



CO SI ČESKO NADROBILLO, TO SI TAKY SNÍ !

Validace laboratorních mikrobiologických metod. Akreditace laboratoří.

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2012

Obsah přednášky

- 1) Co všechno musí mikrobiologická laboratoř dodržet**
- 2) Úrovně zabezpečení mikrobiologických laboratoří**
- 3) Nakládání s GMM**
- 4) Biologický zákon**
- 5) Akreditace mikrobiologické laboratoře**
- 6) Struktura diagnostické laboratoře pro PCR**
- 7) Metody zkoušení**
- 8) *In vitro* diagnostické soupravy**



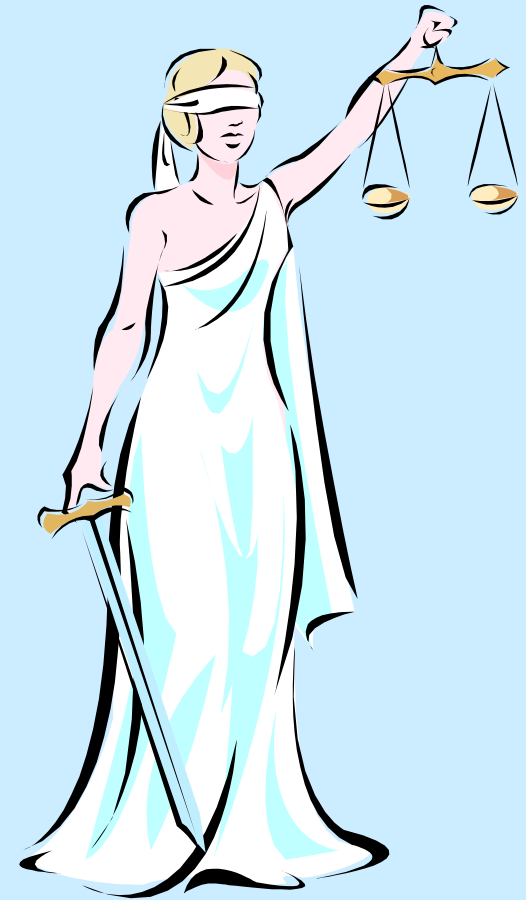
Doporučená literatura

Zákony

Nařízení vlády

Směrnice

Technické normy



Co všechno musí mikrobiologická laboratoř dodržet?

- 1) Jak laboratoř postavit?**
- 2) Čím laboratoř vybavit?**
- 3) Jaký personál do laboratoře najmout?**
- 4) Jaké pracovní postupy používat?**
- 5) Jak zajistit bezpečnost práce v laboratoři?**
- 6) Jak zajistit bezpečí okolí laboratoře?**

Co všechno musí mikrobiologická laboratoř dodržet?



PŘICHÁZÍM Z ČESKÝCH ZEMÍ A VÍM, CO SE SLUŠÍ. PŘIJMĚTE TUTO OBÁLKU, PANE, A PROSÍM O SLUŠNÉ ZACHÁZENÍ.

Přehled mikrobiologických norem

<http://shop.normy.biz/show.php?categoryID=ics&ics=07.100.01&PHPSESSID=9DfuSqUdyhHsW9,Uwz2Gkf50M74>

Technické normy | Internetová prodejna | Seznam norem | Normovinky - informace o nových normách

NORMY.biz [Přihlásit](#) | [Registrovat](#) | [Jak nakupovat](#) | [Reklamacie](#) | [Kontakty](#)

Uživatel nepřihlášen ([přihlásit](#))
Celková cena: 0 Kč | [Košík](#) je prázdný

NAVIGÁTOR

VYHLEDÁVÁNÍ
Vyhledat:

[Rozšířené hledání](#)

NORMY PODLE MĚSÍCŮ

- [Normy z června 2012](#)
- [Normy z května 2012](#)
- [Normy z dubna 2012](#)
- [Normy z března 2012](#)
- [Normy z února 2012](#)

[Starší normy](#)

KATEGORIE ZBOŽÍ

- [ČSN 73 4201](#)
- [ČSN OHSAS 18002](#)
- [ČSN EN ISO 9001 ed. 2](#)
- [ČSN EN ISO 9004](#)
- [ČSN 73 0802](#)
- [Zelená úsporám \(normy\)](#)
- [Jakost](#)
- [Stavební normy](#)
- [Požární normy](#)
- [Elektro normy](#)
- [Vytápění](#)

ICS 07.100.01 - Mikrobiologie obecně

Katalog	Označení Název	Cena s DPH	Přidat do košíku
74972	ČSN ISO 21528-1 (560096) - únor 2006 zobrazit podrobnosti Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi Enterobacteriaceae - Část 1: Průkaz a stanovení počtu technikou nejvýše pravděpodobného počtu s předpomnožením	220 Kč vč. DPH	Do košíku
74969	ČSN ISO 21528-2 (560096) - únor 2006 zobrazit podrobnosti Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi Enterobacteriaceae - Část 2: Technika počítání kolonií	180 Kč vč. DPH	Do košíku
52614	ČSN EN ISO 846 (640780) - srpen 1998 zobrazit podrobnosti Plasty - Hodnocení působení mikroorganismů	325 Kč vč. DPH	Do košíku
53940	ČSN EN 12296 (831005) - leden 1999 zobrazit podrobnosti Biotechnologie - Vybavení - Návod pro postupy zkoušení čistitelnosti Norma obsahuje anglický text normy a českou titulní	220 Kč vč. DPH	Do košíku

100%

Přehled biotechnologických norem

http://shop.normy.biz/show.php?categoryID=8310&PHPSESSID=9DfuSqUdyhHsW9,Uwz2Gkf50M74

