

**Implementace procesních a aplikačních
postupů pro akreditaci vybrané metody v
ÚHKT**

**Implementation of process and application
procedures for the accreditation of selected
methods in ÚHKT**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor: Systémová integrace procesů ve zdravotnictví

Autor diplomové práce: Bc. Kristýna Svobodová
Vedoucí diplomové práce: Ing. Ivana Švandová

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Kristýna Svobodová**
Studijní obor: Systémová integrace procesů ve zdravotnictví
Téma: **Implementace procesních a aplikačních postupů pro akreditaci vybrané metody v ÚHKT**
Téma anglicky: Implementation of process and application procedures for the accreditation of selected methods in ÚHKT

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je navrhnout postup při akreditaci konkrétní metody používané v Ústavu hematologie a krevní transfúze (ÚHKT). Zaměřte se na metodu Heparin indukované trombocytopenie (HIT) používanou v ÚHKT a připravte ji k akreditaci. Na základě současného stavu problematiky ve světě a v České republice analyzujte procesy a postupy používané při akreditacích. V rámci řešení problematiky použijte metody z oblasti systému managementu kvality a proveďte analýzu rizik použítí dané metody a dále neopomíňte legislativní opatření spojená s akreditací. Vyhodnoďte přínosy akreditace zmíněné metody.

Seznam odborné literatury:

- [1] Madar J., Řízení kvality ve zdravotnickém zařízení. Grada Publishing, Praha, 2004, ISBN 8024705850
- [2] Zlámal Jaroslav, Bellová Jana, Ekonomika ve zdravotnictví, ed. 2.vydání, 2013, 249 s., ISBN 978-80-7013-551-8
- [3] Kavalier, P. - Spiegel, D., Risk management in health care institutions, ed. London, Subdary: Jones and Bartlett Publisher, 2003, ISBN 0-7637-2314-2
- [4] Škrta, P. - Škrta, M., Řízení rizik ve zdravotnických zařízeních, Praha Grada Publishing, 2008, ISBN 978-80-247-2616-8

Vedoucí: Ing. Ivana Švandová

Zadání platné do: 20.08.2016

vedoucí katedry / pracoviště

děkan

V Kladně dne 20.02.2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Implementace procesních a aplikačních postupů pro akreditaci vybrané metody v ÚHKT“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 10. 5. 2017

.....

Bc. Kristýna Svobodová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce, Ing. Ivaně Švandové, za odborné vedení a poskytnuté rady, které mi věnovala při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům oddělení biochemie v ÚHKT za ochotu a pomoc, kterou mi poskytli při vypracování této diplomové práce.

ABSTRAKT

Implementace procesních a aplikačních postupů pro akreditaci vybrané metody v ÚHKT.

Diplomová práce se zabývá přípravou metody SRA-HPLC pro diagnostiku heparinem indukované trombocytopenie k akreditačnímu šetření. V teoretické části diplomové práce je rozebrána problematika akreditací v zahraničí a ČR a právní předpisy a náležitosti související s procesem akreditace. Ve druhé části diplomové práce je provedena analýza rizik. Jako metody pro analýzu rizik byly zvoleny Ishikawův diagram a FMEA. V kapitole Výsledky práce jsou shrnuty průběhy analýzy rizik a nápravná opatření pro rizikové potenciální chyby. Dále je zde popsán postup validace metody a postup přípravy Standardního operačního postupu pro metodu SRA-HPLC. Výsledkem diplomové práce je připravená dokumentace pro akreditační šetření včetně validace metody a provedená analýza rizik metody.

Klíčová slova

Akreditace, analýza rizik, FMEA, Heparinem indukovaná trombocytopenie

ABSTRACT

Implementation of process and application procedures for the accreditation of selected methods in ÚHK

This thesis reviews a preparation of serotonin release assay – high-performance liquid chromatography (SRA-HPLC) method for diagnosis of heparin induced thrombocytopenia for accreditation process. Theoretical part is dedicated to accreditation processes in the Czech Republic and elsewhere, in the terms of legislation and requirements related to the accreditation. Practical part is centred around validation and risk management. Failure mode and effects analysis (FMEA) and Ishikawa diagrams were used for risks assessment. As results summary of risk analysis and recommended corrective measures in the case of failure are presented. The processes of validation of SRA-HPLC and preparation of SRA-HPLC Standard Operating Procedure are described. Outcome of thesis is complete documentation for accreditation body, validation and FMEA included.

Keywords

Accreditation, risk analysis, FMEA, Heparin induced thrombocytopenia

Obsah

Seznam zkratk	9
Úvod	11
1 Současný stav problematiky	12
1.1 Akreditace zdravotnických laboratoří	12
1.1.1 Akreditace zdravotnických laboratoří mimo EU	12
1.1.2 Akreditace zdravotnických laboratoří v EU	12
1.1.3 Zahraniční studie zabývající se akreditacemi	14
1.1.4 Mezinárodní akreditační organizace	18
1.1.5 Dokumenty EU týkající se akreditace	18
1.1.1 Akreditace zdravotnických laboratoří v ČR	18
1.2 Proces akreditace	21
1.3 Přínosy akreditace	21
1.4 ISO normy	22
1.4.1 Nejdůležitější normy pro řízení kvality v laboratoří	22
1.5 Heparinem indukovaná trombocytopenie	24
1.5.1 Klinické projevy	24
1.5.2 Diagnostika HIT	24
1.6 ÚHKT	27
1.7 Laboratorní procesy	27
2 Metody	32
2.1 Brainstorming	32
2.2 Ishikawův diagram	32
2.3 FMEA (Failure Mode and Effects Analysis)	33
2.3.1 Analýza a hodnocení současného stavu	34
2.3.2 Nápravná opatření	36
2.3.3 Hodnocení stavu po realizaci nápravných opatření	36
2.4 Standardní operační postup (SOP)	38
2.4.1 Obsah SOP	38
2.5 Validace metody	40
2.5.1 Přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost)	40

2.5.2	Vychýlení	41
2.5.3	Linearita a pracovní rozsah měření	41
2.5.4	Pracovní rozsah měření	41
2.5.5	Mezilehlá preciznost měření.....	41
2.5.6	Mezilaboratorní reprodukovatelnost	42
2.5.7	Interference.....	42
2.5.8	Porovnání s jinou metodou.....	42
2.6	Verifikace metody	42
2.6.1	Nejistota měření.....	43
2.7	Postup validace a verifikace	43
2.8	Vnitřní kontrola kvality	43
2.9	Externí kontrola kvality.....	43
3	Výsledky.....	45
3.1	Ishikawův diagram	45
3.2	FMEA.....	47
3.2.1	Nápravná opatření	55
3.2.2	Grafické znázornění provedení FMEA analýzy.....	63
3.3	SOP.....	65
3.4	Postup laboratorního vyšetření HIT	65
3.4.1	Inkubace pacientského séra s krevními destičkami a heparinem	65
3.4.2	Stanovení serotoninu	67
3.4.3	Analýza HPLC.....	68
3.4.4	Vyhodnocení výsledků	68
3.5	Validace metody SRA-HPLC	69
3.6	Validace přístrojů a použití kalibrovaných pipet	69
4	Diskuse.....	70
5	Závěr	74
	Seznam použité literatury	75
	Seznam tabulek	81
	Seznam obrázků.....	82
	Seznam příloh.....	83

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
5-HT	5-hydroxytryptamin
EA	European co-operation for Accreditation
EA MLA	EA Multilateral Agreement – Multilaterální dohody EA o vzájemném uznávání výsledků akreditace
EDTA	Ethylendiamintetraacetát sodný
EN	Evropská norma
EKK	Externí kontrola kvality
EU	Evropská Unie
ES	Evropské společenství
FMEA	Failure Mode and Effect Analysis – Metoda pro analýzu možného výskytu vad a jejich následků
ČIA	Český institut pro akreditaci o.p.s.
ČSL JEP	Česká lékařská společnost Jana E. Purkyně
ČSN	Česká technická norma
ČR	Česká republika
HIT	Heparinem indukovaná trombocytopenie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAF	International Accreditation forum – Mezinárodní akreditační fórum
IKK	Vnitřní kontrola kvality
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation – Mezinárodní spolupráce v oblasti akreditace laboratoří
IS	Vnitřní standard
ISO	International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro standardizaci
KL ÚHKT	Komplement laboratoří ÚHKT
MLA	Multilateral Agreement – Multilaterální dohoda o vzájemném uznávání

MPA	Metodický pokyn pro akreditaci
MRA	Mutual Recognition Arrangement – Dohoda o vzájemném uznávání státních etalonů a certifikátů vydávaných národními metrologickými úřady
MZ	Ministerstvo zdravotnictví
NASKL	Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře
POCT	Point of care testing – testování u lůžka pacienta
PGE1	Prostaglandin E1
PP	Polypropylen
PRP	Plazma bohatá na destičky
SOP	Standardní operační postup
SRA	Serotonin release assay
RPN	Číslo priority rizika
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze

Úvod

Kvalita poskytování zdravotní péče je v dnešní době na předních stupních zájmu jak odborné veřejnosti, tak klientů. Zdravotnické laboratoře mají zásadní význam v diagnostice zdravotního stavu pacienta a je tedy žádoucí, aby servis poskytovaný laboratořemi byl na co nejvyšší úrovni. V oblasti laboratorních vyšetření je jednou z metod pro potvrzení kvality poskytované péče zdravotnickou laboratoří akreditace podle mezinárodní normy ISO 15189. Získání statusu akreditované laboratoře přináší laboratoři prestiž, posílení pozice na trhu a pro zákazníky je zárukou kvality poskytovaných služeb.

Hlavním cílem diplomové práce je navržení postupu přípravy laboratorní metody Kvalitativní stanovení Heparinem indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC k akreditaci. Na základě zhodnocení současného stavu a pochopení problematiky procesu a požadavků akreditace bude při přípravě k akreditačnímu šetření postupováno podle normy ČSN EN ISO 15189:2013 Zdravotnické laboratoře- Požadavky na kvalitu a způsobilost. Součástí této normy je požadavek na zavedení managementu rizik v laboratořích. V rámci diplomové práce bude provedena analýza rizik pomocí metody FMEA a Ishikawova diagramu.

Diplomová práce je rozdělena na několik částí. V teoretické části je popsán současný stav problematiky související s akreditacemi. V této části je popsána platná legislativa týkající se akreditace a postup akreditačního šetření a akreditační společnosti v České republice. V kapitole Metody jsou popsány použité metody pro provedení analýzy rizik v diplomové práci, konkrétně Ishikawův diagram a FMEA. Dále je zde uveden postup pro validaci metody a tvorbu Standardního operačního postupu (SOP). V poslední části diplomové práci je provedena analýza rizik metody SRA-HPLC, validace metody a vypracován Standardní operační postup.

1 Současný stav problematiky

Kvalita poskytované zdravotní péče je stále více sledovaným parametrem, snahou všech zdravotnických zařízení je neustálé zlepšování kvality nabízených služeb. Jedním z nástrojů, kterým lze prokázat kvalitu zdravotnického zařízení, je akreditace. Akreditace probíhá v jednotlivých státech za pomoci národních akreditačních orgánů, kteří jsou signatáři multilaterálních dohod o vzájemném uznávání výsledků akreditací.

1.1 Akreditace zdravotnických laboratoří

Akreditace je nezávislé formální uznání třetí osobou ke způsobilosti provádět specifické zkoušky nebo činnosti posuzování shody, které stanovují harmonizované normy. Akreditace je založena na principech nezávislosti, nediskriminačního přístupu, transparentnosti procesu posuzování a jasně stanovených kritériích. Pro zdravotní laboratoře slouží jako nástroj k prokázání jejich způsobilosti a schopnosti zajištění poskytování přesných a spolehlivých výsledků [1, 2].

Zisk akreditace přináší laboratoři také závazky, laboratoř musí být neustále v souladu s požadavky aplikované normy. V případě jakékoli změny je třeba tuto změnu ohlásit akreditačnímu orgánu. Akreditační osvědčení smí laboratoř používat pouze v souvislosti s oborem, který byl úspěšně posuzován. V případě odebrání akreditace ji musí ihned přestat používat [1].

1.1.1 Akreditace zdravotnických laboratoří mimo EU

Vzhledem k mezinárodním úmluvám je norma ISO 15189 platná ve všech státech, které jsou signatáři mezinárodní úmluvy International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC).

V USA je akreditace zdravotnických laboratoří zajišťována následujícími společnostmi: the Joint Commission, College of American Pathologists, American Association of Bioanalysts. Akreditace zdravotnických laboratoří je vyžadována pro smlouvu s vládním programem MEDICARE a MEDIAID. Stejný systém nalezneme také v Austrálii, kde je akreditujícím orgánem NATA. V Kanadě akreditace laboratoří není povinná, ale stále více laboratoří ji využívá. Národním akreditačním orgánem je zde Accreditation Canada [3, 4].

1.1.2 Akreditace zdravotnických laboratoří v EU

Akreditace zdravotnických laboratoří jsou prováděny prostřednictvím národních akreditačních orgánů. Národní akreditační orgán je jediným poskytovatelem akreditace pro svou zemi. Jednotlivé národní akreditační orgány jsou sdruženy v rámci regionální

spolupráce při EA. Ve všech státech EU probíhá akreditační proces v souladu s normou ISO 15189, popř. dobíhá akreditační období s normou ISO 17025 [5, 6].

V případě, kdy v dané zemi není akreditace nabízena vlastním národním akreditačním orgánem, je možnost využití národního akreditačního orgánu jiného státu na základě dohody o přeshraniční akreditaci. Této možnosti využívají například Albánie (spolupráce s řeckým akreditačním orgánem), Island (švédský akreditační orgán) a Slovinsko (chorvatský akreditační orgán) [6].

Povinná akreditace zdravotnických laboratoří je pouze v pěti státech EU (Francie, Belgie, Maďarsko, Irsko, Litva, ČR). V těchto státech je akreditace povinná buď pro určitá odvětví laboratorních vyšetření, anebo pro všechna vyšetření. Belgie požaduje povinnou akreditaci pro oblast molekulární biologie. V Irsku platí povinnost akreditace laboratoří pro imunohematologii a krevní transfúze, v Litvě pro biochemii a hematologii. V ČR je akreditace povinná pro oblast genetických laboratoří. V Německu, Rumunsku a Itálii je akreditace vyžadována pro uzavření smlouvy s pojišťovnami. Ve Velké Británii, Irsku a Holandsku je využíváno akreditace pomocí národních standardů, tyto standardy jsou vytvořeny na stejné bázi jako norma ISO 15189. Nejvyšší procento akreditovaných laboratoří v rámci EU nalezneme ve Finsku, Irsku, Švédsku, Švýcarsku a Velké Británii [6, 7, 8]. V tabulce č.1.1 je uveden přehled akreditačních orgánů v Evropě.

Tabulka 1.1: Přehled národních akreditačních orgánů v Evropě [9]

Stát	Národní akreditační organ
Belgie	BELAC
Kypr	CYS-CYSAB
Česká republika	ČIA
Dánsko	DANAK
Estonsko	EAK
Finsko	FINAS
Francie	COFRAC
Německo	DAkkS
Řecko	ESYD
Irsko	INAB
Litva	LATAK
Malta	NAB-MALTA
Nizozemsko	RVA
Norsko	NA
Portugalsko	IPAC
Chorvatsko	HAA
Srbsko	ATC
Španělsko	ENAC
Švýcarsko	SAS
Turecko	TURKAS
Velká Británie	UKAS
Rumunsko	RENAR
Itálie	ACCREDIA

1.1.3 Zahraniční studie zabývající se akreditacemi

Procesem akreditace se zabývá řada zahraničních studií. Do diplomové práce byly vybrány studie, které se zabývají samotným procesem přípravy na akreditaci podle normy ISO 15189, přínosy akreditace a dopady akreditace na výsledky vyšetření. Vybrané studie jsou shrnuty v tabulce č. 1.2.

Tabulka 1.2: Seznam zahraničních studií [vlastní]

Číslo studie	Autoři	Jméno studie	Rok vydání	Zaměření	Ref.
1	BOURSIER, Guilaine, Ines VUKASOVIC, Pika Mesko BRGULJAN, et al.	Accreditation process in European countries – an EFLM survey:	2015	Proces akreditace v jednotlivých státech EU	[6]
2	GUZEL, Omer a Ebru Ilhan GUNER	ISO 15189 Accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I	2009	Příprava na akreditaci podle normy ISO 15189 v laboratoři	[7]
3	PETER, ROTZ, BLAIR, KNIHE, FREEMAN, MURTAGH	Impact of Laboratory Accreditation on Patient Care and the Health System	2015	Vliv akreditace laboratoře na péči o pacienta	[8]
4	GARCIA HEJL, Carine, Jose Manuel RAMIREZ, Philippe VEST, et al.	Working Towards Accreditation by the International Standards Organization 15189 Standard: How to Validate an In-house Developed Method, an Example of Lead Determination in Whole Blood by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry	2014	Validace laboratorní metody podle normy ISO 15189	[10]
5	IACOB, Erica, Lia VANZETTI, Salvatore GENNARO, et al.	Quality management system and accreditation of measurements in a surface science laboratory: the case study of MiNALab	2014	Postup přípravy na akreditaci v laboratoři a její dopady na organizaci práce	[11]
6	YANIKKAYA-DEMIREL, Gulderen	ISO 15189 accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory II.	2009	Postup přípravy na akreditaci v laboratoři a její dopady na organizaci práce	[12]
7	JANG, Mi-Ae, Young Ahn YOON, Junghan SONG, et al.	Effect of Accreditation on Accuracy of Diagnostic Tests in Medical Laboratories	2017	Vliv akreditace na přesnost diagnostických testů a porovnání s neakreditovanými subjekty	[13]

Číslo studie	Autoři	Jméno studie	Rok vydání	Zaměření	Ref.
8	HUISMAN, Wim, A. Rita HORVATH, David BURNETT, et al.	Accreditation of medical laboratories in the European Union	2007	Studie se zabývá procesem akreditace v EU	[14]
9	ALKHENIZAN, Abdullah, Charles SHAW, Philippe VEST, et al	Impact of Accreditation on the Quality of Healthcare Services: A Systematic Review of the Literature.	2011	Systematická rešerše přínosů akreditace	[15]

Akreditačním procesem v EU se zabývá studie z roku 2015. Tato studie probíhala pomocí rozeslání online dotazníku delegátům 39 EFLM jednotlivých států v EU. Dotazník obsahoval otázky zaměřené na počet akreditovaných laboratoří, možnost flexibilního rozsahu akreditace, POCT. Z 39 odeslaných dotazníků bylo navráceno 29 dotazníků, tedy 74 %. Z dotazníků, které byly zpět doručeny autorům, bylo potvrzeno, že proces akreditace zdravotnické laboratoře je v těchto zemích zaveden. Ve třech zemích není zřízen národní akreditační orgán, zde využívají přeshraniční spolupráce. Studie se dále zabývá povinností akreditace v jednotlivých zemích a součinností se státní správou [6].

Stejnou problematikou se zabývá i studie z roku 2007. Tato konstatuje, že akreditace probíhá za pomoci národních akreditačních orgánů. Tyto orgány vzájemně spolupracují v rámci regionální spolupráce při EA. V rámci jednotlivých spolupracujících zemí se liší frekvence dozorových návštěv od 1 do 4 let. Autoři studie poukazují na sjednocení této frekvence [14].

Důležitostí akreditace zdravotnické laboratoře se zabývá studie autorů Peter, Rotz, Blair, Knihe a spol. z roku 2015. V této studii autoři popisují přínosy akreditace zdravotnické laboratoře. Opět zaznamenávají, že akreditace může být dobrovolnou i povinnou aktivitou, záleží na vnitrostátní politice kvality. Studie potvrzuje, že akreditace laboratoře, respektive účast v PT programech, vede ke snížení laboratorních chyb. Poukazuje však také na nutnost provedení dalších studií, které by toto potvrdily [8].

Zkušenosti s akreditací laboratoře podle normy ISO 17025 popisuje studie autorů Iacoba a spol. z roku 2014. Autoři popisují proces zavádění systému řízení kvality na základě normy ISO 17025 do laboratoře MiNALab v Itálii. Analyzují proces přípravy na akreditaci metod a shrnují s odstupem čtyř let přínosy akreditace, mezi něž řadí zlepšení systému kvality v laboratoři, zkvalitnění práce v laboratoři, lepší obraz pro zákazníka laboratoře, zlepšenou detekci chyb a jejich opravy. Jako stinnou stránku

akreditace popisují finanční náročnost procesu a potřebu zaměstnání více pracovníků [11].

Studie autorů Guzel a Guner popisuje zkušenost s přípravou akreditace laboratoří podle normy ISO 15189. Autoři popisují postup přípravy k akreditačnímu šetření, jednotlivé kroky postupu od samotného rozhodnutí se přihlásit k akreditaci až do akreditačního šetření. Doba přípravy k akreditačnímu šetření v laboratoři obsahující přípravu dokumentace a organizaci práce může trvat až dva roky [7].

Zkušenosti s akreditací laboratoří podle normy ISO 15189 shrnuje i studie autora Yanikkaya z roku 2009. Autor popisuje přístup jejich laboratoře k akreditaci. V rámci přípravy k akreditaci byla provedena SWOT analýza, která týmu ukázala silné a slabé stránky laboratoře. Autoři dále popisují problém s tvorbou nápravných opatření. Pro zajištění dodržování tvorby nápravných a preventivních opatření byl vytvořen systém odměn pro zaměstnance. Zaměstnanci, kteří se podíleli na zlepšování kvality poskytovaných služeb, byli bonifikováni. Od tohoto návrhu si autoři práce slibují zvýšení kvality poskytovaných služeb [12].

Korejská studie z roku 2017 se zaměřila na srovnání rozdílů mezi laboratořemi akreditovanými korejským akreditačním programem a laboratořemi bez akreditace. Autoři provedli analýzu skóre indexu variability těchto dvou skupin v rozmezí roků 2010 až 2013. Skupina akreditovaných laboratoří vykazovala nižší variabilitu výsledků než skupina bez akreditace. Výsledky studie potvrdily, že standardizace laboratorních postupů (požadavek akreditace) je spojena s vyšší přesností laboratorních testů [13].

Systematickou rešerši dopadů akreditace na kvalitu poskytování zdravotnických služeb se zabývali autoři Alkhenizan a Shaw. Ve své práci čerpají z 26 provedených studií z různých databází (Medline, HealthStar, EMBase), které hodnotí dopady akreditace. Autoři nejdříve popisují proces vyhledávání studií, zadávání klíčových slov a kritéria pro zařazení studie. Celkově bylo nalezeno 520 abstraktů, z toho 51 studií bylo způsobilých pro zařazení do přezkumu. Z těchto studií bylo vyloučeno 25 studií (popis osobního postoje zaměstnanců k akreditaci, nákladové analýzy akreditace). Celkově bylo tedy identifikováno 26 studií. Po zhodnocení těchto studií došli autoři k závěru, že akreditační programy zlepšují proces poskytované péče ve zdravotnických zařízeních a klinické výsledky [15].

Poslední zmíněná studie se týká procesu validace laboratorní metody podle normy ISO 15189 autorů Garcia, Ramirez, Vest a spol. Autoři ve své práci popisují proces akreditace detekce a kvantifikace olova pomocí absorpční spektrometrie. V práci jsou porovnávána různá doporučení pro vytvoření validačního protokolu a na základě těchto poznatků je navržen vlastní validační protokol [10].

1.1.4 Mezinárodní akreditační organizace

V oblasti akreditace existuje ve světě několik organizací, které zajišťují mezinárodní spolupráci a rozvoj v této oblasti. Mezi tyto organizace řadíme [16]:

- EA – European co-operation for Accreditation – Evropská spolupráce pro akreditaci zkušebních a kalibračních laboratoří, certifikačních a inspekčních orgánů;
- ILAC – International Laboratory Accreditation Cooperation – Mezinárodní spolupráce pro akreditaci zkušebních a kalibračních laboratoří;
- IAF – International Accreditation Forum – Mezinárodní sdružení pro akreditaci certifikačních orgánů;
- ISO – International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro normalizaci.

