

Tehnici microscopice paralele utilizate în analiza sedimentului urinar

The use of parallel microscopic techniques in the analysis of the urinary sediment

Sorin Gîju *

Spitalul Clinic Județean de Urgență Timișoara, Laboratorul Central de Analize

Rezumat

Scopul lucrării este de a prezenta diferitele tipuri de tehnici microscopice utilizate în laborator pentru examinarea sedimentului urinar.

Microscopia în câmp luminos se mai folosește și astăzi, dar elementele sedimentului urinar nu se diferențiază prea bine de fondul lamei, mai ales cele cu un indice de refracție mult mai scăzut, cum ar fi cilindrii hialini și eritrocitele cu conținut redus de hemoglobină.

Microscopia în contrast de fază se bazează pe folosirea unui condensator special și a unui obiectiv special. Condensatorul conține o diafragmă specială inelară care transformă raza de lumină într-un con de lumină de intensitate mai redusă iar obiectivul conține în planul său focal posterior un inel circular - inelul de fază - care este acoperit de un strat subțire și translucid de argint. Microscopia în lumină polarizată necesită un microscop echipat cu două filtre de polarizare a luminii: unul numit polarizor și celălalt numit analizor.

Bazându-ne pe experiența noastră precum și pe datele existente în literatură putem să concluzionăm că pentru identificarea cu precizie a tipurilor de elemente de sediment este necesar paralelismul tehnicilor microscopice.

Abstract

The aim of the work is to show the different types of microscopic techniques used in our laboratory for the examination of the urinary sediment.

Bright field microscopy is still used today for the analysis of the urinary sediment, but with this type of microscopy the elements of the sediment are poorly differentiated from the background of the slide, especially the elements with a low refractive index (hyaline casts, red blood cells with low hemoglobin content).

Phase contrast microscopy is based on the use of a special condenser and a special objective. The condenser has an annular diaphragm which transforms the incident light into a hollow cone of light. The objective contains in its posterior focal plane a circular ring, the so-called phase ring which is covered with a translucent

* **Adresa pentru corespondență:** Sorin Gîju, Str. Timiș nr. 16-18, sc. B, apt. 37, Timișoara, cod 300650, Jud. Timiș, Romania
Tel.: 0256/447039, Mobil.: 0744/771368, E-mail: soringiju@yahoo.com

layer of silver.

Polarized light microscopy requires a microscope equipped with two polarization filters: the polarizer and the analyzer.

Based on our experience as well as on the references data we can say that for a certain identification of the urinary sediment elements it is necessary to us the parallelism of the microscopic techniques.

Scopul lucrării este de a prezenta diferitele tipuri de tehnici microscopice utilizate în laborator pentru examinarea sedimentului urinar.

Microscopul optic este format, în esență, din două sisteme de lentile cuplate^{1,10} (Fig 1):

- obiectivul este un sistem de lentile cu distanța focală de ordinul milimetrilor (mm), situat către obiectul examinat; obiectivul formează imaginea primară, reală și mărită a obiectului examinat;
- ocularul este un sistem de lentile cu distanța focală de ordinul centimetrilor, situat către ochiul examinatorului; el funcționează ca o lupă care preia imaginea primară formată în

interiorul distanței sale focale și o transformă în imagine virtuală, mult mărită.

Obiectivul microscopului este format din mai multe lentile convergente fixate la capătul unui tub cilindric filetat ce se înșurubează în revolver. Fiecare revolver prezintă 4-5 orificii în care pot fi înșurubate tot atâtea obiective cu putere de mărire și apertură numerică foarte diferită care pot fi schimbate prin rotirea revolverului.

În complexul optic al obiectivului prima lentilă sau primele grupe de lentile asigură puterea de mărire a lentilelor iar restul grupelor de lentile asigură corecțiile aberațiilor sferice și cromatice.

Obiectivele uscate sunt obiective mici, cu putere de mărire de 10 X, 20 X, 40 X, 60 X; sunt numite astfel deoarece mediul care se interpune între lentila frontală a obiectivului și preparat este aerul.

