

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):

- 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 acetocetovou 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 ($\mu\text{mol/l}$)	norm		35	68	150	>150	
126	bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	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 acetoaceticou a β -hydroxymáselnou je posunuta na stranu kyseliny β -hydroxymáselné – 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 2000 rpm, 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

Erythrocyty, leukocyty, válce a epitelie - 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 erythrocytů (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
- ztráta významu

Hodnocení močového sedimentu:

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

Dlaždicové (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 - balóny s vodou
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

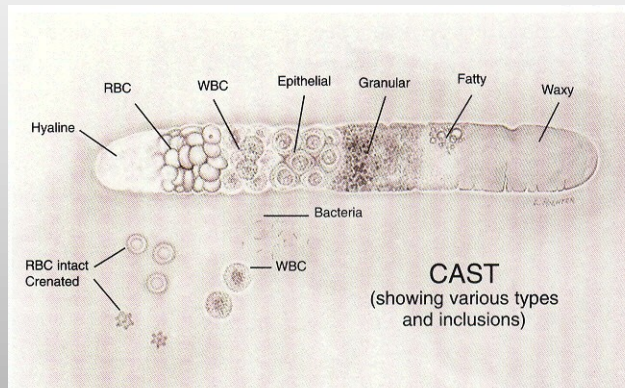
Oválná tuková tělíska :

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, vlákna z plínek

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

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

Válce

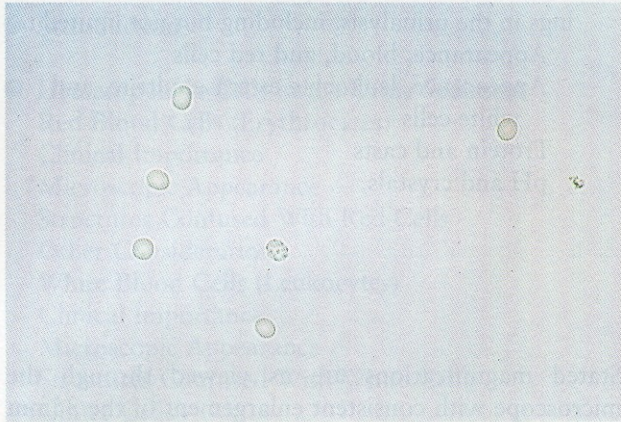
- Hyalinní – světle modré případně světle růžové
- Buněčné, granulované – buňky či granula tmavě fialová či tmavě růžová

Barvený sediment

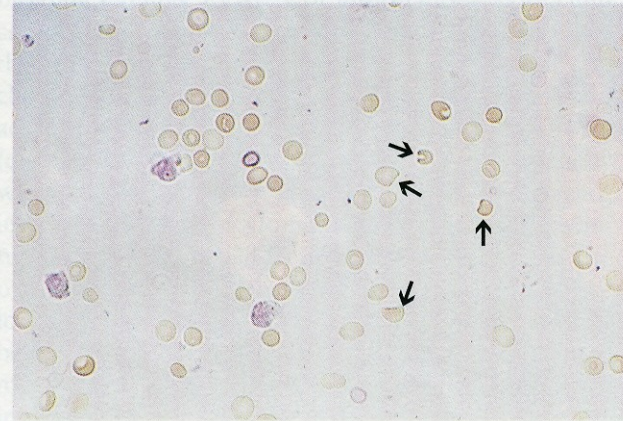
- Krystaly – nebarví se
- Amorfni drt' – nebarví se, výjimečně nafialovělá
- Bakterie – většinou modrá
- Kvasinky, plísně – světlé
- Tukové kapky - nažloutlé
- Hlen – modrá

Urinalysis and Body Fluids

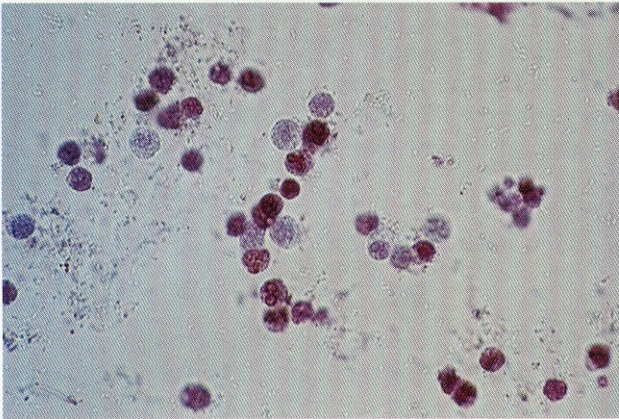
K.M. Ringsrud, J.J. Linné



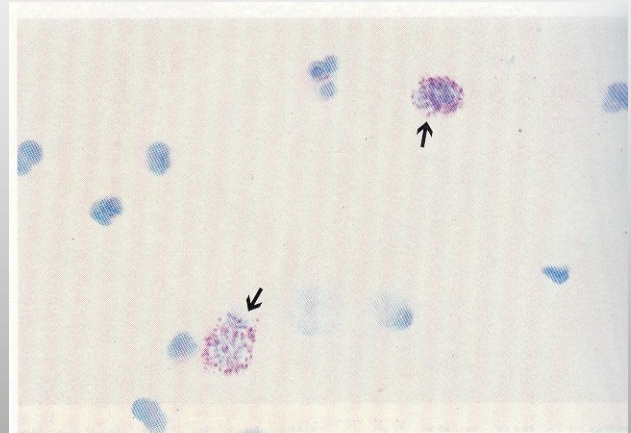
Red cells, 5 intact, 1 crenated. Unstained, $\times 400$.



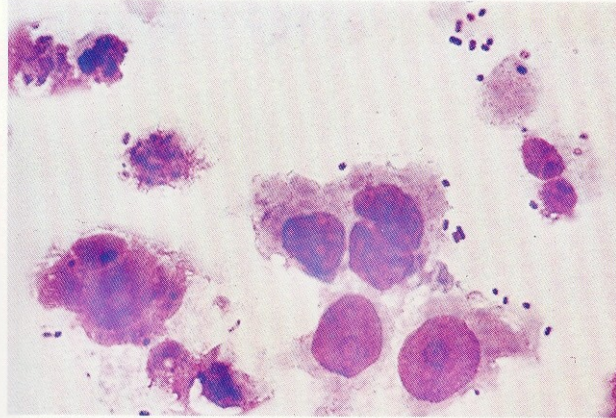
Dysmorphic red cells (arrows), with many other red cells and three white cells, Sedi-Stain, $\times 400$.



Many white cells showing varied staining. Many bacteria also present. Sedi-Stain, $\times 400$.



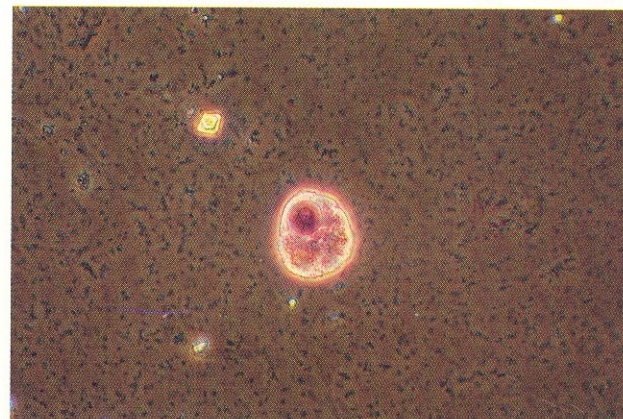
Eosinophils (at arrows) and neutrophils. Cytospin, Hansel's stain, $\times 1000$.



Mononuclear cells, possibly lymphocytes. Cytospin, Wright's stain, $\times 1000$.

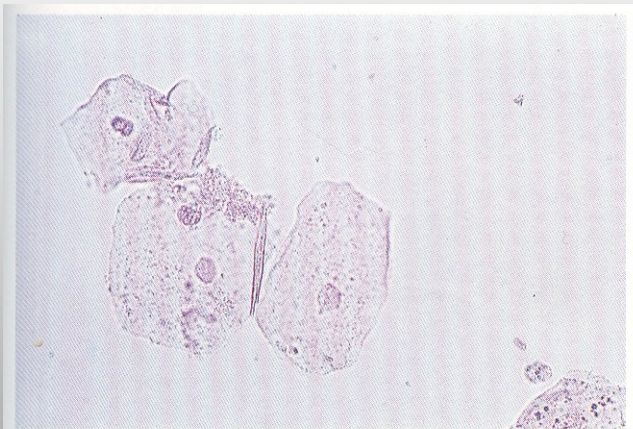


A

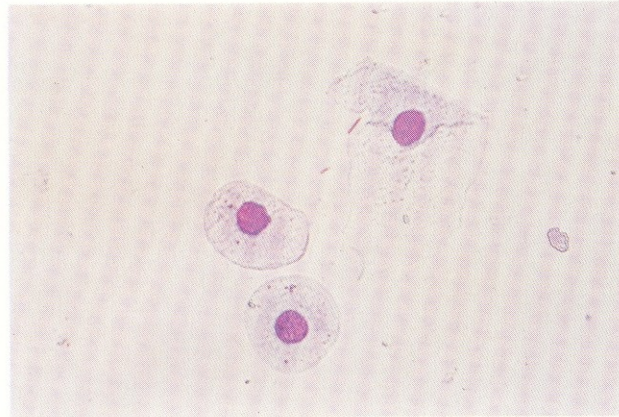


B

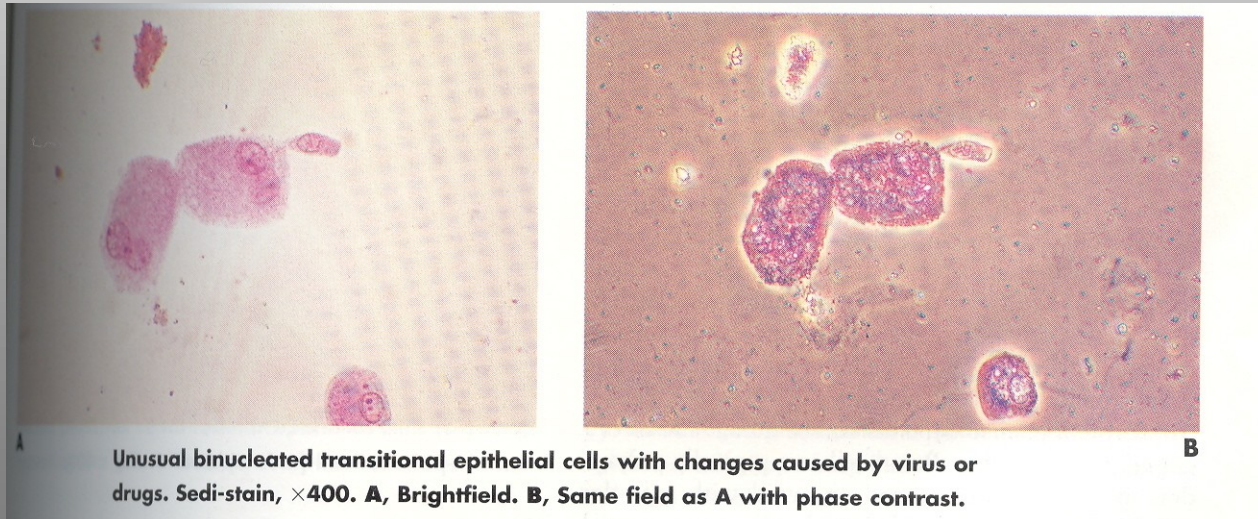
Macrophage, and many bacteria. Sedi-Stain, $\times 400$. A, Brightfield. B, Phase contrast.



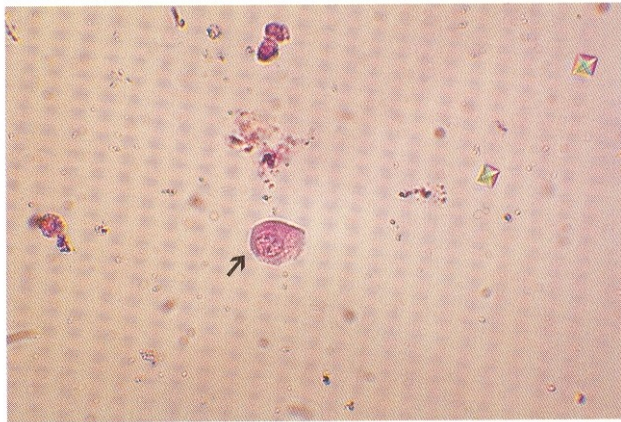
Squamous epithelial cells, with one beginning to appear as a clue cell. Sedi-Stain, $\times 400$.



