

P. Schneiderka, Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc

Močové analýzy

Úvod

Močové analýzy patří mezi nejstarší vyšetřovací postupy. V minulosti se jednalo buď o barevné nebo srážecí reakce prováděné na tzv. „mokrém cestě“, tj. ve zkumavkách, nebo o nativní pozorování korpuskulárních součástí moče mikroskopem. Analýzy moče, podobně jako některá další biochemická a hematologická vyšetření, prováděli dříve ošetřující lékaři přímo ve své ordinaci nebo u lůžka. Dnes jsou tyto činnosti vesměs soustředěny do laboratoří a začínají být stále více automatizovány. Výjimku tvoří specifická skupina vyšetření označovaných jako „point-of-care testy“ (POCT) nebo též „vyšetření u pacienta“, „bed-side testy“, „off site testy“ apod., které se provádějí mimo laboratoř, např. u lůžka pacienta, v ordinaci lékaře, v domácnosti, na sportovišti nebo ve válečném poli.

Základní vyšetření moče

Základní vyšetření moče se provádí jak cíleně při podezření na určité onemocnění spojené s patologickými močovými projevy, tak i necíleně jako screening u bezpříznakových osob, nebo jako součást panelů běžných vstupních vyšetření. Základní vyšetření moče dělíme na fyzikální, chemické a morfologické vyšetření. Morfologickým vyšetřením se rozumí mikroskopie močového sedimentu. Moč odebraná do čisté nádoby se má morfologicky vyšetřit do 1h po odběru, aby se zabránilo rozpadu elementů. Chemické vyšetření lze provést do 4h po odběru. Nejvíce vypovídají hodnoty vyšetření prvního ranního vzorku moče. Moč sbíranou po delší časový úsek (např. 24 h) je nutno konzervovat. Před odlitím vzorku pro odeslání do laboratoře se musí sbíraná moč promíchat a změřit její celkový objem.

Fyzikální vyšetření

Fyzikálním vyšetřením se rozumí sensorické hodnocení barvy, zákalu, případně pěny a zápachu. Instrumentálně nebo indikátorovým papírkem se měří pH a hustota. Čerstvá moč je za fyziologických okolností čirá, světle až sytější žlutá a pěna po protřepání rychle mizí. Při proteinurii moč pění silně a pěna je trvalejší. Různá zbarvení vyvolávají vylučovaná zlučová barviva a jejich metabolity. Bilirubin způsobuje hnědočervené zbarvení, které se na vzduchu oxidací mění na hnědozelený biliverdin. Barvu moče dále ovlivňují některé požití vitaminy, léky a jiná xenobiotika. Charakteristický zápach čerstvé moči se mění stáním a při některých chorobách. Ze staré moče a při chorobách se stagnací moče je cítit amoniak, při ketoacidóze je cítit aceton, při proteinurii a hematurii páchne moč hnilobně což je způsobeno uvolňováním sirovodíku z aminokyselin obsahujících skupiny –SH. Při dědičné metabolické chorobě leucinóze páchne moč po javorovém sirupu.

Od sensorického hodnocení moče se dnes většinou upouští, protože individuální manuální vyšetření je nahrazováno velkosériovým automatizovaným procesem. Pozorování neobvyklého zbarvení pak může být součástí specifických poznámek, které doprovázejí výsledek vyšetření.

Chemické vyšetření moče

Chemické vyšetření moče pomocí kapalných reakcí ve zkumavce je už od 70. let minulého století postupně nahrazováno metodami na bázi suché chemie. K tomu slouží komerční monovalentní nebo polyvalentní testační (indikátorové, reagenční) proužky obsahující zóny impregnované činidly, která poskytují s příslušnou součástí moče barevnou reakci. Barevnou změnu je možno hodnotit pouhým okem (subjektivně) nebo je možné ji objektivně měřit. Vizualně se zbarvení srovnává s přiloženou barevnou stupnicí, která umožňuje semikvantitativní posouzení.

