

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E
INFORMÁTICA INDUSTRIAL**

GABRIEL KOVALHUK

**SISTEMA *STAND ALONE* DE CONTAGEM DE CÉLULAS
VERMELHAS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2012**

GABRIEL KOVALHUK

**SISTEMA *STAND ALONE* DE CONTAGEM DE CÉLULAS
VERMELHAS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências, do Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider

**CURITIBA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

K88 Kovalhuk, Gabriel
Sistema *stand alone* de contagem de células vermelhas de animais domésticos e
sivestres / Gabriel Kovalhuk. — 2012.
72 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Fábio Kurt Schneider.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de
Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. Área de concentração:
Engenharia Biomédica, Curitiba, 2012.

Bibliografia: p. 65-66.

1. Diagnóstico. 2. Eritrócitos - Contagem. I. Schneider, Fábio Kurt, orient. II.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em
Engenharia Elétrica e Informática Industrial. III. Título.

CDD (22. ed.) 621.3

Título da Dissertação Nº.616

“Sistema *Stand Alone* de Contagem de Células Vermelhas de Animais Domésticos e Silvestres”

por

Gabriel Kovalhuk

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 14h do dia 31 de outubro de 2012. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores:

Prof. Fábio Kurt Schneider, Dr.
(Presidente – UTFPR)

Prof. Altair Olivo Santin, Dr.
(PUC-PR)

Prof. Gilberto Branco, Dr.
(UTFPR)

Visto da coordenação:

Prof. Ricardo Lüders, Dr.
(Coordenador do CPGEI)

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tenho e que sou.

Aos meus pais pelas oportunidades de estudo que me proporcionaram.

A minha família, Maria Angélica, Maria Luísa e Maria Clara por entenderem os motivos de minhas ausências em alguns momentos.

Aos meus colegas do Departamento de Eletrônica pelo incentivo, apoio e motivação.

Ao aluno de Engenharia Felipe Pegoraro pela ajuda em configurar o Angstrom Linux para funcionar com a câmera de 5 MPixels.

Ao amigo Claudio R. Marquette Mauricio, pelo seu apoio e suas sugestões na construção deste trabalho.

Ao amigo professor Dr. Gilson Yukio Sato, com o qual dividi a disciplina de microcontroladores e, ajudou-me com a preparação desta disciplina durante este período.

Agradeço em especial ao amigo, professor e orientador Dr. Fábio Kurt Schneider por toda a ajuda e compreensão na realização deste trabalho.

RESUMO

KOVALHUK, Gabriel. Sistema stand alone de contagem de células vermelhas de animais domésticos e silvestres. 2012. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

Este trabalho propõe um sistema de baixo custo baseado em uma plataforma com um processador RISC para contagem de células vermelhas (hemácias) de animais silvestres aplicável a animais domésticos. Este sistema tem o objetivo de realizar a contagem semi-automática de células de diferentes espécies de animais silvestre, cujos tamanhos e volumes variam consideravelmente.

Os resultados obtidos com a contagem de células de cães e cavalos mostram que o sistema proposto consegue contar de modo automático a maioria das células, apresentando um erro médio de 1,88% de falsos negativos e de 1,82% de falsos positivos. O sistema permite ao usuário corrigir manualmente esta contagem, no máximo, 3,70% da quantidade total das células. Também, o sistema permite o armazenamento das imagens das amostras como forma de documentação do exame.

Palavras-Chave: Sistemas de diagnóstico, contagem de células vermelhas sanguíneas

ABSTRACT

KOVALHUK, Gabriel. Stand alone system for counting red blood cells of wild and domestic animals. 2012. 72f. Dissertation (Master of Electrical Engineering and Computer Science) Graduate School of Electrical Engineering and Computer Science, Federal University of Technology - Parana. Curitiba, 2012.

A RISC-based platform is proposed for supporting the counting of red blood cells of wild animals. This platform is aimed for semi-automatic counting of the cells from different species of animals where size and volume of cells can greatly differ.

The results show that this system can automatically count most of the cells correctly with an average error of only 1.88% of false negatives and 1.82% of false positives. It's possible for the user to manually correct the results where a work at most 3.70%. It's also possible to storage the images for future use.

Key Words: Diagnostic systems, red blood cell counting

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Exemplo de células vermelhas e plaquetas de sangue de cachorro. (FRENCH, et al.)..... | 16 |
| Figura 2 - Exemplos de células brancas de cachorros. (FRENCH, et al.) | 16 |
| Figura 3 - (a) Vista em corte da câmara de contagem mostrando a área reticulada. (b) Representação em 3D. Fonte: Autoria própria..... | 18 |
| Figura 4 - (a) Imagem negativa de uma câmara de Neubauer, (b) Câmara de Neubauer com nove regiões de $1 \times 1 \text{ mm}^2$. A profundidade da câmara é $0,1 \text{ mm}$ resultando em regiões com volume de $0,1 \text{ mm}^3$. As regiões nos quatro cantos são divididas em regiões de $1/16 \text{ mm}^2$ (i.e., regiões 1B, 2B, 3B e 4B). O quadrado de $1 \times 1 \text{ mm}^2$ central é composto de 25 regiões com $1/25 \text{ mm}^2$ (e.g., 1A e 2A), onde cada um desses pequenos quadrados é subdividido em 16 regiões com $1/400 \text{ mm}^2$. Fonte: Autoria própria. | 19 |
| Figura 5 - Células das bordas consideradas (O) e descartadas (x) na contagem e sequência de contagem. As setas indicam o deslocamento de contagem em zigue-zague. Fonte: Autoria própria. | 20 |
| Figura 6 - Esquema do <i>Coulter Counter</i> mostrando os seus componentes: 20 - amostra em suspensão, 21 e 22 - recipientes contendo a amostra, 23- tubo capilar por onde passam as células, 24 e 25 – eletrodos, 26 –bateria, 27 – medidor, 28: Potenciômetro de ajuste, 30 - nível do fluido do primeiro recipiente, 31 - nível do fluido do segundo recipiente, 32 - escala graduada, 33 – agitador. Fonte: (COULTER, 1953). | 21 |
| Figura 7 - Seção transversal do canal capilar. Em (a) canal sem nenhuma célula, em (b) canal com uma célula pequena e em (c) canal com uma célula grande. A elipse em azul representa a seção transversal do canal e a elipse em vermelho representa a hemácia. Fonte: Autoria própria. | 21 |
| Figura 8 - Esquema de um citômetro de fluxo. Fonte: modificado de (BROWN, 2000)..... | 23 |
| Figura 9 - Câmara de fluxo. Fonte: Autoria própria. | 23 |
| Figura 10 - Funcionamento de um espelho dicróico. Em (a) exemplo de funcionamento, em (b) curva de resposta em frequência. Adaptado de (ORMEROD, 2008)..... | 25 |
| Figura 11 - Funcionamento dos filtros dicróicos em um citômetro de fluxo. Fonte: Autoria própria. | 26 |
| Figura 12 - Amostra de imagem adquirida em Botucatu. Fonte: Autoria própria..... | 33 |
| Figura 13 - Amostra de imagem adquirida na UTFPR com o microscópio XSB42. Fonte: Autoria própria..... | 34 |
| Figura 14 - Foto do sistema montado. (a) vista de frente, (b) vista lateral. A: BeagleBoard, B: Câmera LI-5M03, C: Microscópio XSB 421, D: monitor de vídeo, E: Câmara de Neubauer. Fonte: Autoria própria..... | 34 |
| Figura 15 - Diagrama do subsistema de captura da imagem. Fonte: Autoria própria. | 35 |
| Figura 16 - Diagrama completo do subsistema de captura da imagem. Fonte: Autoria própria. | 35 |
| Figura 17 - Módulo de imagem LI-5M03 da Leopard Imaging®. Fonte (LeopardImaging)..... | 36 |
| Figura 18 - Placa BeagleBoard-xM. Fonte: modificado de COLEY, 2010. | 37 |
| Figura 19 - Diagrama em blocos da placa BeagleBoard-xM. Fonte: modificado de COLEY, 2010..... | 37 |

| | |
|---|----|
| Figura 20 - Diagrama em blocos simplificado do processador DM3730. Fonte: Autoria própria. | 38 |
| Figura 21 - Operações básicas na teoria de conjuntos. Em (a) está representado o conjunto A, e m (b) está representado o conjunto B, em (c) a translação de A por x , em (d) o complemento de A, em (e) a reflexão de A e em (f) a diferença entre A e B. Fonte: Autoria própria. | 44 |
| Figura 22 - Exemplo das operações fundamentais da Morfologia Matemática, onde A é o objeto na imagem e B o elemento estruturante. Em (a) a operação de dilatação e em (b) a operação de erosão. Fonte: Autoria própria. | 45 |
| Figura 23 - Exemplo da operação de <i>blending</i> . Imagens originais, em (a) imagem 1, em (b) imagem 2, em (c) a imagem 1 está com 25% e a imagem 2 está com 75%, em (d) as duas imagens estão com 50% e em (e) a imagem 1 está com 75% e a imagem 2 está com 25%. Fonte: Autoria própria. | 46 |
| Figura 24 - (a) Imagem Img_1 , capturada no foco. (b) Imagem Img_2 , capturada com um foco 15 micra acima da primeira imagem. Fonte: Autoria própria. | 47 |
| Figura 25 - (a) $Iroi_1$, região de interesse da imagem Img_1 e (b) $Iroi_1$, região de interesse da imagem Img_2 . Fonte: Autoria própria. | 48 |
| Figura 26 - Imagem mostrando a seleção da região onde serão contadas as hemácias. Fonte: Autoria própria. | 49 |
| Figura 27 - Elemento Estruturante. Fonte: Autoria própria. | 49 |
| Figura 28 - Imagem $Iroi_2$, após a operação de dilatação. Fonte: Autoria própria. | 50 |
| Figura 29 - (a) Ibw_1 , imagem em tons de cinza da região de interesse da imagem Img_1 , (b) Ibw_2 , imagem em tons de cinza da região de interesse da imagem Img_2 . Fonte: Autoria própria. | 50 |
| Figura 30 - As imagens Ibw_1 e Ibw_2 após serem limiarizadas. Devido ao processo de aquisição a primeira apresenta os objetos em preto e o fundo branco e a segunda apresenta objetos em branco com fundo preto. Fonte: Autoria própria. | 51 |
| Figura 31 - Imagem Ibw_1 complementada para que possam ser usados os mesmos algoritmos que para a imagem Ibw_2 . Fonte: Autoria própria. | 52 |
| Figura 32 - Região da imagem usada para cálculo da área de um pixel. Fonte: Autoria própria. | 52 |
| Figura 33 - Imagem contendo os resultados da contagem: quantidade contabilizada pelo <i>software</i> (Automático), falsos negativos, falsos positivos e totais. Fonte: Autoria própria. | 54 |
| Figura 34 - Foto do sistema montado. Em (a) o sistema completo e em (b) Detalhe do microscópio acoplado a BeagleBoard. Fonte: Autoria própria. | 55 |
| Figura 35 - Fotos mostrando os componentes do microscópio. Em (a) conjunto montado e em (b) componentes separados. Fonte: Autoria própria. | 56 |
| Figura 36 - Câmara de Neubauer obtida com o microscópio proposto. Fonte: Autoria própria. | 56 |
| Figura 37 - Contagem de células vermelhas estimadas a partir da contagem de células nas quadrículas 1A a 5A. Fonte: Autoria própria. | 58 |
| Figura 38 - Contagem de células vermelhas estimadas a partir da contagem de células nas quadrículas 1B a 4B. Fonte: Autoria própria. | 58 |
| Figura 39 - Erros de contagem do processo automático e corrigidos pelo operador (falsos negativos em azul e falsos positivos em vermelho) para as quadrículas 1A a 5A. Fonte: Autoria própria. | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 40 - Erros de contagem do processo automático e corrigidos pelo operador (falsos negativos em azul e falsos positivos em vermelho) para as quadrículas 1B a 4B. Fonte: Autoria própria. | 60 |
| Figura 41 - Contagem automática (coluna da esquerda) e corrigida (coluna da direita) consideradas as quadrículas 1A a 5A para as figuras (a) e (b) e as quadrículas 1B a 4B para as figuras (c) e (d). | 62 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características morfológicas das hemácias de alguns animais domésticos. Fonte: Adaptado de (REAGAN, 2008)..... | 17 |
| Tabela 2 - Erro médio e desvio padrão da contagem realizada nas regiões 1A a 5A e 1B a 4B. | 59 |
| Tabela 3 - Correlação entre os resultados do algoritmo de referência e os resultados obtidos pelo sistema proposto..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