Obiectivele umede (cu imersie) sunt obiective mari, cu o putere de mărire de 90 X, 100 X, 120 X; sunt numite astfel deoarece mediul care se interpune între lentila frontală a obiectivului și preparat este un lichid de imersie¹. (Fig. 2 - Fig. 3, Fig. 4)

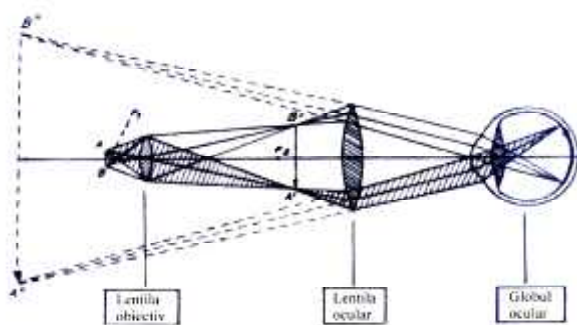


Fig.1.Principiul de funcționare a microscopului optic:

AB-obiectul,

F₁-focarul obiectivului

A'B'-imaginea reală, mărită și răsturnată a obiectului plasată la o distanță mai mică decât distanța focală a ocularului, mai aproape de focar.

F₂-focarul ocularului

A''B''-imaginea virtuală mult mărită și răsturnată, în raport cu obiectul.

Microscopia în câmp luminos se mai folosește și astăzi, dar elementele sedimentului urinar nu se diferențiază prea bine de fondul lamei, mai ales cele cu un indice de refracție mult mai scăzut, cum ar fi cilindrii hialini și eritrocitele cu conținut redus de hemoglobină⁸. Din această cauză riscul omiterii unor elemente ale sedimentului urinar este destul de crescut^{4,5}. (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7a, Fig. 7b, Fig. 8).

Microscopia în contrast de fază se

bazează pe folosirea unui condensator special și a unui obiectiv special. Condensatorul conține o diafragmă specială inelară care transformă raza de lumină într-un con de lumină de intensitate mai redusă. Obiectivul conține în planul său focal posterior un inel circular - inelul de fază – care este acoperit de un strat subțire și translucid de argint (Fig. 9).

Principiul de funcționare

După ce penetrează obiectul de studiat, raza de lumină este compusă din lumină directă