K objektivnímu měření slouží různé typy reflexních fotometrů, jimiž se měří intenzita světla několika vybraných vlnových délek odraženého od příslušné zóny testačního proužku. Některé z takových fotometrů jsou dnes automatizovány a spolu s automatizovanou mikroskopickou částí tvoří linku pro automatizovanou komplexní analýzu moče, tedy močový analyzátor. Automatický vyhodnocovací proces vylučuje možné chyby, které vznikají při vizuálním hodnocení testačních proužků např. vlivem různých světelných podmínek na pracovním místě, individuálními schopnostmi při rozlišování barev a postupující únavou pracovníka. Omezuje chyby v dodržení reakčního času pro proužky a odstraňuje chyby vzniklé přepisem výsledků do dokumentace. Dnes se ve vyspělých zemích při chemickém vyšetřování moči dává zcela jednoznačně přednost tomuto objektivnímu hodnocení.

Typický testační proužek obsahuje zóny pro stanovení pH, hustoty, leukocytů, nitritů, proteinů, glukózy, ketolátek, krve (erytrocytů), bilirubinu a urobilinogenu.

1. Pro orientační **stanovení pH** obsahuje příslušná zóna 3 indikátory: bromtymolovou modř, fenolftalein a metylovou červen. Jejich poměry jsou upraveny tak, aby poskytovaly barevné přechody od oranžové při kyselém pH až po modrou při alkalickém pH.

2. **Hustota** (specifická hmotnost) se semikvantitativně nejčastěji určuje také pomocí směsi indikátorů, podobně jako u pH. Hustota nás informuje především o koncentraci iontů. Ionty obsažené v moči vytěsňují z barevného komplexu protony, a tím mění barvu indikační zóny od tmavomodré při nízké koncentraci až po žlutozelenou při vysoké koncentraci. Hustota je orientačním ukazatelem příjmu tekutin, případně poruch tubulárních funkcí. Normální hodnoty se během dne pohybují mezi 1,016 - 1,022, u dětí mezi 1,006 - 1,014. Falešně vyšší hodnoty způsobuje proteinurie nad 1g/l a alkalické pH moče.

3. **Důkaz leukocytů** pouze doplňuje mikroskopické vyšetření. Detekce je založena na esterázové reakci, která je pozitivní i v případě rozpadu leukocytů. Určují se hlavně neutrofilie. Jejich nespecifická esteráza štěpí ester indoxylu a uvolněný indoxyl potom reaguje s diazoniovou solí za tvorby fialově zbarveného komplexu. Mez detekce je 10 až 25 leukocytů v 1 μ l moče a za patologickou leukocyturii se považuje už 20 leukocytů v 1 μ l moče.

4. **Nález nitritů (dusitanů)** je pozitivní při bakteriurii, především gramnegativních bakterií. Principem stanovení je reakce nitritů v kyselém prostředí se sulfanilamidem za vzniku diazoniové soli a vzápětí azokopulace této soli s derivátem chinolinu, např. 3-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzochinolinu, na růžové až fialové azobarvivo.

5. Políčkem pro **důkaz proteinů** je nejcitlivěji detegován albumin (u glomerulární proteinurie), méně citlivě bývají detegovány globuliny a zcela negativní výsledek je u Bence-Jonesovy bílkoviny. Při reakci se využívá tzv. proteinové chyby indikátoru pH, který se při hodnotách pH do 3,5 barví jasně žlutě, při vyšším pH přechází přes zelenou do modré, v přítomnosti bílkoviny tato barevná změna nastupuje již při pH nižším než 3,5. Okyselení moče pod pH 3,5 zajišťuje pufr obsažený v indikační zóně proužku. Mez detekce zóny pro proteinurii se pohybuje mezi 0,15 až 0,2 g/l. Při pozitivním výsledku a pH 8,0 nebo vyšším se vyšetření má opakovat s močí okyselenou zředěnou kyselinou octovou na pH 5,0 až 6,0. Z léků interferuje urogantrisin, chininové a cholinové přípravky. Stejně vadí zbytky dezinfekčních prostředků nebo saponátů.

