



Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
Ústavní lékárna



Návrh pravidelného monitoringu kontaminace zdravotnických zařízení cytotoxickými léčivými v České republice

Souhrn doporučení

PROJEKT 2B06171 (CYTO):

Výzkum profesní zátěže zdravotnických pracovníků nakládajících s cytotoxickými léčivými v chronických prahových a podprahových expozicích

Vypracovali: Mgr. Pavel Odráška
PharmDr. Lenka Doležalová

Lektoři: PharmDr. Šárka Kozáková, MBA
Doc. RNDr. Luděk Bláha, Ph.D.

Pracoviště: Ústavní lékárna
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno



Osnova

1	Souhrn	2
2	Úvod	3
2.1	Systém přípravy a aplikace cytotoxických léčiv v ČR	3
2.2	Distribuce kontaminace na pracovišti	3
3	Navrhovaný systém sledování kontaminace zdravotnických zařízení cytotoxickými léčivy	6
3.1	Cíle monitoringu	6
3.2	Základní charakterizace monitoringu	6
3.3	Metody pro odběr a analýzu vzorků	7
3.4	Vyhodnocování výsledků	8
4	Seznam příloh	10
5	Literatura	10

1 Souhrn

Kontaminace zdravotnických zařízení cytotoxickými léčivy (CL) a související profesní expozice zdravotnických pracovníků začleněných do péče o onkologické pacienty (příprava CL, aplikace CL, péče o pacienty, kteří jsou po chemoterapii) je známým negativním aspektem používání těchto léčiv v rámci chemoterapie nádorových onemocnění. Díky svým nežádoucím vlastnostem se CL řadí mezi nejvýznamnější zástupce tzv. nebezpečných léčiv a jejich používání je vázáno na zvláštní provozní režim s vysokými nároky na zajištění ochrany zdraví zdravotnického personálu při práci. Navzdory všem dosud přijatým bezpečnostním opatřením však úniku CL do pracovního prostředí nelze zabránit, a proto problém profesní expozici nemocničních pracovníků CL zůstává stále aktuální.

Za účelem hodnocení bezpečnosti práce na pracovištích s CL navrhujeme zavést pravidelný monitoring jejich kontaminace vybraným léčivem. S přihlédnutím k poznatkům o distribuci CL v pracovním prostředí by měl být tento monitoring založen na sledování kontaminace povrchu vybraného vybavení pracoviště. Na základě výsledků a zkušeností získaných v průběhu řešení projektu CYTO (grant MŠMT, NPVII - 2B06171) navrhujeme provádět pravidelný monitoring 2x za rok na všech základních nemocničních pracovištích (nemocniční lékárna, chemoterapeutický stacionář a lůžková oddělení). Ve vzorcích stěrů z povrchů navrhujeme analyzovat obsah cyklofosfamidu (často užívané CL s karcinogenními vlastnostmi, jeho výskyt v pracovním prostředí je opakovaně prokazován, existují metody pro jeho stanovení).

Navrhovaný monitoring poskytne vedoucím pracovníkům praktický nástroj pro hodnocení bezpečnosti svého pracoviště, který lze uplatnit například při zařazování jednotlivých prací do kategorií. Pro řadové pracovníky přináší monitoring možnost aktivně sledovat míru a vývoj kontaminace pracoviště a také porovnat své výsledky s výsledky ostatních pracovišť monitorovaných na území České republiky. Zaměstnavatelé budou



schopni vyhodnocovat efektivnost využívaných postupů a ochranných opatření a posuzovat vhodnost zavedení dodatečných opatření. Z dlouhodobého hlediska tak vlastní monitoring přispěje ke zvýšení bezpečnosti práce ve zdravotnických zařízeních, kde se nakládá s CL.

2 Úvod

2.1 Systém přípravy a aplikace cytotoxických léčiv v ČR

Systém přípravy a aplikace CL vychází z platné legislativy ČR. Požadavky a podmínky pro přípravu sterilních léčivých přípravků skupiny CL jsou dány vyhláškou č. 84/2008 Sb., kterou se stanoví správná lékárenská praxe. Dle této vyhlášky musí být individuální příprava CL prováděna v podtlakových bezpečnostních boxech s vertikálním laminárním prouděním umístěných v prostorách, které jsou určeny speciálně pro tento účel a které splňují předepsané požadavky na čistotu vzduchu v místnosti. V praxi je tato podmínka řešena prováděním přípravy CL v čistých prostorách specializovaných (nemocničních) lékáren disponujících potřebným technickým zařízením. V souvislosti se zavedením tohoto požadavku došlo k centralizaci přípravy CL a k přesunu nejvíce rizikových činností souvisejících s manipulací s CL z jednotlivých nemocničních oddělení do kontrolovaných prostor nemocniční lékárny. Vstup a pohyb osob v prostorách pro přípravu CL musí být zaznamenáván s cílem kontrolovat dobu strávenou jednotlivými pracovníky v kontrolovaném pásmu. Za účelem zajištění čistoty prostředí a ochrany pracovníka je pobyt v přípravně CL striktně podmíněn používáním všech předepsaných osobních ochranných pracovních prostředků (pracovní kombinéza, jednorázové rukavice, rouška, pokrývka hlavy).

Aplikace CL je prováděna jednak na lůžkových odděleních a především pak ambulantně na chemoterapeutických stacionářích. Transport CL mezi nemocniční lékárnou a aplikačním oddělením musí probíhat v uzavřených a nárazu odolných boxech, jejichž používáním se předchází možným haváriím a únikům CL do prostředí. Aplikace CL pacientům je realizována prostřednictvím infuze, bolusové injekce nebo ve formě tablet. Zdravotníci zajišťující aplikaci CL na odděleních mimo lékárnu běžně používají jako ochranné pomůcky jednorázové rukavice.

2.2 Distribuce kontaminace na pracovišti

Stejně jako studie publikované v zahraniční literatuře tak i výzkumy realizované v rámci ČR dokládají častou přítomnost různých CL zejména na povrchu rozmanitého vybavení pracovišť zajišťujících přípravu a aplikaci těchto léčiv. Pikogramy až nanogramy jednotlivých cytostatik na cm^2 byly nalezeny na podlahách, pracovních pultech, policích, dveřích, telefonech a počítačových klávesnicích [1-5], na použitých ochranných rukavicích, ložním prádle pacientů, hygienických zařízeních [6-8] a také na obalech léčivých přípravků odebíraných od výrobců [9-11]. Přítomnost cytostatik v pracovním ovzduší byla v porovnání



s povrchovou kontaminací pozorována jen v malém počtu případů a v nízkých koncentracích čítajících nejvíce několik nanogramů až mikrogramů na m³ [12-14].

K obdobným výsledkům dospěli i řešitelé projektu CYTO zabývající se profesní expozicí CL na území České republiky. Na modelovém případě pracoviště Masarykova onkologického ústavu byla na odděleních vyznačujících se intenzivním nakládáním s CL (nemocniční lékárna a chemoterapeutický stacionář) pozorována častá povrchová kontaminace (viz. tabulka 1) [15]. Kontaminace pracovního ovzduší byla pozorována pouze ojediněle. Nízké hladiny par cyklofosfamidů (0,3 – 4,3 ng/m³) byly zjištěny na pracovišti chemoterapeutického stacionáře. Přítomnost aerosolů obsahujících CL nebyla doložena na žádném ze sledovaných nemocničních pracovišť [16].

Na základě informací o distribuci znečištění pracovního prostředí a informací o fyzikálních vlastnostech CL se v současné době za nejvýznamnější typ příjmu považuje expozice dermální [6, 13, 17]. V souvislosti s tímto zjištěním se v rámci sledování kontaminace pracovního prostředí jeví nejvíce opodstatněnou analýza povrchové kontaminace.

Hlavními zdroji kontaminace pracoviště a potažmo i expozice CL jsou především následující činnosti:

1. Otevřená manipulace s CL

- příprava CL – rozpouštění, ředění a zejména pak transport léčiv do konkrétních aplikačních forem
- vytlačování vzduchu z injekčních stříkaček s obsahem CL
- napouštění infuzních setů roztokem s obsahem CL
- odpojování infuzních setů po ukončení aplikace a likvidace
- operace s orálně podávanými CL (tabletami)
- provádění některých speciálních operativních typů aplikace (např. intraperitoneální podání CL)

2. Manipulace s kontaminovaným materiálem

- obaly s nízkou kontaminací (krabičky a vialky HVLP)
- obaly s vysokou kontaminací (CL připravená v prostředí bezpečnostního boxu pomocí tradiční techniky využívající pro přenos CL injekční stříkačku a jehlu)
- manipulace s pacienty, jejich exkremty či ložním prádlem
- manipulace s odpadem vznikajícím při přípravě a aplikaci CL



Tabulka 1: Střední (mediánové) hodnoty zjištěných koncentrací cyklofosfamidu a platiny na sledovaných plochách jednotlivých nemocničních oddělení (údaje v závorkách určují poměr vzorků, u kterých byly hodnoty vyšší než limit detekce (LOD), k celkovému počtu analyzovaných vzorků)

Vzorek	Platina	Cyklofosfamid
	ng / vzorek	
Denní stacionář		
Pracovní stůl (30 x 30 cm)	33 (7/7)	21 (7/7)
Telefon, myš, inf. pumpa	21 (7/7)	53 (7/7)
Podlaha - stacionář (30 x 30 cm)	480 (7/7)	650 (6/7)
Podlaha - toaleta (30 x 30 cm)	680 (7/7)	380 (7/7)
Lůžkové oddělení		
Pracovní stůl (30 x 30 cm)	< 2,5 (2/7)	< 2,5 (2/7)
Telefon, myš, klika	< 2,5 (1/7)	< 2,5 (2/7)
Podlaha - sesterna (30 x 30 cm)	5,8 (7/7)	< 2,5 (2/7)
Podlaha na pokoji (30 x 30 cm)	36 (6/7)	< 2,5 (1/7)
Nem. lékárna - sklad cytostatik		
Pracovní stůl (30 x 30 cm)	< 2,5 (1/7)	< 2,5 (2/7)
Telefon, myš, klika	< 2,5 (0/7)	< 2,5 (3/7)
Podlaha (30 x 30 cm)	< 2,5 (1/3)	< 2,5 (0/3)
Nem. lékárna - přípravná cytostatik		
Pracovní stůl (30 x 30 cm)	9,4 (7/7)	65 (7/7)
Telefon, klika	10 (7/7)	58 (7/7)
Podlaha (30 x 30 cm)	8,2 (7/7)	52 (6/7)
Izolátor (30 x 30 cm)	60 (3/3)	1200 (3/3)