| | |
|------|--|
| CCV | Contagem de Células Vermelhas |
| FACS | <i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i> - Separador de Células Ativado por Fluorescência |
| FACS | <i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i> – Separador de células ativadas por fluorescência |
| JPG | <i>Joint Photographics Expert Goup</i> |
| LCD | <i>Liquid Crystal Display</i> – Display de Cristal Líquido |
| LED | <i>Light Emitting Diode</i> – Diodo Emissor de Luz |
| RBC | <i>Red Blood Cell</i> – Células Vermelhas do Sangue |
| RISC | <i>Reduced Instruction set computing</i> - Computador com um Conjunto Reduzido de Instruções |
| WBC | <i>White Blood Cell</i> – Células Brancas do Sangue |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 MOTIVAÇÃO..... | 12 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | 12 |
| 1.3 OBJETIVO GERAL | 13 |
| 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 1.5 DELIMITAÇÕES | 14 |
| 1.6 ESTRUTURA DO TRABALHO..... | 14 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 16 |
| 2.1 COMPOSIÇÃO DO SANGUE | 16 |
| 2.2 ERITRÓCITOS..... | 17 |
| 2.3 CONTAGEM DE ELEMENTOS FIGURADOS | 17 |
| 2.3.1 Método Visual ou Manual | 18 |
| 2.3.2 Método Fotoelétrico | 20 |
| 2.3.3 Impedância..... | 20 |
| 2.3.4 Citometria de Fluxo..... | 22 |
| 2.3 EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS PARA CONTAGEM DE CÉLULAS DE ANIMAIS | 26 |
| 2.3.1 CellDyn 3500..... | 26 |
| 2.3.2 LaserCyte..... | 27 |
| 2.3.3 ForCyte | 27 |
| 2.3.4 MS45 | 27 |
| 2.3.5 Genesis | 27 |
| 2.3.6 Avaliação..... | 28 |
| 2.4 ANÁLISE COMPARATIVA | 28 |
| 2.5 CONCLUSÕES | 29 |
| 2.6 PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DE UM EQUIPAMENTO <i>STAND ALONE</i> PARA CONTAGEM DE CÉLULAS DE ANIMAIS SILVESTRES..... | 30 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARAS DE NEUBAUER | 31 |
| 3.2 SISTEMAS DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO..... | 33 |
| 3.2.1 Sistema de Aquisição de Imagem | 33 |
| 3.2.2 Arquitetura de processamento..... | 36 |
| 3.3 ALGORITMO DE DETECÇÃO E CONTAGEM | 41 |
| 3.3.1 Processamento Digital de Imagens | 41 |
| 3.3.2 Apresentação do Algoritmo Proposto..... | 46 |
| 3.4 CONSIDERAÇÕES..... | 54 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 4.1 UNIDADE ÓPTICA | 55 |
| 4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS..... | 57 |
| 4.3 DISCUSSÃO | 61 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS | 63 |
| 5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 63 |
| 5.2 TRABALHOS FUTUROS | 63 |
| REFERÊNCIAS | 65 |
| ANEXO | 63 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

A análise do sangue, tanto de seres humanos como de animais, e conhecido como hemograma, é um dos exames mais comuns que auxilia no diagnóstico de doenças e permite determinar as condições gerais de saúde do paciente. Pode-se obter uma avaliação do tamanho, da forma e da contagem do número dos elementos figurados da amostra utilizada (GENOVESE, 1996). A variação da quantidade destas células informa para o médico o estado geral de saúde do paciente, bem como auxilia a diagnosticar diversas doenças. Por exemplo, uma diminuição da quantidade das células vermelhas indica anemia ou uma inflamação crônica e, por sua vez, o seu aumento indica um possível tumor renal ou sobrecarga de ferro no organismo (GUIMARÃES, 1978).

Atualmente existem vários métodos e equipamentos que realizam a contagem de hemácias para o sangue de seres humanos. Porém, para outras espécies de animais, principalmente animais silvestres, não existem ainda equipamentos adequados.

A construção de equipamentos para a análise de sangue de animais não é trivial, pois a grande quantidade de espécies requer que o equipamento seja dedicado a cada espécie sobre investigação. Além disso, a baixa demanda de exames com este propósito pode não tornar viável a construção de equipamentos semelhantes ao usado para análise de sangue humano, assim, como consequência da falta de um equipamento adequado, não existe uma base de referência de valores hematológicos para animais. Entretanto, esta deficiência de instrumentos abre a possibilidade de um projeto de sistema adaptável a várias espécies, especialmente para animais silvestres (MAURICIO, et al., 2012).

1.2 JUSTIFICATIVA

Tradicionalmente os exames hematológicos de animais, principalmente animais silvestres, são pouco efetuados. Entretanto, este contexto está mudando, graças a um crescimento das investigações dos parâmetros sanguíneos na medicina veterinária em animais domésticos, pecuária e animais esportivos. Assim, existe a necessidade de se verificar a viabilidade de se desenvolver sistemas automáticos e semi-automáticos para realizar estes exames em substituição aos métodos manuais usados nos laboratórios veterinários (HENNESSY, 1998).

Quando se faz a análise de sangue de espécies pouco difundidas, como os animais

silvestres, usa-se o método manual. Pelo método manual, o sangue é diluído com corantes apropriados para realçar as células a serem contadas. Um operador treinado faz, então, a análise da amostra sob um microscópio óptico. Isto exige que o operador seja propriamente treinado para preparar a lâmina e realizar a contagem do número dos elementos figurados do sangue para que os resultados sejam confiáveis (KOVALHUK, et al., 2012).

A razão disso é que os equipamentos automáticos existentes devem ser configurados para cada tipo de animal, pois suas células variam em tamanho e concentração de acordo com a espécie. Como normalmente não existe a necessidade de grandes quantidades de exames de sangue para estes animais, muitas vezes não é viável adaptar os equipamentos para isto. Além disso, os equipamentos comerciais atuais normalmente são caros, o que não justifica sua aquisição em laboratórios de baixa demanda.

Dentro deste contexto, **verifica-se a necessidade de desenvolver um equipamento de baixo custo, de fácil transporte para regiões de difícil acesso, fácil operação e que possa ser facilmente adaptado para as diversas espécies de animais, principalmente animais silvestres** (KOVALHUK, et al., 2012). Esse equipamento, preferencialmente, não deve exigir a conexão a um computador, o que exigiria um investimento adicional.

1.3 OBJETIVO GERAL

Propor uma nova alternativa para contagem de células vermelhas de sangue de animais domésticos ou silvestres, tendo como princípio as ferramentas computacionais para processamento de imagens. Esta proposta visa ainda gerar como parte da solução um sistema de baixo custo e de fácil manuseio pelo operador, denominada **Sistema Stand Alone de Contagem de Células Vermelhas de Animais Domésticos e Silvestres**.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conforme a justificativa e o objetivo geral, para o desenvolvimento do **Sistema Stand Alone de Contagem de Células Vermelhas de Animais Domésticos e Silvestres**, os objetivos específicos são divididos em:

- A partir do conhecimento dos procedimentos atuais de contagem de hemácias de amostras de sangue, tanto no método manual, quanto nos

processos automáticos existentes, definir os requisitos de um sistema **portátil**, de **baixo custo** e de **fácil operação**;

- Desenvolver um sistema computacional (*hardware* e *software*) que seja portátil, de fácil construção e/ou aquisição e de baixo custo, incluindo a escolha da plataforma de *hardware* e o desenvolvimento do *software* para adquirir, processar e apresentar os resultados da contagem das hemácias das amostras de sangue.
- Apresentar uma solução de baixo custo para o sistema óptico de aquisição de imagens (microscópio).
- Avaliar o sistema computacional desenvolvido.

1.5 DELIMITAÇÕES

Apesar deste trabalho ter como foco a contagem de células vermelhas de sangue de animais silvestres, existe uma grande dificuldade na aquisição de amostra de sangue destes tipos de animais. Assim, os testes foram realizados usando amostras de **células de cães** e **células de cavalo** obtidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Botucatu. Como as células a serem analisadas são hemácias e estas células são morfologicamente semelhantes para a maioria dos mamíferos, é possível validar o sistema usando amostras de sangue de animais domésticos. O uso de células de cães e cavalos permite obter um parâmetro de comparação e validação dos resultados obtidos pelo sistema aqui proposto e o resultado obtido por meios clássicos.

Outro ponto relevante é que as amostras de sangue efetivamente usadas para avaliar a exatidão dos algoritmos não foram adquiridas com este protótipo, mas foram previamente adquiridas e armazenadas conforme (MAURICIO, et al., 2012). Estas imagens foram então aplicadas ao sistema baseado em processador RISC para validação do algoritmo proposto.

1.6 ESTRUTURA DO TRABALHO

O trabalho está assim dividido em 5 capítulos: o primeiro capítulo descreve a motivação, as justificativas e os objetivos geral e específicos.

No capítulo 2 é feita uma revisão dos métodos de contagem de células e alguns equipamentos comerciais que realizam esta tarefa, com um enfoque na contagem de hemácias. São apresentados um método manual e dois métodos automáticos e 5

equipamentos automáticos que utilizam estes métodos automáticos para realizar a análise das amostras de sangue. Também são apresentados os resultados de uma pesquisa que realiza a comparação entre os métodos manual, automático e por automático por processamento de imagem.

O capítulo 3 apresenta uma proposta de simplificação para o microscópio a ser usado neste sistema. Em seguida são apresentados os recursos de hardware usados para o desenvolvimento da proposta, como a plataforma computacional, os sensores de aquisição de imagem e os sistemas ópticos utilizados e propostos. Também é feita a descrição do algoritmo de aquisição e processamento das imagens, apresentando todas as etapas de processamento e interação com o usuário.

Os resultados obtidos são mostrados no capítulo 4. Inicialmente é apresentado o protótipo do microscópio simplificado para obter as imagens da câmara de Neubauer. Posteriormente é mostrado o desempenho do algoritmo quanto a sua exatidão e tempo de resposta necessário para aquisição e apresentação dos resultados.

Finalmente, no capítulo 5 propõem-se as melhorias e novas funcionalidades para ampliar a gama de exames possíveis para este sistema e as conclusões finais do trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo serão vistos os métodos de contagem de células vermelhas mais difundidos. São também apresentados alguns equipamentos comerciais que realizam contagens de células e que são usados na área veterinária.

2.1 COMPOSIÇÃO DO SANGUE

O sangue é um tecido líquido formado por três tipos de células, glóbulos vermelhos ou hemácias ou eritrócitos (Figura 1), glóbulos brancos ou leucócitos (Figura 2) e as plaquetas (Figura 1). Estas células estão imersas em um meio intercelular chamado plasma. O plasma é composto por 91,5% de água, 7,5% de sólidos orgânicos e 1% de sólidos inorgânicos. As proteínas, colesterol, fosfolipídios, glicose, enzimas e hormônios fazem parte dos sólidos orgânicos. Os sólidos inorgânicos são minerais como sódio (Na), cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg), fósforo (P), cobre (Cu) e bicarbonatos (HCO_3) (GARCIA-NAVARRO, et al., 1994).

