

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**katedra biologických a lékařských věd**

**Laboratorní příručka a standardní operační postupy pro**  
**serologický úsek OKBH, Panochovy nemocnice s.r.o,**  
**Turnov**  
(bakalářská práce)

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práci jsem nepoužila k získání jiného titulu.

datum

podpis

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se týká pomoci při přípravě Laboratorní příručky pro sérologický úsek Oddělení klinické biochemie a hematologie, Panochovy nemocnice, s.r.o., Turnov a další dokumentace nutné k akreditaci laboratoře.

Zpracování příručky a dokumentů probíhá ve specializovaném programu SLP (Správná laboratorní práce). Tato práce se spíše zabývá standardními operačními postupy, validací a verifikačními protokoly pro nejfrekventovanější metody v laboratoři.

V této práci uvádím pouze ukázkou těchto dokumentů vzhledem k velkému množství metod a obsáhlému textu.

Teoretická část pojednává o obecných věcech týkajících se laboratoře, validace, akreditace, systému SLP a standardních operačních postupů.

Praktická část je zaměřena na praktické věci týkající se přípravy laboratorní příručky. Na ukázkou zde uvádím postup zpracování verifikace a její příklady pro biochemickou i imunochemickou analýzu.

## **Abstract**

This bachelor thesis relates to an assistance in the preparation of laboratory manuals for the serology section of the Department of Clinical Biochemistry and Hematology, Panocha's hospital, s.r.o. Turnov and other documentation necessary for the accreditation of the laboratory.

Development of manuals and documents takes place in a specialized program, GLP (Good Laboratory Practice). This work deals with the standard operating procedures, validation and verification protocols for the most frequently used methods in the laboratory.

I only show a few of these documents due to the large amount of methods and comprehensive text in them.

The theoretical part deals with general matters relating to the laboratory, validation, accreditation, GLP system and standard operating procedures.

The practical part is focused on practical matters relating to the preparation of laboratory manuals. The progress of verification and the examples of biochemical and immunochemical analysis are also mentioned there.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu primáři RNDr. Petru Brzákovi za jeho ochotu, pomoc a rady při vypracování. Dále bych chtěla poděkovat celému oddělení Klinické biochemie a hematologie Panochovy nemocnice, s.r.o., Turnov za jejich trpělivost, pomoc a spolupráci. Děkuji i paní Janě Sedlákové za seznámení s programem SLP. Mé díky také patří garantovi bakalářské práce panu PharmDr. Petru Jílkovi CSc.

# Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
1 Zadání - cíl práce .....	7
2 Úvod.....	8
3 Zkratky .....	9
4 Teoretická část.....	10
4.1 Laboratorní příručka.....	10
4.2 Systém SLP .....	10
4.3 Laboratoř.....	11
4.4 Akreditace laboratoře .....	12
4.5 Validace a verifikace .....	12
4.6 Beckman Coulter .....	13
4.6.1 Přístroj Beckman Coulter Dxl800 a DxC880 .....	13
4.6.2 Standardní operační postup pro analýzu draslíku .....	14
4.7 Abbott.....	17
4.7.1 Analyzátor Abbott Architect i1000SR.....	17
4.7.2 Standardní operační postup pro stanovení protilátek proti <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
5 Praktická část.....	24
5.1 Verifikace pro stanovení draslíku .....	24
5.1.1 Verifikace.....	24
5.1.2 Pracovní postup verifikace .....	24
5.1.3 Verifikační protokol pro stanovení draslíku .....	26
5.2 Verifikace pro stanovení protilátek proti <i>Toxoplasma gondii</i> .....	28
5.2.1 Verifikace.....	28
5.2.2 Pracovní postup.....	28
5.2.3 Verifikační protokol pro stanovení Toxo IgG.....	28
6 Diskuze .....	30
7 Závěr.....	31
8 Přílohy.....	32
9 Zdroje.....	33

# **1 Zadání - cíl práce**

Cílem práce bylo pro účel akreditace laboratoře Oddělení klinické biochemie a hematologie Panochovy nemocnice, s.r.o., Turnov pomoci s přípravou laboratorní příručky, vypracovat standardní operační postupy pro nejfrekventovanější metody v biochemické laboratoři a k nim náležící verifikační protokoly, díky kterým se zjistila validita metody.

## 2 Úvod

V dnešní době je nezbytné, aby každá laboratoř měla vypracovanou vlastní laboratorní příručku. Laboratoře jsou kontrolovány nadřízenými orgány, které dohlíží na to, aby vydávaly pravdivé výsledky. Proto je nutné, aby laboratoř měla v pořádku řízenou dokumentaci (např. standardní operační postupy) a správně validované či verifikované metody.

Zpracování řízené dokumentace a příprava laboratorní příručky probíhá ve specializovaném programu SLP (Správná laboratorní práce).

Pro akreditaci laboratoře je nutné mít vypracovanou laboratorní příručku, standardní operační postupy a verifikační protokoly pro 20% nejfrekventovanějších metod prováděných v laboratoři.



### 3 Zkratky

APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
b	bias
CAL	kalibrátor
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročá- sticích
CV	variační koeficient
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GTT	glukózo-toleranční test
*i	imunoanalýza
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IU	international unit (mezinárodní jednotka)
ISE	iontově selektivní elektrody
K <sup>+</sup>	draselný kation
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
OKBH	Oddělení klinické biochemie a hematologie
PT	protrombinový test
R (x)	výtěžnost
RLU	relativní světelné jednotky
SD	směrodatná odchylka
SLP	Správná laboratorní práce
SOP	standardní operační postup
tab.	tabulka
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan v HCl
u <sub>r,tot</sub>	kombinovaná nejistota

## 4 Teoretická část

### 4.1 Laboratorní příručka

„Laboratorní příručka reprezentuje laboratoř, přináší základní informace o jejích nabídkách, podmínkách a o nabízené paletě laboratorních testů. Může být připravována v papírové i hypertextové podobě.“ (web 1)

OKBH Panochovy nemocnice, s.r.o. Turnov připravuje laboratorní příručku v systému SLP (Správná laboratorní práce).

