

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA BRAČEK

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Univerza v Ljubljani



FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA BRAČEK

**PRIMERJAVA ŠTETJA BAKTERIJ V URINSKEM
SEDIMENTU POD MIKROSKOPOM IN Z
AVTOMATIZIRANIM ANALIZATORJEM**

**COMPARISON OF COUNTING BACTERIA IN
URINARY SEDIMENT UNDER A MICROSCOPE
AND WITH AN AUTOMATED ANALYZER**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v Kliničnem centru na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem..

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., ki je sprejel mentorstvo, si vzel čas zame, me usmerjal in mi s svojimi nasveti pomagal pri pisanju diplomske naloge.

Najlepša hvala mojim staršem, ki so me vsestransko podpirali in mi vedno stali ob strani.

Nazadnje pa hvala fantu Boštjanu in sinu Žaku, za spodbujanje in potrpežljivo prenašanje tekom študija in pri pisanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem..

Ljubljana, 2011

Tina Braček

KAZALO

1 UVOD	12
1.1 NASTANEK URINA	12
1.2 VRSTE URINSKIH VZORCEV	13
1.2.1 Prvi jutranji urin	13
1.2.2 Drugi jutranji urin.....	14
1.2.3 Naključni vzorec	14
1.2.4 Časovni vzorec	14
1.3 OSNOVNA ANALIZA URINA – kvalitativna urinska analiza	16
1.3.1 Organoleptični pregled urina.....	16
1.3.2 Fizikalni pregled urina	17
1.3.3 Kvalitativna kemijska analiza urina – suha kemija.....	17
1.3.3.1 Levkociti v urinu	19
1.3.3.2 Nitriti (bakterije).....	20
1.3.3.3 Eritrociti.....	21
1.3.3.4 Proteini (albumini).....	22
1.3.3.5 Relativna gostota	23
1.3.3.6 Glukoza.....	24
1.3.3.7 Ketonska telesa	25
1.3.3.8 Koncentracija vodikovih ionov (pH).....	25
1.3.3.9 Žolčna barvila v urinu: bilirubin in urobilinogen	26
1.3.3.10 Askorbinska kislina (vitamin C).....	26
1.3.4 Mikroskopska analiza urina	27
1.3.4.1 Vrednotenje sestavin urinskega sedimenta.....	27
1.4 PRISOTNOST BAKTERIJ V URINU	29
1.5 NORMALNA MIKROBNA FLORA	30
1.5.1 Normalna mikrobna flora sečil in spolovil.....	31
1.6 OKUŽBE SEČIL	31
1.6.1 Klinična slika.....	32
1.6.1.1 Uretritis.....	32
1.6.1.2 Cistitis.....	32

1.6.1.3 Pielonefritis.....	32
1.6.1.4 Prostatitis	32
1.6.2 Dejavniki, ki povečujejo verjetnost okužbe	33
1.7 PREISKAVA URINA PRI OKUŽBAH SEČIL	33
1.8 ODVZEM URINA ZA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE	34
1.9 BAKTERIURIJA.....	35
1.9.1 Osnovna mikrobiološka analiza urina (urinokultura).....	35
1.10 PREPREČEVANJE OKUŽB SEČIL	37
1.11 ZDRAVLJENJE OKUŽB SEČIL	38
2 NAMEN DELA	39
3 MATERIALI IN METODE	40
3.1 VZORCI URINA	40
3.2 ODVZEM VZORCA URINA	40
3.3 ŠTETJE URINSKIH SEDIMENTOV POD MIKROSKOPOM.....	41
3.3.1 Oprema	41
3.3.2 Postopek	41
3.4 ŠTETJE URINSKIH SEDIMENTOV Z ANALIZATORJEM SYSMEX UF-1000i.....	43
3.4.1 Oprema	43
3.5.2 Reagenti in kontrole	44
3.4.3 Princip delovanja.....	44
3.4.4 Osnovni postopek testa.....	45
3.4.4.1 Pretočna citometrija v analizatorju Sysmex UF- 1000i.....	46
3.4.4.2 Optični sistem analizatorja Sysmex UF-1000i	47
3.4.4.3 Hidravlični sistem za pretok nosilne tekočine.....	48
3.4.4.4 Elektronski sistem	48
3.4.4.5 Analiza vrste urinskih celic in zaznava signalov.....	49
3.5 STATISTIČNA PRIMERJAVA REZULTATOV	50
4 REZULATATI IN IZRAČUNI	51
4.1 IZRAČUNI	54
5 RAZPRAVA.....	60
6 SKLEP	63
7 LITERATURA	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz nefrona.	12
Slika 2: Testni trakovi.	18
Slika 3: Primer testnega traka Combur ¹⁰ Test® M za kvalitativno določanje parametrov urina.	19
Slika 4: Različne stopnje zamotnitve urina z 20% SSA.	23
Slika 5 : Levkociti v urinu.	27
Slika 6: Primer cilindra.	28
Slika 7: Kristali kalcijevega oksalata.	29
Slika 8: Gojišča Uricult.	35
Slika 9: Prikaz izvedbe postopka Uricult.	36
Slika 10: Referenčna tabela za določanje števila bakterij v urinu.	36
Slika 12: Analizator Sysmex UF- 1000i.	43
Slika 13: Prikaz in interpretacija rezultatov, ki jih podaja analizator UF-1000i.	46
Slika 14: Shematski prikaz pretočne celice analizatorja Sysmex UF-1000i.	47
Slika 15: Shematski prikaz optičnih diod z laserskimi žarki v pretočnem citometru.	48
Slika 16: Shematski prikaz enojnega pretoka celic.	49

KAZALO TABEL

Tabela 1: Osnovna analiza urina.	16
Tabela 2: Navodila za pravilen odvzem vzorca urina pri moških in ženskih preiskovancih.	40
Tabela 3: Način podajanja rezultatov ugotavljanja posameznih sestavin urinskega sedimenta.	42
Tabela 4: Rezultati določanja števila bakterij v urinu pod svetlobnim mikroskopom in z analizatorjem.	51
Tabela 5: Števila bakterij ugotovljena z analizatorjem, urejena v kategorije določene s pregledom pod svetlobnim mikroskopom.	53
Tabela 6: Povprečne vrednosti in standardni odkloni po kategorijah vseh prešteti bakterij.	55

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Grafični prikaz razpona števila znotraj kategorije »MALO«	56
Graf 2: Grafični prikaz razponov števila bakterij znotraj kategorije »ŠTEVILNE«. Z rdečimi točkami so označene meritve, ki so izven izračunanega intervala.	57
Graf 3: Grafični prikaz razponov števila bakterij v kategoriji »ZELO ŠTEVILNE«. Z rdečimi točkami so označene meritve, ki so izven izračunanega intervala.	58
Graf 4: Grafični prikaz prešteti bakterij v izbranih vzorcih, znotraj vseh kategorij.	59

POVZETEK

Okužbe sečil so med najpogostejšimi okužbami pri ljudeh. Najpogostejši povzročitelji so bakterije (*E. coli*), redkeje glive (*Candida* spp.), virusi (virus Herpes simplex) ali paraziti (*Trichomonas vaginalis*). Okužba sečil pomeni vdor mikroorganizmov v sečila, kjer se v sečniku, prostati, votlem sistemu ali ledvičnem parenhimu razmnožujejo in povzročijo vnetje. Glede na mesto nastanka delimo okužbe sečil na okužbe spodnjih sečil (prostatitis, uretritis in cistitis) in zgornjih sečil (pielonefritis). Pogostost okužb sečil se razlikuje pri moških in ženskah različne starosti. V odrasli dobi najpogostejše zbole vajo ženske, po 55. letu starosti pa zaradi hipertrofije prostate tudi moški. Pogostost okužb sečil nato s starostjo pri obeh spolih narašča. Pri nekaterih skupinah je tveganje za okužbe sečil večje; med njimi so bolniki z anatomskimi ali funkcijskimi motnjami delovanja sečil, nosečnice, bolniki po presaditvi ledvice in spolno aktivni homoseksualni moški.

V diplomski nalogi smo primerjali štetje bakterij v urinskem sedimentu pod mikroskopom in z avtomatiziranim analizatorjem.

Uporabili smo 70 vzorcev urinskega sedimenta, v katerih smo šteli bakterije. Vzorce smo analizirali z avtomatizirano metodo na analizatorju UF-1000i in z ročno metodo štetja bakterij v urinskem sedimentu pod mikroskopom. Rezultate smo med seboj primerjali in jih statistično ovrednotili.

Ugotovili smo, da sta metodi dobro primerljivi, saj v primeru rezultatov v nizkem koncentracijskem območju (kvalitativno »malo«) dobimo 100 % ujemanje, v primeru srednjih koncentracij (kvalitativno »številne«) 89,3 % ujemanje in v primeru visokih koncentracij (kvalitativno »zelo številne«) 60 % ujemanje.

Ugotovili smo tudi, da je klasična metoda, to je štetje bakterij v urinskem sedimentu pod mikroskopom zamudna, ker ni avtomatizirana, ter da za njeno izvedbo potrebujemo dodatno opremo in subjektivnega opazovalca. To je tudi vzrok za veliko sipanje rezultatov med posameznimi štetji, zato se v laboratorijih vse bolj pojavljajo analizatorji, ki bakterije štejejo avtomatsko. Pri štetju bakterij v urinskem sedimentu z analizatorjem je zaradi avtomatizacije manjša možnost napak in tudi čas analize je krajši.

Z diplomsko nalogo smo ugotovili, da je avtomatizirana metoda pri večjem številu vzorcev primernejša kot klasična metoda štetja bakterij.

ABSTRACT

Urinary tract infections are among the most common infections in humans. The most common are pathogenic bacteria, rarely fungi (*Candida* spp.), Viruses (herpes simplex virus) or parasites (*Trichomonas vaginalis*). Urinary tract infection begins with the penetration of microorganisms in the urinary system, where in the bladder, prostate, hollow system, renal parenchyma, where they multiply and cause inflammation. Depending on where the urinary tract infections are divided on the lower urinary tract infection (prostatitis, urethritis and cystitis) and upper urinary tract infection (pyelonephritis). The frequency of urinary tract infections is different in men and women of varying ages. In adulthood, mostly women fall ill, while men begin to experience the infection after age of 55 due to prostatic hypertrophy. The frequency of urinary tract infections, then increases with age in both sexes. For some groups, the risk of urinary tract infections increases, especially in patients with anatomical or functional abnormalities of the urinary tract, pregnant women, renal transplant patients and sexually active homosexual men. In this thesis, we compared the counting methods of bacteria in the urinary sediment under a microscope and with a use of an automated analyzer.

We used 70 samples of urine sediment in which bacteria were counted. Samples were analyzed with an automated method by using the analyzer UF-1000 and with the manual counting method under a microscope. The results were compared and statistically evaluated.

We found that the methods are comparable, as the results within a low concentration range (qualitatively "small") were 100 % matched, in the mean concentration range (qualitative "number") 89.3 % matched and in case of high concentrations (qualitatively "very many") 60 % matched.

We have also established that the classical microscopy method, is time consuming and needs additional equipment and a subjective observer. This is also a reason for large scattering of results between individual counts, so most of the laboratory are increasingly introducing automated analyzers for bacterial counting. The automated method of counting bacteria in urine sediment generates less errors and shortens analysis time. We conclude

that the automated method of counting bacteria is now suitable for large numbers of samples than the classic one.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADH – antidiuretični hormon

BACT (Bacteria) - bakterije

CAST – cilindri

CFU /mL (Colony-forming unit /mL) – enote, ki tvorijo kolonijo bakterij /mL vzorca

EC – epitelijske celice

EE – Erlichove enote

Erci – eritrociti

FCM (Flow Cytometry) – pretočna citometrija

GOD – encim glukozna oksidaza

IPU – informacijska procesna enota

LIS – laboratorijski informacijski sistem

Lkci - levkociti

OGTT – obremenilni glukozni tolerančni test

POD – encim peroksidaza

RBC (Red Blood Cells) – rdeče krvne celice

SSK – sulfosalicilna kislina

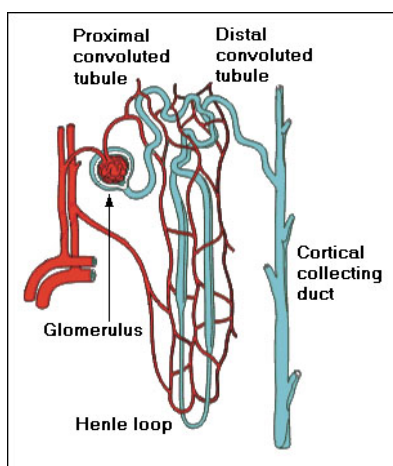
WBC (White Blood Cells) – bele krvne celice

1 UVOD

Urin je biološka snov in zelo zanesljiv pokazatelj presnovnih procesov ter vodnega, elektrolitskega in kislinsko-bazičnega ravnotežja v organizmu. Že najmanjše zgodnje motnje v delovanju ledvic in sečnih poti se kažejo v spremenjenem videzu, kemični sestavi in mikrobiološki vsebnosti urina. Osnovna urinska analiza ima pomembno vlogo pri odkrivanju motenj v delovanju ledvic in sečnih poti. Za zanesljivo urinsko analizo je bistvenega pomena pravilen odvzem ter neokrnjenost in visoka kakovost vzorca. Odvzem, zbiranje, hranjenje, stabiliziranje in transport urina pa so najpomembnejši elementi predanalitične stopnje.

1.1 NASTANEK URINA

Ledvica so parni organ fižolaste oblike. Leva in desna ledvica ležita tik ob hrbtenici, pod trebušno prepono. Funkcionalna enota ledvice je nefron. Sestavljen je iz glomerula, proksimalnega tubula, Henlejeve zanke, distalnega tubula ter zbirnega voda. Glomerul je sestavljen iz glomerulnih kapilar in Bowmanove kapsule, nahaja pa se na začetku proksimalnega zvitega tubula. Proksimalni tubul je za presnovo najdejavnejši del nefrona in prehaja v Henlejevo zanko. Tu se urin predvsem koncentrira (reabsorbirajo se Na^+ , K^+ in Cl^- , brez vode). Sledi distalni tubul, ki povezuje Henlejevo zanko z zbirnim vodom. Tu poteka predvsem izločanje in manj reabsorpcija. V distalnem delu tubula se uravnava tudi kislinsko-bazično ravnotežje, in sicer z izločanjem H^+ in reabsorpcijo Na^+ in HCO_3^- , poleg tega pa poteka tudi reabsorpcija vode pod vplivom antidiuretičnega hormona (ADH), ki deluje v distalnih tubulih in zbirnih vodih.



Slika 1: Shematski prikaz nefrona.

Najpomembnejše naloge ledvic:

- izločajo odpadne snovi presnove (končne produkte presnove beljakovin, sečnina, kreatinin...) in telesu tuje snovi (zdravila, strupe...),
- uravnavajo koncentracijo snovi v telesnih tekočinah (vodo in elektrolite),
- vzdržujejo kislinsko-bazično ravnotežje,
- izvajajo endokrino funkcijo (tvorba renina, eritropoetina, vitamina D, prostaglandinov).

Pri nastajanju urina sodelujejo trije dejavniki. Najprej v glomerulu poteka glomerulna filtracija, to je ultrafiltracija krvne plazme. Sestava ultrafiltrata je enaka sestavi krvne plazme, le da ultrafiltrat vsebuje samo nekaj proteinov nižje molekulske mase. Dnevno ga nastane približno 180 litrov. V proksimalnem delu tubula se reabsorbira ultrafiltrat, voda ter za organizem nujno potrebne snovi (Na^+ , K^+ , Cl^- , večina glukoze, aminokisline, Ca^{2+} , bikarbonat, fosfati in sulfati). Skozi distalni tubul pa se snovi (sečnina, K^+ in H^+ , kreatinin, sečna kislina, itd.) bolj izločajo v seč in manj reabsorbirajo. Tubulna sekrecija predstavlja izločanje različnih stranskih in končnih produktov presnove in mnogih organskih spojin, ki se zaradi vezave na plazemske proteine ne morejo filtrirati v glomerulu. Tako nastane urin, ki ga dnevno izločimo približno 1,5 L.

1.2 VRSTE URINSKIH VZORCEV

Urinske vzorce ločimo glede na čas in način odvzema ali zbiranja. Čas in postopek morata biti točno določena in napisana tako na napotnici kot tudi na izvidu laboratorijskih preiskav.

