremalny przykład, jednak wyniki badań biegłości laboratoryjnej w oznaczaniu ilościowym DNA CMV prowadzone w Europie i USA wykazują, że rozbieżność wyników na poziomie 2-3 wartości logarytmu dziesiętnego nie jest zjawiskiem rzadkim.

W listopadzie 2010 WHO rozpoczęło dystrybucję pierwszego międzynarodowego wzorca CMV (NIBSC 09/162) przeznaczonego do standaryzacji oznaczeń ilościowych z użyciem NAT (nucleic acids amplification techniques). Wzorec ten ma status referencyjnego materiału odniesienia i zawiera całe wiriony cytomegalowirusa (szczep Merlin,  $5 \times 10^6$  wirionów/ml). Zaleca się, aby standard został docelowo rozcieńczony w tym rodzaju materiału klinicznego, w którym laboratorium rutynowo określa DNAemię wirusa. W założeniu wzorec ma służyć do ujednoczenia wyników oznaczeń DNA CMV z uwzględnieniem całego procesu izolacji, amplifikacji i detekcji przy użyciu metodyki identycznej z używaną w konkretnym laboratorium do badania próbek klinicznych. Wydaje się, że wprowadzenie międzynarodowego standardu WHO umożliwi nadanie odpowiedniego trendu w standaryzacji wyników, a docelowo pomoże w osiągnięciu odpowiedniej zgodności oznaczeń ilościowych DNAemii CMV uzyskiwanych w różnych laboratoriach.

*Piśmiennictwo dostępne na życzenie u autorów.*



## Nowe informacje na stronie internetowej

Na stronie internetowej [www.biomerieux.pl](http://www.biomerieux.pl) pojawiło się kilka nowych informacji. Do naszej oferty wprowadzony został nowy produkt – system do monitorowania środowiska Labguard 3D. Labguard 3D to produkt najnowszej generacji, zaprojektowany specjalnie z myślą o laboratoriach, aby ułatwić proces kontroli warunków w jakich przechowywane są odczynniki oraz materiały biologiczne. Bogata oferta sond pomiarowych oraz elastyczność oprogramowania sprawia, że system Labguard 3D znajduje zastosowanie nie tylko w wielu gałęziach przemysłu (przemysłe spożywcze, farmaceutyczny, kosmetyczny), ale również w laboratoriach klinicznych czy weterynaryjnych. System znajduje zastosowanie wszędzie tam, gdzie potrzebna jest kontrola parametrów fizycznych. Labguard® 3D to system, który zapewnia automatyczne pomiary, monitorowanie, zapisywanie danych oraz alarmowanie w czasie rzeczywistym o wystąpieniu niepożądanych wartości parametrów fizycznych m.in.: temperatury, ciśnienia, wilgotności względnej, stężenia CO<sub>2</sub>. Dzięki temu obowiązek systematycznego spisywania temperatur z urządzeń laboratoryjnych może zostać wyeliminowany z codziennego grafiku, a dzięki temu zyskają Państwo czas, który będzie można wykorzystać na inne zadania i obowiązki.

Kolejny nowy produkt w ofercie bioMérieux to RAPIDEC® CARBA NP. Jest to test, który wykrywa oporność na karbapenemy. Test RAPIDEC® CARBA NP zapewnia wysoką użyteczność kliniczną dzięki szybkim wynikom w przedziale 30 min – 2 godzin, rozwiązaniem typu wszystko w jednym opakowaniu, przy zachowaniu racjonalnych kosztów metody. Zasadą działania testu RAPIDEC® CARBA NP jest bezpośrednie wykrywanie hydrolizy cząsteczki karbapenemu przez bakterie produkujące karbapenemazy. Dzięki temu możliwe jest rozróżnienie pomiędzy opornością na karbapenemy związaną z przeniesieniem źródła zakażeń od takiej, która nie wymaga izolacji pacjentów. Wysoka specyficzność (97.8%\*) i czułość testu (97.8%\*) pozwala na właściwy nadzór nad pacjentem oraz lepszą kontrolę zakażeń związanych z opieką zdrowotną (HAI). Test RAPIDEC® CARBA NP jest szybki i wiarygodny. Może być wykorzystany zarówno w badaniach przesiewowych jak i w celu potwierdzenia diagnozy oraz ukierunkowania leczenia pacjenta.

