Datum:	Jméno: Skupina:

CVIČENÍ 10: Základní chemická kvalitativní analýza moči. Orientační analýzy moči pomocí diagnostických proužků

Úvod

Základní chemické vyšetření moči:

- pH
- osmolalita
- proteiny
- krev resp. hemoglobin
- glukóza
- ketolátky
- žlučové barvivo (bilirubin)
- deriváty žlučového barviva (urobilinogen, urobilinoidy)

Jedná se o patologické součásti moči. Citlivé metody je zachytí i v moči zdravého člověka, proto se používají metody, které zachytí hledané látky až při překročení jejich fyziologického rozmezí.

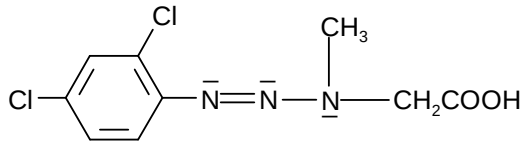
Vyšetření se obvykle provádí diagnostickými proužky. Při pozitivním výsledku mluvíme např. o proteinurii, hematurii atd.

Kromě patologických součástí moči lze prokázat např. drogy nebo hormony pomocí testů využívajících imunochromatografii.

10.1 Vyšetření moči polyfunkčními diagnostickými proužky

Polyfunkční diagnostické proužky PHAN (Pliva-Lachema) obsahují tyto indikační zóny: **hemoglobin/erytrocyty**, **ketony**, **bilirubin**, **urobilinogen**, **glukóza**, **bílkoviny**, **pH**, *dusitany*, *askorbová kyselina*, *specifická hmotnost*, *leukocyty*.
Principy testů napsaných **tučně** byly probrány už v dřívějších cvičeních.
Principy testů napsaných *kurzívou* budou probrány nyní.

pozn. Proužky PHAN využívají pro zjišťování bilirubinu a urobilinogenu v moči reakci s triazenem, ze kterého se v kyselém prostředí uvolňuje vlastní činidlo diazoniová sůl. Proužky jiných výrobců mohou využívat stabilních diazoniových solí, jak bylo zmíněno ve cvičení 5.

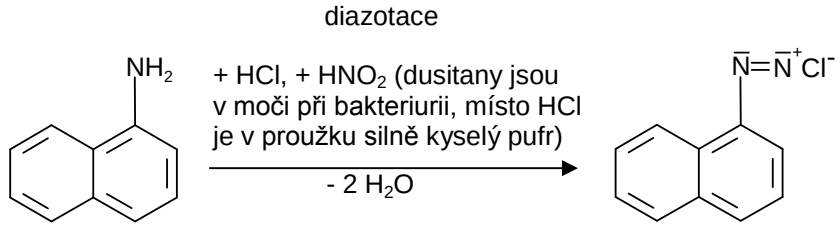


1-methyl-1-karboxymethyl-3-(2,4-dichlorfenyl)triazen

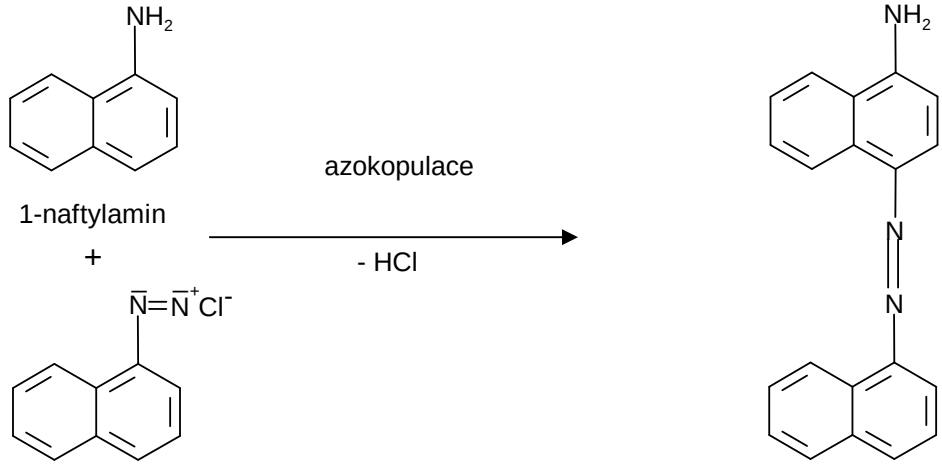
Příklad triazenu na zjišťování bilirubinu. Triazen je stálý v alkalickém roztoku, v kyselém prostředí se štěpí na reaktivní 2,4-dichlorbenzendiazoniový kation a *N*-methylglycin (sarkosin).

