



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Stanovení glykovaného hemoglobinu metodou HPLC

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE
ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Martina Kuníková

Vedoucí práce: Ing. Iveta Náprstková

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem Stanovení glykovaného hemoglobinu metodou HPLC jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 6. 2020

podpis

)

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především vedoucí mé práce Ing. Ivetě Náprstkové za odborné vedení, pomoc, radu a ochotu po celou dobu práce. Velké poděkování patří také celé mojí rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

Stanovení glykovaného hemoglobinu metodou HPLC

Abstrakt

Tato bakalářská práce je věnována stanovení glykovaného hemoglobinu pomocí metody HPLC na dvou analyzátořech D-10 firmy Bio-Rad. V rámci práce byly změřeny a vyhodnoceny hodnoty vzorků interní kontroly kvality na dvou přístrojích v období listopad 2019 až březen 2020. Byla provedena pravidelná verifikace metody na dvou přístrojích. Dále byly změřeny vzorky SEKK v plánovaném cyklu EHK Kompenzace diabetu KD 1/20.

Každý měsíc bylo prováděno pravidelné srovnání obou přístrojů na laboratorních vzorcích, celkem 50 vzorků.

Výsledky této práce jsou součástí sledování kontroly kvality laboratorního stanovení a podkladem pro zlepšování kvality práce v laboratoři.

Klíčová slova

Diabetes mellitus; glykovaný hemoglobin; chromatografie; HPLC

Determination of glycated hemoglobin by HPLC method

Abstract

This bachelor thesis deals with the determination of the glycated hemoglobin by the HPLC method at two analyzers D-10 from the company Bio-Rad.

The sample values for the internal control quality were measured and evaluated for two devices in the period from November 2019 to March 2020 in this bachelor thesis. The regular verification of the method was realized for both analyzers. The SEKK samples were measured in the planned survey of external quality assesment SEKK Compensation of diabetes KD 1/20. The regular comparation of both analyzers was performed by the measurement of laboratory samples once in the month. Overall 50 samples were measured in this period.

The results of this bachelor thesis are part of a monitoring of the laboratory determination quality control and they are the base for the improving of the work quality in the laboratory and the base for the increase of the effectiveness of the laboratory's quality management system.

Key words

Diabetes mellitus; glycated hemoglobin; chromatography; HPLC

Obsah

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Diabetes mellitus	9
2.1.1 Diabetes mellitus I. typu	9
2.1.2 Diabetes mellitus II. typu	11
2.2 Glykovaný hemoglobin.....	13
2.2.1 Hemoglobin.....	13
2.2.2 Glykace hemoglobinu	14
2.2.3 Použití glykovaného hemoglobinu.....	15
2.2.4 Stanovení glykovaného hemoglobinu	16
2.3 Metody stanovení glykovaného hemoglobinu	18
2.3.1 Chromatografie	18
2.3.2 HPLC.....	20
2.3.3 Ostatní metody pro stanovení HbA _{1c}	21
2.4 Vlastnosti analytické metody	22
2.4.1 Preciznost	23
2.4.2 Pravdivost.....	24
2.4.3 Přesnost	24
2.4.4 . Validace a verifikace	24
2.4.5 Interní kontrola kvality.....	24
2.4.6 Externí kontrola kvality.....	25
3. CÍLE PRÁCE.....	26
4. METODIKA	27
4.1 Popis přístroje	27
4.2 Pracovní postup.....	29
4.2.1 Složení reagenční soupravy.....	31

4.3	Kalibrace přístroje.....	31
4.4	Kontrola kvality	34
4.5	Verifikační protokol	37
4.6	Měření EHK	43
4.7	Měření patientských vzorků.....	44
4.7.1	Lineární regresní analýza	44
4.7.2	Korelační koeficient	45
4.7.3	Porovnání měřených vzorků na dvou přístrojích	47
5.	DISKUZE	48
6.	ZÁVĚR	50
7.	LITERATURA	52
8.	SEZNAM ZKRATEK	55
9.	PŘÍLOHY	56

1. Úvod

Diabetes je závažné chronické onemocnění, které se vyskytuje, jak u dětí, tak i u dospělých jedinců. Toto onemocnění je charakteristické poruchou metabolismu sacharidů a hlavním znakem je hyperglykémie. Známe několik typů diabetu mellitu: diabetes mellitus I. typu, diabetes mellitus II. typu, gestační diabetes mellitus a další specifické typy.

Příčinou tohoto onemocnění je porucha B – buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. To má za následek deficit inzulinu v krvi anebo jsou cílové buňky vůči inzulinu rezistentní. Léčba diabetu zahrnuje úpravu stravovacích návyků a jejich přísné dodržování. Dále je přistupováno k podávání perorálních antidiabetik a inzulinu.

Vhodným nástrojem pro sledování kompenzace diabetu je hladina glykovaného hemoglobinu, jenž vzniká neenzymatickou glykací hemoglobinu. Hodnota glykovaného hemoglobinu ukazuje stav glykémie za období 8 – 12 týdnů. Jako glykovaný hemoglobin se stanovuje jeho frakce HbA1c. Požadavky na metodu z pohledu přesnosti a dostupnosti výsledků se stále zvyšují jako počet pacientů s prokázanou diagnózou diabetes mellitus.

V této práci byl stanovován glykovaný hemoglobin metodou HPLC na přístroji D-10 firmy Bio-Rad. V období od listopadu 2019 do konce března 2020 bylo monitorováno měření kontrolních materiálů, bylo provedeno pravidelné měsíční porovnání dvou přístrojů D-10 na patientských vzorcích. V březnu proběhl plánovaný cyklus EHK. Zároveň byla provedena pravidelná verifikace metody v laboratoři.

2. Teoretická část

2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je závažné chronické onemocnění, jenž se projevuje poruchou metabolismu sacharidů. Hlavním znakem je zvýšená hladina krevního cukru, neboli hyperglykémie, způsobená absolutním nebo relativním nedostatkem hormonu inzulínu.

Pro určení diagnózy diabetu byly stanoveny koncentrace glukózy v plazmě žilní krve na lačno $\geq 7,0$ mmol/l, kdykoli během dne $\geq 11,1$ mmol/l, nebo koncentrace glukózy ve 120. minutě orálního glukózového tolerančního testu $\geq 11,1$ mmol/l. Před vyslovením diagnózy diabetu je nutné náhodný záchyt hyperglykémie potvrdit opakovaným měřením z dalšího odběru v následujících dnech (Diabetes Care 2011).

Podle příčin a průběhu rozlišujeme několik typů diabetu

Tabulkač.1 Klasifikace *diabetes mellitus* podle WHO a ADA

DIABETES MELLITUS	
I.	Diabetes mellitus I. typu
	Imunitně podmíněný
	Idiopatický
II.	Diabetes mellitus II. typu
III.	Ostatní specifické typy diabetu
	Genetický defekt funkce β -buněk
	Genetické defekty účinku inzulínu
	Onemocnění exokrinního pankreatu
	Endokrinopatie
	Chemicky a léky indukovaný diabetes
	Infekce
	Neobvyklé formy imunologicky podmíněného diabetu
	Genetické syndromy asociované s diabetem
IV.	Gestační diabetes mellitus

(Zamrazil 2007)

2.1.1 *Diabetes mellitus I. typu*

Příčinou diabetu I. typu je nedostatečná nebo chybějící tvorba inzulínu v B-buňkách pankreatu. Tento typ bývá označován jako inzulinodeficientní, u kterého dochází autoimunitními procesy a působením vnějších vlivů k destrukci B-buněk

Langerhansových ostrůvků. Autoimunitní poškození B-buněk pankreatu spustí obvykle prodělaná infekce, nejčastěji virového původu (Perušičová 2017).

S tímto typem diabetu se setkáváme především u dětí a dospívajících jedinců. Nástup choroby bývá většinou rychlý s klasickými příznaky, jako je hubnutí, žízeň a špatné prospívání. *Diabetes mellitus* I. typu se vyskytuje i u dospělých jedinců.

Diabetes mellitus I. typu, který se projeví až v dospělosti jedince, se označuje jako typ LADA . Jedná se o latentní autoimunitní diabetes dospělých. Tito pacienti bývají zpočátku často považováni za diabetiky II. typu, ale jsou u nich prokázány protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (anti-GAD), které jsou charakteristické pro diabetes mellitus I. typu (Rybka 2006). Typ LADA se velmi často vyskytuje spolu s autoimunitním onemocněním štítné žlázy (Perušičová 2017). Nedostačující sekrece inzulínu je následně potvrzena vyšetřením C-peptidu nalačno a po stimulaci (Carlsson et al., 2000).

Základní léčba spočívá v podávání injekčních preparátů inzulínu dle potřeb pacienta.

Jednou z možností podání inzulínu jsou inzulínové pumpy, jenž doplňují inzulín kontinuálně. Dalším řešením deficitu inzulínu je transplantace buněk Langerhansových ostrůvků, ale tato metoda je momentálně finančně velmi náročná. Vzhledem k autoimunitnímu charakteru onemocnění by řešením mohla být léčba monoklonálními protilátkami (Perušičová 2017).

2.1.1.1. Inzulín, C- peptid

Inzulín je hormon produkovaný B-buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu snižující glykémii. Je nezbytný pro udržení normální hladiny glykémie. Chemicky se jedná o peptid, který obsahuje celkem 51 aminokyselin. Aminokyseliny jsou uspořádány do dvou řetězců A a B, které jsou spojeny dvěma disulfidovými můstky. Řetězec A je stabilizován třetím disulfidovým můstkem (Barevný atlas biochemie 2012).

C-peptid je součástí molekuly proinzulinu, ze které se uvolňuje při štěpení na inzulín a C - peptid. Množství C - peptidu odpovídá množství uvolněného inzulínu. C - peptid je stabilnější než inzulín a zároveň není obsažen v injekčně podaném inzulínu, proto je ke stanovení vhodnější (Průša et al. 2012).

2.1.2 *Diabetes mellitus II. typu*

Diabetes mellitus II. typu patří mezi nejrozšířenější civilizační choroby, je též označován jako non-inzulinentní *diabetes mellitus*. V Langerhansových ostrůvcích nedochází k destrukci B-buněk, ale postupně se zhoršuje jejich funkce, nedostatek inzulínu je relativní. Tvorba inzulínu může být normální nebo dokonce zvýšená, ale cílové buňky vykazují vůči inzulínu sníženou citlivost (Perušičová 2017).

Primární příčinou bývá často označována obezita, jež je způsobená nadměrným příjmem kalorií, nevyhovujícím složením stravy a nedostatečnou tělesnou aktivitou. Při snížení hmotnosti dochází obvykle i k úpravě hladiny glykémie.

Diabetes II. typu se objevuje v dospělosti, mnohdy bez typických příznaků a záchyt hyperglykémie je často náhodný. Díky skrytému průběhu má řada nemocných v době zjištění diagnózy mnoho komplikací, které lze zahrnout do metabolického syndromu. Mezi komplikace patří hypertenze, porucha metabolismu lipidů, hyperurikémie, abdominální obezita a další (Rybka 2006).

Dlouhodobá hyperglykémie je jedním z hlavních faktorů rozvoje cévních komplikací u pacienta s diabetem. Podle místa postižení cévy mluvíme o diabetické retinopatii, nefropatii nebo neuropatii (Karen, Svačina 2011).

2.1.3. *Gestační diabetes mellitus*

Porucha glukózové tolerance, která vznikla v průběhu těhotenství a po porodu spontánně mizí, je označována jako gestační diabetes mellitus. Pokud však hyperglykémie přetrvává i po porodu, jde o diabetes II. typu.

Gestační diabetes se objevuje v průměru zhruba u 7 % těhotenství (King 1998).

Pro záchyt gestačního diabetu se používá vyšetření orálního glukózového tolerančního testu (oGTT), prováděného mezi 24.— 28. týdnem gravidity. Test se provádí zátěží 75g glukózy. Odebírá se venózní krev do zkumavek s přídavkem fluoridu sodného nalačno, hodinu po zátěži a dvě hodiny po zátěži. Glykémie nalačno nesmí přesáhnout hodnotu 5,1 mmol/l, po 60. minutě 10,0 mmol/l nebo ve 120. minutě 8,5 mmol/l. Pacientky s patologickým výsledkem oGTT jsou odesílány na diabetologické ambulance, kde jsou sledovány až do konce těhotenství (Haluzík 2009).

Sledování pacientek je velmi důležité i po porodu. V prvních letech po porodu se zhruba u jedné třetiny pacientek vyvine klasický diabetes mellitus. Celkově se objeví do konce života diabetes u více než poloviny pacientek s diagnózou gestačního diabetu (Škrha et al. 2009).

2.1.4. Ostatní specifické typy diabetu

Mezi nejčastější specifické typy diabetu patří diabetes vzniklý na základě onemocnění zevně sekretorické části slinivky břišní. Ke vzniku diabetu může dojít i při dalších onemocněních pankreatu, kam patří např. Cushingův syndrom, akromegalie nebo glukagonom (Škrha et al. 2009)

Další skupinu tvoří diabetes MODY (diabetes mellitus charakteru dospělých vzniklý v mládí). MODY diabetes vzniká jako následek geneticky podmíněného defektu B – buněk pankreatu. Jedná se o autosomálně dědičné onemocnění (Shepherd et al. 2001)

2.1.5. Prediabetes

Prediabetes je stav, kdy je hladina glykemie vyšší než je normální hodnota, ale ještě nedosahuje hodnot diagnostických pro diabetes mellitus. Jedná se o hodnoty glykemie v rozmezí 5,6 - 6,9 mmol/l. Tyto hodnoty představují riziko vzniku jakéhokoli typu diabetu. (Škrha et al.2009) Jedná se o stav, který diabetu předchází a kromě rozvoje diabetu zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. U neléčených pacientů s prediabetem hrozí vznik nemoci do deseti let (www.szu.cz).

