

Historie

- 1500 př.n.l. – Egypťané zjistili, že někteří pacienti mají zvýšený objem moče, která přitahuje mravence
- V 6.stol. – Indové zjistili, že sladká moč je spojena s nemocí
- V r.1674 – anglický lékař Thomas Willis zařadil ochutnávání moče do rutinní praxe a zavedl pojem Diabetes mellitus



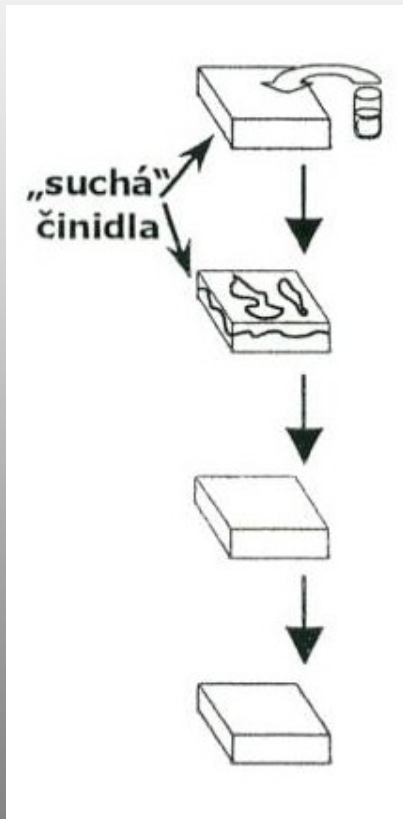
Analýza moče

- **Chemická analýza moče**
- **Automatická morfológická analýza moče
nebo mikroskopické vyšetření močového
sedimentu**

Chemická analýza moče

- Automatizace od 80. let minulého století
- Přístroje využívají stanovení parametrů pomocí diagnostických proužků (suchá chemie)
- Semikvantitativní stanovení bilirubinu, urobilinogenu, bílkoviny, ketonů, hemoglobinu, leukocytů, dusitanů, pH, glukosy a specifické hmotnosti
- Standardizace měřící procedury
- Namáčení proužků x **pipetování na jednotlivé reakční zóny**
- analýza na principu **reflexní fotometrie**

Diagnostické proužky



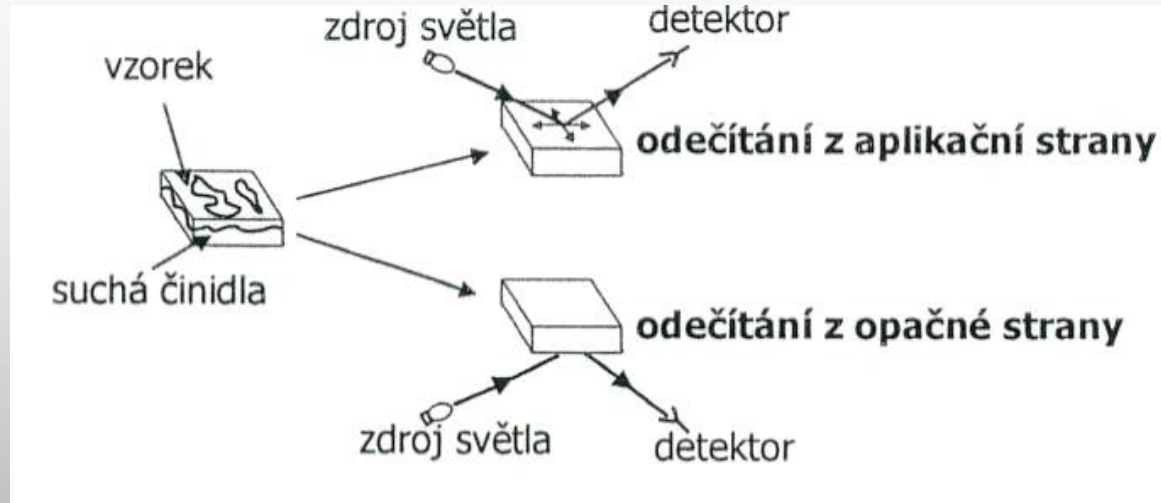
- Matrice pro suchá činidla - **Impregnovaná vlákna**
- Analyzovaný vzorek (moč) je aplikován na povrch pevné fáze
- **Difunduje** do její matrice a **rozpouští** suché činidlo, které je v matrici dispergováno
- Rozpuštěné **činidlo reaguje s analyzovanou látkou** za vzniku barevného produktu
- Výsledné zbarvení na povrchu pevné fáze je sledováno vizuálně nebo instrumentálně

