

Studijní obor: Měřicí a výpočetní technika – kombinované studium

Katedra: Fyziky

Bakalářská práce

**Měřicí přístroje a technologie
v klinické biochemii**

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. František Špulák

Autor:

Jaromír Hruža

Anotace:

Tato bakalářská práce se zabývá měřicími přístroji používanými v klinické biochemii. Popisuje princip a fyzikální vlastnosti vybraných přístrojů (analyzátorů). Ukáže konkrétní přístroje a kontrolní měření v Laboratoři klinické chemie v Nemocnici České Budějovice, a.s.. Cílem práce je přiblížit technologie používané při zjišťování biochemických parametrů popisujících vnitřní prostředí lidského těla.

Abstract:

This thesis is concerning about measuring technique used in the clinical biochemistry. It is describing the principle and physical properties of some selected analyzers. It is researching some concrete laboratory instruments and check measurement in the Laboratory of clinical chemistry in the hospital in České Budějovice. The main goal of my thesis is to make clear the technology used in biochemical parameters determination which describes internal climate of human bodies.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce pedagogickou fakultou, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum: 6.5.2009

Podpis: _____

Poděkování:

Tímto bych chtěl hlavně poděkovat RNDr. Františku Špulákovi za velmi cenné rady a připomínky při vypracování mé bakalářské práce. Dále děkuji všem, kteří svými radami, věcnými i kritickými upozorněními přispěli ke vzniku mé bakalářské práce.

Obsah:

Úvod:	8
1 Laboratorní vyšetření acidobazické rovnováhy (poruchy ABR)	10
1.1 Reakce organismu směřující k udržení stálého pH	11
1.1.1 Nárazníkové reakce	11
1.1.2 Kompenzační reakce	12
1.1.3 Korekční reakce	12
1.2 Nárazníkové systémy (pufrý)	12
1.3 Parciální tlak kyslíku (pO_2)	13
1.4 Parciální tlak oxidu uhličitého (pCO_2)	13
1.5 Poruchy vodního a iontového hospodářství	14
1.5.1 Natrium	15
1.5.2 Kalium	15
1.5.2.1 Kalémie	15
1.5.2.2 Hypokalémie	16
1.5.2.3 Hyperkalémie	16
1.5.3 Magnézium	16
1.5.3.1 Hypomagnezémie	17
1.5.4 Kalcium	18
1.5.4.1 Hypokalcémie	18
1.5.4.2 Hyperkalcémie	19
1.5.5 Chloridy	19
1.5.6 Laktát	20
1.6 Elektrochemické metody	21
1.6.1 Potenciometrie	21
1.6.2 Teorie pH	21
1.6.3 Elektroda pro měření pCO_2 (Severinghausova)	23
1.6.4 Iontově selektivní elektrody	24
1.6.5 Enzymové elektrody	25
1.6.6 Srovnávací (referenční) elektrody	26
1.7 Analyzátor krevních plynů a elektrolytů NOVA CCX (obr. 1.3)	27
1.7.1 Základní popis analyzátoru	28

1.7.2	Kalibrace a kontrola analyzátoru.....	31
1.7.3	Měření vzorků	31
1.7.4	Základní údržba a části analyzátoru	32
2	Vyšetření osmolality	35
2.1	Osmometrie	35
2.2	Definice a terminologie	35
2.2.1	Osmóza:.....	35
2.2.2	Osmotický tlak:	36
2.2.3	Osmolalita:	37
2.2.4	mOsm (miliosmol)	37
2.2.5	Klinické údaje	37
2.3	OsmoStation typ: OM-6050 firmy Arkray.....	38
2.3.1	Princip	39
2.3.2	Popis zařízení:	40
2.3.3	Teorie, použití, předpoklady provádění postupu.....	41
2.3.4	Kalibrace a kontrola činnosti.....	41
2.3.5	Pracovní postup	44
3	Chemické vyšetření moči a vyšetření močového sedimentu	46
3.1	Chemické kvalitativní vyšetření moči.....	46
3.1.1	Orientační stanovení pH.....	47
3.1.2	Orientační stanovení hustoty	47
3.1.3	Bílkovina	47
3.1.4	Krev, krevní barvivo	48
3.1.5	Leukocyty.....	48
3.1.6	Glukóza	48
3.1.7	Důkaz dusitanů	48
3.1.8	Ketolátky (kyselina acetocetová, beta-hydroxymáselná, aceton)	49
3.1.9	Urobilinogen.....	49
3.1.10	Bilirubin	49
3.1.11	Vyšetření močového sedimentu	49
3.2	Teorie měření	50
3.2.1	Fotometrie a spektrofotometrie	50
3.2.2	Fotometry a spektrofotometry	51

3.2.3	Reflexní fotometrie	51
3.3	Analýzátor Urisys 2400 (obr. 3.1).....	52
3.3.1	Princip	53
3.3.2	Pracovní postup	54
3.3.3	Kalibrace	56
4	Praktická část	58
4.1	Popis tabulky	58
4.2	Použité výpočtové vzorce:	59
4.3	Závěr.....	59
	Seznam použité literatury:	60
	Přílohy:.....	61

Úvod:

Tato práce se zabývá fyzikálními vlastnostmi měřících přístrojů v klinické biochemii, popisuje tři vybrané přístroje pro vyšetření acidobazické rovnováhy, osmolality (vodního hospodářství v těle) a vyšetření při onemocněních ledvin a močových cest.

Acidobazické analyzátory, tj. analyzátory pH a krevních plynů, jsou dodnes často nazývané podle jednoho z prvních autorů "Astrup". Jsou to složité přístroje, které pomocí elektrod umožňují přesné měření základních parametrů ABR, t.j. pH, $p\text{CO}_2$ a $p\text{O}_2$. Ostatní parametry jsou kalkulovány podle softwarového vybavení analyzátoru na bázi Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice. Modernější analyzátory umožňují kromě stanovení základních parametrů ještě stanovení koncentrace Hb, a dalších derivátů hemoglobinu. Tato stanovení jsou základem pro výpočet ostatních parametrů, které jsou důležité pro posouzení oxygenace organismu.

Osmolalita je jednou ze základních hodnot vnitřního prostředí, která nám umožní posoudit stav hydratace pacienta a jeho hospodaření s minerály, zejména se sodíkem. Stanovení osmolality v krevním séru má význam pro sledování léčby hyperosmolárních stavů, např. hyperglykemického kómatu nebo hyperkalcémie. Při léčbě těchto stavů umožní stanovení osmolality posoudit, zda je vhodná rychlost jejího poklesu. Při poklesu osmolality větším než 2-4 mOsm/kg/hod. hrozí nasávání vody do centrálního nervového systému, kde jsou změny osmolality díky existenci hematoencefalické bariéry pomalejší, a z toho důvodu hrozí rozvoj edému mozku. Druhou indikací stanovení osmolality je odhad koncentrace etanolu či etylénglykolu v krvi při intoxikaci těmito látkami, pokud není možnost přímého měření koncentrací těchto látek. Stanovení osmolality v séru a v moči současně má význam v diferenciální diagnostice oligoanurických stavů (tvorba malého množství moče).

Biochemická vyšetření při onemocněních ledvin a močových cest patří k základním vyšetřením, nezbytným pro stanovení diagnózy, sledování průběhu onemocnění a hodnocení účinků terapie. Ledviny se podílejí jak na homeostáze (stálosti vnitřního prostředí) vody a iontů, tak na exkreci odpadních látek a proto sledujeme pomocí biochemických vyšetření převážně změny postihující tyto základní funkce.

Vyšetření ledvin musí být komplexní, postupujeme však většinou od vyšetření jednodušších ke složitějším. Potřebné informace získáváme vyšetřením moči, jako konečného produktu funkce ledvin, vyšetřením koncentrace některých látek v krvi a v moči s následnými výpočty a pomocí funkčních testů.

Ve své práci jsem ověřoval přesnost a správnost měření na analyzátoru krevních plynů, iontů a metabolitů Nova CCX od firmy Nova Biomedical pomocí validovaných certifikačních kontrolních materiálů Liquichek Blood gas plus EGL control Firmy Biorad v souladu se „zásadami správné laboratorní práce“ [1].

Závěrem je provedeno kontrolní měření roztoku od firmy Biorad na acidobazickém analyzátoru Nova CCX.

Seznam použitých zkratk:

pCO₂ - parciální tlak oxidu uhličitého

pO₂ - parciální tlak kyslíku

Hb - hemoglobin

Na⁺ - sodík

K⁺ - draslík

Ca⁺⁺ - ionizovaný vápník

Mg⁺⁺ - magnézium

Cl⁻ - chlorid

Lac - laktát

Glu - glukóza

1 Laboratorní vyšetření acidobazické rovnováhy (poruchy ABR)

Vyšetření parametrů ABR

Měřené parametry: pH, pCO₂, pO₂, Hb, saturace Hb kyslíkem,

Ostatní měřené parametry ABR

Koncentrace iontů:

Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻,

Koncentrace ostatních látek (metabolitů)

močovina, kreatinin, glykóza, laktát (kyselina mléčná).

Vyšetření

Vyšetřuje se arteriální krev, arteriolární, respektive kapilární krev nebo smíšená venózní krev. Arteriální krev odebírá lékař arteriální punkcí. Odběr se provádí do injekční stříkačky z plastiku, kde v konusu je malé množství heparinu zabraňující srážení krve a případně i skleněná kulička k promíchání krve. Krev musí být nabrána bez vzduchových bublin. . Krev s ponechanými vzduchovými bublinami je pro vyšetření parametrů ABR nevhodná. Přítomnost vzduchu snižuje výsledky vyšetření pCO₂, zvyšuje pO₂ a zvyšuje pH krve na alkalickou stranu (hodnoty pH vyšší než 7,400). Kapilární (arteriolární) odběr se provádí z ušního lalůčku nebo z bříšek prstů, u kojenců z patičky po předchozí hyperemizaci. Rozšíření arteriol lze dosáhnout použitím hyperemizačních mastí, jako např. Finalgon, nebo působením tepla. Z hlubokého vpichu sterilní lancetkou po předchozí dezinfekci povrchu je krev odebírána do heparinizovaných skleněných nebo speciálních plastových kapilár. Krev je z odběrového místa odebírána bez vymačkávání (přítomnost lymfy není žádoucí). Sloupec krve v kapiláře nesmí být přerušen vzduchovou bublinou. Do kapiláry vložíme krátký drátek z nerez oceli, kapiláru uzavřeme plastickými uzávěry a pomocí magnetu, kterým pohybujeme podél kapiláry, promícháme krev, aby se v ní rozpustil vysušený heparin ze stěn kapiláry, který zabraňuje srážení krve. Sraženou krev nelze vyšetřit!

Arteriální krev vyšetřujeme u pacientů, kde se z různých důvodů liší výrazně složení arteriální krve od krve arteriolární. K takovým rozdílům dochází zejména u pacientů s centralizací oběhu, kde výsledky vyšetření kapilární krve poskytují informace o poměrech ve tkáni, odkud byla krev odebrána, nelze je však vztahovat na celý organismus. Rovněž při posuzování hodnot pO_2 je výhodnější vyšetření arteriální krve, neboť hodnoty v krvi kapilární jsou vždy poněkud nižší než hodnoty systémové

Vyšetření se musí provést co nejdříve po odběru. Nastane-li z technických důvodů prodleva, je nutno odebranou krev uchovávat ve vodní lázni s ledem (nezmrazovat!), a to maximálně 2 hodiny od odběru. Dále skladovaný vzorek nemá smysl posílat do laboratoře a měřit.

Vlastní laboratorní vyšetření (provedení analýzy) trvá přibližně 2 minuty, takže lékař má k dispozici výsledky ve velmi krátké době po odběru,.

1.1 Reakce organismu směřující k udržení stálého pH

Poruchy ABR se dělí co do původu na poruchy metabolické a respirační. U poruch metabolických se primárně mění nezávisle proměnné veličiny jako je rozdíl mezi hodnotou kladných a záporných nábojů na tzv. silných iontech (SID) a sekundárně koncentrace HCO_3 a pH. U respiračních se primárně mění pCO_2 , koncentrace HCO_3 zůstává prakticky nezměněna a mění se pH. Reakce organismu na poruchy ABR směřují k zachování stálého pH a lze je rozdělit na:

- **nárazníkové reakce**
- **kompensační reakce**
- **korekční reakce.**

1.1.1 Nárazníkové reakce

Probíhají jako bezprostřední reakce organismu na vzniklou poruchu. Jejich kapacita je limitována a trvá-li příčina poruchy déle, nárazníková schopnost krve se vyčerpá a dochází k výraznějším změnám pH. [2]

1.1.2 Kompenzační reakce

Kompenzační reakce jsou vždy zajišťovány orgány nepostižené složky, tj. u poruch respiračních ledvinami, u poruch metabolických plícemi a směřují k udržení pH. Jejich dynamika se liší. Kompenzační reakce zajišťované ledvinami se rozvíjejí postupně, maxima účinnosti dosahují do 5 dnů a po odeznění příčiny vyvolávající poruchu stejně dlouho odeznívají. Plíce kompenzují poruchu tak, že maxima účinnosti je dosaženo do 24 hodin od začátku poruchy a stejně dlouho trvá návrat k normě po odeznění. [2]

1.1.3 Korekční reakce

Přicházejí v úvahu prakticky jen u metabolických poruch za předpokladu, že příčinou poruchy není onemocnění ledvin. Upravují koncentraci primárně změněné složky. U respiračních poruch je postižení funkce plic z různých důvodů vždy příčinou poruchy a nelze tedy o korekci plícemi uvažovat. [2]

1.2 Nárazníkové systémy (pufry)

Jsou to soustavy látek, které brání změně pH roztoku po přidání kyseliny nebo zásady. Nárazníky jsou tvořeny párem - slabá kyselina a její sůl se silnou zásadou, nebo naopak slabá zásada a její sůl se silnou kyselinou. Nárazníkové roztoky působí tak, že volný H^+ vážou ve formě slabé kyseliny, která je velmi málo disociovaná a tak se koncentrace H^+ udržuje relativně stálá. pH nárazníkového roztoku je dáno vztahem, který podle autorů nazýváme Hendersonova-Hasselbachova rovnice (viz. vztah 1.2.1):

$$pH = pK + \log \frac{\text{sůl}}{\text{kyselina}} \quad (1)$$

Z rovnice vyplývá, že při konstantní hodnotě pK (tzv. rovnovážná disociační konstanta, která odpovídá hodnotě pH, při které jsou obě složky v rovnováze) závisí pH pufru výhradně na velikosti poměru koncentrace soli ke koncentraci kyseliny. Jakákoliv změna v tomto poměru se projeví změnou pH.

1.3 Parciální tlak kyslíku (pO_2)

U vyšetření ABR je parciální tlak O_2 běžně udáván spolu s ostatními parametry. I když sám o sobě není přímo údajem o ABR, jeho hodnota má pro posuzování poruch acidobazické rovnováhy velký význam. Snížený pO_2 vede k úvaze o možnosti tkáňové hypoxemické metabolické laktátové acidózy, i když ani normální hodnota pO_2 tuto možnost nevylučuje. Referenční rozmezí: 9,3 – 15,5 kPa. Rozmezí je závislé na věku, u starších osob se hodnoty fyziologicky snižují. Pro vyšetření pO_2 je vhodný odběr arteriální krve, případně odběr z dobře hyperemizovaného ušního lalůčku. Odběr z bříška prstu není vhodný pro nestandardně falešně nižší hodnoty.