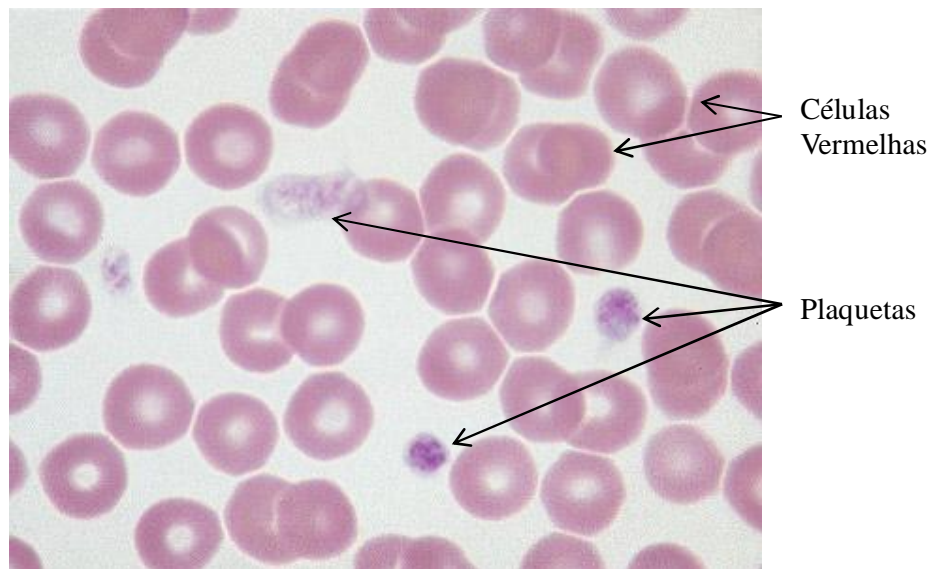


Figura 1. Exemplo de células vermelhas e plaquetas de sangue de cachorro. (FRENCH, et al.).

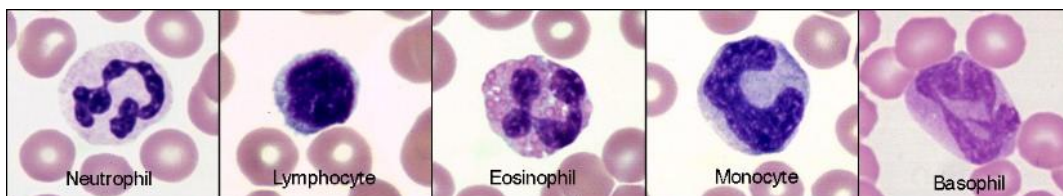


Figura 2. Exemplos de células brancas de cachorros. (FRENCH, et al.)

2.2 ERITRÓCITOS

Os eritrócitos ou hemácias ou células vermelhas do sangue são as células mais numerosas do sangue. Variam em forma e quantidade de acordo com a espécie, possuem uma vida média entre 60 e 120 dias, de acordo com a espécie e seu volume globular médio varia entre $16\mu\text{m}^3$ e $95\mu\text{m}^3$. Representam cerca de 40% do volume sanguíneo, valor que se mantém mais ou menos constante para todas as espécies, independentemente do seu tamanho. A função do eritrócito é transportar o oxigênio dos pulmões para os tecidos e de gás carbônico dos tecidos para o pulmão (GARCIA-NAVARRO, et al., 1994).

As hemácias dos mamíferos possuem suas características morfológicas muito parecidas, não possuem núcleo, possuem uma tonalidade entre avermelhada a laranja-avermelhada e possuem um formato geralmente bicôncavo e discóide. As principais diferenças recaem no seu tamanho e na profundidade da depressão central (REAGAN, 2008). A Tabela 1 mostra o diâmetro dos eritrócitos de alguns animais domésticos.

Tabela 1. Características morfológicas das hemácias de alguns animais domésticos. Fonte: Adaptado de (REAGAN, 2008).

| Animal | Diâmetro médio (μm) |
|---------------|--|
| Cachorro | 7,0 |
| Gato | 5,8 |
| Cavalo | 5,7 |
| Vaca | 5,5 |
| Cabra | 4,5 |
| Ovelha | 3,2 |

2.3 CONTAGEM DE ELEMENTOS FIGURADOS

A importância da contagem dos elementos figurados do sangue consiste em uma indicação primária da saúde de animal.

Os elementos figurados do sangue podem ser avaliados quantitativamente por método visual ou manual ou por métodos automáticos (MOURA, 1987). Os métodos para contagem dos elementos figurados do sangue dependem de uma série de fatores, como concentração da diluição, capacidade da câmara de contagem, entre outros, e devem ser matematicamente corretos para determinar a quantidade correta do número de elementos (FISCHER, 1948).

2.3.1 Método Visual ou Manual

O método manual utiliza um microscópio para visualizar a amostra de sangue colocada em uma lâmina própria para facilitar a contagem pelo técnico. Para isto, dilui-se um volume conhecido de sangue com uma quantidade também conhecida do líquido diluidor e contam-se os elementos na área reticulada da câmara, obtendo-se a sua quantidade por mm^3 (LIMA, 1985).

As câmaras de contagem, também conhecidas como hemocitômetros, são construídas em uma lâmina espessa de vidro retangular cuja parte central é rebaixada e separada das partes laterais por dois sulcos (MOURA, 1987). Uma vista em corte e uma representação em 3D da câmara de contagem são mostradas na Figura 3.

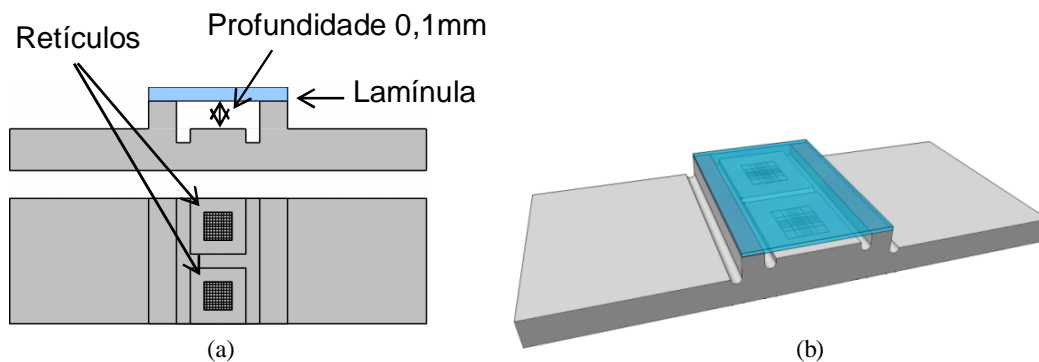


Figura 3. (a) Vista em corte da câmara de contagem mostrando a área reticulada. (b) Representação em 3D. Fonte: Autoria própria

Conforme a Figura 3, a área reticulada se localiza nesta parte central, 0,1 mm mais baixa que as duas plataformas laterais que sustentam a lamínula (LIMA, 1985). Existem vários modelos de retículo: Thoma, Türk, Fuchs-Rosenthal e Neubauer. Sendo que o modelo de Neubauer é o mais usado (LIMA, 1985). A Figura 4a apresenta uma foto de uma câmara de Neubauer adquirida em um microscópio e modificada por *softwares* de processamento de imagens. Já a Figura 4b mostra um desenho da câmara de Neubauer destacando as regiões normalmente utilizadas no processo de contagem de hemácias, isto é, regiões 1A a 5A e 1B a 4B e suas dimensões.

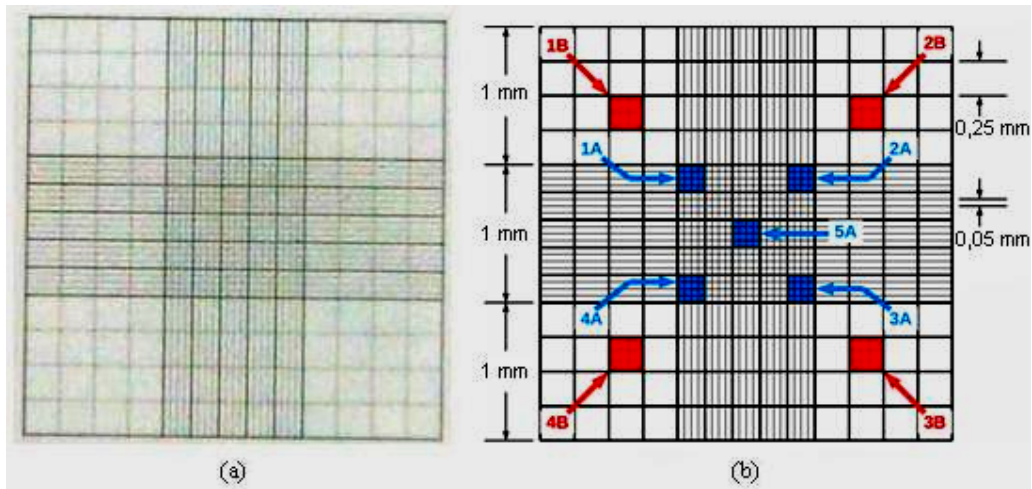


Figura 4. (a) Imagem negativa de uma câmara de Neubauer, (b) Câmara de Neubauer com nove regiões de $1 \times 1 \text{ mm}^2$. A profundidade da câmara é $0,1 \text{ mm}$ resultando em regiões com volume de $0,1 \text{ mm}^3$. As regiões nos quatro cantos são divididas em regiões de $1/16 \text{ mm}^2$ (i.e., regiões 1B, 2B, 3B e 4B). O quadrado de $1 \times 1 \text{ mm}^2$ central é composto de 25 regiões com $1/25 \text{ mm}^2$ (e.g., 1A e 2A), onde cada um desses pequenos quadrados é subdividido em 16 regiões com $1/400 \text{ mm}^2$. Fonte: Autoria própria.

Depois de preparada com a amostra de sangue já diluído, coloca-se a câmara no microscópio e observa-se primeiro com um pequeno aumento para verificar se a distribuição está homogênea em toda a área reticulada. Em seguida observa-se com um aumento maior pra efetuar a contagem (FISCHER, 1948). Para a câmara de Neubauer, a contagem dos glóbulos vermelhos é feita prioritariamente no retículo central, em cinco grupos de quadrados médios (com 80 quadrículas), conforme indicado em azul na Figura 4b.

Para cada quadrado médio de 16 quadrículas (em azul na Figura 4b), a contagem é feita em zigue-zague na horizontal, ou seja, da esquerda para a direita e de cima para baixo. Nas bordas (do quadrado médio) consideram-se as hemácias que tocam as linhas à esquerda e acima e descartam-se as hemácias que tocam as linhas à direita e abaixo (LIMA, 1985). A Figura 5 mostra este processo, mostrado também as hemácias das bordas consideradas e descartadas.

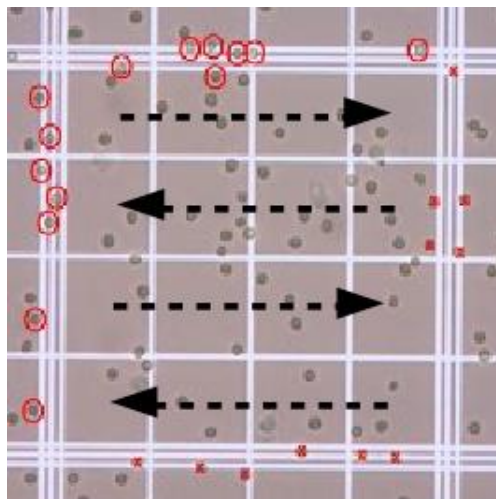


Figura 5. Células das bordas consideradas (O) e descartadas (x) na contagem e seqüência de contagem. As setas indicam o deslocamento de contagem em zigue-zague. Fonte: Autoria própria.

Como foram contados cinco quadrados médios, para uma diluição de 1/200 basta acrescentar quatro zeros (multiplicar por 10000) ao número total de glóbulos encontrados. Este valor corresponde ao número de eritrócitos por mm^3 de sangue (LIMA, 1985).

2.3.2 Método Fotoelétrico

Em 1934, Andrew Moldavan publicou na revista *Science* um pequeno texto explicando o funcionamento de uma máquina capaz de contar células de maneira automática. Neste equipamento, as células suspensas em água, passavam em um tubo de vidro capilar montado sob um microscópio e um detector fotoelétrico acoplado ao microscópio realizava a contagem das células detectando a variação da luz (MOLDAVAN, 1934). Este conceito é parecido com o utilizado na citometria de fluxo com análise de dispersão de luz.

2.3.3 Impedância

Wallace Coulter patenteou, em 1956, outro método de contagem automática de células usando como detector a variação da corrente elétrica. O funcionamento do método de Coulter se baseia no princípio de que as partículas a serem contadas passam por um tubo estreito e causam mudanças detectáveis das características elétricas na presença ou na ausência destas partículas dentro do tubo. A Figura 6 mostra o esquema do contador de Coulter.