Technické normy | Internetová prodejna | Seznam norem | Normovinky - informace o nových normách

NORMY.biz

[Přihlásit](#) | [Registrovat](#) | [Jak nakupovat](#) | [Reklama](#) | [Kontakty](#)

Uživatel nepřihlášen ([přihlásit](#))

Celková cena: 0 Kč | [Košík](#) je prázdný

NAVIGÁTOR

VYHLEDÁVÁNÍ

Vyhledat:

[Rozšířené hledání](#)

NORMY PODLE MĚSÍCŮ

- [Normy z června 2012](#)
- [Normy z května 2012](#)
- [Normy z dubna 2012](#)
- [Normy z března 2012](#)
- [Normy z února 2012](#)

[Starší normy](#)

KATEGORIE ZBOŽÍ

- [ČSN 73 4201](#)
- [ČSN OHSAS 18002](#)
- [ČSN EN ISO 9001 ed. 2](#)
- [ČSN EN ISO 9004](#)
- [ČSN 73 0802](#)
- [Zelená úsporám \(normy\)](#)
- [Jakost](#)
- [Stavební normy](#)
- [Požární normy](#)
- [Elektro normy](#)
- [Vytápění](#)

[CENÍK](#) | [KOŠÍK](#) | [POKLADNA](#) | [PŘIHLÁSIT](#)

Třída 8310 - Biotechnologie

45 norem!

[Zobrazit obsah třídy 83](#)

Katalog	Označení Název	Cena s DPH	Přidat do košíku
51837	ČSN EN 1620 (831001) - říjen 1998 zobrazit podrobnosti Biotechnologie - Velkovýroba a výroba - Požadavky na konstrukci budov podle stupně rizikovosti	220 Kč vč. DPH	Do košíku
51838	ČSN EN 1826 (831002) - září 1998 zobrazit podrobnosti Biotechnologie - Velkovýroba a výroba - Postup řízení surovin	180 Kč vč. DPH	Do košíku
51840	ČSN EN 1619 (831003) - září 1998 zobrazit podrobnosti Biotechnologie - Velkovýroba a výroba - Všeobecné požadavky na management a organizaci postupů pro konzervaci kmenů	180 Kč vč. DPH	Do košíku
53816	ČSN EN 12075 (831004) - říjen 1998 zobrazit podrobnosti Biotechnologie - Velkovýroba a výroba - Postupy pro fermentaci a zpracování	220 Kč vč. DPH	Do košíku
	ČSN EN 12296 (831005) - leden 1999 zobrazit podrobnosti		

100%

Úrovně zabezpečení mikrobiologických laboratoří

Řídí se normou a jsou celkem čtyři

ČSN 12128

Biotechnologie - Laboratoře pro výzkum, vývoj a analýzu - Stupně zabezpečení mikrobiologických laboratoří, zóny rizika, prostory a technické požadavky na bezpečnost

- pochází ze září 1999
- je českou verzí evropské normy EN 12128:1998

Stanoví minimální bezpečnostní požadavky na biologickou bezpečnost, založené na principech prevence a kontroly mikrobiologického rizika pro lidi, zvířata, rostliny a prostředí, kterým se musí přizpůsobit zakládání a provoz mikrobiologických laboratoří.

ČSN 12128 – předmět a oblast použití

- minimální technické požadavky pro biologickou bezpečnost v laboratořích ve čtyřech úrovních technického zabezpečení, které jsou přiměřené pro manipulaci s mikroorganismy různých rizikových skupin
- především se zabývá ochranou před mikroorganismy, které představují riziko pro lidské zdraví
- platí pro mikrobiologické laboratoře, ve kterých se manipuluje s mikroorganismy v oborech bakteriologie, mykologie, virologie, parazitologie a/nebo kde se provádějí genetické modifikace

ČSN 12128 – Obsah směrnice

Předmluva

Úvod

1 Předmět normy a oblast použití

2 Normativní odkazy

3 Termíny a definice

4 Třídění úrovní technického zabezpečení

5 Laboratoř s úrovní 1 technického zabezpečení (ÚTZ 1)

6 Laboratoř s úrovní 2 technického zabezpečení (ÚTZ 2)

7 Laboratoř s úrovní 3 technického zabezpečení (ÚTZ 3)

8 Laboratoř s úrovní 4 technického zabezpečení (ÚTZ 4)

Příloha A (informativní) Směrnice pro prostorové požadavky a rozměry

Příloha B (informativní) Metoda zkoušky pro stanovení rozdílů tlaku

Příloha C (informativní) Bibliografie

Laboratoř ÚTZ 1

Stupeň biologického rizika BSL 1

Biologické agens, u kterého není pravděpodobné způsobení onemocnění u lidí.

Bacillus subtilis, Naegleria gruberi

Virus hepatitidy psů

Požadavky na laboratoř ÚTZ 1

Standardní mikrobiologické postupy

Žádné zvláštní bezpečnostní vybavení

- **Práce na otevřeném stole**
- **Nutná výlevka**

Náhled do laboratoře ÚTZ 1



Náhled do laboratoře ÚTZ 1



Laboratoř ÚTZ 2

Stupeň biologického rizika BSL 2

Biologické agens, které může způsobit onemocnění u lidí, může být rizikové pro zdravotnické pracovníky, je nepravděpodobné rozšíření v komunitě, je možná profylaxe nebo účinná léčba.