1.4 Parciální tlak oxidu uhličitého (pCO_2)

Kyselina uhličitá se v Hendersonově-Hasselbachově rovnici označuje jako respirační složka. Její koncentrace v arteriální krvi je dána rovnováhou mezi množstvím CO_2 produkovaného ve tkáních a množstvím, které je z organismu vyloučeno plicemi. V alveolárním vzduchu se za fyziologických podmínek ustálí parciální tlak CO_2 na hodnotě 5,35 kPa. Při průchodu krve plicními kapilárami se vyrovná pCO_2 v alveolárním vzduchu s pCO_2 v krvi, protékající plicními kapilárami a pCO_2 v arteriální krvi je prakticky totožný s pCO_2 v alveolárním vzduchu. H_2CO_3 (kyselina uhličitá) se v krvi vyskytuje jako:

fyzikálně rozpuštěný CO_2

hydratovaný CO_2 , to znamená H_2CO_3 .

Vzájemný poměr obou složek je 800:1 a jsou ve vzájemné rovnováze. Součet jejich koncentrací se označuje jako efektivní koncentrace kyseliny uhličité. Ke kvantitativnímu vyjádření velikosti respirační složky proto běžně používáme hodnotu pCO_2 , kterou můžeme přepočítat na koncentraci kyseliny uhličité, jak už bylo zmíněno. [2]

Normální hodnoty pCO_2 v arteriální krvi jsou $5,3 \text{ kPa} \pm 0,5 \text{ kPa}$.

Hodnoty nad 5,8 kPa - hyperkapnie

Hodnoty pod 4,8 kPa – hypokapnie [2]

1.5 Poruchy vodního a iontového hospodářství

Předpoklady hodnocení poruch vodního a iontového metabolismu

Znalost aktuální tělesné hmotnosti a její porovnání s běžnou (standardní) hmotností nemocného. Protože nemocné na většině jednotek intenzivní péče a resuscitačních stanic vážit nelze, je nutno se spokojit s odhadem běžné hmotnosti.

Posouzení akutně vzniklé změny:

při klinicky zřejmé dehydrataci se uvažuje deficit tekutin v rozsahu 2,5 až 5,0 % běžné tělesné hmotnosti, při hyperhydrataci je to nadbytek tekutin v rozsahu 2,5 až 7,5 % hmotnosti. Takže, když např. u 70 kg dehydratovaného nemocného odhadneme úbytek tělesné hmotnosti na 5 %, počítáme s deficitem 3,5 litru, který nutno korigovat. Kritériem správnosti tohoto odhadu je klinická reakce nemocného na léčbu (stav hydratace, diuréza) i úprava laboratorních parametrů.

Příznaky dehydratace:

snížený turgor (napětí) kůže, suché sliznice, "hadrovité" bulby, snížená náplň žil, oligurie, nízký centrální žilní tlak.

Příznaky hyperhydratace:

zvýšený turgor kůže, i lehké kabely od monitorů zanechávají otisk na kůži, je zvýšená náplň žil i centrální žilní tlak, stoupá hmotnost, začínají otoky. [2]

Výpočty terapeutických dávek Na^+ , které vycházejí z natrémie, je nutno posuzovat v širších souvislostech. Jejich validita závisí nejen na absolutní koncentraci Na^+ , ale i na jeho zásobě a na vztahu mezi touto zásobou a velikostí ECT (extracelulární tekutina) a sekundárně i ICT (intracelulární tekutina). [2]

Dělení poruch vodního a iontového hospodářství

Stav hydratace se hodnotí klinicky a podle toho se nemocní dělí na tři skupiny: s hydratací fyziologickou, s dehydratací a s hyperhydratací. Ve všech těchto skupinách může být zjištěná natrémie jak v referenčním intervalu, tak i hyponatrémie nebo hypernatrémie.

1.5.1 Natrium

Referenční meze:

plazma 132 - 142 mmol/l

moč 120 - 140 mmol/l.

Celková zásoba Na^+ u muže vážícího 70 kg činí asi 3700 až 4000 mmol. Z toho asi 30% (1100 - 1200 mmol) je nesměnitelný podíl uložený v kostech a v buněčných strukturách. Extracelulární zásoba je 1800 až 2000 mmol, směnitelná celulární zásoba je kolem 1000 mmol. Interpretaci nálezů natrémie a úvahu o vhodné korekční dávce Na^+ nebo vody může usnadnit rozdělení poruch vodního a solného metabolismu. [2]

1.5.2 Kalium

Referenční interval:

plazma 3,8 - 5,4 mmol/l

moč 45 - 90 mmol/d.

Celková zásoba cca 3500 mmol, z toho 3150 mmol směnitelných, v ECT je 60 mmol K. Koncentrace intracelulárního K je 10 až 20násobně vyšší než v plazmě. Denní příjem a výdej je 50 až 100 mmol. Draslíkové ionty jsou hlavními kationty intracelulárního prostoru. Jsou nezbytné při tvorbě i rozpadu makroergních fosfátů. K^+ se účastní všech fosforylačních dějů v organismu a proto souvisí s energetikou. Jestliže převládají anabolické děje, zvyšuje se ukládání kalia v buňkách. Naopak při katabolizmu buňky opouští. [2]

1.5.2.1 Kalémie

Je závislá na pH. Při acidémii se uvolňuje K^+ především z vazby na fosfáty v buňce. Dále se uvolňuje při rozpadu tkáňových bílkovin, na které je vázáno. V alkalémii se naopak více váže na fosfáty a jsou vyšší ztráty močí - směna za Na^+ . Při acidémii normální S- K^+ upozorňuje na depleci K^+ v organismu. Při alkalémii normální nebo zvýšené S- K^+ svědčí pro hyperkatabolismus.

1.5.2.2 Hypokalémie

Příčiny:

- Ze zvýšených ztrát ledvinami.
- Léčba diuretiky, polyurie, léčba steroidy ve vysokých dávkách. Hypokalémie může vzniknout již během 2 dnů po zahájení této léčby
- Průjmy, střevní píštěle
- Přesun K do buněk. Alkalóza, léčba diabetické acidózy infúzemi glukózy a inzulinem.

Klinické příznaky:

slabost, sklon k paralytickému ileu, renální poruchy - neschopnost koncentrovat moč, zvýšená citlivost myokardu na kardiotonika, nebezpečí arytmií. Nižší T vlny, objevují se U vlny. Terapie spočívá v úpravě primární poruchy a v doplnění draselných iontů. [2]

1.5.2.3 Hyperkalémie

Příčiny:

Vážné vylučování ledvinami:

při akutní renální insuficienci, léčbě antagonisty aldosteronu (Spirolakton, Amilorid, Triamteren), nedostatku mineralokortikoidů.

Uvolnění K z buněk: katabolismus, acidóza, rozpad tkání, únik K z erytrocytů, trauma.

Nadměrný přívod:

infúze s obsahem solí kalia, transfúze staré krve. [2]

1.5.3 Magnézium

Referenční interval:

sérum 0,7 - 0,9 mmol/l

moč 1,2 - 12 mmol/d

ionizované Mg sérum 0,45 - 0,62 mmol/

V těle je celkem 600 až 1150 mmol hořčíku. Z toho je asi 53% v kostech, v příčně pruhovaném svalstvu a dalších měkkých tkáních je 46%. V ECT je jen 1%, z toho 0,5% v erytrocytech a 0,3% v plazmě, takže podobně jako S-K, ani S-Mg neodráží stav zásob v těle. Asi 33% plazmatického Mg je vázáno na bílkoviny, 5 - 12% je v komplexech s jinými ionty (citráty, fosfáty) a zbytek, 55 - 60% je volný, fyziologicky aktivní Mg^{++} . V poslední době (od r. 1993) je možno v závislosti na technickém vybavení laboratoře vyšetřovat Mg^{++} místo celkového Mg. Protože informace o koncentraci Mg^{++} je blíže jeho biologické aktivitě, je tomuto vyšetření třeba dávat přednost. [2]

Význam hořčíku vychází ze skutečnosti, že Mg^{++} je po K^{+} druhým nejzastoupenějším intracelulárním kationtem. Je kofaktorem více než 300 enzymových reakcí. Mezi reakce zajišťované Mg^{++} patří např. funkce Na^{+} - K^{+} ATPázové pumpy (enzym štěpící ATP s uvolněním energie). Proto buňka s nedostatkem Mg^{++} nemůže doplnit chybějící K^{+} ani při jeho dostatečném přívodu. Další funkcí je zajištění činnosti ATPázové pumpy, bránící vstupu Ca^{++} do buněk. Při úbytku Mg^{++} vstupují Ca^{++} do buněk. V případě buněk hladkého a příčně pruhovaného svalstva stoupá jejich tonus, je sklon k hypertenzi a křečím. Mg^{++} se také účastní reakcí s užitím ATP (energie pro potřeby buňky) pro syntetické procesy, pro funkci myokardu a svalové kontrakce, neuromuskulární převod a uvolňování hormonů. Mg^{++} má funkce antiarytmické, vasomotorické, snižuje excitabilitu myokardu a zlepšuje průtok koronárními arteriemi.

1.5.3.1 Hypomagnezémie

Příčiny:

Snížený příjem při stravování předem připravenými jídly a "fast food", snížený příjem parenterální výživou.

Snížená absorpce:

alkoholismus, zvracení, průjmy a laxativa, malabsorpční syndrom, pankreatitis, stavy po resekci tenkého střeva.

Zvýšené vylučování:

antibiotika,

Různé:

gravidita, laktace,

Klinické příznaky:

arytmie, hypertenze, deprese se manifestují obvykle při poklesu celkového S-Mg pod 0,5 mmol/l.

1.5.4 Kalcium**Referenční interval:**

sérum 2,23 - 2,63 mmol/l

moč 2,5 - 7,5 mmol/l

ionizované kalcium - sérum 1,0 - 1,4 mmol/l [2]

Horní hranice odpadu vápníku močí lze též určit výpočtem ve vztahu k hmotnosti pacienta:

$$\text{dU-Ca (mmol/24 h)} = \text{kg} \times 0,1$$

(tedy např. pro osobu o hmotnosti 70 kg to je 7 Ca mmol/d). [2]

Celková zásoba vápníku v těle je 30 mol (1200 g), z toho 75% je uloženo v kostech. V séru je 40 až 45% vápníku vázáno na bílkoviny, 50% ionizováno, 5 až 10% v komplexu s kyselinami. Pro myokard a neuromuskulární dráždivost má význam hlavně ionizované Ca (Ca^{++}). Pokles koncentrace má za následek vyšší dráždivost, zároveň snížení síly svalové kontrakce

1.5.4.1 Hypokalcémie**Příčiny:**

Snížení celkového Ca^{++} bývá u nekrotizující pankreatitidy, hypoparatyreózy, renální insuficience, hypomagnezémie, poklesu proteinémie, osteomalacie, deficitu D vitamínu, osteoblastických tumorů.

Pokles Ca^{++} nastává u alkalózy i po masivních transfúzích, kdy citrát váže Ca^{++} . Pokles Ca^{++} nemusí být provázen poklesem celkového Ca^{++} . [2]

Klinické příznaky:

parestézie, dušnost, abdominální koliky, křeče, zmatenost, podrážděnost.

Při hodnocení hypokalcémie je vždy nutno posuzovat současně třemi parametry: pH, Ca^{++} , celkovou bílkovinu.

Např. normální celkové Ca^{++} , při alkalóze a vysoké celkové bílkovině mohou být křeče, protože Ca^{++} je nízké. [2]

1.5.4.2 Hyperkalcémie

Příčiny:

hyperparatyreóza, hypervitaminóza D, metastázy tumorů do kostí, hyperproteinémie. [2]

Klinické příznaky:

slabost, letargie, únava, zmatenost, snížení neuromuskulární dráždivosti, nechutenství, zvracení, na EKG zkrácení QT, zvýšená citlivost na digitalisové preparáty. Při Ca^{++} vyšším než 4 mmol/l se objevuje hyperkalcemická krize, zmatenost, bezvědomí, zástava srdce v systole.

1.5.5 Chloridy

Ztráty Cl^- bez odpovídajících ztrát silných kationtů. Zvracení kyselého žaludečního obsahu, eventuálně odsávání kyselého žaludečního obsahu sondou. Za 24 hodin se v žaludeční šťávě odčerpá přibližně 40 až 160mmol Na^+ , 15mmol K^+ , 200mmol Cl^- , 25 až 100mmol H^+ . Při zvracení nebo odsávání žaludečního obsahu jsou ztráty Cl^- vyšší než ztráty Na^+ .

Zvýšené ztráty Cl^- stolicí. U vrozených chloridy ztrácejících průjmů, dále u pacientů s adenomatózou tlustého střeva, obsahuje někdy stolice větší množství bílkovin, Na^+ , K^+ , ale hlavně Cl^- . [2]

1.5.6 Laktát

Podle vzniku rozlišujeme 2 druhy laktátové acidózy:

Typ A laktátová acidóza

Zvýšená koncentrace laktátu je způsobena jak zvýšením jeho produkce, tak sníženým metabolizováním v játrech a ledvinách, kde je obvykle za normálního stavu konvertován na pyruvát a použit buď v glukoneogeneze nebo metabolizován aerobní cestou v Krebsově cyklu. Příčinou laktátové acidózy typu A jsou stavy, kdy vážně dodávka O_2 do tkání, septický šok, selhání levé komory srdeční.

Při klinickém podezření na laktátovou acidózu je třeba vyšetřit koncentraci laktátu, nejlépe v arteriální krvi.

Referenční rozmezí koncentrace laktátu je 0.3 - 1.3 mmol/l. Jako závažný stav hodnotíme laktátovou acidózu, kde koncentrace laktátu je vyšší než 5 mmol/l a pH menší nebo rovno 7,250. [2]

Typ B laktátová acidóza:

je způsobena neschopností využít laktát pro glukoneogenezu (působením některých léků nebo toxických látek jako biguanidy, ethanol, methanol, streptozotocin) nebo pro defekt nebo inhibici enzymů katalyzujících glukoneogenezu např. fruktosa-1, 6-bisfosfatasa, glukosa-6-fosfatasa. Též u diabetického komatu může acidóza potlačit využití laktátu a dochází k laktátové acidóze.[2]

Obecné zásady terapie poruch ABR:

Terapie musí být především kauzální, to znamená odstranit příčinu, která poruchu ABR vyvolává. Musí být komplexní, neupravuje pouze pH, ale celé vnitřní prostředí. Pokud nelze vyvolávající příčinu odstranit, snažíme se upravit hodnotu pH krve k hodnotám optimálním. Řídíme se přitom zásadou, že organismu, který je adaptován na určité pH, prudká změna pH spíše uškodí než prospěje. Při úpravě pH je nutno počítat se stupněm rozvinutí kompenzačních a korekčních dějů a s předpokládanou dobou jejich trvání.

1.6 Elektrochemické metody

1.6.1 Potenciometrie

Elektrochemická metoda, při které se měří rozdíl potenciálů (napětí) mezi dvěma elektrodami, se nazývá potenciometrie. Jedna z elektrod pracuje jako referenční (srovnávací) a má konstantní potenciál, který nezávisí na složení měřeného roztoku.