### 4.2 Systém SLP

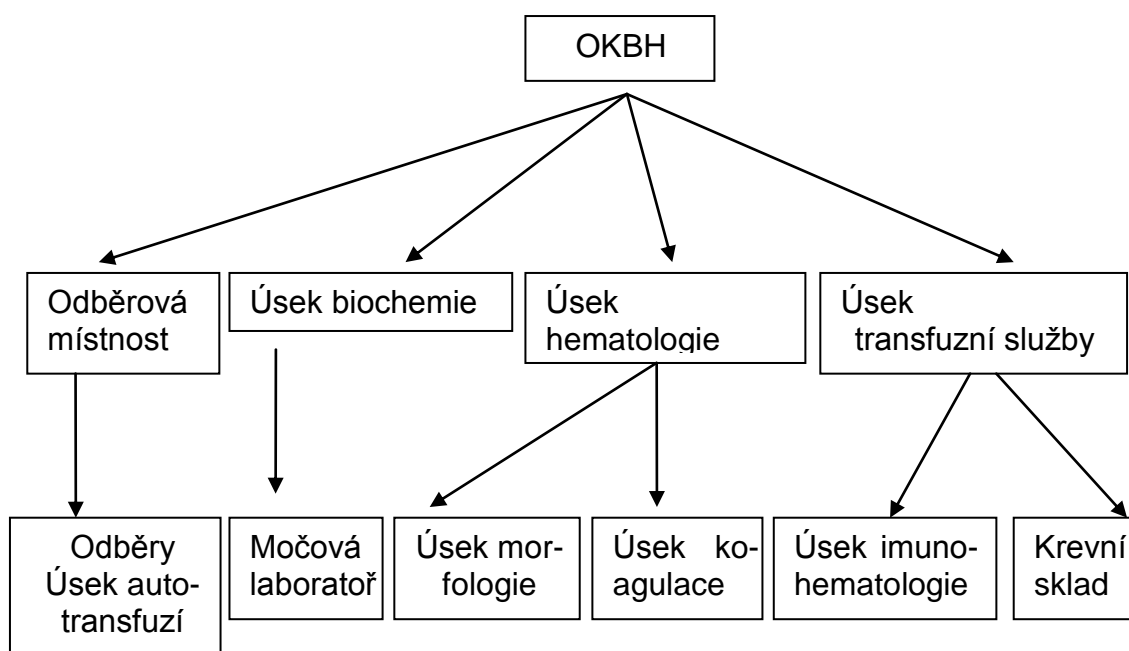
- SLP je informační systém používaný klinickými laboratořemi, klinickými obory s laboratorní složkou a pro podporu informačních systémů spolupracujících s laboratořemi.
- SLP představuje koncepci moderní klinické laboratoře, která musí splnit akreditaci, přesně definovat podmínky své činnosti a rovněž obhájit výsledky a způsob své práce před auditorem, pacientem či jeho právníkem.
- SLP umožňuje definovat pravidla a vzájemné vztahy mezi subjekty spolupracujícími s laboratořemi, ať se jedná o lékaře a sestry, jiné laboratoře či samotné pacienty.
- V SLP najdeme vše, co je nutné pro zásady správné laboratorní práce pro každodenní provoz laboratoře po stránce technické, analytické, organizačně provozní, personální i infromatické. (web 2)

V systému SLP pracujeme s Národním či lokálním číselníkem laboratorních položek, s dokumenty jako jsou například příručka jakosti, standardní operační postupy, směrnice, vyhlášky, atd. Jedná se o systémový přístup k datům v klinických laboratorních oborech. V SLP je možno průběžně doplňovat data provázané vnitřními vazbami.

Autorský kolektiv několika odborných společností České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně vytváří datovou základnu, další potřebná data si doplní sám uživatel. (web 2)

### 4.3 Laboratoř

Laboratoř Oddělení klinické biochemie a hematologie (OKBH), Panochovy nemocnice, s.r.o., Turnov se skládá ze čtyř úseků – odběrové místnosti, úseku biochemie, úseku hematologie a úseku transfuzní služby. Biochemie se skládá z částí biochemie, imunochemie a močová laboratoř. Hematologie z úseku morfologie a koagulace. Transfuzní služba z částí imunohematologické a krevního skladu.



OKBH se zabývá biochemickým, sérologickým a hematologickým vyšetřením humánních materiálů (krev, moč, mozkomíšní mok, další tělesné tekutiny a biologické materiály). Jde především o základní ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , ureu, kreatinin, atd.) a specializovaná biochemická vyšetření (stanovení nádorových markerů, protilátek, kostních markerů, složek humorální imunity, proteinových frakcí a dalších vyšetření v různých biologických materiálech, funkční testy – GTT), základní (krevní obraz, APTT, PT, atd.) a specializovaná hematologická vyšetření (D-dimery), základní imunohematologická vyšetření, distribuce transfuzních přípravků, odběry a výroba autotransfuzí, zajištění odběrů biologického materiálu a konzultační služby. (Drobníková, 2011).

Za normálního stavu v laboratoři pracuje primář, vedoucí laborantka, 9 specializovaných laborantek a 1 odběrová sestra.

## 4.4 Akreditace laboratoře

Akreditace je úředně potvrzené uznání způsobilosti laboratoře vykonávat určitou činnost. Akreditace provádí akreditační orgán, v České republice jsou to orgány dva – Český institut pro akreditaci (ČIA) a Národní akreditační středisko pro klinické laboratoře (NASKL). (Racek, 2006)

## 4.5 Validace a verifikace

### Validace

Validace slouží k získání objektivních důkazů o tom, že metoda, postup nebo přístroj vykazují vlastnosti, které jsou po něm požadovány. Různé metody vyžadují různý rozsah validace, proto je nutné nejprve vypracovat validační plán. Podle validačního plánu vyhledáme a zpracujeme příslušné externí údaje, ke kterým přidáme vlastní výsledky experimentů a vypracujeme validační protokol, který se stane součástí standardních operačních postupů (SOP). SOP vypracovává laboratoř pro každou metodu i přístroj. Validace metod a přístrojů pro klinickou praxi je vyžadována zákonem. Přestože výrobce garantuje validitu, je nutné výrobek před uvedením do provozu verifikovat, aby se ověřilo, že údaje výrobce platí v podmínkách dané laboratoře. (Racek, 2006)