3 Navrhovaný systém sledování kontaminace zdravotnických zařízení cytotoxickými léčivy

3.1 Cíle monitoringu

Cílem navrhovaného monitoringu je zavedení pravidelného sledování koncentrací CL v prostředí jako nástroje pro ověření míry kontaminace zdravotnických zařízení, ve kterých se cytostatika používají. Provádění monitoringu umožní jednotlivým pracovištím kontrolu účinnosti bezpečnostních opatření používaných pro omezování úniku CL do prostředí. Informace o výši kontaminace umožní plánování a přijímání nových opatření a uplatní se také při udržování obezřetnosti zdravotnického personálu při práci s CL. Mimoto každému pracovišti poskytne možnost hodnocení vývoje své kontaminace v čase a také srovnání svých výsledků s výsledky ostatních monitorovaných pracovišť. V případě potřeby (např. při výskytu zdravotních problémů, při zjištění zvýšených hladin CL aj.) lze používané analytické metody využít i jako nástroj pro identifikaci příčin problému (zdrojů kontaminace).

Navrhovaný monitoring poskytne praktický nástroj pro plnění nařízení vlády 361/2007 Sb., které mimo jiné stanovuje zaměstnavateli povinnost zavést vhodné analytické postupy pro měření chemických karcinogenů v pracovním prostředí (§10). Monitoring také umožní naplnit zákon č. 309/2006 Sb., v jehož rámci je zaměstnavateli ustanovena povinnost pravidelně (a dále bez zbytečného odkladu vždy, pokud dojde ke změně podmínek práce) měřením zjišťovat a kontrolovat hodnoty rizikových faktorů (§7), a také zákon č. 262/2006 Sb. (Zákoník práce), kterým se mimo jiné ustanovuje zaměstnavateli povinnost vytvářet bezpečné a zdravé neohrožující pracovní prostředí, soustavně vyhledávat nebezpečné činitele a vyhodnocovat rizika z nich plynoucí (§102).

3.2 Základní charakterizace monitoringu

Navrhovaný systém monitoringu spočívá v pravidelném sledování povrchové kontaminace všech úseků, v jejichž rámci dochází k manipulaci s CL. V rámci standardního zdravotnického zařízení se jedná o nemocniční lékárnu, chemoterapeutický stacionář a lůžková oddělení zajišťující komplexní péči o pacienty s indikovanou chemoterapií. Základní rámec monitoringu se opírá o stanovení vybraného CL (cyklofosfamidu) na určitém počtu přesně definovaných míst s periodicitou 2-krát ročně. Mezi standardně sledované povrchy doporučujeme zařadit následující odběrová místa:

Nemocniční lékárna – prostory pro manipulaci s nízkou kontaminovaným materiálem (příjem, sklad, vstupní materiálová propust přípravní CL) - dvě odběrová místa:

- plocha pracovního stolu pro příjem CL od dodavatele
- podlaha před tímto stolem

Nemocniční lékárna – prostory pro manipulaci s vysoce kontaminovaným materiálem (přípravní CL, výstupní materiálová propust přípravní CL) - dvě odběrová místa:

- plocha pracovního stolu pro odkládání/balení připravených CL



- podlaha před tímto stolem

Chemoterapeutická ambulance - tři odběrová místa:

- plocha pracovního stolu, na kterém probíhá přejímání připravených CL
- podlaha pod infuzním stojanem
- příruční stolek u infuzního křesla nebo opěradlo tohoto křesla

Lůžkové oddělení - tři odběrová místa:

- plocha pracovního stolu, na kterém probíhá přejímání připravených CL
- podlaha pod infuzním stojanem v místě aplikace CL
- podlaha místnosti pro čištění ložních nádob na moč a stolicí

Uvedený výčet ploch shledáváme základním minimem pro racionální hodnocení kontaminace uvedených pracovišť. Kontaminace uvedených odběrových míst se vyhodnocuje zvlášť, případně je možné v rámci minimalizace finančních nákladů spojených s monitoringem vyhodnocovat pouze průměrnou kontaminaci pracoviště prováděním analýz u směsných vzorků. Výchozím předpokladem pro zajištění srovnatelnosti výsledků v rámci různých odběrových kampaní či různých pracovišť je provádění odběru vzorků vždy ve stejném rozsahu, tj. zastoupení vzorkovacích míst musí být vždy stejné. Výběr míst vychází z poznatků o distribuci CL v pracovním prostředí shrnutých v předchozích kapitolách a navazuje na zkušenosti z výzkumných a monitorovacích prací prováděných v rámci projektu CYTO v letech 2008-2010.

Cyklofosfamid byl jako ukazatel kontaminace CL vybrán z následujících důvodů. Toto CL patří mezi léčiva s vysokou spotřebou (má široké uplatnění a je používán ve vysokých koncentracích). Jde též o prokázaný lidský karcinogen, tudíž i z hlediska profesní hygieny je sledování tohoto CL plně relevantní. Z hlediska analytického stanovení se pak jedná o látku relativně snadno měřitelnou, neboť disponuje vysokou chemickou stabilitou a dobrou rozpustností ve vodných rozpouštědlech. Její stanovení je zpravidla vázáno na citlivé analytické metody založených na hmotnostní spektrometrii ve spojení s kapalinovou nebo plynovou chromatografií.

V případě potřeby či zájmu ze strany monitorovaného pracoviště může být základní rámec měření rozšířen o další odběrové lokality nebo o analýzy dalších CL (dle dostupnosti analytických metod - např. stanovení platiny jako markeru platinových cytostatik, fluorouracilu apod.). Toto rozšíření by se mělo týkat především pracovišť, která s daným CL (cyklofosfamidem) nemanipulují nebo ho užívají pouze v omezené míře (množství připraveného/spotřebovaného cyklofosfamidu je například nižší než 5 dávek/aplikací týdně a příspěvek cyklofosfamidu k celkovému množství připravených/podaných chemoterapií je zároveň menší než 10 %).

3.3 Metody pro odběr a analýzu vzorků

Odběr vzorků spadá do kompetence příjemce/uživatele výsledků (vedoucí pracovník monitorovaného pracoviště resp. pověřený vzorkovací technik apod). Metoda pro odběr je



založena na setření povrchu vybraného objektu stěrkou z netkané textilie navlhčenou ve vodném roztoku octanu amonného (20 mM, pH = 4). Pokud to daný objekt umožňuje, je vzorek odebrán z plochy 30 x 30 cm. Pracovní postup obsahující všechny potřebné informace pro odběr vzorků byl zpracován ve formě standardního operačního postupu uvedeného v příloze 1. Pro názornou demonstraci pracovního postupu bylo vytvořeno instruktážní video, které je dostupné na internetových stránkách projektu (www.cytostatika.cz).

Realizace odběru je plánována na den s přibližně průměrnou intenzitou provozu a samotný odběr by měl být prováděn až na závěr pracovního dne před sanitací (odběr vzorků před sanitací lépe vypovídá o tom, jaká kontaminace se za daný den může nashromáždit a s jakou maximální expozicí personálu je nutno počítat). Odběr vzorků je dokumentován vyplněním odběrového protokolu, který shromažďuje informace ohledně monitorovaného pracoviště, osoby realizující vzorkování, termínu vzorkování a předmětu měření (charakteristika vzorkovaných míst a pracoviště). Předlohu odběrového protokolu uvádí příloha 3.

Transport vzorků do analytických laboratoří by měl být zajištěn ihned po jejich odběru. Vhodnou formou doručení je například služba EMS zajišťovaná Českou poštou, která garantuje dodání zásilek do 14. hodiny následujícího dne. Během transportu je nutno vzorky udržovat v chladném prostředí (např. polystyrenový termobox s chladičími vložkami).

Standardizované metodiky pro zpracování vzorků a stanovení cyklofosfamidu a platiny jsou uvedeny v přílohách 1 a 2. Analýzy vzorků mohou formou dodávek zajišťovat laboratoře, které disponují danou nebo obdobnou měřicí technikou pro kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii.

3.4 Vyhodnocování výsledků

Výsledky měření je vhodné udávat v koncentračních jednotkách. V odborné literatuře je nejběžnějším typem vyjadřování těchto dat pg/cm^2 . Používání těchto jednotek umožňuje lepší srovnávání výsledků z různě velkých ploch. Pro porovnávání jednotlivých výsledků monitoringu (porovnávání dat z jednotlivých kampaní v rámci daného pracoviště či porovnávání dat z různých pracovišť) pak doporučujeme odvozovat hodnotu průměrné kontaminace sledovaných objektů na daném úseku.

Vzhledem k vysoce komplexnímu charakteru problému profesní expozice CL (látky s bezprahovým účinkem, přijímané dermální cestou, kombinovaná expozice směsi CL) je velmi nepravděpodobné, že by se v dohledné době podařilo uspokojivě vyřešit otázku nastavení hygienických limitů pro expozici CL na základě informací o jejich toxicitě. V současné době je řízení rizik práce s těmito látkami založeno na principu předběžné opatrnosti, který spočívá v usilování o dosažení nejnižší možné míry kontaminace prostředí a expozice pracovníků s přihlédnutím na existující a reálně dostupné technické a organizační prostředky.

