



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina

Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpml@sbpc.org.br,adagmar.andriolo@g
mail.com

Sociedade Brasileira de Patologia
Clínica/Medicina Laboratorial

Bottini, P.V.; Garlipp, C.R.

Urinálise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 42, núm. 3, junio, 2006, pp.

157-162

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541929003>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Urinálise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo

Primeira submissão em 28/11/05
Última submissão em 03/04/06
Aceito para publicação em 11/04/06
Publicado em 20/06/06

Urinalysis: comparison between microscopic and flow cytometry analysis

Bottini P.V.¹; Garlipp C.R.²

unitermos

Urinálise
Microscopia óptica comum
Citometria de fluxo

resumo

Introdução e objetivo: O exame de urina é um procedimento de alta demanda, trabalhoso e pouco padronizado. Este estudo teve por objetivo avaliar o desempenho de um citômetro de fluxo na realização do exame de urina de rotina. **Casuística e métodos:** Foram analisadas 1.140 amostras de urina através de microscopia óptica comum e de citometria de fluxo (UF-100/SYSMEX). A precisão foi estabelecida com a análise de quatro amostras de urina (20 replicações cada). O cálculo da reprodutibilidade foi realizado a partir de 30 determinações de dois controles comerciais em dias consecutivos. **Resultados:** As contagens de hemácias e leucócitos mostraram concordância de 91% e 93%, respectivamente. Cilindros, células e bactérias mostraram sobreposição dos valores fornecidos pelo UF-100 quando comparados com os relatados na análise microscópica. A precisão do UF-100 variou de 4% a 155%, com reprodutibilidade de 3% e 25%, dependendo do parâmetro avaliado. **Conclusão:** O equipamento UF-100/SYSMEX demonstra boa precisão, reprodutibilidade e concordância com a microscopia óptica. A utilização da citometria de fluxo implica numa maior agilização e padronização da rotina, bem como em uma nova maneira de reportar e interpretar o exame de urina de rotina.

abstract

Introduction: Urinalysis is a high demand procedure, with large amount of manual labor and poorly standar-dized. The purpose of this investigation was to analyze the performance of an automated system based on flow cytometry for routine urinalysis. Material and methods: We analyzed 1,140 urine samples by light field microscopy and by flow cytometry (UF-100/SYSMEX). For the precision study of the UF-100, we calculated the within-run and between-run coefficients of variation using two different levels of commercial controls and four different urine samples. Results: Erythrocytes and leukocytes counts by the two methods showed an agreement of 91% and 93%, respectively. Casts, epithelial cells and bacteria counts by the UF-100 showed a significant overlap when compared to microscopic analysis. Intra assay precision (within-run) ranged from 4% to 155% and interassay precision (between-run) varied from 3% to 25%, depending on the considered parameter. Conclusion: Flow cytometry is a precise and reproducible technique, with a strong correlation with the results obtained by microscopic analysis. Flow cytometry allows a better workflow and a new manner of reporting and interpreting routine urinalysis.

key words

Urinalysis
Microscopic examination
Flow cytometry

1. Médica patologista clínica; supervisora do Serviço de Líquidos Biológicos da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/UNICAMP).

2. Professora associada do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP.

Introdução

Embora a análise do sedimento urinário forneça informações essenciais sobre o estado funcional dos rins, o exame de urina é um procedimento de alta demanda que requer um trabalho intenso, é pouco padronizado e apresenta uma ampla variabilidade interobservadores⁽¹³⁾. Adicionalmente, esse exame gera um custo elevado aos laboratórios, já que para se obter resultados de qualidade há a necessidade de pessoal bastante qualificado⁽²⁾. Atualmente, tanto o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) dos EUA⁽¹¹⁾ como o European Urinalysis Guidelines⁽⁵⁾ recomendam a padronização da contagem de células do exame de urina, por meio de um sistema automatizado e/ou de um procedimento padronizado em uma câmara de contagem de células de volume pré-definido⁽¹²⁾.

Na tentativa de se automatizar a análise microscópica da urina, no final dos anos 1980, surgiram alguns sistemas analisadores de imagens. Esses equipamentos, apesar de melhorarem o fluxo de trabalho e aumentarem a produtividade e precisão das análises, ainda são bastante dependentes de um observador bem treinado⁽⁴⁾.