O porušené glukózové toleranci mluvíme tehdy, jestliže ve 120. minutě oGTT je hodnota glykemie v rozmezí 7,8 - 11,0 mmol/l (Karen, Svačina 2011).

2.1.6. Sledované parametry u diabetika

U pacienta s diabetes je důležité nejen stanovení hladiny glykémie a glykovaného hemoglobinu, ale i sledování dalších parametrů.

Pro včasné odhalení diabetického onemocnění ledvin se uplatňuje vyšetření albuminu v moči, které odhalí zvýšené vylučování proteinů ledvinami nezachycené kvalitativními metodami. Ke stanovení je doporučeno použít první ranní moč a počítat poměr albumin/ kreatinin, popřípadě protein / kreatinin (National Kidney Disease Education Program).

Při sledování stavu diabetika je dále vhodné alespoň jedenkrát ročně kontrolovat hladinu minerálů, kreatininu, kyseliny močové, TSH a lipidů v séru a chemické a morfologické vyšetření moče (Karen, Svačina 2011).

2.2 Glykovaný hemoglobin

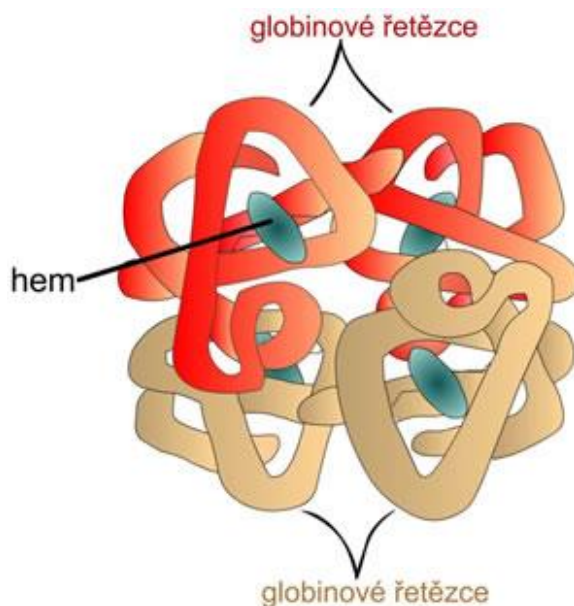
Ke sledování stavu diabetika můžeme mimo jiné použít stanovení glykovaného hemoglobinu. Glykovaný hemoglobin vzniká neenzymovou glykací hemoglobinu.

2.2.1 Hemoglobin

Hemoglobin je červené barvivo erytrocytu sloužící k transportu krevních plynů. Je tvořen dvěma páry globinových řetězců, čtyřmi cyklickými protoporfyriny IX a čtyřmi, centrálně uloženými atomy dvojmocného železa.

Protoporfyrin spolu s centrálně uloženým železem označujeme jako hem, globin tvoří většinou dva páry řetězců α a dva páry řetězců β (97%), jen zhruba 3% tvoří tetramer $\alpha_2\delta_2$ viz Obr. č. . Fetální hemoglobin je tvořen řetězci typu β a γ . Struktura hemoglobinu se během embryonálního, fetálního a postnatálního života mění. Embryonální a fetální hemoglobin mají vyšší afinitu ke kyslíku než hemoglobin u dospělých (Penka, Tesařová 2011).

Obrázek č. 1 Molekula hemoglobinu



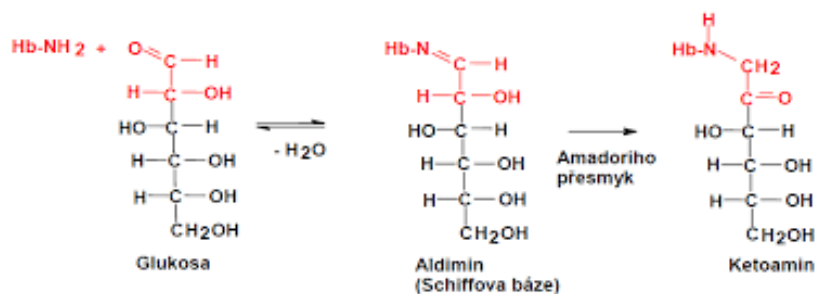
www.studiumbiochemie.cz

2.2.2 Glykace hemoglobinu

Glykací nazýváme proces, při kterém se aldehydická skupina glukózy naváže na volné aminoskupiny bílkovin. Tato reakce není katalyzována žádným enzymem, proto je označována jako neenzymatická. Rychlost reakce závisí na koncentraci glukózy, protože koncentrace bílkovin v krvi je téměř konstantní.

Glykace má dvě fáze. Nejprve dochází kondenzační reakcí ke vzniku Schiffovy báze. Tato reakce je z vratná a při poklesu přechodné hyperglykémie se glukóza z vazby uvolní. Je-li však hyperglykémie dlouhodobější, dochází k intramolekulárnímu přesmyku a vzniká tzv. Amadoriho produkt viz Obr.č. 2. Tento krok je již nezvratný a molekula glukózy zůstává na bílkovině po celou dobu její existence (Racek 2006).

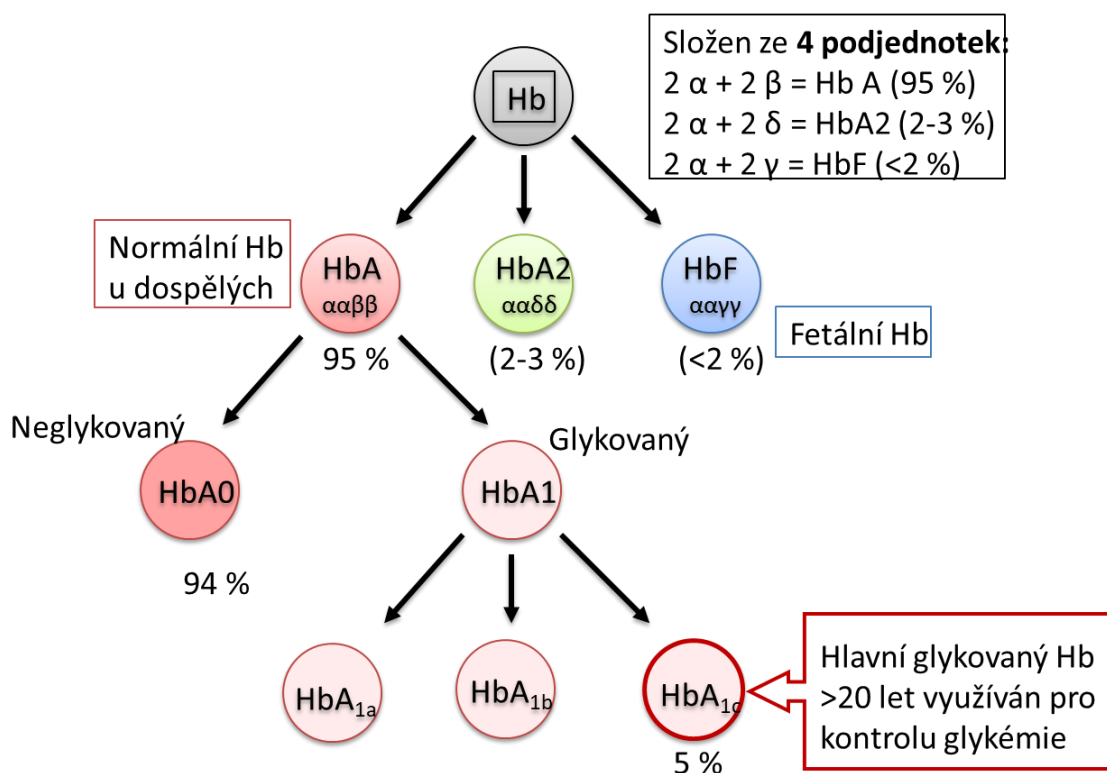
Obrázek č. 2 Glykace hemoglobinu



(www.is.muni.cz)

Glykaci podléhá rovněž hemoglobin v erytrocytu. Při glykaci vynikají tři deriváty, které označujeme jako HbA1a, HbA1b a HbA1c viz Obr. č.3 . Jako glykovaný hemoglobin stanovujeme frakci HbA1c, která představuje vlastní stabilní ketoamin (Racek 2006).

Obrázek č. 3 Typy hemoglobinů



(www.is.muni.cz)

2.2.3 Použití glykovaného hemoglobinu

Glykovaný hemoglobin HbA_{1c} udává dlouhodobý stav glykémie za období 8 až 12 týdnů v závislosti na době života erytrocytů. Průměrná doba života erytrocytu se uvádí 120 dnů (doporučení ČSKB 2019).

Stanovení glykovaného hemoglobinu se zatím nevyužívá k určení diagnózy diabetu mellitu, ale jeho koncentrace je vhodným nástrojem pro kontrolu kompenzace diabetu. Při náhodném nález vyšší hodnoty glykovaného hemoglobinu je nutné diagnózu diabetu potvrdit nebo vyloučit pomocí stanovení glykémie na lačno či provedením oGTT.

Koncentrace glykovaného hemoglobinu se udává v mmol/mol hemoglobinu. Starší literatura udává hodnoty koncentrace v % z celkového hemoglobinu (Racek 2006). Hodnoty v % byly v České republice používány do 31. 12. 2011. Pro přepočítání na jednotky mmol/mol se používá výpočet:

$$X \text{ (mmol/mol)} = 10 \times X \text{ (%) (doporučení ČSKB 2019)}$$

2.2.4 Stanovení glykovaného hemoglobinu

Glykovaný hemoglobin se stanovuje z plné krve s přidavkem K_3 EDTA (draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové). Stabilita odebraného materiálu je 2-3 dny při teplotě 18-26 °C, 5-7 dní při teplotě 2-8°C. Ke stanovení jsou k dispozici různé metody, které jsou založeny na rozdílných separačních principech nebo imunochemické metody. (Encyklopedie laboratorní medicíny).

2.2.4.1. Výhody stanovení

Při stanovení glykovaného hemoglobinu nemusí být pacient nalačno, odběr lze provést kdykoli během dne bez předešlé přípravy. Preanalytické podmínky pro stanovení jsou jednodušší než u stanovení glykémie, analyt je stabilní a výsledek není ovlivněn glykolýzou.

Zvýšená hodnota glykovaného hemoglobinu ukazuje na chronickou hyperglykémii, zatímco při zjištění hyperglykémie může jít jen o přechodný stav (Škrha et al. 2009).

2.2.4.2. Nevýhody stanovení

Nevýhody stanovení vycházejí ze změny délky života erytrocytu. Pacient, jehož průměrná doba života erytrocytu je kratší než uvedených 120 dní, bude mít i sníženou hodnotu glykovaného hemoglobinu a naopak.

Tyto změny jsou ukázány v následující tabulce č. 2.

Tabulka č.2 Změny hodnot HbA1c pro střední hodnotu HbA1c =53 mmol/mol při zvolené střední délce života erytrocytů 120 dnů

Střední doba života erytrocytů	110 dnů	120 dnů	130 dnů
Hodnota HbA1c	46 mmol/mol	53 mmol/mol	60 mmol/mol

(doporučení ČSKB 2019)

Hodnotu glykovaného hemoglobinu mohou ovlivňovat i skutečnosti nesouvisející s diabetem jako například hemoglobinopatie, těhotenství nebo hemolytická anemie (Škrha et al. 2009).

Mezi další faktory, které mohou ovlivnit hladinu glykovaného hemoglobinu, patří hyperbilirubinémie, hypertriacylglycorolémie, alkoholismus nebo užívání některých léků, jako jsou salicyláty nebo vitamín C (Goldstein et al. 2004).

Z hodnoty glykovaného hemoglobinu nelze zjistit přítomnost náhodných hyperglykemií nebo hypoglykemií. Velké kolísání mezi těmito hodnotami není pro diabetika optimální, ale glykovaný hemoglobin ukáže průměr těchto glykemií, který může být v pořádku (Lebl et al. 2016).

Frekvence stanovení glykovaného hemoglobinu záleží na typu diabetu, použité léčbě a aktuální kompenzaci. Doporučuje se stanovit glykovaný hemoglobin alespoň jednou ročně u všech pacientů s diagnózou *diabetes mellitus*. U pacientů léčených inzulínem je doporučeno vyšetřit glykovaný hemoglobin každé tři měsíce, u pacientů, kterým jsou podávána perorální antidiabetika jednou za 3-6 měsíců dle stavu pacienta (Hazulík 2009).

Tabulka č.3 Sledování stavu diabetika

HbA1c (mmol/l)	Interpretace
20 až 42	referenční interval (dospělí, negravidní)
43 až 53	kompenzovaný diabetes (dospělí, negravidní)
>53	dekompenzovaný diabetes, signál ke změně terapie a režimu
<59	kompenzovaný diabetes v dětském věku

(doporučení ČSKB 2019)

Údaje v literatuře, které se týkají rozhodovacích mezí, se často liší. Tyto rozdíly jsou závislé na zvolené metodě stanovení.

2.3 Metody stanovení glykovaného hemoglobinu

Glykovaný hemoglobin lze stanovit pomocí imunochemických metod, iontově-výměnné chromatografie, afinitní chromatografie, HPLC, elektroforézy nebo izoelektrické fokuse. K dispozici je více než 30 různých metod vhodných ke stanovení glykovaného hemoglobinu (Encyklopedie laboratorní medicíny).

2.3.1 Chromatografie

Chromatografie je separační analytická metoda poskytující kvalitativní i kvantitativní informaci o analytu. Využívá rozdělení látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Jedna je vždy pohyblivá (mobilní), druhá nepohyblivá (stacionární). Mobilní fází je pohybující se kapalina nebo plyn, stacionární fází je sorbent, pevná látka nebo kapalná látka fixovaná na povrchu pevné látky. Rozdělování může probíhat v separační koloně nebo na ploše-tenké vrstvě (Pertile E. 2017).