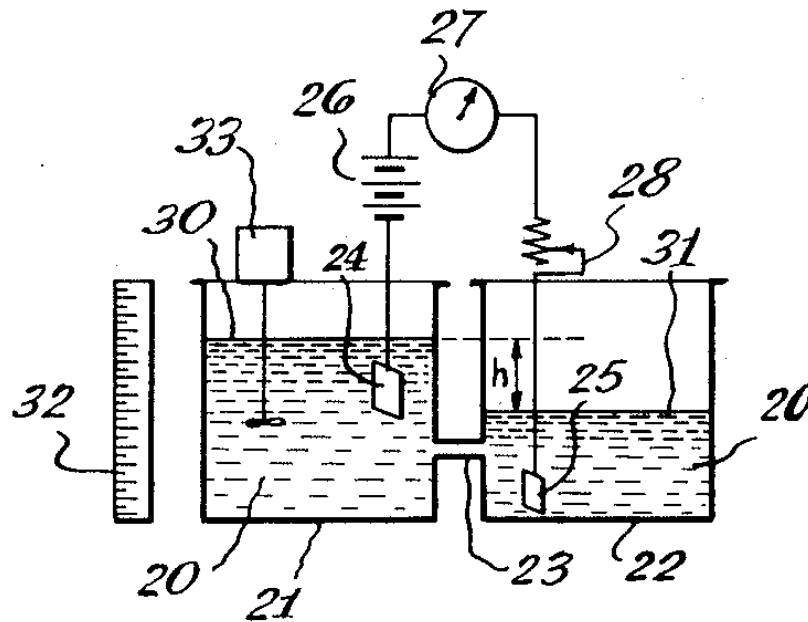


Figura 6. Esquema do Coulter Counter mostrando os seus componentes: 20 - amostra em suspensão, 21 e 22 - recipientes contendo a amostra, 23- tubo capilar por onde passam as células, 24 e 25 - eletrodos, 26 -bateria, 27 - medidor, 28: Potenciômetro de ajuste, 30 - nível do fluido do primeiro recipiente, 31 - nível do fluido do segundo recipiente, 32 - escala graduada, 33 - agitador. Fonte: (COULTER, 1953).

Neste sistema, dois recipientes (30 e 31) estão ligados por um pequeno canal capilar (23), formando um sistema de vasos comunicantes. No primeiro recipiente (30) é colocada a solução contendo as células a serem contadas suspensas no fluido (20). Para entrar em equilíbrio, a solução passará do primeiro recipiente para o segundo, formando o fluxo de fluido e células pelo canal capilar. Nos sistemas comerciais o fluxo é forçado, através da sucção da solução no lado do recipiente 31. Dois eletrodos (24 e 25) são colocados, um em cada recipiente, formando um circuito elétrico composto ainda pela fonte (26), medidor (amperímetro) (27), um potenciômetro de ajuste (28) e o eletrólito (fluido mais células) (20).

Quando uma célula passa pelo tubo capilar, a seção transversal do tubo capilar diminui, pois o volume ocupado pela célula substitui o volume do fluido (Figura 7).

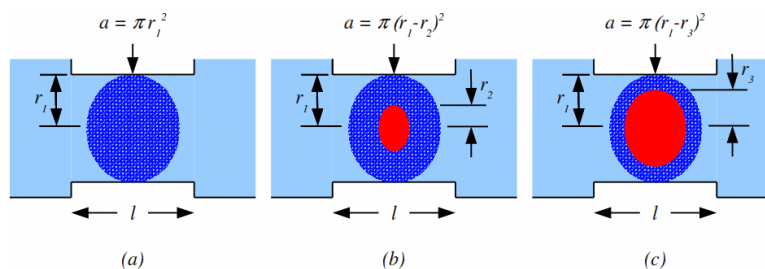


Figura 7. Seção transversal do canal capilar. Em (a) canal sem nenhuma célula, em (b) canal com uma célula pequena e em (c) canal com uma célula grande. A elipse em azul representa a seção transversal do canal e a elipse em vermelho representa a hemácia. Fonte: Autoria própria.

Como o valor da resistência é função da seção transversal (eq. 1), a redução da seção transversal resulta no aumento da impedância entre os dois eletrodos. Isto altera a corrente elétrica que é medida pelo amperímetro (27) (COULTER, 1953).

$$R = \rho \frac{l}{a} \quad 1$$

onde: R é a resistência do canal capilar;

ρ é resistividade do fluido;

l é o comprimento do canal capilar;

a é a área da seção transversal do fluido no canal capilar.

O principal requisito deste método é que existam diferenças entre a condutividade elétrica do fluido e da partícula. Apesar de ser difícil existir um conjunto fluido e partículas com a mesma condutividade elétrica, se isto ocorrer, é possível alterar a condutividade do fluido com a adição de eletrólitos ao mesmo (COULTER, 1953).

2.3.4 Citometria de Fluxo

Citometria refere-se às medidas físicas e químicas das células ou outras partículas biológicas. A citometria de fluxo é o processo automático para realização destas medidas (KRICKA, 2008). Em um citômetro de fluxo, as células em suspensão são sugadas para dentro de um estreito canal formado por um fluxo contínuo de líquido isotônico. Isto faz com que as células passem individualmente pelo detector, uma após a outra (BROWN, 2000).

A citometria de fluxo utiliza dois fenômenos físicos para analisar as células, a fluorimetria e a dispersão da luz (KRICKA, 2008). Na fluorimetria, um laser é usado para excitar o marcador fluorescente ligado à célula e na dispersão da luz consegue-se determinar a quantidade e o tamanho da célula (MURRAY, 2006). As células passam pela câmara de fluxo e as medidas da dispersão da luz e da fluorescência são feitas simultaneamente. Normalmente os citômetros de fluxo possuem vários detectores de fluorescência, permitindo a utilização de vários marcadores fluorescentes (KRICKA, 2008). O Separador de Células Ativado por Fluorescência (FACS – *Fluorescence-Activated Cell Sorter*) é um citômetro de fluxo que consegue separar subpopulações específicas de células baseados em seus tamanhos e imunofluorescência (MURRAY, 2006).

Os resultados são apresentados na forma de um histograma, onde a intensidade da

fluorescência ou o volume da célula é apresentada no eixo x e a quantidade de células no eixo y ou na forma de gráficos de dispersão que é uma plotagem de pontos na qual mais de um parâmetro é comparado para cada célula (MURRAY, 2006).

Um citômetro de fluxo é composto por cinco subsistemas, a Figura 8 mostra um diagrama de um citômetro de fluxo.

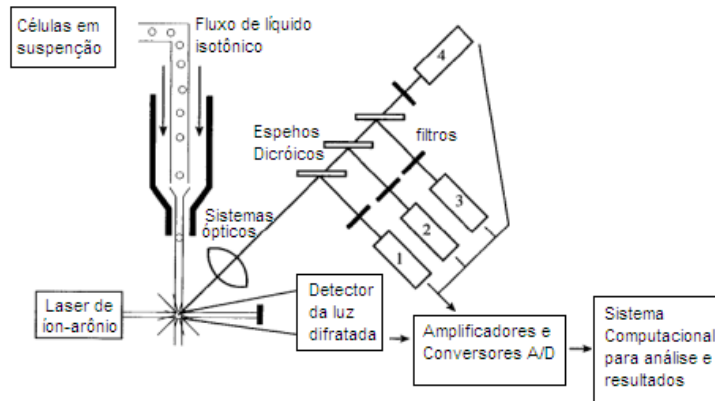


Figura 8. Esquema de um citômetro de fluxo. Fonte: modificado de (BROWN, 2000)

- A **câmara de fluxo** (ou célula de fluxo) é construída para que as células passem individualmente e alinhadas pelo ponto de medição (feixe de luz). Para que isto seja possível, a amostra é injetada sob pressão no centro de um fluxo de líquido envolvente chamado de fluído *sheath*. Se não ocorrer nenhuma perturbação no sistema, a amostra e o fluído não se misturam e permitem a formação de um canal de $10\mu\text{m}$ de diâmetro para passagem das células (ORMEROD, 2008). Este sistema é chamado de focagem hidrodinâmica (Figura 9).

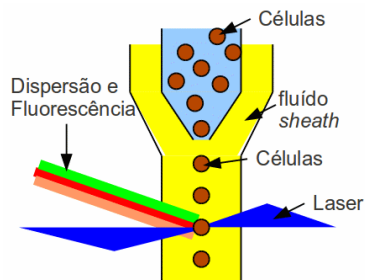


Figura 9. Câmara de fluxo. Fonte: Autoria própria.

Existem dois tipos de câmaras de fluxo: as câmaras totalmente fechadas, usadas somente para realizar as análises das células e as câmaras abertas, que, além de realizarem a análise das células, também são usadas para fazer a separação de subpopulações de células, de acordo com suas características (ORMEROD, 2008).

- A **fonte de luz** normalmente é um laser, mas pode ser uma lâmpada de arco voltaico ou até um diodo emissor de luz (LED). O laser é o mais utilizado por ser uma fonte de luz coerente, monocromática e de alta intensidade, atuando em um pequeno ponto. Normalmente se usam lasers de argônio, com comprimento de onda de 488nm. Este comprimento de onda é importante para excitar os marcadores fluorescente (fluoróforos) ligados a célula. Porém, outros tipos de lasers, como o laser de HE-NE ou HE-CD ou mesmo lasers de semicondutores com comprimento de onda de 355nm, 405nm, 488nm, 530nm, 594nm, 635nm e 780nm tem sido usados (ORMEROD, 2008).
- Um **conjunto óptico** composto por lentes para focalizar o feixe da luz do laser sobre a amostra e filtros dicróicos que separam os vários comprimentos de onda da radiação (luz) emitida.
O feixe de luz deve estar focalizado no fluxo de amostras. Lentes elípticas geram um foco elíptico de 20um por 60um perpendicular ao fluxo, de maneira que a parte central do fluxo esteja uniformemente iluminada. Este ponto, onde o feixe de luz intercepta o fluxo é chamado de “ponto de análise” ou “ponto de interrogação” (GIVAN, 2001).
Os filtros dicróicos permitem a passagem de luz com comprimento de onda menores que a especificação do filtro e refletem a luz com comprimento de onda maiores que a especificação (Figura 10) (Ormerod, 2008).

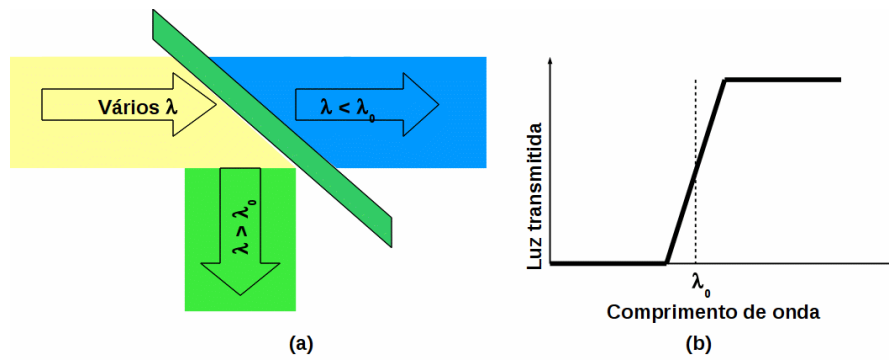


Figura 10. Funcionamento de um espelho dicróico. Em (a) exemplo de funcionamento, em (b) curva de resposta em frequência. Adaptado de (ORMEROD, 2008).

- Os fotodetectores convertem o sinal luminoso em sinais elétricos, onde a intensidade do sinal elétrico é proporcional à intensidade do sinal luminoso (GIVAN, 2001). Após interceptar o fluxo de células, o feixe de luz do laser e os feixes de luz emitidos pelos marcadores fluorescentes são direcionados para os filtros dicróicos e, depois, para os detectores (fotodiodos ou fotomultiplicadores). A luz do laser passa perpendicular ao feixe (dispersão para frente) e é parcialmente bloqueada e a parte da luz dispersada é detectada por um fotodetector, que determina o tamanho e o volume das células (GIVAN, 2001). Os fotodetectores de estado sólido podem ser usados para medirem a luz dispersa, mas para medir a fluorescência, são necessárias válvulas fotomultiplicadoras (ORMEROD, 2008).

