

Chemické vyšetření moče

Úvod

Ledviny se podílejí významným dílem na homeostáze organismu. Mají řadu funkcí: vylučují z těla škodlivé látky, dále vylučují látky pro tělo sice využitelné, avšak vyskytující se v nadbytku, udržují stálý objem a složení extracelulární tekutiny, regulují krevní tlak a acidobazickou rovnováhu, produkují hormony renin a erythropoetin a aktivují vitamin D. Kromě toho je třeba zmínit vlastní metabolickou aktivitu ledvin, která je velmi intenzivní.

Exkretční funkce ledvin je zajištěna tvorbou moči, jejíž složení se mění podle potřeby organismu. Nízkomolekulární látky se dostávají do moči glomerulární filtrací, větší molekuly jsou zadrženy a v moči je nacházíme jen při poruchách glomerulu.

Glomerulární filtrát přechází do proximálního tubulu, kde dochází k 75–80% resorpci. Resorbována je především voda, dále glukosa a aminokyseliny. Kotransportem s Na^+ ionty se resorbují také fosfáty. Dochází k resorpci Ca^{2+} a Na^+ iontů výměnou za H^+ . Část Na^+ a také Cl^- je resorbována i pasivně, po koncentračním spádu. Resorbováno je rovněž 80 % hydrogenuhličitanů ve formě CO_2 . V proximálním tubulu dochází také k sekreci NH_3 , který vzniká v buňkách tubulů účinkem glutaminázy na glutamin. Jak resorpce CO_2 , tak sekrece amoniaku a H^+ hrají významnou roli při udržování acidobazické rovnováhy.

Dalším významným pochodem je resorpce proteinů s nižší molekulovou hmotností, které při ultrafiltraci v glomerulech nebyly zachyceny. Moč odcházející z tubulů neobsahuje prakticky žádné bílkoviny.

Resorpce solutů z proximálního tubulu je sledována pasivní resorpcí vody. Resorbovaná i odtékající tekutina je izotonická s krevní plazmou. Osmotická „úprava“ tubulární tekutiny (z izoosmotické na hypoosmotickou) probíhá v Henleově kličce, která je uložena mezi proximálním a distálním tubulem ve dřeni ledvin. Děje se to činností protiproudového multiplikačního systému. Hypotonická tekutina (ve srovnání s extracelulární tekutinou nebo plazmou) vstupuje ze vzestupného raménka Henleovy kličky do distálního tubulu. Pod vlivem aldosteronu zde dochází k další resorpci Na^+ , která pokračuje i ve sběrných kanálcích. Iontový deficit vyvolaný resorpcí sodíku je částečně vyrovnáván exkrecí K^+ a H^+ . Dochází rovněž k další resorpci HCO_3^- a Cl^- . Vazopresin zvyšuje propustnost buněčné membrány buněk distálního tubulu a sběrných kanálků pro vodu a dochází k postupné resorpci vody na 1 % původního objemu. K tomu přispívá i zanoření sběrných kanálků do dřene, v níž je vysoká osmolarita intersticiální tekutiny. Resorpce sodíku a vody je závislá na hydrataci organismu.

1.1 Objektivní a fyzikální vyšetření moči

Odběr moči

Pro základní chemické vyšetření moči se používá zpravidla *první ranní moč*, která je poměrně koncentrovaná. Pro kvantitativní stanovení se vyšetřuje vzorek moči *sbírané určitý časový interval* (obvykle 3, 6, 12 nebo 24 h).

Pacienta je třeba poučit o podmínkách odběru a transportu. Pro většinu vyšetření se používá *střední proud moči*. Moč se zachytí do dobře vymyté nádoby. U žen je nutné zjistit poslední menses, upozornit na nutnost omytí genitálií vodou (ne dezinfekčním prostředkem).

Pokyny pro správný sběr moči v delším časovém intervalu (je vhodné dát pacientovi písemně): vyšetřovaný se vymočí např. v 7:00 h ráno a tato moč se vylije do odpadu. Od tohoto okamžiku začíná sběrné období a shromažďuje se veškerá moč (v zakryté nádobě v temnu a chladu, příp. s přidavkem konzervačního činidla). Poslední odběr je v okamžiku, kdy končí sběrné období. Celý sběr moči se dobře promíchá, v odměrném válci změří objem a poznamená do průvodky. Pak zpravidla postačí k vyšetření vzorek 10–20 ml. Nedodržení správného postupu může vést k hrubým chybám, které zcela znehodnotí analýzu.

Pokud je to možné, je doporučeno pro kvantitativní stanovení využít kratší sběrný interval nebo korigovat množství stanoveného analytu v první ranní moči na exkreci kreatininu (množství analytu/mol kreatininu).