Druhá elektroda je označována jako indikační (měrná) a její potenciál závisí na aktivitě měřeného analytu ve zkoumaném roztoku. Napětí mezi oběma elektrodami se měří digitálním voltmetrem. Elektrochemické reakce probíhají téměř výhradně na povrchu elektrod. Jde tedy o reakce heterogenní, kde velmi záleží na povrchu elektrod, který musí být dostatečně stálý a reprodukovatelný. Biologické tekutiny jsou složité systémy a obsahují celou řadu povrchově aktivních látek, takže je to technicky dost obtížné

1.6.2 Teorie pH

O tom, zda roztok je kyselý, neutrální nebo zásaditý, rozhoduje koncentrace vodíkových iontů. Chemicky čistá voda, která je neutrální, je disociována na vodíkový a hydroxylový iont jen v malé míře. V jednom litru vody při +22°C je pouze jedna desetimilióntina molu vodíkových iontů, tedy 0,0000001 molu/l. Roztoky, které mají koncentraci vodíkových iontů vyšší než voda, jsou kyselé, roztoky, které mají koncentraci vodíkových iontů nižší než voda, jsou zásadité.

Koncentraci vodíkových iontů (pH) nemůžeme, měřit přímo, můžeme však měřit potenciál vodíkových iontů roztoku. Pouze chemicky čistá voda má koncentraci vodíkových iontů shodnou s jejich aktivitou. Přítomnost jakýchkoliv jiných rozpustných látek snižuje koncentraci H (tzv. solný efekt). Z praktických důvodů se však v lékařství pojmy aktivita a koncentrace H nerozlišují.

Vznik potenciálu elektrody:

Je-li do destilované vody ponořena kovová (například zinková) tyč, vzniká mezi kovem a vodou potencionální rozdíl, protože atomy kovu se v nepatrné míře rozpouští a ve formě kationtu přechází do bezprostředního okolí tyče. Tím získává tyč záporný a bezprostřední okolí tyče kladný potenciál.

Ponoříme-li tyč z ušlechtilého kovu, který má silné vázané valenční elektrony (např. měď) do roztoku vlastních iontů (např. síranu měďnatého), nabíjí se kovová elektroda kladně. Při spojení kladné a záporně nabitě elektrody putují elektrony z elektrody záporné k elektrodě kladné a vzniká tak elektrický proud. Galvanický článek vzniká spojením dvou poločlánků (elektrod) např. elektrody zinkové a měděné. Roztoky síranu zinečnatého a měďnatého musí být odděleny polopropustnou membránou. [3]

Nernstova rovnice:

Nernst odvodil pro potenciál elektrody výraz, který stanoví velikost elektrodového potenciálu v závislosti na koncentraci příslušných iontů v roztoku (viz. vztah 1.6.2):

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln a \quad (2)$$

E - potenciál elektrody,

E_0 - standardní potenciál, konstantní pro danou elektrodu,

R - plynová konstanta vyjádřená v Joulech,

T - absolutní teplota v Kelvinech,

N - mocenství iontů,

F - Faradayův náboj,

A - aktivita elektrolytu (zjednodušeno). [3]

Z Nernstovy rovnice lze odvodit, že při dané teplotě potenciál měrné elektrody závisí na aktivitě (koncentraci) iontů v roztoku, do něhož je ponořena. Potenciál jedné elektrody nemůžeme změřit a proto k měření sestavujeme galvanický článek ze dvojice elektrod. Jedna z elektrod má potenciál známý, konstantně stálý a dobře reprodukovatelný a nazývá se elektroda srovnávací (referenční).

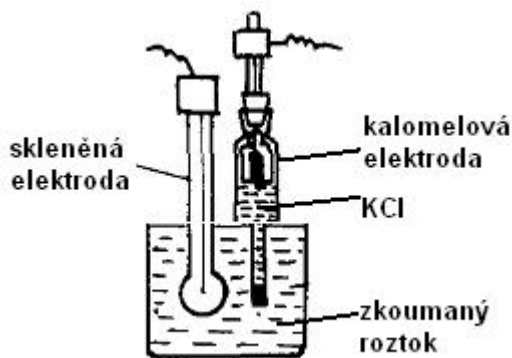
Druhá, měřicí (indikační) elektroda má potenciál neznámý, závislý na koncentraci (aktivitě) iontů v roztoku, který měříme. Obě elektrody jsou propojeny solným můstkem. Rozdíl potenciálů mezi indikační a referenční elektrodou je možno změřit a určit z něj koncentraci měřených iontů a pH. [3]

Indikační elektrody:

K měření pH a při potenciometrických neutralizačních titracích používáme jako indikační elektrody elektrodu vodíkovou, chinhydrinovou, antimonovou a skleněnou.

Skleněná elektroda (nejpoužívanější)

Tenká skleněná baňka ze speciálního skla, plněná tlumivým roztokem nebo kyselinou chlorovodíkovou (0,1 mol/l). Do kyseliny je zasunut stříbrný drátek, pokrytý vrstvičkou chloridu stříbrného. Tím je vytvořena uvnitř baňky argentschloridová elektroda, která má stálý potenciál. Je-li vložena skleněná elektroda do roztoku s neznámou koncentrací vodíkových iontů, vzniká na stěnách skleněné membrány rozdíl potenciálů, který je úměrný rozdílu pH vně a uvnitř elektrody. Protože pH uvnitř elektrody je stálé, je potenciál elektrody závislý pouze na pH vnějšího, měřeného roztoku. [3]



Obr. č. 1.1 Schéma měření pH skleněnou elektrodou s referenční elektrodou kalomelovou

1.6.3 Elektroda pro měření $p\text{CO}_2$ (Severinghausova)

V podstatě rovněž skleněná elektroda pro měření pH, je však od měřeného prostředí oddělena membránou, která propouští pouze CO_2 .

Koncentrace vodíkových iontů mezi membránou propustnou pro CO_2 a mezi povrchem skleněné elektrody je pak úměrná koncentraci kyselině uhličitě (H_2CO_3 , H^+ , HCO_3^- a CO_2 jsou ve vzájemném konstantním vztahu), a tím i parciálnímu tlaku kysličníku uhličitého. [3]

1.6.4 Iontově selektivní elektrody

Biologický materiál (krev, sérum, plazma, moč, buněčné tekutiny atd.) se liší od ostatních analyzovaných vzorků tím, že obsahují různorodé organické a anorganické látky, složení vzorků se s časem mění a k dispozici je jen malé množství materiálu, obvykle několik desítek mikrolitrů. Všechny tyto faktory spolu s požadavky na přiměřenou spolehlivost analýz a dlouhou životnost elektrod přímo rozhodují o návrhu konstrukce ISE. V současné době se většina měření pro klinickou praxi uskutečňuje v průtokových sestavách s kontinuální detekcí. Hlavním problémem při navrhování konstrukce elektrod pro klinické použití je samotná membrána. Membrána je i místem, kde dochází k chemickým rozlišovacím procesům. Membrána určuje rozhodujícím způsobem kvalitu signálu a životnost elektrody. Pro měření elektrolytů a krevních plynů se používá jen omezený počet druhů membrán.

V klinické biochemii se používají tři základní konstrukce ISE:

1. Skleněné membrány se běžně používají pro měření pH a někdy pro sledování aktivity sodných iontů. Ve tvaru kapiláry jsou velmi vhodné pro průtokové sestavy; mají rychlou, stabilní a reprodukovatelnou odezvu a dlouhou životnost. Jejich hlavní nevýhody jsou mechanický odpor a náchylnost k adsorpci organických makromolekul.
2. Polymerní membrány jsou také někdy nazývány "plastické membrány". Jejich matici tvoří nejčastěji PVC a jeho deriváty. Selektivita membrány závisí na typu použitého ionoforu (syntetické molekuly) - v současné době se používají hlavně neutrální nosiče - a na modifikátorech (rozpouštědla, změkčovadla, iontové přísady). Protože polymerní membrána je rozpustná v organických rozpouštědlech, lze ji poměrně snadno umístit do elektrod různých tvarů. Životnost je zpravidla kratší než u skleněných membrán.

Selektivita elektrod s polymerními membránami je v současnosti dostatečná.

3. Pevné (krystalické) membrány jsou jen vzácně používány v rutinní klinické praxi s výjimkou chloridových elektrod. Vnitřní spoj, nebo-li kontakt, v typické ISE je proveden tak, že referenční AgCl elektroda je ponořena do vnitřního (výplňového) roztoku. Hlavní nevýhodou tohoto uspořádání je odpařování vnitřního roztoku což vede k přerušení elektrického obvodu a vyžaduje zásah obsluhy. Moderní způsob jak odstranit tento problém je vsazení mezivrstvy mezi membránu a elektrický kontakt. To lze uskutečnit různými cestami, např. použitím vodivého polymeru

Všechny ISE jsou elektrody s velkým odporem a přesnost jejich měření závisí na citlivosti voltmetru.

Pro stanovení alkalických kovů - sodíku, draslíku a kovů alkalických zemin (vápníku) byly připraveny elektrody ze speciálních skel. Velmi dobré výsledky byly získány s membránovými elektrodami. Iont-selektivní membrána je tvořena nosičem (např. silikonovou pryží), v které jsou rozptýleny nerozpustné sloučeniny iontů, jejichž aktivita má být měřena. Membránou se uzavře z jedné strany skleněná trubice, která se naplní roztokem rozpustné soli měřeného iontu a do něj se ponoří nasycená kalomelová elektroda. Potenciál této elektrody je pak závislý na aktivitě odpovídajícího iontu v měřeném roztoku.

1.6.5 Enzymové elektrody

Podstatou konstrukce enzymových elektrod je předřazení membrány s imobilizovaným enzymem (např. ureázou pro stanovení močoviny nebo glukózaoxidázou pro stanovení glukózy) před vlastní elektrochemické čidlo. Stanovovaný substrát difunduje do enzymové membrány, kde reaguje s imobilizovaným enzymem na produkt, který se pak detekuje potenciometricky nebo ampérometricky.

1.6.6 Srovnávací (referenční) elektrody

Srovnávací elektrody mají známý konstantní potenciál. K nejužívanějším patří kalomelová elektroda. Patří mezi elektrody 2. druhu, které jsou tvořeny kovem pokrytým vlastní solí, ponořeným do iontů soli. Je sestavena z kovové rtuti, z chloridu rtuťnatého (kalomelu) a roztoku KCl. Potenciál kalomelové elektrody s nasyceným KCl při 24°C je 241mV. Konstrukce je znázorněna na obr. č.2



obr. č.1.2 Jeden z typů kalomelové elektrody [3]

Potenciometry, elektronkové voltmetry

Potenciometry jsou přístroje k zjišťování elektromotorického napětí článků.

Elektromotorické napětí mezi indikační a referenční elektrodou nelze měřit běžnými voltmetry, protože by měřeným článkem protékaly poměrně velké proudy, které by mohly způsobit polarizaci jedné nebo obou elektrod a zavinit chybné výsledky. K měření tohoto napětí jsou použity tyto způsoby:

- Nepřímá metoda je používána jen výjimečně tam, kde nejsou kladeny velké nároky na přesnost měření. Používá zrcátkového galvanometru, k němuž je do série připojen velký odpor.
- Kompenzační metoda je přesnější než nepřímá, protože z měřeného článku neodebírá proud. Při této metodě je proti měřenému článku zapojeno vnější napětí opačného směru, které můžeme regulovat a měřit. Jakmile při regulaci vnějšího napětí dosáhneme stavu, že okruhem neprochází proud, znamená to, že vnější napětí je stejné jako napětí článku.

Elektronkové voltmetry jsou citlivé přístroje, které měřenému článku prakticky neodebírají proud. Jejich základem je zesilovací schopnost elektronky - triody. Užívají se pro měření systémů, které mají velký odpor (přes 1 Mohm) např. při používání skleněné elektrody. Elektronkové voltmetry, které vedle stupnice v milivoltech mají také stupnici v jednotkách pH se označují jako pH metry. [3]