Při dodržení reakčního času umožňují diagnostické proužky provést vizuálně semikvantitativní stanovení určovaných látek na základě porovnání intenzity zbarvení indikační zóny se srovnávací stupnicí. Proužky k tomu určené mohou být hodnoceny elektronicky měřením reflektance.

Dusitany (Griessova reakce: diazotace a azokopulace s 1-naftylaminem, nebo její modifikace)

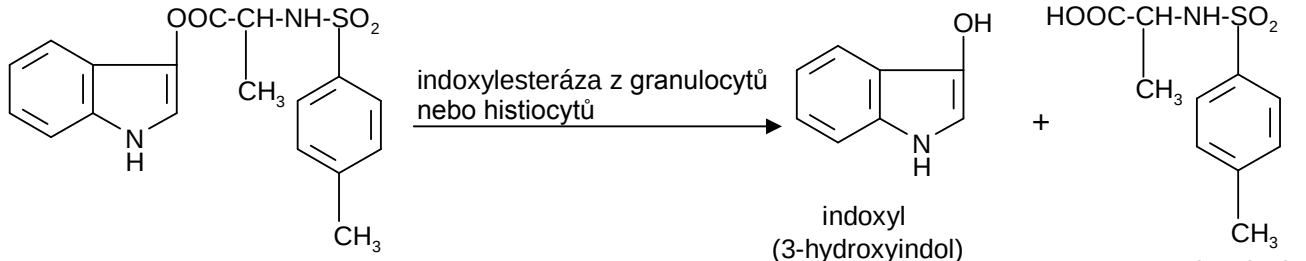


1-naftylamin — naftalendiazonium-chlorid

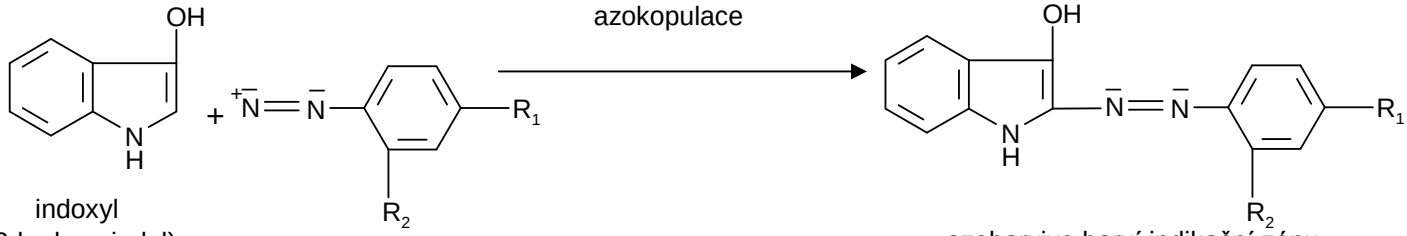


naftalendiazonium-chlorid — 4-[(1-naftyl)azo]naftalen-1-amin (barví indikační zónu do růžova)

Leukocyty (využití esterázové aktivity leukocytů, zachytí intaktní i lyzované leukocyty)



3-[(*N*-tosyl-L-alanyl)oxy]indol — indoxyl (3-hydroxyindol) — *N*-tosyl-L-alanin



indoxyl (3-hydroxyindol) — nějaká stabilní diazoniová sůl — azobarvivo barví indikační zónu béžovofialově

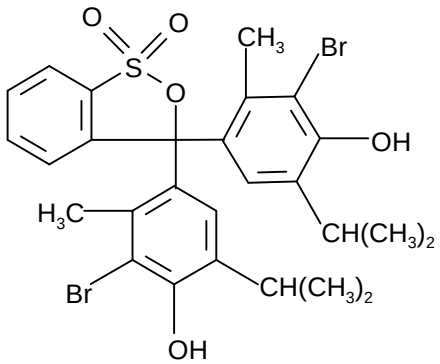
Askorbová kyselina (využití jejich silných redukčních vlastností)

askorbová kyselina + kyselina fosfomolybdenová → dehydroaskorbová kyselina + fosfomolybdenová modř

Negativní reakce: indikační zóna je žlutá
Pozitivní reakce: zelenožluté až zelenomodré zbarvení kombinujícím dvě barvy - žlutou moč s modrým redukčním produktem

Vitamin C (askorbová kyselina) interferuje se stanovením těch analytů, které je založeno na reakcích s H_2O_2. Kromě toho rozkládá (redukuje) aryldiazoniové kationty i stabilní diazoniové soli na produkty neschopné azokopulace.

