

Automatický osmometr A₂O Advanced

L. Šprongl

Úvod

Osmolalita je celkové množství osmoticky aktivních částic rozpuštěných v kilogramu rozpouštědla (obvykle vody). Závisí na počtu částic v roztoku bez ohledu na jejich velikost. Můžeme ji tedy definovat také jako celkovou molární koncentraci všech rozpuštěných složek roztoku. Osmolalita krve je dána především množstvím iontů, glukózy a močoviny v kilogramu plazmy.

Příbuznou veličinou je osmolarita, udávající celkové látkové množství rozpuštěných částic v jednom litru roztoku (jde tedy o celkovou molární koncentraci rozpuštěných součástí).

Efektivní osmolalita tělesných tekutin uvažuje pouze glukózu a hlavní ionty (natrium, kalium, chloridy). Nezapočítává jednak látky, které rychle difundují přes semipermeabilní membrány (urea), jednak látky, které se fyziologicky v organismu nevyskytují (léky, xenobiotika).

Osmolalita se v laboratořích měří osmometry, zpravidla na kryoskopickém principu. Používají se také odhady osmolality:

$$\text{osmolalita} = 2 \text{ Na}^+ + \text{S-urea} + \text{S-glukóza}$$

$$\text{efektivní osmolalita} = 2 \text{ Na}^+ + \text{S-glukóza} \quad (\text{mmol/kg})$$

Rozdíl mezi skutečnou osmolalitou séra a jejím vypočteným odhadem označujeme jako osmolální okno (*osmolal gap*):

$$\text{osmolální okno} = \text{S-osm naměřená} - \text{S-osm vypočtená}$$

Osmolální okno vzniká hlavně, jsou-li v séru přítomny cizorodé látky, které výpočet osmolality nebere v úvahu:

Měření osmolality je tedy jednou ze základních metod v rutinních laboratořích. Požadavky jsou poměrně časté a automatizace minimální až nulová.

Principy měření

Pokud se solut (látko rozpuštěná v roztoku) rozpustí v čistém solventu (rozpuštědlo), dojde k následujícím změnám ve vlastnostech roztoku:

- Bod tuhnutí se sníží
- Bod varu se zvýší
- Osmotický tlak se zvýší
- Tenze par se sníží

Většina přístrojů je založena na měření bodu tuhnutí, existují i osmometry využívající měření bodu varu.

Bod tuhnutí čisté H₂O je přesně 0,010 °C. Jeden mol nedisociovaného solutu (kdy nedochází k disociaci solutu na druhy iontů), např. glukóza rozpuštěná v 1 kg vody sníží bod tuhnutí o 1,858 °C. Tato změna je známá jako kryoskopická konstanta vody (tj. molární snížení bodu tuhnutí vody). Snížení bodu tuhnutí rovněž závisí na stupni disociace solutu. Pokud jde o iontové solut, každý druh iontů sníží bod tuhnutí o 1,858 °C. Například pokud 1 mol NaCl zcela disociuje na dva druhy iontů (Na⁺ a Cl⁻) v 1 kg vody, bod tuhnutí se sníží o 3,716 °C. Disociace však není nikdy úplná. Vzájemné působení mezi molekulami solutu snižuje disociaci o číselný osmotický koeficient.

Popis přístroje

A₂O Advanced je automatický osmometr – výrobcem je Advanced Instruments (USA).

Nejrychlejší a nejpřesnější způsob měření bodu tuhnutí vzorku je přechlazení roztoku o několik stupňů pod bod tuhnutí. Roztok v tomto stavu je nestabilní, mechanická agitace tudíž vyvolá krystalizaci. Náhlé uvolnění skupenského tepla tání vede k tomu, že se teplota vzorku zvýší až na úroveň konstantní teploty, kdy dochází k rovnovážnému stavu mezi kapalinou a pevnou fází. Podle definice představuje rovnovážná teplota bod tuhnutí roztoku.

Trvání rovnovážného stavu mezi kapalinou a pevnou fází je funkcí rychlosti, s jakou se uvolňuje skupenské teplo tání proti rychlosti odvodu do okolního prostředí nebo pohlčováním okolním prostředím. Tento poměr lze zpomalit a prodloužit rovnovážný stav tak, aby se vytvořila rozlišitelná konstantní velikost měřitelná s přesností 0,001 °C.

Citlivé termistorové sondy monitorují teplotu vzorku a kontrolují termoelektrický chladicí prvek. Mikroprocesorové řízení a automatizovaný provoz minimalizují nepřesnosti způsobené postupem uživatele.

Možnosti přístroje:

- Dotyková obrazovka – spolu s operačním systémem a jednoduchým programem umožňuje snadné ovládání přístroje, stále je perfektní přehled o stavu osmometru.
- Práce s primárními zkumavkami – odstraňuje nutnost pipetování, minimalizuje vzorkovou chybu a zlepšuje správnost výsledku.
- Technologie práce s kapalinou – umožňuje detekci pevné překážky, sraženiny, pozná hladinu vzorku, zajišťuje promytí dávkovací pipety (minimalizuje kontaminaci vzorku a carry-over efekt).