Na základě znalostí koncentrací na různých pracovištích lze však pro pracoviště s CL navrhnout limity, které jsou s pomocí aktuálně používaných opatření pro zabezpečení ochrany

zdraví pracovníků reálně dosažitelné a které současně nebudou připouštět neopodstatněně vysoké hodnoty nejvíce znečištěných pracovišť. Smyslem tohoto systému je vyvinout tlak na pracoviště s nejvyšší kontaminací, aby tuto kontaminaci snížila na úroveň ostatních pracovišť. Vzhledem k rozdílům v kontaminaci jednotlivých nemocničních úseků (nemocniční lékárna, lůžková oddělení, chemoterapeutické stacionáře), které jsou dány rozdílným charakterem prováděných činností a rozdílnými zdroji kontaminace, doporučujeme stanovovat limity pro jednotlivé úseky zvlášť.

Tento princip byl nedávno navržen Dr. Rudolfem Schierlem, který tímto způsobem navrhl limity kontaminace platinou a 5-fluorouracilem pro nemocniční lékárny v Německu [18]. Pro své závěry využil výsledky ze studie, v rámci které zkoumal kontaminaci 10 vybraných míst ve 102 nemocničních lékárnách. Tento autor navrhuje odvození horního limitu koncentrace daného CL od hodnoty 75. percentilu koncentrací zjištěných v rámci provedené studie. Koncentrace překračující tuto hodnotu by podle Dr. Schierla měly být signálem potřeby optimalizace postupů práce s CL na daném pracovišti.

Obdobný postup byl použit pro odvození doporučených limitů kontaminace pracovního prostředí nemocničních lékáren cyklofosfamidem a platinou (pro ostatní nemocniční oddělení prozatím neexistuje dostatečně reprezentativní množství dat). Data použitá pro odvození limitu byla naměřena během monitoringu zdravotnických zařízení provedeného v rámci řešeného projektu CYTO. Během této studie byly realizovány 4 vzorkovací kampaně, v rámci kterých bylo analyzováno celkem 330 vzorků na obsah cyklofosfamidu a 239 vzorků na obsah platiny. Vzorky hodnocené ve studii pocházely z celkem 20 různých nemocničních lékáren. Sumární prezentace frekvenční distribuce koncentrací obou analytů ve skladu CL a v přípravně CL je uvedena v tabulce 2 (cyklofosfamid) a 3 (platina). Výsledné doporučené limity (průměrné) povrchové kontaminace skladu a přípravní CL cyklofosfamidem a platinou jsou v daných tabulkách vyznačeny tučně a jsou dány 75. percentilem průměrné kontaminace jednotlivých pracovišť.

Tabulka 2: Kontaminace sledovaných provozních úseků nemocniční lékárny cyklofosfamidem (pg/cm²)

Pracoviště	Objekt	n	Pozitivní (%)	50. Percentil	75. Percentil	90. Percentil	Maximu m
Sklad CL	Stůl - příjem CL	66	29	<2	9	85	4400
	Podlaha	66	26	<2	2	100	240
	Průměrná konc.	66	28	<2	4	95	2200
Přípravná CL	Stůl - balení CL	67	64	10	140	420	4400
	Podlaha	66	58	3	50	210	640
	Madlo lednice	65	49	<2	29	120	400
	Průměrná konc.	67	63	9	67	260	1700

Tabulka 3: Kontaminace sledovaných provozních úseků nemocniční lékárny platinou (pg/cm²)

Pracoviště	Objekt	n	Pozitivní (%)	50. Percentil	75. Percentil	90. Percentil	Maximum
Sklad CL	Stůl - příjem CL	48	44	<0,2	4,1	15,1	7340,0
	Podlaha	48	58	0,5	1,9	14,9	57,2
	Průměrná konc.	48	60	0,5	4,0	17,5	3700,0
Přípravna CL	Stůl - balení CL	48	75	5,2	14,7	50,6	3300,0
	Podlaha	48	60	0,6	4,2	13,6	60,3
	Madlo lednice	47	64	1,0	7,5	13,2	22,9
	Průměrná konc.	48	88	3,6	11,6	25,2	1150

4 Seznam příloh

Příloha 1 – Stanovení cyklofosfamidu ve stěrech pracovního prostředí (standardní operační postup)

Příloha 2 – Stanovení platiny ve stěrech pracovního prostředí (standardní operační postup)

Příloha 3 – Odběrový protokol

5 Literatura

1. Sessink, P.J.M., et al., *Occupational Exposure to Antineoplastic Agents at Several Departments in a Hospital - Environmental Contamination and Excretion of Cyclophosphamide and Ifosfamide in Urine of Exposed Workers*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 1992. **64**(2): p. 105-112.
2. Micoli, G., et al., *Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. Journal of Chromatography B, 2001. **750**(1): p. 25-32.
3. Hedmer, M., B.A.G. Jonsson, and O. Nygren, *Development and validation of methods for environmental monitoring of cyclophosphamide in workplaces*. Journal of Environmental Monitoring, 2004. **6**(12): p. 979-984.
4. Mason, H.J., et al., *Exposure to antineoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units*. Annals of Occupational Hygiene, 2005. **49**(7): p. 603-610.
5. Odrážka, P., et al., *Monitoring povrchové kontaminace cytotoxickými léčivými v nemocničních lékárnách České republiky*. Česká a slovenská farmacie, 2009. **58**(5-6): p. 225-229.
6. Sessink, P.J.M., et al., *Environmental Contamination and Assessment of Exposure to Antineoplastic Agents by Determination of Cyclophosphamide in Urine of Exposed*



- Pharmacy Technicians - Is Skin Absorption an Important Exposure Route.* Archives of Environmental Health, 1994. **49**(3): p. 165-169.
7. Fransman, W., R. Vermeulen, and H. Kromhout, *Occupational dermal exposure to cyclophosphamide in Dutch hospitals: A pilot study.* Annals of Occupational Hygiene, 2004. **48**(3): p. 237-244.
 8. Fransman, W., R. Vermeulen, and H. Kromhout, *Dermal exposure to cyclophosphamide in hospitals during preparation, nursing and cleaning activities.* International Archives of Occupational and Environmental Health, 2005. **78**(5): p. 403-412.
 9. Nygren, O., et al., *Cisplatin contamination observed on the outside of drug vials.* Annals of Occupational Hygiene, 2002. **46**(6): p. 555-557.
 10. Mason, H.J., et al., *Cytotoxic drug contamination on the outside of vials delivered to a hospital pharmacy.* Annals of Occupational Hygiene, 2003. **47**(8): p. 681-685.
 11. Connor, T.H., et al., *Surface contamination of chemotherapy drug vials and evaluation of new vial-cleaning techniques: Results of three studies.* American Journal of Health-System Pharmacy, 2005. **62**(5): p. 475-484.
 12. Minoia, C., et al., *Application of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in the environmental and biological monitoring of health care personnel occupationally exposed to cyclophosphamide and ifosfamide.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998. **12**(20): p. 1485-1493.
 13. Kromhout, H., et al., *Postulating a dermal pathway for exposure to anti-neoplastic drugs among hospital workers.* Ann Occup Hyg, 2000. **44**(7): p. 551-560.
 14. Kiffmeyer, T., et al., *Vapour pressures, evaporation behaviour and airborne concentrations of hazardous drugs: implications for occupational safety.* The Pharmaceutical Journal, 2002. **268**: p. 331-337.
 15. Doležalová, L., et al., *Studium kontaminace pracovišť a profesionální expozice zdravotnických pracovníků zajišťujících přípravu a aplikaci protinádorových léčiv.* Pracovní lékařství, 2009. **61**(3): p. 117-122.
 16. Odráška, P., et al. *Monitoring profesní expozice cytotoxickým léčivům na pracovištích zajišťujících přípravu a aplikaci chemoterapie.* in *Edukační sborník - XXXIII. Brněnské onkologické dny, ISBN 978-80-86793-15-3.* 2010. Brno.
 17. Fransman, W., et al., *Inhalation and dermal exposure to eight antineoplastic drugs in an industrial laundry facility.* International Archives of Occupational and Environmental Health, 2007. **80**(5): p. 396-403.
 18. Schierl, R., A. Bohlandt, and D. Nowak, *Guidance Values for Surface Monitoring of Antineoplastic Drugs in German Pharmacies.* Annals of Occupational Hygiene, 2009. **53**(7): p. 703-711.

Příloha 1 – Stanovení cyklofosfamidu ve stěrech pracovního prostředí
(kompletní informace k metodě včetně validačního protokolu a standardního
operačního postupu)

Metoda č.: W4001

Koncentrační rozsah: 1,8 – 1600 ng/stěr (2,0 – 1780 pg/cm² při vzorkování plochy 900 cm²)

Popis metody: Vzorky z předem vybraných a prostorově vymezených ploch jsou odebrány ručně za použití stěrek z netkané textilie. Ty jsou poté extrahovány v acetátovém pufru na ultrazvukové lázni a takto připravené vzorky jsou analyzovány pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s detekcí na tandemovém hmotnostním spektrometru.

Limit kvantifikace: 6,0 ng/stěr (6,7 pg/cm² při vzorkování plochy 900 cm²)

Status metody: Částečně validována. Metoda byla podrobena podrobnému přezkoumání zaměřeným na charakterizaci její opakovatelnosti a výtěžnosti.

Datum vypracování: 4.11.2008

Datum doplnění: 26.11.2010

Vypracoval: Mgr. Pavel Odráška

Adresa pracoviště: Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
Ústavní lékárna
Projekt CYTO

1. Obecné informace

1.1. Úvod do problému

1.1.1. Význam metody

Profesní expozice cytotoxickým léčivům (CL) je v současnosti vnímána jako negativní problém neoddelitelně spojený s oblastí poskytování zdravotní péče onkologickým pacientům. Zdravotnický personál může být exponován obecně třemi způsoby: inhalací cytostatik ve formě aerosolu nebo par, dermálním kontaktem a náhodnou ingescí v důsledku havárie nebo při nedůsledném dodržování hygienických pravidel. S ohledem na současné poznatky o distribuci kontaminace na onkologických pracovištích lze za hlavní z jmenovaných expozičních cest označit příjem dermální. Toto tvrzení vychází z četných zpráv o výskytu různých cytostatik na povrchu běžného vybavení pracovišť zajišťujících přípravu i aplikaci těchto léčiv pacientům. Právě na sledování tohoto typu kontaminace je uváděná metoda zaměřena.

