

# Správná laboratorní praxe

Jana Klánová

[klanova@recetox.muni.cz](mailto:klanova@recetox.muni.cz)

## Doporučená literatura:

Drobník, J. a kol.: Mezinárodní pravidla pro práci v chemických a biologických laboratořích

Suchánek, M. a kol.: Kvalimetrie 12: Průvodce jakostí v analytické chemii

Drobník J. a kol.: Harmonizace pravidel práce v biologii a chemii I: Bezpečnost biotechnologií

Drobník J. a kol.: Harmonizace pravidel práce v biologii a chemii II: Systémy zabezpečování jakosti

Crosby, N.T.-Patel, I.: General principles of good sampling practice

# Úvod

**Se vstupem do EU** bude ČR muset upravit své zákonodárství a pravidla tak, aby nebyla v rozporu s mezinárodně přijatým systémem. Při styku s některými zeměmi se dodržování těchto pravidel vyžaduje už dnes.

Týká se to i systému **Správné laboratorní praxe** (SLP, GLP), na nějž navazují další mezinárodní pravidla zahrnující bezpečnost práce a ochranu zdraví, ochranu prostředí, práci s živými organismy, vnášení geneticky modifikovaných organismů do prostředí, vhodnost lékařských a veterinárních produktů, testy, patenty a podobně.

Firmy a instituce (zdravotnické, veterinární, obchodní) komunikující se zahraničím budou nuceny režim GLP co nejrychleji zavést, jinak jejich laboratorní výsledky nebudou mít žádnou váhu.

Pojem **Správná laboratorní praxe** skrývá soubor opatření k zajištění kvality dat.

Odhaduje se, že až 10% HDP průmyslově vyspělých zemí lze přičíst k nákladům na různá měření, přičemž nejméně desetina této částky se spotřebuje na různá opatření v důsledku nesprávných měření. V minulosti se totiž často ukázalo, že analytické výsledky různých laboratoří nebo dokonce jedné laboratoře v různých obdobích nemusí být vůbec srovnatelné. Výsledky laboratorních testů jsou přitom často podkladem pro další rozhodnutí a opatření. Hodnota dat každé laboratoře závisí na úrovni důvěryhodnosti, kterou je možno přiřadit jejím výsledkům. Větší váhu budou mít výsledky od laboratoří, které mohou svým zákazníkům poskytnout důkaz o tom, že výsledky jejich práce mají určitou jakost. Je proto nezbytné, aby laboratoře měly zavedený určitý **system jakosti**, který si mohou nechat posoudit třetí stranou.

Na zavedení pravidel GLP působí i silný **ekonomický tlak**. Systém, který by umožnil sjednotit kvalitu laboratorní praxe, by přispěl k všeobecnému zlepšení ochrany zdraví a životního prostředí. Pokud by umožnil akceptování výsledků jiných laboratoří, zabránil by zároveň zbytečnému opakování zkoušek v dalších zemích a uspořil finance státu i průmyslu, usnadnil výměnu informací a odstranil překážky mezinárodního obchodu.

Zejména pro členské státy EU existuje silná legislativní provázanost a bylo nezbytné při tvorbě zásad GLP postupovat jednotně. Nekompatibilní pravidla v jednotlivých státech by totiž znamenala znemožnění vzájemného vývozu chemikálií a léčiv.

# Historie

# Historie Evropské unie

- 1952 Společenství pro uhlí a ocel (I, F, B, N, D, L)
- 1958 Evropské hospodářské společenství (EHS, EES)
- 1967 Evropská společenství (ES, EC)
- 1972 GB, 1981 G, 1986 S, P
- 1992 Maastrichtská dohoda
- 1994 EU

## Nejdůležitější instituce

- Komise (výkonný orgán)
- Evropský parlament
- Rada ministrů
- Evropský soudní dvůr

## Dokumenty pěti kategorií

- Nařízení (Regulation), závazné pro členy, nadřazené národním zákonům
- Směrnice (Directive), hranice, které se musí přizpůsobit národní legislativa
- Rozhodnutí (Decision), závazné jen pro určitého adresáta
- Doporučení (Recommendation), návrh nebo rada
- Stanovisko (Opinion), nezávazné hledisko

## **Historie Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj**

(Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD)

- 1948 Organizace pro Evropskou hospodářskou spolupráci (OEEC)
- 1961 OECD

Nejvyšší orgány

- Rada
- Výkonný výbor

Základní úkoly

- Dosáhnout nejvyššího udržitelného hospodářského růstu a zaměstnanosti a zvyšovat životní standard členských zemí při udržení finanční stability
- Přispívat k rozumnému zvyšování hospodářství v členských i nečlenských zemích
- Přispívat k rozšiřování světového obchodu

# Historický přehled o správné laboratorní praxi

- vlády jsou povinny chránit zdraví lidí a životní prostředí
- veškeré chemikálie vstupující na trh musí být testovány
- regulační úřady jednotlivých zemí nesou odpovědnost za provádění těchto testů
- v minulosti řada afér s klinickým užíváním preparátů, které se ukázaly jako toxické
- 70.léta: FDA v USA provádí kontrolu laboratorních postupů farmaceutických firem s velmi neuspokojivým výsledkem
- 1973 GLP v legislativě Nového Zélandu a Dánska
- 1978 předpisy o GLP v USA
- 1979 EPA GLP standardy
- 1977 při OECD vytvořena skupina, která má vytvořit mezinárodní pravidla GLP
- 1981 oficiální schválení OECD principů GLP
- 1989 schválení dokumentu o vzájemném akceptování dat v souladu s GLP
- tyto zásady se musí promítnout do legislativy členských států
- v každé zemi bude ustanoven inspektorát GLP
- 1998 nové zmodernizované **OECD Zásady GLP**
- ČR je členem OECD od roku 1996
- regulačním úřadem je Ministerstvo životního prostředí

# Jakost

## **Správná laboratorní praxe**

je manažerské schéma a vztahuje se na proces organizace a podmínky pro plánování, provádění, sledování, zaznamenávání a ohlašování výsledků studií.

Správná laboratorní praxe, včetně jejího formálního uznání akreditací nebo certifikací, pomáhá zajistit, že výsledky jsou validní a vhodné pro svůj účel.

Jádrem GLP je systém zabezpečování jakosti (QA/QC)

## Terminologie

**Jakost** (kvalita): stupeň splnění určitých požadavků souborem znaků

**Akreditace**: postup, na jehož základě vystavuje úřední orgán oficiální uznání, že organizace nebo osoba jsou způsobilé k vykonávání určitých činností

**Certifikace**: postup, kterým třetí strana poskytuje písemné ujištění, že výrobek, proces nebo služba jsou ve shodě se stanovenými požadavky. Certifikace se od akreditace liší zejména tím, že výslovně nezmiňuje odbornou způsobilost.

**Audit** má několik forem:

- audit jakosti uvnitř laboratoře - interní audit (ověření existence a zavedení postupu jakosti)
  - přezkoumání vyšším managementem (ověření, zda je systém účinný)
- posuzování: externí audit nezávislým orgánem jako součást akreditace

# QA/QC

## Zabezpečování jakosti (Quality assurance)

jsou všechny plánované a systematické činnosti nezbytné pro poskytnutí nezbytné důvěry, že produkt nebo služba bude splňovat dané požadavky na jakost (preventivní činnost).