1.7 Analyzátor krevních plynů a elektrolytů NOVA CCX (obr. 1.3)

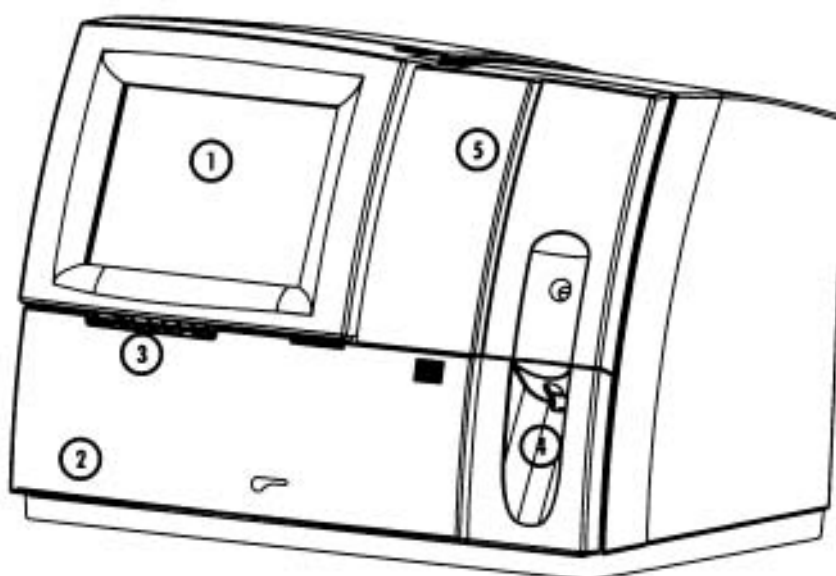


obr. 1.3 vnější pohled



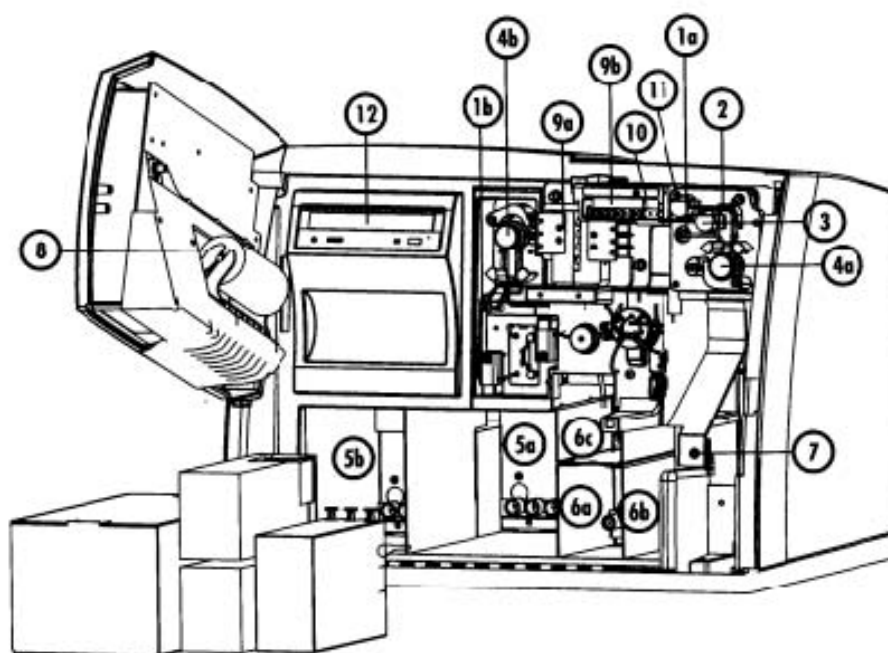
obr. 1.4 vnitřní pohled

1.7.1 Základní popis analyzátoru



obr. 1.5 Vnější pohled - popis

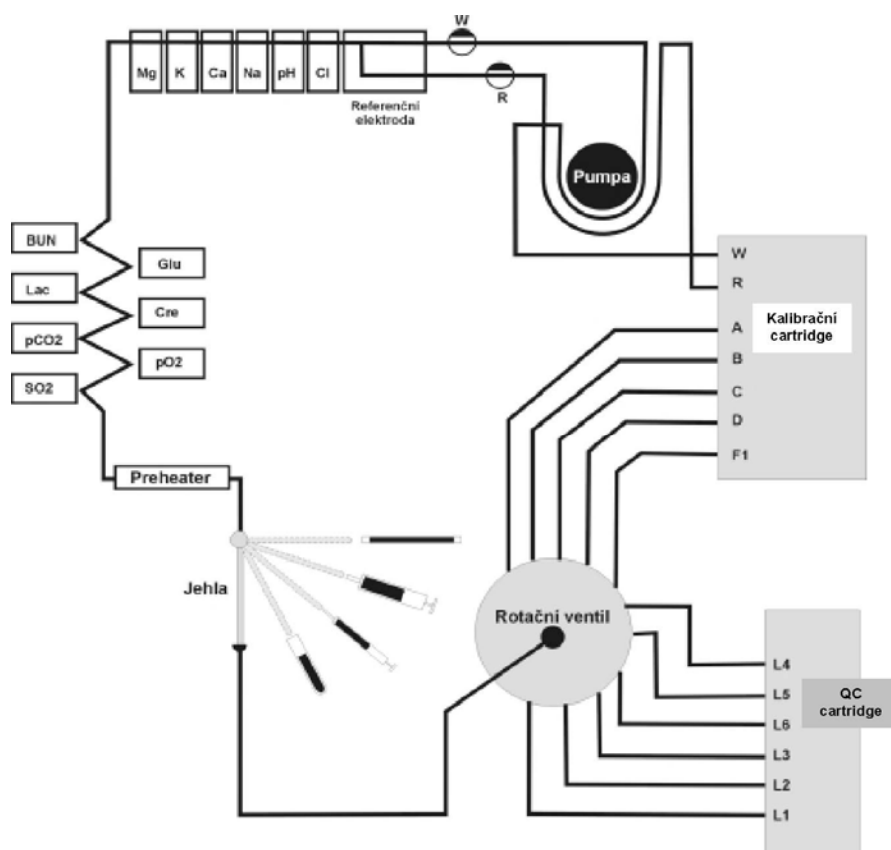
- 1 - Doteková obrazovka
- 2 - Dvířka/Volitelná klávesnice
- 3 - Tiskárna
- 4 - Nasávací jehla
- 5 - Dvířka/Přední panel [4]



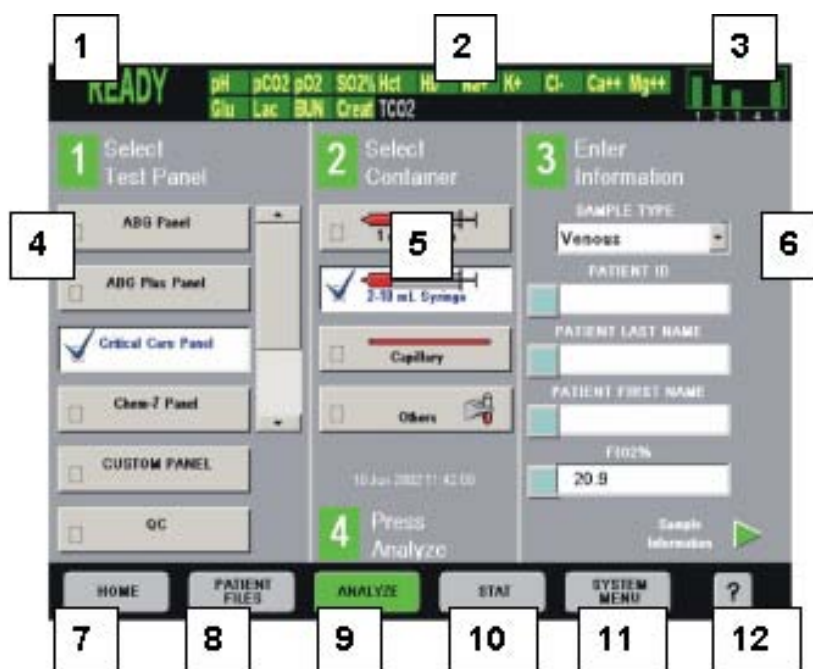
obr. 1.6 Pohled na analytickou část

- | | |
|--|--|
| 1a. Odpadní hadička ABR | 6c. Vstup pro QC cartridge (CO-Ox) |
| 1b. Odpadní hadička CO-Ox | 7. Nasávací jehla |
| 2. Referenční hadička | 8. Tiskárna |
| 3. Přítlačný ventil (referenční) | 9a. Sensorový modul – BUN, Lac, PCO ₂ , SO ₂ |
| 4a. Pumpa a hadičky pumpy ABR | GLU, Creat, PO ₂ |
| 4b. Pumpa a hadičky pumpy CO-Ox | 9b. Sensorový modul – Mg, K, Ca, Na, pH, Cl |
| 5a. Vstup pro kalibrační cartridge ABR | 10. Referenční elektroda |
| 5b. Vstup pro kalibrační cartridge CO-Ox | 11. Přítlačný ventil (odpadní) |
| 6a. Vstup pro QC cartridge (BG) | 12. CD ROM |
| 6b. Vstup pro QC cartridge (Chemistry) | |

[4]



obr. 1.7 Schéma průtoku reagenčních roztoků a vzorku



obr. 1.8 Základní obrazovka

1. Dotykem na tuto část obrazovky se objeví tabulka STATUS.
2. Dotykem na tuto část obrazovky se objeví tabulka CALIBRATION DATA.

3. Dotykem na tuto část obrazovky se objeví tabulka s přehledem kalibračních a QC packů a počítadlo vzorků.
4. V sekci obrazovky Select Test Panel lze zvolit panel požadovaných parametrů v měřeném vzorku.
5. V sekci obrazovky Select Container lze zvolit typ odběrové soupravy.
6. V sekci obrazovky Enter Informarion lze zadat informace o analyzovaném vzorku a o pacientovi.
7. Dotykem na tlačítko HOME se vždy vrátíte do základní obrazovky.
8. Dotykem na tlačítko PATIENT FILES lze vyvolat soubory s výsledky již změřených vzorků pacientů.
9. Dotykem na tlačítko ANALYZE zahájíte analýzu vzorku.
10. Dotykem na tlačítko STAT zahájíte analýzu vzorku podle předem definovaného nastavení.
11. Dotykem na tlačítko SYSTEM MENU se otevře nabídka pro vstup do jednotlivých druhů menu.
12. Dotykem na tlačítko ? se otevře nabídka HELP (pomoc). [4]

1.7.2 Kalibrace a kontrola analyzátoru

Přístroj je automaticky kalibrován dvoubodovou kalibrací z kalibračního setu v intervalu 2 - 6 hodin. Pouze SO₂ a hemoglobin je třeba kalibrovat pomocí dvou externích kalibrátorů v ampulkách. V případě, že požadované parametry nejsou nakalibrovány, lze spustit kalibraci ručně. Kontrola se provádí 1x denně ze dvou interních kontrolních setů (zvláště pro pH, pCO₂, pO₂ a zvláště pro Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻, laktát a glukózu). Navíc 3x týdně externí kontrola roztokem od firmy Biorad

1.7.3 Měření vzorků

Vzorky mohou být měřeny ze stříkaček o objemu 1-10 ml, kapilár různých velikostí, zkumavek apod. Plná krev musí být vždy heparizovaná, nejlépe heparinem litným v maximální koncentraci 20 jedn./ml. Před každým měřením je nezbytné vzorek řádně promíchat!

Ze základní obrazovky postupujte takto:

Vybere se měřený test - Select Test Panel (Předvolby jsou nadefinovány výrobcem, lze je ovšem změnit v SETUPu analyzátoru). Při stisknutí předvolby se v horních řádcích vysvítí testy, které budou měřeny.

Vybere se odběrová souprava - Select Container (vybranému tlačítku odpovídá poloha nasávací jehly.)

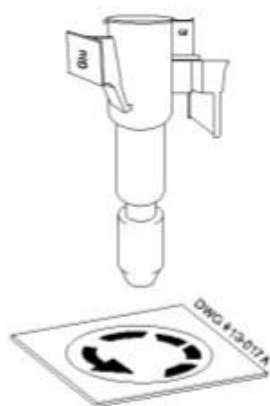
Stiskne se ANALYZE

Přiloží se odběrová souprava k jehle a potvrdí se tlačítkem ANALYZE. Vzorek se nasaje do prostoru elektrod a probíhá měření.

1.7.4 Základní údržba a části analyzátoru

Výměna glukózové a laktátové membrány.

Po vyjmutí elektrody z komůrky, se stáhne membrána z elektrody. Leštění glukózové a laktátové elektrody se provede přiloženým čistým suchým leštícím papírkem žluté barvy, podloží se prstem, a vyvine se mírný tlak proti leštěné elektrodě. Krouživým pohybem se leští elektroda 10-15 s. (viz obr. 1.9)



Obr 1.9 Leštění elektrody

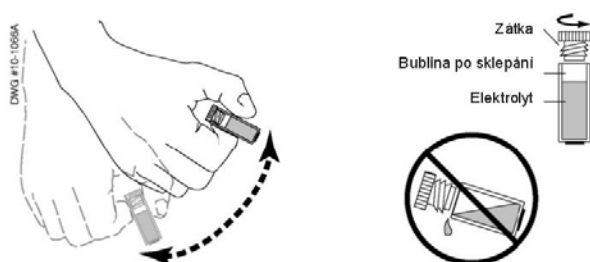
Pak se elektroda ponoří na 5 minut do roztoku Nova Cleaning Solution, který se před tím nakape do kondičního kalíšku (PN 09458).

Po vyjmutí elektrody z roztoku, se řádně opláchne (nejméně 10 s) deionizovanou vodou a osuší se jemně povrch elektrody gázou nebo tamponem.

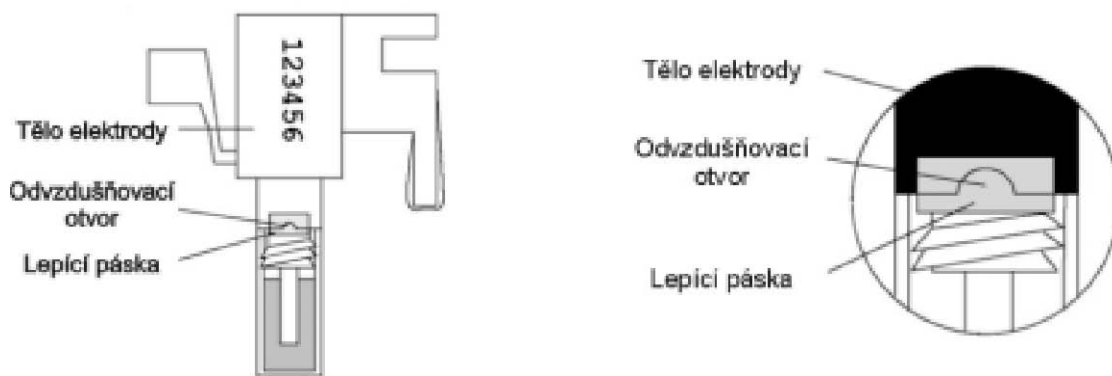
Opatrně se nasadí nová membrána na elektrodu. Membránou se neotáčí! A provede se kalibrace analyzátoru.

Výměna PCO₂ membrány

Po vyjmutí elektrody z komůrky, se odšroubuje membrána z elektrody. Nová elektrolytem předplněná membrána se sklepe tak, aby vzduchová bublina nebyla na membráně a odšroubuje se černý uzávěr.(obr. 1.10). Opatrně se nasadí nová membrána a našroubuje. Odstraní se vzduchová bublina z prostoru membrány. Osuší se tělo elektrody s nasazenou membránou a přelepí odvzdušňovací otvor lepicí páskou.(obr. 1.11). A překalibruje se analyzátor.



obr. 1.10 Sklepnutí vzduchové bublinky



obr. 1.11 Nasazení nové membrány

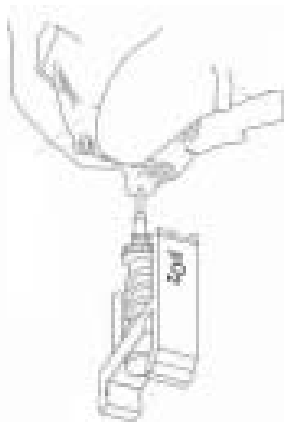
Výměna PO₂ membrány.

Po vyjmutí elektrody z komůrky, se odšroubuje membrána z elektrody. Nová elektrolytem předplněná membrána se sklepe tak, aby vzduchová bublina nebyla na membráně a odšroubuje se černý uzávěr. Leštění PO₂ membrány se provede přiloženým leštícím papírkem modré barvy, na který se nakape destilovaná voda, podloží se prstem, a vyvine se mírný tlak proti leštěné elektrodě. Krouživým pohybem se leští elektroda 10-15 s. (viz. obr. 1.12)

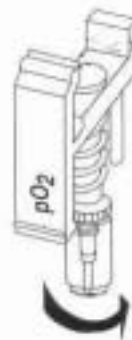
Poté se navlhčenou buničinou otře hrot elektrody (obr. 1.13). Opatrně se nasadí nová membrána a našroubuje (obr. 1.14). Odstraní se vzduchová bublina z prostoru membrány.



obr. 1.12



obr. 1.13



obr. 1.14

2 Vyšetření osmolality

2.1 Osmometrie

Tlak rozpuštěných, zejména nízkomolekulárních látek a iontů v roztoku odděleném polopropustnou membránou od samotného rozpouštědla se nazývá osmotický tlak. Osmotický tlak je přímo úměrný celkovému počtu rozpuštěných nebo disociovaných částic. Pokud látka disociuje, je každá její disociovaná část osmoticky aktivní částicí. Nedisociovaná látka představuje jen jednu osmoticky aktivní částici. Látková koncentrace osmoticky aktivních částic v 1 kg rozpouštědla se označuje jako osmolalita (mmol/kg). Měření osmolality se nazývá osmometrie.

V laboratorní práci se používá nepřímé měření osmotického tlaku. Vychází se z měření těch vlastností roztoků, které se mění v závislosti na změně osmolality. V klinické biochemii se používají dva typy osmometrů. První typ využívá snížení teploty tuhnutí roztoku v závislosti na koncentraci částic v roztoku (kryoskopie). Osmometry musí být vybaveny velmi citlivým teploměrem (s rozlišitelností tisíciny °C), protože snížení teploty tuhnutí je velmi malé (přibližně o 0,5 °C v séru). Druhý typ sleduje snížení tenze par rozpouštědla nad roztokem (zvýšení teploty varu, ebulioskopie), resp. snížení rosného bodu par nad roztokem v závislosti na koncentraci částic v roztoku pomocí termoelektrického hygrometru. Osmometry mohou být vybaveny podavačem vzorků a automatizovány.

