

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE INTEROBSERVADOR DA MORFOLOGIA  
DAS HEMÁCIAS NO SEDIMENTO URINÁRIO**

**LIRIANE COMERLATO**

**Porto Alegre**

**2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE INTEROBSERVADOR DA  
MORFOLOGIA DAS HEMÁCIAS NO SEDIMENTO URINÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada  
como requisito parcial para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Médicas: Nefrologia.

**LIRIANE COMERLATO**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves

**PORTO ALEGRE**

2003

*Aos meus pais, que sempre me acalentaram  
e incentivaram em todas as etapas deste  
processo de construção do conhecimento.*

## **A**GRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves, orientador deste trabalho, pela atenção, paciência, apoio e dedicação em todos os momentos desta construção e pelos conhecimentos transmitidos durante a elaboração da dissertação.

Ao colega André Aozani Prochnow, pela imprescindível colaboração na coleta do material e pelo apoio.

Aos profissionais dos laboratórios de Análises Clínicas de Porto Alegre, que aceitaram participar da pesquisa, pela disponibilidade e profissionalismo, sem os quais o trabalho não seria possível.

Aos meus familiares, pela compreensão e apoio.

Aos amigos, pelas palavras de incentivo e respeito.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A secretária do Curso de Pós Graduação em Nefrologia pelo auxílio e atenção.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo a pesquisa e apoio financeiro.

Ao grupo de Pesquisa e Pós Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte financeiro.

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	
INTRODUÇÃO .....	01
1. Considerações gerais .....	01
2. Diagnóstico de hematúria .....	03
3. Classificação de hematúria .....	04
4. Alterações morfológicas eritrocitárias no sedimento urinário e seu papel no diagnóstico do sítio do sangramento .....	05
4.1. Fonte do sangramento .....	06
4.2. Alterações morfológicas dos eritrócitos no sedimento urinário .....	07
4.3. Patogênese das alterações morfológicas no sedimento urinário .....	12
4.4. Avaliação do dismorfismo eritrocitário no sedimento urinário .....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
OBJETIVOS .....	22

1. Objetivo Geral .....	22
2. Objetivos Específicos .....	22
ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	23
ARTIGO EM INGLÊS.....	38

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Dados demográficos e número de acertos por observador.....	35
Tabela 2- Cálculo do erro padrão e do erro amostral .....	36
Tabela 3- Resultados da análise de concordância: coeficiente kappa e Phi.....	37

# I. INTRODUÇÃO

## 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hematúria, excreção anormal de eritrócitos, intactos ou distorcidos, na urina, é um problema freqüente enfrentado não só por nefrologistas e urologistas, mas também por clínicos generalistas. Indivíduos normais excretam um número reduzido de eritrócitos na urina. Este número usualmente é expresso pela contagem de hemácias por campo de alta resolução (400 x) obtido através do exame de sedimento urinário e varia em diferentes séries, sendo aceito como normal a excreção de até dois eritrócitos por campo (1). A hematúria pode ser observada pelo próprio paciente, vista a olho nu, ser detectada na investigação de pacientes com sintomas urinários ou ser um achado ocasional durante exames de rotina em indivíduos assintomáticos.

A estimativa da ocorrência de hematúria microscópica assintomática em crianças e adultos varia amplamente na literatura. A prevalência da hematúria tem sido determinada através de estudos populacionais e estudos em populações selecionadas de centros de referência, variando de 3 a 22%. Esta ampla variação depende de características da população estudada ocorrendo aumento da prevalência com o aumento da idade dos indivíduos. Outros fatores que também contribuem para essa variação são o número de amostras de urina



analisadas, o método diagnóstico empregado e o tempo de acompanhamento dos pacientes (2-6).

A fonte do sangramento pode se localizar em qualquer ponto do aparelho urinário, desde os rins até a uretra distal, e pode se relacionar a doenças específicas dos rins e trato urinário, ser manifestação de alguma doença sistêmica ou ser resultado de situações benignas como a associada a exercícios vigorosos. Devido ao grande espectro de diagnósticos possíveis frente a um caso de hematúria isolada, o estabelecimento etiológico não é tarefa simples. Uma das maiores dificuldades no manuseio desses casos é a determinação da extensão da investigação.

Os objetivos da investigação são, além do esclarecimento diagnóstico, excluir doenças graves e potencialmente curáveis mediante intervenção precoce. A investigação atualmente disponível, mesmo sendo ampla, algumas vezes falha na determinação diagnóstica. Um passo importante na orientação da investigação é a determinação do sítio do sangramento, que é didaticamente dividido em 2 grandes grupos, o de hematúria glomerular, no qual a fonte do sangramento é renal, e o de hematúria não glomerular, sendo a fonte do sangramento qualquer outro ponto do aparelho urinário. Esta distinção é muito importante visto que a investigação, além de onerosa, pode submeter o paciente a procedimentos invasivos e não isentos de parafiteiros. Nesse contexto, a determinação da morfologia das hemácias presentes no sedimento urinário, com forma normal (isomórficas) ou distorcidas (dismórficas) é um subsídio bastante útil na suspeição da fonte do sangramento e, dessa forma, na orientação da investigação posterior.

Em 1925, Addis observou que pacientes com glomerulonefrites apresentavam um grande número de hemácias com morfologia distorcida no sedimento urinário (7). Desde então, inúmeros estudos foram realizados, concluindo-se que a morfologia das hemácias pode

ser um elemento importante na identificação da origem da hematúria – glomerular ou extra-glomerular – orientando a investigação posterior. Embora bem estabelecido o valor das alterações morfológicas no sedimento urinário, muitas dúvidas ainda incorrem quanto a sua quantificação e quanto a variabilidade na sua observação e classificação.

## **2. DIAGNÓSTICO DE HEMATÚRIA**

O diagnóstico de hematúria é realizado pelo exame de urina. Quando adequadamente realizado e interpretado, o exame de urina fornece preciosas informações sobre o trato urinário. A hemoglobina presente na urina é detectada por fitas teste impregnadas por um reagente semelhante a peroxidase, que catalisa a oxidação do peróxido presente nas fitas ao reagir com a hemoglobina. Esse teste detecta a presença de hemoglobina livre, mioglobina e hemácias intactas na amostra urinária em estudo. A presença de uma a duas hemácias por campo de grande aumento já é suficiente para que a reação ocorra. O exame microscópico do sedimento urinário que rotineiramente é realizado no exame de urina identifica os elementos presentes na amostra urinária, sendo considerado o padrão ouro para o diagnóstico de hematúria. A avaliação do sedimento urinário ajuda a elucidar se a reação na fita teste foi causada pela presença de hemácias ou pela presença de pigmentos.

A primeira descrição da existência de depósitos na urina data de 1827, embora, naquela ocasião, os elementos não tenham sido estudados (8). Nos anos posteriores, esses elementos foram analisados e quantificados nas amostras urinárias. Atualmente, é bem estabelecido que o sedimento urinário consiste em elementos citológicos, cilindros, corpos químicos amorfos e cristalinos e elementos que, suspensos na urina, depositam-se quando esta permanece em repouso (9).

Após a preparação da amostra urinária e da lâmina citológica, o sedimento urinário é submetido à microscopia. Rotineiramente, o sedimento é analisado por microscopia óptica convencional. Embora não realizada rotineiramente, o uso da microscopia de contraste de fase é uma estratégia bastante útil para a observação de detalhes estruturais dos elementos presentes no sedimento urinário. O princípio desse tipo de microscopia é a separação dos raios luminosos difratados e não difratados através de um diafragma presente no condensador do microscópio. Esse artifício permite que objetos em observação apareçam mais escuros que o meio circundante, ocasionando ainda a produção de halos luminosos em torno das estruturas. As hemácias, quando analisadas por microscopia óptica ou de contraste de fase, aparecem na urina como discos bicôncavos, anucleados, pálidos, lisos, com conteúdo de hemoglobina e diâmetro de 7-8 micrômetros, denominadas de discócitos, e com forma semelhante às hemácias encontradas no sangue periférico.