Vzorčenje glede na čas odvzema

1.2.1 Prvi jutranji urin

Vzame se takoj po prespani noči. Urin je bil v mehurju približno 8 ur, zato je tak vzorec primeren za analizo snovi, za katere sta potrebni določena koncentracija in inkubacija, ki omogočata njihovo zaznavo (npr. nitriti in proteini). Vzorec je primeren tudi za odkrivanje ortostatske proteinurije. Formirani elementi, npr. levkociti, eritrociti in cilindri so v takih koncentriranih vzorcih bolj obstojni. Niso pa primerni za citološke analize zaradi

sprememb epitelnih celic (predolgo so v mehurju, vpliv kristalizacije soli na celice pri ohladitvi na sobno temperaturo). Prvi jutranji urin je najprimernejši za bolnišnične preiskovance. Pri ambulantnih preiskovancih pa mora biti zagotovljeno predvsem njihovo sodelovanje in hitra dostava vzorca v laboratorij. Če vzorec ne dostavimo v laboratorij v 4 urah, ga moramo ustrezno konzervirati.

1.2.2 Drugi jutranji urin

Zbiramo ga 2 do 4 ure po prvem jutranjem urinu. Največkrat ga uporabljamo pri ambulantnih preiskovancih, primeren pa je za večino rutinskih analiz. Do odvzema vzorca lahko preiskovanec popije samo 1 kozarec vode (200 mL), in sicer po 22. uri prejšnjega večera. Če preiskovanec ne upošteva uveljavljenih navodil, lahko drugi jutranji urin velja le kot naključni vzorec.

1.2.3 Naključni vzorec

To je vzorec urina zbran v kateremkoli času, brez predhodne priprave preiskovanca. Je najbolj uporabljan za rutinske presejalne teste. Zaradi preveč zaužite tekočine ali prevelikega telesnega napora, pa tak vzorec ne odraža pravega stanja organizma.

1.2.4 Časovni vzorec (urin, zbran v določenem času)

Običajno ga uporabljamo za primerjavo koncentracij analita v urinu in v krvi. Primerjava serije urinskih in krvnih vzorcev, zbranih v določenih časovnih presledkih in testiranje glede na vsebnost določenega analita, lahko pomaga pri proučevanju ledvičnih mejnih vrednosti in diagnozi bolezni. Primer takega zbiranja je obremenilni glukozni tolerančni test (OGTT). Uporabljamo tudi vzorce, odvzete ob določeni uri, npr. med 14. in 16. uro za določanje urobilinogena (v tem času se ga izloči največ), ali pa 2-urni postprandialni vzorec za določanje glukoze oz. glukozurije po kateremkoli obroku.

Zaradi vpliva biološkega ritma, telesnega napora, hidracije in presnove na hitrost izločanja snovi, moramo zbrati vzorce urina v določenem časovnem obdobju. Največkrat gre za 12- in 24-urna obdobja in za zbirne vzorce, ki omogočajo primerjavo izločanja določenega analita več dni zapored. Pri vseh teh vzorcih je torej pomembno časovno določeno in dokumentirano zbiranje urina ter ravnanje po navodilih. Pomembno je dobro

sodelovanje s preiskovancem ter razumljiva ustna in pisna navodila v obliki standardiziranega postopka za zbiranje.

Vzorčenje glede na način odvzema:

- Srednji curek urina – čisti zajem urina: uporablja se pri vsakdanjem laboratorijskem odvzemu; prvi curek urina je vedno kontaminiran z normalno bakterijsko floro končnih delov sečnice pri obeh spolih ali nožnice pri ženskah (z vaginalno floro), zato je srednji curek urina najustreznejši vzorec za mikrobiološke preiskave (kulture bakterij).
- Prvi curek urina: je najprimernejši vzorec za zaznavanje in določevanje bakterije *Chlamydia trachomatis* s tehniko PCR.
- Pediatrični vzorci: jemljejo jih otrokom s posebnimi tehnikami, običajno v zdravstvenih ustanovah.
- Vzorčenje s kateterizacijo in suprapubično aspiracijo: je invaziven odvzem.

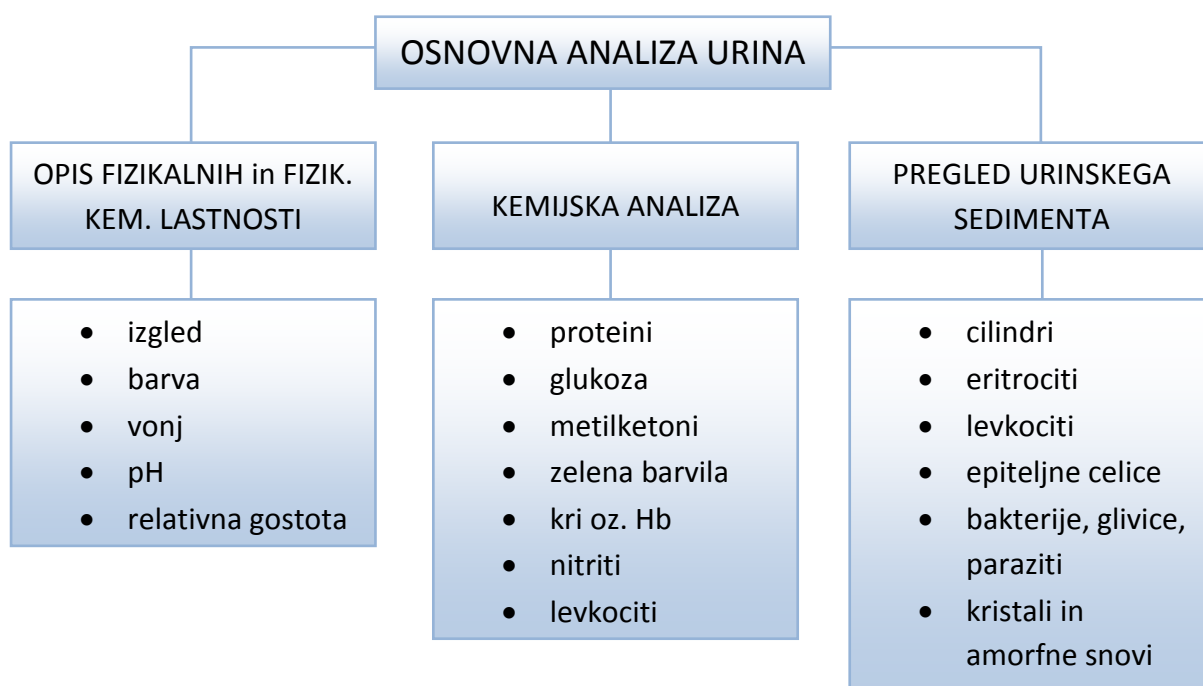
Vzorčenje se izvaja v primarne (zbirne), sekundarne (epruvete) in sterilne zbiralnike za bakteriološki odvzem. Urin prelijemo iz primarnega v sekundarni zbiralnik (polnjenje epruvet), tako da vzorec ne izteka. Vsi zbiralniki morajo biti že pred zbiranjem urina ali pa takoj po tem opremljeni z nalepkami, odpornimi proti hlajenju in vlagi. Označba mora biti na takem mestu, da je zagotovljen jasen pregled vzorca. Oznako nanese na zbiralnik, nikoli ne sme biti samo na pokrovu, saj po odstranitvi le-tega tak vzorec velja za neoznačenega. Označba lahko vsebuje tudi črtno kodo in kodo za zahtevane analize (1).

1.3 OSNOVNA ANALIZA URINA – kvalitativna urinska analiza

Urin je tekočina s katero se iz organizma izločajo odpadni produkti metabolizma ter telesu škodljive snovi. Urin analiziramo za diagnosticiranje raznih ledvičnih bolezni, bolezni hepatobilarnega trakta in sladkorne bolezni. Prav tako z urinsko analizo spremljamo potek in učinkovitost terapije teh bolezni.

Epruvete z urinom za osnovno kvalitativno urinsko analizo hranimo pri sobni temperaturi ali ustrezno ohlajene (+4 do +8 °C), analiza pa mora biti opravljena v 4 urah od odvzema. Stabilizatorjev ne dodajamo, ker lahko vplivajo predvsem na encimske reakcije testnega traku (2).

Tabela 1: Osnovna analiza urina.



1.3.1 Organoleptični pregled urina

Barva urina je običajno jantarno-rumena, intenzivnost je odvisna od gostote, glavni pigment pa je urohrom, ki je končni razgradni produkt hema. Barve, vonja in bistrosti ne opisujemo, nas pa te lastnosti lahko opozarjajo na nekatera bolezenska stanja. Na barvo vplivajo prehrana, nekatera zdravila in patološka stanja. Rdečkast urin nakazuje na vsebnost eritrocitov in pigmenta hema. Če tak urin centrifugiramo in dobimo rdečkast supernatant, potem ta vsebuje hemoglobin (hemoglobinurija) ali mioglobin. Urin je običajno bister. Lahko pa postane moten zaradi obarjanja amorfnih kristalov ali sluzi,

zaradi povečanja števila bakterij v nepravilno hranjenem vzorcu ali zaradi prevelikega časovnega razmika med odvzemom vzorca in analizo. Motnost povzročajo tudi levkociti, eritrociti in različni paraziti. Za urin je značilen vonj po goveji juhi. Če dalj časa stoji pri sobni temperaturi, nastaja iz sečnine zaradi bakterijske pretvorbe amonijak z značilnim močnim vonjem. Tak urin ni več uporaben za analizo. Kadar pa ima že svež urin vonj po amonijaku, gre pri bolniku verjetno za bakterijsko okužbo sečil. Pri sladkornih bolnikih ima urin značilen sladkobni vonj.

1.3.2 Fizikalni pregled urina

Med fizikalne preiskave urina spada določanje koncentriranosti urina z merjenjem relativne gostote, osmolalnosti in koncentracije kreatinina.

Relativna gostota urina je razmerje med njegovo gostoto (teža volumske enote) in gostoto demineralizirane vode pri določeni temperaturi. Odvisna je od števila, gostote in teže raztopljenih delcev (molekul in ionov) v urinu. Gre za relativno razmerje dveh tež, ki zelo variira (1,003 – 1,040). Relativna gostota vpliva na rezultate vseh drugih analiz. Izmerimo jo z refraktometrijo in ustreznim reagentnim trakom. Reagentni trak vsebuje indikator bromtimol modro in polielektrolit v alkalnem pH (ionski izmenjevalec in indikator). V urinu prisotni kationi sprostijo iz polielektrolita protone, ti pa znižajo pH in spremenijo barvo indikatorja. Zanesljivo je merjenje pri pH do 6,5. Določanje z refraktometrom temelji na merjenju loma svetlobe na meji urina z zrakom. Za analizo zadostuje že ena kapljica vzorca. Pri refraktometričnem odčitavanju je popravek avtomatski. Neelektrolitske sestavine, kot so glukoza in kontrastna sredstva ne vplivajo. Lažno zvišane vrednosti pa dobimo pri proteinurijah ($\geq 1\text{ g/L}$).

1.3.3 Kvalitativna kemijska analiza urina – suha kemija

Kvalitativna urinska kemijska analiza temelji na kemiji trdnih nosilcev - testnih trakov. To so plastični trakovi, na katerih so kemijsko reaktivna polja oziroma reagenti v suhi obliki. Na vsakem od teh polj lahko določimo en analit. Ob stiku z urinom se reagenti raztopijo. Med analitom vzorca in raztopljenimi reagenti poteče kemijska reakcija, pri kateri pride do obarvanja. Spremembo barve ali intenziteto obarvanja ocenimo s prostim očesom ali pa izmerimo instrumentalno s pomočjo refraktometrične zaznave.

Dandanes so v uporabi testni trakovi za rutinsko določanje več sestavin hkrati (multitest), npr: levkocitov, nitritov, eritrocitov, proteinov (albuminov), glukoze, ketonov, pH, relativne gostote, bilirubina, urobilinogena in askorbinske kisline.

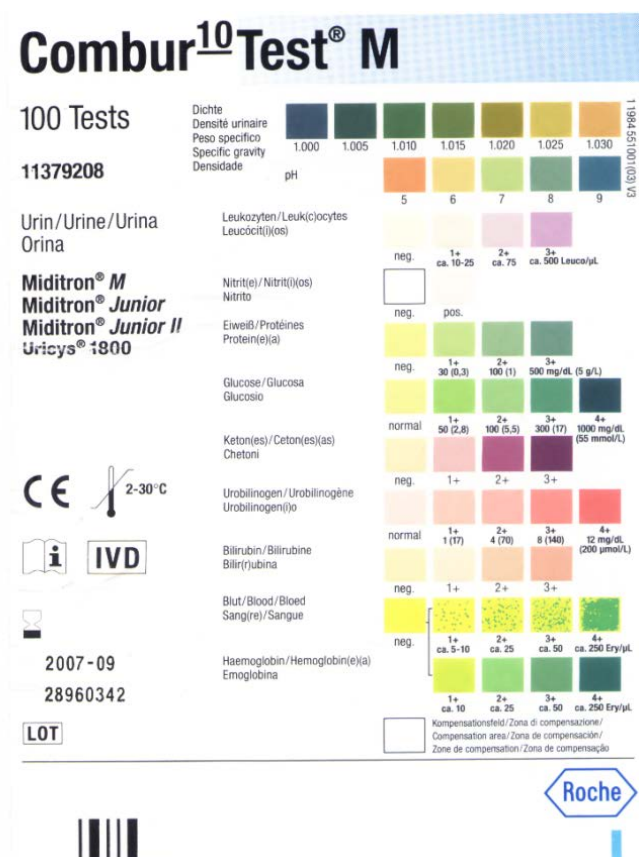


Slika 2: Testni trakovi.

Pri delu s testnimi trakovi moramo dosledno upoštevati navodila proizvajalca, splošni postopek pa je naslednji:

- testni trak potopimo za približno 1 sekundo v svež, dobro premešan urin;
- odvečni urin odstranimo tako, da testni trak potegnemo po robu posode;
- po določenem času s prostim očesom primerjamo barvo testnih polj z barvami v priloženi tabeli ali pa
- izmerimo refraktometrične sestavine urina z analizatorjem,
- rezultate izrazimo v dogovorjenih enotah, običajno kot 0 (-), 1 (+), 2 (+), 3 (+) ali 4 (+), kot zelo izraženo pozitivno vrednost (izjeme so vrednosti pH, relativna gostota in urobilinogen izražena v Ehrlichovih enotah - 1mg v 100 mL).

Testni trakovi morajo biti zaščiteni pred vlago, neposredno svetlobo in toploto. Hranimo jih v zaprti, temni posodi, vendar ne v hladilniku. Posamezen trak vzamemo iz embalaže vedno tik pred uporabo.



Slika 3: Primer testnega traka Combur¹⁰ Test® M za kvalitativno določanje parametrov urina: relativne gostote, pH, levkocitov, nitritov, proteinov, glukoze, ketonov, urobilinogena, bilirubina, eritrocitov in hemoglobina.

1.3.3.1 Levkociti v urinu

Esterazni test: levkociti v urinu so posledica okužbe urinarnega trakta ali pa ledvične bolezni brez infekcije. Zaznava levkocitov temelji na indoksilesterazni aktivnosti nevtrofilnih granulocitov in makrofagov, ki se sprosti iz liziranih celic na testni coni. Esterazni test ne zazna limfocitov.

Ref. vrednosti: 0 (negativno)

Podajanje rezultatov:

- negativno
- 1+ (približno 10-25 Lci / μ L)
- 2+ (približno 75 Lci / μ L)
- 3+ (približno 500 Lci / μ L)

Določanje levkocitov s testnim trakom

Na reagenčnem traku sta ester in diazonijeva sol. Levkociti razpadejo, sprosti se esteraza, ki hidrolizira ester. Pri tem se sprošča aromatični alkohol, ki reagira s diazonijevo soljo in tvori značilno barvo. Lažno pozitivne rezultate lahko povzročijo oksidirajoči detergenti (hipoklorit), formaldehid, natrijev azid in obarvani urin (bilirubin), lažno negativne pa visoka relativna gostota urina, zvišana koncentracija glukoze, beljakovin in vitamina C, nekatera zdravila (antibiotiki) ter zakasnela analiza (3).

1.3.3.2 Nitriti (bakterije)

Preiskava temelji na aktivnosti nitratnereduktaze, ki je prisotna v večini patogenih gramnegativnih bakterijah (npr. *E. coli*) in na pretvorbi nitrata (normalne sestavine urina) v nitrit. S to metodo pa ne moremo dokazati okužb urogenitalnega trakta s tistimi patogenimi bakterijami kot sta npr. *Enterococcus* spp. in *Staphylococcus* spp., ki ne vsebujejo omenjenega encima. Pozitivno reakcijo na nitrite lahko zaznamo le ob zadostnem vnosu nitratov s hrano (z zelenjavo), po najmanj 4-urnem zadrževanju urina v mehurju ter z izključeno antibakterijsko terapijo, vsaj 3 dni pred testiranjem.