Objem moči

Objem moči vyloučený za 24 h (diuréza) je závislý hlavně na objemu přijatých tekutin a na objemu vody vyloučené potem (fyzická námaha) a stolicí (průjmy). U dospělých je to nejčastěji 1000 až 2000 ml/den. Snížená diuréza (oligurie) pod 500 ml/den je u dospělých závažnou známkou funkční nedostatečnosti u ledvinových poruch, někdy vzniká u horečnatých onemocnění, nadměrného pocení, těžkých průjmů; závažná je anurie, diuréza pod 100 ml/den. Zvýšená diuréza nad 2500 ml/den (polyurie) je běžná při nadměrném příjmu tekutin, po podání diuretik, někdy z psychických vlivů, jako je rozčilení, nebo tréma; neléčená porucha regulace vazopresinem (diabetes insipidus) se projevuje diurézou až 10–20 litrů denně.

Barva

Normální barva moči je podle její koncentrace světle až zlatě žlutá, velmi bledá moč je typická pro polyurii. Stáním moč tmavne, některé chromogeny se oxidují kyslíkem na barviva. Zbarvení působí buď přirozená močová barviva (urochrom, uroerythrin, stopy biopterinu a koproporfyriu), exogenní složky (léčiva) nebo patologické součásti.

Některá typická zbarvení jsou uvedena v tabulce:

Barva moči	Možná příčina
------------	---------------

Jasně žlutá	riboflavin, vitaminové směsi
Růžová až červená	hemoglobin, myoglobin, porfyriny, rostlinná barviva (červená řepa, borůvky, rebarbora)
Hnědá až tmavohnědá	bilirubin, methemoglobin, melanin
Zelená	biliverdin

Zápach

Pach normální moči je svérázný, připomíná pach hovězí polévky nebo bujónových kostek. Mění se použitím některých druhů potravin (např. chřest, česnek, káva), léků nebo vdechovaných těkavých látek (chloroform, terpentýn, toluen); výrazný pach acetonu bývá při ketonurii, čpavkový při infekcích močových cest (bakterie obsahující ureázu) nebo hnilobný (sulfan, methanthiol, bakteriální rozklad při proteinurii, jaterní kóma). Zápach koňské stáje je při fenylketonurii (fenyloctová kyselina).

Zákal

Moč ihned po vymočení má být čirá. Zákal v teplé, čerstvě vymočené moči je patologickým nálezem. Zákal nebo větší sedlina však může vznikat při odstavení a chladnutí i v normální moči. Nejběžnější je jemný obláčkový zákal (nubecula) tvořený glykoproteiny a větší sedlina vyloučených solí (fosfáty v alkalických močích, močová kyselina nebo uráty v kyselých).

1.1.1 Stanovení pH moči

Ledviny se podílejí na udržování acidobazické rovnováhy v organismu tím, že do moči vylučují většinu H^+ iontů pocházejících z některých kyselin vzniklých v metabolismu živin nebo přímo přijatých potravou. Jen zanedbatelná část z nich jsou volné H^+ ionty, projevující se aktuální kyselostí (hodnotou pH moči nižší než pH krevní plazmy). Fyziologická exkrece volných H^+ iontů je méně než 0,1 mmol H^+ /den. Asi 2/3 H^+ iontů vyloučených do moči je vázáno v NH_4^+ iontech (30–50 mmol/den), zbytek na různé báze, zvláště na hydrogenfosfát (10–30 mmol/den, tzv. titrační acidita moči). Ve vztahu k acidobazické rovnováze je ještě důležitá exkrece HCO_3^- , zanedbatelná v kyselých močích (nejvýše 1–2 mmol/den), výrazně se však zvyšující v močích s $pH > 6,5$.

Princip: Hodnota pH moči se určuje acidobazickými indikátory. Nelze použít ty, které vykazují proteinovou chybu v přítomnosti proteinů. V praxi se ke stanovení pH moči užívá indikační zóny na diagnostických prouzcích albuPHAN, heptaPHAN, aj. Reakci moči určíme co nejdříve po vymočení. Není-li moč konzervována, dochází k rozmnožení mikroorganismů spojené s hydrolýzou močoviny na NH_3 a posunu pH k vyšším hodnotám.

Materiál: Vzorek moči, univerzální papírky pH 0–12, papírky PHAN.

Provedení

☞ Ve vzorcích moči určete pH pomocí indikátorových papírků.

Hodnocení

Hodnota pH moči se pohybuje obvykle v rozmezí 5,5–6,5; s krajními mezemi 4,5–8,0. Snížené pH moči (*acidurie*, pH < 5,5) způsobuje např. masitá strava (vyšší produkce fosfátů a sulfátů, stoupá vylučování močové kyseliny), metabolická nebo respirační acidóza, hladovění (současně ketonurie), dekompenzovaný diabetes (současně glukosurie a ketonurie).

Zvýšené pH moči (*alkalurie*, pH > 6,5) bývá zapříčiněno např. vegetariánskou stravou, infekcí močových cest, metabolickou nebo respirační alkalózou.

Základní chemická kvalitativní analýza moči.