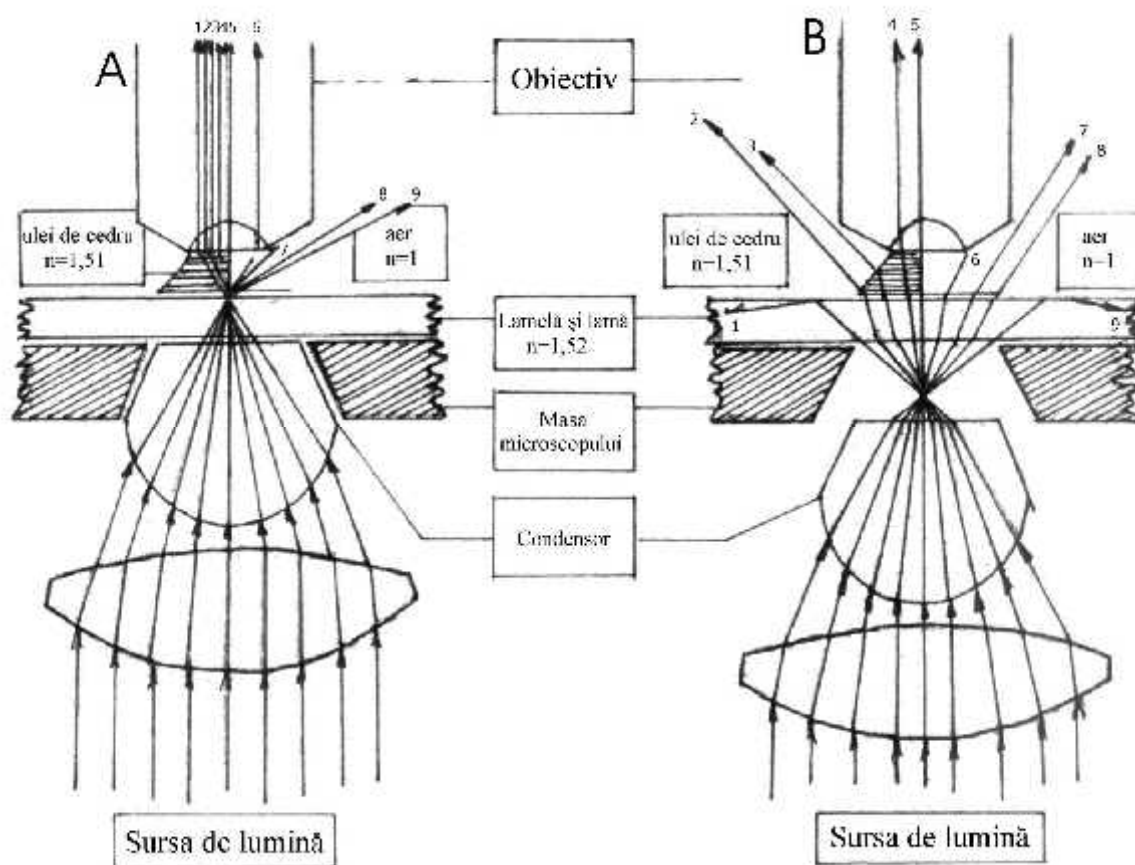


Fig2-Fig3.Principiul de funcționare al obiectivului cu imersie

Uleiul de cedru dintre preparat și lentila frontală a obiectivului previne pierderea prin refracție a razelor cu valoare în formarea imaginii (razele 1-5), imaginea apare cu detalii pe câmp microscopic bine luminat. În lipsa uleiului de cedru, o parte din razele cu valoare în formarea imaginii sunt pierdute prin refracție în aer (razele 7-9), imaginea apare săracă pe câmp microscopic insuficient iluminat.



Figura 4. Obiectiv cu imersie (umed) - parametrii grași pe montura unui obiectiv



Fig.5. Cristal de leucină și hematii. MO x 400. (colecție personală)

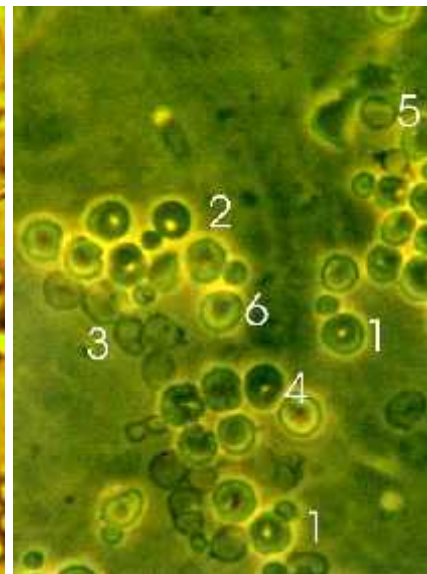


Fig.6. Hematii dismorfe (acantocite)(1). MO x 640



Fig. 7a



Fig. 7b

Figura 7. Macrocilindru de tip ciros (1) cu capetele pătrate și cu câteva incluzii eritrocitare. Se observă omogenitatea și intensitatea culorii roșii. Spre deosebire de cilindrul hialin (2) mai mic de asemenea colorat dar având o cloare roșie mai pală a matricei hialine. Colorație Sternheimer-Malbin. MO x 100 (fig.7a). MCF x 100 (fig.7b). (colecție personală)



Fig.8. Cilindru ciros convolut (1) alături de cilindrii granuloși (2) și izolat un cilindru ciros simplu (3). MCF x 200 (colecție personală)

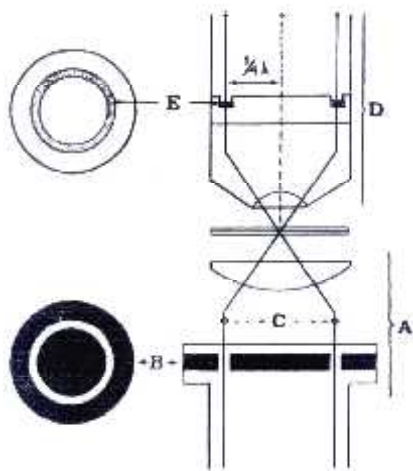


Fig.9.Schema optică a microscopului cu contrast de fază (M.C.F)

A-condensor

B-diafragma anulară a condensorului

C-haloul conului de lumină

D-obiectiv

E-inel de fază cu un gel translucid de argint (punctat de aria gri)