Ref. vrednosti: negativno

Podajanje rezultatov:

- negativno
- pozitivno.

Določanje nitritov s testnim trakom

Metoda temelji na reakciji diazo. V kislem mediju nitrit reagira z aromatičnim aminom v diazonijevo sol, katera se nato veže z drugim aminom v različna azobarvila. Lažno pozitivni rezultati utegnejo nastati z vzorci urina, ki vsebujejo razne obarvane spojine in v katerih rastejo bakterije in vitro (onesnaženje). Lažno negativni rezultati pa lahko nastanejo zaradi uživanja hrane brez zelenjave, kratkotrajne inkubacije urina v mehurju, zvišane

koncentracije askorbinske kisline v urinu, ki reducira diazonijeve soli ali zaradi vsebnosti grampozitivnih bakterij.

1.3.3.3 Eritrociti

Vsebnost eritrocitov, hemoglobina ali mioglobina dokazujemo s pomočjo psevdoperoksidazne aktivnosti hema. Hemoglobin se lahko nahaja v eritrocitih (hematurija) ali pa izven celic v raztopljeni obliki (hemaglobinurija). Eritrociti v urinu so pokazatelj pre-ledvičnih, ledvičnih in po-ledvičnih bolezni, pojavijo pa se tudi pri telesnem naporu in menstruaciji. Mioglobin je značilen za preiskovance z mišično nekrozo, rabdomiolizo (zloraba drog, nevroleptični maligni sindrom) ali s polimiozitisom. Hemoglobin brez prisotnosti eritrocitov pa je običajno prisoten pri hemolitičnih stanjih preiskovancev s pre-ledvično, ledvično in po-ledvično hematurijo in razpadom celic in vivo ali in vitro. Urin, ki vsebuje eritrocite je moten in rdeče-rjavo obarvan. Po centrifugiranju se zbistri, v sedimentu najdemo eritrocite, supernatant pa ni več rdeče-rjav. Urin, ki vsebuje hemoglobin, je bister in rdeče-rjav. Po centrifugiranju ni sedimentiranih eritrocitov, supernatant pa ostaja rdeče-rjav.

Ref. vrednosti: 0 (negativno)

Podajanje rezultatov:

- normalno
- 1+ (5-10 Erc / μ L)
- 2+ (približno 25 Erc / μ L)
- 3+ (približno 50 Erc / μ L)
- 4+ (približno 250 Erc / μ L)

Določanje krvi (eritrocitov, hemoglobina) s testnim trakom

Eritrocite in hemoglobin določamo s psevdoperoksidazno aktivnostjo hema, ki v prisotnosti peroksida oksidira različne kromogene (polifenole in aromatske amine). Če so v urinu prisotni hemoglobin, mioglobin ali hemolizirani eritrociti, se na reagenčnem traku pojavi enakomerno zeleno obarvanje, v kolikor pa so prisotni nepoškodovani eritrociti, se na testnem področju pojavijo le zelene pike. Test je veliko občutljivejši za prosti hemoglobin kot za eritrocite. Lažno pozitivne rezultate lahko povzročajo nekateri oksidirajoči detergenti (hipoklorit), bakterijske peroksidaze pri infekcijah sečil ter menstrualna kri.

Vzroki za lažno negativne rezultate pa so zvišani nitriti, zvišana gostota urina, formaldehid in zakasnela analiza.

1.3.3.4 Proteini (albumini)

Skupni proteini v urinu so zmes beljakovin z visoko (albumin, transferin, imunoglobulin,...) in nizko molekularno težo, običajno filtratov iz plazme (α_1 -mikroglobulin, lahke verige imunoglobulinov...), beljakovin iz ledvic (Tamm-Horsfallova beljakovina) in iz urinskega trakta. Seč zdravega človeka vsebuje do 0,25 g beljakovin dnevno, proteinurijo oziroma zvišano količino proteinov v urinu pa označujemo kot blago (0,250 do 1 g), zmerno (1 do 3 g) ali nefrotsko, če je v 24-urnem urinu več kot 3 g beljakovin ali 3,5 g /1,73 m² telesne površine. Klasični test za klinično proteinurijo je občutljiv predvsem za albumine v koncentraciji 0,2 g /L. Manj občutljiv je za mukoproteine in beljakovine z nizko molekularno težo ter neobčutljiv za monoklonske imunoglobuline oz. njihove lahke verige (Bence-Jonesove beljakovine). Zato še dandanes določamo proteinurijo z obarjanjem beljakovin s sulfosalicilno kislino (SSK).

Poznamo različne vrste proteinurij:

- renalne so posledica bolezni ledvic (nefritisa, nefroskleroze, nefroze, tuberkuloze ledvic);
- prerrenalne so posledica bolezni srca, krvnega obtoka in povišanega krvnega tlaka;
- postrenalne pa nastanejo zaradi vnetja mehurja, sečil, prostate ter bolezni urogenitalnega trakta;

Vsebnost monoklonskih imunoglobulinov oz. njihovih lahkih verig je posledica napak v sintezi imunoglobulinov.

Katerokoli proteinurijo vedno vrednotimo hkrati s pregledom urinskega sedimenta.

Ref. vrednost: 0 (negativno)

Podajanje rezultatov:

- negativno
- sled (trace, približno 0,15 g /L)
- 1+ (približno 0,3 g /L)
- 2+ (približno 1,0 g /L)
- 3+ (približno 5,0 g /L)

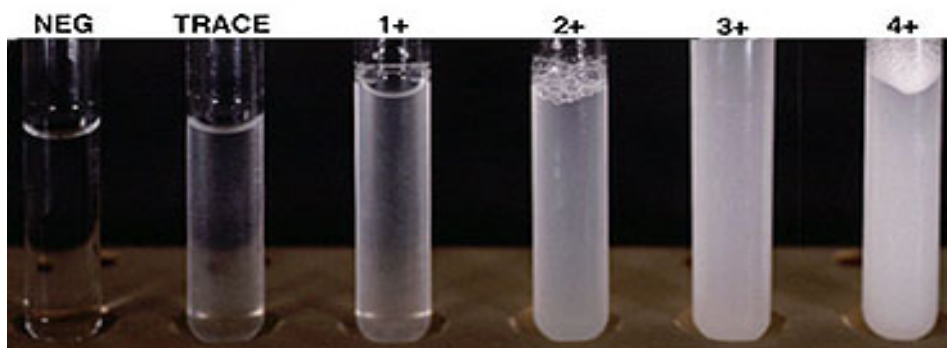
Določanje beljakovin v urinu s testnim trakom

Takšen trak vsebuje na določenem mestu pH- indikator, vgrajen v pufer s pH vrednostjo 3. V stiku z urinom, ki vsebuje proteine, se indikator veže na njihove NH_3^+ - skupine. S tem molekula indikatorja, pri stalnem pH-ju pufru, spremeni ionsko obliko in barvo. Intenziteta barve indikatorja je sorazmerna koncentraciji proteinov. Testni trak je občutljivejši za albumine, kot za ostale vrste proteinov, zato negativni rezultati ne izključujejo vsebnosti proteinov. V takšnih primerih vedno preverjamo morebitno lažno negativni rezultat s pomočjo sulfosalicilne kisline (SSA) (2).

Določanje beljakovin v urinu z 20 % sulfosalicilno kislino

Ta postopek je eden najobčutljivejših za določanje proteinurije. Uporabljamo ga v rutinski analizi urina, saj je v primerjavi s testnim trakom občutljiv za vse proteine, poleg tega pa z njim lahko zaznamo že koncentracijo 0,1 g /L proteinov v krvi.

Princip metode: sulfosalicilna kislina cepi vezi med molekulami proteinov in vode, nato pa se sama veže na proteine. Aglomerati protein - sulfosalicilna kislina se med seboj povežejo v še večje aglomerate, ki niso vodotopni, zato nastane zamotnitev urina, ki je približno sorazmerna koncentraciji proteinov v vzorcu.



Slika 4: Različne stopnje zamotnitve urina z 20 % SSA.

1.3.3.5 Relativna gostota

Vse rezultate urinskih analiz bi morali primerjati s stopnjo hidriranosti preiskovanca oz. koncentriranosti urina. Test nam omogoča le grobo oceno tega stanja, zato je priporočljivo, da pri preiskovancih v intenzivni negi in s parenteralno prehrano izmerimo tudi osmolalnost.

Ref. vrednost: 1,005 – 1,040

1.3.3.6 Glukoza

Glukoza se do določene meje (do ledvičnega praga) iz primarnega urina reabsorbira v tubulih. Če se v plazmi koncentracija glukoze poveča nad 10 mmol /L, je ledvični tubuli ne zmorejo več reabsorbirati, zato presežek sladkorja preide v končni urin. Pojav glukoze v urinu imenujemo glukozurija.

Nastane iz naslednjih vzrokov:

- zaradi povišane koncentracije glukoze v krvi (diabetes mellitus),
- zaradi znižanega ledvičnega praga (renalna glukozurija),
- zaradi prekomernega uživanja glukoze (alimentarna glukozurija).

Določanje glukoze v urinu je presejalni test za odkrivanje sladkorne bolezni ali redkega Fanconijevega sindroma, tubulne motnje v reabsorpciji glukoze.

Dokazovanje glukoze v urinu s testnim trakom

Test temelji na dveh encimskih reakcijah:

- $\text{glukoza} + \text{O}_2 \rightarrow \text{glukonska kislina} + \text{H}_2\text{O}_2$

Najprej encim glukoznaoksidaza katalizira oksidacijo glukoze; pri čemer nastaneta glukonska kislina in vodikov peroksid.

- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{reduciran kromogen} \rightarrow \text{oksidiran kromogen} + \text{H}_2\text{O}$

Nato encim peroksidaza katalizira oksidacijo kromogena z vodikovim peroksidom. Oksidirana oblika kromogena (kalijev jodid) je obarvana.

Ref. vrednosti: do 0,8 mmol /L

Podajanje rezultatov:

- normalno
- 1+ (približno 2,8 mmol /L)
- 2+ (približno 5,5 mmol /L)
- 3+ (približno 17 mmol /L)
- 4+ (približno 55 mmol /L)

S tem testom ne zaznamo drugih vrst sladkorjev, torej galaktoze, fruktoze, laktoze in pentoze. Lažno negativne rezultate lahko povzročajo zvišane koncentracije askorbinske

kislina, številna zdravila in vnetja sečil, lažno pozitivne pa peroksidi in oksidirajoči detergenti, prisotni na steklovinu.

1.3.3.7 Ketonska telesa

Mednje spadajo aceton, acetoacetat in β -hidroksibutirat. Ketoni so normalni presnovni produkti maščob. Ko telesna presnova ni sposobna uporabiti ogljikove hidrate kot vir energije (pomanjkanja insulina ali premalo hrane), jih nadomesti tako, da razkroji maščobe. Ketonurija, torej pojav ketonskih spojin v urinu, je tako posledica sladkorne bolezni, stradanja, prekomernega bruhanja, nosečnosti ali večjih telesnih naporov.

Ref. vrednost: 0 (negativno)

Podajanje rezultatov: negativno, 1+, 2+, 3+.

Določanje ketonov v urinu s testnim trakom

Analiza temelji na dokazovanju ketonov po Legalu, z natrijevim nitroprusidom v alkalnem mediju, ki tvori z acetacetatom obarvan kompleks. Test je specifičen za acetacetat, ne zazna pa β -hidroksibutirata. Lažno pozitivne rezultate povzročajo različni pigmenti, zdravila ali spojine, ki pretirano obarvajo urin. Lažno negativne rezultate pa zasledimo pri neprimerno hranjenem (starem) urinu, v katerem se acetoacetat pretvori v hlapni aceton (2).

1.3.3.8 Koncentracija vodikovih ionov (pH)

Odvisna je od sistemskega kislinsko-baznega ravnotežja in se spreminja v območje od 5 do 9. Pri zdravih ljudeh je jutranji, koncentrirani urin običajno kisel, s pH od 5 do 6, seč otrok pa je pogosto alkalen. Prisotnost bakterij, ki vsebujejo ureazo (razgradnjo sečnine v amonijak) lahko zviša vrednost pH. Levkociti in cilindri slabše preživijo v razredčenem alkalnem urinu. Določanje pH je nujno potrebno za diagnozo acido-baznih motenj, ko sta kislost oz. alkalnost urina povezani s specifičnimi boleznimi, npr. z renalno tubularno acidozo ali tvorbo ledvičnih kamnov in pri izločanju nekaterih zdravil ali drog.

Ref. vrednost: 4,5 - 8,0

Določanje vrednosti pH s testnim trakom

Testno polje vsebuje dve indikatorski barvili v območju vrednosti pH med 5,0 in 9,0, in sicer metil rdeče in bromtimol modro. Indikatorja v stiku z urinom spremenita molekulsko obliko in s tem tudi barvo.

1.3.3.9 Žolčna barvila v urinu: bilirubin in urobilinogen

Bilirubin nastane z razgradnjo hemoglobina v celicah retikuloendotelijskega sistema in prehaja v kri. V urin se izloča pri poškodbah jeter, pri motenem odtoku žolča ter povečani razgradnji hemoglobina.

Urobilinogen nastaja v tankem črevesju iz bilirubina s pomočjo črevesne flore. Delno se izloča skozi debelo črevo v blato, delno pa se resorbira v kri in se nato preko ledvic izloči v urin.

Žolčna barvila v urinu so posledica jetrne bolezni ali motnje v presnovi hemoglobina. Določanje bilirubina in urobilinogena nima bistvenega kliničnega pomena za diagnostiko jetrnih bolezni, uporabno pa je za razlikovanje zlateničnih bolnikov.

Ref. vrednosti za bilirubin: 0 (negativno)

Podajanje rezultatov za bilirubin: negativno, 1+, 2+, 3+.

Ref. vrednost za urobilinogen: 0 (negativno)

Podajanje rezultatov za urobilinogen:

- normalno
- 1+ (približno 17 $\mu\text{mol/L}$)
- 2+ (približno 70 $\mu\text{mol/L}$)
- 3+ (približno 140 $\mu\text{mol/L}$)
- 4+ (približno 200 $\mu\text{mol/L}$)

1.3.3.10 Askorbinska kislina (vitamin C)

Vitamin C lahko vpliva (interferira) na določanje številnih analitov v urinski analizi. Njegovo določanje je priporočeno za tiste preiskovance, ki uživajo velike količine tega vitamina (> 1g dnevno), saj se s tem lahko izognemo lažno negativnim rezultatom. Še boljša pa je uporaba testnih trakov brez interferenčnih reakcij z vitaminom C (npr. dodatek jodata ali askorbatneoksidaze na občutljiva reagenčna polja).

1.3.4 Mikroskopska analiza urina

Mikroskopski pregled urinske usedline je kvalitativna analiza formiranih (neraztopljenih) in s centrifugiranjem skoncentriranih sestavin urina. Te so eritrociti, levkociti, cilindri, bakterije, glive, paraziti, epitelne celice, soli v kristalni in amorfni obliki, sluz (mukopolisaharidi) in maščobe (lipidi). Analizo moramo opraviti v 2 urah od odvzema urina ali v 8 urah pri vzorcih, ohlajenih na +4 do +6 °C. Pri precipitaciji uratov v kislem ali fosfatov in karbonatov v alkalnem seču, moramo analizirati nov vzorec, ki ga obvezno hranimo pri sobni temperaturi.

Rezultati mikroskopskega pregleda urinskega sedimenta so pomembni:

- za ločevanje mikrohematurije od makrohematurije,
- za grobo opredelitev poškodb tubulov in/ali glomerulov,
- za oceno okužbe zunanjega in notranjega dela sečil,
- za opredelitev vrste okužbe s paraziti (4).

1.3.4.1 Vrednotenje sestavin urinskega sedimenta

Eritrociti (Erci) in levkociti (Lkci): pri 400-kratni mikroskopski povečavi preštajemo celice v 10 vidnih poljih in kot rezultat navedemo spodnjo in zgornjo mejo, npr. 0 – 2 eritrocitov, 2 – 5 levkocitov. Če je v vidnem polju več kot 50 ali 100 celic, to označimo z opombo »številni« ali »zelo številni« eritrociti oziroma levkociti. Če se celice nahajajo v skupinah, to označimo kot število skupin v vidnem polju. Pri eritrocitih opišemo tudi njihov videz (sveži, izluženi, zmanjšani), pri levkocitih pa morebitno razpadlost (detritus) ali vsebovanje maščob (mastna degeneriranost) (3).