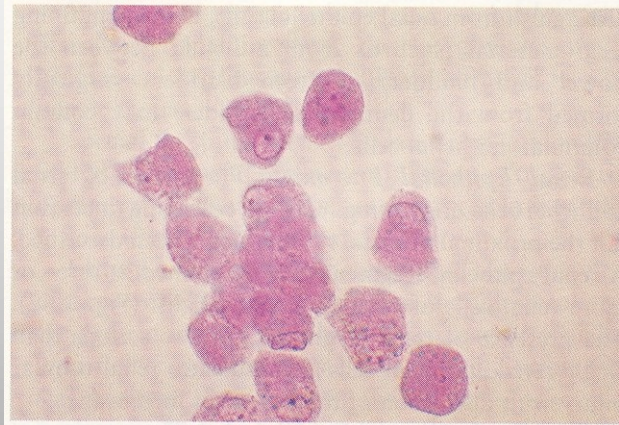
Two transitional epithelial cells, one folded squamous epithelial cell. Cytospin, Wright's stain, $\times 400$.



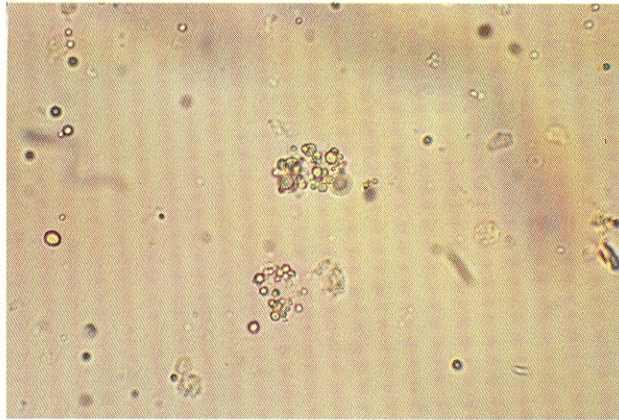
Unusual binucleated transitional epithelial cells with changes caused by virus or drugs. Sedi-stain, $\times 400$. **A**, Brightfield. **B**, Same field as A with phase contrast.



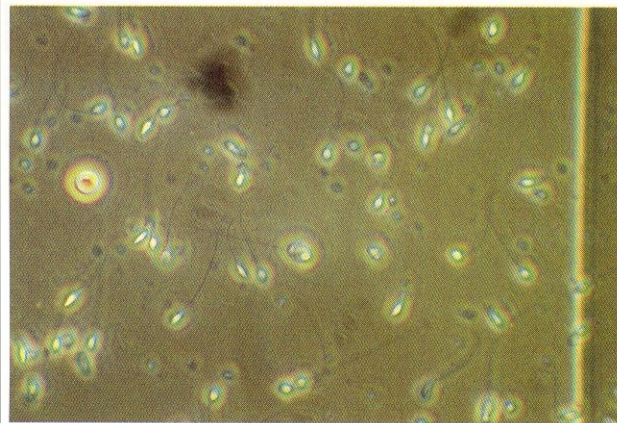
Renal epithelial cell (arrow). Sedi-Stain, $\times 400$.



Cuboidal or polyhedral renal tubular epithelial cells probably from the small collecting ducts; very difficult to differentiate from transitional epithelial cells. Sedi-Stain, $\times 400$.



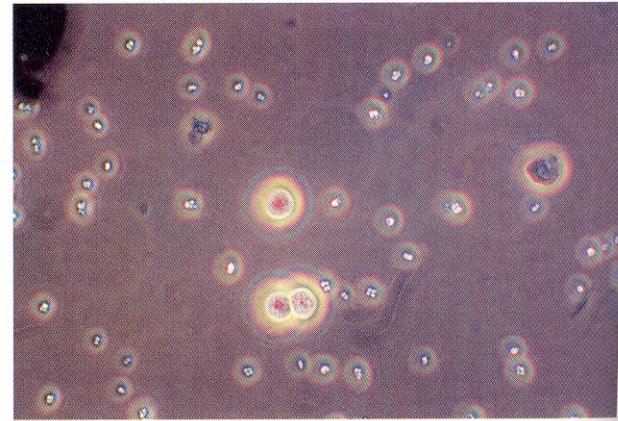
Free fat and oval fat bodies. Unstained, $\times 400$.



Sperm, many in counting chamber. Phase contrast, $\times 400$.



A

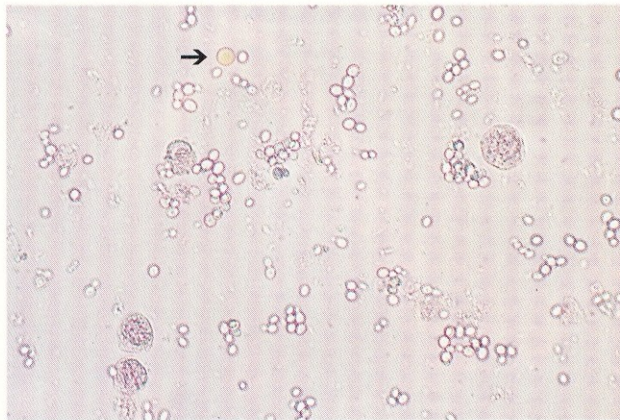


B

Bacteria (Staphylococci) seen as large cocci in clusters and tetrads appearing like small crystals with phase contrast. White cells also present. A, Brightfield, $\times 450$. B, Same field as A with phase contrast, showing how these cocci might be mistaken for small crystals, $\times 400$.



White cells and purple-staining gram-negative bacteria (rods) on cytocentrifuged preparation of urine sediment stained with Wright's stain, $\times 1000$.



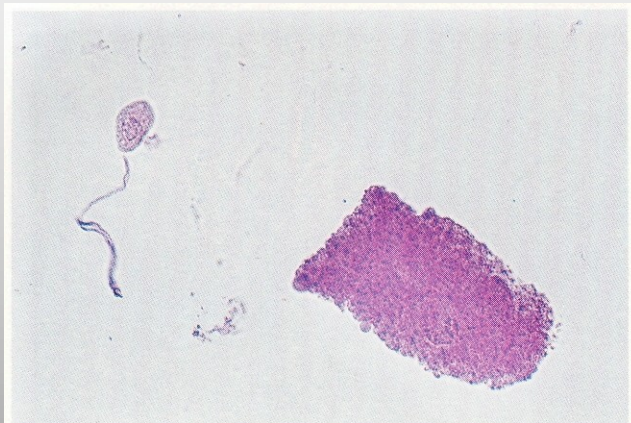
Many slightly stained yeast, white cells (4), and red cell (arrow). Sedi-Stain, $\times 400$.



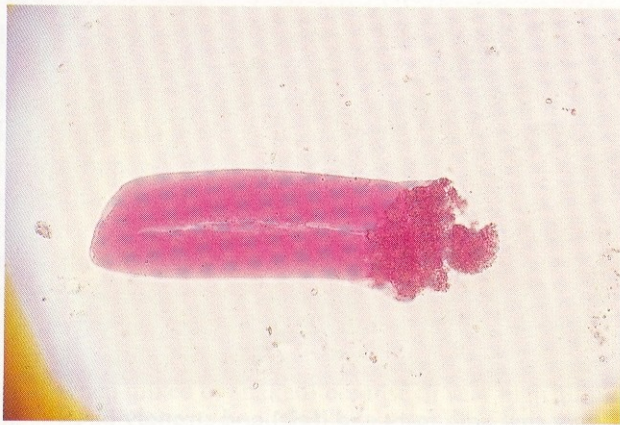
**Cellular cast (probably red cell origin). Sedi-Stain,
×400.**



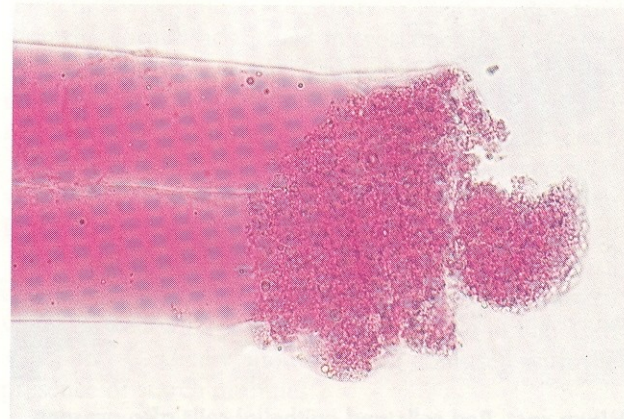
**White blood cell cast, basically hyaline. Sedi-Stain,
×450.**



Stained granular cast like the cast in Fig. 6-139. Also, mucus, and renal epithelial cell. Sedi-Stain, $\times 400$.



A

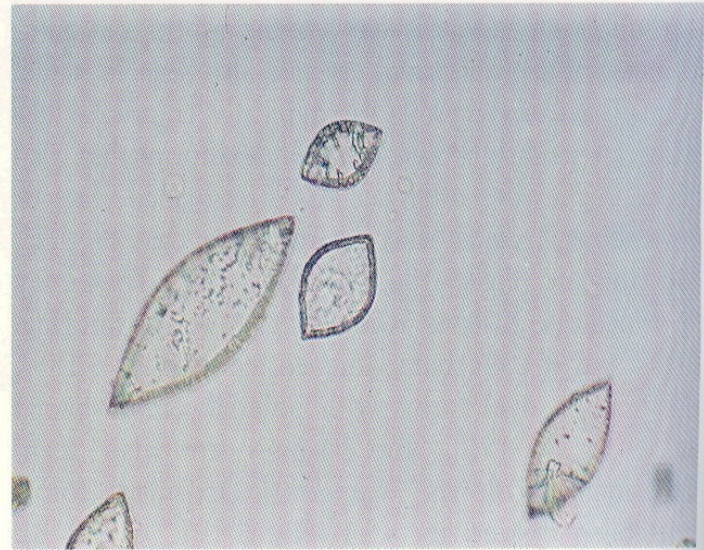


B

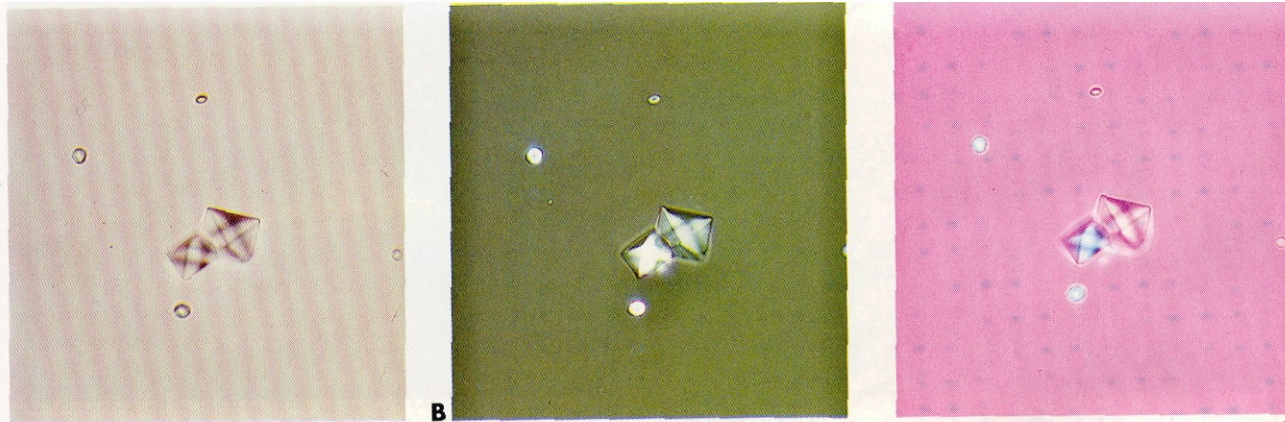
Broad waxy cast with central fissure and granular end. Sedi-Stain. A, Low-power, $\times 160$. B, Higher magnification of same cast as in A, showing granular end and fat inclusions, $\times 400$.