### Validační parametry

- Přesnost – schopnost změřit totožnou hodnotu u jednoho vzorku během opakovaných měření
- pravdivost (bias) – odchylka nalezené střední hodnoty dané veličiny od hodnoty změřené referenční metodou
- mez detekce – nejnižší koncentrace analytu, která je stanovena s dostatečnou jistotou
- linearita – rozsah, ve kterém je metoda aplikovatelná bez modifikací
- kriteria vnitřní kontroly kvality
- mez stanovitelnosti – nejmenší množství látky, které jsme schopni stanovit
- selektivita
- specifičnost – schopnost stanovovat pouze tu veličinu, která má být stanovována

- citlivost – schopnost vyvolat změnu signálu vztaženou ke změně množství
- návaznost a nejistota (Novák, 2002; web 3)

### Verifikace

Verifikace neboli ověřování schopností poskytnout objektivní důkaz, že určitá položka splňuje dané požadavky. (Pecka a kolektiv, 2010)

K verifikaci je nutné vybrat vhodný referenční materiál, nejlépe s udanou nejistotou. Referenční hodnota, která může být hodnotou získanou referenční metodou, hodnotou získanou skupinou expertních laboratoří či hodnotou průměru laboratoří účastnících se kontroly, musí být uvedena ve validačním protokolu. Měření se provádí nejméně na dvou hladinách, pokud možno klinicky či laboratorně významných a reprezentujících celý rozsah měření (např. fyziologická a patologická hladina). (web 4)

## **4.6 Beckman Coulter**

### **4.6.1 Přístroj Beckman Coulter Dxl800 a DxC880**

#### Biochemické analyzátory řady UniCel® DxC

Jde o plně automatické biochemické analyzátory pro in vitro analýzu širokého spektra rutinních metod, drog, léků a dalších analytů. Jako analyzovaný materiál se používá plná krev, sérum, plazma, moč či likvor v závislosti na dané metodě. Tyto analyzátory lze použít při konsolidaci pracovních stanic a analyzátorů využívající maximální efektivitu práce v laboratoři. Systém je jednoduchý na obsluhu, je vybaven čtečkou čárových kódů a výhodou může být i kontinuální vkládání vzorků a reagensů za provozu či snadná komunikace s laboratorním informačním systémem. (web 5)

#### UniCel Dxl 800

Unicel Dxl® 800 je automatický uzavřený systém využíváný k provádění imunoanalytických stanovení tumorových markerů, srdečních markerů, hepatálních markerů, infekčních onemocnění, parametrů štítné žlázy a dalších. Principem tohoto imunochemického systému je luminiscenční detekce, používající

alkalické fosfatázy jako markeru a paramagnetické částice jako nosiče protilátek (resp. antigenu). Výhodou tohoto systému je dobrá přesnost a reprodukovatelnost výsledků, vysoká citlivost při širokém koncentračním rozmezí a možnost propojení s biochemickými analyzátory Synchron LX® 20 a UniCel® Dx.C. (web 6)

#### **4.6.2 Standardní operační postup pro analýzu draslíku**

Beckman Coulter Draslík (zdroj Beckman Coulter, 2005)

##### Využití

Měření koncentrace draslíku slouží k diagnostice a léčbě hyperkalémie (renální insuficience, nedostatek mineralokortikoidů, šok, acidóza) a hypokalémie (průjmy, diuretika, hyperaldosteronismus, diabetická ketoacidóza), při selhání ledvin, poruch acidobazické rovnováhy, srdeční arytmie či chronického srdečního selhání. (Kessler, 1993; Masopust, 1998)

##### Princip

Koncentrace draselných iontů se stanovuje nepřímou potenciometrií, která používá draselnou elektrodu jako iontově selektivní a sodíkovou jako referenční. Přesný objem vzorku (40 µl) se smíchá s tlumivým roztokem, používá se poměr 1:33 (vzorek:tlumivý roztok). Pro stanovení konstantního aktivního koeficientu draselných iontů se používá tlumivý roztok s vysokou molární koncentrací.

Draselná iontově selektivní elektroda se skládá z valinomycinové polyvinylchloridové membrány na pevném podkladě. Kavita ionoforu valinomycinu se rovná průměru  $K^+$ , čímž vznikají komplexy  $K^+$  s valinomycinem. Jakmile se elektroda dostane do styku se směsí vzorku a tlumivého roztoku, změní se potenciál elektrody. Na tyto změny potenciálu reaguje sodíková referenční elektroda. Pomocí Nernstovy rovnice vypočteme koncentraci draslíku ve vzorku.

##### Vzorek

Pro vyšetření lze použít sérum, plazmu nebo sesbíranou moč. Nedoporučují se používat vzorky plné krve.

Oddělené sérum nebo plazmu lze skladovat maximálně 8 hodin při pokojové teplotě, pro delší časový interval platí teplota +2°C až +8°C. V případě, že stanovení provádíme déle než za 48 hodin, vzorky zmrazíme při teplotě -15°C až -20°C. Tyto vzorky bychom měli rozmrazit pouze jednou. U vzorků s močí by mělo stanovení proběhnout do dvou hodin od odběru, u časově omezeného sběru by se měla nádoba uchovávat v lednici či na ledu. Optimální objem vzorku je 0,5 ml.

### Reagencie

Obsah soupravy

ISE Electrolyte Buffer Reagent (2 láhve, 2 x 2l)

ISE Electrolyte Reference Reagent (2 láhve, 2 x 2l)

Objemy pro stanovení

Objem vzorku 40 µl, objem ISE Electrolyte Buffer 1,27ml, ISE Electrolyte reference 3,23ml.

Další potřebné materiály (kalibrátory)

SYNCHRON® Systems AQUA CAL 1, 2 a 3

Skladování

Reagencie je možné skladovat v uzavřené láhvi při laboratorní teplotě až do data expirace, po otevření je reagencie stabilní 30 dnů při laboratorní teplotě. Kalibrátory skladujeme při +2 až +8 °C v uzavřené láhvi do data expirace, po otevření 30 dnů při laboratorní teplotě.