6. Detekční reakce pro **glukózu** je založena na enzymové oxidaci glukózooxidázou a vznikající peroxid vodíku pak za katalýzy peroxidázou reaguje např. s 3,3', 5, 5'-tetrametylbendizidem se vznikem barevného produktu. Falešnou negativitu může způsobit kyselina askorbová (vitamin C) a jiné redukující látky, např. některé léky (salicyláty, gentisová kyselina, DOPA) a bilirubin nad 60 mg/l. Mez detekce zóny pro glykosurii je obvykle okolo 1 mmol/l.

7. **Ketolátky**. Reakce indikuje zejména aceton a acetacetát (jen nepatrně 3-hydroxybutyrát), vznikající z různých příčin při ketoacidózách (diabetes mellitus, zvracení, hladovění). Základem tohoto testu je Legalova reakce. Indikační zóna obsahuje nitroprussid sodný v silně alkalickém prostředí. Na přítomnost ketolátek reaguje indikátor obsažený v indikační zóně změnou zbarvení z krémového přes růžovou do temně fialového.

8. **Krev**. Reakce je založena na pseudoperoxidázovém účinku hemoglobinu, který katalyzuje oxidaci chromogenu organickým hydroperoxidem. Bílá indikační zóna obsahující tyto komponenty se barví za přítomnosti erytrocytů nebo hemoglobinu (nebo myoglobinu) jasně modře. Proužky vynikají vysokou citlivostí a umožňují spolehlivou detekci 5 až 10 ery/ μ l moče, případně ekvivalentního množství hemoglobinu. Pozitivitu reakce mohou způsobit i peroxidázy leukocytů nebo některých

druhů bakterií a plísní, pokud se jich v moči vyskytuje velký počet. Falešnou pozitivitu mohou způsobit také zbytky oxidujících čistících prostředků z nedokonale vymytých sběrných nádob.

9. Bilirubin. Bilirubin jako produkt degradace hemu vzniká zejména v retikuloendotelových buňkách sleziny a jater. Jde o lipofilní látku oranžové barvy. V krvi normálně koluje bilirubin vázaný na albumin (nekonjugovaný). V jaterní buňce se konjuguje s kyselinou glukuronovou na mono a bisglukosiduronáty (konjugovaný bilirubin). Ty se vylučují do žluči a s ní do střeva. Část z toho se ze střeva vstřebává do krevního oběhu a prodělává tím enterohepatální koloběh. Konjugovaný bilirubin je ve vodě rozpustný, filtruje se proto v ledvinách a vylučuje se moči.

Za normálních okolností se bilirubin v moči prakticky nevyskytuje. Detekovatelné koncentrace bilirubinu v moči způsobené nadbytkem konjugovaného bilirubinu se objevují u obstrukčních i hepatocelulárních žloutenek (žlučové konkrementy, hepatitidy, toxická poškození jater a nádory jater).

Typické nálezy	Hemolytický ikterus	Hepatocelulární ikterus	Obstrukční ikterus
Bilirubin v moči	neg.	+	+
Urobilinogen v moči	+	+	neg.

Konjugovaný bilirubin reaguje azokopulační reakcí se stabilizovanou diazoniovou solí v indikačním políčku proužku za vzniku červeného až červenofialového zbarvení. Pozitivní reakce na bilirubin v moči se objevuje při zvýšení konjugovaného bilirubinu v krvi na 30 až 34 $\mu\text{mol/l}$. Falešně pozitivní reakce mohou být způsobeny větší koncentrací askorbové kyseliny v moči. Vzorok moči nesmějí být před vyšetřením vystaveny přímému slunečnímu světlu, aby nedocházelo k nežádoucí oxidaci bilirubinu. Pozitivní nálezy bilirubinu v moči je vhodné korelovat se stanovením celkového a přímého bilirubinu v séru.

