



Kontroly jakosti v ZTS

MVDr. Nad'á Poloková
TTO FN Brno

Kontrola kvality (jakosti) - definice

Kvalita (jakost) je pojmem pro zpravidla kladné vlastnosti výrobku nebo služby. Kvalitní výrobek nebo služba je tak v souladu s požadavky zákazníků nebo standardů.

Transfuzní přípravek (TP) musí splňovat určité **parametry**, abychom ho označili přívlastkem „kvalitní“ - důkaz o tom by měla podat kontrola kvality.

Kontrola kvality (jakosti) - definice

- Kontrola výrobního procesu
- Zajištění neustálého zlepšování
- Zavedení opatření k nápravě a prevenci opakovaných problémů

Kontrola kvality – úrovně

- Při odběru a zpracování
- Při výdeji
- Namátková kontrola kvality

Kontrola kvality – základní parametry jakosti

- V praxi jsou sledovány parametry jakosti, které jsou určeny vyhláškou 143/2008 Sb. o lidské krvi
 - Požadavky na jakost jsou uvedeny v příloze č.4, část A
 - Ods.9 přílohy č.1 – Kontroly jakosti (popis co všechno je potřeba kontrolovat)

Kontrola kvality – základní parametry jakosti

- Guide to the preparation, use and quality assurance of blood component
 - soubor mezinárodních doporučení
 - tabulky pro jednotlivé TP s kontrolovanými parametry a doporučenou četností kontrol

Kontrola kvality spočívá v kontrole:

1. Dokumentace
2. Vizuální inspekce
3. Kontrola parametrů jakosti TP
 - Povinné parametry jakosti
 - Speciální parametry jakosti
4. Mikrobiologická kontrola
 - Výrobního prostředí (stěry ploch, vzdušné odkryvy)
 - Sterilita transfuzních přípravků
 - Kontrola účinnosti dezinfekce místa venepunkce

Kontrola kvality spočívá v kontrole - pokračování:

- Dokumentace
 - Správné vyplnění dotazníku dárce
- Vizuální inspekce
 - Celistvost vaku
 - Barva TP
 - Údaje na štítku

Vizuální inspekce TP

- Kontrola vzhledu vyrobeného TP (při výrobě, při výdeji, vzorkováním)
 - Barva
 - Neporušenost obalu
- Kontrola štítku
 - Uvedené údaje
 - Přílnavost štítku
- U trombocytových TP se hodnotí tzv. „swirling“- víření, agregáty
- U erytrocytových TP se hodnotí hemolýza a přítomnost sraženin

Kontrola parametrů jakosti TP

- Povinné parametry jakosti
 - Vyšetřované u všech jednotek
 - Vyšetřované u náhodně vybraných jednotek

Kontrola parametrů jakosti TP (povinné parametry jakosti) – pokračování:

- **Vyšetřovány u všech odebraných jednotek**
 - imunohematologické parametry (krevní skupiny v ABO systému, RhD a screening nepravidelných protilátek)
 - vyhledávací testy na krví přenosné infekční choroby (HBV, anti-HCV, HIV 1 a 2, syfilis)
 - Objem TP, barva, vzhled, celistvost

Kontrola parametrů jakosti TP (povinné parametry jakosti) – pokračování:

- **Kontroly jakosti u náhodně vybraných jednotek (metodou vzorkování)**
 - Kontrola procesu výroby TP v ZTS
 - Je hodnocen obsah účinné látky:
 - u RBC hemoglobin, hematokrit, % hemolýzy
 - u PLT jejich počet v terapeutické dávce, pH
 - u plazmy: F VIII, celková bílkovina

Kontrola parametrů jakosti TP (povinné parametry jakosti) – pokračování:

- Buněčná kontaminace transfuzních přípravků a sterilita
- Kontrola účinnosti desinfekce místa venepunkce před odběrem krve a jejích složek

Podmínky vzorkování TP

- Počet kontrol musí odpovídat kvantitě výroby na ZTS
 - Minimálně 1% z výroby
 - Vyhodnocení kontrol kvality v měsíčních intervalech
- Laborant nebo VŠ kontroly kvality pracuje samostatně a hlavně nezávisle na ostatních úsecích výroby TP, aby byla zajištěna nezávislost kontroly