Bordetella pertussis, Chlamydia pneumoniae, Corynebacterium diphtheriae, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Legionella pneumophila, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium avium

Orthomyxoviridae: Virus chřipky A,B,C; Herpesviridae: Epstein-Barrové virus (EBV), lidský cytomegalovirus (CMV), virus varicely-zosteru; rhinoviry; Poxviridae: cow pox, elephant pox, rabbit pox

Požadavky na laboratoř ÚTZ 2

Omezený přístup, Označení „Biohazard“, „Přísná“ bezpečnostní opatření, Manuál pro dekontaminace

Primárními bariérami jsou laminární boxy třídy I nebo II nebo jiná ochranná zařízení ve kterých se provádí veškeré manipulace a agens, která mohou šplíchat nebo vytvářet aerosoly obsahující infekční materiál.

Osobní ochranné pomůcky = plášť, rukavice, ochrana obličeje, pokud je to třeba.

- UTZ 1**
- Autokláv**

Náhled do laboratoře ÚTZ 2



Náhled do laboratoře ÚTZ 2



Laboratoř ÚTZ 3

Stupeň biologického rizika BSL 3

Biologické agens, které může vyvolat těžké onemocnění u lidí, představuje významné riziko pro pracovníky, může se rozšířit do komunity, existuje profylaxe a účinná léčba.

Bacillus anthracis, Chlamydia psittaci (aviární kmeny), Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis

Bunyaviridae; virus dengue; hantaviry: korejská hemoragická horečka, virus Seoul; virus monkey pox

Požadavky na laboratoř ÚTZ 3

Kontrolovaný přístup, dekontaminace veškerých odpadů, dekontaminace laboratorních oděvů před praním.

Primárními bariérami jsou laminární boxy třídy I nebo II nebo jiná ochranná zařízení ve kterých se provádí veškeré otevřené manipulace s agens.

Osobní ochranné pomůcky = plášť, rukavice a ochrana dýchacích cest, pokud je to třeba.

- **UTZ 2**
- **Fyzické oddělení od vstupního koridoru**
- **Samouzavírací systém, přístup přes dvoje dveře**
- **Odváděný vzduch nesmí být recirkulován**
- **Laboratorní prostor podtlakovaný – negativní tlak**

Náhled do laboratoře ÚTZ 3



Náhled do laboratoře ÚTZ 3



Box s odtahem



A jak to asi funguje?



Kouřový test



Prokládací autokláv



A hurá do sprchy



Brněnská UTZ 3 zvenčí



Brněnská UTZ 3 zvenčí



Brněnská UTZ 3 na počátku



Nadšení po úspěšné kolaudaci



Laboratoř ÚTZ 4

Stupeň biologického rizika BSL 4

Biologické agens, které je schopno vyvolat těžké onemocnění u člověka, představuje významné riziko pro pracovníky, je vysoké riziko pro šíření do komunity, není dostupná profylaxe a léčba.

Mycobacterium tuberculosis - MDR kmeny;

Arenaviridae: virus horečky lassa, Tacaribe complex, arenaviry Nového světa: Junin, Guanarito, Sabia, Machupo; Nairovirus (krymsko-konžská hemoragická horečka); Filoviridae: virus eboly, virus Marburské horečky; Poxviridae: virus varioly; Coronaviridae: SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome)

Požadavky na laboratoř ÚTZ 4

Před vstupem výměna oblečení, Sprcha na výstupu, na výstupu dekontaminace všech materiálů.

Primární bariéry: všechny postupy musí být prováděny v laminárním boxu třídy III nebo v celotělových přetlakových (pozitivní tlak) skafandrech se samostatným přívodem vzduchu v kombinaci s laminárními boxy třídy I nebo II.

- UTZ 3**
- Oddělená budova nebo izolovaná zóna**
- Samostatný přívod a odvod, vakuový a dekontaminační systém**
- Další požadavky podle směrnice**

Náhled do laboratoře ÚTZ 4





A kam se řadí virus HIV?

??????



ČSN 12741

Biotechnologie - Laboratoře pro výzkum, vývoj a analýzu - Pokyny pro biotechnologické laboratorní postupy

- pochází z června 2000
- je českou verzí evropské normy EN 12741:1999

Poskytuje pokyny pro praxi při biotechnologických postupech ve výzkumných, vývojových a analytických laboratořích s úrovní technického zabezpečení 1, 2, 3 a 4 (viz ČSN 12128)

ČSN 12741 – Obsah směrnice

- 1 - Předmět normy a oblast použití**
- 2 - Normativní odkazy**
- 3 - Termíny a definice,**
- 4 - Základní praxe v biotechnologických laboratořích**
- 5 - Laboratorní praxe při manipulaci s mikroorganismy v jednotlivých úrovních technického zabezpečení**
- 6 - Zneškodňování odpadu a odpadních kapalin**
- 7 - Zdravotní a lékařský dohled**
- 8 - Postup při laboratorních nehodách**
- 9 - Čištění a údržba**
- 10 - Dekontaminace**

Nakládání s GMM



Zákon č. 78/2004 Sb.

**Směrnice Evropského parlamentu a Rady
2001/18/ES ze dne 12.3. 2001**

Směrnice Rady 90/219/EHS ze dne 23. dubna 1990

Směrnice Rady 98/81/ES ze dne 26. října 1998

Geneticky modifikovaný organismus

Zákon č. 78/2004 Sb.