### Pracovní postup

- Do systému vložíme reagencie.
- Provedeme kalibraci.
- Naprogramujeme vzorky a kontrolní vzorky pro analýzu.
- Dále postupujeme podle protokolů pro obsluhu systému.

## Výpočty

Systemy SYNCHRON<sup>®</sup> provádějí všechny výpočty a vydávají konečný výsledek. System vypočítá konečný výsledek pro ředění vzorku připravený obsluhou, jestliže se během programování vzorku vloží do přístroje faktor ředění.

## Charakteristika spolehlivosti

### Citlivost

Citlivost je definovaná jako nejnižší měřitelná koncentrace, kterou je možné odlišit od nuly se spolehlivostí 95%. Citlivost stanovení draslíku ve vzorcích séra nebo plazmy je 1,0 mmol/l a ve vzorcích moči 2,0 mmol/l.

### Přesnost

Správně fungující systém SYNCHRON<sup>®</sup> by měl vykazovat hodnoty nepřesnosti nižší nebo shodné s maximálními limity funkční charakteristiky stanovení uvedenými v následující tabulce.

tab. 1: Tabulka přesnosti pro draslík

TYP PŘESNOSTI	TYP VZORKU	1 SD	HRANIČNÍ HODNOTA	%CV
		mmol/l	mmol/l	
V rámci stanovení (Within-run)	Sérum/plazma	0,10	5,0	2,0
	Moč	2,0	50,0	4,0
Celková	Sérum/plazma	0,20	6,67	3,0
	Moč	3,0	50,0	6,0

### Analytické rozmezí

Metoda SYNCHRON<sup>®</sup> pro stanovení draslíku poskytuje tato analytická rozmezí hodnot.



tab. 2: Analytická rozmezí

TYP VZORKU	OBVYKLÉ JEDNOTKY	S.I. JEDNOTKY
Sérum nebo plazma	1,0 až 15,0 mmol/l	1,0 až 15,0 mmol/l
Moč	2 až 300 mmol/l	2 až 300 mmol/l

Vzorky, jejichž koncentrace převyšuje horní limit analytického rozmezí, je třeba naředit deionizovanou vodou a analyzovat znovu.

### Výpočty

Systemy SYNCHRON<sup>®</sup> provádějí všechny výpočty a vydávají konečný výsledek. Systém vypočítá konečný výsledek pro ředění vzorku připravený obsluhou, jestliže se během programování vzorku vloží do přístroje faktor ředění.

## **4.7 Abbott**

### **4.7.1 Analyzátor Abbott Architect i1000SR**

ARCHITECT i1000SR<sup>®</sup> je nejnovější analyzátor pro imunologická stanovení, sdílející získané výhody z ostatních přístrojů typu Architect. Tento přístroj je navržen pro malé a střední laboratoře, a také jako možnost integrace s biochemickým analyzátozem ARCHITECT c400. i1000SR<sup>®</sup> nabízí ulehčení od denních rutinních operací. Mezi výhody patří použití čárových kódů, nepřetržitý přístup ke vzorkům a reagentům, detekce hladin kapalin, bublin a sraženin, statimové vyšetření a další. (web 7; web 8)

### **4.7.2 Standardní operační postup pro stanovení protilátek proti *Toxoplasma gondii***

ARCHITECT Toxo IgG (zdroj Abbott, 2009)

#### Využití

Specifické protilátky IgG nenaznačují přítomnost čerstvé infekce, jsou pozitivní za 1 – 2 týdny a jejich titr je prokazatelný celoživotně, ukazují tedy na chronickou či již proběhlou infekci. Pokud jsou přítomny protilátky IgM a IgG jedná se o akutní infekci. (Kessler, 1993; Kopáč, 2004)

## Princip

Metoda ARCHITECT Toxo IgG je dvoukroková imunoanalýza ke kvalitativní detekci protilátek Toxo IgG v lidském séru a plazmě využívající technologii chemiluminiscenční imunoanalýzy na mikročásticích (CMIA).

Během prvního kroku se přidá vzorek k ředicímu roztoku a paramagnetickým mikročásticím, které jsou potažené rekombinantním antigenem *Toxoplasma gondii*. Protilátky přítomné ve vzorku se navážou na rekombinantní antigen *Toxoplasma gondii* na mikročásticích a vytvoří se komplex. Po promytí se během druhého kroku přidá konjugát anti-humánních protilátek s akridinem, který se váže na komplex vzniklý v prvním kroku. Po dalším promývacím cyklu se do reakční nádoby (RV - Reaction Vessel) přidají roztoky Pre-Trigger a Trigger. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách (RLU - Relative Light Units). Množství protilátek přítomných ve vzorku je přímo úměrné jednotkám RLU detekovaným optickým systémem ARCHITECT *i* (\**i* = imunoanalýza).

## Vzorek

Pro vyšetření metodou ARCHITECT Toxo IgG lze použít lidské sérum (včetně séra odebraného do separačních zkumavek) nebo plazmu odebranou do draselné soli EDTA, sodné soli heparinu, lithné soli heparinu a citrátu sodného. Použití jiných antikoagulantů nebylo pro metodu ARCHITECT Toxo IgG ověřeno. Dodržujeme pokyny výrobce odběrových zkumavek na sérum nebo plazmu.

Vzorky lze přepravovat při teplotě okolí, při teplotě 2 – 8 °C (chlazené ledem) nebo při teplotě -20 °C a nižší (na suchém ledu). Nepřekračujeme výše uvedenou dobu skladování. Před přepravou se doporučuje oddělit vzorky od koagula, separátoru séra nebo erytrocytů.

Tato metoda byla vyvinuta a validována pro vyšetřování vzorků lidského séra nebo plazmy od jednotlivých pacientů a dárců krve. K vyšetření nelze používat směsné vzorky, jelikož nebyla potvrzena správnost získaných výsledků.

Nepoužíváme tepelně inaktivované vzorky, silně hemolytické vzorky ani vzorky obsahující bubliny.