Výsledky kontrol

- Řešeny na radě jakosti
- Všechny neshody a odchylky od limitů uvedených ve vyhlášce 143/2008 Sb. se řeší okamžitě z důvodu odstranění příčiny co nejdříve, aby kvalita vyrobených TP nebyla ovlivněna

Kontrola parametrů jakosti TP (speciální parametry jakosti):

- Jedná se o sledování změn v buněčné morfologii, biochemickém stavu buněk, expresi markerů aktivace PLT atd.
- Pro procesní validaci nových postupů je vhodné těchto parametrů využít
- S využitím např. průtokové cytometrie (FCM) nebo jiné vyšetřovací analýzy

Kontrola parametrů jakosti TP (speciální parametry jakosti):

Lze využít změn:

- Apoptických = řízená buněčná smrt
 - Morfologické změny
 - Změny tvaru buňky
 - Metabolické změny
 - Změna pH
 - Spotřeba glukózy
 - Produkce laktátu
 - Uvolnění markerů aktivace (u trombocytových TP)

Phosphatidylserin – marker jakosti:

- Časný znak apoptózy
- Fosfolipid fyziologicky lokalizován na vnitřní straně buněčné membrány
- V buňkách podléhající apoptóze se phosphatidylserin translokuje na vnější stranu buněčné membrány a do plasmy

Obsah leukocytů v transfuzním přípravku

- Při skladování TP dochází k rozpadu přítomných WBC, uvolnění cytokinů a intracelulárních enzymů, které mohou indukovat poškození RBC, resp. PLT
- Zvýšená hladina volných cytokinů v TP může vést u příjemce k febrilní nehemolytické potransfuzní reakci

Obsah leukocytů v transfuzním přípravku -pokračování

- Proto je vhodné již při výrobě TP deleukotizovat, zabránit tím rozpad WBC a uvolnění cytokinů

Stanovení cytokinů ve vhodných kombinacích může být vhodným indikátorem jakosti TP.

Transfuzní přípravky, přehled a charakteristika

- Odběry plné krve (PK)
 - PK je následně zpracována na jednotlivé složky krve s minimální příměsí složek ostatních (erytrocyty, trombocyty, čerstvě zmražená plazma)
- Odběry aferetické
 - Přístrojové odběry pouze určité složky krve, ostatní složky krve se dárci vrací do oběhu (takto se odebírají erytrocyty, trombocyty a plazma)

Erytrocytové TP

- Jsou TP získané z odběru plné krve, s následným odstraněním plazmy a vrstvy buffy-coatu
- Přidáním resuspenzního roztoku s glukózou a adeninem (SAG-M)
- Základní zpracování může být rozšířeno dle požadavků klinik o de leukotizaci, promytí, ozáření či rozdělení na pediatrické dávky

Mezi nejčastěji vyráběné erytrocytové TP patří:

- Erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované (EBR)
- Erytrocyty deleukotizované (ERD)
 - Pre-storage – při výrobě
 - Post-storage - sekundárně
- Erytrocyty promyté (EP)
- Erytrocyty deleukotizované z aferézy (ERDA)

Vlastní provedení kontroly kvality erytrocytových TP

- Namátkový výběr vzorku
- Řádné označení vzorku (číslo TP, množství, datum odběru, kdo TP vyrobil, číslo centrifugy, číslo lisu)
- Na laboratoři je vzorek naředěn (2x), změřen na hematologickém analyzátoru krevní obraz

Vlastní provedení kontroly kvality erytrocytových TP - pokračování

- Mikroskopicky se v Naggeottově komůrce spočítají WBC (jen u de leukotizovaných TP)
- Vše se zapíše do tabulek a přepočítá na transfuzní jednotku (TU)
- Vyšetření hemolýzy se provádí na konci expirace (po centrifugaci vzorku se odesílá supernatant na OKB)

Erytrocytové TP - závěr

- Objem je stanoven dle způsobu skladování tak, aby se dodržely specifikace pro hemoglobin a hemolýzu.
- Exspirace 42 dnů
- Skladování +2 až +6°C v lednici