Kolejna nowość w ofercie firmy bioMérieux to nowy, szybki test immunochromatograficzny bioNexia® Legionella. Jest to szybki test do jakościowego wykrywania antygenu *Legionella pneumophila* serogrupy 1 z próbki moczu. Test bioNexia® Legionella jest dedykowany pacjentom z objawami zapalenia płuc. Procedura wykonania testu jest jednoetapowa z użyciem 3 kropli moczu. Wynik testu jest dostępny w czasie 15 min. Test bioNexia® Legionella charakteryzuje doskonała czułość i specyficzność.

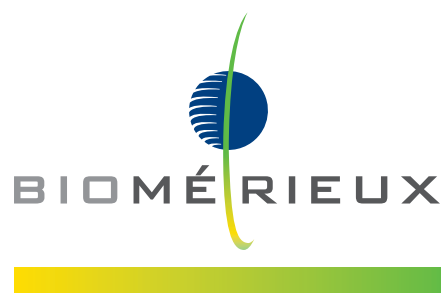
**mgr Marta Warowny-Krawczykowska**  
bioMérieux Polska Sp. z o.o.  
Warszawa

W centrum uwagi znajduje się informacja o Klubie Rzadkich Organizmów. Przypominamy, że od roku funkcjonuje baza, która została stworzona w celu śledzenia wykrywania nietypowych i rzadkich drobnoustrojów w butelkach BacT/ALERT. W bazie Klubu Rzadkich Organizmów dostępne są informacje o rodzajach podłoża oraz czasach detekcji charakterystycznych dla tych izolatów klinicznych. Baza Klubu Rzadkich Organizmów umożliwia uzyskanie pewności, że konkretny mikroorganizm został wyizolowany z próbki badanej przy użyciu podłoża BacT/ALERT. Dostępne są dane dotyczące czasu detekcji pochodzące z wielu ośrodków i wielu izolatów. Informacje o izolacji rzadkich mikroorganizmów trafiają do bioMérieux od tych z Państwa, którzy są użytkownikami systemu BacT/ALERT. Zgłoszenia są całkowicie dobrowolne. Jeżeli złożą Państwo dokumentację o wykryciu rzadkiego mikroorganizmu, zostanie on wprowadzony do naszej bazy danych. Następnie państwa laboratorium otrzyma certyfikat Klubu Rzadkich Organizmów wraz z aktualnym wykazem rzadkich organizmów oraz materiały szkoleniowe bioMérieux. Aby zgłosić mikroorganizm, uzyskać certyfikat oraz listę Klubu Rzadkich Organizmów należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem handlowym i poprosić o formularz zgłoszeniowy lub pobrać go ze strony [www.biomerieux.pl](http://www.biomerieux.pl). Następnie wypełniony formularz należy wysłać pocztą lub e-mailem na wskazany adres. Szczegółowe informacje wraz z formularzem dostępne są w „CENTRUM UWAGI”.

Na stronie głównej w zakładce „Z ostatniej chwili” dostępny jest plan szkoleń edukacyjnych na rok 2015. W ofercie szkoleń znajdują Państwo poniższe tematy:

- System API – złoty standard w identyfikacji drobnoustrojów.
- Pożywki mikrobiologiczne i szczepy wzorcowe drobnoustrojów w laboratorium mikrobiologicznym w świetle najnowszych wymagań.
- Przygotowanie próbek do badań.
- Drobnoustroje zanieczyszczające środowisko produkcji i ich monitoring.
- System oceny jakości higienicznej mleka surowego w Polsce.
- Zagrożenia mikrobiologiczne w produkcji mleka i przetworów mlecznych.

Przypominamy również o funkcjonowaniu serwisu [www.mybiomerieux.com](http://www.mybiomerieux.com). Za jego pośrednictwem mogą Państwo korzystać z dokumentacji biblioteki technicznej: ulotek technicznych, instrukcji i certyfikatów. Od początku roku 2014 bezpośrednio w Bibliotece Technicznej bioMérieux dostępna jest również dokumentacja techniczna produktów AES CHEMUNEX.



[www.biomerieux.pl](http://www.biomerieux.pl)