Orientační analýzy moči pomocí diagnostických proužků

Úvod

K základnímu chemickému vyšetření moči náleží zjištění pH, osmolality a analýza přítomnosti proteinů, krve resp. hemoglobinu, glukosy, ketolátek, žlučového barviva a jeho derivátů urobilinoidů. Vyjmenované součásti se označují též jako "patologické". Při analýze zvláště citlivými metodami je nalezneme v nepatrných koncentracích i v moči zdravého člověka. *Chemické vyšetření moči* proto používá takové kvalitativní zkoušky, jejichž výsledek je *pozitivní teprve tehdy, přestoupí-li koncentrace hledané látky jisté fyziologické rozmezí*. Vyšetření se obvykle provádí pomocí diagnostických proužků. Výhodné pro tento účel jsou kombinované diagnostické proužky, které umožňují současnou detekci několika látek. Při pozitivitě těchto zkoušek teprve mluvíme o proteinurii, hematurii, atd., a je nutné nález korelovat s jinými faktory a případně žádat další vyšetření na potvrzení výsledku.

Kromě diagnostických proužků na zjištění „patologických“ součástí v moči jsou vyráběny různé další screeningové testy založené většinou na imunochromatografických metodách, např. pro průkaz *drog* nebo *hormonů* v moči.

Důkaz proteinurie

Za fyziologických okolností proniká bazální membránou glomerulů do filtrátu jen malá část plazmatických proteinů, z nichž je většina resorbována v tubulech. V moči se pak za den fyziologicky vyloučí nejvýše několik miligramů málo rozměrných globulinů krevní plazmy s $M_r < 60\,000$ a glykoproteinů z epitelu dutého systému ledvin a vývodných cest. Běžné zkoušky na proteinurii toto množství neprokáží.

Jako *proteinurie* se označuje vylučování více než 150 mg proteinů za den.

V průběhu dne je vylučování proteinů močí u zdravého člověka asi dvakrát větší než v noci (závislost na poloze těla, na námaze). Proto je nutné vyšetřovat první ranní moč (zachycení noční klidové proteinurie). Při pozitivním výsledku opakujeme vyšetření několik dní po sobě, abychom odlišili fyziologickou přechodnou proteinurii od patologické (z příčin prerenálních, renálních nebo postrenálních). "Neškodné" fyziologické proteinurie se vyskytují zvláště u mladých osob při zhoršeném prokrvení ledvin, např. po tělesné námaze, silných emocích, dlouhém stání.

Po zjištění proteinurie musí nezbytně následovat vyšetření hematurie, morfologické vyšetření močového sedimentu, mikrobiologické vyšetření moči, podle potřeby funkční zkoušky ledvin, kvantitativní stanovení proteinurie (např. biuretovou reakcí) a určení jejího typu (např. SDS-elektroforézou v polyakrylovém gelu, viz Biochemie I – Semináře, kap. 1).

Jen podle koncentrace proteinů nelze usuzovat na závažnost příčiny, někdy i nepatrná proteinurie může být příznakem velmi závažného stavu.

Průkaz proteinurie sulfosalicylovou kyselinou

Působením sulfosalicylové kyseliny bílkovina denaturuje, což se projeví tvorbou zákalu až sraženiny v závislosti na množství přítomné bílkoviny.

Materiál: 5-Sulfosalicylová kyselina (1 mol/l), vzorky moči.

Provedení

- ☞ Asi k 2 ml čirého vzorku moči přidejte 5–10 kapek roztoku sulfosalicylové kyseliny a promíchejte. V přítomnosti zvýšeného množství bílkovin vznikne podle jejich koncentrace opaleskující zákal (nejpozději do 10 minut) až sraženina (ihned), které nemizí po zahřátí. Pozorujte proti černému pozadí.

Hodnocení

Zkouška je velmi citlivá (lze prokázat bílkoviny v koncentraci asi od 100 mg/l), je proto vhodná pro screeningová vyšetření. Pokud je negativní, je zbytečné provádět další zkoušky. Slabě pozitivní výsledek ještě proteinurii nemusí prokazovat, musí být potvrzen některou další zkouškou.

Průkaz proteinurie diagnostickými proužky albuPHAN

K důkazu se využívá tzv. *proteinové chyby* některých acidobazických indikátorů. Tyto indikátory mění své zbarvení v přítomnosti proteinů a vykazují zdánlivě jinou hodnotu pH, než odpovídá skutečnosti. Příkladem jsou indikátory sulfoftaleinového typu. Indikační zóna na konci proužku je nasycena uvedeným indikátorem a kyselým pufrům o hodnotě pH 3. Po smočení v roztoku obsahujícím proteiny indikátor nabude zbarvení odpovídající podstatně vyšší hodnotě pH, než které v indikační zóně zajišťuje pufr (indikátor vykazuje proteinovou chybu).

Materiál: Proužky albuPHAN (Pliva-Lachema), vzorky moči.

Provedení

- ☞ Proužek krátce ponořte do vyšetřované čerstvé, nijak neupravované moči tak, aby indikační zóna byla stejnoměrně smočena. Ihned vyjmete, přebytečnou kapku otřete o okraj nádobky. Po 1 minutě srovnajte zbarvení zóny s předtištěnou barevnou stupnicí pro semikvantitativní vyhodnocení koncentrace proteinů, nalepenou na pouzdrě pro proužky.