Slika 5: Levkociti v urinu.

Cilindri: sestavljeni so iz beljakovinske (Tamm-Horsfallova beljakovina) in hialine osnove, ki jo izločajo uroepitelne celice. So odlitki ledvičnih cevčic (5). Na hialino osnovo se lahko prilepijo različne celice. Ločimo: hialine, granulirane, eritrocitne, levkocitne, epitelne, maščobne, voščene, pigmentne in mešane cilindre. Vsaka vrsta je diagnostično značilna za določena ledvična obolenja. Eritrocitni cilindri so znak za glomerulno bolezen, levkocitni pa za akutni pielonefritis, tubulointersticijske bolezni in glomerulonefritis. Granulirani cilindri z ne prilepljenimi propadajočimi celicami so znak številnih glomerulnih in tubulnih bolezni. Nanje se lahko pritradijo tudi različne snovi (npr. bilirubin) in dobimo pigmentne celice ali cilindre. Maščobni cilindri so značilni za bolnike z nefrotskim sindromom ali proteinurijo, voščeni pa običajno nastanejo pri kroničnih ledvičnih boleznih. V preparatu opišemo vrste prisotnih cilindrov pri večji povečavi in jih preštejemo, in sicer pri manjši povečavi in v celem preparatu. Če je cilindrov zelo veliko, to izrazimo z njihovim povprečnim številom v vidnem polju ali pa navedemo spodnjo in zgornjo mejo.



Slika 6: Primer cilindra.

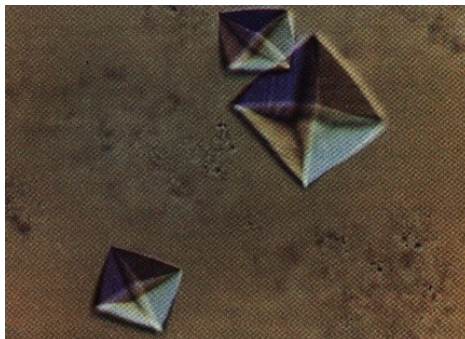
Bakterije, glive, paraziti: diagnostično pomembna je najdba več kot 20 bakterij v vidnem polju, okužbo pa nato potrdimo z urinokulturo. Bakterije opisujemo z oznakami: malo, številne in zelo številne. Pri 400-kratni povečavi prepoznamo in opišemo obliko bakterij (paličaste ali okrogle). Vrste gliv, najpogostejše je to *Candida albicans*, navajamo samo kot glive, pri parazitech pa navedemo tudi ime parazita, npr. *Trichomonas vaginalis*.

Epitelne celice: opisujemo jih le, če jih je v sedimentu veliko, in sicer kot številne in zelo številne. Videza in izvora ne navajamo. Diagnostično pomembne so ledvične tubulne

celice, ki so značilne za akutno tubulno nekrozo, prisotne pa so tudi pri pielonefritisu ali nefrotskem sindromu. Vsebnost ploščatih epitelnih celic je največkrat povezana z onesnaženim vzorcem urina.

Lipidi (maščobe): so prisotni v urinu oz. urinskem sedimentu bolnikov z nefrotskim sindromom ali z raznimi embolijami v obliki prostih maščobnih kapljic ali z maščobo napolnjenih odluščenih tubulnih epitelijskih celic. Njihovo vsebnost v urinu označimo kot: prisotne proste maščobne kapljice.

Kristali: so posledica sečnih ali ledvičnih kamnov, presnovnih motenj ali terapije z nekaterimi zdravili. Pri zdravih ljudeh nimajo diagnostičnega pomena. V sveže izločenem urinu ni kristalov, lahko pa pri sobni temperaturi nekatere soli izkristalizirajo. Opisujemo samo kristale tistih snovi, ki so lahko sestavine sečnih kamnov (sečna kislina, kalcijev oksalat, fosfati, magnezij-amonijev fosfat, kalcijev karbonat, kalcijev sulfat, cistin) ali snovi, ki nastanejo endogeno zaradi nekaterih bolezni (tirozin, levcin, cistin, holesterol, bilirubin). Opišemo tudi prisotnost amorfnih soli.



Slika 7: Kristali kalcijevega oksalata.

1.4 PRISOTNOST BAKTERIJ V URINU

Zdrava sečila so bakteriološko sterilna, izjema je iztočni del sečnice, ki ga normalno naseljujejo različne komenzalne bakterije. Okužba sečil se običajno začne zaradi prisotnosti bakterij iz črevesa ali vagine, ki se naselijo v sečnico. Ascendentno širjenje bakterij v mehur in ledvice preprečuje že normalni pretok in iztok seča, zlasti pa normalno delovanje sečnih zaklopk. Bakterije, ki pridejo v mehur, se ob popolnem praznjenju

mehurja izperejo navzven. Ostanajo le tiste, ki so se zmožne močnejše pritrditi na sluznico. Take bakterije tudi izzovejo vnetje sluznice s spremljajočimi kliničnimi znaki in simptomi (6).

1.5 NORMALNA MIKROBNA FLORA

Normalno mikrobno floro predstavljajo mikroorganizmi, ki naseljujejo kožo in sluznice zdravih ljudi. Sestavlja jo veliko različnih vrst bakterij ter posamezne vrste gliv in parazitov. Mikroorganizme normalne mikrobne flore lahko razvrstimo v stalno in prehodno floro. Stalno floro zastopajo mikroorganizmi, ki jih v določenem starostnem obdobju praviloma vedno najdemo na nekem območju. Prehodno pa opredeljujejo tisti patogeni ali pogojno patogeni mikroorganizmi, ki začasno (nekaj ur, dni ali tednov) naseljujejo kožo ali sluznice. Predstavniki prehodne mikrobne flore praviloma nimajo posebnega pomena, vse dokler je stalna normalna mikrobna flora neokrnjena. Kadarkoli pride do motenj v njihovi sestavi, pa lahko predstavniki prehodne mikrobne flore kolonizirajo posamezno območje, se namnožijo in povzročijo okužbo z izraženo bolezensko sliko.

Predstavniki normalne mikrobne flore so s človekom v komenzalnem sožitju. Njihova prisotnost za človeka sicer večinoma ni nujno potrebna, vendar pa je v nekaterih anatomskih področjih pomembna za ohranjanje zdravja in normalne funkcije organizma. Tako npr. predstavniki normalne črevesne flore proizvajajo vitamin K in sodelujejo pri absorpciji hranil. Mikroorganizmi normalne mikrobne flore s svojo prisotnostjo na koži in sluznicah aktivno preprečujejo kolonizacijo patogenih bakterij in posledični razvoj okužbe. Poleg koristnih učinkov pa lahko predstavniki normalne flore v nekaterih okoliščinah povzročijo tudi hude okužbe. Ti mikroorganizmi namreč nimajo virulentnih dejavnikov, ki bi jim omogočali aktivni prodor v organizem, zato zanje že sama koža in sluznice pomenijo zadostno oviro za prehod v tkiva in krvni obtok. V kolikor pa se te ovire poškodujejo, lahko ti mikroorganizmi preidejo v tkiva in krvni obtok in s tem postanejo patogeni.

Sestava normalne mikrobne flore se med posameznimi anatomskimi območji razlikuje in s starostjo tudi spreminja. Odvisna je od različnih fizioloških dejavnikov, npr. od temperature telesa, vlage, prisotnosti hranil in antimikrobnih snovi (7).

1.5.1 Normalna mikrobna flora sečil in spolovil

Pri zdravem človeku so mikrobi v sečilih praviloma samo v sečnici, in to le v njeni distalni tretjini ali polovici, medtem ko so preostali predeli urinskih izvodil sterilni. Normalno floro sečnice sestavljajo koagulazno negativni stafilokoki, enterokoki, difteroidi (predvsem iz rodu *Corynebacterium*), nepatogene najserije, različne vrste enterobakterij, acinetobaktiri, mikoplazme in glive kvasovke (največkrat *Candida albicans*). Število mikrobov v izločenem seču pri zdravem človeku ni večje od 10^2 do 10^4 /mL. Normalna nožnična mikrobna flora se spreminja s starostjo ženske, glede na njeno hormonsko stanje in vzporedno spreminjanje pH vrednosti nožnice. V rodnem obdobju prevladujejo laktobacili, ki s fermentacijo ogljikovih hidratov, zlasti glikogena, do kisline omogočajo vzdrževanje kislega vaginalnega pH. Kisel pH namreč preprečuje kolonizacijo nožnice s potencialno patogenimi bakterijami.

1.6 OKUŽBE SEČIL

Sečila so zelo pogosto mesto okužb. Njihova etiologija, patogeneza in pogostnost so odvisne od tega, ali gre za bolnišnične ali zunaj bolnišnične, sporadične okužbe. Slednje so običajno ascendentne, ki se začnejo v uretri (uretritis) ter mehurju (cistitis) ter se lahko razširijo do ledvic (pielonefritis). Bakterije prodrejo v sečila med spontano mikcijo zaradi turbulentnega toka seča in refluksa seča v sečni mehur. Okužbe so pogostejše pri ženskah, zlasti do 10. leta starosti ter med 20. in 40. letom. Vzrok zato so anatomske razlike med ženskimi in moškimi sečili. Kratka ženska sečnica se navzven odpira v vlažno, za bakterijsko rast ugodno območje vulve, medtem ko se dolga moška sečnica odpira v razmeroma suh predel sluznice in kože. Pomembna je tudi znatno manjša razdalja med anusom in sečnico pri ženskah, zaradi česar je pri njih prenos črevesnih bakterij v sečila pogostejši.

Okužbe navadno najprej zajamejo spodnja sečila (sečnico ali mehur), lahko pa se širijo tudi v zgornja sečila (sečevod ali ledvice). Cistitis je okužba mehurja, ki jo spremljajo značilni klinični znaki (pekoče in pogosto siljenje na vodo). Pielonefritis pomeni okužbo zgornjih sečil. Bolnik ima vročino in ledveno bolečino. Cistitis in pielonefritis se pogosto pojavljata v akutni obliki, vendar obstajajo tudi kot kronične ali ponavljajoče se okužbe. Poleg opisane ascendentne širitve je možna tudi hematogena okužba sečil, ki pa je posledica bakteriemije.

1.6.1 Klinična slika

Klinična slika vnetja sečil je odvisna od prizadetega organa. Ločimo vnetje sečnice (uretritis), mehurja (cistitis), ledvice in ledvičnega meha (pielonefritis), pri moških pa tudi vnetje prostate (prostatitis). Večinoma gre za akutna stanja, izjema je le vnetje prostate, kjer ima bolezen po navadi kroničen potek (8).

1.6.1.1 Uretritis

Vnetje sečnice je posledica okužbe s spolno prenosljivimi mikroorganizmi, zlasti s klamidijo in gonokokom. Okužba lahko poteka asimptomatsko, torej brez kliničnih znakov ali pa se kaže s pekočimi bolečinami v sečnici in/ali z izcedkom. Okužbo navadno dokažemo z brisom sečnice. Zlasti dolgotrajna je asimptomatska okužba s klamidijo, ki lahko vodi v okvaro jajcevodov in težave pri zanositvi (neplodnost, izvenmaternična nosečnost).

1.6.1.2 Cistitis

Vnetje mehurja spremlja pogosto in pekoče uriniranje, neprestano tiščanje na vodo, redkeje pa je urin tudi krvav. Bolniki pogosto navajajo bolečino nad mehurjem oziroma nad sramno kostjo (suprapubična bolečina). Telesna temperatura navadno ni povišana.

1.6.1.3 Pielonefritis

Pri vnetju ledvice in ledvičnega meha se pojavi povišana temperatura (38 °C in več) ter mrzlica, bolečina ledveno ter težave zaradi pridruženega vnetja mehurja.

1.6.1.4 Prostatitis

Vnetje prostate je večinoma kronične narave. Kaže se z nejasnimi bolečinami v predelu presredka, z bolj ali manj izraženimi težavami pri uriniranju. Bolnik nima povišane telesne temperature. Zbolevajo zlasti mlajši moški. Natančnega vzroka bolezni ne poznamo, kronična bakterijska okužba pa je prisotna samo v 5 % primerov. Pri akutnem vnetju prostate pa ima bolnik povišano temperaturo, bolečino v predelu presredka, pogoste in

pekoče mikcije in tanjši curek urina. Vnetje lahko povzroči popolno zaporo pretoka seča (urinska retenca).

1.6.2 Dejavniki, ki povečujejo verjetnost okužbe

Dovzetnost za okužbe sečil povečujejo številni dejavniki. Večja je predvsem pri otrocih z anatomskimi ali fiziološkimi motnjami sečil, ki ovirajo normalno pretakanje urina. Nekatere ženske imajo v sluznici sečil močno povečano koncentracijo receptorjev, na katere se pritrjujejo patogene bakterije. Tudi spolna aktivnost in uporaba spermicidov, zlasti pri mladih ženskah, lahko povečata nevarnost okužbe sečil. Izjemno pa se nevarnost tovrstnih okužb poveča zaradi uporabe urinskih katetrov. Tudi ob optimalni izvedbi kateterizacije in ustrezni higieni je bakterijska kolonizacija mehurja po 4-5 dneh 50 % od uvedbe, po 7 do 9 dneh 75 % in po 2 tednih 100 %.

Dokaz prisotnosti bakterij v urinu (bakteriurija) še ne pomeni okužbe sečil, zlasti ker je običajen odvzem seča povezan z okužbo vzorca iz predela sečnice. Na splošno velja, da je več kot 100.000 bakterij /mL urina znak okužbe (signifikantna bakteriurija). Ob tem pa so klinični znaki lahko prisotni ali pa tudi ne. Nekatere, zlasti mlajše ženske, imajo lahko klinične znake okužbe že pri manjši koncentraciji bakterij v urinu, pri čemer prisotnost že 1000 bakterij /mL pomeni značilno bakteriurijo.

Okužbe sečil najpogosteje povzročajo *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., enterokoki in stafilokoki. *E. coli* povzroča 80 do 90 % akutnih, nezapletenih okužb sečil. Tudi zapletene okužbe, povezane z anatomskimi anomalijami sečil ali s kateterizacijo, najpogosteje povzroča *E. coli*, vendar pa je v teh primerih spekter možnih povzročiteljev širši (9).

1.7 PREISKAVA URINA PRI OKUŽBAH SEČIL

Pri okužbi sečil se mikroorganizmi v sečniku, prostati, votlem sistemu ali ledvičnem parenhimu razmnožijo in povzročijo vnetje. Najpogostejši povzročitelji so bakterije, redkeje glive (*Candida* spp.), virusi (*Herpes simplex*) ali paraziti (*Trichomonas vaginalis*). Glede na mesto njihovega nastanka delimo okužbe sečil na infekcije spodnjih (prostatitis, uretritis in cistitis) in zgornjih sečil (pielonefritis). Okužbe so lahko akutne ali kronične, najpomembnejša pa je njihova opredelitev v smislu nezapletenih ali zapletenih stanj, saj

glede na to izbiramo ustrezne preiskave in načine zdravljenja. Med nezapletene okužbe sečil prištevamo akutni cistitis in akutni pielonefritis pri zdravih ljudeh, največkrat pri ženskah, kjer ni dodatnih dejavnikov tveganja za dodatne zaplete. Zapletena okužba nastane najpogosteje pri osebah s funkcijskimi, presnovnimi ali anatomskimi nepravilnostmi ali po invazivnih uroloških posegih.

Urin je v sečnem mehurju zdravega človeka sterilna telesna tekočina, saj so sečila pri zdravem človeku na vsej poti od ledvic do sečnika brez mikroorganizmov, izjema je le zadnji del sečnice, v kateri je prisotna normalna bakterijska flora, ki najpogosteje kontaminira vzorce urina. Omenili smo že, da normalna bakterijska flora preprečuje kolonizacijo sečil s patogenimi bakterijami in te stalno spira z urinom. Okužba sečil nastane, ko ji poruši ravnovesje med obrambnimi sposobnostmi telesa (anatomske značilnosti sečil, normalna flora, tok, sestava urina ter lokalna in sistemska imunost) in virulenčnimi dejavniki povzročitelja. Večina bakterij, ki povzročajo okužbe sečil, izvira iz prebavil (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*), redkeje s kože (*Staphylococcus epidermidis*), spolovil (*Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *S. epidermidis*) ali iz bolnišničnega okolja (*Proteus* spp., *Acinetobacter* spp.). Najpogostejši povzročitelji so sevi *E. coli*, ki so odgovorni za 60-90 % izven bolnišničnih in 50 % bolnišničnih okužb. V več kot 95 % pa okužbo povzroča ena vrsta bakterij (7).

