

Standardizirana obrada supravitalno obojenog sedimenta mokraćé

Sikirica, Mirjana; Bobetić-Vranić, Tanja; Flegar-Meštrić, Zlata; Kardum-Skelin, Ika; Juretić, Dubravka

Source / Izvornik: **Biochemia Medica, 2002, 12, 57 - 72**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:322329>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Pregledni članak
Review

STANDARDIZIRANA OBRADA SUPRAVITALNO OBOJENOG SEDIMENTA MOKRAĆE

Mirjana Sikirica¹, Tanja Bobetić-Vranić¹, Zlata Flegar-Meštrić¹, Ika Kardum-Skelin², Dubravka Juretić³

¹ Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica "Merkur", 10000 Zagreb, I. Zajca 19

² Laboratorij za citologiju i hematologiju, Interna klinika Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinička bolnica "Merkur" 10000 Zagreb, I. Zajca 19

³ Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 10000 Zagreb, Domagojeva 2

SAŽETAK – Cilj: Prikazati standardizirani postupak mikroskopske obrade supravitalno obojenog sedimenta mokraće.

Metode: Usklađene preporuke za optimalne postupke obrade jednokratnog uzorka mokraće Europske grupe za analizu mokraće pri Europskoj konfederaciji za laboratorijsku medicinu (ECLM - European Urinalysis Group) i vodič koji je odobrio National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS.

Rezultati: Supravitalno bojenje sedimenta mokraće poboljšava vidljivost nužnu za prepoznavanje stanica i njenih struktura pa je ono preporučena metoda kod svjetlosne mikroskopije, zasnovana na selektivnom afinitetu stanica i staničnih struktura prema bojama ovisno o njihovom fizikalno-kemijskom statusu.

Zaključak: Primjena standardizirane obrade supravitalno obojenog sedimenta mokraće značajan je doprinos pouzdanosti laboratorijskih nalaza u rutinskoj obradi mokraće kao jedne od najučestalijih pretraga na svim razinama zdravstvene skrbi. U surhu promicanja dobre laboratorijske prakse od 1997. godine proširen je program "Vanjske procjene kakvoće rada medicinsko-biokemijskih laboratorija Republike Hrvatske" u organizaciji Hrvatskog društva medicinskih biokemičara i na preporučenu standardiziranu rutinsku obradu mokraće.

Ključne riječi: standardizirana mikroskopska obrada, sediment mokraće, supravitalno bojenje

1. UVOD

Obrada mokraće, kao prvog biološkog materijala, u svrhu dijagnostičke informacije datira daleko u prošlost i predstavlja ishodište znanstvenih spoznaja o ljudskom tijelu. Prvi pisani dokumenti u kojima se spominje obrada mokraće je sanskritska literatura u kojoj se spominje "slatka mokraća" koja je zbog "slatkastog okusa i mirisa" mjesto okupljanja mrava i drugih insekata. Takva opažanja su zabilježena i u starim

zapisima kineskih liječnika, dok se promjene mokraće u boji i mirisu navode u medicinskim zapisima iz Mezopotamije (1). Prvi počeci mikroskopiranja zabilježeni su već u prvoj polovici 17. stoljeća, kada je Nicolaus Claude Fabri de Piersc oko 1630. godine među prvima uočio prisutnost kristala u mokraći, dok je Herman Boerhaave 1743. godine zabilježio pojavu taloga nakon 24-satnog stajanja mokraće. U prvoj polovici 19. st. mikroskopija mokraće počinje se sustavno koristiti. Među prvima su bili Pierre Rayer (1793-1867) i Eugen Napoleon Vigla (1813-1872), a Domenico Gusmano Galeazzi (1686-1775) je među prvima nalaze dobivene mikroskopijom mokraće

Adresa za dopisivanje:

Mirjana Sikirica, dipl. ing., Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica "Merkur", 10000 Zagreb, I. Zajca 19. Tel/fax: 2431-397

doveo u vezu s ispitivanom bolesti. Dismorfne eritrocite prvi opisuje Alfred Becquerel (1814-1866), a Johan Franz Simon (1807-1843) je u svojoj knjizi iz 1842. godine opisao cilindre, pri čemu je razlikovao "amorfne, granulirane i stanične", uz istodobnu prisutnost "određene količine albumina" u mokraći. Istodobno je Jacob Henle (1809-1885) zabilježio postojanje tvorevina tubularnih odljeva u histološkom preparatu i u mokraći. U 1875. godini učinjena je klasifikacija cilindara, koja je vrlo slična današnjoj, a 1898. god. Herman Rieder objavljuje knjigu u kojoj opisuje svaki sastojak sedimenta mokraćne (2). U 20. stoljeću mikroskopska obrada sedimenta mokraćne doživljava svoj veliki razvitak. U prvoj polovici 20. stoljeća veliki doprinos dao je svakako Thomas Addis (1881-1949) koji je cijeli svoj život posvetio ukazivanju na vrijednost mikroskopskog ispitivanja sedimenta mokraćne (3). S razvojem medicinskih znanosti i uz tehnološka dostignuća u drugoj polovini 20. st. mikroskopija je dostigla nevjerojatne mogućnosti uočavanja i najsitnijih dijelova staničnih struktura kako u citologiji, histologiji, tako i u obradi sedimenta mokraćne. Temeljni uvjet točnog prepoznavanja je dobra vidljivost i dugotrajna vježba. Da bi klinička interpretacija dobivenih rezultata bila pouzdana, analitički postupak mora biti točno definiran, što zahtijeva standardizaciju svih stupnjeva analitičkog procesa. Unatoč bogatoj povijesti obrade mokraćne, tek nedavno su načinjeni dokumenti za standardizaciju kako za kvalitativno tako i za kvantitativno određivanje u mokraći. 1983. g. su objavljene preporuke radne grupe Clinical Laboratory Quality Control in Finland (4) u kojima su navedene preporuke za pripremu bolesnika, pravilno skupljanje, te kvalitativno i kvantitativno ispitivanje mokraćne uz pravilno tumačenje dobivenih rezultata. Ista radna grupa izdala je 1986. godine nadopune tih preporuka (5). Europska grupa za analizu mokraćne u okviru Europske konfederacije za laboratorijsku medicinu 2000. g. izdaje preporuke kao optimalne postupke za najčešće analize iz jednokratnog uzorka mokraćne (6). U 2001. godini objavljena je nadopuna NCCLS-ovog dokumenta GP16-A2 u kojem se također objavljuju standardizirani postupci u obradi mokraćne kako kemijskom analizom polukvantitativno test-trakama tako i mikroskopskom obradom sedimenta mokraćne (7). Standardizirana metoda definira se kao postupak koji se provodi na točno određen i ekonomski isplativ način i obuhvaća predanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku fazu. U okviru analize mokraćne to obuhvaća postupke od pripreme bolesnika, skupljanja, prijenosa do mikroskopske obrade sedimenta mokraćne.

2. PREDANALITIČKA FAZA

Prema preporukama Europske grupe za analizu mokraćne (6) i vodiču GP16-A2 kojeg je odobrio NCCLS, 2001. godine (7), svi predanalitički, analitički i poslijeanalitički postupci u analizi mokraćne su standardizirani i prikazani u sljedećim poglavljima.

Priprema bolesnika i vrsta uzorka

Kvaliteta uzorka je nezaobilazni preduvjet točnog ishoda kemijskog i mikroskopskog pregleda mokraćne. Uzorak izbora, odnosno uzorak s najvećim brojem prisutnih elemenata je mokraćna uzeta odmah nakon noćnog sna, prije doručka i drugih aktivnosti a nakon provedene toaleta vanjskog spolovila. Na taj način smanjuje se utjecaj fizičke aktivnosti koja može izazvati hematuriju uzrokovanu položajem i opterećenjem tijela kao i razrjeđenje mokraćne unosom tekućine. Vrijeme zadržavanja mokraćne u mokraćnom mjehuru treba biti najmanje 4, a najviše 8 sati od posljednjeg pražnjenja mjehura, što bi predstavljalo mirnu fazu inkubacije mikroorganizama. Nije preporučeno raditi obradu kod žena u slučajevima kada je prisutan vidljivi vaginalni iscjedak, kao i neposredno prije, za vrijeme i neposredno poslije menstruacije zbog kontaminacije menstrualnom krvlju.

Spremnici za skupljanje i prijenos mokraćne

Mokraća se treba skupljati u posudama sa širokim grlom, po mogućnosti za jednokratnu uporabu. Ako se uzorak mora transportirati do mjesta obrade, spremnici moraju imati poklopac za zatvaranje uz mogućnost obilježavanja.

Vrijeme obrade i pohrana uzorka mokraćne

Kako je mokraćna agresivan uzorak, obrada se mora učiniti u što kraćem vremenskom periodu. Ukoliko će se iz nekih razloga obrada učiniti unutar 2 - 4 sata, uzorak treba biti pohranjen na +4 °C, ali i takav način čuvanja treba biti što kraći, jer se kod nižih temperatura talože soli fosfata i urata, pa obilna taloženja mogu prikriti dijagnostički značajne elemente sedimenta. Uzorak može biti pohranjen na sobnoj temperaturi (+20 °C), ako se obrada izvodi unutar 30 min., a nakon tog vremena dolazi do lize staničnih elemenata, posebice kod niske relativne volumne mase i alkalnog pH mokraćne. Broj staničnih elemenata je upitan ako se analiza radi nakon 2 - 4 sata, čak i ako je uzorak pohranjen u hladnjaku

(+4 °C). Upotrebom različitih fiksativa (50%-tni etanol) i stabilizirajućih tvari (kristali borne kiseline ili formaldehida) donekle se mogu zaštititi morfološka svojstva sastojaka sedimenta mokraće, ali i to treba izbjegavati.

Volumen mokraće za centrifugiranje

Volumen mora biti točno definiran i obično je u rasponu od 5 - 15 ml. Kako mora biti uvijek isti, preporuča se upotreba jednokratnih polistirenskih epruveta s koničnim dnom, na kojima su označeni izborni volumeni mokraće za centrifugiranje. Svaka promjena volumena mokraće uzete za obradu mora se naznačiti zbog točne kvantifikacije staničnih elemenata.

Vrijeme centrifugiranja mokraće

Da se stanice što manje mehanički oštete, a da se istovremeno kvantitativno sedimentiraju, preporučeno vrijeme centrifugiranja je 5 min.