Há alguns anos surgiu no mercado um equipamento que realiza a análise da urina por citometria de fluxo, o UF-100/SYSMEX. Esse equipamento é um analisador totalmente automatizado, que aspira a amostra de urina e, por fluorescência, cora o DNA e as membranas dos elementos formados na urina nativa (fenantridina para ácidos nucleicos e carbocianina para membranas celulares). A seguir, células, bactérias e cilindros são analisados e classificados, levando-se em consideração o volume (impedânci), o tamanho (dispersão de luz) e as características tintoriais (fluorescência) nucleares e citoplasmáticas dos elementos urinários⁽⁶⁾. A distinção entre hemácias e leveduras é feita de acordo com a intensidade de suas fluorescências.

Apesar de a análise microscópica da urina demandar enorme trabalho laboratorial manual e de apresentar precisão limitada, ainda é universalmente utilizada para o exame de células e partículas presentes na urina. Quando comparados com a microscopia óptica comum, os citômetros de fluxo melhoraram a precisão e a eficácia das contagens, gerando uma substancial redução do trabalho. No entanto, a falta de padronização nos seus procedimentos analíticos permanece um importante fator limitante para sua ampla utilização.

Objetivo

Este estudo teve por objetivo avaliar o desempenho de um citômetro de fluxo (UF-100/SYSMEX), frente a análises microscópicas do sedimento urinário, em um hospital de atendimento terciário.

Casuística

Foram avaliadas 1.140 amostras isoladas de urina (jato médio), encaminhadas ao laboratório a pedido médico, para análise de rotina (exame físico-químico e análise do sedimento urinário) na Seção de Urinálise da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/UNICAMP).

Este estudo obteve a dispensa da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, uma vez que os testes laboratoriais foram realizados com o excedente das amostras de urina encaminhadas para o diagnóstico e tratamento dos pacientes atendidos em nosso Serviço. O anonimato dos indivíduos foi preservado, segundo os critérios estabelecidos pela Resolução 196/96 e observados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

Métodos

Todas as amostras foram analisadas por microscopia óptica comum e por citometria de fluxo. Para análise microscópica do sedimento, as amostras foram inicialmente homogeneizadas e submetidas a centrifugação (10ml de urina a 1.500rpm/min, durante 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado, restando 1ml de sedimento, que foi ressuspensão por agitação e transferido para um pocinho da lâmina padronizada (KCELL).

O sedimento foi inicialmente analisado (aumentado em 100 vezes) para verificar a disposição dos elementos presentes na área não-demarcada por círculos. A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada com aumento de 400 vezes, sendo contados pelo menos 10 campos e o resultado expresso em número médio de leucócitos e hemácias por campo. A presença de bactérias, cilindros, cristais e células epiteliais foi expressa de maneira semiquantitativa (**Tabelas 1 e 2**).

Para análise por citometria de fluxo utilizou-se o equipamento UF-100/SYSMEX. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos de 10ml, os quais

Expressão dos resultados: hemácias e leucócitos	
Nº médio/campo	Descrição
< 1	Inferior a 1/campo
Entre 1 e 100	Número/campo
> 100	Superior a 100/campo

Expressão dos resultados: cilindros, cristais e células epiteliais	
Nº médio/campo	Descrição
0	Ausentes
< 1	Raros
1 a 3	Número regular
> 3	Numerosos

foram colocados em *racks* do equipamento. Este realizou a aspiração da amostra e o processamento automatizado da contagem dos elementos figurados presentes na urina. Os resultados foram expressos de forma gráfica e numérica (elementos por μl e por campo).

A precisão do UF-100 foi estabelecida a partir da análise de quatro amostras de urina (20 replicações cada), sendo o cálculo da *reprodutibilidade* realizado a partir de 30 determinações de dois controles comerciais, em dias consecutivos.

Análise estatística

A análise estatística se baseia em testes de concordância (através da construção de tabelas 2 x 2 com posterior análise pelo χ^2) e em cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos, conforme recomendação do fabricante do equipamento.

Resultados

O estudo da precisão do UF-100 (**Tabelas 3 e 4**) apresentou coeficientes de variação (CV) intra-ensaio de 5% a 21% (hemácias); 4% a 24% (leucócitos); 5% a 35% (células epiteliais); 66% a 155% (cilindros) e 4% a 6% (bactérias).

A reprodutibilidade (coeficiente de variação [CV] interensaio, **Tabelas 5 e 6**) variou entre 3% e 25%, dependendo do parâmetro avaliado.

Tabela 3 Precisão do UF-100/CV intra-ensaio: hemácias e leucócitos

	Hemácias*				Leucócitos*			
Replicatas	20	20	20	20	20	20	20	20
Média	39	5	4	0,2	106	2	22	0,5
Mínimo	34	4	3	0,2	101	1	18	0,3
Máximo	42	7	4	0,3	115	2	30	0,7
Desvio-padrão	2	1	0,4	0,1	4	0,1	3	0,1
CV (%)	5	12	9	21	4	9	13	24

* Contagem/campo.