10. Urobilinogen (Ubg). Urobilinogen a sterkobilinogen představují konečné produkty katabolismu hemoglobinu. K přeměně bilirubinu na urobilinogen a sterkobilinogen dochází zčásti již ve vývodných žlučových cestách, hlavně však v tlustém střevě redukční činností bakterií. Analytická diferenciacce urobilinogenu a sterkobilinogenu je obtížná, nemá diagnostický význam, a proto se obě látky stanovují a vyjadřují sumárně jako urobilinogen. Většina urobilinogenu se vyměšuje stolicí. Část urobilinogenu prodělává enterohepatální koloběh a malé množství je vylučováno ledvinami do moče.

Množství vytvořeného urobilinogenu je úměrné koncentraci bilirubinu vylučovaného žlučí do střeva. Zvýšené vylučování Ubg moči se nachází při stavech spojených se zvýšeným rozpadem hemoglobinu, při omezení funkce jaterního parenchymu (hepatitidy, cirhóza, nádory a toxické poškození jater) a při zvýšené produkci a resorpci Ubg u infekcí žlučového traktu, enterokolitid a ilea. Ke snížení vylučování Ubg moči (což se běžně neprojevuje) dochází při uzavěru žlučových cest (obstrukční žloutenky), omezení nebo zástavě tvorby žluči, při vymizení střevní flóry a při celkovém snížení resorpce v tlustém střevě.

Reakce je založena na přímé reakci Ubg s diazoniovou solí. Bledá barva indikační zóny se v přítomnosti Ubg barví červeně. Proužky někdy detegují již horní mez fyziologického vylučování. Po dlouhém stání moči, nebo při použití formalinu jako konzervačního činidla inhibujícího reakci, bývá výsledek negativní. Falešně pozitivní reakci působí léky, které barví moč na červeně. Silně žlutě zbarvená zóna indikuje přítomnost větší koncentrace bilirubinu, které po delší době může přejít do zeleného zbarvení způsobeného přeměnou na biliverdin. Oproti Ehrlichově aldehydové reakci jsou proužky specifitější, protože nereagují na tzv. Ehrlich-pozitivní látky, jako jsou porfobilinogen, indikán močový, PAS, sulfonamidy aj.

Morfologické vyšetření moče

Morfologické vyšetření lze provádět klasičkou mikroskopií nebo pomocí močového analyzátoru. "Mikroskopická část" močového analyzátoru je založena buď na principu průtokové analýzy nebo jako v následujícím příkladu na principu automatizované analýzy obrazu.

Manuální mikroskopické vyšetření se provádí v 10x koncentrovaném močovém sedimentu, k vyšetření se používá tzv. střední proud čerstvé první ranní moči. Výsledek je směrodatný, je-li vyšetření skončeno do 1 hodiny po odběru moče. Konzervovanou moč na vyšetření močového sedimentu je

nutné do laboratoře doručit do 3 hodin po odběru a během další 1 hodiny se musí vzorek vyšetřit. Konzervace však nechrání buněčné elementy před rozpadem vlivem nepříznivého pH, příp. osmotického tlaku při nízké hustotě moče. Příprava sedimentu se provádí za těchto standardních podmínek:

1. Moč ve sběrné nádobě se důkladně (bez pění!) promíchá. Odebere se vzorek přesně 10 ml moče a centrifuguje se 5 minut při 400 G, čehož se u běžných centrifug s výkyvným (swing-out) rotorem o poloměru 10 cm dosáhne u 1500 ot./min.
2. Po ukončení centrifugace se opatrně odsaje 9 ml supernatantu a ve zbylém 1 ml se sediment důkladně promíchá. Kapka rozmíchaného sedimentu se umístí na speciální hodnoticí akrylátové sklíčko (Fast Read 10 systém), které zajišťuje tloušťku vrstvy 100 µm. Sediment se nejprve orientačně prohlídí mikroskopem v mírně zastíněném procházejícím světle při zvětšení 200x. Poté prohlídíme sediment při zvětšení 400x (450x).