2.2 Definice a terminologie

2.2.1 Osmóza:

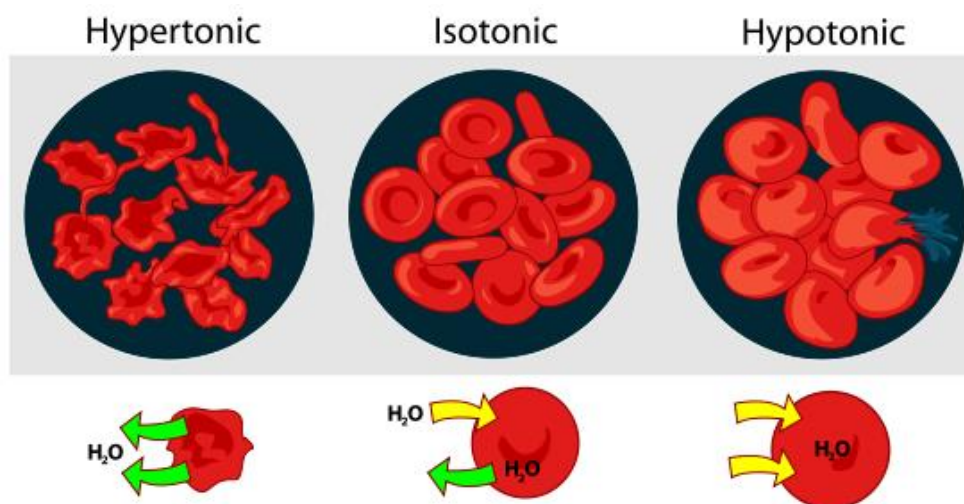
Nazývá se tak průnik solventu (rozpouštědla) přes semipermeabilní (polopropustnou, tj. propustnou pouze pro vzorek, ne pro roztok) membránu ze zředěného prostoru do koncentrovanějšího. V organismu vede osmóza především k pohybu kapaliny mezi různými kapalinovými prostory.

2.2.2 Osmotický tlak:

Rovná se tlaku, kterým by bylo nutno působit na koncentrovanější roztok aby se zabránilo průniku rozpouštědla přes semipermeabilní membránu ze zředěného roztoku. Osmotický tlak roste rovnoměrně se vzrůstající teplotou a je rovněž lineárně úměrný koncentraci roztoku. Je zde analogie se zákony ideálních plynů (Boyl-Mariottův pro koncentraci a Gay-Lussacův pro teplotu). Osmotický tlak je roven tlaku, který by měla rozpuštěná látka, kdyby byla za stejné teploty v plynném stavu a měla též objem jako roztok. To plně platí jen v zředěných roztocích blížících se pojmu ideální roztok. Osmotický tlak je obtížné stanovit přímo. Snadnější je vypočítat jej ze snížení bodu tuhnutí, které je rovněž úměrné koncentraci látky v roztoku. Osmotický tlak má důležitou úlohu při pohybu vody a elektrolytů v organismu. [5]

V těle živočichů, v jejich extracelulární tekutině, se udržuje přesně daná koncentrace iontů. Extracelulární prostředí je tak k prostředí uvnitř buňky isotonické a buňky tak nejsou poškozovány nadměrným přísunem vody nebo naopak jejím přílišným úbytkem. Kromě iontů solí se na celkové osmolalitě prostředí podílí anionty proteinů. Koloidně-osmotický tlak proteinů se nazývá tlakem onkotickým.

Význam onkotického tlaku proteinů krevní plazmy (obr. 2.1) záleží na umožnění vzniku a následné resorbce tkáňového moku. Na začátku kapilár je hydrostatický tlak (generovaný srdcem) ve vlasečnici větší než onkotický tlak bílkovin krevní plazmy. Krevní plazma se tímto tlakem filtruje do tkání jako tkáňový mok nesoucí živiny. Na konci kapilár hydrostatický tlak poklesne, onkotický tlak je relativně vyšší a tkáňový mok (voda a metabolity buněk) je nasáván zpět do krevního oběhu. Při poklesu koncentrace bílkovin v krvi se objevují otoky, protože onkotický tlak už nestačí k vyčerpání nadbytečného moku. [5]



obr. 2.1 vliv osmotického tlaku na lidské červené krvinky

2.2.3 Osmolalita:

Moly nedifusibilních částic roztoku rozpuštěných v kilogramu vzorku. Jde o vyjádření osmoticky účinné koncentrace obdobné molalitě (moly roztoku v kilogramu rozpouštědla) zahrnující navíc disociaci roztoku. Obvykle se vyjadřuje v mOsm/kg (mmol/kg). Stejnou osmolalitu má roztok obsahující 1 mol glukózy, močoviny, ale i vysokomolekulárního albuminu. Roztok obsahující 1 mol NaCl má (za předpokladu úplné disociace osmolalitu dvojnásobnou, neboť obsahuje dvojnásobné množství částic (1 mol Na^+ a 1 mol Cl^-)). [2]

2.2.4 mOsm (miliosmol)

je množství rozpuštěného roztoku, které vykazuje stejný osmotický tlak (osmotickou koncentraci) jako 1 mmol ideálního nedisociovaného roztoku ve stejném množství vzorku. [2]

2.2.5 Klinické údaje

Referenční meze:

Osmolalita séra se za fyziologických okolností pohybuje v rozmezí 275 - 295 mOsm/kg a je velmi přísně regulována pomocí osmoreceptorů v mezimozku.

Ty regulují sekreci adiuretinu, který ovlivňuje zpětnou resorpci vody v distálním tubulu ledvin. Při měření osmolality v plazmě se kromě jiného uplatňují i látky, které volně procházejí biologickými membránami. Tyto roztoky sice zvyšují osmolalitu plazmy, ale neuplatňují se při přesunech vody přes biologické membrány z osmotických důvodů. Typickým představitelem těchto osmoticky neefektivních látek je urea, jejíž molální koncentrace se při úvahách o efektivní osmolalitě neuvažuje. Za normální hodnotu osmolality v běžném náhodném vzorku moče se považuje rozmezí 40 - 1200 mOsm/kg.

2.3 OsmoStation typ: OM-6050 firmy Arkray



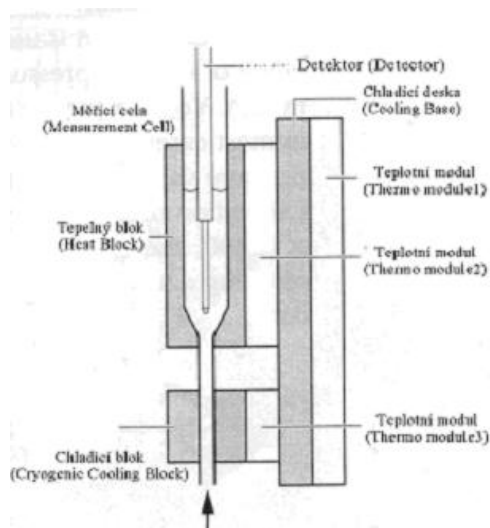
obr. 2.1 vnější pohled



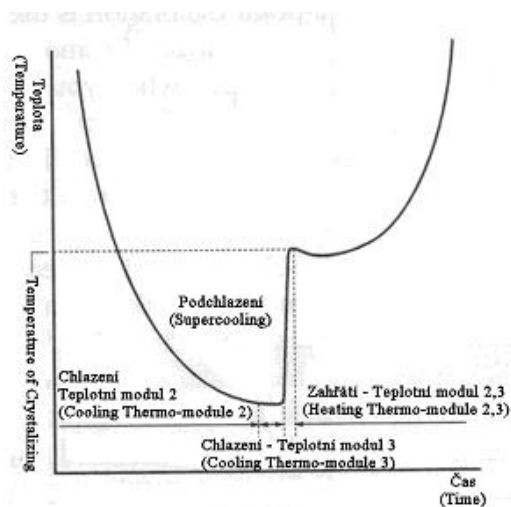
obr. 2.2 vnitřní pohled

2.3.1 Princip

Osmometr je založen na kryoskopickém měření, kdy se měří bod tuhnutí vodných roztoků. Tryska natáhne vzorek a pošle ho do měřicí cely (obr.2.3). Thermo-module 2 je aktivován a postupně ochlazuje Heat Block. To způsobuje superchlazení - vzorek v měřicí cele je ještě kapalný v bodě tuhnutí (tání). Thermo modul 3 je aktivován k chlazení Cryogenic Cooling Blocku dokud teplota nepoklesne pod teplotu tuhnutí (obr. 2.4). Vzorek v bloku tuhne (zmrzne) a vzorek v měřicí cele koaguluje (sráží se). Vznikají kryohydráty, směs ledu a roztoku. Měření teploty krystalizace určuje snížení teploty v bodě tuhnutí. Opačný proud je aplikován na Thermo-moduly 1 a 3 k zahřátí Heat Blocku a Cryogenic Cooling Blocku. Vzorek roztaje do svého původního kapalného stavu. Tryska přenesse vzorek z měřicí cely do nádoby.

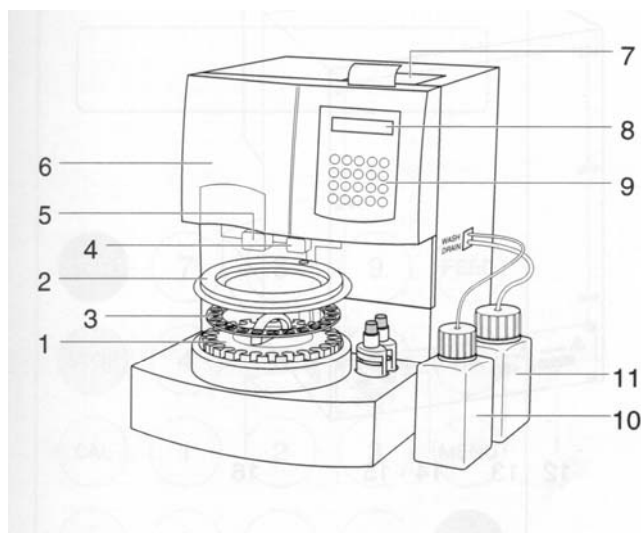


obr. 2.3 Měřicí cela



obr. 2.4 Teplota vzorku během měření

2.3.2 Popis zařízení:



obr. 2.5 Popis osmometru OsmoStation

Osmometr OsmoStation se skládá z následujících částí (obr 2.5):

- 1.Podavač
- 2.Kryt zabraňující odpařování vzorků A
- 3.Druhý protiodpařovací kryt B
- 4.Promývací cela
- 5.Statimová pozice
- 6.Přední kryt

- 7.Tiskárna
- 8.Displej
- 9.Operační panel
- 10.Láhev s promývacím roztokem
- 11.Odpadní nádoba [6]

2.3.3 Teorie, použití, předpoklady provádění postupu

Osmometr OsmoStation je možné použít ke stanovení osmolality ve vzorcích sér (plazmy) nebo ve vzorcích močí. Předpokladem stanovení je mimo jiné dodržení zásad správného preanalytického zabezpečení vzorků. Měřit je nutné ihned po oddělení krevních elementů, krátkodobé skladování (do 24 hodin) je přípustné pouze při uchovávání do 4°C, vzorky uchovávané při teplotě laboratoře mají falešně snížené hodnoty, zmražené vzorky jsou zcela nevhodné. Stanovení ovlivňuje těhotenství (snížení), nadmořská výška (snížení) a glykolýza (zvýšení). Pro stanovení v moči je třeba zaslat koncentrovanou první ranní moč a nejpozději do 1 hodiny dopravit do laboratoře. Pokud se osmolalita určuje v moči sbírané 24 hodin, je nutno moč uchovávat v chladničce při teplotě 2 - 8°C. Nelze použít moč upravenou přidáním jakékoliv látky. Stanovení v moči ovlivňuje pitný režim.

Bezpečnostní aspekty:

Při práci je nutné dodržovat předpisy a zásady práce s infekčním materiálem a to nejen přímo při zacházení se vzorky biologického materiálu, ale i při manipulaci s přístrojem.

2.3.4 Kalibrace a kontrola činnosti

Vztah mezi exponentem bodu tuhnutí a osmotickým tlakem představuje kalibrační křivka. Křivka je citlivá k mechanickému zařízení analyzátoru a okolnímu prostředí. Přístroj může vydávat falešné výsledky po dlouhodobém nepoužívání. K eliminaci tohoto problému je nutná kalibrace přístroje. Kalibrace zahrnuje měření dvou nebo více standardních roztoků, každý z nich má různou ale známou hodnotu osmotického tlaku. Můžeme volit mezi tří- nebo dvoubodovou kalibrací.

Kalibrace se provádí v případě nesplnění požadavků na denní kontrolu kvality. Výsledky kalibrace se zakládají do provozního deníku přístroje

Třibodová kalibrace:

Třibodová kalibrace se používá v rozsahu osmotických tlaků od 0 do 2000 mOsm. Tento kalibrační mód můžeme volit ve většině případů. U této kalibrace měříme tři Standard Solution 0, 300 a 1000 mOsm.

Dvoubodová kalibrace:

Dvoubodová kalibrace se používá v limitovaném rozsahu osmotických tlaků. Měří se Low a High Standard Solution. Užší rozsah kalibrátorů dává přesnější výsledky. Výsledná data můžeme vnést do logaritmické kalibrační křivky.

Kalibrační postup třibodové kalibrace je následující:

1. Do prvního kališku napipetujeme destilovanou vodu a kep vložíme do pozice 22, do druhého kepu dáme standard 300 mOsm a vložíme jej do pozice 23, třetí kep se standardem 1000 mOsm dáme do pozice 24.
2. Nasadíme protiodpařovací kryt
3. Zmáčkne tlačítko CAL a vybereme typ kalibrace zmáčknutím čísla 1 a potvrdíme YES. Kalibrace, která byla v paměti uložena bude smazána.
4. Zmáčkne START. Na displeji se nám zobrazuje, který standard zrovna měří a z tiskárny nám vyjede i jeho změřená hodnota.
5. Kalibraci můžeme ukončit tlačítkem STOP.
6. Kalibrace je skončena až se na displeji ukáže READY.

Kalibrační postup dvoubodové kalibrace je následující:

Do jednoho kepu dáme Standard Solution 300 mOsm v pozici 23 a standard 1000 mOsm do pozice 24

Nasadíme protiodpařovací kryt

Zmáčkne tlačítko CAL a vybereme typ kalibrace zmáčknutím čísla 2 a potvrdíme YES. Kalibrace, která byla v paměti uložena bude smazána.

Na číselné klávesnici navolíme hodnotu Low kalibrátoru a zmáčkne pomlčku. Potvrdíme hodnotu High kalibrátoru

Zmáčkne START. Na displeji se nám zobrazuje, který standard zrovna měří a z tiskárny nám vyjede i jeho změřená hodnota

Kalibraci můžeme ukončit tlačítkem STOP.

Kalibrace je skončena až se na displeji ukáže READY.

Kontroly:

K denní vnitřní kontrole dle zásad správné laboratorní práce Osmometru jsou používány certifikované validované kontrolní materiály Standard solution od výrobce o hodnotách 300mOsm a 1000mOsm. Vnější kontrola kvality (EKK) je zajištěna společností SEKK s.r.o. 4x ročně. Na základě úspěšnosti EKK je na kontrolovaný přístroj udělen certifikát o správnosti měření.

SEKK (celostátní systém externí kontroly) měříme 3x do roka

Údržba:

Denní údržba:

Do půllitrové láhve se nalije 50 ml koncentrovaného promývacího roztoku Washing solution dodaného výrobcem a doplní se 450 ml destilované vody a láhev se zašroubuje. Promývací roztok se používá na čištění senzoru po každém změřeném vzorku. Před každým měřením se musí zkontrolovat zásoba promývacího roztoku.

