

Новые аспекты общего клинического анализа мочи

Благодаря развитию методов сухой химии общеклинический анализ мочи (ОАМ) претерпел существенные изменения: расширился спектр доступных тестов, сократилось время выполнения, что особенно важно при проведении массовых исследований, появилась возможность автоматизации процесса.

Первые тест-полоски с нанесенными на них сухими реагентами, предназначенные для определения глюкозы в моче, были представлены на рынке в 1956 г. компанией Bayer. С тех пор технология сухой химии активно совершенствовалась, и в настоящее время использование тест-полосок для определения наиболее важных физико-химических параметров мочи получило широкое распространение в клинических лабораториях.

Современный ОАМ — это возможность в течение нескольких минут получить качественную или полуколичественную оценку таких аналитов, как белок, глюкоза, кетоны, билирубин, уробилиноген, кровь, лейкоциты, нитриты, а также относительная плотность и рН мочи. Простота работы с тест-полосками обеспечивается тем, что реакция с определяемым веществом изменяет цвет индикаторной зоны. Полученный результат либо визуально сопоставляется с цветовой шкалой, предоставляемой производителем, либо учитывается с помощью автоматического отражательного фотометра. Тем не менее из-за технологически обусловленных ограничений чувствительности или специфичности при использовании тест-полосок нередко ложноположительные и ложноотрицательные результаты, что в ряде случаев требует подтверждающих исследований. В данной статье рассмотрены факторы, приводящие к получению некорректных данных, и способы верификации результатов.

Тест на белок основан на принципе белковой ошибки индикатора. Реактивная зона полоски содержит кислый буфер и индикатор тетрабромфеноловый синий. При наличии белка в моче протоны, высвобождающиеся из индикатора в кислой среде, захватываются белковыми молекулами, аминогруппы которых являются сильным акцептором водорода; цвет индикатора из-за недостатка протонов меняется с желтого через зеленый на синий. Тест особенно чувствителен к присутствию альбумина (0,1 г/л) и трансферрина (0,2 г/л), поскольку содержание аминокислот у этих протеинов наиболее высокое, остальные белки определяются с меньшей чувствительностью. Наиболее распространенной причиной ложного завышения результата является резко щелочная моча (рН более 8-9), что связано с подавлением кислой буферной системы реагента и высвобождением протонов из индикатора даже в отсутствие белка. К аналогичному эффекту приводит контаминация мочи моющими средствами на основе четвертичного аммония, антисептиками (хлоргексидином). Кроме того, ложноположительные реакции отмечаются при высоком удельном весе мочи, в темно окрашенном пигментами образце, после приема пациентом препаратов, содержащих хинин, а также после инфузий поливинилпирролидона. Ложнозаниженные (отрицательные) результаты связаны, как правило, с низкой чувствительностью выявления белков, не являющихся альбуминами (глобулинов, мукопротеинов, белка Бенс-Джонса). Подтверждающим тестом является реакция с сульфосалициловой кислотой, которая обязательно должна проводиться в образцах мочи с рН >8-9 и в тех ситуациях, когда клиницисты предполагают присутствие белков неальбуминовой природы.

Глюкоза определяется с помощью двухэтапной реакции окисления D-глюкозы с использованием глюкозооксидазы и пероксидазы, промежуточным продуктом реакции является перекись водорода. Тест высокоспецифичен для глюкозы и не выявляет другие сахара (галактозу, лактозу, мальтозу, фруктозу и др.), поэтому не пригоден

для скрининга галактозурии у детей. По этой же причине традиционное название теста «анализ мочи на сахар» в случае использования сухой химии некорректно. К ложному занижению результатов может приводить высокое содержание в образце аскорбиновой кислоты, которая является сильным восстановителем и подавляет реакцию; подобный эффект оказывает гентизиновая кислота (метаболит аспирина и салицилатов, ряда антибиотиков). Чувствительность реакции снижают рН <5,0, высокий удельный вес мочи, низкая температура (охлажденный образец). При исследовании мочи, длительно хранившейся без консервантов, к ложноотрицательному результату анализа приводит разрушение глюкозы под действием микрофлоры и вследствие внутриклеточного гликолиза. Ложное завышение показателя наблюдается из-за контаминации образца дезинфицирующими средствами или моющими веществами, содержащими гипохлорит натрия или перекись водорода, а также пероксидазами любого происхождения (например, пероксидазой хрена).