2.3.1.1. Rozdělení chromatografií

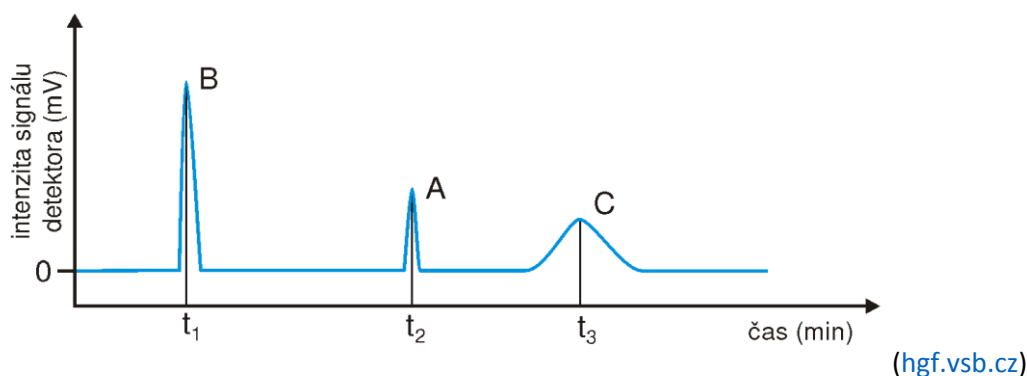
Chromatografie lze rozdělit podle typu mobilní fáze na plynovou nebo kapalinovou. Dalším kritériem pro rozdělení chromatografií je způsob provedení, buď na ploše, kam patří tenkovrstevná nebo papírová chromatografie, anebo chromatografie v koloně.

Chromatografie lze rozdělit i podle principu separace na rozdělovací, adsorpční, iontoměničovou, gelovou a afinitní.

2.3.1.2. Chromatogram

Výsledek analýzy je detektorem zaznamenán na chromatogramu v podobě píků. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, pak každý pík znázorňuje jednu složku směsi. Poloha píku na ose x určená pomocí retenčního času udává, o jakou látku se jedná. Pomocí plochy píku nebo jeho výšky určíme koncentraci analytu. Za ideální považujeme úzký a symetrický pík.

Obrázek č.4 Chromatogram



Základní pojmy používané v chromatografii:

- Retenční čas, je doba, která uběhne od nanesení vzorku na kolonu do průchodu stanovované látky detektorem
- Pík- grafický záznam detektoru při průchodu stanovované látky
- Výška píku- vzdálenost mezi základní linií chromatogramu a vrcholem píku
- Šířka píku- šířka píku u základní linie chromatogramu
- Plocha píku- plocha, kterou ohraničuje pík na chromatogramu, ideálním tvarem píku je Gaussova křivka
- Účinnost kolony- udává, jak kvalitně lze na koloně oddělit různé látky, matematicky se vyjadřuje počtem teoretických pater, což je bezrozměrná veličina, která říká, kolikrát je daný analyt na koloně rozdělen (Dastych 2014).

2.3.1.3. Detektory

Nejčastěji užívaným detektorem je spektrofotometr pro měření absorbance ve viditelné a ultrafialové oblasti. Podmínkou použití spektrofotometru je schopnost rozdělených analytů absorbovat světlo určité vlnové délky. Při plynové chromatografii se nejvíce používá plamenový ionizační detektor. Hmotnostní spektrometr identifikuje jednotlivé analyty na základě jejich molekulové hmotnosti (Dastych 2014).

2.3.1.4. Derivatizace

Některé analyty je nutné pro chromatografické stanovení upravit, je potřeba provést derivatizaci vzorku. Derivatizaci tvoří soubor reakcí, které vedou k tvorbě derivátů analytů, jenž mají vhodnější vlastnosti pro separaci nebo detekci. Tyto reakce mohou probíhat před nebo v průběhu separace či po ukončení separace před vstupem do detektoru (Cibíček, Vacek 2014).

2.3.2 HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) patří v klinických laboratořích k nejčastěji používané metodě. Jedná se o rychlou a přesnou metodu, která je v kombinaci s hmotnostním spektrofotometrem považována za referenční.

Mobilní fází u HPLC je kapalina. Pokud je po celou dobu dělení použita mobilní fáze konstantní, je eluce rozdělených látek označována jako izokratická. Mění-li se složení mobilní fáze během dělení, potom je tento způsob označován jako gradientový.

2.3.2.1. Konstrukce kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z vysokotlaké pumpy, injektoru, dělicí kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení (počítačová jednotka) viz obr. č. 5 .

Vysokotlaká pumpa musí zajistit konstantní průtok mobilní fáze kolonou bez kolísání tlaku a objemu mobilní fáze. Využívají se tlaky až 40 MPa. K zamezení kolísání tlaku při pohybu pístu je možno využít dvoupístové pumpy.

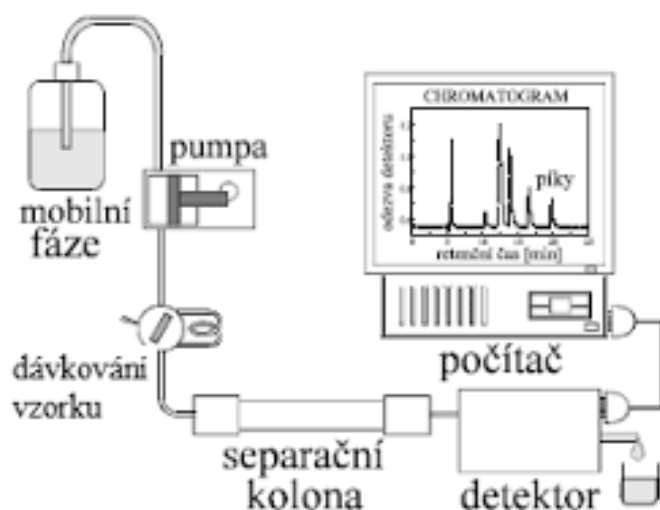
Kvůli vysokému tlaku v dělicím systému chromatografu se pro nástřík vzorku používá injektor, který lze mechanickým pootočením připojit nebo odpojit od dělicí kolony.

Dělicí kolona je nejdůležitější součástí kapalinového chromatografu. Délka kolony se pohybuje kolem 25 cm. Novější přístroje jsou vybaveny kolonami o délce 3-5 cm. Na kratších kolonách probíhá rozdělení rychleji (Dastych 2014).

Vnitřní povrch kolony musí odolávat chemickému působení pohyblivé fáze, aby nedošlo k ovlivnění výsledků analýzy. Komerčně dodávané kolony mají vnitřní průměr 2,1- 5 mm a jsou plněny částicemi o velikosti 1-10 μm (Nováková 2013).

Při kapalinové chromatografii lze využít všechny detektory popsané v kapitole 4.1.3. Výběr detektoru závisí na povaze stanovovaného analytu.

Obrázek č. 5 Schéma kapalinového chromatografu



(<https://chemistry.ujep.cz>)

2.3.2.2. Využití HPLC v medicíně

V klinických laboratořích patří chromatograf mezi časté vybavení. Kromě glykovaného hemoglobinu se chromatografie používá ke stanovení koncentrace katecholaminů, aminokyselin, steroidů a vitamínů. Chromatografii lze využít i ke stanovení hladin podávaných léků pro správné nastavení terapeutické dávky (Cibíček, Vacek 2014).

2.3.3 Ostatní metody pro stanovení HbA1c

2.3.3.1. Imunochemické metody

Imunochemické metody stanovují glykovaný hemoglobin pomocí monoklonálních nebo polyklonálních protilátek, které rozeznávají aminokyseliny na amino-konci β -řetězce nebo glukózový zbytek, případně obojí. Využívají se ovčí polyklonální protilátky. Vzniklý komplex je měřen pomocí imunoturbidimetrie, měříme změnu absorbance. Změna absorbance je přímo úměrná koncentraci glykovaného hemoglobinu ve vzorku (BioVendor).

2.3.3.2. Iontově-výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie využívá méně kladně nabitých frakcí glykovaného hemoglobinu při neutrálním pH. Tyto frakce mají slabší vazbu k negativně nabitě pryskyřici a jsou eluovány dříve. U nemocných s β -talasemií nelze tato metoda použít,

poskytuje falešně zvýšené výsledky. Ke stanovení je využita fotometrie. (Encyklopedie laboratorní medicíny)

2.3.3.3. Afinitní chromatografie

Při afinitní chromatografii se využívají kolony s kyselinou boronovou, na kterou se glykovaný hemoglobin váže. Nejprve dojde k eluci neglykovaného hemoglobinu, následně je glykovaný hemoglobin z boronátové vazby vytěsněn sorbitolem a posléze eluován. Jednotlivé frakce jsou detekovány fotometricky (Bulletin FONS.cz).

2.3.3.4. Elektroforéza

Elektroforetická separace glykovaného hemoglobinu se provádí na agaru. Je využita schopnost volných N-koncových skupin neglykovaného hemoglobinu reagovat s nabitými skupinami v agaru nebo pufru. V kyselém prostředí neglykovaný hemoglobin putuje k anodě, většina glykovaných hemoglobinů ke katodě a frakce HbA1c zůstává v místě aplikace. Jednotlivé frakce se vyhodnocují denzitometricky.

2.3.3.5. Izoelektrická fokusace

Jednotlivé frakce hemoglobinu jsou při izoelektrické fokusaci separovány na základě jejich rozdílné migrace v polyakrylamidovém gelu s gradientem pH 6-8. K detekci je využit denzitometr (Encyklopedie laboratorní medicíny).

2.4 Vlastnosti analytické metody

Pro použití metody v klinické laboratoři je potřeba splnit několik parametrů. Tyto parametry jsou denně sledovány pomocí interní kontroly kvality a čtvrtletně v rámci externí kontroly kvality.

Metody pro stanovení glykovaného hemoglobinu musí splňovat požadavky uvedené v následující tabulce.

Tabulka č. 4 Požadavky na analytickou kvalitu měření

Mezilehlá preciznost	Pravdivost (bias)	Celková chyba
CV < 3 %	b < 2,0 %	TE ≤ 5 mmol/mol

(doporučení ČSKB 2019)

2.4.1 Preciznost

Jednou z nejdůležitějších vlastností analytické metody je preciznost. Určuje těsnost shody mezi nezávislými výsledky analýz získaných za předem určených podmínek. Pokud je metoda precizní, potom výsledky opakovaných analýz nejsou významně rozdílné. Těsnost shody nezávislých výsledků ovlivňují náhodné chyby, které nelze zcela vyloučit. Náhodné chyby odchylojí výsledek od skutečné hodnoty nepravidelně k nižším i vyšším hodnotám (Mezinárodní metrologický slovník).

Míra preciznosti se vypočítává jako směrodatná odchylka opakovaných výsledků analýzy. Čím je preciznost menší, tím větší je směrodatná odchylka. Často se preciznost vyjadřuje termínem variační koeficient, který se vypočítává jako poměr směrodatné odchylky a průměru výsledků opakovaných analýz.

Pokud analýzu opakujeme za stejných analytických podmínek ve stejný čas, stejnou osobou na téže analyzátoru v sérii, mluvíme o opakovatelnosti metody. Jestliže však opakování provádíme mezi dny po sobě jedenkrát denně za stejných podmínek, používáme termín reprodukovatelnost metody (www.sekk.cz).

Mezilehlá preciznost (CV) je opakovatelnost ve stejné laboratoři, v širším časovém úseku, kdy došlo ke změně kalibrace, šarže reagenční soupravy nebo změně obsluhy (Hercová 2012).

Pro výpočet mezilehlé preciznosti používáme vzorec:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

kde s je směrodatná odchylka, \bar{x} je aritmetický průměr

Výpočet pro směrodatnou odchylku:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

kde n je počet měření vzorků, x_i je i -té měření (výsledek), \bar{x} je aritmetický průměr

2.4.2 *Pravdivost*

Pravdivost ukazuje, jak úzce se shoduje průměr změřených koncentrací analytu při opakovaných měřeních se skutečnou hodnotou koncentrace analytu ve vzorku. Pravdivost kvantitativně vyjadřujeme jako velikost odchylky – bias, kterou počítáme podle vzorečku:

$$\text{bias (\%)} = \frac{\bar{x} - x_0}{x_0} * 100$$

x_0 ve vzorečku představuje dohodnutou referenční hodnotu

Pravdivost metody vymezují systematické chyby, které vychylují výsledek vždy jedním směrem (Racek 2006).

2.4.3 *Přesnost*

Metoda nemůže být jen precizní nebo pravdivá, musí platit obojí současně. Přesností tedy rozumíme kombinaci preciznosti a pravdivosti. Matematicky je přesnost vyjádřena jako celková chyba měření TE (total error), která je rovna součtu náhodné a systematické chyby měření (Westgard, J. O., Westgard, S. A.).

$$\text{TE} = 1,96 \cdot s + \text{bias}$$

2.4.4 *Validace a verifikace*

Validací se rozumí proces, při kterém se získávají nezaujaté důkazy, že metoda, postup nebo přístroj mají takové vlastnosti, které jsou pro zamýšlené použití vyžadovány. Klinická laboratoř nesmí používat metody, které by nebyly validované. Pro certifikované metody validaci zajišťuje výrobce.

Pojem verifikace se používá pro ověření, zda validační údaje výrobce jsou totožné i ve specifických podmínkách konkrétní laboratoře (Racek 2006).

2.4.5 *Interní kontrola kvality*

Interní kontrola kvality patří mezi nástroje k zajištění bezpečí pacientů. Díky kontrole kvality v laboratoři je zajištěno vydání validního výsledku, který je použitelný při

diagnostickém a terapeutickém rozhodovacím procesu. Cílem kontroly kvality je určit a minimalizovat analytické chyby.

Interní kontrola kvality se v klinických laboratořích provádí denně analýzou obvykle dvou kontrolních vzorků o rozdílných koncentracích analytu. Koncentrace kontrolních materiálů by se měly blížit klinicky rozhodovacím hladinám. Na základě výsledků kontrol se laboratoř rozhoduje, zda je metodu možné použít na měření patientských vzorků. Jestliže výsledky interní kontroly nejsou uspokojivé, musí dojít k nápravě – např. kontrola reagensů, nová kalibrace metody a opakování měření kontrolních vzorků (Encyklopedie laboratorní medicíny).