**Směrnice Evropského parlamentu a Rady
2001/18/ES ze dne 12.3. 2001**

Organismus, kromě člověka, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací provedenou některým z technických postupů stanovených v bodu 1 přílohy č. 1 k tomuto zákonu

Genetický produkt

Jakákoli věc obsahující jeden nebo více geneticky modifikovaných organismů, která byla vyrobena nebo jinak získána bez ohledu na stupeň jejího zpracování a je určena k uvedení do oběhu



S GMO se nakládá

- 1) Uzavřené nakládání = v uzavřeném prostoru, např. v laboratořích**
- 2) Uvádění do životního prostředí = mimo uzavřený prostor, např. polní pokusy**
- 3) Uvádění do oběhu = úplné nebo bezúplatné předání nebo nabídnutí jiné osobě, např. prodej v supermarketu**

Pro nakládání s GMO platí

- 1) Princip předběžné opatrnosti = chránit zdraví lidí, zvířat, složky životního prostředí a biologickou rozmanitost**
- 2) Nutno dodržovat podmínky uvedené na obalu nebo průvodním listu**
- 3) Kdo chce s GMO nakládat, musí získat povolení MŽP, vyjadřuje se i MZd**

Kategorie rizika

1. kategorie

- **bez rizika nebo riziko zanedbatelné pro zdraví nebo životní prostředí (většina laboratoří)**

2. kategorie

- **nízké riziko snadno odstranitelné (laboratoře s produkcí rekombinantních proteinů)**

3. kategorie

- **riziko odstranitelné jen náročnými zásahy**

4. kategorie

- **vysoké riziko**

Kde se dozvím víc ?

Ministerstvo životního prostředí

http://www.mzp.cz/cz/geneticky_modifikovane_organismy

Czech Biosafety Clearing House

Legislative, kontakty, schvalovací proces v ČR

<http://www.mzp.cz/biosafety>

Biologický zákon

Státní ústav pro jadernou bezpečnost ?

<http://www.sujb.cz/>

Oddělení pro kontrolu zákazu biologických zbraní

- **výkon státního dozoru nad dodržováním ustanovení zákona č. 281/2002 Sb., a jeho prováděcí vyhlášky č. 474/2002 Sb.**
- **Každý, kdo nakládá s biologickými agens nebo toxiny uvedenými v přílohách vyhlášky č. 474/2002 Sb., je povinen (podle druhu biologického agens nebo toxinu) buď mít povolení k nakládání od SÚJB nebo nakládání pouze ohlásí.**

Biologický zákon

ZÁKON č. 281/2002 Sb.

O některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona

Změna: 186/2004 Sb.

Změna: 413/2005 Sb.

Změna: 296/2007 Sb.

Změna: 124/2008 Sb.

Změna: 223/2009 Sb.

Změna: 227/2009 Sb.

Biologická agents a toxiny

Vysoce rizikové

- **opičí B virus, Sin Nombre virus, virus bílých neštovic, virus Dengue, virus Ebola, virus Hantaan, virus horečky Lassa**
- ***Bacillus anthracis, Brucella melitensis Clostridium botulinum, Francisella tularensis, Chlamydia psittaci, Salmonella typhi, Shigella dysenteriae Typ 1, Vibrio cholerae, Yersinia pestis, ...***
- **Riketsie - *Bartonella quintana (Rochalimea quintana, Rickettsia quintana), Coxiella burnetii, Rickettsia prowazekii, Rickettsia rickettsii***
- **Patogeny živočichů i rostlin**
- **GMM**

Biologická agents a toxiny

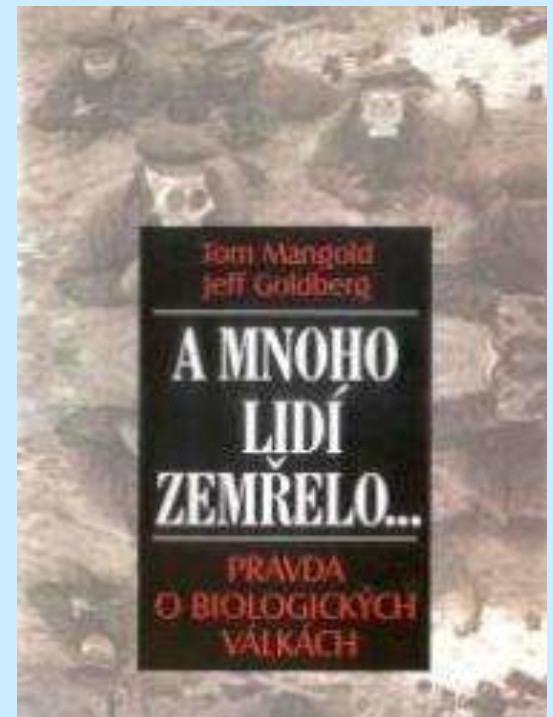
Rizikové

- **Virus hepatitidy B, C, D, E, G a nezjištěné, virus klíšťové encefalitidy, ...**
- ***Brucella melitensis*, biovar *Canis*, *Clostridium tetani*, *Legionella pneumophilia*, *Mycobacterium africanum*, *bovis* (s výjimkou kmene BCG), *leprae*, *microti*, *tuberculosis*, *ulcerans*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*, *Yersinia pseudotuberculosis***
- **Řada riketsií**
- **GMM**

Úmluva

Úmluva o zákazu vývoje, výroby a hromadění zásob bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o jejich zničení

- **Podepsána 10. dubna 1972 v Moskvě, Londýně a Washingtonu**
- **V platnost vstoupila 26. března 1975**
- **Verifikačního protokolu ale nebylo nikdy dosaženo!**



Akreditace mikrobiologické laboratoře

Akreditace laboratoře

ČESKÝ INSTITUT PRO AKREDITACI, o. p. s.

