



➤ 5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΩΝ

Οι ηλεκτρολύτες (κάλιο, νάτριο), τα χλωριούχα, το ασβέστιο και ο φωσφόρος αποτελούν τα ανόργανα συστατικά που συνήθως προσδιορίζονται στα ούρα.

Η ποσότητα των ηλεκτρολυτών που απεκκρίνεται στα ούρα 24ώρου είναι στενά συνδεδεμένη με τη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας και την κατακράτηση ή απέκκριση του νερού.

Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι προσδιορισμού των ηλεκτρολυτών. Χρησιμοποιήθηκαν παλαιότερα η φλογοφωτομετρία και η φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης. Τα τελευταία χρόνια βρίσκουν ευρεία εφαρμογή χρωματομετρικές-φωτομετρικές μέθοδοι, αλλά και σύγχρονες με τους αυτόματους αναλυτές ιόντων (με ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια).

Αρχή φλογοφωτομετρίας: Αν μέσα σε ισχυρή άχρωμη φλόγα ψεκάσουμε διάλυμα ουσίας, τότε μερικά άτομά της καίγονται εκπέμποντας χαρακτηριστική έγχρωμη ακτινοβολία. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας, που υπήρχε στο διάλυμα που ψεκάσαμε, υπολογίζεται δε φωτομετρικά. Είναι μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αρκετά κατά το παρελθόν, χρειάζεται προσοχή κατά τη χρήση των αερίων και έχει αντικατασταθεί τελευταία από πιο σύγχρονες και ασφαλείς μεθόδους.

Αρχή φασματοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης: Σε αντίθεση με τη φλογοφωτομετρία βασίζεται στην ιδιότητα των ατόμων πολλών μεταλλικών στοιχείων, να απορροφούν ακτινοβολία κάτω από ειδικές συνθήκες. Έτσι, αν μέσα σε ισχυρή άχρωμη φλόγα ψεκάσουμε διάλυμα ουσίας, τότε τα άτομα που δεν καίγονται απορροφούν χαρακτηριστική ακτινοβολία. Η ένταση της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας που υπήρχε στο διάλυμα που ψεκάσαμε, υπολογίζεται δε φωτομετρικά.

► Αναλυτές ιόντων

Οι αναλυτές φέρουν εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (Ion Selective Electrodes), γι' αυτό και λέγονται αναλυτές ISE.

Η χρήση τους είναι απλή. Παρέχουν μεγάλη ακρίβεια, και δεν απαιτούνται ιδιαίτερα μέτρα ασφαλείας.

Η λειτουργία τους είναι ηλεκτροχημική, και εφαρμόζεται τόσο για τη μέτρηση των ιόντων καλίου, νατρίου, ασβεστίου, του pH, αλλά και των αερίων του αίματος.

Αρχή μεθόδου: Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων και είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του ιόντος που υπάρχει στο εξεταζόμενο δείγμα.

Πρακτικά, ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια, το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το ηλεκτρόδιο μέτρησης, παρεμβάλλεται το διάλυμα του ηλεκτρολύτη, στην περίπτωση μας, το εξεταστέο δείγμα που παίζει ρόλο αγωγού ιόντων. Τα ηλεκτρόδια φέρουν μεμβράνες που είναι επιλεκτικά διαπερατές από ανιόντα ή κατιόντα. Το πέρασμα των ιόντων δημιουργεί διαφορά δυναμικού, η οποία μετριέται και είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του ιόντος στο εξεταστέο δείγμα.

Οι ποσότητες καλίου και νατρίου που αποβάλλονται με τα ούρα ποικίλλουν ανάλογα με τη διατροφή. Οι τιμές που ακολουθούν αναφέρονται σε κανονική διατροφή.



Εικόνα 5.1: Αναλυτής ιόντων ISE.

Φυσιολογικές τιμές:

- | | |
|-----------------------------|---|
| α) στον ορό αίματος: | Νάτριο 136 – 148 mEq/L
Κάλιο 3,6 – 5,1 mEq/L |
| β) στα ούρα: | Νάτριο 40 έως 220 mEq/24ωρο
Κάλιο 25 έως 125 mEq/24ωρο |

➤ 5.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Οι οργανικές ουσίες που συνήθως, προσδιορίζονται στα ούρα είναι: η ουρία, το ουρικό οξύ, η κρεατινίνη και η αμυλάση.

1. Προσδιορισμός ουρίας

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της ουρίας, γίνεται σε δείγμα ούρων 24ώρου. Στα δείγματα των ούρων είναι εύκολη η απώλεια της ουρίας, γιατί διασπάται από τα μικρόβια προς αμμωνία. Για το λόγο αυτό τα ούρα πρέπει να παραδίδονται στο εργαστήριο, γρήγορα και η μέτρηση της ουρίας να γίνεται αμέσως.

Σήμερα οι πλέον εύχρηστες μέθοδοι προσδιορισμού της ουρίας είναι οι ενζυμικές βασιζόμενες στο ένζυμο ουρεάση. Μια τέτοια μέθοδο περιγράφουμε ευθύς αμέσως.

Αρχή μεθόδου: Η ουρία διασπάται παρουσία του ενζύμου ουρεάση σε αμμωνία, η οποία σε αλκαλικό περιβάλλον παρουσία φαινόλης και υποχλωριώδους νατρίου δίνει μπλε χρώμα. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουρίας στο εξεταζόμενο δείγμα.

Υλικά και αντιδραστήρια

- Πρότυπο διάλυμα ουρίας, 4%.
- Διάλυμα ουρεάσης.
- Πυκνό διάλυμα φαινόλης.
- Πυκνό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου.
- Δείγμα ούρων 24ώρου.