### **3. CLASSIFICAÇÃO DE HEMATÚRIA**

A hematúria é definida como o aumento do número de eritrócitos na urina. Normalmente em torno de um milhão de hemácias são eliminadas diariamente na urina de indivíduos normais, o que se traduz pela presença de até duas hemácias no exame microscópico do sedimento urinário por campo de grande aumento; valores superiores a este, são considerados diagnósticos de hematúria microscópica (1). A estimativa do número de eritrócitos é realizada pela contagem de hemácias presentes em amostras de urina centrifugada para obtenção do sedimento urinário. Este sedimento é ressuspenso e examinado por microscopia em um aumento de 400x. A expressão da contagem do número de hemácias por campo microscópico pode sofrer algumas discordâncias por se tratar de um exame

semiquantitativo. Outros fatores que contribuem para a discrepância são relacionados à técnica do exame, especialmente a falta de padronização na realização e preparação da amostra de urina, bem como a experiência do observador.

Quanto à classificação, a hematúria pode ser classificada em grupos distintos na dependência de alguns critérios. Diz-se que a hematúria é microscópica quando a quantidade de eritrócitos presentes no exame de sedimento urinário for superior a dois eritrócitos por campo de grande aumento e, macroscópica quando é visível a olho nu. O sangramento pode ser contínuo ou intermitente, e pode ser acompanhado por sinais ou sintomas – hematúria sintomática – ou não apresentar nenhuma sintomatologia, sendo somente evidenciada por investigação laboratorial ou pelo acaso. A origem do sangramento é classificada como glomerular ou não glomerular. A hematúria não glomerular pode ainda ser subdividida em parenquimatosa renal e extra-renal. Esta divisão didática é importante tanto para o prognóstico do paciente quanto para a orientação e otimização da avaliação subsequente, direcionada aos rins (investigação nefrológica) ou ao aparelho urinário (investigação urológica).

#### **4. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ERITROCITÁRIAS NO SEDIMENTO URINÁRIO E SEU PAPEL NO DIAGNÓSTICO DO SÍTIO DO SANGRAMENTO**

##### **4.1. Fonte do sangramento**

Após ter sido firmado o diagnóstico de hematúria, a investigação posterior será direcionada para a avaliação renal (avaliação nefrológica) ou do restante do aparelho urinário (avaliação urológica). Muitos pacientes com hematúria apresentam alguns sinais, sintomas ou

alterações na história e exames subsidiários que sugerem a causa básica do sangramento, porém, num significativo número de pacientes, o sangramento é o único sintoma. Causas extra-renais respondem por 60% dos casos de hematúria, sendo que as patologias malignas do trato urinário, como o câncer de próstata e de bexiga, representam respectivamente a primeira e a segunda neoplasia mais freqüente em homens com mais de 55 anos (10).

Pacientes com forte evidência de hematúria extra-glomerular devem ter seu aparelho urinário investigado, realizando-se exames invasivos como cistoscopia com biópsia e/ou urografia venosa. Pacientes com hematúria glomerular apresentam alguns achados bastante característicos no exame de urina e nos exames subsidiários. A ocorrência de proteinúria superior a 500mg em 24 horas ou a perda de função renal são fortemente sugestivas de doenças glomerulares. Alguns achados como, a presença de cilindros hemáticos no sedimento urinário, também são considerados patognomônicos da origem glomerular do sangramento. Os cilindros são formações gel dos túbulos renais cuja matriz é uma proteína originada das células tubulares renais. Essa proteína, chamada de proteína de Tamm-Horsfall, precipita na luz tubular, influenciada pela concentração eletrolítica, fluxo urinário e variações do pH. Quando ocorre precipitação, os elementos presentes na luz tubular são envoltos nessa matriz protéica e eliminados na urina. Na maioria das vezes, a presença de cilindros na urina denota lesões parenquimatosas renais. No exame de urina, os cilindros são avaliados e descritos no exame microscópico, sendo que a presença de hemácias no interior dos cilindros confere a eles uma cor de ferrugem.

#### **4.2. Alterações morfológicas dos eritrócitos no sedimento urinário**

O primeiro relato de alterações morfológicas das hemácias presente no sedimento urinário data de 1925 (7). Addis observou que a maioria das hemácias urinárias de pacientes

com glomerulonefrites apresentava-se com morfologia distorcida ou em lise. Nos anos seguintes, várias observações da morfologia das hemácias foram realizadas e descritas por diferentes autores (10-13).

Em 1979, Birch e Fairley propuseram uma classificação para a origem do sangramento glomerular e não glomerular, baseados nas alterações morfológicas das hemácias presentes no sedimento urinário, observado por microscopia de contraste de fase (14). Esses autores observaram que, na hematúria de origem glomerular, as hemácias apresentavam grande variação em sua forma e dimensões, sendo nomeadas de dismórficas. Nos sangramentos não glomerulares, as hemácias conservavam seu aspecto usual, isomórficas, podendo apresentar, eventualmente, perda no conteúdo de hemoglobina, denominadas de hemácias fantasma, ou estarem crenadas. Na descrição inicial, os autores utilizaram uma avaliação quantitativa para o dismorfismo, porém descreveram sua classificação qualitativamente, classificando o dismorfismo como ausente, discreto, moderado ou evidente (15).

Na década seguinte, vários estudos foram realizados em pacientes com hematúria, aplicando a classificação de Birch e Fairley, a fim de comprovar as suas observações. Em 1981, Fasset, Horgan e Mathewen examinaram 62 amostras de urina, classificando-as conforme a população eritrocitária predominante, com acerto na correlação entre o diagnóstico microscópico e clínico em 57 dos 60 casos (16). Em 1982, Fairley e Birch estudaram 88 pacientes, comprovando a presença de dismorfismo em 55 de 58 pacientes com doença glomerular (15). No mesmo ano, Fasset, Horgan e Mathewen publicaram a análise de 253 pacientes com hematúria usando como ponto de corte para o diagnóstico de dismorfismo, porcentagens superiores a 80% de células dismórficas ou isomórficas, apresentando correlação clínico-microscópica em 85% dos casos (17).

Em 1984, Rizzoni e colaboradores compararam os resultados obtidos por dois observadores utilizando microscopia de contraste de fase e óptica convencional em 65 crianças, com concordância diagnóstica em 60 casos (18). No mesmo ano, foi publicado um estudo em pacientes com hematúria induzida por exercício físico, com resultados indicando a origem glomerular dessas hemácias (19). Ainda nesse ano, o uso de microscopia de contraste de fase foi usada para avaliar amostras de urina de 22 pacientes com hematúria glomerular, considerando-se com critério diagnóstico valores superiores a 75% de hemácias dismórficas, com sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (20).

Em 1985, foi realizado em Porto Alegre um estudo que constatou que a presença de porcentagens iguais ou superior a 65% de hemácias dismórficas no sedimento urinário parece ser o critério mais adequado de classificação de hematúria glomerular, com especificidade de 100% e sensibilidade superior a 85% na amostra estudada (21).

Em 1987, De Santo e colaboradores avaliaram 163 pacientes, 61 adultos e 102 crianças, com hematúria, analisando amostras de urina em dois dias não consecutivos com microscopia de contraste de fase, por dois observadores de diferentes instituições. O ponto de corte utilizado na classificação das amostras foi de 80% de células isomórficas ou dismórficas, correlacionando os achados com o diagnóstico clínico. A porcentagem de acerto foi de 96,4%. Nessa série, a presença de 50-70% de células dismórficas foi evidenciada em 5 casos, que foram classificados como hematúria mista (22).

Para determinar se o dismorfismo eritrocitário é um preditor de sangramento glomerular, em 1989, Pollock, comparou o número de células dismórficas na urina de pacientes com biópsia renal comprovando glomerulopatias, antes e imediatamente após a biópsia renal, demonstrando que, após a biópsia, houve aumento no número de hemácias dismórficas. Essas amostras foram posteriormente comparadas com pacientes com

diagnóstico de hematúria não glomerular por sangramento de trato urinário baixo, determinando, nessa série, que contagens superiores a 75% de células dismórficas se correlacionam com sangramento glomerular, sendo que a presença de até 17% de células dismórficas pode ser encontrada em pacientes com hematúria não glomerular (23).

Em 1993, Mohammad e colaboradores avaliaram amostras de urina de 109 pacientes com hematúria. As amostras foram analisadas por microscopia de contraste de fase, e a proporção de hemácias dismórficas e isomórficas foi determinada utilizando porcentagens iguais ou superiores a 20% de isomorfismo ou dismorfismo como diagnóstico. O correto sítio de sangramento foi demonstrado em 27 de 30 (90%) pacientes com glomerulopatias e em todos os 17 pacientes com sangramento de trato urinário inferior, demonstrando uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 100% para a determinação da fonte do sangramento (24).