Tato metoda umožňuje kontrolovat úroveň kontaminace pracovního prostředí jedním velmi často používaným cytostatikem – cyklofosfamidem. Z literatury víme, že toto cytostatikum je obecně nejčastěji sledovaným markrem kontaminace. K přednostem této sloučeniny patří poměrně vysoká stabilita a dobré fyzikálně-chemické vlastnosti umožňující analýzu pomocí metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

1.1.2. Nebezpečné vlastnosti cytotoxických léčiv

Z možných akutních vedlejších účinků cytostatik pozorovaných při aplikaci těchto léčiv onkologickým pacientům lze uvést např. bolesti břicha, kašel, závratě, kožní vyrážky, padání vlasů, zvracení nebo průjem. U zaměstnanců byla z akutních projevů působení CL pozorována například kožní vyrážka. Symptomy akutní expozice jsou spojeny s relativně vysokými dávkami CL, jejichž příjem lze očekávat jen výjimečně (např. při mimořádných událostech jako jsou havárie spojené s únikem CL).

Hlavní nebezpečí doprovázející práci s cytostatiky však plyne z chronického působení těchto látek přijímaných dlouhodobě v nízkých dávkách v důsledku stopové kontaminace pracovního prostředí. S přibývajícimi lety výkonu takového povolání pak roste riziko projevu některého z dalších účinků těchto látek jako je genotoxicita, karcinogenita, vývojová nebo reprodukční toxicita.

1.1.3. Profesní expozice

S ohledem na nebezpečné vlastnosti CL je práce s těmito látkami shledávána jako riziková. Chemické látky s karcinogenními účinky řadíme mezi faktory s bezprahovým účinkem, jinými slovy: u těchto látek nelze definovat bezpečnou míru expozice, která by neohrožovala zdraví ovlivněných osob. Ohledně kontaminace pracovního prostředí takto působícími látkami je obecně přijímán

názor, že expozice zasažených osob by měla být snížena na co nejnižší (reálně možnou) úroveň.

Kontaminace CL byla doložena na všech pracovištích začleněných do přípravy CL nebo aplikace CL. Nanogramy až mikrogramy CL (nejčastěji cyklofosfamidu) na m³ byly zjištěny ve vnitřním ovzduší připraven i lůžkových oddělení. Nejčtenější jsou pak zprávy o kontaminaci různého vybavení klinik. CL lze běžně nalézt na podlahách, pracovních pultech, policích, dveřích, telefonech a počítačových klávesnicích, použitých ochranných rukavicích, ložním prádle pacientů, hygienických zařízeních a také na obalech léčivých přípravků odebíraných od výrobců.

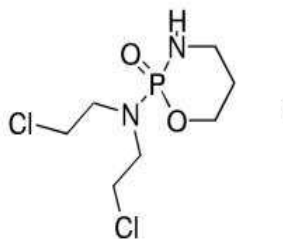
1.1.4. Fyzikální vlastnosti cyklofosfamidu

CAS kod:	6055-19-2	tenze par:	3,3 mPa
mol. hmotnost:	279.10 g/mol	teplota vzplanutí:	113 °C
bod varu:		zápach:	ne
bod tání:	49-51 °C	hustota:	
vzhled:	bílá, krystalická látka	uchovávání:	2-8 °C
rozpustnost:	čirý, bezbarvý 0,1 g/ml H ₂ O		

synonyma: N,N-Bis(beta-chloroethyl) N'-O-propylenphosphorildiamid monohydratum (Romanian) * 2-(Bis(2-chloroethyl)amino)-1-oxa-3-aza-2-phospho cyclohexane 2-oxide monohydrate * 1-Bis(2-chloroethyl)amino-1-oxo-2-aza-5-oxaphosphoridine monohydrate * (Bis(chloro-2-ethyl)amino)-2-tetrahydro-3,4,5,6- oxazaphosphorine-1,3,2-oxide-2 monohydrate * Bis(2-chloroethyl)phosphoramidate cyclic propanolamide ester monohydrate * N,N-Bis(beta-chloroethyl)-N',O-propylenephosphoric acid ester amide monohydrate * N,N-Bis(2-chloroethyl)tetrahydro-2H-1,3,2-oxaphosphorin-2-amine, 2-oxide monohydrate * N,N-Bis(beta-chloroethyl)-N',O-trimethylenephosphoric acid ester diamide monohydrate * Cyclic N',O-propylene ester of N,N-bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic acid monohydrate * Cyclophosphamide hydrate * Cyclophosphamide monohydrate * 2-(Di(2-chloroethyl)amino)-1-oxa-3-aza-2-phosphacyclohexane-2-oxide monohydrate * N,N-Di(2-chloroethyl)amino-N,O-propylenephosphoric acid ester diamide monohydrate * Endoxan monohydrate

sumární vzorec: C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P

strukturní vzorec:



1.2. Parametrická charakteristika metody

1.2.1. Limit detekce

Detekční limit metody zahrnující zpracování vzorku je 1,8 ng/vzorek (2,0 pg/cm² při vzorkování plochy 900 cm²). Toto je nejmenší množství cyklofosfamidu ve vzorku, jehož analytický signál je ještě spolehlivě odlišitelný od signálu slepého vzorku (trojnásobek šumu signálu detektoru). (Více v kapitole 6.1)

1.2.2. Limit kvantifikace

Limit kvantifikace činí 6,0 ng/vzorek (6,7 pg/cm² při vzorkování plochy 900 cm²). Toto je nejmenší množství cyklofosfamidu nanesené na stěrku, které již lze kvantitativně stanovit (10-ti násobek šumu signálu detektoru). (Více v kapitole 6.1)

1.2.3. Výtěžnost

Průměrná výtěžnost metody zahrnující zpracování vzorku činí 93 %. Nejvyšší výtěžnost je dosahována u vzorků s vyšším množstvím analytu (nad 1 µg/vzorek). (Více v kapitole 6.3)

1.2.4. Účinnost vzorkování

Účinnost vzorkování pomocí vybraných materiálů a roztoků činí 104 %. Jedná se o procentuální množství cyklofosfamidu setřeného z modelového povrchu z nerezové oceli s přesně definovanou kontaminací. (Více v kapitole 6.4)

1.2.5. Krátkodobá opakovatelnost (intradenní)

Relativní směrodatné odchylky hodnot získaných analýzou tří vzorků v rámci jednoho dne se pohybují v rozsahu 3-6 %. Opakovatelnost se v rámci různých koncentrací mění, přičemž rozptyl analytických výsledků je vyšší ve spodní části koncentračního rozsahu metody. (Více v kapitole 6.5)

1.2.6. Dlouhodobá opakovatelnost (interdenní)

Relativní směrodatné odchylky hodnot získaných analýzou tří vzorků, přičemž každý vzorek byl analyzován v jiném dni, se pohybují v rozsahu 4-12 %. Opakovatelnost se v rámci zkoumaného koncentračního rozsahu různí, přičemž rozptyl analytických výsledků je vyšší v jeho spodní části. (Více v kapitole 6.6)

2. Plánování odběru

Realizace odběru by měla být plánována na den s přibližně průměrnou intenzitou provozu a samotný odběr by měl být proveden až na závěr pracovního dne, nicméně před sanitací. Odběr vzorků před sanitací lépe vypovídá o tom, jaká kontaminace se za daný den může naakumulovat a s jakou maximální expozicí personálu je nutno počítat.

Odběr a odeslání vzorků plánovat na dny pondělí-čtvrtek. Vzorky odeslané v pátek jsou doručovány s prodlevou (tj. po víkendu) a u těchto vzorků nelze zaručit úplnou správnost výsledků.

3. Vzorkování – postup

3.1. Materiál

Kompresní obklady Mesoft 7.5 cm x 7.5 cm;
Jednorázové ochranné rukavice (jeden pár na každý vzorek);
Automatická nebo Pasteurova pipeta;
Injekční stříkačky s Luer-lockem (50 mL);
Stop konus;
Měřítka – pravítka nebo metr.
Desorpční roztok (viz bod 3.2.)

3.2. Chemikálie

Octan amonný;
Kyselina octová;
Voda.
(Vše v čistotě pro HPLC.)

Desorpční roztok - 20 mM acetátový pufr (pH = 4) připravený smícháním 20 mM vodných roztoků octanu amonného a kyseliny octové.

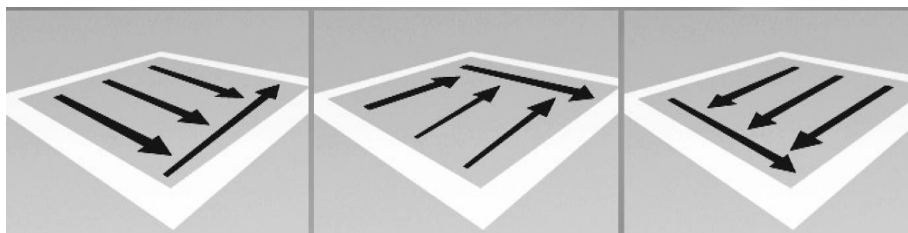
3.3. Technika odběru

- vyberte místo a vymezte na něm plochu, ze které bude stěr proveden (ideálně čtverec 30 x 30 cm, hranice vyznačte fixem nebo lepicí páskou),
- na ruce navlékněte čisté jednorázové rukavice,
- uchopte stěrku a její spodní polovinu zvlhčete 0.75 mL desorpčního roztoku, k odměření a přenesení uvedeného objemu použijte Pasteurovu plastovou pipetu,
- vyznačené plochy setřete 3x stejnou stěrku, směry stírání jsou vyznačené na přiloženém obrázku:

1.

2.

3.