Zahrnuje

- systém jakosti
- vhodné laboratorní prostředí
- personál s odpovídajícím vzděláním a výcvikem, postupy a záznamy o něm
- vhodné zařízení, náležitě udržované a kalibrované
- postupy řízení jakosti
- dokumentované a validované metody
- standardní operační postupy
- návazné kalibrace
- požadavky na činidla
- zkoušení způsobilosti
- kontrolní postupy a postupy vyjadřování výsledků
- preventivní opatření a opatření k nápravě
- interní prověrky a přezkoumání systému jakosti
- postupy pro řešení stížností

# QA/QC

## Operativní řízení jakosti (Quality control)

jsou operativní prostředky a činnosti používané pro splnění požadavků na jakost (kontrolní činnost), vztahují se k zajištění jakosti specifických vzorků (interních i externích) a zahrnují:

- analýzu slepých vzorků
- standardů a referenčních materiálů
- duplikátů
- obohacených vzorků
- použití vzorků QC a regulačních diagramů
- mezilaboratorní testy, prověrky, audity jakosti

# Jednotlivé systémy jakosti a jejich charakteristiky

## Jednotlivé systémy jakosti

Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) je celosvětově zodpovědná za harmonizaci technických předpisů, včetně jakosti

Společný evropský institut pro normalizaci (CEN) je zodpovědný za vydávání evropských norem EN

Základní filozofie **GLP, ISO 9000 a EN 45000-17025** je shodná, jde o systémy jakosti, na jejichž konci je odvedená práce v nejvyšší možné kvalitě. Podmínkou je školený personál, odpovídající prostory a vybavení, kvalitní výchozí materiál, dobře odvedená činnost, dokumentace umožňující kdykoli činnost rekonstruovat a dobře fungující systém jištění jakosti.

Jaký systém jakosti je vhodný pro práci určité laboratoře, je do značné míry určeno oblastí, ve které působí. Normy ISO 9000 jsou určeny zejména pro výrobní podniky. Chce-li laboratoř vydávat protokoly, může prokázat svou způsobilost akreditací podle EN 45000, která popisuje všeobecná kritéria pro činnost zkušebních laboratoří. Působí-li laboratoř v oblasti bezpečnosti látek ve vztahu k ochraně člověka a prostředí, měla by pracovat ve shodě v principy GLP.

## Normy řady ISO 9000

popisují modely zabezpečování jakosti při návrhu, vývoji, výrobě, instalaci a servisu. Jsou aplikovatelné na různé průmyslové obory, jsou zaváděny především v průmyslových podnicích.

V rámci certifikace může být do systému jakosti zařazena i podniková laboratoř, která produkuje výsledky pro interní kontrolu. Výsledkem posouzení je certifikát potvrzující dosažení přiměřené důvěry, že výrobek, postup nebo služba je ve shodě s předepsanou normou.

Certifikace je dobrovolná a je spojena s konkurenceschopností podniku. Certifikační orgán pak provádí periodické kontroly během celé doby platnosti certifikátu.

Je to mezinárodní systém kvality a slouží jako podklad pro certifikaci, k dosažení podnikatelského cíle, k zabezpečování kvality (audity) nebo odstraňování nedostatků.

Tento systém je **nejobecnější** a **je komplexní**, povinnost jej dodržovat **nevyplývá ze zákona** a firma jej zavádí jako známku své kvality.

## **ISO Guide 25 a EN 45000-17025, EN 29000**

kladou důraz na zabezpečení jakosti a věrohodnost údajů poskytovaných laboratoří. Rozšiřuje prvky systému jakosti o:

- právní identifikovatelnost laboratoře
- nestrannost a věrohodnost laboratoře při vykonávání zkoušek
- odbornou kvalifikaci personálu a prokázání technických znalostí
- prokázání návaznosti měření (referenční materiály, mezilaboratorní testy)
- stanovení minimálního rozsahu informací v protokolu o zkoušce
- požadavky na archivaci i primárních dat
- požadavky na důvěrnost a utajení získaných dat

Je určeno především pro laboratoře provádějící zkoušky opakujícího se charakteru (analýzy vod, ovzduší potravin)

## ČSN EN 45001 a jeho dokumentace

Aby laboratoř získala osvědčení o akreditaci, musí mít zaveden funkční a dostatečně zdokumentovaný systém jakosti, aby bylo možné kdykoli prokázat, že zkouška proběhla za definovaných podmínek. Musí dodržovat platné národní legislativy a hygienické předpisy a veškeré své činnosti musí mít popsány v **příručce jakosti**. To je základní dokument popisující plnění akreditačních kritérií a má být k dispozici všem pracovníkům laboratoře a být trvale udržován v aktuálním stavu. Musí obsahovat:

- identifikační údaje laboratoře a organizace, kam je začleněna
- ustanovení o koncepci jakosti
- strukturu laboratoře, organizační schéma, kvalifikovaný personál
- popis pracovních a funkčních činností, odpovědností a pravomocí (laboratoř má mít vedoucího, technického vedoucího a manažera jakosti)
- dokumentaci prostor, vstupů osob, úklidu, zařízení a vybavení
- všeobecné a specifické postupy zabezpečování jakosti
- odkazy na zkoušení způsobilosti a referenční materiály
- uspořádání zpětné vazby a opatření k nápravě
- postupy pro vyřizování stížností
- zabezpečení neustrannosti, nezávislosti a věrohodnosti (nesmí být vnější vlivy, komerční ovlivnění, vazba na výrobce)

Laboratoř musí vést záznamy o každém důležitém **zařzení** a tyto musí obsahovat:

- název zařízení
- výrobce, identifikace typu a výrobní číslo
- datum dodání a uvedení do provozu
- současné umístění
- stav zařízení při dodání a údržba
- poškození, selhání, opravy
- identifikační číslo v laboratoři
- údržba, zodpovědná osoba
- technická dokumentace
- omezení pro použití
- postupy pro provádění kalibrace (jak se provádí, jak často, rekalkibrace standardů, návaznost)

Potřebnou **návaznost** poskytují v chemických měřeních **referenční materiály**. Jsou používány pro kalibraci přístrojů a metod, sledování provozu a prokazování správnosti výsledků a validaci metod.

Referenční materiál je definován jako látka, jejíž jedna nebo více vlastností jsou dostatečně homogenní a určené, aby mohly být použity pro přisouzení hodnot. **Certifikovaného referenčního materiálu** lze použít pro kalibraci s návazností celé metody. Shoda mezi hodnotou získanou analýzou a certifikovanou hodnotou lze použít pro stanovení správnosti hodnot u analyzovaných vzorků. U matricových RM je třeba volit matici co nejpodobnější analyzovanému vzorku. Pro přípravu roztoků standardů v laboratoři jsou nezbytné písemné návody a trvalé označení roztoků identifikací, koncentrací, datem, expirací a zdravotními riziky. RM je třeba vhodným způsobem skladovat a je nutné vést evidenci všech používaných RM s přesnou identifikací (typ, zdroj, šarže), podmínkách skladování, expiraci, způsobu použití, omezení, certifikátem a dokumentací výrobce.

Laboratoř by měla vycházet z **normovaných metod**, v případě vlastních metod je třeba provést jejich **validaci**

Vlastní metody musí být plně dokumentovány, validace podloženy výsledky měření, stanoven postup pro řízení jakosti.

Metody se používají jako **standardní operační postupy (SOP)**.

Metody podléhají periodickým revizím, i zrevidované metody musí být dokumentovány a chváleny, a staré nahrazeny.

Validace je soubor systematických laboratorních studií dokládajících provozní charakteristiky metody a měly by zahrnovat:

- selektivitu
- rozsah
- linearitu
- citlivost
- mez detekce
- mez stanovitelnosti
- robustnost
- správnost
- přesnost

To vše musí být uvedeno v dokumentaci metody.

## Správná laboratorní praxe

V systému GLP se provádí farmakologické a toxikologické studie nových léčiv a chemikálií a veškeré zkoušky, kde se získávají údaje s ohledem na lidské zdraví a životní prostředí.

**GLP je systém jakosti, týkající se procesu organizace** a podmínek, za nichž jsou neklinické studie plánovány, prováděny, sledovány, zaznamenávány, archivovány a o jejich výsledcích podávány zprávy.

Oproti dříve uvedeným má některé zvláštnosti:

- Na rozdíl od správné výrobní praxe, kde na konci stojí výrobek o vysoké kvalitě, zde stojí výsledek o vysoké validitě.
- Jelikož se testují potenciální zdroje poškození zdraví, je systém GLP povinný
- Existuje státní inspektorát GLP, který dohlíží, že testování probíhá v souladu se zásadami GLP
- Inspektorát vydává Osvědčení GLP zařízením, která splňují požadavky.