1.8 ODVZEM URINA ZA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE

Za diagnostiko okužbe sečil je najpomembnejša mikrobiološka preiskava vzorca urina. Z njo opredelimo povzročitelja (bakterije, glive) in njegovo občutljivost za antibiotike ali antimikotike. Pogoji za uspešno mikrobiološko preiskavo so: pravilen odvzem vzorca, hranjenje in transport kužnin. Načrt odvzema urina za mikrobiološko preiskavo je odvisen od starosti bolnika, njegovega stanja, obolenja in sposobnosti sodelovanja pri odvzemu urina. Urin mora biti odvzet v sterilni lonček. Po tem ga je potrebno hraniti v hladilniku pri temperaturi 4 °C in poslati v mikrobiološki laboratorij čim prej, najbolje v 4 urah po odvzemu, najkasneje pa po 24 urah. Za transport moramo uporabiti hladilno torbo z nameščenim hladilnim telesom. Urin je hranljivo gojišče, idealno za razmnoževanje bakterij. Pri sobni temperaturi se v njem število bakterij vrste *E. coli* podvoji vsakih 30 min. Koncentracija bakterij se lahko pri neprimernem hranjenju vzorca že v 2 urah tako

poveča, da rezultati niso več točni, oziroma so lahko zavajajoči. Ob odvzemu kužnine je potrebno natančno izpolniti spremni list za mikrobiološke preiskave.

1.9 BAKTERIURIJA

Za okužbo sečil je značilna bakteriurijska ali prisotnost bakterij v urinu. Največkrat najdemo v urinokulturi eno vrsto bakterij, redkeje dve. Izolacija treh ali več bakterij, od katerih nobena ne prevladuje pa nakazuje na kontaminacijo. Prava polimikrobna bakteriurijska je redka in značilna za bolnike po invazivnih uroloških posegih ali operacijah in za tiste s kroničnimi okužbami zaradi prisotnosti sečnih kamnov. Asimptomatska bakteriurijska je najdba 10^5 ali več bakterijskih kolonij v mL urina pri osebi brez piurije (levkociturija) ali drugih kliničnih znakov za okužbo sečil.

1.9.1 Osnovna mikrobiološka analiza urina (urinokultura)

Semikvantitativna urinokultura

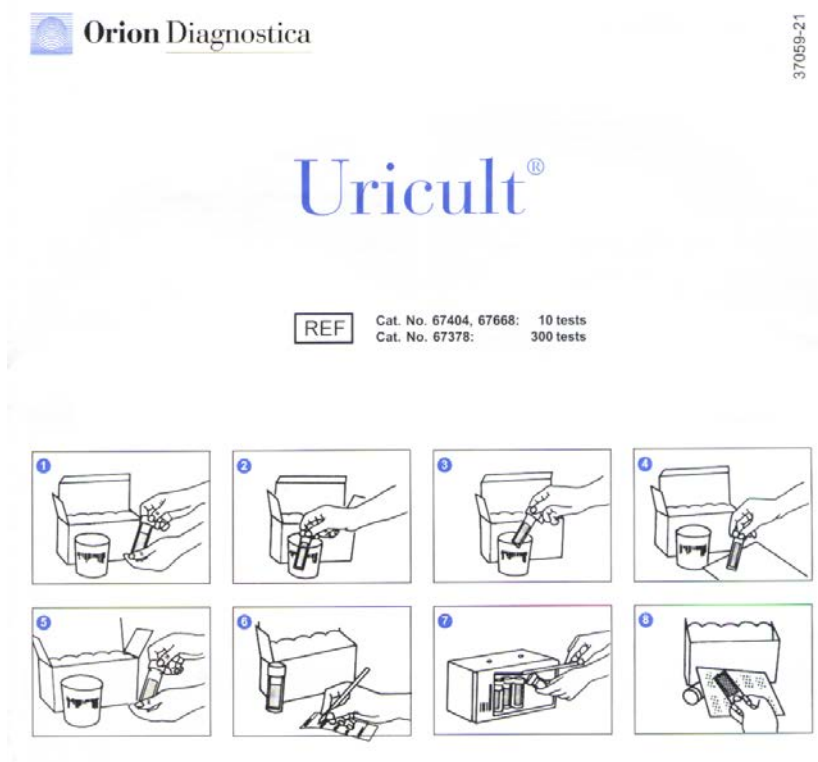
Bakteriurijsko lahko dokažemo s semikvantitativnimi metodami, npr. Uricult, Uricult Trio, Uriline, Te za določevanje bakterij uporabljajo komercialno pripravljene hranljive podlage na plastičnih nosilcih. Testne ploščice imajo na eni strani nanesen neselektivni agar CLED, na katerem se razmnožujejo G- pozitivne in G- negativne bakterije, na nasprotni strani pa selektivni Mac Conkeyev agar, na katerem rastejo samo G- negativne bakterije.



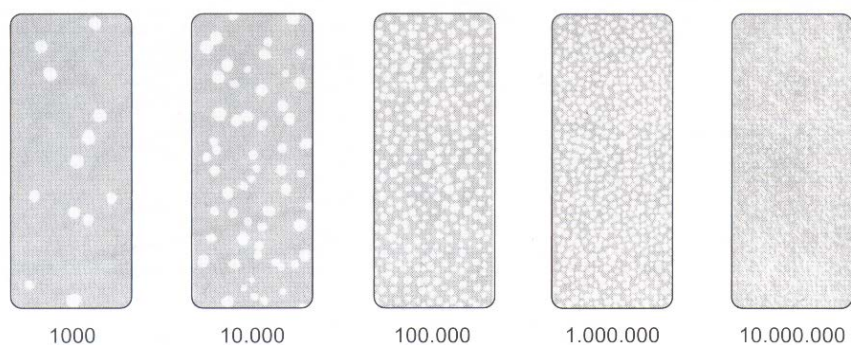
Slika 8: Gojišča Uricult.

Izvedba semikvantitativne urinokulture:

Izvajamo jo s postopkom čistega mokrenja. Testno ploščico potopimo v sveže odvzet urin. Če je urina malo, z njim rahlo prelijemo obe strani testne ploščice in pustimo da odteče. Testno ploščico nato postavimo v priloženo epruveto in jo v pokončnem položaju inkubiramo od 24 do 48 ur pri $+37^{\circ}\text{C}$. Koncentracijo bakterij ocenimo s postnim očesom glede na gostoto kolonij, in sicer glede na priloženo skalo. Če je vzorec patološki z vsebnostjo $> 10^5$ bakterij /mL urina in so kolonije istovrstne, ga pošljemo v mikrobiološki laboratorij, za opredelitev vrste bakterij in za izdelavo antibiograma.



Slika 9: Prikaz izvedbe postopka Uricult.



Slika 10: Referenčna tabela za določanje števila bakterij v urinu.

Kvantitativna urinokultura po Sanfordu:

Najzanesljivejša preiskava za opredelitev števila bakterijskih kolonij in vrste povzročitelja infekcije v urinu je kvantitativna urinokultura po metodi Sanford. Temelji na pripravi ustrezne razredčine urina, ki ga prenesemo na selektivno gojišče Sanford, ki omogoča rast po Gramu negativnim in pozitivnim bakterijam ter glivam. V nekaterih mikrobioloških laboratorijih nerazredčeni urin nanesejo tudi na krvni agar, ki omogoča lažjo identifikacijo po Gramu pozitivnih bakterij, zlasti *Streptococcus agalactiae*. Po 24-urni inkubaciji pri temperaturi 35-37 °C določimo število poraslih kolonij na obeh gojiščih in dobljene vrednosti pomnožimo z ustreznim faktorjem razredčitve. Glede na rezultat in specifični videz kolonij se klinični mikrobiolog odloči za nadaljnjo serijo identifikacijskih testov namenjenih določitvi vrste povzročitelja in testiranju njegove občutljivosti za posamezen antibiotik oz. antimikotik. (10)

1.10 PREPREČEVANJE OKUŽB SEČIL

Vnos tekočine naj bo zadosten, tako da bo količina dnevno izločenega seča med 1,5 do 2 litra. Okužbe lahko preprečujemo s pitjem soka ameriških brusnic, saj ta zmanjšuje adherenco bakterij na sluznico sečil. Ženske poučimo o ustrezni intimni higieni, pri čemer naj uporabljajo čim manj agresivna mila brez morebitnega izpiranja nožnice, da ohranijo ustrezno zaščitno urogenitalno floro. Pomembno je odstraniti takšne dejavnike tveganja, kot sta uporaba kemičnih spermicidnih sredstev in/ali diafragme. Ženskam tudi priporočimo, da po vsakem spolnem odnosu izpraznijo sečni mehur in s tem mehanično izplavijo bakterije.

Pri ponavljajočih se okužbah sečil je učinkovita nizko dozirana uroantiseptična profilaksa, ki je varna tudi pri večletnem jemanju, če je to potrebno.

V zadnjem času skušajo preprečiti okužbe sečil pri ženskah z oralno ali vaginalno aplikacijo izbranih laktobacilov z ustreznimi adherentnimi lastnostmi in z antimikrobnim delovanjem. Na ta način naj bi povrnilo normalno zaščitno floro, ki preprečuje kolonizacijo in okužbo z *E. coli*. V teku so tudi poskusi kolonizacije sečnega mehurja z nevirulentno obliko *E. coli*, ki naj bi preprečila naselitve z virulentnejšimi sevi te bakterije. Razvijajo tudi antiadhezinska cepiva, ki naj bi izzvala imunost proti povzročiteljem okužb sečil. (9)

1.11 ZDRAVLJENJE OKUŽB SEČIL

Bakterijske okužbe sečil zdravimo z antibiotiki. Antibiotiki so naravne snovi, katere pri svoji presnovi proizvajajo mikrobi in z njimi zavirajo rast drugim mikrobnim vrstam. Antibiotiki lahko delujejo baktericidno ali bakteriostatično. Delujejo na manjše število mikrobnih vrst ter imajo ozek spekter delovanja ali pa na veliko različnih vrst mikrobov ter imajo širok spekter delovanja. Za zdravljenje nekompliciranega vnetja mehurja pri zdravih mlajših ženskah navadno uporabljajo enostavne antibiotike, npr. sulfametoksazol in trimetoprim, in sicer 3-5 dni. Po končanem zdravljenju moramo opraviti navaden pregled seča, da preverimo, ali je bilo zdravljenje uspešno. Pri kompliciranih okužbah pa zdravniki predpišejo močnejše antibiotike. V teh primerih je pogosto potrebno bolnišnično zdravljenje, redko pa dodatni posegi kot npr.: vzpostavitev drenaže pri motnjah pretoka urina in kirurško zdravljenje pri tvorbi ognojnikov. Pomembna je tudi ustrezna hidracija, saj večja količina izločenega urina iz sečil izloči tudi več mikroorganizmov. Kadar se vnetja mehurja ponavljajo zelo pogosto, se lahko zdravnik odloči za dolgotrajnejšo zaščito z antibiotikom (1 tableta sulfametoksazola in trimetoprima zvečer). Pri tako nizkem odmerku ne dosežemo zadostne koncentracije antibiotika v plazmi, ki bi delovala tudi na črevesno floro. Ker pa se antibiotik izloča preko ledvic, je njegova koncentracija čez noč zadostna, da uniči bakterije prisotne v mehurju. Na ta način se tudi izognemo razvoju rezistence.

2 NAMEN DELA

Za ugotavljanje prisotnosti bakterij v urinu se v laboratorijih v veliki meri še vedno uporablja klasična metoda, to je njihovo štetje v urinskem sedimentu pod svetlobnim mikroskopom. Zaradi velikega sipanja rezultatov med posameznimi štetji pa se vse bolj uveljavljajo analizatorji, ki število bakterij določajo avtomatsko.

Namen naše diplomske naloge je primerjalno prešteti bakterije pod svetlobnim mikroskopom in z analizatorjem Sysmex UF-1000i. Ugotoviti želimo kakšno število bakterij dejansko ustreza arbitrarno določenim enotam »malo«, »številne« in »zelo številne« ter primerjati in ovrednotiti rezultate dobljene s štetjem pod mikroskopom in z avtomatskim analizatorjem.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI URINA

Izbrali smo skupino 70 vzorcev urina in v njih primerjalno prešteli število bakterij, in sicer pod svetlobnim mikroskopom in z avtomatskim analizatorjem Sysmex UF-1000i.

Obravnavani vzorci so bili odvzeti pacientom, ki so ležali na različnih Klinikah UKC Ljubljana in so predstavljali prvi jutranji urin. Analizirali smo jih takoj, po njihovi dostavi v laboratorij.

3.2 ODVZEM VZORCA URINA

Pravilen odvzem urina je za nedvoumno opredeljevanje okužb sečil najpomembnejši. Zato moramo za potrebne preiskave zagotoviti odvzem vzorca srednjega curka seča med prvo jutranjo mikcijo.

Tabela 2: Navodila za pravilen odvzem vzorca urina pri moških in ženskih preiskovancih.

MOŠKI	ŽENSKE
• odstranite prepucij z glavice spolnega uda	• udobno se namestite na straniščno školjko
• z vlažnim zložencem z enkratnim potegom očistite glavico spolnega uda, postopek ponovite trikrat	• z eno roko razširite sramne ustnice
• s suhim zložencem z enkratnim potegom osušite glavico spolnega uda	• z namiljenim zložencem z enkratnim potegom od zgoraj navzdol očistite spolovilo
• srednji curek seča oddajte v priloženo posodico, prvi in zadnji curek spustite z mikcijo v straniščno školjko	• z vlažnim zložencem z enkratnim potegom od zgoraj navzdol očistite spolovilo, postopek ponovite trikrat
	• s suhim zložencem z enkratnim potegom od zgoraj navzdol osušite spolovilo
	• srednji curek seča ujemite v priloženo posodico, prvi in zadnji curek pa spustite z mikcijo v straniščno školjko

Urin mora biti odvzet pravilno, saj je v nasprotnem primeru pogosto okužen. Bakterije, ki ga najpogosteje kontaminirajo so:

- Staphylococcus epidermidis
- Corynebacteria
- Lactobacillus
- Gardnerella vaginalis
- anaerobne bakterije

3.3 ŠTETJE URINSKIH SEDIMENTOV POD MIKROSKOPOM

Formirane urinske sedimente, torej celice, cilindre, kristale in bakterije najprej koncentriramo s centrifugiranjem, nato pa jih kvalitativno ovrednotimo pod svetlobnim mikroskopom, v vidnem polju, pri 400- kratni povečavi.

3.3.1 Oprema

Centrifuga, epruvete za centrifugiranje, pipeta, nastavki za pipeto, objektno stekelce in optični mikroskop.

3.3.2 Postopek

1. v koničasto centrifugirko odlijemo približno 10 mL svežega, dobro premešanega urina;
2. centrifugiramo 5 min pri 1500- 2000 obr. /min,
3. supernatant previdno odlijemo, da ne suspendiramo sedimenta, pri čemer mora v epruveti ostati približno 0,3 mL urina;
4. usedlino dobro pretresemo in majhno kapljico suspenzije prenesemo z oglom krovnega stekla na objektno steklo in jo pokrijemo z istim krovnim steklom,
5. sediment pogledamo pod mikroskopom (proizvajalca Olympus) najprej pri manjši (100X), nato pa podrobnejše pri večji povečavi (400X).

V sedimentu iščemo:

- bakterije, glivice in parazite.

Prisotnost bakterij izrazimo z oznakami: - MALO,

- ŠTEVILNE,

- ZELO ŠTEVILNE.

Podajanje rezultatov:

1+ , do 10 bakterij v vidnem polju (malo)

2+, od 11 do 100 bakterij v vidnem polju (številne)

3+, nad 100 bakterij v vidnem polju (zelo številne)

4+, masovno prisotne bakterije v vidnem polju.

- cilindre (hialini, eritrocitni, granulirani). Če je cilindrov malo, pregledamo ves preparat pri manjši povečavi in napišemo število v preparatu, če pa jih je izredno veliko pa navedemo njihovo št. v vidnem polju;
- epitelne celice – njihovo prisotnost izrazimo z oznakama: številne, zelo številne;
- kristale – njihovo prisotnost opisujemo z imeni kristalov.
- eritrocite – štejemo jih v vidnem polju, 50-100 E pomeni, da so številni, nad 100 E pa da so zelo številni.
- levkocite - rezultat izrazimo podobno kot pri eritrocitih.

