

COLORAÇÃO DE LEUCÓCITOS EM MEIO LÍQUIDO PARA AQUISIÇÃO E DIFERENCIAÇÃO POR PROCESSAMENTO DE IMAGENS

V. A. O. Nascimento*, T. F. Moraes*, H. J. Q. Oliveira*

*Núcleo de Pesquisas Tecnológicas - Universidade de Mogi de Cruzes, Mogi das Cruzes, Brasil
e-mail: vanilda@umc.br

Resumo: O hemograma é um dos exames laboratoriais mais solicitados para acompanhamento e diagnóstico de diversas patologias. Entretanto, os métodos usados para sua realização (manual e automatizado) apresentam limitações para uso em ambiente ambulatorial. As técnicas de aquisição, processamento e análise de imagens representam uma alternativa de automatização do hemograma manual, que pode viabilizá-lo em ambulatorios. Visando a caracterização e contagem dos leucócitos, por processamento de imagens, desenvolveu-se um corante de fase única (VMPF) que cora diferenciadamente os leucócitos em meio líquido. A coloração ocorre em menos de um minuto. Para validar o corante proposto foi realizada uma análise estatística das contagens de leucócitos com quatro técnicas: Automatizada, Manual em esfregaço com Leishman e VMPF e Manual em meio líquido com VMPF. Não houve diferenças estatísticas entre elas, o que valida o VMPF como corante diferencial. Uma análise visual das imagens foi realizada por um biomédico experiente, atestando que a diferenciação ocorre de forma semelhante aos corantes usuais. A viabilidade para a diferenciação celular por processamento de imagens foi avaliada por comparação dos histogramas RGB das células coradas por Leishman e VMPF. Observou-se que todas as células coradas com Leishman apresentam o mesmo padrão nos histogramas RGB, enquanto as coradas com VMPF apresentam histogramas diferenciados, criando um potencial de diferenciação celular por processamento de imagem, já na fase de aquisição das imagens. O método proposto também apresenta potencial de diferenciação por iluminação monocromática em RGB.

Palavras-chave: Hemograma, Processamento de imagens, Aquisição de Imagens, Leucócitos, Coloração diferencial.

Abstract: *The hemogram is one of the most requested laboratory tests for monitoring and diagnosis of various diseases. However, the methods used for their implementation (manual and automated) have limitations for use in an outpatient setting. The techniques acquisition, processing and analysis of images are alternative for automation of the manual count, which can enables it you uses in clinics. In order, to characterize and counting of leukocytes by image processing, with a single phase colorant (VMPF), which allows differentially stain leukocytes in the liquid medium environment, was developed. The coloring*

occurs in less than a minute. To validate the proposed dye, a statistical analysis of WBC counts was performed with four techniques: Automated, Manual smear with Leishman and VMPF Manual and in liquid medium environment with VMPF. There were no statistical differences between them, which validates the VMPF as differential dye. A visual analysis of the images was performed by an experienced biomedical, attesting that the differentiation occurs in a similar way to the usual coloring. The feasibility for cell differentiation by processing images was evaluated by comparing the RGB histograms of cells stained with Leishman and VMPF. It was observed that all cells stained with Leishman shown the same pattern in the RGB histograms, while the ones stained with VMPF shown distinct histograms, creating a potential for cell differentiation by image processing at the stage of images acquisition. The proposed method also has shown potential for differentiation by monochromatic illumination RGB.

Keywords: Hemogram, Image processing, Image acquisition, Differential staining, Leukocytes.

Introdução

O hemograma é o exame laboratorial mais solicitado para acompanhamento e triagem do estado de saúde do paciente. Ter o hemograma com maior agilidade durante as consultas de rotina ou emergências é essencial [1]. No entanto, os dois métodos disponíveis atualmente (manual e automatizado) não são viáveis para o ambiente ambulatorial. As leituras automatizadas são ágeis, mas só apresentam viabilidade se forem realizadas em grandes quantidades, o que não é o caso de ambulatorios e clínicas. Além disso, quando ocorrem desvios dos valores normais é necessário realizar a leitura manual, pois as leituras automatizadas não permitem verificação direta dos resultados. As leituras manuais são trabalhosas, lentas e requerem pessoal treinado e experiente, o que acaba elevando os custos e retardando os resultados [2]. Por isso, em atendimentos de urgências e emergência os médicos são levados a tomarem decisões sem o exame.

