Reproducibilnost citološke dijagnostike dismorfičnih eritrocita

Dubravac, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:331675

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Ivona Dubravac

REPRODUCIBILNOST CITOLOŠKE DIJAGNOSTIKE DISMORFIČNIH ERITROCITA

Diplomski rad

Osijek, 2016.

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek i u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod.

Mentor rada: prof. dr. sc. Valerija Miličić, dr. med., specijalist kliničke citologije

Rad ima 30 listova, 10 tablica i 6 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Etiologija mikrohematurije 2
1.2. Dijagnostika mikrohematurije 2
1.3. Vrste uzoraka urina u citologiji 3
1.3.1. Spontano izmokreni urin 3
1.3.2. Urini dobiveni instrumentacijom 4
1.4. Glatki i dismorfični eritrociti 4
1.5. Neglomerularni i glomerularni eritrociti 5
1.5.1. Neglomerularni eritrociti 5
1.5.2. Glomerularni eritrociti 5
1.6. Dijagnostika glomerularnih eritrocita 7
2. HIPOTEZA 8
3. CILJ RADA 9
4. ISPITANICI I METODE 10
4.1. Ustroj istraživanja 10
4.2. Ispitanici 10
4.3. Metode 10
4.4. Statističke metode 13
5. REZULTATI 14
6. RASPRAVA 19
7. ZAKLJUČAK 23
8. SAŽETAK 24
9. SUMMARY 25
10. LITERATURA 27
11. ŽIVOTOPIS 30

1. UVOD

Hematurija je abnormalna prisutnost krvi ili eritrocita u urinu (1). Jedan je od najznačajnijih simptoma bolesti mokraćnog sustava. Krv u mokraći simptom je koji treba ozbiljno shvatiti te dijagnostičkom obradom pronaći uzrok krvarenju. Ukoliko je krv u urinu vidljiva golim okom, riječ je o makrohematuriji. To znači da je krv prisutna u većoj količini, a vidi se kao promjena boje urina u crvenu (1, 2, 3). Crvena obojenost urina nije sinonim za makrohematuriju jer crvenu boju urina mogu uzrokovati hemoglobinurija i mioglobinurija (pozitivne testne trakice, negativan mikroskopski nalaz), konzumacija neke vrste hrane (npr. cikla, kupine) ili lijekova (npr. klorokin, deferoksamin, ibuprofen, metronidazol, nitrofurantoin i drugi). U slučaju konzumacije određene hrane i lijekova negativan je nalaz testnih trakica kao i mikroskopski nalaz (4). Osim iz mokraćnog sustava, krv može biti podrijetlom iz drugih organskih sustava (npr. gastrointestinalnog ili genitalnog), stoga je prvi korak u obradi utvrditi radi li se uistinu o krvi u mokraći. Mikrohematurija označava pojavu krvi u urinu koja nije vidljiva golim okom. Nalaz manjeg broja eritrocita u urinu nazivamo još i eritrociturija. U fiziološkim se uvjetima u urinu može naći pokoji eritrocit po vidnom polju i takav nalaz nema posebno značenje. Mikrohematuriju definiramo kao prisutnost pet ili više eritrocita u vidnom polju svjetlosnog mikroskopa svježeg centrifugiranoga urina, dokazanu u tri uzastopna uzorka tijekom tjedan dana (5, 6). Mikrohematurija je laboratorijski nalaz, a ne bolest. Može biti simptomatska ili asimptomatska, prolazna ili trajna, udružena s drugim simptomima ili izolirana (7).

Pretrage koje se rade u sklopu obrade hematurije ovise o prezentaciji bolesti i pratećim simptomima. Osobito je značajna detaljna anamneza i klinički pregled, zatim biokemijska analiza urina i slikovne metode. Ovisno o anamnestičkim podatcima u obradi hematurije koriste se ultrazvuk (UZV), nativna rendgenska slika abdomena, intravenska urografija (IVU), kompjuterizirana tomografija (CT) te razne invazivne urološke metode. Urološka evaluacija asimptomatske mikrohematurije preporuča se nakon isključivanja benignih uzroka (8).

1.1. Etiologija mikrohematurije

Etiologija mikrohematurije varira od slučajnog nalaza, koji je samo prolazan simptom i nije bolest, do stanja koje, ako se ne prepozna dovoljno rano i ne liječi, ugrožava život pojedinca. Etiologiju mikrohematurije možemo podijeliti na glomerularnu, neglomerularnu, mikrohematurije povezane s poremećajima sustavne koagulacije, mikrohematurije zbog vaskularnih poremećaja te mikrohematurije u tubulointersticijskim nefritisima (9, 10). Posebnu skupinu mikrohematurija čine one koje se mogu naslijediti (11). Bolesti bubrežnog parenhima treći su po učestalosti uzrok mikrohematurije, odmah nakon neoplazmi i kamenaca (12). Patofiziološki mehanizmi nastanka mikrohematurije mogu biti glomerularni i ekstraglomerularni. Osim navedenih, sposobnost promjene oblika eritrocita, tzv. deformibilnost eritrocita, može biti uzrokom mikrohematurije. Oštećenje pora glomerularne bazalne membrane upalnim procesima, imunosnim mehanizmima, različitim kemijskim agensima ili pak mehaničko oštećenje dovodi do prolaska eritrocita u urin (11). Takav tip mikrohematurije nazivamo glomerularnim. Ekstraglomerularni ili postglomerularni tip mikrohematurija javlja se izolirano.

1.2. Dijagnostika mikrohematurije

Najbrži je način otkrivanja eritrocita u urinu pomoću testne trake impregnirane ortotoluidinom koji u katalitičkoj reakciji s peroksidom iz hemoglobina daje zelenu obojenost (13, 14). Ta metoda može dati lažno pozitivne rezultate u prisutnosti peroksidaze iz bakterija. Nalaz može biti lažno negativan u vrlo koncentriranoj mokraći te ako je u mokraći prisutna velika količina reduktivnih tvari (tipa vitamin C) (15). Kako bismo bili sigurni da je nalaz testne trake doista pozitivan na eritrocite, a ne na slobodni hemoglobin i mioglobin, urin treba pregledatiti mikroskopom (12).

Urin se pod mikroskopom može pregledavati u sedimentiranom i nesedimentiranom obliku. Sedimentirani urin dobije se centrifugiranjem 10 – 15 ml svježeg urina tijekom 5 minuta na 1500 okretaja u minuti, odvoji se supernatant i gleda pod velikim povećanjem (40 x). Nesedimentirani urin svjež je i necentrifugiran. Necentrifugirani urin pregledava se u komoricama za brojanje eritrocita (12). Komore su poznatog volumena pa je moguće izračunati broj eritrocita u odnosu na volumen urina. Patološki nalaz sedimentiranog urina jest postojanje više od 3 do 5 eritrocita u vidnom polju (5), a u nesedimentiranom urinu postojanje

više od 5 eritrocita u mm^3 (13, 15). Ako postoji potreba daljnje dijagnostike oblika eritrocita, rabe se fazno-kontrastni mikroskop (PCM) i metode protočne citometrije urina.

1.3. Vrste uzoraka urina u citologiji

Uzorci urina za citološku pretragu dijele se na slobodno izmokren urin i urin dobiven instrumentacijom. Za citologa je osobito važno poznavati način na koji je uzorak dobiven jer su dijagnostičke pogrješke specifične za pojedine tipove uzoraka. Dvije spomenute kategorije urina morfološki se razlikuju prije svega u celularnosti jer su stanice u slobodno izmokrenom urinu dobivene spontanom deskvamacijom te je celularnost takvih uzoraka slaba, osim u slučajevima kada je ista pojačana zbog prisutnosti bolesti (16).