Každý den se kontroluje množství odpadu v odpadní nádobě a je-li třeba, vylije se. Po stisknutí tlačítka MENU a se vybere WASH (č.2). Zobrazí se nabídka tří typů mytí. Typ 1 a typ 2 se provádí denně.

Typ 1 – volí se počet mycích cyklů

Typ 2 – přístroj se myje dokud nezmáčkne STOP

Týdenní údržba:

Zvolí se MENU, číslo 2 – WASH a TYPE 3

Zředěný roztok sava 1:9 se nalije do kepu, který se vloží do statimové pozice.

2.3.5 Pracovní postup

Měření vzorků:

1. Přístroj je zapnutý.
2. Zkumavku s čárovým kódem vložíme do podavače (Nemíchat do jednoho kola zkumavky a kepy)
3. Vložit protiodpařovací kryt
4. Na číselné klávesnici zmáčkeme 1- x (x ... počet vzorků v kruhu) a ENTER
5. Zmáčkeme START
6. Pokud nemáme na zkumavce čárové kódy, na displeji se zobrazí HOLE001-01, kde první trojčíslí představuje číslo dávky a dvojčíslí pořadí vzorku. U čárových kódů se zobrazí ID 0000000X
7. Měření můžeme přerušit tlačítkem STOP
8. Vzorky jsou hotové, když se na displeji zobrazí READY [6]

Měření statimu:

1. Vzorek přelejeme do kepu a zmáčkeme STAT
2. Kep umístíme do statimové pozice. Lze vkládat pouze kepy (zkumavky by vypadly)
3. Zmáčkeme START.

Řízení jakosti:

Osmometr OsmoStation je přístroj umožňující přesné a správné měření osmolality, ale konečný výsledek měření může být významně ovlivněn i faktory nesouvisejícími bezprostředně se správnou funkcí přístroje (způsob odběru, skladování vzorků apod.). Nejjednodušší cestou zajištění kontroly i těchto faktorů je vkládání kontrolních referenčních materiálů. Tyto kontrolní materiály se vkládají v pravidelných intervalech mezi měřené vzorky. Výsledky měření kontrolních referenčních materiálů se zaznamenávají do tabulek a umožňují tak trvale sledovat stabilitu (správnost a přesnost) měření. V případě překročení varovných či regulačních mezí se okamžitě prověří situace a odstraní příčina chybného měření. Data těchto kontrolních měření je možné uchovávat v jakémkoliv laboratorním systému umožňujícím konstrukci regulačních diagramů.

Vedle uvedené interní kontroly kvality je laboratoř zařazená do vnější (externí) kontroly kvality (pravidelné kontrolní cykly firmy SEKK s.r.o.). Jakost stanovení je také zajišťována pravidelnou údržbou, která je zaznamenávána do provozního deníku přístroje.

3 Chemické vyšetření moči a vyšetření močového sedimentu

Provádí se z čerstvé, pokud možno ranní moči. Ranní moč vyšetřujeme proto, že v ní bývá nejvíce patologických součástí. Dáváme však přednost moči co nejčerstvější, hlavně proto, aby se v ní zachovalo co nejvíce intaktních buněčných elementů, případně válců. Moč se získává nejlépe spontánní mikcí, od cévkování se ustupuje především pro možnost zanesení sekundární infekce do vývodních cest močových. Pacient musí být poučen o nutnosti očištění ústí uretry před mikcí. K vyšetření používáme tzv. střední proud moči. Močí se do suché, čistě vymyté, uzavíratelné nádoby, ve které nesmí být zbytky např. desinfekčních činidel, které by mohly ovlivnit výsledky chemické analýzy. U žen nevyšetřujeme moč v období menses nebo krátce před a po menses (erytrocyty v moči). Je-li v tomto období vyšetření moči nezbytné, je nutno vyšetřovat moč cévkovanou. Moč je třeba k vyšetření dopravit co nejdříve, tak aby vyšetření močového sedimentu bylo provedeno maximálně do dvou hodin po vymočení.

3.1 Chemické kvalitativní vyšetření moči

Pro posouzení renální patologie mají z chemického kvalitativního vyšetření význam především:

Orientační zjištění hustoty (měrné hmotnosti)

Orientační stanovení pH moči

Zjištění bílkoviny v moči

Zjištění krve v moči

Průkaz leukocyturie

Zjištění glukózy

Zjištění nitritů [2]

K chemickému důkazu přítomnosti, tedy ke kvalitativnímu (semikvantitativnímu) stanovení jednotlivých patologických složek se dnes používají nejčastěji testovací papírky, kterými lze současně provést vyšetření až 10 parametrů. To umožňuje ještě vyšetření dalších patologických součástí moče, jako jsou:

Ketolátky
Bilirubin
urobilinogen.

3.1.1 Orientační stanovení pH

Zjišťuje se zpravidla testačním proužkem impregnovaným acidobázickým indikátorem. Změny barvy srovnávají se s barevnou stupnicí a vyjadřujeme s přesností ± 0.5 pH. Možné je i přesnější měření pH-metrem, které má své místo v diagnostice renálních tubulárních acidóz.

3.1.2 Orientační stanovení hustoty

Provádí se testačním proužkem, který reaguje s ionty přítomnými v měřené moči. Jejich koncentrace dobře koreluje s hustotou moče. Komplexotvorné činidlo uvolňuje protony (H^+) v přítomnosti kationtů. Uvolněné protony reagují s acidobázickým indikátorem, bromthymolovou modří, a mění barvu indikátoru. Vysoké koncentrace bílkoviny v moči mohou falešně zvyšovat měření hustoty. Pozor na falešně vyšší výsledky v močích, které mají vysokou koncentraci bílkovin! [2]

3.1.3 Bílkovina

U testačních proužků se využívá tzv. proteinové chyby acidobázického indikátoru. Proužek je impregnován acidobázickým indikátorem a pufrům s pH v oblasti normálního barevného přechodu acidobázického indikátoru. V přítomnosti bílkoviny reaguje indikátor, jako by pH bylo alkaličtější a mění barvu. Silně alkalické moče jsou k vyšetření indikátorovým proužkem nevhodné, protože dávají falešně pozitivní reakce. Změna zbarvení indikátorového proužku se srovnává s barevnou stupnicí a tak se odhaduje semikvantitativně koncentrace bílkoviny ve vyšetřované moči. Citlivost proužků je od 0.12 až 0.20 g/l. [2]

3.1.4 Krev, krevní barvivo

K důkazu se používá testovací proužek, který umožňuje orientační zjištění volného hemoglobinu, případně erytrocytů v moči. Hemoglobin volný nebo vázaný v erytrocytech uvolňuje z organického peroxidu kyslík a ten oxidační redox indikátor, který je v redukované formě bezbarvý. Oxidovaný chromogen je na rozdíl od redukovaného zbarvený a to se projeví buď difuzním zbarvením proužku (volný hemoglobin) nebo vznikem barevných teček (erytrocyty). Falešně pozitivní reakce bývá v přítomnosti většího množství leukocytů nebo bakterií vybavených pseudoperoxidázovou aktivitou. Hodnocení je semikvantitativní srovnáním s barevnou stupnicí. Citlivost reakce je 5-10 erytrocytů v 1 μ l moči. [2]

3.1.5 Leukocyty

Leukocyty vykazují esterasovou a proteasovou aktivitu. Semikvantitativní stanovení leukocytů v moči využívá hlavně tyto dva enzymy. Pozitivita testu se projeví změnou barvy a je způsobena esterázovou aktivitou leukocytů. Citlivost je nad 10 leukocytů v 1 μ l moče. [8]

3.1.6 Glukóza

Průkaz glukózy v moči má význam hlavně pro zjišťování diabetu a některých renálních poruch. Provádí se specificky testovacím proužkem napojeným redox indikátorem a enzymy glukozaoxidázou a peroxidázou. Ty katalyzují oxidaci glukózy na glukonolakton. Současně vzniklý peroxid vodíku se působením peroxidázy štěpí na vodu a kyslík. Vzniklý kyslík oxidační redox indikátor, jehož oxidace se projeví změnou barvy. Citlivost zkoušky je nad 2 mmol/l. Falešná pozitivita se objevuje u močí obsahujících oxidující látky (chloramin, persteril, peroxid). Falešně negativní může být vyšetření močí s vysokou koncentrací redukujících látek (kys. askorbová,). [2]

3.1.7 Důkaz dusitanů

Tímto testem zjišťujeme přítomnost bakterií, které jsou schopny měnit dusičnany v moči normálně přítomné, na dusitany.

Jde zejména o *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, a o řadu dalších, které mohou vyvolávat infekce ledvin a močových cest. Vzniklé dusitany reagují s modifikovaným Griessovým činidlem za vzniku červeného zbarvení. Vyšetření je třeba provádět z čerstvé ranní moči. Citlivost je od 105 mikrobů v 1 ml moče. [8]

3.1.8 Ketolátky (kyselina acetoctová, beta-hydroxymáselná, aceton)

Ketolátky se dokazují reakcí s nitroprussidem sodným v alkalickém prostředí (Legalova zkouška). Pozitivita se projeví změnou barvy testační zóny do fialové. Reakce je senzitivnější pro kyselinu acetoctovou než pro aceton a beta-hydroxymáselnou kyselinu. [2]

3.1.9 Urobilinogen

Stabilizovaná diazoniová sůl v kyselém prostředí reaguje s urobilinogenem téměř okamžitě za vzniku červeného azobarviva. To se projevuje změnou barvy testační zóny do růžovočervené. Falešně pozitivní reakci dávají některé léky. Test je specifitější pro urobilinogen než dosud používaná zkouška s Ehrlichovým činidlem. [2]

3.1.10 Bilirubin

Průkaz bilirubinu je založen na kopulační reakci bilirubinu s diazoniovou solí. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny vysokou koncentrací kyseliny askorbové ve vyšetřované moči. Moč, ve které vyšetřujeme bilirubin, nemá být delší dobu exponovaná přímému slunečnímu světlu (oxidace bilirubinu - falešně negativní výsledek). [8]

3.1.11 Vyšetření močového sedimentu

Je indikováno při pozitivním nálezu chemického vyšetření moče, při pozitivním výsledku vyšetření leukocytů, při nefrologické nebo urologické kontrole a při klinickém podezření na onemocnění ledvin a vývodních cest močových. [2]

3.2 Teorie měření

Optické metody patří v klinické biochemii k nejpoužívanějším analytickým postupům. Využívají jevů, které vznikají při vzájemném působení elektromagnetického záření a analyzované soustavy. Původně se optické metody vztahovaly pouze na viditelnou oblast elektromagnetického záření ("světlo"). Nyní pod tímto pojmem rozumíme využívání celé stupnice vlnových délek od záření gama až po rádiové mikrovlny. Dělení elektromagnetického záření podle vlnových délek je uvedeno v tabulce č. 3.1.

Tabulka č. 3.1 - Rozložení barev ve spektru a doplňkové barvy

Oblast	Vlnová délka	Viditelná barva	Doplňková barva
Ultrafialová			
blízká	180 - 400 nm	0	0
	400 - 435 nm	fialová	žlutozelená
	435 - 480 nm	modrá	žlutá
	480 - 490 nm	zelenomodrá	oranžová
	490 - 500 nm	modrozelená	červená
	500 - 560 nm	zelená	purpurová
	560 - 580 nm	žlutozelená	fialová
	580 - 595 nm	žlutá	modrá
	595 - 610 nm	oranžová	zelenomodrá
	610 - 750 nm	Červená	modrozelená
Infračervená	10^2 - 10^0 nm	0	0
Mikrovlny	10^2 - 10^{-2} cm	0	0

Zrakem vnímáme elektromagnetické záření v rozmezí 380 - 760 nm a v tomto rozsahu vnímáme záření různých vlnových délek jako barevné světlo. Světelnou absorpci vidíme jako barevnost látek pouze ve viditelné oblasti záření. Barevná (průhledná) látka pohlcuje ze spojitého viditelného záření ("bílého světla") jen záření některých vlnových délek a zbytek světla propouští v doplňkovém (komplementárním) zabarvení (viz tab. č. 3.1). [3]

3.2.1 Fotometrie a spektrofotometrie

Stanovení vlastností vzorku, např. koncentrace určité látky, na základe pohlcování světla určité vlnové délky se označuje jako fotometrie.

Pokud se neměří jen při jedné vlnové délce, ale hodnotí se určitý úsek spektra, mluvíme o spektrofotometrii.

3.2.2 Fotometry a spektrofotometry

Pro měření absorbance se používají fotometry, zařízení schopná pracovat při více vlnových délkách a změřit absorpční spektrum vzorku se označují jako spektrofotometry.

Principiálně se fotometr skládá ze čtyř částí:

1. zdroj světla
2. monochromátor
3. oddíl, ve kterém je umístěn vzorek
4. detektor

Přístroje pracují na principu reflexní fotometrie za různých vlnových délek emitovaných ze selektivních světelných diod (LED, vlnové délky 555, 620 a 660 nm). Používá referenčních vlnových délek a kompenzačního políčka pro každý měřený vzorek, což potlačuje vliv vlastní barvy moči a zmenšuje tuto interferenci. Odečtení je provedeno ve 48. a 120. sekundě. Před každou sérií měření se přístroj nastaví zvláštním kalibračním proužkem. Správná pozice proužku je zajištěna podložkou (táckem), jehož cena významněji nezvyšuje cenu vyšetření. Přístroj má vstup pro manuální zadávání výsledků vyšetření až 30 položek močového sedimentu s 5 texty. Souhrnné výsledky jsou tištěny nebo je možné on-line napojení na laboratorní informační systém. Přístroj má od výrobce základní (default) nastavení optické citlivosti (reflektance) mezi jednotlivými pásmy. Toto nastavení je možné měnit s vědomím, že upravujeme senzitivitu zvláště v hraničních hodnotách positivity. Tato úprava citlivosti se týká zvláště stanovení hemoglobinu (erytrocytů) a bilirubinu.

3.2.3 Reflexní fotometrie

Jinou fotometrickou technikou je reflexní fotometrie - technika rutinně používaná například v klinické biochemii v rámci tzv. suché chemie.

V suché chemii se biologický materiál nezpracovává obvyklým způsobem ve zkumavkách či jiných nádobkách, ale nanese se na film napuštěný jednotlivými složkami reakční směsi. Výsledkem je změna barvy políčka, kterou lze kvantifikovat pomocí reflexního fotometru – měří se úbytek světla určité vlnové délky odraženého od políčka. Jako zdroj světla se používají buď LED diody emitující vhodnou vlnovou délku, nebo žárovkové zdroje s interferenčními filtry. Pro zvýšení citlivosti se odražené světlo soustřeďuje na detektor vydutým zrcadlem (tzv. Ulbrichtovou koulí - fokusuje veškeré odražené světlo z reagenčního políčka impregnovaného vlákna na fotonku). Klasickým příkladem suché chemie a reflexní fotometrie je vyšetření moči pomocí diagnostických proužků, vzhledem k jednoduchosti a rychlosti při přesnosti srovnatelné s klasickými metodami se však množství aplikací rychle rozšiřuje.