Brzina centrifugiranja mokraće

Preporučena je relativna centrifugalna sila (RCF) od 400 x g kao dostatna brzina za kvantitativno sedimentiranje prisutnih elemenata. Ona predstavlja odnos između polumjera centrifuge i broja okretaja i izračunava se za svaku centrifugu prema sljedećem izračunu:

$$RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$$

Uobičajeno je izražavanje brzine centrifugiranja kao broj okretaja u minuti, što se može izračunati iz gornjeg izračuna i glasi:

$$RPM = \sqrt{\frac{RCF}{1,118 \times 10^{-5} \times r}}$$

r = polumjer u centimetrima od središta rotora do dna epruvete

RPM = broj okretaja u minuti.

Volumen i faktor koncentracije sedimenta mokraće

Uzorci mokraće se moraju centrifugiranjem koncentrirati iz određenog ukupnog volumena mokraće u određeni volumen sedimenta mokraće za mikroskopiranje. Glavni uvjet za koncentraciju sedimenta mokraće, ali i glavni izvor greške je centrifugiranje i odvajanje supernatanta. Danas na tržištu postoje standardizirani sustavi s jednokratnim polistirenskim epruvetama na kojima je označen izborni volumen ukupne mokraće uzete za centrifugiranje i volumen sedimenta

mokraće za mikroskopiranje. Na taj način postiže se točan faktor koncentracije koji predstavlja odnos ukupnog volumena i dobivenog sedimenta mokraće. Npr. uz faktor koncentracije 20, za volumen od 10 ml mokraće dobiveni sediment iznosi 0,5 ml (10 : 0,5), a za volumen 12 ml mokraće dobiveni sediment iznosi 0,6 ml (12 : 0,6). Kako izbor faktora koncentracije ovisi i o vrstama epruveta koje postoje na tržištu, on može iznositi od 10 do 25. Odvajanje supernatanta mora se izvoditi usisavanjem vakuumskom pumpom čime se povećava ponovljivost nalaza, jer se prelijevanjem supernatanta (dekantiranjem) dio sedimenta odlije, zbog čega je volumen sedimenta različit od zadanog pa je kvantifikacija staničnih elemenata u preostalom sedimentu netočna.

Supravitalno bojenje sedimenta mokraće

Postupak bojanja

Na sediment mokraće doda se 10% boje od volumena sedimenta mokraće, npr. 0,5 ml sedimenta mokraće i 50 µL boje ili 0,6 ml sedimenta mokraće i 60 µL boje. Kako bi sediment u potpunosti došao u dodir s bojom, potrebno je lagano promiješati epruvetu i ostaviti stajati 5-10 minuta. Bojenje započinje odmah, a intenzivnost obojenja raste naročito u prvih pet minuta. Jednom obojeni sediment može se mikroskopirati i nakon nekoliko sati (6,7).

Svjetlosna mikroskopija neobojenog preparata sedimenta mokraće u Hrvatskoj je još uvijek najraširenija tehnika kao najjednostavnija metoda, ali i najnepouzdanija. Stanični elementi koji se nalaze u mokraći imaju isti ili gotovo isti indeks loma svjetlosti kao i sama mokraća, što smanjuje vidljivost koja je nužna za točno prepoznavanje sastojaka. Supravitalnim bojenjem sedimenta mokraće vodenim otopinama boja zadovoljava se taj uvjet, pa je preporučena metoda obrade sedimenta mokraće za svjetlosnu mikroskopiju supravitalno bojenje. Suština bojanja nije u potpunosti razjašnjena. Postoji više teorija koje se temelje na kemijskom vezivanju boja s tkivom, odnosno staničnim strukturama, ili na fizikalnim procesima kao što su otapanje i apsorpcija. Neosporno je, međutim, da i fizikalni i kemijski čimbenici sudjeluju u mehanizmu bojanja kao složenom procesu, kada stanica ili tkivo kao supstrat dolaze u dodir s bojom. Bjelančevine koje su sastavni dijelovi stanica ili tkiva općenito su amfofilne, što znači da primaju i kisele i bazične boje. Ipak, kod nekih bjelančevina postoji veći afinitet prema kiselim bojama, dok kod drugih prema bazičnim, pa prema tome postoje

acidofilne i bazofilne strukture. Kako je jezgra bazofilna, a citoplazma acidofilna, bazične boje podrazumijevaju "nuklearne", a kisele boje "citoplazmatske". Na tim se različitim osobinama temelji supravitalno bojenje, gdje se razlike u brzini difuzije i selektivnog afiniteta mogu staviti u korelaciju s fizikalno-kemijskim statusom stanice i njenih struktura. Primjena odgovarajućih boja nužan je uvjet da bojenje bude što bolje, zbog čega postoje posebne boje i metode bojanja vlažnog preparata koje ovise o promatranim staničnim strukturama sastojaka sedimenta.

Najčešće metode bojanja su prema Sternheimeru, Sternheimer-Malbinu i bojenje s toluidinom (8,9,10,11,12).

Bojenje prema Sternheimeru

Alcian blue-pyronin B (crveno-plavo)

Otopina A: 40 g Alcian Blue otopiti u 1000 mL redestilirane vode

Otopina B: 15 g Pyronin B otopiti u 1000 mL redestilirane vode

Koncentracija boje Alcian Blue može se mijenjati ovisno o seriji. Boje treba otapati s pomoću magnetske mješalice i tako otopljene filtrirati. Otopine A i B miješaju se u omjeru 1 : 1. Smjesa se čuva na sobnoj temperaturi i postojana je 1 - 3 mjeseca.

Bojenje prema Sternheimer-Malbinu

otopina 1

genciana violet	3 g
etilni alkohol 95%-tni	20,0 ml
amonijev oksalat	0,8 g
H ₂ O	100 ml

otopina 2

safranin O	0,25 g
etilni alkohol 95%-tni	10,0 ml
H ₂ O	100 ml

radna otopina

- 3 dijela otopine 1 se pomiješa s 97 dijelova otopine 2

- otopina se filtrira a pH se namjesti na 5 do 7 pH jedinica

- otopina se čuva u tamnoj boci na sobnoj temperaturi i postojana je do 3 mjeseca

Bojenje s toluidinom

Toluidine blue O

0,5 g Toluidine Blue otopiti u 100 mL redestilirane vode, pustiti da se potpuno otopi i čuvati u hladnjaku na +4 °C. Nije potrebno filtrirati i otopina je postojana nekoliko mjeseci.

3. ANALITIČKA FAZA

3.1. Mikroskopska obrada sedimenta mokračé

Mikroskopska obrada tako dobivenog sedimenta mokračé predstavlja najsloženiji dio analitičkog postupka jer zahtijeva edukaciju, dugotrajnu vježbu i dobar optički instrument. Optički instrumenti koji se koriste za analizu sedimenta mokračé su: svjetlosni mikroskop, fazno-kontrastni mikroskop, mikroskop tamnog polja, interferentni mikroskop i fluorescentni mikroskop. Preporučena metoda mikroskopiranja je mikroskopija fazno-kontrastnim mikroskopom koji u odnosu na svjetlosni mikroskop omogućava bolju vidljivost naročito kod finih struktura kao što su hijalini cilindri ili "isprani" eritrociti.

Pregled sedimenta svjetlosnim mikroskopom

Od obojenog vlažnog preparata sedimenta mokračé priređenog standardiziranim postupkom uzima se uvijek isti volumen i najčešće iznosi od 10 do 20 μ L, nanosi na predmetno stakalce i prekrije pokrovnicom koja mora biti uvijek iste površine (npr. 13 μ L obojenog sedimenta mokračé je prikladan volumen za pokrovnicu 18 x 18 mm). Tako priređeni vlažni preparat promatra se binokularnim mikroskopom, koji mora biti opremljen objektivima i okularima za:

- malo povećanje: objektiv 10x i okulara 10x - za grubu procjenu sadržaja sedimenta pregledava se cijeli preparat, uključujući i rubove pokrovnice, gdje se vrlo često nakupljaju cilindri. Broj cilindara se daje pri ovom povećanju.
- veliko povećanje: objektiv 40x i okulara 10x - za kvantificiranje prisutnih elemenata u pažljivo pretraženih 20 vidnih polja.

3.2. Morfološka obilježja elemenata sedimenta mokračé

Osnovni preduvjet pouzdanog laboratorijskog nalaza sedimenta mokračé je točno prepoznavanje elemenata sedimenta mokračé, koje se temelji na morfološkim obilježjima staničnih struktura koje definiraju stanicu, po čemu se sediment mokračé dijeli na vrste staničnih elemenata.

Stanice čine vrstu staničnih elemenata koja se sastoji od hematopoetskih, epitelnih i lipidnih stanica.

doveo u vezu s ispitivanom bolesti. Dismorfne eritrocite prvi opisuje Alfred Becquerel (1814-1866), a Johan Franz Simon (1807-1843) je u svojoj knjizi iz 1842. godine opisao cilindre, pri čemu je razlikovao "amorfne, granulirane i stanične", uz istodobnu prisutnost "određene količine albumina" u mokraći. Istodobno je Jacob Henle (1809-1885) zabilježio postojanje tvorevina tubularnih odljeva u histološkom preparatu i u mokraći. U 1875. godini učinjena je klasifikacija cilindara, koja je vrlo slična današnjoj, a 1898. god. Herman Rieder objavljuje knjigu u kojoj opisuje svaki sastojak sedimenta mokraće (2). U 20. stoljeću mikroskopska obrada sedimenta mokraće doživljava svoj veliki razvitak. U prvoj polovici 20. stoljeća veliki doprinos dao je svakako Thomas Addis (1881-1949) koji je cijeli svoj život posvetio ukazivanju na vrijednost mikroskopskog ispitivanja sedimenta mokraće (3). S razvojem medicinskih znanosti i uz tehnološka dostignuća u drugoj polovini 20. st. mikroskopija je dostigla nevjerojatne mogućnosti uočavanja i najsitnijih dijelova staničnih struktura kako u citologiji, histologiji, tako i u obradi sedimenta mokraće. Temeljni uvjet točnog prepoznavanja je dobra vidljivost i dugotrajna vježba. Da bi klinička interpretacija dobivenih rezultata bila pouzdana, analitički postupak mora biti točno definiran, što zahtijeva standardizaciju svih stupnjeva analitičkog procesa. Unatoč bogatoj povijesti obrade mokraće, tek nedavno su načinjeni dokumenti za standardizaciju kako za kvalitativno tako i za kvantitativno određivanje u mokraći. 1983. g. su objavljene preporuke radne grupe Clinical Laboratory Quality Control in Finland (4) u kojima su navedene preporuke za pripremu bolesnika, pravilno skupljanje, te kvalitativno i kvantitativno ispitivanje mokraće uz pravilno tumačenje dobivenih rezultata. Ista radna grupa izdala je 1986. godine nadopune tih preporuka (5). Europska grupa za analizu mokraće u okviru Europske konfederacije za laboratorijsku medicinu 2000. g. izdaje preporuke kao optimalne postupke za najčešće analize iz jednokratnog uzorka mokraće (6). U 2001. godini objavljena je nadopuna NCCLS-ovog dokumenta GP16-A2 u kojem se također objavljuju standardizirani postupci u obradi mokraće kako kemijskom analizom polukvantitativno test-trakama tako i mikroskopskom obradom sedimenta mokraće (7). Standardizirana metoda definira se kao postupak koji se provodi na točno određen i ekonomski isplativ način i obuhvaća predanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku fazu. U okviru analize mokraće to obuhvaća postupke od pripreme bolesnika, skupljanja, prijenosa do mikroskopske obrade sedimenta mokraće.