1.3.1. Spontano izmokreni urin

Upotreba spontano izmokrenog urina zadovoljavajuća je za rutinska ispitivanja (12). Za citološku analizu preporuka je koristiti drugi izmokren urin nakon ustajanja (zovemo ga prvi jutarnji urin, za razliku od noćnog urina koji pacijent izmokri prvog nakon ustajanja (16). Noćni urin ne bi se smio koristiti za analizu jer produljeno stajanje stanica u urinu uzrokuje degenerativne promjene zbog djelovanja proteolitičkih enzima i bakterijskih citolizina (12).

Upute za davanje reprezentativnog uzorka urina trebale bi se nalaziti u klinikama i bolničkim odjelima (17). Liječnik obiteljske medicine trebao bi pripremiti pacijenta za ispravno davanje uzorka urina usmenim i pismenim uputama (16). Pacijent treba nakon ustajanja popiti čašu vode, mokriti i temeljito obaviti toaletu spolovila te doći u ustanovu gdje se pretraga vrši (12, 16). Uzorci se uzimaju tri dana za redom na odjelu za citologiju. Preporuča se uzeti 1 gram C-vitamina noć prije pregleda urina jer je niski pH bolji za očuvanje stanica (18). Ukoliko pacijent nije u mogućnosti doći u ustanovu, uzorak se mora dostaviti u laboratorij u roku od dva sata. Ukoliko to nije moguće, uzorak treba pohraniti na +4 °C i dostaviti u laboratorij najkasnije unutar 24 sata od uzimanja uzorka (19).

Uzorak se daje tehnikom srednjeg čistog mlaza. Prije uzimanja uzorka mokraće potrebno je oprati vanjsko spolovilo toplom vodom i sapunom te osušiti papirnatom maramicom. Ukoliko pranje spolovila nije moguće, preporuča se sljedeći postupak: raširiti

čistim prstima velike usne spolovila, obrisati vanjsko spolovilo s 3 – 4 papirnate maramice povlačeći od naprijed prema nazad, ispustiti prvi mlaz mokraće u toalet, izmokriti oko 50 ml mokraće u neprekinutom nizu u sterilnu posudicu te čvrsto zatvoriti posudicu poklopcem ne dotičući ga prstima s unutrašnje strane. Kod muškaraca je potrebno obrisati vrh spolovila čistom, vlažnom papirnatom maramicom, ispustiti prvi mlaz mokraće u toalet i izmokriti oko 50 ml mokraće u neprekinutom mlazu u sterilnu posudicu (19).

1.3.2. Urini dobiveni instrumentacijom

Urini dobiveni instrumentacijom uključuju kateterizirani urin (kateterizacija mokraćnog mjehura ili pojedinih uretera), ispirke mokraćnog mjehura, desnog i lijevog uretera te uzorke uretera, uretre ili mokraćnog mjehura dobivene četkanjem. Uzorci dobiveni ispiranjem preferiraju se kod pacijenata sa suspektnom neoplazmom jer je razlika u celularnosti između uzorka dobivenog ispiranjem i slobodno izmokrenog urina znatna. Neki autori smatraju nepromišljenim postavljanje pozitivne dijagnoze na temelju analize slobodno izmokrenog urina, osim ako promjene nisu drastične i visokoga stupnja (17).

Uzimanje ispirka mokraćnog mjehura temelji se na injiciranju 50 – 100 ml fiziološke otopine ili Ringerova laktata u mokraćni mjehur. Preporuča se primjena izotoničnih otopina kako bi se izbjeglo osmotsko oštećenje stanica (12). Uzorci dobiveni četkanjem mogu se uzeti iz bilo kojeg područja urinarnog trakta, a obično se uzimaju s ispirkom određenog područja.

Nedostatak uzimanja ispirka invazivnost je metode i moguće reaktivne promjene stanica koje mogu izgledati poput displastičnih ili tumorskih stanica, a posljedica su instrumentalne manipulacije (12). Nedostatci tehnike četkanjem su bol, potreba za upotrebom anestezije i artefakti (12, 16).

1.4. Glatki i dismorfični eritrociti

Citološka analiza urina obuhvaća kvalitativnu analizu (morfološki izgled) i semikvantitativnu analizu (međusobni omjer eritrocita u postotcima) nativnog i trajno obojenih preparata sedimenta urina. Citološka analiza nativnog sedimenta radi se samo kod spontano izmokrenog urina i njome se određuje vrsta i postotak eritrocita koji mogu biti glatki ili dismorfični (20). Glatki i dismorfični eritrociti u sedimentu urina ukazuju na podrijetlo hematurije (21). Glatki eritrociti imaju intaktnu membranu i znak su krvarenja iz donjeg

urotrakta, dok dismorfični eritrociti imaju nazubljenu membranu i znak su krvarenja iz gornjeg urotrakta (18). Smatra se da više od 70 % dismorfičnih eritrocita ukazuje na hematuriju koja je podrijetlom iz gornjeg urotrakta, a više od 70 % glatkih eritrocita na hematuriju iz donjeg urotrakta.

1.5. Neglomerularni i glomerularni eritrociti

U trajno obojenim sedimentima urina citološki razlikujemo glomerularne i neglomerularne eritrocite, a semikvantitativnom analizom eritrocita citološki određujemo jesu li oštećeni glomeruli bubrega ili nisu.

1.5.1. Neglomerularni eritrociti

Neglomerularni eritrociti glatkih su kontura, okrugli i pravilni. Opisivanje njihovih oblika neophodno je jer prilikom dužeg stajanja u urinu te pri promjenama osmolarnosti dolazi do promjene morfologije neglomerularnih eritrocita. Neglomerularni eritrociti mogu imati dvostruku zadebljanost membrane, šiljaste nastavke, diskoidni oblik ili oblik kape te nabranu membranu.

Dvostruko zadebljanje membrane nastaje kada su eritrociti izloženi urinu duže vrijeme. Razlikuju se od glomerularnih prstenastih oblika jer je prostor između membrana ispunjen citoplazmom i nedostaje centralna „rupa“ karakteristična za prstenastu glomerularnu formu. Difuzijski procesi u hipertoničnom urinu mogu uzrokovati skupljanje eritrocita i stvaranje šiljastih nastavaka na površini eritrocita (12). U hipotoničnom urinu eritrociti poprimaju diskoidni oblik. Neglomerularni eritrociti ponekad mogu imati oblik kape ili bizarne nabore koji zbog središnjeg prosvjetljenja citoplaze imaju oblik Mercedes zvijezde.

1.5.2. Glomerularni eritrociti

Najčešće opisivani „glomerularni“ oblik eritrocita oblik je prstena s debelim rubom (tzv. *„doughnut“* oblik) kod kojega je cijeli volumen stanice raspoređen u perifernom prstenu. Taj je oblik patognomoničan za glomerularnu hematuriju (12). S površine zadebljanog ruba

mogu se izbočiti pupoljci (vezikule) s unutrašnje ili vanjske strane eritrocita ili se vezikularni oblici mogu pojaviti samostalno. Neki glomerularni oblici mogu biti u potpunosti deformirani. Takvi se groteskni eritrociti pojavljuju kao fragmentirane čestice potpuno izobličenog oblika, ali očuvane intaktne membrane. Groteskni oblici eritrocita vrlo su slični oštećenim eritrocitima, a razlikuju se po tome što groteskni oblici imaju cjelovitu membranu. Zbog toga se semikvantitativna analiza glomerularnih eritrocita smije raditi isključivo u trajno obojenim preparatima u kojima se može točno vidjeti intaktna membrana glomerularnih eritrocita.

Uzrok nastanka eritrocitnog dismorfizma još uvijek nije u potpunosti objašnjen. Većina autora smatra da je glavni uzrok nastanka mehaničko oštećenje membrane koje nastaje prolaskom eritrocita kroz glomerule i tubule. Neki autori navode i moguće toksično oštećenje uzrokovano osmotskim gradijentom ili lizosomskim enzimima u upalno promijenjenom bubrežnom parenhimu (12).