1.1.5 Dokumenty EU týkající se akreditace

Oblast problematiky akreditace v rámci EU upravují následující dokumenty [17]:

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 765/2008 ze dne 9. 7. 2008, které stanovuje požadavky na akreditaci a dozor nad trhem týkající se uvádění výrobků na trh;
- Rozhodnutí Evropského parlamentu a Rady č. 768/2008/ES ze dne 9. 7. 2008 o společném rámci pro uvádění výrobků na trh a o zrušení rozhodnutí Rady 93/465/EHS s opravou 1. 7. 2015 v Úředním věstníku EU;
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 764/2008 ze dne 9. 7. 2008 stanovující postupy týkající se uplatňování některých vnitrostátních technických pravidel u výrobků uvedených v souladu s právními předpisy na trh v jiném členském státě a kterým se zrušuje rozhodnutí č. 3052/95/ES.

1.1.1 Akreditace zdravotnických laboratoří v ČR

V laboratorní oblasti probíhá externí hodnocení prostřednictvím akreditace podle ČSN EN ISO 15189:2013 *Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost*. Personální požadavky na odborné obsazení zdravotnických laboratoří jsou stanoveny Vyhláškou MZ 99/2012 Sb. – Vyhláška o požadavcích na minimální personální zabezpečení zdravotních služeb a nepodkročitelná minima odborných lékařských společností České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (ČLS JEP) [1, 18].

Mezi základní požadavky na akreditované laboratoře patří:

- dostupnost,
- komplexnost,
- rychlá odezva,

- spolehlivost a správnost,
- informovanost a konzultace,
- analýza stížností a reklamací.

Získem akreditace se laboratoř zavazuje k zachování vysoké kvality poskytovaných služeb, neustálé práci na zlepšování a minimalizaci rizik. Pro tyto důvody si každá laboratoř stanovuje a sleduje indikátory kvality. Při volbě indikátoru kvality volíme takový indikátor, který je měřitelný, dosažitelný, užitečný a dokážeme jeho výsledky interpretovat [18].

Norma ČSN EN ISO 15189: 2013 klade na každou akreditovanou laboratoř požadavky na vedení řady dokumentů. Mezi nejzákladnější z nich patří Laboratorní příručka a Příručka kvality. Příručka kvality je souhrnným dokumentem, který popisuje strukturu laboratoře a systém řízení všech hlavních a podpůrných činností laboratoře. Laboratorní příručka je dokument určený primárně pro zákazníka laboratoře a musí k ní mít přístup. Její struktura je vytvořena na základě požadavků normy ČSN EN ISO 15189: 2013. Laboratorní příručka poskytuje kromě jiného přehled poskytovaných vyšetření, žádanky na jednotlivá vyšetření, manuál pro odběr primárních vzorků, dobu trvání zpracování vzorků a postup vydání výsledků vyšetření. Pro každou akreditovanou laboratorní metodu musí být vypracován tzv. Standardní operační postup (SOP), ve kterém je popsán přesný postup metody, postup její validace a verifikace, oprávněné osoby atd. Tímto SOP jsou povinni se všichni pracovníci laboratoře řídit. Všechny tyto dokumenty musí být v laboratoři pro zaměstnance přístupné [17].

Právní předpisy ČR regulující oblast akreditace

Oblast akreditací regulují v ČR následující právní předpisy [19]:

- zákon č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky, ve znění pozdějších předpisů;
- vyhláška č. 490/2009 Sb., o rozsahu znalostí a dalších podmínkách k získání odborné způsobilosti v některých oborech ochrany veřejného zdraví. Obsahuje novelu zákona č. 22/1997 Sb.;
- zákon č. 155/2010 Sb., obsahuje novelu zákona č. 22/1997 Sb.;
- zákon č. 100/2013 Sb., Zákon, kterým se mění zákon č. 22/1997 Sb., obsahuje novelu zákona č. 22/1997 Sb.;
- zákon č. 500/2004 Sb., Správní řád;
- zákon 373/2011 Sb., O specifických zdravotních službách (určuje povinnou akreditaci pro laboratoře zabývající se laboratorní analýzou lidského zárodečného genomu nebo jeho částí).

Český institut pro akreditaci, o.p.s.

Český institut pro akreditaci, o. p. s.(ČIA), je notifikován a uznán Evropskou komisí jako jediný akreditační orgán České republiky. ČIA byla založena vládou České

republiky v roce 1993. Rozhodnutím ministra průmyslu a obchodu č. 319/2009 ze dne 17. 12. 2009 o notifikaci ČIA Komisí Evropského parlamentu a Rady je ČIA jako formálně uznaný vnitrostátní akreditační orgán oprávněn provádět akreditaci v souladu s ES č. 765/2008 v rozsahu specifikovaném tímto rozhodnutím. Jako národní akreditační orgán musí plnit požadavky mezinárodní normy ISO/IEC 17011. Plnění všech požadavků je nutné pro úspěšnou evaluaci, která umožňuje podepsat takzvanou Multilaterální dohodu o vzájemném uznávání výsledků akreditace (EA MLA). EA MLA je dohoda členských akreditačních orgánů, která zajišťuje rovnocennost akreditačních systémů. Na základě této dohody a evropského nařízení 765/2008 je akreditace vydána národními akreditačními orgány povinně uznatelná ve všech ostatních státech EU [20].

ČIA zajišťuje akreditaci pro [20]:

- laboratoře zkušební, kalibrační, zdravotní;
- inspekční orgány;
- certifikační orgány certifikující osoby, produkty, systémy managementu;
- ověřovatele výkazů emisí skleníkových plynů;
- poskytovatele zkoušení způsobilosti pro zkušební a kalibrační laboratoře.

NASKL

NASKL ČLS JEP (Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře při České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně) je edukační a poradenský orgán, který pomáhá laboratořím implementovat kvalitu a připravuje laboratoře k absolvování průkazu kvality. Hlavním posláním NASKL je edukace. Při své činnosti vychází z normy ISO 15189, hlavní důraz klade na odborné prvky a spolupráci s odbornými společnostmi. Řídícím orgánem NASKL je Rada pro akreditaci ČLS JEP [22, 23].

V případě spolupráce mezi laboratořemi a NASKL je prvním krokem registrace laboratoře. Registrovaná laboratoř tak deklaruje dobrovolný zájem zvyšovat kvalitu. Získá přístup k edukačním materiálům a podkladům pro přípravu na Audit I nebo Audit II nebo akreditaci podle ISO 15189 včetně metodických pokynů, vzorové dokumentace, školení, seminářů a webových služeb [21, 22].

Mezi základní služby, které NASKL poskytuje registrovaným laboratořím, patří [21, 22]:

- konzultační činnost,
- metodické pokyny,
- vzorová dokumentace,
- semináře a školení,
- audit I,

- audit II,
- dozorový audit

Audit I je prověření základní přípravy laboratoře na průkaz kvality a obsahuje prověrku především v oblasti odborných prvků, předpokládá se pokračování s vyšším podílem systémových prvků (Audit II nebo akreditace). Při Auditu I se prověřuje 6 oblastí (Pracovníci, Přístrojové vybavení laboratoře, Preamalytická fáze, Vyšetřovací postupy, Zajištění kvality vyšetřovacích postupů, Postanalytická fáze), při Auditu II přichází navíc prověrka dalších prvků (Řízení laboratoře, management kvality, Řízení a uchovávání dokumentace v laboratoři, Identifikace neshodné práce, nápravná a preventivní opatření, Metrologie). Audity provádí tým posuzovatelů, který pokrývá prakticky všechny základní odbornosti. Posuzovatelé jsou experti schválení odbornými společnostmi, mají kvalifikaci a praxi v příslušném laboratorním oboru, jsou proškoleni ve spolupráci s ČIA. Další užitečnou činností před auditem je konzultační návštěva, která efektivně přispívá ke zvyšování kvality činnosti laboratoře [21, 22].

1.2 Proces akreditace

Základní etapy akreditačního procesu [17,19]:

1. přijetí žádosti a její evidence,
2. přezkoumání žádosti,
3. příprava na posuzování,
4. přezkoumání dokumentů a záznamů,
5. posuzování na místě,
6. rozhodování a udělování akreditace.

1.3 Přínosy akreditace

Proces přípravy na akreditaci a samotný zisk akreditace by měl znamenat pro laboratoř/ lékařské zařízení přínos. Přínosy akreditace se zabývala řada studií, které jsou uvedeny v tabulce č.1.2. Přínosy akreditace lze rozdělit do dvou skupin, a to přínosy pro samotnou laboratoř a přínosy pro zákazníka.

Mezi hlavní přínosy akreditace pro samotnou laboratoř lze zařadit samotný zisk akreditace, a tedy uznání splnění určité deklarované kvality poskytované služby. Tento benefit by měl přivést více zákazníků, kteří obzvláště v oblasti péče o své zdraví vyhledávají co nejkvalitnější služby. Zisk akreditace vede ke zvýšení prestiže laboratoře a ke zvýšení důvěry zákazníků. Vlivem standardizace postupů v laboratoři dochází i k provozní efektivitě na pracovišti. Laboratoře mají možnost porovnání svých výsledků v rámci externí kontroly kvality, čímž si mohou ověřit správnost svých výsledků. V mnoha státech je zisk akreditace povinností, popř. je podmínkou pro uzavření smlouvy s pojišťovnou a proplácení jednotlivých vyšetření. V České republice

je zisk akreditace na laboratorní vyšetření zohledňován při bodovém ohodnocení výkonu u pojišťovny a otázkou prestiže daného zařízení.

Pro zákazníka laboratoře lze jako hlavní benefit označit zaručení kvality výsledků od akreditované laboratoře a pravidelný dohled akreditačního orgánu na laboratoř. Ve studiích bylo dokázáno, že v laboratořích, které jsou akreditovány, dochází k menšímu množství chyb ve výsledcích než v neakreditovaných laboratořích. Akreditační standardy také vyžadují neustálé vzdělávání pracovníků a vyvíjejí tlak na neustálé zlepšování služeb, které laboratoře poskytují. Laboratoře tak mají vyhovující vybavení a personální obsazení, které je potřeba pro zajištění kvalitního provozu laboratoře, a tedy i vydávání správných výsledků vyšetření [7, 15].

1.4 ISO normy

ISO normy jsou vydávány společností ISO – International Organization for Standardization. Tyto normy jsou mezinárodně uznávané a zaručují, že výrobek nebo služba, které se touto normou řídí, jsou bezpečné, spolehlivé a kvalitní. První normy byly přijaté v roce 1987, jejich koncepcí je univerzální systém, který je vhodný pro široké použití od velké po malou firmu a zároveň pro různá odvětví (stavebnictví, IT, komunikační technologie, zdravotnictví, strojírenství). Hlavním posláním norem je sjednotit jednotlivé standardy v různých zemích, čímž se vytváří jednotný systém, který umožní uznávání např. laboratorních testů napříč všemi laboratořemi, které splňují danou ISO normu. Normy také využíváme jako strategický nástroj, kterým lze docílit zlepšení kvality nabízených služeb, snížení nákladů a minimalizace produkce odpadu. Zavedení a ověřování norem je dobrovolnou aktivitou, která může být vyžadována pouze v legislativně určených případech, kdy je akreditace nebo certifikace vyžadována [24, 25].

Normy jsou v České republice vydávány v souladu se zákonem č. 22/1997 Sb., jejich přístupnost je však omezena a jednotlivé normy se dají pouze zakoupit v elektronické či papírové podobě.

Zavedení a ověření správného fungování norem zajišťují pomocí akreditací a certifikací společnosti, které k tomu získaly akreditaci od příslušného národního akreditačního orgánu.

1.4.1 Nejdůležitější normy pro řízení kvality v laboratoři

V této kapitole jsou popsány nejdůležitější normy objevující se v souvislosti s řízením kvality ve zdravotnických laboratořích.

ČSN EN ISO 9000 Systém managementu kvality – Základní principy a slovník

Tato norma popisuje základy managementu kvality a upřesňuje pojmy související s kvalitou a jejím zabezpečením [25].

Základ norem ISO 9000 tvoří osm zásad managementu kvality [25]:

- zaměření na zákazníka,
- vedení a řízení zaměstnanců (vůdčí role),
- zapojení zaměstnanců,
- procesní přístup,
- systémový přístup managementu,
- neustálé zlepšování,
- přístup k rozhodování zakládající se na faktech,
- vzájemně prospěšné dodavatelské vztahy.

ČSN EN ISO 9001 Systém managementu kvality – Požadavky

Zavedení systému podle této normy pomáhá identifikovat a uspořádat veškeré činnosti, přesně definovat pravomoci a odpovědnosti jednotlivých pracovníků, dbá na kontrolu zajištění odpovídající úrovně údržby zařízení, správný výběr dodavatelů a mnoho dalšího. Mezi základní požadavky, které norma stanovuje, je neustálé sledování a plnění spokojenosti zákazníka a snaha o trvalé zlepšování se. Norma dále používá tzv. procesní přístup při tvoření systému managementu kvality [26].

Základ normy ISO 9001 tvoří sedm základních principů řízení kvality [26]:

- zaměření na zákazníka – plnit a překonávat očekávání zákazníka;
- řízení – uvést účel, směřování zakázek;
- zapojení lidských zdrojů – rozpoznání, posílení a zkvalitnění dovedností a znalostí;
- zaměření na procesy – zavedení procesů za účelem optimalizace výkonů;
- zlepšování – udržení aktuální výkonnosti a vytváření nových příležitostí;
- rozhodování dle skutečnosti – fakta, podklady a analýza dat pro účely rozhodování;
- řízení vztahů – řízení vztahů se zainteresovanými stranami za účelem optimalizace výkonu.

ČSN EN ISO 15189: 2013 Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost

Norma, která také slouží jako základní materiál pro posuzování zdravotnických laboratoří. Požadavky normy ČSN EN ISO 15189: 2013 se skládají ze dvou částí. První část zahrnuje požadavky všech částí ISO 9001, navíc obsahuje požadavek subjektu posuzování shody, například nestrannosti a nezávislosti z jiné strany. Druhá část zahrnuje požadavky na laboratorní působnost (například personální, zařízení, přístroje a metody vyšetření), kromě toho požaduje účast laboratoří na testování způsobilosti a kontrolu kvality výsledků laboratoří. Dalším požadavkem na akreditované laboratoře je

validace nebo ověření každé zkušební metody a pravidelná účast na externí kontrole kvality [17].

Akreditace podle normy ČSN EN ISO 15189: 2013 se zaměřuje na pět kritických míst [17,18]:

1. odběr vzorku, popřípadě informace o postupu odběru vzorku,
2. provedení vyšetření,
3. interpretace výsledků laboratoří,
4. poskytování názoru i výsledku testu na základě diagnózy pacienta,
5. etické hodnoty – první povinností je pacient.

1.5 Heparinem indukovaná trombocytopenie

Heparinem indukované trombocytopenie (HIT) je jednou z hlavních komplikací léčby heparinem, která se vyskytuje přibližně u 5 % pacientů léčených pomocí nefrakcionovaného heparinu. HIT se nejčastěji vyskytuje u pacientů po ortopedických a kardiologických zákrocích. Heparinem indukovaná trombocytopenie je způsobena specifickými protilátkami, které rozpoznávají komplexy heparinu a destičkového faktoru 4, což vede k aktivaci krevních destiček. V případě podezření na HIT musí být zahájena léčba jiným antikoagulačním lékem, než je heparin, čímž je zabráněno vzniku dalších komplikací, které by mohly mít fatální důsledky [27, 28].

1.5.1 Klinické projevy

V klinickém obraze můžeme pozorovat rozvoj trombocytopenie a trombózy. Trombocytopenie se nejčastěji objevuje pátý až desátý den po zahájení léčby heparinem. Projev trombocytopenie v tomto časovém období je jedním z nejdůležitějších parametrů k posouzení míry pravděpodobnosti stanovení diagnózy HIT. Pro stanovení diagnózy HIT je důležitým faktorem míra poklesu krevních destiček, u zhruba 10–15 % nemocných se sníženým počtem krevních destiček o 30–50 % výchozích hodnot nemusí počet krevních destiček dosáhnout hranice trombocytopenie, ačkoli se jedná o diagnózu HIT [28, 29].

Mezi další klinické příznaky HIT patří trombotické příhody, které mohou být mylně interpretovány jako selhání léčby heparinem. Trombóza postihuje jak žilní, tak venózní řečiště. Mezi nejčastější projevy patří hluboká žilní trombóza, plicní embolizace, akutní končetinová ischemie, cévní mozková příhoda a infarkt myokardu [29, 30].

1.5.2 Diagnostika HIT

Pro diagnostiku HIT se využívá zhodnocení klinického stavu a laboratorní testy. V klinické praxi je využíváno 4Ts skórovacího systému, při tomto systému se udělují 0–2 body pro jednotlivé příznaky HIT. Tabulka je zaměřena na počet trombocytů, čas

začátku příznaků a výskyt komplikací. Po ohodnocení jednotlivých příznaků je sečten počet bodů a získáno celkové skóre. Bodová hodnota 0–3 body znamená nízkou pravděpodobnost pozitivitu laboratorních testů HIT a je možné pokračovat v podávání heparinu. Skóre 4–5 bodů představuje střední riziko HIT. Hodnota 6–8 bodů značí vysokou pravděpodobnost HIT a je důvodem k zastavení podávání heparinu a jeho náhradě jiným antikoagulačním přípravkem [31].

Tabulka 1.3: 4Ts skórovací systém [31]

	2 body	1 bod	0 bodů
Trombocytopenie	Pokles počtu destiček o více jak 50 %, nadir destiček ≥ 20 G/l	Pokles destiček o 30–50 % nebo nadir 10–19 G/l	Pokles destiček o méně než 30 % nebo nadir pod 10 G/l
Doba poklesu počtu destiček	Projev poklesu mezi 5. a 10. dnem nebo pokles <1 den	Nejasný počátek poklesu, rozvoj po 10. dni	Není
Trombóza nebo jiná komplikace	Nově potvrzená trombóza, kožní nekróza v místě injekce heparinu, akutní systémová reakce po i.v. heparinu	Progresivní nebo opakovaná trombóza, nenekrotizující kožní léze, suspektní trombóza	Není
Jiná příčina trombocytopenie	Není	Je možná	Je zřejmá

Pro potvrzení HIT se využívají laboratorní testy, které dělíme na imunologické a funkční. Imunologické testy jsou založeny na reakci antigenu a příslušné protilátky. Jejich pomocí stanovujeme přítomnost specifické protilátky v séru. Imunologické testy jsou charakterizovány vysokou senzitivností, ale nízkou specifíčností. Jejich nevýhodou je častější výskyt falešně pozitivních a negativních výsledků než při použití funkčních testů. Funkční testy testují schopnost HIT protilátek ze séra nebo plazmy pacienta aktivovat krevní destičky dárce [32].

Imunologické testy:

- PF4/heparin EIA (ELISA imuno assay),
- metody sloupcové aglutinace ID-HPF4 (Diamed),
- PIFA Heparin/platelet Faktor 4,
- Rapid assay – test typu Bed-side.

Funkční testy:

- Agregační test,

- Heparinem indukovaná aktivace destiček (HIPA),
- Průtoková cytometrie,
- DT 40 – luciferasa,
- C14-serotonin release assay,
- Serotonin release assay.

Heparinem indukovaná aktivace destiček (HIPA)

Při tomto testu jsou destičky zdravého dárce inkubovány s tepelně inaktivovaným patientským sérem a nízkou a vysokou koncentrací heparinu v mikrotitrační destičce po dobu 45 minut za stálého míchání. V případě pozitivního vzorku se suspenze projasní v přítomnosti nízké koncentrace heparinu. Naopak v přítomnosti vysoké koncentrace heparinu se suspenze neprojasní. Metoda je založena na vizuální kontrole shlukování aktivovaných krevních destiček v průběhu času. Vyhodnocení se provádí na mikrotitračních destičkách a výsledek se odečítá proti černému pozadí [29, 30].

C14 – serotonin release assay (SRA)

Tento test je označován za zlatý standard funkčních testů. Princip metody spočívá v inkubaci krevních destiček s radioaktivně značeným C¹⁴ serotoninem a heparinem. Přítomnost HIT protilátek způsobuje aktivaci krevních destiček, jehož následkem je uvolnění radioaktivně značeného serotoninu. Výsledky testu jsou vyjádřeny jako procento uvolněného serotoninu. [33].

Pozitivita testu je definována jako 20 % nebo vyšší uvolňování radioaktivního izotopu z krevních destiček, které byly aktivovány pomocí dvou hladin heparinu, nízké (0,1 U/ml) a vysoké (100U/ml). Pozitivním výsledkem v případě HIT je aktivace krevních destiček při nízké koncentraci heparinu – 0,1 U/ml. Vyšetření HIT pomocí tohoto testu se vyznačuje vysokou citlivostí a senzitivitou. Mezi její nevýhody patří vysoké náklady v důsledku použití radioaktivního materiálu a dostupnost testu vzhledem k technickým požadavkům na test [33].

Serotonin release assay (SRA – HPLC)

Tato metoda je na rozdíl od předchozí zbavena zatížení radionuklidů díky fluorescenční detekci uvolněného serotoninu (5-HT). Při metodě je využíváno promytých krevních destiček od zdravého dárce. Metoda využívá principu HPLC (kapalinová chromatografie s vysokým tlakem) a umožňuje rychlé a citlivé stanovení diagnózy HIT. Metoda probíhá dvoubodově při dvou koncentracích heparinu (nízké a vysoké), kdy za nízké koncentrace heparinu (0,1 U/ml) dochází k aktivaci destiček HIT sérem, zatímco při vysoké koncentraci (100U/ml) je aktivace potlačena díky rozpadu imunokomplexu, a tak je možné vyloučit aktivaci nespecifickou. Pro kontrolu spontánního uvolňování serotoninu (negativní kontrola) je využíváno místo séra Tyrodového pufru. Pro zjištění maximálního množství uvolnitelného serotoninu je

použita aktivace krevních destiček peptidem aktivujícím destičkový trombinový receptor (TRAP) [34].

1.6 ÚHKT

ÚHKT je výzkumnou a zdravotnickou institucí, která je přímo řízena ministerstvem zdravotnictví. Zabývá se výzkumem a léčením hematom-onkologických onemocnění, specializuje se na výzkum závažných krevních chorob. ÚHKT spojuje léčebnou hematologickou péči, diagnostické a výzkumné laboratoře a transfúzní oddělení [35].

ÚHKT poskytuje vysoce specializovanou péči v oblasti hematologických nádorů a zejména leukémií. Dále v oblasti poruch krve tvorby, koagulace krve, a i v řadě dalších oblastí, které nemocným ÚHKT poskytuje. Ústav odpovídá světovým standardům, o čemž svědčí i mezinárodní certifikace JCI, kterou v roce 2016 ÚHKT obhájil [35].

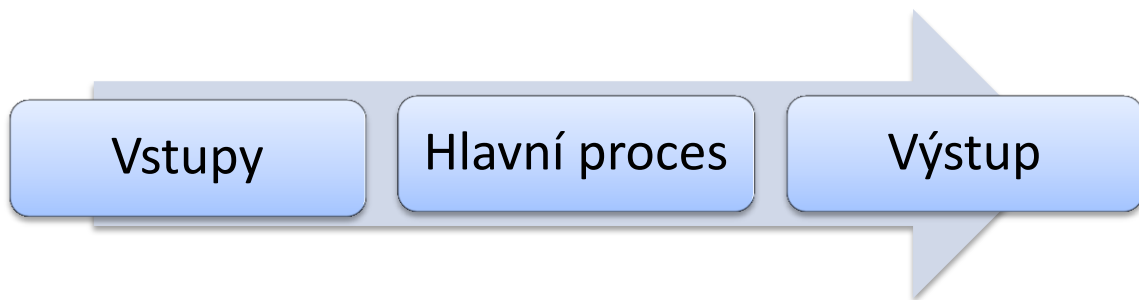
Komplement laboratoří ÚHKT je tvořen jednotlivými laboratořemi rozdělenými do klinického, transfuziologického a výzkumného úseku. Komplement laboratoří je veden v souladu s normou ČSN EN ISO 15189:2013. V roce 2016 proběhlo úspěšné akreditační šetření ČIA.

