



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Vyšetření proteinurie a její identifikace

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Eliška Hořejší

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr.h.c.

České Budějovice 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Vyšetření proteinurie a její identifikace vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným stanovením zákona č. 111/1989 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 11.8.2016

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli Prof. MUDr. Miloši Velemínskému, CSc., dr.h.c. za odborné vedení a poskytnutí cenných informací při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala pracovišti klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a. s. za jejich spolupráci a rady. Poděkování patří i mé rodině a příteli za trpělivost, podporu a pomoc při psaní závěrečné práce.

Vyšetření proteinurie a její identifikace

Abstrakt

Proteinurie jakožto přítomnost bílkoviny v moči, se u zdravé populace prakticky nevyskytuje, často bývá objektivním příznakem vážných onemocnění, převážně vylučovacího, kardiovaskulárního systému či metabolických poruch. Včasná diagnostika je velice důležitá, kdy mimo provedení dalších klinických vyšetření je nutné moč vyšetřit ve specializovaných biochemických laboratořích pomocí vhodných metod. Hlavním cílem práce je vyšetřit 29 vzorků moče, ve kterých bude zjišťována přítomnost bílkovin. Vyšetření bude probíhat kvalitativně, prostřednictvím elektroforézy na agarózovém gelu. Kvalitativní vyšetření jednorázových vzorků bylo prováděno také pomocí vyšetření diagnostickými proužky a vyšetřením zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou, která však registruje všechny přítomné proteiny. Dále byla v rámci bakalářské práce použita kvantitativní metoda imunoturbidimetrie a analýza pomocí fotometrické metody fungující na vazbě barviva spolu s bílkovinou. Analyzovaná moč byla zpracována na pracovišti klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a. s., ze vzorků dětské moči i moči dospělého člověka. Vzorky byly zpracovány pod odborným dohledem laboratorních pracovníků, rovněž pomocí přístrojového vybavení – přístroji ADVIA Chemistry a Sebia. Výsledkem bakalářské práce je prezentace výsledků získaných při vlastním vyšetření moči. Přínosem bakalářské práce je fakt, že základní informace získané z vyšetření moče po jejich analýze a interpretaci přispějí k porozumění problematice identifikace proteinurie pro práci zdravotního laboranta.

Klíčová slova

Proteinurie; vyšetření moči; elektroforéza bílkovin v moči

Examination of proteinuria and its identification

Abstract

Proteinuria as the presence of protein in urine is practically non-existent within the healthy population. Often, it is an objective symptom of serious illnesses, mostly of urinary or cardiovascular system or metabolic disorders. An early diagnosis is very important. Besides performing further clinical examinations, it is necessary to examine the urine in specialized biochemical laboratories using appropriate methods. The main objective is to examine 29 urine samples, in which the presence of proteins will be detected. The examination will be done quantitatively by electrophoresis on an agarose gel. Immunoturbidimetry method and analysis using photometric method, which works on binding dye along with protein, was used further within the thesis. Qualitative examination of single-use samples was performed by using diagnostic examination papers and by testing with sulfosalicylic acid; however, this one registers all the proteins present. The analyzed urine was processed at the department of clinical chemistry at Nemocnice České Budějovice, a.s., from children and adult urine samples. The samples were processed under specialised supervision of laboratory workers, also by using laboratory devices such as - ADVIA Chemistry and Sebia. Final conclusion of thesis is to present results obtained in the urine examination itself. Benefit of the thesis is the fact, that the basic information obtained from examination of urine after its analysis and interpretation will contribute to understanding the problems of identification of proteinuria for the work of a medical laboratory technician.

Key words:

Proteinuria; urine analysis; electrophoresis of proteins in urine

Obsah

Úvod	8
1 Teoretický diskurz.....	9
1.1 Anatomie ledvin	9
1.2 Fyziologie ledvin.....	9
1.2.1 Funkce ledvin	10
1.2.2 Vstřebávání jednotlivých látek v ledvinách	11
1.3 Moč	12
1.3.1 Tvorba moči	12
1.3.2 Fyziologie vylučování bílkovin do moči.....	12
1.3.3 Definice proteinurie	13
1.3.4 Formy proteinurie.....	14
1.3.5 Mikroalbuminurie	16
1.4 Vyšetření moči	17
1.4.1 Fyzikální vyšetření moči	17
1.4.2 Chemické vyšetření moči	18
1.4.3 Morfologické vyšetření močových sedimentů	19
1.5 Vyšetřování celkové bílkoviny a albuminu v moči.....	20
1.5.1 Chemické vyšetření pomocí testovacích proužků	21
1.5.2 Srážecí reakce.....	21
1.5.3 Biuretová metoda	22
1.5.4 Imunochemické metody	23
1.5.5 Elektroforéza bílkovin.....	24
1.5.6 Chromatografické metody.....	25
2 Cíl práce	28
3 Metodika	29
3.1 Vyšetření pomocí testovacích proužků	29
3.2 Vyšetření pomocí zkoušky s kyselinou sulfosalicylovou	32

3.3	Imunochemické vyšetření	32
3.4	Elektroforéza	33
4	Výsledky	37
5	Diskuze	46
6	Závěr.....	49
7	Seznam literatury	50
8	Seznam příloh a obrázků.....	54
9	Seznam použitých zkratk.....	56

Úvod

Pro lidský organizmus jsou ledviny nepostradatelné, tak jako například srdce, plíce nebo mozek. Navíc poruchy ledvin mají vliv na další nemoci, hlavně na nemoci kardiovaskulárního systému.

Chronické onemocnění ledvin, stejně jako počáteční stádia ledvinných onemocnění, nemusí pacienta bolet. V raných stádiích někdy nedochází ani k projevům, mezi které může patřit krev v moči, otoky nohou, únava, vyšší krevní tlak nebo časté močení.

Čím dříve je nemoc ledvin diagnostikována, tím jednodušší je léčba a tím nižší je riziko výskytu dalších onemocnění (Světový den ledvin, 2016a). Podle odborných odhadů každého desátého Čecha postihuje onemocněním ledvin. Mnozí lidé však nevědí, že se u nich zákeřná choroba rozvíjí. Nakonec cca u devíti tisíc pacientů v České republice ledviny úplně selžou, pacienti pak musí chodit na dialýzu nebo podstoupit transplantaci ledvin. (Peiskerová, 2010).

Kvalita života pacientů, kteří jsou léčeni dialýzou, se výrazně zhoršuje. Do zdravotnického zařízení musí dojíždět třikrát týdně, ošetření trvá asi čtyři hodiny. Tato léčba je navíc velice drahá, pojišťovnu stojí více než milion korun ročně (Peiskerová, 2010).

Na transplantaci ledviny se v ČR čeká v průměru 1,5 roku. (Světový den ledvin, 2016b) Proteinurii je tedy třeba včas diagnostikovat a léčit, taktéž sledovat průběh léčby. V nefrologii má své nezastupitelné místo, současná diagnostika se zaměřuje zejména na vyšetření celkové bílkoviny a albuminu v moči. Aby nedošlo k nebezpečí z prodlení, u diabetiků a hypertoniků se doporučuje pravidelně stanovovat tzv. mikroalbuminurie. (Tesař et al., 2014).

Vzhledem k závažnosti této problematiky je také každoročně Mezinárodní federací pro nemoci ledvin (International Federation of Kidney Foundations) a Mezinárodní nefrologickou společností (International Society of Nephrology) vyhlašován Světový den ledvin (World Kidney Day), který připadá vždy na druhý čtvrtek v měsíci březnu. Cílem této akce je zvýšit informovanost odborné i laické veřejnosti o včasné diagnostice a léčbě onemocnění ledvin (Světový den ledvin, 2016b).

1 Teoretický diskurz

1.1 Anatomie ledvin

Ledviny jsou párový orgán, který je uložen po obou stranách páteře mezi 11. hrudním a 3. bederním obratlem v retroperitoneálním prostoru. Jsou široké asi 5 cm, dlouhé 11 cm a tlusté přibližně 2,5 cm. Jedna ledvina váží okolo 150 g, přičemž pravá ledvina je díky velikosti jater asi o 1 až 1,5 cm uložena níže než levá. Ledvina v nezvětšeném stavu je nehmatná, jen u hubených lidí může být při hluboké palpaci hmatný dolní pól pravé ledviny (Špínar et al., 2008). Zezadu jsou ledviny kryty páteřním svalem, levou ledvinu obklopuje slinivka břišní, lačník a tračník. Pravá ledvina přiléhá k játrům, dvanáctníku a tračníku. Obě ledviny jsou kryty tukovým vazivem, které má ochrannou funkci (The Human Body, 1992).

Makroskopicky členíme ledvinu na kůru a dřeň, v kůře jsou uloženy glomeruly, proximální a distální tubulus. Ve dřeni je zanořena Henleova klička (má tvar vlásenky), navazuje na distální tubus, který přechází do sběrného kanálku. Ten odvádí moč do ledvinové pánvičky (Rokyta et al., 2000).

1.2 Fyziologie ledvin

Základní funkční jednotkou je nefron. Skládá se z glomerulu, Bowmanova pouzdra, proximálního tubulu, Henleovy kličky, distálního tubulu a sběracího kanálku. (Rokyta et al., 2000)

Glomerulus se skládá z klubíčka kapilár, přívodné arterioly (vas afferens) a tenčí odvodné arterioly (vas efferens). Rozdílem v průměru arteriol je zde anatomicky zajištěn vyšší krevní tlak než v ostatních arteriích, což umožňuje filtraci krve v glomerulu. Odvodná céva se dále znovu dělí do kapilárního řečiště peritubulárního aparátu a vasa recta (Rokyta et al., 2000) - efer. arterioly juxtamedulárních nefronů (Kittnar et al., 2011), které jsou umístěné na rozhraní kůry a dřene, doprovází sestupné raménko Henleovy kličky (Dusíková, Maďa, 2014). Krev v ledvinách prochází sériově řazenými dvěma kapilárními řečišti, která souhrnně nazýváme portální oběh ledvin (Rokyta et al., 2000). Kulovitý Bowmanův váček obaluje glomerulus. Ten je tvořen

buňkami podocyty, které jsou spojeny výrůstky a tvoří ultrafiltr. Mezi dvěma listy Bowmanova pouzdra se filtruje krevní plazma, která pak odtéká do proximálního tubulu. (The Human Body, 1992).

Proximální tubulus je vystlán jednovrstevnatým epitelem a obepíná ho druhá síť kapilár. Probíhá zde reabsorpce do krve části vody, soli a dalších důležitých látek. Odpadní látky však zůstávají v moči, která se shromažďuje ve sběrném kanálku a odkud odtéká do ledvinné pánvičky (The Human Body, 1992).

Tvorba definitivní moči je ukončena na papile ledviny, odsud začíná odsun z organismu. Moč odchází skrz vývodné cesty močové, které jsou tvořeny kalichy a pánvičkami ledvin, močovody, močovým měchýřem a uretrou. Ve vývodných cestách močových jsou dva zásobníky moči. Menší je ledvinová pánvička a větší je močový měchýř (Trojan et al., 1994).

1.2.1 Funkce ledvin

Ledviny mají několik funkcí. Vylučují z těla škodlivé zplodiny metabolismu, cizorodé látky a také látky, které by mohly být využitelné, pakliže by nebyly v daný moment příliš koncentrované, např. ionty (Rokyta et al., 2000). Jde zejména o ureu, kreatinin, kyselinu močovou, metabolity hormonů, léků či léky jako takové (Racek et al., 2006).

Ledviny jsou dále důležité jako regulátor extracelulární tekutiny, zachovávají její stálý objem a složení, mají také vliv na regulaci krevního tlaku (Rokyta et al., 2000), mimo jiné i syntézou vazodilatačních faktorů (kininů, prostaglandinů) (Vokurka et al., 2005). Udržují tedy stálost vnitřního prostředí, to znamená osmotický tlak, koncentraci základních minerálů a vodíkových iontů (pH) (Racek et al., 2006).

Ledviny produkují i biologicky aktivní látky - hormony renin a erythropoetin, kalcitriol. Mají současně metabolickou funkci (Racek et al., 2006). Probíhá zde například glukogenese – tedy proces tvorby molekul glukózy z látek nesacharidové povahy (Fontana et al., 2016).

1.2.2 Vstřebávání jednotlivých látek v ledvinách

Voda - vstřebává se aktivně i pasivně. Pasivně v proximálním tubulu a aktivně v distálním tubulu v závislosti na stavu extracelulární tekutiny (ECT). Aktivní vstřebávání je řízeno hormonem vazopresinem (Rokyta et al., 2000), také ADH-tj. antidiuretickým hormonem (Antidiuretický hormon, 2015).

Sodík – vstřebává se pasivně i aktivně za pomoci Na/K pumpy. Zpětné vstřebávání Na⁺ iontů je řízeno hormonem aldosteronem. Spolu se sodíkem se resorbuje také voda a vylučuje draslík (Rokyta et al., 2000).

Draslík – vylučuje se výměnou za resorbovaný sodík v distálním tubulu a sběrném kanálku. Výdej K⁺ je řízen aldosteronem (Rokyta et al., 2000).

Chloridové ionty – většinou se vstřebávají společně s ionty Na⁺, v proximálním tubulu i pasivně (Rokyta et al., 2000).

Hydrogenkarbonátové ionty – vstřebávají se v závislosti na potřebách homeostázy jen aktivně (Rokyta et al., 2000).

Glukóza – jde o tzv. prahovou látku, kdy do určité hladiny glukózy v krvi (ledvinový práh, jehož hodnota je 8-10 mmol/l) je proximální tubulus schopný všchnu glukózu aktivně vstřebat. Pakliže dojde k překročení této hladiny, objevuje se glukóza v definitivní moči a dochází k tzv. glykosurii (Rokyta et al., 2000).

Proteiny – jsou filtrovány z plazmy do glomerulárního filtrátu v množství asi 30 g denně. Jsou příliš velké na to, aby se reabsorbovaly běžnými transportními mechanismy, dostávají se zpět do krve pinocytózou. Shromáždí se u kartáčového lemu membrány, jsou obemknuty a vpraveny dovnitř buňky. Tam jsou rozloženy na aminokyseliny a absorbovány do intersticiální tekutiny (Rokyta et al., 2000).

1.3 Moč

1.3.1 Tvorba moči

Moč je tvořena v ledvinách pomocí glomerulární filtrace, tubulární resorpce a tubulární sekrece. Množství látek, které jsou vylučovány močí, je řízeno podle aktuálních potřeb organismu. Při onemocnění organismu může docházet k úniku látek, které se za normálních okolností v moči nevyskytují (Homolka et al., 1984).

U zdravého dospělého člověka protéká ledvinami zhruba 1 700 l krve za 24 hodin, to odpovídá 1 200 ml krve za minutu. Velký průtok ledvinami je důležitý pro dostatečnou renální filtraci a tím odstraňování odpadních látek z krve. Za den se vytvoří a přefiltruje cca 180 l ultrafiltrátu (primární moči) a utvoří zhruba 1,5 l definitivní hypertonické moči (Rokyta, 2000). Složení primární moči (glomerulárního filtrátu) je velmi podobné složení plazmy, ale bez většiny bílkovin. V dalších úsecích, tedy při průchodu proximálním a distálním tubulem a Henleho kličkou se moč zahušťuje, dochází k reabsorpci potřebných látek pro organismus. V tubulech se dále resorbují a dochází k sekreci minerálů tak, aby byla zachována stálost vnitřního prostředí (Racek et al., 2006).