Para avaliar o melhor método microscópico para a avaliação do dismorfismo, em 1994, Mehta e colaboradores estudaram 87 casos de hematúria, comparando o uso de microscopia de contraste de fase e óptica convencional. Dos 87 pacientes, 45 tinham hematúria glomerular, e 42 tinham hematúria não glomerular. O uso da microscopia de contraste de fase apresentou sensibilidade de 91,1%, e a microscopia óptica, de 66,7% na detecção da fonte glomerular do sangramento. Ambos os métodos apresentaram sensibilidade de 92,2% para a determinação de hematúria não glomerular, sugerindo que o uso de microscopia de contraste de fase é mais sensível na detecção de dismorfismo (25).

No mesmo ano, outro grupo avaliou 107 pacientes com micro hematúria com o uso de microscopia óptica convencional, utilizando como ponto de corte porcentagens de até 40% de dismorfismo. Adicionalmente, avaliaram a variação interobservador em uma série de 26 amostras. Valores de até 40% de eritrócitos dismórficos apresentaram uma sensibilidade de



100% para patologias urológicas, com uma especificidade de 66,7%. O grau de correlação entre os observadores foi demonstrado por um coeficiente de 0,90 (kappa: 0,77) (26).

Já em 1996, Georgopoulous avaliou a morfologia eritrocitária em 2145 amostras de urina de 1391 pacientes com hematúria, analisando essas amostras com microscopia de interferência de contraste. Porcentagens superiores a 90% de dismorfismo apresentaram boa correlação com sangramento glomerular (27).

Em 1998, um estudo de corte com 123 pacientes foi realizado para determinar o valor limite de dismorfismo para o diagnóstico de hematúria glomerular, analisando as amostras com microscopia de contraste de fase. Nessa série, as amostras foram divididas em três grupos na dependência da morfologia eritrocitária predominante. Porcentagens maiores de 60% de dismorfismo foram classificadas como glomerulares; de 20-60%, como mistas; e inferiores a 20%, como não glomerulares. O diagnóstico de glomerulopatias foi confirmado em 54 de 57 amostras classificadas como hematúria glomerular e em todos os 8 casos de hematúria classificadas como mista. Nos 58 pacientes com hematúria não glomerular, a correlação microscópica foi encontrada em 55 pacientes. Os três pacientes com classificação duvidosa pela morfologia foram submetidos a punção biópsia renal, cujo resultado foi normal. Esse estudo sugeriu que porcentagens superiores a 20% de dismorfismo na microscopia com contraste de fase são fortemente sugestivas de patologias glomerulares, justificando a realização de biópsia renal nesses casos, devendo-se excluir o termo hematúria mista (28).

Nestas diferentes séries, o predomínio de hemácias dismórficas ou isomórficas classificaram a fonte do sangramento em glomerular ou não glomerular respectivamente, porém não houve concordância no valor limite para a ocorrência do dismorfismo, variando as observações de 20 a 90% de predomínio de uma forma em relação à outra.

Na tentativa de avaliar a existência de uma alteração morfológica patognomônica do sangramento glomerular, Kohler e colaboradores, em 1991, avaliaram amostras de urina de 351 pacientes com hematúria e 33 controles saudáveis, analisando a morfologia dos eritrócitos por microscopia de contraste de fase e classificando os eritrócitos de acordo com a classificação hematológica usual (29). Nessa avaliação, a maioria das células dismórficas, como os equinócitos, anulócitos, esquizócitos, estomatócitos, codócitos e cnizócitos, ocorreram em doenças glomerulares e não glomerulares, sugerindo que não são características de sangramento glomerular. Em contraste, uma deformidade eritrocitária chamada de acantócito foi a que melhor se correlacionou com sangramento glomerular. Os acantócitos são eritrócitos em anel contendo várias espículas e protusões. Nessa série, demonstrou-se que, nos pacientes com glomerulopatias comprovadas por biópsia, os acantócitos representavam 12,4% de todos os eritrócitos presentes nas amostras de urina, enquanto, nos pacientes com doenças não glomerulares ou nos controles saudáveis, os acantócitos foram encontrados em porcentagens muito pequenas, inferiores a 2%, ou não foram encontrados. Contagens de acantócitos iguais ou superiores a 5% do total de eritrócitos excretados foram encontrados em 75 dos 143 pacientes com glomerulopatias comprovadas por biópsia (sensibilidade de 52%) e em 4 dos 187 pacientes com doenças não glomerulares (especificidade de 98%), sugerindo que a presença de acantócitos em porcentagens iguais ou superiores a 5% é um bom marcador preditivo de sangramento glomerular, mesmo em contagens muito pequenas de eritrócitos.

Em 2002, Catala e colaboradores compararam a efetividade da contagem de acantócitos em comparação com a contagem de eritrócitos dismórficos em 170 pacientes com hematúria. Destes pacientes, 73 apresentavam hematúria glomerular, e 97, hematúria não glomerular. A porcentagem de células dismórficas e de acantócitos foi examinada por microscopia de contraste de fase e determinada para cada paciente, correlacionando os

achados com o diagnóstico definitivo. Hematúria glomerular foi definida pela presença de contagens superiores a 35% de células dismórficas, apresentando uma sensibilidade de 69% e uma especificidade de 100%. Quando a hematúria glomerular foi definida pela contagem de acantócitos igual ou superior a 5%, a sensibilidade aumentou para 88%, e a especificidade permaneceu em 100%, sugerindo fortemente, nessa série, a superioridade da contagem de acantócitos no diagnóstico de sangramento glomerular (30).

#### **4.3. Patogênese das alterações morfológicas no sedimento urinário**

Independente das alterações morfológicas apresentadas, ainda especula-se qual seja a causa das deformidades eritrocitárias. Em 1984, Chang e colaboradores ressaltaram, em suas observações, que a patogênese das alterações morfológicas nos indivíduos com hematúria glomerular, apesar de não totalmente elucidada, parece não se relacionar unicamente com a composição da urina (31).

Em 1989, foi desenvolvido um modelo *in vitro* em que se demonstrou que as mudanças osmóticas (mimetizando as alterações osmóticas sofridas pelas hemácias durante a passagem pelo néfron) podem causar alterações nas membranas celulares, alterando a sua forma (32). Em 1992, Kitamoto destacou que a mudança da osmolaridade associada a variações do pH produzia, *in vitro*, alterações celulares (33). No mesmo ano, Rath e colaboradores conduziram um experimento semelhante, sugerindo que os eritrócitos sofrem deformações, primariamente, por dano mecânico causado pela passagem da hemácia pela membrana basal glomerular e, secundariamente, por alterações osmóticas durante a passagem das hemácias pelos segmentos diluidores do néfron (34, 27).

Apesar de ainda não totalmente elucidados, os mecanismos de produção do dismorfismo parecem ser vários. Fatores mecânicos, teciduais e químicos de composição do meio podem atuar em conjunto na patogênese das alterações morfológicas eritrocitárias.

#### **4.4. Avaliação do dismorfismo eritrocitário no sedimento urinário**

A avaliação do dismorfismo eritrocitário, além das divergências quanto à quantificação do número significativo de células com morfologia alterada e das dúvidas quanto à existência de uma morfologia patognomônica da origem glomerular do sangramento, ainda pode sofrer uma considerável variação na dependência do observador. Na tentativa de minimizar a subjetividade do exame, algumas técnicas de quantificação automatizada e digital têm sido estudadas.

Em 1984, Chang estudou 20 pacientes com hematúria microscópica, 10 com hematúria glomerular e 10 com hematúria não glomerular, observando que os pacientes com sangramento de origem glomerular, além das alterações morfológicas já previamente descritas por outros autores, também apresentavam hipocrômia (31). Em 1990, Godwasser tentou confirmar esse achado estudando por análise eletrônica o tamanho das hemácias e seu volume corpuscular médio. Nesse estudo, demonstrou que os pacientes com hematúria glomerular apresentavam um volume corpuscular médio significativamente menor do que os pacientes com hematúria não glomerular (35). No mesmo ano, Sayer avaliou as diferenças na morfologia das células eritrocitárias urinárias através de contagens automatizadas, utilizando um contador hematológico. Cada análise foi demonstrada graficamente, com a obtenção de diagnósticos corretos em 97 de 100 pacientes (36).

