

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

30 января 2009 г.

Регистрационный № 194-1208

**МЕТОДИКА АНАЛИЗА МОЧЕВЫХ КАМНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КАЧЕСТВЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ
И МИКРОКРИСТАЛЛОСКОПИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУО «Белорусская медицинская академия
последипломного образования»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. В.И. Вошула, канд. мед. наук, доц.
И.В. Тарасюк, А.Н. Бычкова, Т.М. Юрага, С.И. Станкевич, Т.А. Жуковец,
В.Ю. Лелюк, С.Г. Никонович

Минск 2009

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Микроскоп, $\geq 300\times$ с встроенным осветителем.
2. Баня водяная, рабочий диапазон 20–100 °С.
3. Дозатор пипеточный переменного объема 0,5–10 мкл, 1–5 мл с наконечниками.
4. Электроплитка настольная, мощность 0,197–0,8 кВт.
5. Колба мерная, 1 л.
6. Стакан лабораторный, 0,3 л.
7. Цилиндр, 0,5 л.
8. Пипетки стеклянные.
9. Ступка и пестик.
10. Пробирки стеклянные 14×60, 4 мл.
11. Предметные стекла
12. Покровные стекла 24×24 мм.
13. Азотная кислота, хч.
14. Серная кислота, хч.
15. Натрия гидроксид, чда.
16. Аммиак водный, чда.
17. Соляная кислота, хч.
18. Резорцин (1,3-дигидроксибензол) ($\geq 99\%$).
19. Реактив Несслера K_2HgI_4 , чда.
20. Аммония молибдат $(NH_4)_2MoO_4$, чда.
21. Магnezон I (4-(4-нитрофенилазо)резорцин) ($\geq 96\%$).
22. 5-нитробарбитуровая кислота ($\geq 96\%$).
23. Масло иммерсионное.
24. Хлороформ, ч.
25. Полисиликон (silicon elastomer) SE-30.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

У каждого пациента с мочекаменной болезнью (МКБ) хотя бы один камень должен быть проанализирован. Результаты определения состава мочевых камней должны являться обязательным компонентом алгоритма диагностики и лечения МКБ.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Не выявлены.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСБА

1. Подготовка исследуемого материала

Камень очищают, промывают дистиллированной водой и высушивают на фильтровальной бумаге при комнатной температуре в течение 12 ч, после чего взвешивают и описывают внешний вид. Затем разрезают на части

тонкой пилкой; при наличии в образце нескольких визуально различимых фаз (в виде ядра, зональности и т. п.) отбирают фрагменты каждой фазы для микроскопии и химического анализа согласно нижеприведенной процедуре.

Образцы измельчают (при наличии хорошо сформированных кристаллов их отделяют иглой или шпателем для последующей микроскопии) и хранят в закрытых стеклянных пробирках (использование пластиковой посуды для хранения нежелательно по причине электризации порошка).

2. Подготовка реактивов

2.1. Азотная кислота, 20% р-р: 19,86 мл 63% HNO_3 доводят H_2O до 100,0 мл.

2.2. Натрия гидроксид, 10% р-р: 10,0 г NaOH растворяют в 90,0 мл H_2O .

2.3. Аммиак водный, 10% р-р: 40,0 мл 25% р-ра аммиака доводят H_2O до 100,0 мл.

2.4. Соляная кислота, 10% р-р: 24,0 мл HCl 36%, $\rho=1,18$ г/мл, доводят H_2O до 100,0 мл.

2.5. Молибденовая жидкость: 5,0 г $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ растворить в смеси 100,0 мл H_2O и 35,0 мл 63% HNO_3 (реактив стабилен в стеклянной посуде в течение 30 дней).

2.6. Раствор магнезона: 5 мг магнезона I растворить в 10 мл 10% NaOH (Реактив устойчив только в щелочной среде. Все манипуляции с твердым магнезоном выполнять в стеклянной посуде по причине сильной электризации порошка).