<http://www.cai.cz/>

ČSN EN ISO/IEC 17025 (015253)

ČSN EN ISO/IEC 15189 (855101)

Další činnosti ČIA

- **Zkušební laboratoře (ČSN EN ISO/IEC 17025:2005, ČSN EN ISO 15189:2007 – speciálně pro zdravotnické laboratoře)**
- **Kalibrační laboratoře (ČSN EN ISO/IEC 17025:2005)**
- **Certifikační orgány provádějící certifikaci systémů jakosti, ... (ČSN EN ISO/IEC 17021:2007)**
- **Certifikační orgány certifikující produkty vč. procesů a služeb (ČSN EN 45011:1998) Ověřovatelé emisí skleníkových plynů (ČSN EN 45011:1998, zákon č. 695/2004 Sb. a vyhláška č. 12/2009 Sb.)**
- **Certifikační orgány provádějící certifikaci osob (ČSN EN ISO/IEC 17024:2003)**
- **Inspekční orgány (ČSN EN ISO/IEC 17020:2005)**
- **Poskytovatele zkoušení způsobilosti (ČSN EN ISO/IEC 17043)**
- **Environmentální ověřovatele programů EMAS a dohled nad zahraničními environmentálními ověřovateli (nařízení ES č. 1221/2009)**

Co je to akreditace zdravotnické laboratoře?

Posouzení shody zavedeného systému managementu kvality laboratoře se všemi kritérii mezinárodní normy ISO 15189, resp. ISO/IEC 17025

- **Je-li shoda, pak laboratoř obdrží Osvědčení o akreditaci, které je dokumentem potvrzujícím způsobilost zdravotnické laboratoře k provádění vyšetření a odběru primárních vzorků**
- **Nedílnou součástí posuzování žadatelů o akreditaci je i přímé sledování jejich činnosti v místě jejich působnosti a posuzování vyšetření předváděných za provozu**

Norma ČSN EN ISO 17025 (015253)

Posuzování shody - Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří

- **Slouží též k akreditaci mikrobiologických laboratoří národními organizacemi**
- **Platí od listopadu 2005**

Je navázána na normu ISO 9001:2000

Co obsahuje ČSN EN ISO 17025

Veškeré požadavky na zkušební a kalibrační laboratoře, které musí tyto plnit, pokud chtějí prokázat, že provozují

- a) systém managementu**
- b) jsou odborně způsobilé**
- c) jsou schopny poskytovat technicky platné výsledky**

Norma ČSN EN ISO 15189 (855101)

Zdravotnické laboratoře - Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost

- **Vychází z normy ISO/IEC 17025**
- **Platná od listopadu 2007**

**Uvádí požadavky na způsobilost a kvalitu
zdravotnických laboratoří**

Co obsahuje ČSN EN ISO 15189

Služby zdravotnické laboratoře jsou základem péče o pacienta

Laboratoř musí být připravena splnit požadavky všech pacientů i klinického personálu odpovědného za péči o pacienty

Služby = organizace příjmu, identifikace a příprava pacienta, odběr, dopravu, skladování, zpracování a vyšetřování klinických vzorků, následné ověření, interpretace, předkládání zpráv a poradenská činnost, a navíc hodnocení bezpečnosti a etiky práce zdravotnické laboratoře.

ČSN EN ISO 9001 (010321)

Systemy managementu kvality - Požadavky

➤ Platná od května 2009

V této normě jsou specifikovány požadavky na systém managementu jakosti v případech, kdy organizace potřebuje prokázat svoji schopnost trvale poskytovat výrobek, který splňuje požadavky zákazníka a příslušné požadavky předpisů a kdy má v úmyslu zvyšovat spokojenost zákazníka, a to efektivní aplikací tohoto systému, včetně procesů pro jeho neustálé zlepšování.

Správná laboratorní praxe

ČSN EN ISO 7218 (560103)

Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení

- **všeobecné požadavky a doporučení určené pro**
 - a) **průkaz a stanovení počtu mikroorganismů;**
 - b) **správnou laboratorní praxi v mikrobiologických laboratořích**
 - c) **návod pro akreditaci mikrobiologických laboratoří**

- **Ize využít celou nebo částečně jako specifikující technické požadavky v souladu s Přílohou B normy EN ISO/IEC 17025**

