

MÉTODO DE LIMIAÇÃO AUTOMÁTICA PARA A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM IMAGENS MICROSCÓPICAS

METHOD THRESHOLDING AUTOMATIC FOR SOMATIC CELL COUNT IN MICROSCOPIC IMAGES

Gabriel Jesus Alves de Melo¹; Bianco Alves de Melo Neto²; Viviani Gomes³; Luiz Alberto Luz de Almeida⁴; Antônio Cezar de Castro Lima⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial – PEI/UFBA – Salvador/BA – Brasil
gabrieluesc@gmail.com

²Instituto Federal Baiano – NUTEC/IFBAIANO – Uruçuca/BA – Brasil
biano.neto@gmail.com

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMV/USP – São Paulo/SP – Brasil
viviane.gomes@usp.com

⁴Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial – PEI/UFBA – Salvador/BA – Brasil
alberto2008@gmail.com

⁵Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial – PEI/UFBA – Salvador/BA – Brasil
acd@gmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho é apresentar um método de segmentação e contagem de células somáticas de leite bovino para imagens obtidas diretamente do microscópio óptico por meio de uma proposta de limiarização automática. Para fins de verificar eficiência da técnica, o método de limiarização proposto foi comparado com dois métodos de limiarização reconhecidos pela literatura. A correlação obtida entre a contagem manual de referência e os métodos de limiarização testados foi de 0,98, 0,71 e 0,12, respectivamente. O método proposto apresentou correlação aceitável demonstrando eficiência deste algoritmo para limiarização e contagem de células somáticas e outras aplicações similares.

Palavras-chave: microscópio; limiarização de Rosin; limiarização de Otsu.

Abstract

The objective of this work was to present a segmentation method and somatic cell count of bovine milk for images obtained directly from the optical microscope through a proposal for automatic threshold. For purposes of verifying efficiency of the technique, proposed thresholding method was compared with two thresholding methods known in the literature. The correlation between the manual reference counting and thresholding methods tested was 0.98, 0.71 and 0.12, respectively. The proposed method acceptable correlation demonstrating efficiency of this algorithm for thresholding and somatic cell count and other similar applications.

Key-words: microscope; Rosin thresholding; Otsu thresholding.

1. Introdução

As células somáticas no leite bovino são constituídas por células de defesa ou epiteliais. Do total de células somáticas, 75 a 98% correspondem a células de defesa (leucócitos) e 2 a 25%, de células epiteliais, provenientes da descamação natural que ocorre no tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (Ribas, 1994).

A contagem de células somáticas (CCS) pode ser determinada por meio de equipamentos eletrônicos e através da microscopia óptica direta. Os analisadores eletrônicos baseiam-se em diferentes técnicas de análises e, dentre os mais utilizados, destacam-se os aparelhos FossomaticTM (Foss, Dinamarca) e SomacountTM (BentleyInstruments, USA) (SILVEIRA, 2005). No entanto, devido ao alto custo destes equipamentos, a contagem manual das células somáticas por meio do microscópio ainda se faz necessária. Além disso, a contagem realizada por meio da microscopia óptica é o método de referência adotado pela Federação Internacional do Leite (FIL), inclusive, para calibração de contadores mais modernos (Berry, 2007).

Softwares baseados em técnicas de processamento de imagens também são utilizados para contagem de alguns tipos de células, partículas e objetos (Abramoff, 2004). No entanto, como estes softwares não são adaptados para contagem de células somáticas do leite bovino e, apresentam limitações que são inerentes a cada aplicação, se faz necessário o surgimento de novos algoritmos de processamento de imagens tais como apresentado por Sadeghian (2009) e Hiremath (2010) para contagem de células do sangue humano.

O processamento de imagens baseado em técnicas de limiarização de histogramas é um tema amplamente utilizado para o reconhecimento de diferentes células e partículas nos campos da biologia e da medicina (Wu, 2000; Qian, 2009), no entanto, aplicado para segmentação células somáticas é um tema novo e ainda não discutido na literatura.

Existem diversas técnicas de limiarização desde as baseadas em critérios entrópicos ou estatísticos da imagem (Jawahar, 2000) até as que utilizam sofisticados mecanismo de busca (Yin 2002). Segundo Gonzales (2004), a limiarização é o estágio primário em problemas de segmentação de imagens e, devido à simplicidade dos algoritmos, outras técnicas devem ser tentadas quando esta não apresentar resultados satisfatórios. Além disso, outros algoritmos que não são fundamentalmente baseados em limiarização de histogramas, como a transformada de Watershed para imagens binárias (Edinns, 2002), necessitam da aplicação prévia de algoritmos de limiarização para retornarem resultados satisfatórios.