Nefrolozi Birch i Fairly iz Australije prvi su opisali mikroskopske karakteristike na promijenjenim eritrocitima u urinu kao posljedicu glomerulonefritisa 1979. godine razlikujući glomerularne i neglomerularne oblike eritrocita u sedimentu urina (22). Poloni i suradnici neglomerularne eritrocite nazvali su izomorfičnim eritrocitima pa su pretpostavili da su glomerularni eritrociti dismorfični (23). Pojmovi glomerularni i dismorfični eritrociti često se izjednačavaju i danas, što nije točno. Pojam dismorfični znatno je širi i obuhvaća sve eritrocite promijenjenoga oblika, a pojam glomerularni označava jasno definirane oblike eritrocita koji su jako dobar indikator glomerularnih bolesti. Iako su glomerularni oblici indikator glomerularnih bolesti, oni se mogu pojaviti u urinu zdravih osoba, stoga se samo na temelju morfologije eritrocita ne smije postaviti konačna dijagnoza. Dodatni je problem što ne postoji suglasnost o graničnoj vrijednosti („*cut-off*“), odnosno točan postotak glomerularnih eritrocita koji je siguran znak glomerularne bolesti. Tome pridonosi i neujednačeno korištenje terminologije koja se odnosi na morfologiju eritrocita u urinu. Prema nekim izvorima manje od 20 % glomerularnih/dismorfičnih eritrocita ukazuje da nema glomerularnog oštećenja, 20 % do 50 % glomerularnih/dismorfičnih eritrocita ukazuje na moguću glomerulopatiju, 50 % do 75 % glomerularnih/dismorfičnih eritrocita ukazuje na mogući glomerulonefritis, a više od 80 % glomerularnih/dismorfičnih eritrocita ukazuje na glomerulonefritis (12, 24). Drugi izvori navode različite postotke glomerularnih eritrocita koji ukazuju na podrijetlo hematurije (25). Budući da suvremeni autori smatraju da je dijagnostička vrijednost nalaza glomerularnih eritrocita u urinu samo umjerena, njihov nalaz značajan je u dijagnostici bubrežnih bolesti prije šire primjene invazivnih dijagnostičkih metoda.

1.6. Dijagnostika glomerularnih eritrocita

U trajno obojenim sedimentima urina citološki razlikujemo glomerularne i neglomerularne eritrocite, a semikvantitativnom analizom eritrocita citološki određujemo jesu li oštećeni glomeruli bubrega ili nisu.

Zbog svoje jednostavnosti fazno-kontrastni mikroskop (PCM) jedna je od najvažnijih metoda u dijagnostici glomerularnih eritrocita. Povećanje kontrasta nastaje zbog odjeljivanja prelomljenih i neprelomljenih zraka svjetlosti koje stvaraju fazne razlike koje su vidljive kao razlike u svjetlini (12). Dismorfični eritrociti mogu se vizualizirati i svjetlosnim mikroskopom nakon pripreme preparata metodama brzoga bojanja. Bez obzira na poznate dehidracijske učinke alkohola, glomerularni eritrociti mogu zadržati svoja karakteristična strukturalna svojstva prilikom bojanja po Papanicolaou (12).

2. HIPOTEZA

Citološka procjena podrijetla eritrocita u urinu utvrđivanjem udjela dismorfičnih eritrocita u urinu nije reproducibilna tehnika.

3. CILJ RADA

Cilj je ovog presječnog istraživanja:

1. Učiniti procjenu morfologije eritrocita od strane dvaju citologa u sedimentu urina bojanom nativno te procjenu morfologije eritrocita u biokemijskom laboratoriju u komorici na 100 eritrocita.
2. Procijeniti reproducibilnost citološke procjene morfologije eritrocita dvaju promatrača (specijalisti citolozi – *interobserver variability*) te njihovo slaganje s promatračem biokemijskog laboratorija.
3. Utvrditi eventualnu povezanost slaganja među promatračima s drugim parametrima: pH urina, količina eritrocita i proteina u urinu.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj istraživanja

Ovo je presječno istraživanje (26) u kojem su se prikupljali podatci o morfologiji eritrocita u urinu u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek, Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek te na Odjelu za patologiju i citologiju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu.

4.2. Ispitanici

Presječnim istraživanjem obuhvaćeno je 100 ispitanika (56 muškaraca i 44 žene) upućenih na Klinički zavod za kliničku citologiju i Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek te na Odjel za patologiju i citologiju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu tijekom prosinca 2015. godine i siječnja 2016. godine s ciljem utvrđivanja morfologije eritrocita u sedimentu urina u jednom ili tri navrata. Uveden je sustav šifriranja prema kojem nije moguće utvrditi identitet osobe čiji su podatci korišteni u daljnjem tijeku istraživanja.

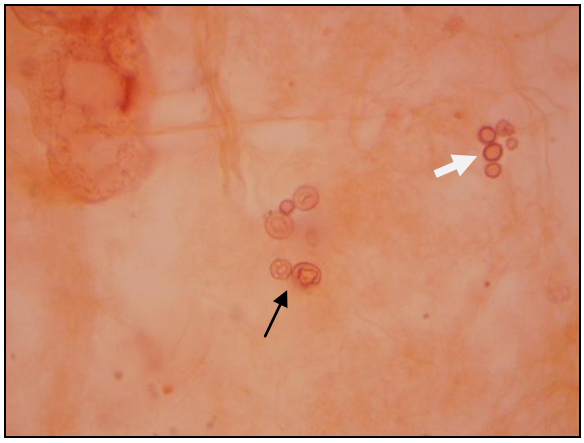
4.3. Metode

Uzorak urina koji je pacijent dao u citološkom ili biokemijskom laboratoriju odmah je prepolovljen te je druga polovica dostavljena u drugi laboratorij. U biokemijskom laboratoriju procijenjen je postotak dismorfičnih eritrocita u sedimentu na 100 eritrocita u komorici (promatrač 3). Postupak obrade urina u biokemijskom laboratoriju: od svakog uzorka urina uzeo se volumen od 10 ml i u njega uronila jedna testna trakica za urin (Combur^{10}) te tako odredio pH urina, osmolalnost, proteini i broj eritrocita. Broj eritrocita odredio se i mikroskopski kao prosjek na 20 velikih vidnih polja i klasificirao u pet kategorija (Tablica 1.)

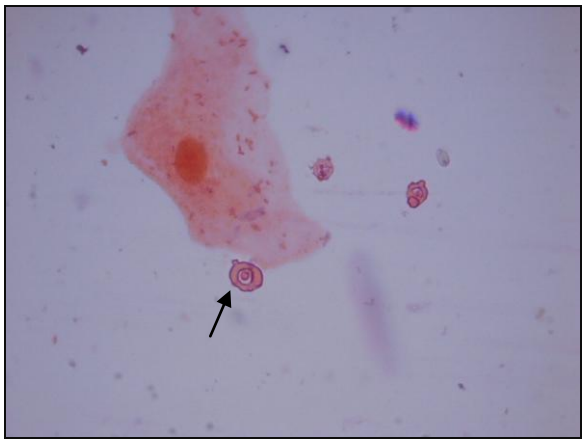
Tablica 1. Kategorije eritrocita određene mikroskopski prosjekom na 20 velikih vidnih polja

KATEGORIJA	**BROJ ERITROCITA PO VIDNOM POLJU**
Negativan nalaz	0 – 1 1 – 2 2 – 3 3 – 5
1/+	5 – 8 8 – 10 10 – 15
2/++	15 – 20 20 – 30 30 – 100 (dosta)
3/+++	100 – 200 (mnogo)
4/++++	> 200 (masa)