## **Správná výrobní praxe, SVP (Good manufacturing practice, GMP)**

se týká zejména farmaceutické výroby. Požadavky na kvalitu léčiv jsou extrémně vysoké a tato kvalita nesmí kolísat v čase.

Rozdíly oproti ostatním systémům jištění jakosti:

- trojí nezávislé jištění kvality
  - ředitel má nejvyšší odpovědnost
  - vedoucí kontroly jakosti (rozhoduje o splnění jakosti podle zkoušky)
  - vedoucí jištění jakosti (neustále sleduje výrobní podmínky)
- Dodržování GMP je povinné, systém jištění jakosti je doplněn o státní dozor.
- Státní orgány provádějí inspekce, zda v kterémkoli okamžiku nedochází ohrožení kvality  
Inspektor má právo kdykoli podnik navštívit a okamžitě zastavit výrobu a distribuci

## Správná klinická praxe

Po úspěšném ukončení neklinických zkoušek následuje klinické zkoušení, které musí probíhat za přesně definovaných a objektivně kontrolovatelných podmínek, aby se dospělo k validním výsledkům.

Podmínky Správné klinické praxe jsou podobné GLP:

- klade se důraz na zkoušení a výsledky
- dodržování je povinné
- existuje inspektorát SKP, jehož pracovníci provádějí audity na pracovištích

Rozdíly:

- klinické pracoviště žádá státní regulační úřad o schválení každé konkrétní klinické zkoušky
- každé klinické pracoviště smí provádět jen určitý typ klinického hodnocení

# Správná laboratorní praxe

## Definice používaných pojmů

Pojmy vztahující se k organizaci zkušebního pracoviště:

- **zkušební pracoviště** (osoby, prostory, vybavení)
- **vedoucí studie** (osoba odpovědná za celkovou studii)
- **plán zajišťování jakosti** (vnitřní kontrolní systém k zajištění GLP)
- **standardní operační postupy** (podrobné písemné popisy zkoušek)
- **zadavatel** (osoba nebo organizace, která studii zadává a financuje)

Pojmy vztahující se ke studii

- **studie** (pokus nebo soustava pokusů k získání požadovaných údajů)
- **plán studie** (dokument stanovující celý rozsah studie)
- **zkušební systém** (použitý ve studii - chemický, biologický, buněčný)
- **primární údaje** (všechny laboratorní záznamy původních pozorování)
- **testovaný vzorek** (materiál odebraný ze studovaného systému ke zkoušce)

Pojmy vztahující se ke zkoušené látce:

- **zkoušená látka** (látka nebo směs, která je předmětem zkoumání)
- **referenční látka** (dostatečně definovaná látka sloužící ke srovnání)
- **šarže** (specifické množství látky získané v jediném výrobním cyklu)
- **vehikulum** (nosič, prostředek pro rozpouštění zkoumané látky pro aplikaci)

## Zásady GLP zahrnují

- organizaci a pracovníky
- plán zajišťování jakosti
- pracoviště
- přístroje, materiály, činidla
- zkušební systémy
- zkoušené a referenční látky
- standardní operační postupy
- provádění studie
- dokumentaci výsledků
- archivaci záznamů

# **Organizace a pracovníci zkušebního pracoviště**

## **Povinnosti vedení pracoviště:**

- zajistit dodržování GLP (prostory, vybavení, kvalifikovaní pracovníci, zvyšování kvalifikace a školení, dodržování bezpečnosti, jasná pravomoc a odpovědnost, plány studií, dokumentace, SOP, archivace, termíny, dostatek pracovníků)

## **Povinnosti vedoucího studie:**

- zodpovědný za celkové provedení studie a zprávu (odsouhlasení plánu, dodržování postupů, záznamy změn, plná dokumentace, archivace dat)
- podepsáním a datováním závěrečné zprávy potvrzuje dodržení zásad GLP a přebírá odpovědnost za správnost údajů
- po ukončení studie se archivuje plán studie, primární data, závěrečná práva a podpůrné materiály

## **Povinnosti pracovníků:**

- dodržování pravidel bezpečnosti práce s chemikáliemi
- dodržování zdravotních opatření, aby neohrozili sebe a nenarušili studii

# Plán zajišťování jakosti

- je písemný plán zaručující, že prováděné studie budou ve shodě s GLP
- je realizován odpovědnou osobou, pověřenou vedením pracoviště
- tato osoba se nemá účastnit studie, jejíž kvalitu zajišťuje
- veškerá zjištění hlásí přímo vedoucímu pracoviště

## Pracovník pověřený zajišťováním jakosti

- dohlíží na to, aby zúčastnění pracovníci měli plán studie a odpovídající SOP
- pravidelnými inspekcemi a audity dohlíží na jejich dodržování
- uchovává veškeré zápisy z těchto inspekcí
- neprodleně oznamuje vedoucímu pracoviště a vedoucímu studie odchylky
- prostuduje závěrečné zprávy a prověří, že metody a pozorování jsou správně popsány a výsledky odpovídají primárním datům
- napíše a podepíše hlášení, které se přikládá k závěrečné zprávě studie

## **Pracoviště**

- má mít přiměřené prostory a konstrukci, aby se omezily rušivé faktory
- má umožnit oddělení různých činností

### **Prostory pro zkušební systémy**

- dostatečně velké a oddělené, aby se zajistila izolace jednotlivých zkoušek
- specializované pracoviště pro diagnostiku vzorků, které by mohly postihnout systém a narušit jeho kvalitu
- oddělené a dostatečně chráněné skladovací prostory
- chlazení nestabilních vzorků

### **Manipulační prostory**

- předcházení záměnám a kontaminacím, sklady oddělené od laboratoří
- zásobní roztoky odděleně od vzorků a zkušebních systémů
- jednoznačné označení totožnosti, koncentrace, čistoty, stability
- bezpečné uchování nebezpečných látek

### **Archivy**

- prostory pro uchovávání primárních dat, závěrečných zpráv a vzorků

### **Likvidace odpadů**

- zacházení s odpady a jejich likvidace nesmí narušovat průběh studie
- zacházení s odpady a jejich likvidace musí být v souladu s platnými předpisy

# Přístroje, materiály a činidla

## Přístroje

- musí být vhodného typu a přiměřené výkonnosti
- vhodné umístění
- dobrý technický stav
- pravidelné prohlížení, čištění, údržba
- pravidelná kalibrace podle SOP
- uchovávání záznamů o všech činnostech

## Materiály

- použité ve studii nesmějí mít rušivý vliv na zkušební systém

## Činidla

- musí být příslušně označena
- jednoznačný původ, totožnost, koncentrace, datum přípravy, expirace
- informace o uchovávání

# Zkušební systémy

## **Systémy fyzikální a chemické**

- vhodného typu, výkonnosti a umístění
- pro kontrolu funkce se užívá referenčních látek

## **Systémy biologické**

- vhodné podmínky pro laboratorní zvířata, rostliny, buněčné systémy
- dodržení platných předpisů o dovozu, získávání, ošetřování a užití
- izolace nově došlých systémů do ověření zdravotního stavu
- záznamy o dodavateli, datu a stavu
- dodržení aklimatizace systémů před zkouškou
- plná identifikace na všech kontejnerech
- je třeba evidovat veškerá onemocnění v průběhu studie, diagnózy, léčení

# Zkoušené a referenční látky

## Převzetí, skladování a vzorkování látek

- je třeba vést záznamy o převzetí látek, datu, množství, testování
- všechny zásobní roztoky musí mít příslušné označení a pokyny ke skladování
- musí existovat postupy na odběr a zacházení se vzorky, aby se zaručila homogenita a stabilita a předešlo se kontaminaci

## Charakterizace látek

- každá zkoušená i referenční látka musí být přiměřeně označená
- musí být známa totožnost všech zkoušených látek
- musí být známa jejich stabilita za podmínek uchovávání
- musí být známa jejich stabilita za podmínek zkoušky
- je-li látka testována v nosiči, musí existovat SOP na homogenitu
- u studií delších než 4 týdny musí být uchována část vzorku k přezkoušení

# Standardní operační postupy

- Každé zkušební pracoviště musí mít vypracovány vlastní písemné SOP, schválené vedením, které zaručují kvalitu a neporušenost údajů.
- V každé jednotlivé laboratoři musí být okamžitě k dispozici SOP k činnostem, které se v ní provádějí, upřednostňují se normované metody.