Vzorky mohou být skladovány separované i neseparované od koagula či erytrocytů při teplotě 2 – 8 °C maximálně 14 dní.

Budou-li vzorky vyšetřeny za delší dobu než 14 dní, oddělíme sérum či plazmu od koagula, separátoru séra nebo erytrocytů a uskladníme je zmrazené (při teplotě -20 °C nebo nižší). Po šestinásobném opakovaném zmrazování a rozmrazování nebyly zjištěny mezi zkušebními kontrolami s 24 nereaktivními a 24 obohacenými reaktivními vzorky žádné kvalitativní rozdíly. Přesto se opakovaného zmrazování a rozmrazování vzorků vyvarujeme.

### Přístroje a pomůcky

Systém Abbott Architect i1000SR

Pipety nebo pipetovací špičky (volitelné) pro dávkování objemů uvedených na obrazovce Objednávka vzorků od pacientů (Patient Order) nebo Objednávka kontrol (Control Order).

### Reagencie

6C19 Reagenční souprava (ARCHITECT Toxo IgG Reagent Kit)

1 lahvička nebo 4 lahvičky (6,6 ml na 100 testů / 27,0 ml na 500 testů) - mikročástice potažené *Toxoplasma gondii* antigen v MES pufru s bílkovinnými stabilizátory. Minimální koncentrace: 0,03 % pevných částic. Konzervační činidlo: ProClin 300.

1 lahvička nebo 4 lahvičky (5,9 ml na 100 testů / 26,3 ml na 500 testů) - konjugát myších anti-humánních protilátek s akridinem v MES pufru s bílkovinnými stabilizátory. Minimální koncentrace: 0,05 µg/ml. Konzervační činidlo: antimikrobiální látka.

1 lahvička (10 ml na 100 testů / 50,9 ml na 500 testů) – Toxo IgG diluent obsahující TRIS pufr s bílkovinnými stabilizátory

Konzervační činidlo: ProClin 300.

Ostatní reagenty: pre-trigger roztok, trigger roztok a promývací pufr

### Podmínky skladování

Reagenční soupravu, kalibrátory a kontroly ARCHITECT Toxo IgG skladujeme při teplotě 2 – 8 °C ve svislé poloze. Můžeme je použít ihned po vyjmutí z chladicího zařízení nastaveného na tuto teplotu.

Reagenční souprava ARCHITECT Toxo IgG může být v přístroji ARCHITECT *i* používána maximálně 30 dní. Po 30 dnech se musí vyřadit.

### Spotřební materiál

ARCHITECT *i* Pre-Trigger Solution obsahující 1,32% (w/v) peroxid vodíku.

ARCHITECT *i* Trigger Solution obsahující 0,35 molární hydroxid sodný

ARCHITECT *i* Wash Buffer obsahující fyziologický roztok s fosfátovým puftrem.

Konzervační činidlo: antimikrobiální látka.

### Pracovní postup

Objednáme testy. Informace o objednávání vzorků od pacientů, kalibrátorů a kontrol a údaje o obecných postupech při zpracování nalezneme v Uživatelské příručce systému ARCHITECT.

Vložíme reagenční soupravu ARCHITECT Toxo IgG do přístroje ARCHITECT *i*. Ověříme, že máme k dispozici všechny potřebné reagensie. Ujistíme se, že jsou na všech reagenčních lahvičkách nasazena septa.

Minimální objem vzorku ve vzorkové nádobce je vypočtený systémem a zobrazí se na výtisku objednávky (Orderlist Report). Z jedné vzorkové nádoby lze provést maximálně 10 opakování. Před zahájením vyšetření se ujistíme, že je ve vzorkových nádobkách dostatečný objem vzorku, aby došlo jen k minimálnímu odpaření.

Přednostní zpracování: Pro první test Toxo IgG je požadováno 75  $\mu$ l vzorku a pro každý další test Toxo IgG prováděný z téže vzorkové nádoby je třeba dalších 25  $\mu$ l vzorku.

Méně než 3 hodiny po vložení: Pro první test Toxo IgG je požadováno 150  $\mu$ l vzorku a pro každý další test Toxo IgG prováděný z téže vzorkové nádoby je třeba dalších 25  $\mu$ l vzorku.

Více než 3 hodiny po vložení: Je požadován přídatný objem vzorku.

Kalibrátor a kontroly ARCHITECT Toxo IgG před použitím promícháme opatrným převrácením. Pro získání požadovaného objemu kalibrátoru a kontrol ARCHITECT Toxo IgG držíme lahvičky ve svislé poloze a do příslušných nádobek nadávkuje 6 kapek kalibrátoru nebo 4 kapky jednotlivých kontrol.

Vložíme vzorky.

- Stiskneme klávesu RUN (Zahájení zpracování).

## Postup při ředění vzorků

Při vyšetření metodou ARCHITECT Toxo IgG se vzorky o koncentraci větší než 200,0 IU/ml ředí podle dilučního protokolu 1:10.

## Stručný popis postupu

Vložíme vzorky. Stiskneme klávesu RUN (Zahájení zpracování).

## Kalibrace a návaznost

Při kalibraci metody ARCHITECT Toxo IgG změříme ve dvou opakovaných kalibrátor A až F Toxo IgG. Pro vyhodnocení kalibrace metody musí být jedenkrát zanalyzovány všechny hladiny kontrol Toxo IgG. Ověříme, že se hodnoty kontrol metody nacházejí v rozmezích uvedených v příbalovém letáku soupravy kontrol (0-200IU/ml). Kalibrátory vkládáme přednostně.