- 1. stěr proved'te navlhčenou spodní stranou stěrky, poté stěrku přeložte napůl - použitou stranou stěrky dovnitř,
- 2. stěr proved'te rubovou stranou navlhčené strany stěrky a podruhé pak stěrku přeložte – opět použitou stranou dovnitř,
- 3. stěr po každém dílčím setření stěrku přeložit napůl a stěr opakovat čistou stranou takto přeložené stěrky,
- použitou stěrku zasuňte do připravené 50mL stříkačky a uzavřete na jedné straně pístem a na druhé straně stop-konusem,
- stříkačku se vzorkem popište přiřazeným číslem a do protokolu uveďte identifikaci vzorku: číslo vzorku, datum, obsah setřené plochy a její popis,
- před odebráním dalšího vzorku vždy vyměňte použité rukavice za nové,
- vzorky uchováváme v mrazícím boxu (minus 20 st.C).

3.4. Odběr blanku

Z každé lokality, která je podrobena vzorkování, se s každou sérií vzorků odebírá také blank, který slouží jako tzv. negativní kontrola používaná pro kontrolu čistoty používaných materiálů a správného zacházení se vzorky během jejich transportu do analytické laboratoře (případně i jejich uložení).

- na dané lokalitě navlhčíme čistou, nepoužitou stěrku 0.75 mL desorpčního roztoku a rovnou vložíme do připravené označené stříkačky,
- identifikaci blanku zaneseme do protokolu,
- skladování a další zpracování probíhá společně s ostatními vzorky a také stejným způsobem.

3.5. Uchovávání a transport vzorků do laboratoře

- vzorky s vyplněným odběrovým protokolem zabalte spolu s namraženým chladícím sáčkem nebo láhví do termoboxu a prostřednictvím expresní služby EMS odešlete poštou ještě ten samý den do analytické laboratoře

- v laboratoři se vzorky do doby zpracování ukládají do mrazícího boxu (minus 20 st.C).

3.6. Možné interference

Tato metoda dobře vyhovuje pro rovné povrchy jako jsou například souvislé plochy pracovních stolů či podlahy. Výtěžnost vzorkování členitých či dokonce hrubých povrchů nebyla blíže studována, nicméně dle zkušeností s jinými analyty nelze reprodukovatelnost odběru předpokládat ani v případě cyklofosfamidu.

4. Zpracování vzorku

Pro všechny úkony spojené se zpracováním a analýzou vzorku jsou závazné pokyny pro dodržování bezpečnosti práce formulované bezpečnostním technikem daného pracoviště. Práce v laboratoři je též podmíněna znalostí používaných sloučenin jejichž rozsah je dán bezpečnostními listy konkrétních chemických látek.

4.1. Chemikálie

Octan amonný (HPLC grade),
Kyselina octová (HPLC grade),
MeOH (HPLC gradient grade, Labicom);
²H₄-cyklofosfamid (CP-D4; čistota 97 %, Niomech, Bielefeld, Německo).

4.2. Příprava extrakčního činidla

Desorpční roztok je 20 mM acetátový pufr (pH = 4) připravený smícháním 20 mM vodných roztoků octanu amonného a kyseliny octové

4.3. Příprava standardu

Jako standard používáme cyclofosfamid o vysoké čistotě (> 99 %, Sigma-Aldrich) rozpuštěný v MeOH v koncentraci např. 0,5 mg/ml. Pro každou sadu vzorků je pak potřeba připravit vodné kalibrační roztoky v rozsahu 0,5 – 500 ng cyklofosfamidu v 1 ml extrakčního roztoku. V praxi se osvědčilo připravit nejprve roztok cyklofosfamidu o koncentraci 512 ng/ml přidáním odpovídajícího objemu zásobního roztoku standardu v MeOH do 1 ml extrakčního činidla obsahujícího interní standard (CP-D4) v koncentraci 25 ng/ml a z něj pak připravit pět dalších koncentrací postupným ředěním v poměru 1:3 (0,25 ml ředěného kalibračního roztoku : 0,75 ml extrakčního činidla). Takto připravíme dohromady šest kalibračních roztoků o koncentraci: 512, 128, 32, 8, 2 a 0,5 ng/ml.

4.4. Příprava vzorku

- do stříkačky se vzorkem přidáme 24,25 ml extrakčního činidla a ústí stříkačky uzavřeme stop-konusem,
- dobře uzavřenou stříkačku kolmo ponoříme do ultrazvukové lázně a v ní vzorek extrahujeme po dobu 30 minut,
- po extrakci obsah stříkačky převedeme do zkumavky a vyextrahovanou stěrku řádně vyždímeme tlakem na píst stříkačky,
- 1 ml extraktu přeneseme ze zkumavky do zkumavky eppendorf, přidáme interní standard (CP-4D) do koncentrace 25 ng/ml a zcentrifugujeme při 20 tis.×g po dobu 10 minut,
- supernatant přeneseme do vialky a uzavřeme víčkem se septem,
- do doby analýzy uchováváme při minus 20 st.C.

5. Chemická analýza

5.1. Chemikálie

Acetonitril (HPLC gradient grade, Labicom, s.r.o.);
 MilliQ voda (HPLC gradient grade, připravená v MilliPure System);
 Octan amonný (HPLC grade);
 Kyselina octová (HPLC grade).

5.2. Technická specifikace analytické metody

Pro stanovení obsahu cyklofosfamidu ve vzorku se používá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na tandemovém hmotnostním spektrometru

Kapalinový chromatograf: Agilent HP1200 HPLC System

LC kolona: ZORBAX SB-18 (Rapid Resolution), 2,1 x 30 mm, 3,5 µm

Hmotnostní spektrometr: Agilent 6410 TripleQuad

Vialky: 2 ml, hnědé, širokohrdlé, 12 x 32 mm

5.3. Podmínky separace

mobilní fáze: fáze A - acetátový pufr 20 mM, pH = 4
 fáze B - acetonitril (AcN)

gradient: lineární
 0 min 10 % AcN

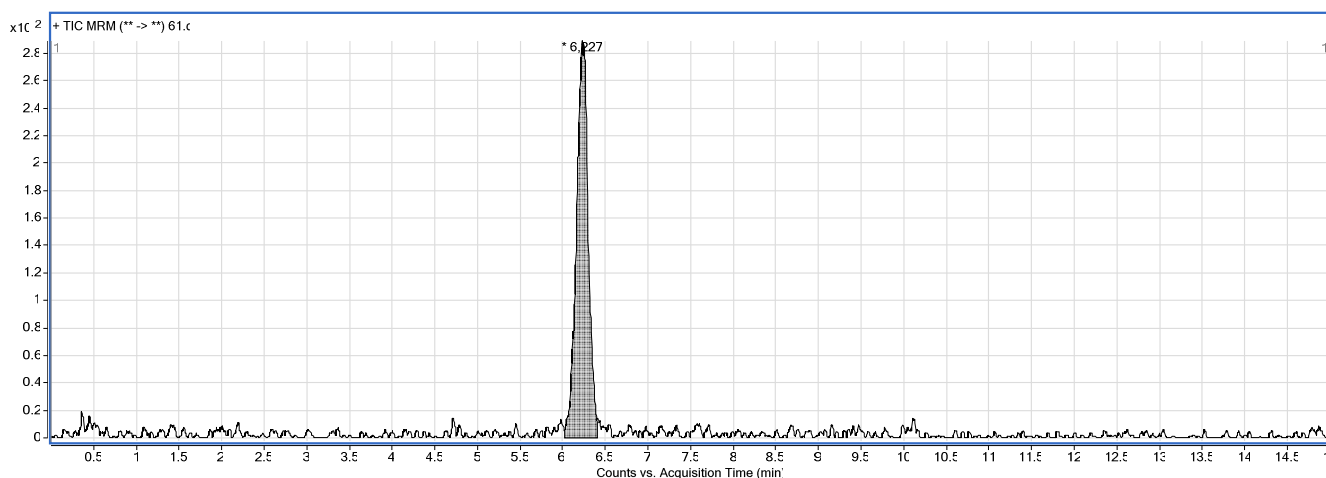
6 min 25 % AcN
7 min 80 % AcN
10 min 80 % AcN
11 min 10 % AcN
15 min 10 % AcN

průtok: 0,3 ml / min

obj. nástřiku: 10 µl

retenční čas: 6,4 min

chromatogram:



5.4. Výpočty

Kvantifikace množství analytu u neznámých vzorků se provádí dle rovnice získané kalibrační přímkou normované na hodnotu interního standardu. Pokud se po měření v některém vzorku zjistí koncentrace přesahující rozsah kalibrace (512 ng/ml extraktu), je třeba vzorek zředit a analýzu opakovat.

Celkové množství navzorkovaného analytu je pak dopočítáno vynásobením získané koncentrace objemem přidaného extrakčního činidla (25 ml). Výsledky jsou obvykle prezentovány jako hodnota kontaminace připadající na 1 cm².

$$c_s = 25 * c_0 / S$$

kde: c_s je počet pg analytu připadající na 1 cm²
 c_0 je koncentrace naměřená v extraktu stěrky [pg/ml]
 S je plocha vzorkovaného povrchu [cm²]

6. Souhrn dat validace

6.1. Limit detekce a kvantifikace

Vzhledem k vysoké selektivitě použité analytické metody a dobré reprodukovatelnosti realizovaných měření, lze limity detekce a kvantifikace stanovit z intenzity šumu signálu zjištěného na chromatogramu reálného vzorku.