Tabela 4 Precisão do UF-100/CV intra-ensaio: células epiteliais, cilindros e bactérias

	Células*					Cilindros*				Bactérias*		
Replicatas	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Média	14	1	7	0,3	1,0	0,3	0,3	0,2	1087	136	694	81
Mínimo	13	1	6	0,1	0	0	0	0	858	124	564	75
Máximo	16	2	10	0,5	3	1	1	1	1176	147	728	89
Desvio-padrão	1	0,2	1	0,1	0,7	0,3	0,4	0,3	68	6	35	3
CV (%)	5	15	14	35	66	121	109	155	6	4	5	4

* Contagem/campo.

Tabela 5 Reprodutibilidade/CV interensaio: hemácias e leucócitos

	Hemácias*		Leucócitos*	
Replicatas (CQ 1 E 2)	30	30	30	30
Média	40	201	42	196
Mínimo	31	187	33	187
Máximo	48	210	51	207
Desvio-padrão	4	6	5	6
CV (%)	10	3	11	3

* Contagem/ μ l.**Tabela 6** Reprodutibilidade/CV interensaio: células, cilindros e bactérias

	Células*		Cilindros*		Bactérias*	
Replicatas (CQ 1 e 2)	30	30	30	30	30	30
Média	12	95	6	21	2.975	981
Mínimo	8	92	5	15	2.026	569
Máximo	18	105	8	25	3.763	1.328
Desvio-padrão	2	4	2	3	43	21
CV (%)	19	5	25	13	1	2

* Contagem/ μ l.

As contagens de hemácias e leucócitos mostraram concordância entre os métodos de 91% e 93%, respectivamente, com valor preditivo (VP) negativo superior a 97% quando consideramos como limite de normalidade uma contagem de até cinco elementos/campo ($p < 0,05$) (Tabelas 7 e 8).

Em relação a cilindros, células e bactérias (Figuras 1, 2 e 3), observamos uma grande sobreposição das contagens fornecidas pelo UF-100 quando comparados com os relatados na análise microscópica, onde foram expressos como ausentes, raros, regular número e numerosos.

O principal interferente nas contagens de cilindros foi a presença de filamentos de muco, enquanto leveduras e cristais de oxalato de cálcio discóides foram os principais responsáveis por contagens de hemácias falsamente elevadas.

Tabela 7 Concordância entre as contagens de hemácias

	> 5/campo (M0)	até 5/campo (M0)	Total
> 5/campo (UF 100)	141	77	218
até 5/campo (UF 100)	31	891	922
Total	172	968	1140

Sensibilidade = 82%; especificidade = 92%; VP positivo = 65%; VP negativo = 97%; concordância = 91%.

Tabela 8 Concordância entre as contagens de leucócitos

	> 5/campo (M0)	até 5/campo (M0)	Total
> 5/campo (UF 100)	25	61	312
até 5 / campo (UF 100)	15	813	828
Total	266	874	1.140

Sensibilidade = 94%; especificidade = 93%; VP positivo = 80%; VP negativo = 98%; concordância = 93%.

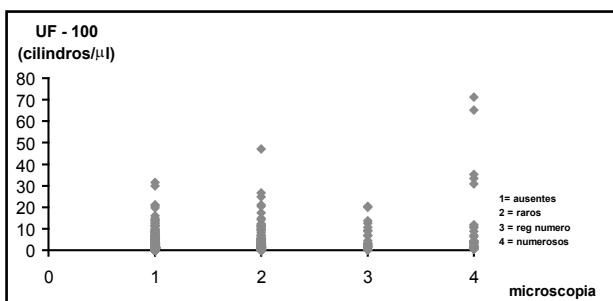


Figura 1 – Relação entre microscopia ótica e citometria de fluxo – cilindros

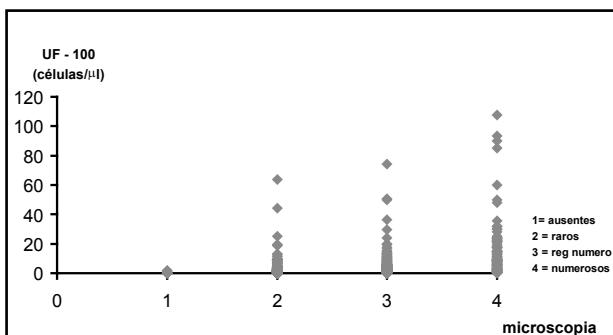


Figura 2 – Relação entre microscopia ótica e citometria de fluxo – células epiteliais

