

INTERPRETAÇÃO E USO CLÍNICO DA PESQUISA DE DISMORFISMO ERITROCITÁRIO NO SEDIMENTO URINÁRIO

CLINICAL UTILITY AND INTERPRETATION OF SCREENING FOR URINARY ERYTHROCYTE DYSMORPHISM

Liriane Comerlato, Francisco José Veríssimo Veronese, André Aozani Prochnow, Luiz Felipe Santos Gonçalves

RESUMO

Introdução: O dismorfismo eritrocitário urinário foi descrito há vários anos e tem sido usado para identificar os sangramentos glomerulares e para orientar a investigação subsequente. Este estudo avalia a variabilidade na análise do dismorfismo eritrocitário por diferentes observadores, verificando a correlação entre as observações e sua associação com o diagnóstico etiológico das hematúrias.

Métodos: Foram selecionadas 18 amostras de sedimento urinário de pacientes com hematúria glomerular e não-glomerular, cujas imagens foram capturadas por um programa de análise de imagens e gravadas em meio magnético. Essas imagens foram analisadas por doze observadores treinados na análise de dismorfismo eritrocitário que atuam em laboratórios de análises clínicas de Porto Alegre. Os observadores, cegos em relação ao diagnóstico etiológico da hematúria, classificaram as amostras pela presença ou ausência de dismorfismo e estimaram a porcentagem de hemácias dismórficas em relação ao seu número total.

Resultados: Utilizando o ponto de corte de 75% de hemácias dismórficas como diagnóstico de hematúria glomerular, o diagnóstico correto foi obtido em 79% das observações. A sensibilidade foi de 76%, e a especificidade de 82%, com valores preditivos positivo e negativo de 80% e 78% respectivamente. A correlação entre as observações foi calculada com o uso de coeficiente kappa, observando-se uma concordância moderada ($\kappa = 0,58$).

Conclusões: Este estudo demonstrou que, a despeito da ausência de critérios rígidos de avaliação e classificação do dismorfismo, sua realização por profissionais capacitados apresenta um nível aceitável de acurácia e concordância, justificando seu uso na avaliação de pacientes com hematúria.

Unitermos: Dismorfismo eritrocitário, hematúria, variabilidade interobservador.

ABSTRACT

Introduction: Urinary erythrocyte dysmorphism was described long ago and has been used to identify glomerular bleeding and to guide subsequent investigation. The aim of this study was to analyze the variability of erythrocyte dysmorphism observation performed by several observers, evaluating the correlation between the observations and their association with etiologic diagnosis of hematuria.

Methods: Eighteen urinary sediment samples from patients with glomerular and non-glomerular hematuria were studied. Their images were captured by phase-contrast microscopy and saved for later analysis. These images were analyzed by 12 observers experienced in

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS. Correspondência: Luiz Felipe Santos Gonçalves, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Nefrologia, Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS. Tel.: (51) 2101.8295. Fax: (51) 2101.8121. E-mail: lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br.

erythrocyte dysmorphism evaluation who work in clinical laboratories in Porto Alegre, Brazil. The observers, who were blinded to the etiologic diagnosis of hematuria, classified the samples according to the presence or absence of erythrocyte dysmorphism and estimated the percentage of dysmorphic erythrocytes in relation to total number.

Results: Correct diagnoses were obtained in 79% of the observations, considering 75% as the cut-off point of dysmorphic erythrocytes for the diagnosis of glomerular hematuria. Sensitivity and specificity were 76 and 82%, respectively; positive predictive value was 80% and negative predictive value was 78%. Agreement among observers was calculated using the kappa coefficient, which showed a moderate agreement (kappa = 0.58).

Conclusions: Our study demonstrated that, despite the absence of strict criteria for assessing and classifying dysmorphism, the performance of urinary erythrocyte dysmorphism test by skilled professionals presents an acceptable level of accuracy and agreement, which supports its use in the evaluation of patients with hematuria.

Keywords: Erythrocyte dysmorphism, hematuria, interobserver variability.