Uric acid, large, barrel-shaped, $\times 100$

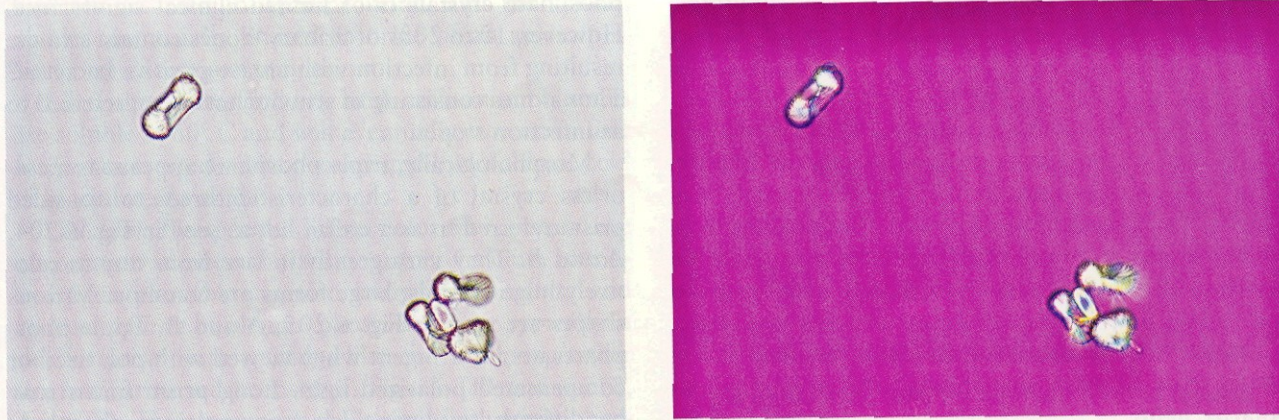


Uric acid, large, lemon-shaped, $\times 400$.

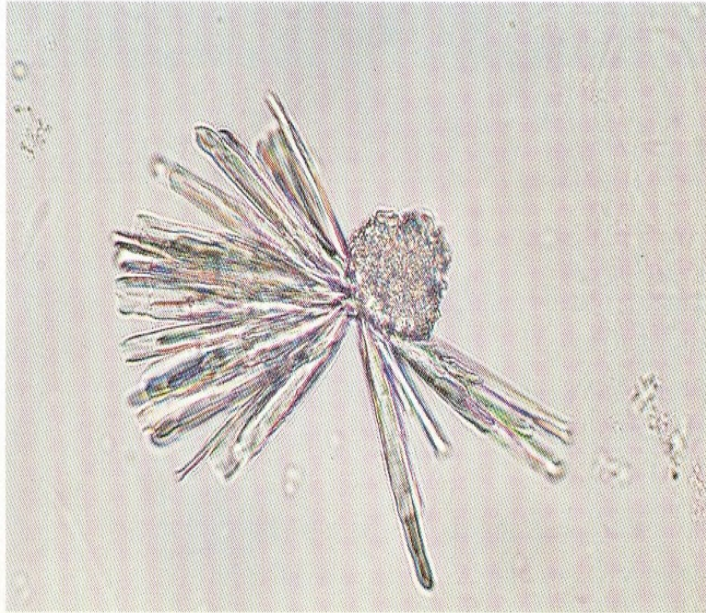


A Calcium oxalate, typical and oval forms appearing like red blood cells, exhibiting strong birefringence with polarized and compensated polarized light, $\times 400$. **A**, Brightfield. **B**, Polarized light. **C**, Compensated polarized light.

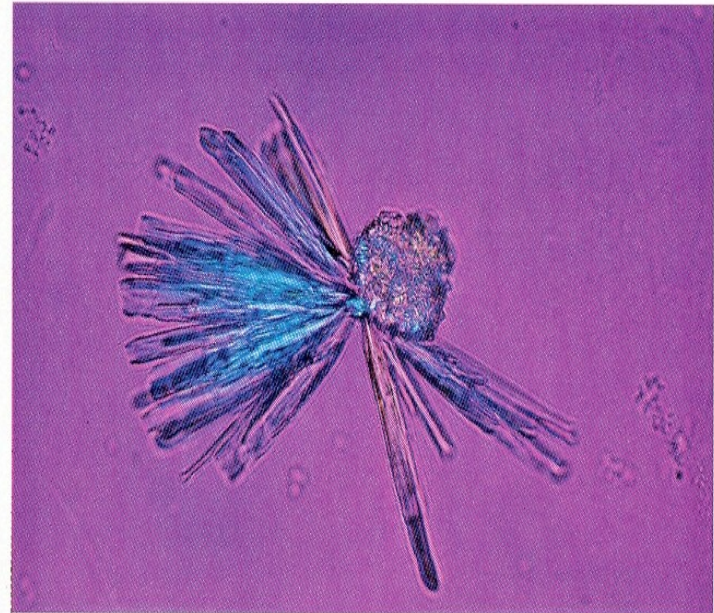
Figure 6-201



A Calcium oxalate, rare large ovoid form of a type associated with ethylene glycol poisoning, $\times 400$. **A**, Brightfield. **B**, Compensated polarized light.

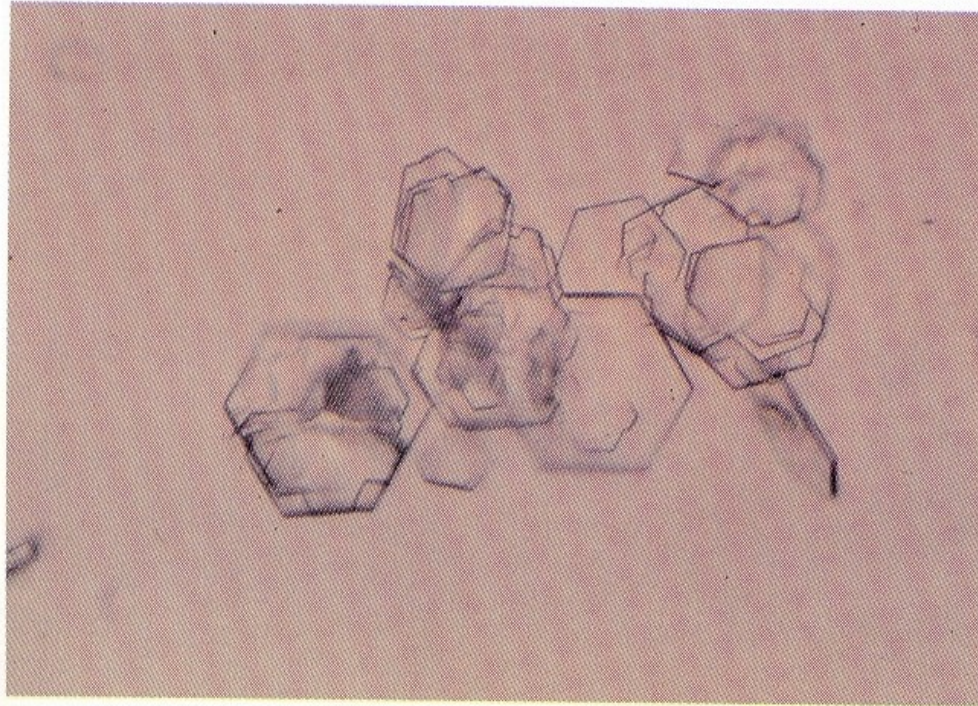


A

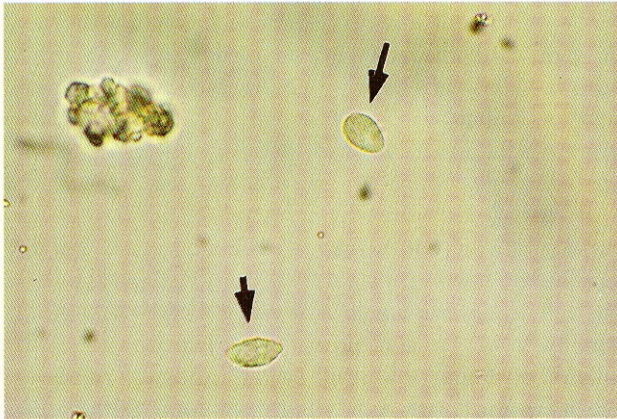


B

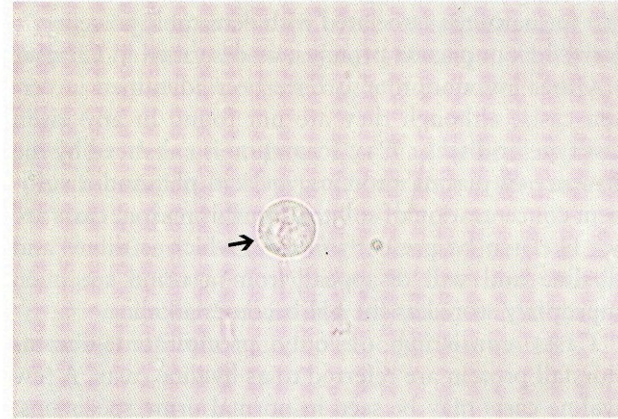
Calcium phosphate, slender prisms arranged in a rosette, $\times 400$. A, Brightfield. B, Compensated polarized light showing weak birefringence.



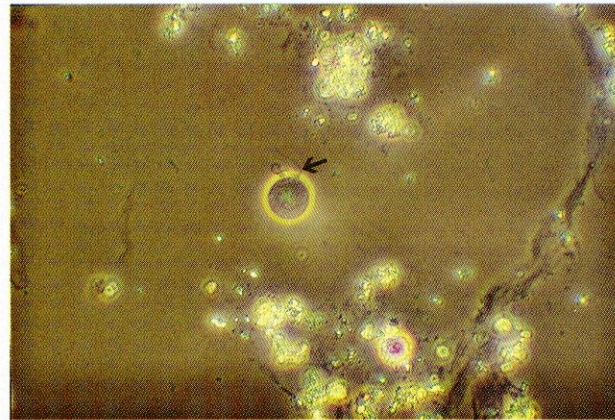
**Cystine, thin colorless hexagons with laminations,
×640.**



Trichomonas, pear shaped (arrows). Unstained, $\times 400$.



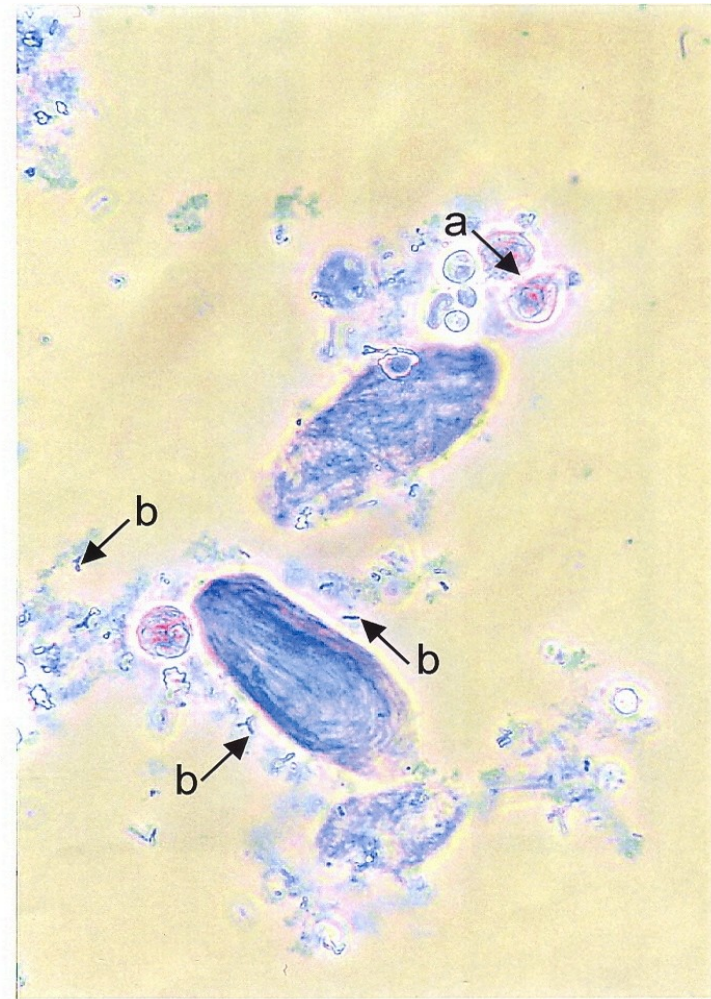
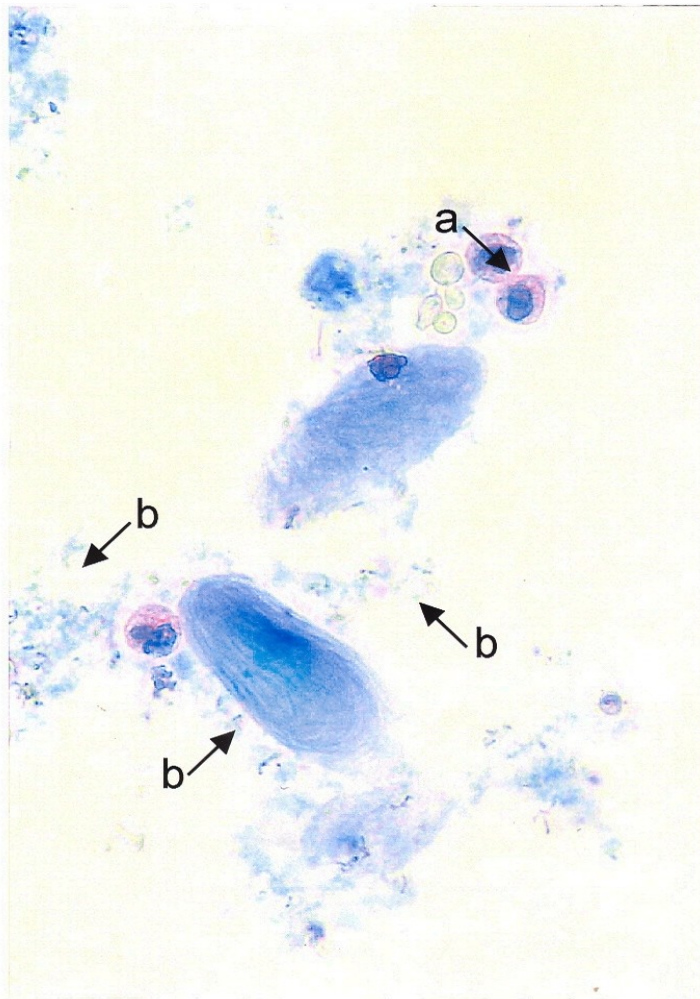
Trichomonas, rounded with very hard to see flagella (arrow). Unstained, $\times 640$.