Os feixes de luz dispersados em 90° passam pelos filtros dicróicos que separam os diversos comprimentos de onda (Figura 11). O primeiro filtro separa a luz com comprimentos de onda menores que 500nm (azul). O segundo filtro separa a luz com comprimento de onda menores que 540nm (verde). O terceiro filtro separa a luz com comprimento de onda menores que 590nm (laranja) e os outros comprimentos de onda (maiores que 590nm - vermelho) passam direto para o último fotomultiplicador (ORMEROD, 2008).

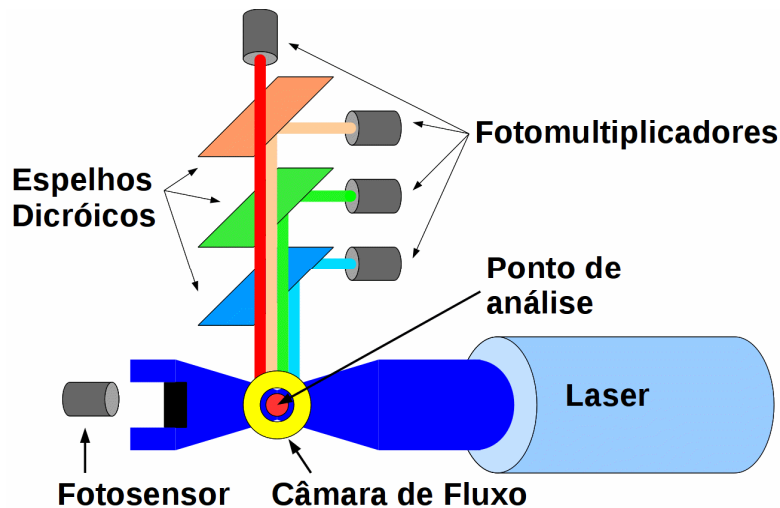


Figura 11. Funcionamento dos filtros dicróicos em um citômetro de fluxo. Fonte: Autoria própria.

- O processamento dos sinais elétricos dos fotodetectores são amplificados e aplicados a um sistema de aquisição que transforma o sinal analógico para digital. Este sinal digital é processado por um sistema microprocessado que faz a análise da informação e apresenta os resultados.

2.3 EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS PARA CONTAGEM DE CÉLULAS DE ANIMAIS

A seguir são apresentados exemplos de equipamentos disponíveis para uso em contagem de células de animais silvestres e domésticos.

2.3.1 CellDyn 3500

O CellDyn 3500 foi desenvolvido originalmente para análise de sangue humano, mas, através de alterações do *software*, ele pode ser utilizada para várias espécies de animais (BECKER, 2007).

O CellDyn 3500 utiliza os dois principais métodos para efetuar a análise do sangue: o método da impedância, para análise das RBCs, das plaquetas e das WBCs e o método da citometria de fluxo para, novamente, analisar as WBCs. A análise das WBCs pelos dois métodos é feita para proporcionar um controle de qualidade da análise (BECKER, 2007).

A difração da luz é medida para quatro ângulos diferentes, 0°, 10°, 90° e 90° com luz não polarizada. Isto permite diferenciar as WBCs como neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos (BECKER, 2007).

2.3.2 LaserCyte

O LaserCyte é um dos equipamentos mais avançados para hematologia e está disponível para uso em medicina veterinária. Ele é capaz de fazer a análise do sangue de vinte e uma espécies de animais. Porém, devido ao seu tamanho, preço e pequena capacidade de análise de amostras por hora, ele não é muito viável para pequenos laboratórios e clínicas (BECKER, 2007).

O LaserCyte é capaz de realizar a análise de 18 parâmetros, entre eles a contagem de células vermelhas e células brancas. Para cada tipo de análise, é necessário colocar a amostra em um tubo específico, com um reagente próprio para cada tipo. O laserCyte realiza a análise em dois passos: no primeiro passo é feita a análise das células vermelhas, plaquetas e concentração de hemoglobina. No segundo passo, as células vermelhas são dissolvidas e é feita a análise das células brancas e, mais uma vez, da concentração de hemoglobina (IDEXX 1, 2008).

2.3.3 ForCyte

O ForCyte é um equipamento próprio para uso em clínicas e utiliza as tecnologias da impedância e da citometria de fluxo.

As RBCs e plaquetas são medidas pelo método da impedância. As WBCs e reticulócitos são analisados pelo método da citometria de fluxo (BECKER, 2007).

2.3.4 MS45

O MS45 realiza a análise exclusivamente usando o método da impedância. Realiza a contagem de WBCs, RBCs e plaquetas, apresentando o resultado através de histogramas (BECKER, 2007).

2.3.5 Genesis

O Genesis é um equipamento capaz de fazer a análise do sangue de mais de 50 espécies de animais. Foi projetado para ser usado em clínicas e pequenos laboratórios. Usa as tecnologias de impedância e citometria de fluxo. Neste equipamento, o método da impedância é usado para contar e determinar o tamanho das células enquanto o método da citometria de fluxo é usado para medir parâmetros intracelulares (Oxford Science).

2.3.6 Avaliação

Os equipamentos apresentados anteriormente representam a implementação dos métodos automatizados de contagem de células baseados no método Coulter ou em citometria de fluxo, entretanto, os equipamentos descritos não fazem uso da análise de imagem para a contagem dos elementos figurados como é o caso do sistema proposto. Desta forma, discute-se no item a seguir apresenta-se uma comparação dos métodos de contagem, usando imagem da amostra sanguínea, contagem manual e contagem automática usando o método de Coulter.

2.4 ANÁLISE COMPARATIVA

Em (MAURICIO, et al., 2012), foi feita uma comparação entre 4 métodos de contagem das hemácias. Os métodos usados nesta comparação são:

- **Contagem automática:** neste método foi usado um analisador hematológico automático (Hemascreen 18, Ebram, São Paulo, Brasil) para contar apenas as células vermelhas. As amostras foram diluídas com a solução isotônica própria do equipamento.
- **Contagem manual:** a contagem manual foi feita usando os procedimentos descritos no item 2.3.1, usando a câmara de Neubauer. As amostras foram diluídas em uma solução salina (Soro fisiológico - NaCl à 0,9%), numa proporção de 1:200, sendo 10µl de sangue para 2000 µl de soro. A contagem foi realizada por pessoas especializadas do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ, da UNESP, campus de Botucatu. Neste processo foi usado o mesmo microscópio descrito no item 3.2.1.1.
- **Contagem auxiliada por computador:** para este método foi desenvolvido um aplicativo usando o Matlab que realiza a seleção e contagem inicial das células. As amostras foram preparadas da mesma maneira que para a contagem manual. Depois que o *software* realiza a contagem automática, marcando em vermelho as hemácias encontradas, o técnico faz uma correção da contagem, marcando as células não identificadas pelo algoritmo automático e desmarcando as falsas células identificadas pelo algoritmo automático. Esta marcação feita pelo técnico é feita em tempo real, assim, o técnico pode visualizar as células que já foram contadas, evitando que sejam contadas várias vezes. A contagem realizada por este método

foi realizada por três pessoas diferentes, um bioquímico experiente e duas pessoas leigas. Este é o método implementado neste trabalho em uma plataforma RISC.

- **Contagem automática baseada em processamento digital de imagens:** neste método, foram capturadas duas imagens de cada quadrícula, com focos diferentes. Na primeira imagem foi aplicada a operação morfológica de erosão para destacar as células das linhas de referência da câmara de Neubauer. As imagens, após serem convertidas para escala de cinza, foram limiarizadas para se obter as células segmentadas numa imagem binária. Assim, usando as informações das duas imagens diminui a quantidade de células não identificadas. A área e as coordenadas de cada objeto encontrado foram armazenadas, sendo a área usada para selecionar aqueles que não são hemácias. Para esta seleção foi considerada uma tolerância de $\pm 50\%$ em relação ao valor mediano da área das hemácias.

Em (MAURICIO, et al., 2012) mostra-se que existe uma correlação maior entre os métodos manual e auxiliado por computador ($r=0,994$) do que entre os métodos manual e o método automático usando o analisador comercial ($r=0,958$). E que, comparando-se os métodos auxiliado por computador e automático por processamento de imagens com o método manual, aqueles são clinicamente válidos, apresentando correlação de $r= 0,994$ e $r=0,979$ respectivamente.

2.5 CONCLUSÕES

Dos métodos e equipamentos avaliados, permite-se a implementação de um sistema de contagem de células baseado na aquisição de uma imagem que será processada pelo equipamento e aplicada a ela um algoritmo de contagem para a determinação do número das hemácias. O sistema também permitirá a intervenção do usuário para correções dos falsos positivos e falsos negativos.

No próximo capítulo é apresentado um equipamento *stand-alone* proposto para realizar a contagem de células vermelhas do sangue de animais silvestres e animais domésticos e de produção. A necessidade desse equipamento se dá em função dos custos associados ao uso das opções comerciais disponíveis, entre elas os equipamentos citados na seção 2.3.

2.6 PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DE UM EQUIPAMENTO *STAND ALONE* PARA CONTAGEM DE CÉLULAS DE ANIMAIS SILVESTRES

No próximo capítulo é apresentado um equipamento *stand-alone* proposto para realizar a contagem de células vermelhas do sangue de animais silvestres e animais domésticos e de produção. A necessidade desse equipamento se dá em função dos custos associados ao uso das opções comerciais disponíveis, entre elas os equipamentos citados na seção anterior.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo destaca-se o processo de contagem de células pelo método manual, no qual este sistema se baseia. Também são apresentados os recursos de *hardware* e *software* usados no desenvolvimento deste trabalho e os detalhes do algoritmo de aquisição, identificação e contagem das células vermelhas do sangue.

3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARAS DE NEUBAUER

O sistema proposto neste trabalho está fundamentado no método manual de contagem usando câmaras de Neubauer, semelhante ao que é feito por um técnico usando um microscópio. Assim, este método será mais detalhado nesta seção.

A contagem visual de células com microscópio é feita com auxílio das câmaras de contagem. As câmaras de contagem são construídas de lâminas de vidro com um retículo na parte central que são usados como referência espacial para a contagem. Existem vários tipos de retículos, sendo o retículo de Neubauer (Figura 4) o mais usado para análise dos elementos figurados do sangue (LIMA, 1985), pois permite a contagem em reticulados de maior (0,25 mm de lado) e menor (0,05 mm de lado) área. Sendo que as regiões de área maior são usadas para contagem de amostras com menores concentrações de células e as regiões de área menor são usadas para contagem de amostras com maiores concentrações de células respectivamente.

A câmara de Neubauer está dividida em nove regiões de 1mm^2 ($1 \times 1 \text{ mm}$), com uma profundidade de $0,1\text{mm}$. Isto resulta em regiões com um volume de $0,1\text{mm}^3$. As regiões dos vértices (1B, 2B, 3B e 4B) são subdivididas em 16 regiões de $1/16\text{mm}^2$. A região central é subdividida em 25 regiões de $1/25\text{mm}^2$ (1A a 5A) e cada uma destas subdivisões são novamente subdivididas em 16 regiões de $1/400\text{mm}^2$. Esta estrutura pode ser visualizada na Figura 4b.