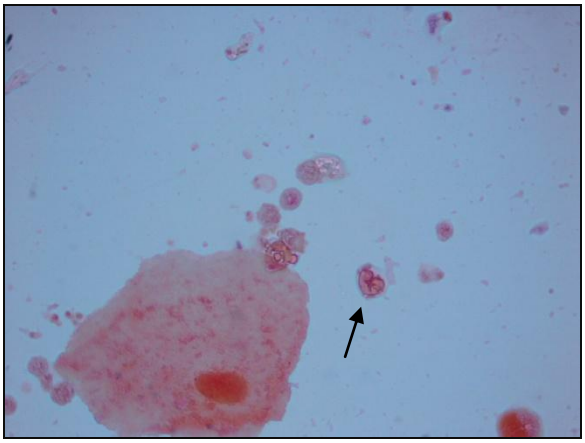
Nakon očitavanja rezultata testne trakice, uzorak urina centrifugira se 5 minuta na 2500 okretaja, odvaja se supernatant, a nativnom sedimentu dodaje se kap Urised boje (*URISED barvilo*) za nativno bojanje. Jednokratna urinska pločica za mikroskopsku analizu sedimenta urina sastoji se od deset testnih polja. Na svako testno polje (komoricu) pipetom se kapne jedna kap sedimenta obojenog Urised bojom. Testna polja, tj. komorice standardizirane su dubine i volumena. Uzorak se mikroskopira na povećanjima 20 x i 40 x. Na povećanju 40 x broje se dismorfični eritrociti na 100 eritrocita te tako procjenjuje postotak dismorfičnih eritrocita. Ukoliko broj eritrocita u komorici nije 100, analiziraju se naredne komorice sve dok se ne analizira ukupno 100 eritrocita. U citološkom laboratoriju uzorci urina obrađeni su u citocentrifugi 3 minute na 1500 okretaja i nativno bojani Urised bojom, a morfologija eritrocita procijenjena je od strane dvaju citologa (promatrač 1 i 2) neovisno o broju eritrocita u sedimentu (Slike 1. – 6.). Problem je s tako pripremljenim uzorkom što kod pacijenata s blažom hematurijom ili intermitentnom hematurijom broj eritrocita u sedimentu ne mora biti veći od nekoliko, što dovodi u pitanje adekvatnost rezultata.



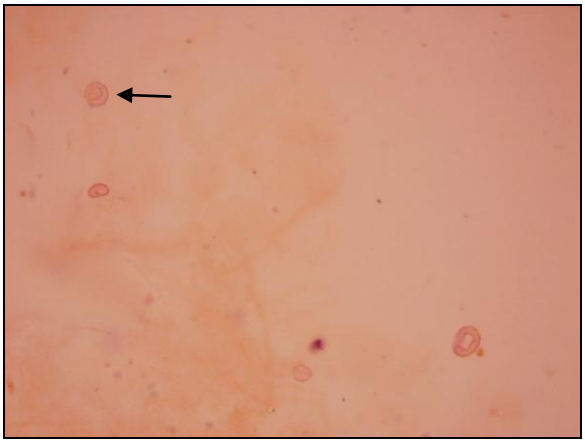
Slika 1. Dismorfični i glatki eritrociti u nativnom sedimentu urina (preuzeto iz arhive Kliničkog zavoda za kliničku citologiju, KBC-a Osijek)



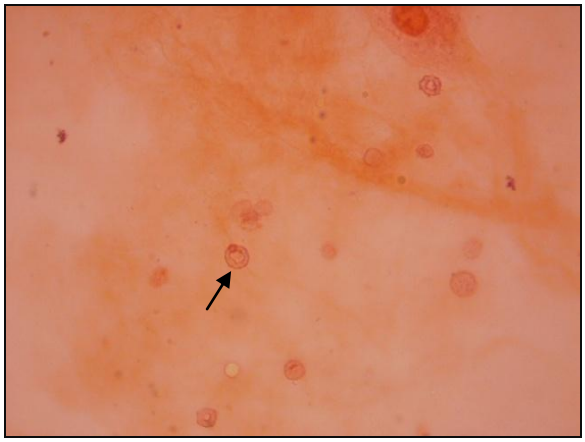
Slika 2. Dismorfični eritrociti s pupićima u nativnom sedimentu urina (preuzeto iz arhive Kliničkog zavoda za kliničku citologiju, KBC-a Osijek)



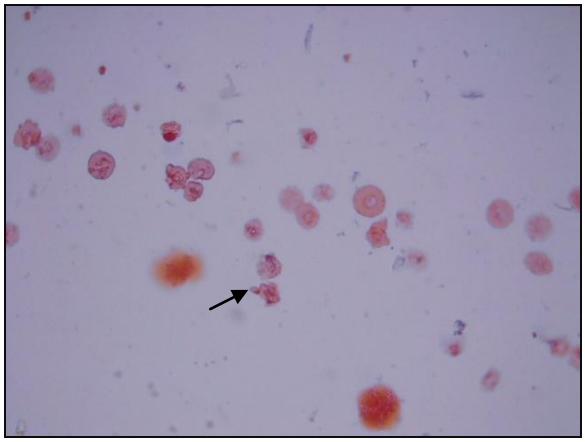
Slika 3. Dismorfični eritrociti nepravilnog oblika u nativnom sedimentu urina (preuzeto iz arhive Kliničkog zavoda za kliničku citologiju, KBC-a Osijek)



Slika 4. Dismorfični eritrociti- „doughnut oblici" u nativnom sedimentu urina (preuzeto iz arhive Kliničkog zavoda za kliničku citologiju, KBC-a Osijek)



Slika 5. Dismorfični eritrociti s pupićem u nativnom sedimentu urina (preuzeto iz arhive Kliničkog zavoda za kliničku citologiju, KBC-a Osijek)



Slika 6. Dismorfični eritrociti grotesknog oblika u nativnom sedimentu urina (preuzeto iz arhive Kliničkog zavoda za kliničku citologiju, KBC-a Osijek)

4.4. Statističke metode

Kategorijski podatci prikazani su u obliku apsolutnih i relativnih frekvencija, a numerički, koji nisu bili normalno distribuirani, prikazani su pomoću medijana, prve i treće kvartile. Normalnost distribucije ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Rezultati analize pouzdanosti prikazani su pomoću Cronbachovog alfa koeficijenta i pripadajuće neparametrijske korelacijske analize čiji su rezultati iskazani pomoću Kendallovog tau koeficijenta. Razlike među kategorijskim varijablama ispitane su pomoću hi-kvadrat testa, a razina statističke značajnosti određena je s $p < 0,05$ (27, 28). Podatci su statistički obrađeni pomoću računalnog programa R (inačica 3.2.3, R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) (29).

5. REZULTATI

Istraživanjem je obuhvaćeno 100 ispitanika (56 muškaraca i 44 žene) koji su dali uzorak urina u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju i Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek te na Odjelu za patologiju i citologiju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu tijekom prosinca 2015. godine i siječnja 2016. godine radi utvrđivanja podrijetla eritrocita kod izražene mikrohematurije i makrohematurije.

Od ukupnog broja sedimenata (N = 284) 42,25 % sedimenata urina sadržavalo je jedan križ eritrocita određenih testnom trakicom, a gotovo podjednak broj sedimenata imao je ili negativan nalaz eritrocita ili dva križa eritrocita (hi-kvadrat test, $p < 0,001$) (Tablica 2.).

Tablica 2. Nalaz eritrocita u urinu određen testnom trakicom (N = 284)

Krv	N (%)	p*
Negativno	73 (25,7 %)	
1/+	120 (42,25 %)	
2/++	70 (24,65 %)	< 0,001
3/+++	12 (4,23 %)	
4/++++	9 (3,17 %)	

*hi-kvadrat test

Proteine nije sadržavalo 73,94 % sedimenata urina, a u 19,37 % sedimenata urina bio je prisutan samo jedan križ proteina, što je zajedno činilo više od 90 % uzoraka (hi-kvadrat test, $p < 0,001$) (Tablica 3.).