SOP jsou nezbytné pro následující činnosti:

- převzetí látky, ověření totožnosti, označení, skladování, vzorkování
- kontrola, údržba, čištění a kalibrace přístrojů, příprava činidel
- vedení záznamů a hlášení, ukládání a vyhledávání, zpracování dat, sestavování zpráv, kódová značení
- příprava prostor, kontrola podmínek,
- ověření systému před začátkem, během a po ukončení studie
- zacházení s uhynulými jedinci zkušebního systému
- postup zajišťování jakosti, provádění auditů probíhajících studií, revize závěrečných zpráv, podávání hlášení
- opatření k ochraně zdraví a bezpečnosti podle požadavků národní a mezinárodní legislativy

## **Provedení studie**

Před zahájením studie musí být vypracován písemný plán studie, který se archivuje s primárními daty. Veškeré schválené změny, zdůvodněné a podepsané vedoucím studie, se také archivují.

**Plán studie** obsahuje:

- název, povaha a účel studie, zkoušené látky, jejich názvy a kódy, referenční materiály
- jméno a adresa zadavatele, zkušebního pracoviště a vedoucího studie
- datum schválení a podepsání plánu vedoucím studie, případně zadavatelem, termíny zahájení a ukončení práce
- metody zkoušení, odkaz na směrnice
- zdůvodnění výběru a charakteristika zkušebního systému
- aplikace, velikost dávek, koncentrace, trvání
- podrobný popis pokusného schématu, metod, podmínek, frekvence analýz
- dokumentace, seznam záznamů, jež je třeba chovávat

### **Průběh studie**

- studie a její materiály musí být jednoznačně označeny
- musí probíhat podle plánu,
- veškeré experimentální údaje musí být zapsány, datovány, podepsány, opravy zdůvodněny, datovány a podepsány
- počítačová data vnášena odpovědným pracovníkem

# Dokumentace výsledků studie

Každá studie musí být uzavřena závěrečnou zprávou, podepsanou a datovanou vedoucím studie. Jakékoli dílčí zprávy musí být datovány a podepsány. Opravy a doplňky mají mít formu zdůvodněných a datovaných dodatků.

**Závěrečná zpráva** obsahuje:

- název zprávy, název a adresa laboratoře
- označení zkoušené látky a referenčních materiálů, čistota, stabilita
- informace o zkušebním pracovišti, vedoucí studie, případně dílčích studií
- data započetí a ukončení
- prohlášení útvaru zabezpečování kvality s daty inspekci, nálezy a hlášením
- popis materiálů a zkušebních metod, odkazy na směrnice
- souhrn výsledků, všechny informace požadované plánem
- vlastní vyhodnocení výsledků, výpočty, statistické metody
- hodnocení, diskuse, závěry
- archivace, údaje o uložení vzorků, primárních dat a závěrečné zprávy

# Archivace záznamů a materiálů

## Ukládání a vyhledávání

Archivy musí bezpečně uchovávat:

- plány studií
- primární údaje
- závěrečné zprávy
- hlášení o inspekcích a auditech podle plánu zajišťování jakosti
- vzorky

Materiály musí být přehledné a snadno vyhledatelné. Přístup k nim mají jen osoby zmocněné vedoucím pracoviště, o pohybu dokumentů je třeba vést řádné záznamy.

## Uchovávání dokumentace

Po dobu určenou úřady je třeba uchovávat:

- plán studie, primární údaje, vzorky, závěrečné zprávy
- záznamy o inspekcích a auditech
- přehled o kvalifikaci, školení, délce praxe pracovníků, popisy práce
- záznamy o údržbě a kalibraci zařízení
- SOP v historickém pořadí podle a data vzniku

Vzorky se uchovávají jen dokud jejich stav umožňuje vyhodnocení.

Při zrušení pracoviště se příslušný archiv převede zadavateli

# Způsoby posuzování systémů jakosti

# Akreditace

Akreditaci provádí třetí, nezávislá strana, kterou je **akreditační orgán**.

**Osvědčení o akreditaci** je oficiální konstatování, že laboratoř splňuje kritéria ČSN EN ISO/IEC 45 000-17025 (2001) a je odborně, technicky, organizačně a personálně způsobilá k nezávislému provádění zkoušek specifikovaných v příloze osvědčení. Akreditace se řídí metodickým pokynem MPA-10-01-01.

Akreditační orgán provádí minimálně jedenkrát ročně **dozor nad dodržováním akreditačních kritérií** u držitelů osvědčení.

Akreditace může být

- dobrovolná, přispívá k věrohodnosti laboratoře
- vyžadovaná legislativou (v regulované sféře)

# Akreditační systém České republiky

vychází z mezinárodních souvislostí:

## **Globální koncepce přístupu ke zkoušení a certifikaci ES:**

- nebude se budovat nadnárodní systém, ale budou se uznávat národní
- akreditační, certifikační a inspekční orgány se budou řídit jednotnými pravidly (EN 45 000)
- systémy jakosti výrobků budou odpovídat normám ISO 9000
- odpovědnost za jakost výrobků nese výrobce
- specifikuje se používání značky Evropský certifikát CE
- upravuje se vzájemné uznávání zkoušek
- harmonizace se týkají především ochrany veřejných zájmů (zdraví obyvatel, bezpečnost, ochrana životního prostředí), tj. regulovaná sféra, neregulovaná sféra je dobrovolná

# Národní akreditační orgán

zastřešuje ve většině evropských zemí veškerou akreditační činnost. Vychází z požadavků EN řady 45 000.

Tyto národní orgány se sdružují v mezinárodních organizacích, zabývajících se akreditací, certifikací a zkoušením:

- **Evropská organizace pro akreditaci laboratoří** (EAL - European Cooperation for Accreditation of Laboratories)
- **Evropská organizace pro akreditaci certifikačních orgánů** (EAC - European Accreditation of Certification)

## **Základní požadavky pro prohlášení důvěry:**

- nestrannost a nezávislost akreditačních orgánů
- technická způsobilost akreditovaných objektů

# Český institut pro akreditaci (ČIA)

je národní akreditační orgán České republiky.

Je výkonným orgánem pro:

- akreditaci zkušebních laboratoří
- akreditaci kalibračních laboratoří
- akreditaci certifikačních orgánů provádějících certifikaci výrobků, systémů jakosti a personálu
- akreditaci certifikačních orgánů provádějících certifikaci EMS organizací
- akreditaci inspekčních orgánů

Akreditační systém je založen na evropských normách EN 45 000, které byly přeloženy a začleněny do systému národních norem jako ČSN EN řady 45 000.

ČIA vydává **Metodické pokyny pro akreditaci**, které interpretují a zpřesňují obecné formulace evropských norem a jsou pravidelně aktualizovány.

ČIA je **přidruženým členem EAL a EAC**, což umožňuje uzavření dohody o vzájemném uznávání výsledků akreditací. Dohled na nestrannost a správnou činnost akreditačních orgánů zajišťuje **Rada pro akreditaci**, která je dozorčím orgánem ČIA. Jejími členy jsou zástupci orgánů státní správy, výrobců, podnikatelů, spotřebitelů, akreditovaných objektů a nezávislých expertů. Existují **technické výbory** pro jednotlivé oblasti akreditace (zkušební, kalibrační laboratoře,...), a také rozsáhlá **data báze expertů** (odborných posuzovatelů). Posuzovatelé musí mít potřebnou odbornost i znalost procesu akreditace a podléhají procesu dalšího vzdělávání a hodnocení.