Em 1991, foi descrito, pela primeira vez, o uso de citometria de fluxo com o uso do sistema Technicon H para analisar a morfologia das hemácias, comparando seu uso com os métodos de microscopia de contraste de fase e de citocentrifugação. Nessa série, todos os métodos foram equivalentes na diferenciação entre células dismórficas e isomórficas, sendo o uso da citometria de fluxo não recomendado devido à equivalência dos métodos (37). O uso da citometria de fluxo pode fornecer uma medida objetiva dos eritrócitos presentes na urina com base no volume e na densidade das hemácias. Em 1995, seu uso foi novamente testado. Com a utilização do sistema Technicon H-1TM, foram avaliados 63 pacientes com micro e macro hematúria. A sensibilidade do método na detecção da fonte do sangramento foi de 75%, com especificidade de 86%. Após a exclusão de 20 amostras de pacientes com micro hematúria, a sensibilidade aumentou para 93%, e a especificidade, para 100%, sugerindo que a intensidade da hematúria pode ser determinante no poder diagnóstico da análise automatizada (38). O mesmo autor, em 2001, descreveu um estudo comparando o uso da citometria de fluxo urinário com o sistema Sysmex UF-100 com a microscopia óptica, na avaliação de 79 amostras de urina de pacientes com hematúria. A sensibilidade e a especificidade da contagem automatizada foram, respectivamente, de 83% e 94%, com valores preditivos positivo e negativo de 95% e 78%, respectivamente. Os valores correspondentes da microscopia óptica apresentaram sensibilidade de 79%, com especificidade de 90% e com valores preditivos positivo e negativo de 93 e 74%, respectivamente, para a detecção de sangramentos não glomerulares (39).

Para avaliar a utilidade da contagem automatizada do volume corpuscular médio, em 2002, Game e colaboradores analisaram 45 amostras de urina avaliadas por método automatizado. As amostras foram classificadas em 3 grupos, conforme o volume corpuscular médio das hemácias: com elevado volume corpuscular médio (> 50 fl), com baixo volume

corpúscular médio (< 50 fl) e com origem mista. A sensibilidade da avaliação automatizada no diagnóstico de hematúria glomerular foi de 100%, com especificidade de 37,5%, sendo esta muito baixa para confirmar a origem do sangramento (40). Em 2003, o uso de análise eletrônica de tamanho de partículas foi comparado com a microscopia de contraste de fase, demonstrando que ambos os métodos apresentam boa acurácia para a detecção da fonte do sangramento (41).

Em 2001, Dinda e colaboradores descreveram o primeiro relato na literatura demonstrando a utilidade da aferição da densidade da hemoglobina das hemácias presentes no sedimento urinário, correlacionando esse achado com a morfometria celular através de um sistema de análise digital das hemácias. Nessa série, o uso isolado dos dados morfométricos obteve um resultado correto em 93,4% dos casos de hematúria glomerular e, quando analisados conjuntamente com a densitometria, o diagnóstico foi correto em 100% dos casos (42).

Apesar de amplamente estudados, o uso dos métodos automatizados não é usual na prática clínica. A observação microscópica continua sendo o método diagnóstico mais utilizado para a pesquisa do dismorfismo eritrocitário. As variações interobservadores são facilmente explicadas por se tratar de um exame semiquantitativo que depende da experiência do examinador e do estabelecimento de critérios rígidos para a sua avaliação. Poucos relatos na literatura avaliam a pesquisa do dismorfismo eritrocitário na dependência de diferentes observadores. Em 1986, Ramann e colaboradores publicaram um estudo controlado, cego, com dois observadores independentes, em que se avaliou a correlação entre a observação da morfologia eritrocitária e o diagnóstico clínico. Nessa série, não houve concordância entre os observadores quanto ao ponto de corte específico capaz de diferenciar a fonte do sangramento (43).

Em 1993, a morfologia dos eritrócitos urinários como preditora da fonte do sangramento na população pediátrica foi estudada (44). Dois observadores independentes, usando microscopia de contraste de fase, avaliaram 101 amostras de urina de 90 pacientes pediátricos. Um dos observadores utilizou também microscopia de interferência diferencial (Nomarski). Vinte e oito casos foram excluídos por apresentarem diagnóstico clínico duvidoso. Dos 62 casos restantes, o diagnóstico microscópico foi comparado ao clínico. O observador 1 documentou dismorfismo em 40 dos 42 pacientes com glomerulopatias e isomorfismo em 19 dos 20 casos de sangramento não glomerular. O observador 2 documentou dismorfismo em 39 dos 42 casos com hematúria glomerular e isomorfismo em todos os casos de hematúria não glomerular. Estes achados representam sensibilidade de 95% para o observador 1 e de 93% para o observador 2, com especificidade de 95% e 100%, respectivamente. Não houve, nessa série, vantagens do uso de microscopia de interferência (Nomarski) em relação ao contraste de fase; e os resultados confirmaram a acurácia da avaliação microscópica para o diagnóstico diferencial das hematúrias em pacientes pediátricos.

Em 1994, Van der Snoek estimou a variação interobservadores em uma série de 26 amostras de urina selecionadas de 107 espécimes previamente avaliadas por microscopia óptica. Nesse estudo, o coeficiente de correlação foi de 0,90 (kappa 0,77), embora tenha sido salientada a importância de critérios rígidos para o estabelecimento do dismorfismo (26).

Neste estudo apresentado a seguir, os autores avaliaram o grau de correlação entre a avaliação de dismorfismo eritrocitário por diferentes observadores com prática e experiência na pesquisa de hemácias dismórficas, objetivando determinar a reprodutibilidade deste exame na prática médica e o grau de correlação entre as observações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Larcom RC, Carter GH. Erythrocytes in urinary sediment: identification and normal limits. *J Lab Clin Med* 1948; 33: 875-880
2. Dodge WE *et al.* Proteinuria and hematuria in schoolchildren: epidemiology and early natural history. *J Pediatr* Feb 1976; 88(2): 327-347
3. Vehaskari VM *et al.* Microscopic hematuria in schoolchildren: epidemiology and clinicopathologic evaluation. *J Pediatr* Nov 1979; 95(5): 676-684
4. Mohr D. Asymptomatic microhematuria and urologic disease: a population-based study. *JAMA* 1986; 256: 224-229
5. Woolhandler S. Dipstick urinalysis screening of asymptomatic adults for urinary tract disorders. *JAMA* 1989; 262:1214-1219
6. Coelho S. Epidemiology of hypertension and kidney disease in Recife, Brazil. *Nephrology* 1997; S(3): 224
7. Addis TA. Clinical classification of Bright's diseases. *JAMA* Jul 1925; 85(3): 163-167
8. Lippman RW. *Urine and the urinary sediment*. 2nd ed. Charles C. Thomas, Springfield: 1957; 3-140
9. Gonçalves LF, Barros EG, Manfro RC. Exame de urina e provas de função renal. In: Barros EG, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF *et al.* *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento*. 2<sup>a</sup> ed. Artes Médicas Sul, Porto Alegre: 1999; 68-80
10. Glassock R. Hematuria. In: *Massry & Glassock Textbook of Nephrology*. 3rd ed. Williams & Wilkins, USA: 1995
11. Naeraa A. Studies on urinary sediment. *Acta Med Scand* 1038; 95(2-4): 341-350
12. Naeraa A. *Glomerulonephritis*. Horta, Barcelona: 1950; 50-51



13. Walker WG. The hematurias. In: Harvey AM *et al.* *The principles and practice of medicine*. 18th ed. Appleton-Century-Crofts, New York: 1972; 162
14. Birch DF, Farley KF. Haematuria glomerular or non glomerular? *The Lancet* 1979; 2: 845-846
15. Farley KF, Birch DF. Hematuria: a simple method for identifying glomerular bleeding. *Kidney Int* 1982; 21: 105-108
16. Fasset RG *et al.* The value of phase-contrast microscopy in separating glomerular from non-glomerular urinary bleeding. *Aust Nz J Med* 1981; 11: 593-594
17. Fasset RG *et al.* Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. *Lancet* 1982; 1: 1432-1434
18. Fasset RG *et al.* Detection of glomerular and non glomerular bleeding. *J Pediatr* 1984; 104(1): 161
19. Fasset RG *et al.* Red cell morphology as a diagnosis aid in hematuria. *JAMA* Oct 1984; 252(13): 1747-1749
20. Dantas M. Diagnóstico diferencial das hemácias através da microscopia de contraste de fase. In: *XII Congresso Brasileiro de Nefrologia*. No. 315. Salvador: 1984
21. Gonçalves LF, Rauber MR, Fiori AG, Kopstein, J. Morfologia das hemácias no sedimento urinário - técnica de detecção de hematúria glomerular. *Rev AMRIGS* 1986; 30(3): 185-190
22. De Santo NG, Nuzzi F, Capodicasa G *et al.* Phase contrast microscopy of the urine sediment for the diagnosis of glomerular and nonglomerular bleeding-data in children and adults with normal creatinine clearance. *Nephron* 1987; 45(1): 35-39
23. Pollock C, Lui PL, Gyory AZ *et al.* Dysmorphism of urinary red blood cells – value in diagnosis. *Kidney Int* 1989; 36(6): 1045-1049