2.7. Раствор 5-нитробарбитуровой кислоты (5-НБК): 10 мг 5-НБК растворить в 10 мл H_2O при 70–80 °С, охладить до комнатной температуры (раствор стабилен в стеклянной посуде в течение 7 дней).

2.8. Раствор для силиконирования предметных стекол: 0,75 мл полисиликона SE-30 растворить в 300 мл хлороформа (хранить в стеклянной посуде, плотно закрытой полиэтиленовой пробкой, вдали от источников тепла).

3. Ход определения

3.1. Микроскопия

Образец наносят на предметное стекло и микроскопируют при 50–70×, отмечают размер, текстуру и форму кристаллитов.

3.2. Проба с азотной кислотой

На предметном стекле или пластинке для капельного анализа к небольшому количеству (≈ 5 мг) порошка камня прибавляют 2 капли 20% HNO_3 , затем осторожно выпаривают досуха на плитке или водяной бане.

Возможные результаты:

1. Остаток (первоначально пурпурно-красного или желтого цвета, с коричневым оттенком) изменяет цвет на фиолетово-красный при охлаждении и добавлении 1 капли 10% NH_4OH — присутствует мочева кислота или 2,8-дигидроксиаденин.

2. Образуется зеленовато-желтый остаток, меняющий цвет на оранжевый в присутствии щелочи, и на красный — при дальнейшем нагревании — ксантин.

3. Происходит почти полное обугливание образца, часто сопровождаемое появлением неприятного запаха — присутствует цистин.

4. Образуется белый или светло-серый остаток — образец минерального состава (содержит оксалаты или фосфаты).

Для дальнейшего анализа органические образцы, состоящие из пуриновых соединений, растворяют в 10% NaOH, цистиновые камни — в 10% HCl, минеральные — в 20% HNO₃ (1 мл на 5 мг порошка камня).

3.3. Микрорентгенофлуоресценция

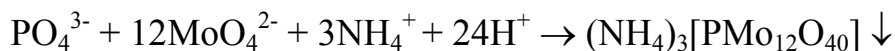
Предметные стекла для микрорентгенофлуоресценции обрабатывают хромовой смесью в течение 24 ч, промывают дистиллированной водой, сушат, обезжиривают и обрабатывают раствором SE-30 в хлороформе, с последующей сушкой при 120 °С в течение 3 ч.

Для всех микрохимических реакций обязательна постановка холостого опыта.

Обнаружение мочевой кислоты: порошок камня растворяют в концентрированной H₂SO₄ (1 мл на 10 мг порошка камня). Каплю раствора наносят стеклянной палочкой на предметное стекло, добавляют 10 мкл дистиллированной воды через 5 мин. Накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Из сернокислого раствора кристаллы мочевой кислоты выпадают вначале в форме четко очерченных параллелограммов (табличек), растущих вдоль одной оси, но по мере испарения растворителя агрегируют (рис. 1, 2).

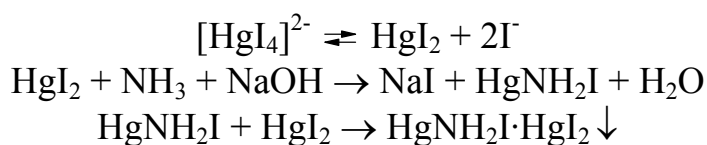
Обнаружение цистина: к 5 мг порошка камня прибавляют 1 мл 10% HCl. Отбирают 1–3 мкл раствора, препарат оставляют до полного высыхания, затем микроскопируют. В присутствии цистина выпадают крупные игольчатые кристаллы цистина гидрохлорида (рис. 3). К препарату добавляют 5 мкл дистиллированной воды, через 1 мин накрывают покровным стеклом и микроскопируют (высыхание препарата недопустимо). Цистин выпадает в виде характерных гексагональных кристаллов (рис. 4), при дальнейшем росте образующих агрегаты.