Celulózová impregnovaná vlákna

- **Celulózová matrice** (firma Bayer – Siemens) porézní či polopropustná
- Reagencie v suché formě distribuovány
 - **do matrice**
 - **na povrchu matrice**
- Postupná impregnace a zasoušení jednotlivých činidel

hydrataci praskne)

Reflexní fotometrie



Impregnovaná vlákna mají vysokou opacitu (neprůhlednost)

Ke stanovení jejich zbarvení nutno využít reflexní fotometrii

- měření ze stejné strany jako nanesen vzorek, ale na jiném místě (Roche, vhodné i pro plnou krev – přístroj Reflotron)
- měření z opačné strany než aplikován vzorek (vícevrstvé filmy)

Chemická analýza moče

Reflexní fotometrie:

- zdroj světla - **světlo emitující diody**
- emitují světlo o různých přesně definovaných vlnových délkách – světlo pak dopadá v různých úhlech na reagenční zóny diagnostického proužku
- **světlo je odraženo na fotodiodu** , která slouží jako detektor
- intenzita odraženého světla závisí na vybarvení reakční zóny (od bílé zóny se odráží prakticky 100%, čím tmavší zóna, tím víc světla je absorbováno)

Chemická analýza moče

- semikvantitativní analýza
- diagnostické proužky
- malá pracoviště ručně,
velké klinické laboratoře na automatech
- proužky používané v ČR - Hepta(Okta)Phan (Pliva-Lachema Diagnostika), Combur (Roche Diagnostic), Aution Sticks (Arkray)
- 10 zón (+ kompenzace)
- odčítání po 60 – 90 s

Principy jednotlivých stanovení:

Specifická hustota (hmotnost):

- na automatech se zóna nevyužívá (provádí se refraktometricky)
- pomocí koncentrace iontů v moči
- koreluje dobře s refraktometrickým stanovením
- v přítomnosti kationtů jsou protony uvolněny komplexotvorným činidlem
- mění barevu bromthymolové modře od modré přes modrozelenou ke žluté
- při pH =7 a více připočíst hodnotu 5 kg/m³
- bílkoviny v koncentraci 1 - 5 g/l nebo ketoacidóza hustotu zvyšují

pH:

- měřeno pomocí acidobazických indikátorů methylová červeň, fenolftalein a bromthymolová modř
- kombinace indikátorů umožňuje změnu barvy testační zóny od oranžové přes zelenou na modrou v závislosti na pH moče.

Nitrity:

- vznik dusitanů redukcí dusičnanů vlivem patogenních mikrobů
- na principu Griessovy reakce - **dusitanový anion s aromatickým aminem v kyselém prostředí tvoří diazo-sloučeninu**
- ta kopuluje s vhodnou látkou na červené azobarvivo.
- již slabé růžové zbarvení indikuje značnou bakteriurii
- falešně negativní výsledky mohou být způsobeny léky (Antibiotika vysadit tři dny před testem)

Bílkovina:

- přítomnost proteinů - **změna barvy acidobazického indikátoru**
- test je citlivý na **albumin**, podstatně nižší citlivost vykazuje vůči globulinům, mukoproteinům a Bence-Jonesově bílkovině.
- falešná pozitivita - léky, dezinfekční prostředky obsahující kvartérní amoniové soli

Glukosa:

- na principu enzymové **reakce glukosooxidáza/peroxidáza**
- glukosa je enzymaticky oxidována na glukonolakton
- v přítomnosti peroxidázy peroxid vodíku oxiduje indikátor za vzniku zelené barvy
- test je specifický pro stanovení D-glukózy, ostatní cukry nedávají pozitivní reakci.
- při koncentraci glukózy 5,5 mmol/l a vyšší, neovlivňuje výsledky stanovení ani vyšší koncentrace kyseliny askorbové.
- test je specifický pro glukosu, ostatní cukry nereagují

Ketony:

- test je založen na Legalově reakci
- **ketolátky reagují s nitroprusidem sodným** v silně alkalickém prostředí **do fialova**
- reakce je citlivější na kyselinu acetoctovou než na aceton

Bilirubin:

- test je založen na **kopulaci bilirubinu s diazoniovou solí**
- vznik růžového zbarvení testační zóny

Urobilinogen:

- reaguje **se stabilní diazoniovou solí** v kyselém prostředí
- **vznik červeného azobarviva**
- vzorky moče chránit před přímým slunečním světlem
- jinak nižší nebo falešně negativní výsledky