24. Mohammad KS, Bdesha AS, Snell ME *et al.* Phase contrast microscopic examination of urinary erythrocytes to localize source of bleeding: an overlooked technique? *J Clin Pathol* 1993; 46(7): 642-645
25. Mehta K, Tirthani D, Ali U. Urinary red cell morphology to detect site of hematuria. *Indian Pediatr* 1994; 31(9): 1039-1045
26. Van Der Snoek BE *et al.* Dysmorphic erythrocytes in urinary sediment in differentiating urological from nephrological causes of hematuria. *Ned Tijdschr Gen* 1994; 138(14): 721-726
27. Georgopoulos M *et al.* Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria - influence and clinical relevance of osmolality and pH on urinary erythrocyte morphology. *Br J Urol* 1996; 78(2): 192-196
28. Obroniecka I. Values of phase-contrast microscopy in the etiological diagnosis of hematuria in adults. *Pol Merkuriusz Lek* 1998; 5(29): 277-279
29. Kohler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia – a characteristic marker for glomerular bleeding. *Kidney Int* 1991; 40(1): 115-120
30. Catala Lopez JL, Fabregas MB. Acanthocyturia is more efficient to differentiate glomerular from non-glomerular hematuria than dysmorphic erythrocytes. *Arch Esp Urol* 2002; 55(2): 164-166
31. Chang BS. Red cell morphology as a diagnostic aid in hematuria. *JAMA* Oct 1984; 252(13): 1747-1749
32. Schramek P, Moritisch A *et al.* In vitro generation of dysmorphic erythrocytes. *Kidney Int* Jul 1989; 36(1): 72-77
33. Kitamoto Y, Yide C, Tomita M. The mechanism of glomerular dysmorphic red cell formation in the kidney. *Tohoku J Exp Med* Jun 1992; 167(2): 93-105

34. Rath B, Turner C. What makes red cells dysmorphic in glomerular hematuria? *Pediatr Nephrol* Sep 1992; 6(5): 424-427
35. Goldwasser P, Antignani A, Mittman N *et al.* Urinary red cell size: diagnostic value and determinants. *Am J Nephrol* 1990; 10(2): 148-156
36. Sayer J, McCarthy MP, Schmidt JD. Identification and significance of dysmorphic versus isomorphic hematuria. *J Urol* 1990; 143(3): 545-548
37. De Metz M, Schiphorst PP, Go RI. The analysis of erythrocyte morphologic characteristics in urine using hematologic flow cytometer and microscopic methods. *Am J Clin Pathol* 1991; 95(2): 257-261
38. Apeland T. Flow cytometry of urinary erythrocytes for evaluating the source of haematuria. *Scand J Urol Nephrol* 1995; 29(1): 33-37
39. Apeland T, Mestad O, Hetland O. Assessment of haematuria: automated urine flowmetry vs microscopy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(8): 1615-1619
40. Game X, Soulie M, Fontanilles AM *et al.* Can urinary corpuscular volume using automated hematology contribute the diagnostic etiology of hematuric microscopy? *Prog Urol* 2002; 12(2): 248-252
41. Gam X, Soulie M, Fontanilles AM *et al.* Comparison of red blood cell volume distribution curves and phase-contrast microscopy in localization of the origin of hematuria. *Urology* 2003; 61(3): 507-511
42. Dinda AK, Singh C, Aggarwal SK *et al.* Diagnosis of glomerular haematuria by imagecytometry of urinary red cells. *Nephron* 2001; 88: 93-94
43. Ramann GV, Pead L, Lee HA *et al.* A blind controlled trial of phase-contrast microscopy by two observers for evaluation the source of haematuria. *Nephron* 1986; 44: 304-308

44. Crompton CH, Ward PB. The use of urinary red cell morphology to determine the source of hematuria in children. *Clin Nephrol* 1993; 39(1): 44-49

## II. OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

Analisar a variação da observação de dismorfismo eritrocitário entre observadores com experiência na análise do sedimento urinário.

### 2. Objetivos Específicos

- Analisar o grau de correlação entre as observações.
- Correlacionar a observação do dismorfismo eritrocitário com o diagnóstico da causa básica da hematúria.

### III. ARTIGO EM PORTUGUÊS

#### **Avaliação da variabilidade interobservador da morfologia das hemácias no sedimento urinário**

Liriane Comerlato

André Aozani Prochnow

Luiz Felipe Santos Gonçalves

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia. Faculdade de Medicina.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Serviço de Nefrologia. Hospital de Clínicas de

Porto Alegre. Porto Alegre RS. Brasil.

#### **Autor para correspondência**

Dr Luiz Felipe Santos Gonçalves

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Nefrologia

Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030

Porto Alegre, RS, Brasil. 90035-003

Telefone: 51 33168295

**Fax: 51 33168121**

**E-mail: lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br**

## **AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE INTEROBSERVADOR DA MORFOLOGIA DAS HEMÁCIAS NO SEDIMENTO URINÁRIO**

Nephrology Dialysis Transplantation

### **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 analisa a variabilidade na análise do dismorfismo eritrocitário por diferentes observadores, avaliando a correlação entre as observações e sua associação com o diagnóstico etiológico das hematúrias.

**Métodos:** Foram selecionados dezoito amostras de sedimento urinário de pacientes com hematúria glomerular e não glomerular, as imagens foram capturadas por um software de captura de imagens e gravadas em meio magnético. As 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, classificaram as amostras pela presença ou ausência de dismorfismo e estimaram a porcentagem de hemácias dismórficas em relação ao seu número total.

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

Palavras chaves: Dismorfismo eritrocitário, hematúria, variabilidade interobservador.

Título resumido: Variabilidade na morfologia dos eritrócitos urinários avaliados por diferentes observadores.



## **Introdução**

A hematúria é um achado freqüente na prática médica, com prevalências na população que variam de 3 a 22% (1, 2). Quando assintomática, a sua investigação pode ser extensa e onerosa, sendo importante o desenvolvimento de métodos diagnósticos não invasivos que orientem para o local do sangramento.

Em 1979, Birch e Fairley descreveram que as hemácias presentes na urina de pacientes com patologias glomerulares apresentavam marcada variação de tamanho e forma quando analisadas por microscopia de contraste de fase, chamadas por isso de dismórficas. Já as hemácias originadas de sangramentos não glomerulares apresentavam forma e tamanho uniformes, com morfologia semelhante à encontrada no sangue periférico, denominadas isomórficas, embora um número variado de hemácias poderia perder seu conteúdo de hemoglobina, chamadas células fantasmas, ou estarem crenadas (3). Nas décadas seguintes, a observação de dismorfismo eritrocitário no sedimento urinário passou a ser amplamente empregada na avaliação de pacientes com hematúria. Entretanto, a subjetividade dessa observação resultou em inúmeras discrepâncias quanto à definição da presença de dismorfismo e a forma de quantificar a porcentagem mínima de células dismórficas capaz de indicar o sangramento glomerular. Assim, em 13 estudos selecionados, o ponto de corte mínimo de células dismórficas necessário para o diagnóstico de hematúria glomerular variou de 10 a 90% (4-16), com sensibilidades e especificidades variáveis para cada série. A principal explicação para essa grande variabilidade é a ausência de critérios bem definidos na literatura que caracterizem o dismorfismo. Outros autores têm utilizado como critério

diagnóstico de dismorfismo a presença de uma forma específica de hemácias, os acantócitos (9).

A avaliação da morfologia das hemácias no sedimento urinário, além das divergências quanto à quantificação, ainda está sujeita a variações na dependência da experiência e dos critérios utilizados por diferentes observadores. Dois relatos na literatura avaliaram a variabilidade entre dois diferentes observadores na pesquisa de hemácias dismórficas. Nessas séries, houve boa correlação entre as observações, porém os resultados foram limitados pelo pequeno número de observadores (11, 17).