Oddělení biochemie, na kterém se bude metoda HIT zpracovávat, je součástí Komplementu laboratoří a zabývá se jak rutinní, tak výzkumnou činností. Hlavní činností je studium struktury a funkce krevních destiček a krevních bílkovin účastnících se hemostázy a trombózy.

Stanovení HIT pomocí metody SRA-HPLC je metodou in-house. Metoda zde byla zavedena na základě studií provedených v zahraničí. V České republice je ÚHKT jediným zařízením, které tuto metodu provádí. Pro zavedení metody HIT pomocí SRA-HPLC disponuje veškerým nutným personálním, materiálním a přístrojovým vybavením. Diagnostika HIT se zde již ve spolupráci s Laboratoří imunohematologie provádí.

1.7 Laboratorní procesy

Laboratorní proces definujeme jako logicky uspořádané aktivity s jasně definovanými vstupy a výstupy, kde jsou vstupní zdroje během procesu přeměněny na výstupní produkty. Za vstup v laboratorním procesu považujeme například žádanky o vyšetření. Po vstupním požadavku (přijetí žádanky o vyšetření a k tomu spojených úkonů) následuje hlavní proces zahrnující zpracování biologického materiálu. Konečnou fází tvoří výstup, kterým je protokol o výsledku. Procesní přístup vyžaduje, aby byly jednotlivé procesy identifikovány, určeny jejich vzájemné vazby, vztahy a účinky. Základní schéma procesů v laboratoři je znázorněno na obrázku 1.1 [36, 37].



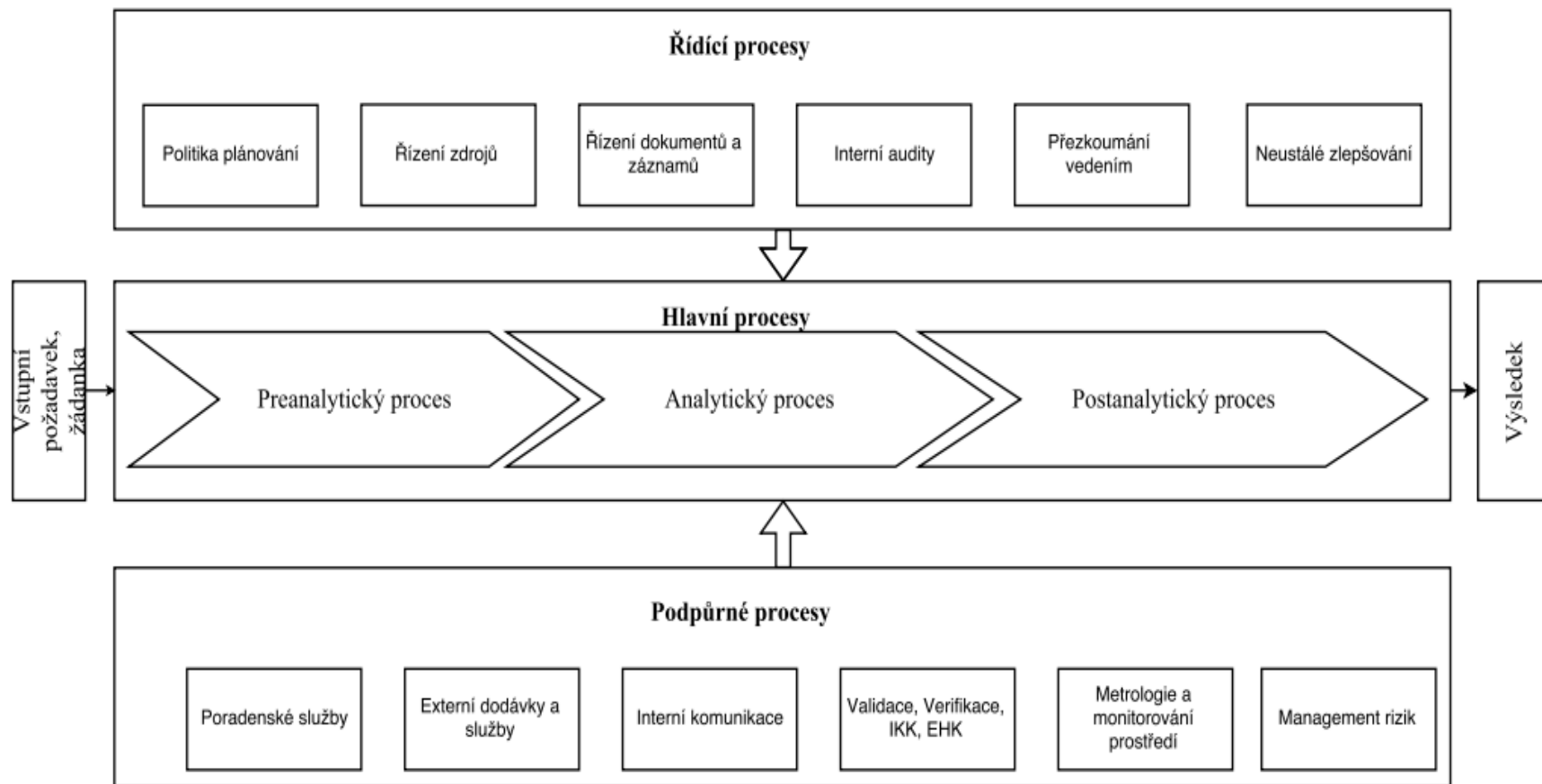
Obrázek 1.1 Základní schéma procesů v laboratoři [36]

Laboratorní procesy je možné rozdělit na procesy řídicí hlavní a podpůrné:

- řídicí procesy (slouží k řízení chodu laboratoře, vyhodnocování chodu laboratoře a zajištění zdrojů pro hlavní proces);
- hlavní (laboratorní vyšetření, nosná činnost laboratoře);
- podpůrné (zabezpečení chodu laboratoře a průběhu hlavního procesu);

Všechny tyto procesy je třeba sledovat, vyhodnocovat a pracovat na jejich zlepšování.

Schéma laboratorních procesů v laboratoři je znázorněno na obrázku 1.2:



Obrázek 1.2: Procesní mapa procesů v laboratoři [17]

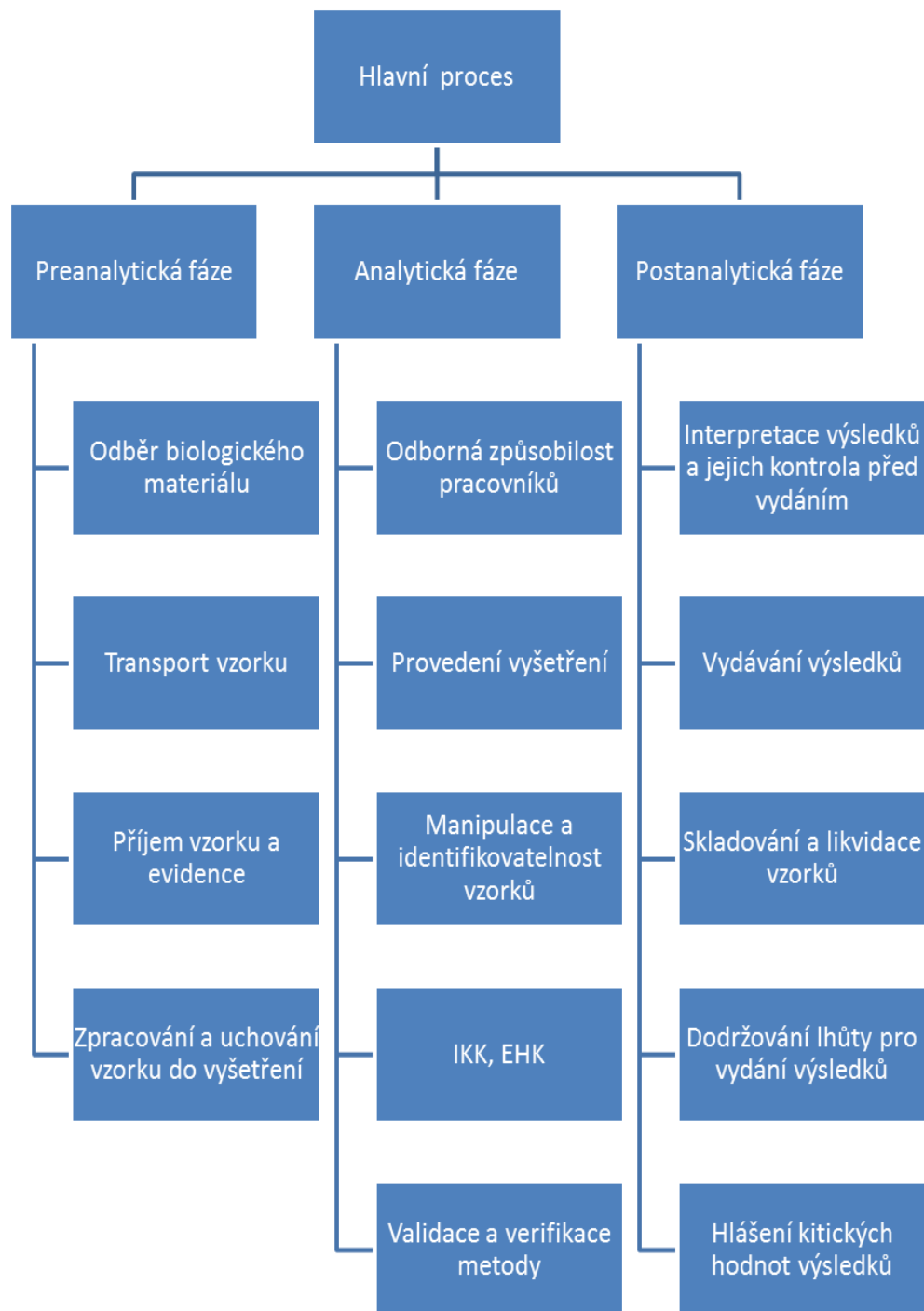
Podle normy ISO 15189 dělíme hlavní proces na následující fáze [17]:

- preanalytická fáze,
- analytická fáze,
- postanalytická fáze.

Pro každou fázi je možné definovat její podpůrné procesy viz. Obrázek 1.3. Mezi podpůrné procesy preanalytické fáze řadíme odběr a transport vzorku, příjem a evidenci vzorku v laboratoři, identifikaci a manipulaci se vzorkem, skladování a zpracování vzorku [36, 37].

Do podpůrných procesů analytické fáze řadíme vlastní analýzu vzorku, proces validace metody a její verifikace, SOP, způsob zajištění IKK a EKK [36, 37].

Podpůrnými procesy postanalytické fáze jsou kontrola a schválení výsledků analýzy, interpretace výsledků odpovědným pracovníkem, hlášení výsledků nacházejících se nad kritickými hodnotami, vystavení protokolu výsledků a likvidace vzorků [36, 37].



Obrázek 1.3: Rozdělení procesů dle normy ISO 15189 [17]

2 Metody

V rámci řízení kvality v ÚHKT a požadavku normy ČSN EN ISO 15189: 2013 je na akreditovaných pracovištích management rizik. Management rizik se zabývá vyhodnocováním dopadů jednotlivých chyb na výsledek laboratorního vyšetření a bezpečnost pacienta. Pro každé potenciaální riziko je třeba přijmout nápravná opatření, která povedou k snížení jeho vlivu na laboratorní vyšetření. Cílem řízení rizik je zvýšení detekce chyb a předcházení vzniku chyb.

2.1 Brainstorming

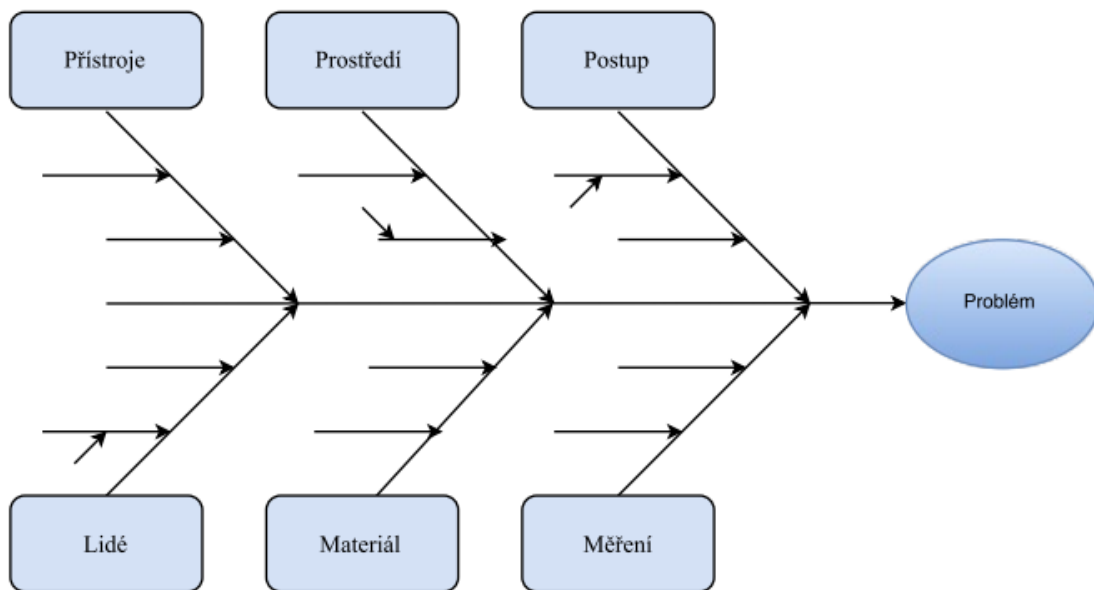
Brainstorming je skupinovou kreativní technikou, jejímž cílem je vytvořit co nejvíce nápadů nebo řešení daného tématu. Mezi základní zásady brainstormingu řadíme vytvoření příjemné atmosféry, která navozuje správné tvůrčí prostředí. Ideální počet členů týmu je 7–9 osob, během brainstormingu jsou si všichni členové týmu rovni. Brainstorming je řízen moderátorem, který jednotlivé návrhy zapisuje. Během brainstormingu by mělo vzniknout co nejvíce návrhů, které nejsou omezeny žádnou kritikou. Právě důraz na absenci jakékoli kritiky je důležitým aspektem pro vytvoření tvůrčí atmosféry, ve které pak mohou vznikat různorodé nápady a jejich následná kombinace. Po vyjádření každého člena týmu a zapsání jeho nápadů dochází k rozebírání nápadů ostatních členů týmu a jejich rozvinutí. Nápady však nesmí být kritizovány. Moderátor brainstormingu jednotlivé nápady zapisuje, tak aby byly přístupné všem členům týmu. V momentě, kdy již nevznikají další nápady, jsou všechny navržené nápady přezkoumány a zapsány [38].

2.2 Ishikawův diagram

Ishikawův diagram neboli diagram příčin a následků je pro svůj vzhled nazýván také diagramem rybí kosti. Ishikawův diagram je jednou z metod řízení rizik, která představuje grafické znázornění nejpravděpodobnějších příčin řešeného problému, potenciaální příčiny jsou obvykle vytvořeny pomocí brainstormingu. Při sestavování diagramu představuje hlavu pomyslné rybí kosti daný problém, hlavní kosti odstupující od páteře značí jednotlivé oblasti příčin, vedlejší kosti představují potenciaální příčiny. Obvykle se používají nejvýše 2 úrovně (příčiny a podpříčiny). Cílem Ishikawova diagramu je určení nejpravděpodobnější příčiny problému. V laboratorní praxi se nejčastěji příčiny dělí do 6 základních skupin (obrázek 2.1), které zahrnují přístroje, postup, prostředí, lidi, materiál, měření [39, 40].

Při tvorbě Ishikawova diagramu vycházíme z brainstormingu, během kterého jednotliví členové navrhnou nápady. Před tvorbou diagramu je třeba jasně definovat

problém a hlavní kategorie možných příčin. Poté se začne sestavovat samotný diagram a přiřazují se jednotlivé příčiny ke kategoriím. Po vytvoření diagramu dojde k identifikaci příčin, které mají pravděpodobně největší vliv na daný problém. Těmto příčinám je třeba věnovat pozornost při tvorbě opatření, která sníží jejich závažnost [40].



Obrázek 2.1: Schéma Ishikawova diagramu [39]

2.3 FMEA (Failure Mode and Effects Analysis)

Metoda FMEA neboli analýza možného výskytu vad a jejich následků je analytickou metodou, která se zaměřuje na odhalení místa možného vzniku vad pomocí týmové spolupráce. Tato metoda byla vyvinuta v šedesátých letech minulého století pro potřeby NASA, první použití v civilní sféře bylo pro potřeby společnosti Ford. Metoda představuje týmovou analýzu možností vzniku chyb v určitém procesu, hodnotí míru jejich rizika a navrhuje nápravná opatření a následně jejich realizaci. Metoda FMEA je obvykle použita před uvedením nového postupu do procesu nebo při změnách postupu procesu. Dalším jejím využitím je přezkoumání již stávajícího procesu, kdy umožňuje odhalit slabá místa procesu a pro ta navrhnout nápravná opatření. Aplikace metody FMEA je důležitou součástí systému kontroly, zkracuje dobu řešení chyb v procesu a optimalizuje proces, čímž umožňuje snížení počtu chyb ve fázi realizace. Pomocí metody FMEA je možné odhalit 70–90 % možných chyb [41, 42].

Metoda FMEA je výsledkem týmové práce. Tým je složen ze zaměstnanců, kteří se podílejí na jednotlivých procesech podléhajících analýze FMEA. Důležitým aspektem

je odbornost hodnotícího týmu. Členové týmu musejí být schopni rozeznat a posoudit velikost a následky různých druhů potenciaálních chyb. Odpovědnost za provedení analýzy pomocí metody FMEA nese pověřený pracovník [42].

Analýzy pomocí metody FMEA probíhají v následujících krocích [44,45]:

1. analýza a hodnocení současného stavu,
2. návrh preventivních opatření,
3. zhodnocení stavu po aplikaci preventivních opatření.

2.3.1 Analýza a hodnocení současného stavu

Prvním krokem FMEA analýzy je analýza současného stavu. Během tohoto kroku dochází k navrhování možných chyb, které se v procesu mohou vyskytovat a ovlivnit konečný výsledek procesu [44, 45].

Následně dochází k analýze příčin a důsledků těchto chyb na konečný výsledek. Hodnotící tým analyzuje ke každé potenciaální chybě její možné příčiny a současný stav kontrolních opatření [44, 45].

Při hodnocení pomocí analýzy FMEA se zaměřujeme na tři hlavní body [45].:

- hodnocení závažnosti chyby,
- hodnocení výskytu chyby,
- pravděpodobnost detekce chyby.

Pro hodnocení parametrů je možné využívat bodové stupnice 1-5 nebo 1-10. V rámci ÚHKT je využíváno bodové stupnice 1–10, kdy hodnota 1 je nejlepší a hodnota 10 nejhorší známkou (viz tabulka 2.1) [45].

Hodnocení závažnosti chyby je bráno vzhledem ke vztahu k následkům, které může daná chyba způsobit. Hodnota 1 znamená bezvýznamnou chybu, naopak hodnota 10 chybu zásadní [45].

Při hodnocení výskytu chyby hodnotíme pravděpodobnost, že se daná chyba vyskytne a ovlivní tak výsledek vyšetření. Hodnota 1 vyjadřuje nepravděpodobný výskyt, hodnota 10 znamená jistý výskyt dané chyby [45].

Při hodnocení detekce chyby hodnotíme účinnost nynějších kontrolních opatření, které vedou k odhalení možné chyby [20]. Při hodnocení detekce chyby vyjadřuje hodnota 1 nejlepší podmínky pro odhalení potenciaální chyby, hodnota 10 značí téměř nemožnost odhalení chyby [45].

Tabulka 2.1: Hodnocení parametrů metody FMEA [45]

Závažnost	Hodnocení	Výskyt	Hodnocení	Detekce	Hodnocení
Žádný	1	Nepravděpodobný výskyt	1	Téměř jistá	1
Velmi málo významný	2	Nízká pravděpodobnost	2	Velmi vysoká	2
Málo významný	3		3	Vysoká	3
Velmi nízká	4	Mírná pravděpodobnost	4	Středně vysoká	4
Nízká	5		5	Střední	5
Střední	6		6	Nízká	6
Vysoký	7	Vysoká pravděpodobnost /četný výskyt	7	Velmi nízká	7
Velmi vysoký	8		8	Slabá	8
Nebezpečný s varováním	9	Velmi vysoká pravděpodobnost	9	Velmi slabá	9
Nebezpečný bez varování	10		10	Absolutně nejistá	10

Na základě bodového ohodnocení jednotlivých kritérií potencionálních chyb je vypočítáno RPN, které se vypočte jako součin bodového hodnocení závažnosti chyby, pravděpodobnosti výskytu chyby a pravděpodobnosti odhalení chyby [44]:

$$RPN = \text{význam} \times \text{výskyt} \times \text{odhalení chyby} \quad (2.1)$$

Vypočtené RPN je porovnáno s předem stanovenou mezní hodnotou. Mezní hodnotu hranice RPN určuje zákazník. Hranici je třeba volit uvážlivě, aby byla vytvořena nápravná opatření pro všechny závažné chyby [45].

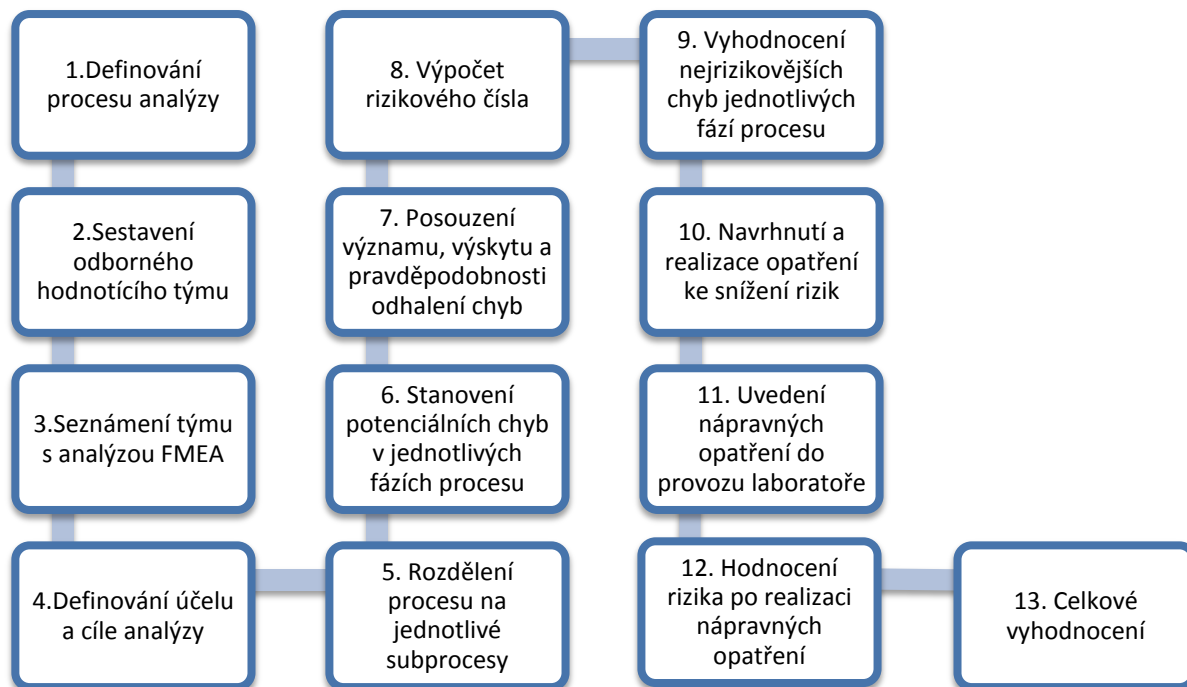
Výsledná hodnota RPN slouží také k vytvoření seznamu potencionálních chyb podle jejich důležitosti, kdy vyšší číslo představuje potencionálně vyšší nebezpečí pro pacienta. Veškerým potencionálním chybám v laboratorním vyšetření by se měla věnovat pozornost, je však nutné posoudit i četnost těchto chyb. Pozornost je tedy věnována chybám, které mají vážné důsledky pro pacienta, anebo se vyskytují často a jsou hůře odhalitelné [45].