Sledované parametry kvality u erytrocytových koncentrátů:

| | Hb (g/TU) | Htk | WBC (TU) | Hemolýza (%) | exspirace |
|--------------|----------------------|-------------|------------------------------|-------------------------|------------------|
| EBR | > 43 | 0,5 – 0,7 | $< 1,2 \times 10^9$ | < 0,8 | 42 dnů |
| ERD, ERDA | > 40 | 0,5 – 0,7 | $< 1,0 \times 10^6$ | < 0,8 | 42 dnů |
| EP | > 40 | 0,65 – 0,75 | CB ($< 0,5\text{g/TU}$) | < 0,8 | 48 hodin |

Trombocytové TP

- Jsou TP získané z plné krve nebo technikou aferézy, které obsahují stanovené množství trombocytů v terapeuticky účinné formě
- V průběhu přípravy či následně, mohou být ošetřeny deleukotizací, ozářením, méně často promytím

Mezi nejčastěji vyráběné trombocytové TP patří:

- Z plné krve
 - Trombocyty z buffy-coatu (TB)
 - Trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované v náhradním roztoku (TBsD) – od 4 – 6 dárců
- Z aferézy
 - Získány přístrojovým odběrem od jednoho dárce (TA, TAD, TAD PAS)

Vlastní provedení kontroly kvality trombocytových TP

- Namátkový výběr vzorku, odběr homogenního vzorku
- Řádné označení vzorku
- Příprava vzorku před měřením (10x ředění), měření krevního obrazu na hematologickém analyzátoru

Vlastní provedení kontroly kvality trombocytových TP - pokračování

- Počítání reziduálních leukocytů mikroskopicky v Naggeottově komůrce
- Měření pH vzorku na pH metru
- Vše se zapíše do tabulek a přepočítá na transfuzní dávku

Trombocytové TP - závěr

- Objem je stanoven dle způsobu skladování tak, aby se dodržely specifikace pro pH.
- pH je měřeno na konci doby expirace, korigované na 22°C.
- Koncentrace trombocytů má být menší než $1,5 \times 10^9/\text{ml}$
- Expirace PLT koncentrátů je 5 dnů.
- Skladování 20 až 24°C za stálého třepání

Sledované parametry kvality u PLT koncentrátů:

| | PLT ($\times 10^9$/TD) | WBC (TD) | pH |
|----------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|
| TB | $> 50 \times 10^9$ | $< 0,05 \times 10^9$ | $> 6,4$ |
| TBsD_PAS | $> 200 \times 10^9$ | $< 1,0 \times 10^6$ | $> 6,4$ |
| TA, TAD_PAS | $> 200 \times 10^9$ | $< 1,0 \times 10^9$ $< 1,0 \times 10^6$ | $> 6,4$ |

Čerstvě zmražená plazma

- Jsou TP získány z plné krve nebo aferézou
- Zmražení co nejdříve na takovou teplotu, aby byly zachovány přítomné koagulační faktory ve funkčním stavu (na -30°C v jádře během jedné hodiny)

Mezi nejčastěji vyráběné plazmové TP patří:

- Plazma z plné krve (P)
- Plazma z aferézy (PA)
- Kryoprotein (KP)
 - Složka plazmy připravená ze zmrazené čerstvé plazmy precipitací (srážením) bílkovin při tání ze zmrazeného stavu a následnou resuspenzí precipitovaných bílkovin v malém objemu tekuté plazmy

Vlastní provedení kontroly kvality plazmových TP

- Namátkový výběr vzorku (před i po zmrazení)
- Řádné označení vzorku
- Příprava vzorku před měřením, měření krev. obrazu na hematologickém analyzátoru

Vlastní provedení kontroly kvality plazmových TP - pokračování

- Počítání reziduálních WBC a RBC mikroskopicky v Naggeottově komůrce
- Vyšetření F VIII a celkové bílkoviny
- Vše se zapíše do tabulek a přepočítá na litry

Čerstvě zmražená plazma - závěr

- Objem je deklarován +/-10%.
- Exspirace plazmy je 3 roky.
- Skladování:
 - 36 měsíců při méně než -25°C
 - 3 měsíce při -18°C až -25°C