Обнаружение фосфатов: к 1 мкл раствора порошка камня прибавляют 1 мкл молибденовой жидкости, после высыхания препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют. При наличии в растворе ионов PO₄³⁻ образуются желтые икосаэдрические кристаллы фосфомолибдата аммония (рис. 5):



Обнаружение аммония: к 10 мкл 10% NaOH добавляют 1 мкл раствора порошка камня в HNO₃, затем 1 мкл реактива Несслера (реактив Несслера устойчив только в щелочной среде; в кислой среде выпадают ярко-красные октаэдры диодида ртути).

В присутствии ионов аммония выпадает желто-коричневый визуально аморфный осадок амидоидида:



Раздельное обнаружение кальция и магния по реакции с 5-нитробарбитуровой кислотой: к 1 мкл минерализата камня добавляют 1 мкл раствора 5-НБК, препарат оставляют до полного высыхания и микроскопируют. При комнатной температуре (18–25 °С) в присутствии магния выпадают ромбические кристаллы нитробарбитурата магния (рис. 6); нитробарбитурат кальция кристаллизуется в форме призматических игл, прямоугольных или квадратных табличек (рис. 7). Реакция более чувствительна для магния.

Тест основан на различии габитуса кристаллов, образуемых нитробарбитуратами различных щелочноземельных металлов¹.

Обнаружение магния с магнезоном: к капле 10% NaOH на предметном стекле добавляют 5 мкл раствора порошка камня в HNO₃. На выпавший осадок наносят 1 мкл раствора магнезона. В присутствии соединений магния окраска индикатора изменяется с красно-фиолетовой на интенсивно-синюю.

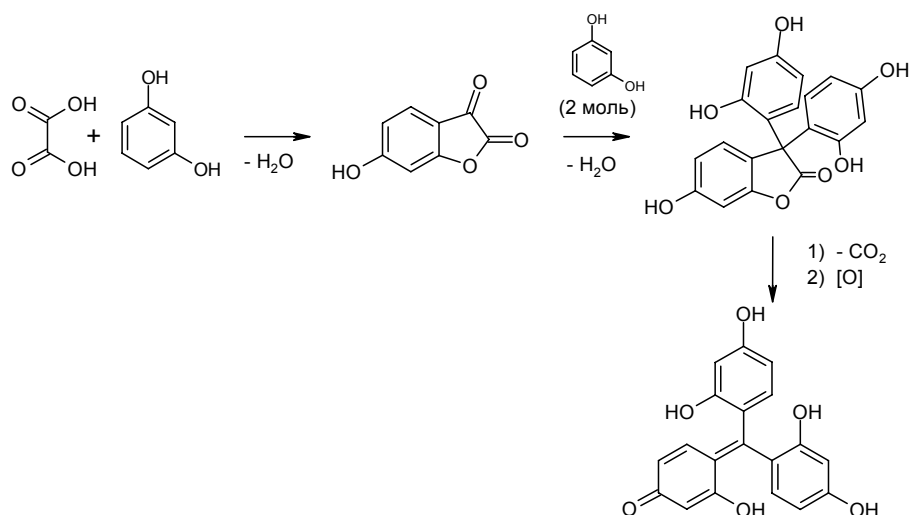
Можно проводить тест также с твердым образцом: к 5 мг порошка камня на предметном стекле добавляют 1 мкл раствора магнезона и наблюдают изменение окраски. Данный тест основан на изменении цвета индикатора при адсорбции на гидроксиде магния, выпадающем в щелочной среде из растворов, содержащих ионы Mg²⁺.

3.4. Качественная реакция

Обнаружение оксалатов: 2–3 мг порошка камня смешивают с двойным количеством порошка резорцина и прибавляют 2 капли H₂SO₄. Смесь нагревают до 90–110 °С. Появление интенсивно-синей окраски указывает на присутствие оксалатов. Возможен ложноотрицательный результат при содержании органического компонента > 1/4 от массы образца, поскольку обугливание органических соединений искажает окраску. Для каждого исследуемого образца необходима постановка контрольного опыта.