Finálním produktem ledvinného parenchymu je tzv. definitivní moč. Moč je typicky zápachající, čirá kapalina, která je zbarvena zlatožlutě urochromem. Její specifická hmotnost se pohybuje okolo 1 003 až 1 038 kg/m³. Moč je většinou lehce kyselá, ale pH se může být v rozmezí od 4,5 do 8,0. Obsahuje kreatinin, vápník, zhruba 135 mmol/l chloru, 25 – 100 mmol/l draslíku, 100 – 250 mmol/l sodíku. Dále se zde vyskytuje urea, kyselina močová, amyláza, kyselina vanilmandlová jakožto zbytek po odbourávání katecholaminů a další látky. Při normální diuréze se vyloučí 55 – 70 g pevných látek za 24 hodin. V moči zdravého člověka se ovšem vyskytuje bilirubin, glukóza i bílkoviny ve stopovém množství. (Rokyta et al., 2000).

1.3.2 Fyziologie vylučování bílkovin do moči

Glomerulární bazální membrána efektivně brání průniku bílkovin na základě jejich molekulové hmotnosti (velikosti), dále na základě tvaru a náboje - pomocí usnadnění vylučování kationických a ztížení vylučování anionických bílkovin (Žabka, 2008).

Proteiny s molekulovou hmotností větší než albumin (tedy 69 kD, efektivního průměru 3,6 nm) pronikají do moči velice zřídka. V glomerulární bazální membráně je velké množství proteoglykanů, které fungují jako polyanionty. Díky tomu pak pronikají do moči nejnáze bílkoviny s převahou bazických aminokyselin. Za fyziologického pH se většina plazmatických bílkovin (např. albumin) chová jako polyanionty (Žabka, 2008).

Bílkoviny s nízkou molekulární hmotností, které jsou filtrovány v glomerulech, jsou vstřebávány a dále katabolizovány (degradovány na peptidy a aminokyseliny) v proximálním tubulu (Žabka, 2008).

Jejich nález v moči je tak minimální. Při normálním průtoku krve zdravými ledvinami (1,2 l/min) proteče asi 40–45 kg albuminu za 24 hodin. Z tohoto množství se do ultrafiltrátu dostane cca 2–3 g albuminu. 99% profiltrovaného albuminu je však katabolizováno v tubulech, takže močí se obvykle vyloučí méně než 30 mg albuminu denně (Tesař et al., 2014).

Hodnoty fyziologické proteinurie rozlišujeme pro daný typ bílkoviny. Nejvyšší podíl má tzv. Tamm-Horsfallův protein (uromodulin), což je mukoprotein, který je vylučován tubulárními buňkami v tlusté části vzestupného raménka Henleho kličky (jde o zhruba 30 – 50 mg/24 hod.). Dále je obsažen albumin (do 10 mg/24 hod.), IgG a sekreční IgA (okolo 10 – 15 mg/24 hod.) a volné řetězce imunoglobulinů (do 10 – 15 mg/24 hod.) (Tesař et al., 2014).

1.3.3 Definice proteinurie

Proteinurie je jeden ze symptomů, který doprovází onemocnění ledvin a je definována jako přítomnost bílkoviny v moči nad hodnotu 150 – 200 mg za 24 hodin (Teplan, 2013). Obvykle rutinním vyšetřením moči tuto hladinu neprokážeme (Vokurka, 2005). Při běžné svalové aktivitě fyziologická proteinurie nepřesáhne hladinu 50 – 80 mg denně, při větší svalové zátěži, prolongované ortostáze a sníženém příjmu tekutin může být vyšší. Podle posledních prací je propustnost kapilární stěny glomerulu podstatně vyšší než se obecně předpokládalo. Vzhledem k vysoce efektivní tubulární resorpci je u zdravých osob přítomno jen minimum albuminu (Tesař et al., 2014).

1.3.4 Formy proteinurie

Dělení dle lokality vzniku proteinurie

Proteinurie glomerulární (renální) - její vznik je na základě nefunkční glomerulární membrány (Teplan, 2013). Může být způsobena ztrátou negativního náboje bazální membrány glomerulu, kdy důsledkem je hlavně albuminurie. Je typická u tzv. nefrotického syndromu a jde o tzv. selektivní proteinurii, dochází ke ztrátě selektivity podle náboje. Vzniká také těžším poškozením glomerulární membrány se vznikem velkých defektů. Následkem toho dochází ke ztrátě selektivity dle velikosti, procházejí bílkoviny s velkou molekulovou hmotností (Tesař et al., 2014).

Proteinurie tubulární (renální) - dochází k ní v případě nedostatečného vstřebávání nízkomolekulární bílkoviny a albuminu v tubulech (Teplan, 2013). V proximálním tubulu může být příznakem tubulointersticiální nefropatie, např. na podkladě pyonefritidy nebo jako projev tzv. Fanconiho syndromu u kupř. mnohočetného myelomu či Wilsonovy choroby, dále následkem toxického poškození (gentamycinem, rtuť, kadmium, NSAID), při ischemii, metabolických dysbalancí, při hyperurikémii, hyperkalcémii, hypokalémii. Tubulární proteinurie vzniká i na základě překročení maximální tubulární resorpční kapacity buněk proximálního tubulu, když dojde k vyšší koncentraci jiných resorbovatelných proteinů (např. imunoglobulinů, hemoglobinu, myoglobinu). V neposlední řadě se může projevit na podkladě metabolického poškození – při obstrukční uropatii, hyperoxalurii, hyperurikémii (Tesař et al., 2014).

Proteinurie smíšená - vzniká kombinací neselektivní glomerulární proteinurie a tubulární proteinurie, bývá projevem zániku většiny nefronů (Proteinurie, 2016).

Proteinurie prerenální - vzniká v důsledku zvýšené koncentrace v séru u některých bílkovin, které jsou schopné pronikat glomerulární membránou (Teplan, 2013). Hovoří se o ní jako o proteinurii z „přetékání“ - overflow proteinurii, kdy i za fyziologických podmínek mohou bílkoviny o nízké molekulové hmotnosti procházet do ultrafiltrátu. Glomerulární permeabilita bílkovin tak nemusí být porušena. Tubulární resorpce může být také normální, ale vzhledem ke zvýšené náloži část bílkovin uniká do moči, protože je překročena resorpční kapacita proximálního tubulu (Proteinurie, 2016). Patologicky jde např. o tzv. Bence-Jonesovu bílkovinu, která je nahromaděná v krevním séru při

myelomu (Teplan, 2013), hemoglobin u akutní hemolýzy, lysozym u některých druhů leukémie, u tkáňových katabolitů či eventuelně bílkovin akutní fáze (Tesař et al., 2014).

Proteinurie postrenální - je zapříčiněna stav, kdy dojde k přímému pronikání plazmy skrz cévy do moči (tzv. k extravazaci) ve vývodných cestách močových. Příčinou může být např. krvácení, nádorové onemocnění močové soustavy, propustnost podslizničních kapilár při zánětu močových cest (Teplan, 2013). Typická je zde přítomnost α 2-makroglobulinu IgM (Tesař et al., 2014), což jsou bílkoviny o vysoké molekulové hmotnosti, které neprojdou ani poškozenou glomerulární membránou (Marshall, Bangert, 2008).

Artificiální proteinurie- jde o průkaz cizorodé bílkoviny v moči, kterou si pacient do moči záměrně přidal. Nejčastěji jde o vaječný bílek, který lze prokázat elektroforeticky, případně imunochemicky (Tesař et al., 2014).

Dělení dle kvantity proteinurie

Při úniku bílkoviny močí do 1,5 g/24 hodin se užívá označení tzv. malá proteinurie. (Teplan, 2013). Například u infekce močových cest anebo u chronické pyelonefritidy se obvykle vylučuje jen něco okolo 1 g proteinu za 24 hodin (Teplan et al., 2007). Dochází-li ke ztrátě v rozmezí 1,5 až 3,5 g/24 hodin mluvíme o střední proteinurii a nad 3,5 g/24 hodin se jedná již o proteinurii velkou. Ta doprovází velmi závažná onemocnění, např. nefrotický syndrom, kde hladina bílkoviny v moči je často vyšší než 10 -20 g/24 hodin (Teplan, 2013). Může se však vyskytnout i u jedince s chronickou infekcí močových cest, nejčastěji pakliže jde o jedince postiženého diabetem na podkladě diabetické nefropatie (Teplan et al., 2007).

Další dělení proteinurie

Selektivní proteinurie se vyznačuje takřka pouze vylučováním albuminu, který má relativně nižší molekulární hmotnost. Jako neselektivní proteinurii chápeme situaci, kdy je do moči vylučován albumin, ale i jiné druhy globulinů o vysoké molekulární

hmotnosti, transferin, fibrinogen, hormony, vazebné bílkoviny pro vitaminy, atd. (Teplan, 2013).

1.3.5 Mikroalbuminurie

V brzkých stádiích některých onemocnění ledvin (hlavně u hypertenzní a diabetické nefropatie) dochází na základě hemodynamicko-morfologických změn k propouštění malého množství sérového albuminu do moči. To lze prokázat jen velmi citlivými diagnostickými metodami a takovouto proteinurii nazýváme mikroalbuminurií. Zdravý dospělý člověk nepřesáhne hodnotu 30 mg/24 hodin (tzn. 20 µg/min). Patologická hodnota se pohybuje v rozmezí 30–300 mg/24 hodin (tj. 20-200 µg/min). Při hodnotách nad 300 mg za den hovoříme o tzv. zjevné proteinurii a nebo makroalbuminurii. V této kvalitativní úrovni se jedná o ztráty většinou čistého albuminu (Žabka, 2007). Zvýšené hladiny albuminu v moči mohou také souviset s některými abnormalitami metabolismu lipidů, s různými poruchami imunity a rovněž mohou být způsobeny jinými stavy, například po intenzivní fyzické námaze, při infekci močového ústrojí, dehydrataci, po užívání léků nebo při přítomnosti krve v moči (Návod k použití, Siemens, ADVIA Chemistry, 2011).

Záchyt mikroalbuminurie je důležitý pro co nejčasnější zahájení léčby, což je zásadní z hlediska prognózy onemocnění (Teplan, 2013).

1.4 Vyšetření moči

Analýzou moči získáme mnoho informací o stavu organismu a jeho metabolismu. Vyšetření moči tak přispívá k diagnostice, sledování průběhu i výsledků léčby. Mezi základní vyšetření patří fyzikální, chemické vyšetření moči a morfologické vyšetření močových elementů (Levková, n.d.).

1.4.1 Fyzikální vyšetření moči

Pomocí fyzikálního vyšetření zjišťujeme objem moči, barvu, zápach, přítomnost zákalu a pěny, hustotu moči (Levková, n.d.).

Objem moči měříme pomocí odměrných válců. Diuréza je samozřejmě jiná u novorozenců, dětí nebo dospělých osob a je také významně ovlivněna příjmem tekutin a objemem vyloučené tekutiny (např. potem, stolicí) (Levková, n.d.).

Barva moči, závisí na objemu vyloučené moči, na přítomnosti pigmentů z potravy, přítomnosti léků a jiných patologických součástí (Levková, n.d.).

Zápach moči se vyšetřuje jen u čerstvě sebrané moči, při delším skladování se moč rozkládá a získává tak amoniakální zápach. Zápach je navíc zkreslen složením přijaté potravy, a tedy není podstatným ukazatelem pro stanovení diagnózy (Levková, n.d.).

Hodnocení zákalu provádíme pouze u čerstvé moči, protože stáním se může vysrážet mukoprotein. Při chladnutí se z moči uvolňují různé krystaly solí, v tomto případě zákal nemá patologický význam. Fyziologicky je moč čirá nebo jen velmi slabě zakalená přítomností fosfátů, urátů či mucinových látek (Levková, n.d.).

Pěna u moči je bezbarvá a rychle se ztrácí. Pokud je jí velké množství bílého a event. bezbarvého vzhledu, může ukazovat na proteinurii, glukosurii, ale rovněž i na špatně vypláchnutou sběrnou nádobu, ve které zůstaly zbytky saponátu. Žlutohnědá, žlutá a snadno zelenající pěna identifikuje bilirubin v moči, bublinky jsou příznakem infekce močových cest při současné glukosurii (Levková, n.d.).

Hustotu moči ovlivňuje množství pevných látek, které jsou vyloučeny močí, zejména močoviny a chloridů. Měříme ji urometrem, refraktometrem či nejlépe osmometrem (Levková, n.d.).

1.4.2 Chemické vyšetření moči

Chemické kvalitativní vyšetření provádíme pomocí zkumavkových testů, indikátorových tablet a nejběžněji diagnostickými proužky (Levková, n.d.). Mezi základní chemická vyšetření řadíme zjištění pH moči, přítomnost bílkovin, glukosy, žlučových barviv, ketolátek a krevních barviv v moči (Racek et al., 2006). Někdy je možné stanovovat obsah některých patologických složek moči, např. melaninů, alkaptonů, kyseliny fenylpyrohroznové, porfyrinů (Levková, n.d.).

Hladina bílkoviny a glukózy bývá v některých případech kvantifikována, mluvíme pak o kvantitativním vyšetření proteinurie a glykosurie (Racek et al., 2006).

Nejčastěji užívané diagnostické proužky jsou obvykle vyhodnocovány subjektivně okem. Existují také reflexní fotometry (v klinicko-biochemických laboratořích), které umožňují poloautomatické nebo dokonce i automatické zpracování a následně objektivní vyhodnocení testovacích proužků (Racek et al., 2006). Testovací proužky jsou k dispozici v různých verzích, některé jednodušší hodnotící jeden klinicky významný analyt (např. proužky pro diabetiky), až po několik klinicky významných analytů jako jsou krev/erytrocyty/hemoglobin, glukóza, ketony, kyselina askorbová, proteiny, leukocyty, dusitany, pH, bilirubin, urobilinogen, specifická hmotnost moči (Diagnostické proužky, 2013). Při práci s proužky je třeba dodržet zejména krátkou dobu namáčení (cca 1 sekundu), aby nedošlo k vymytí reagentů a správnou dobu odečtu k jednotlivým parametrům. Důležité je také odstranění přebytku moči otřením hrany proužku o okraj nádoby s močí a uložení proužku do vodorovné polohy tak, aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých indikačních zón. Proužky chráníme před vlhkostí uzavřením v tubě, jednotlivých políček se rukou nedotýkáme (Racek et al., 2006).

1.4.3 Morfologické vyšetření močových sedimentů

Kvalitativní vyšetření močového sedimentu je možné provádět orientačně za pomoci diagnostických proužků (erytrocyty a leukocyty), případně u indikovaných případů kvantitativně pomocí mikroskopu (Masopust, 1998).

Na diagnostických proužkách se přítomnost krve projeví modrými až modrozelenými tečkami na ploše testovací plochy, volné krevní barvivo obarví zónu cele. Důkaz přítomnosti leukocytů se projeví modrozeleným zbarvením po 15 minutách. Proces obarvení je založen na specifické esterasové aktivitě bílých krvinek (Masopust, 1998).

Při pozitivním patologickém výsledku pomocí testovacích proužků je indikováno mikroskopické vyšetření močového sedimentu (Masopust, 1998). Zde je nutné dbát na správný postup odběru vzorku i na správnou techniku zpracování. Kvalitní vzorek ranní moči vyžaduje omezení příjmu tekutin před odběrem tak, aby nedošlo k přílišnému naředění moči a tím se nesnížila koncentrace bílkoviny v moči nebo počty buněčných elementů v sedimentu. Samotný odběr má probíhat po důkladné hygieně okolí zevní močové trubice, u žen je třeba vyloučit období menstruace (i krátce před či po ní). Sběr moči je možné provádět klasicky dle Addise (10 hodin sběru přepočtený na 24 hodin), ale tento způsob se v praxi již nevyužívá vzhledem k degradaci močových elementů v moči sbírané za delší časový úsek. I když Teplan (2013) upozorňuje, že pokud je vzorek zpracován co nejdříve po odběru, maximálně do jedné hodiny z důvodu hrožících infekcí vzorku ze zevního prostředí a z nebezpečí rozpadu buněčných elementů, je tato metoda možná.

V současné době se spíše než dřívější metoda určení průměrného počtu elementů v jednom zorném poli mikroskopu při definovaném zvětšení a zahuštění používá metoda průtokové cytometrie nebo vyhodnocení mikroskopického obrazu pomocí počítače. Výsledkem je údaj o počtu elementů v 1 μ l moči (Racek et al., 2006).

Při hodnocení močového sedimentu sledujeme přítomnost erytrocytů, leukocytů, epitelových buněk a válců (Levková, n.d.).

1.5 Vyšetřování celkové bílkoviny a albuminu v moči

Problematika vyšetření přítomnosti bílkoviny v moči je velmi složitý analytický úkol z důvodu široké škály plazmatických (prerenálních), renálních a postrenálních bílkovin s různým složením, v diametrálně rozdílných koncentracích, navíc na jejich odhalování může mít současně vliv objem diurézy a interference nebílkovinných složek moči. Koncentrace proteinů v moči může být za fyziologických i patologických okolností ovlivňována i procesy, které se na vlastní příčině proteinurie nepodílí, tj. hlavně prozatímními výkyvy renální hemodynamiky. Následkem tohoto se často stává, že výsledek může být falešně negativní a dále i pozitivní výsledek může být podhodnocen (Engliš, 2007).

Při záchytu i monitorování průběhu proteinurie se doporučuje vyšetření ze vzorku nejlépe první ranní nesbírané moči, která je nejvhodnější z důvodu nejlepší korelace mezi poměrem albuminu a kreatininu spolu s 24-hodinovým vylučováním albuminu. Není-li možné využít první ranní vzorek moči, je použitelný i jiný nesbíraný vzorek (Tesař et al., 2014). Stále častěji se také doporučuje použití druhého ranního vzorku moči, případně s korekcí výsledků kvantitativních stanovení na kreatininurii. Nevhodný je tento postup u dětí, kde je podezření na ortostatickou proteinurii. Může u nich totiž dojít k ortostaticky podmíněné proteinurii i několik minut po ranním přechodu do vzpřímené polohy (Teplan, 2006). Tuto proteinurii nazýváme také juvenilní proteinurií, protože se objevuje u rychle rostoucích dětí nejčastěji v prepubertálním období. Jedná se většinou o děti astenického typu postavy s bederní hyperlordózou. Proteinurie se objevuje ráno po přechodu do vzpřímené polohy, v noci mizí. Záleží však na fyzické aktivitě, ostatní výsledky vyšetření moče jsou fyziologické. Tento typ proteinurie obvykle mizí okolo 20. roku věku (Racek et al., 2006).

Na proteinuriích se nejčastěji podílejí bílkoviny, které jsou poměrně stabilní při pokojové teplotě, chemickou konzervací není třeba použít. Platí zde, že vzorek by měl být do dvou hodin vyšetřen, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi a ovlivnění výsledků rozpadem přítomných buněk (Teplan, 2006).

Kvantitativní proteinurie je vyjadřována jako poměr proteinu a kreatininu v moči (PCR). Vzhledem ke skutečnosti, že nejčastějšími příčinami chronického onemocnění ledvin dospělé populace jsou hypertenze, diabetes mellitus a chronická

glomerulonefritis, které se někdy projevují jen mírně zvýšenou exkrecí albuminu, je lépe stanovovat koncentraci albuminu a výsledek měření vyjadřovat jako poměr albuminu a kreatininu v moči (ACR) (Tesař et al., 2014).

1.5.1 Chemické vyšetření pomocí testovacích proužků

Metodou první volby jsou testovací proužky, které kromě jiného orientačně detekují bílkovinu v moči za předpokladu, je-li její koncentrace vyšší než 0,2 g/l. Výsledky závisí na výrobci proužků (Tesař et al., 2014). Proužky jsou citlivé zejména na albumin, méně citlivé na globuliny a velice málo citlivé na hemoglobin, glykoproteiny a na Bence- Jonesovu bílkovinu (Levková, n.d.). Proužkovou metodou nezachytíme přítomnost malého množství albuminu, při podezření na mikroalbuminurii provedeme imunochemické vyšetření na principu imunoturbidimetrie a nebo na imunochromatickém (Zima et al., 2007).

Diagnostické proužky fungují na principu využití chyby speciálního indikátoru, který se při pH menším než 3,5 barví žlutě, při pH vyšším než 3,5 se barva mění přes zelenou až do modré. Menší pH než 3,5 zajišťuje pufr, který je přítomen v indikační zóně. Pokud je ve vzorku obsažena bílkovina, váží se ionty vodíku (H^+) na zásadité skupiny proteinů a zbarvení se mění do zelena až modra (Levková, n.d.).

1.5.2 Srážecí reakce

Stanovení bílkoviny v moči je možné i dříve používanými metodami, které jsou založené na srážecí reakci ve zkumavce. Jde o stanovení bílkoviny reakcí s kyselinou sulfosalicylovou, zkouškou s koncentrovanou kyselinou dusičnou a zkouškou varem (Levková, n.d.).

Použitím kyseliny sulfosalicylové dojde k vysrážení bílkoviny v moči a to se projeví zákalem až vznikem sraženiny. Pokud vyšetřovaná moč již před zkouškou není čirá, použijeme porovnání vzniklého zákalu s polovinou vzorku, který nebyl použit a byl pouze okyselen kapkou kyseliny octové. Jako reagentie se užívá 20% roztok kyseliny sulfosalicylové, vzniklý zákal se hodnotí proti tmavému pozadí a bočním světlem. Moč

nesmí být konzervována thymolem, stanovení ruší sulfonamidy, penicilin, kontrastní jodové látky vyloučené močí. Jednou z dalších nevýhod je neprůkaznost glykoproteinů, k jejichž zvýšenému vylučování dochází u zánětů. Naopak, může být zachycena i fyziologická proteinurie (od 20 mg/24 hod), která se projeví opalescencí (Levková, n.d.).

Tzv. Hellerova zkouška funguje na principu denaturace bílkovin s koncentrovanou kyselinou dusičnou. Na 1 ml koncentrované kyseliny dusičné navrstvíme po stěně zkumavky moč, která byla okyselena 30% kyselinou octovou. Pozitivní reakcí je vznik bílého prstence na rozhraní, někdy až sraženiny (Levková, n.d.).

Zkouška varem stanovuje bílkovinu denurací v prostředí octanového pufru, kdy dle koncentrace bílkoviny vznikne zákal až sraženina. Chybou při vyšetření je nedostatečný var, nedostatečné okyselení i přebytek kyseliny octové (rozpustí zákal) i přítomnost léků. Tato metoda se rovněž může použít k deproteinaci moči za účelem analýzy látek, u kterých by přítomnost bílkoviny byla překážkou (Levková, n.d.).

Důkaz Bence-Jonesovy bílkoviny, která může být vylučována do moči při některých mnohočetných myelomech, lymfosarkomu, makroglobulinemii býval v minulosti stanovován koagulací v úzkém rozmezí teplot (40-70°C), neboť je za horka rozpustná. Moč se okyselila 30% kyselinou octovou, v případě pozitivní reakce se při teplotě 50-60°C objevil zákal, který při zvyšování teploty zmizel a při chladnutí se zase objevil. V současné praxi je využíván imunochemický průkaz (Levková, n.d.).

1.5.3 Biuretová metoda

V rutinním provozu se nejčastěji jako kvalitativní metoda stanovení celkové bílkoviny užívá biuretová metoda. Jde o vyšetření poměrně jednoduché, avšak nevýhodou je nedostatečná citlivost u biologického materiálu s malou koncentrací celkové bílkoviny (např. mozkomíšní mok, moč) a je tedy doporučena spíše pro stanovení celkové bílkoviny v séru (Čermáková et al., 2005).

Principem je reakce Cu^{2+} v alkalickém prostředí s bílkovinou nebo jejími štěpnými produkty (peptony a polypeptidy). Sloučeniny, obsahující v molekule 2 a více amidových nebo peptidových vazeb poskytují s Cu^{2+} ionty charakteristické

červenofialově zbarvení, které je dané komplexní měďnatou solí. Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu peptidových vazeb. Měří se fotometricky při 545 nm. Název reakce je odvozen od „biuretu“, názvu sloučeniny ($\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$), která vzniká tepelnou úpravou ze dvou molekul močoviny (Kraml et al., 2000). Pro použití této metody ke stanovení celkové bílkoviny v moči je nutné užít kyselinu trichloroctovou k vysrážení bílkoviny. Sraženina se následně oddělí centrifugací a rozpustí v biuretanovém činidle. Před fotometrováním je potřeba zabránit styku s přímým světlem (Čermáková et al., 2005).

1.5.4 Imunochemické metody

Pomocí imunoanalytických metod je možné stanovit bílkoviny, léky, hormony, markery nádorových onemocnění aj. Jejich velkou předností je vysoká citlivost a specifita (Čermáková et al., 2005). Jsou založené na reakci mezi antigenem a protilátkou, v tomto případě jsou bílkoviny jako antigeny. Reakcí vznikne imunokomplex, tedy precipitát. Množství precipitátu je závislé na poměru antigenu a protilátky (Ferenčík et al., 1981).

V klinické biochemii se používají hlavně turbidimetrie a nefelometrie. Jsou to optické metody vhodné pro stanovení specifických proteinů (Doležalová et al., 1995). Imunoturbidimetrie je využívána zejména pro stanovení albuminu v moči – tzv. mikroalbuminurii (Králová et al., 2001). Metoda využívá měření stupně zákalu čili turbidituv případě, že se měří intenzita světla procházejícího vzorkem v původním směru. Nefelometrie je k turbidimetrii zrcadlová, měří také intenzitu světla, ale rozptýleného pod určitým úhlem (90° a $31-35^\circ$ u laserových nefelometrů). Koncentrace se odečítá z kalibračního grafu, který je stanoven na základě současně prováděné analýzy standardních roztoků (Doležalová et al., 1995).

Metoda je založena na tzv. Tyndallově jevu, kdy dojde k difúznímu rozptylu světla, pokud paprsek prochází prostředím, které málo absorbuje mikroskopické částice. Procházející paprsky jsou viditelné ve formě kužele, protože došlo k odklonu procházejícího světla. Množství rozptýleného světla závisí na mnoha proměnných, na koncentraci a velikosti částic, na vlnové délce světla (Doležalová et al., 1995).

Pro stabilitu imunokomplexu tvořícího zákal se přidává do reakční směsi ochranný koloid, nejčastěji polyethylenglykol (PEG). Intenzita zákalu je za definovaných podmínek přímo úměrná obsahu stanovované bílkoviny. Zákal je velmi jemný a měří se pomocí vysoce citlivých spektrofotometrů (Doležalová et al., 1995).

Pyrogalolová červeň se dnes užívá takřka nejčastěji ke kvantitativnímu stanovení celkové bílkoviny v moči. Metoda je založena na vazbě barviv, kdy společně s molybdenanem vytváří růžový komplex, který má absorpční maximum 470 nm. Když se bílkovina naváže na tento vytvořený komplex v kyselém prostředí, dojde ke zbarvení a absorpční maximum se posune do oblasti 600 nm (Proteinurie, 2016).

1.5.5 Elektroforéza bílkovin

Užitím elektroforézy bílkovin v moči lze stanovit typ proteinurie, resp. zda jde o selektivní glomerulární proteinurii či neselektivní, protože každá z těchto forem má i svůj specifický nálezný bílkovinných frakcí. Bílkoviny s menší molekulární hmotností (např. transferin, albumin) jsou charakteristické pro selektivní proteinurii, zatímco bílkoviny s molekulovou hmotností větší než 100 000 (např. imunoglobuliny) najdeme u neselektivní proteinurie (Čermáková et al., 2005). Je méně vypovídající u tubulárních proteinurií a neumožňuje jejich diferenciaci (Masopust, 1998).

Elektroforetické metody pracují na základě oddělení látek, buněk a jiných částic, které nesou elektrický náboj (ionty nebo amfolyty). Jde o tzv. separační metodu. V případě, že vystavíme tyto látky v určitém prostředí působení elektrického pole, začnou se molekuly látek pohybovat. Jejich pohyblivost je závislá na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, podmínek prostředí a síly elektrického pole. Velikost náboje ovlivňuje stupeň ionizace, pH a iontová síla prostředí (Ferenčík et al., 1981).

Pohyb molekul při elektroforéze probíhá na některém druhu nosiče – filtračním papíru (papírová elektroforéza), acetátcelulóze nebo gelu (agarózový, škrobový, polyakrylamidový gel). Některé gely (např. polyakrylamidový, škrobový) ovlivňují velikostí svých pórů dělení molekul, představují tak molekulární síto a omezují tím pohyb větších molekul (Kraml et al., 2000).

V elektrolytu nejprve rozpustíme látky nesoucí elektrický náboj a umístíme je mezi dvě elektrody. Následkem toho se začnou pohybovat konstantní rychlostí směrem dle svého náboje. Bílkoviny jako amfolyt nesou náboj podle pH prostředí, ve kterém se nalézají – v kyselém prostředí se chovají jako zásady (jejich náboj je kladný, v elektrickém poli putují ke katodě) a naopak v zásaditém prostředí (Doležalová et al., 1995).

Elektroforéza bílkovin v moči je nejčastěji prováděna za přítomnosti detergentu laurylsíranu sodného (SDS), který prostřednictvím svého záporného náboje nahradí vlastní náboj bílkoviny. Vzniklé komplexy jsou přibližně stejného tvaru a náboje, proto se v elektrickém poli budou dělit jen na základě velikosti svých molekul. Současně se za stejných podmínek posuzují vzorky se známými relativními hmotnostmi molekul, následně se porovná pohyblivost analyzovaných bílkovin v moči se standardními vzorky. K dělení se nejběžněji užívá nezahuštěná moč na fóliích s agarózovým gelem a v polyakrylamidovém gelu (PAAG) (Čermáková et al., 2005). Stabilita moče pro elektroforetické vyšetření je minimálně jeden týden při teplotě 2-8 °C, vzorky není vhodné mrazit (Tesař et al., 2014).

Analýza trvá asi 15 – 30 minut, kdy dojde k denuraci bílkoviny v gelu (většinou působením metanolu a kyseliny octové, aby se zabránilo jejich difuzi anebo vymytí z gelu v dalších fázích vyšetření. Následně se bílkoviny obarví vhodným organickým barvivem (např. amidočerní). Hodnocení probíhá pomocí denzitometrie. Světlo určité vlnové délky prochází štěrbinou na elektroforeogram, kde v místě frakci je částečně absorbováno záření. Posléze dochází k dopadu záření na čidlo a jeho převod na analogový záznam (Králová et al., 2001).

1.5.6 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou fyzikálně chemické dělicí metody, kdy se složky dělené směsi nanášejí na stacionární fázi, kterou přetéká mobilní fáze. Různá afinita složek ve směsi způsobuje, že dochází k strhávání složek v stacionární směsi pomocí mobilní fáze různou rychlostí, čímž se jednotlivé částice rozdělují. Následně jsou identifikovány právě podle různé pohyblivosti a chování při detekci (Ferenčík et al., 1981).

Tyto metody můžeme obecně rozdělit z hlediska použité mobilní fáze na plynnou, kdy mobilní fází je nosný plyn, fluidní, jež jako mobilní fází používá kapalinu v superkritickém či subkritickém stavu, dále pak plazmovou, ve které je mobilní fází proud iontů a kapalinovou, kde mobilní fází je kapalina (Ferenčík et al., 1981).

Z hlediska formy stacionární fáze se dělí na sloupcovou, papírovou a chromatografii na tenkých vrstvách (Ferenčík et al., 1981). Při sloupcové je stacionární fáze uložena v tzv. chromatografických kolonách, tedy skleněných nebo kovových trubicích (Chromatografie, 2014). Dělená směs se nanáší navrch, případně dospod kolony, mobilní fáze se protlačuje skrz náplň hydrostatickým tlakem kapaliny. Při papírové chromatografii je jako stacionární fáze užívána celulóza či papír ze skleněných vláken. Chromatografie na tenkých vrstvách je podobná papírové. Dochází k průtoku mobilní fáze po skleněné či hliníkové desce vlivem kapilárních sil nebo i hydrostatickým tlakem kapaliny, kdy stacionární fáze je nanesena ve formě suspenze čímž vytvoří tenkou vrstvu (Ferenčík et al., 1981).

Podle fyzikálního principu členíme chromatografii ještě na rozdělovací, absorpční, iontově výměnnou (ionexovou), gelovou a afinitní (Chromatografie, 2014).

Chromatografie je především analytická metoda užívaná na dělení látek, zároveň je však schopna pomoci při jejich identifikaci a kvantitativním stanovení. V praxi se jednotlivé druhy chromatografie kombinují tak, aby došlo k co nejúčinnějšímu rozdělení potřebné látky (Ferenčík et al., 1981).

V souvislosti s vyšetřením proteinurie je třeba zmínit vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), která je jednou z forem kapalinové chromatografie, při které má sloupec náplně průměr 2 – 8 mm. Částice, které tvoří náplň, mají průměr od 5 do 50 μm a lineární rychlost mobilní fáze je od 0,1 do 10 cm/s na rozdíl od klasické kapalinové chromatografie, kde průměr sloupce je 1 cm a víc a lineární rychlost mobilní fáze je menší než 0,02 cm/s. Vysoká lineární rychlost mobilní fáze je dosahována pomocí užití vysokého tlaku (desítky atmosfér), pod kterým se protlačuje eluční činidlo přes náplň. Někdy je také nazývána vysokotlakou kapalinovou chromatografií, její účinnost se vyjadřuje počtem teoretických pater za sekundu a je ovlivňována délkou náplně, velikostí částic náplně a rychlostí mobilní fáze (Ferenčík et al., 1981).

Kapalinový chromatograf se obecně skládá ze zásobníku mobilní fáze, odplynovače, dávkovače, vysokotlakého čerpadla (desítky atmosfér), kolony a detektoru. Může mít řadu obměn, některé zařízení je možné dodat a jiné naopak odebrat. V tomto sloupcovém uspořádání může kolona pracovat na jakémkoliv separačním principu (iontoměnič, reversní fáze, gelová permeační chromatografie, absorpční chromatografie atd.) (Kodíček, 2004, s. 80).

Pomocí kapalinové chromatografie je vhodné prokázat např. mikroalbuminurii, která bývá nedostatečně průkazná běžným imunochemickým vyšetřením z hlediska schopnosti zachytit změněnou molekulu albuminu. Vyšetření se neužívá běžně, je ho třeba pravidelně opakovat v intervalu asi třech až šesti měsíců. Jako pozitivní nález se mikroalbuminurie hodnotí ze dvou až tří pozitivních výsledků (Jabor et al., 2008).

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo vyšetřit 29 vzorků moče, ve kterých byla zjišťována přítomnost bílkovin. Vyšetření probíhalo kvalitativně tzn. na základě následujících parametrů, použitím diagnostických proužků, zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou a elektroforézou a kvantitativně, tzn. prostřednictvím imunochemických metod. Dílčím cílem práce je fakt, že základní informace zjištěné z vyšetření moče byly analyzovány a interpretovány, taktéž porovnávány výsledky z některých metod měření proteinurie, což přispěje k porozumění problematice identifikace proteinurie pro budoucí práci zdravotního laboranta.

3 Metodika

Vyšetření moče na přítomnost bílkoviny jsem prováděla nejprve pomocí diagnostických proužků s odečtem výsledků vizuálně, následně pomocí analyzátoru a zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou. Po centrifugaci vzorků byl použit přístroj ADVIA Chemistry (obr. 1), který vyhodnocuje hladiny celkové bílkoviny a albuminu. Některé ze vzorků byly vyšetřovány též elektroforeticky na přístroji Sebia.



Obr. 1 – Přístroj AdviaChemistry

3.1 Vyšetření pomocí testovacích proužků

Příprava vzorků

Vzorky moče byly připraveny k vyšetření v označených zkumavkách k tomuto určených, tedy v jednorázových, čistých a suchých plastových zkumavkách se žlutou zátkou, do kterých byla odebrána moč. Šlo o střední proud ranní moči, který měl být získán po důkladné hygieně genitálií a rukou. U kojenců je k odběru využíváno sběrných sáčků, u batolat a předškoláků se používá důkladně vymytého a vysušeného nočníku. Moč byla dopravena do laboratoře spolu se žádankou, která je označena stejným štítkem jako zkumavka a musí obsahovat následující údaje: jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, číselný kód diagnózy, označení zařízení, které požaduje vyšetření, kód zdravotní pojišťovny. Na žádance je mimo těchto údajů informace o požadovaném vyšetření. Údaje na zkumavce a žádance jsem nejprve pečlivě zkontrolovala. Moč před

samotným vyšetřením se dále neupravuje. Samotné vyšetření se provádí suchýma a čistýma rukama, laborant se chrání při práci rukavicemi na jedno použití.

Materiál

K analýze vzorků se využívaly testovací proužky Heptaphan firmy Erba Mannheim (obr. 2). Proužky detekují přítomnost bílkoviny, pH, glukózy, ketonů, urobilinogenu, bilirubinu, krve a hemoglobinu.



Obr. 2 – Testovací proužky

Analýza

Vyhodnocení vzorků se provádí porovnáním okem diagnostického proužku a stupnice. Nejprve se vzorek promíchá a po krátkém namočení (asi 1-2 s.) všech indikačních zón v moči jsem otřela hranu proužku tak, aby nedocházelo k vymývání reagensů, proužek je možné položit na podložku, která není savá. Po uplynutí 1 minuty jsem spolu s laborantkou odečítala výsledky dle přiložené stupnice. V případě přítomnosti bílkoviny se testovací zóny obarvila od žlutozelené barvy až do tmavě zelené či zelenomodré.

Testovací proužky je třeba chránit před možným znečištěním či vlhkostí úklidem zpět do tuby, taktéž je nutné dotýkat se pouze části, kde nejsou indikační zóny. Výsledek byl

zapsán do příloženého protokolu označeného jménem pacienta. Pakliže byla přítomna bílkovina, vzorek se dále vyšetřoval zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou.

Moč jsem dále vyšetřovala pomocí testovacích proužků v analyzátoch Arkray - Aution Max a IRIS iQ200 (viz obr. č. 3). Jedná se o linku, která se skládá z analyzátoru na chemickou analýzu moči Arkray-Aution MAX (měří glukózu, bílkovinu, bilirubin, urobilinogen, pH, specifickou hmotnost, peroxidázovou reakci, ketolátky, nitrity a leukocyty) a přístroje na automatizovanou mikroskopii IRIS IQ 200 (Pavličková, 2007).

Po promíchání vzorku analyzátor Arkay – Aution MAX automaticky pipetuje přesné množství moči na jednotlivá diagnostická políčka močového proužku, následně je barevná změna hodnocena reflektometricky. Výsledky jsou dále odesílány do analyzátoru IRIS IQ 200, kde po automatickém promíchání je nasáto přesné množství moči do průtokové komůrky a pomocí digitální kamery nasnímáno 500 obrázků. Počítač provede analýzu velikosti, kontrastu, tvaru a textury a částice je zařazena do jedné z 12 kategorií (erytrocyty, leukocyty, hyalinní válce, ostatní válce, dlaždicové epitelie, bakterie, kvasinky, krystaly, hlen, spermie a shluky leukocytů. (Pavličková, 2007). Výsledky jsem porovnála s měřením pomocí testovacích proužků odečítaným vizuálně.



Obr. 3 – analyzátoch Arkray - Aution Max a IRIS iQ200

3.2 *Vyšetření pomocí zkoušky s kyselinou sulfosalicylovou*

K potvrzení pozitivního výsledku bílkoviny v moči jsem dále používala zkoušku s kyselinou sulfosalicylovou, kdy do zkumavky byl odlit vzorek o objemu 2 ml. Následně jsem přidala 1-2 kapky roztoku kyseliny 5-sulfosalicylové (1mmol/l). Zkumavkou se opatrně zamíchá, posléze se proti tmavému pozadí prohlíží vzorek okem, zda je zakalen nebo vznikla-li sraženina. Doba odečítání je ihned (sraženina) až 10 min (opaleskující zákal). Výsledek se vyznačí do tabulky k personáliím pacienta.

3.3 *Imunochemické vyšetření*

Před vložením vzorků do plně automatického přístroje ADVIA Chemistry 1800, který analyzoval přítomnost albuminu a celkové bílkoviny, bylo potřeba moč zcentrifugovat. Do rotoru odstředivky jsem umístila sudý počet zkumavek (ať už plných močí nebo v případě lichého počtu, byla doplněna zkumavka s odpovídajícím množstvím vody pro vyvážení). Zkontrolovala jsem již přednastavené parametry nastavení počtu otáček za minutu, dobu odstředění. Poté byly vzorky přemístěny do přístroje ADVIA Chemistry.

Metoda využívaná přístrojem pro stanovení celkové bílkoviny je modifikací postupu s navázáním barviva. Používá se pro kvantitativní stanovení celkové bílkoviny v moči, nejlépe ze sběru za 24 hodin. Dle příručky přístroje je *detekcí této metody koncový bod a je založena na stanovení změny absorpce, ke které dochází, když se komplex pyrogalolová červeň – molybdenan váže na protonovanou formu zásaditých aminoskupin proteinů při kyselém pH. Nárůst absorpance při 596/694 nm je přímo úměrný koncentraci proteinu ve vzorku* (Návod k použití, Siemens, ADVIA Chemistry, 2011, s. 2).

Jako reagentie se používají komponenty dodávané v kitu, které jsou určeny pro určitý počet vyšetření. Jsou stabilní za podmínek skladování při teplotě mezi 15 až 25 °C až do data vyznačeného na obalu. Přístroj je rovněž nutno kalibrovat a to při nutnosti výměny čísla šarže činidla, po výměně důležité části optické nebo hydraulické, apod., minimálně však jedenkrát za 14 dní. Činidlo R1 nutné k vyšetření celkové bílkoviny je v tomto případě složeno z pyrogalolové červeně v koncentraci 79,8 µmol/l, molybdenanu sodného 91 µmol/l, pufru, detergentů a konzervační látky. Činidlem je nutno před

použitím jemně zakroužit, aby se odstranily bubliny a byla zajištěna homogenita činidla. Pakliže by byla přítomna pěna či bubliny, musí se před použitím odsát pomocí čisté pipety.

Další pomůcky jsou: zkumavky se vzorky, systémové roztoky, kalibrátor, kontrolní materiály pro řízení kvality měření, adaptéry lahvíček na činidlo, ev. pipeta. Vzorky moči jsem vložila do přenosného kruhového držáku, poté jsem je instalovala do přístroje a zapnula analýzu. Asi po 10 minutách byl hotov výsledek označený číselným kódem. Pakliže se vyskytl výsledek s přítomností celkové bílkoviny nad 1200 mg/l, přístroj po vyhodnocení vzorek dále ředí a proces trvá o dalších 10 – 11 minut déle.

Mikroalbuminurie vyšetřuje systém ADVIA Chemistry pomocí imunoturbidimetrie podporovaná PEG, která je schopná stanovit i velmi nízké hladiny albuminu v moči. Lze využít vzorek moči sbíraný 24 hodin i vzorek náhodný ze středního proudu moči. Je možné použít vzorky uchované maximálně 2 týdny při teplotě 4 °C či 5 měsíců při teplotě -70 °C. Vzorek, který obsahuje lidský albumin je naředěn, pak smíchám s antisérem tak, aby vytvořil precipitát, který lze měřit pomocí turbidimetrie při vlnové délce 340 nm. Následně vznikne křivka absorbancí standardů, podle které se stanoví koncentrace albuminu ve vzorku moči.

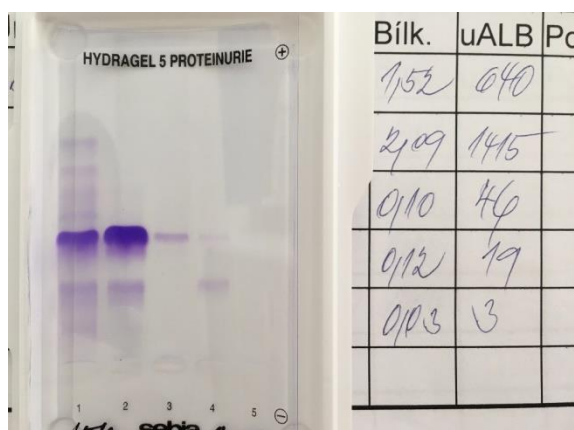
K analýze se využívá 2 činidel. První činidlo obsahuje polyethylenglykol v 6,00% koncentraci a NaN_3 v 0,09% koncentraci. Druhé činidlo se skládá s protilátky proti lidskému globulinu (kozy) v koncentraci, která je vždy dle šarže a NaN_3 v koncentraci 0,09 %. Činidla se připravují stejně jako v případě měření celkové bílkoviny u tohoto přístroje, tedy promícháním a odpipetováním případných bublin, skladují se při teplotě 2-8 °C až do data použitelnosti vytištěného na štítku.

Před analýzou se vzorky dobře promíchají a centrifugují, následně je postupováno stejně jako v případě měření celkové bílkoviny, resp. vyšetření celkové bílkoviny a albuminu se dělá rutinně současně z jednoho vzorku.

3.4 Elektroforéza

10 vzorků moči jsem vyšetřila elektroforeticky na přístroji Sebia., který pomocí separace jednotlivých močových bílkovin dle jejich molekulové hmotnosti odlišuje

bílkoviny tubulární od bílkovin glomerulárních. Na vyšetření se používá speciálního kitu HYDRAGEL PROTEINURIE 5 (obr. 4), který hodnotí - identifikuje proteinurii z nezahuštěné moči. Jedná se poloautomatizovaný systém, kdy automaticky je prováděna postupně elektroforetická migrace, sušení, barvení, odbarvování a konečné osušení gelové plotny. Ručně je třeba manipulovat se vzorky, gely, vkládat reagentie a spustit přístroj (Laboratorní příručka Sebia, 2014). Nejprve jsem do předem připravených zkumavek odpipetovala dle návodu diluent, následně jsem přidala vzorek moči. Po promíchání vždy po pěti vzorcích jsem získanou směs aplikovala pomocí pipety na agarózový gel. Následně bylo potřeba kápnout destilované vody 1 cm nad lištu v přístroji a vložit vzorky do držáku. Sebia po spuštění pracovala cca 2,5 hodiny, načež výsledek, který byl vytištěn, jsem porovnála vizuálně s proteinovými markery v referenční stopě, čímž jsem identifikovala typ proteinurie.



Obr. 4 – Hydrigel 5 proteinurie

Reagencie:

- agarózové gely: obsahují agarózu, tlumící roztok pH cca 7 a přídavné látky; jde o nosné medium pro elektroforézu moči
- pufované proužky: slouží jako rezervoár pufru pro elektroforézu a zajišťují kontakt mezi gelem a elektrodami
- kyselá violeť: obsahuje kyselý roztok (pH =2), kyselou violeť, ethylenglykol a přídavné látky; používá se k barvení gelů s rozdělenými bílkovinami po elektroforéze, je určen pro 10 gelů

- diluent: skládá se z tlumícího roztoku pH cca 7, bromfenolové modři a přídatných látek; slouží k ředění moči, modř je migračním a aplikačním markerem
- proužky filtračního papíru: pro odsátí přebytečné tekutiny
- fyziologický roztok: používá se pro ředění moči s vysokou koncentrací bílkoviny (nad 2 g/l)
- odbarvovací roztok: na odstraňování přebytečného množství barvy, odbarvuje se pozadí agarózové plotny
- promývací roztok: obsahuje tlumící roztok pH cca 8,7, slouží k promývání barvicí části cca 1 x za týden, používá-li se denně
- konzervační roztok: jde o 15 % roztok glycerinu v destilované vodě, využívá se k prevenci poškození gelu při sušení a skladování

Další pomůcky: univerzální držák gelu, pipety – 5 µl, 20 µl a 200 µl, markery molekulární hmotnosti.

Příprava vzorků: 20 µl disentu se přenesse na dno mikrozkuřavky, poté se přidá 80 µl čisté moči a 5 vteřin promíchá. Jestliže vzorek obsahuje více než 2 g/l bílkovin, ředí se fyziologickým roztokem.

Pracovní postup analýzy:

1. Migrace

Nejprve je třeba vybalit gel, jemně a rychle odsát přebytek tekutiny z jamek za použití filtračního papíru. Strip se musí umístit tak, aby byl zarovnan s jamkami. Potom se napipetuje 5 µl upraveného vzorku moči do každé jamky. Je třeba dát pozor, aby nedošlo k napipetování bublin a po každé aplikaci je třeba vyměnit špičku pipety či jí otřít. Také nesmí dojít k doteku dna jamek pipetou. Následně se otevře víko modulu, zvedne migrační rámeček s elektrodami a nosičem aplikátoru směrem vzhůru. Poté se nastaví příslušný program migrace pro jeden či dva gely. Dalším krokem je vyjmutí a aplikace stripů na výstupky elektrodového nosiče, nanesení 120 µl destilované či

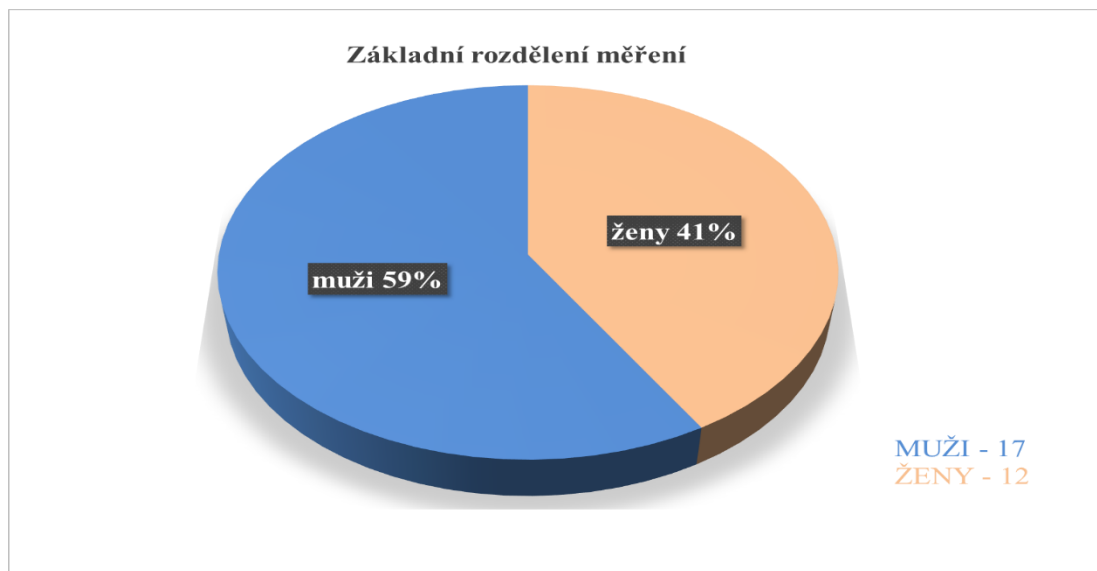
deionizované vody na dolní střední část rámečku vyznačeného na migrační plošině migračního modulu pro jeden gel nebo dvakrát, po 100 μ l na dolní pravou i levou polovinu při použití dvou gelů. Dále se opře gelová plotna o zarážku vyznačeného rámečku, gel se ohne a vloží do vody tak, aby se voda rozlila rovnoměrně pod celým gelem bez vzduchových bublin. Rámeček se poté sníží dolů tak, aby se pufrované stripy nedotýkaly gelu. Po uzavření víka modulu se zapne proces tlačítkem START (Laboratorní příručka Sebia, 2014).

2. Příprava zpracování gelu

Asi po 25 minutách, kdy Sebia pracuje, se ozve zvukový signál (krátké pípnutí) a je třeba přistoupit k následujícím krokům. Po otevření víka se zvedne migrační rámeček, vyjmou pufrované stripy a odstraní se. Následně je nutné vyjmout usušené gely, otřít elektrody a migrační plochu. Dále se vyjme držák gelu z barvicí komory, otevře se a umístí se gelová plotna do žlábků obou tyček a držák se uzavře a vloží do modulu na barvení a zpracování. Je třeba, aby byl již instalován barvicí roztok (300ml), odbarvovací roztok (1 litr), konzervační roztok (300 ml). Kontejner na odpad nesmí být plný. Dále se postupuje dle pokynů na obrazovce přístroje, zvolí se barvicí program „PROTEINURIE“ a stiskne zelená šipka pro start. Přístroj signalizuje ukončení práce zvukovým signálem, pak je možné vyjmout držák s gelem a odečítat výsledky (Laboratorní příručka Sebia, 2014).

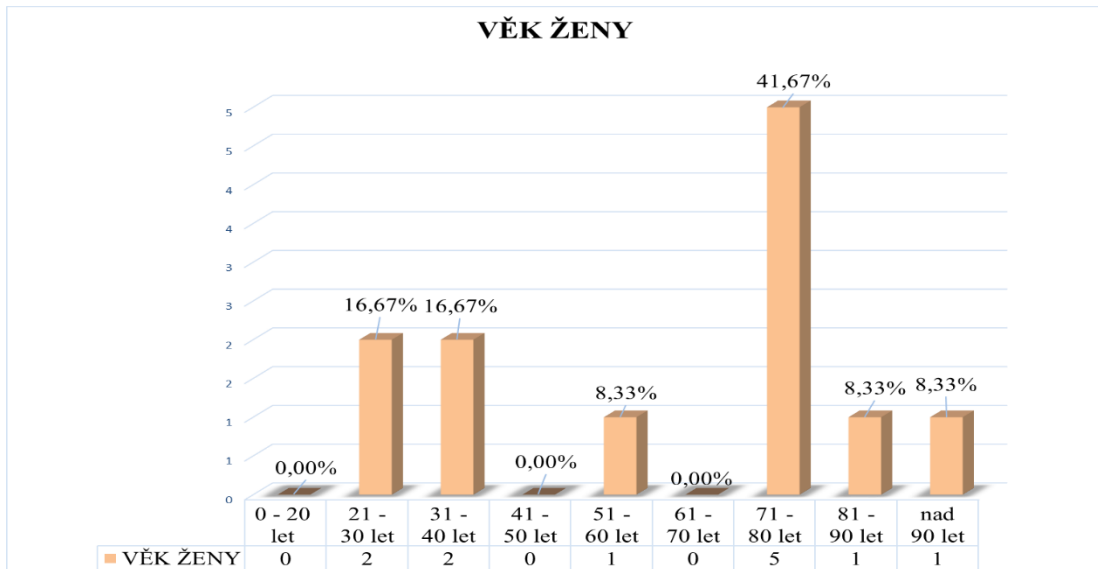
4 Výsledky

Základní rozdělení měření zkoumaných vzorků moči bylo podle množství a pohlaví. Bylo vyhodnocováno 29 vzorků moči, 12 vzorků (41%) patřilo ženám, 17 vzorků (59 %) bylo mužských (obr. 5).



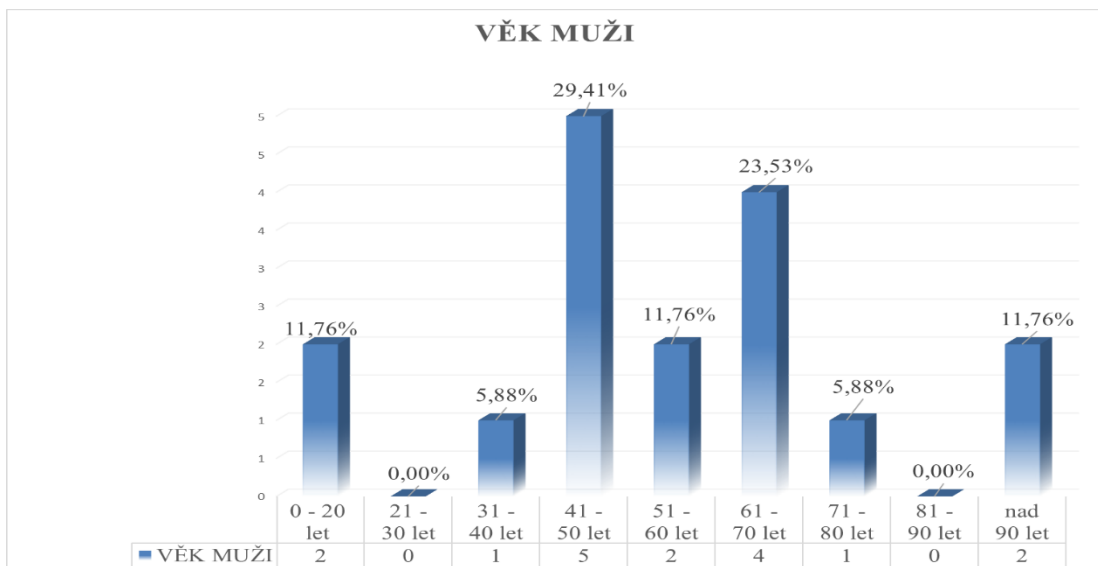
Obr. 5 - Graf rozdělení měření

Obr. 6 popisuje věk žen. Nejvíce (téměř 42%) jsem vyšetřovala moče žen ve věku mezi 71 až 80 lety, následně ve dvou skupinách, mezi 21 až 30 rokem věku a mezi 31 až 40 rokem (obojí 16,67%). Žádný vzorek nebyl u mladých do 20 let, dále v rozmezí věku 41 – 50 let a 61 – 70 let.



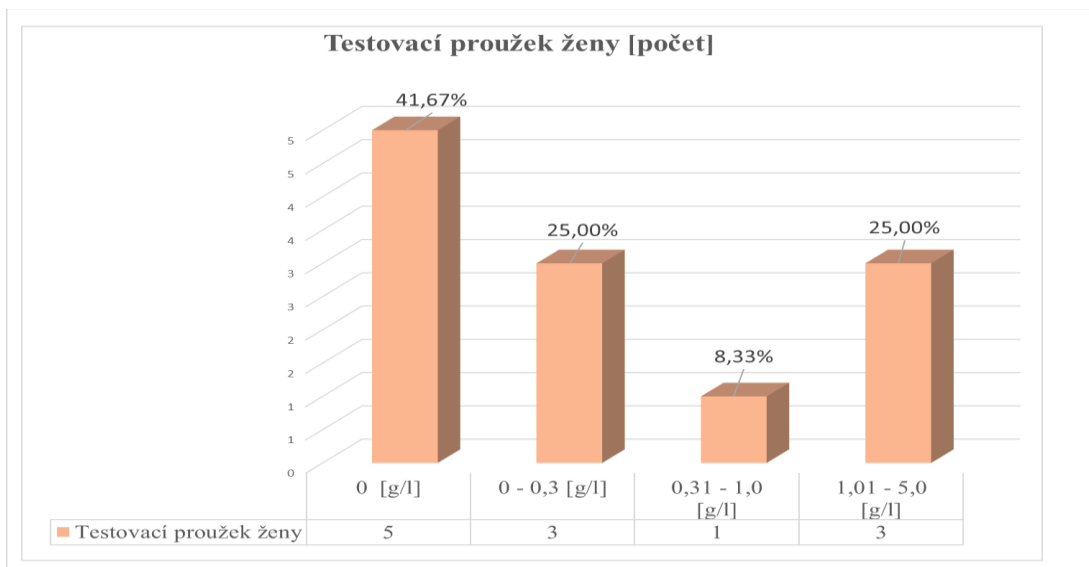
Obr. 6 - Graf zastoupení žen dle věku

U mužů bylo vyšetřováno nejvíce vzorků ve věku mezi 41 až 50 lety (29,41 %), dále pak ve věkové skupině od 61 do 70 let (23,53 %). Žádný vzorek nebyl u mladých od 21 do 30 let a v rozmezí věku 81 – 90 let (obr. 7).



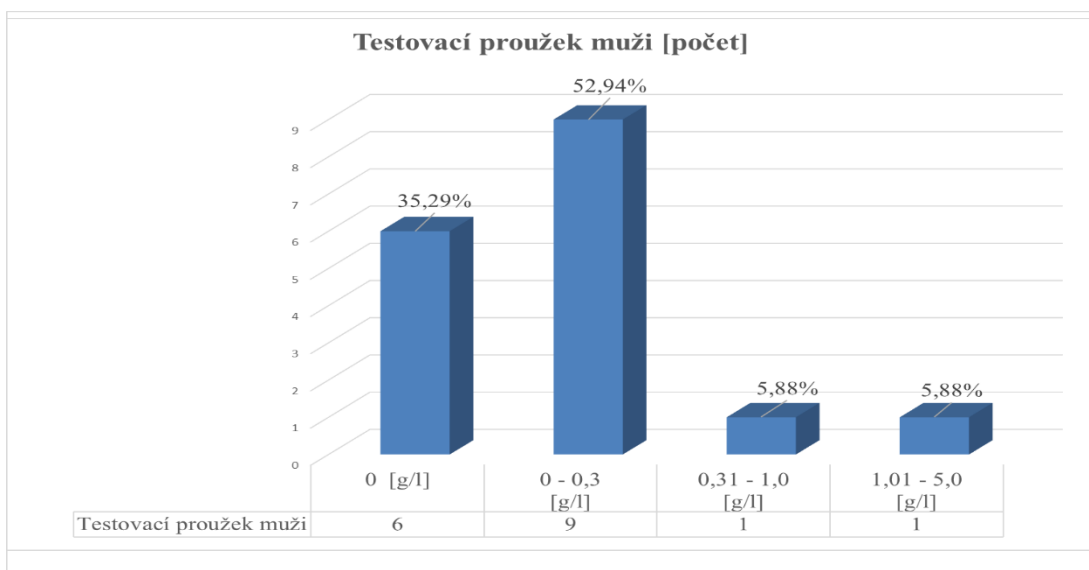
Obr. 7 - Graf zastoupení žen mužů dle věku

Vyšetření diagnostickými proužky vizuálně u žen popisuje obr. 8. Celkem 41,67 % vzorků bylo negativních (žlutá barva pole), 25 % obsahovalo od 0 do 0,3 g/l bílkoviny (světle zelená barva pole), 8,33 % vzorků vykazovalo 0,3 do 1,0 g/l bílkoviny (tmavě zelená barva pole) a 25 % vzorků čítalo 1,01 až 5 g/l proteinu.



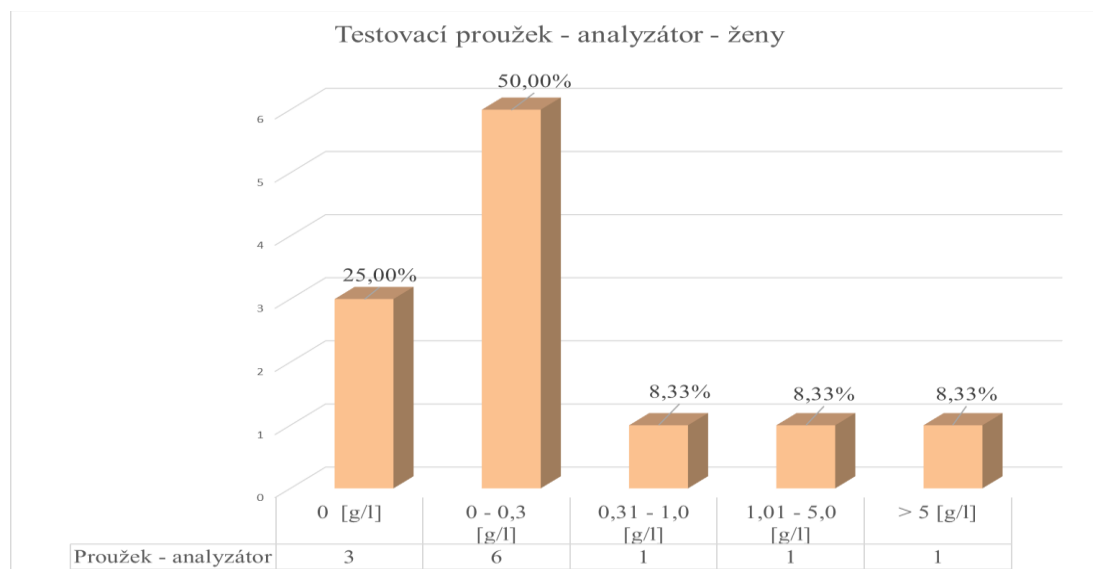
Obr. 8 - Graf výsledků diagnostickými proužky - ženy

U mužů testovací proužky odečítané vizuálně vykazovaly: 35,29% vzorků bylo negativních (žlutá barva pole), 52,94 % obsahovalo od 0 do 0,3 g/l bílkoviny (světle zelená barva pole), 5,88 % vzorků vykazovalo 0,3 do 1,0 g/l bílkoviny (tmavě zelená barva pole) a rovněž 5,88 % vzorků čítalo 1,01 až 5 g/l (obr. 9).



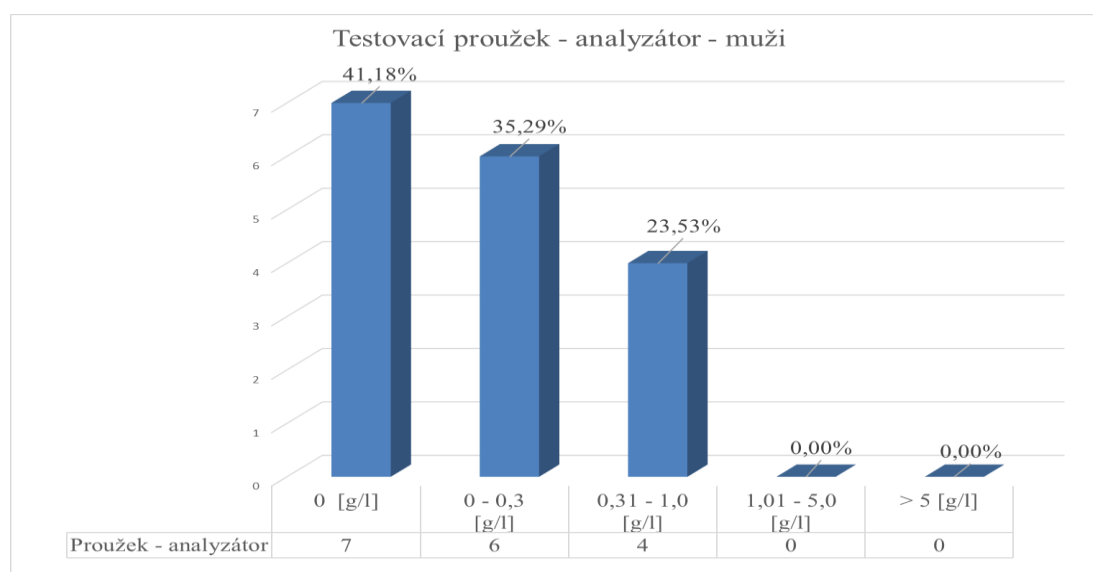
Obr. 9 - Graf výsledků diagnostickými proužky – muži

Na grafu č. 10 je možné sledovat výsledky měření bílkoviny v moči odečítané pomocí analyzátoru. Zajímavý se jeví výsledek s více než 5 g/l celkové bílkoviny, který u testovacích proužků není měřitelný.



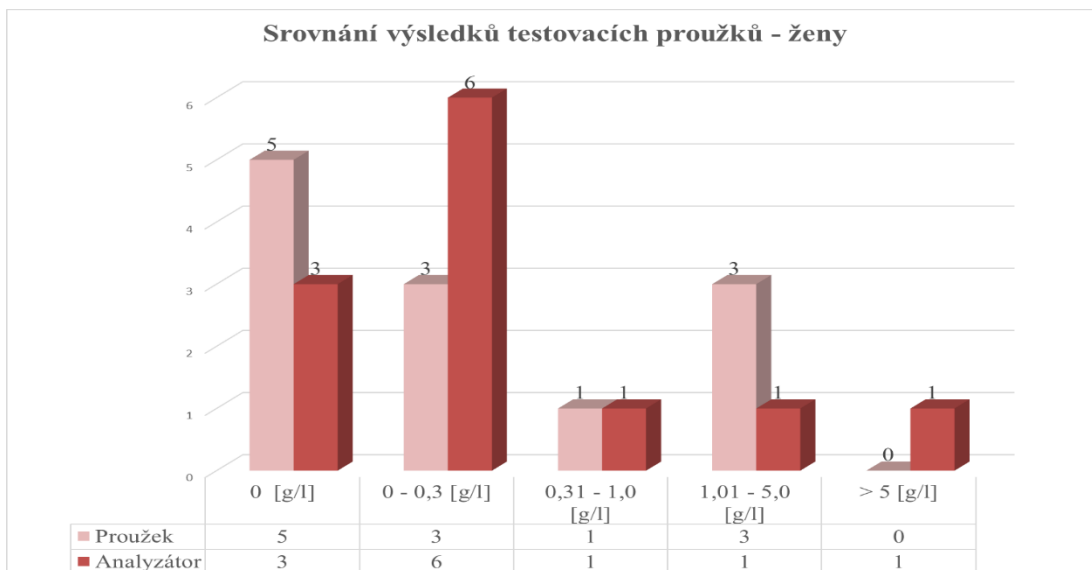
Obr. 10 - Graf výsledků diagnostickými proužky – analyzátor - ženy

Graf č. 11 znázorňuje výsledky měření bílkoviny v moči testovacími proužky u mužů s odečtem prováděným na analyzátoru. Nejvyšších hodnot je dosahováno v poli s negativními hodnotami (41,18 %), následuje 35,29 % vzorků s bílkovinou do 0,3 g/l, dále 23,53 % s výsledkem mezi 0,31 až 1,0 g/l.

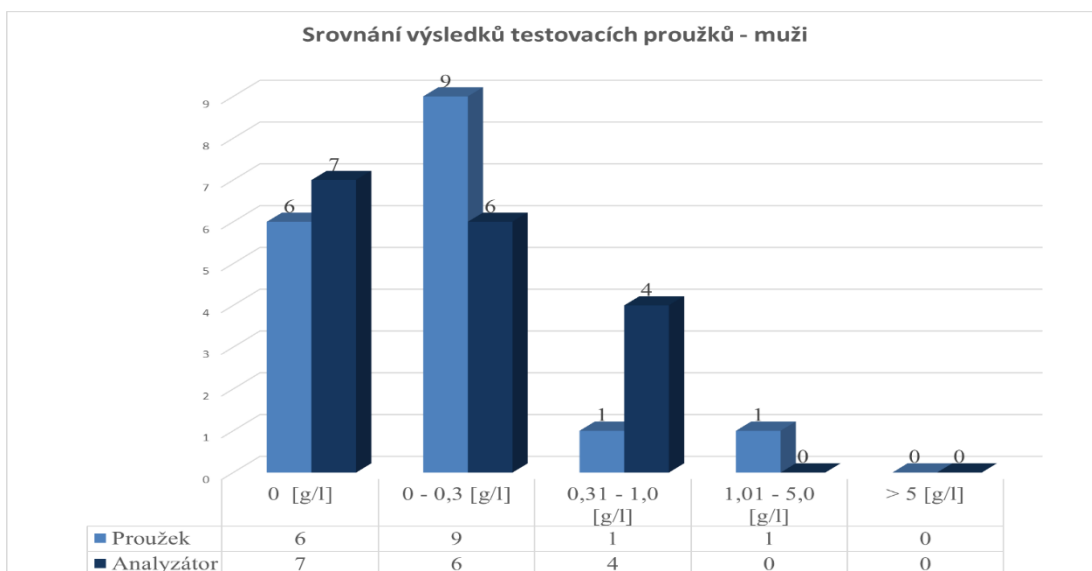


Obr. 11 - Graf výsledků diagnostickými proužky – analyzátor - muži

Porovnání výsledků vyšetření bílkoviny testovacími proužky vizuálně a za pomoci analyzátoru je graficky znázorněno na obr. č. 12 u žen a na obr. č. 13 u mužů.

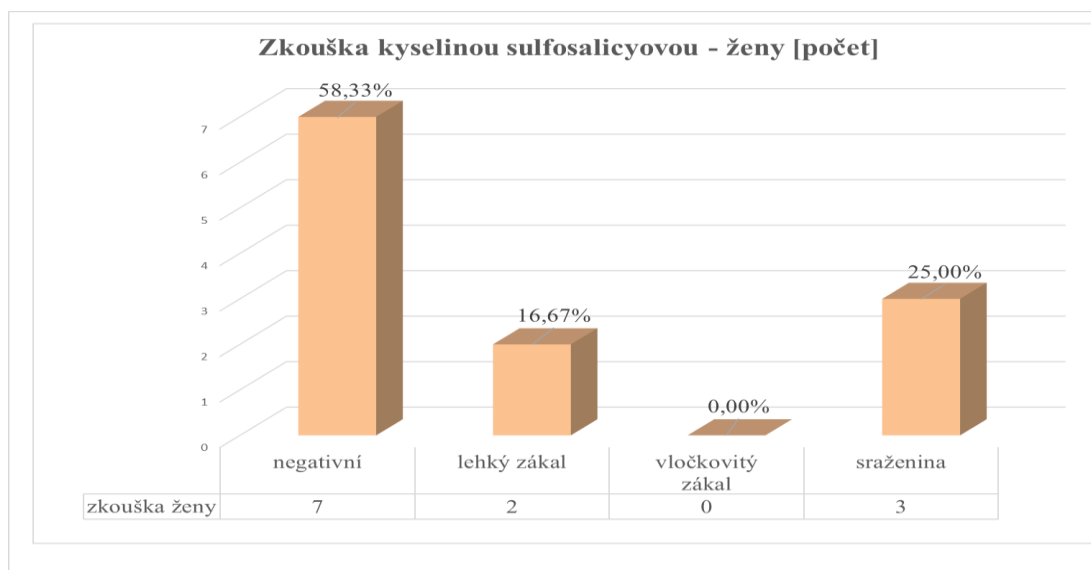


Obr. 12 - Graf srovnání výsledků diagnostickými proužky – ženy



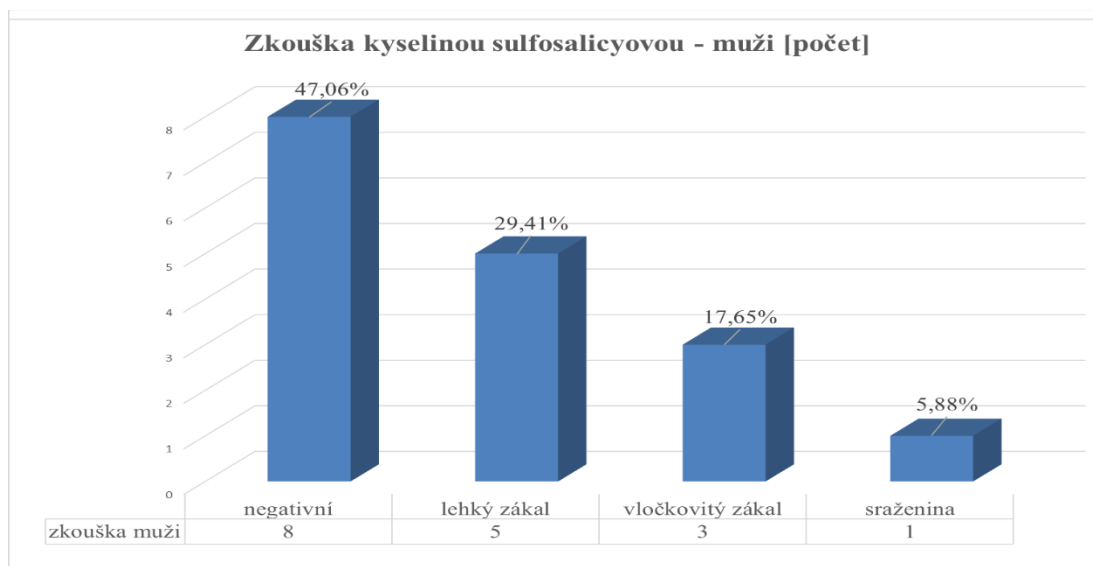
Obr. 13 - Graf srovnání výsledků diagnostickými proužky – muži

Na obr. 14 můžeme vidět výsledky měření proteinurie u žen pomocí zkoušky s kyselinou sulfosalicylovou. Nejvíce výsledků bylo negativních (58,33 %), 25 % vzorků vykazovalo sraženinu, u žádného vzorku se nevyskytl vločkovitý zákal.



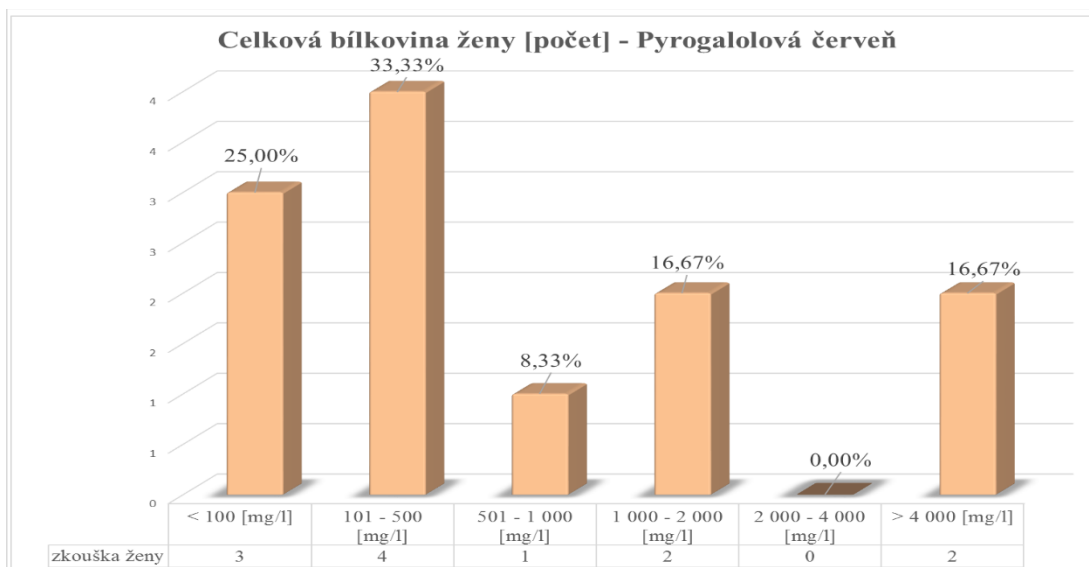
Obr. 14 - Graf výsledků zkouška kyselinou sulfosalicylovou – ženy

U mužů jeden ze vzorků prokázal nejtěžší možný výsledek - tvorbu sraženiny, stejně jako u žen byl nejčastější výsledek negativní – 47,06 % (obr. 15)



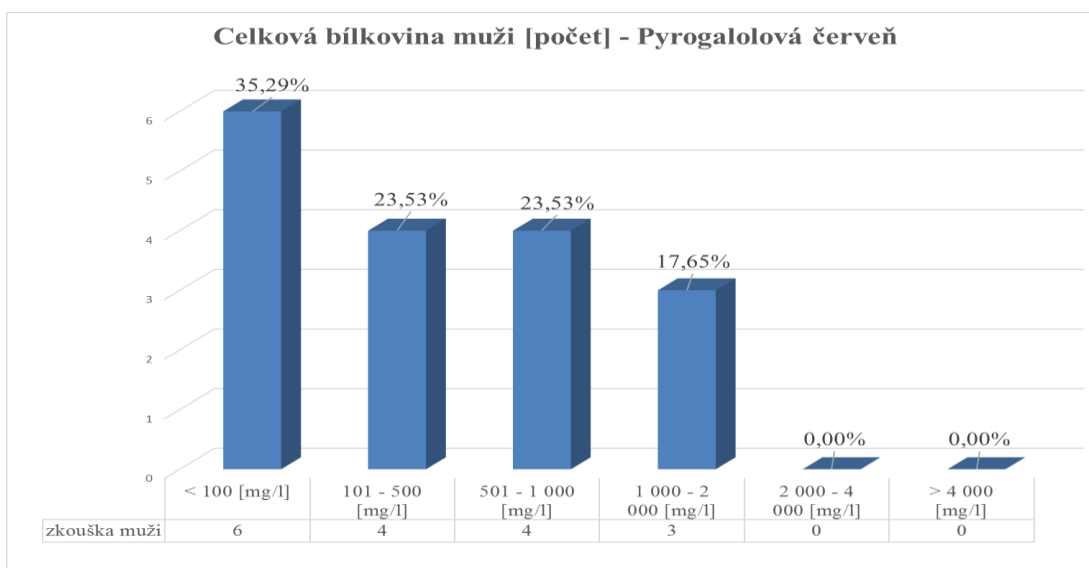
Obr. 15 - Graf výsledků zkouška kyselinou sulfosalicylovou – muži

Vyšetření celkové bílkoviny v moči u žen i mužů probíhalo pomocí přístroje ADVIA Chemistry za pomoci pyrogalolové červeně. U žen ze 12 vzorků 33,33 % obsahovalo 101 až 500 mg/l (tedy 0,101 až 0,5 g/l) a ani jeden vzorek nebyl v rozmezí 2000 až 4000 mg/l (2,0 až 4,0 g/l). (obr. 16).



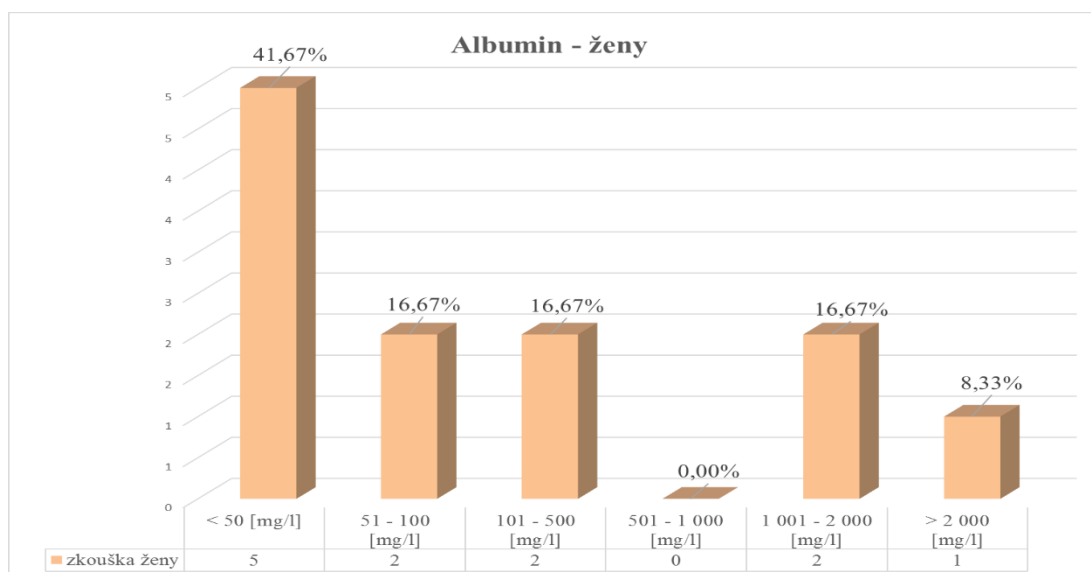
Obr. 16 - Graf vyšetření celkové bílkoviny – ženy

U mužů se celková bílkovina v moči (pyrogalolovou červení) v 35,29 % případů pohybovala do 100 mg/l. 23,53 % bylo shodně naměřeno v rozmezí od 101 mg/l do 500 mg/l a od 501 mg/l do 1000 mg/l. (obr. 17).



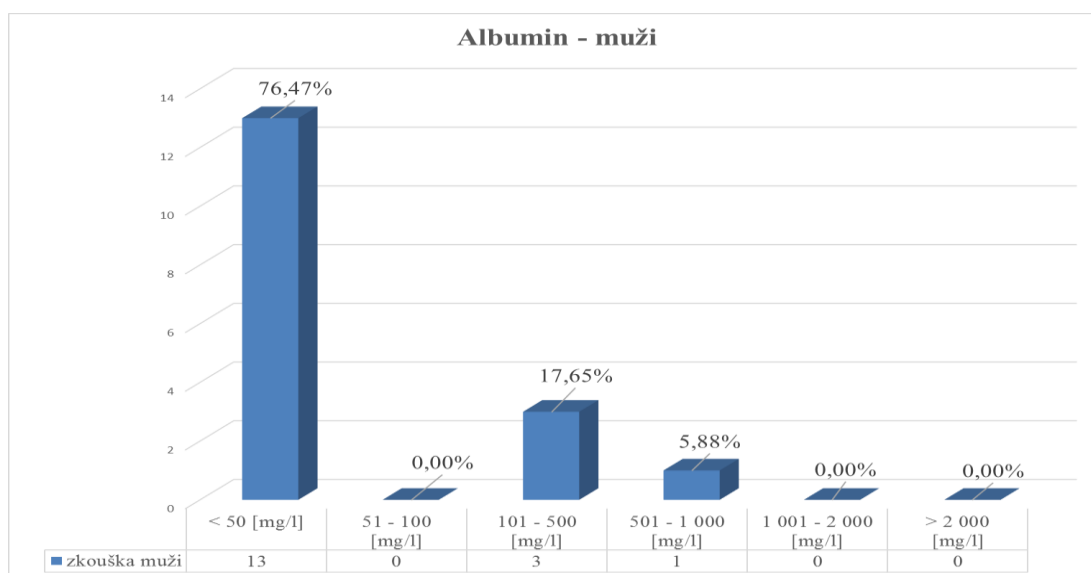
Obr. 17 - Graf vyšetření celkové bílkoviny – muži

Přítomnost albuminu v moči byla zjištěna imunoturbidimetrickým vyšetřením. Výsledky obsahu albuminu v moči u žen jsou patrné z obr. 18, kde nejčastěji byla prokázána hladina do 50 mg/l (41,67 %).



Obr. 18 - Graf vyšetření albuminu –ženy

V 76,47 % byla vykazována hodnota do 50 mg/l albuminu v moči u mužů, což je patrné z obr. č. 19.



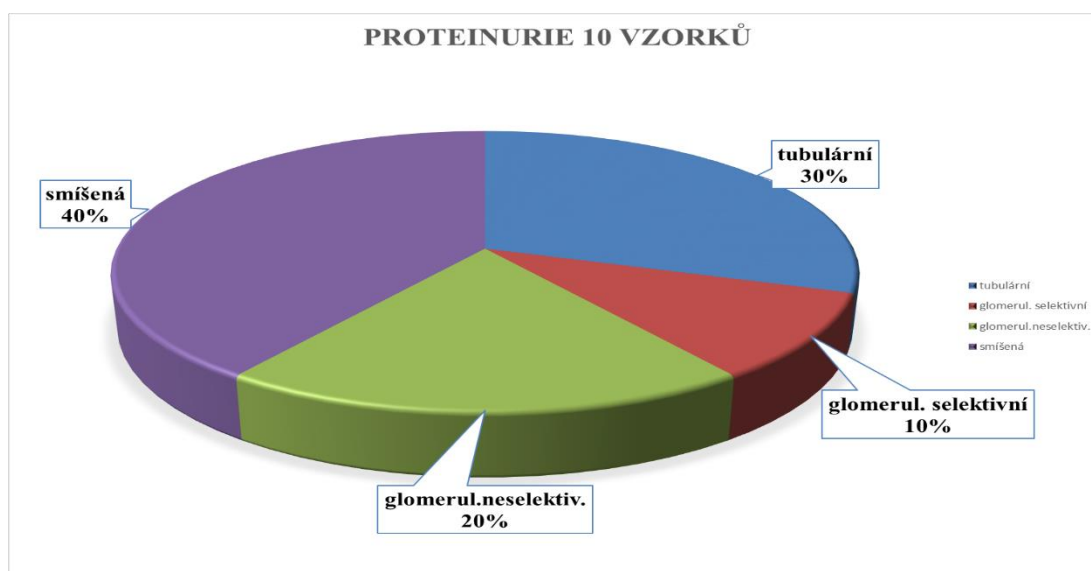
Obr. 19 - Graf vyšetření albuminu –muži

U 10 vzorků moči bylo provedeno elektroforetické vyšetření na agarózovém gelu. Naměřené hodnoty celkové bílkoviny a albuminu znázorňuje obrázek č. 20.

Elektroforéza - 10 vzorků SEBIA		
	celková bílkovina [g/l]	albumin [mg/l]
1.	0,61	11
2.	1,19	205
3.	0,76	243
4.	0,96	204
5.	0,92	32
6.	0,11	5
7.	0,18	122
8.	1,07	18
9.	0,46	155
10.	1,12	83

Obr. 20 – Tabulka výsledků elektroforézy 10 vzorků

U 20 % případů šlo o glomerulární neselektivní proteinurii, v 10 % případů o glomerulární selektivní a ve 40 % se jednalo o smíšenou proteinurii. V 30 % byla identifikována tubulární proteinurie (obr. 21).