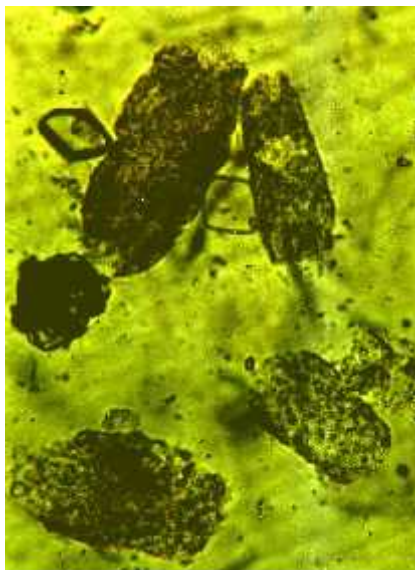


Fig. 10a

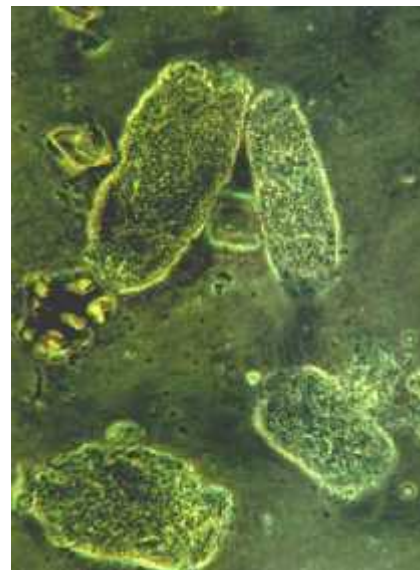


Fig. 10b

Fig.10a, Fig.10b-Cilindri granulosi de tip II prezentând o textură omogenă alături de cristale romboidale de acid uric. MO x 640 (Fig.10a), MCF x 640 (fig.10b), (colecție personală)

și din lumina difractată ai căror fotoni au interacționat cu obiectul de studiat. În timp ce lumina directă trece prin inelul de fază, lumina difractată trece doar prin zonele mai subțiri din jurul inelului de fază. Această diferență între drumul parcurs de fiecare rază de lumină determină o diferență de fază între cele două raze de aproximativ un sfert de lungime de undă. În acest mod se obține un clar contrast între fondul lamei, care apare mai întunecat și elementele care trebuie observate și care au o luminozitate mai accentuată. Această diferență de luminozitate este caracteristică pentru contrastul de fază.

Principala caracteristică a

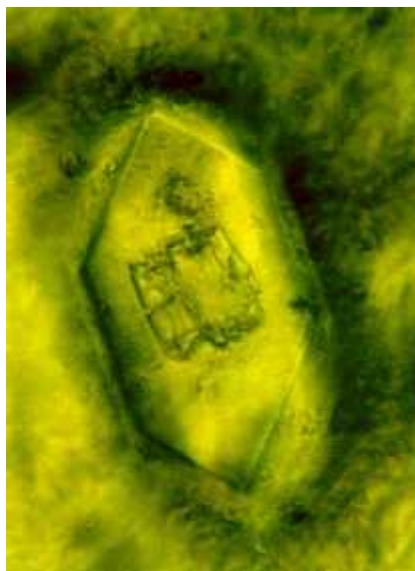


Fig. 11a



Fig. 11b

Figura 11. Macrocrystal de fosfat bimagnezian având încastrat un cristal de fosfat de calciu (de formă neregulată). MO x 640 (Fig.11a), MCF x 640 (Fig.11b). (colecție personală)

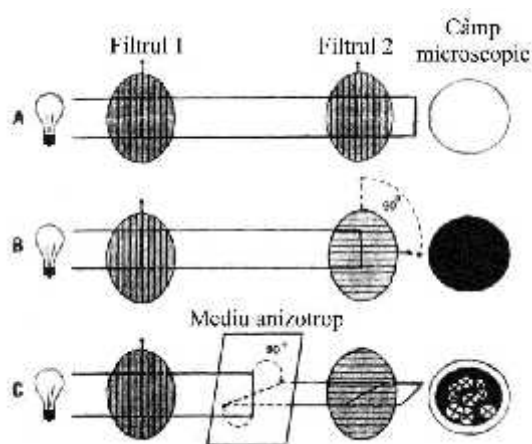


Figura 12. Principiul microscopului cu lumină polarizată (M.L.P)

A-cele două filtre de polarizare sunt așezate în paralel; lumina trece prin ambele iar câmpul microscopic este vizibil

B-filtrul 2 este rotit cu 90°, lumina este absorbită de filtrul 2 iar câmpul microscopic se întuneacă.