Specifická hmotnost (nesprávný název pro hustotu nebo-li objemovou hmotnost)



bromthymolová modř
3,3´-dibromthymolsulfonftalein

Indikační zóna proužku na stanovení hustoty obsahuje analytický systém založený na výměně kationtů z moči za H^+ ionty polyelektrolytu, což je často kopolymer methylvinyletheru s kyselinou maleinovou. Výměnnou reakcí uvolněné vodíkové ionty okyselují slabě pufrovaný acidobazický indikátor v alkalické formě. Indikátor přechází, v závislosti na obsahu kationtů v moči (hlavně Na^+, K^+, NH_4^+, které jsou zastoupeny nejvíce), do formy kyselé za plynulé změny zbarvení. Indikátorem je nejčastěji bromthymolová modř s barevným přechodem z modré do žluté při pH = 7,6 - 6,0. Barevná stupnice má pro hustotu moči škálu od modrozelené přes tmavě zelenou do tmavě žluté. Takto stanovená hustota nezahrnuje neelektrolyty glukózu, bílkoviny, kreatinin, močovinu apod.

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

Diagnostické proužky na moč dostupné v ČR: PHAN (Pliva-Lachema), Combur-Test (Roche Diagnostics), Multistix, Labstix (Bayer), Medi-Test Combi (Macherey-Nagel). Principy stanovení analytů jsou většinou stejné, na následující straně je přehled informací k proužkům PHAN.

Diagnostické proužky PHAN® pro analýzu moče

Diagnostické proužky PHAN® pro analýzu moče

Reakční zóny	Vyhodnocení testu po	Srovnávací stupnice	Princip reakce	Citlivost SI jednotky	Konvenční jednotky	Specificita reakce	Interference
Hemoglobin Ery/µl Erytrocyty Ery/µl	ca 60 s	neg. ca. 10 ca. 50 ca. 250 ca. 5-10 ca. 50 ca. 250	oxidace chromogenu organickým peroxidem v přítomnosti hemoglobinu	0,3 mg/l 5 Ery/µl	0,03 mg/dl	specifická pro hemoglobin a myoglobin	kys. askorbová, extrémně vysoká spec. hmotnost
Ketony mmol/l mg/dl	ca 60 s	neg. 1,5/16 3/31 7,5/78 15/156	alkalický pufr s nitroprusidem sodným (Legalova reakce)	0,3 - 0,5 mmol/l	3,0 - 5,0 mg/dl	vysoká: kys. acetoctová nižší: aceton žádná: β-hydroxymáselná	léky nebo diagnostika na bázi fenolftaleinu nebo sulfoftaleinu (Novopuren)
Bilirubin arb.j.	ca 60 s	neg. + ++ +++	reakce s triazenem v kyselém prostředí	2,5 - 3,0 mg/l	0,25 - 0,30 mg/dl	specifická pro konjugovaný bilirubin	vysoké koncentrace kyseliny askorbové a urobilinogenu, světlo
Urobilinogen µmol/l mg/dl	ca 60 s	normal 17/1 51/3 102/6 203/12	reakce s triazenem v kyselém prostředí	6,0 µmol/l	0,35 mg/dl	urobilinogen, sterkobilinogen	světlo, fenazopyridin, bilirubin
Glukosa mmol/l	ca 60 s	neg. normal 2,8 5,5 17 55	enzymatická reakce: glukosaoxidasa, peroxidasa, chromogen	0,1 mmol/l	2 mg/dl	specifická pro D-glukózu	vysoké koncentrace kys. askorbové, zbytky čistících prostředků (peroxidy a jiné oxidační látky)
Bílkoviny g/l mg/dl	ca 60 s	neg. 0,3/30 1,0/100 5,0/500	tetrabromfenolová modř v přítomnosti proteinů má barevný přechod při nižším pH (proteinová chyba indikátorů)	0,1 g/l	10 mg/dl	specifická pro albumin, značně nižší pro jiné nízkomol. bílkoviny	léky na bázi chininu a chinolinu, alkalické moči pH > 8, zbytky čistících prostředků, desinfekční prostředky typu kvarterních amoniových solí
pH	ca 60 s	5 6 7 8 9	směsný acidobazický indikátor				cizorodé látky kyselé a alkalické povahy, stará moč (má pH kolem 9,0)
Dusitany	ca 60 s	neg. pos.	modifikovaná Griessova reakce	1,0 mg/l	0,1 mg/dl	specifická pro nitrity, 70% pro bakteriurii	vysoká koncentrace kys. askorbové, diuréza, fenazopyridin
Kyselina askorbová mmol/l mg/dl	ca 60 s	neg. 0,6/10 1,1/20 2,3/40 3,4/60	redukce kyseliny fosfomolybdenové na molybdenovou modř	0,2 - 0,3 mmol/l	3 - 5 mg/dl	nespecifická redox. reakce	redukující látky v přítomné moči
Specifická hmotnost	ca 60 s	1,000 1,005 1,010 1,015 1,020 1,025 1,030	iontová výměna a barevná změna acidobazického indikátoru				vysoké koncentrace kyseliny askorbové, pH > 6,5
Leukocyty Leu/µl	ca 120 s	neg. ca. 10-25 ca. 75 ca. 500	enzymatická reakce: esteráza štěpí substrát na volný indoxyl, který dále reaguje s diazoniovou solí	10 Leu/µl		granulocyty, histiocyty	intenzitu barevné reakce zvyšuje alkalické pH, vyšší hustota moče a vysoká koncentrace bilirubinu