# Akreditace

je proces **časově i finančně náročný**, proto je třeba náležitě zvážit, co může přinést a jaké jsou veškeré požadavky, prostudovat všechny normy a zhodnotit jejich dopad na fungování laboratoře.

**Fáze přípravy** zahrnuje:

- inventarizaci materiálních i lidských zdrojů
- přípravu personálu laboratoře
- vybudování funkčního systému jakosti
- zavedení dokumentace

# Akreditační proces

- podání žádosti (příhláška, dotazník o připravenosti a shodě)
- registrace žádosti (po kontrole žádosti a zaplacení poplatku), přidělení vedoucího posuzovatele z ČIA)
- uzavření obchodní smlouvy
- posuzování dokumentace systému řízení jakosti (zejména příručka jakosti)
- sestavení skupiny posuzovatelů (odborník na systém jakosti, metrologii, jednotlivé typy zkoušek, pozorovatelé), podepsání prohlášení posuzovatele
- posuzování na místě (shody kritérií se skutečným stavem)
- vypracování souhrnné zprávy (identifikace, předmět, rozsah, posuzovatelé, plnění jednotlivých kritérií)
- rozhodování o akreditaci (vydání, pozastavení, zrušení, odmítnutí - vydává ředitel ČIA)
- dozor nad akreditovanými subjekty (prověřování průběžného plnění plánované i mimořádné, min. jednou ročně)

## Osvědčení o akreditaci

je oficiálním konstatováním, že akreditovaný subjekt trvale plní kritéria příslušné evropské normy a je odborně, technicky, organizačně a personálně způsobilý k nezávislému provádění zkoušek. Součástí osvědčení je **příloha s přesnou specifikací** předmětu akreditace.

**Platnost osvědčení** o akreditaci je tři roky, poté je možné žádat o reakreditaci.

**Platnost reakreditace** je pět let.

## Závazky vyplývající z akreditace

- být trvale v souladu s požadavky normy
- používat akreditaci jen v souvislosti s obory, kde je udělena
- uhradit poplatky
- nepoškodit pověst akreditačního orgánu
- po ukončení akreditace ji přestat používat
- upozornit zákazníky, že akreditace zkoušky neznamena schválení výrobku, nelze využívat části výsledků k reklamě
- akreditační orgán musí být informován o změnách
- při odkazech na akreditaci musí být přesně uvedeno, pro co akreditace platí, kdo ji provedl a pod jakým číslem
- při odebrání akreditace se nesmí dále používat
- laboratoř se může akreditace písemně vzdát

# Certifikace

je postup, při kterém třetí strana (nezávislá osoba nebo orgán nezainteresovaný v daném problému) poskytuje písemné ubezpečení, že výrobek, proces nebo služba jsou ve shodě se specifikovanými požadavky.

Třetí stranou je certifikační orgán, který musí být pro svou činnost akreditovaný.

Normy řady ISO 9000 jsou obecný návod pro management jakosti, nezávisí na průmyslovém odvětví:

- ISO 9 001: shoda s požadavky v průběhu návrhu, vývoje, výroby, instalace, servisu
- ISO 9 002: shoda s požadavky v průběhu výroby, instalace, servisu
- ISO 9 003: shoda s požadavky pouze při výstupní kontrole a zkoušení

# Audit ze strany certifikačního orgánu

se zabývá **posuzováním** toho

- zda zavedený systém zahrnuje všechny body systému jakosti požadované příslušnou normou
- zda je konkrétní naplnění bodů vhodné pro daný proces
- zda je vše náležitě popsáno a zdokumentováno v příručce jakosti

Organizace usilující o akreditaci svého systému musí stanovit **dokumentovat**

- politiku jakosti
- organizační strukturu
- vymezení vztahů, odpovědnosti, pravomoci
- jmenování pracovníka odpovědného za jakost
- přezkoumání systému jakosti

# **System ISO 9001 musí obsahovat dokumentované postupy** odpovídající požadavkům normy pro

- řízení návrhu, dokumentů, údajů
- nákup
- identifikaci a sledovatelnost výrobku během procesu
- kontrolní a zkušební činnost
- kalibrace a údržbu měřícího zařízení
- opatření k nápravě a preventivní opatření
- manipulaci, skladování, balení, dodávku
- identifikaci, registraci, ukládání
- plánování a provádění interních prověrek jakosti
- výcvik pracovníků provádějících činnost
- servis

Výsledkem úspěšného auditu je **certifikát**, který uvádí shodu s příslušnou zavedenou normou pro zkoumaný proces. Certifikační orgán dále provádí **kontrolu** nad dodržováním kritérií.

**ISO 9000** jsou obecně určeny pro výrobní procesy, nezabývají se laboratořemi, na rozdíl od **ISO G. 25/ EN 45 001**.

Nezabývají se tedy operativním řízením jakosti v laboratoři, zkoušením způsobilosti, používáním referenčních materiálů a dalšími detaily spojenými s technickou způsobilostí..

# Inspekce

se řídí směrnicemi, zejména rozhodnutím Rady OECD C(95)8/FINAL, které zavazuje členské země k vytvoření národních úředních postupů ke kontrole dodržování zásad GLP.

**Národní program dodržování GLP** je podrobné schéma vytvořené členskou zemí ke kontrole pomocí inspekcí a auditů.

**Národní úřad pro kontrolu GLP** je zodpovědný řídicí orgán kontroly.

**Inspekce** je na místě provedená kontrola pracovních postupů a zvyklostí na zkušebním pracovišti, posouzení shody s GLP a kvality a neporušenosti dat.

**Audit** je porovnání primárních údajů s průběžnými a závěrečnými zprávami za účelem ověření, že byly zpracovány a interpretovány správně, podle plánu a SOP, a že nedošlo k něčemu, co by mohlo zpochybnit jejich platnost.

## Postup inspekci

- předběžná inspekce (seznámení inspektora s pracovištěm)
- úvodní pohovor (vysvětlení účelu, rozsahu inspekce, vyžádání dokumentů a vzorků, kontakt s útvarem zajišťování jakosti)
- organizace práce a pracovníci (personál, vzdělávání, dokumentace)
- plán zajišťování jakosti (ověření dostatečnosti mechanismů)
- pracoviště (rozměry, uspořádání, záměny, kontaminace)
- biologické zkušební systémy (péče, ošetření, pomocná zařízení)
- přístroje, materiály, činidla, vzorky (kvalita, kapacita)
- zkušební systémy (přiměřené postupy užití a kontrola)
- referenční látky (totožnost, skladování, SOP na zacházení)
- SOP (písemné pro všechny důležité postupy, dodržování)
- provádění studií (plány, dodržování, zaznamenávání)
- zprávy (podpisy, jakost, opravy, archivace)
- archivace, dokumentace (SOP pro archivaci, typy dokumentů)

# Audit

může být součástí inspekce, může mít velmi různý rozsah. Cílem je zrekonstruovat celou studii na základě jejího plánu a SOP, primárních údajů a archivu.

Může jít o kontrolu

- dostatečného personálního zajištění (vzdělání a čas)
- konkrétního zařízení (údržba, kalibrace)
- zacházení s materiálem
- osudu laboratorních zvířat (aplikace, dávky, nálezy)
- dokumentace

# Jak přežít audit

## Příprava

- shromáždit data a dokumentaci k auditované studii, nenechat auditory hledat v ostatních materiálech
- uložit vedoucímu studie projít veškeré materiály a zodpovědět otázky
- prohlédnout časový harmonogram a zajištění kvality
- připravit pracovní místo pro auditory
- vyvěsit plán místností
- připravit zaměstnance na to, jak bude audit probíhat

## **Průběh auditu**

- kontinuálně sledovat inspekci, doprovázet auditory
- mít všechny materiály připraveny
- předkládat kopie, nedávat originály
- uschovat duplikáty všech poskytnutých materiálů
- ihned realizovat korigující akce
- denně organizovat informační schůzky k průběhu auditu
- být zdvořilý a spolupracovat
- odpovídat jen na položené otázky
- chránit důvěrné informace

## **Závěr**

- provést závěrečné shrnutí
- zeptat se na další otázky a důvody k nespokojenosti
- připravit složky s inspekčními materiály
- připravit zprávu o auditu

## Výsledky inspekce a auditu

musí být zpracovány písemně a projednány se zkušebním pracovištěm.