Uma alternativa adequada é a automatização do hemograma manual, de modo que ele seja realizado com maior agilidade, com menor dependência de pessoal especializado, com a vantagem de permitir a verificação dos resultados. Esses requisitos são atendidos por técnicas de aquisição, processamento e

análise de imagens [3]. Entretanto, para realizar um projeto dessa magnitude é necessário cumprir grande quantidade de etapas. Uma delas é a preparação das células (diluição e coloração) visando a caracterização e a contagem. Então, neste trabalho foi desenvolvido um novo método de preparação das amostras de sangue, em meio líquido, visando a contagem e a caracterização dos leucócitos por processamento de imagens. Este novo método suprime a etapa de preparação dos esfregaços e permite a contagem diferencial e absoluta em uma etapa.

Materiais e métodos

O método proposto, que cora diferenciadamente os leucócitos, utiliza dois corantes catiônicos com seletividade para ácidos nucleicos: verde de metil e pironina Y, e um corante aniônico com afinidade para estruturas basófilas: fluoresceína sódica. O verde de metil possui forte caráter catiônico, pois é atraído eletrostaticamente pelos grupos fosfato que estão localizados na parte externa da cadeia de ácido desoxirribonucleico (DNA). Isso resulta em núcleos de leucócitos corados em azul-esverdeado. A pironina Y é levemente catiônica, o que lhe confere maior afinidade com estruturas planas e menos polimerizadas, como as moléculas de ácido ribonucleico (RNA). Assim, ela cora os nucléolos e as áreas contendo RNA em tons rosados (*pink*). A fluoresceína sódica cora os grânulos citoplasmáticos e outras estruturas que possuem proteínas básicas, por conta do seu caráter aniônico. Desta forma, grânulos eosinofílicos assumem uma coloração amarelo alaranjado. Essas características de coloração são desejáveis ao processamento de imagens, pois apresentam três grupos distintos de cores, enquanto a coloração tradicional resulta em imagens nas cores róseo-azuladas, mais difíceis de processar digitalmente. Porém, usando as preparações usuais desses corantes, a diferenciação dos leucócitos é sutil e de baixo contraste [4]. Além disso, a preparação da lâmina é trabalhosa, inviabilizando seu uso para contagem visual tradicional.

Para obter uma coloração diferencial melhorada e mais simples de utilizar em rotina foi desenvolvida uma nova combinação dos corantes em uma solução única, que foi preparada conforme a seguinte descrição. Inicialmente foi produzida uma solução contendo verde de metil (0,2%) e pironina Y (0,15%) em tampão acetato. A solução foi purificada através da extração com clorofórmio, para a remoção dos cristais violeta [5], em condições controladas de concentração, temperatura e pH. Posteriormente preparou-se a solução de fluoresceína sódica (0,5%) em meio alcoólico, novamente em condições controladas. Então, o corante único VMPF foi obtido pela mistura da solução de verde de metil, pironina Y com a solução de fluoresceína sódica na proporção de 2:1, obtendo assim uma solução única com pH de 5,01.

Validação do VMPF como corante – por se tratar de um protocolo de preparação ainda não documentado foi necessário validar a atuação e a estabilidade do VMPF. Para esta etapa um biomédico, com mais de 10

anos de experiência em exames de hemograma, trabalhou como colaborador da pesquisa.

Toda validação foi realizada com sangue de cachorro, que ao microscópio se assemelha ao sangue humano. A coleta do sangue foi autorizada pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade de Mogi das Cruzes - CEMEA-UMC 045/07. Todas as coletas de sangue foram realizadas por médicos veterinários.

As amostras foram submetidas à contagem automatizada num Citômetro de fluxo comercial da marca Mindray, modelo BC 2800Vet. Este Citômetro diferencia os leucócitos em três grupos e não em cinco como está sendo proposto. Estas contagens foram utilizadas com parte da validação do novo método.

A validação, realizada pelo biomédico, ocorreu com a técnica manual, ou seja, distensão do sangue em esfregaço sobre lâmina de vidro. Foram produzidas 20 lâminas. Os esfregaços foram fixados por 10 minutos em metanol. Em seguida 10 lâminas foram coradas com os corantes usuais do tipo Romanowsky, para esta validação optou-se pelo Leishman. As outras 10 foram coradas com VMPF. O processo de coloração com Leishman ocorre em 20 minutos. Para obter a coloração do esfregaço com VMPF foram necessários 50 minutos. As lâminas foram então, lavadas e secas. As contagens diferenciais foram realizadas em microscópio óptico com ampliação de 1000 vezes. Para proceder adequadamente a validação o biomédico realizou a análise comparativa da morfologia das células coradas com os dois corantes. Constatada a viabilidade do VMPF, procedeu-se a coloração em meio líquido.