2.3.2 Nápravná opatření

Pro skupinu potencionálních chyb s vyššími hodnotami RPN, než je zvolená mezní hodnota, jsou navrhována opatření, která by měla vést ke snížení míry rizika chyby, tzv. nápravná opatření. Soubor těchto nápravných opatření vytvořených pracovním týmem je projednán s pověřeným pracovníkem. Všechna nápravná opatření mají svůj termín realizace a odpovědného pracovníka [46].

2.3.3 Hodnocení stavu po realizaci nápravných opatření

Po realizaci nápravných opatření do procesu dochází k opětovnému hodnocení potencionálních chyb, u kterých byla aplikována nápravná opatření. Hodnocení by mělo být prováděno stejným hodnotícím týmem a stejnou bodovou stupnicí jako v úvodní analýze stavu. Takto nově získané hodnoty RPN nám poté umožní posoudit účinnost nápravných opatření. V případě snížení RPN pod určenou mezní hranici jsou nápravná opatření hodnocena přijatelně, v opačném případě je třeba vytvořit a realizovat nová nápravná opatření, která hodnotu RPN sníží [46].



Obrázek 2.2: Schéma průběhu FMEA analýzy [43]

Průběh FMEA analýzy je zaznamenáván do předpřipraveného formuláře. Na obrázku 2.3 je zobrazen formulář, který byl vytvořen na základě normy ČSN EN 60812.

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Preanalytický proces									

Obrázek 2.3: Příklad formuláře FMEA analýzy [vlastní]

2.4 Standardní operační postup (SOP)

Komplement laboratoří ÚHKT používá pro laboratorní vyšetření definované a dokumentované postupy – standardní operační postupy pro laboratorní vyšetření (SOP). Tento dokument je souborem pracovních pokynů a veškerých informací, které musejí být laboratorním pracovníkem splněny. SOP je tvořen na základě požadavků normy ČSN EN ISO 15189:2013 [47]. SOP je řízený dokument laboratoře, který musí být dostupný všem pracovníkům laboratoře. Účelem SOP je standardizace pracovního postupu a vytvoření přehledného a srozumitelného návodu ke všem činnostem, které jsou součástí vyšetření.

V SOP je popsán celý proces laboratorního vyšetření. SOP popisuje validaci a verifikaci metod, stanovuje postup odběru vzorků a jejich uchování a zachycuje jednotlivé kroky vyšetření.

Při zpracování SOP vycházíme z postupů uznávaných odbornou veřejností, které jsou uveřejněny:

- v odborné literatuře,
- v doporučení odborných společností,
- v manuálech výrobců analyzátorů,
- v doporučeních výrobců reagensů.

2.4.1 Obsah SOP

SOP musí podle normy ČSN EN ISO 15189:2013 obsahovat následující informace [17]:

- titulní strana (zahrnuje kompletní název metody postupu, jméno laboratoře, datum schválení SOP, zpracovatele SOP, seznam změn a revizí);
- účel vyšetření (stručný popis účelu vyšetření, jeho využití a vhodnost);

- princip a použitá metoda (stručný popis principu vyšetření);
- druh primárního vzorku (vyšetřovaný materiál, druh odběrové nádoby, odběrové médium, požadavky na odběry vzorku a další pokyny pro postupy před přijetím vzorku k vyšetření, specifikace primárního materiálu pro vyšetření, vhodné odběrové nádoby, přídavné látky, množství vzorku pro analýzu a jeho stabilita před dodáním do laboratoře);
- přístroje a pomocná zařízení (seznam použitých přístrojů a zařízení);
- chemikálie, reagenty, spotřební materiál (seznam použitých reagentů a spotřebního materiálu, podrobné informace o způsobu použití, informace o BOZP a způsobu likvidace);
- metrologická návaznost (obsahuje informace o kalibraci metody a metrologické návaznosti);
- kalibrace metody (stručný popis přípravy kalibračních roztoků a měření kalibrační závislosti, četnost kalibrace, nezávislost kalibračního materiálu);
- metrologická návaznost použitých přístrojů a zařízení (popis zajištění metrologické návaznosti, validace přístrojů, servisní kontroly přístrojů);
- pracovní postup (popis místa, kde probíhá vyšetření, specifikace prostorů, řízení práce v laboratoři);
- osoby oprávněné k provedení vyšetření (aktualizovaný seznam pracovníků s jednotlivými kompetencemi v rámci prováděného vyšetření);
- postupy před přijetím vzorku do laboratoře (požadavky na odběry a další pokyny pro postupy před přijetím vzorku k vyšetření včetně specifikace primárního a zpracovaného materiálu pro vyšetření, vhodné odběrové nádoby, přídavné látky, množství vzorku pro analýzu a jeho stabilita před dodáním do laboratoře);
- příjem vzorku do laboratoře a evidence vzorků (stručný popis značení vzorků a systému jejich evidence, kritéria pro přijetí/odmítnutí vzorku);
- podrobný postup;
- systém kontroly kvality (seznam výkonnostních charakteristik při validaci/verifikaci);
- externí kontrola kvality (popis nastavení EKK, jeho vyhodnocení);
- interní kontrola kvality (popis nastavení a plánu IKK; plán);
- validace/verifikace (stručný popis validace a verifikace, validační/verifikační protokol);
- nejistota měření (postup pro stanovení nejistoty měření u kvantitativních metod, nastavené hodnoty nejistoty měření);
- možné zdroje variability, interference a zkřížené reakce (stručný popis způsobu vydávání výsledků, způsobu kontroly a autorizace výsledku);
- biologické rozmezí a klinické rozhodovací metody (popis získaných hodnot fyziologické/patologické hodnoty);
- dokumentace zpracování a vyhodnocení dat;

- postup pro výpočet výsledků (stručný postup výpočtu výsledků);
- vznikající záznamy a dokumenty (výčet přesných názvů všech záznamů vznikajících v průběhu činnosti, kterou SOP popisuje, např. pracovní protokoly, knihy pro zápis provedení postupu, databáze výsledků);
- související dokumenty (seznam všech souvisejících dokumentů včetně příbalových letáků);
- odkazy;
- definice, terminologie, zkratky;
- rozdělovník (uvedený seznam řízených výtisků a osob, kterým jsou jednotlivé výtisky přiděleny);
- použitá literatura, publikace.

2.5 Validace metody

Validace je definována mezinárodním metrologickým slovníkem jako ověření, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamyšlené užití [48]. Jinou definicí je potvrzení získané prostřednictvím poskytnutých objektivních důkazů, že byly splněny požadavky na specifické použití [25]. Tedy, že úroveň měření je dostatečná a jsou správné postupy s řádně provedenou kalibrací.

Podle normy ČSN EN ISO 15189:2013 musí laboratoř používat pouze validované postupy. Validace musí mít takový rozsah, aby odpovídal požadavkům při daném použití [17].

Validaci provádíme:

- při zavedení nové metody,
- při pořízení a před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře,
- při zavedení nového diagnostického kitu,
- pokud rozšíříme použití stávající metody o další účel,
- ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém,
- při převzetí metody (typu in house) z jiné laboratoře nebo z publikace.

Při validaci metod typu in house je třeba použít validační plán, který obsahuje následující parametry: přesnost, vychýlení, linearita, pracovní rozsah měření, mezilehlá preciznost, mezilaboratorní reprodukovatelnost, interference a porovnání s jinou metodou [49].

2.5.1 Přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost)

Opakovatelností se rozumí opakované měření jednoho vzorku v krátkém časovém intervalu na stejném přístroji jedním pracovníkem. Reprodukovatelnost znamená měření

jednoho vzorku několik dnů za sebou. Po naměření dojde ke statistickému vyhodnocení hodnot. V rámci statistického vyhodnocení je vypočten průměr, směrodatná odchylka a variační koeficienty [49].

2.5.2 Vychýlení

Vychýlení metody (BIAS) udává míru vychýlení od správného výsledku. Stanovuje se s využitím vyhodnocení výsledků opakovaných měření referenčních materiálů s deklarovanou návazností referenční hodnoty. Vychýlení je charakterizováno jako rozdíl mezi střední hodnotou výsledku zkoušky a přijatou referenční hodnotou (vzorec 2.2) [49].

$$BIAS\% = \frac{\text{průměrná hodnota laboratoře} - \text{správná hodnota}}{\text{správná hodnota}} * 100 \quad (2.2)$$

2.5.3 Linearita a pracovní rozsah měření

Linearita je přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Pro vyhodnocení linearity měření se používá korelační koeficient. Výsledkem je grafické znázornění změřených a teoretických hodnot [49].

2.5.4 Pracovní rozsah měření

Pracovní rozsah měření udává interval, ve kterém lze očekávat, že platí laboratoří deklarované hodnoty preciznosti a vychýlení [50].

Mezi pracovní rozsah měření řadíme [50]:

- mez detekce jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno;
- mez stanovitelnosti jako nejmenší množství analytu, které může být stanoveno s přijatelným stupněm správnosti a shodnosti.

2.5.5 Mezilehlá preciznost měření

Podmínkou pro stanovení mezilehlé preciznosti je měření jednoho stejného kontrolního vzorku na stejném přístroji, ale s různou obsluhou a připravenými reagensy. Měření probíhá v delším časovém období. Mezilehlá preciznost může být

stanovena s pomocí IKK. Mezilehlou preciznost měření vyjadřujeme pomocí směrodatné odchylky a variačním koeficientem [51].

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \tilde{x})^2}{n - 1}} \quad (2.3)$$

$$CV = \frac{SD}{\tilde{x}} \quad (2.4)$$

SD – směrodatná odchylka

CV – variační koeficient

N – počet naměřených hodnot

X – průměr naměřených hodnot

x_i – jednotlivé naměřené hodnoty

2.5.6 Mezilaboratorní reprodukovatelnost

Měření jednoho vzorku na různých přístrojích s různou obsluhou. Princip externí kontroly kvality (EKK) [50].

2.5.7 Interference

Interference udává stručný popis možných zdrojů variability. Popisuje látky, jejichž přítomnost v analyzovaném vzorku danou analýzu ruší nebo ovlivňuje naměřenou hodnotu [50].

2.5.8 Porovnání s jinou metodou

Při porovnání s jinou metodou u metody in house se doporučuje porovnat minimálně 40 vzorků. Vzorky musejí pokrýt celý pracovní rozsah měření. Výsledek srovnání je zaznamenán do tabulky [50].

2.6 Verifikace metody

Verifikací se rozumí ověření základních funkčních charakteristik postupu vyšetření realizovaného v konkrétních podmínkách laboratoře. Pomocí verifikace potvrzujeme, že je měřicí postup v dané laboratoři plně funkční. Verifikace se v laboratoři provádí vždy při zavedení nové metody, při jejím rozšíření, při převzetí metody z jiné laboratoře a při dlouhodobých problémech s kontrolou kvality. Výstupem provedené verifikace by měla

být co nejpřesnější nejistota měření. Četnost verifikací si laboratoř stanovuje ve validačním plánu laboratoře. Minimální četnost je však 1x ročně [49, 50].

2.6.1 Nejistota měření

Každá laboratoř stanovuje odhad nejistoty měření výsledků. Výsledky vydávané laboratoří nejsou nikdy 100 % přesné, každá laboratoř tak udává svou nejistotu měření. Nejistota měření představuje interval, ve kterém se nachází skutečný výsledek měření s danou pravděpodobností. Vypočet nejistoty měření je minimálně z 10 měření téhož vzorku za stejných podmínek jako při měření mezilehlé preciznosti. Poté je vypočítána směrodatná odchylka a variační koeficient. Vypočítaný variační koeficient vyjádřený v procentech je odhadem nejistoty měření. Kombinovaná nejistota měření je vypočtena podle rovnice 2.5 [49].

$$u_c = \sqrt{(u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2)} \quad (2.5)$$

2.7 Postup validace a verifikace

Pro úspěšnou tvorbu validačního a verifikačního protokolu je nutné dodržet následující postup [49]:

1. formulace požadavků, kterých má být dosaženo,
2. určení rozsahu validace/verifikace,
3. provedení validačních/verifikačních měření,
4. vyhodnocení výsledků měření,
5. vytvoření validačního/verifikačního protokolu,

2.8 Vnitřní kontrola kvality

Vnitřní kontrola kvality (IKK) je jedním z nástrojů laboratoře, který vede k vyšší pravděpodobnosti správných výsledků. Cílem IKK je rozpoznání a minimalizování chyb, tohoto lze dosáhnout zařazením kontrolních vzorků do rutinního měření a porovnání výsledků s očekávanými hodnotami. Další metodou je provedení analýzy dvěma laboranty a porovnání jejich výsledků. Frekvence IKK je závislá na druhu analytu, měla by však proběhnout minimálně jednou měsíčně. Všechny výsledky IKK je nutné uchovávat [52].

2.9 Externí kontrola kvality

Externí kontrola kvality (EKK) je objektivním hodnocením laboratorních výsledků nezávislou externí organizací, která je tím pověřena. EKK se provádí pravidelným porovnáváním naměřených výsledků daných laboratoří navzájem a následně jejich porovnáním s referenčními hodnotami měření. Účast na EKK je dána požadavkem

normy ISO 15189: 2013. Externí kontrola kvality je prvkem řízení kvality, používá se ke sledování úrovně práce laboratoře ve srovnání s jinými laboratořemi. Proces EKK je organizován a vyhodnocován organizátory EKK tzv. EQA providers [53].

Proces EKK probíhá podle následujícího harmonogramu. Organizátor EKK rozešle kontrolovaným laboratořím kontrolní vzorky a kontrolované laboratoře následně provedou analýzu, kdy vzorky musejí být zpracovány stejně jako běžné patientské vzorky, laboratoř výsledky nesmí zfalšovat a měření by mělo proběhnout pouze jedenkrát. Po provedení analýzy laboratoř odešle výsledky zpět organizátorovi EKK. Organizátor následně provede vyhodnocení výsledků a ty rozešle zpět kontrolovaným laboratořím. Cílové hodnoty jsou účastníkům sdělovány až jako součást vyhodnocení. Veškerou dokumentaci o průběhu EKK a její výsledky je nutné archivovat [53].

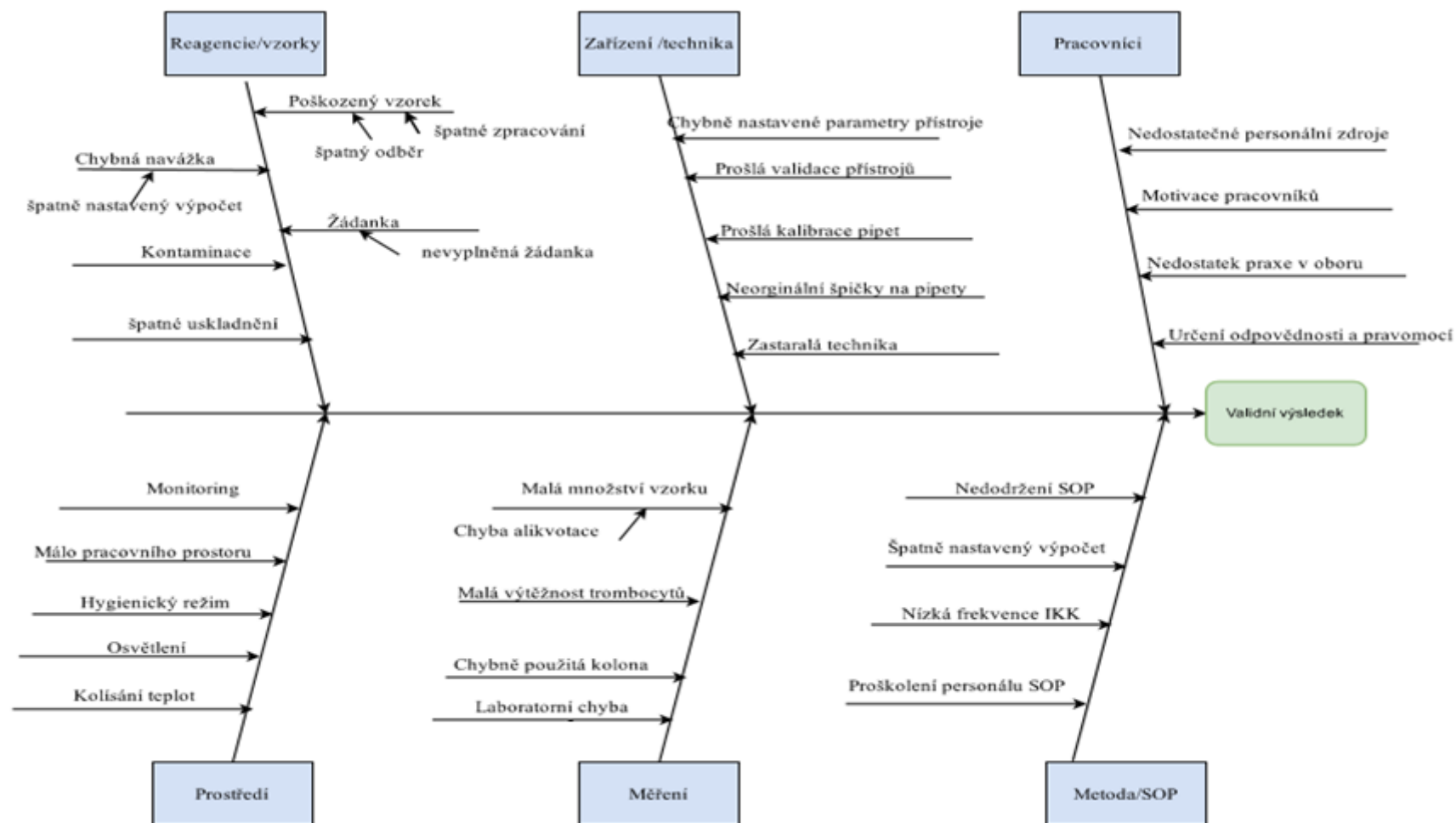
V případě, kdy není možné danou metodiku přihlášenou k akreditaci ověřit účastí v oficiálním programu EKK, nebo není oficiální program mezilaboratorního porovnávání k dispozici, je možná vzhledem k charakteru metody výměna vzorků s jinou laboratoří.

3 Výsledky

Pro analýzu rizik byl sestaven tým hodnotitelů. Tento tým byl složen z pracovníků oddělení biochemie a manažerky kvality ÚHKT. Tým byl seznámen s metodou brainstormingu a jejími zásadami. Dále všichni členové hodnotitelského týmu obdrželi podklady pro hodnocenou metodu SRA-HPLC. Zde je třeba zdůraznit, že všichni členové týmu, kromě manažerky kvality, se na realizaci této metody podílejí a znají její postup. Někteří členové se přímo podíleli na této zavedení metody v ÚHKT.

3.1 Ishikawův diagram

Ishikawův diagram byl vytvořen na základě brainstormingu provedeného s pracovníky oddělení biochemie. Cílem Ishikawova diagramu bylo určení potencionálních příčin, které mohou ovlivnit výsledek vyšetření. Hodnotící tým byl před samotným brainstormingem seznámen s zásadami tvorby Ishikawova diagramu a postupem jeho realizace. Před zahájením brainstormingu byl definován hlavní problém a hlavní skupiny příčin. Každý člen hodnotícího týmu provedl přiřazení možných příčin k jednotlivým kategoriím. Sestavený diagram (obr. 3.1) byl dále využit pro analýzu rizik jako jeden z materiálů pro vypracování metody FMEA.



Obrázek 3.1 Ishikawův diagram [vlastní]

3.2 FMEA

FMEA analýza byla provedena pro všechny fáze procesu vyšetření. Tým hodnotitelů byl složen z pracovníků oddělení biochemie a manažerky kvality ÚHK T.

Složení hodnotitelského týmu:

Bc. Kristýna Svobodová

prof. J.E.Dyr, DrSc.

Ing. Jiří Sutt nar, CSc.

Ing. Leona Chrastinová, Ph.D.

Ing. Jana Štikarová, Ph.D.

Ing. Alžběta Hlaváčková, Ph.D.

Hana Feixová

Blanka Veselá

Analýza rizik pomocí metody FMEA proběhla na základě vypracovaného Ishikawova diagramu, který usnadnil orientaci v problematice. Po vybrání potenciálních rizikových chyb v procesu byly stanoveny příčiny vedoucí k chybám a stávající opatření, která mají chyby odhalit. Všechny tyto parametry byly bodově ohodnoceny a bylo vypočítáno RPN dle vzorce (2.1). Dále byla stanovena míra přijatelnosti rizika podle tabulky 3.1.

Tabulka 3.1: Míra přijatelnosti RPN

Hodnota RPN	Míra přijatelnosti RPN
$RPN \leq 80$	Zanedbatelné riziko
$81 \leq RPN \leq 199$	Přijatelné riziko
$RPN \geq 200$	Nepřijatelné riziko

Hranice přijatelnosti RPN byla navržena na základě zavedeného systému kvality v ÚHK T. stanovena na hodnotu 200. Po konzultaci s manažerkou kvality byla nápravná opatření navržena pro všechny potenciální chyby. U potenciálních chyb, které přesáhly stanovenou hodnotu RPN, byla nápravná opatření realizována prioritně. Pro každé nápravné opatření byl stanoven odpovědný pracovník a termín realizace. Tato opatření byla následně uvedena do provozu laboratoře a po jejich zapracování do chodu laboratoře bylo provedeno nové bodové ohodnocení daných chyb a znovu vypočteno RPN. Toto RPN bylo znovu porovnáno se stanovenou hranicí a došlo k vyhodnocení, zda byla navrhovaná nápravná opatření účinná.

V následujících tabulkách 3.1, 3.2, 3.3 jsou zaznamenány jednotlivé potenciální chyby, které navrhl hodnotící tým.