Para avaliarmos o real impacto da variação interobservador na análise do dismorfismo e sua correlação com o diagnóstico da fonte do sangramento, realizou-se um estudo com doze observadores experientes na análise de dismorfismo eritrocitário, e os submetemos a avaliação de 18 exames de urina de pacientes com diagnóstico de hematúria glomerular ou não glomerular.

### **Materiais e métodos**

Foram selecionados dezoito pacientes dos ambulatórios de Urologia e Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de julho a dezembro de 2002. Destes pacientes, nove apresentavam sangramento de origem glomerular, com diagnóstico confirmado por exame do tecido renal, e nove apresentavam hematúria não glomerular, com diagnóstico estabelecido por urografia excretora, ecografia do aparelho urinário, exame anátomo-patológico 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 após orientação, 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 pesquisador. As imagens das hemácias em aumento de 400x foram selecionadas, e foi realizada a captura digital das mesmas com o uso do software de captura 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 deste exame em laboratórios de análises clínicas de Porto Alegre. Os observadores que concordaram em participar do estudo analisaram as imagens, acompanhados 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 realizadas utilizando os coeficientes de Pearson, Kappa e Phi. 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 de 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 ficou com 180 observações. As características dos observadores e seus respectivos acertos estão sumarizados na Tabela 1.

Segundo os dados apresentados na Tabela 1, o tempo médio de experiência na avaliação de dismorfismo eritrocitário foi de 18 anos, com desvio padrão de 10. O tempo médio de experiência com o uso de contraste de fase foi de 7,7 anos, com desvio padrão de 11 anos. O tempo de experiência com microscopia de contraste de fase, não foi informado por um dos observadores.

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 sensibilidade da amostra foi de 76%, e a especificidade, de 82%, com valores preditivos positivo e negativo, respectivamente, de 80% e 78% e a acurácia foi de 79%.

A correlação dos acertos de cada observador com a idade, o tempo de experiência e a experiência com microscopia de contraste de fase não apresentou significância estatística. O coeficiente de correlação de Pearson calculado foi de  $-0,25$  ( $p=0,42$ ) para a idade do observador,  $-0,28$  ( $p=0,35$ ) para o tempo de experiência com análise de dismorfismo e  $0,35$  ( $p= 0,23$ ) para o tempo de experiência com microscopia de contraste de fase.

Para avaliar o grau de concordância entre os 12 observadores, foram aplicadas análises de coeficientes de correlação Kappa, corrigindo a proporção de ocorrência devida ao acaso, a tendenciosidade e a prevalência, conforme a Tabela 3.

## **Discussão**

A avaliação de pacientes com hematúria continua sendo um desafio diagnóstico. Desde a descrição inicial de Birch e Fairley sobre a ocorrência de alterações morfológicas nas hemácias provenientes de sangramentos glomerulares, este dado vem sendo investigado e utilizado na orientação da investigação subsequente dos pacientes. Indivíduos com forte evidência de sangramento glomerular devem ser investigados com 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 a utilidade do dismorfismo eritrocitário como estratégia de diferenciação na avaliação de pacientes com hematúria, muitos pontos não estão elucidados na literatura. O principal ponto de divergência na literatura é o número mínimo de hemácias dismórficas capaz de 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 descreveram, com base na literatura e em seus conhecimentos prévios, esse valor mínimo de alterações eritrocitárias, e utilizaram esse critério na avaliação das amostras. 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, 13). A ocorrência de acantócitos, nesta série, foi avaliada em conjunto com as observações, não sendo utilizado como critério isolado de dismorfismo. A ocorrência deste fato se justifica, já 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). Um dos objetivos do nosso estudo foi o de avaliar o desempenho de profissionais envolvidos em atividades assistenciais, avaliando a eficácia do exame de dismorfismo eritrocitário nesse contexto. A acurácia estimada nesta série foi de 79%, que é compatível com a descrita na literatura (8,9,13).

Ao contrário do que se esperava, não se evidenciou significância estatística ao correlacionarmos as observações com o tempo de experiência ou a experiência dos observadores com o uso de microscopia de contraste de fase. Essa não correlação é bastante interessante, uma vez que a literatura cita que a experiência do observador pode ser um fator

limitante da avaliação do dismorfismo, podendo-se sugerir que a avaliação cuidadosa do sedimento urinário por observadores capacitados é útil e relevante, independente 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 uso de microscopia de contraste de fase é citado na literatura como superior ao uso da microscopia óptica convencional (18), 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, 17, 19). Nesses estudos, foi demonstrado coeficiente de correlação substancial entre os observadores ( $\kappa > 0,60$ ), porém seus resultados são limitados pelo número dos observadores avaliados. Nesta série, a concordância entre os 12 observadores foi estimada com um coeficiente Kappa de 0,58, denotando uma concordância moderada entre as observações (20).

Em conclusão, nosso estudo demonstra que, apesar da subjetividade e das limitações pela ausência de critérios estritos de avaliação e quantificação do dismorfismo das hemácias no sedimento urinário, a sua realização por profissionais envolvidos na prática assistencial apresentou um nível de acurácia e de concordância aceitáveis, reforçando a importância desse exame na avaliação e investigação de pacientes com hematúria.

### Referências Bibliográficas

1. Mohr D. Asymptomatic microhematuria and urologic disease: a population-based study. *JAMA* 1986; 256: 224-229
2. Woolhandler S. Dipstick urinalysis screening of asymptomatic adults for urinary tract disorders. *JAMA* 1989; 262: 1214-1219
3. Birch DF, Fairley KF. Haematuria: glomerular or non glomerular? *The Lancet* 1979; 2: 845-846
4. Georgopoulos M, Schuster FX, Porpaczy P *et al.* Evaluation of asymptomatic microscopic haematuria – influence and clinical relevance of osmolality and pH on urinary erythrocyte morphology. *Br J Urol* 1996; 78(2): 192-196
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): 35-39
6. Chang BS. Red cell morphology as a diagnostic aid in hematuria. *J Am Med Assoc* 1984; 252: 1747-1749
7. Fassett RG, Horgan BA, Mathew TH. Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. *Lancet* 1982; I: 1432-1434
8. Birch DF, Fairley KF, Whitworth JA *et al.* Urinary erythrocyte morphology in diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 1983; 20: 78-84
9. Kohler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia – a characteristic marker for glomerular bleeding. *Kidney Int* 1991; 40(1): 115-120
10. Pollock C, Pei-Ling L, Gyory AZ *et al.* Dysmorphism of urinary red blood cell – value in diagnosis. *Kidney Int* 1989; 36: 1045-1049



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): 721-726
12. Rizzoni G, Braggion F, Zacchello G. Evaluation of glomerular and non-glomerular hematuria by phase contrast microscopy. *J Paediatr* 1983; 103: 370-374
13. Catala Lopez JL, Fabregas MB. Acanthocyturia is more efficient to differentiate glomerular from non-glomerular hematuria than dysmorphic erythrocytes. *Arch Esp Urol* 2002; 55(2): 164-166
14. Thiel G, Biemann D, Wegmann W *et al.* Glomeruläre Erythrozyten im Urin: Erkennung und bedeutung. *Schweiz med Wochenschr* 1986; 116: 790-797
15. Obroniecka I. Values of phase-contrast microscopy in the etiological diagnosis of hematuria in adults. *Pol Merkuriusz Lek* 1998; 5(29): 277-279
16. Stapleton FB. Morphology of urinary red blood cells: A simple guide in localizing the site of haematuria. *Paediatr Clinic NA* 1987; 34: 562-569
17. Ramann GV, 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: 304-308
18. Mehta K, Tirthani D, Ali U. Urinary red cell morphology to detect site of hematuria. *Indian Pediatr* 1994; 31(9): 1039-1045
19. Crompton CH, Ward PB. The use of urinary red cell morphology to determine the source of hematuria in children. *Clin Nephrol* 1993; 39(1): 44-49
20. Landis R, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; S3: 159-174

## TABELAS

*Tabela 1.* Dados demográficos e do número de acertos por observador

OBSERV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total Acertos
TEM EXP	22	25	11	39	17	3	31	13	25	5	26	10	
EXPCF	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	
TEXPCF	22	0	0	0	17	1,5	31	13	NI	0	0	0	
Acertos	9	3	4	7	14	17	18	15	12	15	15	14	143

*OBSERV: observadores; TEM EXP: tempo de experiência (em anos); EXPCF: experiência com contraste de fase: sim 1, não 2; TEXPCF: tempo de experiência com contraste de fase (em anos); NI: não informado*

Tabela2.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 à tendenciosidade.*
Kappa de Bennet	0,5889	Índice de concordância entre diagnósticos e ocorrência de dismorfismo, corrigida relativamente à concordância casual, ajustado à tendenciosidade e à prevalência.*
Índice de Tendenciosidade	-0,0278	Medida da tendenciosidade na concordância.
Índice de Prevalência	-0,0500	Medida da prevalência na concordância.
Coeficiente Phi	0,5891	Grau de associação entre diagnósticos e ocorrência de dismorfismo.