C-un obiect (mediu) anizotrop este plasat între cele două filtre, planul de vibrație a luminii care a trecut de filtrul 1 este schimbat și doar o parte din lumină ajunge la ochi arătând un obiect strălucitor birefringent pe un fundal negru.

microscopiei în contrast de fază este prezența unui halou, o zonă mai luminoasă în jurul obiectelor mai întunecate și o zonă mai întunecată în jurul obiectelor mai clare. Microscopul cu contrast de fază este mult mai util și mai bun decât microscopul cu câmp luminos.

Majoritatea elementelor sedimentului urinar pot fi observate cu ușurință folosind microscopul cu contrast de fază, inclusiv lipidele, cilindrii hialini și eritrocitele cu un conținut redus de hemoglobină. Microscopul cu contrast de fază este prevăzut cu o lentilă care centrează inelul condensatorului pe inelul de fază al obiectivului (așa numitul telescop de fază sau microscop auxiliar) (Fig. 10a, Fig. 10b, Fig. 11a, Fig. 11b).

Atunci când se trece la folosirea unui

obiectiv mai mare, condensatorul inelar trebuie schimbat în același timp deoarece inelul diafragmei anulare și inelul obiectivului trebuie să se potrivească. Din cauza acestui lucru microscopul modern sunt prevăzute cu mai multe diafragme inelare și cu obiective corespunzătoare.

Cu ajutorul microscopului cu contrast de fază, examinarea în lumină polarizată este, de asemenea, posibilă, dar rezultatele nu sunt atât de bune ca și atunci când se folosește polarizarea luminii obținută folosind un microscop cu câmp luminos. Totuși, având în vedere faptul că obiectivele de contrast de fază pot fi folosite și utilizând condensatoarele obișnuite, este suficientă schimbarea condensatorului din contrast de fază în poziția pentru câmp luminos în vederea obținerii unei polarizări perfecte⁹.

Microscopia în lumină polarizată necesită un microscop echipat cu două filtre de polarizare a luminii: unul numit **polarizor** și celălalt numit **analizor** (Fig. 12).

Principiul de funcționare

Razele luminoase nepolarizate pătrund în prisma Nicol printr-una din fețele sale: ele sunt descompuse în două raze care vibrează în unghi drept una față de cealaltă:

- rază ordinală care se supune legilor refracției și suferă o reflexie totală;
- rază extraordinară care este transmisă cu altă viteză și ale cărei vibrații se stabilesc în planul figurii.

Lumina transmisă prin prisma Nicol este deci polarizată într-un singur plan. Dacă un al doilea Nicol este plasat în serie cu primul și într-o poziție identică cu acesta, lumina polarizată este transmisă. Prin rotirea analizorului cu 90°, prismele Nicol devin încrucișate, câmpul vizual devenind întunecat. În această situație dacă între cei doi Nicoli se interpune un corp birefringent, el devine strălucitor ceea ce indică faptul că a fost polarizat de lumina care îl traversează. Dacă se rotește încă o dată analizorul cu 90°, câmpul devine obscur.

Unghiul de rotație al celei de-a doua prisme necesar pentru a stabili obscuritatea, măsoară de-

viața planului de polarizare al luminii prin obiectul interpus.