Em uma contagem manual, dilui-se uma quantidade conhecida de sangue com uma quantidade também conhecida do líquido diluidor, obtendo-se uma concentração b . Se uma região de 1 mm^2 é considerada para a contagem, sabendo-se que a profundidade da câmara é d , basta realizar a contagem das células vermelhas (CCV) na área de 1 mm^2 (CCV/mm^2) e obter CCV/mm^3 utilizando a equação (2).

$$\text{CCV}/\text{mm}^3 = \text{CCV}/\text{mm}^2 \cdot d \cdot b$$

Para a câmara de Neubauer, a contagem dos glóbulos vermelhos é feita exclusivamente no retículo central, utilizando cinco grupos de quadrados médios (i.e., 1A, 2A, 3A, 4A e 5A apresentado na Figura 4b). Quando a contagem é manual, por inspeção visual, os 16 quadrados pequenos que compõe o quadrado médio são contados respeitando uma ordem em zigue-zague, como apresentado anteriormente na Figura 5. As hemácias que tocam as linhas à esquerda e as hemácias que tocam as linhas acima da região, mesmo que pelo lado de fora, são contabilizadas. Já as hemácias que tocam as linhas abaixo e à direita, mesmo que pelo lado de dentro, são desconsideradas (LIMA, 1985). Como a contagem foi feita em cinco regiões de $1/25 \text{ mm}^2$, para se obter a quantidade total de hemácias dentro da área de 1 mm^2 tem-se que multiplicar o resultado obtido na somatória das cinco regiões por 5. Desta forma, considerando a profundidade igual a 0,1 mm, a equação (3) apresenta a quantidade de hemácias por mm^3 :

$$CCV/\text{mm}^3 = 5 \cdot \sum_{1A}^{5A} CCV_{1/25\text{mm}^2} \quad 3$$

Se for utilizada a diluição típica de 1:200 usamos a equação (4) para definir o número de eritrócitos por mm^3 de sangue (LIMA 1985).

$$CCV/\text{mm}^3 = 1000 \cdot \sum_{1A}^{5A} CCV_{1/25\text{mm}^2} \quad 4$$

Para o caso da contagem dos reticulados 1B, 2B, 3B e 4B, a equação (5) é a que deve ser usada para a mesma diluição de 1:200.

$$CCV/\text{mm}^3 = 800 \cdot \sum_{1B}^{4B} CCV_{1/16\text{mm}^2} \quad 5$$

3.2 SISTEMAS DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO

Este sistema foi elaborado com a intenção de obter um dispositivo de baixo custo, e de fácil operação. O sistema de aquisição é composto de um sistema óptico e por um sensor de imagem e o sistema de processamento de arquitetura livre, baseada em um processador RISC que permite a comunicação com periféricos de interação com o usuário como monitor LCD, mouse e teclado.

3.2.1 Sistema de Aquisição de Imagem

O sistema de aquisição de imagem é composto de um microscópio e uma câmera digital, que captura a imagem do microscópio e a converte em formato digital para o processador.

3.2.1.1 Aquisição de imagem

As imagens das amostras de sangue usadas para validar o algoritmo foram adquiridas na pesquisa de Claudio R. Marquetto Mauricio (MAURICIO, et al., 2012). Nesta aquisição foi utilizado um microscópio óptico Leyca DMLS (Leyca Microsystems, Wetzlar, Alemanha), com objetiva 20X e uma câmera digital Motic (Motic, Hong Kong, China). As imagens foram capturadas com resolução de 1280 por 1024 pixels, no formato JPG (Joint Photographics Expert Goup). Um exemplo de uma imagem adquirida pode ser visto na Figura 12.

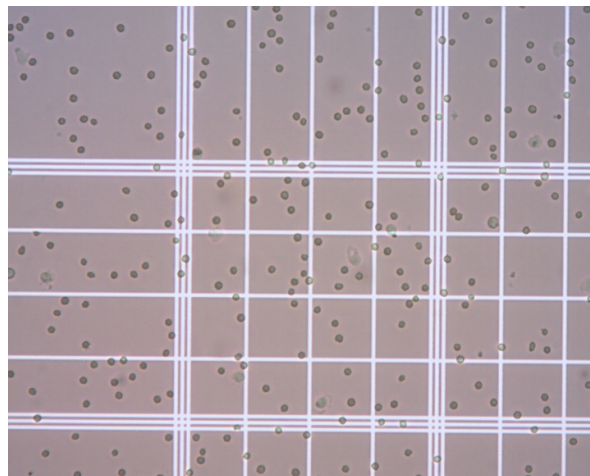


Figura 12. Amostra de imagem adquirida em Botucatu. Fonte: Autoria própria.

Para validar o sistema de aquisição e o *hardware*, as imagens foram adquiridas na UTFPR, usando um microscópio óptico *Edmund Scientific*, XSB421, com objetivas

4X e a câmera LI-5M03 (*Leopard Imaging*) acoplada a *BeagleBoard* (*BeagleBoard Org*, U.S.A.). Uma foto da câmara de Neubauer adquirida com esta placa e microscópio pode ser visto na Figura 13.

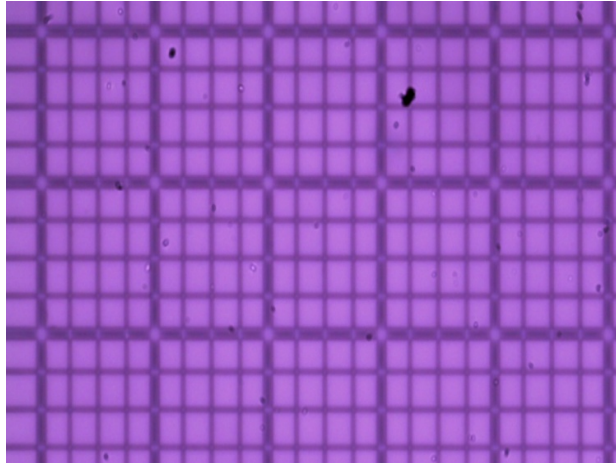


Figura 13. Amostra de imagem adquirida na UTFPR com o microscópio XSB42. Fonte: Autoria própria.

Uma foto deste conjunto pode ser visto na Figura 14.

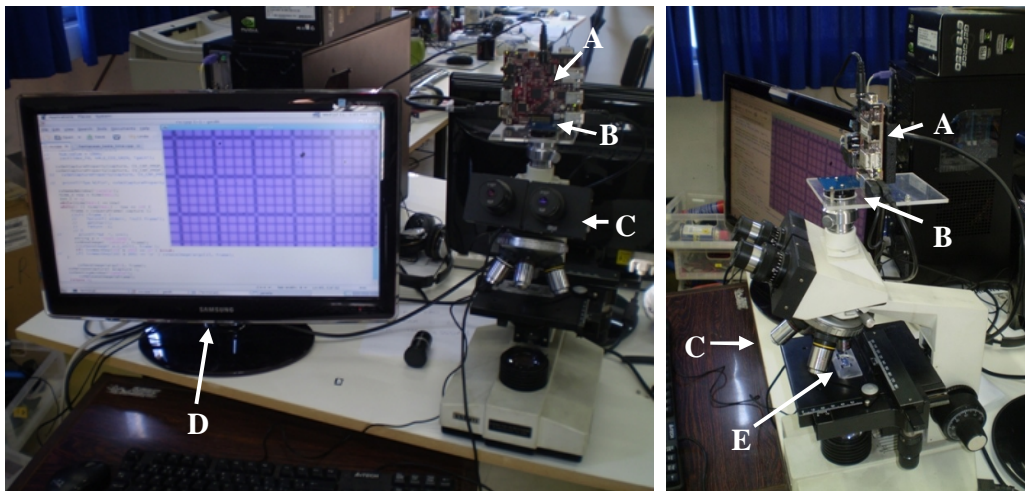


Figura 14. Foto do sistema montado. (a) vista de frente, (b) vista lateral. A: BeagleBoard, B: Câmera LI-5M03, C: Microscópio XSB 421, D: monitor de vídeo, E: Câmara de Neubauer. Fonte: Autoria própria.

Porém, o microscópio de uso em laboratório possui diversos recursos que não são necessários para realizar a contagem descrita neste trabalho. Assim um protótipo de microscópio mais simples foi desenvolvido, o que possibilitaria um contador semi-automático de custo reduzido. Assim, uma simplificação maior é possível na instrumentação uma vez que somente uma lente objetiva e um tubo para controle de foco é necessário para a parte óptica do instrumento *stand alone*. Dessa forma, a Figura 15 apresenta um sistema de aquisição composto por uma fonte de iluminação com

controle de intensidade de luz e condensador óptico, uma lente objetiva típica de microscópio com distância focal de 160 mm e um sensor de imagem do tipo CMOS.

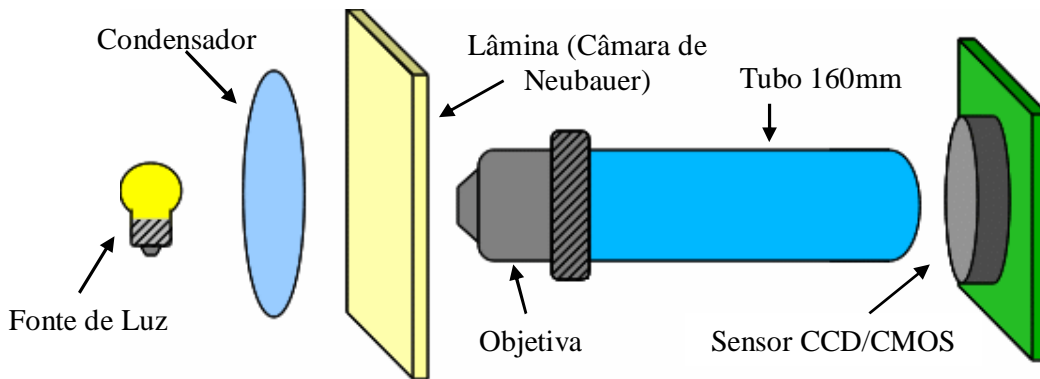


Figura 15. Diagrama do subsistema de captura da imagem. Fonte: Autoria própria.

O microscópio desenvolvido é composto por dois tubos de aço inox que se encaixam. Em um dos tubos é fixada a objetiva e no outro tubo é fixado o sensor de imagem. Como os tubos estão dispostos um dentro do outro, o comprimento total, ou seja, a distância entre a objetiva e o sensor de imagem pode ser ajustada para se encontrar a distância focal apropriada em conformidade com a lente objetiva.

A Figura 16 mostra como fica a montagem do microscópio, com os detalhes da fixação do sensor e da fixação do microscópio em uma base.

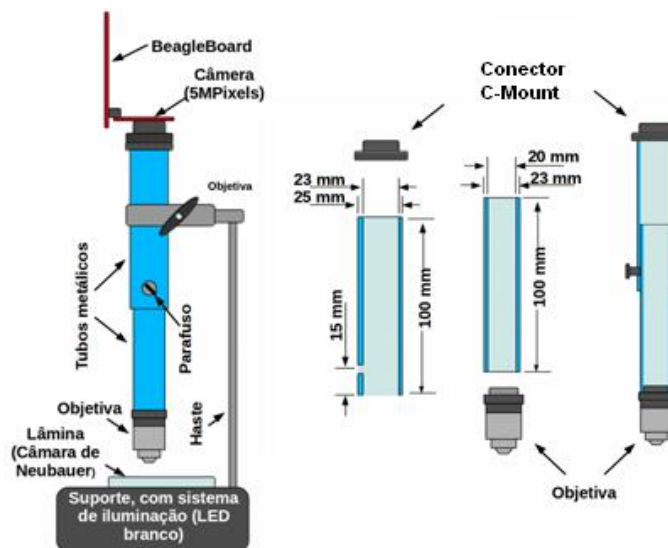


Figura 16. Diagrama completo do subsistema de captura da imagem. Fonte: Autoria própria.

3.2.1.2 Sensores

O módulo do sensor de imagem usado foi o LI-5M03 de 5 *Mpixels* da *Leopard Imaging*® (Figura 17), pois é compatível com a placa *BeagleBoard*®. Foi usado este módulo porque ele possui o conector *c-mount*, provendo um meio seguro de prender o sensor ao microscópio. Seguem as descrições do módulo ():

- Sensor: CMOS MT9P031 (Aptina®)
- resolução de 5 *Mpixels* (2592x1944 pixels);
- formato de saída RGB;
- este módulo não possui lente, apenas um conector *c-mount* para se colocar um conjunto de lentes ou para se adaptar a um instrumento como o microscópio.

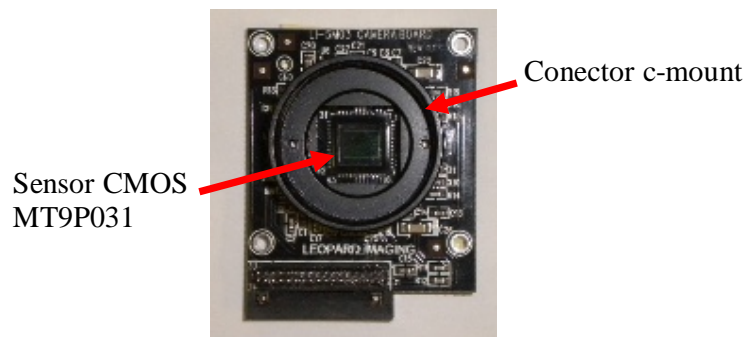


Figura 17. Módulo de imagem LI-5M03 da Leopard Imaging®. Fonte (LeopardImaging).