Leukocyty:

- na základě přítomnosti **esteráz granulocytů**
- tyto enzymy **štěpí ester indoxylu na indoxyl, který dává s diazoniovou solí barevný fialový produkt**
- test není ovlivněn přítomností bakterií, trichomonád a erytrocytů v
- zeslabení reakce - bílkovina v koncentraci nad 5 g/l a glukóza nad 111 mmol/l
léky (gentamycin)

Erytrocyty:

- erytrocyty jsou hemolyzovány na **hemoglobin**
- **ten spolu s myoglobinem katalyzuje oxidaci indikátoru (organický hydroperoxid) – v přítomnosti pseudoperoxidasy**
- ze žluté na zelenomodrou
- lze detekovat mikrohematurii
- kyselina askorbová neinterferují

Další zóny – kompenzace, turbidita

Historie

- fyzikální vlastnosti moče (barva, zápach)
- klasické chemické reakce ve zkumavce –
 - stanovení bilirubinu s alkoholickým roztokem jódu- vznik zeleného prstence biliverdinu
 - reakce s Ehrlichovým činidlem – azokopulační reakce diazoniové soli – vznik červeného zbarvení s urobilinogenem a porfyriny

Hodnocení chemické analýzy moče

č.m et.	analyt	arbitrární jednotky						
		0	+-	1	2	3	4	
144	leukocyty (elem/ul)	neg		25	75	250	500	
118	nitrity (dusitany)	neg		+1	+2			
122	bílkovina (g/l)	neg	0,15	0,3	1,0	3,0	10,0	
123	glukóza (mmol/l)	norm	3	6	12	30	60	
124	ketony (mmol/l)	neg		1,5	4	8	15	
125	urobilinogen (μ mol/l)	norm		35	68	150	>150	
126	bilirubin (umol/l)	neg		8,5	35	100	>100	
127	krev-ery (mg/l)	neg		0,6	2	10		
		absolutní hodnoty						
147	hustota (g/ml)	1,000	1,005	1,010	1,015	1,020	1,025	1,030
121	pH	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0		

Referenční interval: hustota 1.010 – 1.025g/ml

- posouzení zředovací a koncentrační schopnosti ledvin
- přesnější je vyšetření osmolality moče

Referenční interval: pH 5,0 – 6,5

- vliv potrava (rostlinná alkalizuje, živočišná naopak acidifikuje)
- vliv chronické poruchy acidobazické rovnováhy, léčiva.
- alkalické pH patologické

Příčiny:

- bakteriální infekce ledvin a močových cest (pozor na arteficiální pomnožení bakterií při delším skladování moči v teplém prostředí!),
- renální tubulární acidóza

Referenční interval: nitrity negativní

- průkaz svědčí pro uroinfekci (většina bakterií způsobujících močové infekce redukuje nitráty na nitrity).
- vyšetření lze použít ke kontrole účinku léčby

Referenční interval: bílkovina negativní

- **prerenální** proteinurie
vysoká konc. bílkoviny o malé molekule - projde glomerulem: hemoglobin, myoglobin, Bence-Jonesova bílkovina
zdravé ledviny
- **renální** proteinurii
při onemocnění ledvin: glomerulární
 - selektivní – poškození mírné, ztráta negativního náboje glomerulární membrány vazbou kyseliny sealové (albumin a bílkoviny o molekulové hmotnosti do 100 tisíc)
 - neselektivní – poškození větší (prochází i bílkoviny o největší molekule)
tubulární
 - nedostatečné vstřebávání proteinů, které prošly glomerulem (mikroproteiny - α_1 a β_2 -mikroglobulin).
při intoxikaci – sloučeniny Cd, Hg
smíšená
- **subrenální** proteinurie (bílkovina pochází z močových cest) – při zánětech doprovází ji leukocyturie.

Referenční interval: glukóza normální

- reabsorbována tubulárními buňkami ledvin
- renální práh (9 – 10 mmol/l) - glykosurie

Příčiny :

- hyperglykémie (diabetes mellitus)
- snížený renální práh pro glukózu
- těhotenství (zvýšení glomerulární filtrace + snížení renálního prahu)

Referenční interval: ketony negativní

- vznik při získávání energie z mastných kyselin

Příčiny:

- hladovění (nedostatek sacharidů, rychle u dětí),
- diabetes mellitus
- při tkáňové hypoxii (šok) - falešně negativní

rovnováha mezi kyselinou acetoctovou a β -hydroxymáseľnou je posunuta na stranu kyseliny β -hydroxymáseľné – ta nereaguje

Referenční interval: urobilinogen normální

Příčiny:

- funkční nedostatečnost jater – hepatální ikterus
- překročení funkční kapacity jater – prehepatální ikterus (hemolytické anémie, krvácení do GIT, ...)