EN ISO 7218

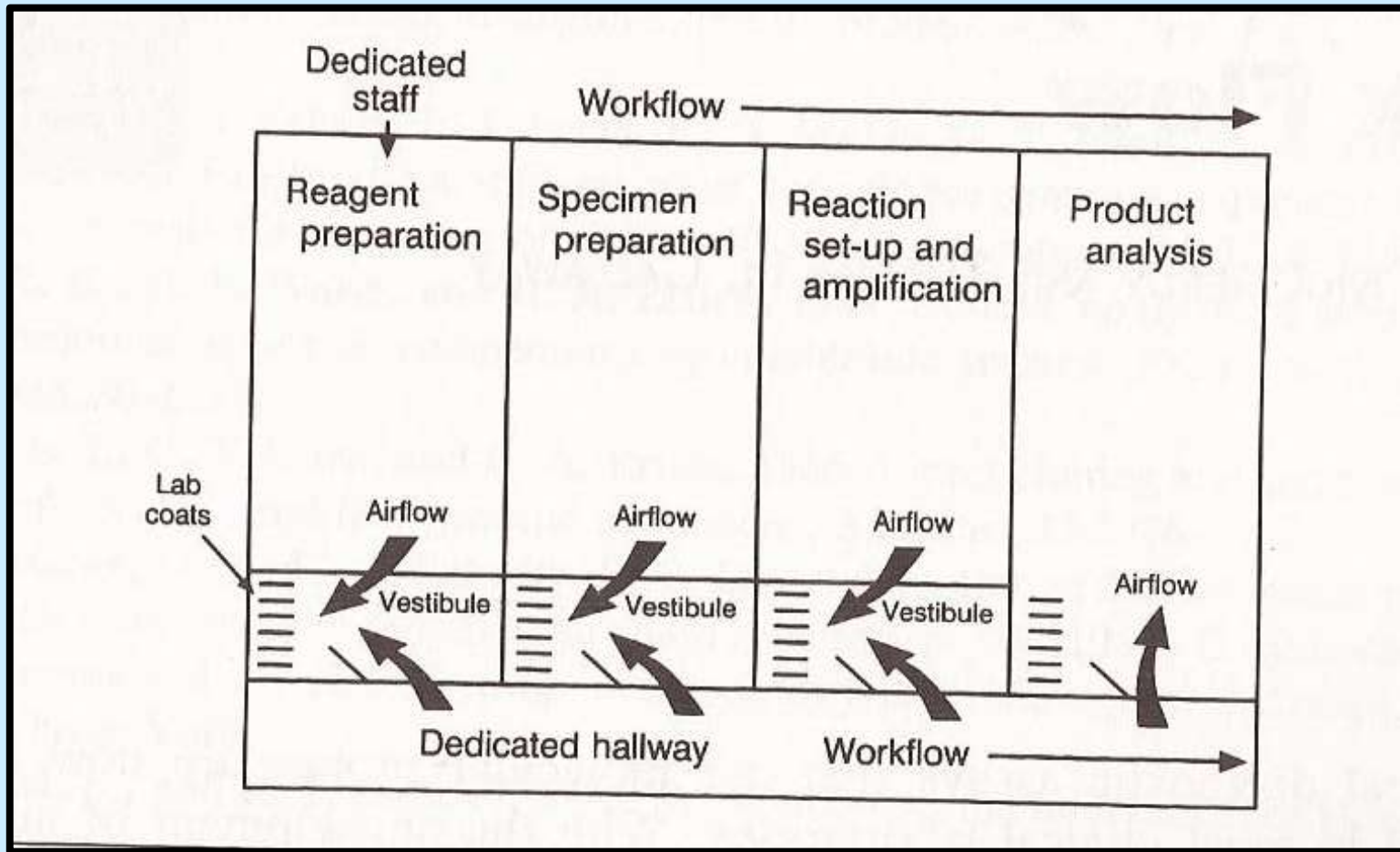
- **kalibrace a ověřování funkčnosti u všech přístrojů a zařízení**
- **u vybraných přístrojů navíc vstupní validace a revalidace**
- **validace mikrobiologických metod**
- **podmínky identifikace cílových mikroorganismů za použití sad miniaturizovaných biochemických testů a genových sond**
- **interní a externí hodnocení kvality**

***Diagnostická laboratoř
provádějící PCR***

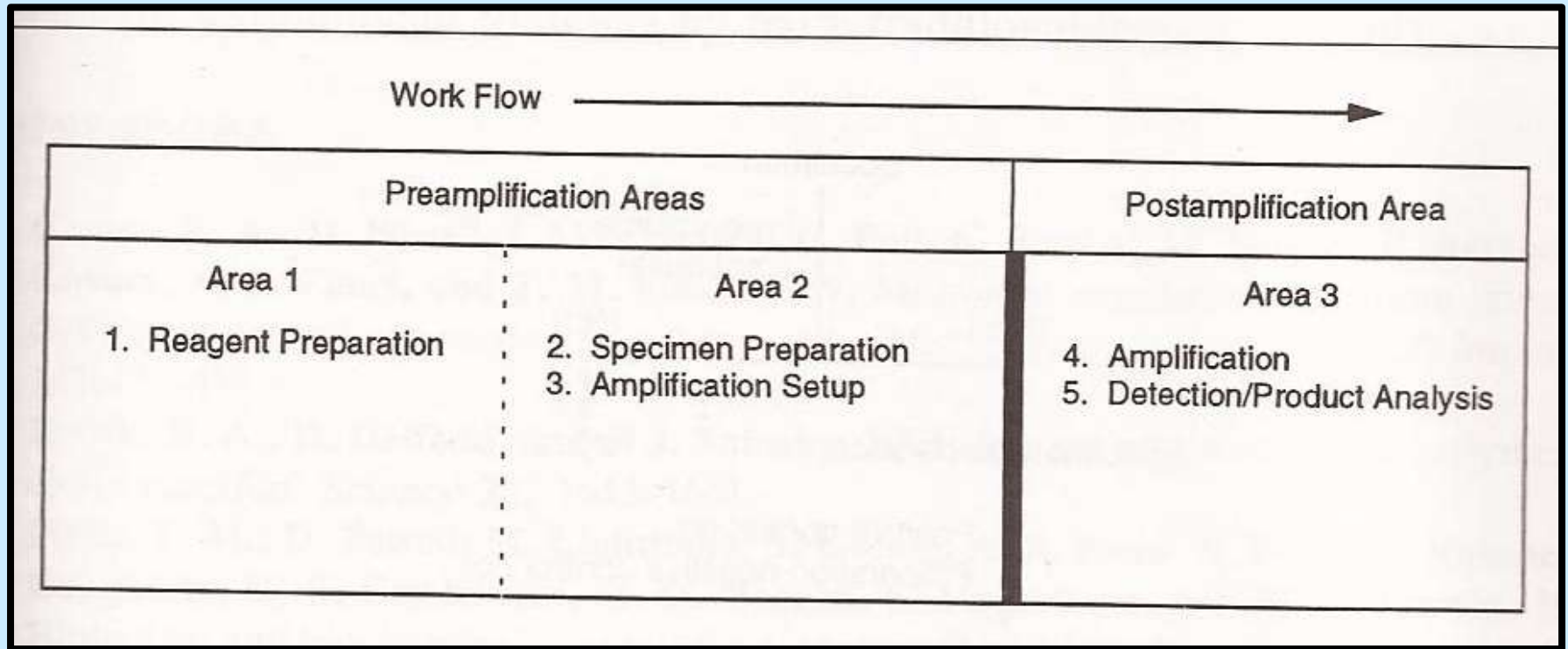
Struktura diagnostické laboratoře

- 1) Příprava reagensií - přetlak**
- 2) Příprava vzorků - přetlak**
- 3) Nastavení reakce a PCR - přetlak**
- 4) Analýza produktů - podtlak**