	Leukocyty	Dusitany	pH	Bílkoviny	Glukóza	Urobilinogen	Bilirubin	Ketony	Krev	Kys. askorbová	Specifická hmotnost
AlbuPHAN			●	●							
GlukoPHAN					●						
HemoPHAN									●		
KetoPHAN								●			
TriPHAN			●	●	●						
PentaPHAN			●	●	●			●	●		
HexaPHAN			●	●	●	●		●	●		
HeptaPHAN			●	●	●	●	●	●	●		
OktaPHAN	●		●	●	●	●	●	●	●		
NonaPHAN SG		●	●	●	●	●	●	●	●		●
DekaPHAN asco		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
DekaPHAN leuco	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●
Proužky pro speciální vyšetření											
DiaPHAN					●			●			
TetraPHAN dia			●	●	●			●			
IktoPHAN						●	●				
NefroPHAN leuco	●	●	●	●					●		

PLIVA Lachema

Provedení (proužek ponořit, vyjmout, otřít, položit vodorovně, počkat na výsledek)

Výsledky:

Hodnocení (jen bakteriurie a leukocyturie, ostatní už bylo popsáno v předchozích cvičeních)

Bakteriurie (počet baktérií vyšší než 10^5/ml moči; močové cesty jsou normálně sterilní)
Test prokazuje dusitany, které nejsou normálně součástí moči, ale které v moči vznikají při bakteriurii působením mikroorganismů *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella* a částečně i působením enterokoků, stafylokoků a pseudomonád na dusičnany (normální složka moči), které mikroorganismy redukují na dusitany (průkaz NO_2^- Griessovou reakcí).
Před vyšetřením na bakteriurii dodržet:

- předchozí den normální dieta zahrnující zeleninu ⇒ dostatečné množství NO_3^- v moči
- dostatečně dlouhá doba retence moči v močovém měchýři (aspoň 4 h)
- vyloučení možné antibakteriální léčby (snižuje počet baktérií v moči)

Výsledky:

- negativní (30 - 50 % případů bakteriurie - infekce baktériemi neredukujícími NO_2^-)
- pozitivní (50 - 70 % případů bakteriurie)
- falešně negativní (při polyurii, častém močení, nadměrném lačnění, hladovění, nadměrných dávkách vitaminu C)
- falešně pozitivní (při bakteriální kontaminaci vzorku)

Leukocyturie (> 20 leukocytů/µl moči; při 10 - 20 leukocytů/µl moči znovu provést vyšetření s novou čerstvou močí)

- zánětlivé onemocnění ledvin (pyelonefritida)
- zánětlivé onemocnění dolních močových cest (cystitida, uretritida)

Při pozitivním nálezu stanovit proteinurii, hematurii, nitriturii, pH a provést mikroskopické vyšetření močového sedimentu.
Abakteriální leukocyturie je při zánětech způsobených toxickými látkami, infekcích trichomonádami, viry, plísněmi.