2. PREDANALITIČKA FAZA

Prema preporukama Europske grupe za analizu mokraće (6) i vodiču GP16-A2 kojeg je odobrio NCCLS, 2001. godine (7), svi predanalitički, analitički i poslijeanalitički postupci u analizi mokraće su standardizirani i prikazani u sljedećim poglavljima.

Priprema bolesnika i vrsta uzorka

Kvaliteta uzorka je nezaobilazni preduvjet točnog ishoda kemijskog i mikroskopskog pregleda mokraće. Uzorak izbora, odnosno uzorak s najvećim brojem prisutnih elemenata je mokraća uzeta odmah nakon noćnog sna, prije doručka i drugih aktivnosti a nakon provedene toaleta vanjskog spolovila. Na taj način smanjuje se utjecaj fizičke aktivnosti koja može izazvati hematuriju uzrokovanu položajem i opterećenjem tijela kao i razrjeđenje mokraće unosom tekućine. Vrijeme zadržavanja mokraće u mokraćnom mjehuru treba biti najmanje 4, a najviše 8 sati od posljednjeg pražnjenja mjehura, što bi predstavljalo mirnu fazu inkubacije mikroorganizama. Nije preporučeno raditi obradu kod žena u slučajevima kada je prisutan vidljivi vaginalni iscjedak, kao i neposredno prije, za vrijeme i neposredno poslije menstruacije zbog kontaminacije menstrualnom krvlju.

Spremnici za skupljanje i prijenos mokraće

Mokraća se treba skupljati u posudama sa širokim grlom, po mogućnosti za jednokratnu uporabu. Ako se uzorak mora transportirati do mjesta obrade, spremnici moraju imati poklopac za zatvaranje uz mogućnost obilježavanja.

Vrijeme obrade i pohrana uzorka mokraće

Kako je mokraća agresivan uzorak, obrada se mora učiniti u što kraćem vremenskom periodu. Ukoliko će se iz nekih razloga obrada učiniti unutar 2 - 4 sata, uzorak treba biti pohranjen na +4 °C, ali i takav način čuvanja treba biti što kraći, jer se kod nižih temperatura talože soli fosfata i urata, pa obilna taloženja mogu prikriti dijagnostički značajne elemente sedimenta. Uzorak može biti pohranjen na sobnoj temperaturi (+20 °C), ako se obrada izvodi unutar 30 min., a nakon tog vremena dolazi do lize staničnih elemenata, posebice kod niske relativne volumne mase i alkalnog pH mokraće. Broj staničnih elemenata je upitan ako se analiza radi nakon 2 - 4 sata, čak i ako je uzorak pohranjen u hladnjaku

acidofilne i bazofilne strukture. Kako je jezgra bazofilna, a citoplazma acidofilna, bazične boje podrazumijevaju "nuklearne", a kisele boje "citoplazmatske". Na tim se različitim osobinama temelji supravitalno bojenje, gdje se razlike u brzini difuzije i selektivnog afiniteta mogu staviti u korelaciju s fizikalno-kemijskim statusom stanice i njenih struktura. Primjena odgovarajućih boja nužan je uvjet da bojenje bude što bolje, zbog čega postoje posebne boje i metode bojanja vlažnog preparata koje ovise o promatranim staničnim strukturama sastojaka sedimenta.

Najčešće metode bojanja su prema Sternheimeru, Sternheimer-Malbinu i bojenje s toluidinom (8,9,10,11,12).

Bojenje prema Sternheimeru

Alcian blue-pyronin B (crveno-plavo)

Otopina A: 40 g Alcian Blue otopiti u 1000 mL redestilirane vode

Otopina B: 15 g Pyronin B otopiti u 1000 mL redestilirane vode

Koncentracija boje Alcian Blue može se mijenjati ovisno o seriji. Boje treba otapati s pomoću magnetske mješalice i tako otopljene filtrirati. Otopine A i B miješaju se u omjeru 1 : 1. Smjesa se čuva na sobnoj temperaturi i postojana je 1 - 3 mjeseca.

Bojenje prema Sternheimer-Malbinu

otopina 1

genciana violet	3 g
etilni alkohol 95%-tni	20,0 ml
amonijev oksalat	0,8 g
H ₂ O	100 ml

otopina 2

safranin O	0,25 g
etilni alkohol 95%-tni	10,0 ml
H ₂ O	100 ml

radna otopina

- 3 dijela otopine 1 se pomiješa s 97 dijelova otopine 2

- otopina se filtrira a pH se namjesti na 5 do 7 pH jedinica

- otopina se čuva u tamnoj boci na sobnoj temperaturi i postojana je do 3 mjeseca

Bojenje s toluidinom

Toluidine blue O

0,5 g Toluidine Blue otopiti u 100 mL redestilirane vode, pustiti da se potpuno otopi i čuvati u hladnjaku na +4 °C. Nije potrebno filtrirati i otopina je postojana nekoliko mjeseci.

3. ANALITIČKA FAZA

3.1. Mikroskopska obrada sedimenta mokračé

Mikroskopska obrada tako dobivenog sedimenta mokračé predstavlja najsloženiji dio analitičkog postupka jer zahtijeva edukaciju, dugotrajnu vježbu i dobar optički instrument. Optički instrumenti koji se koriste za analizu sedimenta mokračé su: svjetlosni mikroskop, fazno-kontrastni mikroskop, mikroskop tamnog polja, interferentni mikroskop i fluorescentni mikroskop. Preporučena metoda mikroskopiranja je mikroskopija fazno-kontrastnim mikroskopom koji u odnosu na svjetlosni mikroskop omogućava bolju vidljivost naročito kod finih struktura kao što su hijalini cilindri ili "isprani" eritrociti.

Pregled sedimenta svjetlosnim mikroskopom

Od obojenog vlažnog preparata sedimenta mokračé priređenog standardiziranim postupkom uzima se uvijek isti volumen i najčešće iznosi od 10 do 20 μ L, nanosi na predmetno stakalce i prekrije pokrovnicom koja mora biti uvijek iste površine (npr. 13 μ L obojenog sedimenta mokračé je prikladan volumen za pokrovnicu 18 x 18 mm). Tako priređeni vlažni preparat promatra se binokularnim mikroskopom, koji mora biti opremljen objektivima i okularima za:

- malo povećanje: objektiv 10x i okulara 10x - za grubu procjenu sadržaja sedimenta pregledava se cijeli preparat, uključujući i rubove pokrovnice, gdje se vrlo često nakupljaju cilindri. Broj cilindara se daje pri ovom povećanju.
- veliko povećanje: objektiv 40x i okulara 10x - za kvantificiranje prisutnih elemenata u pažljivo pretraženih 20 vidnih polja.

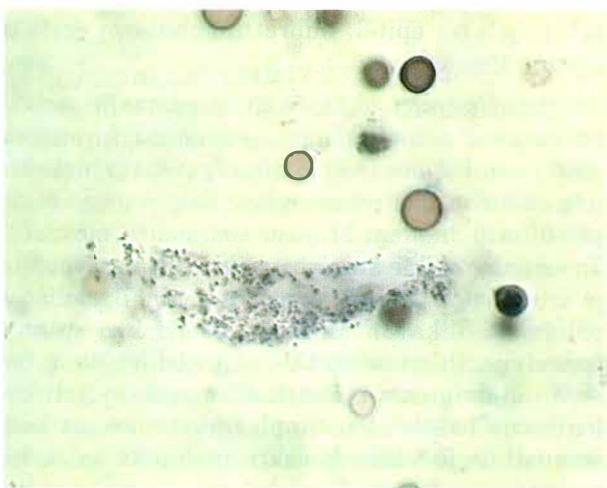
3.2. Morfološka obilježja elemenata sedimenta mokračé

Osnovni preduvjet pouzdanog laboratorijskog nalaza sedimenta mokračé je točno prepoznavanje elemenata sedimenta mokračé, koje se temelji na morfološkim obilježjima staničnih struktura koje definiraju stanicu, po čemu se sediment mokračé dijeli na vrste staničnih elemenata.

Stanice čine vrstu staničnih elemenata koja se sastoji od hematopoetskih, epitelnih i lipidnih stanica.

1) Hematopoetske stanice obuhvaćaju: eritrocite (Erc), leukocite (Lkc), eozinofilne granulocite, limfocite i makrofage.