INTRODUÇÃO

Desde a sua introdução na prática clínica, a partir da publicação de Birch & Fairley em 1979 (1), a observação do dismorfismo das hemácias no sedimento urinário tem sido um importante recurso na avaliação diagnóstica de pacientes com microhematúria assintomática. Essa simples observação microscópica pode auxiliar no direcionamento subsequente da investigação da hematúria para doenças parenquimatosas renais (essencialmente glomerulares) mediante exame positivo para dismorfismo ou do trato urinário em caso contrário. Tal importância adquire maior magnitude se considerarmos a prevalência de hematúria microscópica assintomática, que varia de 3 a 22% em diferentes estudos (2,3), e a ausência de outros sinais ou sintomas que possam auxiliar na investigação. Entretanto, a pesquisa do dismorfismo das hemácias se apóia em uma observação subjetiva e propensa a variações na avaliação por diferentes indivíduos. Além disso, os critérios que definem a presença de dismorfismo e a forma de caracterizá-lo também apresentam grande variabilidade na literatura. Assim, a maioria dos estudos publicados e grande parte dos laboratórios de análises clínicas no nosso meio descrevem a presença de dismorfismo em contagens percentuais, sendo os pontos de corte que definem dismorfismo amplamente variáveis nos estudos publicados. Em 13 desses estudos selecionados, o ponto de corte mínimo de células dismórficas necessário para o diagnóstico de hematúria glomerular variou de 10 a 90% (4-17). Outros autores têm utilizado como critério diagnóstico de dismorfismo a presença de uma forma específica de hemácias: os acantócitos (9). Adicionalmente, o seu uso na prática assistencial, quando realizado pelos laboratórios de análises clínicas, não permite o

estabelecimento de pontos de corte, da sensibilidade, especificidade e de valores preditivos negativos e positivos, desejáveis em qualquer teste diagnóstico. Dois relatos na literatura avaliaram a variabilidade entre dois diferentes observadores na pesquisa de hemácias dismórficas. Nessas séries, houve boa correlação na interpretação do dismorfismo, porém a avaliação desses resultados fica limitada pelo pequeno número de observadores (11,18). O objetivo deste estudo foi avaliar o real impacto da variação interobservador na análise do dismorfismo e sua correlação com o diagnóstico da fonte do sangramento e discutir a interpretação dessa observação na prática clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 18 pacientes dos Ambulatórios de Urologia e Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de julho a dezembro de 2002. Desses pacientes, nove apresentavam sangramento de origem glomerular, com diagnóstico confirmado por biópsia renal, e nove apresentavam hematúria não-glomerular, com diagnóstico estabelecido por urografia excretora, ecografia do aparelho urinário, exame anatomopatológico ou urocultura com crescimento bacteriano superior a 100.000 unidades formadoras de colônia por mL. Os pacientes com mais de uma possível causa para o sangramento foram excluídos da análise. As amostras de urina foram coletadas por micção espontânea, na segunda micção da manhã, e armazenadas em frascos estéreis. A presença de hematúria foi confirmada por exame de fita-teste. O exame do sedimento urinário foi realizado de forma padronizada, com microscopia de contraste de fase por um único pesqui-

sador. As imagens das hemácias em aumento de 400x foram selecionadas, e a captura digital das mesmas foi obtida através de programa de captura e análise de imagens (Image-Pro Plus 4.0, Maryland, USA). As imagens relativas a cada exame foram editadas e gravadas em meio magnético, sendo organizadas em diferentes pastas relativas a cada exame. O número de imagens de cada pasta variou de acordo com a intensidade da hematúria, observando-se o critério do número mínimo de cem hemácias por amostra.

Foram convidados a participar do estudo 12 observadores com experiência na avaliação de dismorfismo eritrocitário, responsáveis pela realização desse exame em laboratórios de análises clínicas de Porto Alegre. Os observadores que concordaram em participar do estudo analisaram as imagens, supervisionados por um dos investigadores, cegos em relação ao diagnóstico definitivo dos pacientes. Cada exame foi classificado pela presença ou ausência de dismorfismo eritrocitário e pela porcentagem estimada de hemácias dismórficas em relação ao número total de hemácias. A idade, o tempo de experiência e a experiência prévia com microscopia de contraste de fase de cada observador também foram avaliados. Os dados foram analisados utilizando testes para avaliar a proporção de acertos diagnósticos, bem como os falsos positivos e negativos. Os erros padrão e amostral foram calculados considerando um nível de confiança de 95%, e as análises de correlação foram rea-

lizadas utilizando os coeficientes de Pearson, kappa e Phi. Valores de kappa superiores a 0,8 expressam uma concordância excelente; entre 0,61 e 0,8, concordância boa; entre 0,41 e 0,60, concordância moderada; e um kappa igual ou inferior a 0,4 expressa uma concordância medíocre a pobre. O valor de $p < 0,05$ foi adotado para significância estatística.