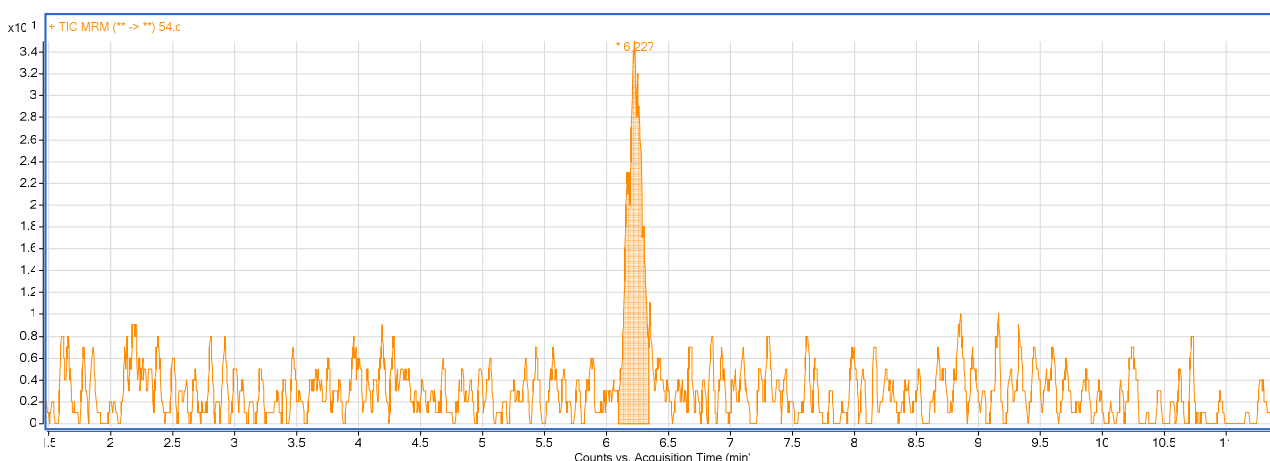
Limit detekce a limit kvantifikace je pak přisuzován takové koncentraci, jejíž pík je vyšší než trojnásobek, respektive desetinásobek, šumu sledovaného signálu.

Pro stanovení konkrétních limitů bylo použito výsledků získaných z monitoringu kontaminace pracovního prostředí Masarykova onkologického ústavu prováděného v listopadu 2008. Přiložený chromatogram ukazuje záznam měření referenčního vzorku získaného ze stěru podlahy v ekotoxikologické laboratoři Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity s přidavkem standardu o výsledné koncentraci 0,1 ng/ml (obrázek č. 5.1).

Limit detekce: LD = 0,07 ng/ml = 1,8 ng/stěr

Limit kvantifikace: LK = 0,24 ng/ml = 6,0 ng/stěr

Obrázek č. 5.1: Příklad chromatogramu reálného vzorku (koncentrace cyklofosfamidu, $c = 0,1 \text{ ng/ml}$)



6.2. Výtěžnost metody

Výtěžnost metody byla stanovena na základě zpracování stěrek se známým množstvím analytu, který byl na dané stěrky nanesen ve formě různě koncentrovaného roztoku standardu v methanolu.

Výtěžnost metody byla testována ve třech různých koncentracích (18, 180 a 1800 pg/cm^2). Hlavními faktory s vlivem na výtěžnost metody jsou: materiál stíracího materiálu, použité extrakční činidlo a způsob extrakce. Změnu těchto parametrů nelze proto přijmout bez revalidace metody.

Tabulka č.5.3: Výtěžnost extrakce cyklofosfamidu [%] ze stěrek Mesoft 7,5 x 7,5 cm

konc. pg/cm^2	opakování						průměr
	1	2	3	4	5	6	
18	94.5	83.7	86.4	94.1	88.8	90.2	89.6
180	87.7	96.2	101.3	96.6	88.7	71.0	90.2
1800	97.8	107.9	103.5	101.1	87.8	92.1	98.3

6.3. Účinnost vzorkování

Na příkladu třech kontrolních ploch s přesně definovanou kontaminací byla stanovena výtěžnost kompletní metody včetně vzorkování. Tento test slouží ke kontrole účinnosti desorpce analytů z modelového povrchu za použití popsané techniky a materiálu.

Tabulka č. 5.4 : Výtěžnost analytické metody včetně vzorkování

koncentrace [pg/cm ²]	18	180	1800
výtěžnost [%]	116	100	96

6.4. Opakovatelnost krátkodobá – shodnost metody uvnitř analytické série

Krátkodobá opakovatelnost byla určena pomocí opakovaného zpracování kontrolních vzorků se známou koncentrací analytu. V rámci jednoho dne byly v triplikátu zpracovány vzorky o třech různých koncentracích (18, 180 a 1800 pg/cm²). Pro každou hodnocenou koncentrační úroveň se pak z naměřených hodnot stanovil jejich směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

Tabulka č. 5.5: Intradenní opakovatelnost metody

konc. pg/cm ²	opakování			průměr	SD	RSD
	1	2	3			
18	14	15	16	15	0.9	6.1
180	152	160	152	155	4.4	2.8
1800	1593	1528	1493	1538	50.6	3.3

6.5. Opakovatelnost dlouhodobá – shodnost metody mezi sériemi analýz

Dlouhodobá opakovatelnost byla testována ve třech po sobě jdoucích týdnech. Každý týden byly zpracovány 3 kontrolní vzorky připravené nanesením standardu cyklofosfamidů na čisté stěrky. Pro každou hodnocenou koncentrační úroveň (18, 180 a 1800 pg/cm²) se pak z naměřených hodnot stanovila jejich směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

Tabulka č. 5.6: Interdenní opakovatelnost metody

konc. pg/cm ²	opakování			průměr	SD	RSD
	1	2	3			
18	15	12	13	13	1.5	11.1
180	155	122	133	136	16.5	12.1
1800	1538	1449	1540	1509	52.2	3.5

Příloha 2 – Stanovení platiny ve stěrech pracovního prostředí

(kompletní informace k metodě včetně validačního protokolu a standardního operačního postupu)

Metoda č.:	W4002
Koncentrační rozsah:	0,2 – 2500 ng Pt/stěr (0,2 – 2780 pg/cm ² při vzorkování plochy 900 cm ²)
Popis metody:	Vzorky z předem vybraných a prostorově vymezených ploch jsou odebrány ručně za použití stěrek z netkané textilie. Ty jsou poté extrahovány v acetátovém pufru na ultrazvukové lázni a takto připravené vzorky jsou analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.
Limit kvantifikace:	0,7 ng Pt/stěr (0,8 pg/cm ² při vzorkování plochy 900 cm ²)
Status metody:	Částečně validována. Metoda byla podrobena podrobnému přezkoumání zaměřeným na charakterizaci její opakovatelnosti a výtěžnosti.
Datum vypracování:	4.11.2008
Datum doplnění:	26.11.2010
Vypracoval:	Mgr. Pavel Odráška
Adresa pracoviště:	Masarykův onkologický ústav Žlutý kopec 7 656 53 Brno Ústavní lékárna Projekt CYTO

1. Obecné informace

1.1. Úvod do problému

1.1.1. Význam metody

Profesní expozice cytotoxickým léčivům (CL) je v současnosti vnímána jako negativní problém neoddelitelně spojený s oblastí poskytování zdravotní péče onkologickým pacientům. Zdravotnický personál může být exponován obecně třemi způsoby: inhalací cytostatik ve formě aerosolu nebo par, dermálním kontaktem a náhodnou ingescí v důsledku havárie nebo při nedůsledném dodržování hygienických pravidel. S ohledem na současné poznatky o distribuci kontaminace na onkologických pracovištích lze za hlavní z jmenovaných expozičních cest označit příjem dermální. Toto tvrzení vychází z četných zpráv o výskytu různých cytostatik na povrchu běžného vybavení pracovišť zajišťujících přípravu i aplikaci těchto léčiv pacientům. Právě na sledování tohoto typu kontaminace je uváděná metoda zaměřena.

Tato metoda umožňuje kontrolovat úroveň kontaminace pracovního prostředí cytostatiky s obsahem platiny. Díky kvantifikaci platinových léčiv podle měřeného množství prvkové platiny ve vzorku je tato metoda robustní vůči chemické nestabilitě původních léčiv v prostředí a umožňuje stanovení kontaminace prostředí cytostatiky i po relativně dlouhé době.

1.1.2. Nebezpečné vlastnosti cytotoxických léčiv

Z možných akutních vedlejších účinků cytostatik pozorovaných při aplikaci těchto léčiv onkologickým pacientům lze uvést např. bolesti břicha, kašel, závratě, kožní vyrážky, padání vlasů, zvracení nebo průjem. U zaměstnanců byla z akutních projevů působení CL pozorována například kožní vyrážka. Symptomy akutní expozice jsou spojeny s relativně vysokými dávkami CL, jejichž příjem lze očekávat jen výjimečně (např. při mimořádných událostech jako jsou havárie spojené s únikem CL).

Hlavní nebezpečí doprovázející práci s cytostatiky však plyne z chronického působení těchto látek přijímaných dlouhodobě v nízkých dávkách v důsledku stopové kontaminace pracovního prostředí. S přibývajícím lety výkonu takového povolání pak roste riziko projevu některého z dalších účinků těchto látek jako je genotoxicita, karcinogenita, vývojová nebo reprodukční toxicita.

1.1.3. Profesní expozice

S ohledem na nebezpečné vlastnosti CL je práce s těmito látkami shledávána jako riziková. Chemické látky s karcinogenními účinky řadíme mezi faktory s bezprahovým účinkem, jinými slovy: u těchto látek nelze definovat bezpečnou míru expozice, která by neohrožovala zdraví ovlivněných osob. Ohledně kontaminace pracovního prostředí takto působícími látkami je obecně přijímán názor, že expozice zasažených osob by měla být snížena na co nejnížší (reálně možnou) úroveň.

Kontaminace CL byla doložena na všech pracovištích začleněných do přípravy CL nebo aplikace CL. Nanogramy až mikrogramy CL (nejčastěji cyklofosfamidu) na m³ byly zjištěny ve vnitřním ovzduší připraven i lůžkových oddělení. Nejčtenější jsou pak zprávy o kontaminaci různého vybavení klinik. CL lze běžně nalézt na podlahách, pracovních pultech, policích, dveřích, telefonech a počítačových klávesnicích, použitých ochranných rukavicích, ložním prádle pacientů, hygienických zařízení a také na obalech léčivých přípravků odebíraných od výrobců.