4 Jaký vliv má dlouhodobé skladování moči na možnou přítomnost erytrocytů, příp. leukocytů, baktérií, koncentraci glukózy, NO_2^-, H^+, bilirubinu, urobilinogenů, acetoacetátu?

- Ery, Leu
- baktérie
- Glc
- NO_2^-
- H^+
- bilirubin, urobilinogen
- acetoacetát

10.2 Průkaz drog* v moči
10.3 Průkaz barbiturátů v moči

Pro rychlou kvalitativní detekci uvedených látek jsou v ČR nejvíce používány testy **DynexTest®** založené na imunochromatografickém principu.

Dostupné jsou testy pro jednotlivé drogy: opiáty (morfin/heroin), THC (marihuana), amfetamin, metamfetamin (pervitin), kokain, PCP (fencyklidin), barbituráty, benzodiazepiny, metadon (opioid).
Kombinovaný test 5 drog: (amfetamin,metamfetamin,THC,opiáty,kokain).

Opiáty (morfin/heroin): detekce opiátů a jejich metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči již několik hodin po aplikaci a přetrvávají zvýšené 3 - 10 dnů.

THC (=tetrahydrokanabinol, v marihuaně a hašiši): detekce THC a jeho metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči již několik hodin po kouření marihuany a přetrvávají zvýšené 3 - 10 dnů, u chronických kuřáků i několik týdnů po přerušení kouření.

---

* drogy = omamné a psychotropní látky, droga má psychotropní účinek a může vyvolat závislost
lékopisný termín droga = upravená surovina nerostného, rostlinného či živočišného původu
anglický termín drug = droga ve smyslu omamné a psychotropní látky; lék; jed
Omamnými a psychotropními látkami se zabývá zákon o návykových látkách č. 167/1998 Sb., který má několik novel.
Omamné látky (3 skupiny): I. sk. - opioidy s vysokým potenciálem závislosti (morfin, aj.), II. sk. - opioidy s nižším rizikem (např. kodein), III. skupina - látky, které se terapeuticky neužívají (např. konopí, heroin)
Psychotropní látky (4 skupiny): I. sk. - silně halucinogenní látky (např. lysergid = LSD, psilocybin), II. sk. - psychostimulancia s vysokým rizikem vzniku drogové závislosti (např. amfetamin, kokain, fenmetrazin, methylfenidát), III. sk. - např. barbituráty, IV. sk. - benzodiazepiny a některá psychostimulancia s možným vznikem závislosti při delším používání (např. efedrin)
Léky obsahující léčiva, ze skupiny I. omamných a skupiny II. psychotropních látek musejí být předepisovány na evidované recepty a žádanky s modrým pruhem.

Amfetamin: detekce amfetaminu a jeho metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči již několik hodin po požití, zvýšené hodnoty nacházíme v moči 1 - 2 dny.

Metamfetamin (pervitin): detekce metamfetaminu a jeho metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči již několik hodin po požití a přetrvávají zvýšené 3 - 5 dnů.

Kokain: detekce kokainu a jeho metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči již několik hodin po požití a přetrvávají zvýšené 1 - 2 dny.

PCP (fencyklidin): detekce PCP a jeho metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči za 4 - 6 hodin po aplikaci a přetrvávají 7 - 14 dnů po požití (medián 10 dnů).

Barbituráty (př. fenobarbital, aprobarbital): detekce barbiturátů a jejich metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči již několik hodin po požití, zvýšené hodnoty nacházíme 4 - 7 dnů.

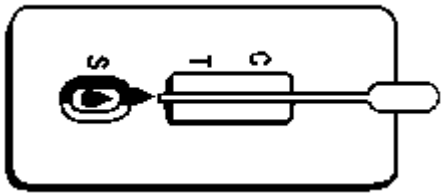
Benzodiazepiny (př. diazepam, flunitrazepam): detekce benzodiazepinů a jejich metabolitů, které nacházíme zvýšené v moči již několik hodin po požití, přetrvává 3 - 5 dnů.