Hodnocení

Exkrece proteinů moči u zdravých dospělých do 150 mg/den, z toho množství albuminu není větší než 20 mg/l. Proužky albuPHAN indikují albumin již od koncentrace 100 mg/l, na globuliny a glykoproteiny jsou méně citlivé. Žlutě zelený odstín, slabší než odpovídá barevnému poli stupnice 1 (300 mg/l), se hodnotí jako "stopy". Při proteinurii vzniká zbarvení žlutě zelené až modré.

Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat u pacientů, kterým byly podávány chininové preparáty nebo léčiva na bázi chinolinu, nebo v neobvykle alkalických močích ($\text{pH} \approx 8$), případně v neutrálních koncentrovaných močích s vysokou pufrací kapacitou. V těchto případech stačí okyselit vzorek několika kapkami zředěné kyseliny na $\text{pH} 5\text{--}6$ a provést zkoušku s novým papírkem.

Důkaz a stanovení glukosy v moči

Za normálních okolností se v moči vyskytuje v závislosti na složení a příjmu potravy jen nepatrné množství glukosy (případně jiných cukrů: galaktosa, fruktosa, laktosa, maltosa a některé pentosy), které nejsme schopni běžně používanými zkouškami prokázat. O *glukosurii* hovoříme při hodnotách glukosy v moči $> 0,8$ mmol/l. Glukosurie vzniká při hyperglykemii takového stupně, kdy je překročena maximální schopnost buněk proximálního tubulu resorbovat glukosu z glomerulárního filtrátu. Tato hodnota se obvykle udává kolem 10 mmol/l (tzv. *renální glukosový práh*), může však kolísat v poměrně značném rozmezí (2,8–18 mmol/l). Vzácněji se objevuje *renální glukosurie*, vznikající při nezvýšené glukosemii důsledkem porušené zpětné tubulární resorpce.

Zjištění glukosurie často vede k odhalení diabetu, avšak negativní nález glukosy v moči toto onemocnění nevylučuje. Kvantitativnímu stanovení glukosurie se v poslední době přikládá menší význam, používá se jako doplňkové vyšetření. Má význam pro určení denních ztrát glukosy močí.

Ke zjištění glukosurie lze využít *nespecifickou* zkoušku s Benedictovým činidlem (viz cvičení Sacharidy v 1. semestru). Tyto zkoušky se však používají již jen výjimečně. *Specifický* důkaz glukosy v moči lze provést diagnostickými proužky, např. glukoPHAN.

Ke kvantitativnímu stanovení glukosy v moči se používají stejné metody jako pro stanovení glukosy v séru.

Specifický důkaz glukosy diagnostickými proužky glukoPHAN

Princip důkazu je stejný jako u kvantitativního enzymového stanovení glukosy (viz úloha **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Indikační zóna diagnostického proužku obsahuje enzymy (glukosaoxidázu a peroxidázu) a vhodný substrát, který se v přítomnosti vzniklého peroxidu oxiduje na barevný produkt.

Provedení

- ☞ Proužek ponořte asi na 1 s do moči, potom položte na nádobu s močí a po 3 min srovnejte zbarvení indikační zóny se stupnicí na pouzdře s proužky.
- ☞ Ověřte si možnost falešně pozitivního výsledku tak, že zopakujete zkoušku diagnostickým proužkem s močí (ve které jste neprokázali glukosu), kterou odpipetujete do zkumavky, kterou jste předtím vypláchli malým množstvím 3% peroxidu vodíku nebo 0,5% Persterilu.

Hodnocení

Zkouška je dosti citlivá, výsledek je zřetelně pozitivní přibližně od koncentrace 2 mmol/l. Zároveň je velmi specifická, jiné cukry než D-glukosa nereagují.

Falešně negativní výsledky vznikají při vysokých koncentracích redukujících látek (askorbová kyselina nebo některá spazmolytika zpomalují vývin zbarvení).

Falešně pozitivní výsledky může způsobit přítomnost substrátů peroxidázy v nádobách na moč (běžný dezinfekční prostředek Persteril /peroxooctová kyselina/ nebo peroxid vodíku). Nádoby se proto po dezinfekci musí důkladně vypláchnout čistou vodou.

Využití redukční zkoušky s Benedictovým činidlem: Při podezření na některou z dědičných metabolických poruch sacharidů (např. galaktosemii) požadují novorozenecká oddělení orientační zjištění přítomnosti jiného cukru v moči než glukosy. V laboratoři se provede porovnání glykosurie vyšetřené enzymovou a redukční zkouškou. Při zjištěném rozdílu je třeba provést specifické stanovení na přítomnost jiných monosacharidů.

Důkaz ketolátek v moči

Průkaz ketolátek v moči má význam především u diabetiků 1. typu. U správně léčeného diabetika ketolátky v moči nenacházíme. Jejich přítomnost společně s nálezem výrazné hyperglykemie a glukosurie svědčí pro diabetickou ketoacidózu.