Eritrociti (6,12,13) su stanice bez jezgre čija veličina i oblik variraju u ovisnosti o fizikalno-kemijskim uvjetima okruženja u kojima se nalaze (Slika 1). Mokraća zdravih osoba može sadržavati nekoliko eritrocita, ali nikad više od 3 / Erc po vidnom polju velikog povećanja. Hematurija označava prisutnost eritrocita u mokraći i uvijek je pokazatelj nekog krvarenja zbog čega predstavlja ozbiljan dijagnostički nalaz i većina autora smatra da već > 2-3 Erc po vidnom polju predstavlja patološki nalaz. Naziv mikrohematurija ukazuje na prisutnost svega par eritrocita u mokraći, no međutim još uvijek postoje neslaganja oko broja eritrocita koji bi definirali mikrohematuriju. Prema nekim autorima eritrociti u mokraći prisutni su u oko 3% odrasle muške populacije i u oko 13% žena u postmenopauzi (13). Uzroci hematurije su višestruki i mogu se podijeliti na hematurije bubrežne parenhimske bolesti, bubrežne vaskularne bolesti, ekskrecijske bolesti mokraćnog sustava i sistemske poremećaje koagulacije (14). Mikrohematurija je privlačila pozornost mnogih kliničara kao jedan od glavnih uroloških i nefroloških problema. Morfološke promjene eritrocita od savršeno okrugle do bitno promijenjene stanice uočene su unazad dva desetljeća i postale su okosnica iznalaženja neinvazivnih metoda koje bi ukazivale na podrijetlo krvarenja. Sva ispitivanja "in vitro" i "in vivo" pokazuju utjecaj fizikalno-kemijskog okruženja koji uzrokuje morfološke promjene eritrocita na putu kroz nefron (15,16). Birch i suradnici 1979. godine objavljuju različite oblike eritrocita uočene kod bolesnika s glomerularnom



Slika 1 – Eritrociti
Figure 1 – Erythrocytes

bolešću (17). 1982. godine Faireley i Birch su prvi objavili hematuriju glomerularnog podrijetla na temelju morfološki promijenjenih eritrocita koje su nazvali "dismorfni eritrociti", nasuprot "izomorfni eritrocita", eritrocita normalne morfolologije kod krvarenja neglomerularnog podrijetla (18), a Kohler i suradnici navode akantocite kao biljege glomerularne bolesti. Akantociti su eritrociti prstenastog oblika s izbojcima poput mjehurića i nisu nađeni ni kod zdravih ispitanika ni kod bolesnika s neglomerularnim bolestima (19). Tomita i suradnici 1992. objavljuju klasifikaciju eritrocita prema morfološkim promjenama (20), a 1993. ista skupina autora za diferenciranje hematurije navodi jedan oblik eritrocita (G1) kao biljeg glomerularnog podrijetla krvarenja (21). Iako su mnogi autori, koristeći te kriterije, naveli morfološku analizu eritrocita kao dobar pokazatelj lokalizacije krvarenja, postoje i autori koji smatraju da morfolologija eritrocita nije potpuno pouzdan podatak za točno utvrđivanje podrijetla eritrocita (22). Ako je u sedimentu mokraćne prisutno > 30% dismorfni eritrocita, podrijetlo hematurije je u bubrežnoj bolesti. Za identifikaciju dismorfni eritrocita metoda s fazno-kontrastnim mikroskopom predstavlja preporučenu metodu (6). Supravitalnim bojenjem eritrociti na sebe slabo vežu boje i u preparatu su blijedo ružičasto obojeni. Boja koja se koristi za bojenje eritrocita je eozin, pri čemu se eritrociti ružičasto oboje. U sedimentu mokraćne mogu biti slični kapljicama masti, nekim oblicima kristala kalcijeva oksalata, nekim oblicima kristala urata i kristalima amonijeva biurata i gljivicama.

Razlika između eritrocita i gljivica može se utvrditi bojenjem mokraćnog sedimenta eozinom, pri čemu se samo eritrociti oboje. Otopinom saponina ili 5%-tne CH_3COOH eritrociti se razlikuju od ostalih elemenata po tome jer se jedino oni dodatkom tih otopina razore.

Prisutnost eritrocita se određuje:

- test-trakom (peroksidaznom reakcijom za intaktne i lizirane eritrocite)
- mikroskopskim pregledom obojenog vlažnog preparata sedimenta mokraćne pod pokrovnicom ili u komorici

Referentni raspon: 0 - 3 Erc / vidnom polju velikog povećanja
< 30% dismorfni eritrocita

Leukociti (6,11,12,23) su okrugle stanice promjera 10-12 μm čija veličina i morfolologija ovise o pH i relativnoj volumnoj masi mokraćne, u koju dolaze kroz glomerule ili ameboidnom migracijom između tubularnih stanica (Slika 2). To su



Slika 2 – *Leukociti*
Figure 2 – *Leucocytes*

okrugle stanice sa središnje položenom jezgrom koja može biti okrugla ili segmentirana. Polimorfonuklearni leukociti, koji su uglavnom neutrofilni granulociti, stanice su sa segmentiranom jezgrom i granuliranom citoplazmom, koji su jedan i pol puta veći od eritrocita. U kiseloj mokraći stanična struktura je uočljiva, dok u alkalnoj "nabubre", zbog čega obrisi stanice postaju nejasni i imaju tendenciju stvaranja nakupina. Ako takvu mokraću ostavimo da stoji neko vrijeme, stanica će se razoriti. U koncentriranoj mokraći citoplazmatske granule su sabijene i mogu prikriti jezgru dok su kod mokraće niske relativne volumne mase, < 1,010 citoplazmatske granule raspršene i mogu se kretati unutar stanice kao tzv. Brownovo gibanje. Taj tip neutrofila neki autori nazivaju i "Sternheimer-Malbinove" (glitter-bljeskave) stanice. Prisutnost leukocita u mokraći znak je upalnog procesa u bubrežima, donjem dijelu mokraćnog sustava ili genitalnim organima. Leukociturija udružena s bakteriurijom je posljedica upale mokraćnog mjehura (cistitis) ili bubrega (pijelonefritis).

Leukociti se mogu zamijeniti sa stanicama bubrežnog tubularnog epitela, ali za razliku od njih, leukociti su manji, jezgra nije položena ekscentrično, a u sebi nikad ne sadrže kapljice masti. Supravitalnim bojenjem živi leukociti ne dozvoljavaju uvijek prodor boje u stanicu pa u preparatu ostaju neobojeni ili svijetlo obojeni. Mrtve stanice se intenzivnije bojaju, u rasponu od crvenog do ljubičastog obojenja, a citoplazmatske granule ne vibriraju.

Prisutnost leukocita u mokraći se određuje:

– test-trakom (određivanjem leukocitne esterase za intaktne i lizirane leukocite)

– mikroskopskim pregledom obojenog vlažnog preparata sedimenta mokraće pod pokrovnicom ili brojanjem u komorici.

Referentni raspon: 0-4 Lkc/ vidnom polju velikog povećanja

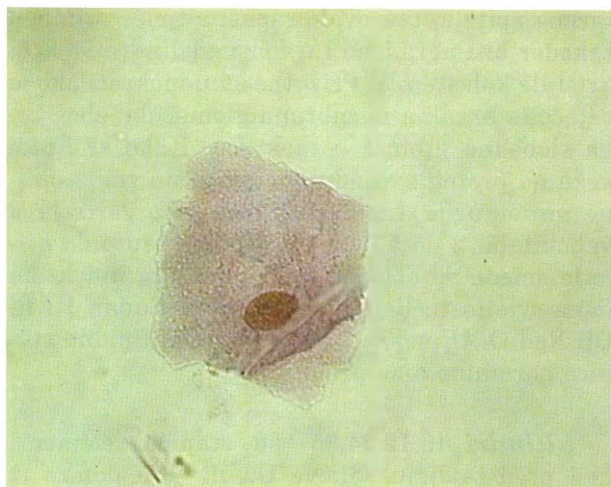
Eozinofilni granulociti (6,11,12,23) su prisutni u sedimentu mokraće kod mokraćnih infekcija i tada oni čine manje od 5% od ukupnog broja leukocita. Veći postotak eozinofila može se naći kod ateroembolijskih bolesti bubrega kao i kod sekundarnog akutnog intersticijskog nefritisa zbog alergije na lijekove. Za svoju identifikaciju zahtijevaju posebno bojenje po Hanselu, Wrightu, Papanicolaouu ili May-Grunwald-Giemsu. U preparatu se vide kao stanice s bilobularnom jezgrom i dobro izraženim eozinofilnim granulama koje ispunjavaju cijelu citoplazmu. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

Limfociti (6,11,12,23) su rijedak nalaz u mokraćnom sedimentu i predstavljaju stanice s glatkom, jednoličnom jezgrom koja ispunjava gotovo cijelu stanicu i supravitalnim bojenjem se boja tamno plavo, dok je citoplazma bez granula i čini tanki prsten oko jezgre, plavo obojen. Mogu se prepoznati jedino u obojenom preparatu. Pojava limfocita povezuje se s kroničnim upalnim procesima, virusnim bolestima kao i u slučajevima odbacivanja bubrežnog transplantata. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

Makrofagi (6,11,12,23), mononuklearni fagociti, su stanice koje se mogu naći u mokraći kod upalnih procesa. Jezgra sadrži nejednako raspoređen kromatin koji se supravitalnim bojama oboji plavo, dok je citoplazma granulirana nejednolikim granulama nježno ružičasto obojena, često ispunjena vakuolama ili različitim inkluzijama. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

2) Epitelne stanice obuhvaćaju: pločasti epitel, prijelazni epitel, bubrežni tubularni epitel i lipidne stanice.

Pločasti epitel (6,11,12,23) predstavlja najveću stanicu u mokraćnom sedimentu, promjera 40-60 μm . Potječe iz krajnjih segmenata mokraćnog sustava (uretre) i vagine, zbog čega je često prisutan u malom broju u sedimentu mokraće. To su poligonalne stanice, zaobljenih kutova, čija je citoplazma obilna, a jezgra mala i središnje položena (Slika 3). Mogu se naći i kao stanice "presavijenih" rubova. Dolaze pojedinačno, a često i u nakupinama. Ponekad se može vidjeti kolonizacija bakterija u citoplazmi stanice, za koje se misli da je važan korak u nastanku infekcije mokraćnog sustava. U sedimentu se može naći i sama jezgra koja ostaje nakon razaranja stanice. Vaginalne stanice kao i stanice iz donjih dijelova



Slika 3 – Pločasti epitel
Figure 3 – Squamous cells

uretre kod žena podliježu promjenama zbog menstrualnog ciklusa, koje se uočavaju citološkim bojenjem stanica u određenim fazama. Ako je u sedimentu prisutno dosta stanica pločastog epitela, a bez prisutnosti leukocita, to ukazuje da stanice potječu iz donjih dijelova uretre, i uglavnom predstavljaju onečišćenje zbog nepravilnog skupljanja ili loše provedene toalete vanjskog spolovila. Takav nalaz nema nekog dijagnostičkog značenja, a ako je prisutan veliki broj leukocita, mora se isključiti vaginalna kontaminacija kako bi se potvrdila uroinfekcija. U vrlo rijetkim slučajevima malignog procesa donjih dijelova mokraćnog sustava, mogu se naći stanice pločastog epitela u mokraćnom sedimentu, ali tada pokazuju promjene u strukturi i obliku jezgre. U slučaju takvog nalaza potrebna je citološka obrada.