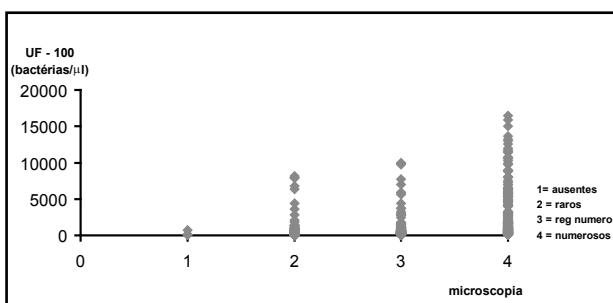


Figura 3 – Relação entre microscopia ótica e citometria de fluxo – bactérias

Discussão

A análise manual do sedimento urinário, embora de grande utilidade clínica, apresenta muitos problemas metodológicos. Além de consumir considerável tempo de trabalho do analista, vários fatores podem contribuir para a imprecisão nos resultados desse método (centrifugação, diferenças de interpretação de elementos celulares, cilindros, entre outros)⁽²⁾.

O analisador UF-100 identifica na urina, pelo princípio da citometria de fluxo, células e partículas de maneira análoga à dos analisadores de células sanguíneas. Portanto é um equipamento totalmente automatizado, multiparamétrico e com boa velocidade de processamento (em torno de 100 amostras/hora). Em relação à análise estatística, o fabricante do equipamento recomenda o uso de testes de comparação dos resultados entre metodologias (microscopia x automa-

ção), com base em cálculos de taxas de concordância das amostras consideradas negativas ou normais.

Estudos têm relatado uma boa correlação entre o número de células contadas por microscopia óptica e citometria de fluxo⁽¹⁾. De fato, nossos resultados apresentaram boa concordância entre as duas metodologias quando consideramos o limite de normalidade de até cinco elementos/campo (hemácias ou leucócitos). Além disso, o UF-100 vem se mostrando bastante preciso e com boa reprodutibilidade, o que foi demonstrado neste e em outros estudos^(2, 7, 12). Já com relação aos cilindros, o elevado coeficiente de variação intra-ensaio observado em nosso estudo se deve ao pequeno número de cilindros presentes no material analisado.

Vários autores^(2, 12) vêm demonstrando que o UF-100 detecta mais hemácias, leucócitos e células epiteliais do que a microscopia manual. Isto provavelmente representa a detecção real de elementos que não são identificados pela microscopia óptica, uma vez que a rotina de urinálise compreende várias etapas, como centrifugação, decantação e ressuspenção, as quais podem levar a uma perda e/ou degeneração celular variável. Além desses fatores, até a matéria-prima do tubo côncico para centrifugação pode ser mais um fator de variação, podendo ocorrer, ou não, adsorção de elementos celulares às suas paredes^(8, 10). Provavelmente, essa observação justifica uma das maiores dificuldades de sua implantação na rotina da maioria dos laboratórios, que reside no fato de seus valores de referência serem significativamente diferentes e mais elevados do que os habitualmente adotados.

No presente trabalho, o principal interferente nas contagens de cilindros foi a presença de filamentos de muco, enquanto leveduras e cristais de oxalato de cálcio discóides foram os principais responsáveis por contagens de hemácias falsamente elevadas. Outros autores⁽²⁾ observaram que o UF-100 superestimava a contagem de células epiteliais na presença de cilindros, *Trichomonas* sp. e proteinúria. Nesse último caso a explicação seria a formação de grumos leucocitários devido à presença de proteínas na amostra.

Vários relatos fazem referência à contagem incorreta de hemácias na presença de cristais, leveduras, espermatozoides e grande número de bactérias^(9, 10, 12). Da mesma forma, a principal causa de contagem de leucócitos falsamente elevados é a presença de núcleos isolados de células epiteliais⁽¹²⁾.

Segundo Ottiger e Huber⁽¹²⁾, a maior parte das revisões pode ser atribuída a alertas decorrentes da presença de células redondas (SRC), cilindros, cristais, leveduras e espermatozoides. Células epiteliais agrupadas freqüentemente dão um alerta para cilindros patológicos e SRC que necessitam de confirmação. Grande número de cristais, leveduras e espermatozoides superestimam a contagem de hemácias, como foi comprovado em nosso estudo.