Ketolátky reagují s nitroprusidem sodným v alkalickém prostředí za vzniku fialového zbarvení. Tentýž princip je využit u diagnostických proužků. Používáme některý z proužků se zónou na důkaz ketolátek např. diaPHAN. Zkouška dokazuje v čerstvé moči zvláště acetoacetát, který při delším stání spontánně dekarboxyluje na aceton (na něj je zkouška méně citlivá).

Provedení

☞ Proužek se krátce namočí do analyzované moči, přebytek moči se otře o okraj nádoby a po 1 minutě se zbarvení indikační zóny porovná s barevnou stupnicí na pouzdru, která umožní semikvantitativní stanovení.

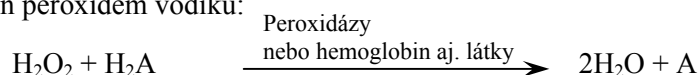
Hodnocení

Za normálních okolností je vylučování ketolátek nepatrné, nedosahuje hodnoty 0,5 mmol/den. Ke zvýšené produkci ketolátek dochází v důsledku zvýšené utilizace tuků a při současné poruše nedostatečnosti utilizace glukosy (např. při vyčerpávající fyzické námaze bez dodávky glycidů, několikadenním hladovění, redukční dietě s převahou proteinů, u diabetes mellitus). V těchto případech se zvyšuje koncentrace ketolátek v krvi nad 200 $\mu\text{mol/l}$ a moči se jich vylučuje i více než 100 mmol/den. Aceton je poměrně těkavý a je poměrně rychle vylučován expirací. Ketonurie se současnou glukosurií je odrazem metabolické dekompenzace diabetiků. Proto je nezbytné provádět zkoušky na ketonurii zvláště při každém zjištění glukosurie.

Zjištění krevního barviva v moči

Močí zcela zdravých lidí se vyloučí až milión erytrocytů za den (viz Biochemie II – Semináře, kap. 11). Toto velmi malé množství nelze prokázat běžnými chemickými zkouškami. Výskyt většího množství erytrocytů (*hematurie*) nebo průnik volného hemoglobinu, příp. svalového myoglobinu, do definitivní moči (*hemoglobinurie*, resp. *myoglobinurie*) je téměř vždy patologickým nálezem. Moč s nadměrnou příměsí hemoglobinu má narůžovělé až masové zbarvení a spektroskopicky v ní lze prokázat hemoglobin; u masivní hemoglobinurie může nabýt až zbarvení černého piva (degradace hemoglobinu na hematin).

Princip: Principem chemického zjištění hemoglobinu nebo erytrocytů v moči je tzv. *pseudoperoxidázový účinek* hemoglobinu. Některé látky, jako např. hemoglobin, hem a jeho deriváty (i chlorofyl), méně těž ionty Fe^{3+} , katalyzují *neenzymovou oxidaci* (dehydrogenaci) vhodných organických sloučenin peroxidem vodíku:



Výhodné je ke sledování reakce použít chromogenní substrát, tj. látku poskytující dehydrogenací výrazně zbarvený produkt (zde aminofenazon, často též benzidin nebo jeho nekancerogenní deriváty). Diagnostické proužky hemoPHAN obsahují v indikační zóně *o*-tolidin (3,3'-dimethylbenzidin) a kumenhydroperoxid v kyselé pufované směsi.

Stejnou reakci katalyzují enzymy – peroxidázy, které slouží k odstraňování peroxidu vodíku vznikajícího v průběhu některých oxidoredukčních dějů v buňkách. Z poznaných krevních elementů mají vysokou peroxidázovou aktivitu leukocyty. Katalytická aktivita enzymu se ztrácí jeho tepelnou denaturací.

Pozitivita zkoušky na pseudoperoxidázový účinek hemoglobinu v moči může tedy být způsobena i peroxidázami leukocytů nebo některých bakterií. V tomto případě opakování zkoušky s povařeným vzorkem dá negativní výsledek, zatímco pseudoperoxidázová aktivita neenzymových katalyzátorů zůstává i po povaření vzorku zachována.

Materiál: Diagnostické proužky hemoPHAN (Pliva-Lachema), vzorky moči.

Provedení

☞ Proužek se krátce ponoří do čerstvé, dobře promíchané, necentrifugované moči a přebytek moči se otře o okraj nádoby. Za 30 s se srovná barva indikační zóny proužku s předtištěnou barevnou stupnicí na pouzdru, která umožní semikvantitativní stanovení.

Hodnocení

Při negativní reakci zůstává indikační zóna žlutá, v přítomnosti hemoglobinu (nebo četnějších leukocytů) se barví žlutě zeleně až modře. Jsou-li v moči intaktní erytrocyty může být zbarvení zóny

nerovnoměrné. Hematurii potvrdí nálezy četných erytrocytů v močovém sedimentu. Citlivost důkazu se snižuje, je-li v moči přítomno větší množství redukujících látek (např. askorbátu po vysokých dávkách vitamínu C, urátu v příliš koncentrovaných močích, gentisátu). Falešně pozitivní výsledek může vzniknout za přítomnosti železitých solí, jodidů nebo stop silných oxidačních činidel (dezinfekčních prostředků obsahujících chlor, chlornan, chloramin).