RESULTADOS

Foram obtidos 216 diagnósticos dicotômicos sobre 18 exames de pesquisa de dismorfismo eritrocitário por 12 observadores. Dois diagnósticos não foram dados pelos observadores entrevistados. Os resultados dos 18 exames eram previamente conhecidos, sendo utilizados como padrão ouro para a comparação de acertos diagnósticos.

Sobre os 216 diagnósticos, foi realizada uma análise técnica de consistência dos diagnósticos, com base no padrão de análise da literatura, considerando como ponto de corte para o diagnóstico de patologias glomerulares a presença de valores superiores a 75% de dismorfismo. Com base nessa análise, foram considerados inválidos 34 diagnósticos. Considerados os dois diagnósticos ausentes, a amostra restante constou de 180 observações. As características dos observadores e seus respectivos acertos estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos e do número de acertos por observador

Observadores	Tempo de experiência (anos)	EXPCF	TEXPCF	Acertos
1	22	1	22	9
2	25	2	0	3
3	11	2	0	4
4	39	2	0	7
5	17	1	17	14
6	3	1	1,5	17
7	31	1	31	18
8	13	1	13	15
9	25	1	NI	12
10	5	2	0	15
11	26	2	0	15
12	10	2	0	14
Total de acertos				143

EXPCF = experiência com contraste de fase: sim 1, não 2; TEXPCF = tempo de experiência com contraste de fase (em anos); NI = não informado.

Segundo os dados apresentados na tabela 1, o tempo médio de experiência na avaliação de dismorfismo eritrocitário foi de 18 ± 10 anos. O tempo médio de experiência com o uso de contraste de fase foi de $7,7 \pm 11$ anos (um dos observadores não informou o tempo de experiência).

O diagnóstico correto foi obtido em 79% das observações consideradas válidas. Os resultados falsos negativos e falsos positivos foram, respectivamente, de 11,7% e 8,9%.

A análise do erro-padrão e do erro amostral, com nível de confiança de 95%, está demonstrada na tabela 2.

A análise do dismorfismo eritrocitário pelo conjunto de observadores mostra uma sensibilidade de 76%, especificidade de 82%, valores preditivos positivo e negativo de 80% e 78%, respectivamente, e acurácia de 79% para o diagnóstico da origem da hematúria.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre número de acertos por observador e idade, tempo de experiência e experiência com microscopia de contraste de fase. O coeficiente de correlação de Pearson foi de $r = -0,25$ ($p = 0,42$) para a idade do observador; $r =$

$-0,28$ ($p = 0,35$) para o tempo de experiência com análise de dismorfismo; e $r = 0,35$ ($p = 0,23$) para o tempo de experiência com microscopia de contraste de fase.

Para avaliar o grau de concordância no diagnóstico de dismorfismo eritrocitário entre os 12 observadores, foram aplicadas análises de coeficientes de correlação kappa, corrigindo a proporção de ocorrência devida ao acaso, à tendenciosidade e à prevalência, conforme a tabela 3. O grau de concordância entre os observadores foi moderado ($kappa = 0,58$).

DISCUSSÃO

A avaliação de pacientes com hematúria continua sendo um desafio diagnóstico. Desde a descrição inicial de Birch & Fairley sobre a ocorrência de alterações morfológicas nas hemácias provenientes de sangramentos glomerulares, esse dado vem sendo investigado e utilizado na orientação da investigação subsequente dos pacientes. Indivíduos com evidência de sangramento glomerular devem ser investigados com

Tabela 2 - Cálculo do erro-padrão e do erro amostral

Categorias	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Erro-padrão	Erro amostral*
Acertos (0)	143	79	2,8	5,4
Falsos negativos (1)	21	11,7	2,2	4,3
Falsos positivos (-1)	16	8,9	1,9	3,8
Total	180	100,00		

* Considerando um nível de confiança de 95%, valores em percentual.

Tabela 3 - Resultados da análise de concordância: coeficientes kappa e Phi

Medida	Valor	Descrição
Kappa de Cohen	0,5882	Índice de concordância entre diagnósticos e ocorrência de dismorfismo, corrigida relativamente à concordância casual.*
Kappa de Scott	0,5879	Índice de concordância entre diagnósticos e ocorrência de dismorfismo, corrigida relativamente à concordância casual, ajustado para tendenciosidade.*
Kappa de Bennet	0,5889	Índice de concordância entre diagnósticos e ocorrência de dismorfismo, corrigida relativamente à concordância casual, ajustado para tendenciosidade e para prevalência.*
Índice de Tendenciosidade	-0,0278	Medida da tendenciosidade na concordância.
Índice de Prevalência	-0,0500	Medida da prevalência na concordância.
Coefficiente Phi	0,5891	Grau de associação entre diagnósticos e ocorrência de dismorfismo.