Referentni raspon: 0-4 stanice/vidnom polju velikog povećanja.

Prijelazni epitel (11,12,23,24) ili urotel je visoko specifičan epitel koji oblaže vrčeve bubrežne nakapnice, mokraćnog mjehura kod žena i proksimalnog dijela uretre kod muškaraca. Normalni prijelazni epitel se sastoji od nekoliko slojeva, ali obično ne više od sedam. Morfološki izgled stanice ovisi o sloju iz kojeg potječe pa tako mogu biti iz:

– *površinskih* slojeva, i to su obično velike poligonarne, okrugle ili ovalne mononuklearne stanice, promjera 30-40 μm , s okruglom ili ovalnom jezgrom središnje ili malo ekscentrično položene. Citoplazmatske granule su obično raspoređene oko jezgre dok su obilnije na periferiji tvoreći perinuklearni vjenčić. Ponekad se mogu naći i stanice s dvije ili više jezgara (Slika 4).



Slika 4 – Prijelazni epitel
Figure 4 – Transitional cells

Nalaz tih stanica je najčešći kod infekcije donjih dijelova mokraćnog sustava ili nekog urološkog poremećaja

– *dubljih* slojeva, to su stanice manje od stanica površinskih slojeva, ali s puno više različitih oblika (Slika 5). Osim malih okruglih ili ovalnih stanica mogu se naći i stanice s “repićem”, izdužene kao palica za bejzbol ili kao čekić. Male okrugle stanice imaju veliku, središnje položenu jezgru s nježnim citoplazmatskim prstenom, pa se mogu lagano zamijeniti s bubrežno-tubularnim epitelom. Stanice s “repićem” ili stanice izdužene kao palica za bejzbol imaju jezgru periferno smještenu s uočljivom jezgričicom i jako granuliranom citoplazmom. Stanice kao “čekić” mogu biti i binuklearne. Nalaz takvih stanica



Slika 5 – Prijelazni epitel
Figure 5 – Transitional cells

ukazuje na oštećenje dubljih slojeva urotela zbog malignih procesa, raznih infekcija, mokraćnih kamenaca ili hidronefroze bubrega. Obojene su intenzivnije od stanica iz površinskih slojeva, a atipični oblici zahtijevaju daljnju citološku obradu.

Referentni raspon: 0-2 stanice/vidno polje velikog povećanja.

Bubrežni tubularni epitel (6,11,12,23) je jednoslojni epitel koji oblaže nefron što uključuje stanice koje oblažu glomerule, proksimalne i distalne tubule kao i sabirne kanaliće koje se zbog toga pojavljuju u velikom broju različitih oblika. Stanice bubrežno-tubularnog epitela su obično u promjeru oko 13 μm , okrugle ili ovalne s velikom, središnje ili lagano ekscentrično položenom jezgrom koja sadrži jednu ili dvije jezgrice, a u citoplazmi se mogu vidjeti dobro izražene organele koje mogu biti obilne ili raspršene. Inkluzivna tjelešca mogu se naći kod virusne infekcije, kao što je rubeola i herpes, a naročito kod infekcije citomegalovirusom. Stanice koje potječu iz sabirnih kanalića imaju kvadratni oblik za razliku od malih stanica urotela koje su više okrugle ili ovalne. Stanice koje dolaze iz proksimalnih tubula su relativno veće, ovalne ili izdužene granulirane stanice. Pojava tih stanica u mokraći je udružena s akutnom tubularnom nekrozom i s odbacivanjem bubrežnog transplantata. Prisutni su i kod groznice, raznih toksičnih oštećenja, oštećenja lijekovima (naročito aspirinom), trovanja teškim metalima, raznim upalama, infekcijama i kod neoplazmi. Njihovo razlikovanje je dosta teško, i lako se mogu zamijeniti s malim ovalnim stanicama iz dubljih slojeva urotela (germinativnog sloja), a neznatno su veći od granulocita. Pomoć u razlikovanju je i u okruženju u kojem su uočene. Tubularne stanice su obično udružene s nalazima koji ukazuju na parenhimnu bolest bubrega kao što su dismorfni eritrociti, cilindri ili lipidi, dok je prijelazni epitel prisutan s leukocitima, izomorfim ("normalnim") eritrocitima, bakterijama ili kristalima.

Supravitalnim bojenjem boja se nježno, citoplazma se boja crveno, dok se jezgra boja plavo. Kod bolesnika s obilnom proteinurijom mogu sadržavati i kapljice masti.

Ponekad, ali vrlo rijetko, mogu se naći i u zdravoj mokraći kao posljedica regeneracije epitela.

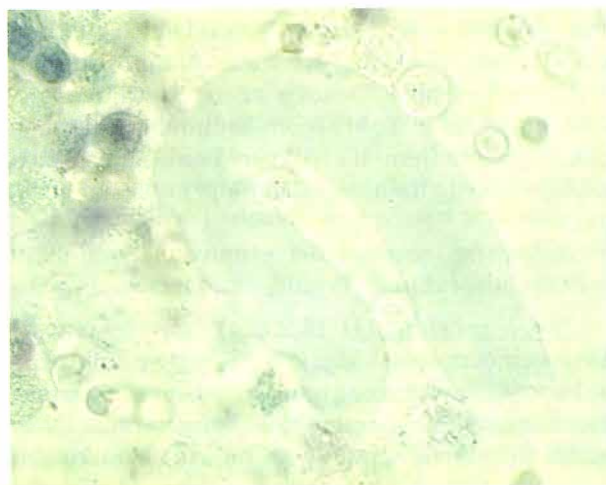
3) Lipidne stanice (6,12,23) predstavljaju masnu degeneraciju bubrežno-tubularnog epitela i u mokraći se pojavljuju obično kao slobodne kapljice masti ili lipidima zasićene stanice tubu-

larnog epitela, tzv. ovalna masna tjelešca. Mogu također biti ugrađene i u masne cilindre kao i u kristale kolesterola. Prisutne su u mokraći ako je oštećena bazalna membrana glomerula, zbog čega slobodno prolaze u mokraću. Kako se lipidi vežu na proteine, lipidurija je tipičan znak obilne proteinurije. Lipidne stanice jako variraju u veličini, od 2 do 50 μm u promjeru, žuto do svijetlo smeđe su obojene s jako velikim indeksom loma svjetlosti. Bojaju se s bojama Sudan III ili Oil Red O. U mokraći zdravih osoba lipidne stanice normalno nisu prisutne.

Cilindri (6,12,24,25) su stanični elementi koji predstavljaju odljeve tubula koji dolaze iz distalnih segmenata tubula, Henleove petlje i sabirnih kanalića. Veličina i oblik variraju i ovise o njihovoj lokaciji, pa prema obliku, svojstvima i podrijetlu dijele se na:

Hijaline cilindre koji su obično ravni i kratki, ali mogu biti i veliki i savinuti. Površina im je glatka i obično nemaju nikakvih inkluzija (Slika 6). Indeks loma svjetlosti je vrlo nizak zbog čega se doimaju kao vrlo nježne strukture koje se moraju promatrati prvo pod malim povećanjem kako se ne bi previdjeli.

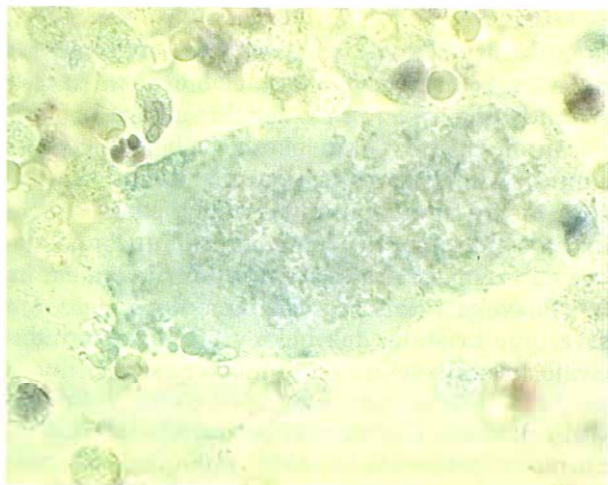
Referentni raspon: 0-2 hijalina cilindra / vidnom polju malog povećanja (x 200).



Slika 6 – Hijalini cilindri
Figure 6 – Hyaline cast

Cilindri sastavljeni od proteina plazme koji se dijele na:

granulirane cilindre koji nastaju degeneracijom renalnih - tubularnih stanica. Sadržaj granula u matriksu cilindra ovisi o stupnju degeneracije stanica zbog čega mogu biti fino i grubo



Slika 7 – Granulirani cilindar
Figure 7 – Granular cast

granulirani (Slika 7). Ukazuju na prisutnost bubrežne bolesti, ali nisu specifičan pokazatelj za mjesto ili vrstu oštećenja u bubregu. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

voštane cilindre koji su obično veliki s ostrim ili izlomljenim rubovima i glatkom površinom bez inkluzija. Građeni su pretežno od plazmat-skih proteina zbog čega imaju visoki indeks loma svjetlosti. U preparatu su lako prepoznatljivi i vide se kao sjajno žuti cilindri slični vosku. Njihova prisutnost u mokraći je uvijek udružena s ozbiljnim bolestima bubrega. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

hemoproteinske cilindre koje čine hemoglobinski, koji vrlo često nastaje iz eritrocitnog cilindra i ukazuje na krvarenja bubrežnog parenhima, i *mioglobinski* cilindar koji se može naći kod bolesnika s bolešću bubrega izazvanom "crush" sindromom. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

Stanični cilindri

Stanični cilindri (Slika 8) predstavljaju cilindre koji imaju ugrađene neke inkluzije prema kojima se zatim dijele na:

a) *eritrocitne cilindre* (25) koji su načinjeni od Tamm-Horsfallovog proteina na koji su ugrađeni intaktni eritrociti, normalne morfologije, ili više - manje razoreni (lizirani) eritrociti. Ako su eritrociti potpuno lizirani, u preparatu se vide kao cilindri homogene strukture i karakteristične crveno-smeđe boje i tada predstavljaju hemoglobinski cilindar. Njihova prisutnost u mokraći uvijek predstavlja pokazatelj krvarenja iz bubrežnog parenhima. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.