Diante do cenário apresentado se faz necessário o desenvolvimento de uma tecnologia nacional para contagem de células somáticas do leite. Assim, o objetivo desta pesquisa é apresentar

um novo método de limiarização automática para CCS em imagens digitais capturadas diretamente do microscópio óptico.

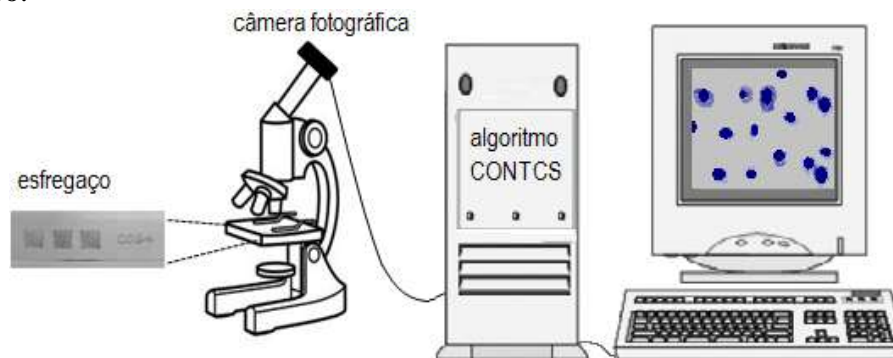
Com base nos resultados do estudo, observou-se que o uso do novo limiar produz melhores resultados quando comparado a outros dois métodos populares da literatura. Além disso, este algoritmo pode ser parte integrante de um sistema baseado em processamento de imagens para automatizar a análise do leite feita por microscopia ótica.

Nas seções seguintes são apresentados: a metodologia para confecção dos esfregaços lácteos (lâminas); o procedimento para captura das imagens; o método proposto para limiarização de histogramas unimodais e, por fim, o resultado e discussão do novo algoritmo em relação a outros dois já existentes na literatura.

2. Materiais e Métodos

No estudo realizado, procedeu-se a análise de 400 imagens provenientes de amostras de leite dos quartos mamários de duas vacas da raça Holandesa oriundas de propriedade localizada no estado de São Paulo. Inicialmente foi realizada a higienização dos tetos com solução clorada, secagem com papel toalha individual e antissepsia com álcool 70%. Após o descarte dos primeiros jatos de leite, as amostras foram colhidas em tubos de vidro com capacidade para 5 ml, imersos em gelo triturado e encaminhados ao laboratório em caixa de material isotérmico. Em seguida, os esfregaços lácteos foram confeccionados e examinados via microscopia óptica de acordo com os procedimentos descritos Berry (2007). O sistema para captura e contagem de células somáticas presentes nos esfregaços lácteos (Figura 1) foi constituído por uma câmera fotográfica digital (CoolSnap Color, Media CyberneticsTM, USA) acoplada ao microscópio óptico (Eclipse 800, Nikon®, Japan) no aumento de 1000x e um computador que executa o algoritmo desenvolvido em linguagem Matlab, versão 7.8 (licença concedida ao Instituto Federal de Educação da Bahia).

Figura 1. Sistema para contagem de células somáticas do leite de vacas em imagens capturadas do microscópio óptico.



Inicialmente, as imagens RGB obtidas com tamanho 1392 x 1040 foram reduzidas para 278 X 208 (sem perdas para identificação das células) e convertida para o espaço monocromático (256 níveis de tons de cinza) seguindo procedimento apresentado por Gonzales (2004). Nesta etapa, o algoritmo de limiarização proposto, analisa o histograma da imagem monocromática e determina o limiar que será utilizado para converter imagem para o formato preto e branco (binária). Ao final, os objetos não conectados resultantes da etapa anterior, foram rotulados e contados por meio do algoritmo de clusterização apresentado por Gonzales (2004) e, classificados de acordo com seu tamanho, seguindo as orientações apresentadas por Berry (2007).