Tabulka 3.2 FMEA Preanalytická fáze procesu [vlastní]

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Preanalytická fáze									
1	Špatný poměr krve a antikoagulancia	Snížená vypovídací hodnota výsledku, nemožnost vyšetření	10	Špatně označené množství krve/koagulancia, nevhodný odběrový materiál	4	Vizuální kontrola před začátkem odběru	3	120	Přijatelné
2	Nedostatečné množství vzorku	Nemožnost vyšetření	10	Špatně zvolená odběrová zkumavka, nepozornost personálu	2	Vizuální kontrola	2	40	Zanedbatelné
3	Poškození vzorku během transportu	Snížená vypovídací hodnota výsledku, nemožnost vyšetření, opakování odběru pacienta	7	Nevhodná manipulace, špatně zvolený druh transportu, špatné uchování vzorku během transportu	5	Kontrola při příjmu	4	140	Přijatelné
4	Nedodržení doby dodání vzorku do laboratoře	Snížená vypovídací hodnota výsledku, nemožnost vyšetření	10	Nedodržení podmínek transportu	2	Kontrola při příjmu	1	20	Zanedbatelné
5	Špatně vyplněná žádanka	Zpoždění vyšetření, nemožnost provedení vyšetření	8	Nepozornost odebrajícího pracoviště/pracovníka	8	Kontrola při příjmu	4	256	Nepřijatelné
6	Chybné zadání údajů žádanky do databáze pacientů	Neprovedení analýzy, záměna pacientů	10	Nepozornost personálu	4	Kontrola zápisu žádanek, kontrola dvou párů očí	4	160	Přijatelné

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Preanalytická fáze									
7	Záměna vzorků nebo ztráta označení vzorku	Možnost záměny výsledku vyšetření/pacienta	10	Nedodržení stanoveného postupu, špatné označení vzorku	4	Kontrola při příjmu, hodnocení historie výsledků pacienta a souladu s klinickým obrazem pacienta	8	320	Nepřijatelné
8	Špatné zpracování vzorku	Snížená vypovídací hodnota výsledku, nemožnost vyšetření	8	Nedodržení SOP	4	Dodržování SOP	6	192	Přijatelné
9	Špatná alikvotace vzorku	Neprovedení analýzy	8	Nepozornost personálu, nekalibrované pipety	4	Dodržování SOP	6	192	Přijatelné
10	Špatné uchování vzorku do zpracování	Snížená vypovídací hodnota výsledku, nemožnost vyšetření	10	Nevhodná manipulace, nedodržení pracovního postupu	3	Monitoring prostoru	5	150	Přijatelné

Tabulka 3.3 FMEA Analytická fáze procesu [vlastní]

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Analytická fáze									
1	Znehodnocení/poškození reagentie, spotřebního materiálu	Snížená vypovídací hodnota výsledku	7	Nedodržení skladovacích podmínek	2	Monitoring prostor, monitoring teplot	3	42	Zanedbatelné
2	Kontaminace reagentie	Snížená vypovídací hodnota výsledku	7	Nesprávná manipulace/skladování reagentií	4	Kontrola odpovědným pracovníkem	2	56	Zanedbatelné
3	Záměna reagentie	Snížená vypovídací hodnota výsledku	8	Chyba pracovníka laboratoře	4	Dodržování SOP	5	160	Přijatelné
4	Znehodnocení vzorku pracovníkem laboratoře	Neprovedení analýzy, nutnost opakovat vyšetření	10	Nedodržení SOP	4	Kontrola odpovědným pracovníkem, proškolení odpovědným pracovníkem	1	40	Zanedbatelné
5	Nedodržení postupu SOP	Chybný výsledek, snížená vypovídací hodnota výsledku	8	Chyba pracovníka laboratoře, nedodržení kalibrace pipet, nedodržení doby rozpouštění reagentií	5	Dodržování SOP	5	200	Nepřijatelné

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Analytická fáze									
6	Centrifugace	Znehodnocení vzorku, neoddělení jednotlivých složek vzorku	8	Porucha přístroje, špatně zvolený počet otáček, doba centrifugace	2	Kontrola přístroje odpovědným pracovníkem, dodržování servisních kontrol, proškolení pracovníků	3	48	Zanedbatelné
7	Pipetování	Zhoršená kvalita výsledku	10	Nedodržení frekvence kalibrace pipet, nesprávná manipulace s pipetami	3	Pravidelná kontrola a kalibrace pipet	7	210	Nepřijatelné
8	Záměna vzorků v laboratoři	Záměna výsledků pacientů	10	Chyba pracovníka laboratoře, špatný popis vzorků	4	Kontrola odpovědným pracovníkem	8	320	Nepřijatelné
9	Selhání přístroje/analyzátoru	Nedokončení/neprovedení analýzy, nutnost opakovat vyšetření	10	Porucha přístroje	3	Pravidelný servis, kontrola odpovědným pracovníkem	2	60	Zanedbatelné
10	Kontaminace dárcovských trombocytů	Neprovedení analýzy, nutnost opakovat vyšetření	10	Nesprávná manipulace	5	Kontrola odpovědným pracovníkem	3	150	Přijatelné
11	Nedostatek dárcovských trombocytů	Neprovedení analýzy, nutnost opakovat vyšetření	10	Menší počet dárců transfuzního oddělení, nedostatečná výtěžnost	5	Plánování odběrů	1	50	Zanedbatelné

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Analytická fáze									
12	Nefunkční kolona	Neprovedení analýzy, nutnost opakovat vyšetření	10	Chybná dodávka, nedodržení podmínek skladování	2	Vstupní kontrola dodávky odpovědným pracovníkem	5	100	Přijatelné

Tabulka 3.4 FMEA Postanalytická fáze procesu [vlastní]

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Postanalytická fáze									
1	Chybné vyhodnocení výsledku	Možné poškození pacienta	10	Chyba odpovědného pracovníka, nepřehlednost systému vyhodnocení	2	Kontrola pracovníkem odpovědným za uvolňování výsledků	5	100	Přijatelné
2	Nevyhovující výsledek pozitivní/negativní kontroly	Opakování vyšetření	8	Reagencie, destičky od dárce	6	Dvojstupňová kontrola/verifikace	4	192	Přijatelné
3	Odeslání výsledku na jiné pracoviště	Zpoždění doručení výsledku	5	Chyba administrativy	5	Zpětná vazba od laboratoře	3	75	Zanedbatelné
4	Přenos dat/výsledků	Záměna výsledků	10	Manuální přepis, chyba synchronizačního softwaru	4	Kontrola výsledků odpovědným pracovníkem, kontrola verifikace přenosu dat	8	320	Nepřijatelné
5	Interní a externí kontrola kvality	Nevyhovující výsledek IKK a EKK	7	Chyba odpovědného pracovníka, nevyhovující meze	4	Pravidelné vyhodnocování IKK a EKK, verifikace	3	84	Přijatelné
6	Uchování vzorků pro další zpracování	Nemožnost opakování vyšetření, opakovaný odběr pacienta	6	Špatná alikvotace vzorku, lidský faktor	4	Proškolení pracovníků laboratoře	6	144	Přijatelné
7	Nedodržení doby odezvy	Zpoždění doručení výsledku	5	Technický/ personální problém	4	Informování lékaře	2	40	Zanedbatelné

Riziko	Potenciální chyba	Možné následky	Závažnost	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Detekce	RPN	Přijatelnost rizika
Postanalytická fáze									
8	Obnova zastaralé přístrojové techniky	V případě výpadku, pozdržení, pozastavení vyšetření; mimořádné náklady.	8	Složitost při pořizování, investiční náklady, mimořádně rychlý rozvoj oboru	3	Plán průběžné obnovy přístrojů/ investiční plán	3	72	Zanedbatelné

3.2.1 Nápravná opatření

Hranice akceptovatelnosti rizika byla na základě nastaveného systému kvality v komplementu laboratoří ÚHKT stanovena na hodnotu 200. V rámci validace in house metody a domluvy manažerkou kvality ÚHKT byla nápravná opatření nastavená a realizovaná i pro nižší hodnoty RPN. Cílem nápravných opatření byla minimalizace chyb pro všechny procesy SOP.

Preanalytická fáze

V preanalytické fázi byla jako nejvyšší RPN vyhodnocena chyba záměna vzorků nebo ztráta označení vzorku. Tato chyba může mít kritické důsledky pro vyhodnocení vyšetření. Pro toto riziko byla vypracována nápravná opatření ve formě proškolení laboratorních pracovníků, zopakování postupu značení vzorků a jednotlivých zkumavek a jejich dodržování. Po realizaci nápravného opatření klesla hladina RPN pod kritickou úroveň. Druhým rizikem s RPN nad kritickou úrovní bylo riziko špatně vyplněné žádanky. Tento druh rizika je aktuální v případě, kdy je na pracovišti přijímán vzorek od externího zadavatele, který žádanku nevyplňuje přes informační systém UNIS. Neúplná žádanka je důvodem k odmítnutí přijmutí vzorku a může tak dojít ke zpoždění vyšetření. Jako nápravné opatření byla žádanka upravena do graficky optimálnější formy a externí žadatelé byli informováni o možnosti stažení nové žádanky z webové stránky ústavu. Pro další rizika, jejichž hodnota rizikového čísla přesáhla hodnotu 100, byla navržena nápravná opatření do protokolu FMEA analýzy. Seznam všech navržených a provedených nápravných opatření je uveden v tabulce č. 3.4. U všech realizovaných nápravných opatření klesla hodnota rizikového čísla pod stanovenou kritickou hranici. Nápravná opatření byla tedy účinná.

Analytická fáze

V analytické části vyšetření byla vyhodnocena tři rizika nad akceptovatelnou hranici rizikového čísla. Nejvyšší hodnotu rizikového čísla mělo riziko záměny vzorků v laboratoři. Nápravné opatření pro toto riziko bylo obdobné jako v preanalytické fázi. Laboratorní pracovníci byli proškoleni a upozorněni na dodržování jednotného značení vzorků po dobu celého průběhu vyšetření. Dalším rizikem nad hranicí přijatelnosti bylo nedodržení postupu SOP. Příčinou tohoto rizika je lidský faktor. Pracovníci byli poučeni o používání postupu při každém vyšetření. Postupy jsou také dostupné v každé laboratoři, kde je vyšetření prováděno. Třetí riziko nad hranicí přijatelnosti bylo pipetování. Při nedodržení používání pouze kalibrovaných pipet a originálních špiček může dojít ke zkreslení výsledku vyšetření. Laboratorní pracovníci byli seznámeni se správnou manipulací s pipetami a důsledným dodržováním intervalu kalibrace pipet 1x ročně. Seznam všech navržených a provedených nápravných opatření je uveden v tabulce č. 3.5.

Postanalytická fáze

V postanalytické fázi byly vyhodnoceny jako kritické chyby přenos dat/výsledku a nevyhovující výsledek pozitivní a negativní kontroly. Jako nápravná opatření pro riziko přenosu dat/výsledků byly stanoveny kontrola odpovědným pracovníkem (kontrola dvou párů očí) a nastavení kontroly verifikace přenosu dat. U rizika nevyhovující výsledek pozitivní/negativní kontroly, kdy je třeba zopakovat znovu celou analýzu, byla jako nápravné opatření určena dvojstupňová kontrola funkčnosti. Seznam všech navržených a provedených nápravných opatření je uveden v tabulce č. 3.6.

U všech realizovaných nápravných opatřeních klesla hodnota rizikového čísla pod stanovenou kritickou hranici. Nápravná opatření byla tedy účinná.

Tabulka 3.5:FMEA preanalytická fáze procesu po provedení nápravných opatření [vlastní]

Riziko	Potenciální chyba	Navrhovaná opatření	Odpovědnost	Provedená opatření	Výsledky opatření				Původní RPN	Přijatelnost rizika
					Závažnost	Výskyt	Detekce	RPN		
Preanalytická fáze										
1	Špatný poměr krve a antikoagulancia	Proškolení odběrových pracovníků	Vrchní sestra, vedoucí laboratoře	Edukace zdravotních sester, seminář pro externí pracovníky	10	2	3	60	120	Zanedbatelné
2	Nedostatečné množství vzorku	Důsledné značení množství antikoagulačního činidla	Vrchní sestra, vedoucí laboratoře	Edukace zdravotních sester, seminář pro externí pracovníky	10	2	2	40	40	Zanedbatelné
3	Poškození vzorku během transportu	Proškolení pracovníků provádějících transport	Vrchní sestra, vedoucí laboratoře	Edukace zdravotních sester, seminář pro externí pracovníky	7	4	4	112	140	Přijatelné
4	Nedodržení doby dodání vzorku do laboratoře	Kontrola při příjmu, proškolení pracovníků provádějících odběr a transport	Vedoucí laboratoře	Edukace zdravotních sester, seminář pro externí pracovníky	10	2	1	20	20	Zanedbatelné
5	Špatně vyplněná žádanka	Lepší čitelnost žádanky, webová přístupnost	Manažer kvality, vedoucí laboratoře	Edukace pracovníků, upozornění na webových stránkách	10	4	3	120	256	Přijatelné

Riziko	Potenciální chyba	Navrhovaná opatření	Odpovědnost	Provedená opatření	Výsledky opatření				Původní RPN	Přijatelnost rizika
					Závažnost	Výskyt	Detekce	RPN		
6	Chybné zadání údajů žádanky do databáze pacientů	Proškolení pracovníků laboratoře, kontrola dvou párů očí	Vedoucí laboratoře	Proškolení pracovníků	10	3	3	90	160	Přijatelné
7	Záměna vzorků nebo ztráta označení vzorku	Proškolení pracovníků, důsledné značení vzorků	Vrchní sestra, vedoucí laboratoře	Proškolení pracovníků	10	2	8	160	320	Přijatelné
8	Špatné zpracování vzorku	Dodržování SOP	Vedoucí laboratoře	Proškolení laboratorních pracovníků v metodě	8	3	5	120	192	Přijatelné
9	Špatná alikvotace vzorku	Používání pouze kalibrovaných pipet	Vedoucí laboratoře	Kalibrace pipet 1x ročně	8	2	6	96	192	Přijatelné
10	Špatné uchování vzorku do zpracování	Kontrola monitoringu teplot v mrazácích	Laborant	Využívání loggerů, nastavení systému alarmu	10	1	1	10	150	Zanedbatelné

Tabulka 3.6: FMEA pro analytickou fázi procesu po provedení nápravných opatření [vlastní]

Riziko	Potenciální chyba	Doporučená opatření	Odpovědnost	Provedená opatření	Výsledky opatření				Původní RPN	Přijatelnost rizika
					Závažnost	Výskyt	Detekce	RPN		
Analytická fáze										
1	Znehodnocení/poškození reagentie, spotřebního materiálu	Dodržování VP	Vedoucí laboratoře	Edukace pracovníků manažerem kvality v rámci semináře	7	2	3	42	42	Zanedbatelné
2	Kontaminace reagentie	Dodržování SOP	Laboratorní pracovník	Proškolení laboratorních pracovníků	7	4	2	56	56	Zanedbatelné
3	Záměna reagentie	Popisování jednotlivých reagentií	Vedoucí laboratoře	Proškolení laboratorních pracovníků	8	3	5	120	160	Přijatelné
4	Znehodnocení vzorku pracovníkem laboratoře	Dodržování SOP	Vedoucí laboratoře	Proškolení laboratorních pracovníků	10	4	1	40	40	Zanedbatelné
5	Nedodržení postupu SOP	Grafické upravení postupu SOP	Vedoucí laboratoře	Seznámení laborantů s grafickým upraveným postupem SOP	8	4	4	128	200	Přijatelné
6	Centrifugace	Dodržování postupů SOPT	Laboratorní pracovník	Proškolení laboratorních pracovníků	8	3	2	48	48	Zanedbatelné

Riziko	Potenciální chyba	Doporučená opatření	Odpovědnost	Provedená opatření	Výsledky opatření				Původní RPN	Přijatelnost rizika
					Závažnost	Výskyt	Detekce	RPN		
7	Pipetování	Kalibrace pipet	Laboratorní pracovník	1x ročně kalibrace pipet, používání originálních špiček	10	2	6	120	210	Přijatelné
8	Záměna vzorků v laboratoři	Důsledné značení vzorků a zkumavek	Vedoucí laboratoře	Edukace pracovníků	10	3	5	150	320	Přijatelné
9	Selhání přístroje/analyzátoru	Pravidelný servis, kontrola oprávněným pracovníkem	Vedoucí laboratoře/metrolog	Vypracování postupu pro selhání analyzátoru	10	3	2	60	60	Zanedbatelné
10	Kontaminace dárcovských trombocytů	Důsledné dodržování podmínek pracovního prostředí a SOP	Laboratorní pracovník	Proškolení laboratorních pracovníků	10	2	4	80	150	Zanedbatelné
11	Nedostatek dárcovských trombocytů	Důsledné plánování odběru	Vedoucí laboratoře/ vedoucí TU	Dokumentovaný postup plánovaných odběrů dárců	10	3	1	30	50	Zanedbatelné
12	Nefunkční kolona	Plánování a kontrola objednávek	Laboratorní pracovník	Vstupní verifikace	10	2	5	100	100	Přijatelné

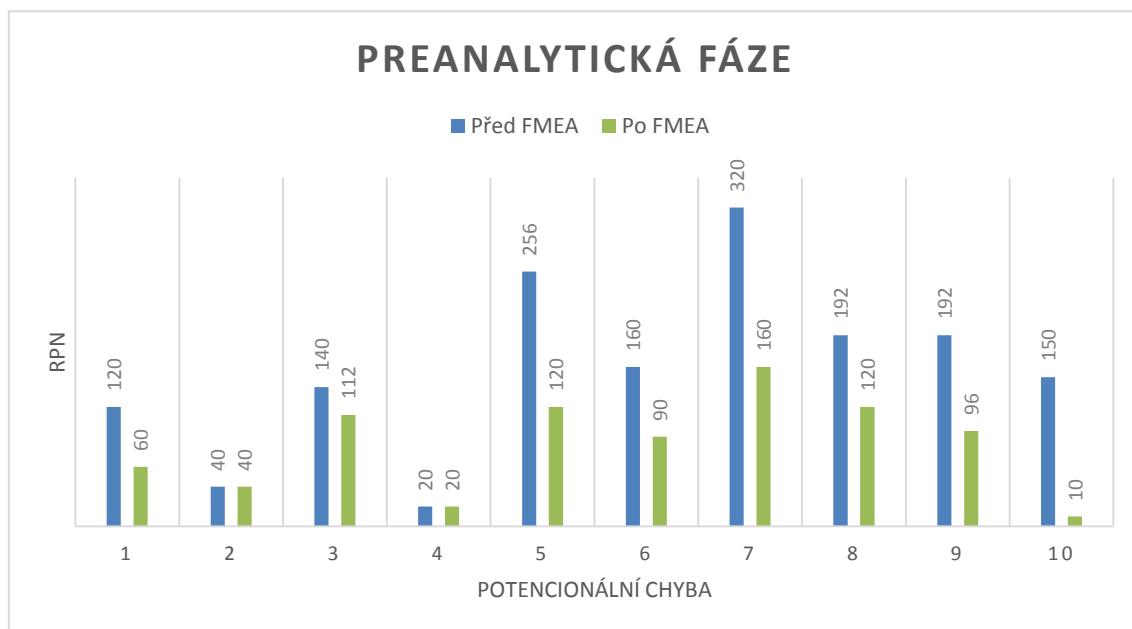
Tabulka 3.7 FMEA Postanalytická fáze procesu po provedení nápravných opatření [vlastní]

Riziko	Potenciální chyba	Navrhovaná opatření	Odpovědnost	Provedená opatření	Výsledky opatření				Původní RPN	Přijatelnost rizika
					Závažnost	Výskyt	Detekce	RPN		
Analytická fáze										
1	Chybné vyhodnocení výsledku	Kontrola pracovníkem odpovědným za uvolňování výsledků	Vedoucí laboratoře	Proškolení pracovníků, víceúrovňová kontrola uvolňování výsledků	10	2	4	80	100	Zanedbatelné
2	Nevyhovující výsledek pozitivní/negativní kontroly	Dvojitupňová kontrola/verifikace	Pracovník odpovědný za uvolňování výsledků	Proškolení pracovníků, postupy verifikace	8	3	3	72	192	Zanedbatelné
3	Odeslání výsledku na jiné pracoviště	Zpětná vazba od laboratoře	Vedoucí laboratoře	Proškolení pracovníků	5	5	3	75	75	Zanedbatelné
4	Přenos dat/výsledků	Kontrola výsledků odpovědným pracovníkem, kontrola verifikace přenosu dat	Pracovník odpovědný za uvolňování výsledků/ manažer kvality	Nastavení pravidel pravidelné verifikace přenosu dat	10	3	6	180	320	Přijatelná
5	Interní a externí kontrola kvality	Pravidelné vyhodnocování IKK a EKK, verifikace	Pracovník odpovědný za uvolňování výsledků	Pravidelné vyhodnocování IKK, EKK	7	4	3	84	84	Přijatelné

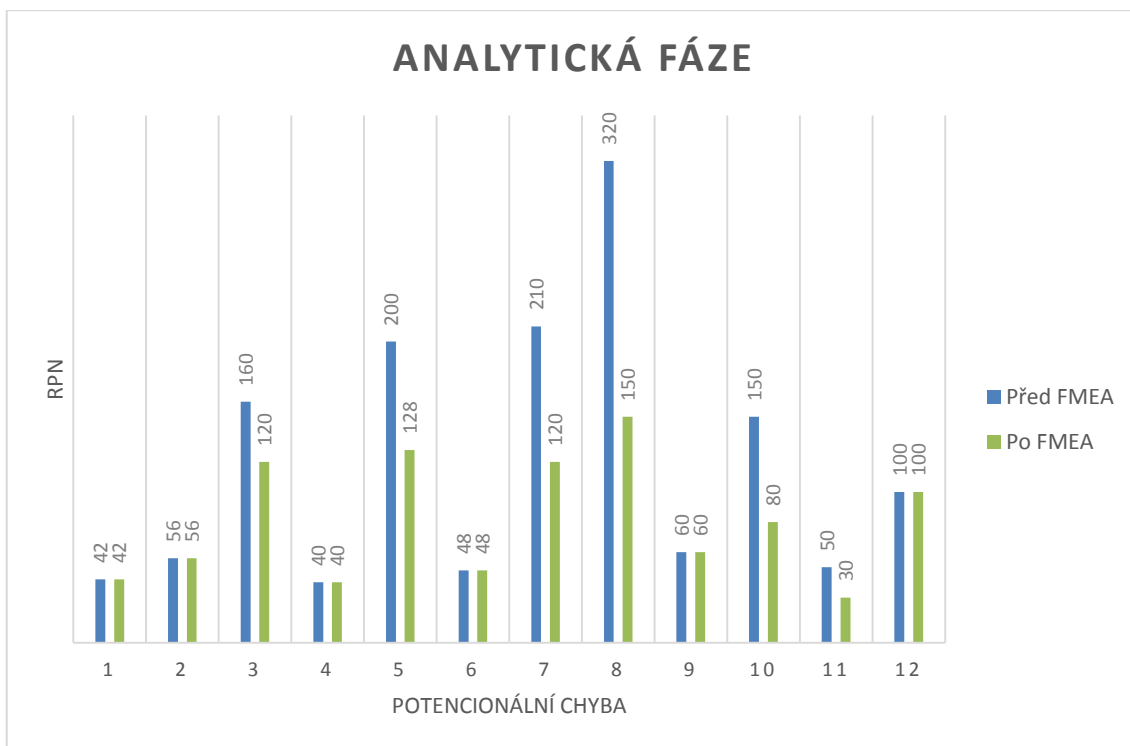
Riziko	Potenciální chyba	Navrhovaná opatření	Odpovědnost	Provedená opatření	Výsledky opatření				Původní RPN	Přijatelnost rizika
					Závažnost	Výskyt	Detekce	RPN		
Analytická fáze										
6	Uchování vzorků pro další zpracování	Proškolení pracovníků laboratoře	Vedoucí laboratoře	Nastavení pravidel pro uchovávání a proškolení pracovníků	6	4	4	96	144	Přijatelné
7	Nedodržení doby odezvy	Informování lékaře	Vedoucí laboratoře	Nastavení statistického LIS	5	4	2	40	40	Zanedbatelné
8	Obnova zastaralé přístrojové techniky	Plán průběžné obnovy přístrojů/investiční plán	Vedoucí laboratoře/metrolog	Podklady pro výběrová řízení	8	3	3	72	72	Zanedbatelné

3.2.2 Grafické znázornění provedení FMEA analýzy

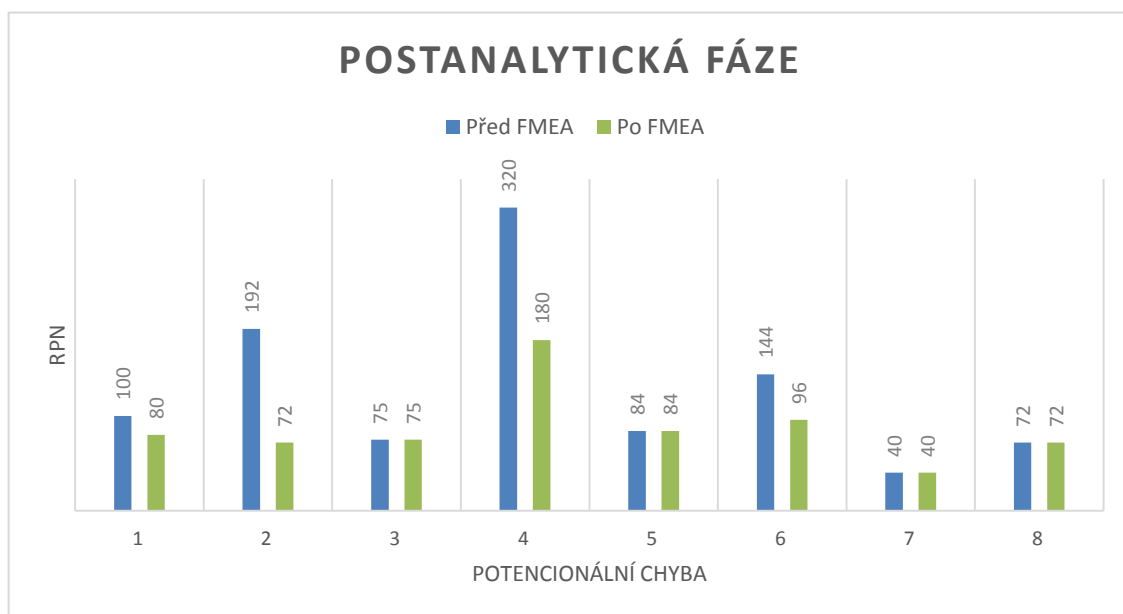
Na následujících grafech je shrnuto porovnání potencionálních chyb před a po provedení FMEA analýzy.