Slika 8 – Stanični cilindar
Figure 8 – Cellular cast

b) *leukocitne cilindre* koji predstavljaju mukoproteinske cilindre u koje su inkorporirani leukociti, a obično su to neutrofilni granulociti i uvijek potječu iz bubrežnog parenhima (tubula). Granulociti mogu biti intaktni ili degenerativno promijenjeni. Njihov broj po cilindru varira tako da se može naći cilindra s mnogo granulocita ili s nekoliko granulocita razbacanih po cijelom cilindru. U obojenom preparatu jezgre su intenzivno plavo-ljubičaste u ružičastom hijalnom matriksu. Prisutni su kod raznih infektivnih, kroničnih i akutnih bolesti bubrega kao i kod malignih hipertenzija i drugih bolesti. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

c) *bubrežne tubularne epitelne cilindre* koji su građeni od mukoproteinskog matriksa i stanica bubrežno tubularnog epitela. Vrlo često se stanice tako degenerativno promijene da ih je teško prepoznati, što je posljedica oštećenja tubula. Degeneracijske promjene u stanici očituju se u obliku granula kao i pojavljivanja kapljica masti. Takvi cilindri su prisutni u mokraći u slučajevima u kojima se mogu naći i slobodne stanice bubrežnog tubularnog epitela. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

d) *masne cilindre* koji na svojoj površini imaju kapljice masti koje jako lome svjetlo pa se u preparatu vide kao bljeskave, žute kapljice, topljive u eteru. Bojaju se s bojom Sudan III. Kako kapljice masti dolaze iz razorenih stanica bubrežnog tubularnog epitela, nalaz masnih cilindra može se očekivati kod opsežnijih bubrežnih oštećenja, naročito kod nefrotskog sindroma. Masne cilindre je moguće naći i kod subakutne i kronične upalne bolesti bubrega kao posljedicu masne degeneracije bubrežnog tkiva. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

e) *miješane cilindre* čiji se matriks sastoji od više od jednog proteina koji može sadržavati stanice ili neke druge inkluzije. Takvi cilindri imaju najmanje dva jasno izdvojena i dobro označena dijela. Često se u takvim cilindrima mogu naći i granulociti i eritrociti i epitelne stanice istovremeno, a vrlo često se mogu naći i cilindri koji su jednom polovinom hijalini, a drugom granulirani ili dijelom granulirani dijelom voštani. Kada se nađu različite vrste stanica u takvom cilindru (npr. eritrociti u jednom dijelu i leukociti u drugom) to ukazuje na oštećenja u više segmenata nefrona. Eritrociti u cilindru ukazuju na glomerularna oštećenja dok leukociti ukazuju na pijelonefritis ili intersticijske bolesti. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

Bilirubinski cilindri

Bilirubinski cilindri nastaju kad se mokraćom izlučuje konjugirani bilirubin koji oboji hijalini matriks žuto smeđe. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

Bakterijski i gljivični cilindri

Bakterijski i gljivični cilindri su rijedak nalaz i pojavljuju se kod imunokompromitiranih bolesnika s bakterijskom i gljivičnom infekcijom bubrega. Bakterijski cilindri se mogu naći kod pijelonefritisa. U mokraći zdravih osoba nisu prisutni.

Pseudocilindri

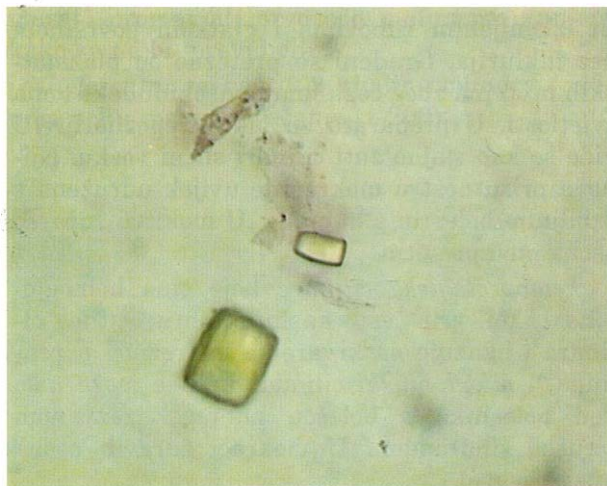
Pseudocilindri su tvorevine cilindričnog oblika koje nastaju izvan bubrega, a pojavljuju se u mokraći i morfološki su slični pravim cilindrima. Nazivaju se još i cilindroidi, a njihova prisutnost u mokraći nema kliničkog značenja. Tu se ubrajaju fosfatni, uratni cilindroidi ili cilindroidi kristala urata. Mogu biti prisutni i u mokraći zdravih osoba.

Kristali

Kristali (6,12,27) u mokraći su relativno čest nalaz, iako u svježoj mokraći obično nisu prisutni. Nastaju kada se kemijski sastojci koncentriraju i zasite mokraću, zbog čega dolazi do smanjene topljivosti što izaziva početak kristalizacije. Taj se učinak može vidjeti kada se mokraća ostavi stajati na temperaturi nižoj od tjelesne i većina kristala otapa se zagrijavanjem na 37 °C. Neke tvari, poput albumina, sprječavaju stvaranje kristala, dok neke vrste lijekova induciraju kristalizaciju čije kliničko značenje nije u potpunosti razjašnjeno. Prepoznavanje vrste kristala značajno je zbog razlikovanja patoloških od normalno prisutnih kristala. Kako mokraća može biti kisela ili alkalna određeni kristali mogu biti prisutni jedino ili uglavnom u kiseloj ili alkalnoj mokraći. U tablici 1. prikazani su kristali podijeljeni prema kliničkom značenju i pH mokraće.

Urati

Kristali urata variraju u svom obliku i mogu biti kvadratne, heksagonalne ili romboidne priz-



Slika 9 – Kristali urata
Figure 9 – Uric acid crystals

Tablica 1. Podjela kristala u sedimentu mokraće
Table 1 Classification of crystals in urinary sediment

Nepatološki kristali		Patološki kristali	Ostali kristali
Kisela mokraća	Alkalna mokraća	Kisela mokraća	
urati	kalcijev fosfat	cistin	bilirubin
kalcijev oksalat	tripel-fosfat	leucin	hemosiderin
hipurna kiselina	kalcijev karbonat	tirozin	natrijev urat
solii amorfnih urata	solii amorfnih fosfata	kolesterol	kalcijev sulfat
	amonijev biurati		kristali lijekova

me, a mogu se naći oblici poput bačvi, rozeta i vrlo rijetko, kao igle ili koplja (Slika 9). U preparatu su žuto do žuto-smeđe obojeni, što ovisi o debljini kristala. Kristali urata su klinički značajni samo ako ih nađemo u svježoj mokraći. Prisutnost obilne kristalurije je indikacija za giht ili intoksikaciju lijekovima, kao kod bolesnika s citostatskom terapijom zbog maligne bolesti. Mogu se naći u bolestima koje su karakterizirane pojačanom razgradnjom staničnih jezgri kao kod leukoza.

Kalcijev oksalat

Kristali koji su najčešće prisutni u kiseljoj, ali i u slabo alkalnoj mokraći. Postoje dvije vrste kristala kalcijeva oksalata, dihidrat (Weddellite) i monohidrat (Whewellite). Kristali dihidrata su najčešći kristali kalcijeva oksalata. Dolaze u različitim veličinama i oblicima pa tako mogu biti kao dvostruke piramide, poput pisma ili pješčanog sata, rijetko ovalni (Slika 10). U preparatu



Slika 10 – Kristali kalcijev oksalat dihidrata
Figure 10 – Bihydrated calcium oxalate crystals

su bezbojni i kod obilne kristalurije dolazi do stvaranja taloga. Kristali monohidrata su rjeđi oblik kalcijeva oksalata i mogu se pojaviti kao bikonkavni diskovi ili ovalni, jajoliki oblici. Za razliku od dihidrata, monohidrati se pojavljuju u slučajevima obilnog taloženja. Prisutnost kristala kalcijeva oksalata ima kliničko značenje kod osoba koje pokazuju tendenciju stvaranja mokraćnih kamenaca, inače nemaju neku kliničku važnost. Mogu se naći u mokraći osoba koje su konzumirale hranu bogatu oksalatima kao što je rajčica, špinat, salata i drugo. Kod bolesnika sa šećernom bolešću, kao i kod žutice, mogu se naći kristali kalcijeva oksalata. Ponekad prisutnost

kristala u kanalčićima može izazvati blagu hematuriju. Prisutnost kalcijeva oksalata u svježoj mokraći ukazuje na litijazu uvjetovanu hiperkalcijemijom (koja može, ali i ne mora biti udružena s hiperkalcemijom) ili hiperoksalurijom. Također se mogu naći i kod trovanja etilen-glikolom. U svježoj mokraći obično nisu prisutni.

Amorfni urati

Amorfni urati su Na-, K-, Ca- i Mg-soli mokraćne kiseline i pojavlju se najčešće u nakupinama kao prljavo-žute ili slabo obojene granule. Stajanjem mokraćne na nižim temperaturama stvara se narančasto-crveni talog "sedimentum lateritium". Obično se pojavljuju kao obilne nakupine koje mogu maskirati ostale elemente prisutne u mokraći. Nemaju neko naročito dijagnostičko značenje i najčešće se nalaze u koncentriranoj mokraći, kod groznice ili kod gihta.

Hipurna kiselina

Kristali hipurne kiseline pojavljuju se u obliku iglica, prizmi ili romboida i mogu biti bezbojni, rijetko blijedo žuto obojeni. Mogu se naći u mokraći nakon unosa voća i povrća koje sadrži velike količine benzojeve kiseline. Kristali hipurne kiseline mogu se naći i nakon primjene salicilata kao i kod bolesnika s jetrenom bolesti ili kod groznice.

Fosfati

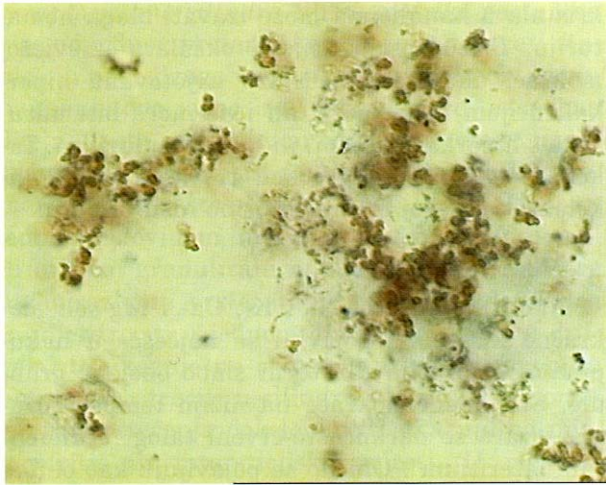
Fosfati su kristali koji se pojavljuju kao kalcijev fosfat ili tripel-fosfat.