Zjištění bilirubinu v moči

V moči zdravého člověka se může vyskytovat nepatrné množství konjugovaného bilirubinu (až 0,5 $\mu\text{mol/l}$), které běžnými zkouškami není prokazatelné.

Moč k důkazům bilirubinu musí být **čerstvá**, bilirubin se na vzduchu snadno oxiduje.

Princip: K důkazu použijeme některý z diagnostických proužků obsahující zónu pro detekci bilirubinu. Tato zóna je nasycena vhodnou diazoniovou solí, s níž bilirubin poskytne barevnou azosloučeninu.

Materiál: Diagnostické proužky s detekční zónou pro bilirubin.

Provedení

☞ Proužek krátce smočte v čerstvém vzorku moči a po 20–30 s sledujte vybarvení indikační zóny. V přítomnosti konjugovaného bilirubinu se světlé zbarvení mění v růžové až červené. Srovnávací barevná stupnice na obalu pouzdra umožní semikvantitativní vyhodnocení koncentrace.

Hodnocení

Zkoušky na bilirubin v moči jsou pozitivní, zvýší-li se koncentrace *konjugovaného* bilirubinu v krevní plazmě asi nad 30 $\mu\text{mol/l}$. *Nekonjugovaný bilirubin je v plazmě vázán na albumin a do glomerulárního filtrátu proto neproniká.* Zjištění bilirubinu v moči je tedy známkou neschopnosti hepatocytů vyloučit konjugovaný bilirubin do žluče nebo známkou uzávěry žlučových cest, patří proto k příznakům hyperbilirubinemie hepatocelulární nebo obstrukční. Při déletrvajících poruchách však nemusí být v moči prokazatelný ani konjugovaný bilirubin, neboť se v séru přeměňuje na delta formu.

Zjištění urobilinogenů v moči

Bilirubin vylučovaný játry do žluče je redukován enzymy střevní bakteriální flóry na bezbarvé chromogeny *urobilinogeny* (Ubg). Většina z nich se vstřebává do krve a je z ní játry vychytána a odbourána, nepatrná část (průměrně 4 $\mu\text{mol/den}$) se vylučuje močí. Zbytek Ubg neresorbovaný ve střevě se vylučuje stolicí. Zkoušky na přítomnost urobilinogenů se provádějí jen v **čerstvé** (a

zchladlé) moči (vhodná polední nebo odpolední moč), během prvních dvou hodin po vymočení; delším stáním se urobilinogeny přeměňují na své oxidační produkty - *urobiliny*.

Princip: Průkazem Ubg je specifická barevná kopulační reakce urobilinogenů s vhodnou diazoniovou solí v kyselém prostředí. Srovnání s barevnou stupnicí umožní semikvantitativní vyhodnocení. Slabě růžové zbarvení zóny, odpovídající prvnímu políčku srovnávací stupnice (přibližně 17 $\mu\text{mol/l}$), lze považovat za horní mez fyziologických koncentrací urobilinogenů v moči v průběhu dne.

Reagencie: Diagnostické proužky s detekční zónou pro Ubg.

Provedení

☞ Indikační zóna proužku se krátce ponoří do vyšetřované moči, přebytek moči se otře o okraj nádoby. Po 1 min se porovná zbarvení indikační zóny s barevnou stupnicí na pouzdru pro proužky. Na zbarvení vzniklé po 3 min se nebere zřetel.

U silněji zbarvených, koncentrovaných močí jsou při pozitivní reakci odstíny indikační zóny poněkud oranžovější; i tak lze podle celkové intenzity zbarvení semikvantitativně určit koncentraci urobilinogenu.

Hodnocení

Zvýšené množství těchto látek je velmi citlivou známkou **funkčního zatížení** nebo **nedostatečnosti hepatocytů**, výrazem neschopnosti vylučovat z krve a přeměnit většinu z urobilinogenů resorbovaných v tlustém střevě.

Jednoduchost zkoušky již při orientačním vyšetření moči je cenná, pozitivní nález může být první objektivní známkou funkčního zatížení jater (značná fyzická zátěž, jednorázové požití větší dávky etanolu, nadměrná hemolýza) nebo poškození jaterních buněk, např. při virovém zánětu, toxickém poškození (též u horečnatých stavů) nebo u nádorů jater. Nález je nutno zpřesnit rozborů krevního séra - jaterními testy. Z vyšetření moči je naprosto nezbytné provést zkoušky na bilirubin.

Urobilinoidy v moči zcela chybějí jednak při úplné obstrukci žlučových cest, jednak neprobíhá-li ve střevě redukce bilirubinu pro chybění střevní flóry (u novorozenců nebo při terapii některými antibiotiky) nebo při velmi zrychlené pasáži (průjmy). V prvním případě je stolice acholická, ve druhém intenzivně zbarvená bilirubinem a na vzduchu zelená.