Obrázek 3.2 Preanalytická fáze procesu srovnání FMEA



Obrázek 3.3 Analytická fáze procesu srovnání FMEA



Obrázek 3.4 Postanalytická fáze procesu srovnání FMEA

3.3 SOP

V rámci této diplomové práce byl vytvořen SOP, který bude předkládán při akreditačním šetření. SOP je řízený dokument laboratoře, který musí být dostupný všem pracovníkům laboratoře. Při vypracování SOP bylo postupováno na základě požadavků normy ČSN EN ISO 15189: a je přiložen k diplomové práci v Příloze 1.

3.4 Postup laboratorního vyšetření HIT

Postup laboratorního vyšetření HIT je rozdělen do dvou na po sobě následujících kroků.

3.4.1 Inkubace patientského séra s krevními destičkami a heparinem

Prvním krokem vyšetření SRA-HPLC je získání zdravých dárcovských destiček.

Izolace krevních destiček

Krevní destičky jsou získávány od dobrovolných dárců na odběrovém sálu ÚHKT. Dárci nesmí 14 dní před odběrem požit léky, které ovlivňují krevní destičky (ibuprofen, paralen). Dárci je odebrána žilní krev do PP zkumavek s ACD v poměru 8,1: 1,9 ml. Celkové množství žilní krve v jednotlivých zkumavkách je tedy 10 ml.

Po ukončení odběru je krev odstředěna na centrifuze (220 g/ 15 min/37 °C). Při odstředění dojde k oddělení jednotlivých složek krve a laboratorní pracovník stáhne do nové PP zkumavky bohatou plazmu (PRP). Na 10 ml plné krve připadá zhruba 3,5 ml PRP. Odebereme 400 µl pro zjištění počtu krevních destiček. Do bohaté plazmy je přidán prostaglandin (PGE1) a to v poměru 1 µl /1 ml plazmy. PGE1 tlumí aktivitu destiček. Takto upravená plazma je poté inkubována ve vodní lázni (10 min, 37 °C). Po inkubaci je PRP odstředěna (1000 g /10 min, 37 °C). Poté je stáhnuta chudá plazma do nových PP zkumavek a tato plazma je použita v následujícím kroku pro přípravu kalibrace. Peleta destiček je resuspendována v Tyrodovém pufru pH 6,2 a to ve stejném množství jaký byl původní objem PRP. Z vytvořené směsi je odebráno 400 µl pro zjištění počtu krevních destiček. Do směsi je přidáno PGE1 v poměru 1µl /1ml plazmy a odstředěno (600 g/10 min/37 °C). Poté je stáhnut promývací pufr, peleta destiček je resuspendována ve vypočteném množství Tyrodového pufru pH 7,4, a to tak, aby výsledný počet destiček byl 300 000/ µl (podle vzorce). Vyizolované destičky jsou inkubovány ve vodní lázni (30 min, 37 °C).

Vztah pro výpočet množství (ml) Tyrodového pufru pH 7,4

$$\frac{\text{celkové množství PRP} \times \text{počet destiček spočtených analyzátozem}}{300 \text{ (požadované množství destiček v reakci)}} \quad (3.1)$$

Příprava na mikrotitrační destičce:

Chemikálie:

Heparin: HH: 725 μ l tyrodového pufru pH 7,4 + 500 μ l heparinu, LH: 5 ml tyrodového pufru pH 7,4 + 5 μ l odebraných z HH

Fraxiparin: HF: 1025 μ l tyrodového pufru pH 7,4 + celý fraxiparin (fraxiparine inj. Sol 6 ml), LF: 5 ml tyrodového pufru pH 7,4 + 5 μ l odebraných z HF)

Imipramin: 4ml tyrodového pufru pH 7,4 + 1 ml Imipraminu s vitamínem C (0,00634 g imipraminu, 0,3523 g vit. C/100 ml vody)

TRAP: 30 μ l tyrodového pufru pH 7,4 + 20 μ l TRAPU

Mikrotitrační destičku je rozdělena na dvě poloviny a podle připraveného rozpisu jsou umístěny do každé jamky po jedné kovové kuličce. Poté je do každé jamky přidáno 5 μ l připraveného imipraminu. Do jamek TP je přidáno 20 μ l tyrodového pufru pH 7,4 + 5 μ l naředěného TRAPU. Do jamek D je přidáno 25 μ l tyrodového pufru pH 7,4. Od řady B přidáváme do jamek po 5 μ l LH/HH nebo LF/HF podle rozpisu. Od řady B je přidáno do jamek plazma pacientů podle rozpisu. Do všech jamek je přidáno 75 μ l vyizolovaných destiček a necháme je 1 hod třepat na třepačce při 300 ot/min. Poté přidáme 100 μ l EDTA a opět třepeme na třepačce po dobu 1 min. Následně jsou vzorky přendány z mikrotitrační destičky do PP zkumavek (Ependorf) po 200 μ l a odstředěny 2079 g/ 5 min /17 °C a poté jsou převedeny 150 μ l do popsaných zkumavek a zamrazeny při teplotě -20 °C do dalšího zpracování.

Příprava pro kalibraci:

Při přípravě kalibračních vzorků jsou připraveny zkumavky označené KAL 500 μ l chudé plazmy dárce + 1500 μ l tyrodového pufru pH 7,4 + 2000 μ l EDTA. Poté jsou rozpipetovány po 150 μ l do označených zkumavek 1 až 8.

Totální serotonin (TOT): Do zkumavky označené TOT1 přidáme 400 μ l EDTA + 100 μ l tyrodového pufru pH 7,4 + 300 μ l promytých destiček. Poté rozpipetován po 150 μ l do dvou zkumavek označených TOT.

Takto připravené zkumavky (kalibrace plus vzorky TOT) jsou zamrazeny při teplotě -20 °C do dalšího zpracování.

3.4.2 Stanovení serotoninu

Chemikálie:

5-HT: 50 μ L zásobního roztoku přidáme do 5 ml H₂O (10000 ng/ml) (Zásobní roztok (5) 1 mg/ml, což je uloženo při -80 °C po 1 ml)

IS: 25 μ L zásobního roztoku přidáme do 20 ml H₂O (1250 ng/ml) (Zásobní roztok 5-N- ω -methyltryptamin (5-MeHT) 1 mg/ml vody)

25 % HClO₄: 21 ml 60 % HClO₄ doplníme do 50 ml redestilovanou vodou

Sodium borohydride: roztok připravujeme hodinu před zpracováním vzorku (rozpuští se při 4 °C). Smícháme 0,5 g sodium borohydridu s 4,5 ml redestilované vody. Erlenovu baňku s tímto roztokem uchováváme na ledové tříšti v lednici do úplného rozpuštění.

Kalibrační řada

Do připravených a nadepsaných PP zkumavek (Eppendorf, 1,5 ml) přidáme:

Do zkumavek 7-1 je napipetováno 400 μ l redestilované vody. Do zkumavek 8,7 napipetujeme 400 μ l 5-HT, zkumavku 7 je promíchána a z ní přeneseno 400 μ l do zkumavky č. 6, opět promíchána a přeneseno 400 μ l do zkumavky č.5, postup je opakován až do zkumavky č. 2, z té poté 400 μ l zlikvidováno. Ve všech zkumavkách je zachován objem 400 μ l. Ve zkumavce č. 8 je pouze 5-HT a v č.1 je pouze voda. Takto je vytvořena kalibrační řada o klesající koncentraci 5-HT, hodnoty koncentrací jsou zaznamenány v tabulce 3.7:

Tabulka 3.8: Kalibrační řada 5-HT [vlastní]

Číslo zkumavky	8	7	6	5	4	3	2	1
Koncentrace (ng/ml)	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0

Postup stanovení serotoninu:

Zpracování je prováděno v lázni s ledovou drtí. Připravená kalibraci je přidána Hamiltonovou pipetou v množství 15 μ l do připravených zkumavek, do zkumavek se vzorky přidáme 15 μ l redestilované vody. Do všech zkumavek (kalibrace+ vzorky) je přidáno 15 μ l IS a 30 μ l Sodium borohydride. Poté přidáme 39 μ l HClO₄ (vzorky pění – kontrola přidání borohydridu) a průběžně jsou vzorky vortexovány. Následně jsou vzorky odstředěny (3000 g/10 min/4 °C). Poté přepipetovány do stejně označených PP zkumavek 100 μ l supernatantu a ten odstředíme (37547 g/ 30 min/ 4 °C) a poté přepipetujeme do mikrotitrační destičky 75 μ l. Takto připravené vzorky jsou připraveny pro analýzu pomocí HPLC.

3.4.3 Analýza HPLC

Příprava přístroje SHIMADZU:

1. Zapnutí přístroje +PC
2. Do Erlenovy baňky je připravena MilliQ voda a umístěna kapilára. Na pumpě je otevřen kohout (DRAIN) a poté stiskneme tlačítko PURGE.
3. Zavřít kohout (DRAIN) a na pumpě stisknout tlačítko PUMP→30 min ekvilibrace vodou.
4. Zopakovat bod 3 až 4 s připravenou přefiltrovanou mobilní fází (směs methanolu a fosfátového pufru v poměru (13:87, v/v). Fosfátový pufr: 100 mM kyselina fosforečná, 5 mM hex SO₃Na, pH 2,5). Ekvilibrace mobilní fází probíhá 60 min, dále zapneme termostat (vyhřívání kolony na 45 °C)

Po přípravě přístroje na analýzu je možné vložit mikrotitrační destičku se vzorky do automatického dávkovače a nastavit přístroj podle následujících bodů:

1. Zapnutí lampy: Tlačítko FUNC- →LAMP →navolit 1 a zmáčknout ENTER a tlačítkem ZERO vynulujeme baseline lampy
2. Na modulu Pumpy: Tlačítko EDIT→ FUNC. FLOW 0,5 ml/min
3. Automatický dávkovač: EDIT→ Navolení počtu jamek, dle vzorků, REPEAT 1×, VOLUME 20 µl, TIME 16 min.
4. Nastavení software Clarity dle printscreenu
5. Start →Začátek analýzy

Po provedení analýzy:

1. Vypnutí detektorů a termostatu
2. Do Erlenovy baňky si připravíme vodu a umístíme kapiláru. Na pumpě otevřeme kohout (DRAIN) a stiskneme tlačítko PURGE.
3. Zavřeme kohout (DRAIN) a na pumpě stiskneme tlačítko PUMP→30 min ekvilibrace vodou
4. Zopakujeme bod 3 až 4 s 50 % methanolem.
5. Vypnutí přístroje.

3.4.4 Vyhodnocení výsledků

1. Program Clarity vyhodnotí plochu píku pro 5-HT a IS pro vzorky i kalibraci.
2. Z kalibrační křivky je vypočtena směrnice (závislost plochy píku (5-HT) /plochy píku (IS) na koncentraci 5-HT).

3. Pomocí směrnice je vypočtena koncentrace 5-HT ve vzorcích a % release 5-HT ve vzorcích dle vzorce:

$$\% \text{ release } 5 - \text{HT} = \frac{c(5 - \text{HT})_{\text{vzorku}}}{c(5 - \text{HT})_{\text{TOT}}} \times 100\% \quad (3.2)$$

4. Porovnání % release 5-HT pro LH a HH. Při rozdílu (LH-HH) větším než 20 % je vzorek označen za pozitivní, při rozdílu menším než 20 % je označen za negativní.

3.5 Validace metody SRA-HPLC

Validace metody stanovení SRA-HPLC u pacientů s HIT byla provedena podle metody popsané v člancích autorů Koch et al. [34] a Sono-Koree. [54]. Při validaci byla změřena kalibrační řada vzorků s klesající koncentrací serotoninu. Validační parametry (pracovní rozsah, mez stanovitelnosti a mez detekce) byly zjištěny proměřením šesti řad vzorků plazmy s přidaným serotoninem o koncentraci v rozmezí 1000 ng/ml až 7,3 ng/ml. Koncentrace serotoninu, u nichž se teoretická a naměřená hodnota lišily více než o 10 %, nebyly zahrnuty do pracovního rozsahu. Výsledky validace jsou součástí SOP a jsou uchovávány v písemné podobě, výpočty a tabulky v podobě elektronické.

3.6 Validace přístrojů a použití kalibrovaných pipet

Všechny používané přístroje během provádění analýzy musejí být pravidelně servisované a validované. Pro validaci přístrojů je využívána externí firma, která provádí kompletní servis přístroje, jehož součástí je i validace, pravidelně jednou ročně. O proběhlé validaci je vypracován validační protokol, který je uchováván pro potřeby akreditačního šetření.

Kalibrace pipet probíhá v národním kalibračním centru, které působí při Národní referenční laboratoři pro DNA diagnostiku v ÚHK. Pipety jsou kalibrovány s frekvencí jednou ročně (v případě potřeby častěji). O kalibraci je veden záznam, který je archivován na pracovišti.

4 Diskuse

Kvalita poskytovaných služeb ve zdravotnictví je v současné době zásadní prioritou pro společnost. Akreditace zdravotnické laboratoře přináší pro uživatele záruku, že jsou splněny požadavky jak na kvalitu poskytovaných služeb, tak i na kvalifikovanost a proškolenost personálu, který je zajišťuje. Posouzení kvality ve zdravotnické laboratoři v ČR probíhá podle normy ČSN EN ISO 15189: 2013 (Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost) prostřednictvím akreditačních orgánů. Upřesnění požadavků normy lze nalézt v dokumentu MPA 10-02-13 (Metodický pokyn k aplikaci ČSN EN ISO 15189:2013 v akreditačním systému ČR).

V rámci řešerše problematiky bylo zjištěno, že získání osvědčení o akreditaci probíhá v jednotlivých státech pomocí Národních akreditačních orgánů a podle mezinárodní normy ISO 15189. Doba přípravy na akreditační šetření může být až dva roky. Důvodem takto dlouhé přípravy je nutnost vypracovat rozsáhlou dokumentaci, jež je předložena akreditační komisi k posouzení. Hlavní přínos akreditace je spatřován ve zkvalitnění poskytovaných služeb v laboratoři. Mezi další přínosy lze zařadit zvýšení prestiže laboratoře, odlišení akreditovaných a neakreditovaných zařízení a lepší bonifikaci od zdravotní pojišťovny. K nejčastěji zmiňovaným záporům akreditace patří finanční náročnost řízení a administrativní zátěž spojená se samotným procesem akreditace. Kvalita laboratorních vyšetření je zajišťována mimo jiné standardními operačními postupy. Účelem SOP je standardizace pracovního postupu a vytvoření přehledného a srozumitelného návodu ke všem činnostem, které jsou součástí vyšetření. V rámci této diplomové práce byl vytvořen SOP, který bude předkládán při akreditačním šetření. Při vypracování SOP bylo postupováno na základě požadavků normy ČSN EN ISO 15189: 2013. Při vypracování bylo využito znalostí z certifikovaného kurzu Interní auditor v klinických laboratořích s praktickou částí, který jsem absolvovala v roce 2016.

Pracoviště oddělení biochemie, kde je vyšetření prováděno, je součástí Komplementu laboratoří ÚHKT (KL ÚHKT). KL ÚHKT je držitelem osvědčení o akreditaci ČIA platného do listopadu 2017. V roce 2016 ÚHKT úspěšně prošel již třetí reakreditací mezinárodní společností JCI. Prestižnost tohoto ocenění je doložena tím, že v rámci ČR jsou pouze čtyři akreditované instituce. Vyjma ÚHKT osvědčení o akreditaci získaly pouze Ústřední vojenská nemocnice Praha, Nemocnice Na Homolce a Fakultní nemocnice Ostrava. Lze tedy konstatovat, že zavedený systém kvality v ÚHKT je nastaven na vysoké úrovni.

V rámci této diplomové práce byl zpracován funkční test stanovení HIT pomocí SRA-HPLC. V České republice je diagnóza HIT stanovována imunochemicky (např. PF4-Enhanced, Accustar IgG) a funkčně (HIPA, agregace destiček). ÚHKT je jediné

pracoviště v ČR, které SRA test provádí. Potřeba akreditovat metodu SRA-HPLC tedy vyvstala z důvodu nezbytnosti specifického a senzitivního funkčního testu pro diagnostiku HIT v ČR. Diagnostika HIT je velmi obtížná a je složena z klinického a laboratorního vyšetření. Ke klinickému hodnocení HIT se využívá 4T skórovací tabulka, která je součástí žádanky o vyšetření. Laboratorní potvrzení HIT je možné provádět imunologickými nebo funkčními testy. Imunologické testy se vyznačují vysokou senzitivitou, ale nízkou specifitou. Funkční testy jsou založeny na průkazu aktivace dárčovských destiček působením HIT protilátek v přítomnosti heparinu. Mezi nejčastěji používané funkční testy patří agregační metoda, HIPA a SRA. Agregační metoda je málo citlivá s vysokým rizikem falešné negativity. HIPA test je založený na vizuální kontrole aktivovaných/neaktivovaných krevních destiček (pročeřených/nepročeřených jamek mikrotitrační destičky). Nevýhodou této metody je subjektivita při odečítání výsledků. 14C SRA metoda je charakterizována vysokou specifitou i senzitivitou, její nevýhodou je použití radioaktivně značeného serotoninu. EIA SRA má srovnatelnou citlivost jako test 14C SRA, ale je časově velmi náročná. Používaná metoda SRA-HPLC není zatížena použitím radioaktivně značeného serotoninu jako 14C SRA a ani časovou náročností jako EIA SRA. Tato metoda je vysoce senzitivní i specifická, umožňuje kvantitativní stanovení serotoninu uvolněného z dárčovských destiček a je pokládána za zlatý standard ve funkční diagnostice HIT.

Při přípravě na akreditační šetření bylo třeba pro metodu Kvalitativního stanovení HIT pomocí metody SRA-HPLC vypracovat jako součást SOP validační protokol. Validace metody probíhala ve dvou na sebe navazujících krocích. Oba kroky validace byly úspěšné a jejich vyhodnocení je součástí SOP metody a je uchováváno v elektronické podobě. Dalším krokem přípravy byla kontrola kalibrace používaných pipet a přístrojů. Pro přístroje byly vytvořeny zkrácené návody, které jsou k dispozici u každého z nich. Kalibrace používaných pipet byla zajištěna v kalibračním centru ÚHK. Kalibrační listy pipet jsou uloženy v laboratoři biochemie, odpovědnou osobou za kontrolu kalibrací je Bc. Kristýna Svobodová.

Povinností laboratoře bylo také nastavení vnitřní a vnější kontroly kvality. Tyto kontroly umožňují včas odhalit případnou chybu. Také fungují jako zpětná vazba pro laboratoř a dokazují spolehlivost laboratorních výsledků.

Vnitřní kontrola kvality byla nastavena přidáním negativní a pozitivní kontroly do každého zpracování patientských vzorků. Nastavení této kontroly se jeví jako zcela dostačující.

Při nastavení externí kontroly kvality jsme využili předešlé spolupráce s University of Pennsylvania, The Children's Hospital of Philadelphia. Využití externí kontroly kvality v rámci ČR není možné vzhledem k tomu, že tato metoda je v rámci ČR zavedena jen v ÚHK. Vzhledem k náročnosti transportu vzorků do USA je potřeba v co nejbližším horizontu navázat spolupráci s pracovištěm v Evropě.

V rámci přípravy na akreditaci proběhl interní audit, který měl za úkol zhodnotit připravenost na akreditační šetření. Výsledky tohoto auditu byly uspokojivé a metoda je tedy připravená k akreditačnímu šetření. V případě úspěšné akreditace by došlo k rozšíření nabízených vyšetření stanovení HIT a zpřesnění vyšetření. Vyšetření by také mělo být dostupnější pro více pacientů. Osvědčení o akreditaci bude hlavním vstupním bodem při jednání s odbornou hematologickou společností a následně VZP o zařazení vyšetření do úhradové vyhlášky. Vzhledem k unikátnosti metody a absenci kalkulačního listu (bodového ohodnocení pojišťovnou) není nyní tato metoda proplácena.

Pro zhodnocení vyskytujících se rizik byl zvolen Ishikawův diagram a metoda FMEA, která je již v ÚHKT zavedena a je jednou z nejpoužívanějších metod pro analýzu rizik. Pro potřeby analýzy rizik byl vytvořen hodnotící tým, který se skládal z pracovníků laboratoře biochemie a manažerky kvality. V první fázi analýzy rizik byl vytvořen Ishikawův diagram, který sloužil k určení hlavních oblastí potencionálních chyb a následně byl využit při analýze rizik pomocí metody FMEA. Průběh metody FMEA byl bez zásadních problémů. Pro členy týmu nebylo problematické ohodnotit jednotlivé chyby a ve většině případů byli ve shodě s hodnocením. Tento fakt je možné vysvětlit zkušeností jednotlivých členů s touto metodou, kdy každý z členů, vyjma manažerky kvality, zná postup této metody a na metodě se podílí. Po stanovení potencionálních chyb pro všechny procesy a jejich ohodnocení byla týmem navržena nápravná opatření. Hranice pro akceptování RPN byla navržena na základě zavedeného systému kvality v ÚHKT na hodnotu 200. Po konzultaci s manažerkou kvality ÚHKT byla nápravná opatření navržena pro všechny potencionální chyby. Cílem tohoto kroku byla minimalizace veškerých chyb na nejnižší úroveň. Potencionální chyby, u nichž rizikové číslo přesáhlo hranici akceptovatelnosti, byly při realizaci nápravných opatření prioritní. Tyto chyby s vysokým RPN byly podrobněji rozepsány v textu diplomové práce. Zde je potřeba zmínit, že potencionálních chyb, které byly nad stanovenou hladinou RPN, bylo poměrně malé množství (celkově 7). Toto je možné vysvětlit tím, že laboratoř biochemie má již akreditovanou jinou metodu (stanovení volného hemoglobinu) a postupy v laboratoři jsou tedy kontrolované a laboratorní pracovníci jsou dostatečně proškoleni.

Vzhledem k tomu, že většina potencionálních chyb vzniká na základě selhání lidského faktoru, byla většina nápravných opatření navržena jako edukace pracovníků. Hlavním smyslem edukace je neustálé opakování principů postupu práce a nutnosti jeho dodržování. Po navržení nápravných opatření byla tato opatření aplikována do laboratorní praxe. V prvních týdnech po jejich aplikaci bylo třeba vzhledem ke zvyklostem laborantek dohlížet na správné dodržování nových postupů (opatření). Po třech měsících bylo provedeno nové hodnocení procesu pomocí metody FMEA. Při tomto hodnocení došlo ke snížení rizikového čísla u všech potencionálních chyb pod stanovenou hranici přijatelnosti rizika. Z vyhodnocených výsledků analýzy FMEA je patrné, že zavedení metody FMEA do procesu laboratoře vedlo ke zvýšení kvality

prováděného vyšetření. Uvedení nápravných opatření vedlo ke snížení rizikového čísla a bylo tedy ku prospěchu zákazníka (pacienta). Zavedení metody FMEA lze tedy vyhodnotit jako přínos pro udržování systému kvality v laboratoři.