\* Pressupõe independência entre os observadores.

#### IV ARTIGO EM INGLÊS

### **Evaluation of variability in urinary erythrocyte morphology test performed by different observers**

Liriane Comerlato

André Aozani Prochnow

Luiz Felipe Santos Gonçalves

Post Graduation Medical Sciences: Nephrology Program. School of Medicine,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Renal Division, Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Luiz Felipe Santos Gonçalves M.D.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Renal Division

Ramiro Barcelos Street, 2350, room 2030

Porto Alegre, RS, Brazil. 90035-003

Telephone number: 51 33168295

E-mail: lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br

Fax: 51 33168001

## VARIABILITY IN URINARY ERYTHROCYTE MORPHOLOGY TEST BY DIFFERENT OBSERVERS

Nephrology Dialysis Transplantation

### Abstract

**Background:** Urinary erythrocyte dysmorphism was described long ago and has been used to identify glomerular bleeding and to guide follow-up investigation. This study aimed at analyzing the variability in erythrocyte dysmorphism observation performed by several observers, evaluating the correlation among the observations and its association with the diagnosis of the hematuria cause.

**Methods:** Eighteen urinary sediment samples from patients with glomerular and non-glomerular hematuria were selected, had the images captured and saved for later analysis. These images were analyzed by twelve observers experienced in erythrocyte dysmorphism evaluation who are presently in charge of conducting this test in clinical laboratories in the city of Porto Alegre (Brazil). The observers, blind to the patients' diagnoses, classified the samples according to presence or absence of erythrocyte dysmorphism and to estimated percentage of dysmorphic erythrocytes.

**Results:** Correct diagnoses were obtained in 79% of the observations, taking 75% as the minimum percentage of dysmorphic erythrocytes for the diagnosis of glomerular hematuria. We obtained 76% sensitivity, 82% specificity, 80% positive predictive value and

78% negative predictive value. The correlation among the observers was calculated with Kappa coefficient, with a agreement acceptable (kappa 0.58).

**Conclusions:** Our study demonstrated that, despite the lack of strict criteria for the evaluation and quantification of erythrocyte dysmorphism in the urinary sediment, the performance of this test by professionals involved in healthcare practice presents an acceptable level of accuracy and agreement, what supports the use of this test in the evaluation of patients with hematuria.

**KEYWORDS:** Erythrocytes dysmorphism, hematúria, interobservers variability

**RUNNING TITLE:** Variability in urinary morphology test by different observers

## **Introduction**

Hematuria is a frequent finding in medical practice; its prevalence in the population varies from 3 to 22% (1, 2). Investigation of asymptomatic hematuria might turn costly and time-consuming justifying the need for developing noninvasive diagnostic methods that can help localize the source of bleeding.

In 1979, Birch and Fairley reported that the erythrocytes found in the urine of patients with glomerular diseases presented considerable variation in size and shape when analyzed through phase contrast microscopy, so they were called dysmorphic. In contrast, the erythrocytes from non-glomerular bleeding presented uniform shape and size, with a morphology similar to that of peripheral blood, called isomorphic. A variable number of erythrocytes might lose their hemoglobin content and are called ghost cells, or be crenated (3). In the following decades, the finding of dysmorphic erythrocytes in the urinary sediment started to be widely used in the evaluation of hematuria. However, the subjectivity of this test resulted in countless discrepancies regarding the minimum percentage of dysmorphic cells needed for a diagnosis of glomerular bleeding. In the 13 studies we reviewed, the minimum percentages of dysmorphic cells needed for a diagnosis of glomerular hematuria varied between 10 and 90% (4-16) with varied sensitivity and specificity values in each series. The main explanation for the large variability in the literature is the lack of well-defined criteria for characterizing dysmorphism. Some authors have been using as a diagnostic criterion for dysmorphism the presence of a specific kind of erythrocyte, the acanthocytes (9).

Besides divergences in quantification, the evaluation of erythrocyte morphology in the urinary sediment is subject to variations due to individual observer's different criteria and amount of experience. In the literature, two studies assessed the variability in dysmorphic



erythrocytes evaluation by two observers. A strong correlation was found among the observations reported in those series, but the value of these studies are limited by the small number of observers (11, 17).

In order to evaluate the impact of the variability among observers in the analysis of urinary dysmorphic erythrocytes and its correlation with the diagnosis of the bleeding source, the present study was conducted with 12 observers experienced in evaluation of dysmorphic erythrocytes, who assessed 18 urine samples of patients with glomerular and non-glomerular hematuria.

### **Subjects and Methods**

Eighteen patients were selected in the Urology and Nephrology clinics of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brazil), from July to December 2002. Nine of these patients presented glomerular bleeding diagnosed through renal biopsy, and nine of them presented non-glomerular hematuria diagnosed through excretory urography, renal ultrasound, histologic examination or urine culture test with bacterial growth higher than 100,000 colony units per milliliter. Patients with more than one possible cause for the bleeding were excluded from the analysis. Urine samples were collected spontaneously, from the second void in the morning, and were then stored in sterile containers. The presence of hematuria was confirmed by strip test. The urinary sediment was tested in a standardized way, with phase contrast microscopy performed by a single researcher. The images of the erythrocytes enlarged 400 times were selected and their digital capture was carried out with the use of the software Image-Pro Plus 4.0, Maryland, USA. The images were stored and organized in different

folders related to each test. The number of images in each folder varied according to the intensity of the hematuria, always meeting the criterion of having at least one hundred erythrocytes per sample.

Twelve observers with experience in erythrocyte dysmorphism evaluation, presently in charge of conducting this test in clinical laboratories in the city of Porto Alegre, were invited to participate in the present study. The participants analyzed the images, accompanied by one of the researchers, blind to the patients' final diagnoses. Each test was classified according to presence or absence of erythrocyte dysmorphism and according to the estimated percentage of dysmorphic erythrocytes in comparison to the total number of erythrocytes. Each observer's age, time of experience and previous experience with phase contrast microscopy were also taken into consideration. The data were analyzed and tested as to the proportion of correct diagnoses, as well as to false positive and negative results. Standard errors and sample errors were calculated considering a confidence level of 95%, and the analysis of correlation was conducted with the use of Pearson, Kappa and Phi coefficients.

## **Results**

Two hundred and sixteen diagnoses were obtained from 18 urinary erythrocyte dysmorphism evaluations performed by 12 observers. Two diagnosis were not provided by the observers. The actual disease causing hematuria in the 18 tests were known and were used as gold standards.

The 216 diagnoses were technically analyzed for consistency, based on the literature standards, and the cutoff for the diagnosis of glomerular disease was defined as above 75% of

dysmorphism urinary red blood cells. Based on this criterion, 34 diagnoses were considered invalid. Since two diagnoses were not provided, the final material consisted of 180 observations. Observers' characteristics and their respective correct diagnoses are summarized in Table 1.

Average time of experience with analysis of the erythrocyte dysmorphism test was 18 years. Average time of experience with phase contrast microscopy was 7.7 years. The time of experience with phase contrast was not informed by one of the observers.

A correct diagnosis was obtained in 79% of the valid observations considered. The false-negative and false-positive results were respectively 11.7% and 8.9%.

The analysis of standard error and of sample error with confidence level of 95% is demonstrated in Table 2.

As for the diagnostic parameters the sensitivity was 76%, specificity 82%, positive and negative predictive value were 80% and 78% respectively and the accuracy was 79%.