Тест основан на реакции образования окрашенных трифенилметановых производных при конденсации резорцина с оксалатом в сильноокислой среде:

¹ При необходимости возможно определение оптических свойств полученных кристаллов нитробарбитуратов в поляризованном свете.



Обнаружение карбонатов: 50-100 мг порошка камня обрабатывают 2–3 каплями 10% HCl, вначале без нагрева, затем нагревают. Если выделяется CO₂, камень содержит карбонаты. При этом можно предположить и присутствие фосфатов, так как CO₃²⁻ встречается в мочевых камнях практически всегда в форме карбонат-апатита. Тест основан на реакции:

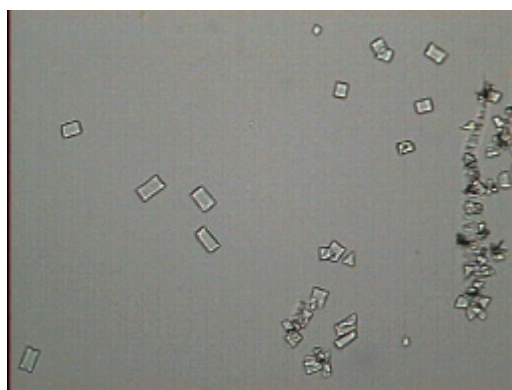
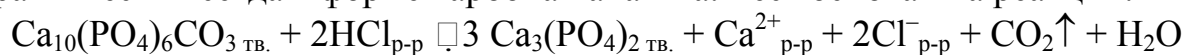


Рис. 1. Микрофотография кристаллов мочевой кислоты, образующихся при переосаждении из раствора в концентрированной H₂SO₄. Время кристаллизации 10 мин. Увеличение x200



Рис. 2. Микрофотография кристаллов мочевой кислоты, образующихся при переосаждении из раствора в концентрированной H₂SO₄. Время кристаллизации 60 мин. Увеличение x200



Рис. 3. Микрофотография кристаллов цистина гидрохлорида. Увеличение x50

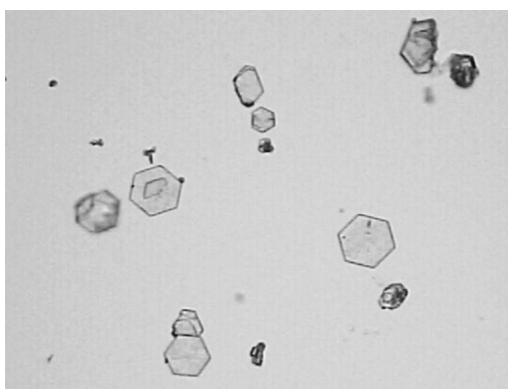


Рис. 4. Микрофотография кристаллов цистина, образующихся при гидролизе цистина гидрохлорида. Начальная стадия кристаллизации (мокрый препарат). Увеличение x200

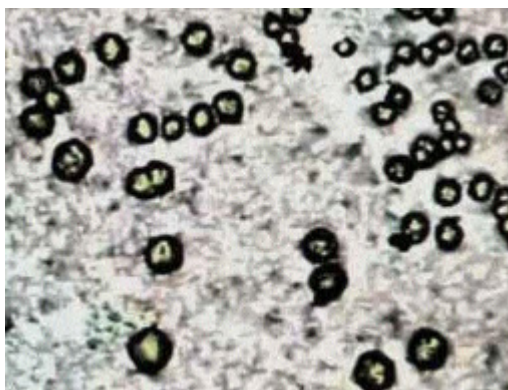


Рис. 5. Микрофотография кристаллов фосфомолибдата аммония. Увеличение x200



Рис. 6. Микрофотография кристаллов нитробарбитурата магния, осажденных из минерализата магнияммонийфосфатного камня. Увеличение x100