V močovém sedimentu pozorujeme jak složky anorganické, tak i buněčné elementy. Prohlídíme vždy celý preparát meandrovitým způsobem. Při jasně pozitivním nálezu a rovnoměrném rozložení elementů stačí prohlédnout 10 polí v různých místech preparátu zvětšením 400 až 450x. Průběžné výsledky zaznamenáváme do protokolu a jako konečný výsledek uvádíme průměrný počet každého nalezeného typu elementů na zorné pole.

Při zřetelně negativním nálezu a při nerovnoměrném rozložení elementů je třeba orientačně na sedimentu prohlédnout celou plochu preparátu. Doporučuje se hodnotit též sediment barvený např. podle Sternheimera-Malbina roztokem genciánové violeti (Crystal violet, Basic violet 3) a Safraninu O. Jde vlastně o modifikované Gramovo barvení s použitím safraninu jako kontrastní barvy. Safranin O je lipofilní kationické barvivo, které se používá také pro barvení glykosaminoglykanů a proteoglykanů.

Hodnocení nálezů v močovém sedimentu

Erythrocyturie je buď známkou porušení permeability glomerulární membrány, nebo erythrocyty pocházejí z vývodných močových cest. Leukocyturie se může objevit při infekcích močového ústrojí (v nálezu převažují leukocyty) a při glomerulonefritidách (převažují erythrocyty a bílkoviny).

Epitelie mohou být různého tvaru a původu. Renální (tubulární) signalizují patologický proces zvláště jsou-li nalepeny na válcích. Ploché, dlaždicové epitelie pocházejí z vývodných močových cest.

Klinicky významný je nález válců, které vždy pocházejí z ledvin. Mohou mít různý vzhled: rozlišují se válce hyalinní, granulované, leukocytární, erythrocytární, epiteliální, voskové i jiné. Válce se často hromadí u okrajů preparátů a protože jsou málo kontrastní, musí se pečlivě hledat. Při nálezů válců se často chemickým vyšetřením prokazuje proteinurie.

Krystaly jsou charakterizované různými tvary, podle nichž se určí jejich složení (oxaláty, kyselina močová, cystin, tyrosin, leucin, aj.). V sedimentu je možno dále nalézt bakterie, vlákna plísni, kvasinky, trichomonády, spermie. Někdy se nacházejí i cizorodé látky, jako partikule pudru, vlákna vaty, textilní vlákna apod.

Fyziologické rozmezí počtu elementů v zorném poli

Erythrocyty	0 - 4
Leukocyty	0 - 4
Válce hyalinní	0
granulované	0
leukocytární	0
Epitelie dlaždicovité	0

Videosekvence „Močový analyzátor“

Požadavky na analýzy moče jsou velmi časté a pro laboratoře znamenají velké pracovní zatížení.

Automatizace těchto činností je proto významným krokem k urychlení práce a současně představuje nedocenitelný faktor zvýšení kvality výsledků vyšetření.

Chemické analyzátoři moče, které zjednodušovaly, objektivizovaly a standardizovaly práci s reagenčními proužky, se začaly v laboratořích používat od 80.let minulého století. Kombinované analyzátoři pro chemickou a současně i mikroskopickou analýzu se v našich podmínkách objevují

přibližně od přelomu tisíciletí. Tyto přístroje mívají dvě části: chemickou a morfologickou. Chemická část stále využívá reagenční proužky a mikroskopická je založena buď na principu průtokové cytometrie nebo na principu analýzy obrazu.