Σημείωση: Πρέπει να γίνει ανασύσταση των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσεως της εταιρείας παρασκευής. Στην τεχνική που ακολουθεί, χρησιμοποιούμε τα αντιδραστήρια της εταιρείας Biosis.

Τεχνική:

- Τοποθετούμε σε στατώ τρία δοκιμαστικά σωληνάρια και τα χαρακτηρίζουμε Τυφλό (T), Standard - πρότυπο (ST) και Εξεταστέο (E).
- Βάζουμε 0,2 mL απεσταγμένου νερού στο (T) και στο (E).
- Στο (E) βάζουμε 0,02 mL ούρα σε αραιώση 1/10.
- Στο (ST) βάζουμε 0,2 mL διάλυμα ουρίας 4%.
- Ρίχνουμε και στα τρία σωληνάρια από 3 σταγόνες ουρεάσης.
- Αναμιγνύουμε καλά το περιεχόμενό τους, χρησιμοποιώντας αναδευτήρα (vortex).

- Τοποθετούμε τα σωληνάρια σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 10 min.
- Βγάζουμε τα σωληνάρια από το υδατόλουτρο, τα αφήνουμε για λίγο να κρυώσουν και προσθέτουμε στο καθένα 5 mL διαλύματος φαινόλης και 5 mL διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου.
- Ανακινούμε τα σωληνάρια και τα τοποθετούμε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 15 min.
- Φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 550 nm, αφού πρώτα μηδενίσουμε την ένδειξη με το Τυφλό αντιδραστήριο.



Εικόνα 5.2: Σετ αντιδραστηρίων ουρίας.

Ο τρόπος εκτέλεσης της μεθόδου φαίνεται σχηματικά στον πίνακα που ακολουθεί:

	T	ST	E
Απεσταγμένο νερό	0,2 mL	-	0,2 mL
Δείγμα ούρων σε αραιώση 1/10	-	0,02 mL	-
Πρότυπο διάλυμα ουρίας 4%	-	0,2 mL	-
Ουρεάση	3 σταγόνες	3 σταγόνες	3 σταγόνες

Ανάδευση και επώαση στους 37°C για 10 min ή στους 55°C για 5 min.

Διάλυμα φαινόλης	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL
Διάλυμα υποχλωριώδους Na	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL

Ανάδευση και επώαση στους 37°C επί 15 min, ή στους 55°C επί 10 min.
Αναδεύουμε, μηδενίζουμε με Τυφλό και φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 550 nm.

Πίνακας 5.1: Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου μέτρησης της ουρίας ούρων.

Αποτέλεσμα: Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της ουρίας στο δείγμα, από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ουρία (mg/dL)} = \frac{\text{Απορρόφηση Εξεταστέου (E)}}{\text{Απορρόφηση Προτύπου (ST)}} \times \text{συντελεστή}^*$$

* Ο συντελεστής αφορά την πυκνότητα του πρότυπου διαλύματος και δίδεται από την εταιρεία, την τεχνική της οποίας χρησιμοποιούμε. Στην προκειμένη περίπτωση είναι 40. Πολλαπλασιάζουμε όμως απ' ευθείας με 400, συνυπολογίζοντας και την αραιώση του δείγματος 1/10.

Σημείωση: Επειδή η ουρία μετριέται σε ούρα 24ώρου, ανάγουμε το αποτέλεσμα σε g/24ωρο.

Φυσιολογικές Τιμές

20 έως 36 g/24ωρο

2. Προσδιορισμός ουρικού οξέος

Για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος χρειαζόμαστε ούρα 24ώρου, τα οποία, χρησιμοποιούμε σε αραιώση 1:10 με απεσταγμένο νερό. Έτσι για το αποτέλεσμα της μέτρησης πολλαπλασιάζουμε στο τέλος επί 10 και κατόπιν ανάγουμε στον όγκο των ούρων που συλλέχτηκε. Αν ο προσδιορισμός δεν είναι δυνατόν να γίνει αμέσως, πρέπει τα ούρα να συντηρηθούν στο ψυγείο.

Σήμερα οι πλέον εύχρηστες μέθοδοι προσδιορισμού του ουρικού οξέος είναι οι ενζυμικές, βασιζόμενες στο ένζυμο ουρικάση. Μια τέτοια μέθοδο περιγράφουμε ευθύς αμέσως.

Αρχή μεθόδου: Το ουρικό οξύ παρουσία των ενζύμων, ουρικάση και υπεροξειδάση, μετατρέπει ένα χρωμογόνο σε έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στα ούρα.

Η μέθοδος οξειδωσης του ουρικού οξέος με τη χρήση του ενζύμου ουρικάση είναι η πλέον ειδική. Τα πλεονεκτήματά της είναι τα εξής: α) δεν χρειαζόμαστε απολευκωμάτων, και β) έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση, σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους.

Υλικά και αντιδραστήρια

- Πρότυπο διάλυμα ουρικού οξέος 8%.
- Ρυθμιστικό διάλυμα.
- Ένζυμο (ουρικάση και υπεροξειδάση).
- Δείγμα ούρων 24ώρου σε αραιώση 1/10.



Εικόνα 5.3: Πιπέτα με μηχανισμό για αυτόματη αναρρόφηση.

Σημείωση: Πρέπει να γίνει ανασύσταση των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσεως της εταιρείας παρασκευής. Στην τεχνική που ακολουθεί χρησιμοποιούμε τα αντιδραστήρια της εταιρίας Biosis.