Na análise dos dados relativos a cilindros, células e bactérias, em razão da sobreposição dos valores fornecidos pelo UF-100 quando comparados com os relatados na análise microscópica, é necessário estabelecer uma nova maneira de expressar esses resultados em substituição à forma de expressão semiquantitativa habitualmente utilizada, ressaltando-se a presença ou ausência desses elementos.

A correta identificação de cilindros e cristais patológicos ainda necessita ser realizada através de microscopia óptica tradicional. Da mesma forma, deve-se ressaltar que todas as amostras que apresentem alertas (*flags*) ou elementos anormais devem ser submetidas à revisão microscópica. Vale lembrar que amostras de urina proveniente de serviços de nefrologia apresentam maior taxa de revisão⁽³⁾.

Para o estabelecimento de um algoritmo que reduza o trabalho manual, permitindo maior otimização das rotinas sem perda de sensibilidade e especificidade, deve-se levar em conta contagens celulares elevadas, presença de cilindros, cristais, leveduras, espermatozoides, além de alertas para elementos patológicos e da análise detalhada dos gráficos de dispersão para detectar um possível padrão anormal.

Antes da liberação final é prudente associar uma checagem cruzada entre os resultados obtidos na análise físico-química (através de tiras reagentes) com os dados fornecidos pelo UF-100.

Conclusão

Nossos resultados demonstram que o equipamento UF-100 apresenta boa precisão, reproduzibilidade e concordância com a microscopia óptica. Os dados apresentados confirmam a dificuldade de padronização e a subjetividade da análise microscópica do exame de urina. A utilização rotineira da citometria de fluxo implica em maior agilização e padronização da rotina, ao lado de uma nova maneira de se reportar e interpretar o exame de urina de rotina.

Agradecimentos

A Bruna de Carvalho Gallo, João Guilherme A. P. Franceschi, José Ricardo Lauand e a Susy Helena Afaz pela ajuda inestimável na compilação dos dados.

Referências

1. ANDRIOLI, A. et al. Avaliação de um sistema totalmente automatizado para a realização do exame de urina de rotina: urina tipo I. *NewsLab*, v. 36, p. 76-80, 1999.
2. BEN-EZRA J.; BORK, L.; MACPHERSON, R.A. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. *Clin Chem* v. 44, p. 92-95, 1998.
3. DELANGHE J.R. et al. The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice. *Clin Chim Acta*, v. 301, p. 1-18, 2000.
4. DIMECH, W.; RONEY, K. Evaluation of an automated urinalysis system for testing urine chemistry, microscopy and culture. *Pathology*, v. 34, p. 170-7, 2002.
5. EUROPEAN CONFEDERATION OF LABORATORY MEDICINE. European urinalysis guidelines. *Scand J Clin Lab Invest*, v. 60, s. 231, p. 1-86, 2000.
6. FENILI, D.; PIROVANO, B. The automation of sediment urinalysis using a new urine flow cytometer (UF-100). *Clin Chem Lab Med*, v. 36, n. 12, p. 909-17, 1998.
7. KEIJZER, M.H.; BRANDTS, R.W. Flow cytometry and the urine laboratory: field evaluation of the SYSMEX UF-100. *SYSMEX J Int*, v. 7, p. 117-22, 1997.
8. KIM Y. et al. Quantitative analysis of urine sediment using newly designed centrifuge tubes. *Ann Clin Lab Sci*, v. 32, p. 55-60, 2002.
9. KOURI T.T. et al. Evaluation of SYSMEX UF-100 urine flow cytometer vs. chamber counting of supravitally stained specimens and conventional bacterial cultures. *Am J Clin Pathol*, v. 112, p. 25-35, 1999.
10. LANGLOIS M.R. et al. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. *Clin Chem*, v. 45, p. 118-22, 1999.
11. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens; approved guideline: NCCLS document GP 16-A. Wayne, PA: NCCLS, 1995.
12. OTTIGER, C.; HUBER, A.R. Quantitative urine particle analysis: integrative approach for the optimal combination of automation with UF-100 and microscopic review with KOVA cell chamber. *Clin Chem*, v. 49, p. 617-23, 2003.
13. WINDEL, P.; STATLAND, B.E.; JORGENSEN, K. Urine microscopy, an ill defined method, examined by a multifactorial technique. *Clin Chem*, v. 20, p. 436-9, 1974.

Endereço para correspondência

Paula V. Bottini
Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP
Cidade Universitária Zeferino Vaz
Caixa Postal 6142
CEP: 13083-888 – Campinas-SP
Tel.: (019) 3788-7539 – Fax: (019) 3788-7510
e-mail: lbio@hc.unicamp.br