Jakmile je kalibrace metody ARCHITECT Toxo IgG akceptována a uložena do paměti, mohou být všechny následující vzorky vyšetřovány bez další kalibrace až do okamžiku, kdy:

- Je použita reagenční souprava nové výrobní šarže
- Hodnoty kontrol se nacházejí mimo stanovená rozmezí

## Charakteristika spolehlivosti

### Přesnost

Přesnost metody ARCHITECT Toxo IgG byla stanovena během klinických studií za použití dvou šarží reagensů. Panel obsahující šest specifických vzorků byl testován ve čtyřech opakováních s každou šarží reagensů jednou denně po dobu pěti dní na třech pracovištích. Na začátku a na konci každé denní série vyšetření byly také v duplikátu vyšetřeny pozitivní kontroly ARCHITECT. Směrodatná odchylka (SD - Standard Deviation) a variační koeficient vyjádřený v procentech (% CV - Coefficient of Variation) při stanovení analytu v jedné dávce (Intra-assay) a při stanovení analytu ve více dávkách (Inter-assay) byly zjištěny pomocí analýzy komponent rozptylu pro model náhodných výsledků (tab. 3).

tab. 3: Přesnost metody ARCHITECT Toxo IgG

Vzorky	Počet opakování	Průměr (IU/ml)	Během analýzy		Celkem <sup>a</sup>	
			SD	% CV	SD	% CV
Negativní kontrola	576	0,1	0,03	N/A	0,03	N/A
Pozitivní kontrola 1	576	6,4	0,14	2,17	0,16	2,55
Pozitivní kontrola 2	576	119,2	3,69	3,10	4,74	3,98
Lidský vzorek	192	3,3	0,09	2,74	0,10	3,10

<sup>a</sup> Celková variabilita metody zahrnuje variabilitu během procesu, mezi procesy a během dne

#### Referenční a varovná rozmezí

System ARCHITECT i vypočte průměrnou hodnotu chemiluminiscenčního signálu ze dvou opakovaných měření kalibrátoru A až F Toxo IgG a výsledek uloží do paměti.

#### Výpočet

Metoda ARCHITECT Toxo IgG vypočte výsledek na základě poměru IU/ml.

#### Interpretace výsledků, konzultační činnosti a hlášení

##### Interpretace výsledků

Vzorky s hodnotami nižšími než 1,6 IU/ml jsou metodou ARCHITECT Toxo IgG považovány za nereaktivní.

Vzorky s hodnotami, které jsou vyšší nebo rovny 3,0 IU/ml, jsou metodou ARCHITECT Toxo IgG považovány za reaktivní a značí prodělanou či akutní infekci.

Vzorky v intervalu 1,6 do 3,0 IU/ml se nachází v šedé zóně.

#### Řízení jakosti

Pro ověření kalibrace metody ARCHITECT Toxo IgG se doporučuje zanalyzovat pozitivní a negativní kontrolu.

Doporučený kontrolní požadavek pro metodu ARCHITECT Toxo IgG je provést jedenkrát test všech hladin kontrol v průběhu 24 hodin každého dne provozu. Jestliže systém kontroly kvality v laboratoři vyžaduje k ověření výsledků vyšetření častější používání kontrol, postupujeme v souladu s tímto požadavkem. Ověříme, že se hodnoty kontrol metody nacházejí v rozmezích uvedených v příbalovém letáku soupravy kontrol.

#### Poznámka

Podrobné informace nalezneme v příbalovém letáku či v Uživatelské příručce systému ARCHITECT.

## 5 Praktická část

### 5.1 Verifikace pro stanovení draslíku

#### 5.1.1 Verifikace

Stanovení draslíku na přístroji Beckman Coulter DxC880 je kvantitativní metoda, má k dispozici referenční materiál validovaný minimálně v rámci Externí kontroly kvality.

Při verifikaci kvantitativních metod stanovujeme:

- mezilehlou přesnost – přesnost měření v delším časovém úseku
- opakovatelnost – přesnost během jedné analýzy
- bias - rozdíl mezi průměrem získaným z měření a referenční hodnotou
- kombinovanou nejistotu – další složky nejistoty

Mezilehlou přesnost stanovíme ideálně z dat vnitřní kontroly kvality, kterou si provádí laboratoř sama. Jedná se o jednotlivé hladiny kontrol proměřované na stejném přístroji, stejným postupem v delším časovém úseku. Čím více hodnot, tím lépe. Ze získaných hodnot naměřených na analyzátoru vypočítáme aritmetický průměr, směrodatnou odchylku a variační koeficient. Vše zadáme v systému SLP do protokolu.

Opakovatelnost se provádí referenčním materiálem na stejném přístroji, stejnou metodou, jedním člověkem v krátkém časovém úseku. Během jedné analýzy změříme minimálně 10krát vzorek, jednotlivé hodnoty zadáme do protokolu. Systém SLP si dále sám vypočítá aritmetický průměr, směrodatnou odchylku a variační koeficient.

Kombinovaná nejistota zahrnuje další složky nejistoty (nejistota pipetování, kalibrátoru, atd.). (web 9)

#### 5.1.2 Pracovní postup verifikace

- Nejprve změříme vzorek pro opakovatelnost
  - Jeden vzorek necháme během jedné analýzy změřit 10x
- Zjistíme naměřená data pro mezilehlou přesnost
  - Výsledky vypíšeme z dat Vnitřní kontroly kvality



- V programu SLP si v menu „Výpočty“ vybereme položku „verifikační protokol“
- Založíme nový protokol
- Vyplníme pole:
  - metoda – název verifikované metody, kterou provádíme
  - analyzátor – údaje o analyzátoru
  - datum – den, kdy se hodnocení provádělo
  - vyhodnotil – osoba, která vyhodnotila protokol
- Dále vyplňujeme údaje o mezilehlé přesnosti
  - u každého vzorku datum od kdy do kdy měření probíhalo
  - použitý materiál (nejlépe ve 3 hladinách)
  - počet hodnot změřených za daný časový úsek
  - vypočtenou směrodatnou odchylku z naměřených hodnot
  - vypočtený variační koeficient
  - případně variační koeficient výrobce (není nutné)
- poté vyplníme hodnoty pro opakovatelnost, bias a biologickou variabilitu
  - provedl – osoba, která provedla vlastní pokus opakovatelnosti
  - použitý materiál – stejný jako u mezilehlé přesnosti
  - výsledné hodnoty – jednotlivé hodnoty naměřené na analyzátoru během jedné analýzy
  - SD, CV, nejistota a bias se vypočítají automaticky
  - hodnoty intraindividuální a interindividulání variability – nalezené na (web 10)
  - zbylé hodnoty (celková biologická variabilita, přesnost, bias a celková chyba odvozené z biologických variabilit) se vypočítají v programu automaticky
- kombinovanou nejistotu si program sám vypočítá pomocí jednotlivých druhů nejistot
- dále můžeme v textovém editoru slovně vyhodnotit:
  - ostatní znaky metody
  - senzitivita, specifita – určeno pouze pro kvalitativní metody
- nakonec slovně vypíšeme závěr verifikace