Τεχνική:

- Ετοιμάζουμε τα σωληνάρια και τα χαρακτηρίζουμε *Τυφλό (T)*, *Πρότυπο (ST)*, και *Εξεταστέο (E)*.
- Προσθέτουμε κατά τα γνωστά τα απαραίτητα αντιδραστήρια και υλικά ακολουθώντας τις οδηγίες χρήσεως της μεθόδου, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

	T	ST	E
Διάλυμα εργασίας (περιέχει ουρική οξύ)	1 mL	1 mL	1 mL
Πρότυπο διάλυμα 8% ουρικού οξέος	-	0,05 mL	-
Απεσταγμένο νερό	0,05 mL	-	-
Δείγμα ούρων	-	-	0,05 mL

Επώαση στους 37 °C για 5 min.

Απεσταγμένο νερό	1 mL	1 mL	1 mL
------------------	------	------	------

Ανάδευση, μηδενισμός με Τυφλό και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm.

Πίνακας 5.2: Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου μέτρησης του ουρικού οξέος.

Αποτέλεσμα: Χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στο δείγμα σε mg/dL.

$$\text{Ουρικό οξύ (mg/dL)} = \frac{\text{Απορρόφηση (E)}}{\text{Απορρόφηση (ST)}} \times 80^*$$

* Ο συντελεστής αφορά την πυκνότητα του πρότυπου διαλύματος και δίδεται από την εταιρεία, την τεχνική της οποίας χρησιμοποιούμε. Στην προκειμένη περίπτωση είναι 8. Πολλαπλασιάζουμε όμως με 80, συνυπολογίζοντας και την αραιώση του δείγματος 1/10.

Σημείωση: Επειδή το ουρικό οξύ μετριέται σε ούρα 24ώρου, ανάγουμε το αποτέλεσμα σε g/24ωρο.

Φυσιολογικές Τιμές

0,4 έως 0,8 g/24ωρο

3. Προσδιορισμός κρεατινίνης

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αλλά και χρησιμοποιείται ακόμα σε πολλά εργαστήρια για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης είναι η μέθοδος Jaffe, που βασίζεται στην αντίδρασή της με το πικρικό οξύ. Η αντίδραση δεν είναι ειδική αφού και άλλες ουσίες (πρωτεΐνες, γλυκόζη, ακετόνη κ.λ.π.) αντιδρούν με το πικρικό οξύ και δίδουν το ίδιο κόκκινο προϊόν. Γι' αυτό κατά τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στον ορό αίματος, είναι απαραίτητο να προηγηθεί απολευκωμάτωση του δείγματος. Στα ούρα δεν κάνουμε απολευκωμάτωση, γιατί αυτά χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1/50.

Οι πιο σύγχρονες μέθοδοι βασίζονται στις ενζυμικές αντιδράσεις. Σ' αυτές, η κρεατινίνη υδρολύεται σε κρεατίνη, η οποία στη συνέχεια προσδιορίζεται ενζυμικά.

Περιγράφουμε, ακολούθως, την κλασική μέθοδο προσδιορισμού της κρεατινίνης, που βασίζεται στην αντίδραση Jaffe, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια της εταιρίας Biosis.

Αρχή μεθόδου: Η κρεατινίνη αντιδρά με διάλυμα πικρικού οξέος, σε αλκαλικό περιβάλλον και δίνει ένωση κοκκινωπού χρώματος (αντίδραση Jaffe). Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με το ποσό της κρεατινίνης στο δείγμα.

Υλικά και αντιδραστήρια

- Πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης 2%.
- Τριχλωροξικό οξύ (διάλυμα απολευκωμάτωσης).
- Διάλυμα πικρικού οξέος.
- Πρόσφατο αλκαλικό διάλυμα NaOH.
- Δείγμα ούρων 24ώρου σε αραιώση 1/50.



Εικόνα 5.4: Σύγχρονο ψηφιακό φωτόμετρο.

Τεχνική:

- Σε σωληνάρια αιμολύσεως που τα χαρακτηρίζουμε (T), (ST) και (E), εκτελούμε κατά τα γνωστά, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

	T	ST	E
Δείγμα ούρων σε αραιώση 1/50	-	-	0,5 mL
Διάλυμα απολευκωμάτωσης	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Απεσταγμένο νερό	0,5 mL	-	-
Πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης 2%	-	0,5 mL	-
Διάλυμα εργασίας	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL

**Ανάδευση και παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min.
Φωτομέτρηση έναντι Τυφλού, σε μήκος κύματος 520 nm.**

Πίνακας 5.3: Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου μέτρησης της κρεατινίνης.

Αποτέλεσμα: Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση κρεατινίνης στο δείγμα από τον τύπο:

$$\text{κρεατινίνη (mg/dL)} = \frac{\text{Απορρόφηση (E)}}{\text{Απορρόφηση (ST)}} \times 100^*$$

* Ο συντελεστής αφορά την πυκνότητα του πρότυπου διαλύματος και δίδεται από την εταιρεία, την τεχνική της οποίας χρησιμοποιούμε. Στην προκειμένη περίπτωση είναι 2. Πολλαπλασιάζουμε όμως με 100, συνυπολογίζοντας και την αραιώση του δείγματος 1/50.

Σημείωση: Επειδή στη μέτρηση της κρεατινίνης χρησιμοποιούμε ούρα 24ώρου, πρέπει να μετατρέψουμε το αποτέλεσμα σε g/24ωρο.

Φυσιολογικές Τιμές
1,3 έως 1,8 g/24ωρο

4. Υπολογισμός κάθαρσης κρεατινίνης

Για να υπολογίσουμε την κάθαρση κρεατινίνης (Clearance), χρειαζόμαστε ορό αίματος, και δείγμα ούρων 24ώρου.