Para testar a coloração em meio líquido foram utilizados 10 μ L de sangue, 95 μ L de hemolisante e 95 μ L de VMPF. O preparado resulta na diluição de 1:20 que é a recomendação para contagem dos leucócitos em câmara de Neubauer. Após homogeneização, a suspensão foi transferida para a câmara até seu preenchimento. Em microscópio óptico constatou-se que ao cessar o movimento das células o que se vê são leucócitos corados diferenciadamente. Os leucócitos foram então caracterizados e contados nos quatro quadrantes laterais e o resultado multiplicado por 50, conforme preconiza a técnica [6]. Em meio líquido o tempo de coloração foi inferior a um minuto. Os testes foram realizados 30 vezes em três meses.

Aquisição das imagens e processamento – Para verificar a efetividade do novo método de coloração no processamento de imagens, as lâminas foram fotografadas e se procedeu a análise dos histogramas em Vermelho-Verde-Azul (RGB) de cada tipo de leucócito. A análise foi realizada com base na distribuição relativa, na forma, na amplitude e posições dos picos dos histogramas. Foram fotografadas 100 células, com resolução de 100x100 pixels. As imagens foram agrupadas nos tipos celulares pelo biomédico e depois segmentadas manualmente, para evitar interferência do fundo na produção dos histogramas. As fotos em meio líquido foram realizadas com ampliação de 400 vezes, pois devido à espessura da câmara de Neubauer não é possível obter foco na ampliação de 1000 vezes.

Resultados

A primeira validação da metodologia foi a verificação de integridade das células, ou seja, o novo método não pode destruir células a ponto de interferir nas contagens. Assim, foi realizada a análise estatística das contagens com as quatro técnicas: Automatizada com Citômetro de fluxo, Manual em esfregaço com Leishman e VMPF e Manual em meio líquido com VMPF. Os resultados dessas contagens são apresentados na Tabela 1.

Aplicando o teste estatístico ANOVA com $\alpha=0,05$ nas contagens apresentadas na Tabela 1 obteve-se $F=0,046$ e $p=0,99$, indicando que não há diferenças estatísticas entre os métodos de contagem num intervalo de confiança de 95%. Então, o VMPF mantém as características das células inalteradas.

A segunda validação do corante VMPF foi a análise de viabilidade para diferenciação das células por processamento de imagens, quando comparado com a coloração tradicional usando Leishman. A análise de viabilidade foi realizada por comparação dos histogramas das células nas duas colorações.

Tabela 1: Comparação das contagens dos leucócitos em valores absolutos (quantidade/mm³) com as técnicas: Automático (Citômetro) e Manuais (Leishman e VMPF).

Técnicas Células	Técnicas				Valores de Referência §
	Automático °	Leishman*	VMPF Esfregaço ‡	VMPF Líquido	
Linfócitos	2970	2364	3208	2879	1000 - 4800
Neutrófilos	4703	4978	5891	6186	3000 - 11500
Monócitos		825	655	655	150 - 1350
Eosinófilos	578	54	66	99	100 - 1250
Basófilos		28	0	0	Raros
Contagem Global	8250			9819	6000 a 17000

°O citômetro de fluxo utilizado agrupa as contagens do monócito, eosinófilo e basófilo em um único valor.

* Para determinar os valores absolutos em Leishman foram utilizadas as contagens absolutas do citômetro.

‡ Para determinar os valores absolutos em VMPF em esfregaço foram utilizadas as contagens absolutas do VMPF em meio líquido (Neubauer).

§ Valores de referência dos leucócitos para cães adultos [7].

As colorações dos esfregaços com VMPF e com Leishman apresentam as células coradas diferentemente conforme descrito a seguir:

Neutrófilos: são células com diâmetro ao redor de 12 μm contendo núcleo com 2 a 5 lóbulos e finas granulações citoplasmáticas (Figuras 1a e 1b).

Eosinófilos: são células com 12 a 17 μm de diâmetro e núcleo frequentemente bilobulado. Possui granulações citoplasmáticas grosseiras menos numerosas e maiores do que as encontradas nos neutrófilos, conforme mostra as Figuras 2a e 2b.