3.2.2 Arquitetura de processamento

3.2.2.1 Especificação do Hardware

A arquitetura de processamento foi baseada no hardware de plataforma aberta conhecido como *Beagleboard-xM* (*BeagleBoard* Org, U.S.A.) (Figura 18). Ela foi construída com base no processador DM3730CBP-1GHz (*Texas Instruments*, Dallas-TX, U.S.A.). Possui ainda memória RAM de 512 *Mbytes*, interface de vídeo HDMI, interface USB, interface serial RS232, interface para memória flash microSD (*SD Association*, CA, U.S.A.), interface de rede ethernet 10/100, interface para câmera de vídeo compatível com os módulos da *Leopard Imaging* (*Leopard Imaging* INC, CA, U.S.A.).

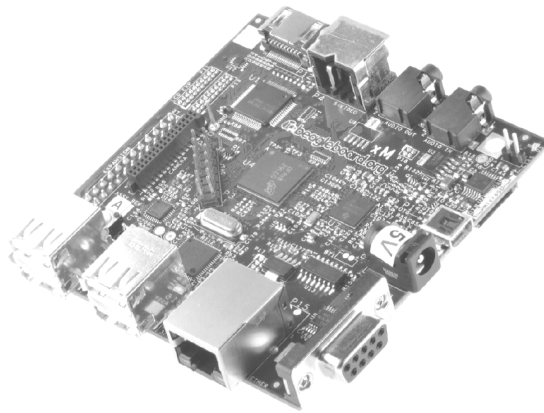


Figura 18. Placa BeagleBoard-xM. Fonte: modificado de COLEY, 2010.

Apesar de a *BeagleBoard* não ter sido projetada para ser usada como produto final, ela pode ser usada como base para o seu desenvolvimento e todas as informações do seu projeto são distribuídas livremente (COLEY, 2010).

Na Figura 19 temos o diagrama em blocos da *BeagleBoard-xM*:

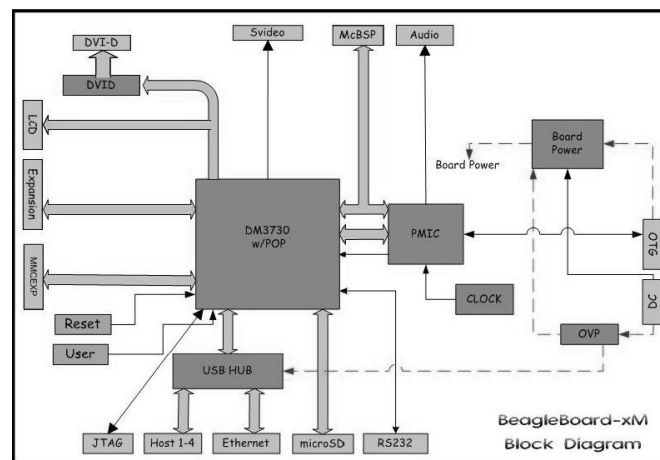


Figura 19. Diagrama em blocos da placa BeagleBoard-xM. Fonte: modificado de COLEY, 2010.

Processador

O processador usado na *BeagleBoard-xM* é o DM3730CBP, fabricado pela Texas Instruments (*Texas Instruments*, Dallas-TX, U.S.A.). É um processador de alto desempenho e baixo consumo destinado a aplicações multimídia. Este processador suporta sistemas operacionais, como Windows CE (Microsoft, Redmond – WA, U.S.A.), Linux, QNX (QNX, Ottawa – Ontário, Canadá) e outros (COLEY, 2010).

Na *BeagleBoard* foram utilizadas as seguintes funções do processador DM3730 (COLEY, 2010):

- Unidade de processamento baseado na arquitetura ARM Cortex-A8™;
- Interface de memória;
- Interface de *display* de 24 bits (RGB);
- Interface para cartões de memória SD/MMC;
- Interface USB e mini AB-USB;
- Interface de vídeo NTSC/PAL/S;
- Unidade de gerenciamento de energia;
- Interface serial;
- Interface I²C;
- Interface de áudio I²S (via McBSP2);
- Expansão McBSP1;
- Interface de depuração JTAG;

A Figura 20 apresenta o diagrama em blocos do processador.

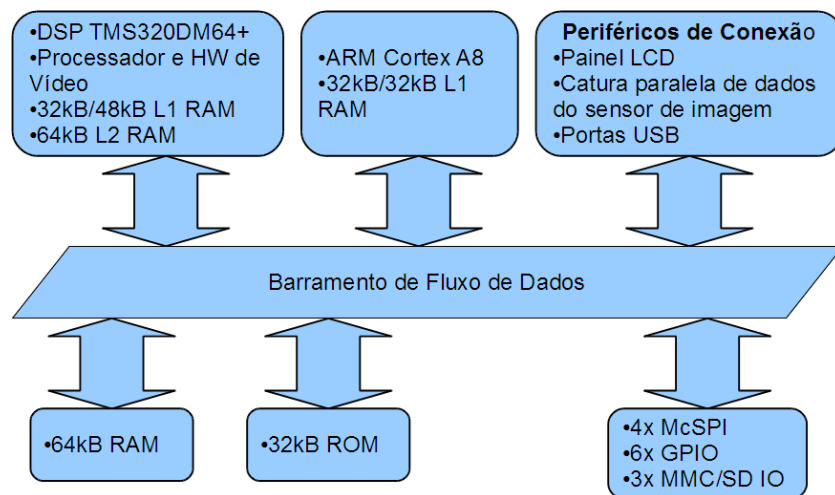


Figura 20. Diagrama em blocos simplificado do processador DM3730. Fonte: Autoria própria.

O processador DM3730CBP, possui um núcleo ARM Cortex-A8, um acelerador de áudio e vídeo (IVA2.2) baseado no processador DSP TMS320DMC64X+ e hardware para aceleração gráfica em 2D e 3D (COLEY, 2010).

Memória

A *BeagleBoard* possui uma memória DDR SDRAM de 4Gbits, ou seja 512 MBytes. Esta memória é montada junto ao processador numa tecnologia chamada POP (*Package-on-Package*). Desta forma, não existe acesso físico ao barramento de memória na placa. Na *BeagleBoard-xM* não existe outro tipo de memória além da SDRAM, mas é possível aumentar a capacidade de armazenamento através de dispositivos USB e cartões microSD.

O cartão microSD pode ser usado para armazenar dados, mas também é usado para armazenar o sistema operacional e todo o *software* que será executado pela *BeagleBoard*. Assim, ele tem um funcionamento semelhante a um disco rígido (HD) em um computador pessoal.

Portas USB 2.0 OTG e USB

A *BeagleBoard* possui uma porta USB OTG e quatro portas USB com conector tipo A com suporte a LS/FS/HS. Cada porta USB pode alimentar dispositivos de até 500mA se a placa for alimentada por uma fonte de pelo menos 3A (COLEY, 2010).

A porta USB OTG pode alimentar a placa e se comunicar com um computador pessoal. Porém, como uma porta USB de um computador pessoal fornece em torno de 500 mA por porta, um cabo USB Y, que possui dois conectores USB em paralelo deve ser usado para fornecer corrente suficiente para alimentar a placa (COLEY, 2010).

Interface DVI-D

A placa *BeagleBoard* possui um conector HDMI para conectar a um monitor LCD externo, porém somente a componente DVI-D é fornecida por este conector, as facilidades de áudio da interface *hdmi* também não estão disponíveis nesta interface. Todos os sinais desta interface são gerados a partir do próprio processador, através do CI TFP410. Este CI faz a interface entre o processador e o monitor externo (COLEY, 2010).

Interface da Câmera

A placa *BeagleBoard* possui um conector para módulos de câmera da Leopard Imaging (*Leopard Imaging INC, CA, U.S.A.*). Ela suporta módulos de câmera com resoluções VGA, 2MPixels, 3MPixels e 5MPixels. Para que o módulo da câmera funcione corretamente, é necessário instalar o driver de *software* apropriado para o respectivo módulo.

Esta interface usa o *hardware* nativo do processador, além de fornecer todas as alimentações necessárias para o módulo.

3.2.2.2 Sistema Operacional

A *BeagleBoard* suporta diversos sistemas operacionais de alto nível. Neste projeto, o sistema operacional usado foi o Linux, distribuição Angström.

A Angström é uma distribuição Linux reconfigurável e de grande portabilidade desenvolvida para dispositivos embarcados como PDAS, telefones celulares, placas de desenvolvimento como a *BeagleBoard* (*BeagleBoard Org*, U.S.A.) e *RaspBerry Pi* (*Rasperry Pi Foundation*, UK), etc. (ANGSTROM).

É uma distribuição Linux moderna com as mesmas características encontradas nas distribuições para computadores pessoais com grande capacidade. Entre estas características encontra-se, por exemplo, programas para gerenciamento de pacotes, com verificação de dependências e instalação pela rede (internet) e softwares para desenvolvimento como o compilador gcc (ANGSTROM).

3.2.2.3 Biblioteca OpenCV

OpenCv é uma biblioteca de visão computacional de código aberto, escrita em linguagem c e c++ e está disponível para diversas plataformas, como Linux, *Windows*, Mac OS X. Ela foi desenvolvida com foco na eficiência computacional e em aplicações de tempo real (BRADSKI, 2008).

A OpenCV possui mais de 500 funções para serem usadas nas mais diversas aplicações, como imagens médicas, segurança, inspeção de produtos, visão estéreo e robótica (BRADSKI, 2008).

3.3 ALGORITMO DE DETECÇÃO E CONTAGEM

3.3.1 Processamento Digital de Imagens

O ambiente de *software* consiste do Sistema Operacional e do programa de detecção e contagem das hemácias. O sistema operacional usado foi o Angstrom Linux, já apresentado em 3.2.2.2. O programa de detecção e contagem de hemácias foi desenvolvido em linguagem C com o uso da biblioteca de visão computacional apresentada em 3.2.2.3. Neste tópico serão apresentadas as principais funções de processamento de imagem usadas no programa.

3.3.1.1 Representação de uma Imagem Digital

Uma imagem é descrita em função da intensidade luminosa nas suas coordenadas espaciais x e y e pode ser representada como:

$$Img_1 = f_1(x, y) \quad 6$$

Onde x e y são as coordenadas do pixel;

f é o valor da intensidade luminosa (brilho) nestas coordenadas.

Em uma imagem digital, a função $f(x, y)$ é amostrada e quantizada. Pela amostragem espacial, a imagem passa a ser uma matriz de M por N pontos, denominados pixels (MARQUES Filho, 1999). Os valores de M e N definem a resolução espacial da imagem. Já a quantização converte o valor da intensidade luminosa em um valor inteiro entre 0 e $2^n - 1$, onde o valor de n determina a quantidade de níveis de intensidade da imagem (MARQUES Filho, 1999).

$$f(x, y) = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0,N-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & \dots & f(1,N-1) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ f(M-1,0) & f(M-1,1) & \dots & f(M-1,N-1) \end{bmatrix} \quad 7$$

Para $f(x, y) = 0$ tem-se um pixel preto e para $f(x, y) = 2^n - 1 = L$ tem-se um pixel branco. Para uma imagem em tons de cinza com 8 bits tem-se valores variando entre 0 e 255.

3.3.1.2 Inversão ou Complemento

Para se obter a imagem complementar (negativa) de uma imagem com L tons de cinza, basta realizar a subtração do valor do branco pelo valor do nível de cinza de cada pixel da imagem:

$$f_{neg}(x, y) = L - f(x, y) \quad 8$$

Que em termos práticos é equivalente a aplicar a operação lógica NOT no pixel:

$$f_{neg}(x, y) = NOT(f(x, y)) \quad 9$$

3.3.1.3 Conversão de cores:

Uma imagem colorida é formada por pixels compostos pelas três cores primárias, vermelho (R – *RED*), verde (G - *GREEN*) e azul (B – *BLUE*). Além disso, existem ainda três características que permitem distinguir uma cor da outra: o brilho, o matiz e a saturação. O brilho está relacionado com a intensidade luminosa, o matiz está relacionado com o comprimento de onda da radiação e a saturação está relacionada com a mistura do matiz original com a luz branca (MARQUES Filho, 1999).