Η συλλογή ούρων 24ώρου, πρέπει να γίνει με προσοχή. Ο εξεταζόμενος σε όλο το διάστημα, μένει ξαπλωμένος, τρώει ελαφρά και πίνει νερό και χυμούς. Δεν πίνει τσάι και καφέ και διακόπτει τη λήψη διουρητικών φαρμάκων. Τα ούρα κατά τη διάρκεια της συλλογής, φυλάσσονται στο ψυγείο. Με το τέλος της συλλογής στέλνονται στο εργαστήριο μαζί με δείγμα αίματος. Σημειώνεται επακριβώς ο χρόνος συλλογής, το βάρος και το ύψος του εξεταζομένου.

Στο εργαστήριο, μετράμε ακριβώς τον όγκο των ούρων και υπολογίζουμε το ποσό τους σε mL/min. Προσδιορίζουμε την κρεατινίνη στα ούρα και στον ορό αίματος με την τεχνική, που ήδη, έχουμε περιγράψει.

Μετράμε τη συγκέντρωση κρεατινίνης στον ορό αίματος και στα ούρα κατά τα γνωστά.

Ο υπολογισμός της κάθαρσης κρεατινίνης γίνεται ως εξής:

$$\text{Κάθαρση κρεατινίνης} = \frac{\text{mg/dL κρεατινίνης ούρων} \times \text{όγκο ούρων/min}}{\text{mg/dL κρεατινίνης ορού αίματος}}$$

Παράδειγμα:

Να υπολογιστεί η κάθαρση κρεατινίνης, όταν έχουμε όγκο ούρων 24ώρου 1400 mL και τιμές κρεατινίνης ούρων και ορού αίματος, 125 και 1 mg/dL, αντίστοιχα.

Κατ' αρχάς, υπολογίζουμε τον όγκο ούρων ανά λεπτό:

α) $24 \text{ h} \times 60 \text{ min} = 1440 \text{ min}$

β) $1400 \text{ mL} : 1440 \text{ min} = 0,97 \text{ mL/min}$

γ) Σύμφωνα με τον τύπο, έχουμε:

$$\text{Κάθαρση κρεατινίνης} = \frac{125 \text{ mg/dL} \times 0,97 \text{ mL/min}}{1 \text{ mg/dL}} = 128,8 \text{ mL/min}$$

Φυσιολογικές Τιμές

Άνδρες, 97 έως 137 mL/min

Γυναίκες, 88 έως 128 mL/min

Μικρή (φυσιολογική) αύξηση παρατηρείται στην εγκυμοσύνη, ενώ ελάττωση στους ηλικιωμένους. Στη νεφρική ανεπάρκεια αυξάνεται νωρίς πριν αυξηθούν στο αίμα η ουρία και η κρεατινίνη, γι' αυτό και η σημασία της δοκιμασίας είναι μεγάλη.

Σημείωση: Ο υπολογισμός αυτός ισχύει για ενήλικα άτομα με σωματική διάπλαση $1,73 \text{ m}^2$. Διαφορετικά (π.χ. στα παιδιά) πρέπει να γίνει διόρθωση της τιμής σύμφωνα με το βάρος και το ύψος του εξεταζομένου. Η διόρθωση γίνεται χρησιμοποιώντας τον παράγοντα $1,73/A$, όπου A είναι το πραγματικό εμβαδόν της επιφάνειας του σώματος του εξεταζομένου.

5. Προσδιορισμός αμυλάσης

Την αύξηση της αμυλάσης του πλάσματος ακολουθεί η αμυλάση των ούρων, εφ' όσον οι νεφροί λειτουργούν κανονικά. Επειδή η αμυλάση των ούρων παραμένει σταθερή για πολλές ώρες, η μέτρησή της έχει μεγάλη διαγνωστική αξία. Ειδικότερα στη οξεία παγκρεατίτιδα βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση και παραμένει για πολλές ημέρες, όταν στο αίμα είναι σε φυσιολογικά επίπεδα.

Ο προσδιορισμός της, είναι προτιμότερο να γίνεται σε πρόσφατα ούρα, αλλά μπορεί να γίνει και σε ούρα 2 ωρών αλλά και 24ώρου. Τότε το δείγμα κατά το διάστημα της συλλογής του πρέπει απαραίτητα να φυλάσσεται στο ψυγείο.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι προσδιορισμού της αμυλάσης, που βασίζονται σε διαφορετικές αρχές. Οι πιο συνηθισμένες είναι οι αμυλοκλαστικές, που βασίζονται στον προσδιορισμό του αμύλου, που παραμένει στο σωληνάριο μετά τη δράση του ενζύμου της αμυλάσης. Σ' αυτές ανήκει και η μέθοδος που περιγράφουμε στη συνέχεια.

Τιτλομετρική μέθοδος.

Αρχή μεθόδου: Διάλυμα αμύλου, γνωστής περιεκτικότητας προστίθεται σε δείγμα ούρων, που υφίσταται υποδιπλάσιες αραιώσεις. Με την προσθήκη διαλύματος *Lugol* εμφανίζεται κυανοϊώδες χρώμα στα σωληνάρια που υπάρχει άμυλο. Αντιθέτως, όπου δεν υπάρχει άμυλο, το περιεχόμενο του σωληναρίου παραμένει άχρωμο.

Υλικά και αντιδραστήρια

- Διάλυμα αμύλου 1%.
- Διάλυμα *Lugol*.
- Φυσιολογικός ορός.
- Δείγμα ούρων 24ώρου.



Εικόνα 5.5: Στατώ με αυτόματες πιπέττες.