Fig. 13a

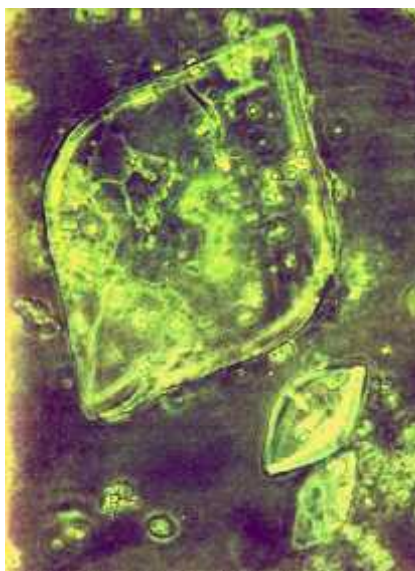


Fig. 13b

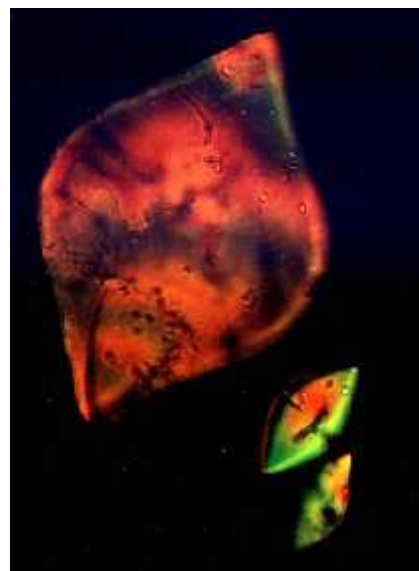


Fig. 13c

Figura 13. Macrocrystal alături de două microcristale ovoidale de acid uric. MO x 640 (filtru verde) (Fig.13a), MCF x 640 (filtru verde) (Fig.13b), MLP x 640 (Fig.13c). (colecție personală)

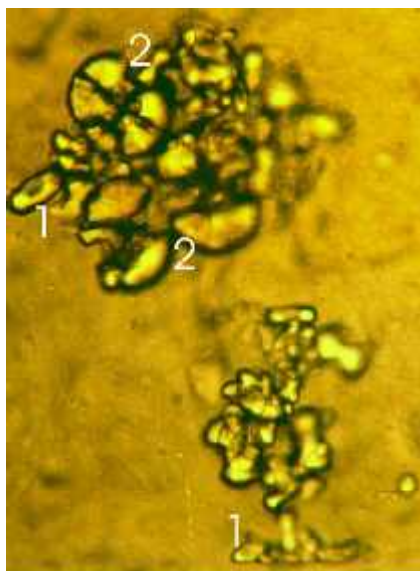


Fig. 14a

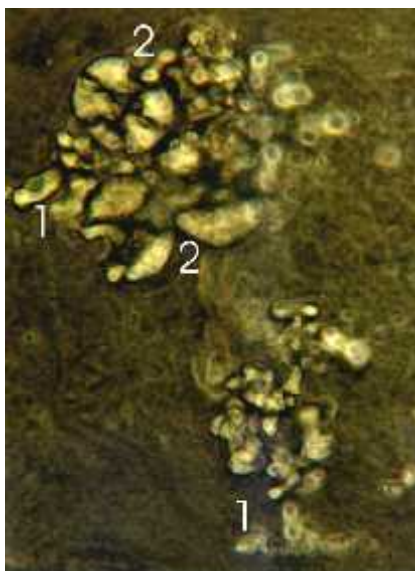


Fig. 14b

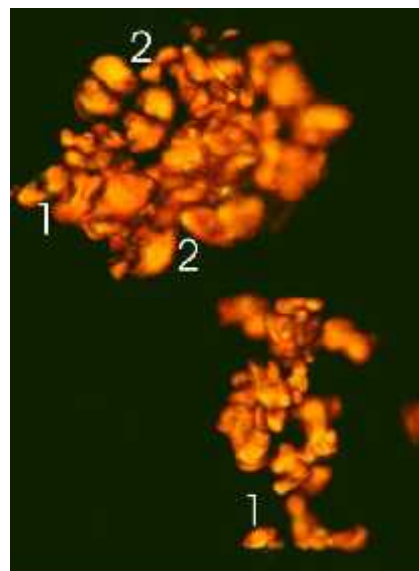


Fig. 14c

Figura 14. Agregat cristalin de oxalat de calciu monohidrat(cu aspect de „trunchi de copac” (1) și de „halteră” sau „papion” (2).Unii autori consideră că forma „halteră” reprezintă o variantă mai aparte de oxalat de calciu dihidrat. MO x 640 (fig.14a), MCF x 640 (fig.14b), MLP x 640 (fig.14c). (colecție personală)

Unul din filtre este plasat dedesubtul condensatorului și celălalt se plasează deasupra obiectivului. Rotind filtrul inferior cu 90° se obține întunecarea câmpului microscopic.