The correlation between each observer's instances of correct diagnoses and their age, time of experience and experience with phase contrast microscopy was not statistically significant. The coefficients of correlation were  $-0,25$  ( $p=0,42$ ) for the observe's age;  $-0,28$  ( $p=0,23$ ) for the length of experience of the observer with dysmorphism analyses and  $0,35$  ( $p=0,23$ ) for length of experience with contrast phase microscopy.

In order to evaluate the level of agreement among the 12 observers, Kappa correlation coefficients were calculated, correcting the proportion of instances due to chance, the bias and the prevalence, as detailed in Table 3.

## **Discussion**

Evaluation of patients with hematuria continues to be a diagnostic challenge. Since Birch and Fairley's early reports on the presence of morphological alterations in the erythrocytes from glomerular bleeding, this data has been studied and used in follow-up investigation of the patients. Individuals who present strong evidence of glomerular bleeding should be investigated with greater focus on glomerular renal diseases, so as to avoid inflicting urinary tract investigation to these patients, thus reducing investigation costs and potential side effects.

Although the usefulness of erythrocyte dysmorphism as strategy for the evaluation of patients with hematuria has been well described, much is still unclear in the literature. The main divergence in the literature is the minimum number of dysmorphic erythrocytes needed for a diagnosis of glomerular bleeding. As many others in the present analyses we established 75% as the cut off for glomerular hematuria(9,10). The observers interviewed defined this minimum value of erythrocyte alterations based on the literature and on their previous knowledge and they used this criterion to evaluate the samples. Some observations were not quantified and were thus excluded from the final analysis, leaving 180 valid observations.

Acanthocytes are described in the literature as the erythrocyte shape deformation that best characterize glomerular bleeding (9,13). The presence of acanthocytes, in this series, was evaluated together with the observations and was not used as the solo criterion for dysmorphism. This fact can be explained by the observers' being free to judge and evaluate the samples.

From the 180 valid observations, 143 (79%) yielded correct diagnoses, with 76% sensitivity, 82% specificity, and 80% positive and 78% negative predictive values. Different series reported in the literature present variations in sensitivity from 52 to 100% and in specificity from 60 to 100%, using different criteria and cutoff points varying from 10 to 80% of cells with altered morphology for characterizing urinary red blood cell dysmorphism (5,9,11,13). One of the aims of the present study was to evaluate the performance of professionals involved in healthcare activities, assessing the efficacy of the erythrocyte dysmorphism test in this context. The estimated accuracy in this series was 79% which is similar to the one referred in the literature (8,9,13).

Contrary to our expectations no statistically significant correlation was found between the observations and the length of experience or experience with the use of phase contrast microscopy. This lack of correlation is very relevant, since the literature shows that the observer's experience may be a limiting factor in dysmorphism evaluation, allowing the speculation that the careful evaluation of the urinary sediment by capable observers is useful and relevant, independent of their length of experience.

Despite not having presented statistical significance, previous experience with phase contrast microscopy demonstrated positive correlation with the number of correct diagnoses. For the evaluation of urinary red blood cell shape such microscopy technique is reported in the literature as superior to conventional optical microscopy and, although its use is not widely spread in clinical practice, it may represent an useful tool for dysmorphism evaluation (18).

To our knowledge the present study was the first to evaluate the level of dysmorphism agreement assessment by multiple observers. Previous published reports have correlated only

two independent observers (11,17,19). Those studies demonstrated substantial correlation coefficient among observers ( $\kappa > 0.60$ ), but the number of observers evaluated clearly limited the applicability of the results. In the present series, agreement among the 12 observers was estimated at 0.58 with Kappa coefficient, denoting fair agreement among observations (20).

In conclusion, this study demonstrated that, despite the subjectivity and the limitations due to lack of strict criteria for evaluation and quantification of erythrocyte dysmorphism in the urinary sediment, the performance of this test by professionals involved in healthcare practice presented a highly acceptable level of accuracy and agreement, supporting the use of this test in the evaluation of patients with hematuria.

## References

1. Mohr D. Asymptomatic microhematuria and urologic disease: a population-based study. *JAMA* 1986; 256: 224-229
2. Woolhandler S. Dipstick urinalysis screening of asymptomatic adults for urinary tract disorders. *JAMA* 1989; 262: 1214-1219
3. Birch DF, Fairley KF. Haematuria: glomerular or non glomerular? *The Lancet* 1979; 2: 845-846
4. Georgopoulos M, Schuster FX, Porpaczy P *et al.* Evaluation of asymptomatic microscopic haematuria – influence and clinical relevance of osmolality and pH on urinary erythrocyte morphology. *Br J Urol* 1996; 78(2): 192-196
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): 35-39
6. Chang BS. Red cell morphology as a diagnostic aid in hematuria. *J Am Med Assoc* 1984; 252: 1747-1749
7. Fassett RG, Horgan BA, Mathew TH. Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. *Lancet* 1982; I: 1432-1434
8. Birch DF, Fairley KF, Whitworth JA *et al.* Urinary erythrocyte morphology in diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 1983; 20: 78-84
9. Kohler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia – a characteristic marker for glomerular bleeding. *Kidney Int* 1991; 40(1): 115-120
10. Pollock C, Pei-Ling L, Gyory AZ *et al.* Dysmorphism of urinary red blood cell – value in diagnosis. *Kidney Int* 1989; 36: 1045-1049

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 Geneeskd* 1994; 138(14): 721-726
12. Rizzoni G, Braggion F, Zacchello G. Evaluation of glomerular and non-glomerular hematuria by phase contrast microscopy. *J Paediatr* 1983; 103: 370-374
13. Catala Lopez JL, Fabregas MB. Acanthocyturia is more efficient in to differentiate glomerular from non-glomerular hematuria then dysmorphic erythrocytes. *Arch Esp Urol* 2002; 55(2): 164-166
14. Thiel G, Biemann D, Wegmann W *et al.* Glomeruläre Erythrozyten im Urin: Erkennung und bedeutung. *Schweiz med Wochenschr* 1986; 116: 790-797
15. Obroniecka I. Values of phase-contrast microscopy in the etiological diagnosis of hematuria in adults. *Pol Merkuriusz Lek* 1998; 5(29): 277-279
16. Stapleton FB. Morphology of urinary red blood cells: A simple guide in localizing the site of haematuria. *Paediatr Clinic NA* 1987; 34: 562-569
17. Ramann GV, 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: 304-308
18. Mehta K, Tirthani D, Ali U. Urinary red cell morphology to detect site of hematuria. *Indian Pediatr* 1994; 31(9): 1039-1045
19. Crompton CH, Ward PB. The use of urinary red cell morphology to determine the source of hematuria in children. *Clin Nephrol* 1993; 39(1): 44-49
20. Landis R, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; S3: 159-174



## TABLES

*Table 1. Demographic data and the number of correct diagnoses by each observer*

OBSER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total number of correct diag- noses
TIMEXP	22	25	11	39	17	3	31	13	25	5	26	10	
EXPPC	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	
TEXPPC	22	0	0	0	17	1,5	31	13	NI	0	0	0	
Correct diagnoses	9	3	4	7	14	17	18	15	12	15	15	14	143

*Sex: male 1, female 2; TIMEXP: time of experience (in years); EXPPC: experience with phase contrast: yes 1, no 2; TEXPPC: time of experience with phase contrast (in years); NI: not informed*

*Table 2. Calculation of Standard error and Sample error*

Categories	Absolute Frequency	Relative Frequency (%)	Standard error	Sample error*
Correct Diagnoses (0)	143	79	2.8	5.4
False Negative (1)	21	11.7	2.2	4.3
False Positive (-1)	16	8.9	1.9	3.8
Total	180	100.00		

*\* Considering a confidence level of 95% - values in percentage*

*Table 3. Results of Agreement Analysis: Kappa and Phi coefficients*

Measurement	Value	Description
Cohen's Kappa	0.5882	Level of agreement among diagnoses and dysmorphism presence, corrected as to chance agreement. *
Scott's Kappa	0.5879	Level of agreement among diagnoses and dysmorphism presence, corrected as to chance agreement and adjusted as to bias. *
Bennet's Kappa	0.5889	Level of agreement among diagnoses and dysmorphism presence, corrected as to chance agreement and adjusted as to bias and prevalence. *
Bies level	-0.0278	Measurement of bias in the agreement.
Prevalence level	-0.0500	Measurement of prevalence in the agreement.
Phi coefficient	0.5891	Degree of association between diagnosis and dysmorphism presence

*\* It presupposes independence among the observers.*