Vyšetření moči polyfunkčními diagnostickými proužky

Polyfunkční diagnostické proužky s několika indikačními zónami jsou založeny na stejných nebo analogických principech jako již u dříve popsaných proužků monofunkčních. Po navlhčení indikačních zón ve vzorku moči je aktivována chemická reakce, která se projeví zbarvením zóny. Vyhodnocení se provádí většinou vizuálně srovnáním indikačních zón s barevnými stupnicemi na pouzdrech pro proužky. Intenzita zbarvení je úměrná množství analytu v moči a při dodržení

výrobce předepsaného času je možné semikvantitativní stanovení určovaných látek. Intenzitu zbarvení je též možné vyhodnotit u proužků k tomu určených elektronicky, obvykle měřením reflektance. Přesný způsob použití a vyhodnocení, včetně informací o interferujících látkách, je vždy popsán v příložených návodech.

Některé polyfunkční proužky obsahují též indikační zóny na detekci dusitanů a leukocytů.

V současné době je u nás dostupná řada polyfunkčních, příp. speciálních diagnostických proužků, např. proužky řady PHAN (Pliva-Lachema, viz tabulka), Combur-Test (Roche Diagnostics), Multistix, Labstix (Bayer), Medi-Test Combi (Macherey-Nagel), v nichž principy jednotlivých semikvantitativních stanovení jsou většinou stejné. Vyhodnocení se obvykle provádí subjektivně (okem), v některých případech reflexními fotometry.

Polyfunkční a speciální diagnostické proužky fy Pliva-Lachema:

Diagnostické proužky		Parametr									
		Specifická hmotnost	pH	Leukocyty	Dusitany	Proteiny	Glukosa	Ketony	Urobilinogen	Bilirubin	Krev
Polyfunkční	pentaPHAN		•			•	•	•			•
	hexaPHAN		•			•	•	•	•		•
	heptaPHAN		•			•	•	•	•	•	•
	nonaPHAN SG	•	•		•	•	•	•	•	•	•
Speciální	diaPHAN						•	•			
	iktoPHAN								•	•	
	nefroPHAN leuco		•	•	•	•					•

Výhodou těchto kombinovaných proužků je možnost rychlého vyšetření moči kdekoli, i přímo u lůžka pacienta, neobyčejně snadným a jednoduchým způsobem. Vždy je nutno mít na paměti, že výsledek může být ovlivněn interferujícími léky nebo jejich metabolity. Mezi nevýhody lze počítat omezenou skladovatelnost (všimněte si proto data expirace uvedeného na obalu).

Vyšetřuje se vždy jen čerstvá moč (nejpozději do 2 h po odběru), sbíraná do zcela čistých nádob, dobře promíchaná, necentrifugovaná.

Provedení

Obecný způsob použití polyfunkčních diagnostických proužků. Proužek se krátce ponoří do vyšetřované čerstvé, nijak neupravované moči tak, aby všechny indikační zóny byly stejnoměrně smočeny. Poté se ihned vyjme, přebytečnou moč se otře o okraj nádoby a proužek se umístí do vodorovné polohy, aby se zabránilo smíchání činidel difundujících z indikačních zón. V předepsaných intervalech (většinou po 1 min.) se proužek vyhodnotí. Dodržení času je důležité pro semikvantitativní stanovení. Vždy je třeba pečlivě dodržovat příložený návod.

☞ U přidělených vzorků moči proveďte základní chemické kvalitativní vyšetření.

Hodnocení

Hodnocení jednotlivých patologických nálezů, s výjimkou bakteriurie a leukocyturie, bylo popsáno v příslušných kapitolách.

Bakteriurie. Močové cesty jsou za normálních podmínek sterilní. Detekce dusitanů v moči slouží jako rychlá metoda na odhalení asymptomatické infekce močových cest. V přítomnosti některých patogenních bakterií v močovém systému dochází k redukci dusičnanů (normální složka moči) na dusitany. Aby tato redukce mohla proběhnout, musí být splněny další předpoklady:

- dostatečné množství dusičnanů v moči (předchozí den je dodržena normální dieta zahrnující zeleninu),
- dostatečně dlouhá doba retence moči v močovém měchýři (aspoň 4 h),
- vyloučení možné antibakteriální léčby (inhibice bakteriálních enzymů).

Při pozitivním nálezu dusitanů je v čerstvé moči přítomno kolem 10^7 zárodků/ml. Negativní nález dusitanů však nevylučuje bakteriurii (možná infekce mikroorganismy neredukující dusičnany). Snížené hodnoty nebo *falešně negativní výsledky* mohou být získány při polyurii a častém močení, nadměrném lačnění či hladovění, nadměrných dávkách vitamínu C. *Falešně pozitivní nález* je způsoben bakteriální kontaminací vzorku.