- Pozitivní identifikace vzorku – zabudovaná čtečka čárových kódů a tiskárna spolu s propojením na LIS minimalizuje záměnu vzorků.
- Kalibrace – možno použít tři nebo čtyřbodovou kalibraci, rozsah kalibrace může být 50 – 3000 mosm/kg



Postup hodnocení přístroje

Byla hodnocena opakovatelnost, mezilehlá preciznost, linearita a porovnání se stávajícím přístrojem (ADVANCED 2020).

Protokol

Opakovatelnost: 20 měření v sérii na 2 hladinách). Použit byl komerční kontrolní materiál (Liquid Assayed Multiqual, Bio-Rad Laboratories, USA). Spočítán byl průměr, SD a CV.

Hladina	Průměr (mmol/kg)	SD (mmol/kg)	CV (%)
Hladina 1	309	1,8	0,59
Hladina 2	410	2,3	0,56

Mezilehlá nepřesnost: Měřeno po dobu 10 dnů, každý den 2 série s časovým rozestupem minimálně 4 hodiny. Byly použity stejné vzorky jako pro opakovatelnost, stanoven průměr, SD a CV.

Hladina	Průměr (mmol/kg)	SD (mmol/kg)	CV (%)
Hladina 1	310	2,9	0,94
Hladina 2	410	3,2	0,78

Mez detekce: Změřil se 20krát v sérii blank, vypočetla se směrodatná odchylka výsledků měření. Trojnásobek směrodatné odchylky přepočítaný pomocí kalibračního faktoru na koncentraci daného analytu je považován za mez detekce. Platí: LD = 3 sbl

Výsledná mez detekce: 1,5 mmol/kg

Mez stanovitelnosti: Mez stanovitelnosti byla vyjádřena jako LQ = 9,12 sbl, (hodnota nejistoty = 10 %).

Výsledná mez stanovitelnost: 4,6 mmol/kg

Linearita: Jako vzorky byly použity pacientské vzorky. Základem byl vzorek o nulové koncentraci měřeného analytu, označený jako L (low) a vzorek o extrémně vysoké koncentraci, která je v oblasti předpokládané horní meze pracovního rozsahu měření, označený jako H (high).

Připravila se řada 5 vzorků:

vzorek 1	jen H
vzorek 2	75 % H + 25 % L
vzorek 3	50 % H + 50 % L
vzorek 4	25 % H + 75 % L
vzorek 5	jen L

Každý vzorek se změřil třikrát. Následně byly vypočítány průměrné hodnoty každého ze tří měření a byl sestrojen graf. Do odchylky výsledku 10 % od teoretické hodnoty byla metoda považována za lineární.

Ověřená horní mez linearity: sérum 626 mmol/kg; moč 3520 mmol/kg

Porovnání: Bylo změřeno 40 vzorků pacientů, vždy 16 s patologickými hodnotami a 24 s fyziologickými hodnotami. Porovnávací metodou bylo měření na analyzátoru ADVANCED 2020 (Advanced Instruments (USA)). Každý vzorek se oběma metodami analyzoval dvakrát, a to jako dva různé vzorky ve dvou různých běžích (tj. ne hned za sebou). Doba měření byla 5 dní, k vyhodnocení byla použita lineární regresní analýza podle Passing-Babloka.

Výsledná rovnice lineární regresní analýzy:

$$x = 1,01y - 0,6 \text{ mmol/kg}; r = 0,999$$

Výtěžnost a pravdivost: K patientskému vzorku o známé nízké koncentraci se přidalo jednak 10 % objemu vzorku o známé vysoké koncentraci, a jednak 10 % nulového kalibrátoru. Takto se připravilo 5 dvojic vzorků, měřilo se v dubletu. Spočítána byla výtěžnost R v procentech.

Výsledný bias: +0,2 %

Závěr

Automatický osmometr A₂O Advanced svými parametry plně vyhovuje požadavkům na měření osmolarity. Výhodou je možnost vícebodové kalibrace. Přístroj je snadno ovladatelný a velmi usnadňuje práci v laboratoři – hodí se do všech typů zdravotnických laboratoří.

Literatura

- Manuál pro práci s osmometrem A₂O Advanced.
- B. Friedecký, L. Šprongl, J.Kratochvíla: Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích.
- J. O. Westgard: Basic Method Validation, 3rd. Edition, 2008, Westgard QC Inc., Madison.
- Materiály CLSI:
 - C24-A3: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions.
 - EP05-A2 : Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods.
 - EP06-A: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach.
 - EP09-A2: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples.
 - EP15-A2: User Verification of Performance for Precision and Trueness.
 - EP17-A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation.