

Общий анализ мочи на современном этапе развития клинической лабораторной диагностики

И.А. Волкова, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва

Автоматизация анализа мочи является достижением лабораторной диагностики. Она позволяет стандартизировать все этапы анализа и получить количественные результаты по форменным элементам, не снижая качества исследования. Для адекватной оценки результатов необходимо понимать возможности сухой химии, автоматического подсчета форменных элементов и их соответствия. При трудностях в дифференцировке клеток мочи может быть использована суправитальная окраска или подсчет клеток мочи в окрашенном препарате осадка мочи.

Automation of urine analysis is an achievement of the laboratory Diagnostics. It allows you to standardize all the stages of the analysis and the quantitative results of cell elements, without reducing the quality of the study. To adequately assess the results you should understand the features of the dry chemistry, automatic counting of loose and their conformity. When difficulties in differentiation of cells in the urine can be used supravital paint or counting cells in urine colored specimen of urine sediment.

Ключевые слова: общий анализ мочи, сухая химия, осадок мочи.

До конца прошлого века все исследования мочи проводились пробирочными методами. В 90-х годах появились так называемые тест-полоски для химического исследования мочи методом сухой химии, результаты которых оценивались визуально с получением полуколичественных данных, основанных на сравнении цвета рабочей полосы с цветовой шкалой. Погрешности определения были связаны преимущественно с несоблюдением времени экспозиции и особенностями цветового зрения оператора.

В конце прошлого века лаборатории стали оснащаться анализаторами мочи – отражательными фотометрами или рефлектометрами, которые проводят полуколичественное измерение параметров мочи в автоматическом режиме, что значительно ускорило анализ и стандартизировало его проведение.

Последние годы все большее число лабораторий общий анализ мочи проводят при помощи полностью автоматизированных анализаторов мочи - мочевого станций, где химическое исследование и оценка форменных элементов мочи осуществляются в автоматическом режиме.

Анализ мочи методом сухой химии

Первый этап автоматизации включал исследование химических и, частично, физических свойств мочи методом сухой химии на тест-полосках с автоматической (приборной) оценкой результатов анализа.

В настоящее время исследование мочи с помощью 10 или 11-параметровых полосок с приборной регистрацией является основой общего анализа мочи с обязательной микроскопией осадка мочи [2]. Визуальная регистрация допускается при единичных анализах (рис. 1).



Рис. 1. Диагностические полоски для анализа мочи (упаковка, контейнер для полосок, полоска с тестовыми зонами)

Основными параметрами тест-полосок являются: плотность, pH, белок, глюкоза, кетоны, нитриты, билирубин, уробилин, кровь, лейкоциты.

Анализаторы мочи оценивают параметры с помощью объективного метода – рефлексоотражательной фотометрии, что упрощает регистрацию результатов и позволяют их ввести в базу данных при подключении анализатора к компьютеру.

Полоски оценивают показатели полуколичественно, что допускает определенный разброс результатов в пределах каждой тестовой зоны полоски. Аналитическая чувствительность, т.е. минимальный уровень определяемого аналита каждой тестовой зоны полоски, соответствует первому положительному (позитивному) результату и отличается у полосок разных производителей. Химические вещества и клетки при содержании ниже чувствительности полоски тест-полосками не определяются и оцениваются как отрицательный результат.

Аналитическая чувствительность полосок, как правило, выше физиологической концентрации определяемого вещества, поэтому белок, глюкоза, кетоны и др. соединения, которые присутствуют в моче здорового

человека в низкой концентрации, полосками не определяются (отрицательный результат). При наличии промежуточного цвета результат выдается в виде того значения, к которому цвет более близок. Например, если цвет полоски на белок изменился, но ближе к отрицательному результату, анализ будет отрицательным, несмотря на наличие небольшого количества белка в моче. Промежуточные результаты полоска не определяет из-за отсутствия шкалы сравнения. В ряде анализаторов при содержании вещества меньше установленного нижнего предела результат выдается в виде «следов» (space).

Работа с полосками проводится в соответствии с инструкцией. В инструкции указаны факторы, влияющие на развитие окраски тестовой зоны, причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов, которые могут отличаться в тест-полосках разных производителей. Для исключения ошибок моча перед анализом тщательно перемешивается, и в нее сразу после перемешивания опускается полоска. Плохое перемешивание мочи – частая причина внутрилабораторных ошибок.

Плотность. Референтным методом определения плотности является измерение урометром. Полоски определяют плотность по содержанию ионов в моче, поэтому результаты отличаются от результатов, полученных урометром. В ряде случаев необходима корректировка плотности в зависимости от pH или некоторых других показателей, которая проводится в некоторых анализаторах в автоматическом, а в некоторых – в ручном режимах. Необходимость и способ корректировки указаны в инструкции. Дополнительно оценивать плотность урометром в разовой порции мочи нецелесообразно, так как единичный результат не отражает способность почек к концентрированию мочи.

Белок. Определение белка является одним из наиболее важных тестов в анализе мочи, так как его появление в определяемых количествах связано с нарушением работы почек, высокой концентрацией низкомолекулярных белков в крови или попаданием белка в мочу из очагов воспаления. В минимальных концентрациях белок содержится в каждой порции мочи, но он не определяется обычными лабораторными методами. Определяемый белок (протеинурия) при правильном сборе мочи свидетельствует о наличии патологии. Однако при определении белка тест-полосками необходимо учитывать следующие факторы:

- ✓ Тестовые зоны полосок определяют преимущественно альбумин, обладая низкой чувствительностью к глобулинам и миеломному белку.
- ✓ Чувствительность тест-полосок к белку отличается в полосках разных производителей (рис.2, белок). Наиболее высокая чувствительность составляет 0,1 г/л, промежуточная 0,15 г/л, а наиболее низкая – 0,3 г/л. Высокая чувствительность полоски снижает погрешности определения.

В случае, когда для идентификации результата теста как положительного белка недостаточно, но наличие слабой окраски в тестовой зоне не позволяет оценить результат как отрицательный, некоторые анализаторы

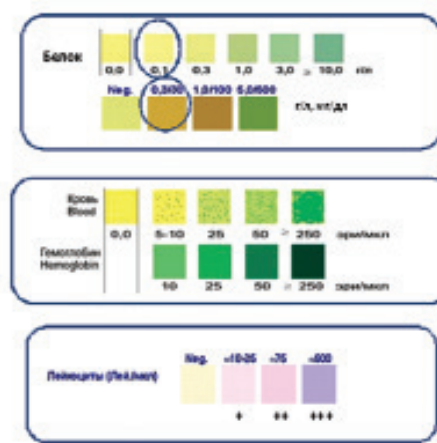


Рис. 2. Тестовые зоны и чувствительность полосок при определении белка, эритроцитов и лейкоцитов. Овалами обозначена чувствительность на белок в тест-полосках разных производителей

оценивают результаты анализа на белок как «следы» (space). В зависимости от чувствительности полоски «следы» будут соответствовать разным концентрациям белка.

При определении белка тест-полосками в связи с низкой чувствительностью тестовых зон к глобулину и миеломному белку рекомендуется при необходимости определять белок дополнительно другими методами: пробой с 20% сульфосалициловой кислотой или с органическим красителем пирогаллоловым красным.

Кровь. Полоски определяют эритроциты, гемоглобин и миоглобин по содержанию гема. Неизмененные эритроциты, содержащие гемоглобин, лизируются, освобожденный гемоглобин вступает в реакцию, вызывая точечное изменение окраски. При высоком содержании эритроцитов область теста может иметь однородный темный цвет. Гемолиз эритроцитов является необходимым условием для протекания цветной реакции, так как гемоглобин, который находится внутри эритроцита, в химическую реакцию не вступает. При частичном гемолизе эритроцитов одновременно появляется диффузное и точечное окрашивание (рис. 2, кровь).

Реакция более чувствительна к гемоглобину и миоглобину, чем к эритроцитам. Гемоглобин и миоглобин равномерно меняют окраску всей тестовой зоны, поэтому различить их данным методом невозможно. Чувствительность теста составляет 5–20 эр./мкл в зависимости от производителя полосок, иногда интервалы зоны сплошного окрашивания идентифицируются по содержанию гемоглобина. При сопоставлении результатов тест-полосок микроскопии следует иметь в виду, что измененные эритроциты полосками не фиксируются, но при большом количестве таких эритроцитов может определяться гемоглобин (табл.1). При содержании эритроцитов и/или гемоглобина ниже чувствительности полоски результат будет отрицательным

Лейкоциты (нейтрофилы). Тест обнаруживает эстеразную активность клеток. Эстераза содержится в гранулоцитах, преимущественно нейтрофилах, и гистиоцитах, которые и определяются данным тестом. Тестом могут быть обнаружены как целые, так и разру-

Таблица 1. Соответствие результатов тест-полосок микроскопии (кровь)

Параметр	Тест-полоски	Микроскопия
Неизмененные эритроциты	+	+
Измененные эритроциты	–	+
Гемоглобин	+	–
Миоглобин	+	–

шенные нейтрофилы, которые не могут быть идентифицированы при микроскопии. Особенно актуальна оценка разрушенных лейкоцитов в щелочной моче. Лимфоциты, увеличение которых в моче наблюдается при аутоиммунной патологии и некоторых других заболеваниях, тест-полосками не идентифицируются, так как не содержат эстеразу.

Чувствительность полосок составляет 10–25 лей./мкл в зависимости от производителя полосок. Результаты анализа на полосках могут выдаваться в полуколичественном виде в соответствии с интервалами определения или в «крестах» (рис. 2, лейкоциты). Большинство тест-полосок имеют интервалы определения, указанные на рисунке. Однако в некоторых полосках интервалы другие, а количество «крестов» зависит от количества и значений интервалов. В связи с этим для адекватной клинической интерпретации результаты по лейкоцитам корректно выдавать либо с указанием их количества (лей/мкл), или в комментариях указывать интервалы.

Причины несоответствия результатов по лейкоцитам тест-полосок и при микроскопии форменных элементов представлены в таблице 2. При содержании нейтро-

Таблица 2. Соответствие результатов теста на лейкоцитарную эстеразу микроскопии

Лейкоцитарная эстераза	Результаты микроскопии	Интерпретация
Отрицательно	В пределах N	Патологии не выявлено
Отрицательно	> N	Лейкоцитурия, но лейкоциты не являются гранулоцитами Ложное занижение из-за влияния посторонних веществ (смотри инструкцию)
«Следы» или положительно	В пределах N	Лейкоцитурия, в пробе разрушенные лейкоциты Ложное завышение из-за влияния посторонних веществ (смотри инструкцию)
«Следы» или положительно	> N	Нейтрофильная лейкоцитурия. Оценивать совместно с тестом на нитриты

Примечание: N – референтные значения

филов ниже чувствительности полоски результат будет отрицательным.

Нитриты – скрининговый тест на скрытую бактериурию, так как способностью восстанавливать нитраты в нитриты обладает большинство бактерий, вызывающих воспалительные процессы в почках и мочевыводящих путях (кишечная палочка, протей, сальмонеллы и др.). Даже незначительное изменение окраски тестовой зоны полоски расценивается как положительный результат. Одновременное повышение лейкоцитов и нитритов свидетельствует о бактериальном воспалении. Ложно отрицательные результаты могут встречаться при контакте бактерий с мочой менее 4ч или при отсутствии нитратов в диете. Бактерии, не образующие нитриты, полосками не определяются.

Глюкоза. Определение глюкозы основано на глюкоксидазной реакции. Чувствительность полосок соответствует 2–3 ммоль/л и превышает границы физиологической концентрации, которая составляет от 0,12 до 1,8 ммоль/л. Высокая чувствительность полосок позволяет, с одной стороны, определить даже небольшую глюкозурию, с другой стороны, при физиологической концентрации глюкозы результат будет отрицательный.

Кетоновые тела. Определение кетоновых тел основано на реакции Легала. Определяется ацетоацетат и ацетон. Тест в 10 раз чувствительнее к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону. Границы чувствительности для ацетоацетата обычно составляют 0,5 ммоль/л.

Билирубин. Тест основан на диазореакции. Практически чувствительность составляет около 9 мкмоль/л (0,5 мг/100 мл) билирубина. Более низкая концентрация билирубина может быть выявлена с относительно низкой вероятностью. В мочу фильтруется только гидрофильный прямой билирубин.

Уробилиноген. С помощью полосок выявляется производные билирубина стеркобилиноген и уробилиноген, но по традиции в диагностических полосках они называются уробилиногеном или уробилином. Чувствительность зависит от используемых полосок и указана в инструкции. Физиологический предел концентраций составляет от 5 до 17 мкмоль/л (до 1мг/100 мл). Отсутствие уробилина полосками не определяется.

pH мочи – оценивается по универсальному индикатору или их смеси.

При выдаче результатов анализа мочи в бланк анализа необходимо включить результаты определения всех параметров по тест-полоскам совместно с результатами микроскопии, так как данные не всегда совпадают, а различия могут стать дополнительным критерием для диагностики.

Полная автоматизация анализа мочи

Современные методы лабораторной диагностики позволяют полностью автоматизировать рутинные анализы, улучшая при этом качество результатов. Автоматические анализаторы мочи, так называемые мочевые станции, эффективны в проведении исследований и просты в использовании.

Преимущества автоматических мочевых станций:

- ✓ Использование нативной мочи без предварительной обработки.
- ✓ Снижение количества ошибок за счет стандартизации аналитического этапа.
- ✓ Освобождение сотрудников от необходимости работы с пробами мочи.
- ✓ Снижение количества проб для микроскопии осадка.
- ✓ Использование небольшого объема мочи, что удобно при отдаленной транспортировке проб и для детей.
- ✓ Сокращение времени анализа до нескольких минут.

Мочевые станции включают 2 модуля:

1. Анализатор диагностических полосок (рассмотрено выше).
2. Анализатор форменных элементов мочи.

Анализаторы форменных элементов позволяют идентифицировать эритроциты, лейкоциты, цилиндры, эпителий, бактерии, дрожжеподобные грибы, кристаллы, слизь, сперматозоиды, однако принцип идентификации может отличаться: часть анализаторов использует метод проточной цитофлуориметрии, другая часть распознавание форменных элементов проводит по микрофотографиям с использованием специальной компьютерной системы, работающей по принципу нейронной сети. Некоторые анализаторы имеют дополнительный канал для оценки бактериурии.

Подсчет форменных элементов анализатором мочи стандартизирован и проводится в трех вариантах (табл. 3).

Таблица 3. Варианты автоматического подсчета форменных элементов мочи

Варианты	Объем мочи
В 1 мкл	1 мкл нативной мочи (универсальный количественный метод)
В поле высокого увеличения*	Стандартный для прибора. Соответствует 0,18 мкл нативной мочи
В поле низкого увеличения	Стандартный для прибора

Примечание: * – в Iris IQ объем был ранее рассчитан по калибратору эритроцитов [1], в UF объемы были определены по коэффициенту в приборе

Большая часть результатов автоматического анализа мочи выдается с прибора. Дополнительная микроскопия или идентификация форменных элементов на экране монитора требуется:

- ✓ при наличии не дифференцированных элементов (клетки эпителия, атипичные и др.)
- ✓ при несовпадении результатов количества клеток, определенных по тест-полоскам, и при подсчете форменных элементов анализатором.

При сложности с идентификацией форменных элементов в осадке мочи их оценка проводится после суправитальной окраски элементов осадка или после окраски мазка из клеточного материала осадка мочи.

Соответствие результатов подсчета форменных элементов мочи традиционными и автоматическими методами

Появление мочевых станций с автоматическим подсчетом форменных элементов ставит вопрос о соответствии результатов подсчета форменных элементов мочи традиционными и автоматическими методами [1]. Сравнение особенно актуально для количества элементов в поле высокого увеличения анализатора и в поле зрения при микроскопии на большом увеличении: объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$ (увеличение в 400 раз). Для выявления соответствия необходимо сравнить объемы мочи, в которых проводится подсчет форменных элементов.

Сравнительная оценка результатов анализов может проводиться только при стандартных условиях проведения теста. Сравнение результатов автоматизированного анализа мочи и оценки форменных элементов осадка при его микроскопии на предметном стекле в общем анализе мочи (ОАМ) не имеет смысла, так как в ОАМ степень концентрирования мочи и толщина препарата не известны. При количественной оценке форменных элементов мочи стандартизированы степень концентрирования, толщина препарата и объем мочи при микроскопии [3], поэтому условия подготовки мочи и микроскопии при подсчете количества клеток взяты за основу при сравнении результатов.

Количество форменных элементов при микроскопии осадка мочи зависит от степени концентрирования мочи (табл. 4) и просматриваемого объема в поле зрения микроскопа.

При разной степени концентрирования количество форменных элементов будет меняться даже при микроскопии одной и той же мочи. Результаты оценки форменных элементов у разных операторов и в разных лабораториях могут существенно отличаться. При оценке образцов с высокой степенью концентрирования мочи возможна гипердиагностика, так как нормальное содержание форменных элементов в нативной моче расценивается в гиперконцентрированной моче как патологическое.

Просматриваемый объем в поле зрения микроскопа определяется толщиной препарата и величиной поля зрения микроскопа

При стандартной толщине препарата 0,1 мм (камера Горяева, слайд-планшеты), объем мочи в поле зрения микроскопа определяется диаметром круга, ограничивающего поле микроскопии. Этот диаметр может быть рассчитан на основании величины линейного поля окуляра, которое указано на окуляре или в инструкции к микроскопу. Например, надпись на окуляре 10/22 показывает, что 10 – увеличение, а 22 – линейное поле. Зависимость объема мочи в поле зрения микроскопа от линейного поля окуляра представлена в таблице 5.

Анализ полученных данных позволил установить соответствие количества форменных элементов в поле высокого увеличения анализатора (0,18 мкл) и при микроскопии осадка мочи на большом увеличении (0,17 мкл). Это соответствие соблюдается при условии концентрирования мочи в 10 раз, толщине препарата

Таблица 4. Зависимость количества клеток в поле зрения микроскопа от степени концентрирования мочи

Параметры	1	2	3
Исходный объем мочи мл	10	10	10
Объем мочи для микроскопии осадка мл	1	0,5	0,25
Степень концентрирования	10	20	40
Количество клеток в поле зрения	3	6	12

Примечание: при микроскопии концентрированной мочи объем просматриваемой мочи в поле зрения микроскопа увеличивается в соответствии со степенью концентрирования

0,1 мм, объективе х40, окуляре 10/18, где 18 – линейное поле окуляра.

Количество форменных элементов в поле зрения микроскопа увеличивается и не соответствует результатам анализатора при большем линейном поле окуляра, увеличении степени концентрирования мочи, увеличении толщины препарата. Определение соответствия количества форменных элементов в не стандартизированных препаратах мочи на предметном стекле и результатами анализатора мочи невозможно.

Подсчет форменных элементов в автоматическом анализаторе мочи является количественным методом и не нуждается в дополнительных количественных исследованиях. Соответствие результатов анализатора и микроскопии осадка прослеживается только при стандартизации всех этапов подготовки мочи и условий микроскопии.