Referenční interval: bilirubin negativní

- bilirubin v moči pozitivní při zvýšení přímého (konjugovaného) bilirubinu v plazmě
- u obstrukčních a hepatálních ikterů

Referenční interval: leukocyty negativní

Příčiny :

- bakteriální zánět močových cest nebo ledvin

Referenční interval: krev - erytrocyty negativní

- Hematurie - makroskopická
mikroskopická (okem ji nevidíme).

Příčiny :

- Renální (glomerulonefritida, nádor ledvin)
- Prerenální (hemoglobinurie a myoglobinurie – hemolýza, svalová traumata, popáleniny)
- Subrenální (krvácení do močových cest – zánět, kámen, nádor; hemoragická diatéza)
- Ponámahová – fyzická námaha, chlad

Močový sediment, mikroskopické vyšetření

Specifikace vzorku :

první nebo častěji druhá ranní moče

- v noci zakoncentrování - patologické hodnoty nejvýraznější

močové proteiny a uráty méně rozpustné - hodnocení zejména válců a krystalů kyseliny močové zatíženo menší chybou

- během dne příjmem potravy moč alkalizuje
vliv diuretik
- druhá ranní moč - elementy neleží dlouho v močovém měchýři, nedochází k jejich rozpadu

Příprava pacienta :

- běžný příjem tekutin
- omytí genitálií vodou – ne desinfekcí
- středního proud moče (mimo období menstruace)

Příprava analytického vzorku – manuální provedení:

- sediment z 4 ml nativní moči
- odstředěním při 500 g, 5 minut, pokojová teplota
- speciální zkumavky k tomuto účelu
- supernatant odlít - zbývá 0,4 ml zahuštěné moče

Mikroskopické vyšetření:

- 10x zakoncentrovaná moč
- 400 násobném zvětšení
- preparát na mikroskopickém sklíčku - počet částic na zorné pole
v komůrce Fast Read - počet částic na 1 μ l nativní moče

Erytrocyty, leukocyty, válce a epiteliie - na 1 μ l

Bakterie, kvasinky, hlen a krystaly - přítomny, četné, záplava..

- do jedné hodiny

Supravitální barvení dle Sternheimera:

- Doc. Timo Kouri - standardizace barvicí procedury
- dvojsložkovou barvu - modř a červeň.
- lepší rozeznatelnost epitelí a válců
- potíže při větším počtu erytrocytů (růžová) a leukocytů (modrá)
- rychlý rozvoj automatizace v močové analýze (flow cytometrie a automatizované mikroskopické vyšetření)
- barvení se v ČR v masovém měřítku neprosadilo

Hamburgerův sediment:

- kvantitativní stanovení **počtu erytrocytů, leukocytů a válců v moči sbírané 3 hodiny**
- výsledek je přepočten - diuréza - na rychlost vylučovaných elementů za časovou jednotku
- umožňuje hodnotit a srovnávat exkreci uvedených elementů a upřesňuje v indikovaných případech základní vyšetření moče
- vyšetření ze sedimentu získaného odstředěním sbírané moče – při manuálním provedení
- masivní hematurie, leukocyturie, krystalurie - z nativní sbírané moče
- zpracovat do 1 hodiny
- V současnosti vyšetření ztrácí význam

Hodnocení močového sedimentu:

- **Leukocyty (shluky) a erytrocyty** – viz chemické hodnocení moče

- **Epitelie :**

Dlaždicové (ploché nebo-li skvamózní) – pochází z uretry a vagíny
nepravidelný tvar, velké, dobře viditelné jádro
minimální klinický význam – kontaminace
častý nález

Buňky přechodného epitelu – jedná se o buňky epit. výstelky
urinálního traktu – močový měchýř, proximální část
uretry u mužů
z hlubších vrstev - hustší a kulatější
kontakt s močí, absorpce vody
menší než dlaždicové epitelie
možnost dvou jader
menší počet může být normální
velké množství - infekce, léky

- **Epitelie :**

Renální tubulární – významný nález, velmi zřídka

- při renální tubulární nekróze nebo virové infekci
- malé, asi dvakrát větší než neutrofily
- polyedrické, mají často excentrické ohraničené jádro