Work flow v diagnostické laboratoři



Zjednodušené schéma



Základní pravidla

- 1) Fyzické oddělení preamplifikační a postamplifikační zóny**
- 2) Jednosměrný tok práce**
- 3) Pohyb vzorků i osob směrem od prostor bez produktů amplifikace k analytické zóně v rámci pracovního dne**
- 4) Samostatná laboratoř pro přípravu reagensů, jejich alikvotování a uskladnění**
- 5) Minimalizace transportu aerosolů kontrolovaným prouděním vzduchu, vstupy přes dvoje dveře a dekontaminací UV**

Laboratoř přípravy reagensií

**Není nezbytně nutná, pokud se pracuje s
komerčními preparáty**

- **Samostatné vybavení často čištěné a kalibrované**
- **Používání jednorázových pomůcek**
- **Vyrobené MasterMixy testovat na**
 - a) **nepřítomnost kontaminant v alespoň 10 vzorcích**
 - b) **senzitivitu pomocí PK s nízkým počtem maticí**

**V této laboratoři se nesmí skladovat vzorky pozitivních
kontrol!**

Laboratoř přípravy vzorků

Výchozí bod klinického testování

- **Samostatné oblečení a přístrojové vybavení**
- **Je vhodné započít pracovní den v této laboratoři a pak se přesouvat dál po směru toku práce**
- **Práce v biohazard boxech, častá výměna rukavic (dva páry!)**
- **Centrifugy s těsněním proti aerosolům**
- **POZOR na bezpečné uzavření zkumavek při inkubaci!**

V této laboratoři je možno skladovat malá množství zředěných vzorků pozitivních kontrol

Laboratoř nastavení reakce a PCR

Lze využít prostoru v laboratoři pro přípravu vzorků – UV lampa!

- **Pipetování vzorků špičkami s filtrem**
- **Nejprve alikvotovat MasterMix, pak zavřít zkumavky a pak samostatně přidávat DNA ze vzorků**
- **Vzorky, potom PK, potom NK a amplifikační NK**
- **Pozor na aerosoly při otevírání zkumavek (kousky sterilní gázy)!**
- **Pozor na otevření zkumavek během a po PCR**

Pravidelně kontrolujte teplotní parametry termocyklerů!

Laboratoř analýzy produktů

Koncový bod diagnostické laboratoře

- **Žádné dvojité dveře – je zde velký pohyb osob – mohou být pořád otevřené**
- **Podtlaková místnost (negative pressure), výstup ven z budovy**
- **Cokoli, co pochází z této laboratoře je potenciálně kontaminující!**
- **Přístroje se pravidelně otírají 10% okysličovadlem (30 min. expozice) a pak omyty vodou**

Dbejte na dodržování SLP protokolů!

Metody zkoušení

<http://www.szu.cz/metody-zkouseni>

- 1) **Metody pro oblast potravinářství**
- 2) **Testování kosmetických přípravků**
- 3) **Vnitřní ovzduší a prostředí**
- 4) **Metody pro testování antimikrobiální účinnosti předmětů**
- 5) **Metody pro testování účinku dezinfekčních prostředků**

Metody zkoušení

Mezinárodní standardy

ISO (International Organization for Standardization) připravuje dokumenty definující přesné postupy při diagnostikování infekčních agens

ISO 20837: Microbiology of food and animal feeding stuffs – PCR for detection of food-borne pathogens – Requirements for sample preparation for qualitative detection

ISO 20838: Microbiology of food and animal feeding stuffs – PCR for detection of food-borne pathogens – Requirements for amplification and detection for qualitative methods

Další standardy

ČSN 56 0100 (560100)

Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven, 1970

ČSN 57 0101 (570101)

Mikrobiologické zkoušení mléka a mléčných výrobků, 1964

ČSN 57 0155 (570155)

Mikrobiologické zkoušení masa, masných výrobků a masových konzerv, 1965

Mezilaboratorní testy

Organizovány Národními referenčními laboratořemi, Státního zdravotního ústavu „Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti“

<http://www.szu.cz/espt>

Plán zkoušek na rok 2012 najdete na

http://www.szu.cz/uploads/documents/CLC/ESPT/dokumenty/plan_ESPT_2012.pdf

Zjistěte, pro které viry jsou prováděny mezilaboratorní testy?