3.3 Analyzátor Urisys 2400 (obr. 3.1)

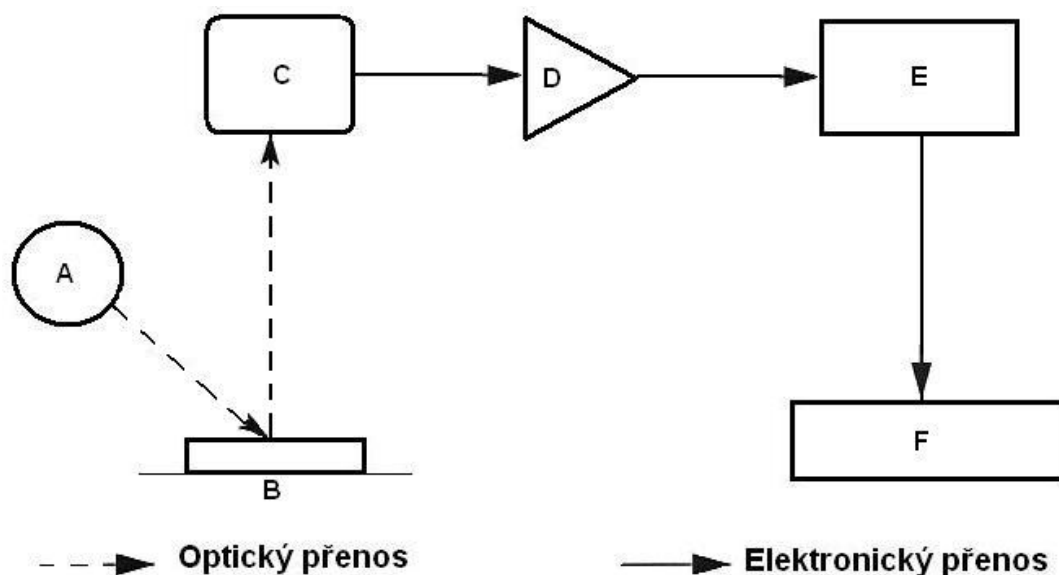


obr 3.1 Urisys 2400

3.3.1 Princip

Měřicí část URISYS 2400 obsahuje LED diody o třech vlnových délkách. Zkušební proužek zůstává pevně v měřicí pozici a měřící hlava se pohybuje přes každé zkušební políčko. Měření začíná v referenční části, která je použita k testování optické části.

Měřicí část ověří, že zkušební proužek je správně umístěn pod měřící částí změřením odraženého světla. Jestliže zkušební proužek není správně umístěn pod měřící hlavou, zobrazí se chybové hlášení a měření se přeruší. Odražené světlo se vyhodnotí v elektro-optické části (obr. 3.2).



obr. 3.2 Princip přenosu dat

A - LED

B - Zkušební proužek

C - Fotodetektor

D - A/D převodník

E - Mikroprocesor

F - výsledek měření

LED dioda (A) přenesse světlo o definované vlnové délce, v optimálním úhlu, na povrch zkušebního proužku (B). Světlo se odrazí od povrchu zkušebního proužku v závislosti na barvě na testovaném políčku.

Fotodetektor (C) vyhodnotí část světelného toku a A/D převodník (D) převede signál na digitální hodnotu. Mikroprocesor (E) porovná hodnotu podle hodnoty z referenční části a spočítá výsledek (F)

Fotometrické měření pro všechny parametry se vykonají do jedné minuty.

Každá ze tří LED diod přenáší světlo různé vlnové délky. Použití různých vlnových délek zlepši výsledky měření na každém měřeném políčku. Vlnové délky používané pro měření různých parametrů jsou uvedené v tabulce (3.2).

Testovaný parametr	Vlnová délka (nm)
pH	555, 620
Leukocyty	555
Dusitany	555
Protein	555
Glukóza	555
Ketolátky	555
Urobilinogen	555
Bilirubin	555
Erytrocyty	555, 620
Barvivo	470, 555, 620

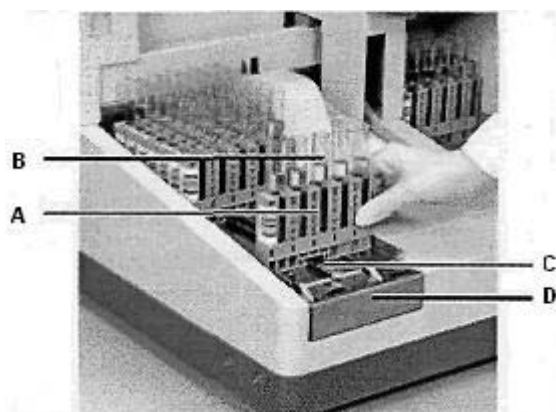
Tabulka 3.2 Vlnové délky používané pro měření různých parametrů

3.3.2 Pracovní postup

Analýza se po vložení stojánků se vzorky (obr. 3.2) spustí stisknutím Start na obrazovce Routine Monitor (obr. 3.3). Stav analyzátoru se změní ze Stand-By na Reset. Analyzátor provede úkony spojené s Resetem (vyprázdnění příčné linie na stojánky, resetování pipetovacího systému, vyprázdnění transportního podnosu na proužky) a pak je zahájeno pipetování, měření a zpracování vzorků, což je indikováno změnou stavu na Operation. V průběhu analýzy se zvyšuje číslo sekvence na obrazovce [Routine Monitor] s každým rutinním nebo statimovým vzorkem. Současně jsou zobrazovány údaje o stojánku, čísle pozice pipetovaného vzorku. Naopak počet zbývajících proužků klesá s každou další analýzou.

Jestliže se sekvenční číslo vzorku, který má být zpracován, dostane až k číslu, které má již zpracovaný vzorek a jehož výsledky jsou uloženy v paměti analyzátoru, objeví se hlášení („Warning/Data overwrite“) a přístroj přejde do stavu S.Stop nebo Stand-By. [7]

Po změření posledního proužku přechází analyzátor do stavu „Sampling Stop“. Opětovně je možné zahájit analýzu, po umístění nových stojánků do vstupní dráhy, stisknutím tlačítka <Start>. Přístroj pokračuje v pipetování a měření



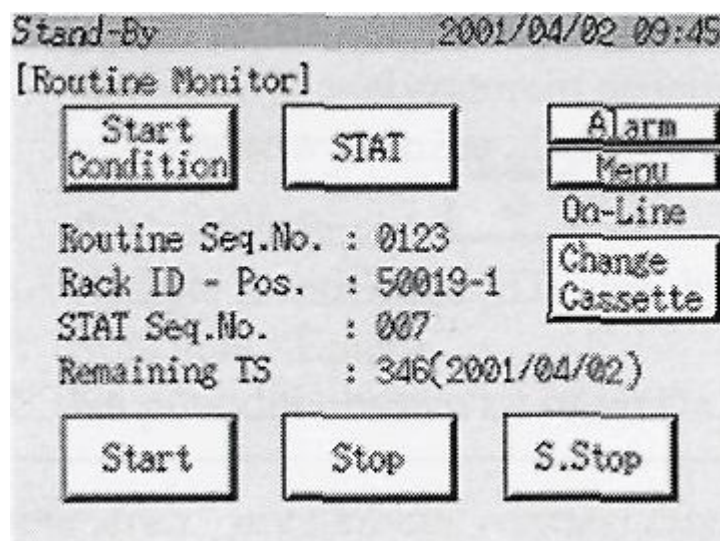
obr. 3.2 Vložení stojánků se vzorky do vstupní dráhy analyzátoru

A - Stojánek

B - Zkumavky

C - Vodící lišta

D – Podnos

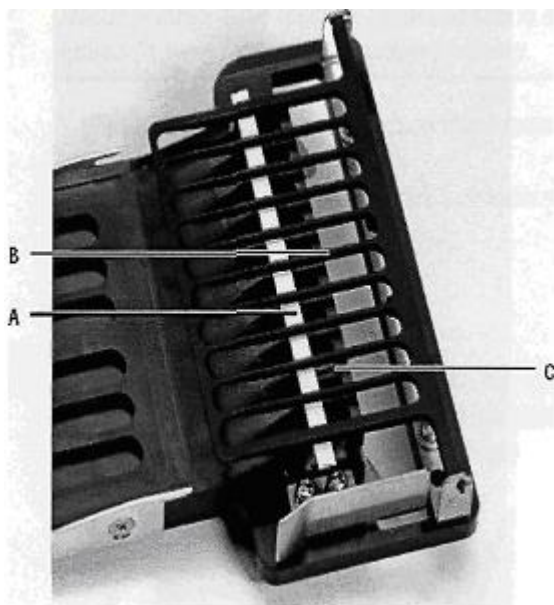


obr. 3.3 Úvodní obrazovka „Routine Monitor“

3.3.3 Kalibrace

Kalibrace fotometru je založena na měření kalibračního proužku s určenými vlastnostmi reflektance. Může být prováděna jen pomocí kalibračních proužků UR1SYS 2400 vyrobených Roche Diagnostics. Kalibrace stanovení specifické hmotnosti je založena na refraktometrickém stanovení kalibračních roztoků o známém indexu lomu. Doporučuje se kalibrovat každé čtyři týdny.

Kalibrační hodnoty změřené u každé vyvýšené plošky kalibračního proužku jsou porovnány s hodnotami předchozí uživatelské kalibrace a firemní kalibrace. Jestliže se kalibrace neliší o více jak $\pm 2\%$ od předchozích hodnot nebo o $\pm 5\%$ od firemních hodnot objeví se na obrazovce [Photometer Calibration] hlášení „Calibration OK“ a předchozí uživatelská kalibrace je přepsána. V případě, že se kalibrace liší více než $\pm 2\%$ od předchozích hodnot nebo více než $\pm 5\%$ od firemních hodnot objeví se na obrazovce [Photometer Calibration] hlášení „Calibr. Failed“ a kalibrační procedura musí být zopakována. Kalibrační proužky jsou vyrobeny z šedého plastu o stálých hodnotách reflektance. Obsahují devět vyvýšených plošek na horní straně a tři nožky na spodní straně. Dvě krajní nožky vytýčují laterální usazení proužku na transportním podnosu proužků a třetí nožka uprostřed ukotvuje kalibrační proužek v měřicí pozici. (obr. 3.3)



obr. 3.3 Umístění kalibračního proužku na transportním podnosu

A kalibrační proužek

B vodící mřížka

C zářez

4 Praktická část

V klinické biochemii se musí provádět v rámci správné laboratorní práce denní kontrolní měření, které jsou průběžně vyhodnocovány a jsou dokladem o způsobilosti měřicího přístroje k zamýšleným účelům, tedy k analýze vzorků pacientů. Pro kvalitu laboratorní metody je zásadní zkoumání přesnosti v čase. Přesnost analýzy se vyjadřuje jako její reprodukovatelnost. Absolutní přesnost nelze nikdy docílit, náhodné chyby způsobují rovnoměrné rozptýlení výsledků opakovaných analýz kolem průměrné hodnoty, přičemž četnost jednotlivých výsledků vykazuje normální rozložení (Gaussova křivka). Matematicky není pak vyjadřovaná přesnost metody, ale její nepřesnost formou směrodatné odchylky (viz. vztah 4.2.3). Velikost směrodatné odchylky závisí na měřené hodnotě, počítá se obvykle tzv. relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient (viz. vztah 4.2.4). Ke kontrole popisovaného přístroje (Nova CCX) jsem používal nezávislé validované certifikované kontrolní materiály s deklarovanými hodnotami Liquichek od firmy Biorad. Ve své práci jsem se zaměřil na měření kontrolního materiálu L2 na acidobazickém analyzátoru Nova CCX, tabulka je uvedena v příloze 2. Vyhodnocení tabulky je v příloze 1

4.1 Popis tabulky

- Datum - den, kdy bylo provedeno kontrolní měření
- Parametry -jednotlivé složky (analyty) testovaného vzorku
- Jednotky - jednotky měřených analytů
- Střední hodnota - ideální střední hodnota kontrolního materiálu, udávaná na příložením letáku od výrobce Biorad
- Rozsah - hraniční hodnoty kontrolních materiálu podle letáku od výrobce
- S - směrodatná odchylka je mírou rozptylu výsledků, tj. nepřesnosti. Má stejný rozměr jako měřená veličina. Jedná se o kvadratický průměr odchylek hodnot znaku od jejich aritmetického průměru. Vypovídá o tom, jak moc se od sebe navzájem liší typické případy v souboru zkoumaných čísel.
- VC - Variační koeficient - tzv. relativní směrodatná odchylka, je udávána v procentech

4.2 Použité výpočtové vzorce:

Směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}. \quad (3)$$

x_i - výsledky jednotlivých měření

$\bar{x}$ - aritmetický průměr

N - počet měření

Variační koeficient:

$$v_x = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 [\%] \quad (4)$$

s - směrodatná odchylka

x_i - aritmetický průměr

[9]

4.3 Závěr

Pro měření je vždy použita nová ampulka s kontrolním materiálem. Při práci s kontrolním materiálem je nutné dbát pokynů výrobce kontrolního materiálu vzhledem k nestabilitě kontrolovaných analytů. Dle výrobce je kontrolní materiál použitelný maximálně do jedné minuty po otevření skleněné ampulky. Při delším stání kontrolního vzorku dochází vzhledem k přímému styku se vzduchem (kyslík, oxid uhličitý) ke změnám hodnoty pO_2 a pCO_2 . S tím samozřejmě je ovlivněna také hodnota pH.

Podle tabulky 1 vyplývá, že analyzátor má největší chybu měření podle variačního koeficientu u pCO_2 a nejmenší u pH, a podle hodnot od výrobce splňují parametry limit nepřesnosti. Lze říci, že analyzátor splňuje požadavky na použití v rámci správné laboratorní práce v klinické biochemii.