Când un obiect anizotrop este plasat între cele două filtre, planul de oscilație al razei de lumină este modificat în urma interacțiunii cu particulele anizotrope ale obiectului aflat în studiu și numai o parte din raza de lumină ajunge la ochiul privitorului. Elementele care polarizează lumina sunt observate ca particule strălucitoare pe fond întunecat. Acest fenomen este cunoscut sub numele de birefrință^{6,7}. În sedimentul urinar există câteva tipuri de cristale care polarizează lumina (sunt birefringente): acidul uric, oxalatul de calciu monohidrat, fosfatul amoniaco-magnezian (fosfatul triplu), fosfatul de calciu, cistina, leucina^{2,3} (Fig. 13a, Fig. 13b, Fig. 13c, Fig. 14a, Fig. 14b, Fig. 14c, Fig. 15a, Fig. 15b, Fig. 15c, Fig. 16).

Alte tehnici microscopice

Microscopia cu imunofluorescență permite identificarea naturii matricei cilindrilor și a granulațiilor acestora. Mai recent a fost folosită pentru diferențierea cilindrilor nepatogeni de cei cauzati de glomerulonefrite și pentru identificarea pacienților cu gamapati monoclonale. Imunofluorescența folosind seruri împotriva proteinelor Tamm-Horstfall a fost propusă pentru folosirea în vederea diferențierii hematuriei glomerulare de cea neglomerară^{6,7} (Fig. 17).

Microscopia în contrast de fază cu interferență (interference contrast microscopy) furnizează imagini tridimensionale ale obiectelor de studiat. Aceasta oferă imagini foarte frumoase, dar valoarea sa diagnostică nu este cu nimic superioară microscopiei în contrast de fază. Mai mult însă, are și o rezoluție limitată din punct de vedere al profunzimii penetrării^{6,7} (Fig. 18).

Microscopia electronică (scanning electron microscopy) folosește la identificarea

unor varietăți de cilindri și a eritrocitelor dismorfice⁷.

Microscopia electronică cu transmisie (transmission electron microscopy) a fost utilizată pentru identificarea fibrilelor de amiloid în urina pacienților cu amiloidoză renală. Totuși, utilizarea ei în acest scop a fost contestată de alții. Această tehnică poate evidenția celulele tubulare necrotice din sedimentul urinar al pacienților cu insuficiență renală acută. De asemenea, se pot observa corpusculii de mielină în interiorul celulelor epitelului tubular renal la pacienții cu nefrotoxicitate aminoglicozidică și cu boala Fabry⁷.

Confocal scanning laser microscopy este o tehnică microscopică recent pusă la punct, care este folosită și pentru studiul eritrocitelor urinare⁷.

Rezultate și discuții

1. Cristalele de acid uric sunt birefringente în proporție de 100%, furnizând imagini deosebite prin spectaculozitatea lor și prin aspectul policromatic, caracteristic pentru acest tip de cristale. Uratul amorf este, de asemenea, intens birefringent².
2. Fosfatul amoniaco-magnezian rotește planul luminii polarizate tot în proporție de 100% din cazuri. Formele tipice de fosfat triplu – “capac de sicriu” apar de culoare galben-portocalie pe fondul întunecat al lamei. Cristalele de fosfat de calciu sunt puternic birefringente⁶.
3. În cele mai multe cazuri, oxalatul de calciu bihidrat – “plic de scrisoare” nu este birefringent; aceasta apare în condițiile în care cristalele au dimensiuni mari sau se află în număr foarte mare și formează agregate. Cristalele de oxalat de calciu monohidrat, cu formă tipică de “trunchi de copac” sunt întotdeauna birefringente, acesta fiind chiar un criteriu de diferențiere a lor de hematii care nu rotesc planul luminii polarizate. Fosfatul amorf nu polarizează lumina³.
4. Cristalele de cistină prezente în urina



Fig. 15a



Fig. 15b



Fig. 15c

Figura 15. Cilindru de urat izolat în sedimentul urinar al unui pacient cu nefropatie gutoasă. MO x 640 (Fig.15a), MCF x 640 (Fig.15b), MLP x 640 (Fig.15c). (colecție personală)