2.1 Proposição de uma nova limiarização

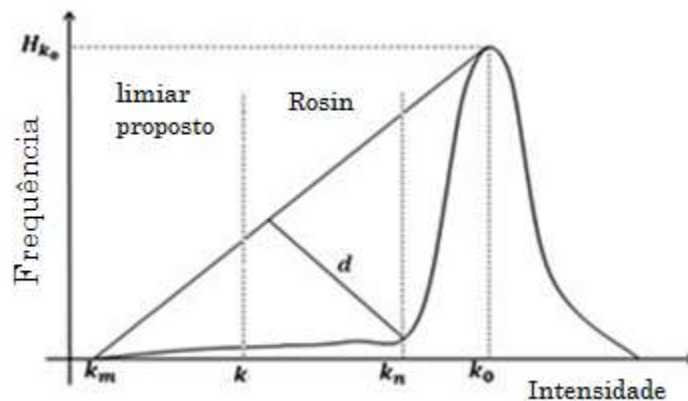
O método de limiarização de Rosin (2001) assume que existe uma população dominante na imagem (*background*), que produz um pico principal único, localizado no extremo inferior do histograma relativo à população secundária (células). O limiar escolhido por este método é o valor do histograma que maximiza a distância perpendicular entre a curva que representa distribuição de frequência dos níveis de cinza da imagem e a reta que passa pelo valor mínimo e máximo do histograma (Figura 2).

Por outro lado, o método proposto parte da premissa que o limiar ideal pode não ser o valor k que maximiza a distância entre a reta d e curva H_k (Figura 2) apresentado por Rosin (2001). Semelhante ao método de Rosin (2001), o método proposto assume também uma população dominante em relação a uma população secundária com distribuição de frequência predominantemente unimodal, no entanto, escolhe como limiar o valor $k \in [k_m, k_o]$, onde,

$$k = \frac{k_m + k_o}{2}, \quad (1)$$

$k_m, k_0 \in \mathbb{R}$.

Figura 2 - Procedimento para a determinação do limiar de intensidade em histograma unimodal.



3. Resultado e Discussão

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados da contagem do número total de células, correlação Pearson e taxa de acerto para o método proposto, Rosin (2001) e Otsu (1975) sendo 1321 o número de células contabilizadas pelo especialista.

Tabela 1 – Comparação entre os métodos de limiarização

Métodos de limiarização	Número de células	Correlação	Taxa de acerto (%)
Rosin (2001)	1034	0,71	78,27
Otsu (1975)	4302	0,12	0,00
Proposto	1318	0,98	99,77

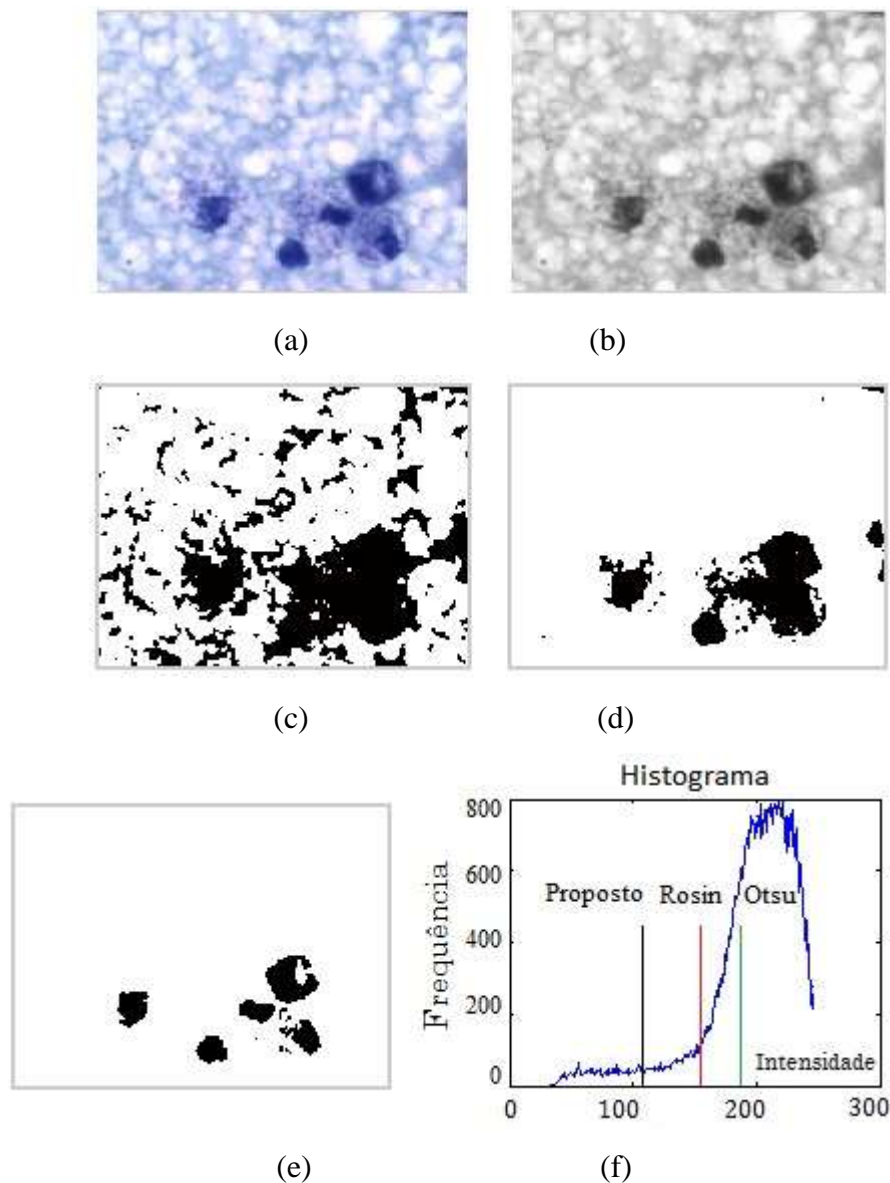
Fonte: Autoria própria (2014).