Seznam použité literatury:

- [1] Česká technická norma. Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na jakost a způsobilost. ČSN EN ISO 15189. Vydavatelství Český normalizační institut Praha, 2004
- [2] <http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/biochem/>
- [3] Kolektiv autorů. Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii I. a II. část. Vydavatelství Institut pro další vzdělávání středních zdravotních pracovníků Brno, 1987
- [4] Metodický návod: Nova CCX
- [5] http://cs.wikipedia.org/wiki/Osmotick%C3%BD_tlak
- [6] Metodický návod: OSMOSTATION Typ:OM-6050
- [7] Metodický návod: Urysis 2400
- [8] Chromý, V a Fischer, J. Analytické metody v klinické biochemii. Masarykova univerzita Brno, 2000
- [9] Racek, J a kolektiv. Klinická biochemie. Vydavatelství Galén Praha, 1999

Přílohy:

Příloha 1: Vyhodnocení měření

parametry	pH	pCO ₂	pO ₂	K	Na	Ca	Cl	Mg	Glu	Lac
jednotky	-	kPa	kPa	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
S	0,0145	0,3462	0,3157	0,0673	0,7047	0,0316	2,6279	0,0218	0,3866	0,1623
jednotky	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
VC	0,2	6,23	2,37	1,54	0,54	2,92	2,71	3,91	3,5	6,17

Příloha 2: Tabulka měření:

parametry	pH	pCO ₂	pO ₂	K	Na	Ca	Cl	Mg	Glu	Lac
stř. hodnota	7,44	43	96	4,5	134	1,13	95	0,61	11,3	2,6
rozsah	7,41-7,47	5,1-6,4	11,5-14,1	4,0-5,0	129-139	1,03-1,23	90-100	0,51-0,71	10,4-12,1	2,1-3,1
jednotky	-	kPa	kPa	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
Datum										
25.4.2005	7,455	5,1	13,6	4,3	129	1,09	98	0,56	10,7	2,5
25.4.2005	7,426	6,3	13,1	4,4	130	1,07	100	0,53	10,6	2,5
27.4.2005	7,421	5,4	13,2	4,5	131	1,10	96	0,55	10,5	2,7
27.4.2005	7,412	5,2	13,5	4,5	130	1,13	96	0,55	10,6	2,8
29.4.2005	7,446	6,1	12,8	4,4	130	1,10	91	0,54	10,7	2,5
4.5.2005	7,451	5,7	13,7	4,3	130	1,03	95	0,52	10,6	2,4
11.5.2005	7,421	5,4	13,7	4,3	130	1,13	98	0,55	10,6	2,5
11.5.2005	7,425	5,2	13,7	4,5	130	1,14	100	0,54	10,7	2,6
19.5.2005	7,426	6,2	12,8	4,3	129	1,09	94	0,55	10,6	2,6
25.5.2005	7,455	5,2	13,9	4,4	130	1,12	95	0,54	10,7	2,6
1.6.2005	7,426	5,8	13,3	4,3	129	1,11	97	0,56	10,8	2,9
8.6.2005	7,421	5,9	13,3	4,4	129	1,10	98	0,55	10,8	2,5
15.6.2005	7,450	5,3	13,3	4,4	129	1,10	98	0,51	10,6	2,6
17.6.2005	7,455	5,4	13,6	4,4	130	1,14	94	0,58	11,0	2,5
22.6.2005	7,421	5,2	13,1	4,3	129	1,05	94	0,53	10,4	2,1
22.6.2005	7,412	5,6	12,8	4,4	129	1,08	93	0,53	10,6	2,3
29.6.2005	7,450	6,1	13,4	4,4	129	1,07	96	0,51	10,6	2,1
8.7.2005	7,446	5,9	13,2	4,3	129	1,08	98	0,51	10,4	2,5
8.7.2005	7,451	5,1	13,2	4,4	130	1,11	97	0,53	10,7	2,6
20.7.2005	7,421	6,3	13,5	4,3	129	1,07	100	0,54	10,6	2,6
27.7.2005	7,412	5,2	13,3	4,4	129	1,06	98	0,56	10,6	2,6
12.8.2005	7,426	5,8	13,3	4,3	129	1,08	91	0,54	10,8	2,6
17.8.2005	7,455	5,4	13,0	4,3	129	1,10	91	0,53	10,6	2,6
24.8.2005	7,446	5,7	13,7	4,4	130	1,09	93	0,55	11,0	2,6
31.8.2005	7,426	6,2	13,3	4,4	129	1,08	90	0,53	11,1	2,6
14.9.2005	7,421	5,1	12,8	4,4	130	1,10	93	0,53	11,0	2,6
15.9.2005	7,458	5,4	12,8	4,4	130	1,11	97	0,55	11,7	2,7
5.10.2005	7,446	5,5	13,7	4,4	130	1,10	98	0,55	10,4	2,7
12.10.2005	7,452	5,4	13,0	4,3	129	1,06	91	0,52	10,6	2,6
19.10.2005	7,425	5,4	13,7	4,4	130	1,11	91	0,56	10,7	2,7
26.10.2005	7,426	5,2	13,7	4,4	131	1,11	93	0,55	10,6	2,5
31.10.2005	7,446	6,1	13,3	4,4	130	1,08	94	0,57	10,6	2,5
2.11.2005	7,426	5,2	13,2	4,3	130	1,07	95	0,57	10,8	2,6
7.11.2005	7,455	5,1	13,5	4,5	130	1,09	95	0,57	10,6	2,7
10.11.2005	7,446	5,2	13,2	4,4	130	1,04	97	0,58	10,5	2,7

16.11.2005	7,451	5,4	13,5	4,4	131	1,05	96	0,54	10,6	2,5
24.11.2005	7,447	5,4	13,7	4,4	130	1,05	97	0,56	10,6	2,7
1.12.2005	7,449	5,2	13,7	4,3	130	1,04	98	0,56	10,6	2,7
7.12.2005	7,446	5,1	13,7	4,4	130	1,08	95	0,56	10,7	2,7
14.12.2005	7,421	5,5	13,7	4,4	129	1,07	93	0,56	10,5	2,7
4.1.2006	7,426	5,8	13,3	4,4	130	1,05	93	0,56	11,4	3,0
12.1.2006	7,426	5,4	13,6	4,4	130	1,11	94	0,52	10,9	2,7
18.1.2006	7,412	5,2	13,1	4,5	130	1,08	92	0,58	11,3	2,7
25.1.2006	7,426	5,8	13,3	4,4	130	1,08	94	0,58	11,3	2,7
1.2.2006	7,425	6,1	13,7	4,3	130	1,04	96	0,58	11,2	2,7
8.2.2006	7,426	5,6	12,8	4,3	129	1,05	96	0,57	11,2	2,7
17.2.2006	7,458	5,4	13,4	4,4	129	1,04	92	0,59	11,3	2,7
22.2.2006	7,421	5,8	13,2	4,4	129	1,05	98	0,58	11,6	2,8
6.3.2006	7,445	5,6	12,8	4,4	130	1,09	97	0,55	10,8	2,7
17.3.2006	7,421	5,7	13,3	4,4	129	1,10	99	0,58	10,9	2,7
29.3.2006	7,426	5,8	13,3	4,4	129	1,11	98	0,57	10,5	2,7
6.4.2006	7,426	5,4	12,8	4,4	130	1,10	100	0,57	11,4	2,6
12.4.2006	7,455	5,2	13,7	4,3	129	1,14	97	0,58	11,3	2,7
21.4.2006	7,446	5,2	13,7	4,3	129	1,11	98	0,57	11,4	2,7
26.4.2006	7,451	5,1	13,2	4,3	129	1,09	100	0,56	11,1	2,7
5.5.2006	7,446	5,5	13,5	4,4	130	1,12	100	0,56	10,6	2,7
11.5.2006	7,439	6,1	13,4	4,3	129	1,05	97	0,57	11,3	2,7
18.5.2006	7,442	5,8	12,9	4,4	129	1,12	98	0,52	11,0	2,7
26.5.2006	7,436	6,2	12,8	4,4	129	1,16	96	0,59	10,6	2,8
2.6.2006	7,412	5,1	13,7	4,4	130	1,16	97	0,58	11,1	2,7
5.6.2006	7,426	5,8	13,3	4,2	130	1,11	100	0,57	10,9	2,7
12.6.2006	7,426	5,9	12,8	4,3	130	1,07	100	-	10,9	2,7
23.6.2006	7,426	5,8	13,3	4,4	129	1,12	97	0,60	11,1	2,7
27.6.2006	7,446	5,6	12,8	4,4	130	1,13	97	0,59	11,2	2,8
3.7.2006	7,441	6,1	13,3	4,4	130	1,12	100	0,56	11,3	2,6
12.7.2006	7,421	5,2	12,8	4,4	129	1,10	99	0,58	11,5	2,7
19.7.2006	7,440	5,8	13,5	4,2	130	1,07	100	0,59	11,2	2,7
26.7.2006	7,426	5,2	13,7	4,4	129	1,13	98	0,58	10,6	2,8
26.7.2006	7,455	5,4	13,7	4,4	130	1,07	99	0,57	11,5	2,7
2.8.2006	7,446	5,2	13,2	4,4	129	1,11	98	0,57	11,2	2,7
7.8.2006	7,451	5,7	13,5	4,7	130	1,10	97	0,53	11,6	2,7
16.8.2006	7,446	5,6	12,8	4,4	129	1,15	96	0,57	11,0	2,8
21.8.2006	7,426	5,8	13,3	4,4	130	1,13	96	0,59	10,8	2,6
25.8.2006	7,446	5,5	13,6	4,4	131	1,14	97	0,57	12,0	2,5
1.9.2006	7,425	5,1	13,1	4,4	129	1,12	97	0,58	11,7	2,7
15.9.2006	7,426	5,2	13,7	4,4	129	1,13	100	0,60	11,1	2,9
27.9.2006	7,434	5,4	13,8	4,5	131	1,13	99	0,55	11,0	2,7
4.10.2006	7,434	5,2	13,2	4,4	130	1,11	99	0,57	11,5	2,7
12.10.2006	7,421	5,9	13,3	4,3	130	1,12	96	0,53	11,4	2,7
18.10.2006	7,426	6,1	13,3	4,4	130	1,10	97	0,60	12,1	2,7
25.10.2006	7,412	5,4	12,8	4,4	129	1,08	98	0,59	12,0	2,9
3.11.2006	7,441	5,2	13,0	4,6	131	1,11	97	0,58	11,4	2,7
10.11.2006	7,426	5,4	13,7	4,4	131	1,10	98	0,60	11,8	2,8
15.11.2006	7,455	5,2	13,7	4,5	129	1,07	100	0,57	11,8	2,6
1.12.2006	7,427	5,7	13,2	4,4	130	1,08	100	0,58	11,6	2,7
7.12.2006	7,446	5,5	13,5	4,3	132	1,08	99	0,59	11,8	2,9
8.1.2007	7,451	5,6	12,8	4,4	131	1,08	100	0,56	11,2	2,7
12.1.2007	7,426	5,8	13,3	4,5	131	1,10	97	0,56	11,3	2,8
29.1.2007	7,446	5,4	13,6	4,4	129	1,05	100	0,57	11,5	2,5
2.2.2007	7,426	6,2	13,1	4,4	130	1,08	98	0,58	11,4	2,9
9.2.2007	7,421	5,7	13,2	4,5	131	1,06	100	0,58	11,6	2,7
19.2.2007	7,446	6,1	13,2	4,4	131	1,07	98	0,57	10,9	2,6
28.2.2007	7,412	5,1	13,5	4,4	131	1,06	99	0,58	11,1	2,6

5.3.2007	7,463	5,2	13,7	4,4	131	1,08	100	0,55	11,0	2,5
16.3.2007	7,426	6,1	13,7	4,4	130	1,04	97	0,56	11,1	2,7
26.3.2007	7,455	5,5	13,3	4,4	130	1,05	98	0,54	11,1	2,8
5.4.2007	7,426	5,8	13,3	4,4	131	1,08	99	0,54	11,0	2,7
20.4.2007	7,421	5,9	12,8	4,4	130	1,07	92	0,54	11,1	2,7
30.4.2007	7,412	5,5	13,6	4,4	131	1,04	98	0,55	11,1	2,8
22.5.2007	7,413	5,2	13,1	4,5	130	1,05	100	0,56	10,6	2,7
1.6.2007	7,446	5,4	12,8	4,4	130	1,08	99	0,59	12,0	2,6
15.6.2007	7,451	5,2	13,7	4,4	130	1,10	99	0,61	10,9	2,7
29.6.2007	7,426	5,7	13,7	4,3	130	1,10	97	0,58	10,9	2,6
12.7.2007	7,425	5,1	13,2	4,4	130	1,14	98	0,60	10,9	2,5
23.7.2007	7,426	5,1	13,5	4,4	130	1,10	100	0,58	10,8	2,3
2.8.2007	7,470	5,6	12,8	4,3	129	1,11	98	0,51	11,0	2,3
16.8.2007	7,446	6,2	12,8	4,3	129	1,08	100	0,56	11,4	2,3
31.8.2007	7,426	5,8	13,3	4,3	129	1,09	92	0,59	11,3	2,6
10.9.2007	7,426	5,8	13,3	4,4	130	1,11	98	0,60	11,0	2,7
20.9.2007	7,446	5,4	13,7	4,3	130	1,08	99	0,57	10,8	2,7
5.10.2007	7,451	5,2	13,7	4,3	129	1,07	92	0,54	11,0	2,7
15.10.2007	7,446	5,8	13,3	4,3	130	1,07	98	0,56	11,0	2,7
26.10.2007	7,421	6,1	13,7	4,3	130	1,09	97	0,56	11,1	2,6
16.11.2007	7,412	5,5	13,1	4,2	130	1,04	98	0,53	11,3	2,6
23.11.2007	7,421	5,8	13,3	4,4	129	1,05	100	0,56	11,3	2,8
3.12.2007	7,426	5,9	12,8	4,2	129	1,03	92	0,54	11,5	2,6
12.12.2007	7,421	5,7	13,7	4,3	129	1,10	98	0,58	11,5	2,7
7.1.2008	7,412	5,7	13,7	4,4	130	1,03	92	0,56	10,7	2,8
25.1.2008	7,412	5,3	13,2	4,3	129	1,06	98	0,56	11,8	2,7
4.2.2008	7,421	6,2	13,5	4,4	130	1,08	98	0,56	11,2	2,7
15.2.2008	7,446	5,2	12,8	4,4	129	1,04	100	0,56	11,1	2,8
10.3.2008	7,425	5,4	13,8	4,4	129	1,05	100	0,55	11,1	2,8
21.3.2008	7,412	5,6	12,8	4,3	129	1,04	97	0,54	11,0	2,8
7.4.2008	7,429	5,6	13,3	4,4	129	1,04	98	0,55	11,1	2,7
21.4.2008	7,446	5,1	13,7	4,4	129	1,05	100	0,55	11,3	2,7
30.4.2008	7,451	5,1	13,7	4,4	130	1,09	97	0,55	11,3	2,7
12.5.2008	7,455	6,1	13,3	4,4	130	1,04	98	0,56	11,3	2,8
29.5.2008	7,461	5,4	13,0	4,4	130	1,05	100	0,55	11,2	2,7
20.6.2008	7,455	5,2	12,8	4,4	131	1,05	92	0,55	11,6	2,6
30.6.2008	7,426	5,9	13,1	4,4	130	1,04	98	0,60	11,2	2,6
11.7.2008	7,426	5,5	13,3	4,4	130	1,08	97	0,54	10,8	2,8
18.7.2008	7,446	5,8	13,3	4,4	130	1,05	98	0,53	10,9	2,7
28.7.2008	7,446	5,4	12,8	4,4	130	1,07	96	0,53	10,9	2,8
8.8.2008	7,457	5,2	13,2	4,4	130	1,06	94	0,54	10,8	2,5
5.9.2008	7,417	5,1	13,5	4,4	130	1,05	92	0,55	10,6	2,6
16.9.2008	7,446	5,9	12,8	4,4	130	1,04	98	0,54	11,7	2,5
26.9.2008	7,435	6,2	12,6	4,4	131	1,08	99	0,55	11,4	2,6
7.10.2008	7,453	5,7	13,1	4,4	130	1,05	98	0,57	11,3	2,5
17.10.2008	7,421	5,1	13,3	4,5	130	1,05	98	0,56	11,6	2,5
29.10.2008	7,425	6,1	13,1	4,4	130	1,05	100	0,56	11,4	2,6
11.10.2008	7,426	5,8	13,3	4,3	130	1,03	100	0,55	11,4	2,5
24.11.2008	7,446	5,6	12,8	4,4	129	1,05	99	0,55	11,0	2,6
4.12.2008	7,421	5,5	13,2	4,4	130	1,04	100	0,55	10,9	2,2
15.12.2008	7,412	5,7	13,5	4,4	129	1,08	97	0,53	11,0	2,1
5.1.2009	7,421	5,4	13,7	4,4	131	1,05	98	0,54	11,1	2,4
20.1.2009	7,446	6,1	13,7	4,5	132	1,04	92	0,55	10,9	2,1
6.2.2009	7,426	5,8	13,3	4,3	130	1,05	98	0,56	11,1	2,1
20.2.2009	7,446	6,2	13,7	4,5	131	1,05	98	0,57	11,0	2,6
4.3.2009	7,451	5,2	13,7	4,4	130	1,03	100	0,52	10,7	2,5
17.3.2009	7,426	5,8	13,3	4,3	129	1,04	100	0,54	10,8	2,3