Kalcijev fosfat se pojavljuje u neutralnoj ili slabo kiseljoj mokraći kao iglice, prizme ili rozete. Mogu se pojaviti i kao velike tanke pločice sa zrnatom površinom. Nužno nisu patološke, ali kod veće prisutnosti mogu biti indikacija za stvaranje kamenca.

Tripe-fosfat ili magnezijev-amonijev fosfat je transparentan kristal koji se često pojavljuje kao kovčeg, ali i u trapezoidnom obliku. Pojavljuje se u alkalnoj mokraći ili u mokraći u kojoj je zbog stajanja došlo do rasta bakterija.

Amorfni fosfati

Amorfni fosfati (Slika 11) mikroskopski su vrlo slični amorfnim uratima. Mogu kao i urati biti u velikim nakupinama. Za razliku od urata, fosfati mogu stvarati talog koji je makroskopski vidljiv kao bijeli talog na dnu epruvete. Glavni uzrok pojave fosfata u mokraći je alkalni pH, što smanjuje topljivost kalcijeva fosfata, a to dovodi do taloženja kristala. Prisutnost tih kristala nema kliničko značenje.



Slika 11 – *Soli amorfnih fosfata*
Figure 11 – *Amorphous phosphates*

Kalcijev karbonat

Kalcijev karbonat se pojavljuje u obliku kristala sferičnog oblika, kao pješčani sat ili kao grube granule. Mogu se naći u mokraći nakon unosa velikih količina povrća. Njihova prisutnost nema kliničkih implikacija.

Amonijev biurat

Amonijev biurat predstavlja rijedak nalaz mokraćnog sedimenta i ti kristali se pojavljuju kao žuto do smeđe obojene "kuglice". Uglavnom nemaju kliničkog značenja.

Bilirubin

Bilirubin je kristal koji se rijetko nalazi i pojavljuje se kao žuto smeđe iglice, granule ili pločice. Mogu se naći kod osoba s bolestima jetre ili kod različitih začepljenja žučnih vodova.

Hemosiderin

Hemosiderin je kristal crveno smeđe boje koji je vrlo sličan amorfnim uratima ili fosfatima i može se naći kod bolesnika s intravaskularnom hemolizom.

Kalcijev sulfat

Kalcijev sulfat je kristal koji je morfološki identičan kalcijevom fosfatu. Nema nekog kliničkog značenja.

Natrijev urat

Natrijev urat je kristal koji se u kiseloj mokraći taloži u obliku iglica, prizmi ili kao amorfne soli i nema neko kliničko značenje.

Kristali lijekova

Kristali lijekova su različiti kristali koji nastaju zbog primjene nekih lijekova.

Cistin

Kristali cistina su tanke heksagonalne ploče s nepravilnim rubovima koje dolaze u hrpicama jedna preko druge, u nakupinama ili u rozetama. Kristali cistina mogu se gomilati, što pokreće stvaranje mokraćnog (bubrežnog) kamena koji se javlja kod nasljednih bolesti koje uzrokuju propuštanje cistina kroz tubule i pojavu cistinurije.

Tirozin

Tirozin je kristal koji dolazi u obliku bezbojnih ili blijedo-žuto obojenih finih iglica, koje se mogu formirati u križiće ili "metlu". Mogu se naći kod oštećenja parenhima jetre kao što je hepatitis, ciroza ili intoksikacija organskim otapalima, kao i kod leukemija.

Leucin

Kristali leucina su slični kapljicama masti s koncentričnim prugama. Obično se nalaze zajedno s kristalima tirozina u istim kliničkim stanjima.

Kolesterol

Kristali kolesterola su tanke pločice s dobro definiranim rubovima i nazubljenim kutovima. To su smeđaste prozirne pločice koje mogu biti pojedinačne ili u nakupinama. Često ih se može vidjeti složene jedne preko druge. Rijedak su i uvijek patološki nalaz. Mogu se naći kod opsežnih bubrežnih oštećenja (nefrotski sindrom), infekcija urogenitalnog sustava, hilurije koja se događa kod torakalne ili abdominalne opstrukcije limfne drenaže.

Uzročnici infekcija i infestacija

Bakterije

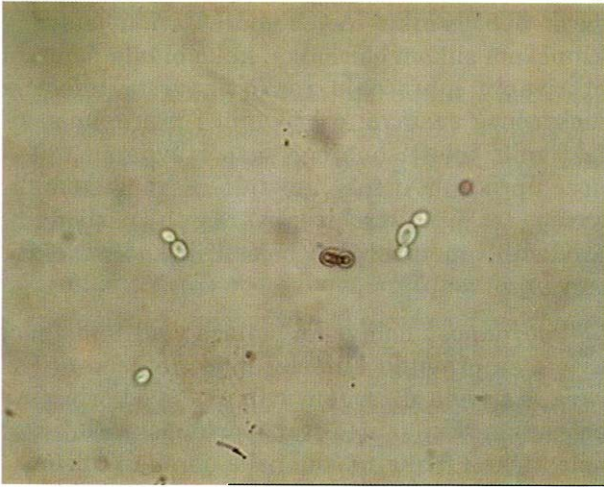
Bakterije u mokraći zdravih osoba nisu prisutne, ali manji broj se može naći zbog kontaminacije zbog neprikladnog skupljanja mokraćne ili duljim stajanjem na sobnoj temperaturi. Točna identifikacija se može dati tek na temelju mikrobiološkog ispitivanja (6,12).

Gljivice

Gljivice su okruglog ili ovalnog oblika homogene strukture bez inkluzija (slika 12). Mogu se pojaviti i u obliku hifa. Obično su prisutne kod dijabetičara, kod žena koje uzimaju kontraceptive, kod bolesnika s dugotrajnom antibiotskom ili imunosupresivnom terapijom (6,12).

Paraziti

Paraziti u mokraći najčešće su posljedica genitalne ili fekalne kontaminacije. *Trichomonas*



Slika 12 – Gljivice
Figure 12 – Yeasts

vaginalis je najčešći nalaz i predstavlja spolno prenosive uzročnike bolesti. Može uzrokovati vaginitis kod žene i uretritis kod muškaraca. Ako je živ, lako se prepozna po nepravilnom kretanju kao i po treperenju biča i *undulirajuće mem-*

brane. Ako je mrtav teško se razlikuje od leukocita ili malih okruglih, epitelnih stanica (6,12).

Artefakti / onečišćenja

Artefakti/onečišćenja su svi elementi koji dolaze u mokraću izvanjskim putem, kao što su dlake, vlakna vate, zrnca pudera, zrnca staklene prašine i slično.

3.3. Razine mikroskopske podjele u kliničkoj obradi mokraće

Iako je preporuka da se mikroskopsko pretraživanje elemenata koji čine sediment mokraće izrazi točnim citološkim nazivima, prihvaća se izražavanje u dvije razine, osnovnoj i dodatnoj. Osnovna razina predstavlja temeljnu razinu mikroskopske podjele (probiranje) bez daljnjih objašnjenja s ciljem pozitivne identifikacije elemenata sedimenta mokraće, dok je dodatna razina mikroskopske podjele (razina pretraživanja) točan opis uz citološke nazive kako bi se dobili podaci relevantni za kliničku interpretaciju. U tablici 2. prikazane su razine mikroskopske podjele u kliničkoj obradi mokraće (6).

Tablica 2. Razine mikroskopske podjele u kliničkoj obradi mokraće

Table 2. Levels of microscopy differentiation in clinical urinalysis

Osnovna razina	Dodatna razina
Eritrociti	Morfološki podtipovi eritrocita: dismorfni eritrociti
Leukociti/granulociti	Leukočiti: granulociti, limfociti Makrofagi (monociti i eozinofilni granulociti)
<i>Epitelne stanice:</i>	
Stanice pločastog epitela	Stanice pločastog epitela
Male epitelne stanice	Stanice bubrežnog tubularnog epitela Stanice prijelaznog epitela (površinske i iz dubljih slojeva) Intestinalne epitelne stanice (nakon kirurškog zahvata na mokraćnom mjehuru) Atipične stanice (citolog)
<i>Cilindri:</i>	
Hijalini	Hijalini
Nehijalini	Eritrocitni, granulocitni cilindri Bubrežno tubularni stanični cilindri Granulirani, voštani, masni cilindri Bakterijski i cilindri koji sadrže gljivice Hemoglobinski i mioglobinski cilindri Bilirubinski cilindri
Bakterije	Mikrobiološka ispitivanja
Gljivice, Trichomonas	Schistosoma haematobium (kod određenih zemljopisnih lokacija)
Spermatozoidi	Spermatozoidi
Artefakti/onečišćenja (dlake, papirna i tekstilna vlakna, zrnca pudera i staklene prašine) i sluzi	kao u osnovnoj razini
<i>Lipidi:</i>	
kapljice (izolirane i u nakupinama)	Lipidi, zajedno s kapljicama: ovalna masna tjelešca (kapljice masti ugrađene u tubularne stanice, kristali kolesterola
<i>Kristali:</i>	
urati, oksalati (mono i dihidrat), fosfati i cistin	Rijetki kristali: lijekovi, cistin, leucin, tirozin, 2,8-dihidroksiadenin, ksantin

3.4. Kvantifikacija staničnih elemenata u sedimentu mokraće

Premda je najučestalije izražavanje broja staničnih elemenata po vidnom polju, preporučeno je izražavanje u SI-sustavu kao broj staničnih elemenata $\times 10^6/L$, koji se izračunava iz debljine sloja ispod pokrovnice i promjera vidnog polja. Izračun se izvodi iz volumena sedimenta mokraće, površine pokrovnice, veličine objektiva i okulara prema sljedećem primjeru:

10 ml mokraće uz faktor koncentracije 20 koncentriran je u 0,5 ml volumena sedimenta za mikroskopiranje na koji je dodano $0,05 \mu L$, nanosi na predmetno stakalce i pokrije pokrovnicom 18×18 . Debljina sloja pod pokrovnicom tada iznosi $13/(18 \times 18) = 0,040$ mm. Ako je pretraživanje učinjeno kod povećanja 10×40 pri čemu je broj vidnog polja okulara 22 (promjer vidnog polja = $22 \text{ mm} / 40 = 0,55 \text{ mm}$), volumen vidnog polja velikog povećanja tada iznosi $0,040 \times \pi \times (0,55 / 2)^2 = 0,00950 \text{ mm}^3$ ili μL .