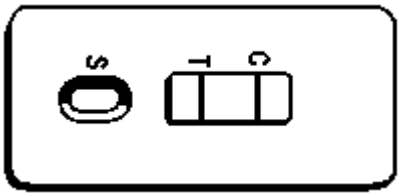
Metadon (opioid): detekce metadonu, který nacházíme zvýšený v moči již několik hodin po aplikaci a přetrvává několik dnů.

Princip (imunochromatografie, viz skripta)

Provedení (podrobně viz skripta)

1) nanesení vzorku moči 2) hodnocení testu po 5 min (maximálně 10 min)





	test
proužky T, C	negativní
proužek C	pozitivní
žádný proužek	neplatný

- Nakresli si vzhled testu pro negativní, pozitivní a neplatný test (pozor je zde rozdíl oproti troponinu, myoglobinu, hCG, LH).

10.4 Detekce luteinizačního hormonu (LH) v moči [ovulační test]

LH je gonadotropin s výrazným nárůstem jeden den před ovulací, zvýšená hladina je v krvi a následně v moči, kde je detekován. Testování se provádí 5 dnů za sebou. První den testování se určí z přiložené tabulky na základě průměrné délky menstruačního cyklu nebo odečtením 17 od průměrné délky cyklu. Testuje se moč odebíraná ve stejnou dobu mezi 10. a 20. hodinou (rozdíl od těhotenského testu detekujícího lidský choriový gonadotropin (hCG), kde se bere první ranní moč).

Princip testu je stejný jako při stanovení troponinu proužky Cardiac T, myoglobinu proužky Cardiac M, hCG těhotenskými testy. Jde o chromatografickou detekci sendvičového komplexu LH se dvěma specifickými protilátkami.

Hodnocení testu:
Pozitivní výsledek může být už po 40 s, na potvrzení negativního výsledku počkat 10 minut.
<u>dva proužky</u> - pozitivní test (testovací proužek musí být stejně nebo intenzivněji zbarven než proužek kontrolní) ⇒ ovulace v následujících 24 hodinách
<u>jeden proužek</u> - negativní test (nebo je testovací proužek slaběji zbarven než proužek kontrolní)
<u>žádný proužek</u> - neplatný test

Problémy související s tímto tématem

4 1. V ordinaci praktického lékaře při preventivní prohlídce u slečny Ch. (20 let) bylo provedeno vyšetření moči pomocí diagnostického proužku. Odečtený výsledek: pH = 5, bílkoviny negativní, glukóza negativní, ketolátky negativní, urobilinogeny zvýšené, bilirubin negativní. Co mohlo způsobit pozitivní nález urobilinogenů?

-

4 2. U chlapce J. (14 let) se objevily potíže s močením - pálení při močení. Při rychlém orientačním vyšetření moči bylo zjištěno pH slabě kyselé, glukóza negativní, ketolátky negativní, bílkoviny zvýšené, leukocyty pozitivní, krev pozitivní. Vysvětlete souvislost biochemických nálezů s obtížemi pacienta.

- bílkoviny
- leukocyty
- krev

4 3. V ordinaci praktického lékaře byla u 40leté ženy zjištěna proteinurie a hematurie. Jaká další vyšetření by měla být provedena?

-
-
-
-
-

4 4. Paní C. při běžné kontrole byla vyšetřena moč diagnostickým proužkem. Lékaře upozornila, že bere zvýšené dávky vitaminu C. Zvažte, zda přítomnost kyseliny askorbové v moči může ovlivnit hodnocení některých parametrů?

- vitamin C redukuje diazoniové soli ⇒
- vitamin C redukuje H_2O_2 a organické peroxidy ⇒
- vysoké koncentrace vitaminu C okyselují moč ⇒

4 5. Pacient K. Přinesl na vyšetření ranní moč. Sestra se k jejímu vyšetření dostala až v odpoledních hodinách. Do té doby stála moč v uzavřené lahvičce na polici. Zóna proužku albuPHAN pro detekci bílkovin vykázala pozitivní reakci, zóna pro hodnocení pH ukázala hodnotu 8. Je možno uzavřít, že pacient má proteinurii? Je možno uzavřít, že moč pacienta má alkalickou reakci?

-
-