Tabela 3: Način podajanja rezultatov ugotavljanja posameznih sestavin urinskega sedimenta.

Sveži eritrociti	Izluženi eritrociti	Levkociti	Epitelne celice	Cilindri (vrsta)	Cilindri (število)	Bakterije	Glive
0-5	0-5	0-5	Malo	Hialini	0-1	Malo	Malo
5-10	5-10	5-10	Številne	Granulirani	1-2	Številne	Številne
10-20	10-20	10-20	Zelo številne	Eritrocitni	3-5	Zelo številne	Zelo številne
20-30	20-30	20-30		Levkocitni	5-10		
30-40	30-40	30-40		Epitelni	> 10		
40-50	40-50	40-50		Maščobni			
Številni	Številni	Številni		Voščeni			
Zelo številni	Zelo številni	Zelo številni					

Če je v sedimentu prisoten parazit, vedno zapišemo tudi njegovo ime.

Pri kristalih opisujemo samo tiste, ki se nahajajo v ledvičnih kamnih in so zgrajeni iz: sečne kisline, Ca-oksalata, Ca-fosfata, Mg-fosfata, Ca-karbonata, Ca-sulfata, amonijevega urata, cistina, tirozina, holesterola ali amorfnih soli, npr. amorfnih uratov. Vedno podamo tudi ocenjeno število kristalov: nekaj, številni, zelo številni (13).

3.4 ŠTETJE URINSKIH SEDIMENTOV Z ANALIZATORJEM SYSMEX UF-1000i

3.4.1 Oprema

Za štetje bakterij v urinskih vzorcih smo uporabili analizator proizvajalca Sysmex, UF- 1000i, ki je povsem avtomatiziran.

Sestavni deli aparature so še: računalnik za vnos in izpis pozicij vzorcev, itd., stojala za vzorce in različne posodice (reakcijske, odpadne,...).

Po podatkih proizvajalca lahko analizator UF-1000i v eni uri izvede do 100 meritev.



Slika 11: Analizator Sysmex UF- 1000i.

3.5.2 Reagenti in kontrole

Analizator UF-1000i potrebuje za svoje delovanje dva reagenta:

- UF II SEARCH SED (za sediment) in
- UF II SEARCH BAC (za bakterije).

Kontroli sta komercialni, dostopni pri proizvajalcu opreme. Vrednosti, ki so že vnaprej določene so deklarirane kot visoke in nizke. Vrednost visoke kontrole (Lot. A 6006) je 796 bakterij / μ L urinskega sedimenta in nizke (Lot. A 6006) je 202 bakterij / μ L urinskega sedimenta, torej:

- UF II CONTROL- H (high)
- UF II CONTROL- L (low)

Ponovljivost obeh kontrol, ki smo ju izmerili desetkrat je bila zelo dobra, in sicer za:

- o UF II CONTROL- H: SD = 34,6 in KV = 4,4 % ,
- o UF II CONTROL- L: SD = 17,3 in KV = 8,5 % .

Za pravilno delovanje aparata in zanesljivost rezultatov moramo analizator vedno ustrezno umeriti.

Kalibracijo izvajamo vedno:

- ko prvič uporabimo nove kalibratorje,
- po dveh tednih od zadnjega kalibriranja,
- če je bil aparat med dvema testoma servisiran in
- če ugotovimo, da so kontrolne vrednosti kalibratorja izven dovoljenih mej.

3.4.3 Princip delovanja

Analizator Sysmex UF-1000i deluje na osnovi tehnologije pretočne citometrije (Flow Cytometry, FCM), ki lahko loči in kvantitativno ovrednoti pet sestavin urinskega sedimenta, in sicer: RBC (Red Blood Cells - rdeče krvne celice), WBC (White Blood Cells - bele krvne celice), EC (Epithelial Cells - epitelijske celice), CAST (Casts - cilindre) in BACT (Bacteria - bakterije).

3.4.4 Osnovni postopek testa

- **Aspiracija vzorca.**
- **Razdelitev vzorca za analizo sedimenta in bakterij.**
- **Predpriprava obeh vzorcev** poteka po enakem postopku, vendar v različnih razmerjih in z različnimi reagenti:

SEDIMENT:

- redčenje z ustreznim reagentom (UF II SEARCH SED),
- barvanje s polimetinskim fluorescentnim barvilom,
- mešanje,
- segrevanje, pri čemer se raztopijo se amorfne soli, ki sicer motijo analizo in
- meritev prevodnosti vzorca.

BAKTERIJE:

- redčenje z ustreznim reagentom (UF II SEARCH BAC),
- barvanje s polimetinskim fluorescentnim barvilom, ki obarva bakterijske nukleinske kisline,
- mešanje,
- segrevanje, s čimer raztopimo amorfne snovi, ki sicer motijo analizo.

- **Analiza v pretočni celici:**

SEDIMENT: vzorec potuje v toku izotonične tekočine skozi pretočno celico, kjer prečka polprevodniški laserski žarek, pri čemer prisotni delci in celice sipajo svetlobo in oddajajo fluorescenčni signal. Sipano in fluorescenčno svetlobo, ter impedanco aparat zazna ločeno in jih pretvori v ustrezne električne signale.

BAKTERIJE: vzorec potuje v toku izotonične tekočine skozi pretočno celico, kjer prečka polprevodniški laserski žarek. Bakterije sipajo svetlobo in oddajajo fluorescenčno svetlobo. Aparat zazna sipano svetlobo in fluorescenco vsako posebej in ju pretvori v proporcionalne električne signale.

ANALIZATOR ZAZNAVA:

v citometru:

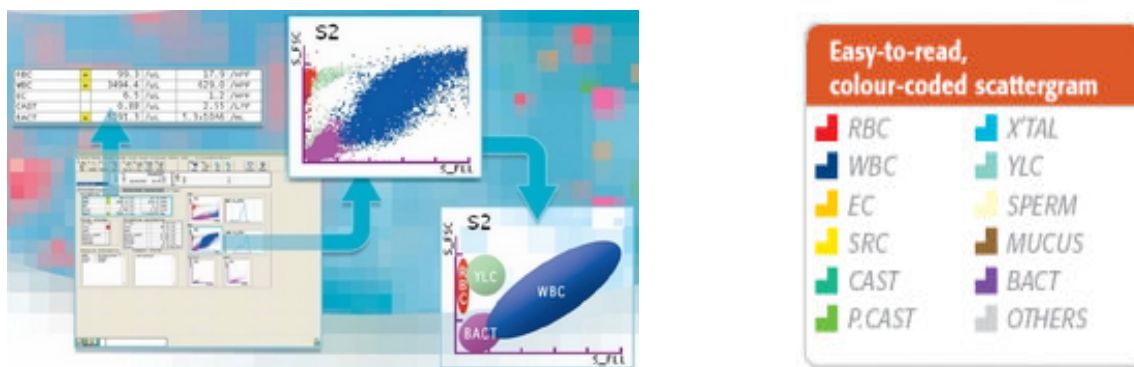
- eritrocite
- levkocite
- epitelijske celice
- cilindre

v komori za bakterije:

- bakterije

PODAJANJE REZULTATOV

Osnovne parametre, ki jih aparat zazna s pretočno citometrijo, podaja v obliki grafično in številčno prikazanih rezultatov. Številčni rezultati so izraženi kot število celic na mikroliter (μL) urina in preračunani na vidno polje mikroskopa s 400x (HPF) oz. s 100x povečavo (LPF) (11).

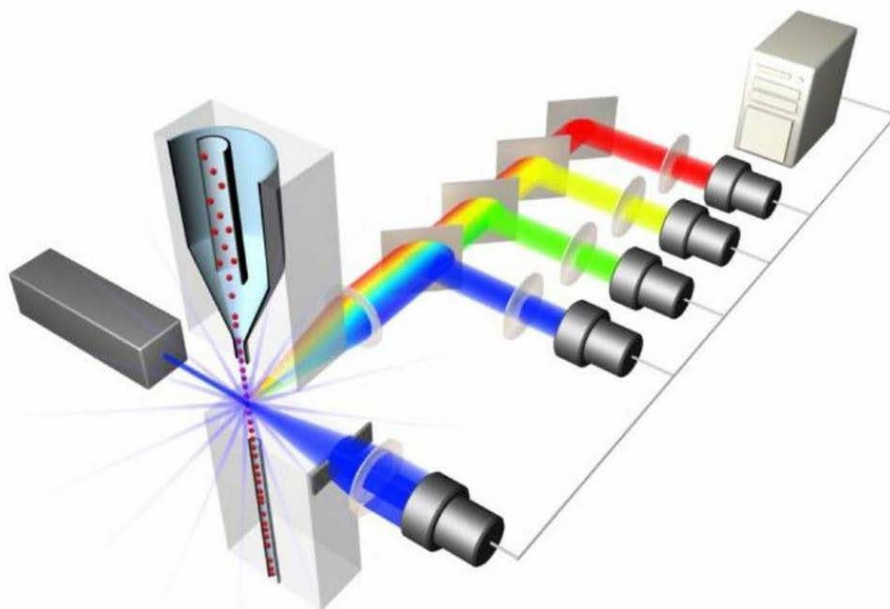


Slika 12: Prikaz in interpretacija rezultatov, ki jih podaja analizator UF-1000i.

3.4.4.1 Pretočna citometrija v analizatorju Sysmex UF- 1000i

Potem ko aparat specifične snovi v celicah označi s fluorescentnim barvilom in pripravi ustrezno celično suspenzijo vzorec zalije z nosilno tekočino in ga v enojnem curku iztisne skozi šobo. Na tem mestu vsako od prisotnih celic zadane ozko usmerjeni laserski žarek. Posamezne, označene celice zato fluorescirajo in v različni meri razpršujejo svetlobo. Z analizo pri tem nastalih električnih signalov lahko ločimo posamezne urinske celice, in sicer s pomočjo enodimenzionalnega histograma na osnovi intenzitete fluorescence in dvodimenzionalnega histograma na osnovi intenzitete fluorescence ter intenzitete sipanja svetlobe. Razpršena svetloba je tista, ki sipa lateralno v stran od smeri vira laserskega

žarka. Njen svetilnost je sorazmerna velikosti in površinskim lastnostim celic. Fluorescenčna svetloba pa kvalitativno odraža lastnosti tako celičnih površin kot njihovih jeder količina RNA in DNA, in sicer skladno z lastnostmi fluorescentno označenih protiteles in v celice vgrajenega fluorescentnega barvila.

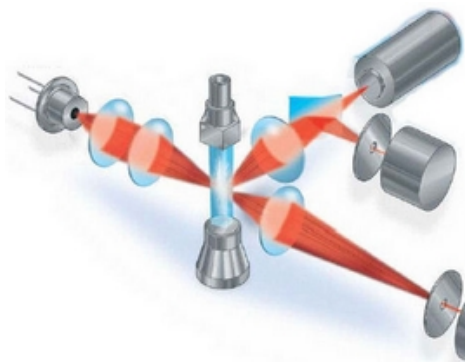


Slika 13: Shematski prikaz pretočne celice analizatorja Sysmex UF-1000i.

3.4.4.2 Optični sistem analizatorja Sysmex UF-1000i

Sestavljajo ga rdeči polprevodniški laser (svetloba z valovno dolžino 635nm), pretočna celica ter zbiralni in detektorski blok.

Pretočna citometrija uporablja za vir svetlobe laserski žarek s stalno valovno dolžino, veliko močjo in usmerljivostjo. To svetlobo nato sipa vzorec v pretočni celici. Prednje sipano in lateralno sipano svetlobe ter lateralno fluorescenco, ki jih povzroča oziroma oddaja vzorec, zaznajo fotodetektorji in jih pretvorijo v proporcionalne električne signale.



Slika 14: Shematski prikaz optičnih diod z laserskimi žarki v pretočnem citometru.

3.4.4.3 Hidravlični sistem za pretok nosilne tekočine

Fluorescentno označeni vzorec urina aparat iz reakcijske komore z brizgo poseja v polnilno linijo. Od tu pa določeno količino vzorca, prav tako z brizgo potisne skozi pretočno cev. Da bi urinske celice prehajale druga za drugo skozi pretočno celico in da ne bi prišlo do njene zamašitve, se v pretočno cev po posebnem tunelu injicira nosilna tekočina pod pritiskom, pri čemer nastane laminarni tok, v katerem so v enojni zaporedni formaciji urejene urinske celice. Tekočini se pri tem ne mešata, kar pomeni, da bodo urinske celice vedno v sredini nosilne tekočine, zato tudi ob prisotnosti velikih delcev ne more priti do zamašitve pretočne celice.

Omenjena oblika pretoka nosilne tekočine močno izboljša natančnost in ponovljivost štetja celic. Ko namreč delci drug za drugim, v enojni vrsti prehajajo skozi sredino pretočne celice, laminarni pretok nosilne tekočine preprečuje njeno kontaminacijo.

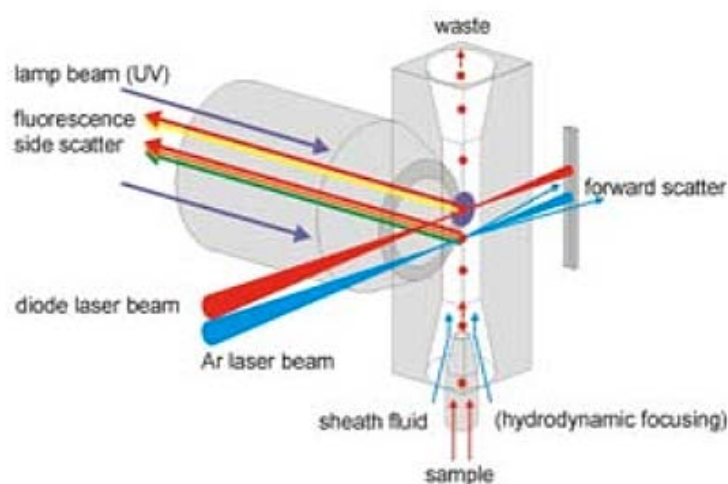
3.4.4.4 Elektronski sistem

Prednje in lateralno fluorescentno sevanje, ki ga oddaja vzorec, aparat s pomočjo fotodiod pretvori v električne signale.

Ker je lateralna fluorescentna svetloba šibka, se kot njen fotodetektor uporablja zelo občutljiv fotopomnoževalnik, ki absorbira energijo fotonov na fotoelektrični površini (katoda) in zaradi fotoelektričnega efekta kovine oddaja fotoelektrone. Te nato izpostavi določeni električni napetosti, pri čemer nastanejo številni sekundarni elektroni, ki povzročijo njihovo pospeševanje. Lateralna fluorescentna svetloba se ob močnem pospeševanju tako pretvori v proporcionalni električni signal.

Aparat te nastale električne signale izmeri in obdela v valovnem procesorju, nato pa podatke pošlje v glavno informacijsko procesno enoto (IPU), kjer jih računalnik analizira in shrani. S kombinacijo intenzitete in širine impulza prednjega sipanja svetlobe, intenzitete lateralno razpršene svetlobe ter intenzitete in širine impulza fluorescentne svetlobe, ki jih povzročajo v vzorcu prisotne urinske celice, računalnik izdela ter v dvodimenzionalnem koordinatnem sistemu izriše razsevni grafikon.

Intenziteto prednjega sipanja svetlobe in fluorescentne svetlobe pa aparat kombinira s številom klasificiranih urinskih celic (samo RBC in WBC), kar prikaže v obliki ustreznega histograma.



Slika 15: Shematski prikaz enojnega pretoka celic.

3.4.4.5 Analiza vrste urinskih celic in zaznava signalov

Aparat analizira tudi višino, amplitudo in druge značilnosti oblike valovanja signalov prednjega sipanja svetlobe, lateralnega sipanja svetlobe in fluorescentne svetlobe. S tovrstno analizo dobimo podatke, kot so velikost celic in stanje njihovih površin ter značilnosti in dolžine obarvanih predelov celic. Avtomatski analizator urinske celice določi na osnovi značilnosti oblike valovanja signalov, ki jo ta povzroči, pri čemer uporablja poseben klasifikacijski algoritem (12).