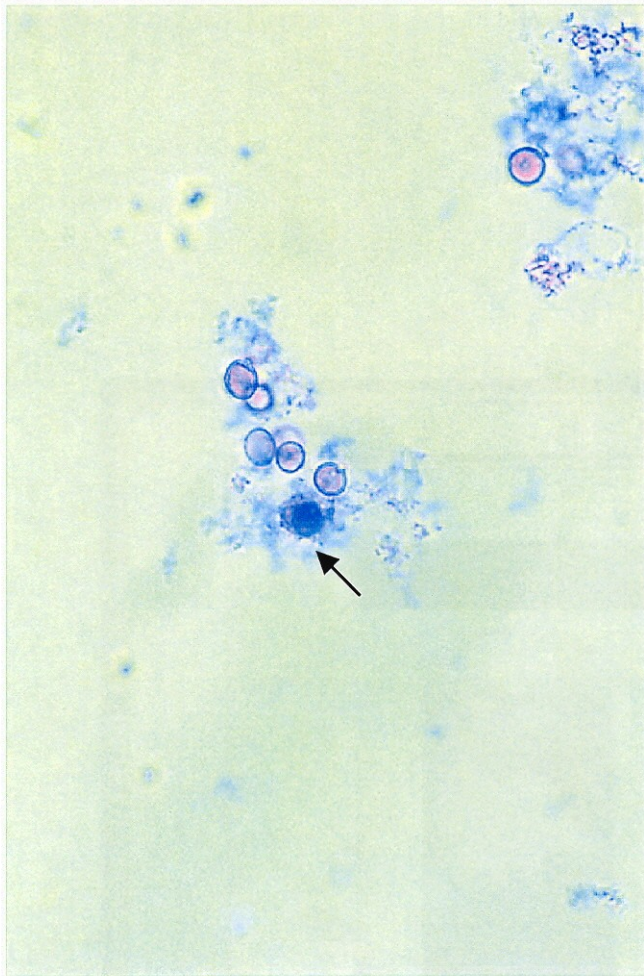
Trichomonas, rounded with flagella (arrow). Phase contrast, $\times 400$.

Ukázky z atlasu barvených preparátů dle Doc. Kouriho

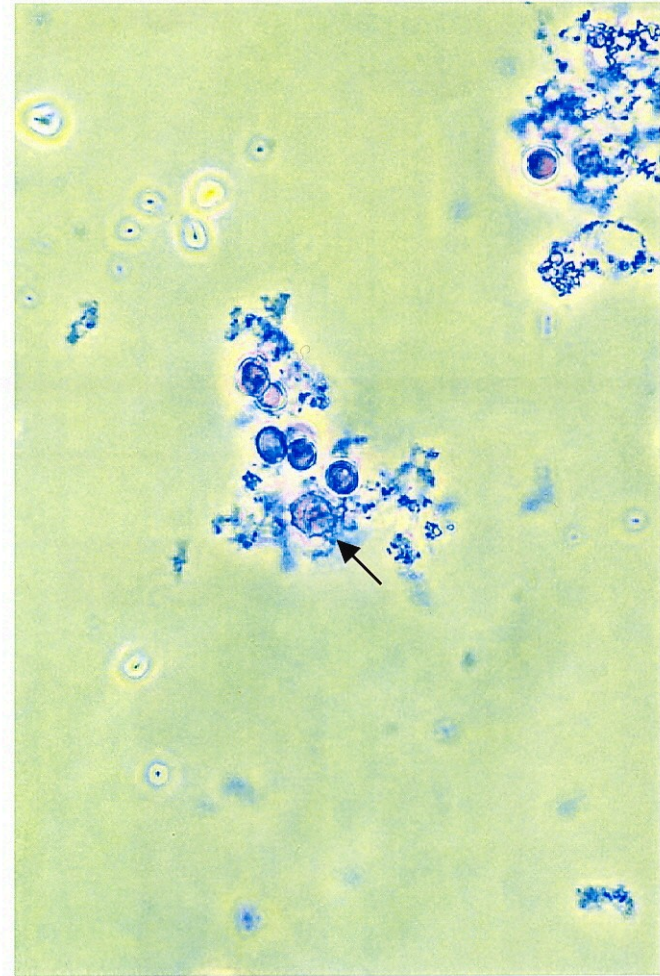
- Obrázek A – zorné pole v běžném mikroskopu
- Obrázek B – zorné pole s fázově kontrastní optikou



- Granulocytv (šipka a) s vícelaločnatými (segmentovanými) jádry
Hyalinní válce a bakterie (šipka b) Rozdíl ve viditelnosti bakterií