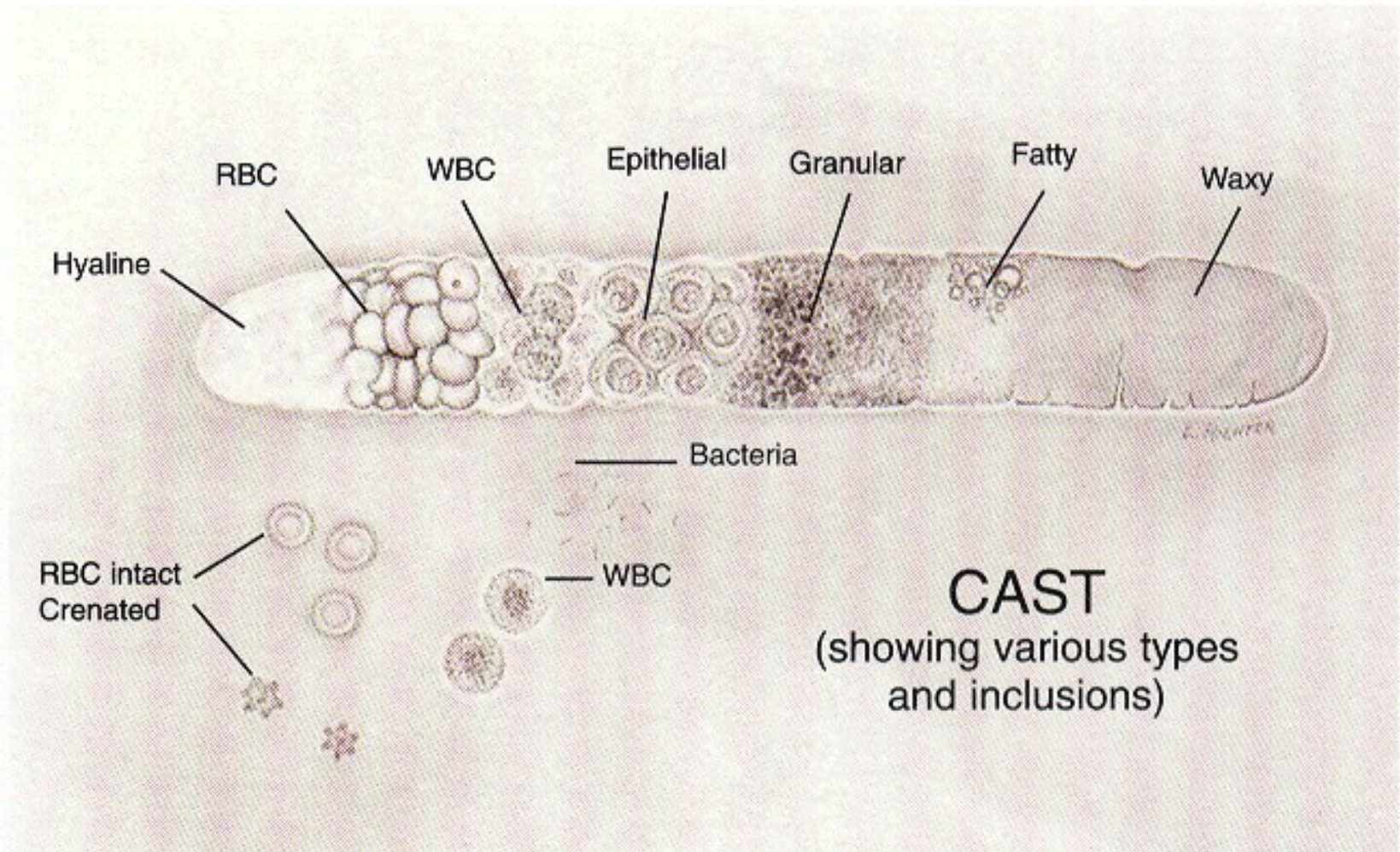
Oválná tuková tělíska :

renální tubulární epitelie nebo makrofágy naplněné tukem

- při velké permeabilitě glomerulu - snížený albumin, zvýšená syntéza proteinů a lipoproteinů

Válce:

- precipitací proteinu v tubulech ledvin
- základ tvoří Tamm – Horsfallův glykoprotein, který
- je sekretován z renálních tubulárních buňek
- tvorbu válců podporuje - kyselější pH, přítomnost větší koncentrace plasmových bílkovin, dehydrataci organismu, náročná fyzická aktivita
- definovaná vnější linie, paralelní strany, zakulacené konce, tvar tubulu
- úlomky válců
- bez barvení pod mikroskopem špatně viditelné
- fázová kontrastní mikroskopie
- hyalinní, buněčné, granulované, tukové, voskové a směsné



Archetypal cast (showing various types and inclusions). (From Linne JJ, Ringsrud KM: *Basic techniques in clinical laboratory science*, ed 3, St. Louis, 1992, Mosby.)