Zobrazený močový analyzátor je plně automatický přístroj pro chemickou i mikroskopickou analýzu moče a skládá se z modulu pro chemickou analýzu (Aution Max, vpravo), jenž je pomocí dopravníku propojen s mikroskopickým modulem (IQ 200, vlevo).

Vzorky moči přijaté k analýze se v laboratoři označují a údaje uvedené na žádance se registrují do laboratorního informačního systému a současně do paměti analyzátoru. Zkumavky se potom ukládají do stojánek a v nich na pult dopravníkové části analyzátoru. Dávkovací jehla nassaje 1 ml nativního vzorku moči a aplikuje ho postupně na jednotlivá pole reagenčního proužku. Do dvou zásobníků chemického modulu lze uložit až 400 testovacích proužků. Každý z nich nese deset reagenčních polí, a to pro pH, hustotu, glukózu, proteiny, ketolátky, krev, bilirubin, urobilinogen, leukocyty a nitrity. Následuje hodnocení vzniklého zbarvení pomocí reflexní fotometrie. Přístroj může zpracovat až 220 vzorků za hodinu.

Hustota moče se v tomto případě měří zvlášť na refraktometrickém principu a samostatně se také měří zákal moče turbidimetricky a barva moče fotometricky. Výsledky lze vytisknout na termotiskárně nebo zpracovat do společného nálezu s morfologickým vyšetřením.

Po ukončení chemické analýzy se registrované a na pult umístěné vzorky nativních moči ve stojáncích přesunou k mikroskopickému modulu. Tam jsou opět postupně aspirovány a v planární průtokové kyvetě začne probíhat jejich automatické mikroskopování. Analyzátor vyhodnotí výsledek mikroskopie na principu tzv. analýzy obrazu. V databázi přístroje jsou uloženy typické obrazy elementů, které mohou být obsaženy v moči a konkrétní nález je s nimi srovnáván, vyhodnocován a spočítán. Je možno rozlišit 12 typů částic a nelze-li nalezený objekt automaticky zařadit, nabízí se alternativa manuálního výběru. Základní menu obsahuje erytrocyty, leukocyty, bakterie, epitelié ploché a kulaté, válce hyalinní a granulované, spermie a krystaly. Výsledek je možno zobrazit na monitoru a stává se součástí nálezu, který lze vytisknout a/nebo odeslat. Přístroj umožňuje u daného vzorku vždy provádět chemické i morfologické vyšetření nebo jen jedno z nich, nebo provádět morfologické vyšetření pouze při patologickém nálezu chemické analýzy.

Literatura

Štern P. a kol.: Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Karolinum Praha, 2. vydání 2011

Schneiderka P. a kol.: Stanovení analytů v klinické biochemii, I.část, Karolinum Praha 1999, ISBN 80-7184-761-5

Chromý V. a kol.: Bioanalytika. Analytická chemie v laboratorní medicíně. MU Brno 2002. ISBN 80-210-2917-X

Další zdroje

<http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-772>

<http://sekk.cz/atlas>

<http://portal.med.muni.cz/clanek-10-automaticka-analyza-moce.html>

<http://www.medista.cz/grsc.jsp?rid=426> (Atlas částic močového sedimentu)

<http://www.agora.crosemont.qc.ca/urinesediments>

<http://library.med.utah.edu/webpath/tutorial/urine>

Poznámky k videosekvenci Močové analýzy

Zrychlit (zkrátit) záběry se zvýrazněným zeleným rámečkem

Zrychlit (zkrátit) záběry nasávání vzorku na pultu analyzátoru

Zpomalit (zmrazit) pohled na žádanku

Záběry na obrazovku s výsledky umístit nakonec

Záběry na reagenční proužky a foto jejich barevné škály přesunout až za 1. záběr se zeleným rámečkem

Zařadit několik záběrů (fotografií) na výsledky mikroskopické analýzy – jako v ppt

8.9.2011