- 1) **Sérologie – EB virus, cytomegalovirus, lymeská borelióza, HBV, HCV, HIV, respirační viry, enteroviry, HSV, varicella-zoster virus, papilomaviry, herpetické viry, klíšťová encefalitida**
- 2) **DNA – HBV, HCV, cytomegalovirus, HSV, varicella-zoster**



Mezinárodní mezilaboratorní testy






QCMD

<http://www.qcmd.org/>



Quality Control for Molecular Diagnostics

- Nezávislá mezinárodní organizace poskytující kontrolní vzorky pro molekulární diagnostiku původců onemocnění

 Viral EQA	Click to view/hide
 Bacterial EQA	Click to view/hide
 Specialist EQA	Click to view/hide
 Fungal EQA	Click to view/hide
 Parasitic EQA	Click to view/hide

Mezinárodní mezilaboratorní testy

INSTAND

<http://www.instandev.de/>



Institute for Standardization and Documentation in Medical Laboratories



- Píší historii od roku 1936
- Mají vlastní referenční laboratoře

In vitro diagnostické soupravy

Nařízení vlády č. 223/2012

Nařízení vlády, kterým se mění nařízení vlády č. 453/2004 Sb., kterým se stanoví technické požadavky na diagnostické zdravotnické prostředky in vitro, ve znění nařízení vlády č. 246/2009 Sb., č. 67/2011

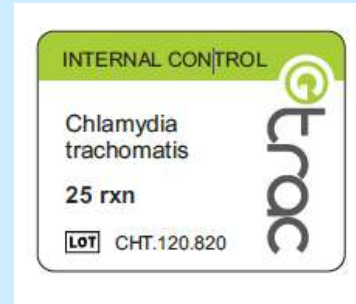
Obsah nařízení vlády č. 453/2004 ve znění 223/2012

**Popisuje, jakým způsobem se vyrábějí tzv.
diagnostické prostředky *in vitro***

- **Kdo může vyrábět**
- **Jaké podmínky výroby musí výrobce dodržet**
- **Jaké jsou podmínky prodeje a sledování výrobku**
- **Jaký je způsob komunikace s notifikovanou osobou a státními orgány**
- **Co dělat, když nastane nějaký problém**

Seznam dokumentace

- Výrobní dokumentace
- Stabilitní studie
- Srovnávací studie
- Základní požadavky
- Analýza rizik
- Postup vyhodnocení výrobku v poprodejní fázi
- Systém hlášení nežádoucích příhod
- Návod k použití
- Bezpečnostní list
- Prohlášení o shodě



**Prohlédněte si předložené
firemní dokumenty, ale mějte na
paměti, že jsou tajné 😊**



Notifikovaná osoba

The image shows a screenshot of a web-based application form from ITC (Institut pro testování a certifikaci, s. r. o.). The form is titled "ŽADOST O POSOUZENÍ SHODY ZDRAVOTNICKÉHO PROSTŘEDKŮ" (Application for conformity assessment of medical devices) and is based on Regulation (EU) 2017/745. The form is divided into several sections:

- ŽADATEL (Applicant):** A table with fields for company name, address, contact information (phone, fax, email), and identification numbers (IČ, Zapsáno u).
- VÝROBEK (Product):** Fields for product name, type, and whether it is an integral part of a device.
- SPECIFIKACE POSTUPU POSOUZENÍ SHODY (Conformity assessment procedure specification):** A table with checkboxes for different assessment procedures (e.g., PT-2, PT-3, PT-4).

Red arrows on the right side of the form point to these three sections, corresponding to the labels in the adjacent text.

← Identifikace žadatele

← Identifikace výrobku

← Specifikace procesu posouzení shody

<http://www.itczlin.cz/>

Poslední úkol: Zjistěte, do jaké kategorie *in vitro* diagnostik patří zmíněná souprava na detekci *Chlamydia trachomatis*



Kategorie D



Další důležité zákony a směrnice I

- 1) Laboratory Biosafety Manual. Second edition. WHO, Geneva 1993.**
- 2) International Regulations for Packaging and Shipping of Microorganisms. European Biological Resource Centres Network 2006.**
- 3) ČSN EN 12740. Biotechnologie – Laboratoře pro výzkum, vývoj a analýzu – Pokyny pro nakládání s odpady, jejich zneškodňování a zkoušení. Červen 2000.**
- 4) Směrnice ministerstva č. 49/1967 Věstníku MZd, o posuzování zdravotní způsobilosti k práci**
- 5) Zákon č. 258/2000 Sb. O ochraně veřejného zdraví ve znění pozdějších právních předpisů (274/2008 Sb.)**
- 6) Nařízení vlády č. 178/2001 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví zaměstnanců při práci, v platném znění.**

Další důležité zákony a směrnice II

- 7) Vyhláška MZ ČR 6/2003 Sb., kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí obytných místností některých staveb.**
- 8) Vyhláška MZ ČR 432/2003 Sb., kterou se stanoví podmínky pro zařazování prací do kategorií, limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů, podmínky odběru biologického materiálu pro provádění biologických expozičních testů a náležitosti hlášení prací s azbestem a biologickými činiteli.**
- 9) Vyhláška MZ ČR 288/2003 Sb., kterou se stanoví práce a pracoviště, které jsou zakázány těhotným ženám, kojícím matkám, matkách do konce 9. měsíce po porodu a mladistvým, a podmínky, za nichž mohou mladiství výjimečně tyto práce konat z důvodu přípravy na povolání**
- 10) Zákon 262/2006 Sb., zákoník práce.**
- 11) Vyhláška č. 537/2006 Sb. o očkování proti infekčním nemocem v platném znění.**

Shrnutí

- 1) Co všechno musí mikrobiologická laboratoř dodržet**
- 2) Úrovně zabezpečení mikrobiologických laboratoří**
- 3) Nakládání s GMM**
- 4) Biologický zákon**
- 5) Akreditace mikrobiologické laboratoře**
- 6) Struktura diagnostické laboratoře pro PCR**
- 7) Metody zkoušení**
- 8) *In vitro* diagnostické soupravy**