1.1.4. Fyzikální vlastnosti platiny a od ní odvozených léčiv

1.1.4.1. Platina

CAS kod:	7440-06-4	tenze par:	
mol. hmotnost:	195.09 g/mol	teplota vzplanutí:	
bod varu:	3827 °C	zápach:	ne
bod tání:	1772 °C	hustota:	21.45 g/cm ³
vzhled:	pevná látka, kov		
uchovávání:			
rozpustnost:			

synonyma: C.I. 77795; Liquid bright platinum; Platin (German); Platinum (ACGIH); Platinum Black; Platinum sponge

sumární vzorec: Pt

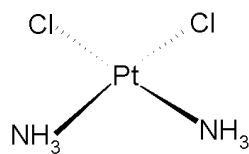
1.1.4.2. Cisplatina

CAS kod:	15663-27-1	tenze par:	1,8 mPa
mol. hmotnost:	300.06 g/mol	teplota vzplanutí:	
bod varu:		zápach:	ne
bod tání:	270 °C	hustota:	
vzhled:	žlutý krystalická prášek		
uchovávání:	do 25 °C, chraňte před světlem		
rozpustnost:	H ₂ O (2,5 g/l), methanol		

synonyma: Biocisplatinum * Briplatin * CDDP * CPDD * Cisplatino (Spanish) * Cisplatyl * cis-DDP * Diamminedichloroplatinum * cis-Diamminedichloroplatinum * cis-Diaminodichloroplatinum(II) * cis-Diamminedichloroplatinum * cis-Dichlorodiammineplatinum * cis-Dichlorodiamminoplatinum(II) * NCI-C55776 * Neoplatin * NSC-119875 * Peyrone's chloride * Platiblastin * Platidiam * cis-Platin * Platinol * cis-Platinous diamminodichloride * cis-Platinous diammine dichloride * cis-Platinum * cis-Platinum(II) * cis-Platinum(II) diamminedichloride * Platinum, diamminedichloro-, (SP-4-2)- (9CI) * cisPt(II) * TR 170

sumární vzorec: $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$

strukturní vzorec:



1.1.4.3. Karboplatina

CAS kod: 41575-94-4

mol. hmotnost: 371.26 g/mol

bod varu:

bod tání:

vzhled: pevná látka

rozpustnost:

tenze par:

teplota vzplanutí:

zápach: ne

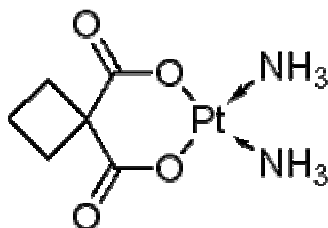
hustota:

uchovávání:

synonyma: Cbdca * 1,1-Cyclobutanedicarboxylate diammine platinum(II) * cis-(1,1-Cyclobutanedicarboxylato)diammineplatinum(II) * Diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) * cis-Diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) * JM 8 * NSC-241240 * Paraplatin

sumární vzorec: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$

strukturní vzorec:



1.1.4.4. Oxaliplatina

CAS kod: 61825-94-3

mol. hmotnost: 397.29 g/mol

bod varu:

bod tání:

vzhled: pevná látka

rozpustnost:

tenze par:

teplota vzplanutí:

zápach: ne

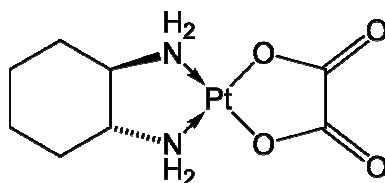
hustota:

uchovávání:

synonyma: 1-OHP * Oxalato(1R,2R-cyclohexanediammine)platinum(II) * Oxalatoplatin * Oxalatoplatinum * Oxaliplatin * Oxaliplatino (Spanish) * RP 54780

sumární vzorec: $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$

strukturní vzorec:



1.2. Parametrická charakteristika metody

1.2.1. Limit detekce

Detekční limit metody zahrnující zpracování vzorku je 0,2 ng Pt/stěr (0,2 pg/cm² při vzorkování plochy 900 cm²). Toto je nejmenší množství platiny ve vzorku, jehož analytický signál je ještě spolehlivě odlišitelný od signálu slepého vzorku (trojnásobek šumu signálu slepého vzorku). (Více v kapitole 6.1)

1.2.2. Limit kvantifikace

Limit kvantifikace činí 0,6 ng Pt/stěr (0,7 pg/cm² při vzorkování plochy 900 cm²). Toto je nejmenší množství platiny ve vzorku, které již lze kvantitativně stanovit (10-ti násobek šumu signálu detektoru). (Více v kapitole 6.1)

1.2.3. Výtěžnost

Průměrná výtěžnost metody zahrnující zpracování vzorku činí 62 %. Výtěžnost je nezávislá na množství analytu ve vzorku. (Více v kapitole 6.3)

1.2.4. Účinnost vzorkování

Průměrná výtěžnost celé metody včetně vzorkování pomocí vybraných materiálů a roztoků činí 62 %. Jedná se o procentuální množství analytu (platina ve formě cisplatinového komplexu) stanovené ve stěru povrchu z nerezové oceli s přesně definovanou kontaminací. (Více v kapitole 6.4)

1.2.5. Krátkodobá opakovatelnost (intradenní)

Relativní směrodatné odchylky hodnot získaných analýzou tří vzorků v rámci jednoho dne se pohybují v rozsahu 1-12 %. Opakovatelnost se v rámci různých koncentrací mění, přičemž rozptyl analytických výsledků je vyšší v horní části koncentračního rozsahu metody. (Více v kapitole 6.5)

1.2.6. Dlouhodobá opakovatelnost (interdenní)

Relativní směrodatné odchylky hodnot získaných u stejného vzorku během tří různých dnů se pohybují v rozsahu 9-25 %. Opakovatelnost se v rámci zkoumaného koncentračního rozsahu různí, přičemž největší rozptyl analytických výsledků byl zjištěn u nejvyšší zkoušené koncentrace. (Více v kapitole 6.6)

2. Plánování odběru

Realizace odběru by měla být plánována na den s přibližně průměrnou intenzitou provozu a samotný odběr by měl být proveden až na závěr pracovního dne, nicméně před sanitací. Odběr vzorků před sanitací lépe vypovídá o tom, jaká kontaminace se za daný den může naakumulovat a s jakou maximální expozicí personálu je nutno počítat.

Odběr a odeslání vzorků plánovat na dny pondělí-čtvrtek. Vzorky odeslané v pátek jsou doručovány s prodlevou (tj. po víkendu) a u těchto vzorků nelze zaručit úplnou správnost výsledků.

3. Vzorkování – postup

3.1. Materiál

Kompresní obklady Mesoft 7.5 cm x 7.5 cm;
Jednorázové ochranné rukavice (jeden pár na každý vzorek);
Automatická nebo Pasteurova pipeta;
Injekční stříkačky s Luer-lockem (50 mL);
Stop konus;
Měřítko – pravítko nebo metr.
Desorpční roztok (viz bod 3.2.)

3.2. Chemikálie

Octan amonný;
Kyselina octová;
Voda.
(Vše v čistotě pro HPLC.)

Desorpční roztok - 20 mM acetátový pufr (pH = 4) připravený smícháním 20 mM vodných roztoků octanu amonného a kyseliny octové.

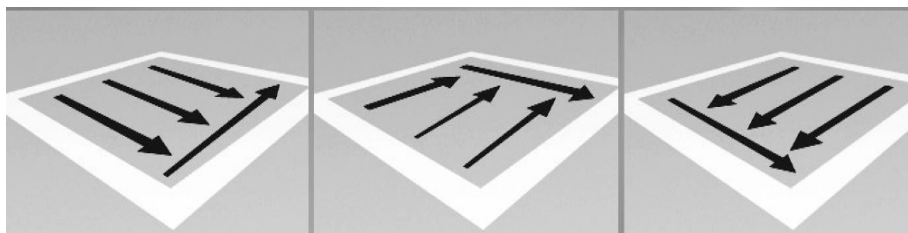
3.3. Technika odběru

- vyberte místo a vymezte na něm plochu, ze které bude stěr proveden (ideálně čtverec 30 x 30 cm, hranice vyznačte fixem nebo lepicí páskou),
- na ruce navlékněte čisté jednorázové rukavice,
- uchopte stěrku a její spodní polovinu zvlhčete 0.75 mL desorpčního roztoku, k odměření a přenesení uvedeného objemu použijte Pasteurovu plastovou pipetu,
- vyznačené plochy setřete 3x stejnou stěrku, směry stírání jsou vyznačené na přiloženém obrázku:

1.

2.

3.



- 1. stěr proved'te navlhčenou spodní stranou stěrky, poté stěrku přeložte napůl - použitou stranou stěrky dovnitř,
- 2. stěr proved'te rubovou stranou navlhčené strany stěrky a podruhé pak stěrku přeložte – opět použitou stranou dovnitř,
- 3. stěr po každém dílčím setření stěrku přeložit napůl a stěr opakovat čistou stranou takto přeložené stěrky,
- použitou stěrku zasuňte do připravené 50mL stříkačky a uzavřete na jedné straně pístem a na druhé straně stop-konusem,
- stříkačku se vzorkem popište přiřazeným číslem a do protokolu uveďte identifikaci vzorku: číslo vzorku, datum, obsah setřené plochy a její popis,
- před odebráním dalšího vzorku vždy vyměňte použité rukavice za nové,
- vzorky uchováváme v mrazícím boxu (minus 20 st.C).

3.4. Odběr blanku

Z každé lokality, která je podrobena vzorkování, se s každou sérií vzorků odebírá také blank, který slouží jako tzv. negativní kontrola používaná pro kontrolu čistoty používaných materiálů a správného zacházení se vzorky během jejich transportu do analytické laboratoře (případně i jejich uložení).

- na dané lokalitě navlhčíme čistou, nepoužitou stěrku 0.75 mL desorpčního roztoku a rovnou vložíme do připravené označené stříkačky,
- identifikaci blanku zaneseme do protokolu,
- skladování a další zpracování probíhá společně s ostatními vzorky a také stejným způsobem.

3.5. Uchovávání a transport vzorků do laboratoře

- vzorky s vyplněným odběrovým protokolem zabalte spolu s namraženým chladícím sáčkem nebo láhví do termoboxu a prostřednictvím expresní služby EMS odešlete poštou ještě ten samý den do analytické laboratoře

- v laboratoři se vzorky do doby zpracování ukládají do mrazícího boxu (minus 20 st.C).