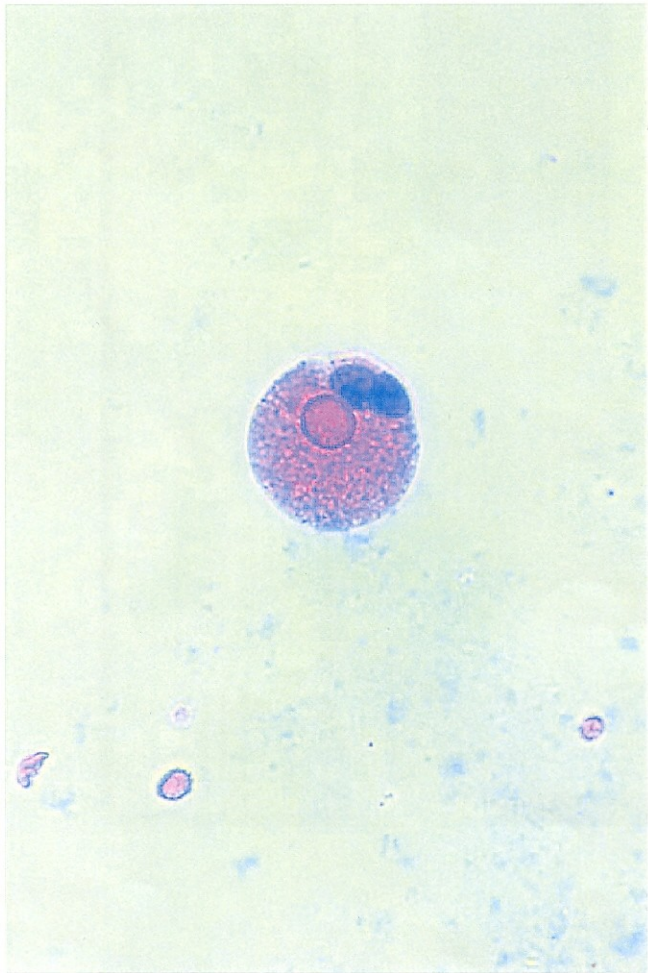


3a

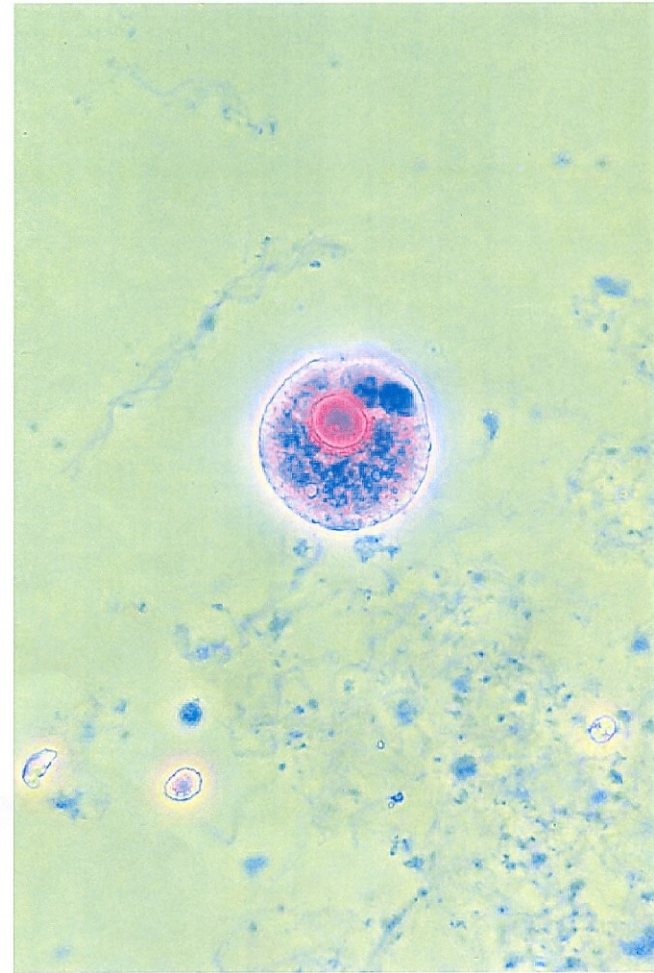


3b

Lymfocyt (šipka) - téměř celá buňka je vyplněna jádrem Erytrocyty



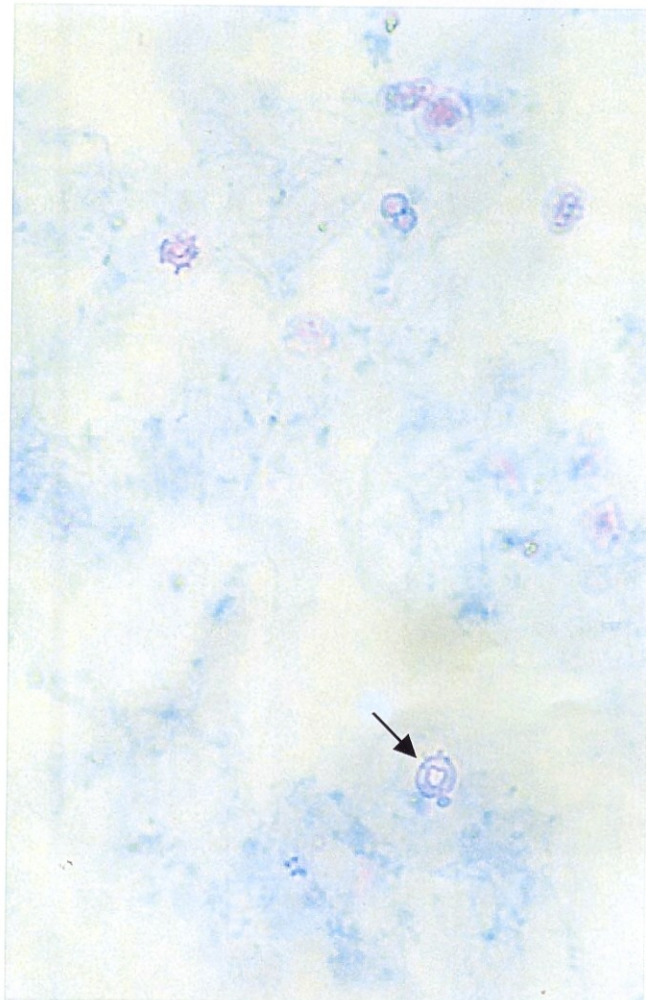
4a



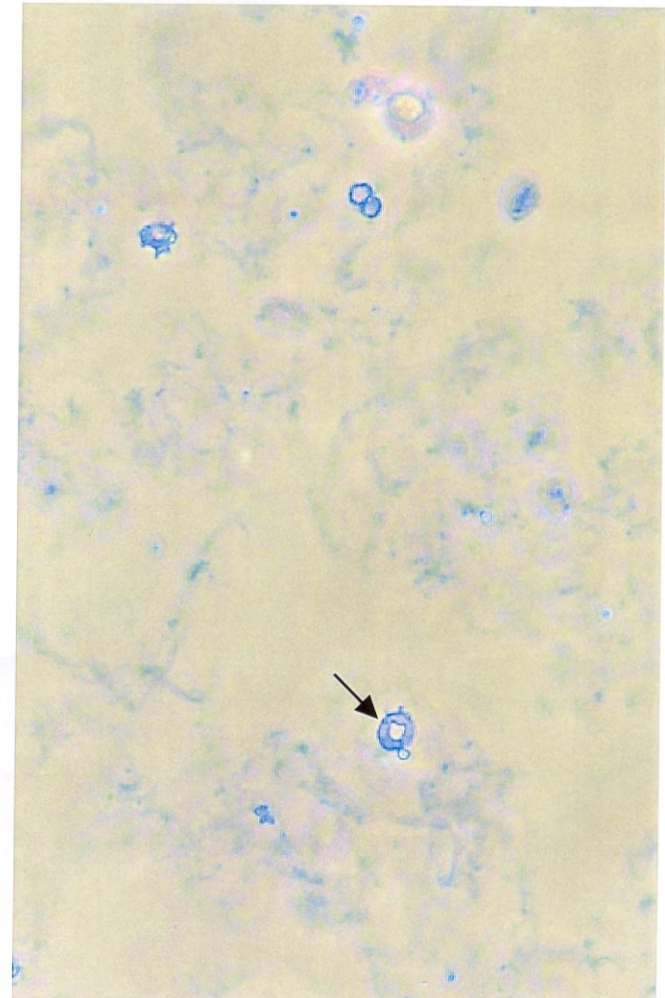
4b

Makrofág, Ery

V jádře je často vidět nepravidelný chromatin.

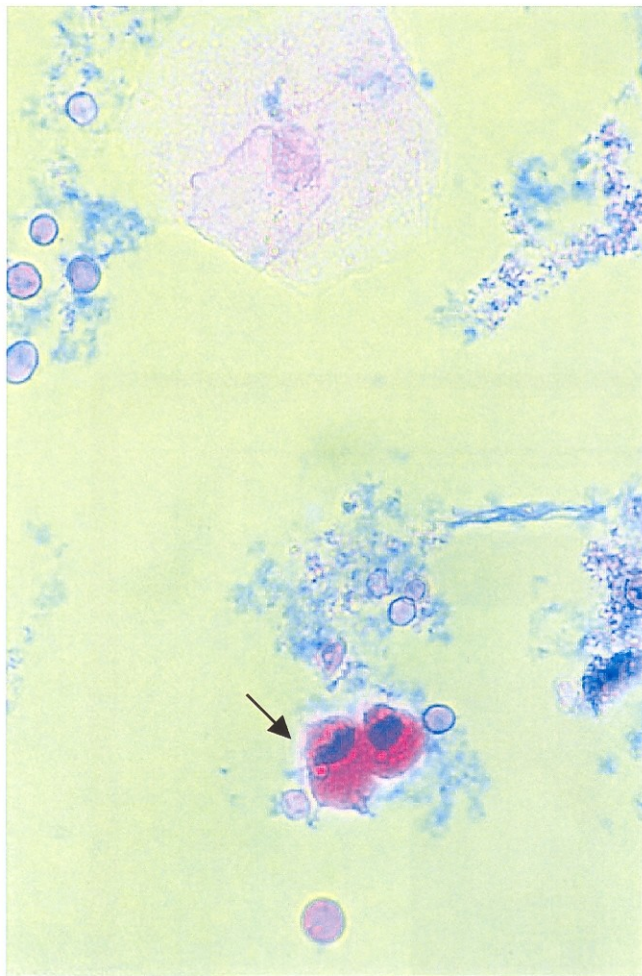


6a

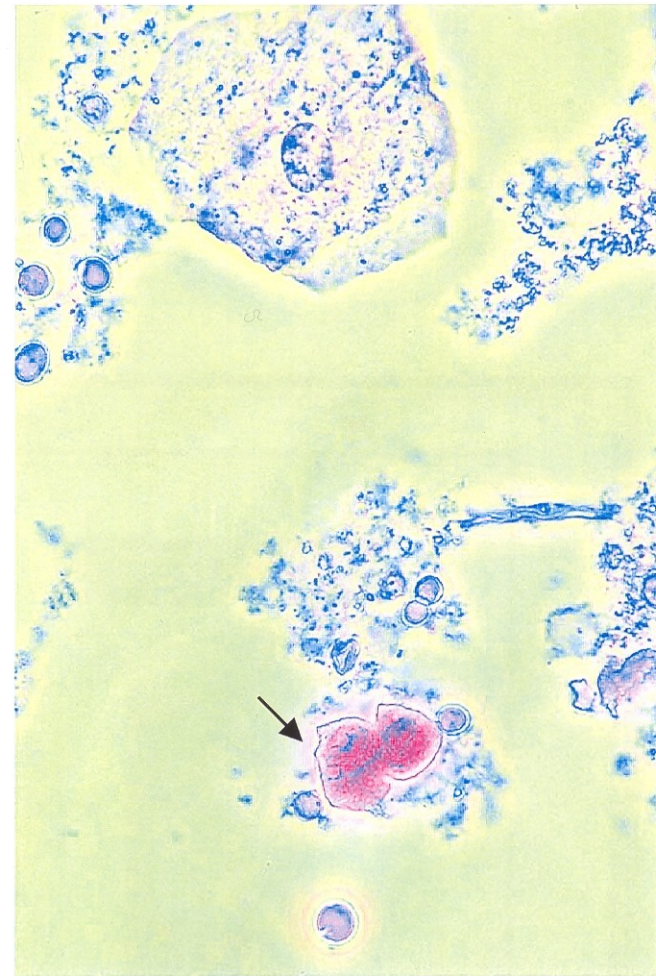


6b

Močové akantocyty (šipka) - dysmorfní erythrocyty - puchýřky pučící z buněčného povrchu. Podíl 5% akantocytů či větší - renální původ krvácení.



7a

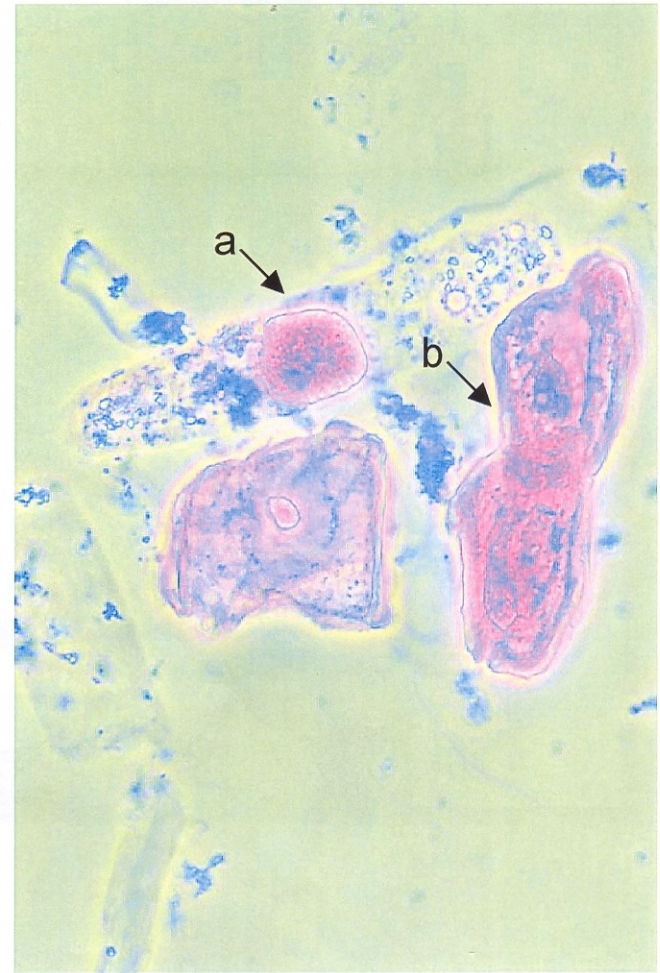


7b

Buňka dlaždicového epitelu a dvě tubulární buňky (šipka) ukazují rozdíl ve velikosti.

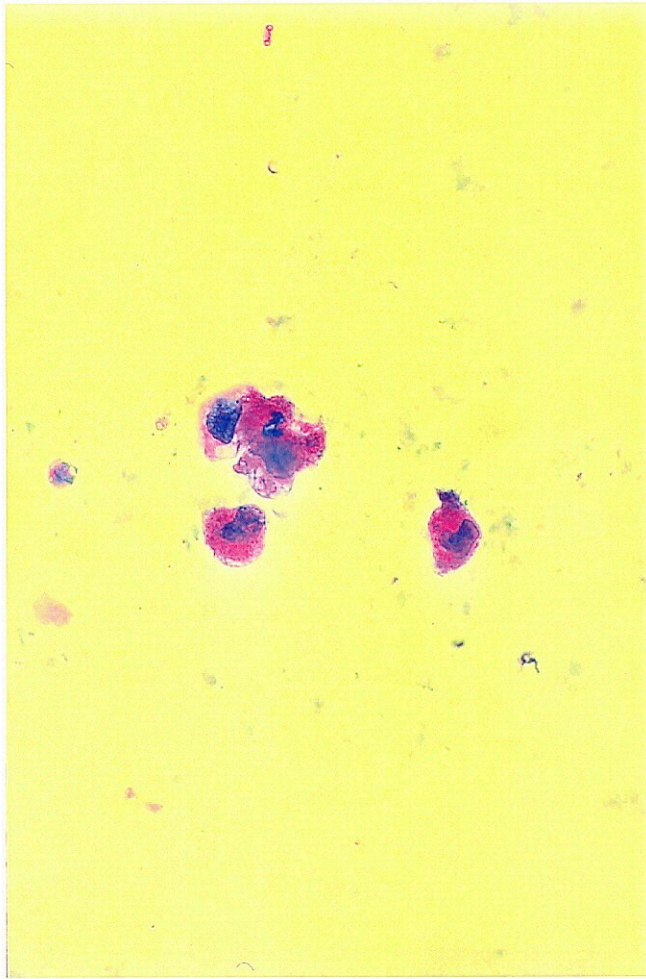


8a

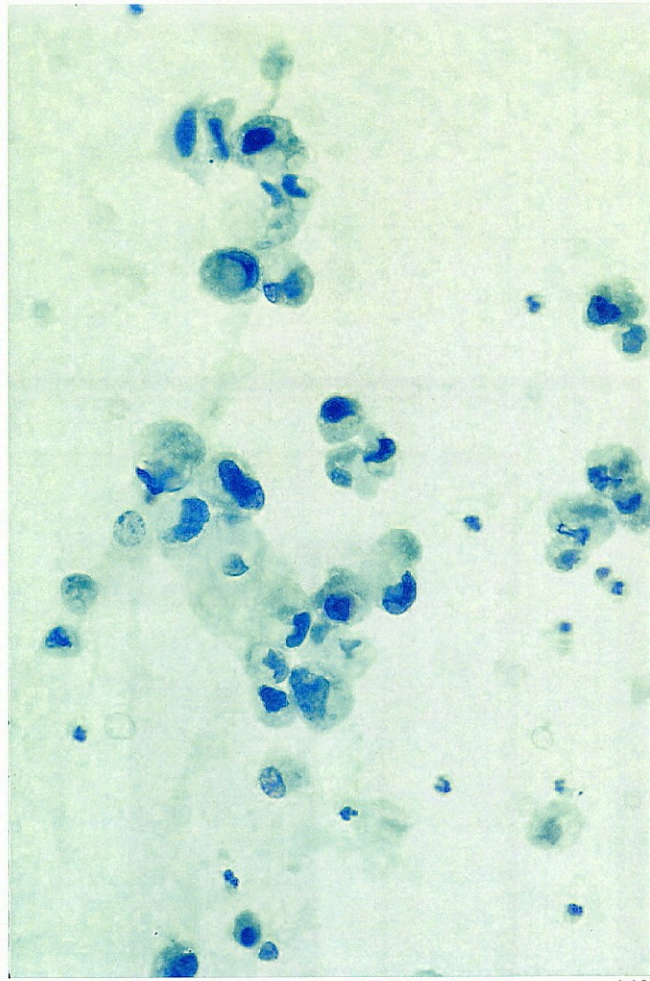


8b

Rozdíl mezi buňkou tubulárního epitelu (šipka a) (granul. cytoplazma uvnitř hyal. válce), buňkami přechodného epitelu (šipka b) (jemně granulované, jasné jádro) a velkou buňkou dlaždicového epitelu (světlá cytoplazma, degenerované jádro)