Sledované parametry kvality u TP

– plazma:

| | F VIII (%) | CB (g/l) | WBC (x10⁹/l) | RBC (x10⁹/l) | PLT (x10⁹/l) |
|----|-----------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| P | > 70 | > 50 | < 0,1 | < 6,0 | < 50 |
| PA | > 70 | > 50 | < 0,1 | < 6,0 | < 50 |
| KP | > 70 | Fibrinogen ≥ 140 mg/TU | | | |



Mikrobiologická kontrola

- Sterilita TP
- Kontrola desinfekce místa venepunkce
- Mikrobiologická kontrola výrobního prostředí

Mikrobiologická kontrola – sterilita TP:

- Provádí se u všech druhů TP
- Četnost kontrol je stanovena podle tzv. „Bensonova vzorce“

$$\text{Počet kontrol} = 0,4 * \sqrt{n}$$

n = počet vyrobených TP

- Kultivace vzorku TP v tekutých půdách za aerobních i anaerobních podmínek při 37°C (Český lékopis)

Mikrobiologická kontrola – kontrola účinnosti dezinfekce místa venepunkce:

- Kontrola správného postupu přípravy místa venepunkce a zajištění aseptického postupu (dezinfekce místa vpichu)
- Pomocí stěrové soupravy
- Po mechanické očištění a dezinfekci loketní jamky



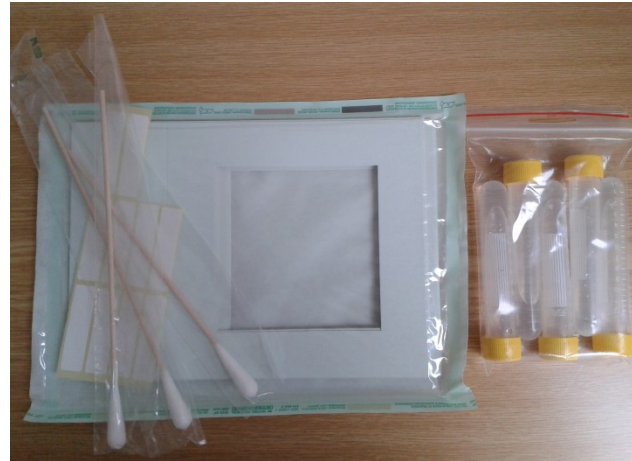
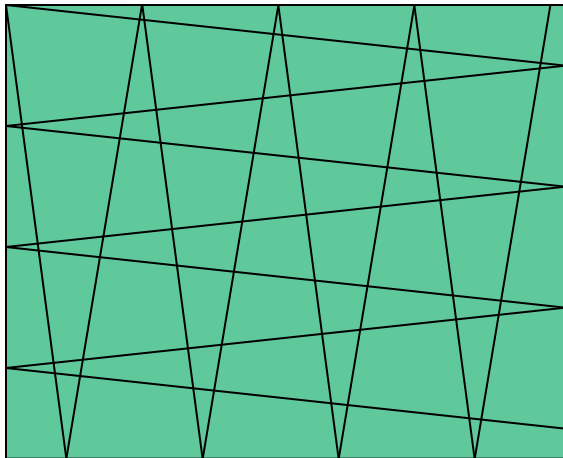
Mikrobiologická kontrola výrobního prostředí - legislativa

Kontrola prostředí:

- Vyhláška č. 143/2008 Sb. Vyhláška o lidské krvi
- Pokyny SÚKL:
 - VYR-36 Čisté prostory
 - VYR-32 Výroba sterilních léčivých přípravků, kap. 6, Kontrola kvality
 - VYR -10 Validace aseptických procesů

Mikrobiologická kontrola výrobního prostředí

- Stěry ploch
 - Pomocí stěrové soupravy
 - Sterilní šablona 10 x 10cm
 - Sterilní tampon
 - Zkumavka se sterilním Ringerovým roztokem
 - Samolepící štítek na označení zkumavek



ITEST plus s.r.o. Kladská 1032,
500 03 Hradec Králové, CZ,
tel./fax: +420 495 217 372,
e-mail: itest-plus@icp.cz, www.itest-plus.cz

Upozornění:

1. STĚROVÁ SOUPRAVA je dodávána v balení po 10 kusech a je určena pouze pro použití *in vitro*.
2. Soupravu uchovávejte v suchu a temnu při teplotách do 25°C a spotřebujte do doby expirace uvedené na štítku.
3. Při poškození primárního obalu IVD nepoužívejte a kontaktujte výrobce.
4. Nepotřebovaný IVD a prázdný obal likvidujte v souladu se zákonem o odpadech č. 185/2001 Sb.