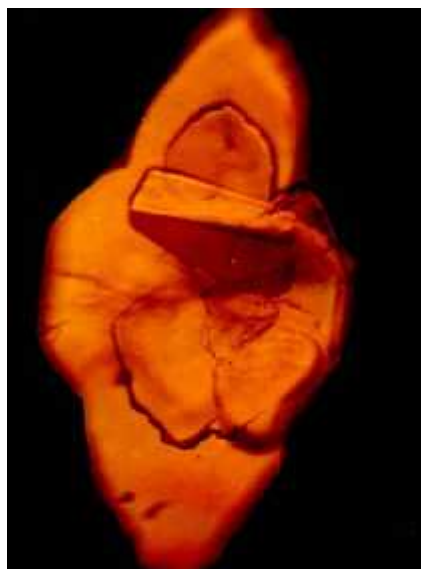


Figura 16. Macrocristale de acid uric situate perpendicular unul pe celălalt. MLP x 640. (colecție personală)



Figura 17. Cilindru cu depozite de IgG. Imunofluorescență cu ser anti-IgG (x 400). (colecție personală)



Figura 18. Acanthocite – imagine tridimensională. MCI x 400. (colecție personală) (MCI - microscopie cu contrast de interferență) Axio Imager – Microscopy from Carl Zeiss

pacienților cu cistinurie sunt intens birefringente iar cristalele de leucină, prezente în urina pacienților cu insuficiență hepatică, formează pseudo-cruci de Malta în lumină polarizată.

Concluzii

Bazându-ne pe experiența noastră precum și pe datele existente în literatură putem să concluzionăm că, pentru identificarea cu precizie a tipurilor de cilindri urinari, este necesar paralelismul tehnicilor microscopice.

Microscopia cu contrast de fază se dovedește a fi utilă în identificarea cilindrilor hialini datorită indicelui de refracție foarte redus.

Utilizarea luminii polarizate pentru studiul cristalelor prezente în sedimentul urinar prezintă câteva avantaje:

1. Permite recunoașterea facilă a elementelor birefringente prezente în sediment și completează tehnicile analitice de determinare a structurii cristalelor existente în urină.
2. Cu ajutorul ei poate fi confirmată prezența cristalelor care rotesc planul luminii polarizate (acidul uric, uratul amorf, oxalatul de calciu monohidrat, fosfatul triplu, fosfatul de calciu, cistina, leucina)
3. Contribuie la creșterea preciziei în examinarea și recunoașterea cristalelor prezente în sedimentul urinar.
4. Fotografiile executate în microscopia în lumină polarizată reprezintă un excelent material didactic.

Abrevieri

MO - microscopie optică obișnuită

MCF - microscopie cu contrast de fază

MLP - microscopie în lumina polarizată.

Bibliografie

1. BUIUC, D.; NEGUȚ, M. - Tratat de microbiologie clinică, Editura Medicală, București, 1999.
2. CAMERON J. S., MORO F., SIMMONDS H. A - Uric acid and the kidney. în DAVISON A.M., CAMERON J.S., GRUNFELD J-P., KERR N.S., RITZ E., WINERS Cr.G., (ed.) - Oxford Text Book of Clinical Nephrology, Oxford University Press, 1997.
3. COE, F-L., PARKS, J-H. - Nephrolithiasis, Pathogenesis and treatment, Second Edition - Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, London, Boca Raton, 1988.
4. FISCHBACH F. T. - Microscopic examination of sediment în FISCHBACH F. T. (ed.) - A Manual of Laboratory Diagnostic Tests. Second Edition. J.B. Lippincott Company Philadelphia. 1984; 2: 141-148.
5. FOGAZZI G.B., FENILI D. - Urinalysis and microscopy în DAVISON A.M., CAMERON J.S., GRUNFELD J-P., KERR N.S., RITZ E., WINERS Cr.G., (ed.) - Oxford Text Book of Clinical Nephrology, Oxford University Press, 1997.
6. FOGAZZI G.B. - Crystaluria; a neglected aspect of urinary sediment analysis - Nephrol Dial Transplant 1996; 11: 379-387.
7. FOGAZZI, G.B., PONTICELLI, C., RITZ, E. - The urinary sediment, Second Edition, Oxford University Press, New York, 1999.
8. FOGAZZI G.B., GRIGNANI S. - Urine microscopic analysis - an art abandoned by nephrologist?, *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2485-2487.
9. FOGAZZI G.B., PASSERINI P., BAZZI M. et al. - Use of high power field in the evaluation of formed elements of urine. *J Nephrol* 1989; 2: 107-112.
10. MOHAN G. - Fotografia la microscop, Editura tehnică, București, 1981.