2.4.6 Externí kontrola kvality

Externí hodnocení kvality EHK je periodická kontrola kvality probíhající zpravidla čtvrtletně na základě mezilaboratorního srovnání. Po úspěšném absolvování EHK dostane laboratoř certifikát platný jeden rok, kterým se uděluje osvědčení pro srovnatelnost výsledků ve skupině nebo návaznost výsledků na vztažnou hodnotu referenčního materiálu u prováděné metody. Pro akreditované laboratoře je účast v systému EHK povinná (www.sekk).

EHK je součástí činností zajištění kvality v biochemických laboratořích je organizováno a zhodnocováno poskytovateli EHK, v tomto případě firma SEKK spol s r.o. Pardubice. Firma SEKK v rámci provádění mezilaboratorní kontroly rozesílá účastníkům kontrolní vzorky, které následně vyhodnocuje podle předem daných kritérií a zasílá účastníkům certifikáty a osvědčení o účasti v jednotlivých cyklech. Každý cyklus má stop termín pro odevzdání výsledků. Pokud účastník do tohoto termínu neodešle požadované naměřené hodnoty, nebude zahrnut do mezilaboratorního srovnání a neobdrží certifikáty.

3. Cíle práce

Při zpracování mé bakalářské práce jsem si stanovila několik cílů a k tomu odpovídající hypotézy.

Cíl 1: Sledování interní kontroly kvality v období listopad 2019 – březen 2020 a statistické zpracování naměřených dat.

Hypotéza 1 : Sledované analytické znaky metody odpovídají požadavkům uváděným v Doporučení ČSKB.

Cíl 2: Verifikace metody na dvou přístrojích D - 10 a vypracování verifikačních protokolů, posouzení analytických vlastností metody z hlediska použití dané metody v laboratoři

Hypotéza 2 : Metoda je vhodná ke klinickému použití.

Cíl 3 : Účast v cyklu EHK, měření kontrolního materiálu.

Hypotéza 3 : Získání certifikátu platného 1 rok, 100 % úspěšnost v cyklu EHK.

Cíl 4 : Srovnání obou přístrojů na 50 laboratorních vzorcích, porovnání patientských vzorků metodou lineární regrese.

Hypotéza 4 : Mezi přístroji se nebudou na měřených vzorcích vyskytovat statisticky významné rozdíly.

4. Metodika

Všechna měření byla prováděna na přístroji D-10 firmy Bio-Rad na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Příbram a.s.. Měření byla prováděna v období listopad 2019 až březen 2020, bylo porovnáno 50 patientských vzorků na dvou přístrojích D-10.

Obrázek č.6 Analyzátor D-10 firmy Bio-Rad



(uživatelský manuál D-10)

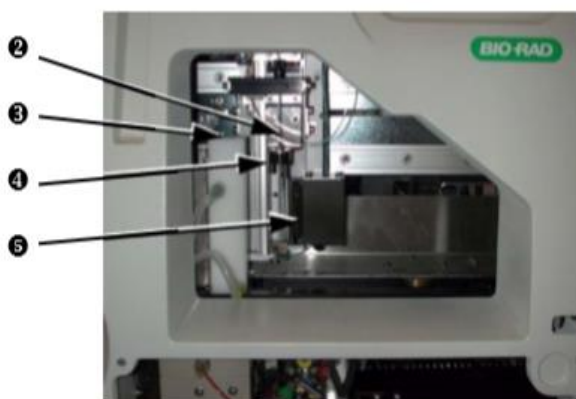
Jedná se o plně automatizovaný analyzátor, který se skládá z jednoho modulu a zajišťuje přípravu vzorků, jejich separaci i detekci jednotlivých frakcí. Analyzátor pracuje na principu HPLC.

K separaci vzorku dochází v iontoměničové koloně díky interakci iontů mezi vzorkem a kolonou, mobilní fáze je pufr s rostoucím gradientem iontové síly. Detekce je prováděna fotometricky, změna absorbance je měřena při 415 nm.

4.1 Popis přístroje

Obrázek č.7 Část pro zpracování vzorků

(uživatelský manuál D-10)



V této části přístroje se nachází pipetovací jehla obr.č.7 (č.2), která po propíchnutí primární zkumavky nasaje vzorek a přenes ho do jamky na vzorky obr.č.7 (č.3), kde dojde k ředění vzorků. Pro zabránění kontaminace vzorků je pipetovací jehla i jamka mezi jednotlivými vzorky oplachována. Držák na zkumavky obr.č.7 (č.4) přidržuje primární zkumavku při propíchování jehlou. V této části analyzátoru se nachází i čtečka čárových kódů obr.č.7 (č.5), sloužící pro identifikaci vzorků.

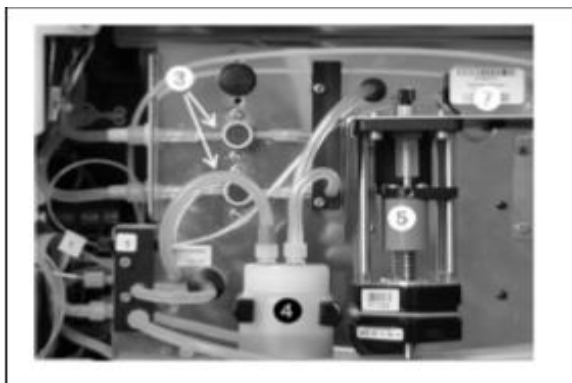
Obrázek č. 8 Část pro analýzu vzorků



(uživatelský manuál D-10)

Další částí přístroje je dvoupístové vysokotlaké čerpadlo obr.č.8 (č.2). Vstříkovací ventil obr.č.8 (č.3) řídí nasátí a vzorku a jeho přenos do analytické cesty přístroje. Vstříkovací ventil je propojen s třicestným ventilem, smyčkou vzorku, pipetovací jehlou, proplachováním pístu a tlakovým senzorem obr.č.8 (č.4), který monitoruje tlak v analyzátoru. Proporcionální ventil obr.č.8 (č.5) reguluje binární gradient. Ohřívač kolony obr.č.8 (č.6) zajišťuje konstantní teplotu během analýzy vzorku. V této části analyzátoru se nachází i detektor pro měření absorpance, který však na obrázku není zobrazen.

Obrázek č.9 Boční část analyzátoru



(uživatelský manuál D-10)

Zde se nacházejí ventily obr.č.9 (č.3) regulující vakuum v jamce na vzorky a promývací stanici. Vnitřní odpadní láhev obr.č.9 (č.4) zajišťuje sběr roztoků z jamky na vzorky a promývací stanice. Stříkačka obr.č.9(č.5) se využívá pro nasátí potřebného množství vzorku a ředícího roztoku. Dalším využitím stříkačky je odměření a dopravení promývacího i ředícího roztoku do pipetovací jehly a jamky a poté k následnému proplachování čerpadla. K odstranění rozpuštěných plynů v elučních roztocích slouží odvodušňovač, který na snímku není zobrazen. Třícestný ventil obr.č.9 (č.7) je propojen se stříkačkou tak, aby nasávala promývací a ředící roztok nebo plnila jamku na vzorky (uživatelský manuál D-10).

4.2 Pracovní postup

K vyšetření používáme vzorky plné krve odebrané do zkumavky s protisrážlivým činidlem, v našem případě K_3EDTA . Lze využít i kapilární odběr, oba materiály jsou rovnocenné. Při kapilárním odběru se odebírá krev do skleněné kapiláry o objemu 5 μ l a ihned po odběru je kapilára vložena do mikrozukavky s 1500 μ l ředícího roztoku. Mikrozukavka s kapilárou musí být důkladně promíchána, aby došlo k uvolnění krve z kapiláry a nedošlo k tvorbě sraženiny.

Vzorky jsou do analyzátoru vkládány v zásobníku na vzorky. Na jedno spuštění analyzátoru je možno zpracovat jeden zásobník, který obsahuje maximálně 10 vzorků.

Pokud je vzorek nabrán do mikrozkušavky, je potřeba ji do zásobníku vložit v adaptéru s magnetem. Vzorky plné krve jsou ředěny ve dvou krocích, u mikrozkušavek v adaptéru je první krok vynechán.

Před začátkem měření patientských vzorků je nutné nejprve zkontrolovat množství reagensů a změřit hladinu kontrolního vzorku. Pokud je hodnota kontroly mimo stanovené rozmezí je potřeba analyzátor překalibrovat a znovu provést měření kontrolního vzorku. Přístroj kalibrujeme vždy při každé výměně reagenční soupravy.

Všechny vzorky jsou opatřeny štítkem s čárovým kódem, pod kterým je vzorek analyzován a výsledek je automaticky přeposlán do LISu. Pokud vzorek čárový kód nemá, je možné tento vzorek do analyzátoru zadat manuálně před začátkem analýzy. Tento výsledek však musí být ručně přepsán i do LISu.

Po vložení každého zásobníku se vzorky do přístroje si nejprve analyzátor připraví pH gradient pufru potřebný pro analýzu vzorků. Tento proces trvá 3 minuty. Poté je zahájena vlastní analýza vzorků.

Zásobník se vzorky se vloží do analyzátoru skrze dvířka zásobníku a po načtení vzorků se spustí test pomocí START. Po ukončení analýzy se výsledky vytisknou a archivují v softwaru přístroje. Odeslání výsledků do LISu probíhá automaticky, kde podléhají lékařské kontrole.

Po načtení vzorku pipetovací jehla propíchně víčko primární zkumavky, nasaje vzorek a přenesení jej do jamky, kde je vzorek zředěn. Poté pipetovací jehla nasaje část ředěného vzorku, zbytek je z jamky odsát. Následně je nasátý vzorek vrácen do prázdné jamky a probíhá druhé ředění. Část dvakrát ředěného vzorku je opět nasáta jehlou a vstříknuta do proudu promývacího roztoku. Tato směs protéká kolonou, kde je vzorek rozdělen na jednotlivé frakce. Rozdělené frakce procházejí detektorem, kde je měřena změna absorbance při 415 nm. Nakonec je celý systém propláchnut promývacím roztokem, aby nedošlo ke kontaminaci následného vzorku.

Analýza zásobníku plně obsazeného vzorky (10) i s vytvořením gradientu trvá 33 minut. Poté je zásobník z analyzátoru vyjmut a celý proces se může opakovat s další sérií patientských vzorků. (uživatelský manuál D-10)

4.2.1 Složení reagenční soupravy

Souprava D-10 Hemoglobin A1c kat.č. 220-0101 firmy Bio-Rad obsahuje:

- Buffer 1- eluční pufr 1 – kat.č. 220-0110 – bis-tris fosfátový pufr pH 6,0
- Buffer 2- eluční pufr 2 – kat.č. 220-0111 – bis-tris fosfátový pufr pH 6,7
- Wash solution – promývací / ředící roztok – kat.č. 220-0112 – deionizovaná voda
- Souprava kalibrátor / diluent – kat.č. 220-0118
- Primer (hemolyzát) – kat.č. 220-0148

Mezi spotřební materiál dodávaný výrobcem v reagenčním setu patří:

- Chromatografická kolona (katexová) – kat.č. 220-0113
- Disketa s parametry programu D-10 HbA1c – kat.č. 220-0115
- Mikrozkušavky – kat.č. 220-0149
- Adaptér na zkumavky – kat. 220-0297
- Termopapír

(SLP, SOPT-OKB-06)

4.3 Kalibrace přístroje

Kalibrace se provádí vždy při výměně kolony nebo pokud jsou výsledky kontroly mimo povolené rozmezí. Kalibrátory hemoglobinu v soupravě jsou navázány na sadu kalibrátorů Kyoto 2002, připravenou pracovní skupinou IFCC pro standardizaci HbA1c.

Stanovení glykovaného hemoglobinu na přístroji D – 10 firmy Bio-Rad je certifikováno dle NGSP a má návaznost na IFCC referenční metodu.

Kalibrátory jsou dodávané lyofilizované a obsahují hemolyzát lidských erytrocytů s gentamicinem, tobramycinem a EDTA jako konzervanty. Před použitím je nutné kalibrátory naředit diluentem obsahujícím deionizovanou vodu s obsahem méně než 0,05 % azidu sodného s pH 7,0.

Pro každou kalibraci jsou určeny dva kalibrátory CAL 1 a CAL 2, které je potřeba připravit k použití dle návodu výrobce. Kalibrátory jsou dodávány výrobcem lyofilizované. Kalibrátory naředíme pomocí skleněné pipety 7 ml diluentu (je součástí

kalibrační soupravy) a necháme rozpouštět 5–10 minut, poté je několikrát promícháme. Takto připravený kalibrátor je nachystán k použití. Rekonstituovaný kalibrátor je stabilní 7 dní při 2–8°C. Přidělené hodnoty IFCC jsou součástí každého setu a je nutné je zadat do analyzátoru.

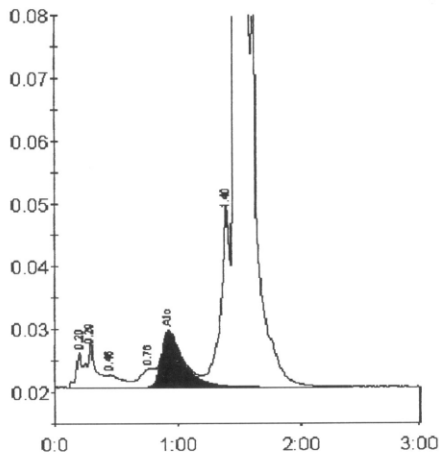
Kalibrátory CAL 1 a CAL 2 napipetujeme do mikrozkušavek označených čárovým kódem a v adaptéru s magnetem vložíme na první dvě pozice zásobníku. Na další pozice umístíme kontroly. Vložíme zásobník do analyzátoru a spustíme kalibraci. Po ukončení kalibrace je nutné zkontrolovat její průběh a správnost výsledků kontrol.