5 Závěr

Cílem diplomové práce bylo připravení laboratorní metody k akreditačnímu šetření. Pro akreditaci byla vybrána metoda Kvalitativní stanovení HIT pomocí metody SRA-HPLC. Jedná se v ČR o jedinečnou metodu, která je zavedena pouze na pracovišti laboratoře biochemie v ÚHKT.

V rámci teoretické části diplomové práce byla zpracována problematika akreditace zdravotnických laboratoří a legislativa oblasti akreditací v ČR. Pro analýzu rizik byl pomocí brainstormingu zpracován Ishikawův diagram a na jeho základě byla vypracována analýza FMEA. Po zanalyzování metody vyšetření byly vyhodnoceny potencionální chyby v preanalytické, analytické a postanalytické fázi procesu. Nápravná opatření byla stanovena pro všechny potencionální chyby v procesu, snahou těchto opatření bylo zajistit co nejnižší chybovost nově zavedené metody. Potencionálním chybám, které měly rizikové číslo nad stanovenou hranicí (200 bodů), byla věnována zvýšená pozornost a jejich implementace měla prioritní zařazení. Po implementaci nápravných opatření došlo ke snížení rizikových čísel pod kritickou hranici. Metoda FMEA tedy vedla ke snížení rizika v procesu laboratoře.

V rámci praktické části diplomové práce byl dále vytvořen SOP pro laboratorní metodu na základě požadavků normy ČSN EN ISO 15189:2013 Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost. Součástí SOP je také validační protokol. Tato validace proběhla na základě zahraniční studie autorů Soha a spol. Po zpracování SOP a standardizaci procesu vyšetření proběhl v laboratoři biochemie interní audit, který shledal, že metoda je připravena k akreditaci a lze ji při nejbližším termínu přihlásit.

Očekávané přínosy akreditace jsou zkvalitnění procesu vyšetření a možnost zahájení vyjednávání s odbornou hematologickou společností a VZP o zařazení vyšetření do úhradové vyhlášky.

Seznam použité literatury

- [1] Český institut pro akreditaci, o.p.s.: Zdravotnické laboratoře [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://www.cia.cz/akreditace.aspx>
- [2] Český institut pro akreditaci o.p.s.: Laboratoře [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://www.cia.cz/akreditace/laboratore/zdravotnicke-laboratore/principy-akreditace-zdravotnickych-laboratori.aspx>
- [3] Medical Laboratory: Medical Laboratory accreditation. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Medical_laboratory#Medical_laboratory_accreditation
- [4] Centers for Medicare and Medicaid services: Regulations and Guidance [online]. [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <https://www.cms.gov/Regulations-and-Guidance/Legislation/CLIA/index.html>
- [5] European accreditation: About us [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://www.european-accreditation.org/mission>
- [6] BOURSIER, Guilaine, Ines VUKASOVIC, Pika Mesko BRGULJAN, et al. Accreditation process in European countries – an EFLM survey: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1515/cclm-2015-0780. ISBN 10.1515/cclm-2015-0780. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2016.54.issue-4/cclm-2015-0780/cclm-2015-0780.xml>
- [7] GUZEL, Omer a Ebru Ilhan GUNER. ISO 15189 Accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.09.011. ISBN 10.1016/j.clinbiochem.2008.09.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912008003998>
- [8] PETER, Trevor F., Philip D. ROTZ, Duncan H. BLAIR, et al. Impact of Laboratory Accreditation on Patient Care and the Health System: How to Validate an In-house Developed Method an Example of Lead Determination in Whole Blood by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1309/AJCPH1SKQ1HNWGHF. ISBN 10.1309/AJCPH1SKQ1HNWGHF. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCPH1SKQ1HNWGHF>
- [9] European accreditation: EA Members [online]. [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: <http://www.european-accreditation.org/ea-members>

- [10] GARCIA HEJL, Carine, Jose Manuel RAMIREZ, Philippe VEST, et al. Working Towards Accreditation by the International Standards Organization 15189 Standard: How to Validate an In-house Developed Method an Example of Lead Determination in Whole Blood by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.3343/alm.2014.34.5.367. ISBN 10.3343/alm.2014.34.5.367. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3343/alm.2014.34.5.367>
- [11] IACOB, Erica, Lia VANZETTI, Salvatore GENNARO, et al. Quality management system and accreditation of measurements in a surface science laboratory: the case study of MiNALab [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1002/sia.5490. ISBN 10.1002/sia.5490. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sia.5490>
- [12] YANIKKAYA-DEMIREL, Gulderen, Young Ahn YOON, Junghan SONG, et al. ISO 15189 accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory II [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.09.099. ISBN 10.1016/j.clinbiochem.2008.09.099. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912008004001>
- [13] JANG, Mi-Ae, Young Ahn YOON, Junghan SONG, et al. Effect of Accreditation on Accuracy of Diagnostic Tests in Medical Laboratories: A Systematic Review of the Literature [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.3343/alm.2017.37.3.213. ISBN 10.3343/alm.2017.37.3.213. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3343/alm.2017.37.3.213>
- [14] HUISMAN, Wim, A. Rita HORVATH, David BURNETT, et al. Accreditation of medical laboratories in the European Union: A Systematic Review of the Literature [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1515/CCLM.2007.037. ISBN 10.1515/CCLM.2007.037. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2007.45.issue-2/cclm.2007.037/cclm.2007.037.xml>
- [15] ALKHENIZAN, Abdullah a Charles SHAW. Impact of Accreditation on the Quality of Healthcare Services: A Systematic Review of the Literature [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.4103/0256-4947.83204. ISBN 10.4103/0256-4947.83204. Dostupné z: <http://www.annsaudimed.net/index.php/vol31/vol31iss4/184.html> European accreditation: About us [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://www.european-accreditation.org/mission>
- [16] Český institut pro akreditaci, o.p.s.: Akreditace [online]. [cit. 2016-06-01]. Dostupné z: <http://www.cia.cz/akreditace.aspx>
- [17] ČSN EN ISO 15189, Zdravotnické laboratoře - Požadavky na kvalitu a způsobilost: ed. 2. Český normalizační institut, 2013

- [18] Metodické pokyny pro akreditaci [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.cia.cz/Download.ashx?Type=Document&Id=17792>
- [19] Český institut pro akreditaci, o.p.s.: Legislativa [online]. [cit. 2016-05-30]. Dostupné z: <http://www.cia.cz/o-nas/legislativa.aspx>
- [20] Český institut pro akreditace o.p.s.: O nás [online]. [cit. 2017-01-03]. Dostupné z: <http://www.cia.cz/o-nas.aspx>
- [21] Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře při České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: www.naskl.cz
- [22] JABOR, Antonín a Janka FRANEKOVÁ. NASKL – proces zvyšování kvality práce klinických laboratoří, příprava k akreditaci a ověřování kvality práce klinických laboratoří. 2010
- [23] MADAR, Jiří. Řízení kvality ve zdravotnickém zařízení. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 248 s. ISBN 8024705850
- [24] Rozdíly mezi normou ISO 9001:2008 a ISO 9001:2015. [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://isoporadce.cz/Rozd%EDly%20mezi%20normou%20ISO%209001.pdf>
- [25] ČSN EN ISO 9000 (010300). Systém managementu kvality – Základní principy a slovník. Praha: Český normalizační institut, 2016.
- [26] ČSN EN ISO 9001 (010321). Systém managementu kvality – Požadavky. Praha: Český normalizační institut, 2016.
- [27] DANĚK, Tomáš, Jaromír GUMULEC, Miroslav TURJAP, Lucie RÉCOVÁ, Lenka NEMETHOVÁ, Pavla PLÍŠKOVÁ, Lubica RAUOVÁ, Radim BRÁT, Milan MATUŠKA a Roman HÁJEK. Terapie heparinem indukované trombocytopenie: návrh doporučeného postupu. In XXII. ČESKO-SLOVENSKÁ KONFERENCE O TROMBÓZE A HEMOSTÁZE. 2015.
- [28] Novotný, J., Konvičková, L. Heparinem indukovaná trombocytopenie. Vnitř. Lék., 1998, 44, 5, s. 282–287.
- [29] WARKENTIN, T. E., A. GREINACHER, Y. GRUEL, R. H. ASTER a B. H. CHONG. Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia: a conceptual framework and implications for diagnosis [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04536.x. ISBN 10.1111/j.1538-7836.2011.04536.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2011.04536.x>
- [30] GUMULEC, J. Možnosti diagnostiky heparin indukované trombocytopenie v České republice. Vnitřní lékařství [online]. 2012, 58(7 a 8): 128-134 [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/profile/Jaromir_Gumulec2/publication/232253741_D

iagnosis_of_heparin-induced_thrombocytopenia_in_the_Czech_Republic/links/0deec5325b6f975d6100000.pdf

- [31] Clinical presentation and diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia [online]. [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-diagnosis-of-heparin-induced-thrombocytopenia>
- [32] Sheridan D, Carter C, Kelton JG, et al.: A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia, *Blood* 1986, 67:27-30
- [33] CHRASTINOVÁ, L., J. SUTTNAR, T. BOLCKOVÁ, A. HLAVÁČKOVÁ, J. ŠTIKAROVÁ, K. PIMKOVÁ a J.E. DYR. Serotonin release assay a další funkční testy v diagnostice HIT.
- [34] KOCH S, HARENBERG J, ÖDEL M, ET AL. Developmnet of a High Pressure Liquid Chromatography Method for Diagnosis of Heparin Induced Thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 117, 2002.
- [35] Ústav hematologie a krevní transfuze [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <https://www.uhkt.cz/ustav>
- [36] ROUBALOVÁ, Lucie. Procesy a management rizik ve zdravotnické laboratoři [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f105/FlyOut/Roubalova_Management_rizik.pdf
- [37] TRÁVNÍČKOVÁ, Dana. Způsobilost procesů ve zdravotnických službách. Ostrava, 2009. Dizertační práce. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství. Vedoucí práce Zgodavová, Kristýna.
- [38] Brainstorming. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Brainstorming>
- [39] Diagram příčin a následků. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Diagram_p%C5%99%C3%AD%C4%8Din_a_n%C3%A1sledk%C5%AF
- [40] Ishikawův diagram. Managementmania [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <https://managementmania.com/cs/ishikawuv-diagram>
- [41] FMEA: Quick Guide to Failure Mode and Effects Analysis [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <https://www.isixsigma.com/tools-templates/fmea/quick-guide-failure-mode-and-effects-analysis/>

- [42] FMEA. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/FMEA>
- [43] ING. ŽILKA MIROSLAV, PH.D. Machinery FMEA – MFMEA [online]. In: . [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: https://www.qmprofí.cz/33/machinery-fmea-mfmea-uniqueidgOkE4NvrWuOKaQDKuox_Z9jYOY2_gF829_n_I5qPcKo/?query=DFMEA&serp=1
- [44] ČSJ.: Analýza možných způsobů a důsledků závad (FMEA). Česká společnost pro jakost, 2001, 72 s, ISBN 80-02-01475-6
- [45] ČSN EN 60812. Techniky analýzy bezporuchovosti systémů - Postup analýzy způsobů a důsledků poruch (FMEA). Praha: Český normalizační institut, Leden 2007. 44 s. Třídící znak 01 0675.
- [46] PLURA, Jiří. *Plánování a neustálé zlepšování jakosti*. Praha: Computer Press, 2001. Business books (Computer Press). ISBN 80-722-6543-1.
- [47] SEKK spol. s r. o. a EURACHEM-ČR: *Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři* [online]. 2009 [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm#O>
- [48] TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
- [49] Bedřich Friedecký, Luděk Šprongl, Josef Kratochvíla a Zbyněk Plzák. *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* [online]. ČSKB ČLS JEP, 2010 [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace_2010.pdf
- [50] Česká společnost klinické biochemie: *Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* [online]. 2004 [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod#06>
- [51] *Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: http://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistoty_doporuceni.pdf
- [52] Vnitřní kontrola kvality. *Česká společnost klinické biochemie* [online]. [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/dokumenty/vnitri-kontrola-kvality.pdf>
- [53] Řízení analytické kvality: Externí kontrola kvality. *Podpora efektivní spolupráce biomedicínských oborů MU a VUT Brno s účastí aplikační sféry 2009–2012* [online]. [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/pes/index.php?id=1190>

[54]SONO-KOREE, N. K., R. A. CRIST, E. L. FRANK, G. M. RODGERS a K. J. SMOCK. A high-performance liquid chromatography method for the serotonin release assay is equivalent to the radioactive method [online]. [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1111/ijlh.12442. ISBN 10.1111/ijlh.12442. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijlh.12442>

Seznam tabulek


Tabulka 1.1: Přehled národních akreditačních orgánů v Evropě	14
Tabulka 1.2: Seznam zahraničních studií	15
Tabulka 1.3: 4Ts skórovací systém	25
Tabulka 2.1: Hodnocení parametrů metody FMEA	35
Tabulka 3.1: Míra přijatelnosti RPN	47
Tabulka 3.2 FMEA Preanalytická fáze procesu	48
Tabulka 3.3 FMEA Analytická fáze procesu	50
Tabulka 3.4 FMEA Postanalytická fáze procesu.....	53
Tabulka 3.5:FMEA preanalytická fáze procesu po provedení nápravných opatření	57
Tabulka 3.6: FMEA pro analytickou fázi procesu po provedení nápravných opatření	59
Tabulka 3.7 FMEA Postanalytická fáze procesu po provedení nápravných opatření	61
Tabulka 3.8: Kalibrační řada 5-HT	67

Seznam obrázků

Obrázek 1.1 Základní schéma procesů v laboratoři.....	28
Obrázek 1.2:Procesní mapa procesů v laboratoři	29
Obrázek 1.3: Rozdělení procesů dle normy ISO 15189	31
Obrázek 2.1: Schéma Ishikawova diagramu.....	33
Obrázek 2.2: Schéma průběhu FMEA analýzy	37
Obrázek 2.3: Příklad formuláře FMEA analýzy.....	38
Obrázek 3.1 Ishikawův diagram	46
Obrázek 3.2 Preanalytická fáze procesu srovnání FMEA	63
Obrázek 3.3 Analytická fáze procesu srovnání FMEA	64
Obrázek 3.4 Postanalytická fáze procesu srovnání FMEA	64


Seznam příloh

Příloha 1: SOP	84
----------------------	----

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Zpracovatel:	Bc. Svobodová Kristýna	Podpis:	
Přezkoumal a schválil:		Podpis:	
Garant dokumentu:		Podpis:	
Platnost od:		Uvolněno pro systém:	
Výtisk č:	1	Počet stran:	
Verze:	A1	Přijato do evidence:	

Platnost od:	Verze	Obsah změny/ revize	Podpis garanta	Schválení revize

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

1 ÚČEL VYŠETŘENÍ

SOP dokumentuje postup pro stanování Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC. Heparinem indukované trombocytopenie (HIT) je jednou z hlavních komplikací léčby heparinem, která se vyskytuje přibližně u 5 % pacientů léčených pomocí nefrakcionovaného heparinu. Heparinem indukovaná trombocytopenie je způsobena specifickými protilátkami, které rozpoznávají komplexy heparinu a destičkového faktoru 4, což vede k aktivaci krevních destiček. SRA-HPLC je metoda na průkaz protilátek proti heparinovému komplexu v séru nemocného s HIT schopných *in vitro* aktivovat krevní destičky zdravého dárce. Průkaz těchto protilátek má zásadní diagnostický význam.

2 PRINCIP VYŠETŘENÍ A POUŽITÉ VYŠETŘOVACÍ METODY.

Metoda využívá principu HPLC a umožňuje rychlé a citlivé stanovení diagnózy HIT. Metoda probíhá dvoukrokovým testem, při dvou koncentracích heparinu. Kdy za nízké koncentrace heparinu (0,1 U/ml) dochází k aktivaci destiček HIT sérem, zatímco při vysoké koncentraci (100U/ml) je aktivace potlačena díky rozpadu imunokomplexu. Tím je možné vyloučit nespecifickou aktivaci. Pro kontrolu spontánního uvolňování serotoninu (negativní kontrola) je využíváno Tyrodového pufru. Pro zjištění maximálního množství uvolnitelného serotoninu (pozitivní kontrola) je použita aktivace krevních destiček peptidem aktivujícím destičkový trombinový receptor (TRAP).

3 MÍSTO PROVEDENÍ POSTUPU A SPECIFICKÉ POŽADAVKY NA BEZPEČNOST PRÁCE A PROTIKONTAMINAČNÍ OPATŘENÍ


Vyšetření je prováděno výhradně ve stálých prostorách oddělení Biochemie. Během práce se dbá bezpečnostních postupů práce s infekčním materiálem. Práce v laboratoři se řídí platným dokumentem PROVOZNÍ ŘÁD.

3.1 Osoby oprávněné k provedení vyšetření

Viz tento SOP příloha č.2: MATICE ODPOVĚDNOSTÍ.

3.2 Postupy před přijetím vzorku do laboratoře

Požadavky na odběry a další pokyny pro postupy před přijetím vzorku k vyšetření včetně specifikací primárního a zpracovaného materiálu pro vyšetření, vhodné odběrové nádoby, přídavné látky, množství vzorku pro analýzu a jeho stabilita před dodáním do laboratoře – viz LABORATORNÍ PŘÍRUČKA.

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Příprava pacienta před odběrem viz LABORATORNÍ PŘÍRUČKA, kapitola POKYNY PRO PŘÍPRAVU PACIENTA

3.3 Příjem vzorků do laboratoře a evidence vzorků

Kritéria pro příjem a odmítnutí vzorků viz LABORATORNÍ PŘÍRUČKA, kapitola KRITÉRIA PRO PŘIJETÍ A ODMÍTNUTÍ VZORKŮ. Vzorky jsou primárně přijímány na Oddělení Imunohematologie. Při převzetí vzorku se do Průvodky o převzetí primárního vzorku, který je přijímán společně se vzorkem a kopií žádanky, zapíše datum, čas přijetí a osoba, která vzorek přijímala. Každý primární vzorek přijatý ke zpracování v laboratoři má při příjmu přidělen kód vzorku.


3.4 Stabilita vzorku

Testování by mělo být provedeno co nejdříve po odběru. Vzorky, které nemohou být vyšetřeny ihned po odběru, by měly být skladovány při 2-8 °C ne déle než 48 hodin nebo zamrazeny na -20 °C. Vzorky zamražené při teplotě – 20 °C je možno skladovat po dobu 3 let. Pokud je vzorek skladován nebo přepravován, mělo by být odděleno sérum od krvinek centrifugací 5 minut při 4000 g.

3.5 Specifické požadavky na bezpečnost

Oddělení biochemie má dokumentované postupy pro:

- odběr vzorků ([Laboratorní příručka](#)),
- provoz pracoviště ([Provozní řád](#), [Laboratorní příručka](#))
- provádění úklidu, dezinfekce ([SŘ Hygienicko-epidemiologický řád ÚHKT](#), [SŘ Desinfekce](#), [Provozní řád](#), [Vnitřní předpisy](#))
- manipulaci s biologickým materiálem ([SŘ Hygienicko-epidemiologický řád](#), [Provozní řád](#), [Laboratorní příručka](#))
- bezpečnost práce ([SŘ Bezpečnost a ochrana zdraví při práci BOZP](#), [SŘ Poskytování osobních ochranných prostředků](#))
- likvidaci odpadů ([SŘ Hygienicko-epidemiologický řád ÚHKT](#), [SŘ Nakládání s odpady v ÚHKT](#), [SŘ Zacházení s nebezpečnými látkami a přípravky v ÚHKT](#))

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

3.6 Dodavatelé

Dodávky materiálů a zařízení a služby servisních organizací musí zaručovat vysokou technickou úroveň a spolehlivost. Proto jsou tyto služby podrobeny jednotnému řízení, pokud lze předpokládat, že mají podstatný vliv na kvalitu prováděných laboratorních vyšetření.

Evidence všech schválených dodavatelů je vedena v elektronickém SW HELIOS. Výběr a hodnocení dodavatelů zajišťuje splnění požadavků zdravotnické laboratoře na nákup kvalitních materiálů, služeb a zařízení ovlivňujících výsledky vyšetření.

4 METROLOGICKÁ NÁVAZNOST

4.1 KALIBRACE METODY


Není relevantní pro tento SOP.

4.2 METROLOGICKÁ NÁVAZNOST POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ

Používané přístroje a zařízení podléhají pravidelným kalibracím, servisním kontrolám a validacím viz. Metrologický řád ÚHKT a návazné předpisy. Pro všechny kroky postupu jsou používány výhradně přístroje s platnou kalibrací/servisní kontrolou/validací. Termín platnosti je uveden na štítku přístroje, obsluha kontroluje jeho platnost při provedení vyšetření.

Pro pipetování přesných objemů jsou používány výhradně automatické pipety s platnou kalibrací.

Konkrétní specifikace požadované metrologické návaznosti je uvedena u jednotlivých přístrojů a zařízení.


Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

5 PŘÍSTROJE A POMOCNÁ ZAŘÍZENÍ

Seznam používaných přístrojů a pomocných zařízení je veden v systému Helios (<http://helios/udrzbapozadavky/menu.aspx>) spravovaném biomedicínskými technikami a uveden níže. Tento systém zajišťuje pravidelné validační a kalibrační kontroly všech přístrojů a zařízení v souladu se Směrnicí pro ověřování, kalibraci a validaci přístrojů a zařízení. Součástí Karty každého přístroje jsou informace o jeho umístění, osobní zodpovědnosti, údaje o kalibracích a validacích. U každého přístroje používaného v akreditovaném provozu je vyvěšen zkrácený návod k použití v českém jazyce. Přístroj je opatřen štítkem s údaji o validaci/kalibraci. Vedle odborného servisu podléhají přístroje pravidelné údržbě dle dokumentu, Plán údržby. Systém Helios rovněž umožňuje zadání požadavků na opravu a servis přístrojů a sledování aktuálního stavu vyřízení těchto požadavků. Pokud je zjištěno, že přístroj nepracuje standardně, je opatřen hlášením: „Porucha, nepoužívat“ a je zadán požadavek na jeho kontrolu/opravu. U chladících zařízení je monitorována teplota záznamovým zařízením.

Seznam používaných přístrojů a pomocných zařízení

- HPLC SHIMADZU
- Vodní lázeň
- Centrifuga chlazená Hereus Megafuge 16R
- Centrifuga Beckman Coulter Avanti J-25I
- Systém na úpravu vody Millipore RiOs 3
- Systém na úpravu vody Millipore Milli Q
- Centrifuga Jouan CT 4.22
- pH metr Jenway 3510
- Míchačka magnetická s topením ARE
- Pipety FinnpiPETTE Novus 100-1000 µl
- Pipeta FinnpiPETTE Novus 1-10 µl
- Pipeta FinnpiPETTE Novus 20-200 µl
- Analytické váhy Sartorius
- Vortex IKA-Schuttler MTS 4

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

6 REAGENCIE A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Kontrolu kvality dodávaného materiálu provádí pracovník, který specifikoval objednávku nebo pracovníci jednotlivých SOP, pro jejichž práci je dodávka určena/kteří ji objednali. Při příjmu se kontroluje vždy:

- totožnost dodávky
- množství
- číslo šarže (je-li uvedeno)
- expirace (je-li uvedena)
- neporušenost a čistota obalu
- vzhled (např. přítomnost zákalu, nepatřičné zbarvení)
- dodržení podmínek přepravy (pokud je u dodávky specifikováno)


Přejímající pracovník potvrdí dodací list a záznam o přezkoumání na žadance příslušné dodávky. Svým podpisem stvrzuje provedení kontroly výše uvedených parametrů. Dodací listy se archivují u žadank ve složce objednávek zboží.

V případě zjištění závad (zboží je poškozeno nebo znehodnoceno) při příjmu je dodávka reklamována u dodavatele. Závady zjištěné při příjmu, které nevyžadují okamžitou reklamací, jsou přejímajícím pracovníkem označeny v žadance/dodacím listu. Pokud je dodávka nepoškozená, je považována za vhodnou pro příjem do laboratoře. V takovém případě se další záznam neprovádí.