Παρασκευή αντιδραστηρίων

- 1. Διάλυμα αμύλου 1%.** Διαλύουμε 0,1 g αμύλου σε 80 mL απεσταγμένου νερού ή φυσιολογικού ορού. Θερμαίνουμε με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού κρυώσει το διάλυμα το μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώνουμε Α.Δ. μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα διατηρείται για δύο εβδομάδες στο ψυγείο. Στη μέθοδο που ακολουθεί χρησιμοποιείται σε αραιώση 1/10.
- 2. Διάλυμα Lugol.** Παρασκευάζουμε υδατικό διάλυμα όγκου 200 mL, όπου περιέχονται 1g μεταλλικού ιωδίου και 2g ιωδιούχου καλίου. Σημειώνουμε ότι το διάλυμα αυτό πρέπει να φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Τεχνική:

- Τοποθετούμε σε στατώ 8 έως 10 σωληνάρια αιμολύσεως.
- Βάζουμε σε καθένα απ' αυτά 1 mL φυσιολογικού ορού.
- Στο πρώτο σωληνάριο προσθέτουμε 1 mL από το δείγμα ούρων 24ώρου.
- Αναμιγνύουμε καλά και μεταφέρουμε 1 mL στο δεύτερο σωληνάριο.
- Αναμιγνύουμε και πάλι και μεταφέρουμε 1 mL στο τρίτο σωληνάριο κ.ο.κ. (υποδιπλάσιες αραιώσεις).
- Οι αραιώσεις που παρασκευάσαμε είναι οι εξής:

Αριθμός σωληναρίου	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Τελική αραιώση	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512

- Προσθέτουμε 2 mL αραιού διαλύματος αμύλου σε όλα τα σωληνάρια, αναμιγνύουμε καλά και τα τοποθετούμε σε υδατόλουτρο 37A για 30 min.
- Προσθέτουμε 2 σταγόνες διαλύματος Lugol (σε αραιώση 1/6).
- Παρατηρούμε την αλλαγή του χρώματος. Αν το άμυλο δεν έχει διασπασθεί από την αμυλάση, το περιεχόμενο του σωληναρίου θα έχει κυανοϊώδες χρώμα, διαφορετικά θα είναι άχρωμο.

Ανάγνωση αποτελέσματος

Σε φυσιολογικά ούρα δεν θα εμφανιστεί χρώμα στο 1ο και 2ο σωληνάριο, γιατί όλο το άμυλο διασπάστηκε από την αμυλάση του δείγματος. Όσο περισσότερη ποσότητα ενζύμου περιέχεται στα ούρα, τόσο η διάσπαση του αμύλου θα γίνει σε μεγαλύτερες αραιώσεις του δείγματος. Θεωρούμε ως δραστηκότητα του ενζύμου, την αραιώση που αντιστοιχεί στο τελευταίο σωληνάριο που δεν χρωματίστηκε. Αυτό σημαίνει ότι η περιεκτικότητα της αμυλάσης στο σωληνάριο αυτό ήταν αρκετή ώστε

να διασπάσει όλο το άμυλο που βάλαμε. Γι' αυτό το Lugol δεν «βρήκε» άμυλο ώστε να δώσει χρώμα.

Ο αριθμός λοιπόν της αραίωσης του σωληναρίου αυτού αποτελεί τις μονάδες Wohlgemuth /mL ούρων.

Για παράδειγμα, στο σωληνάριο 3 αντιστοιχεί αραίωση 1/8, άρα 8 μονάδες,

στο σωληνάριο 4 αντιστοιχούν 16 μονάδες,

στο σωληνάριο 5 αντιστοιχούν 32 μονάδες, κ.ο.κ.

Φυσιολογικές Τιμές
8 έως 64 μονάδες Wohlgemuth/mL
ή 800 έως 6400 U/L

► Άλλες μέθοδοι

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί φωτομετρικές μέθοδοι, ενζυμικές, αλλά και κινητικές, που απαιτούν φωτόμετρο με θερμαινόμενη κυβέττα.

Τέλος, βρίσκουμε σήμερα στο εμπόριο και ταινίες της εταιρείας Hoechst, που κάνουν ημιποσοτικό προσδιορισμό.

➤ 5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι συνηθέστερες εξετάσεις που γίνονται σε ούρα 24ώρου είναι:

- ο προσδιορισμός των οιστρογόνων
- ο προσδιορισμός της πρεγναδιόλης
- ο προσδιορισμός της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH)
- ο προσδιορισμός της θυλακινοτρόπου ορμόνης (FSH)
- ο προσδιορισμός της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG)
- ο προσδιορισμός των 17-κετοστεροειδών

1. Προσδιορισμός οιστρογόνων

Ο προσδιορισμός των οιστρογόνων είναι απαραίτητος για τη διάγνωση των ανωμαλιών του κύκλου καθώς και για την παρακολούθηση της κύησης, δεδομένου ότι τα οιστρογόνα αυξάνονται με την πρόοδό της. Η εξέταση απαιτεί συλλογή ούρων

24ώρου με σχολαστικότητα, σε δοχείο που περιέχει συντηρητικό τολουόλη, καθώς και φύλαξή τους στο ψυγείο καθ' όλη τη διάρκεια της συλλογής. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, είναι η χρωματομετρία και η χρωματογραφία.

2. Προσδιορισμός πρεγναδιόλης

Ο προσδιορισμός της πρεγναδιόλης γίνεται για την παρακολούθηση της εγκυμοσύνης και θεωρείται από τις πιο ειδικές εξετάσεις, δεδομένου ότι η προγεστερόνη (και κατά συνέπεια η πρεγναδιόλη) εκκρίνεται σε μεγάλη ποσότητα από τον πλακούντα παράλληλα με την ανάπτυξή του, κάτι που προϋποθέτει και καλή πορεία της κύησης. Συλλέγονται ούρα 24ώρου με προσοχή, φυλάσσονται στο ψυγείο καθ' όλη τη διάρκεια της συλλογής, στο δε δοχείο υπάρχει ως συντηρητικό, τολουόλη.