Pro svou kalibraci jsem použila CAL 1 šarže AA90242 o hodnotě 36 mmol/mol a CAL 2 šarže AA90243 o hodnotě 88 mmol/mol a její průběh je zaznamenán na následujícím obrázku.

Obrázek č. 10 Průběh kalibrace

Calibration report

Bio-Rad DATE: 05/20/2020
 D-10 TIME: 10:05 AM
 SN: #DC2F728007 Software version: 4.30-2
 Calibrator ID: AA90242
 Injection date 03/04/2020 02:38 PM
 Injection #: 2 Method: HbA1c
 Rack #: — Rack position: 1



Kuniková Martina

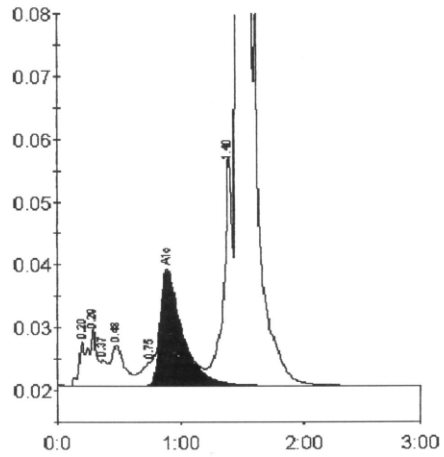
Peak table - ID: CAL1

Peak	R.time	Height	Area	Area %
A1a	0.20	5544	18273	0.6
A1b	0.29	7429	36964	1.3
F	0.46	2030	17737	0.6
LA1c/CHb-2	0.76	2990	23795	0.8
A1c	0.93	8777	110844	5.4
P3	1.40	28969	150770	5.3
A0	1.47	608954	2467401	87.3
Total Area:		2825783		

Concentration:	%	mmol/mol
A1c	5.4	36

Calibration report

Bio-Rad DATE: 05/20/2020
 D-10 TIME: 10:05 AM
 SN: #DC2F728007 Software version: 4.30-2
 Calibrator ID: AA90243
 Injection date 03/04/2020 02:41 PM
 Injection #: 3 Method: HbA1c
 Rack #: — Rack position: 2



Peak table - ID: CAL2

Peak	R.time	Height	Area	Area %
A1a	0.20	7037	21595	0.8
A1b	0.29	9311	43412	1.6
Unknown	0.37	4028	15019	0.5
F	0.48	6431	47484	1.7
LA1c/CHb-2	0.75	3753	28376	1.0
A1c	0.90	18217	225651	10.2
P3	1.40	36617	181445	6.5
A0	1.47	550286	2225813	79.8
Total Area:		2788795		

Concentration:	%	mmol/mol
A1c	10.2	88

Calibration	Passed	New	New
Analysis	Old	Slope	Intercept
A1c	1.09	1.09	1.12 0.98

(zdroj vlastní)

4.4 Kontrola kvality

Ke kontrole kvality jsou používány kontrolní vzorky firmy Bio-Rad Lyphocheck Diabetes 1 a 2. Kontrolní vzorek 1 má normální hodnotu hladiny HbA1c, v kontrolním vzorku 2 je hodnota HbA1c patologická.

Kontrola kvality se provádí denně alespoň na jedné hladině a po každé kalibraci přístroje se měří obě hladiny kontroly. Výsledky kontrol se zapisují do LISu, kde jsou dlouhodobě sledovány a hodnoceny.

Pokud by výsledek kontrolního vzorku byl mimo povolené rozmezí, je potřeba provést novou kalibraci a poté opakovat měření kontrolního vzorku.

Stabilita kontrol je do data expirace, po rekonstituci maximálně 7 dní při 2 – 8°C.

Průběh analýzy kontrolních vzorků po předešlé kalibraci je znázorněn na dalším obrázku. K měření byly použity kontroly Lyphocheck Diabetes 1 šarže 33971 s atestem 35 mmol/mol a Lyphocheck Diabetes 2 šarže 33972 s atestem 86 mmol/mol.

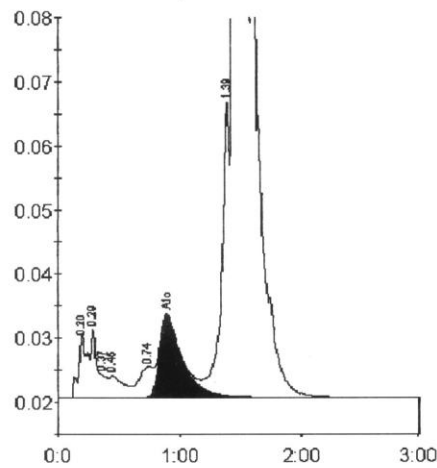
Tyto kontroly jsem měřila denně v rozmezí listopad 2019 až březen 2020 na dvou přístrojích D-10. Tato data jsem vyhodnotila a použila pro zpracování verifikačních protokolů pro oba přístroje. První přístroj (pracovně nový) má výrobní číslo DB/B108218, druhý (pracovně starý) DC2F728007.

Rozdíly v počtu kontrol jsou způsobeny střídáním analyzátorů, oba analyzátory jsou v provozu zároveň při větším objemu patientských vzorků.

Obrázek č. 11 Analýza kontrolního vzorku 1 a 2

Patient report

Bio-Rad DATE: 05/20/2020
 D-10 TIME: 10:05 AM
 SN: #DC2F728007 Software version: 4.30-2
 Sample ID: CTRL
 Injection date 03/04/2020 02:44 PM
 Injection #: 4 Method: HbA1c
 Rack #: — Rack position: 3



Peak table - ID: CTRL

Peak	R.time	Height	Area	Area %
A1a	0.20	9993	49709	1.1
A1b	0.29	10768	32420	0.7
Unknown	0.37	3466	13087	0.3
F	0.45	3353	26444	0.6
LA1c/CHb-2	0.74	4804	38285	0.8
A1c	0.90	12649	162549	5.4
P3	1.39	46033	210761	4.7
A0	1.46	841416	3504715	77.7
D,S-window	1.61	111152	473745	10.5
Total Area:				4511714

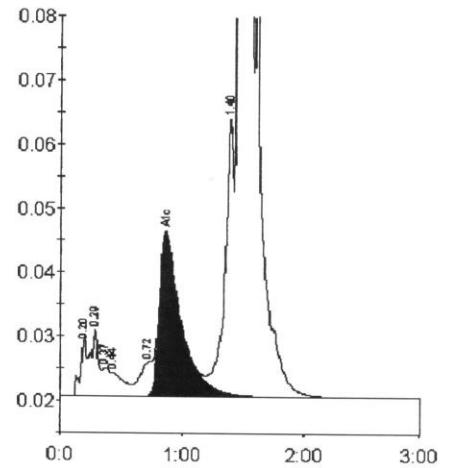
Concentration:	%	mmol/mol
A1c	5.4	36

Kuniková Martina

PRINTED IN

Patient report

Bio-Rad DATE: 05/20/2020
 D-10 TIME: 10:05 AM
 SN: #DC2F728007 Software version: 4.30-2
 Sample ID: CTRH
 Injection date 03/04/2020 02:47 PM
 Injection #: 5 Method: HbA1c
 Rack #: — Rack position: 4



Peak table - ID: CTRH

Peak	R.time	Height	Area	Area %
A1a	0.20	9165	30807	0.8
A1b	0.29	10309	45688	1.2
Unknown	0.37	4398	18477	0.5
F	0.44	3531	27420	0.7
LA1c/CHb-2	0.72	5410	39359	1.0
A1c	0.87	25396	314418	9.8
P3	1.40	43679	219501	5.7
A0	1.47	765291	3178042	82.0
Total Area:				3873712

Concentration:	%	mmol/mol
A1c	9.8	84

PRINTED IN USA

(zdroj vlastní)

Tabulka č. 5 Přehled naměřených kontrol

(zdroj vlastní)

Přehled naměřených kontrol HBA1c 1.11.2019 - 31.3.2020							
D-10 DB/B108218				D-10 DC2F728007			
Název QC	HBA1c 1 no	Název QC	HBA1c 2 no	Název QC	HBA1C 1 st	Název QC	HBA1C 2 st
Šarže	33971	Šarže	33972	Šarže	33971	Šarže	33972
Atest (mmol/mol)	35	Atest (mmol/mol)	86	Atest (mmol/mol)	35	Atest (mmol/mol)	86
Atest (vyp)	36	Atest (vyp)	86	Atest (vyp)	36	Atest (vyp)	85
s (mmol/mol)	3	s (mmol/mol)	6	s (mmol/mol)	3	s (mmol/mol)	6
s (vyp)	1	s (vyp)	2	s (vyp)	1	s (vyp)	2
	Hodnota (mmol/mol)		Hodnota (mmol/mol)		Hodnota (mmol/mol)		Hodnota (mmol/mol)
05.11.2019	35	04.11.2019	82	01.11.2019	37	04.11.2019	83
11.11.2019	35	06.11.2019	81	04.11.2019	35	06.11.2019	82
19.11.2019	37	12.11.2019	83	07.11.2019	36	18.11.2019	82
21.11.2019	38	15.11.2019	82	14.11.2019	35	20.11.2019	84
05.12.2019	38	18.11.2019	83	19.11.2019	34	02.12.2019	85
11.12.2019	38	19.11.2019	85	22.11.2019	36	04.12.2019	86
18.12.2019	36	25.11.2019	88	26.11.2019	36	06.12.2019	86
20.12.2019	37	28.11.2019	86	09.12.2019	38	10.12.2019	87
03.01.2020	36	29.11.2019	86	11.12.2019	36	11.12.2019	83
09.01.2020	37	04.12.2019	86	18.12.2019	36	17.12.2019	83
15.01.2020	38	13.12.2019	89	23.12.2019	36	31.12.2019	83
17.01.2020	35	17.12.2019	89	30.12.2019	37	08.01.2020	84
23.01.2020	37	18.12.2019	82	07.01.2020	36	13.01.2020	85
27.01.2020	37	19.12.2019	85	10.01.2020	37	20.01.2020	85
30.01.2020	37	27.12.2019	83	14.01.2020	36	22.01.2020	86
31.01.2020	37	02.01.2020	82	15.01.2020	38	23.01.2020	81
05.02.2020	35	06.01.2020	83	21.01.2020	39	24.01.2020	82
19.02.2020	38	08.01.2020	83	23.01.2020	36	29.01.2020	83
24.02.2020	38	16.01.2020	83	03.02.2020	36	12.02.2020	84
25.02.2020	38	22.01.2020	83	05.02.2020	37	25.02.2020	85
04.03.2020	37	23.01.2020	84	06.02.2020	37	26.02.2020	86
05.03.2020	37	28.01.2020	82	11.02.2020	36	28.02.2020	86
19.03.2020	37	29.01.2020	84	11.02.2020	36	02.03.2020	85
23.03.2020	37	04.02.2020	84	14.02.2020	36	03.03.2020	85
24.03.2020	37	07.02.2020	82	19.02.2020	36	04.03.2020	84
26.03.2020	37	10.02.2020	85	20.02.2020	36	20.03.2020	86
		12.02.2020	84	27.02.2020	38	31.03.2020	82
		14.02.2020	85	04.03.2020	36		
		17.02.2020	86	09.03.2020	37		
		18.02.2020	86	11.03.2020	37		
		20.02.2020	85	13.03.2020	37		
		21.02.2020	86	17.03.2020	38		
		25.02.2020	83	30.03.2020	36		
		26.02.2020	83				
		03.03.2020	83				
		06.03.2020	84				
		10.03.2020	84				
		12.03.2020	83				
		16.03.2020	84				
		18.03.2020	84				
		25.03.2020	84				

Tabulka č.6 Výpočty z hodnot uvedených v tab.č.5

D-10 DB/B108218				D-10 DC2F728007			
Název QC	HBA1c 1 no	Název QC	HBA1c 2 no	Název QC	HBA1C 1 st	Název QC	HBA1C 2 st
průměr (mmol/mol)	36,885	průměr (mmol/mol)	84,122	průměr (mmol/mol)	36,455	průměr (mmol/mol)	84,185
s (mmol/mol)	0,993	s (mmol/mol)	1,86	s (mmol/mol)	1,003	s (mmol/mol)	1,618
CV (%)	2,7	CV (%)	2,2	CV (%)	2,8	CV (%)	1,9

s směrodatná odchylka (mmol/mol)

CV variační koeficient (%)

Tabulka č.7 Statistika kontrol , LIS

Statistika kontrol 1.11.2019 - 31.3.2020 LIS											
Č.m.	mat.	Kontrola	Šarže kontr.	Atest kontr. (mmol/mol)	s (mmol/mol)	Dmax SEKK (%)	N	Vyp. Prům. (mmol/mol)	s (mmol/mol)	CV (%)	TEa (%)
165	B	HBA1c 1 no	33971	35	3	12	26	36,885	0,993	2,69	10,77
165	B	HBA1C 1 st	33971	35	3	12	33	36,455	1,003	2,75	9,66
165	B	HBA1c 2 no	33972	86	6	12	41	84,122	1,860	2,21	6,61
165	B	HBA1C 2 st	33972	86	6	12	27	84,185	1,618	1,92	5,95

s směrodatná odchylka (mmol/mol)

CV variační koeficient (%)

Dmax povolená chyba uváděná v SEKK (%)

N počet měření

TEa celková analytická chyba, total error (%)

4.5 Verifikační protokol

Verifikační protokol je v klinické laboratoři důležitým dokumentem, který dokládá platnost údajů poskytnutých výrobcem ve specifických podmínkách konkrétní laboratoře. Platnost protokolu je jeden rok. Z výsledků svých měření jsem vypracovala

verifikační protokoly pro oba používané přístroje. Pro verifikaci jsem použila vzorový verifikační protokol ze SLP (SEKK) viz Obr.č.13 a č.14.