Obsah soupravy:

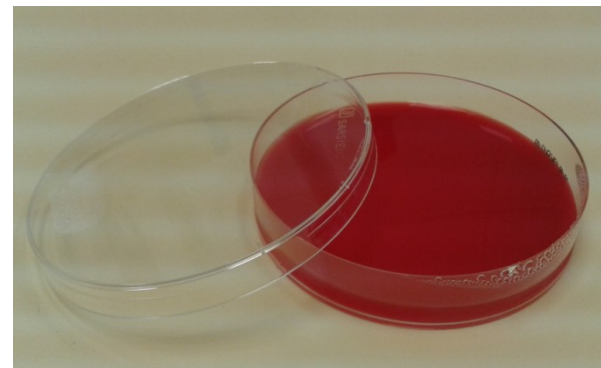
| | |
|---------------------------------------------------|-------|
| Sterilní šablona | 10 ks |
| Sterilní tampon | 10 ks |
| Zkumavka se sterilním Ringerovým roztokem (10 ml) | 10 ks |
| Samolepící štítek na označení zkumavek | 10 ks |
| Návod k použití | 1 ks |

Obrázek:

Rev.: 010/2005

Mikrobiologická kontrola výrobního prostředí – pokračování:

- Vzdušné odkryvy
 - 4 hodinová expozice Petriho misky s krevním agarem
 - provedeno za provozu (= stav s probíhajícími procesy a s předepsaným počtem pracovníků)
 - Limit: třída čistoty D (do 100 kolonií/misku)
- Aeroskopické stanovení prašnosti a mikrob. kontaminace



Doporučené limity pro mikrob. kontaminaci čistých prostor ve stavu „za provozu“ – spadové metody:

| Třída | Petriho miska (průměr 90mm) CFU/4hod. | Vzorkování vzduchu CFU/m ³ |
|-------|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| A | < 1 | < 1 |
| B | 5 | 10 |
| C | 50 | 100 |
| D | 100 | 200 |

| | | |
|---|-----|----------------------------------------|
| A | < 1 | = laminární box |
| B | 5 | = pozadí laminárních boxů |
| C | 50 | = předbox |
| D | 100 | = ostatní kontrolované prostory výroby |

SPC – statistická regulace procesu

- Pomocí statistiky je vhodné a legislativně doporučené hodnotit ve výrobě meziprodukty a konečné produkty, aby bylo možno co nejdříve zjistit a odstranit vzniklé nežádoucí výkyvy ve kvalitě produktu.
- Zavedení SPC vede k vyšší standardizaci vyrobených TP.