De acordo com a Tabela 1, o método de limiarização Otsu (1975) foi ineficiente para esta aplicação com correlação 0,12. Segundo Ng (2006) a técnica de limiarização de Otsu (1975) é muito utilizada e proporciona resultados satisfatórios para limiarização de imagens com histograma de distribuição bimodal podendo falhar se o histograma for unimodal ou perto de unimodal. Portanto, como nesta aplicação uma proporção maior de apenas uma classe de pixels (por exemplo, o fundo) está presente na imagem formando histogramas predominantemente unimodal, justifica-se a limitação do algoritmo de Otsu (1975) para limiarização de células somáticas.

A correlação entre a contagem microscópica e o método de Rosin (2001) foi de 0,71, com taxa de acerto de 78,27%. A escolha deste método para esta aplicação se justifica, pois as imagens

com células somáticas produzem histogramas que apresentam distribuição predominantemente unimodal, conforme aplicação semelhante apresentada Valloton (2013). A Figura 3 apresenta a imagem RGB com células somáticas (Figura 3a), imagem monocromática (Figura 3b), da limiarização de Otsu (1975) (Figura 3c), limiarização de Rosin (2001) (Figura 3d), a limiarização proposta nesse trabalho (Figura 3e) e o histograma da imagem monocromática (Figura 3f).

Figura 3 - (a) Imagem RGB, (b) imagem monocromática (c) limiar de Otsu (1975), (d) limiar de Rosin (2001), (e) limiar proposto, (f) distribuição frequência dos níveis de cinza da imagem monocromática.



Nota-se que a limiarização de Otsu (1975) (limiar = 188) de Rosin (2001) (limiar = 154) não realizam a segmentação desejada das células, pois adiciona ruídos que por hora podem ser

confundidos com células somáticas. O resultado desejado é alcançado por meio do da limiarização proposta (limiar = 106) com correlação positiva de 0,98 e taxa de acerto de 99,77%.

O critério adotado para classificar os objetos resultantes da segmentação (Figura 3e) como célula somática foi o tamanho espacial de cada objeto representada pela quantidade de pixels. Dessa forma, é possível verificar o tamanho de cada célula, mesmo que as células estejam parcialmente destruídas ou em processo de divisão celular. Como as células somáticas possuem diâmetro que variam entre 4 a 8 μm o parâmetro adotado para classificar os objetos resultantes da segmentação (Figura 3e) como células somáticas foi o tamanho espacial de cada objeto utilizando algoritmo clusterização apresentado por Gonzales (2004) e seguindo as orientações para classificação morfológica de células somáticas apresentadas por Berry (2007). Os objetos maiores 8 μm que representam, eventualmente, aglomeração células foram contado por meio da divisão do tamanho médio do objeto (quantidade de pixels da aglomeração) pelo tamanho espacial médio uma célula somática. Um dos principais métodos utilizados na literatura em problemas que envolvem a aglomeração de objetos é a segmentação de Watershed (Lin, 2006). No entanto, a aplicação deste procedimento foi inviabilizada, pois as células destruídas ou em processo de divisão celular sofriam com o efeito de super-segmentação. Por outro lado, objetos menores que 4 μm , que representam fragmentos de células, corpúsculos citoplasmáticos ou restos de corante são descartados automaticamente pelo algoritmo e não são incluídos na contagem final das células.