V první části verifikačního protokolu je zhodnocena mezilehlá preciznost. Na tento výpočet byly použity hodnoty kontrolních vzorků měřených na obou hladinách na dvou přístrojích D-10 v období 1.11.2019 – 31.3.2020 uvedených v tabulce č. 5 .

Na přístroji D-10 DC2F728007 (starý) bylo za uvedené období změřeno 33 kontrolních vzorků HBA1c 1 a 27 kontrolních vzorků HBA 1c 2.

Na přístroji D-10 DB/B108218 (nový) bylo za stejné období změřeno 26 kontrolních vzorků HBA1c 1 a 41 kontrolních vzorků HBA1c 2.

Z těchto hodnot byl vypočítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka a mezilehlá preciznost. Všechny tyto údaje jsou zaznamenány v tabulce č.6 . Výsledek mezilehlé preciznosti nepřekročil ani v jednom případě doporučenou hodnotu $CV < 3 \%$ určenou v Doporučení ČSKB.

Druhá část protokolu je věnována opakovatelnosti.

Pro výpočet opakovatelnosti a následně pro výpočet bias byly použity certifikované referenční materiály firmy SEKK, vzorek A = SEKK KD 5184 a vzorek B = SEKK KD 5185. Každý vzorek byl na obou přístrojích změřen desetkrát v sérii a vypočítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient a bias. Změřená data jsou součástí verifikačního protokolu.

Pro výpočet bias je potřeba znát hodnotu referenčního materiálu, která je uvedena v dodaném Validačním protokolu pro vzorky použité v cyklu EHK Glykovaný hemoglobin 5184-revize 1 a Glykovaný hemoglobin 5185-revize 1., viz příloha č. a č. :

Tabulka č. 8 Atesty referenčních materiálů Glykovaný hemoglobin 5184 a 5185, viz příloha č. a č.:

	Vzorek A 5184	Vzorek B 5185
Atest Hba1c (mmol/mol)	44,2	58
Nejistota referenčního materiálu U_{ref} (%)	0,792	0,689

Atest hodnoty referenčního materiálu je ve verifikačním protokolu uveden jako cílová hodnota referenčního materiálu.

Výsledek bias splňuje ve všech případech doporučenou hodnotu ČSKB B < 2% viz tab.č. 9.

Tabulka č. 9 Vypočítané hodnoty bias pro HbA1c (verifikační protokol)

	Vzorek A 5184	Vzorek B 5185
Přístroj D-10 DC2F728007 st	B = 0,452 %	B = - 1,724 %
Přístroj D-10 DB/B108218 no	B = - 0,904 %	B = - 1,896 %

(zdroj vlastní)

Třetí část protokolu se zabývá pojmem kombinovaná nejistota. Nejistota je údaj, který charakterizuje rozmezí, v němž se výsledek měření s danou pravděpodobností nachází. Rozsah nejistoty je zjištěn experimentálně.

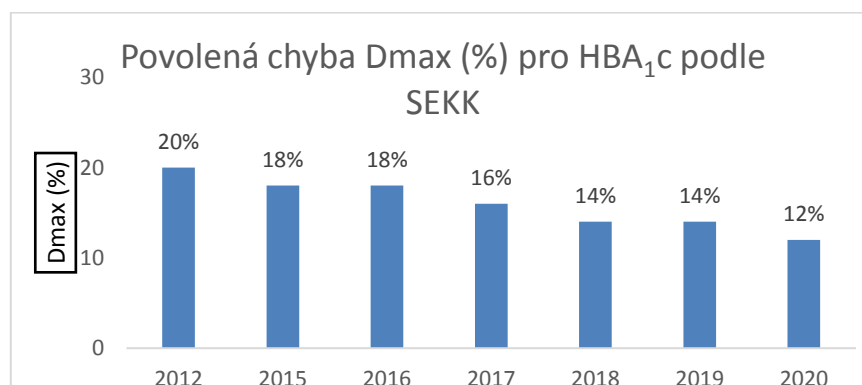
Kombinovaná nejistota zahrnuje všechny dílčí nejistoty a počítá se podle vzorce:

$$U_{r,cel} = \sqrt{CV_A^2 + B^2 + U_{ref}^2 + U_{pr}^2}$$

kde CV_A je mezilehlá preciznost kontrolního vzorku, B je bias, U_{ref} nejistota referenčního materiálu a U_{pr} nejistota průměru referenčního materiálu.

Hodnota kombinované nejistoty nesmí přesáhnout hodnotu cílové nejistoty uváděnou v SEKK , pro rok 2020 $D_{max} < 12\%$. Tato hodnota od roku 2012 neustále klesá. Tento trend je ukázán v následujícím grafu.

Obrázek č. 12 Hodnota cílové nejistoty pro HbA1c podle SEKK



(www.sekk)

Kritická diference (CD %) je rozdíl mezi dvěma po sobě jdoucími měřeními u pacienta, který je z klinického hlediska významný. Překročení kritické diference vyžaduje zásah lékaře např. změnu léčebného plánu. Tato hodnota by neměla být překročena ani v případě, kdy tentýž vzorek změříme na dvou různých přístrojích.

Hodnota kritické diference KD (%) je součástí výpočtů prováděných ve verifikačních protokolech viz Obr. č.13 a č. 14.

Výpočet kritické diference

$$KD (\%) = 2,77 \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2}$$

CV_A analytická chyba laboratoře

CV_I intraindividuální variabilita (www.westgard.com)

Obrázek č. 13 Verifikační protokol D-10 DC2F728007

Verifikační protokol: Verifikační protokol ze dne 31.3.2020 HBA1c st

Metoda: HBA1c
 Analyzátor: D-10 DC2F728007 st
 Vyhodnotil: Náprstková
 Datum: 31.03.2020

Název soupravy: HBA1c
 Výrobce: BioRad
 Katalogové číslo: AD40035

1. Mezelehá preciznost

	Datum (od - do)	Použitý materiál	Počet hodnot	Průměr	SD	CV	CV výrobce
Vzorek 1	01.11.2019 - 31.03.2020	HBA1c 1	33	36,455	1,003	2,751	10,000
Vzorek 2	01.11.2019 - 31.03.2020	HBA1c 2	27	84,185	1,618	1,921	10,000
Vzorek 3							

2. Opakovatelnost, bias

Provedl: Kuniková
 Datum: 24.03.2020
 Použitý materiál: Vzorek A = SEKK KD 5184
 Vzorek B = SEKK KD 5185
 Vzorek C =

Intraindividuální biologická variabilita (CV_i) = 1,9
 Interindividuální biologická variabilita (CV_o) = 5,7
 Celková biologická variabilita = 6,0
 Přesnost odvozená z biologických variabilit (I_{biol}) = 0,9
 Bias odvozený z biologických variabilit (B_{biol}) = 1,5
 Celková chyba odvozená z biologických variabilit (TE_{biol}) = 3,0

Výsledné hodnoty:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	44,000	45,000	45,000	44,000	44,000	45,000	44,000	44,000	44,000	45,000
Vzorek B	56,000	58,000	57,000	57,000	57,000	57,000	57,000	57,000	57,000	57,000
Vzorek C										

Vyhodnocení:

	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr	44,400	57,000		
Cílová hodnota	44,200	58,000		
Nejistota ref. materiálu	0,792	0,689		%
SD	0,516	0,471		
CV	1,163	0,827		%
CV výrobce	0,000	0,000		%
R(x)	100,452	98,275		%
b	0,452	-1,724		%

Cílová hodnota nejistoty (%) : 12,000
 Pramen: SEKK
 Výsledek verifikace: Vzorek A vyhovuje
 Vzorek B vyhovuje

3. Kombinovaná nejistota

	U_{rel} (%)	pro cílovou hodn.	Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu (při 95% intervalu spolehlivosti)	Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD %)
Vzorek A	5,773	44,200	41,648 - 46,751	Vzorek A 8,2
Vzorek B	4,463	58,000	55,411 - 60,588	Vzorek B 4,6
Vzorek C				Vzorek C

4. Ostatní znaky metody:

5. Senzitivita, specifčnost:

6. Závěr:

Metoda je vhodná ke klinickému použití. Hodnota kombinované nejistoty je vyhovující vzhledem k požadavkům TMU SEKK.

Datum schválení: 31.03.2020 Schválil: ing.Náprstková Iveta
 Platnost do: 31.03.2021

Obrázek č. 14 Verifikační protokol D-10 DB/B108218

Verifikační protokol: Verifikační protokol ze dne 31.3.2020 HBA1c no

Metoda: HBA1c
 Analyzátor: D-10 DB/B108218 nov
 Vyhodnotil: Náprstková
 Datum: 31.03.2020
 Název soupravy: HBA1c
 Výrobce: BioRad
 Katalogové číslo: AD40035

1. Mezilehlá preciznost

	Datum (od - do)	Použitý materiál	Počet hodnot	Průměr	SD	CV	CV výrobce
Vzorek 1	01.11.2019 - 31.03.2020	HBA1c 1	26	36,885	0,993	2,692	10,000
Vzorek 2	01.11.2019 - 31.03.2020	HBA1c 2	41	84,122	1,860	2,211	10,000
Vzorek 3							

2. Opakovatelnost, bias

Provedl: Kuniková
 Datum: 24.03.2020
 Použitý materiál: Vzorek A = SEKK KD 5184
 Vzorek B = SEKK KD 5185
 Vzorek C =

Intraindividuální biologická variabilita (CV_i) =	1,9
Interindividuální biologická variabilita (CV_g) =	5,7
Celková biologická variabilita =	6,0
Přesnost odvozená z biologických variabilit (I_{biol}) =	0,9
Bias odvozený z biologických variabilit (B_{biol}) =	1,5
Celková chyba odvozená z biologických variabilit (TE_{biol}) =	3,0

Výsledné hodnoty:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	43,000	43,000	44,000	44,000	44,000	44,000	44,000	44,000	44,000	44,000
Vzorek B	56,000	57,000	56,000	58,000	57,000	57,000	57,000	57,000	57,000	57,000
Vzorek C										

Vyhodnocení:

	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr	43,800	56,900		
Cílová hodnota	44,200	58,000		
Nejistota ref. materiálu	0,792	0,689		%
SD	0,421	0,567		
CV	0,962	0,997		%
CV výrobce	0,000	0,000		%
R(x)	99,095	98,103		%
b	-0,904	-1,896		%

Cílová hodnota nejistoty (%): 12,000
 Pramen: SEKK

Výsledek verifikace: Vzorek A vyhovuje
 Vzorek B vyhovuje

3. Kombinovaná nejistota

	$U_{f,cal}$ (%)	pro cílovou hodn.	Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu (při 95% intervalu spolehlivosti)	Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD %)
Vzorek A	5,645	44,200	41,704 - 46,695	Vzorek A 6,8
Vzorek B	5,044	58,000	55,074 - 60,925	Vzorek B 4,9
Vzorek C				Vzorek C

4. Ostatní znaky metody:

5. Senzitivita, specifická:

6. Závěr:

Metoda je vhodná ke klinickému použití. Hodnota kombinované nejistoty je vyhovující vzhledem k požadavkům TMU SEKK.

Datum schválení: 31.03.2020
 Platnost do: 31.03.2021
 Schválil: ing. Náprstková Iveta

(zdroj vlastní)

4.6 Měření EHK

V rámci měření externího hodnocení kvality zaslá firma SEKK v každém cyklu „Kompenzace diabetu SEKK KD“ dva vzorky o neznámé koncentraci glykovaného hemoglobinu, označené kódem cyklu a písmenem (měřené vzorky SEKK KD 1/20 A, SEKK KD 1/20 B). Vzorky jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Vzorky je nutné před zpracováním uchovávat při teplotě 2 – 8° C a po rekonstituci jsou při téže teplotě stabilní 48 hodin.

Před vlastním měřením je potřeba vzorky připravit. Před přípravou vzorků je necháme vytemperovat na laboratorní teplotu. Pokud na gumové zátce lahvičky ulpívá část lyofilizovaného materiálu sklepneme jej ke dnu lahvičky ještě před otevřením. Poté lahvičku opatrně otevřeme a přidáme 0,2 ml redestilované vody. Opět uzavřeme gumovou zátkou a necháme stát při laboratorní teplotě 15 minut. Po uplynutí této doby lahvičku opatrně promícháme krouživým pohybem a necháme dalších 15 minut stát a znovu promícháme. Při míchání je důležité zabránit kontaktu ředěného vzorku s gumovou zátkou, aby se kapalina nezachytila v jejích záhybech, protože vzorku je velmi malé množství.

Takto připravený vzorek naředíme do mikrozkušavky v poměru 1500 µl ředícího roztoku a 5 µl kontrolního vzorku a dobře promícháme. Mikrozkušavku vložíme v adaptéru s magnetem do zásobníku vzorků a vsuneme do analyzátoru. Před spuštěním analýzy je potřeba kontrolní vzorky do přístroje zadat ručně.

Před měřením vzorků EHK provedeme nejprve interní kontrolu kvality, abychom vyloučili případnou chybu analyzátoru. Pokud by výsledky kontrolních vzorků byly mimo přípustné meze, provedeme novou kalibraci přístroje.

Změřené výsledky zaslanych vzorků odešleme zpět ke zhodnocení do firmy SEKK. Je doporučeno výsledky zadávat ke zhodnocení pomocí webové aplikace Cibule. Přihlašovací údaje do aplikace jsou součástí průvodního listu. Výsledky je nutné odeslat do dne, který je označen jako stop termín. Pokud není k odeslání výsledků použita aplikace Cibule, lze výsledky odeslat doporučeně s průvodním listem na adresu firmy SEKK.

Po úspěšném absolvování kontrolního cyklu obdrží laboratoř certifikát a výsledkový list. Na výsledkovém listě je uveden název cyklu, stop termín, naměřené výsledky

odeslané laboratoří, vztažná hodnota a dolní a horní mez pro úspěšné absolvování cyklu.