Uz faktor koncentracije 20 i 10%-tno razrjeđenje vidno polje velikog povećanja odgovara volumenu od $0,173 \mu L$ originalnog volumena mokraće. U tom slučaju $n \text{ Erc}/\text{vidno polje velikog povećanja}$ odgovara:

$$n \text{ Erc} / 0,173 \mu L = 5, 8 \times n \text{ Erc} \times 10^6/L$$

Iz ovog izračuna proizlazi da je npr. 4 Erc ekvivalentno 23 Erc $\times 10^6/L$.

4. POSLIJEANALITIČKA FAZA

Nakon provedene kompletne obrade mokraće koja se sastoji od fizikalnog (vizualnog) pregleda, kemijskog određivanja test-trakama i mikroskopske obrade sedimenta mokraće, poslijeanalitička faza je onaj dio analitičkog procesa u kojem se dobivene informacije prikazuju u nalazu. Nalaz mora sadržavati ime i prezime, tko je uputio zahtjev, vrstu uzorka, vrijeme obrade, metodu obrade, mjere u kojima se izražavaju ispitivani parametri s pripadnim referentnim rasponima, tko je izvršio obradu i verificirao nalaz te komentar nalaza ako je potreban.

5. ZAKLJUČAK

Analiza mokraće, kao jedna od najčešće traženih pretraga na svim razinama zdravstvene

skrbi o bolesniku uvijek mora biti uvjetovana kliničkom slikom bolesnika, kako bi bila pomoć u otkrivanju i praćenju različitih vrsta infekcija mokraćnog sustava, otkrivanju i praćenju neinfektivnih bolesti bubrega, uspostavljanju dijagnoze i praćenju učinkovitosti ili mogućih komplikacija terapije, probiranju raznih nasljednih, urođenih i metaboličkih bolesti ili kod različitih trovanja.

Pouzdanost dobivenih nalaza kao temeljnog uvjeta za pravilnu kliničku interpretaciju osigurava se standardizacijom svih uvjeta od pripreme bolesnika, skupljanja i transporta mokraće, organoleptičke i fizikalno-kemijske obrade te primjene preporučene standardizirane mikroskopske analize supravitalno obojenog sedimenta mokraće kojom se postiže optimalna vidljivost staničnih elemenata, a time i pouzdanost dobivenih rezultata.

U cilju promicanja dobre laboratorijske prakse od 1997. godine Zavod za kliničku kemiju Kliničke bolnice "Merkur" u suradnji sa Zavodom za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u organizaciji Hrvatskog društva medicinskih biokemičara, ustanovili su nacionalni program za vanjsku procjenu kakvoće rada koji se provodi 3 puta godišnje. Program je temeljen na kemijskoj analizi sintetski dobivene mokraće test-trakama i morfološkom prepoznavanju sastojaka sedimenta mokraće putem slika u boji. Prema dobivenim podacima u Hrvatskoj je kod kemijske analize test-trakama u upotrebi veliki broj test-traka različitih proizvođača. Rezultati pokazuju preklapanja koncentracijskih raspona za sva reagensijska polja kao posljedicu različitih koncentracija reaktanata kod različitih proizvođača, što je naročito izraženo u području pozitivnog ishoda testa (granice osjetljivosti) (28,29). U dijelu morfološkog prepoznavanja sastojaka sedimenta mokraće kao pomoć u identifikaciji elemenata daje se prikaz slučaja, a rezultati se razlikovno opisuju, što znači da se objašnjavaju sve sličnosti i razlike navedenih odgovora i prikazane slike (29,30). Dobiveni rezultati nacionalnog programa pokazuju da još uvijek veliki broj medicinsko-biokemijskih laboratorija ne koristi bojenje sedimenta u svjetlosnoj mikroskopiji kao preporučeni postupak. Zbog toga nacionalni program procjene kakvoće rada u dijelu analize mokraće ima za cilj trajnom edukacijom doprinijeti većoj primjeni standardizirane, preporučene metode obrade sedimenta mokraće supravitalnim bojenjem.

STANDARDIZED ANALYSIS OF SUPRAVITALLY STAINED URINE SEDIMENT

SUMMARY - Aim: To present standardized microscopic analysis of supravitally stained urine sediment.

Methods: Recommended methods for the analysis of fresh urine samples by the European Urinalysis Group of the European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM) and the Approved Guideline by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Results: Supravital staining of urine sediment has been shown to improve the visibility necessary for the accurate identification of cells and their structure, and thus is a recommended method for light microscopy based on the selective affinity of cells and cellular structures for colors depending on their physical-chemical status.

Conclusion: The use of standardized analysis of supravitally stained urine sediment has significantly contributed to the accuracy of routine laboratory urinalysis as one of the most frequently performed laboratory tests at all levels of health care. Since 1997 the External Quality Assessment Programme for Medical Biochemical Laboratories in Croatia, organized under the auspices of the Croatian Society of Medical Biochemists, has been extended to the recommended standardized routine urine evaluation in order to promote good laboratory practice.

Key words: standardized microscopic examination, urine sediment, supravital staining.

LITERATURA

1. Bolodeoku J, Donaldson D. Urinalysis in clinical diagnosis. *J Clin Pathol* 1996;49:623-6.
2. Fogazzi GB, Stewart Cameron J, Ritz E, Ponticelli C. The history of microscopy to the end of the 19th century. *Am J Nephrol* 1994;14:452-7.
3. Fogazzi GB, Stewart Cameron J. Urinary microscopy from 17th century to the present day. *Kidney Int* 1996;50:1058-68.
4. Koivula T, Grönroos P, Hari J, Icen A, Irjala K, Mäkelä P, Penttilä I, Siukola A, Hohenthal U. Recommendations for basic urinalysis and urine culture. (Kliinisten Laboratoriotutkimusten Laaduntarkkailu Oyin PLV-Työryhmä. Suositus virtsan perustutkimuksia ja virtsaviljeilyä varten. *Moodi* 1983;1:1-15.
5. Koivula T, Grönroos P, Icen A, Irjala K, Penttilä I, Siitonen A, Siukola A. Recommendations for basic urinalysis and urine culture. Additions based on experience to the previous recommendations. (Kliinisten Laboratoriotutkimusten Laaduntarkkailu Oyin PLV-Työryhmä. Suositus virtsan perustutkimuksia ja virtsaviljeilyä varten. Kokemuksen mukanaan tuomia lisäyksiä suositukseen.) *Moodi* 1986(a);3:99-109.
6. Kouri T, Fogazzi G, Gant V, Hallander H, Hofmann W, Guder WG. European urinalysis guidelines. ECLM - European Urinalysis Group. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60, Suppl 231:1-96.
7. NCCLS: Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine specimens; Approved Guideline - Second Edition, GP16-A2, 2001; vol 21, No 19:1-36. NCCLS document GP16-A2 2001 (ISBN 1-56238-448-1). NCCLS, Wayne, Pennsylvania.
8. Sternheimer R. Supravital staining. *JAMA* 1975;231:8:826-32.
9. Backer JR. Cytological technique. London: Chapman and Hall, 1975.
10. Lille RD, Conn HJ. Biological stains. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1969.
11. Bibbo M. Comprehensive cytopathology. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., 1991.
12. Fogazzi GB, Ponticelli C, Ritz E. The urinary sediment: an integrated view. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
13. Thomas L. Erythrocytes, leukocytes, and casts in the urine. U: Thomas L. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998:377-82.
14. Fogazzi GB, Ponticelli C. Microscopic hematuria, diagnosis and management. *Nephron* 1996;72:125-34.
15. Georgopoulos M, Schuster FX, Porpaczy P, Schramek P. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria - influence and clinical relevance of osmolality and pH on urinary erythrocyte morphology. *Br J Urol* 1996;78:192-6.
16. Koene RAP. Unexplained haematuria. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2025-7.
17. Birch DF, Fairley KF. Hematuria: Glomerular or nonglomerular? *Lancet* 1979;ii:845-6.
18. Fairley KF, Birch DF. Hematuria: A simple method for identifying glomerular bleeding. *Kidney Int* 1982;21:105-8.
19. Köhler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia - A characteristic marker for glomerular bleeding. *Kidney Int* 1991;40:115-120.
20. Tomita M, Kitamoto Y, Nakayama M, Sato T. A new morphological classification of urinary erythrocytes for differential diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 1992;37:2:84-9.
21. Kitamoto Y, Tomita M, Akamine M, Inoue T, Itoh J, Takamori H, Sato T. Differentiation of hematuria using a uniquely shaped red cell. *Nephron* 1993;64:32-6.
22. Favaro S, Bonfante L, D'Angelo A, Giacomini A, Romano M, Calo L, Bordin V, Vianello D, Meani A, Antonello A, Borsatti A. Is the red cell morphology really useful to detect the source of hematuria? *Am J Nephrol* 1997;17:172-5.
23. Ringsrud, KM. Cells in the urine sediment. *Lab Med* 2001;32;3:153-5.
24. Fogazzi GB, Carboni N, Pruneri G, Ponticelli C. The cells of the deep layers of the urothelium in the urine sediment: an overlooked marker of severe diseases of the excretory urinary system. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:1918-9.
25. Ringsrud, KM. Casts in the urine sediment. *Lab Med* 2001;32;4:191-3.

26. Fogazzi GB, See-odd Leong. The erythrocyte cast. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1649-52.
27. Fogazzi GB. Crystalluria: a neglected aspect of urinary sediment analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:379-87.
28. Sikirica M, Flegar-Meštrić Z, Juretić D, Bobetić-Vranić T. Results of urinalysis EQA-Scheme in Croatia using multiproperty strips. *International Congress for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 7th Alps-Adria Congress, Regensburg, April 20-22, 2002, Abstracts, p. 121.*
29. Sikirica M, Juretić D, Flegar-Meštrić Z, Bobetić-Vranić T. External quality assessment scheme in urinalysis using teststrips and urine sediment morphology in Croatia. *Euromedlab 2001; 14th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Prag, May 26-31, 2001. Abstracts. Clin Chem Lab Med* 2001;S258, PO-M008.
30. Sikirica M, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. Vanjska procjena kakvoće rada u morfološkoj analizi mokraćnog sedimenta. *Međunarodni simpozij "Laboratorijska dijagnostika gastroenteroloških bolesti", Atomske toplice 5. i 6.6.1998.*