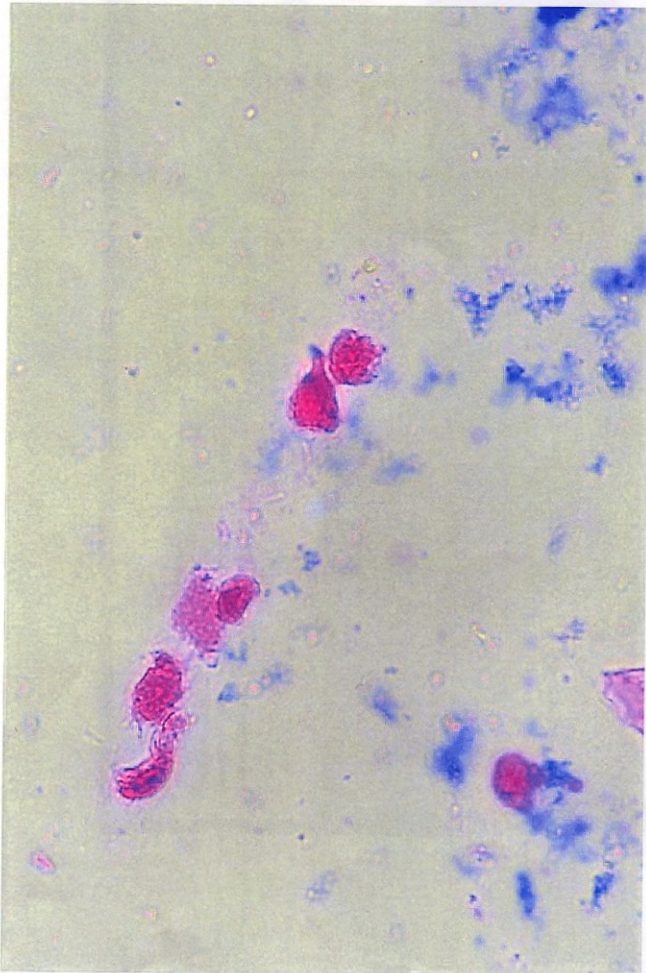


11a

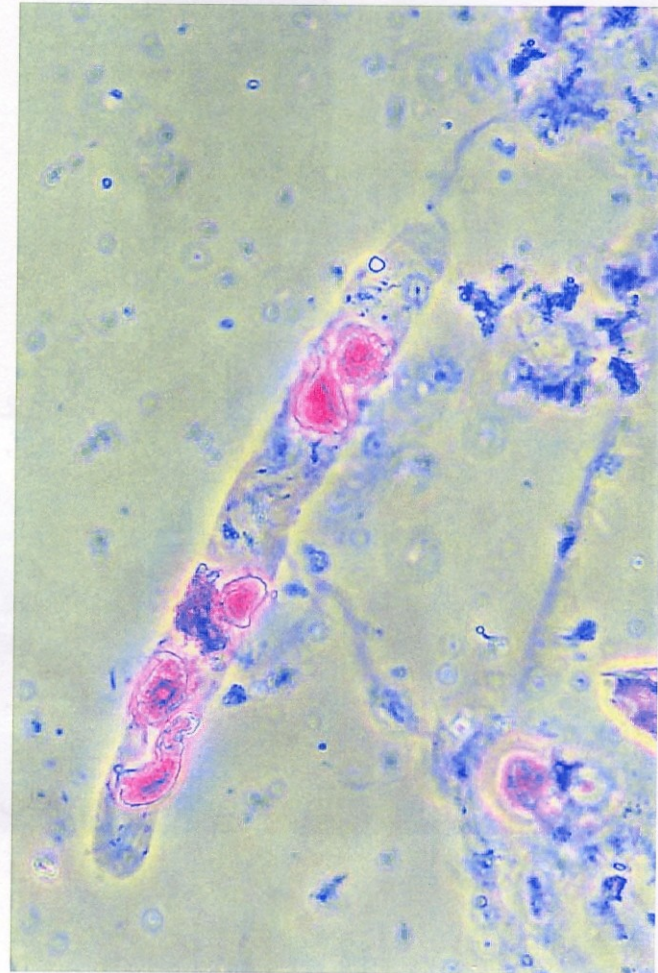


11b

Karcinom buněk přechodného epitelu s atypickými epitelovými buňkami

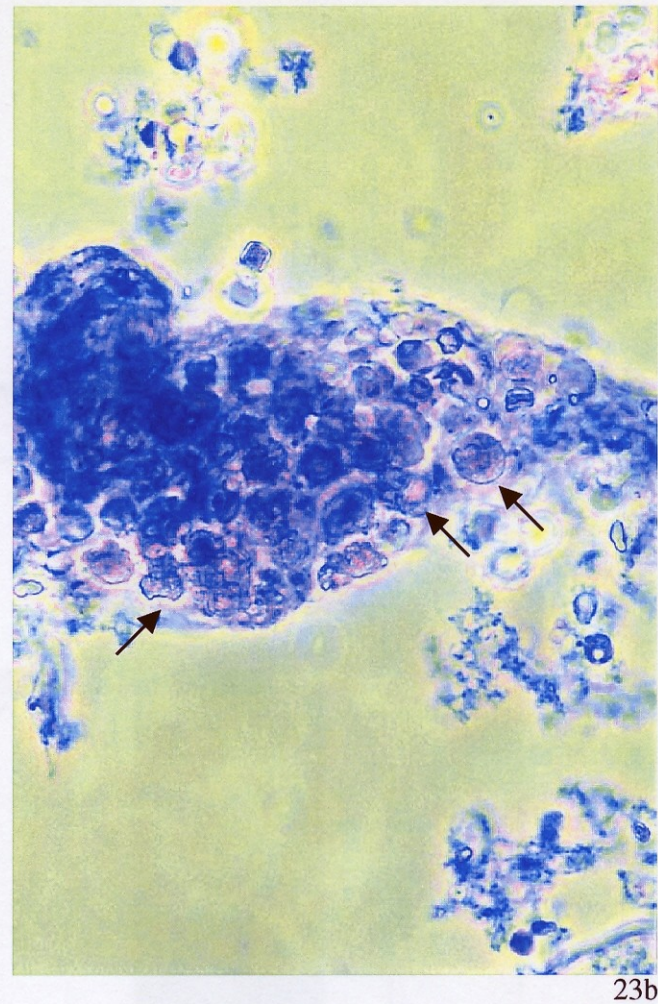
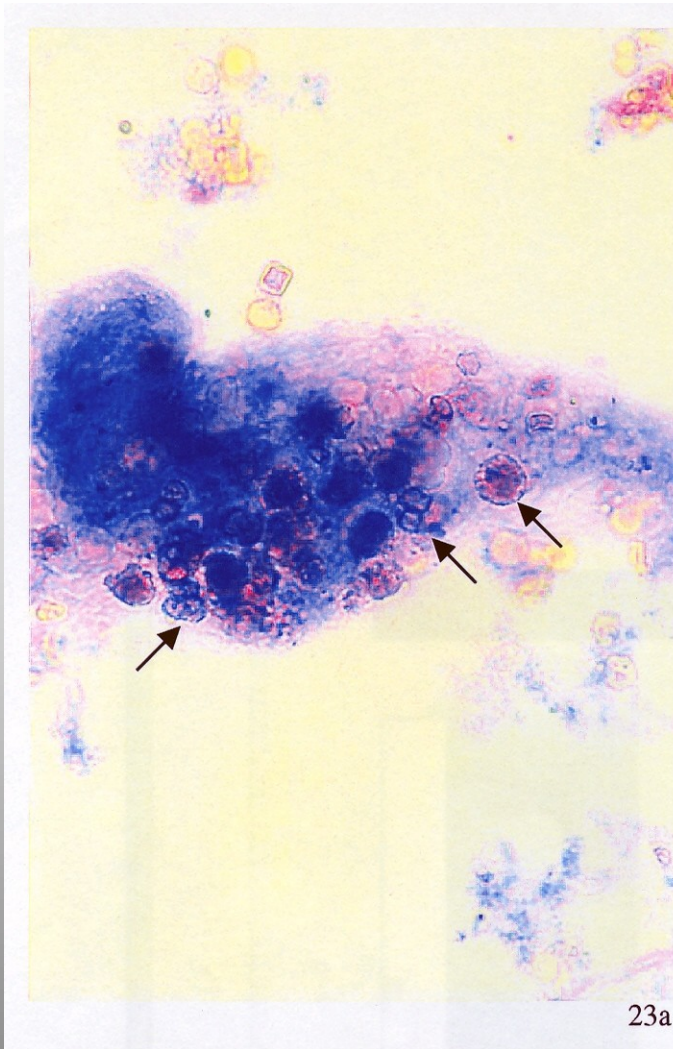


16a



16b

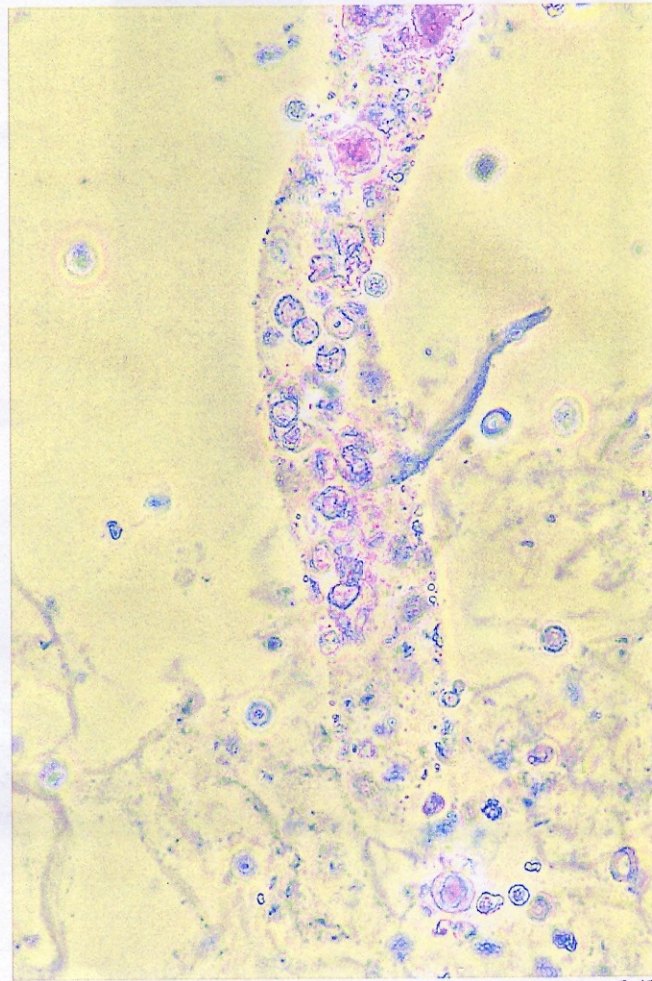
Buňky tubulárního epitelu uvnitř hyalinního válce



Válec Ery, granulocyty - erytrocyty, granulocyty (šipka)
(segmentovaná jádra)