3.5 STATISTIČNA PRIMERJAVA REZULTATOV

- Vse rezultate, ki smo jih dobili z metodo štetja bakterij v urinskih vzorcih pod svetlobnim mikroskopom smo ovrednotili kot »MALO«, »ŠTEVILNE« in »ZELO ŠTEVILNE«;
- nato smo številčne rezultate, ki smo jih izmerili z avtomatskim analizatorjem razporedili tako, da so ustrezali trem zgoraj omenjenim kategorijam;
- izračunali smo povprečne vrednosti števila bakterij v vsaki od kategorij, »MALO«, »ŠTEVILNE« in »ZELO ŠTEVILNE«;
- za vsako povprečno vrednost izračunali standardni odklon (SD);
- še sprejemljive arbitrirane meje oziroma intervale smo določili z enačbo $\bar{x} \pm 2SD$;
- ujemanje med rezultati, dobljenimi z obema metodama smo ocenili tako, da smo izračunali % tistih, ki so odstopali od intervala $\bar{x} \pm 2SD$, v posamezni kategoriji.

UPORABLJENE STATISTIČNE METODE:

- a) Aritmetična sredina ali povprečna vrednost je definirana kot kvocient med vsoto vseh meritev in številom meritev.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- b) Standardni odklon ali standardna deviacija je statistični kazalec, ki ga uporabljamo za merjenje razpršenosti enot v preiskovani populaciji.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n - 1}}$$

4 REZULATATI IN IZRAČUNI

Tabela 4: Rezultati določanja števila bakterij v urinu pod svetlobnim mikroskopom in z analizatorjem.

Vzorec	Štetje pod mikroskopom	Štetje z analizatorjem/ μL
1	številne	438
2	malo	2577
3	zelo številne	9233
4	malo	785
5	zelo številne	10365
6	številne	3935
7	malo	2968
8	številne	4729
9	malo	2405
10	številne	4437
11	malo	1963
12	številne	3899
13	zelo številne	11706
14	malo	2881
15	številne	4637
16	malo	2282
17	malo	2928
18	številne	739
19	zelo številne	9197
20	zelo številne	1407
21	malo	1120
22	zelo številne	32442
23	malo	2456
24	zelo številne	9208
25	malo	1242
26	številne	4729
27	številne	6173
28	številne	3190
29	številne	5352
30	zelo številne	9320
31	številne	3703
32	številne	6364
33	malo	1582
34	malo	1017

35	številne	926
36	malo	587
37	malo	2674
38	zelo številne	11225
39	številne	3719
40	malo	2836
41	številne	6949
42	zelo številne	3544
43	zelo številne	1591
44	malo	1713
45	številne	5902
46	malo	1170
47	številne	3455
48	številne	5208
49	številne	5608
50	številne	6595
51	zelo številne	7863
52	malo	873
53	številne	6136
54	številne	3305
55	malo	1182
56	številne	6032
57	zelo številne	8619
58	številne	3068
59	številne	4393
60	malo	1354
61	številne	5571
62	zelo številne	6693
63	številne	4456
64	številne	3684
65	malo	2105
66	številne	3875
67	številne	5742
68	malo	1793
69	malo	882
70	malo	1989

Tabela 5: Števila bakterij ugotovljena z analizatorjem, urejena v kategorije določene s pregledom pod svetlobnim mikroskopom.

MALO	ŠTEVILNE	ZELO ŠTEVILNE
2577	483	9233
785	3935	10365
2968	4729	11706
2405	4437	9197
1963	3899	1407
2881	4637	32442
2282	739	9208
2928	4729	9320
1120	6173	11225
2456	3190	3544
1242	5352	1591
1582	3703	7863
1017	6364	8619
587	926	6693
2674	3719	
2836	6949	
1713	5902	
1170	3455	
1182	5208	
1354	5608	
2105	6595	
1793	6136	
1989	3305	
882	6032	
873	3068	
	4393	
	5571	
	4456	
	3684	
	3875	
	5742	

4.1 IZRAČUNI

Vsota vseh prešteti bakterij v kategoriji »MALO«

$$n = 25$$

$$\sum_{MALO} = X_1 + X_2 + X_3 \rightarrow +X_{25}$$

$$\sum_{MALO} = 2577 + 785 + 2968 + \dots + 873 = 45364 \text{ } / \mu L$$

Vsota vseh prešteti bakterij v kategoriji »ŠTEVILNE«

$$n = 31$$

$$\sum_{\text{ŠTEVILNE}} = X_1 + X_2 + X_3 \rightarrow +X_{31}$$

$$\sum_{\text{ŠTEVILNE}} = 483 + 3935 + 4729 + \dots + 5742 = 136994 \text{ } / \mu L$$

Vsota vseh prešteti bakterij v kategoriji »ZELO ŠTEVILNE«

$$n = 14$$

$$\sum_{ZELO \text{ ŠTEVILNE}} = X_1 + X_2 + X_3 \rightarrow +X_{14}$$

$$\sum_{ZELO \text{ ŠTEVILNE}} = 9233 + 10365 + 11706 + \dots + 6693 = 132413 \text{ } / \mu L$$

.....

Povprečna vrednost vseh prešteti bakterij v kategoriji »MALO«

$$\bar{X}_{MALO} = \frac{\sum_{MALO}}{n} = \frac{45364}{25} = 1814,56 = 1815 \text{ } / \mu L$$

Povprečna vrednost vseh prešteti bakterij v kategoriji »ŠTEVILNE«

$$\bar{X}_{\text{ŠTEVILNE}} = \frac{\sum_{\text{ŠTEVILNE}}}{n} = \frac{136994}{31} = 4419,16 = 4419 \text{ } / \mu L$$

Povprečna vrednost vseh prešteti bakterij v kategoriji »ZELO ŠTEVILNE«

$$\bar{X}_{ZELO \text{ ŠTEVILNE}} = \frac{\sum_{ZELO \text{ ŠTEVILNE}}}{n} = \frac{132413}{14} = 9458,07 = 9458 \text{ } / \mu L$$

Standardna deviacija vseh prešteti bakterij v kategoriji »MALO«

$$SD_{MALO} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}} = 765$$

Standardna deviacija vseh prešteti bakterij v kategoriji »ŠTEVILNE«

$$SD_{\text{ŠTEVILNE}} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}} = 1644$$

Standardna deviacija vseh prešteti bakterij v kategoriji »ZELO ŠTEVILNE«

$$SD_{ZELO \text{ ŠTEVILNE}} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}} = 7390$$

.....

$$2SD_{MALO} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}} = 1530$$

$$2SD_{\text{ŠTEVILNE}} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}} = 3288$$

$$2SD_{ZELO \text{ ŠTEVILNE}} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}} = 14780$$

Tabela 6: Povprečne vrednosti in standardni odkloni po kategorijah vseh prešteti bakterij.

	MALO	ŠTEVILNE	ZELO ŠTEVILNE
$\bar{X}$ (/μL)	1815	4419	9458
SD	765	1644	7390
2SD	1530	3288	14780

Določitev številčnega intervala za kategorijo »MALO«:

$$\bar{X}_{MALO} = 1815 / \mu L$$

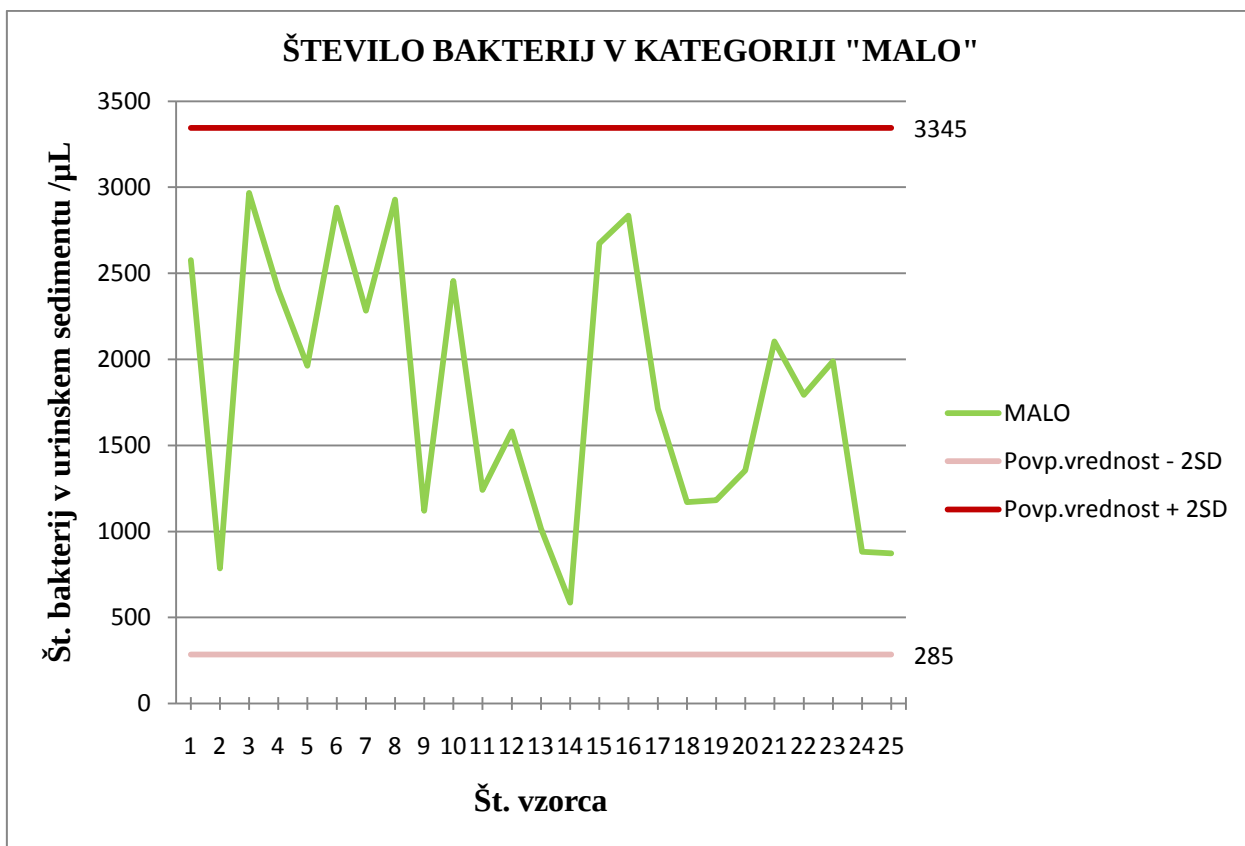
$$SD_{MALO} = 765$$

$$2SD_{MALO} = 1530$$

$$Interval: 1815 \pm 2SD$$

Kategorijo »MALO« lahko ovrednotimo z intervalom 285 – 3345 bakterij / μL urinskega sedimenta.

Od dobljenih 25 rezultatov v skupini so se vsi ujemali (100 %) in ni bilo nepravilnih, glede na interval dobljen z izračunom $\bar{X} \pm 2SD$. Ta pristop smo uporabili zato, ker je štetje pod mikroskopom manj ponovljivo kot v primeru uporabe avtomatskega analizatorja in s tem zagotovili primeren razpon številčnega intervala prešteti bakterij v dani kategoriji.



Graf 1: Grafični prikaz razpona števila znotraj kategorije »MALO«

Določitev številčnega intervala za kategorijo »ŠTEVILNE«

$$\bar{X}_{\text{ŠTEVILNE}} = 4419 \text{ } / \mu\text{L}$$

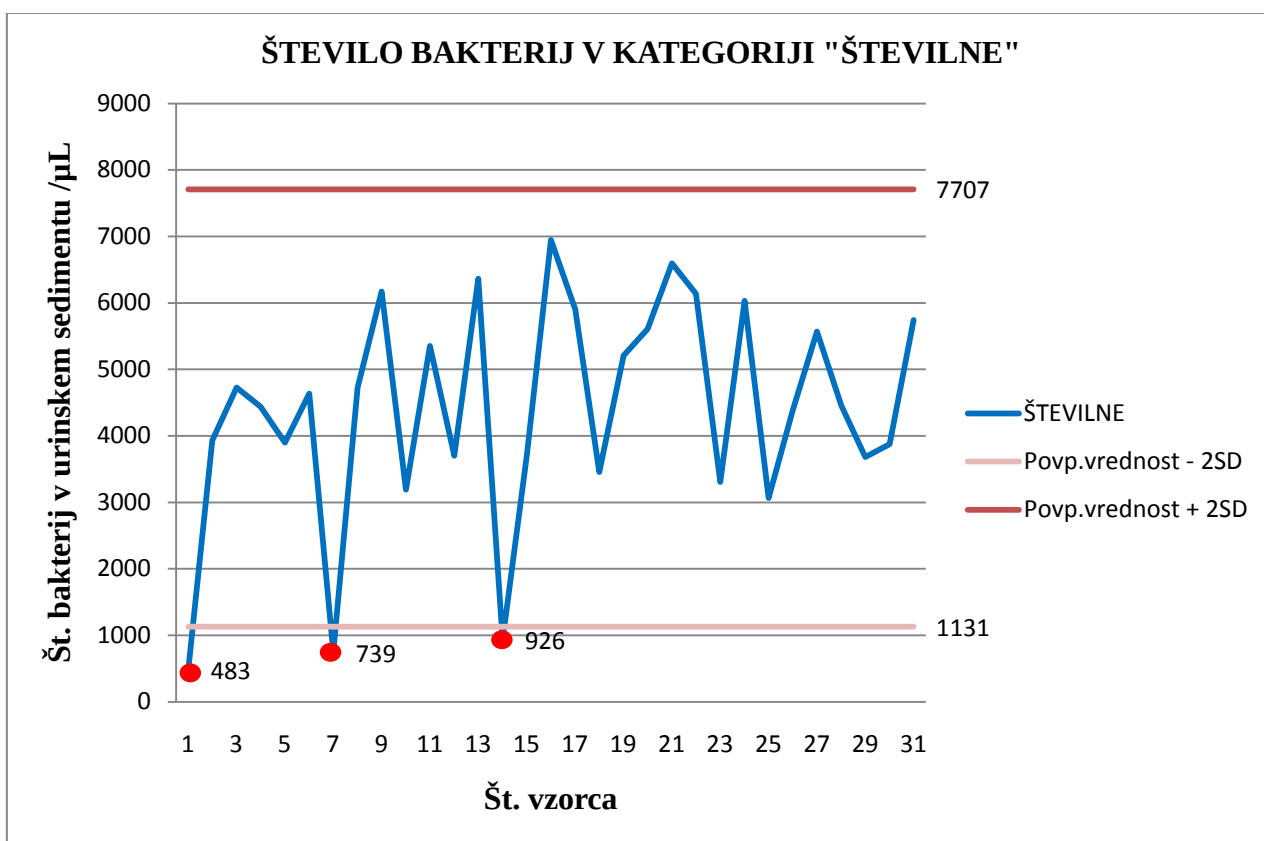
$$SD_{\text{ŠTEVILNE}} = 1644$$

$$2SD_{\text{ŠTEVILNE}} = 3288$$

$$\text{Interval: } 4419 \pm 2SD$$

Kategorijo »ŠTEVILNE« lahko opredelimo z intervalom 1131 – 7707 bakterij / μL urinskega sedimenta.

Od 31 rezultatov v tej skupini, jih je bilo 28 (89,3 %), znotraj intervala, ki smo ga določili na osnovi izračuna $\bar{X} \pm 2SD$, 3 pa izven (10,7 %). Ta statistični pristop smo uporabili zato, ker je štetje bakterij pod mikroskopom manj ponovljivo kot v primeru uporabe avtomatskega analizatorja in s tem zagotovili primeren razpon številčnega intervala prešteti bakterij v dani kategoriji.



Graf 2: Grafični prikaz razponov števila bakterij znotraj kategorije »ŠTEVILNE«. Z rdečimi točkami so označene meritve, ki so izven izračunanega intervala.