* Pressupõe independência entre os observadores.

ênfase nas doenças renais glomerulares, evitando submeter esses pacientes à investigação do trato urinário, diminuindo o ônus e os potenciais para-efeitos da investigação.

Apesar de bem descrita, muitos pontos não estão elucidados na literatura quanto à utilidade do dismorfismo eritrocitário na avaliação de pacientes com hematúria. O principal ponto de divergência é o número mínimo de hemácias dismórficas necessário para diagnosticar o sangramento glomerular. Nesta série, foi utilizado um número mínimo de 75% de hemácias com morfologia distorcida como ponto de corte para o diagnóstico de hematúria glomerular (9,10). Os entrevistados escolheram, com base na literatura e em seus conhecimentos prévios, esse valor mínimo de alterações eritrocitárias, e utilizaram esse critério na avaliação das amostras (9,10,13). Algumas observações, por não terem sido quantificadas, foram excluídas da análise final, resultando em 180 observações válidas por preencherem esse pré-requisito.

Os acantócitos são descritos na literatura como a deformidade eritrocitária mais característica de sangramento glomerular (9,14). A ocorrência de acantócitos, nesta série, foi avaliada em conjunto com as demais observações, não sendo utilizada como critério isolado de dismorfismo. A ocorrência desse fato se justifica uma vez que os observadores tinham total liberdade de julgamento e avaliação das amostras.

Das 180 observações válidas, o diagnóstico correto foi obtido em 143 observações (79%), com sensibilidade de 76%, especificidade de 82% e valor preditivo positivo e negativo de 80% e 78%, respectivamente. As diferentes séries descritas na literatura apresentam variações de sensibilidade de 52 a 100% e de especificidade de 60 a 100%, utilizando critérios variáveis e pontos de corte de 10 a 80% de células com morfologia alterada para diagnosticar dismorfismo (5,9,11,13,14). Um dos objetivos deste estudo foi o de avaliar o desempenho de profissionais envolvidos em atividades assistenciais, testando a acurácia do exame de dismorfismo eritrocitário nesse contexto. A acurácia estimada nesta série foi de 79%, que é compatível com a descrita na literatura (8,9,14).

Ao contrário do que se esperava, não ficou evidenciada significância estatística ao correlacionarmos as observações com o tempo de experiência ou com a experiência dos observadores com o uso de microscopia de contraste de fase. Essa ausência de correlação é um achado controverso, uma vez que a literatura cita que a experiência do observador pode ser um fator limitante na avaliação do dismorfismo. Entretanto, os achados do presente estudo sugerem que a avaliação cuidadosa do sedimento urinário por observadores capacitados é útil

e relevante na prática clínica, independentemente do seu tempo de experiência.

A experiência prévia com microscopia de contraste de fase, apesar de não ter apresentado significância estatística, demonstrou correlação positiva com o número de acertos dos observadores. O método de microscopia de contraste de fase é citado na literatura como superior à microscopia óptica convencional (19), e seu uso, embora não amplamente difundido na prática clínica, pode representar um incremento na avaliação do dismorfismo.

Este estudo foi o primeiro a avaliar o grau de concordância na investigação de dismorfismo por múltiplos observadores. Os relatos até agora publicados correlacionam somente dois observadores independentes na análise de dismorfismo (11,18,20). Nesses estudos, foi demonstrado um coeficiente de correlação substancial entre os observadores ($\kappa > 0,60$), porém seus resultados são limitados pelo pequeno número dos observadores avaliados. Nesta série, a concordância entre os 12 observadores foi estimada com um coeficiente κ de 0,58, denotando uma concordância moderada entre as observações (21).