Linfócitos: são células com 10 a 12 μm de diâmetro e citoplasma escasso ao redor do núcleo condensado, caracterizando uma célula com alta relação núcleo/citoplasma, conforme apresentado nas Figuras 3a e 3b.

Monócitos: são as maiores células do sangue periférico (15 a 18 μm). O núcleo chanfrado, central ou excêntrico, tem cromatina frouxa (Figuras 4a e 4b).

Basófilos: Nas amostras utilizadas essas células não foram encontradas em quantidade suficiente para validação, por isso não foram apresentados os resultados referentes a esta célula. Os valores de referência [7] apontam que são raros em caninos.

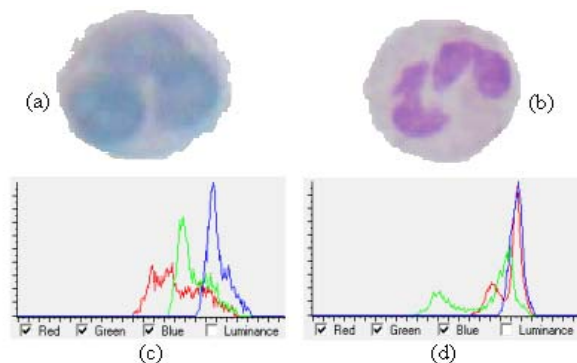


Figura 1: Neutrófilo: (a) corado com VMPF, (b) corado com Leishman; Histograma em RGB (c) coloração VMPF, (d) coloração Leishman.

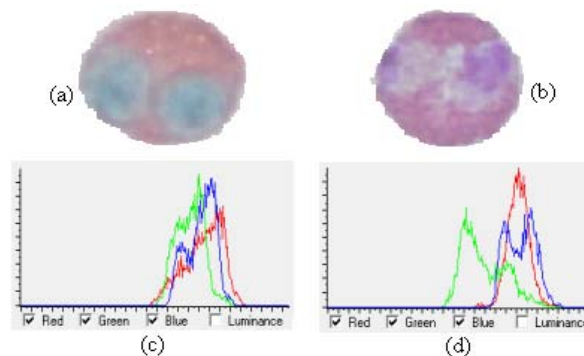


Figura 2: Eosinófilo: (a) corado com VMPF, (b) corado com Leishman; Histograma em RGB (c) coloração VMPF, (d) coloração Leishman.

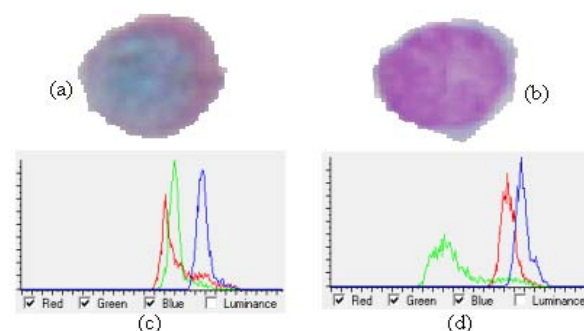


Figura 3: Linfócito: (a) corado com VMPF, (b) corado com Leishman; Histograma em RGB (c) coloração VMPF, (d) coloração Leishman.

Análise dos histogramas: Todas as células coradas com Leishman apresentam o mesmo padrão nos histogramas RGB, Figuras 1d, 2d, 3d e 4d. O vermelho e azul estão agrupados à direita, possuem amplitudes próximas e são estreitos (pequena distribuição de frequências). O verde está deslocado à esquerda, possui amplitude menor e a largura é o dobro se comparado aos

demais. A ordem dos histogramas é sempre a mesma em todas as células: primeiro o verde, o vermelho, seguido pelo azul. Esta uniformidade colorimétrica também pode ser observada nas imagens (Figuras 1b, 2b, 3b e 4b) que tem predominância rosada, com algumas tonalidades de azul. Estas características fazem com que diferenciação das células por processamento de imagens ocorra por métodos de análise morfológica do núcleo e do citoplasma. Como as células podem apresentar diferentes padrões, a análise morfológica não apresenta resultados reprodutíveis em grau aceitável.

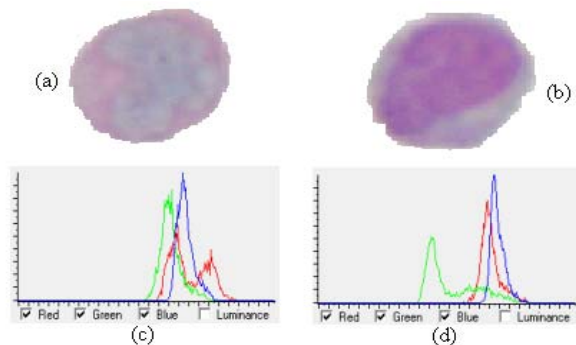


Figura 4: Monócito: (a) corado com VMPF, (b) corado com Leishman; Histograma em RGB (c) coloração VMPF, (d) coloração Leishman.