Obr. 21 – Graf typů proteinurie z elektroforetického vyšetření

5 Diskuze

Průkaz a identifikace proteinurie je jednou z důležitých složek screeningu lidského zdraví, nicméně jde o rozsáhlou, mezioborovou a složitou problematiku, jež se neustále vyvíjí. Engliš ve své práci zdůrazňuje, že je tomu tak z důvodu širokého spektra plazmatických, renálních a postrenálních bílkovin s rozdílnými koncentracemi i s různým složením, z důvodu působení rozličných nepřímých vlivů kupř. výkyvů renální hemodynamiky, vlivu příjmu a výdeje tekutin, atd. Na základě těchto faktů může dojít k podhodnocení pozitivního výsledku nebo k falešně negativnímu výsledku (Engliš, 2007). V rámci bakalářské práce jsem se seznámila s často používanými metodami, diagnostikou pomocí testovacích proužků, zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou a se složitějšími přístrojovými analýzami pomocí imunochemických metod a elektroforézy. Velmi zajímavé bylo také porovnání vizuálního a automatického přístrojového kvalitativního vyšetření diagnostickými proužky.

Vyšetření diagnostickými proužky je jednoduché na provedení, snadno finančně dostupné, avšak je třeba mít zkušenosti s odečítáním výsledků. Dle Racka by bylo řešením použití speciálních fotometrů, které však nemohou být v každé ordinaci, ale spíše ve vybavených biochemických laboratořích (Racek et al., 2006). Při práci v laboratoři jsem měla možnost obě metody vyzkoušet a sledovat rozdíly v měření, které se dle mého názoru nejsou nezanedbatelné. Na druhou stranu vidím výhodu především v tom, že i samotný pacient si pomocí proužků, které mohou měřit jen několik dle onemocnění vybraných testovacích zón, rychle a snadno kontroluje např. průběh léčby. Dále se domnívám, že vzhledem k tomu, že se často využívají proužky s více analyty, dochází často k průkazu několika objektivních příznaků, což směřuje odborníky k rychlému určení následných vyšetření a následně k stanovení definitivní diagnózy. Také dle Tesaře et al., je citlivost na koncentraci a typ bílkovin závislá i na výrobci proužků. (Tesař et al., 2014). Levková dodává, že proužky jsou citlivé zejména na albumin, méně citlivé na globuliny a velice málo citlivé na hemoglobin, glykoproteinům a k Bence- Jonesově bílkovině (Levková, n.d.). Tesař et al. připomíná, že k falešně negativnímu výsledku může dojít i při dehydrataci, hematurii, alkalické moči a pH nad 8a také při kontaminaci dezinfekčními roztoky. Naopak falešně negativního výsledku je možno se dočkat při vylučování jiných bílkovin, než je albumin, které mohou omezeně reagovat s testovacími proužky (Tesař et al., 2014).

Proto se také při podezření na mikroalbuminurii provádí další vyšetřovací metody, jak uvádí Zima et al. na principu imunoturbidimetrie či imunochromatografie (Zima et al., 2007).

Vyšetření proteinurie zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou je rovněž jednoduchou a levnější metodou. Podle Levkové jde o velice citlivou metodu, nicméně neprokáže přítomnost glykoproteinů a také samozřejmě zachytí i fyziologickou proteinurii do 20 mg/ 24 hod. (po fyzické námaze), která se projeví opalescencí. Je však třeba myslet na možnosti interakce, které zkreslí výsledky vyšetření, např. po užití sulfonamidů, penicilínu, kontrastní jodové látky používané k mnohým radiodiagnostickým vyšetřením (Levková,n.d.).

Podstatně náročnějším vyšetřením se jeví analýza moči prostřednictvím imunochemických metod, avšak jde o metody s vysokou mírou citlivosti. Podle Tesaře et al. vykazují mez detekce 2 – 10 mg celkové bílkoviny na litr ve srovnání s analýzou pomocí testovacích proužků, kde mez detekce se pohybuje asi okolo 150 mg/l celkového proteinu. Tesař et al. ve své práci dále porovnává imunochemické vyšetření spolu s HPLC, kdy vysokoúčinná kapalinová chromatografie stanovuje výsledky systematicky vyšší než při imunochemickém vyšetření. Nicméně sděluje, že poslední výzkumy nasvědčují pro větší správnost ve prospěch imunochemických analýz, dále je třeba si dle autora uvědomit, že pro analýzu vzorků s vysokou celkovou bílkovinou je tato metoda nevhodná pro nebezpečí „hook efektu“ (Tesař et al., 2007), tj. zjednodušeně při velmi vysoké koncentraci zkoumané látky dojde k maximálnímu vyvázání protilátek na antigen a následně falešně negativnímu výsledku. V rámci této práce jsem se setkala s informací, která vysvětluje postup při řešení této problematiky. Pakliže by byla celková bílkovina nad 1200 mg/l, přístroj po vyhodnocení vzorek dále ředí a proces dále pokračuje.

Elektroforetické vyšetření moči jsem prováděla na 10 vybraných vzorcích, kdy jsem měla možnost vyzkoušet si využití této metody k identifikaci proteinurie. Šlo o metodu časově náročnou, jen přístrojové vyhodnocení trvalo zhruba 2,5 hodiny. Z práce Engliše vyplývá, že elektroforéza v gradientním polyakrylamidovém gelu v prostředí laurylsíranu sodného je metodou volby u elektroforetických metod, v České republice je prováděna přes 40 let. Je třeba podotknout, že kvantitativní stanovení vhodně zvolených tzv. „indikátorových“ bílkovin v moči je považováno za nejprogressivnější metodu

analýzy a identifikace proteinurie. Toto stanovení proteinurie i elektroforetické metody analýzy moči jsou dle Engliše v ČR ve srovnání se zeměmi západní Evropy a Skandinávie využívány málo (Engliš, 2007).

6 Závěr

Cílem této práce bylo vyšetřit chemicky 29 vzorků moči, ve kterých jsem zjišťovala přítomnost bílkovin a 10 vzorků moči za pomoci elektroforézy na agarózovém gelu.

Díky tomuto tématu jsem si při praxi v laboratoři prošla a osvojila práci s materiálem, od jeho příjmu až do vložení do analyzátoru a zaznamenání výsledku. Naučila jsem se několik metod na prokázání bílkoviny v moči. Vyhodnocení vzorků moči, při které byly použity dané metody, přispělo k porozumění problematice identifikace bílkovin v moči a dalšímu prohloubení informací pro práci zdravotního laboranta.

Výsledky jsem zpracovala ve formě grafů v kapitole 4, znázorňujících závěry měření pomocí testovacích proužků vizuálně a použitím analyzátoru, prostřednictvím zkoušky s kyselinou sulfosalicylovou, imunochemickým vyšetřením a nakonec elektrofereticky .

7 Seznam literatury

1. Antidiuretický hormon [online]. [30.3.2016]. Dostupné z https://cs.wikipedia.org/wiki/Antidiuretick%C3%BD_hormon
2. ČERMÁKOVÁ, M. a kolektiv autorů, Klinická biochemie 2. díl, Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005, s. 164
3. Diagnostické proužky [online]. 2013 [15.4.2016]. Dostupné z https://cs.wikipedia.org/wiki/Diagnostick%C3%A9_prou%C5%BEky_pro_anal%C3%BDzu_mo%C4%8Di
4. DOLEŽALOVÁ, V. a kol., Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, 4. přepracované vydání, Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 286
5. DUSÍKOVÁ, K., MAĎA, P., Vylučovací soustava a acidobazická rovnováha, rovnováha, Krevní oběh v ledvinách [online]. Praha: 3. Lékařská fakulta Univerzita Karlova, 2014 [26.3.2016] Dostupné z <http://fbt.cz/skripta/vii-vylucovací-soustava-a-acidobazicka-rovnovaha/2-krevni-obeh-v-ledvinach/>
6. ENGLIŠ, M., Současné možnosti vyšetřování proteinurií. In: Viklický, o., Dusilová-Sulková, S., Rychlík, I., Vyšetřovací metody v nefrologii a jejich klinická aplikace, Praha: Tigris, 2007, s. 13 – 15
7. FERENČÍK, M., ŠKÁRKA, B. a kol., Biochemické laboratorně metody, Bratislava: Alfa, 1981, s. 856
8. FONTANA, J., TRNKA, J., MAĎA, P., IVÁK, P. a kol., Přeměna látek a energie v těle, In: Funkce buněk a lidského těla. Multimediální skripta. [online]. 2015 [30.3.2016]. Dostupné z http://www.wikiskripta.eu/index.php/Tvorba_gluk%C3%B3zy
9. HOMOLKA, J., KULENDA, Z., MELÍK, E., Klinická biochemia Díl 1., Martin: OSVETA, 1984, s. 215
10. Chromatografie [online]. 2014 [20.4.2016]. Dostupné z <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chromatografie>

11. JABOR, A. a kol., Vnitřní prostředí, Praha: Grada Publishing, 2008, s. 530
12. KITTNAR, O. a kol., Lékařská fyziologie, Praha: Grada Publishing, 2011, s. 800
13. KODÍČEK, M., Biochemické pojmy, výkladový slovník, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, s. 171
14. Kolektiv autorů, z anglického originálu (The Human Body, Marshall Editions Limited, London 1989) přeložil Mgr. Jaroslav Hořejší a René Pahl), Bratislava: Gemini, 1992, 336 s.
15. KRAML, J. a kol., Návod y k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie, 2. vyd., Praha: Karolinum, 2000, s. 312
16. KRÁLOVÁ, B. a kol., Bioanalytické metody, 3. Přepřacované vydání, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, s. 254
17. Laboratorní příručka Sebia, Hydragel 5 proteinurie, 2014, s. 152
18. LEVKOVÁ, T., Cvičení z klinické biochemie I., Plzeň: Střední zdravotnická škola a vyšší zdravotnická škola v Plzni, s. 83
19. MARSHALL, W., BANGERT, S., Clinical Chemistry, Sixth edition, London: Mosby Elsevier, 2008, s. 416
20. MASOPUST, J., Klinická biochemie, Požadování a hodnocení biochemických vyšetření, 1. část, Praha: Karolinum, 1998, 429 s.
21. Návod k použití, Siemens, ADVIA Chemistry, 2011
22. PAVLÍČKOVÁ, M. a kol., Kompletní systém močové analýzy [online]. 2007 [6.8.2016] Dostupné z <http://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/kompletni-system-mocove-analyzy-301155>
23. PIESKAČOVÁ, 2010. Onemocnění ledvin. Základní pojmy, otázky a odpovědi [online]. Praha: 1. lékařská fakulta Univerzita Karlova, 2010 [25.3.2016] Dostupné z <http://nefr.lf1.cuni.cz/onemocneni-ledvin---zakladni-pojmy-otazky-a-odpovedi>
24. Proteinurie [online]. 2016 [12.4.2016]. Dostupné z <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Proteinurie>

25. RACEK, J. et al. Klinická biochemie. 2. přepracované vydání, Praha: Galén, 2006, 329s
26. ROKYTA, R. a kolektiv. Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech, Praha: ISV nakladatelství, 2000, 359 s.
27. Světový den ledvin [online]. 2016a [23. 3. 2016] Dostupné z<http://www.bbraun-avitum.cz/cps/rde/xchg/av-avitum-cs-cz/hs.xsl/svetovy-den-ledvin.html>
28. Světový den ledvin [online]. 2016b [23.3.2016] Dostupné z <http://www.nadaceledviny.cz/svetovy-den-ledvin/rok-2016>
29. ŠPINAR, J. a kolektiv. Propedeutika a vyšetřovací metody vnitřních nemocí, Praha: Grada, 2008, 256 s.
30. TEPLAN, V., Praktická nefrologie, Praha: Grada Publishing, 2006, s. 496
31. TEPLAN, V. Nefrologické minimum pro klinickou praxi, Praha: Mladá fronta, 2013, 317 s.
32. TEPLAN, V., HORŇÁČKOVÁ, M., BÉBROVÁ, E., JANDA, J. a kolektiv Infekce ledvin a močových cest v dospělém a dětském věku. Praha: Grada, 2007, 252 s.
33. TESAŘ, V., ZIMA, T., RACEK, J., TEPLAN, V., FRIEDECKÝ, B., KRATOCHVÍLA, J., GRANÁTOVÁ, J., KUBÍČEK, Z. Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČSL JEP k vyšetření proteinurie, Praha, 2014
34. TROJAN, S., LANGMAIER, M. a kolektiv, Lékařská fyziologie, Praha: GradaAvicentrum, 1994, s. 464
35. VOKURKA, M. a spolupracovníci, Patofyziologie pro nelékařské směry, Praha: Karolinum (Univerzita Karlova v Praze), 2005, s. 217
36. ZIMA, T. a kol., Laboratorní diagnostika, 2. doplněné a přepracované vydání, Praha: Galén, 2007, s. 728

37. ŽABKA, J. Diferenciální diagnostika proteinurie. In. Viklický, O., Dusilová-Sulková, S., Rychlík, I. Vyšetřovací metody v nefrologii a jejich klinická aplikace. Praha: Tigris, 2007, s. 17-22
38. ŽABKA, J. Pacienti s proteinurií, léčba. Interní medicína pro praxi, 2008, roč. 10, č. 2, s.62-63.

8 Seznam příloh a obrázků

Obr. 1 – Přístroj Advia Chemistry	29
Obr. 2 – Testovací proužky.....	30
Obr. 3 – analyzátorůh Arkray - Aution Max a IRIS iQ200	31
Obr. 4 – Hydragel 5 proteinurie.....	34
Obr. 5 - Graf rozdělení měření.....	37
Obr. 6 - Graf zastoupení žen dle věku	38
Obr. 7 - Graf zastoupení žen mužů dle věku	38
Obr. 8 - Graf výsledků diagnostickými proužky - ženy	39
Obr. 9 - Graf výsledků diagnostickými proužky – muži	39
Obr. 10 - Graf výsledků diagnostickými proužky – analyzátor - ženy.....	40
Obr. 11 - Graf výsledků diagnostickými proužky – analyzátor - muži	40
Obr. 12 - Graf srovnání výsledků diagnostickými proužky – ženy	41
Obr. 13 - Graf srovnání výsledků diagnostickými proužky – muži.....	41
Obr. 14 - Graf výsledků zkouška kyselinou sulfosalicylovou – ženy.....	42
Obr. 15 - Graf výsledků zkouška kyselinou sulfosalicylovou – muži.....	42
Obr. 16 - Graf vyšetření celkové bílkoviny – ženy.....	43
Obr. 17 - Graf vyšetření celkové bílkoviny – muži	43
Obr. 18 - Graf vyšetření albuminu –ženy	44
Obr. 19 - Graf vyšetření albuminu –muži.....	44
Obr. 20 –Tabulka výsledků elektroforézy 10 vzorků	45
Obr. 21 – Graf typů proteinurie z elektroforetického vyšetření	45

9 Seznam použitých zkratk

ECT – extracelulární tekutina

ADH – antidiuretický hormon

NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drugs - nesteroidní protizánětlivé léky.

H⁺ - kladně nabitě ionty vodíku

PCR – protein creatinine ratio

ACR – albumin creatinine ratio

SDS – sodiumdodecylsulfát

HPLC - high performance liquid chromatography – vysoce účinná kapalinová chromatografie