### 5.1.3 Verifikační protokol pro stanovení draslíku

Verifikační protokol ze dne 15. 11. 2010 – draslík

Metoda: draslík

Název soupravy: ISE electrolytes

Analyzátor: Beckman Coulter Unicell DxC 880i

Výrobce: Beckman Coulter

Katalogové číslo: T002034

Vyhodnotil: Barbora Faltusová

Datum: 15. 11. 2010

#### 1 Mezilehlá přesnost

	Datum (od – do)	Použitý materiál	Počet hodnot	Průměr	SD	CV	CV výrobce
Vzorek 1	30.07.2010 – 12.11.2010	SYNCHRON CONTROL Level 1	30	2,450	0,095	3,677	3,800
Vzorek 2	22.07.2010 – 11.11.2010	SYNCHRON CONTROL Level 2	30	4,877	0,131	2,729	2,700
Vzorek 3	22.07.2010 – 15.11.2010	SYNCHRON CONTROL Level 3	30	7,460	0,177	2,373	2,300

#### 2 Opakovatelnost, bias

Provedl: Barbora Faltusová

Datum: 28. 03. 2011

Použitý materiál: Vzorek A = SYNCHRON CONTROL Level 1

Vzorek B = SYNCHRON CONTROL Level 2

Vzorek C = SYNCHRON CONTROL Level 3

Intraindividuální biologická variabilita ( $CV_i$ ) = 2,4

Interindividuální biologická variabilita ( $CV_g$ ) = 5,6

Celková biologická variabilita = 6,0

Přesnost odvozená z biologických variabilit ( $I_{biol}$ ) = 1,2

Bias odvozený z biologických variabilit ( $B_{biol}$ ) = 1,5

Celková chyba odvozená z biologických variabilit ( $TE_{biol}$ ) = 3,5

Výsledné hodnoty:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5
Vzorek B	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	5,0	5,0	5,0	5,0
Vzorek C	7,4	7,5	7,6	7,5	7,5	7,7	7,7	7,7	7,8	7,7

Vyhodnocení:

	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr	2,430	4,940	7,610	mmol/l
Cílová hodnota	2,500	4,900	7,500	mmol/l
Nejistota ref. Materiálu				%
SD	0,048	0,051	0,128	
CV	1,987	1,045	1,690	%
CV výrobce	6,000	4,400	4,000	%
R (x)	97,200	100,816	101,466	%
b	-2,800	0,816	1,466	%

Cílová hodnota nejistoty (%) : 6,000

Pramen: SEKK – třetina

Výsledek verifikace: (\*) Vzorek A vyhovuje

(\*) Vzorek B vyhovuje

(\*) Vzorek C vyhovuje

### 3 Kombinovaná nejistota

	$U_{r,tot}$ (%)	Pro cílovou hodnotu	Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu (při 95% intervalu spolehlivosti)	Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD%)
Vzorek A	4,664	2,500	2,266 – 2,733	7,4
Vzorek B	2,867	4,900	4,618 – 5,181	9,3
Vzorek C	2,840	7,500	7,073 – 7,926	9,3

### 4 Závěr

Verifikace splnila všechny podmínky, pouze je třeba zjistit nejistotu referenčního materiálu – jednání s výrobcem.

## 5.2 Verifikace pro stanovení protilátek proti *Toxoplasma gondii*

### 5.2.1 Verifikace

Stanovení protilátek IgG proti *Toxoplasma gondii* na přístroji ARCHITECT i1000SR provádíme stejným způsobem jako metodu kvantitativní s výjimkou opakovatelnosti, která se nestanovuje. Navíc se zde vyplňuje senzitivita a specifická metoda, která je určena pro metody, které lze verifikovat pomocí porovnání s jinou metodou.

### 5.2.2 Pracovní postup

Pracovní postup probíhá stejně jako u stanovení draslíku kap 5.1.2, pouze bez měření opakovatelnosti.

### 5.2.3 Verifikační protokol pro stanovení Toxo IgG

Verifikační protokol ze dne 14. 1. 2011 – Toxo IgG

Metoda: Toxo IgG

Název soupravy: Toxo IgG

Analyzátor: ARCHITECT i1000SR

Výrobce: Abbott

Katalogové číslo: 6C19 - 10

Vyhodnotil: Barbora Faltusová

Datum: 14. 1. 2011

#### 1 Mezilehlá přesnost

	Datum (od – do)	Použitý materiál	Počet hodnot	Průměr	SD	CV	CV výrobce
Vzorek 1	27.05.2010 – 15.12.2010	Toho IgG neg.	20	0,100	0,049	40,825	10,000
Vzorek 2	27.05.2010 – 05.01.2011	Toxo IgG Pos. 1	20	7,285	0,766	10,513	10,000
Vzorek 3	27.05.2010 – 12.01.2011	Toxo IgG Pos. 2	20	141,283	29,073	20,578	10,000

## Vyhodnocení:

	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr		7,200	141,260	IU/ml
Cílová hodnota		6,000	120,000	IU/ml
Nejistota ref. Materiálu		10,000	15,000	%
SD		0,720	28,958	
CV		10,000	20,500	%
CV výrobce		10,000	10,000	%
R (x)		120,000	117,716	%
B			17,716	%

Cílová hodnota nejistoty (%) : 20,000

Pramen:

Výsledek verifikace:

Vzorek B vyhovuje

Vzorek C nevyhovuje

### 3 Kombinovaná nejistota

	$U_{r,tot}$ (%)	Pro cílovou hodnotu	Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu (při 95% intervalu spolehlivosti)	Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD%)
Vzorek A				
Vzorek B	17,621	6,000	3,885 – 8,114	
Vzorek C	37,183	120,000	30,760 – 209,239	

### 4 Ostatní znaky metody

Vzorek A lze jen obtížně hodnotit jako kvantitativní parametr. Jeho cílová hodnota je < 0,5 IU/ml. Ve všech kontrolních měřeních se výsledek pohyboval v požadovaném rozmezí. Ostatní vzorky jsou nadále testovány a po získání statisticky významných počtů bude validace dokončena.