Hyalinní válce - barví se světle růžově nebo světle modře

- nález, který není patologický
- objevují se v koncentrované kyselé moči
- ve velkém počtu - záněty
- úzké v důsledku otoku tubulů

Buněčné válce – erytrocytární, leukocytární (granulocytární), z renálních tubulárních epitelí, bakteriální

- patologický nález

Erytrocytární – při glomerulární nefritidě, nejkřehčí, nalezeny vyjimečně

Leukocytární – nejčastěji z neutrofilů při zánětech a infekcích

Z renálních tubulárních epitelí –

- po otravě Hg nebo etylenglykolem, hepatitidě, kdy dochází k poškození tubulů

Nelze-li určit částice - válec buněčný

Přeměna válců:

- po vytvoření nezůstávají ve stejném stavu
- postupně se vyvíjí.
- čím déle v ledvině (tlak), tím pozdější stádium válců
- buňky v buněčných válcích postupně degenerují
- zborcení, ztrátě buněčné membrány
- tvorba granulí
- granule podléhají další degeneraci, ztrátě struktury, válcová hmota zhoustne, zkřehne a zvoskovatí

Granulované válce:

- granule vznikají po rozbití buněčné membrány ve válci či tubulech
- malý počet po intenzivní fyzické aktivitě (velký počet u otužilců)
- větší počet je silně patologický.
- obsahují agregované plasmatické proteiny, fibrinogen, globuliny
- nelze určit původ buňek
- několik granulí - válce hyalinní

Voskové válce - nejzávažnější

- při chronickém onemocnění ledvin - válce renálního selhání
- homogenní struktura, mohou přecházet ve válec jiného typu – např. granulovaný
- nejširší, nepravidelné zlomené konce
- vypovídají o poškození tubulů, obsahují částičky ledvin

Tukové válce – při silné renální dysfunkci, nefrotickém syndromu

- v moči s pěnou, silně zvýšenou CB a Alb, u diabetiků, po intoxikaci Hg
- obsahují oválná tuková tělíčka
- speciálním barvením lze rozlišit převahu Chol či TG

Pseudoválce – např. vlákna hlenu, shluk buněk

Krystaly a amorfni drt':

- nepřiliš významný nález
- oxaláty, kyselina močová, fosfáty a tripelfosfáty
- vyjimečně lékové, bilirubinové, cystinové a myoglobulinové

Barvený sediment

- **Erythrocyty** – růžová

V kyselém moči světle růžové, se vzrůstajícím pH až červenofialová

- **Leukocyty** – modré až modrofialové jádro

Leu s nepoškozenou cytoplasmatickou membránou neobarvené jádro, poškozené výrazně modré, rozpadající se neobarvené jádro

Barvený sediment

Epitelie

- Dlaždicové epitelie – růžová
- Přejídné – fialovo-růžové, někdy jádro tmavě fialové
- Renální tubulární – fialovo-růžové, někdy jádro tmavě fialové

Válce

- Hyalinní – světle modré případně světle růžové
- Buněčné, granulované – buňky či granula tmavě fialová či tmavě růžová

Barvený sediment

- Krystaly – nebarví se
- Amorfni drt' – nebarví se, výjimečně nafialovělá
- Bakterie – většinou modrá
- Kvasinky – světlé
- Tukové kapky - nažloutlé
- Hlen – modrá

Urinalysis and Body Fluids

K.M. Ringsrud, J.J. Linné

Mikroskopické vyšetření moče

Autoři: *Miroslava Beňovská, Ondřej Wiewiorka, Jana Tůmová*

Oddělení klinické biochemie FN Brno; Katedra laboratorních metod LF MU

- **Mikroskopické nálezy barveného sedimentu**
- **Mikroskopické nálezy nativního sedimentu**
- **Nálezy z automatického analyzátoru FUS-2000 a iQ 200**

Elportál, MU Brno:

<http://elportal.cz/publikace/vysetreni-moce>