3.6. Možné interference

Tato metoda dobře vyhovuje pro rovné povrchy jako jsou například souvislé plochy pracovních stolů či podlahy. Výtěžnost vzorkování členitých či dokonce hrubých povrchů nebyla blíže studována, nicméně dle zkušeností s jinými analyty nelze reprodukovatelnost odběru předpokládat ani v případě komplexních sloučenin platiny.

4. Zpracování vzorku

Pro všechny úkony spojené se zpracováním a analýzou vzorku jsou závazné pokyny pro dodržování bezpečnosti práce formulované bezpečnostním technikem daného pracoviště. Práce v laboratoři je též podmíněna znalostí používaných sloučenin jejichž rozsah je dán bezpečnostními listy konkrétních chemických látek.

4.1. Chemikálie

MilliQ voda (HPLC gradient grade, připravená v MilliPure System),
Octan amonný (HPLC grade),
Kyselina octová (HPLC grade).

4.2. Příprava extrakčního činidla

Desorpční roztok je 20 mM acetátový pufr (pH = 4) připravený smícháním 20 mM vodných roztoků octanu amonného a kyseliny octové

4.3. Příprava vzorku

- do stříkačky se vzorkem přidáme 24,25 ml extrakčního činidla a ústí stříkačky uzavřeme stop-konusem,
- dobře uzavřenou stříkačku kolmo ponoříme do ultrazvukové lázně a v ní vzorek extrahujeme po dobu 30 minut,
- po extrakci obsah stříkačky převedeme do zkumavky a vyextrahovanou stěrku řádně vyždímáme tlakem na píst stříkačky,
- 1 ml extraktu přeneseme ze zkumavky do zkumavky eppendorf a zcentrifugujeme při 20 tis.×g po dobu 10 minut,
- supernatant přeneseme do vialky a uzavřeme víčkem se septem,
- do doby analýzy uchováváme při minus 20 st.C.

5. Chemická analýza

5.1. Chemikálie

MilliQ voda (HPLC gradient grade, připravená v MilliPure System);
Octan amonný (HPLC grade);
Kyselina octová (HPLC grade);
Kyselina chlorovodíková (p.a.).

5.2. Technická specifikace analytické metody

Pro stanovení obsahu platiny ve vzorku se používá metoda hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

Hmotnostní spektrometr: Agilent ICP-MS 7500ce
Zmlžovač Babington

5.3. Podmínky stanovení

příkon do plazmatu: 1500W

nosný plyn (Ar): 1 l/min

pomocný plyn (Ar): 0,15 l/min

plazmový plyn: 15 l/min

m/z: 194, 195

5.4. Příprava standardu

5.4.1. Jako standard používáme roztok platiny v 1% kys. chlorovodíkové. Pro každou sadu vzorků je pak potřeba připravit kalibrační roztoky v rozsahu 0,1 – 100 ng Pt v 1 ml 1% HCl. V praxi se osvědčilo připravit nejprve roztok analytu o koncentraci 100 ng/ml přidáním odpovídajícího objemu zásobního roztoku standardu do 1 ml 1% HCl a z něj pak připravit pět dalších koncentrací postupným ředěním v poměru 1:3 (0,25 ml ředěného kalibračního roztoku : 0,75 ml 1% HCl). Takto připravíme dohromady šest kalibračních roztoků o koncentraci: 100; 25; 6,25; 1,56; 0,39 a 0,1 ng/ml.

5.4.2. Kvantifikace množství analytu v neznámých vzorků se provádí dle rovnice získané kalibrační přímkou. Pokud se po měření v některém vzorku zjistí koncentrace vyšší než 100 ng/ml, je třeba tento vzorek patřičně zředit 1% HCl na koncentraci, která bude uvnitř kalibračního rozsahu, a analýzu opakovat.

5.5. Stanovení obsahu platiny ve vzorku

Před samotnou analýzou se každý vzorek i kalibrační roztok ředí 1% HCl v poměru 1:14 (0,2 ml vzorku : 2,8 ml 1% HCl).

Analýza připravených vzorků je realizována ve spolupráci s analytickou laboratoří centra RECETOX (Výzkumného centra pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii, PřF MU).

Kontaktní osoba: Mgr. Jan Kuta

5.6. Výpočty

Kvantifikace množství analytu ve vzorku probíhá dle kalibrační rovnice. Celkové množství navzorkované platiny je pak dopočítáno vynásobením získané koncentrace objemem přidaného extrakčního činidla (25 ml). Výsledky jsou obvykle presentovány jako hodnota kontaminace připadající na 1 cm².

$$c_s = 25 * c_0 / S$$

kde: c_s je počet pg analytu připadající na 1 cm²
 c_0 je koncentrace naměřená v extraktu stěrky [pg/ml]
 S je plocha vzorkovaného povrchu [cm²]

6. Souhrn dat validace

6.1. Limit detekce a kvantifikace

Vzhledem k vysoké selektivitě použité analytické metody a dobré reprodukovatelnosti realizovaných měření, lze limity detekce a kvantifikace stanovit z intenzity šumu signálu zjištěného během analýzy slepého vzorku (čisté rozpouštědlo – 1% HCl). Limit detekce a limit kvantifikace je pak prisuzován takové koncentraci, jejíž signál je vyšší než trojnásobek, respektive desetinásobek, signálu sledovaného u slepého vzorku.

Stanovení limitů probíhá automaticky během kalibrace na začátku analýzy každé série vzorků a výsledky těchto stanovení musí splňovat následující požadavky:

Limit detekce: LD = 0,008 ng/ml = 0,2 ng/stěr

Limit kvantifikace: LK = 0,027 ng/ml = 0,7 ng/stěr

6.2. Výtěžnost metody

Výtěžnost metody byla stanovena na základě zpracování stěrek se známým množstvím analytu, který byl na dané stěrky nanesen ve formě různě koncentrovaného roztoku standardu v methanolu.

Výtěžnost metody byla testována v šesti různých koncentracích (7, 35, 175, 350, 1750 a 3500 pg Pt / cm²). Hlavními faktory s vlivem na výtěžnost metody jsou: materiál stíracího materiálu, použité extrakční činidlo a způsob extrakce. Změnu těchto parametrů nelze proto přijmout bez revalidace metody.

Tabulka č. 1: Výtěžnost extrakce platiny (ve formě cisplatiny) ze stěrek Mesoft 7,5 x 7,5 cm

konc. pg/cm ²	opakování						průměr
	1	2	3	4	5	6	
7	79.0	52.2	56.7	52.1	53.4	69.7	60.5
35	61.3	61.7	58.9	59.4	55.5	72.7	61.6
175	59.7	63.5	63.1	64.4	57.9	72.1	63.5
350	57.5	54.8	52.9	55.8	59.6	68.2	58.1
1750	60.5	62.5	66.3	54.1	56.4	57.7	59.6
3500	64.2	60.5	59.8	73.3	63.2	77.5	66.4

6.3. Účinnost vzorkování

Na příkladu šesti kontrolních ploch s přesně definovanou kontaminací byla stanovena výtěžnost kompletní metody včetně vzorkování. Tento test slouží ke kontrole účinnosti desorpce analytů z modelového povrchu za použití popsané techniky a materiálu.

Tabulka č. 2: Výtěžnost analytické metody včetně vzorkování

konc. na ploše [pg/cm ²]	7	35	175	350	1750	3500
výtěžnost [%]	91.1	64.8	53.5	55.2	55.0	52.7

6.4. Opakovatelnost krátkodobá – shodnost metody uvnitř analytické série

Krátkodobá opakovatelnost byla určena pomocí opakovaného zpracování kontrolních vzorků se známou koncentrací analytu. V rámci jednoho dne byly v triplikátu zpracovány vzorky o šesti různých koncentracích (7, 35, 175, 350, 1750 a 3500 pg Pt / cm²). Pro každou hodnocenou koncentrační úroveň se pak z naměřených hodnot stanovil jejich směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

Tabulka č. 3: Intradenní opakovatelnost metody

konc. pg/cm ²	opakování			průměr	SD	RSD
	1	2	3			
7	3.5	3.8	3.5	3.6	0.2	4.9
35	20.0	19.1	19.3	19.5	0.5	2.5
175	109.1	108.5	110.7	109.4	1.2	1.1
350	177.2	171.0	180.4	176.2	4.8	2.7
1750	887.4	942.2	768.9	866.2	88.6	10.2
3500	1216.1	1200.8	1472.1	1296.3	152.4	11.8

6.5. Opakovatelnost dlouhodobá – shodnost metody mezi sériemi analýz

Dlouhodobá opakovatelnost byla testována ve třech po sobě jdoucích týdnech. Každý týden byly zpracovány 6 kontrolních vzorků připravených nanesením standardu cisplatinu na čisté stěrky. Pro každou hodnocenou koncentrační úroveň (7, 35, 175, 350, 1750 a 3500 pg Pt / cm²) se pak z naměřených hodnot stanovila jejich směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

Tabulka č. 4: Interdenní opakovatelnost metody

konc. pg/cm ²	opakování			průměr	SD	RSD
	1	2	3			
7	3.6	3.0	3.6	3.4	0.3	9.4
35	19.5	16.0	22.1	19.2	3.1	16.1
175	109.4	82.1	113.0	101.5	16.9	16.7
350	176.2	166.1	214.2	185.5	25.4	13.7
1750	866.2	788.1	1083.6	912.6	153.1	16.8
3500	1296.3	1675.5	2147.3	1706.4	426.3	24.9

Příloha 3 – Odběrový protokol

ODBĚROVÝ PROTOKOL

Typ vzorku: **Stěr pracovního prostředí**

Datum odběru:

Místo odběru:
(město, nemocnice)

CL vybrané pro analýzu:
(cyklofosfamid, platina, fluorouracil)

Popis vzorku

Popis, určení vzorku:

Číslo vzorku	Místnost	Plocha / Objekt
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

Poznámky:
(např. možné ovlivnění odběru)

Operátor - kontakt:

Množství připravené chemoterapie (počet jednotlivých příprav) – nepovinný údaj

	Všechna CL	CL vybrané pro analýzu
V den odběru		
Za posledních 5 pracovních dnů		

Transport vzorků do laboratoře

Datum doručení:
(vyplní pracovníci analytické laboratoře)