6.1 Ověření reagensů

Četnost

- Provádí se u klíčových reagensů v těchto případech:
- Nové nebo pozměněné složení klíčové reagensie
- Změna postupu v doporučení výrobce/v příbalovém letáku
- Nová šarže klíčové reagensie
- Nová dodávka klíčové reagensie

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Provedení

Standardně se provede testování jednoho vzorku s ověřeným výsledkem (dříve testovaného stejnou nebo obdobnou metodou) nebo vhodného referenčního materiálu. Postup musí být zcela v souladu s příslušným SOP. Detailní a alternativní postupy mohou být uvedeny v jednotlivých SOP. Ověření může být provedeno současně s prvním použitím diagnostické soupravy nebo klíčové reagentie. Výsledek ověření musí být prokazatelně zhodnocen, zkontrolován a uvolněn k použití před vydáním prvního výsledku vyšetření provedeného s využitím ověřované diagnostické soupravy nebo klíčové reagentie.

6.2 Reagentie připravené v laboratoři

U reagentií připravovaných v laboratoři je definováno jejich složení, podmínky skladování a doba expirace.

K reagentií jsou vedeny záznamy:


- Identifikaci reagentie
- Složení
- Datum přípravy
- Identifikaci osoby, která reagentii připravila
- Šarže výchozích reagentií použitých při přípravě

Za kontrolu expiraci roztoků, které byly připraveny z kontrolních materiálů, odpovídá pracovník, který je připravil. Kontrolní materiály jsou jednoznačně označeny a jsou skladovány odděleně od ostatních materiálů. Evidence kontrolních materiálů, standardů a etalonů je vedena metrologem.

Pro všechny reagentie je vedena evidence připravených roztoků a evidence reagentií. Podrobnější popis skladování, expirace a přípravy roztoků je uvedeno u jednotlivých postupů.

Seznam chemikálií a reagentií


- ACD pH 4,5
- EDTA
- PGE1 (prostaglandin)
- 5-HT
- IS (Inner standard)

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

- NaBH₄
- HClO₄
- H₂O
- MeOH p.a.
- hexSO₃Na
- Et₃N
- Heparin
- Fraxiparin
- Tyrodový pufr Ca⁺ pH 7,4
- Tyrodový pufr bez Ca pH 6,2
- H₃PO₄
- HEPES

Spotřební materiál

- Ochranné rukavice
- Buničina
- Mikrotitrační destička špičaté dno
- Mikrotitrační destička kulaté dno
- Víčko na mikrotitrační destičky
- Kovové kuličky
- Kónické zkumavky – falkonky (15 ml)
- Zkumavky Eppendorf
- Pasteurovy pipety PE
- Špičky bez filtru
- Zkumavky 15 ccm PS
- Kolona (NUCLEOSIL C18, 125 x 3 mm, 5 μm)

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

7 ŘÍZENÍ KVALITY

Podklady k validacím, výsledky validací a validační protokoly jsou uchovávány v písemné podobě, výpočty a tabulky v podobě elektronické. Metoda byla validovaná v podmínkách laboratoře a byly testovány prvky, které jsou důležité z hlediska použití metody pro klinická vyšetření. V rámci validace metody byly testovány parametry: pracovní rozsah, mez stanovitelnosti a mez detekce. Porovnatelnost výsledků je ověřována v rámci pravidelných průběžných verifikací.

7.1 Externí kontrola kvality

Externí kontrola kvality je prvkem řízení kvality, který se používá ke sledování úrovně práce Oddělení biochemie v kontextu jiných laboratoří. Externí kontroly se používají k ověření vhodnosti používaných postupů. Plán externí kontroly kvality schvaluje vedoucí laboratoře pro celé akreditační období vždy (5 let). Výsledky v externích kontrolách podléhají analýze a vyhodnocení, které provádí odborné vedení laboratoře. V případě neúspěšnosti je aplikován systém řízení neshodné práce. Korespondence a výsledky účasti v externích kontrolách jsou uloženy u vedoucího Oddělení biochemie. Archivace dokladů je minimálně 5 let. Vzorčky externích kontrol kvality a jsou zařazeny jako běžně vyšetřované vzorky a jejich zpracování je provedeno rutinními postupy pracovníky, kteří je standardně provádějí.


Externí kontrola kvality je zajištěna výměnou pozitivních a negativních vzorků s University of Pennsylvania, The Children's Hospital of Philadelphia. (Lubica, Rauova, MD, PhD). Na Pensylvánské univerzitě jsou vzorky analyzovány pomocí metody průtokové cytometrie.

7.2 Interní kontrola kvality

Interní kontrola kvality probíhá při každém zpracování vzorků pomocí negativní a pozitivní kontroly, které jsou zařazeny ke zpracovávaným patientským vzorkům.

7.3 Validace metody SRA-HPLC

Validace metody stanovení SRA-HPLC u pacientů s HIT byla provedena podle metody popsané v článku (Koch S. 2002, Sono-Koree N.K. 2016) Při validaci byla změřena kalibrační řada vzorků s klesající koncentrací serotoninu. Validací parametry (pracovní rozsah, mez stanovitelnosti a mez detekce) byly zjištěny proměřením šesti řad vzorků plazmy s přidaným serotoninem o koncentraci v rozmezí 7,3 ng/ml až 1000 ng/ml. Koncentrace serotoninu, u nichž se teoretická a naměřená hodnota lišily o více než 10 % nebyly zahrnuty do pracovního rozsahu.

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Horní mez pracovního rozsahu odpovídá koncentraci 500 ng/ml. Mez stanovitelnosti je shodná s dolní mezí pracovního rozsahu 15,625 ng/ml. Mez detekce byla vypočtena jako jedna třetina meze stanovitelnosti.


Jednotlivé validační parametry jsou zaznamenány v tabulce č.1. Horní mez pracovního rozsahu odpovídá koncentraci 500 ng/ml. Mez stanovitelnosti je shodná s dolní mezí pracovního rozsahu 15,625 ng/ml. Mez detekce byla vypočtena jako jedna třetina meze stanovitelnosti.

Tabulka 1: Seznam validačních parametrů [vlastní]

Validační parametry	Koncentrace (ng/ml)
Horní mez	500
Dolní mez	15,625
Mez stanovitelnosti	15,625
Mez detekce	5,208333

Vzorky s koncentrací na horní, střední a spodní mezi pracovního rozsahu (koncentrace 500 ng/ml, 125 ng/ml a 15, 625 ng/ml) byly připraveny v šesti opakováních pro každou koncentraci. Celkově bylo tedy připraveno 24 vzorků. Změřením těchto vzorků a následným vypočtením parametrů validace je zajištěna validace metody ve druhém kroku SRA-HPLC metody.

Opakovatelnost byla zjištěna proměřením vzorků plazmy s přidaným serotoninem o třech koncentracích. Naměřené hodnoty koncentrace serotoninu jsou zaznamenány v tabulce č.2

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Tabulka 2: Naměřená koncentrace serotoninu [vlastní]


Vzorek	Koncentrace (ng/ml)		
	500	125	15,625
1	497,0857	132,92219	16,85137
2	487,0351	132,557602	16,78057
3	499,7107	130,432646	16,90402
4	498,931	130,322148	16,86988
5	491,405	130,677385	17,20937
6	489,983	127,688426	16,40774
Průměr	494,0251	130,766733	16,83716
SD	5,250218	1,87863983	0,257641
Variační Koefficient [%]	1,063	1,437	1,530

Na hladině horní meze pracovního rozsahu (500 ng/ml) je variační koeficient 1,063 %, na hladině 125 ng/ml je variační koeficient 1,437 %, na spodní hladině meze (15,625 ng/ml) je variační koeficient 1,530 %.

Správnost metody byla ověřena pomocí porovnání průměrných hodnot koncentrace serotoninu s příslušnou teoretickou hodnotou koncentrace serotoninu viz tabulka č.3.


Tabulka 3: Správnost metody[vlastní]

Vzorek	Koncentrace (ng/ml)		
	500	125	15,625
1	497,0857	132,9222	16,85137
2	487,0351	132,5576	16,78057
3	499,7107	130,4326	16,90402
4	498,931	130,3221	16,86988
5	491,405	130,6774	17,20937
6	489,983	127,6884	16,40774
Průměr	494,0251	130,7667	16,83716
Teoret.hodnota	500	125	15,625
10 % z teoretické	50	12,5	1,5625
Teoretická – měřená	5,975	-5,767	-1,212

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Validace metody v prvním kroku SRA metody (inkubace patientského séra s destičkami a heparinem) byla provedena změřením 8 kontrolních vzorků (4 pozitivní a 4 negativní pacienti) s destičkami od třech různých dárců. U měřených vzorků byla 100 % shoda.

Výsledky validace jsou uchovávány v písemné podobě, výpočty a tabulky v podobě elektronické.

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

7.4 Validace přístrojů a použití kalibrovaných pipet

Všechny používané přístroje během provádění analýzy musí být pravidelně servisované a validované. Pro validaci přístrojů je využívána externí firma, která provádí kompletní servis přístroje, jehož součástí je i validace, pravidelně jednou ročně. O proběhlé validaci je vypracován validační protokol, který je uchováván pro potřeby akreditačního šetření.

Kalibrace pipet probíhá v národním kalibračním centru, které působí při Národní referenční laboratoři pro DNA diagnostiku v ÚHKT. Pipety jsou kalibrovány s frekvencí jednou ročně (v případě potřeby častěji). O kalibraci je veden záznam, který je archivován na pracovišti.

8 PRACOVNÍ POSTUP

Viz. Příloha 1: Pracovní postup

9 Verifikace

Viz. Příloha Verifikační protokol

10 DOKUMENTACE ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ DAT


Naměřené hodnoty jsou z programu Clarity exportovány do programu MS EXCEL.

10.1 Vyhodnocení výsledků

1. Program Clarity vyhodnotí plochu píku pro 5-HT a IS pro vzorky i kalibraci.
2. Z kalibrační křivky vypočítáme směrnici (závislost plochy píku (5-HT) /plochy píku (IS) na koncentraci 5-HT).
3. Pomocí směrnice vypočteme koncentraci 5-HT ve vzorcích a % release 5-HT ve vzorcích dle vzorce

$$\% \text{ release } 5 - \text{HT} = \frac{c(5 - \text{HT})\text{vzorku}}{c(5 - \text{HT})\text{TOT}} \times 100\%$$

4. Porovnání % release 5-HT pro LH a HH. Při rozdílu (LH-HH) větším než 20 % je vzorek označen za pozitivní, při rozdílu menším než 20 % je označen za negativní.

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

10.2 KONTROLA A VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Konečný výsledek je zaznamenán do pracovního protokolu. Tento protokol zpracovává a správnost kontroluje oprávněná osoba viz. příloha MATICE ODPOVĚDNOSTÍ pro tento SOP.

11 MOŽNÉ ZDROJE VARIABILITY, INTERFERENCE A ZKŘÍŽENÉ REAKCE

Nejsou známy

12 BIOLOGICKÉ ROZMEZÍ A KLINICKÉ ROZHODOVACÍ HODNOTY

Hodnocení:

<i>Parametr</i>	<i>% uvolněného 5-HT</i>
0,1 IU/ml heparin	> 35
100 IU/ml heparin	< 15


13 VZNIKAJÍCÍ ZÁZNAMY A DOKUMENTY

13.1 Záznamy

Všechny deníky jsou vedeny v evidenci řízené dokumentace v elektronické podobě a jsou uloženy na zálohovaném disku M.

13.2 Související dokumenty

- Laboratorní příručka
- SOPT
- EKM
- Výsledkový list
- Provozní řád
- Informovaný souhlas dárce
- Evidence příbalových letáků

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Směrnice ředitele:


- Bezpečnost a ochrana zdraví při práci
- Nakládání s odpady v ÚHKT
- Řízení informací v ÚHKT
- Zacházení s nebezpečnými látkami a přípravky v ÚHKT
- Hygienicko-epidemiologický provozní řád ÚHKT
- Směrnice pro řízení dokumentů komplementu laboratoří ÚHKT
- Bezpečnostní listy

14 ODKAZY

SONO-KOREE, N. K., R. A. CRIST, E. L. FRANK, G. M. RODGERS a K. J. SMOCK. *A high-performance liquid chromatography method for the serotonin release assay is equivalent to the radioactive method* [online]. [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1111/ijlh.12442. ISBN 10.1111/ijlh.12442. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijlh.12442>


15 DEFINICE, TERMINOLOGIE A ZKRATKY

SOP	Standartní operační postup
PK	Příručka kvality
LP	Laboratorní příručka
SRA	Serotonin release assay
SOPT	standartní operační technický postup
HIT	Heparin indukovaná trombocytopenie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IKK	Vnitřní kontrola kvality
EKK	Externí kontrola kvality
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

16 ROZDĚLOVNÍK

1.	Elektronicky
2.	

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Příloha č.1: Pracovní postup

Postup laboratorního vyšetření HIT je rozdělen do dvou na po sobě následujících kroků.

1 Inkubace patientského séra s krevními destičkami a heparinem

Prvním krokem vyšetření SRA-HPLC je získání zdravých dárcovských destiček.

1.1 Izolace krevních destiček

Krevní destičky jsou získávány od dobrovolných dárců na odběrovém sálu ÚHKÚ. Dárci nesmí 14 dní před odběrem požit léky, které ovlivňují krevní destičky (ibuprofen, paralen). Dárci je odebrána žilní krev do PP zkumavek s ACD v poměru 8,1: 1,9 ml. Celkové množství žilní krve v jednotlivých zkumavkách je tedy 10 ml.


Po ukončení odběru je krev odstředěna na centrifuze (220 g/ 15 min/37 °C). Při odstředění dojde k oddělení jednotlivých složek krve a laboratorní pracovník stáhne do nové PP zkumavky bohatou plazmu (PRP). Na 10 ml plné krve připadá zhruba 3,5 ml PRP. Odebereme 400 µl pro zjištění počtu krevních destiček. Do bohaté plazmy je přidán prostaglandin (PGE1) a to v poměru 1 µl /1 ml plazmy. PGE1 tlumí aktivitu destiček. Takto upravená plazma je poté inkubována ve vodní lázni (10 min, 37 °C). Po inkubaci je PRP odstředěna (1000 g /10 min, 37 °C). Poté stáhneme chudou plazmu do nových PP zkumavek a tuto plazmu použijeme v následujícím kroku pro přípravu kalibrace. Peletu destiček resuspendujeme v Tyrodovém pufru pH 6,2 a to ve stejném množství jaký byl původní objem PRP. Z vytvořené směsi odebereme 400 µl pro zjištění počtu krevních destiček. Do směsi přidáme PGE1 v poměru 1µl /1ml plazmy a odstředíme (600 g/10 min/37 °C). Stáhneme promývací pufr, peletu destiček resuspendujeme ve vypočteném množství Tyrodového pufru pH 7,4, a to tak, aby výsledný počet destiček byl 300 000/ µl (podle vzorce). Vyizolované destičky inkubujeme ve vodní lázni (30 min, 37 °C).

Vztah pro výpočet množství (ml) Tyrodového pufru pH 7,4

$$\frac{\text{celkové množství PRP} \times \text{počet destiček spočtených analyzátozem}}{300 \text{ (požadované množství destiček v reakci)}}$$

Příprava na mikrotitrační destičce:

Chemikálie:

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Heparin: HH: 725 µl tyrodového pufru pH 7,4 + 500 µl heparinu, LH: 5 ml tyrodového pufru pH 7,4 + 5 µl odebraných z HH

Fraxiparin: HF: 1025 µl tyrodového pufru pH 7,4 + celý fraxiparin (fraxiparine inj. Sol 6 ml), LF: 5 ml tyrodového pufru pH 7,4 + 5 µl odebraných z HF)

Imipramin: 4ml tyrodového pufru pH 7,4 + 1 ml Imipraminu s vitamínem C (0,00634 g imipraminu, 0,3523 g vit. C/100 ml vody)

TRAP: 30 µl tyrodového pufru pH 7,4 + 20 µl TRAPU


Mikrotitrační destičku rozdělíme na dvě poloviny a podle připraveného rozpisu umístíme do každé jamky 1 kovovou kuličku. Poté do každé jamky přidáme 5 µl připraveného imipraminu. Do jamek TP přidáme 20 µl tyrodového pufru pH 7,4 + 5 µl naředěného TRAPU. Do jamek D přidáme 25 µl tyrodového pufru pH 7,4. Od řady B přidáme do jamek po 5 µl LH/HH nebo LF/HF podle rozpisu. Od řady B přidáme do jamek plazmu pacientů podle rozpisu. Do všech jamek přidáme 75 µl vyizolovaných destiček a necháme 1 hod třepat na třepačce při 300 ot/min. Poté přidáme 100 µl EDTA a opět třepe na třepačce po dobu 1 min. Následně přendáme vzorky z mikrotitrační destičky do PP zkumavek (Ependorf) po 200 µl a odstředíme 2079 g/ 5 min /17 °C. Následně převedeme 150 µl do popsanych zkumavek a necháme zamrazit při teplotě -20 °C do dalšího zpracování.

Příprava pro kalibraci:

Při přípravě kalibračních vzorků připravíme do zkumavky označené KAL 500 µl chudé plazmy dárce + 1500 µl tyrodového pufru pH 7,4 + 2000 µl EDTA. Poté rozpipetujeme po 150 µl do označených zkumavek 1 až 8.

Totální serotonin (TOT): Do zkumavky označené TOT1 přidáme 400 µl EDTA + 100 µl tyrodového pufru pH 7,4 + 300µl promytých destiček. Poté rozpipetujeme po 150 µl do dvou zkumavek označených TOT.

Takto připravené zkumavky (kalibrace plus vzorky TOT) zamrazíme při teplotě -20 °C do dalšího zpracování.

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

1.2 Stanovení serotoninu

Chemikálie:

5-HT: 50 µL zásobního roztoku přidáme do 5 ml H₂O (10000 ng/ml) (Zásobní roztok (**5-hydroxytryptamin**) 1 mg/ml, což je uloženo při -80 °C po 1 ml)

IS: 25 µL zásobního roztoku přidáme do 20 ml H₂O (1250 ng/ml) (Zásobní roztok 5-N- ω -methyltryptamin (5-MeHT) 1 mg/ml vody)

25% HClO₄: 21 ml 60 % HClO₄ doplníme do 50 ml redestilovanou vodou

Sodium borohydride: roztok připravujeme hodinu před zpracováním vzorku (rozpuští se při 4 °C). Smícháme 0,5 g sodium borohydridu s 4,5 ml redestilované vody. Erlenovu baňku s tímto roztokem uchováváme na ledové tříšti v lednici do úplného rozpuštění.


Kalibrační řada

Do připravených a nadepsaných PP zkumavek (Eppendorf, 1,5 ml) přidáme:

Do zkumavek 7-1 napipetujeme 400 µl redestilované vody. Do zkumavek 8,7 napipetujeme 400 µl 5-HT, zkumavku 7 promícháme a z ní přeneseme 400 µl do zkumavky č. 6, opět promícháme a přeneseme 400 µl do zkumavky č.5, postup opakujeme až do zkumavky č. 2, z té poté 400 µl likvidujeme. Ve všech zkumavkách je zachován objem 400 µl. Ve zkumavce č. 8 je pouze 5-HT a v č.1 je pouze voda. Takto je vytvořena kalibrační řada o klesající koncentraci 5-HT, hodnoty koncentrací jsou zaznamenány v tabulce 3.7:

Tabulka 1: Kalibrační řada 5-HT [vlastní]

Číslo zkumavky	8	7	6	5	4	3	2	1
Koncentrace (ng/ml)	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Postup stanovení serotoninu:

Zpracování provádíme v lázni s ledovou drtí. Připravenou kalibraci přidáme Hamiltonovou pipetou v množství 15 µl do připravených zkumavek, do zkumavek se vzorky přidáme 15 µl redestilované vody. Do všech zkumavek (kalibrace+ vzorky) přidáme 15 µl IS a 30 µl Sodium borohydride. Poté přidáme 39 µl HClO₄ (vzorky pěni – kontrola přidání borohydridu) a průběžně vortexujeme. Následně vzorky odstředíme (3000 g/10 min/4 °C). Poté přepipetujeme do stejně označených PP zkumavek 100 µl supernatantu a ten odstředíme (37547 g/ 30 min/ 4 °C) a poté přepipetujeme do mikrotitrační destičky 75 µl. Takto připravené vzorky jsou připraveny pro analýzu pomocí HPLC.


1.2.1 Analýza HPLC

Příprava přístroje SHIMADZU:

1. Zapneme přístroj +PC
2. Do Erlenovy baňky si připravíme MilliQ vodu a umístíme kapiláru. Na pumpě otevřeme kohout (DRAIN) a stiskneme tlačítko PURGE.
3. Zavřeme kohout (DRAIN) a na pumpě stiskneme tlačítko PUMP → 30 min ekvilibrace vodou.
4. Zopakujeme bod 3 až 4 s připravenou přefiltrovanou mobilní fází (směs methanolu a fosfátového pufru v poměru (13:87, v/v). Fosfátový pufr: 100 mM kyselina fosforečná, 5 mM hex SO₃Na, pH 2,5). Ekvilibrace mobilní fází probíhá 60 min, dále zapneme termostat (vyhřívání kolony na 45 °C)

Po přípravě přístroje na analýzu můžeme vložit mikrotitrační destičku se vzorky do automatického dávkovače a nastavit přístroj podle následujících bodů:

1. Zapnutí lampy: Tlačítko FUNC- → LAMP → navolit 1 a zmáčknout ENTER a tlačítkem ZERO vynulujeme baseline lampy
2. Na modulu Pumpy: Tlačítko EDIT → FUNC. FLOW 0,5 ml/min
3. Automatický dávkovač: EDIT → Navolení počtu jamek, dle vzorků, REPEAT 1×, VOLUME 20 µl, TIME 16 min.
4. Nastavení software Clarity dle printscreenu
5. Start → Začátek analýzy
6. Po provedení analýzy:

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01


7. Vypnutí detektorů a termostatu
8. Do Erlenovy baňky si připravíme vodu a umístíme kapiláru. Na pumpě otevřeme kohout (DRAIN) a stiskneme tlačítko PURGE.
9. Zavřeme kohout (DRAIN) a na pumpě stiskneme tlačítko PUMP→30 min ekvilibrace vodou
10. Zopakujeme bod 3 až 4 s 50 % methanolem.
11. Vypnutí přístroje.

1.2.2 Vyhodnocení výsledků

1. Program Clarity vyhodnotí plochu píku pro 5-HT a IS pro vzorky i kalibraci.
2. Z kalibrační křivky vypočítáme směrnici (závislost plochy píku (5-HT) /plochy píku (IS) na koncentraci 5-HT).
3. Pomocí směrnice vypočteme koncentraci 5-HT ve vzorcích a % release 5-HT ve vzorcích dle vzorce:

$$\% \text{ release } 5 - \text{HT} = \frac{c(5 - \text{HT})_{\text{vzorku}}}{c(5 - \text{HT})_{\text{TOT}}} \times 100\%$$

4. Porovnání % release 5-HT pro LH a HH. Při rozdílu (LH-HH) větším než 20 % je vzorek označen za pozitivní, při rozdílu menším než 20 % je označen za negativní.

Oddělení biochemie	
Kvalitativní stanovení Heparin indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody SRA-HPLC.	301_SOP_16_01

Příloha č.2: Oprávněné osoby

Jméno	Rozsah oprávnění
Ing. Leona Chrastinová, PhD.	Vyhodnocení zkoušky a uvolňování výsledků
Ing. Alžběta Hlaváčková, PhD.	Provádění, vyhodnocení zkoušky a uvolňování výsledků
Ing. Jana Štikarová, PhD.	Vyhodnocení zkoušky a uvolňování výsledků
Bc. Kristýna Svobodová	Provádění zkoušky
Blanka Veselá	Provádění zkoušky
Ing. Jiří Suttnar, CSc.	Vyhodnocení zkoušky a uvolňování výsledků

Zpracoval: Bc. Kristýna Svobodová	Platnost od: 1.4.2017
--	------------------------------