3. Προσδιορισμός ωχρινοτρόπου και θυλακινοτρόπου ορμόνης

Για τον προσδιορισμό της ωχρινοτρόπου και της θυλακινοτρόπου ορμόνης συλλέγονται ούρα 24ώρου προσεκτικά και φυλάσσονται στο ψυγείο χωρίς συντηρητικά. Η μέτρηση γίνεται με ανοσοβιολογικές ή χρωματομετρικές μεθόδους (όπως και στον ορό αίματος).

4. Προσδιορισμός 17-κετοστεροειδών

Ο προσδιορισμός 17-κετοστεροειδών γίνεται για τον έλεγχο της λειτουργικής ικανότητας των όρχεων, δεδομένου ότι η τεστοστερόνη που παράγεται απ' αυτούς συμβάλλει στην αυξημένη αποβολή τους στα ούρα. Συλλέγονται ούρα 24ώρου και στη φιάλη συλλογής υπάρχει ποσότητα HCl ή οξεικού οξέος, ως συντηρητικό εκλογής.

5. Προσδιορισμός χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG)

Η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) είναι η ορμόνη που μας βοηθά στην πρώιμη διάγνωση της εγκυμοσύνης. Εκκρίνεται από τη χοριακή στιβάδα του πλακούντα και βρίσκεται στα ούρα από την 8η ημέρα μετά τη σύλληψη, αυξάνεται προοδευτικά μέχρι την 8η με 10η εβδομάδα της κύησης, ενώ μετά αρχίζει να μειώνεται μέχρι τον τοκετό. Σε περίπτωση διακοπής της κύησης το ποσό της ορμόνης στα ούρα ελαττώνεται και μέσα σε λίγες ώρες μηδενίζεται. Σε σπάνιες περιπτώσεις, όπως στο χοριοεπιθελίωμα, που είναι μία μορφή καρκίνου και συμβαίνει και στον άνδρα και στη γυναίκα, αυξάνεται το ποσό της hCG στα ούρα.

ΧΡΟΝΟΣ	ΠΟΣΟ ΣΕ U/L
1η εβδομάδα	5-50
2η εβδομάδα	40-200
3η εβδομάδα	100-500
4η εβδομάδα	700-2000
2ος – 3ος μήνας	12.000-200.000
4ος – 9ος μήνας	24.000-55.000

Πίνακας 5.4: Συγκέντρωση hCG, στη διάρκεια της κύησης.

➤ 5.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ



Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συμβαίνουν μεταβολές στη σύσταση του αίματος και των ούρων της εγκύου, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της πορείας της εγκυμοσύνης και της κατάστασης του εμβρύου.

Ειδικότερα, οι εργαστηριακές εξετάσεις προσφέρουν πληροφορίες για:

- την ύπαρξη εγκυμοσύνης
- την πιθανότητα εξωμήτριας εγκυμοσύνης
- την πορεία της εγκυμοσύνης
- την ανάπτυξη του εμβρύου
- την ύπαρξη γενετικών νόσων ή συγγενών ανωμαλιών (λήψη εμβρυϊκών κυττάρων).

► Τεστ κυήσεως

Η βάση των περισσότερων τεστ κυήσεως, είναι ο προσδιορισμός της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) είτε ποιοτικά είτε ποσοτικά. Δείγματα που χρησιμοποιούνται, είναι το αίμα και κυρίως, τα ούρα.

Προϋποθέσεις για σωστή διάγνωση είναι οι εξής:

- Το βράδυ πριν τη συλλογή η έγκυος δεν πρέπει να πιει πολλά υγρά.
- Πρέπει να σταματήσει τη λήψη φαρμάκων (ασπιρίνες, ορμόνες, ηρεμιστικά).

- Η συλλογή των πρώτων πρωινών ούρων, πρέπει να γίνει σε καθαρό δοχείο και αυτά να φυλαχτούν στο ψυγείο.
- Πρέπει τα ούρα να έχουν όξινο pH.
- Επίσης, να χρησιμοποιηθούν διηθημένα ή φυγοκεντρημένα ούρα.

Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί, διάφοροι τρόποι διάγνωσης της κύησης, που βασίζονται στις εξής τεχνικές:

α) Στην τεχνική της αναστολής της συγκόλλησης ερυθρών αιμοσφαιρίων ή σωματιδίων Latex. Τέτοια τεστ, είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στο σπίτι. Είναι ποιοτικά και έχουν ευαισθησία 1500 U/L, οπότε και δίνουν θετικά αποτελέσματα μετά τη σύλληψη.

β) Στις ανοσοενζυμικές τεχνικές. Εφαρμόζονται στα ούρα, έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία 50 U/L και επιβεβαιώνουν την εγκυμοσύνη 1-2 εβδομάδες μετά τη σύλληψη.

γ) Στις ραδιοανοσολογικές (RIA) ή ανοσοραδιομετρικές (IRMA) τεχνικές.

Έχουν πολύ μεγάλη ευαισθησία έως 1U/L ανιχνεύουν τη hCG και στον ορό αίματος επιβεβαιώνοντας μια εγκυμοσύνη 7-10 ημέρες μετά τη σύλληψη.

Ο προσδιορισμός της hCG στα ούρα δεν είναι αξιόπιστος, διότι παρεμβάλλεται η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH). Αντιθέτως, ο προσδιορισμός στον ορό αίματος πληροί τα κριτήρια εξειδίκευσης και ευαισθησίας της μεθόδου.

1. Ανοσοενζυμική μέθοδος

Αρχή μεθόδου: Χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα για την εκλεκτική αναγνώριση της ορμόνης στα ούρα, η οποία προκαλεί συγκόλληση και το αποτέλεσμα φαίνεται, ως (+) ή (-).