Drobné závady nemusí zabránit konstatování shody pracoviště se zásadami GLP, ale vedoucí musí zjednat nápravu.

Inspektor může tato nápravná opatření znovu zkontrolovat. Závažnější odchylky hlásí inspektor příslušnému úřadu pro kontrolu dodržování GLP.

Byla-li inspekce provedena na žádost kompetentního orgánu, bude mu úplná zpráva doručena prostřednictvím úřadu pro kontrolu dodržování GLP.

# Interní audit

Audit má několik forem:

- audit jakosti uvnitř laboratoře
  - prověrka jakosti, interní audit,  
(ověření existence a dodržování postupu jakosti,  
kompetence vnitřního systému kontroly jakosti)
  - přezkoumání vyšším managementem  
(ověření, zda je systém účinný)
- posuzování, externí audit nezávislým orgánem jako součást akreditace.

Jedná se o systematické a nezávislé zkoumání s cílem posoudit, zda činnosti a výsledky vztahující se k jakosti jsou v souladu s plánovaným uspořádáním, zda jsou účinně zavedeny a vhodné k dosažení daného cíle.

# Interní systém zajištění jakosti

- činnosti prováděné při každé analýze (**kalibrace, citlivost**)
  - porovnání změny odezvy systému na standardu (do 20%)
  - stanovení rozpětí paralelních stanovení
- kontrola **přesnosti, opakovatelnosti, správnosti** (kontrolní vzorky se užívají po 50 analýzách nebo 1x týdně, případně na začátku důležité série nebo při nestabilitě systému, vždy několik analýz, výpočet odchylky, regulační diagramy, varovné a regulační meze, opatření, certifikované materiály)
- kontrola **meze detekce** celého zařízení (aspoň 1x ročně na aspoň 10 slepých vzorcích, vypočte se standardní odchylka a porovná s dřívějšími hodnotami)
- externí kontrola jakosti (**srovnávací analýzy**, účast na okružních testech a testování referenčních materiálů), tyto výsledky je třeba propojit do interní kontroly)

## Vnitřní kontrola jakosti (interní prověrka)

Provádí ji manažer jakosti tak, aby každý prvek systému byl zkontrolován alespoň 1x ročně

- horizontální (detailní zkoumání jednoho prvku)
- vertikální (kontrola na základě náhodně vybraného vzorku a veškeré manipulace s ním (identifikace, kalibrace, metody, pracovníci, protokoly, data))

Prověrky jsou plánované i namátkové (reakce na anomálie a stížnosti), protokoly se zapisují do knihy kontrol (jméno auditora, datum, prověřované oblasti, podrobnosti o nich a zjištění, opatření k nápravě a termín, podpis).

# Přezkoumání systému jakosti

(hodnocení stavu ve vztahu ke změnám, výsledkům auditu, stížnostem, akreditacím) se provádí nejméně 1x ročně za účasti ředitele, vedoucích laboratoří a manažera jakosti.

Podklady:

- výsledky předchozího přezkoumání
- protokoly akreditačních orgánů
- výsledky interních prověrek jakosti
- výsledky mezilaboratorních testů
- stížnosti zákazníků
- příručka jakosti včetně dodatků

## Systém jakosti v laboratoři pro GC

Základní údržba měřícího zařízení se provádí dle plánu údržby

Základní kalibrační křivka je tvořena nejméně pěti koncentračními úrovněmi

Při změně kalibračního roztoku se sleduje metrologická návaznost

Kvantifikujeme pouze pro oblast lineární odezvy

Každý 10. vzorek je kalibrační standard

Kontrola čistoty skla a chemikálií

S každou sérií se v laboratoři analyzuje slepý vzorek

Obsah analytu ve slepém vzorku nesmí překročit 1/20 obsahu analytu ve vzorku

Používá se referenční vzorek pro zjištění výtěžnosti metody

Výtěžnost metody nesmí klesnout pod 50 %

Enormně kontaminované vzorky se ředí tak, aby hodnota odezvy byla přibližně v 1/2 kalibrační křivky

Pozitivní vzorky se potvrzují pomocí GC/MS

Vedeme regulační diagramy

MPZ a výměna vzorků s dalšími pracovišti

Data v elektronické podobě se pravidelně archivují

# Standardní operační postupy

## **SOP – standardní operační postup**

1. Úvod (všeobecné údaje, oblast použití, princip metody, terminologie, rušivé vlivy, omezení metody, bezpečnost při práci, toxikologické údaje, odpady a jejich likvidace)
2. Normativní odkazy
3. Chemikálie a spotřební materiál (roztoky, činidla, požadavky na jejich čistotu, příprava roztoků, příprava a uchovávání referenčních materiálů, požadavky na laboratorní sklo)
4. Vzorkování (odběry vzorků, zásady odběru, plán odběru, podmínky transportu vzorku do laboratoře, konzervace vzorků, příprava k analýze)
5. Přístroje a pomocná zařízení (příprava přístroje k měření, požadavky na metrologickou návaznost, kalibrační standard, regulační standard, CRM)

6. Kalibrace
7. Postup zkoušky – analytické schéma
8. Kontrola kvality metody (interní kontrola- CRM, regulační diagramy, externí kontrola – MPZ, nejistota stanovení, validační protokol (většinou příloha SOP )
9. Výpočet (vyhodnocení dat, vyjadřování výsledků)
10. Poznámky, doplňky, přílohy (například validační protokol)

## Specifické problémy environmentální stopové analýzy:

- stopové koncentrace (riziko kontaminace ve všech krocích, nutnost preseparace a koncentrace, nároky na citlivost a selektivitu)
- omezená stabilita analytů a matrice
- nehomogenita vzorků
- speciace analytů a vazba analytů na složky

Oblast ultrastopových analýz vyžaduje **optimalizaci**

- požadavků normy
- vynaložených ekonomických prostředků
- časové náročnosti

vzhledem k **zabezpečení jakosti postupu.**

## Použití normovaných metod

Pokud není normovaná metoda převzatá včetně SOP, je třeba jej vytvořit. Musí obsahovat:

- všechny informace uvedené u SOP výše
- jméno autora překladu při převzetí cizojazyčné metody
- jména těch, kdo metodu zaváděli
- informace o validaci metody (selektivita, rozsah, linearita, robustnost, přesnost, správnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- systém průběžné kontroly správnosti a přesnosti (regulační diagramy)
- výpočetní postupy, způsob prezentace výsledků
- výpočty nejistoty výsledku

## Použití vlastních postupů

musí být zdokumentováno v SOP. SOP musí být srozumitelné a dostupné pro pracovníky, kteří uvedené postupy používají, musí obsahovat:

- všechny informace uvedené u SOP výše
- jména těch, kdo postup vypracovali
- jména těch, kdo postup schvalovali
- jména těch, kdo postup průběžně kontrolují, včetně charakteru a četnosti zkoušek
- informace o validaci metody
- regulační diagramy
- postupy pro výpočet a prezentaci výsledků
- postupy pro výpočet nejistot

# Harmonogram optimalizace a validace analytické metody

- úvodní rozvaha (aplikace, dostupné zařízení, ekonomický stav)
- optimalizace analytické metody
  - ověření statistické kontroly (konstantní průměrné hodnoty, dostačující shodnost)
  - ověření přesnosti metody (kontrolní limity)
- validace - pilotní studie (aplikovatelnost, výtěžnost, efekty matric, kalibrace, linearita, opakovatelnost)
  - standardní operační postup
  - mezilaboratorní porovnávání (reprodukovatelnost)
  - konečná verze textu

## Validace a verifikace

**Validace metody** je potvrzení přezkoušením a poskytnutí objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny. Provádí se pomocí reálných vzorků pro celý předepsaný koncentrační rozsah a různé matrice. Norma uvádí, že laboratoř musí validovat metody nenormalizované, vyvinuté, rozšířené, modifikované, normalizované mimo zamýšlený rozsah. Není nutno provádět při převzetí normovaných metod. Závěrem je vypracování validačního protokolu, který obsahuje získané výsledky, postup využití pro validaci a prohlášení, že metoda vyhovuje zamýšlenému použití.