Leukocyturie. Symptodem zánětlivého onemocnění ledvin (pyelonefritidy) a dolních močových cest (cystitida, uretritida) je zvýšená exkrece leukocytů močí. Zatím není standardizována hranice mezi normální a patologickou exkrecí leukocytů. Jako patologický nález se hodnotí > 20 leukocytů/ μl moči; při nálezu 10–20 leukocytů/ μl je nutné provést další vyšetření s novou čerstvou močí. Při pozitivním nálezu je třeba další vyšetření na proteinurii, hematurii, nitriturii, pH a mikroskopické vyšetření močového sedimentu. Při zánětech způsobených toxickými látkami, infekcích trichomonadami, viry, plísněmi můžeme nalézt tzv. „abakteriální“ leukocyturii.

- Jaký vliv má dlouhodobé skladování moči na možnou přítomnost erytrocytů, příp. leukocytů, bakterií, koncentraci glukosy, NO^{2-} , H^+ , bilirubinu, urobilinogenů, acetoacetátu?

Příklady dalších diagnostických proužků:

Detekce luteinizačního hormonu v moči – zjištění ovulace

Luteinizační hormon (LH) je hormon ze skupiny gonádotropinů. U žen vykazuje sekrece LH v průběhu menstruačního cyklu charakteristický průběh s výrazným maximem těsně před počátkem ovulace. Při zvýšené hladině LH v krvi dochází také k nárustu jeho koncentrace v moči, takže může být prokázán jednoduchým imunochromatografickým testem. Toho se využívá k orientačnímu předvídání termínu ovulace u žen trpících neplodností.

Při zjišťování termínu ovulace se testuje hladina LH v moči několik dní po sobě. Pro určení prvního dne testování je rozhodující průměrná délka menstruačního cyklu. Pak lze začátek testování určit buď s využitím tabulky na přiloženém návodu, nebo odečtením čísla 17 od průměrné délky cyklu.

Princip: K určení koncentrace LH v moči se používají různé v lékárnách dostupné diagnostické proužky, které jsou podobně jako proužky Micral-Test II (úkol **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) a Cardiac T (úkol **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) založeny na chromatografické detekci sendvičového komplexu LH se dvěma specifickými protilátkami.

Materiál: Diagnostický proužek k určení ovulace, např. Souprava Ovulační test 99 (Untraco), nádoba na sběr moči.

Provedení

- ☞ Vzorke moči se odebírají do čisté nádoby, vždy přibližně ve stejnou dobu mezi 10. a 20. hodinou. K testování se nemá použít první ranní moč. Diagnostický proužek případně i vzorek moči nechejte vytemperovat na teplotu místnosti (20–30 °C), teprve bezprostředně před použitím proužek opatrně vyjměte z ochranného obalu.
- ☞ Uchopte testovací proužek za horní barevný okraj a dolním koncem ponořte na 5 sekund do vzorku moči. Nejvíce však po značku vymezenou šipkami.
- ☞ Položte testovací proužek na vodorovnou podložku.
- ☞ V závislosti na množství LH v testovaném vzorku se mohou pozitivní výsledky objevit již za 40 s. Na potvrzení negativního výsledku je třeba počkat 10 minut.

Hodnocení

Při vyhodnocení se porovnává intenzita zbarvení testovací (blíže ke značce ponoření) a kontrolní zóny. Výsledek je pozitivní, jestliže se na testovacím proužku zbarví obě zóny. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci LH. Jestliže je tedy intenzita zbarvení testovací zóny stejná nebo větší jako v případě kontrolní zóny, test je pozitivní a byl indikován ovulační vrchol LH. Ovulaci lze očekávat v průběhu 1–2 dní. Výsledek testu je negativní, jestliže se na testovacím proužku zbarví pouze kontrolní

zóna nebo v případě slabšího vybarvení testovací zóny než kontrolní zóny. V testování je nutno pokračovat následující den. Jestliže se na testovacím proužku nezbarví kontrolní zóna, je výsledek neprůkazný. To signalizuje, že v průběhu testu pravděpodobně došlo k nepřesnostem v postupu nebo k použití znehodnoceného proužku.

Detekce hCG v moči – průkaz těhotenství

Proužky k detekci časného těhotenství jsou založeny na důkazu hCG v moči nebo v séru. Lidský hCG je glykoproteinový hormon, tvořený oplozeným vajíčkem. U normálního těhotenství jej lze detekovat v moči a v séru od 7. až 10. dne a jeho koncentrace stoupá velmi rychle.

Principem důkazů je opět imunochromatografie. Kapka moče se nanáší na diagnostický proužek. hCG v moči obsažený migruje proužkem a reaguje s barevně značenými protilátkami. K důkazu se využívá vzorek ranní moče.

Ve cvičení se seznámíte s některými diagnostickými proužky tohoto typu.

Otázky:

1. Popište základní pravidla správného odběru moče
2. Jaký je obvyklý objem moči a vzhled moči?
3. Co vyjadřují pojmy aurie, oligurie, polyurie?
4. Jaké jsou obvyklé hodnoty pH moči, čím jsou ovlivněny?
5. Které „patologické součásti“ moči se nejčastěji dokazují?
6. Co je to proteinurie, glykosurie, hematurie?