Для определения кетонов (термин обозначает несколько разных веществ: ацетон, ацетоуксусную кислоту, β-гидроксимасляную кислоту) используется реакция с нитропруссидом натрия в щелочной среде, в результате которой образуется розово-фиолетовый комплекс. Реакция наиболее чувствительна к определению ацетоуксусной кислоты, ацетон реагирует слабо, а β-гидроксимасляная кислота не реагирует вообще. Образец мочи, собранный после диагностических процедур с использованием контрастных веществ (фенолсульфоталеина, бромсульфалеина), может дать ложноположительный результат. Аналогичный эффект оказывают производные антрахинона (входит в состав биологических активных добавок), прием пациентом каптоприла, 2-меркаптоэтансульфоната натрия, леводопы, метионина, а также высокое содержание пигментов. К ложному занижению результатов может привести неправильное и длительное хранение образца (испарение из открытой емкости, разрушение бактериями).

Тест для определения крови в моче основан на псевдопероксидазной активности гемоглобина и миоглобина, которые катализируют окисление индикатора перекисью водорода с образованием зеленого окрашивания. Минимальная чувствительность большинства тест-полосок позволяет обнаружить гемоглобин из 10 лизированных эритроцитов или 5 неизмененных клеток в 1 мкл нецентрифугированной мочи. Для дифференциальной диагностики гематурии и гемоглобинурии необходимо микроскопическое исследование осадка мочи. Метод не позволяет различить гемоглобинурию и миоглобинурию, поэтому интерпретация результата должна проводиться с учетом клинических данных (вероятность рабдомиолиза) и с помощью дополнительных исследований (активность сывороточных энзимов ЛДГ и КФК, уровень миоглобина и гаптоглобина крови). В качестве скринингового теста можно использовать осаждение гемоглобина в моче сульфатом аммония, но этот метод не является унифицированным и плохо поддается стандартизации. Ложное завышение результатов наблюдается при контаминации образца дезинфицирующими средствами и моющими веществами, содержащими перекись водорода или гипохлорит натрия, экзогенными пероксидазами. Пероксидазную активность проявляют также ферменты некоторых бактерий, в частности кишечной палочки, являющихся причиной инфекций мочевыводящих путей (ИМВП). Ложное занижение результатов связано

с присутствием аскорбиновой, гентизиновой кислоты, глутатиона, а также с высокой относительной плотностью мочи, большой концентрацией нитритов (более 10 мг/дл). Формалин, используемый в качестве консерванта, может привести к занижению результата из-за ингибирования реакции. Снижение чувствительности реакции наблюдается и при приеме пациентом каптоприла.

Тест для выявления билирубина основан на его способности связываться с солями диазония в сильнокислой среде (реакция азосочетания) с образованием продукта реакции розово-коричневого цвета. К ложному занижению результатов приводит ингибирующее влияние аскорбиновой кислоты, нитритов, длительное хранение образца в условиях попадания солнечного света (при этом билирубин окисляется до биливердина, не реагирующего с азореактивом). Ложное завышение концентрации билирубина чаще всего связано с большим содержанием пигментов, придающих моче интенсивный желто-оранжевый цвет. Это наблюдается при приеме пациентом феназопиридина и в случае высокого содержания в моче индикана или метаболитов этодолака. Большая концентрация уробилиногенов также может усиливать окраску реагентной зоны. В сомнительных случаях обнаружение кристаллов билирубина в осадке мочи при микроскопии свидетельствует в пользу билирубинурии.

Уробилиногены определяются с помощью модифицированной реакции Эрлиха, в результате которой образуются соединения, окрашивающие тест-зону в цвета от розового до красного. Реакция высокоспецифична для уробилиногена и стеркобиногена и не зависит от рН мочи. Ложноположительные результаты обусловлены возможным присутствием порфириногена, индикана; наблюдаются при лечении такими препаратами, как парааминосалициловая кислота, феназопиридин, прокаин, метилдопа, хлорпромазин, феноксиметилпенициллин, сульфаниламиды, а также в интенсивно окрашенных образцах (например, после употребления в пищу свеклы). Ложное занижение результата, как правило, связано с контаминацией образца формалином, некоторыми дезинфицирующими средствами, неправильным хранением (при попадании солнечного света уробилиноген окисляется до уробилина). Помимо этого, чувствительность реакции снижается при наличии высоких концентраций аскорбиновой кислоты и нитритов. Для дифференцированного выявления уробилиногена, порфириногена и других interfering веществ можно использовать качественный тест Уотсона-Шварца.