**Verifikace metody** je ověření správného fungování metody. Provádí při zavádění všech metod, včetně normovaných, dále při jakýchkoli změnách (personál, materiál, laboratoř, přístroje...)

# Software

Norma ISO/IEC 17 025 uvádí, že laboratoř musí zajistit, aby:

- softwarové vybavení vyvinuté uživatelem bylo dostatečně podrobně zdokumentováno, vhodně validováno a vhodné k danému použití
- byly stanoveny a zavedeny postupy pro ochranu dat. Takové postupy musí zahrnovat věrohodnost a důvěryhodnost vstupních údajů, jejich sběru, ukládání a zpracování
- počítače a automatizovaná zařízení byla udržována za účelem zajištění správné funkce a byly zajištěny podmínky nezbytné k udržení věrohodnosti zkušebních a kalibračních údajů
- musí být zajištěna ochrana dat při přenosu a archivaci a ochrana počítačů a sítě

MS Word a Excell se považují za validované.

# Validační parametry

- citlivost, linearita, rozsah
- přesnost, správnost, shodnost
- selektivita, specificita, robustnost
- mez detekce a stanovitelnosti
- opakovatelnost, reprodukovatelnost

Kalibrace a regulační diagramy nejsou nedílnou součástí validace, nicméně:

- z kalibrační křivky lze vyhodnotit citlivost, linearitu, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti
- regulační diagramy monitorují fungování metody v čase

## Neshody v terminologii:

ČSN ISO 3534-1

terminologická komise

accuracy

přesnost

správnost

trueness

správnost

pravdivost

precision

shodnost

přesnost

přesnost = správnost + shodnost

## Definice validačních parametrů

**Kalibrace** zavádí vztah mezi hodnotami udávanými měřícím systémem a hodnotami odpovídajícími obsahu analytu ve vzorku

**Citlivost** – velikost nárůstu závisle proměnné vyvolaná nárůstem koncentrace analytu, směrnice kalibrační křivky

**Linearita** – vlastnost metody poskytnout výsledek zkoušky v určitém rozsahu přímo úměrné koncentraci

**Mez detekce** – nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno

**Mez stanovitelnosti** - nejmenší množství analytu které může být stanoveno s přijatelným stupněm správnosti a shodnosti (např. pro chromatografii z poměru signál:šum mez detekce 3:1, mez stanovitelnosti 10:1)

**Přesnost** ( accuracy ) je těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou

**Správnost** ( trueness ) těsnost shody mezi průměrnou hodnotou a přijatou referenční hodnotou

**Shodnost** ( precision ) těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky získanými za definovaných podmínek

**Selektivita** – stupeň nezávislosti na interferencích

**Specifičnost** – schopnost metody umožnit zjistit analyt v přítomnosti jiných složek

**Robustnost** – vliv změn matrice na výsledek analytické zkoušky

**Opakovatelnost** – nezávislé výsledky získané za stejných podmínek

**Střednědobá opakovatelnost** – regulační diagramy

**Reprodukovatelnost** – shodnost mezi laboratořemi např. z MPZ

**Referenční materiál** - látka o dostatečně určené vlastnosti tak, aby mohla být použita pro kalibraci

**Certifikovaný referenční materiál** - referenční materiál vybavený certifikátem

**Přijatá referenční hodnota** – odsouhlasená referenční hodnota pro porovnání

**Výtěžnost** – podíl stanoveného množství analytu na jeho celkovém množství ve vzorku

**Vychýlení**, odchylka, bias – rozdíl mezi střední hodnotou zkoušek a přijatou referenční hodnotou

**Systematická chyba** výsledku se mění předvídatelným způsobem

**Náhodná chyba** výsledku se mění nepředvídatelně

**Kontrola kalibrace v celém rozsahu** se provádí při každém podstatném zásahu do systému, nejméně dvakrát ročně. Z ní je možné určit **citlivost** (porovnáním odezvy systému), **linearitu** (testujeme těsnost proložení kalibrační křivky regresní funkcí a vypočteme korelační koeficient), **mez detekce a stanovení** (kontrolu meze detekce provádíme aspoň jednou ročně na deseti vzorcích, porovnáme s dřívějšími hodnotami). S každou sérií měření se provádí **kontrola kalibrace** na jednom standardu.

**Pracovní rozsah** metody hledáme obvykle v souvislosti s požadavky legislativy. Je to koncentrační oblast, ve které může být dosaženo přijatelné správnosti a shodnosti.

**Přesnost a správnost** metody určujeme pomocí opakovaných měření referenčních materiálů, obvykle se vyhodnocuje na dvou významných bodech pracovního rozsahu, kontrola vždy po 50 analýzách, jednou týdně, při nestabilitě systému nebo na začátku důležité série.

**Přesnost** zahrnuje **společnou systematickou chybu** - vychýlení (viz správnost) a **náhodné chyby** (viz shodnost). **Shodnost** závisí pouze na distribuci náhodných chyb, vyjadřuje se mírou rozptýlení výsledků, odhadem směrodatné odchylky.

Shodnost může být definována pomocí **opakovatelnosti** (dlouhodobé nebo krátkodobé uvnitř laboratoře) nebo **reprodukovatelnosti** (mezi laboratořemi), konstruuji se regulační diagramy. Ukazatel (mez) opakovatelnosti je hodnota, pod kterou bude s pravděpodobností 95% ležet absolutní hodnota rozdílu dvou stanovení. Vypočte se ze směrodatné odchylky opakovaných analýz téhož vzorku

$$R = 2,8 \sigma$$

Mez reprodukovatelnosti se analogicky vypočte z odhadu směrodatné odchylky z mezilaboratorního testování.

**Robustnost** metody se určí vyhodnocením interference analytů. Sleduje se míra schopnosti metody poskytovat stejné výsledky, pokud je postup zatížen velkými změnami.

**Výtěžnost** se vypočte jako podíl nebo procento stanoveného množství analytu na jeho celkovém množství

## **Odhad směrodatné odchyly**

se provádí z 6-12 opakování analýzy homogenního vzorku nebo 20 duplicitních stanovení běžného vzorku na stejné koncentrační hladině.

$$\sigma^2 = \frac{\sum R_i^2}{2n}$$

## **Relativní směrodatná odchylna**

$$\text{RSD} = \frac{100 \sigma}{X}$$

# Regulační diagram

slouží k monitorování výsledků v čase, je založen na periodickém měření referenčních materiálů.

Konstrukce:

- centrální přímka je zjištěná průměrná hodnota  $X$
- horní a dolní varovná mez  $X \pm 2\sigma$  (95.5% výsledků uvnitř)
- horní a dolní regulační mez  $X \pm 3\sigma$  (99.7% výsledků uvnitř)

Neakceptovatelné je, pokud je

- naměřená hodnota mimo regulační meze
- sedm po sobě jdoucích hodnot klesajících nebo stoupajících
- sedm po sobě jdoucích hodnot pod nebo nad centrální přímkou
- dvě ze tří následujících hodnot mimo varovné meze

## Návaznost měření

Zařízení, které má významný vliv na přesnost nebo platnost výsledků zkoušek nebo vzorkování musí být **kalibrováno**.