Na coloração com VMPF não há uniformidade clara entre os histogramas dos diferentes tipos celulares. Porém, há uniformidade dos histogramas das células do mesmo tipo conforme a descrição que segue. Os histogramas dos neutrófilos estão na ordem vermelho-verde-azul (Figura 1c). A ordem foi estabelecida pela posição do valor médio de cada cor. O vermelho sempre tem a menor amplitude, enquanto os picos de cada cor são equidistantes. A distribuição das frequências (largura) é decrescente do vermelho para o azul.

Nos eosinófilos há troca de ordem dos histogramas RGB, que passa a ser verde-azul-vermelho (Figura 2c). Os picos têm amplitudes semelhantes e as larguras encontram-se no mesmo intervalo, sobrepondo-se. Nos linfócitos praticamente há coincidência de posição e largura do verde e do vermelho, enquanto o azul é mais estreito e está deslocado à direita (Figura 3c). A amplitude do vermelho tende a ser menor que as demais.

Por fim os monócitos apresentam histogramas semelhantes aos dos eosinófilos, com diferenças na largura do azul, que é menor e os picos são mais agrupados. No entanto, para estabelecer a diferenciação de ambos será necessária maior quantidade de amostras.

Os basófilos não foram analisados, pois não foi possível encontra-los nas colorações com VMPF. Também não há registros deles nas contagens automatizadas, uma vez que o Citômetro utilizado agrupa monócitos, eosinófilos e basófilos.

Discussão

O novo corante de fase única, baseado em VMPF, permite o preparo de células sanguíneas para contagem

em uma etapa. Ele cora as estruturas dos leucócitos em três grupos distintos de cores (azul-esverdeado, róseo e amarelo-alaranjado). Em observação visual este grupo de cores não apresenta alto contraste, o que leva os biomédicos a não terem preferência por ele. No entanto, para processamento de imagens ele é mais vantajoso, pois há uma distinção colorimétrica mais pronunciada do que nas colorações do tipo Romanowsky.

Este novo método de coloração é muito mais ágil que o método tradicional, pois é realizado em uma etapa e com dois minutos de preparação é possível ter os leucócitos corados diferenciadamente. Enquanto, no método tradicional são necessárias duas preparações demoradas: contagem em câmara de Neubauer e diferenciação em esfregaço, que exige controle de tempo dos corantes e lavagem das lâminas.

Por haver três grupos distintos de cores é possível explorar a diferenciação celular por iluminações monocromáticas.

Conclusão

O novo método de coloração cora diferenciadamente os leucócitos em meio líquido e apresenta agilidade operacional, com menor exigência de especialização do operador. Ele tem bom potencial para tornar a contagem por processamento de imagens mais reprodutível, visando obter maior exatidão nos resultados.

Agradecimentos

À Universidade de Mogi das Cruzes pela gratuidade no programa de Eng. Biomédica. À FAPESP pelo apoio financeiro através do programa PIPE.

Referências

- [1] Grotto HZW. O Hemograma: Importância para a Interpretação da Biópsia. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2009; 31(3): 178-182.
- [2] Bain BJ. Células Sanguíneas: Um Guia Prático. 4ª ed. Artmed. Porto Alegre: 2007. p. 32.
- [3] Mohamed M, Far B, Guaily A. An Efficient Technique for White Blood Cells Nuclei Automatic Segmentation. In IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics; 2012 October 14-17; Seoul, Korea. 2012. p. 220-5
- [4] Tycko DH, Anbalagan S, Liu HC, Ornstein L. Automatic Leukocyte Classification Using Cytochemically Stained Smears. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1976; 24 (1):178-194.
- [5] Horobin RW, Kiernan JA. CONN'S Biological Stains. 10ª ed. Taylor&Francis. New York: 2008. p.197.
- [6] Oliveira RAG. Hemograma: Como fazer e Interpretar. Livraria Médica Paulista. São Paulo: 2007. p. 100-104.
- [7] Rebar AH. Interpretación del Hemograma Canino y Felino. 2ªed. Nestlé Purina PetCare Company. Argentina: 2003. p. 83.