SPC - pokračování

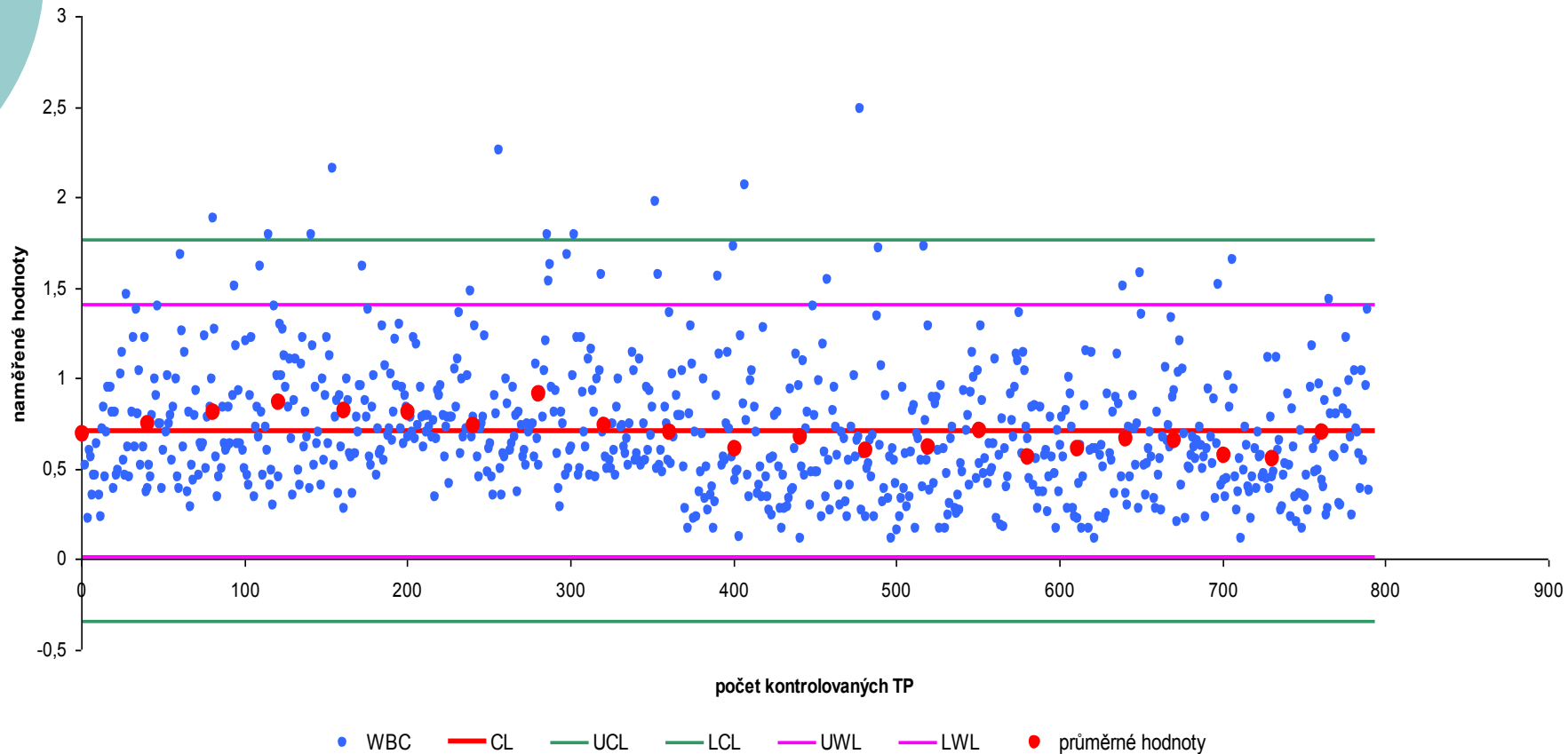
- Preventivní nástroj řízení jakosti
- Vymezení příčin variability procesu:
 - Náhodné příčiny (přirozené)
 - Nestejnorodost vstupního materiálu, vlhkost ovzduší atd.
 - Vymezitelné příčiny (za běžných podmínek na proces nepůsobí)
 - Sporadické (náhlé a působí krátkou dobu)
 - Přetrvávající
 - Poškození nástroje, nové seřízení stroje, nezaškolená obsluha

SPC - pokračování

- Tvorba regulačních diagramů
- Vymezení regulačních mezí
 - Centrální přímka (CL)
 - průměrná hodnota
 - Horní a dolní regulační mez (UCL,LCL)
 - +/- 3 SD od průměru
 - Horní a dolní varovná mez (UWL,LWL)
 - +/- 2 SD od průměru
- Tvorba Gausova normálního rozložení

SPC – příklad vymezení mezí

EBR - WBC 2009 až říjen 2010



SPC – statistická regulace procesu - pokračování

- Tímto hodnocením lze zjistit:
 - Stabilitu procesu
 - Kritické parametry
 - Vhodné četnosti prováděných kontrol
 - Stanovení limitů u některých sledovaných parametrů (objem)

Závěr - shrnutí

- Základní parametry jakosti – legislativně dány, nutné kontrolovat
- Speciální parametry jakosti – vhodné je využít při validacích nových metod výroby TP
- SPC – statistické hodnocení napomáhá udržet proces ve stabilním stavu



Děkuji za pozornost.