Določitev številčnega intervala za kategorijo »ZELO ŠTEVILNE«

$$\bar{X}_{ZELO\ ŠTEVILNE} = 9458 \text{ } / \mu\text{L}$$

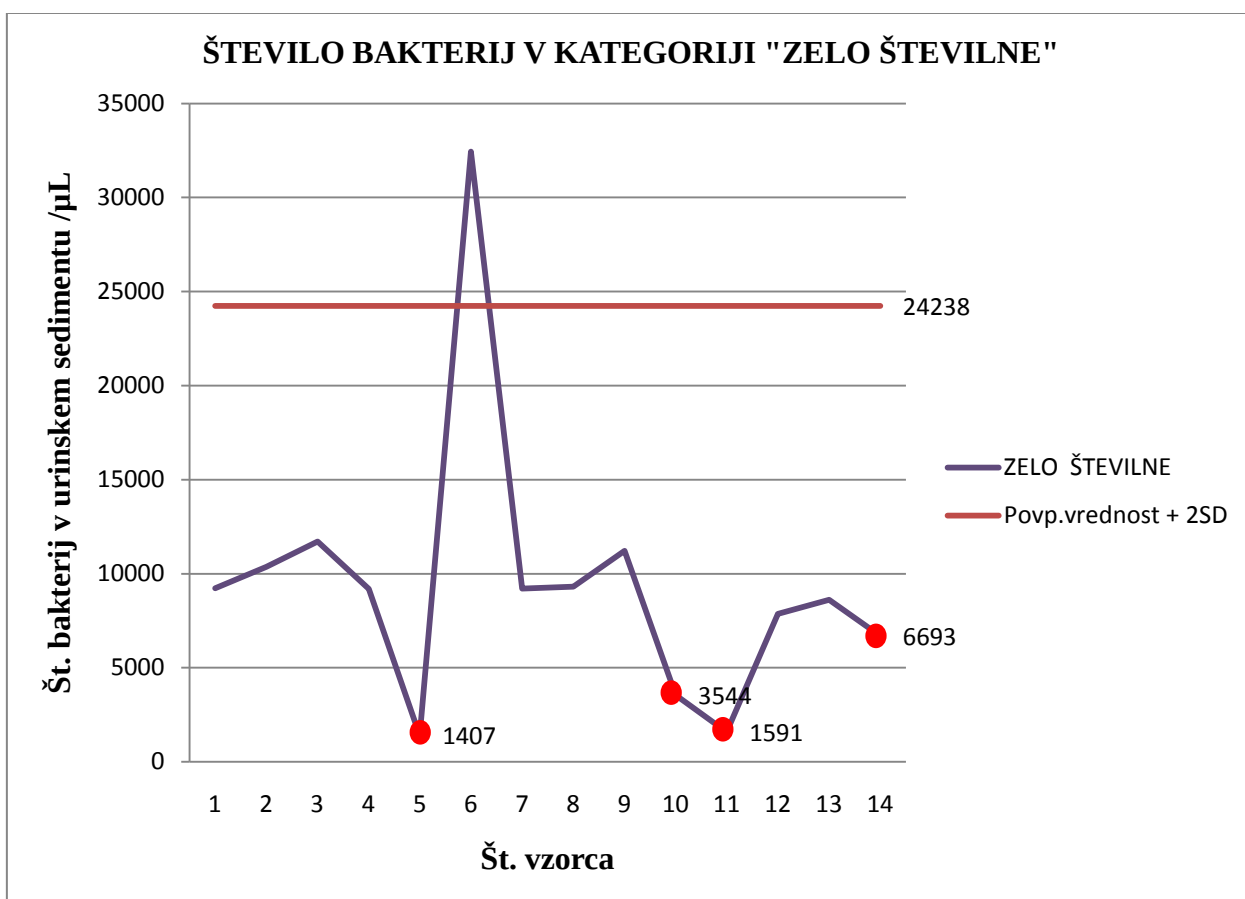
$$SD_{ZELO\ ŠTEVILNE} = 7390$$

$$2SD_{ZELO\ ŠTEVILNE} = 14780$$

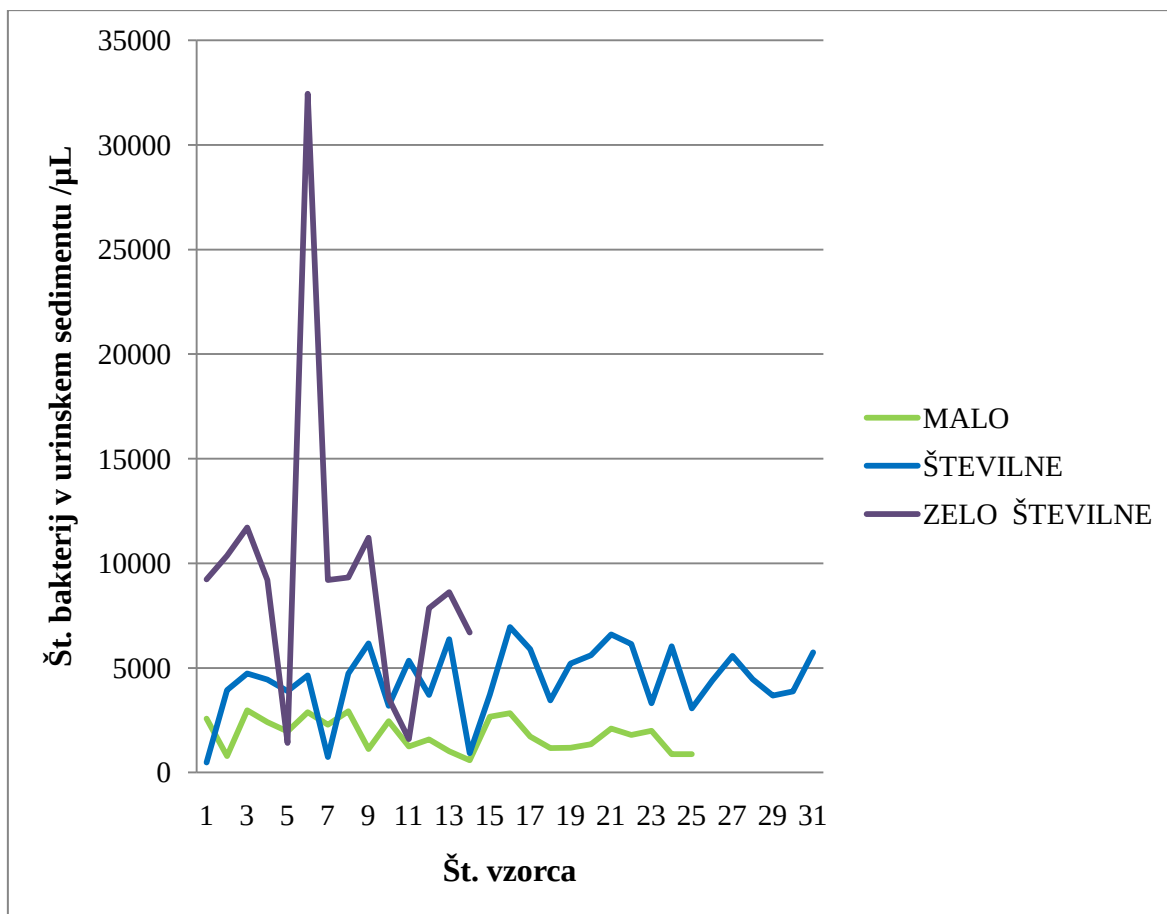
$$\text{Interval: } 9458 \pm 2SD$$

Kategorijo »ZELO ŠTEVILNE« lahko opredelimo z intervalom 0–24238 bakterij / μL urinskega sedimenta.

Od 14 rezultatov v tej kategoriji jih je bilo 10 (60 %) znotraj intervala, ki smo ga določili na osnovi izračuna $\bar{X} \pm 2SD$, 4 (40 %) pa izven. Ta statistični pristop smo uporabili zato, ker je štetje bakterij pod mikroskopom manj ponovljivo kot v primeru uporabe avtomatskega analizatorja in s tem zagotovili primeren razpon številčnega intervala prešteti bakterij v dani kategoriji.



Graf 3: Grafični prikaz razponov števila bakterij v kategoriji »ZELO ŠTEVILNE«. Z rdečimi točkami so označene meritve, ki so izven izračunanega intervala.



Graf 4: Grafični prikaz prešteti bakterij v izbranih vzorcih, znotraj vseh kategorij.

5 RAZPRAVA

Okužbe sečil predstavljajo eno od najpogostejših oblik vnetnih obolenj. Kar 15 % vseh predpisanih antibiotikov gre na način zdravljenja vnetij sečil. Najpogostejši povzročitelji enostavne okužbe so gram negativne bakterije črevesne flore, med katerimi je najpogostejša *E. coli*. Mikroorganizmi v sečila najpogosteje preidejo iz perinealnega dela (presredka) preko sečnice (ascendentna pot). Zaradi razmeroma kratke sečnice zbolevalo ženske 30 krat pogosteje kot moški. Redkeje se vnetje razširi po krvi, limfi ali neposredno iz sosednjih organov. Vnetje mehurja lahko povzročijo tudi drugi mikroorganizmi (virusi ali glivice), ter kemični (npr. citostatiki) ali fizikalni (npr. obsevanje) dejavniki. Okužbe sečil delimo na enostavne in zapletene. Med enostavne uvrščamo vnetje mehurja (cistitis) in vnetje ledvice (pielonefritis), ki se pojavlja predvsem pri mlajših, zdravih ženskah. Med zapletene okužbe pa uvrščamo okužbe pri bolnikih s funkcionalnimi in anatomskimi okvarami sečil (motnje pretoka seča), moških, nosečnicah, bolnikih starih več kot 65 let ter pri tistih s spremljajočimi sistemskimi obolenji z zmanjšano naravno odpornostjo (npr. bolniki s sladkorno boleznijo).

Danes je pregled urina eden izmed najpogosteje izvajanih analiz v laboratoriju, zato zahteva natančno zaznavanje in prepoznavanje bakterij in delcev v odvzetem vzorcu ter hitro ugotovitev oz. potrditev infekcije sečil, da lahko zdravnik začne čim zdraviti ledvične bolezni. Tovrstne rezultate lahko hitro zagotovimo z uporabo analizatorja UF-1000i, pri čemer laboratorijskemu osebju preostane več časa za ostale pomembne naloge.

V analizo smo zajeli 70 vzorcev urina, z rezultati pa izvedli študijo primerljivosti dveh metod določanja bakterij. Uporabili smo prvi jutranji urin pri pacientov, ki so se zdravili na različnih Klinikah UKC Ljubljana.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti katera izmed dveh metod, to je štetje bakterij pod svetlobnim mikroskopom ali z avtomatiziranim analizatorjem, je bolj primerna za določanje prisotnosti teh mikroorganizmov v urinskem sedimentu pri vnetjih in infekcijah sečil. Temeljna naloga vsakega analiznega oziroma diagnostičnega laboratorija je namreč, da daje hitre, točne in zanesljive rezultate.

Čeprav je pojavnost okužb sečil zelo visoka, pa je še vedno velik delež vzorcev, ki jih rutinsko testiramo v mikrobiološkem laboratoriju takšnih, da ne kažejo znakov okužbe. Zato je hitra in zanesljiva presejalna metoda nujna za izločitev negativnih vzorcev in zmanjševanje števila nepotrebnih nadaljnjih analiz. Avtomatizirani analizator Sysmex UF-1000i nam zagotavlja nedvoumne izsledke glede kakršnihkoli indikacij za bakterijske okužbe ali vnetje. To nam omogoča racionalizacijo dodatnih mikrobioloških testov negativnih vzorcev in zmanjšuje število nepotrebnih odločitev za preventivno zdravljenje z antibiotiki.

Metodi štetja bakterij v urinskem sedimentu pod svetlobnim mikroskopom in z avtomatiziranim analizatorjem se že v osnovi razlikujeta glede same izvedbe.

Metoda štetja bakterij v urinskem sedimentu pod svetlobnim mikroskopom ni avtomatizirana in jo opravljamo ročno. To pomeni da moramo vzorec urina najprej centrifugirati, tekoči del odstraniti, ostalo usedlino pa resuspendirati in odpipetirati na ploščico ter mikroskopirati.

Metoda štetja bakterij v urinskem sedimentu z analizatorjem Sysmex UF-1000i pa je avtomatska metoda. Vzorce urina samo vstavimo v aparat, zaženemo program in počakamo na izpis rezultatov. Vsi reagenti, ki jih aparat uporablja so označeni s črtnimi kodami. Čitalec jih prebere, lahko pa podatke o njih vnesemo tudi ročno.

Analizator ima dvosmerno povezavo z LIS (laboratorijski informacijski sistem), kar pomeni da ni potrebno ročno vnašati končnih rezultatov, s čimer se izognemo morebitnim manjšim napakam.

Zaradi avtomatizacije je verjetnost pojavljanja kakršnihkoli napak bistveno manjša, zato se lahko zanesemo na rezultate. Metoda je hitra, saj rezultate dobimo v približno 1 min in enostavna. Aparat lahko v eni uri opravi celotno analizo 100 vzorcev urina, zato je pri veliki količini vzorcev analiza cenejša.

Analizator nam zagotavlja izkoriščanje napredne tehnologije, ki temelji na objektivni analizi, prihranek časa, visoko kakovostne standardizirane rezultate, natančno ugotavljanje prisotnosti in števila delcev v urinu, zmanjšano navzkrižno kontaminacijo, ker celoten postopek poteka v zaprtem sistemu, odkrivanje nizkih koncentracij bakterij, in sicer manj

kot 10^3 CFU /mL, dnevni nadzor kakovosti za vse glavne parametre (visoka in nizka pozitivna kontrola), ter enostavno interpretacijo rezultatov s pomočjo histograma in z jasnimi številčnimi vrednostmi, ki omogočajo strnjen pregled. V merilni sistem, analizatorja UF-1000i so vse vgrajene operacije od aspiracije, redčenja, barvanja in merjenja vzorcev avtomatizirane in zato lahko napake zaradi človeškega dejavnika v veliki meri izključimo.

6 SKLEP

- Z diplomsko nalogo smo dokazali, da je za določanje bakterij v urinskem sedimentu avtomatizirana metoda primernejša od ročne z mikroskopom, saj omogoča analize velikega števila vzorcev na hiter in standardiziran način, kar ima za posledico zmanjšanje delovne obremenitve in hitrejši diagnostični postopek.
- Ugotovili smo, da kvalitativna poimenovanja, ki jih opredelimo z ročno metodo, in sicer »MALO« predstavljajo interval od 258 – 3345 bakterij / μ L urinskega sedimenta, »ŠTEVILNE« interval od 1131 – 7707 bakterij / μ L urinskega sedimenta in »ZELO ŠTEVILNE« interval od 0 – 24238 bakterij / μ L urinskega sedimenta .
- Analizator Sysmex UF- 1000i nam omogoča inteligen način analize urina, saj s standardizirano tehnologijo nadomešča subjektivno vrednotenje in interpretacijo morfologije delcev v urinskem sedimentu. Avtomatizirana metoda je hitrejša, saj so rezultati dostopni že po približno 1 min in ne v urah ali dneh, pri čemer je verjetnost napak majhna.

7 LITERATURA

1. Skitek M.: Osnovna urinska analiza; Zbornik predavanj; Seminar za tehnike laboratorijske medicine; SZKK; Jesenice, Maribor, Ljubljana, Murska Sobota; 2003
2. Plazar Nadja, Pahor Vanja, Berce Klementina: Priporočeni postopki za osnovno analizo urina; SZKK, Ljubljana, 2004
3. Milan Skitek, mag. farm., spec. in Alenka Trampuš Bakija, univ. dipl. biol.: Priporočeni postopek za odvzem, zbiranje, hranjenje, stabiliziranje in transport urina; SZKK, Ljubljana, 2001
4. Avberšek – Lužnik I., Gregurič Silič B.: Citološka in bakteriološka analiza urina; Zbornik predavanj; Slovensko združenje za klinično kemijo; Celje, Jesenice, Ljubljana; 2006
5. Giovanni B. Fogazzi, Claudio Ponticelli, Eberhard Ritz : The urinary sediment: an integrated view second edition. Masson s.p.a. Oxford, 2006
6. Stropnik Z.: Normalna flora v sečilih. Zbornik strokovnega srečanja. Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije, Ljubljana, 1993
7. Gubina M., Ihan A.: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Ljubljana, Medicinski razgledi, 2002
8. Kocjančič, Mrevlje, Štajer: Interna medicina; Ljubljana, 2005
9. Lindič J.: Okužbe sečil; Krka Med Farm, 2003
10. Dermota U., Greek Košnik I.; Mikrobiološke preiskave urina: Sandford in uritest. Fajdigovi dnevi, Ljubljana, 2001
11. Avtomatizacija osnovne urinske analize; Vaje pri predmetu Instrumentalne tehnike v biomedicinskih laboratorijih, Fakulteta za farmacijo, šol.leto 2008/09
12. Sysmex Corporation; Instructions for use; Sysmex UF- 1000i, Kobe; Japan, 2007
13. Snoj N., Modica Kobe J.: Morfološka opredelitev sestavin sečne usedline; Zbornik predavanj; SZKK, Novo Mesto, Jesenice, Ljubljana, 2005
14. Marc J.: Navodila in dnevnik za vaje iz klinične biokemije I, tretja dopolnilna izdaja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008
15. Adamič Š.: Temelji biostatistike; Medicinska fakulteta univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani; Ljubljana, 1989

16. Fogazzi G B, Passerini P, Ponticelli C, Ritz E: The urinary sediment: an integrated view. London: Chapman & Hall Medical, 1994