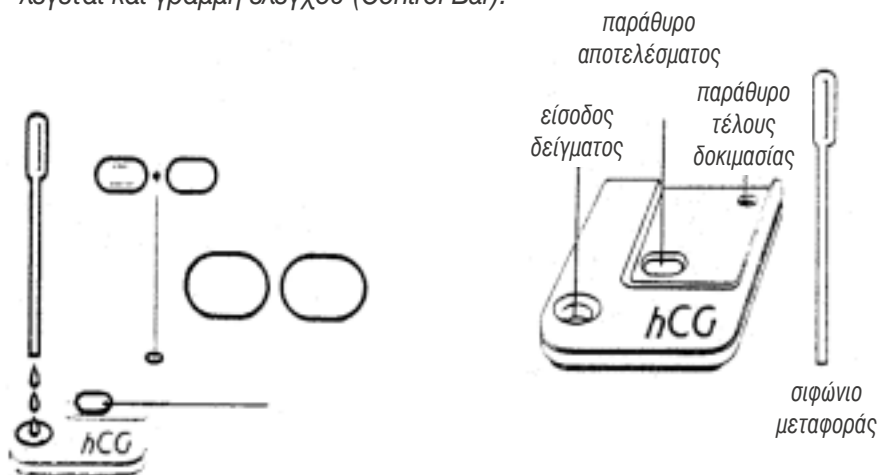
Τεχνική:

- Η δοκιμασία εκτελείται πάνω στον ειδικό δίσκο αντίδρασης.
- Μεταφέρουμε 3 σταγόνες ούρα στην ειδική οπή του δίσκου (sample well).
- Η τεχνική ολοκληρώνεται όταν τα ούρα φθάσουν στο «παράθυρο τέλους της μεθόδου» (End of Assay Window) και αυτό παίρνει σκούρο χρώμα.
- Παρατηρούμε τότε στο «παράθυρο αποτελέσματος» (Result Window), που βρίσκεται στο κέντρο του δίσκου το θετικό (+) ή το αρνητικό (-) αποτέλεσμα. Η δοκιμασία ολοκληρώνεται σε 5 λεπτά περίπου.

Έλεγχος δοκιμασίας

Ο ποιοτικός έλεγχος της δοκιμασίας, γίνεται για να διαπιστώσουμε αν τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε είναι χημικώς ενεργά. Αυτό επιβεβαιώνεται:

- α) όταν το "End of Assay Window" πάρει σκούρο χρώμα, και
- β) με την εμφάνιση του σημείου (-) στο "Result Window". Γι' αυτό και το σημείο (-) λέγεται και γραμμή ελέγχου (Control Bar).



Εικόνα 5.6: Ο δίσκος αντίδρασης του τεστ κύησης.

2. Ανοσοχρωματογραφική μέθοδος (Labomed Test)

Αρχή μεθόδου: Η δοκιμασία βασίζεται στην ανίχνευση της hCG από μονοκλωνικά αντισώματα, που βρίσκονται ενσωματωμένα σε κολλοειδή χρυσό.

Το τεστ αυτό αποτελεί μία ταχύτατη μέθοδο ανίχνευσης της χοριακής γοναδοτροπίνης στον ορό αίματος και στα ούρα από την πρώτη ημέρα της καθυστέρησης. Κατάλληλα είναι τα πρώτα πρωινά ούρα, που έχουν συλλεγεί σε αποστειρωμένο δοχείο μιας χρήσης.

Τεχνική:

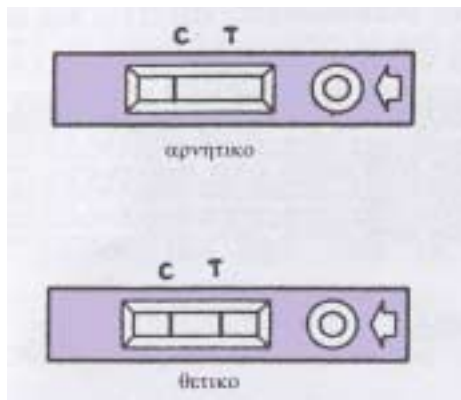
- Αφαιρούμε το πλακίδιο από το φάκελο, το τοποθετούμε σε μια οριζόντια επιφάνεια και το αφήνουμε να πάρει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η μεμβράνη του πλακιδίου είναι επικαλυμμένη με anti-hCG αντισώματα.
- Προσθέτουμε με πιπέττα τρεις σταγόνες δείγματος στη θέση S προσέχοντας να μην σχηματισθούν φυσαλίδες.
- Το δείγμα κινείται κατά μήκος της μεμβράνης του πλακιδίου, συνεπεία τριχοειδικού φαινομένου και αντιδρά με το αντίσωμα.
- Περιμένουμε 3 έως 5 λεπτά για την εμφάνιση του αποτελέσματος.

Αξιολόγηση

ΘΕΤΙΚΟ (+) κρίνεται το τεστ από την **εμφάνιση κόκκινης γραμμής** στη θέση T (Test), που υποδηλώνει την ύπαρξη hCG στο δείγμα. Η επιβεβαίωση της δοκιμασίας γίνεται με την εμφάνιση και δεύτερης κόκκινης γραμμής στη θέση C (Control). Η εμφάνιση της δεύτερης γραμμής, επιβεβαιώνει την αξιοπιστία του αποτελέσματος.

ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-) κρίνεται το τεστ, όταν εμφανίζεται μόνο μία κόκκινη γραμμή στη θέση C. Δεν αξιολογούμε το αποτέλεσμα μετά πάροδο 5 λεπτών από την τοποθέτηση του δείγματος. Επίσης, δεν αξιολογείται το αποτέλεσμα, αν δεν εμφανιστεί καμία κόκκινη γραμμή.

Σημείωση: Πρέπει να τηρούνται οι κανόνες συντήρησης των αντιδραστηρίων, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της εταιρείας παρασκευής.



Εικόνα 5.7: Αξιολόγηση του τεστ κύησης.