Дополнительные методы идентификации клеток мочи

При трудностях с идентификацией клеточных элементов при микроскопии применяется суправитальная окраска элементов осадка мочи и подсчет уролейкограммы.

Суправитальная окраска препаратов осадка мочи

В моче суправитальная окраска предназначена для определения и идентификации клеток и других элементов осадка мочи в жидкой среде без фиксации препарата. Методика рекомендована Европейской группой анализа мочи в рамках Европейской конфедерации лабораторной медицины. Для суправитальной окраски используют краску Штернгеймера. В продаже имеются готовые наборы реактивов.

Суправитальная окраска позволяет провести:

- ✓ дифференциацию клеток плоского и переходного эпителия,
- ✓ отличить клетки почечного эпителия от лейкоцитов,
- ✓ отличить нейтрофилы от лимфоцитов,
- ✓ выявить и отличить различные виды цилиндров.

При суправитальной окраске живые объекты в осадке мочи не окрашиваются, что позволяет обнаружить бесцветные споры гриба и нити мицелия на ярком фоне препарата, в то время как кристаллы оксалата кальция оvoidной формы хорошо окрашиваются.

Таблица 5. Зависимость объема мочи в поле зрения микроскопа от линейного поля окуляра при толщине препарата 0,1мм и концентрировании в 10 раз

Тип окуляра	Линейное поле мм	Объем нативной мочи в п/зр.	Объем мочи в п/зр. в пересчете на нативную
Стандартный	18	0,017мкл	0,17 мкл
Широко-польный	22	0,027мкл	0,27 мкл

Примечание: п/зр. – поле зрения

Уролейкограмма

Уролейкограмма используется для дифференциации лейкоцитов. Для анализа готовят мазок из осадка мочи. Мочу центрифугируют для получения осадка. При отсутствии видимого осадка его обогащают, т.е. центрифугируют весь объем мочи в одной пробирке последовательно в несколько этапов. К полученному осадку добавляют каплю сыворотки или плазмы крови как источник белка, перемешивают и делают мазок на предметном стекле. Мазок фиксируют и окрашивают красителями для окраски мазка крови, но время экспозиции уменьшают по сравнению с кровью в 2 раза. Мазок высушивают. При микроскопии мазка оценивается процентное содержание каждого вида лейкоцитов по отношению к общему количеству лейкоцитов.

Таким образом, использование мочевого станций для исследования мочи является современным перспективным методом. Отсутствие этапа подготовки мочи к анализу, автоматизация всех этапов исследования, получение в общем анализе мочи количественных результатов по форменным элементам позволяет сократить количество проб для микроскопии, ускорить проведение анализа и стандартизировать все его этапы, что в конечном итоге снизит количество повторных исследований и повысит сопоставимость результатов, полученных в разных лабораториях.

Литература

1. И. А. Волкова, И. В. Щербо, А. Е. Талан, Е. А. Бучнева. Сравнение подсчета форменных элементов мочи при помощи автоматического анализатора мочи и при микроскопии осадка. *Ж. Медицинский алфавит* 9/2014. Современная лаборатория № 2, с.6-8.
2. В.В. Меньшиков, Л.М. Пименова, Н.И. Сухачева, И.А. Волкова, И.И. Миронова, Г.Н. Зубрихина. Стандартизованная технология клинического лабораторного анализа мочи. Анализ мочи общий. В кн. «Стандартизация аналитических технологий лабораторной медицины». Вып. 1, М, 2012, Лабора, с.68-108.
3. В.В. Меньшиков, Л.М. Пименова, И.А. Волкова, И.И. Миронова, Г.Н. Зубрихина. Стандартизованная аналитическая технология клинического лабораторного анализа мочи: определение количества форменных элементов в моче. В кн. «Стандартизация аналитических технологий лабораторной медицины». Вып. 1, М, 2012, Лабора, с.109-128.