Permanece a questão de como interpretar o resultado da pesquisa de dismorfismo eritrocitário fornecido por laboratórios de análises clínicas que não definem previamente pontos de corte e que não avaliam a eficácia e acurácia de seus testes. Nosso estudo demonstra que, apesar da subjetividade e das limitações pela ausência de critérios estritos de avaliação e quantificação, a realização do dismorfismo por profissionais envolvidos na prática assistencial apresentou um nível de acurácia e de concordância bastante aceitáveis. Esses dados reforçam a importância desse exame na avaliação e investigação de pacientes com hematúria, sendo sugerido pelos autores que a sua interpretação se apóie no percentual de hemácias dismórficas apresentadas. Assim, quanto maior esse percentual, maior será a probabilidade do diagnóstico correto de hematúria glomerular. A incerteza quanto a esse diagnóstico exige a investigação do aparelho urinário, com o objetivo de afastar causas urológicas de hematúria potencialmente tratáveis como litíase e neoplasias.

REFERÊNCIAS

1. Mohr DN, Offord KP, Owen RA, Melton LJ 3rd. Asymptomatic microhematuria and urologic disease: a population-based study. *JAMA*. 1986;256(2):224-9.
2. Woolhandler S, Pels RJ, Bor DH, Himmelstein DU, Lawrence RS. Dipstick urinalysis screening of asymptomatic adults for urinary tract disorders. I.

- Hematuria and proteinuria. JAMA. 1989;262(9):1214-9.
3. Birch DF, Fairley KF. Haematuria: glomerular or non glomerular? Lancet. 1979;2(8147):845-6.
4. Georgopoulos M, Schuster FX, Porpaczy P, Schramek P. Evaluation of asymptomatic microscopic haematuria – influence and clinical relevance of osmolality and pH on urinary erythrocyte morphology. Br J Urol. 1996;78(2):192-6.
5. De Santo NG, Nuzzi F, Capodicasa G, et al. Phase contrast microscopy of urine sediment for diagnosis of glomerular and nonglomerular bleeding-data in children and adults with normal creatinine clearance. Nephron. 1987;45(1):35-9.
6. Chang BS. Red cell morphology as a diagnostic aid in hematuria. JAMA. 1984;252(13):1747-9.
7. Fassett RG, Horgan BA, Mathew TH. Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. Lancet. 1982;1(8287):1432-4.
8. Birch DF, Fairley KF, Whitworth JA, et al. Urinary erythrocyte morphology in diagnosis of glomerular hematuria. Clin Nephrol. 1983;20(2):78-84.
9. Kohler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia – a characteristic marker for glomerular bleeding. Kidney Int. 1991;40(1):115-20.
10. Pollock C, Liu PL, Gyory AZ, et al. Dysmorphism of urinary red blood cell – value in diagnosis. Kidney Int. 1989;36(6):1045-9.
11. van der Snoek BE, Hoitsma AJ, van Weel C, Koene RA. Dysmorphic erythrocytes in urinary sediment in differentiating urological from nephrological causes of hematuria. Ned Tijdschr Geneesk. 1994;138(14):721-6.
12. Rizzoni G, Braggion F, Zacchello G. Evaluation of glomerular and nonglomerular hematuria by phase-contrast microscopy. J Paediatr. 1983;103(3):370-4.
13. Gonçalves LF, Rauber L, Fiori AM, Kopstein J. Morfologia das hemácias no sedimento urinário: técnica de detecção de hematúria glomerular. Rev AMRIGS. 1986;30(3):185-90.
14. Catala Lopez JL, Fabregas Brouard M. Acanthocyturia is more efficient to differentiate glomerular from non-glomerular hematuria than dysmorphic erythrocytes. Arch Esp Urol. 2002;55(2):164-6.
15. Thiel G, Biemann D, Wegmann W, Brunner FP. Glomeruläre Erythrozyten im Urin: Erkennung und Bedeutung. Schweiz Med Wochenschr. 1986;116(24):790-7.
16. Oborniecka I. Values of phase-contrast microscopy in the etiological diagnosis of hematuria in adults. Part I. Establishing individual norms for glomerular hematuria. Pol Merkuri Lekarski. 1998;5(29):277-9.
17. Stapleton FB. Morphology of urinary red blood cells: a simple guide in localizing the site of haematuria. Pediatr Clin North Am. 1987;34(3):562-9.
18. Venkat Raman G, Pead L, Lee HA, Maskell R. A blind controlled trial of phase-contrast microscopy by two observers for evaluating the source of haematuria. Nephron. 1986;44(4):304-8.
19. Mehta K, Tirthani D, Ali U. Urinary red cell morphology to detect site of hematuria. Indian Pediatr. 1994;31(9):1039-45.
20. Crompton CH, Ward PB, Hewitt IK. The use of urinary red cell morphology to determine the source of hematuria in children. Clin Nephrol. 1993;39(1):44-9.
21. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;S3:159-74.