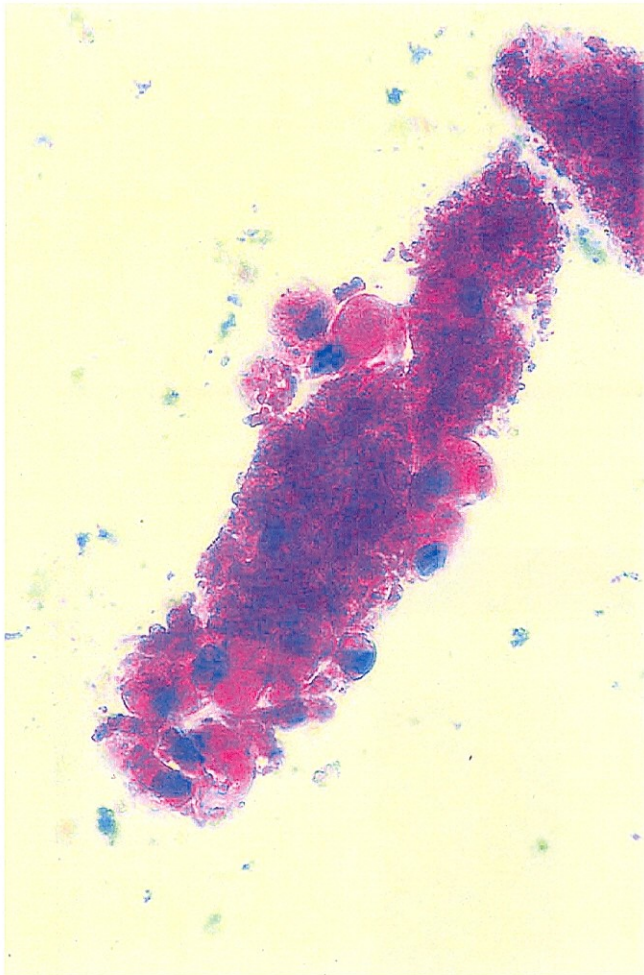
24a



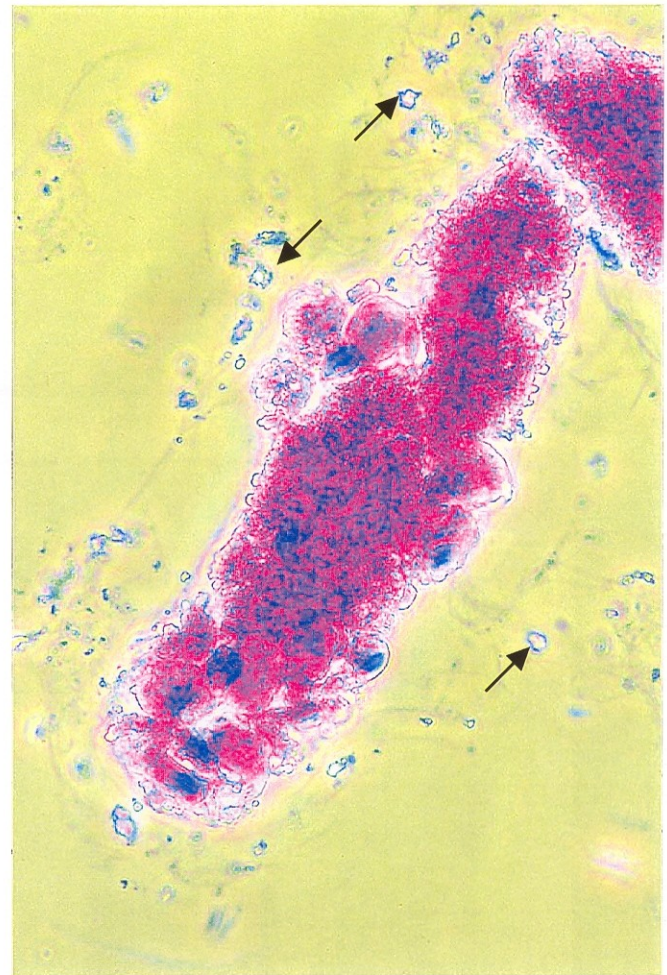
24b

Válec s erythrocyty - renální hematurie

Rozdílnosti ve velikosti a tvaru mezi erythrocyty, dysmorfie



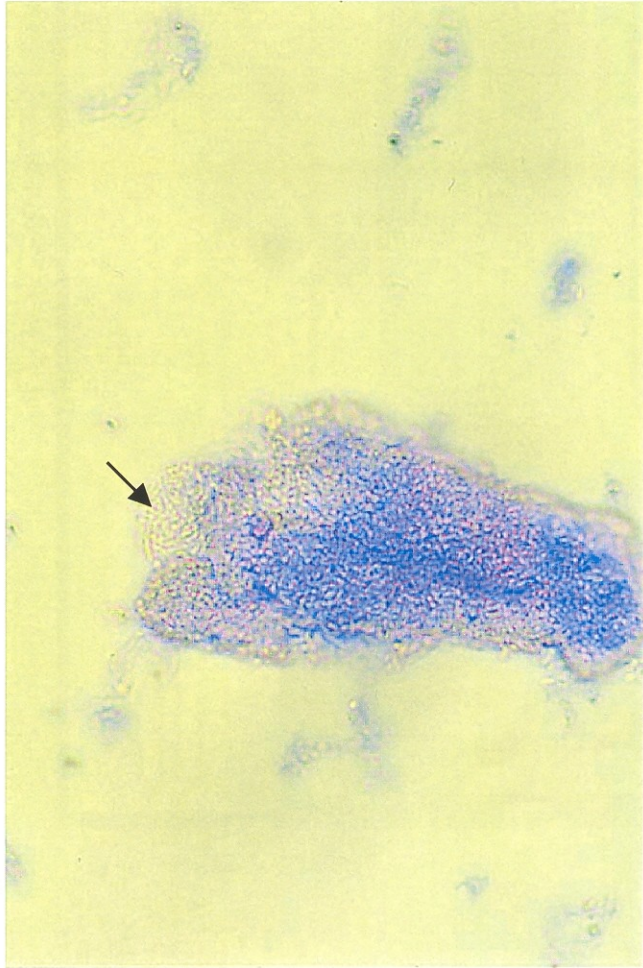
25a



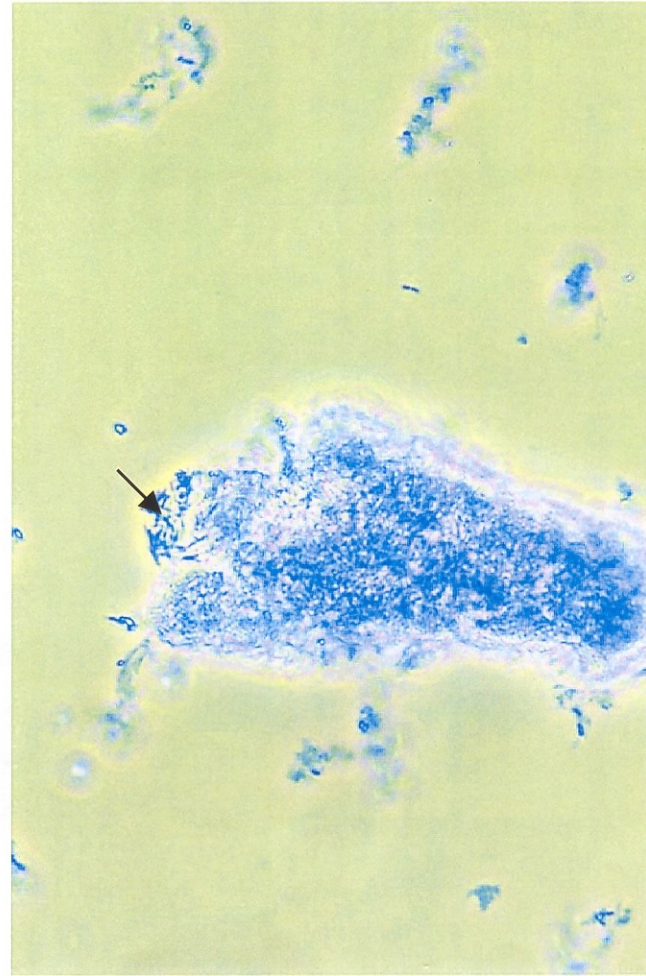
25b

Válec z renálních tubulárních buněk

Několik červených krvinek (šipka) vně válce

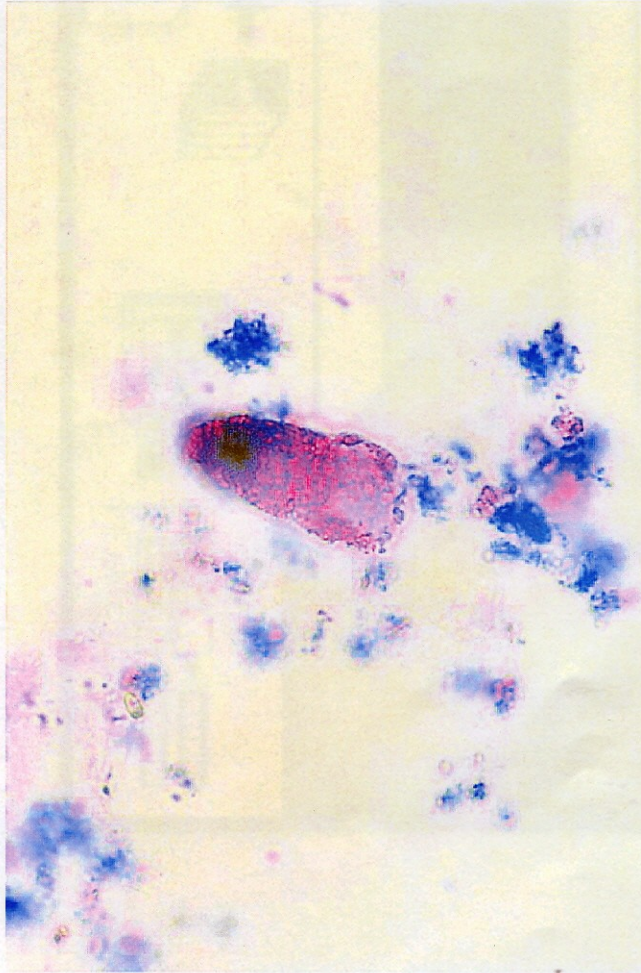


26a

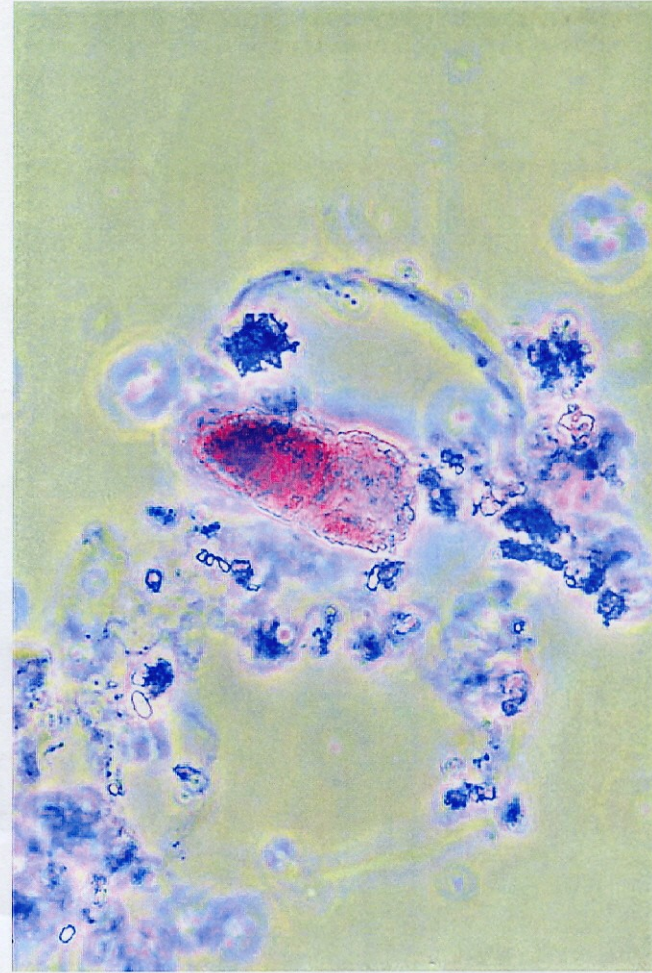


26b

Bakteriální válce - bakterie infikovaly ledviny. Pozor na záměnu s granulovaným válcem. Jasně tyčky (šipka) na jednom konci válce.