### 5 Senzitivita, specifita

Senzitivita udávána výrobcem je 99,7 při koeficientním intervalu 95%.

Specifita udávána výrobcem je 99,5 při koeficientním intervalu 95%.

### 6 Závěr

Verifikace nevyšla, jednáme s výrobcem o dalších podkladech pro verifikaci metody.

## 6 Diskuze

Verifikace metod je velmi důležitá při validaci a kontrole metod, která se provádí jednou ročně. Jak je uvedeno v praktické části, ne všechny výsledky verifikací leží v daných rozmezích referenčních hodnot.

U verifikačního protokolu pro stanovení draslíku můžeme vidět, jak by správná verifikace měla vypadat a jaké výsledky by měla daná metoda poskytovat. Tato verifikace vyšla na výbornou. Verifikovaná metoda splňuje všechny požadavky.

U stanovení protilátek IgG proti *Toxoplasma gondii* se vzorek C nevešel do referenčních rozmezí, protože bylo stanovováno pouze malé množství vzorků a hlavní příčinou byla vysoká hodnota kombinované nejistoty pro tento vzorek. Zde je nutné proměřit kontrolní materiál znovu nebo objednat kontrolní a referenční materiál z jiné firmy.

## 7 Závěr

Sepsání této bakalářské práce pro mě bylo velmi přínosné. Nejen, že jsem se naučila pracovat v programu SLP, vyhodnocovat výsledky verifikací a vypracovávat standardní operační postupy pro různé metody a přístroje, ale svojí prací jsem pomohla vypracovat Laboratorní příručku pro oddělení Klinické biochemie a hematologie Panochovy nemocnice, s.r.o., Turnov a další dokumentaci potřebnou pro akreditaci laboratoře. Díky této práci jsem se mohla zapojit do normálního provozu laboratoře, sama si proměřit výsledky různých metod a zároveň se naučit věci, které se mi budou hodit do budoucího povolání.

Standardní operační postupy jsme vypracovávali z příbalových letáků přiložených k reagensům nebo z informací uvedených v manuálu pro přístroj či metodu. Některé ze standardních operačních postupů jsme využili přímo od výrobce, zejména se jednalo o některé materiály od firmy Beckman Coulter.

Pomocí verifikací jsme se snažili dokázat validitu metod. U biochemických metod se měřila mezilehlá přesnost, opakovatelnost a kombinovaná nejistota. U biochemické metody se jedná o kvantitativní stanovení, proto je nutné proměřit všechny parametry. U imunochemických metod, které jsou většinou kvalitativního charakteru, stačí proměřit pouze mezilehlá přesnost a kombinovaná nejistota a navíc senzitivita a specifita. Ve většině verifikací se výsledky vešly do referenčních rozmezí, avšak našly se zde i případy, které nesplňovaly některé dané podmínky.

## 8 Přílohy



Analyzátor Beckman  
Coulter



Analyzátor ARCHITECT  
i1000



## 9 Zdroje

- Drobníková, Standardní operační postup – zaměření laboratoře, 2011
- Racek: Klinická biochemie, vyd. Galén, 2006, [str. 56], ISBN: 80-7262-324-9
- Novák: Úvod do klinické biochemie, vyd. Karolinum, 2002, [str. 33-37], ISBN: 80-246-0366-7
- Web 1, Základní informace o systému SLP<sup>®</sup>, <http://www.sekk.cz/> 22. 3. 2011
- Web 2, <http://www.sekk.cz/>, 20. 3. 2011
- Web 3, Kratochvíla, Friedecký, Plzák: Požadavky na validace z hlediska norem souvisejících s akreditačními procesy v klinické laboratoři, [http://www.sekk.cz/Texty/2004\\_Validace\\_Pdy\\_1.pdf](http://www.sekk.cz/Texty/2004_Validace_Pdy_1.pdf), 22. 3. 2011
- Pecka a kolektiv: Praktická hematologie, vyd. Infiniti art, s.r.o., 2010, [str. 15-22], ISBN: 978-80-903871-9-5
- Web 4, Jabor, Kotrbatý, Komínková: Verifikační protokol, <http://ciselniky.dasta.stapro.cz/hypertext/201020/hypertext/WWAXU.htm> 23.4.2011
- Web 5, [http://www.immunotech.cz/products\\_klinbio\\_dxc600.htm](http://www.immunotech.cz/products_klinbio_dxc600.htm), 22.3.2011
- Kessler: Memorix - Laboratorní diagnostika, vyd. SCIENTIA MEDICA, spol. s.r.o., 1993, [str. 107, 179], ISBN: 80-85526-12-3
- Masopust: Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření část II., vyd. Karolinum, 1998, [str. 751-756], ISBN: 80-7184-649-X
- Web 6, [http://www.immunotech.cz/products\\_imch\\_dxi800.htm](http://www.immunotech.cz/products_imch_dxi800.htm), 22. 3. 2011
- Beckman Coulter Inc.: Informace o soupravě – Draslík, 2005
- Web 7, [http://international.abbottdiagnostics.com/Products/Instruments\\_by\\_Platform/default.cfm?system=ARCHITECT&suffix=i1000sr](http://international.abbottdiagnostics.com/Products/Instruments_by_Platform/default.cfm?system=ARCHITECT&suffix=i1000sr), 23.3.2011
- Web 8, <http://www.abbottdiagnostics.cz/produkty/imunoanaliza/architect-i1000sr/>, 23. 3. 2011
- Kopáč: Lékařská laboratorní diagnostika, vyd. Polygraf s.r.o., 2004, [str. 654-655]
- Abbott: Informace o soupravě Toxo IgG, leden 2009
- Web 9, Friedecký, Šprongl, Kratochvíla, Plzák: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích [http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace\\_2010.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace_2010.pdf), 23. 4. 2011
- Web 10, <http://www.westgard.com/biodatabase1.hmt>, 25. 3. 2011