Mnou naměřené hodnoty byly použity v cyklu EHK: SEKK KD 1/20 glykovaný hemoglobin

Vzorek A = 75 mmol/mol

Vzorek B = 40 mmol/mol

Oba výsledky byly v povoleném rozmezí a tudíž úspěšnost v cyklu EHK SEKK

KD 1/20 glykovaný hemoglobin byla 100%.

Kompletní výsledkový list je uveden jako příloha č. .

4.7 Měření patientských vzorků

Bylo změřeno celkem 50 patientských vzorků na obou přístrojích D-10 a porovnány rozdily mezi naměřenými hodnotami. Nebylo zjišťováno pohlaví ani věk pacientů. Vzorky byly vybírány náhodně pouze podle hodnoty glykovaného hemoglobinu tak, aby bylo zastoupeno co nejširší rozmezí od normálních hodnot až po hodnoty nekompensovaného diabetu. Zastoupeny byly bez rozdílu jak odběry do zkumavek s EDTA tak i kapilární odběry do mikrozkuavek. Všechny vzorky byly zpracovány v den odběru.

Vzorky byly měřeny za různých analytických podmínek, tzn. po výměně nového setu, před vyčerpáním reagenčního setu a při různých šaržích setů i pracovních roztoků.

Byla provedena regresní analýza laboratorních vzorků změřených na dvou přístrojích. Z klinického hlediska byla posouzená tzv. kritická diference dvou následných měření.

4.7.1 Lineární regresní analýza

Lineární regresní analýza je metoda pro vyhodnocení linearity. Hodnoty x jsou v této metodě brány jako nezávislé proměnné a hodnoty y za závisle proměnné. Předpokladem je konstantní směrodatná chyba v celém rozmezí měřených hodnot. Při jednoduché regresi hledáme přímku ve tvaru $y = ax + b$. Jednoduchou lineární regresní analýzu lze

použit jen v případě, když je vztah mezi oběma metodami měření lineární. Koeficienty regresní přímky jsou velmi citlivé k vychýleným hodnotám, které se v porovnávaných datech nacházejí (Příručka k vnitřní kontrole kvality).

4.7.2 Korelační koeficient

Korelační koeficient popisuje vztah mezi dvěma hodnotami, kdy změna jedné ovlivňuje druhou. Hodnota korelačního koeficientu by měla být co nejvyšší, optimálně $> 0,95$.

Výhodou použití korelačního koeficientu je jeho citlivost k odhalení náhodné chyby, k nevýhodám patří neodhalení přítomnosti proporcionální nebo konstantní systematické chyby (Příručka k vnitřní kontrole kvality).

Tabulka č. 10 Měření patientských vzorků

Srovnání přístrojů D-10 (patientské vzorky)				Srovnání přístrojů D-10 (patientské vzorky)			
vzorek	DC2F728007 st	DB7B108218 no	rozdíl	vzorek	DC2F728007 st	DB7B108218 no	rozdíl
jednotky	mmol/mol	mmol/mol	%	jednotky	mmol/mol	mmol/mol	%
1	56	56	0,0	26	71	70	1,4
2	83	83	0,0	27	66	65	1,5
3	65	66	1,5	28	60	59	1,7
4	61	62	1,6	29	32	31	3,1
5	33	32	3,0	30	77	77	0,0
6	38	38	0,0	31	39	38	2,6
7	42	41	2,4	32	43	42	2,3
8	38	38	0,0	33	36	34	5,6
9	72	72	0,0	34	67	66	1,5
10	72	72	0,0	35	73	71	2,7
11	59	61	3,4	36	51	48	5,9
12	55	57	3,6	37	50	51	2,0
13	65	68	4,6	38	62	63	1,6
14	61	62	1,6	39	65	67	3,1
15	35	36	2,9	40	50	50	0,0
16	49	50	2,0	41	48	48	0,0
17	64	66	3,1	42	63	63	0,0
18	83	84	1,2	43	41	42	2,4
19	103	105	1,9	44	70	70	0,0
20	43	45	4,7	45	43	45	4,7
21	75	74	1,3	46	64	64	0,0
22	60	60	0,0	47	50	52	4,0
23	45	45	0,0	48	86	88	2,3
24	66	65	1,5	49	62	63	1,6
25	65	64	1,5	50	60	59	1,7

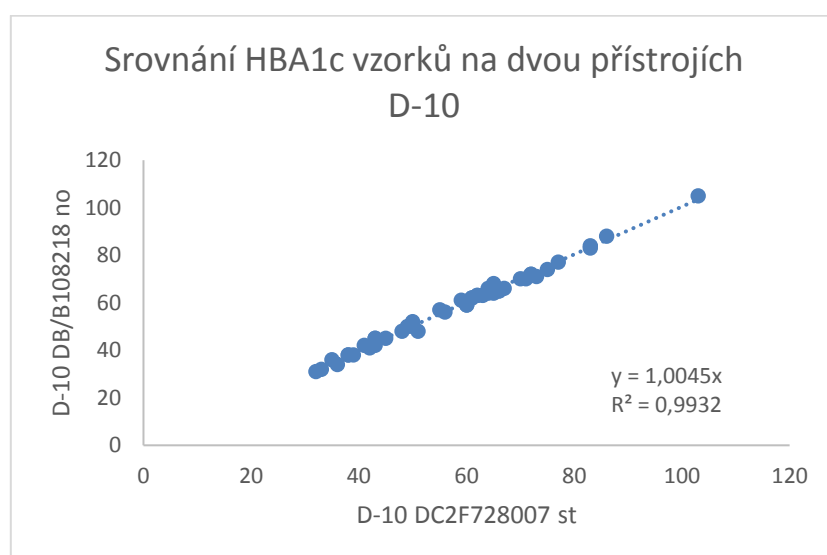
(zdroj vlastní)

4.7.3 Porovnání měřených vzorků na dvou přístrojích

Pomocí funkce lineární regrese jsem porovnávala měření vzorků zpracovaných na dvou přístrojích D-10. Hodnoty na ose x odpovídají výsledkům změřených na starém přístroji. Tyto hodnoty jsou v této metodě považovány za nezávislé proměnné. Hodnoty na ose y jsou brány jako závislé proměnné a představují hodnoty získané z nového přístroje.

Výsledkem srovnávacího měření je rovnice regrese a korelační koeficient viz obr.č. 15.

Obrázek č. 15 Srovnání vzorků HbA1c na dvou přístrojích D-10, N=50



(zdroj vlastní)

Korelační koeficient 0,9932 ukazuje na velmi dobrou shodu obou porovnávaných přístrojů D-10 DC2F728007 (starý) a D-10 DB/B108218 (nový). Dobrá korelace je také zřetelná z vypočítané rovnice regrese $y = 1,0045x$, kde směrnice přímky se blíží hodnotě 1 ($a = 1,0045$) a úsek na ose y je nulový.

5. Diskuze

Tématem mé bakalářské práce bylo stanovení glykovaného hemoglobinu metodou HPLC. Při psaní této práce jsem se seznámila s principem a přístrojovou technikou pro stanovení glykovaného hemoglobinu v klinické laboratoři. Hlavní důraz v této práci byl kladen na dlouhodobé sledování kvality v laboratoři, dále verifikaci metody a ověření požadovaných analytických znaků. Metoda nebyla hodnocena pouze pomocí kontrolních materiálů, ale i na základě srovnání patientských vzorků na dvou přístrojích D-10 firmy Bio-Rad. Součástí sledování kvality v laboratoři je také účast v cyklu SEKK Kompenzace diabetu KD 1/20.

Pomocí stanovení hladiny glykovaného hemoglobinu sledujeme stav kompenzace diabetes mellitus. Laboratorní stanovení má tři fáze: preanalytickou, analytickou a postanalytickou. Největším zdrojem chyb v klinické laboratoři je fáze preanalytická. V této fázi vznikají chyby díky nedostatečné identifikaci pacienta, špatně označenému biologickému materiálu nebo použití zkumavky s nevhodným protisrážlivým prostředkem. Další chyby mohou vzniknout při transportu biologického materiálu a jeho skladování.

Při odběru krve do K_3EDTA je nutné dbát na správné promíchání vzorku. Pokud nebude vzorek po odběru řádně promíchán s K_3EDTA mohou ve zkumavce vzniknout sraženiny, které znehodnotí analýzu. Při odběru do zkumavky musí být dodržen poměr odebrané krve a protisrážlivého činidla. Při kapilárním odběru do mikrozkušavky musí být dodržen objem krve v kapiláře (5 μ l). I v tomto případě je důležité vzorek po odběru řádně promíchat, jinak by došlo ke sražení vzorku v kapiláře a nemohl by být použit k dalšímu zpracování.

Při kalibraci může dojít k chybě, pokud nebude kalibrátor správně připraven nebo budou-li kalibrátory v zásobníku špatně označeny a umístěny. Další zdroj chyb v analytické fázi může být technického charakteru. Sražené vzorky způsobují neprůchodnost vzorkové jehly, kdy dojde k podsátí vzorku nebo k tvorbě bublin ve zkumavce. Při nešetrném zacházení s pracovními roztoky dochází k zabublení analytických cest v přístroji, kdy následuje problém s tlakem v měřící koloně. Řešením je odstranění bublin, jak ze vzorků, tak z analytických cest. Analýza vzorků musí být zopakována.

Výsledky mohou být zkresleny patologickou délkou střední doby života erytrocytu a případně vyskytujícími se hemoglobinopatiemi.

6. Závěr

Cílem práce bylo dlouhodobé sledování kontroly kvality pro stanovení glykovaného hemoglobinu metodou HPLC na dvou přístrojích D-10 Bio-Rad, verifikace metody pro oba přístroje, účast v cyklu externího hodnocení kvality a porovnání obou přístrojů měřením patientských vzorků.

Na základě těchto cílů jsem si stanovila předpoklady pro čtyři hypotézy.

Hypotéza 1 byla potvrzena. Sledované analytické znaky metody odpovídají požadavkům uváděným v Doporučení ČSKB a České diabetologické společnosti – Laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů 2019. V Doporučení je povolená mezilehlá preciznost pro stanovení glykovaného hemoglobinu $CV < 3\%$. Mezilehlá preciznost získaná z měření kontrolních vzorků na dvou hladinách na obou přístrojích v období listopad 2019 – březen 2020 nepřesáhla hodnotu 2,8%.

Hypotéza 2 byla potvrzena. Metoda je vhodná pro využití v klinické laboratoři pro oba přístroje. Hodnota kombinované nejistoty nesmí přesáhnout hodnotu cílové nejistoty pro glykovaný hemoglobin uváděnou v SEKK jako D_{max} . Pro rok 2020 $D_{max} < 12\%$.

Ve verifikačních protokolech byla vypočtena kombinovaná nejistota pro oba přístroje na dvou hladinách referenčního materiálu. Ani v jednom případě nebyla překročena hranice 6%.

Dle Doporučení ČSKB a České diabetologické společnosti – Laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů 2019 nesmí bias překročit hodnotu 2%. Nejvyšší vypočtený bias byl u vzorku B 5185 měřený na přístroji D-10 DB/B108218 byl -1,896% a tím je požadavek doporučení splněn.

Hypotéza 3 byla potvrzena. Úspěšnost v plánovaném cyklu externího hodnocení kvality Kompenzace diabetu 1/20 byla 100%. Laboratoř získala osvědčení o účasti v cyklu a certifikát platný do 21.3.2021. Viz příloha č. a č.

Hypotéza 4 byla potvrzena. Mezi přístroji D-10 nebyly statisticky významné rozdíly u naměřených vzorků pacientů. Srovnání bylo provedeno pomocí funkce lineární regresní analýzy. Dobrá korelace je patrná z rovnice lineární regrese $y = 1,0045x$, kde směrnice

přímky se blíží hodnotě 1 a posun na osy y je nulový. Korelační koeficient je 0,9932. Tím je splněna podmínka, že korelační koeficient má být vyšší než 0,95.

7. Literatura

1. Bio-Rad D-10™ Uživatelský manuál, 200:136,
2. BioVendor – Laboratorní medicína a.s., příbalový leták katalogové číslo 133299910935
3. CARLSSON, A, SUNDKVIST, G.,GROOP, L.,et al. *Insulin and glucagon secretion in patients with slowly progressing autoimmune diabetes (LADA)*. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85, p. 76-80.
4. CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
5. DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant. 2., dopl. vyd.* Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.
6. Doporučení ČSKB a České diabetologické společnosti Diabetes mellitus – Laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů, Publikováno v KLIN.Biochem.Metab.27(48).2019.No.1.p.32-47
7. GOLDSTEIN, DE.,LITTLE,RR.,LORENZ, RA., et al.*Tests of glycemia in diabetes*.Diabetes Care, 2004, 27, p. 1761-1773
8. HALUZÍK, Martin. *Praktická léčba diabetu*. 2. vyd. Praha: Mladá fronta, 2013. Aeskulap. ISBN 978-80-204-2880-6.
9. HERCOVÁ, Lenka. *Chemicko-analytické metody v bezpečnostním inženýrství a požární ochraně*. V Ostravě: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, 2012. Spektrum (Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství). ISBN 978-80-7385-119- 4.
10. <http://sekk.cz/terminologie/index.php?akce=terminologie> dostupné dne 15.4.2020
11. http://www.bulletinfons.cz/12014/bulletin_FONS_1_2014.pdf dostupné dne 13.2. 2020
12. <http://www.studiumbiochemie.cz/dr.html> dostupné dne 4.4. 2020
13. <http://www.szu.cz/hes-glukoza> dostupné dne 19.3. 2020
14. https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analiza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox17102013.pdf dostupné dne 20.4. 2020
15. https://is.muni.cz/el/med/jaro2013/KBSM/um/BC_HbA1c_I_2011.pdf dostupné dne 25.3.2020

16. https://www.hgf.vsb.cz/export/sites/hgf/546/.content/galerie-souboru/Studijni-materialy/Navody_k_praktiku.pdf dostupné dne 3.5.2020
17. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> dostupné dne 10.5.2020
18. JABOR, Antonín a Miroslav ZÁMEČNÍK, ed. *Encyklopedie laboratorní medicíny I*. Pardubice: SEKK, 2002. ISBN 80-238-9775-6.
19. KAREN, Igor a Štěpán SVAČINA. *Diabetes mellitus v primární péči*. Praha: Axonite CZ, 2011. Asclepius. ISBN 978-80-904899-0-5.
20. KING, H. *Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age*. *Diabetes Care*, 1998, 21, Suppl. 2p. B9-B13.
21. KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
22. LEBL, Jan, Eva AL TAJI, Stanislava KOLOUŠKOVÁ, Štěpánka PRŮHOVÁ, Marta ŠNAJDEROVÁ a Zdeněk ŠUMNÍK. *Dětská endokrinologie a diabetologie*. Praha: Galén, [2016]. ISBN 978-80-7492-271-8.
23. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
24. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
25. PERTILE, Eva. *Instrumental methods of analysis*. Ostrava: VŠB - Technical University of Ostrava, 2017. ISBN 978-80-248-4124-3.
26. PERUŠIČOVÁ, Jindra. *Diabetes mellitus: onemocnění celého organismu*. Praha: Maxdorf, [2017]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-512-5.
27. PRŮŠA, Richard. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe, c2012. ISBN 978-80-87553-68-8.
28. Příručka k vnitřní kontrole kvality. Česká společnost klinické biochemie. ISBN 978-80-254-1130-8
29. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-7262-324-9.
30. RYBKA, Jaroslav. *Diabetologie pro sestry*. Praha: Grada, 2006. Sestra (Grada). ISBN 80-247-1612-7.
31. SHEPHERD, M., ELLIS, I., AHMAD, AM., et al. Predictive genetic factors in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med*, 2001, 18, p. 417-421
32. SLP, verze 3.73.01, verze NČLP 02.067.01, SEKK spol.s r.o.
33. ŠKRHA, Jan. *Diabetologie*. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-607-6.

34. TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
35. WESTGARD, J. O., WESTGARD, S. A.; *Measuring analytical quality. Total analytical error versus measurement uncertainty*. Clin. Lab. Med., 2017, 37, 1-13
36. ZAMRAZIL, Václav a Terezie PELIKÁNOVÁ. *Akutní stavy v endokrinologii a diabetologii*. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-478-2.

8. Seznam zkratek

ADA americká diabetická asociace

anti- Gad protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové

CV mezilehlá preciznost

ČSKB česká společnost klinické biochemie

EHK externí hodnocení kvality

HbA1c stanovovaná frakce glykovaného hemoglobinu

HPLC vysokotlaká kapalinová chromatografie

IFCC The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

K₃EDTA draselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové

KD kritická diference

LADA latentní autoimunitní diabetes dospělých

LIS laboratorní informační systém

MODY diabetes mellitus charakteru dospělých vzniklý v mládí

oGTT orální glukózový toleranční test

OKB oddělení klinické biochemie

pH záporný dekadický logaritmus vodíkových iontů

SEKK systém externí kontroly kvality

SEKK KD cyklus SEKK Kompenzace diabetu

SLP Správná Laboratorní Práce, informační systém pro klinické laboratoře

SOPT standardní operační postup technický

TE total error, celková chyba

TSH thyreotropní hormon, thyreotropin

WHO Světová zdravotnická organizace

9. Přílohy

Seznam příloh:

- Příloha č.1 Výsledkový list SEKK cyklu EHK: KD1/20 glykovaný hemoglobin
- Příloha č.2 Validační protokol pro vzorek glykovaný hemoglobin 5184
- Příloha č.3 Validační protokol pro vzorek glykovaný hemoglobin 5185
- Příloha č.4 Certifikát cyklus EHK : KD1/20 Glykovaný hemoglobin
- Příloha č.5 Osvědčení o účasti v cyklu EHK: KD1/20 Glykovaný hemoglobin



SEKK s.r.o., Divize EHK, Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice, Česká republika
 Poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7004 akreditovaný ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17043.
 Podrobnosti o předmětu a rozsahu akreditace naleznete na <http://www.sekk.cz>



B853

VÝSLEDKOVÝ LIST (kvantitativní výsledky)

Cyklus EHK: KD1/20 - Glykovaný hemoglobin

Stop termín (uzávěrka cyklu EHK): 20.03.2020

Odborná garance: Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP

Účastník: Oblastní nemocnice Příbram, a.s., Oddělení klinické biochemie
 Gen. R. Tesaříka 80, 261 01 Příbram, Česká republika
 Prim. MUDr. Miroslava Kopecká

Legenda: Vz ... vzorek VU ... výsledek účastníka	C ... celkové hodnocení zkoušky + ... úspěšná zkouška - ... neúspěšná zkouška ± ... nehodnoceno	AV ... vztázná hodnota LL ... dolní mez UL ... horní mez D[%] ... rozdíl v procentech (VU a AV)
---	--	--

Zkouška	[jednotka]	Základní informace, které o zkoušce uvedl účastník	Návaznost					Úspěšnost za 2 roky
			C	AV	LL	UL	D[%]	
Vz. Hodnocená skupina	VU							
Hemoglobin A1c	[mmol/mol]	M=1=HPLC, LC, R=14=Bio-Rad, P=14=Bio-Rad, S=352=Bio-Rad D-10 series						
A Všechny výsledky	75		+	70,1	60,2	80	7,0	100%
B Všechny výsledky	40			38,2	32,8	43,6	4,7	

Vaše celkové úspěšnosti v jednotlivých cyklech tohoto programu za poslední 2 roky:

B853

2018: KD3 = 100%
 2019: KD1 = 100% KD3 = 100%
 2020: KD1 = 100%

Vaše celková úspěšnost v tomto programu za poslední 2 roky: 100 % (počet hodnocených zkoušek: 4)

Příloha č.2 Validační protokol pro vzorek glykovaný hemoglobin 5184

Validační protokol pro vzorky použité v cyklu EHK Glykovaný hemoglobin 5184 – revize 1

SEKK

Vzorek byl použit v cyklu **KD3/18** jako vzorek **B**.

Při zpracování výsledků, které jste získali měřením validovaných vzorků, vždy nahlédněte do vyhodnocení příslušného cyklu EHK (kde byl vzorek použit) a do komentáře k vyhodnocení tohoto cyklu.

Skladování vzorků a bezpečnostní pokyny

Lyofilizát skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C.

Rekonstituovaný vzorek je stabilní 1 den při teplotě +2 °C až +8 °C za předpokladu, že byl patřičně uzavřen.

S materiálem zacházejte jako s potenciálně infekčním.

Zpracování vzorků

1. Rekonstituce probíhá za teploty laboratoře.
2. Pokud na gumové zátky lahvičky ulpívá část lyofilizovaného materiálu, sklepněte jej ještě před otevřením ke dnu lahvičky.
3. Odstraňte kovové víčko a opatrně sejměte gumovou zátku tak, že nejprve jemným nadzvednutím gumové zátky v místě jejího vykrojení vpustíte do lahvičky vzduch a teprve potom vytáhnete gumovou zátku z lahvičky.
4. Přidejte **0,2 mL** redestilované vody. Opět uzavřete gumovou zátkou a ponechte stát 15 minut.
Uživatelům systémů Roche doporučujeme, aby pro dosažení optimální viskozity vzorku, kterou jejich systémy potřebují, použili k rekonstituci objem 0,25 mL redestilované vody. Výsledky pak použijte tak, jak je vydá váš analyzátor, **nepřepočítávejte je**.
5. Držte lahvičku pod úhlem 45° a jemným kruživým pohybem lahvičkou otáčejte po dobu 30 sekund tak, aby nedošlo ke kontaktu kapaliny s gumovou zátkou. Zabránit kontaktu se zátkou je nezbytné proto, aby se kapalina nezachytila v záhybech gumové zátky, protože kapaliny je velmi malé množství.
6. Lahvičku ponechte stát po dobu 15 minut.
7. Zopakujte bod 5.
8. Pro zajištění homogenity vzorku promíchejte těsně před měřením obsah lahvičky.

Upozornění: s materiálem zacházejte jako s potenciálně infekčním.

Stanovení hodnot v dodaných materiálech provádějte stejným způsobem jako u rutinních vzorků.

Validovaná hodnota

Referenční hodnota (RV) s metrologickou návazností na referenční metodu IFCC (viz www.sekk.cz oddíl Infoservis)

Hodnoty stanovila European Reference Laboratory for Glycohemoglobin, Winterswijk, Nizozemsko (vedoucím laboratoře je Dr. CasWeykamp).

Analyt	Jednotka	RV	Uc (k = 2)
HbA1c	mmol/mol	44,2	0,7

Datum: 4.4.2018
Vvracovala: Marie Kašnarová

SEKK s.r.o., Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice
e-mail: sekk@sekk.cz

Příloha č.3 Validační protokol pro vzorek glykovaný hemoglobin 5185

Validační protokol pro vzorky použité v cyklu EHK Glykovaný hemoglobin 5185 – revize 1

SEKK

Vzorek byl použit v cyklu **KD3/18 jako vzorek A**.

Při zpracování výsledků, které jste získali měřením validovaných vzorků, vždy nahlédněte do vyhodnocení příslušného cyklu EHK (kde byl vzorek použit) a do komentáře k vyhodnocení tohoto cyklu.

Skladování vzorků a bezpečnostní pokyny

Lyofilizát skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C.

Rekonstituovaný vzorek je stabilní 1 den při teplotě +2 °C až +8 °C za předpokladu, že byl patřičně uzavřen.

S materiálem zacházejte jako s potenciálně infekčním.

Zpracování vzorků

1. Rekonstituce probíhá za teploty laboratoře.
2. Pokud na gumové zátku lahvičky ulpívá část lyofilizovaného materiálu, sklepněte jej ještě před otevřením ke dnu lahvičky.
3. Odstraňte kovové víčko a opatrně sejměte gumovou zátku tak, že nejprve jemným nadzvednutím gumové zátky v místě jejího vykrojení vpustíte do lahvičky vzduch a teprve potom vytáhnete gumovou zátku z lahvičky.
4. Přidejte **0,2 mL** redestilované vody. Opět uzavřete gumovou zátkou a ponechte stát 15 minut.
Uživatelům **systémů Roche** doporučujeme, aby pro dosažení optimální viskozity vzorku, kterou jejich systémy potřebují, použili k rekonstituci objem 0,25 mL redestilované vody. Výsledky pak použijte tak, jak je vydá váš analyzátor, **nepře počítávejte je**.
5. Držte lahvičku pod úhlem 45° a jemným kruživým pohybem lahvičkou otáčejte po dobu 30 sekund tak, aby nedošlo ke kontaktu kapaliny s gumovou zátkou. Zabránit kontaktu se zátkou je nezbytné proto, aby se kapalina nezachytila v záhybech gumové zátky, protože kapaliny je velmi malé množství.
6. Lahvičku ponechte stát po dobu 15 minut.
7. Zopakujte bod 5.
8. Pro zajištění homogenity vzorku promíchejte těsně před měřením obsah lahvičky.

Upozornění: s materiálem zacházejte jako s potenciálně infekčním.

Stanovení hodnot v dodaných materiálech provádějte stejným způsobem jako u rutinních vzorků.

Validovaná hodnota

Referenční hodnota (RV) s metrologickou návazností na referenční metodu IFCC (viz www.sekk.cz oddíl Infoservis)

Hodnoty stanovila European Reference Laboratory for Glycohemoglobin, Winterswijk, Nizozemsko (vedoucím laboratoře je Dr. Cas Weykamp).

Analyt	Jednotka	RV	Uc (k = 2)
HbA1c	mmol/mol	58,0	0,8

Datum: 4.4.2018

Vytvořila: Marie Kašnarová

SEKK s.r.o., Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice

e-mail: sekk@sekk.cz www.sekk.cz

Příloha č.4 Certifikát cyklus EHK : KD1/20 Glykovaný hemoglobin



SEKK s.r.o., Divize EHK, Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice, Česká republika
Poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7004 akreditovaný ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17043.
Podrobnosti o předmětu a rozsahu akreditace naleznete na <http://www.sekk.cz>



B853

CERTIFIKÁT

Cyklus EHK: KD1/20 - Glykovaný hemoglobin

Stop termín (uzávěrka cyklu EHK): 20.03.2020

Odborná garance: Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP

Účastník: Oblastní nemocnice Příbram, a.s., Oddělení klinické biochemie
Gen. R. Tesaříka 80, 261 01 Příbram, Česká republika
Prim. MUDr. Miroslava Kopecká

Osvědčujeme, že výše uvedený účastník se úspěšně zúčastnil cyklu externího hodnocení kvality pro následující zkoušky:

**Certifikace návaznosti na vztažnou hodnotu
referenčního materiálu**

Hemoglobin A1c

Tento certifikát platí do 21.03.2021.

Ing. Marek Budina
ředitel společnosti SEKK

prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.
předseda ČSKB

Příloha č.5 Osvědčení o účasti v cyklu EHK: KD1/20 Glykovaný hemoglobin



SEKK s.r.o., Divize EHK, Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice, Česká republika
Poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7004 akreditovaný ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17043.
Podrobnosti o předmětu a rozsahu akreditace naleznete na <http://www.sekk.cz>



B853

OSVĚDČENÍ O ÚČASTI

Cyklus EHK: KD1/20 - Glykovaný hemoglobin

Stop termín (uzávěrka cyklu EHK): 20.03.2020

Odborná garance: Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP

Účastník: Oblastní nemocnice Příbram, a.s., Oddělení klinické biochemie
Gen. R. Tesaříka 80, 261 01 Příbram, Česká republika
Prim. MUDr. Miroslava Kopecká

Osvědčujeme, že výše uvedený účastník se zúčastnil cyklu externího hodnocení kvality pro následující zkoušky:

Hemoglobin A1c

Toto osvědčení platí do 21.03.2021.

Ing. Marek Budina
ředitel společnosti SEKK

prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.
předseda ČSKB