Для определения лейкоцитов используется реакция на лейкоцитарную эстеразу, которая расщепляет эфир индоксила, в результате чего свободный индоксил может реагировать с солями диазония и давать фиолетовое окрашивание. Основным преимуществом этого теста перед рутинной микроскопией является способность определять эстеразу даже в случае полного лизиса лейкоцитов, что наблюдается в образцах щелочной мочи с низким удельным весом. Присутствие в образце дезинфицирующих средств или формалина, а также контаминация вагинальным секретом приводят к получению ложноположительных результатов. Слабовыраженное окрашивание тест-зоны можно наблюдать в высокопигментированной моче (билирубин, производные нитрофурантоина, пищевые красители). Ложноотрицательные результаты отмечаются при очень высоком содержании глюкозы (более 3 г/дл), белка (500 мг/дл), оксолиновой или аскорбиновой кислоты. Метаболиты цефалоспоринов,

гентамицина, тетрациклина значительно ослабляют реакцию. Тест-полоски не выявляют лимфоциты.

Нитраты мочи превращаются в нитриты под действием ферментов в основном грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter* и др.), являющихся наиболее частыми возбудителями ИМВП. Цветная реакция на нитриты основана на модифицированной реакции Грисса. Интенсивность окрашивания тестового поля не пропорциональна концентрации бактерий, т. к. уровень нитритов в моче зависит не только от титра микроорганизмов, но и от их вида, длительности нахождения в мочевом пузыре (поэтому наиболее информативна первая утренняя порция), исходного содержания нитратов.

Ложноотрицательный результат может быть получен при исследовании на фоне антибиотикотерапии или сразу после нее, длительном хранении мочи (нитриты восстанавливаются до азота), инфицировании бактериями, не преобразующими нитраты в нитриты (стрептококки, стафилококки, гонококки, энтерококки, микобактерии туберкулеза), низком поступлении / отсутствии нитратов в пище (у новорожденных и детей на грудном вскармливании, у лиц, не употребляющих овощей). При высоком удельном весе мочи чувствительность определения снижается, аскорбиновая кислота полностью подавляет реакцию. Причиной ложноположительных результатов является вторичное бактериальное загрязнение длительно хранившейся мочи, атипичная окраска наблюдается в высокопигментированном образце.

Определение относительной плотности мочи основано на методе ионного обмена, который происходит между полиэлектролитом тестовой зоны и ионами мочи. Метод не дает количественной оценки недиссоциирующих составляющих (глюкозы, мочевины, креатинина), а значит, не чувствителен к изменениям удельного веса при изменении концентраций этих веществ, например, при глюкозурии. Тест оптимизирован для рН 6,0. Ложное занижение результатов наблюдается в нейтральной и щелочной моче (рН >6,5). Ложное завышение результатов связано с присутствием аскорбиновой кислоты в концентрации более 70 мг/дл, кислой реакцией (рН <6,0), повышенным содержанием белка (более 1,5 г/л). В патологических образцах удельный вес рекомендуется определять с помощью более точных методов — осмометрии или рефрактометрии.

Как видно из вышесказанного, присутствие в моче аскорбиновой кислоты существенно влияет на измерение ряда важных параметров ОАМ. Именно с целью оценки возможной интерференции на тест-полоске присутствует дополнительная реагент-зона для определения концентрации аскорбиновой кислоты. Реакция не обладает достаточной специфичностью и выявляет не только аскорбиновую кислоту, но и другие сильные восстановители (метаболиты аспирина, гентизиновую кислоту и др.), но поскольку их влияние аналогично действию аскорбиновой кислоты, тест пригоден для оценки достоверности определения глюкозы, эритроцитов, нитритов, билирубина, уробилиногена, гемоглобина, удельного веса. При положительной реакции на аскорбиновую кислоту исследование необходимо повторить не ранее чем через 10 ч после последнего употребления витамина С.

Несмотря на общие принципы методов сухой химии, тест-полоски для выполнения ОАМ от разных производителей могут несколько отличаться как чувствительностью и специфичностью, так и природой влияющих факторов. Тщательное изучение инструкции, разработанной производителем, позволит оценить достоверность получаемых данных и избежать некорректных результатов.

Подготовила **Александра Яковец**