Podle metodického pokynu MPA 30-02-97 provádějí kalibrace jen laboratoře Českého metrologického institutu (ČMI) nebo Akreditované kalibrační laboratoře (AKL).

**Návaznost** je nutná jednak na jednotky SI, jednak na referenční materiály.

Pro zajištění jakosti kalibrací a výsledků je nutné

- pravidelné používání CRM (CRM nejvyšší kvality, definovaná nejistota, expirace, RM z MPZ, vlastní RM)
- opakování zkoušek
- pravidelná účast v mezilaboratorním porovnávání způsobilosti laboratoří (MPZ). Podle MPA 30-02-02 má laboratoř povinnost se účastnit dostupných MPZ ve své oblasti působnosti, může se pak prokázat osvědčením o účasti.

# Sjednocení metod hodnocení analytických dat

- charakterizace přesnosti dat, konverze výsledku  $X$  na z-skóre

$$z = \frac{X-x}{\sigma} \quad \text{přijatelné pro } -2 < z < 2$$

- reprezentativní hodnota z-skóre (RSZ- rescaled sum of z-scores), platí pro jednu laboratoř a typ vzorku,  $m$  kol

$$RSZ = \frac{\sum z}{\sqrt{m}}$$

- suma čtverců z-skóre (SSZ - sum of squared z-scores), platí pro jednu laboratoř a jedno kolo

$$SSZ = \sum z^2$$

# Odhad nejistot

Podle požadavků normy ISO/IEC 17 025 se laboratoř musí přinejmenším pokusit identifikovat všechny složky nejistoty, udělat její přiměřený odhad a zajistit, aby nevzbuzovala nesprávnou představu o hodnotě nejistoty. Takový odhad musí být založen na znalosti provedení metody a na rozsahu měření a musí používat údajů o validaci, měření kontrolních vzorků a předchozích zkušenostech. Nejistota vždy odpovídá dané koncentrační úrovni. Laboratoř musí mít zpracovány postupy pro stanovení nejistoty měření.

Alternativy:

- z regulačních diagramů (z individuálních nebo opakovaných měření)
- z dat pro vyhodnocení přesnosti (vícenásobná měření nebo paralelní měření)
- z parciálních nejistot

**Standardní nejistota** je nejistota výsledku vyjádřená jako směrodatná odchylka

**Kombinovaná standardní nejistota** je nejistota výsledku měření, je-li výsledek získán z hodnot odpovídajících několika dalším veličinám (například druhá mocnina rozptylů)

**Rozšířená nejistota** definuje interval hodnot zahrnující výsledek měření

## Vyjadřování výsledků analýz v blízkosti meze detekce

Stanovení mezí detekce a stanovitelnosti (oblast **LOD-LOQ** limit of detection, limit of quantification) je nezbytné pro určení rozumné míry nejistot měření.

Výsledky měření jsou **pravděpodobnostní intervaly** určené střední hodnotou a směrodatnou odchylkou. Relativní směrodatná odchylka roste se snižující se koncentrací. Skutečná hodnota leží s 95% pravděpodobností uvnitř intervalu spolehlivosti, který je dán nulovou koncentrací a dvojnásobkem střední hodnoty. Údaje v oblasti  $X < LOD$  nejsou regulárními kvantitativními údaji. Je třeba rozlišit a hlásit dva rozdílné případy:

- $X < LOD$
- nestanoveno (pro případ vlivu interferencí).

Mají-li data v této oblasti pro uživatele význam, je nutné snížit hodnotu LOD.

# Uvádění výsledků

Protokol o zkoušce musí obsahovat

- název a identifikaci protokolu
- název a adresu laboratoře
- název a adresu zákazníka
- identifikaci použitých metod
- popis zkoušené položky
- datum přijetí vzorku a provedení analýz
- odkaz na plán a postup vzorkování
- výsledky zkoušek včetně jednotek
- identifikace osob podepisujících protokol

## Validační programy

Existují programy pro validaci, například **EffiChem** a **EffiValidation**. Používají se v akreditovaných laboratořích a farmaceutickém průmyslu, od roku 1998 už stovky uživatelů.

Poskytuje možnost provozu lokálně nebo v síti, možnost různých druhů validace (plná, průzkumová, retrospektivní, převod metody). Obsahuje moduly pro validaci metod, nejistoty, regulační diagramy, kalibrace, mezilaboratorní porovnávání, evidenční knihy, validací software.

Vyhodnocení poskytuje detailní výsledky a globální závěr, detekci odlehlých bodů, testování normality, grafy. Je možné výsledky tisknout, různě sestavovat, archivovat, exportovat

# Uplatnění GLP při terénních studiích

## Vzorkování

Laboratoř musí mít:

- plán odběru vzorků
- standardní pracovní postup pro odběr vzorků
- dokumentace odběru vzorků

## **Plán vzorkování**

Konkrétní způsob jednotlivých činností vedoucí k odběru reprezentativního vzorku (vzorek by měl v době zkoušek vykazovat stejné vlastnosti jako celý vzorkovaný objekt v časovém intervalu odběru vzorku )

### **Struktura plánu vzorkování**

Cíl vzorkování

Definice místa odběrů, poznatky z místního šetření

Rozsah ukazatelů a koncentračních hladin

Požadovaný rozsah analýz, technika vzorkování

Volba počtu, doby, četnosti a termínu odběru vzorků

Zabezpečení jakosti vzorkování (dekontaminace vzorkovnic, identifikace, konzervace vzorků, zabezpečení)

Volba analytických metod

Ochrana zdraví a zásady bezpečnosti

Požadavky na formu a způsob předávání výsledků

# Standardní pracovní postup

Písemný návod detailně popisující provádění odběru vzorků  
Definuje použité vzorkovnice, způsob odběru vzorku, jeho konzervaci  
a homogenizaci  
Definuje podmínky přepravy vzorku

## Struktura standardního pracovního postupu

Úvod

Vymezení působnosti

Oblast použití

Definice pojmů, symbolů a zkratk

Princip postupu

Bezpečnost práce

Přístroje a vybavení

Pracovní postup

Kontrola funkce přístrojů

Vnitřní kontrola a řízení jakosti

Četnost kontrol

# Titulní list SOP

Název metody  
Číslo metody  
Řízený/neřízený výtisk  
Vypracoval  
Kontroloval  
Schválil  
Rozdělovník  
Datum platnosti  
Změny

# Záznam o odběru vzorku

- označení záznamu, označení vzorku
- jméno osoby provádějící odběr
- datum odběru
- časový údaj či interval odběru vzorku
- popis místa odběru, meteorologické podmínky, výsledky měření prováděných na místě
- způsob odběru vzorku s odkazem na použitý SOP
- použité zařízení
- způsob předběžné úpravy vzorku, konzervace, stabilizace
- kontrolní vzorky, duplicitní, terénní slepý, obohacený
- způsob přepravy a uchovávání vzorku
- čas předání vzorku do laboratoře, odpovědná osoba
- odchylky od pracovního postupu

## Kvalita vzorku

zahrnuje dostačující velikost, reprezentativnost, stabilitu, pořizovací náklady. Vzorky mohou být **homogenní**, heterogenní nebo kombinované, složené z několika odběrů nebo naopak dělené. Před analýzou se homogenizují a testují na stejnorodost. Odběr může být **systematický** nebo náhodný, vzorky **reprezentativní** nebo nereprezentativní. Technika odběru musí být vybrána podle požadovaného typu analýzy, účelu analýzy (průzkum, monitoring), vlastností analytu a matrice. **Velikost** odběru se musí řídit hmotností potřebnou pro analýzu. Pro odhad nejistot je třeba vzít v úvahu všechny zdroje chyb. Jakost jednotlivých kroků (čistota vzorkovnic, slepé vzorky, doprava, skladování) je třeba kontrolovat

- STOCKHOLMSKÁ ÚMLUVA