4. Conclusão

Os resultados demonstram que o algoritmo desenvolvido é capaz de segmentar e, desta forma, enumerar a células somáticas presentes em imagens capturadas por meio da microscopia direta. Portanto, o algoritmo apresentado pode ser parte integrante de um sistema baseado em processamento de imagens para automatizar a análise do leite feita por microscopia direta, minimizando os erros causados pela fadiga do técnico responsável em realizar a tarefa de contagem.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos financiamentos necessários para execução desse trabalho.

6. Referências bibliográficas

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J. Sunanda J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics international**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- BERRY, E. A.; BROUGHAN, Jennifer. Use of the delaval cell counter (DCC) on goats' milk. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 3, p. 345, 2007.
- EDDINS, S. The Watershed Transform: Strategies for Image Segmentation. **MatLab News & Notes**, 2002.
- GONZALES, R. C.; WOODS, RICHARD. E. **Digital Image Processing Using MATLAB**. Pearson Education, Upper Saddle River, New Jersey 07458, 2004.
- HIREMATH, P. S.; BANNIGIDAD, P.; GEETA, S. Automated identification and classification of white blood cells (leukocytes) in digital microscopic images. **IJCA special issue on “recent trends in image processing and pattern recognition” RTIPPR**, p. 59-63, 2010.
- JAWAHAR, C. V.; BISWAS, P. K.; RAY, A. K. Analysis of fuzzy thresholding schemes. **Pattern Recognition**, v.33, p1339-1349, 2000.
- LIN, Y. C.; TSAI, Y. P.; HUNG, Y. P.; SHIH, Z. C. Comparison between immersion-based and toboggan-based watershed image segmentation. **Image Processing, IEEE Transactions on**, v. 15, n. 3, p. 632-640, 2006.
- NG, H.F. Automatic thresholding for defect detection. **Pattern Recognition Letters**, v. 27, p.1644-1649, 2006.
- OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histograms. **Automatica**, v. 11, n. 285-296, p. 23-27, 1975.
- QIAN, X.; PENG, C.; WANG, X. Self-organizing map-based multi-thresholding on neural stem cells images. **Medical & biological engineering & computing**, v. 47, n. 7, p. 801-808, 2009
- ROSIN, P. L. Unimodal thresholding. **Pattern Recognition**, v. 34, n. 11, p. 2083-2096, 2001.
- RIBAS, N. P. Valor e uso da contagem de células somáticas no manejo de rebanhos leiteiros. In: CONGRESSO HOLSTEIN DE LAS AMERICAS, 6., 2001, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Embrapa Gado de Leite, 2001. P.47-61.
- SADEGHIAN, F.; SEMAN, Z.; RAMLI, A. R.; KAHAR, B. A., SARIPAN, M. A framework for white blood cell segmentation in microscopic blood images using digital image processing. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 196-206, 2009.
- SILVEIRA, T. M.; FONSECA, L. M.; LAGO, T. B.; VEIGA, D. R. Comparação entre o método de referência ea análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 57, n. 1, p. 128-132, 2005.
- SMITH, K.L. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. **Mastitis Newsletter**, v.21, p.7-9, 1996.
- VALLOTTON, P.; OLIVIER, S. Tri-track: Free Software for Large-Scale Particle Tracking. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, n. 2, 2013.
- YIN, P.Y. Maximum Entropy-Based Optimal Threshold Selection Using Deterministic Reinforcement Learning With Controlled Randomization. **Signal Processing**, (82), p993-1006, 2002.

WU, H. S.; BERBA, J.; GIL, J. Iterative thresholding for segmentation of cells from noisy images. **Journal of microscopy**, v. 197, n. 3, p. 296-304, 2000.

Recebido: 06/03/2014

Aprovado: 14/09/2014