Tablica 3. Nalaz proteina u urinu određen testnom trakicom (N = 284)

Proteini	N (%)	p*
Negativno	210 (73,94 %)	
1/+	55 (19,37 %)	< 0,001
2/++	13 (4,58 %)	
3/+++	6 (2,11 %)	

*hi-kvadrat test

Više od polovice sedimenata urina (58,1 %) imalo je pH 5, a ostali sedimenti imali su pH 6, 7, 8 ili 9 (hi-kvadrat test, $p < 0,001$) (Tablica 4.).

Tablica 4. pH urina određen testnom trakicom (N = 284)

pH	N (%)	p*
5	165 (58,1 %)	
6	52 (18,31 %)	
7	39 (13,73 %)	< 0,001
8	27 (9,51 %)	
9	1 (0,35 %)	

*hi-kvadrat test

Uspoređujući mjerenja od strane dvaju citologa (promatrač 1 i 2), koji procjenjuju morfologiju eritrocita u nativnom sedimentu urina i promatrača u biokemijskom laboratoriju (promatrač 3), koji procjenjuje morfologiju na minimalno 100 eritrocita u komorici, pouzdanost u slaganju među promatračima bila je visoka ($\alpha = 0,846$) (Cronbachov alpha).

Usporedbom povezanosti između dvaju citologa (promatrač 1 i 2) koji procjenjuju morfologiju eritrocita u nativnom sedimentu urina obrađenom u citocentrifugi i promatrača u biokemijskom laboratoriju (promatrač 3), koji procjenjuje morfologiju na minimalno 100 eritrocita u komorici, dokazana je statistički značajna povezanost koja se razlikuje u snagama (Kendallov tau b koeficijent, $p < 0,001$). Statistički značajna pozitivna, srednje jaka povezanost pronađena je između promatrača 1 i promatrača 2 ($\tau = 0,689$). Između promatrača 1 i promatrača 3 te promatrača 2 i promatrača 3 postoji pozitivna, ali slaba povezanost (Kendallov tau b koeficijent) (Tablica 5.).

Tablica 5. Slaganje promatrača citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju u procjeni morfologije eritrocita

	Kendallov τ b		
	Promatrač 1*	Promatrač 2*	Promatrač 3†
Promatrač 1*	1		
Promatrač 2*	0,689‡	1	
Promatrač 3†	0,472‡	0,444‡	1

*citolozi, †promatrač u biokemijskom laboratoriju, ‡$p < 0,05$

Usporedbom pouzdanosti mjerenja u odnosu na prisutnost proteina u urinu (prisutnost proteina sa i bez definirane količine) i izostanak proteina, vidljivo je kako se pouzdanost u prisutnosti proteina (α = 0,839) gotovo ne razlikuje od pouzdanosti prilikom izostanka proteina (α = 0,848) (Cronbachov alpha) (Tablica 6.).

Tablica 6. Slaganje promatrača u procjeni morfologije eritrocita ovisno o prisutnosti proteina u urinu

	α* (95 %-tni raspon pouzdanosti)
Prisutnost proteina	
Da†	0,839 (0,762 – 0,893)
Ne	0,848 (0,809 – 0,881)
1/+	0,878 (0,809 – 0,925)
2/++	0,705 (0,25 – 0,902)
3/+++	0,829 (0,274 – 0,974)

*Cronbachov alpha, †prisutnost proteina bez obzira na količinu

Na temelju rezultata usporedbe pouzdanosti mjerenja prema prisutnosti eritrocita određenih testnom trakicom u sedimentu vidljivo je kako postoji razlika u pouzdanosti u prisutnosti krvi (α = 0,839) i izostanku krvi (α = 0,636). Izostanak krvi u ovom istraživanju označava broj eritrocita manji od 5 koji testne trakice ne mogu detektirati, a ne znači u pravom smislu potpuno nepostojanje eritrocita u urinu. Također, porastom količine krvi u sedimentu urina (izražene porastom broja križeva) dolazi do porasta mjerenja pouzdanosti (Cronbachov alpha) (Tablica 7.).

Tablica 7. Ocjena procjene slaganja promatrača u procjeni morfologije eritrocita ovisno o prisutnosti eritrocita u urinu određenih testnom trakicom

	α* (95 %-tni raspon pouzdanosti)
Prisutnost krvi	
Da	0,839 (0,798 – 0,874)
Ne	0,636 (0,463 – 0,76)
1/+	0,689 (0,579 – 0,775)
2/++	0,718 (0,58 – 0,816)
3/+++	0,978 (0,943 – 0,993)
4/++++	0,974 (0,917 – 0,994)

*Cronbachov alpha

U slučaju isključenja pojedinih promatrača, isključenje promatrača 3 u biokemijskom laboratoriju svaki put je uzrokovalo porast pouzdanosti testa (Tablica 8.).

Tablica 8. Ocjena procjene slaganja promatrača u procjeni morfologije eritrocita ovisno o prisutnosti eritrocita u urinu prilikom isključenja pojedinog promatrača

	Prisutnost krvi					
	Ne	Da	1/+	2/++	3/+++	4/++++
Promatrač 1	0,558	0,703	0,637	0,330	0,962	0,987
Promatrač 2	0,408	0,734	0,480	0,510	0,980	0,946
Promatrač 3	0,655	0,871	0,678	0,871	0,959	0,951

*Cronbachov alpha

Pouzdanost mjerenja ovisno o prisutnosti eritrocita u sedimentu urina (određenih mikroskopski kao prosjek na 20 velikih vidnih polja) prilikom izostanka eritrocita ($\alpha = 0,814$) iznosila je gotovo jednako kao u prisutnosti većeg broja eritrocita. Zbog premalog broja uzoraka s 4 križa eritrocita, ta je kategorija isključena iz izračuna (Tablica 9.).

Tablica 9. Ocjena procjene slaganja promatrača u procjeni morfologije eritrocita ovisno o prisutnosti eritrocita u urinu određenih mikroskopski kao prosjek na 20 velikih vidnih polja

	α* (95 %-tni raspon pouzdanosti)
Ne	0,814 (0,73 – 0,88)
1/+	0,823 (0,76 – 0,87)
2/++	0,823 (0,74 – 0,89)
3/+++	0,879 (0,65 – 0,97)

*Cronbachov alpha

Usporedbom pouzdanosti mjerenja u odnosu na pH urina vidljivo je kako postoji visoka pouzdanost ukoliko je pH urina 6 i 7 ($\alpha = 0,954$ i $\alpha = 0,974$), a približavanjem krajnim vrijednostima pH pouzdanost mjerenja smanjuje se (Cronbachov alpha) (Tablica 10.).

Tablica 10. Slaganje promatrača u procjeni morfologije eritrocita ovisno o pH urina

		95 %-tni raspon pouzdanosti	
	α*	Donja granica	Gornja granica
pH = 5	0,718	0,634	0,785
pH = 6	0,954	0,921	0,973
pH = 7	0,974	0,955	0,985
pH = 8	0,698	0,439	0,851

*Cronbachov alpha

6. RASPRAVA

Utvrđivanje podrijetla hematurije citološkom procjenom morfologije eritrocita neinvazivna je i bezbolna metoda koja je, zbog jednostavnog i lakog dobivanja uzoraka, prihvatljiva za bolesnike, ali također i za liječnike zbog mogućnosti usmjeravanja daljnjeg dijagnostičkog postupnika, čime može zamijeniti agresivnije i skuplje dijagnostičke postupke. Pojava dismorfičnih eritrocita u urinu upućuje na krvarenje iz gornjeg urotrakta, stoga se citološka procjena morfologije eritrocita smatra prvim korakom u evaluaciji mikroskopske hematurije jer može uputiti treba li pacijent prvenstveno obradu nefrologa (ukoliko je krvarenje iz gornjeg urotrakta) ili urologa (ukoliko je krvarenje iz donjeg urotrakta).

Osim navedenih prednosti, citološka procjena morfologije eritrocita ima i svoja ograničenja. Ista su u prvom redu posljedica nepostojanja postupnika za obradu uzorka urina za ovu pretragu (treba li uzorak centrifugirati u centrifugi, citocentrifugi ili eventualno u obje; koliki volumen uzorka treba obraditi i sl.), što rezultira različitom celularnošću različito obrađenih uzoraka. Isto osobito dolazi do izražaja kada se urin pacijenata s blagom ili intermitentnom hematurijom obrađuje u citocentrifugi, što za posljedicu može imati premali broj eritrocita za morfološku procjenu.

Daljnje poteškoće proizlaze iz neujednačenog korištenja pojmova glomerularni i dismorfični eritrociti, odnosno učestalog izjednačavanja istih u semantičkom smislu. Pojam dismorfični eritrociti širi je i obuhvaća, kako i sam naziv kaže, sve eritrocite promijenjenog oblika. Paradoksalno je da u jednom urološkom udžbeniku možemo naći kako autor navodi da su dismorfični eritrociti neglomerularni eritrociti promijenjenoga oblika, a zatim nekoliko stranica dalje navodi da su dismorfični eritrociti isto što i glomerulari eritrociti (12).

U Hrvatskoj je upotreba tih dvaju termina, a i sam način priprave uzorka, uvelike ovisan o ustanovi gdje je citolog educiran i gdje je zaposlen. U nekim se ustanovama analizira samo nativno bojani sediment, dok u drugim i nativno i trajno po May-Grünwald-Giemsi (MGG) i Papanicolaou (Papa) bojani sediment. Analiza obuhvaća kvalitativnu analizu, odnosno morfološki izgled eritrocita te međusobni omjer dismorfičnih i glatkih, odnosno glomerularnih i neglomerularnih eritrocita (semikvantitativna analiza). U nativno bojanom sedimentu spontano izmokrenog urina određuje se omjer glatkih i dismorfičnih eritrocita u svrhu diferenciranja hematurije iz gornjeg odnosno donjeg urotrakta. Pregledom trajno bojenog sedimenta semikvantitativnom analizom dijagnosticira se moguće oštećenje glomerula na temelju prisutnosti i omjera glomerularnih i neglomerularnih eritrocita (20). U

najvećem broju laboratorija citolozi analiziraju eritrocite u nativno obojenom uzorku, ali postavlja se pitanje uočavaju li češće glomerularne, a ne sve dismorfične eritrocite zbog lakše morfološke prepoznatljivosti glomerularnih eritrocita i nejasne edukacije u tom području te na taj način umanjuju osjetljivost pretrage.

Treći, ali jednako veliki problem predstavlja nepostojanje suglasnosti o graničnoj vrijednosti glomerularnih eritrocita koja bi sa sigurnošću upućivala na glomerularno oštećenje, a time i na glomerularno podrijetlo hematurije. Dostupni literaturni podatci prepuni su kontradiktornih informacija, tako da se vrijednosti kreću od samo nekoliko postotaka do visokih 80 % (12, 25, 30, 31, 32, 33).

U pokušaju da prevlada tu prepreku Hans Köhler je 1991. klasificirao eritrocite u urinu na devet tipova primjećujući da su akantociti i kodociti (*target cells*) često povezani s glomerularnom hematurijom ukoliko ih ima više od 5 %. Ipak, izostanak tih stanica ne znači odsutnost glomerulopatije pa taj test ima visoku specifičnost, ali nisku osjetljivost (34). Tomita i suradnici godinu dana kasnije predložili su drugu klasifikaciju prema kojoj su eritrociti u urinu podijeljeni na neglomerularne (N1, N2, N3, N4 i N5) i glomerularne (G1, G2, G3, G4 i G5). G1 stanice slične su akantocitima i smatraju se vrlo specifičnima, pa ukoliko ih je više od 1 % već ukazuju na glomerularnu hematuriju. Ako G-1 stanica ima manje od 1 %, granična vrijednost za glomerularnu hematuriju podiže na 15 % svih G-stanica (35). Neki autori tvrde da je potrebno više od 80 % glomerularnih eritrocita da bi se sa sigurnošću moglo reći da se radi o glomerulonefritisu (12). Taj se postotak, ali kao vrijednost dismorfičnih eritrocita, poštuje i na Kliničkom zavodu za kliničku citologiju KBC-a Osijek, dok na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku iste ustanove iskustveno smatraju da je dostatno 30 % glomerularnih eritrocita uz cilindruriju i proteinuriju. Analizom kriterija, prema kojima promatrači u biokemijskom laboratoriju klasificiraju eritrocite, uočava se da isti odgovaraju kriterijima za glomerularne eritrocite, što onda može objasniti da je takav niži postotak (neispravno imenovanih) „dismorfičnih“ eritrocita potvrđen kliničkim nalazima lezije glomerula.

U svjetlu svih tih dijagnostičkih poteškoća nameće se još jedno dodatno pitanje – kolika je reproducibilnost citološke procjene morfologije eritrocita od strane dvaju ili više promatrača te kolika je reproducibilnost te dijagnostičke metode uvažavajući različite metode priprave uzoraka. U tu je svrhu analizirano 284 uzorka urina. Analizom pouzdanosti uspoređena je procjena morfologije dismorfičnih eritrocita od strane dvaju citologa (promatrač 1 i 2) u odnosu na promatrača u biokemijskom laboratoriju (promatrač 3). Rezultati su pokazali da postoji prilično visoka pouzdanost u slaganju rezultata između

citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju (α = 0,846). Kada promatramo povezanost između citologa te citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju, može se uočiti postojanje statistički značajne pozitivne, srednje jake povezanosti između citologa (τ = 0,689) te slabe povezanosti između citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju (τ = 0,472) odnosno (τ = 0,444). Ovdje je potrebno ponovno istaknuti da se uzorci koje analiziraju citolozi i promatrač u biokemijskom laboratoriju pripremaju različitom metodologijom te da promatrači u biokemijskom laboratoriju ocjenjuju morfologiju na minimalno 100 eritrocita. Vjerojatno baš zbog definiranog relativno visokog broja eritrocita koji se moraju pregledati, promatrači u biokemijskom laboratoriju iskustveno percipiraju da je njihovo međusobno slaganje u određivanju postotka dismorfičnih eritrocita izuzetno visoko (reproducibilno). Promatrači 1 i 2 (citolozi) ističu da se pripremom uzorka u citocentifugi često dobiju sedimenti bitno različitog sadržaja eritrocita kao posljedica uzimanja samo dviju kapi uzorka za citocentrifugu. Osim toga, smatraju važnim je li uzorak stajao neko vrijeme prije postupka sedimentiranja, je li tehničar dvije kapi uzorka uzeo s dna ili s površine i je li uzorak promiješao prije pipetiranja. Ukoliko je uzorak stajao prije obrade desetak minuta i time se pod utjecajem gravitacijske sile sedimentirao te je tehničar uzeo dio uzorka s dna posude, dobiveni sediment bit će znatno celularniji i eventualno bogatiji eritrocitima. Citologe također ograničavaju uzorci pacijenata s blažom hematurijom kod kojih se u sedimentima često nađe samo desetak eritrocita te, ako su šest do sedam njih opisani kao dismorfični, znači li to sigurno krvarenje iz gornjeg urotrakta? Postavlja se pitanje koliko je minimalno eritrocita potrebno analizirati da bi se postavila prihvatljivo sigurna dijagnoza.

Istraživanje potkrjepljuje činjenicu da je pouzdanost mjerenja veća u prisutnosti većeg broja eritrocita u uzorku (α = 0,689 u prisutnosti 1/+ eritrocita te α = 0,978 u prisutnosti 3/+++ eritrocita). To značajno povećanje pouzdanosti mjerenja ukazuje da je količina eritrocita u uzorku značajan čimbenik koji utječe na pouzdanost mjerenja i povlači za sobom nužnost revizije i standardizaciju metodologije pripreme uzoraka za procjenu morfologije eritrocita koja omogućuje procjenu na većem broju eritrocita.

Istraživanjem je dokazano kako pH urina znatno utječe na pouzdanost mjerenja, odnosno da je pouzdanost najveća pri srednjim vrijednostima pH (α = 0,954 pri pH = 6, odnosno α = 0,974 pri pH = 7), a približavanjem krajnjim vrijednostima pH pouzdanost se značajno smanjuje (α = 0,634 pri pH = 5, odnosno α = 0,698 pri pH = 8). pH urina varira ovisno o brojnim čimbenicima kao što su stanje uhranjenosti organizma, način prehrane i lijekovi koje pacijent koristi. Ako uzmemo u obzir činjenicu da pH urina znatno utječe na

pouzdanost mjerenja, a gotovo 60 % uzoraka urina u ovom istraživanju činili su urini s pH-om 5 (pH kod kojeg je pouzdanost mjerenja niža), kao eventualno rješenje, s ciljem dobivanja što preciznije procjene morfologije eritrocita u urinu, treba razmotriti educiranje pacijenata o poželjnoj prehrani nekoliko dana prije pretrage.

Proteinurija je simptom koji se često javlja uz kliničku sliku glomerulonefritisa, ali se može javiti i izolirano bez drugih simptoma i otklona. Istraživanjem je dokazano da pouzdanost mjerenja procjene morfologije dismorfičnih eritrocita u urinu ne ovisi o količini proteina u uzorku (α = 0,839 u prisutnosti, odnosno α = 0,848 u odsutnosti proteina), što je osobito važno jer je utvrđivanje morfologije eritrocita prva od metoda za utvrđivanje glomerularne hematurije i postavljanje sumnje na glomerulonefritis.

Posljedično svemu gore navedenom, a u suprotnosti s prvotnom hipotezom istraživanja, proizlazi da je citološka procjena podrijetla eritrocita u urinu utvrđivanjem udjela dismorfičnih eritrocita u urinu reproducibilna tehnika te je treba zadržati u algoritmu pretraga kod prisutne makrohematurije ili mikrohematurije, uz preispitivanje prikladnih metoda tehničke obrade uzorka koje će omogućiti procjenu morfologije na optimalnom broju eritrocita.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Slaganje promatrača citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju u procjeni morfologije eritrocita u kategoriji je dobrog slaganja (Cronbachov alpha, $\alpha = 0,846$).
- Postoji statistički značajna pozitivna, srednje jaka povezanost u procjeni morfologije eritrocita između dvaju promatrača citologa (Kendallov tau b koeficijent, $\tau = 0,689$)
- Između pojedinog promatrača citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju postoji statistički značajna pozitivna, slaba povezanost ($\tau = 0,472$), odnosno ($\tau = 0,444$).
- Količina eritrocita u uzorku čimbenik je koji značajno utječe na pouzdanost procjene morfologije eritrocita (Cronbachov alpha: 1/+ eritrocita ($\alpha = 0,689$), 2/++ eritrocita ($\alpha = 0,718$), 3/+++ eritrocita ($\alpha = 0,978$), 4/++++ eritrocita ($\alpha = 0,974$)).
- Prisutnost/odsutnost proteina i njihova količina u uzorku ne utječe na pouzdanost procjene morfologije eritrocita (u prisutnosti proteina $\alpha = 0,839$; u odsutnosti $\alpha = 0,848$).
- Pouzdanost procjene morfologije eritrocita ovisna je o vrijednostima pH (visoka kod pH = 7 ($\alpha = 0,974$), odnosno pH = 6 ($\alpha = 0,954$)), a približavanjem krajnjim vrijednostima (pH = 5 ($\alpha = 0,718$) i pH = 8 ($\alpha = 0,698$)) pouzdanost se smanjuje.
- Slaganje dvaju citologa u procjeni morfologije eritrocita pripada kategoriji dobrog slaganja, time je metoda reproducibilna.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA. Procijeniti reproducibilnost citološke procjene morfologije eritrocita dvaju promatrača citologa te njihovo slaganje s promatračem biokemijskog laboratorija. Utvrditi povezanost slaganja među promatračima u odnosu na količinu eritrocita i proteina u urinu te pH.

USTROJ STUDIJE. Presječno istraživanje.

ISPITANICI I METODE. Istraživanjem je obuhvaćeno 100 ispitanika koji su dali uzorak urina jednom ili u tri uzastopna dana u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju KBC-a Osijek i Odjelu za patologiju i citologiju OB-a Slavonski Brod. Uzorci su obrađeni u citocentrifugi, nativno bojani i procijenjenji od strane dvaju citologa, a u biokemijskom laboratoriju u centrifugi te je morfologija procijenjena na minimalno 100 eritrocita. Testnim trakicama odredio se pH, broj eritrocita i količina proteina.

REZULTATI. Postoji statistički značajna pozitivna, srednje jaka povezanost u procjeni morfologije eritrocita između dvaju promatrača citologa (τ = 0,689). Između pojedinog promatrača citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju postoji statistički značajna pozitivna, slaba povezanost (τ = 0,472), odnosno (τ = 0,444). Količina eritrocita čimbenik je koji značajno utječe na pouzdanost procjene. Pouzdanost raste s porastom broja eritrocita (α = 0,689 za jedan križ, α = 0,974 za četiri križa). Ekstremne vrijednosti pH negativno utječu na slaganje promatrača.

ZAKLJUČAK. Slaganje dvaju citologa u procjeni morfologije eritrocita pripada kategoriji dobrog slaganja, metoda je reproducibilna. Niže vrijednosti slaganja između citologa i promatrača u biokemijskom laboratoriju, koje su posljedica drugačije metodologije pripreme uzoraka koja promatraču u biokemijskom laboratoriju omogućuje procjenu na minimalno 100 eritrocita, ukazuju na potrebu revidiranja i standardizacije metode obrade uzoraka urina u citološkim laboratorijima.

KLJUČNE RIJEČI. citologija; dismorfični eritrociti; hematurija

9. SUMMARY

REPRODUCIBILITY OF CYTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF DYSMORPHIC ERYTHROCYTES

OBJECTIVES. To evaluate the reproducibility of cytological assessment of red cell morphology of the two observers cytologists and the level agreement between them and the observer from the biochemical laboratory. To determine a degree of correlation among observers based on the amount of erythrocytes and urinary protein, as well as pH.

STUDY DESIGN. A cross-sectional study.

PARTICIPANTS AND METHODS. The study included 100 respondents who provided a urine sample once or in three consecutive days at the Department of Clinical Pathology, University Hospital Center Osijek and the Department of Pathology and Cytology at General Hospital Slavonski Brod. The samples were processed in cytocentrifuge, native colored and assessed by two cytologists. The samples were processed in a centrifuge in the laboratory and the morphology was estimated on at least 100 erythrocytes by the observer. Test strip was used to determine pH, the number of red blood cells and the amount of protein.

RESULTS. There is a statistically significant positive medium strong association in estimating red cell morphology between the two observers cytologists ($\tau = 0.689$). Between each observer cytologist and observer in the laboratory there is a statistically significant positive, but weak correlation ($\tau = 0.472$), respectively ($\tau = 0.444$). The amount of red blood cells is a factor that significantly affects the reliability of the assessment. Reliability increases with the number of red blood cells ($\alpha = 0.689$ for one cross, $\alpha = 0.974$ for four crosses). The extreme pH values negatively affect the degree of the correlation among the observers.

CONCLUSION. The degree of the correlation between the two cytologists in assessing red cell morphology belongs to the category of good agreement, the method is reproducible. Lower values of agreement between cytologists and observer in the

laboratory, which are the result of different methodology of sample preparation, where the observer in the laboratory requires the assessment of the minimum of 100 red blood cells, suggests the need for auditing and standardization of methods of processing urine samples in cytology laboratories.

KEYWORDS. cell biology; dysmorphic erythrocytes; haematuria

10. LITERATURA

1. Vehaskari VM, Rapola J, Koskimies O, Savilathi E, Vilska J, Hallman N. Microscopic Hematuria in school chlidren: epidemiology and clinicopathologic evaluation. J pediatar. 1979;95:676-84.
2. Yuste C, Rivera F, Moreno JA, López Gómez JM. Haematuria on Spanish Registry of Glomerulonephritis. Sci Rep [internet]. 2016. Sij 28. Datum pristupa: 17. 03. 2016. doi.10.1038/srep19731. [Epub ahead of print]
3. Yuste C, Gutierrez E, Sevillano AM, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Ortiz A i sur. Pathogenesis of glomerular haematuria. World J Nephrol. 2015;4(2):185-195.
4. Utsch B, Klaus G. Urinanalysis in Children and Adolescents. Dtsch Arztebl Int. 2014;11(37):617-26.
5. Dodge WF, West EF, Smith EH, Bruce H. Proteinuria and hematuria in schoolchildren: epidemiology and early natural history. J Pediatr. 1976;88:327-47.
6. Meadow SR. Hematuria. U: Postlethwaite RJ, urednik. Clinical pediatric nephrology, 2. izd. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1994. str. 1-14.
7. Diven SC, Travis LB, A practical primary care approach to hematuria in children. Pediatr Nephrol. 2000;14:65-72.
8. Lambert M, AUA Guideline Addresses Diagnosis, Evaluation and Follow – Up of Asymptomatic Microhematuria. Am Fam Physician. 2013;87(9)649-653.
9. Batinić D, Milošević D. Hematurija: postupnik obrade. Medix. 2005;60/61:162-5.
10. Vijayakumar M, Nammalwar BR. Diagnostical Approach to a child with hematuria. Indian Pediatr. 1998;35:525-32.
11. Kalia A, Travis LB. Hematuria, leukocyturia and cylindruria. U: Edelmann CM, Bernstein J, Meadow SR, Spitzer A, Travis LB, ur. Pediatric-kidney diseases. 2.izd. Boston: Little Brown; 1992. str. 553-63.
12. Roth S. Urinary Erthrocyte Morphology and Diagnosis of Hematuria. U: Rather P, Roth S, Soloway MS. Urinary Cytology, Manual and Atlas. 2.izd. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1991. str. 187-204.
13. Fago A, Barakat AY. The urine and urinary sediment. U: Barakat AY, ur. Renal diseases in children. Clinical Evaluation and diagnosis. 1. izd. New York: Springer-Verlag. 1990; 31-54.

14. Taylor CM, Chapman S. Urinalysis. U: Taylor CM, Chapman S, ur. Handbook of renal investigation in children. 1.izd. London: Wright; 1989.
15. Strasinger SK. Urinalysis and blood fluids. 3.izd. Philadelphia: Dravis; 1994. str. 51.
16. Miličić V, Prvulović I. Mogućnosti citodijagnostike bolesti mokraćnog sustava. U: Miličić V, Tomašković I, Butković-Soldo S, urednici. Suvremeni pristup infektivnim i neoplastičnim bolestima mokraćnog sustava. Osijek: Studio HS internet d.o.o., Udruga MOS; 2015. str. 34-48.
17. Rosenthal D, Raab S. Cytologic Detection of Urothelial Lesions. 1.izd. New York: Springer; 2005. str. 169-170.
18. Trutin Ostovic K. Urine Cytology with ancillary tests. In Book of 3rd Annual European Tutorial ed. Anagnostpoulou I, Hellenic Society of Clinical Cytology, Kimi-Evia-Greece, 2010;22-6.
19. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Upute za uzimanje i slanje uzoraka. Dostupno na adresi: http://www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-mikrobiologiju/upute-za-uzimanje-i-slanje-uzoraka/. Datum pristupa: 28.11.2015.
20. Trutin Ostović K. Citološki pregled urina kod hematurija i glomerulonefritisa. Paediatr Croat. 2015;59:66-71.
21. Tesser Poloni JA, Bosan IB, Garigali G, Fogazzi GB. Urinary red blood cells: not only glomerular or nonglomerular. Nephron Clin Pract. 2012;120:c36-c41.
22. Birch DF, Fairley KF. Haematuria: glomerular or nonglomerular. Lancet. 1979;2:845-6.
23. Poloni JAT, Bosan IB, Garigali G, Fogazzi GB. Urinary red blood cells: not only glomerular or nonglomerular. Nephron Clin Pract. 2012;120:36-41.
24. Kardum-Skelin I. Citologija mokraće. U: Flegar-Meštrić Z. Kliničko-biokemijska korelacija rezultata kvalitativne analize mokraće. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. str. 81-106.
25. Sanches Ito CA, Pecoits-Filho R, Bail L, Arcoverde Wosiack M, Afinovcz D, Borsato Hauser A.Comparative analysis of two methodologies for the identification of urinary red blood cell casts. J Bras Nefrol. 2011;33(4)402-407
26. Kločić I, Vorko-Jović A, ur. Epidemiologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
27. Horvat J, Mijoč J. Osnove statistike. 2. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2012.
28. Milošević Z, Bogdanović D. Statistika i informatika u oblasti medicinskih nauka. 1. izd. Niš: Galaksija; 2012.

29. The R Project for Statistical Computing. Dostupno na adresi: https://www.r-project.org/. Datum pristupa: 25.05.2016.
30. Sultana T, Sultana T, Rahman MQ, Rahman F, Islam MS, Ahmed AN. Value of dysmorphic red cells and G1 cells ba phase contrast microscopy in the diagnosis of glomerular diseases. Mymensingh Med J. 2011;20(1):71-7.
31. Miura H, Suwabe A, Tominga M. Evaluation of dysmorphic red cells in the urinary sediment. Rinsho Byori. 2001;49(7):638-45.
32. Lettgen B, Wohlmuth A. Validity of G1-cells in the differentiation between glomerular and non-glomerular children. Pediatr Nephrol. 1995;9(4):435-7.
33. Zaman Z1, Proesmans W. Dysmorphic erythrocytes and G-1 cells as markers of glomerular hematuria. Pediatr Nephrol. 2000;14(10-11):980-4.
34. Kohler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia: a characteristic marker for glomerular bleeding. Kidney Int. 1991;40:115-20.
35. Tomita M, Kitamoto Y, Nakayama M, Nakayama M, Sato T. A new morphological classification of urinary erythrocytes for differential diagnosis of glomerular hematuria. Clin Nephrol. 1992;37:84-9.

11. ŽIVOTOPIS

Ivona Dubravac, studentica 6. godine
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Medicinski fakultet Osijek
Studij Medicine
Cara Hadrijana 10E
Tel. +385-31-51-28-00

Datum i mjesto rođenja:
23. 12. 1991., Đakovo
Kućna adresa:
Vladimira Nazora 76, 31402 Semeljci
Tel. +385-97-763-87-08
E-mail: ivona.dubravac91@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2006. – 2010. Prva gimnazija Osijek

2010. – 2016. Studij medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

OSTALE AKTIVNOSTI:

21. – 23. travnja 2016. sudjelovala na 5. hrvatskom kongresu kliničke citologije, 2. hrvatskom simpoziju analitičke citologije i 3. hrvatskom simpoziju citotehnologije u Opatiji (predavanje „Reproducibilnost citološke dijagnostike dismorfičnih eritrocita“ i plakat prezentacija „Primjena direktne endometralne *brush* citologije u detekciji premalignih i malignih lezija endometrija“)