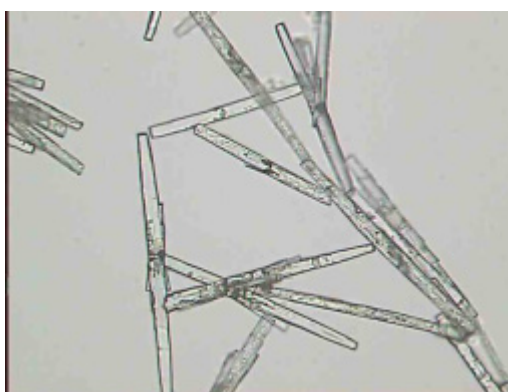


Рис. 7. Микрофотография кристаллов нитробарбитурата кальция, осажденных из минерализата кальций-оксалатного камня. Увеличение x400

4. Идентификация результатов

При проведении микроскопии выделяют следующие типы кристаллов:

1. Онтогенические:

- кристаллолиты (включая индивидуальные органические соединения);
- органолиты (матриксные камни).

2. Структурные:

2.1. По строению:

- радиально-лучистые (астеролиты);
- сферолиты;
- зернистые (криптолиты).

2.2. По микрорельефу поверхности:

- сфероидная (лишенная заметных неровностей);
- фасетчатая (поверхность представлена гранями срастающихся кристаллов либо срастающимися сферолитами);
- коррозионная (микровыступы и микровпадины, возникшие при послойном растворении камня);

2.3. По размеру кристаллов:

- макрокристаллический, более 0,1 мм;
- микрокристаллический, 0,1–0,01 мм;

- криптокристаллический, менее 0,01 мм (на малых увеличениях визуально не распознается).

3. Тектурные:

- однородный;

- зональный (макрозональный — мощность зон более 0,1 мм, микрорональный — мощность зон 0,1–0,01 мм, криптозональный — мощность зон менее 0,01 мм);

- слоистый (классифицируется аналогично зональному);

- кавернозный (поровый, губчатый, камерный и т. п.).

По результатам качественного анализа и микроскопической идентификации можно выявить следующие онтогенические типы уролитов:

1) кальций-оксалатные макрокристаллические, сложенные, как правило, дигидратом оксалата кальция;

2) кальций-оксалатные сферолитные криптокристаллические; основной компонент — моногидрат оксалата кальция;

3) кальций-фосфатные бескарбонатные (брушит, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) либо гидроксилapatит; терапия и метафилактика в этих случаях различны; для установления типа литогенеза и назначения лечения требуется количественный анализ камня);

4) карбонатапатитные;

5) магнийаммонийфосфатные;

6) камни мочевой кислоты, уратов натрия и кальция (качественный анализ не позволяет различить эти соединения, но поскольку терапевтические мероприятия при всех перечисленных типах литогенеза одинаковы, это не имеет клинического значения). Используемые качественные реакции не позволяют также отличить 2,8-дигидроксиаденин от мочевой кислоты, поэтому при подозрении данного типа уролитиаза необходимо определение 2,8-дигидроксиаденина в моче;

7) камни из урата аммония;

8) цистиновые камни.

Для монофазных смешанных камней возможно обнаружение компонентов, составляющих не менее 10% от массы камня.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможными источниками ошибок при постановке и выполнении данной методики могут быть несоблюдение условий хранения и преаналитической обработки материала, а также невыполнение требований аналитической процедуры. Во избежание этого необходимо детально придерживаться вышеприведенной схемы анализа. Качественные реакции, используемые для обнаружения ионов Mg^{2+} и PO_4^{3-} , имеют высокую чувствительность, поэтому во избежание ложноположительных результатов по магнию и фосфату необходимо сопоставлять данные качественного анализа и микроскопического исследования фазового состава камня.

Обязательно сопоставлять результаты анализа камня в целом с данными биохимического анализа мочи на основные литогенные компоненты.

При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам Министерства здравоохранения Республики Беларусь, инструкций по охране труда для КДЛ и инструкциям по эксплуатации медицинских измерительных приборов, разработанных и утвержденных в учреждениях.