3. Τεστ κύησης κατ' οίκον

Χρησιμοποιούνται πολλά ιδιοσκευάσματα που βρίσκουν οι ενδιαφερόμενοι στα φαρμακεία. Τα περισσότερα βασίζονται στην ίδια αρχή και ακολουθούν παρόμοιο τρόπο χρήσης.

Τεχνική:

- Αφαιρούμε το τεστ από το προστατευτικό του κάλυμμα και τραβάμε ώστε να αποχωριστούν τα δύο μέρη του.
- Κρατάμε για μερικά δευτερόλεπτα το απορροφητικό άκρο του τεστ στη ροή των ούρων, ώστε να διαβραχεί καλά.
- Ενώνουμε ξανά τα δύο μέρη του και περιμένουμε 2 - 5 λεπτά για την εμφάνιση του αποτελέσματος. Αυτό παραμένει αξιόπιστο για 10 λεπτά.

Αξιολόγηση

ΘΕΤΙΚΟ (+): Εμφανίζονται δύο γραμμές ή δύο κουκίδες με χρώμα ελαφρά ή έντονα κόκκινο.

ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-): Εμφανίζεται μία κόκκινη γραμμή ή κουκίδα που επιβεβαιώνει ότι το τεστ λειτούργησε σωστά.

Σημείωση: Εάν δεν εμφανισθεί καμία κόκκινη γραμμή ή κουκίδα, σημαίνει ότι το τεστ δεν λειτούργησε σωστά και η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί.



Πρίν τη χρήση



Μετά τη χρήση

Εικόνα 5.8: Έλεγχος εγκυμοσύνης κατ' οίκον.

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ο τρόπος χρήσης του συγκεκριμένου τέστ, καθώς και η επιβεβαίωση της εγκυμοσύνης με την εμφάνιση δύο κόκκινων κουκίδων.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

- Ο προσδιορισμός των ηλεκτρολυτών γίνεται με τη μέθοδο των ιοντοεπιλεκτικών ηλεκτροδίων, δηλαδή ηλεκτροδίων μεμβράνης που αποκρίνονται εκλεκτικά σε ένα ή περισσότερα είδη ιόντων και η ποσότητά τους είναι συνδεδεμένη με τη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας.
- Η μέτρηση οργανικών ουσιών στα ούρα (ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη,) είναι πολύ χρήσιμη αφού τα επίπεδά τους, αποτελούν δείκτη της νεφρικής λειτουργίας.
- Η μέτρηση της αμυλάσης στα ούρα είναι περισσότερο αξιόπιστη μέθοδος από την αντίστοιχη μέτρηση στον ορό αίματος, ελέγχει δε, την λειτουργία του παγκρέατος.
- Αξίζει να τονίσουμε ότι ο προσδιορισμός της κρεατινίνης και ιδιαίτερα η μέτρηση της κάθαρσης της κρεατινίνης αποτελεί τον πιο αντιπροσωπευτικό δείκτη της νεφρικής λειτουργίας, αφού οι τιμές της δεν επηρεάζονται από το διαιτολόγιο και την πρόσληψη ή απέκκριση υγρών.
- Η μέθοδος προσδιορισμού της ουρίας, του ουρικού οξέος και της κρεατινίνης είναι χρωματομετρική και βασίζεται στην κατάλληλη επεξεργασία των δειγμάτων, ώστε να παραχθεί ως τελικό προϊόν της αντίδρασης μια σταθερή ένωση που απορροφά φως σε κατάλληλο μήκος κύματος, ενώ υπάρχει αναλογία μεταξύ της απορρόφησης και της συγκέντρωσης της ουσίας στο δείγμα.
- Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε ότι η ευρεία χρήση των τεστ κυήσεως που αποτελούν την πρώτη δοκιμασία για εγκυμοσύνη, βασίζονται στην ανίχνευση της χοριακής γοναδοτροπίνης. Η μέτρησή της στηρίζεται σε ανοσοχημικές και ανοσοενzymικές μεθόδους.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποια είναι η χρησιμότητα του προσδιορισμού οργανικών ουσιών στα ούρα;
2. Ποια εξέταση θεωρείται η πλέον αντιπροσωπευτική για τον έλεγχο της νεφρικής λειτουργίας; Δικαιολογείστε την απάντησή σας.
3. Αναφέρατε την αρχή της μεθόδου προσδιορισμού της ουρίας και του ουρικού οξέος.
4. Γιατί στον προσδιορισμό του ουρικού οξέος προσθέτουμε απεσταγμένο νερό πριν από τη φωτομέτρηση;
5. Ποια η χρησιμότητα του προσδιορισμού της κρεατινίνης; Γιατί κατά τον προσδιορισμό της με χρωματομετρική μέθοδο, κάνουμε πρώτα απολευκωμάτωση των δειγμάτων;
6. Πώς υπολογίζεται η κάθαρση της κρεατινίνης στο εργαστήριο, και ποιες είναι οι φυσιολογικές τιμές;
7. Να υπολογίσετε την κάθαρση της κρεατινίνης από τα εξής στοιχεία:
Απορρόφηση ορού = 0,167
Απορρόφηση πρότυπου διαλύματος = 0,223
Απορρόφηση ούρων 24ώρου = 0,131 (τα ούρα έχουν αραιωθεί 1/50).
Όγκος ούρων 24ώρου = 157mL
Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος = 2,0 mg/dL
8. Ποια είναι η αρχή στην οποία στηρίζονται τα τεστ κυήσεως;
9. Ποιες είναι οι προϋποθέσεις για τη σωστή διάγνωση κατά το τεστ κυήσεως;
10. Πού στηρίζεται η λειτουργία των αναλυτών ISE.
11. Ποια είναι η αρχή της φλογοφωτομετρίας και ποια της ατομικής απορρόφησης;