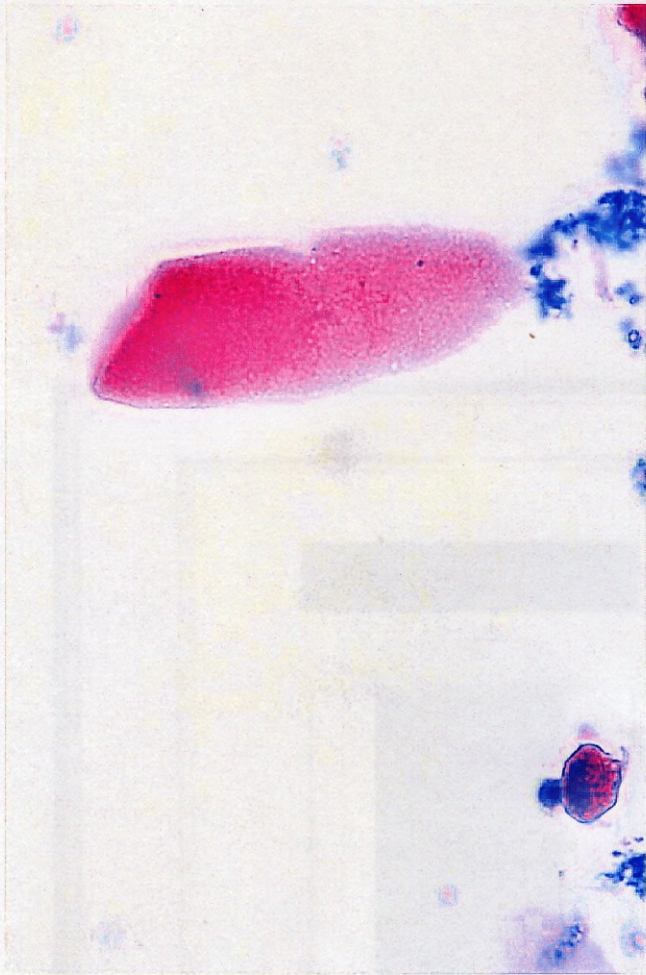


18a

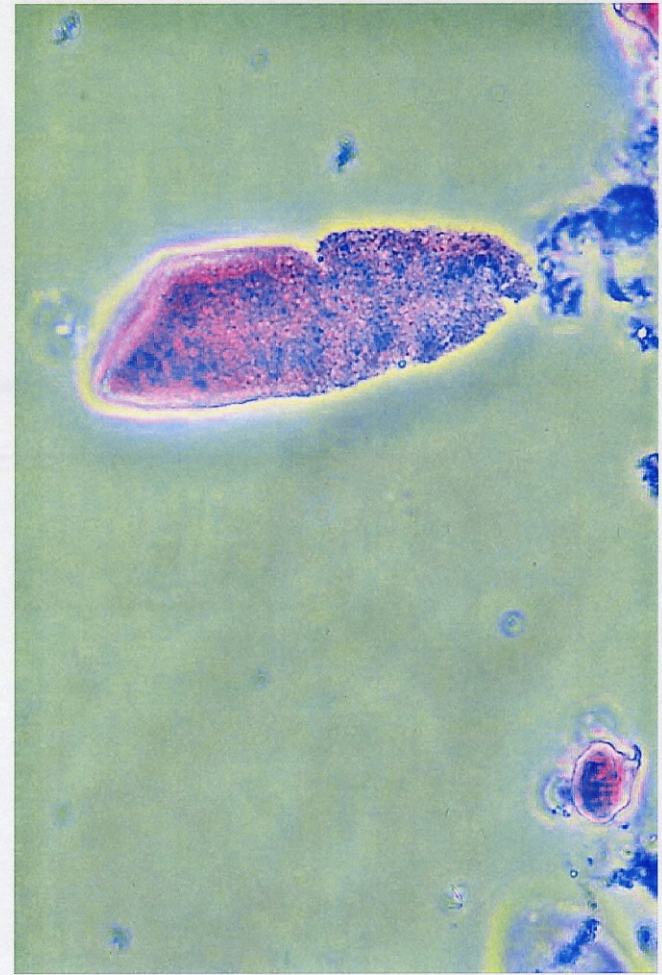


18b

Granulovaný válec - degenerace buněk— granulární srážení nebuněčného organického materiálu v renálním tubulu. Tubulární buňka již nemá plazmat. membránu.



21a



21b

Voskový válec s ulomeným koncem

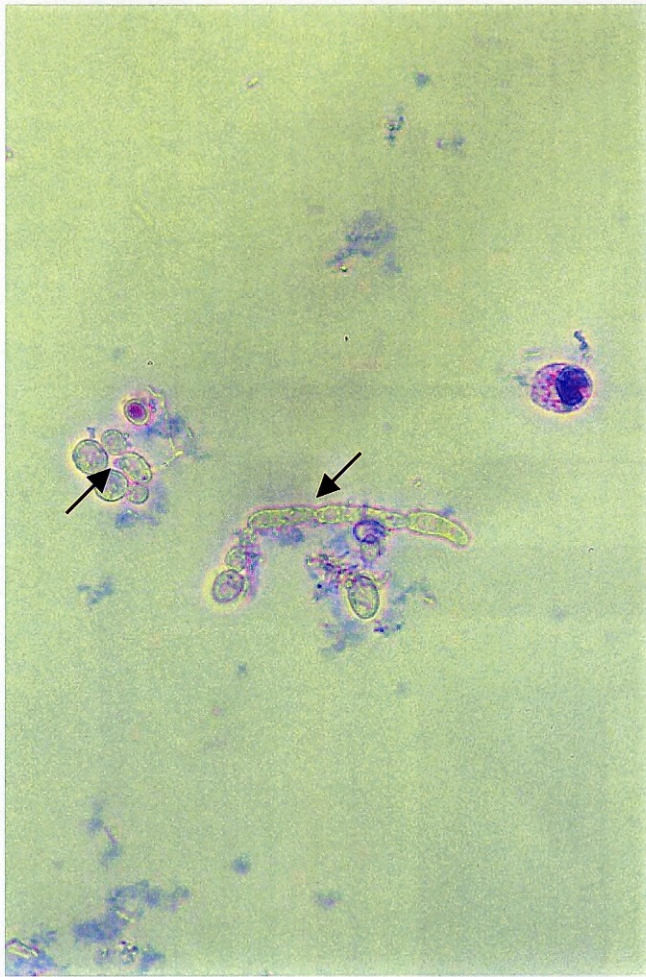


28a

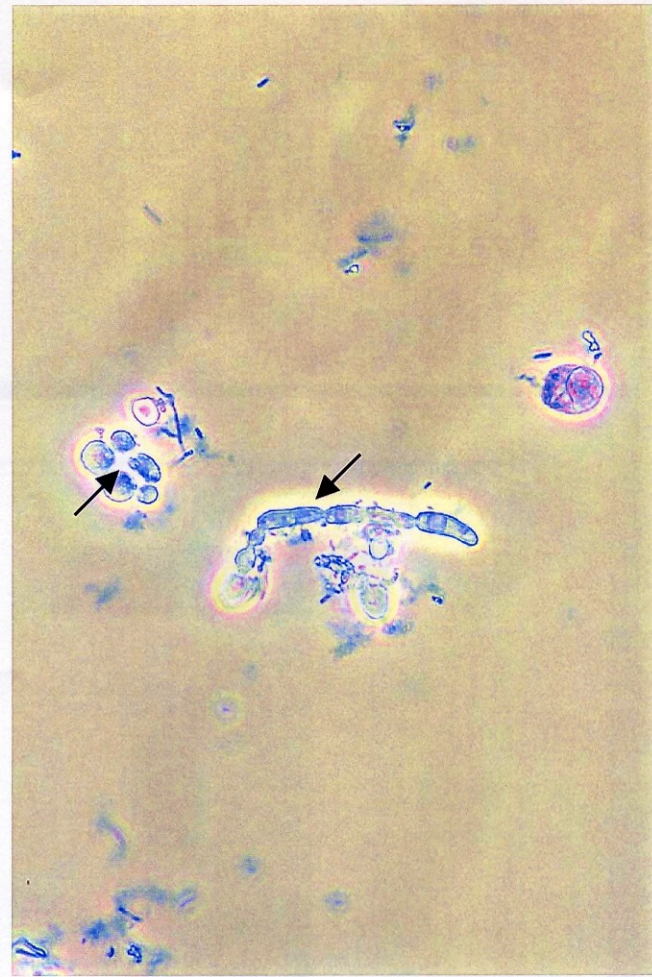


28b

Kousek toaletního papíru
Ostré hrany a zalomené konce

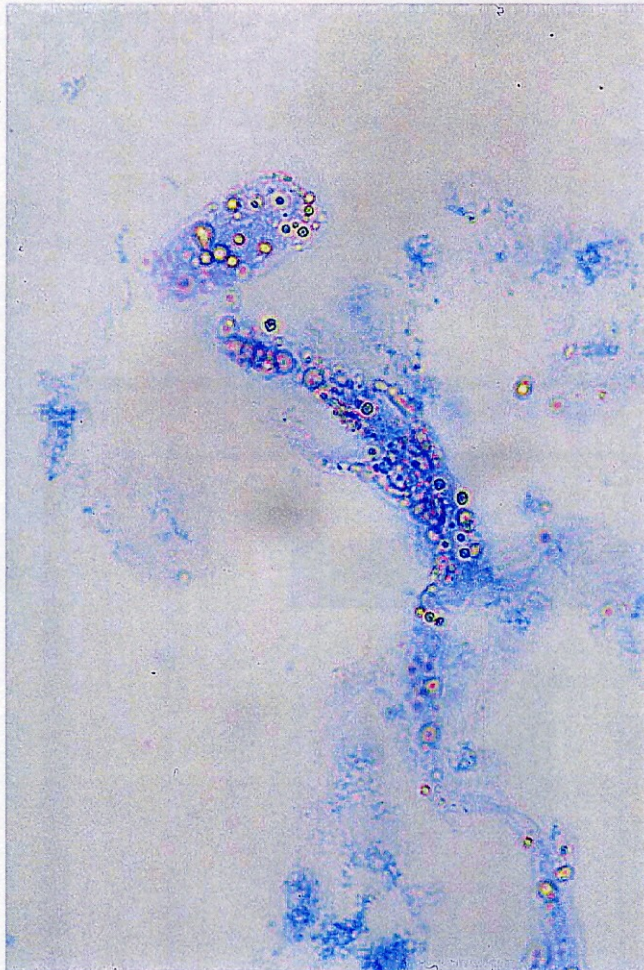


27a

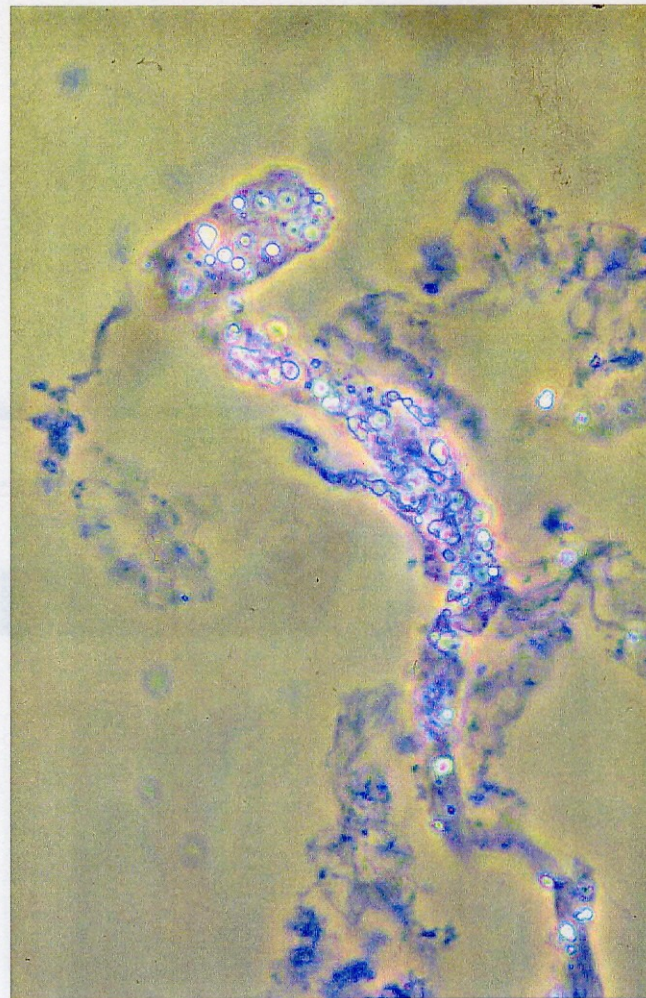


27b

Bakterie a buňky kvasinek (šipka)



29a



29b

Tukový válec - kapénky tuku - ve fázovém kontrastu jako světlé skvrny - lipidurie (obvykle naznačující glomerulární chorobu)

E-learning: Databáze Mikroskopické analýzy moče

- Mikroskopické nálezy barveného sedimentu
- Mikroskopické nálezy nativního sedimentu
- Nálezy z automatického analyzátoru iQ 200

<http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js15/mikroskop/web/index.html>