Para realizar a transformação de uma imagem colorida em uma imagem em tons de cinza é comum utilizar o modelo YIQ desenvolvido para o sistema de televisão colorido NTSC com o objetivo de torná-lo compatível com o sistema preto e branco (MARQUES Filho, 1999). Neste modelo as três cores primárias são codificadas em uma componente de brilho ou luminância (Y) e duas componentes de cromaticidade (I e Q). A codificação é feita de acordo com o conjunto de equações 10, 11 e 12:

$$Y = 0.299 \cdot R + 0.587 \cdot G + 0.114 \cdot B \quad 10$$

$$I = 0.596 \cdot R - 0.275 \cdot G - 0.321 \cdot B \quad 11$$

$$Q = 0.212 \cdot R - 0.523 \cdot G + 0.311 \cdot B \quad 12$$

A componente de brilho (Y) contém toda a informação de intensidade da imagem, portanto ela é usada e as componentes de cromaticidade descartadas.

3.3.1.4 Limiarização

A operação de limiarização consiste em separar regiões de uma imagem. Normalmente as regiões são os objetos e o fundo (MARQUES Filho, 1999).

A limiarização consiste em testar o valor de cada pixel da imagem com um valor predeterminado, chamado de valor de limiar ou *threshold*, e redefinir o valor do pixel conforme o resultado desta comparação. A definição matemática da limiarização é dada pela equação 13

$$f_{lim}(x, y) = \begin{cases} 0, & \text{se } f(x, y) < T \\ L, & \text{se } f(x, y) \geq T \end{cases} \quad 13$$

onde: T é o valor de limiar para a imagem e L é o valor atribuído ao objeto (geralmente é o nível de branco)

Os valores de limiar (T) são, normalmente, obtidos do histograma da imagem. Podem ser obtidos empiricamente, através da análise visual do histograma, ou por meio de algoritmos que tentam buscar os pontos de mínimos locais no histograma para obter o valor de limiar.

3.3.1.5 Morfologia Matemática

A morfologia matemática consiste em estudar as estruturas geométricas das entidades presentes em uma imagem (MARQUES Filho, 1999). Ela é uma ferramenta para extrair informações da imagem úteis para representar e descrever regiões ou objetos, como detecção de borda, esqueletização, etc. A morfologia matemática está fundamentada na Teoria dos Conjuntos, onde um conjunto representa um objeto na imagem (GONZALES, 2001).

Sejam A e B dois conjuntos em Z_2 , composto respectivamente por $a = (a_1, a_2)$ e $b = (b_1, b_2)$.

Define-se translação de A por x como:

$$(A)_x = \{c | c = a + x, \quad \text{para } a \in A\} \quad 14$$

O complemento de A é definido como:

$$A^c = \{x | x \notin A\} \quad 15$$

A reflexão de A, denotada por \hat{A} , é definida como:

$$\hat{A} = \{x | x = -a, \quad \text{para } a \in A\} \quad 16$$

A diferença entre os conjuntos A e B, denotada por $A - B$, é definida como:

$$A - B = \{x | x \in A, x \notin B\} = A \cap B^c \quad 17$$

A Figura 21 exemplifica estas operações básicas da morfologia matemática.

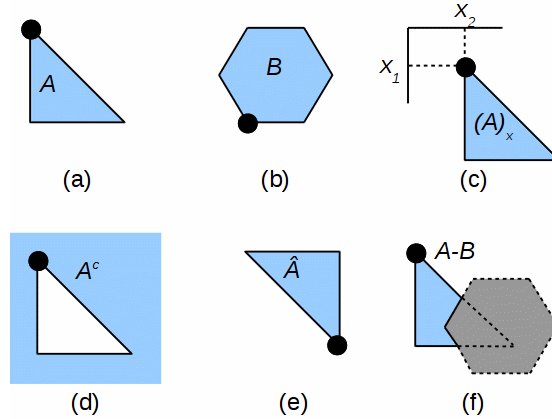


Figura 21. Operações básicas na teoria de conjuntos. Em (a) está representado o conjunto A, e em (b) está representado o conjunto B, em (c) a translação de A por x , em (d) o complemento de A, em (e) a reflexão de A e em (f) a diferença entre A e B. Fonte: Autoria própria.

As duas operações fundamentais em morfologia matemática são a Dilatação e a Erosão.

A operação de dilatação amplia o objeto, causando também o fechamento de lacunas na imagem.

Sejam A e B conjuntos no espaço Z^2 e seja \emptyset o conjunto vazio. A operação de dilatação de A por B, denotada por $A \oplus B$, é definida como (MARQUES Filho, 1999):

$$A \oplus B = \{x | (\hat{B})_x \cap A \neq \emptyset\} \quad 18$$

que consiste no conjunto de todos os elementos resultantes da interseção dos conjuntos A e $(\hat{B})_x$, onde $(\hat{B})_x$, chamado de elemento estruturante, é o conjunto B refletido e deslocado por x . Assim, a equação 10 pode ser reescrita como (MARQUES Filho, 1999):

$$A \oplus B = \{x | [(\hat{B})_x \cap A] \subseteq A\} \quad 19$$

A operação de erosão, por sua vez, causa um afinamento da imagem.

Sejam A e B conjuntos no espaço Z^2 e seja \emptyset o conjunto vazio. A operação de erosão de A por B, denotada por $A \ominus B$, é definida como (MARQUES Filho, 1999):

$$A \ominus B = \{x | (B)_x \subseteq A\} \quad 20$$

assim, a operação de erosão resulta no conjunto de todos os elementos x tais que B , transladado de x , está contido em A (MARQUES Filho, 1999).

A Figura 22 apresenta os efeitos da dilatação e da erosão de um elemento estruturante B sobre um conjunto A .

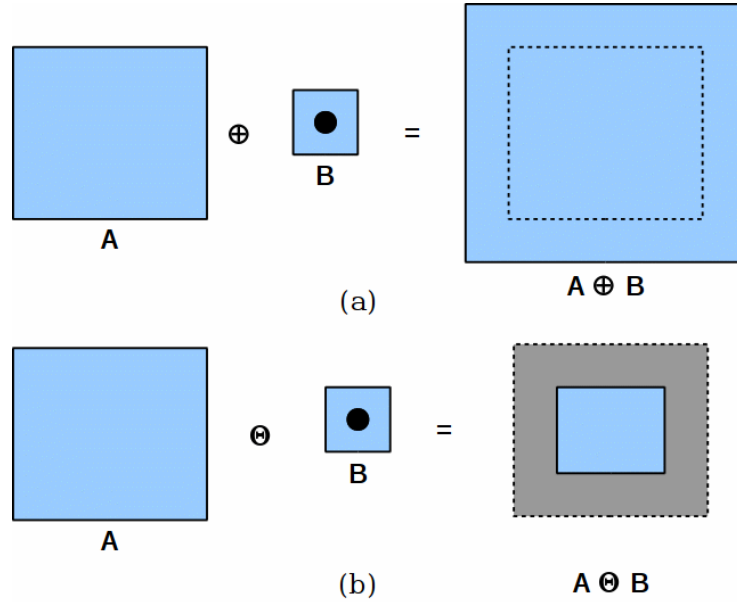


Figura 22. Exemplo das operações fundamentais da Morfologia Matemática, onde A é o objeto na imagem e B o elemento estruturante. Em (a) a operação de dilatação e em (b) a operação de erosão. Fonte: Autoria própria.

3.3.1.6 Etiquetagem

A operação de etiquetagem ou *labeling* consiste em percorrer toda a imagem e atribuir um valor único para cada conjunto de pixels conectados. Supondo, que em uma imagem binária $b(x,y)$, o fundo possua o valor f e os objetos possuam o valor o , e que l seja o valor do label atual (iniciando com $l = 1$), a operação de *labeling* pode ser especificada como :

$$g(x,y) = \begin{cases} f, & b(x,y) = f, \\ l, l(=l+1), & \forall \{i,j \in M_s\}, g(x-i, y-j) = f, \\ g_{\min}(x,y), & \text{outros,} \end{cases} \quad 21$$

para:

$$g_{\min}(x,y) = \min[\{g(x-i, y-j) | i,j \in M_s\}] \quad 22$$

onde: $(l=l+1)$ indica o incremento do label a cada interação;

M_s é a máscara da região de análise, menos o pixel que está sendo avaliado;

3.3.1.7 Blending

A operação de *blending* consiste em misturar duas imagens apresentando como resultado uma imagem que apresenta as duas imagens sobrepostas. A operação de *blending* é descrita matematicamente como:

$$g(x, y) = f_1(x, y) \cdot a_1 + f_2(x, y) \cdot a_2 \quad 23$$

Onde a_1 e a_2 são os pesos aplicados a cada pixel da imagem. É comum usar $a_2 \leq 1 - a_1$

O grau de visualização de cada imagem é dado pelo peso aplicado a cada imagem (a_1 e a_2). Na Figura 23 é apresentado um exemplo de *blending* com três valores diferentes dos pesos.

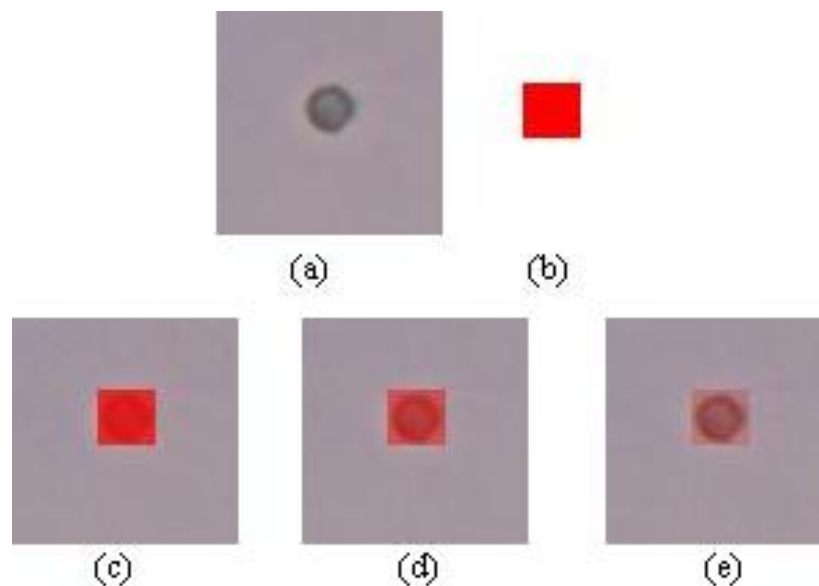


Figura 23. Exemplo da operação de *blending*. Imagens originais, em (a) imagem 1, em (b) imagem 2, em (c) a imagem 1 está com 25% e a imagem 2 está com 75%, em (d) as duas imagens estão com 50% e em (e) a imagem 1 está com 75% e a imagem 2 está com 25%. Fonte: Autoria própria.

3.3.2 Apresentação do Algoritmo Proposto

Os primeiros testes foram realizados usando um algoritmo implementado no *software* MATLAB[®]. Posteriormente o algoritmo foi portado para a plataforma RISC usando a linguagem C e a biblioteca de processamento de imagens OpenCV, da INTEL, onde foram incluídas algumas funções de interação com o usuário.

Inicialmente, este algoritmo faz o processamento inicial de duas imagens (*Img1* e *Img2*), localizando, contando e marcando em vermelho na imagem *Img1* as hemácias

encontradas. Após este processamento inicial, a imagem *Img1* é apresentada na tela do computador e o usuário pode agora interagir, marcando as hemácias não contadas ou desmarcando as falsas hemácias contadas pelo processamento inicial. Ao final a imagem *Img1* é armazenada para a documentação do processo.

Nos próximos tópicos são apresentados os detalhes do algoritmo.

3.3.2.1 Captura e Seleção da Região de Interesse

Inicialmente é realizada a captura de duas imagens da mesma amostra (Figura 24). A primeira imagem, *Img1*, é obtida com o ajuste do microscópio no foco, de maneira que as células sejam apresentadas bem nítidas. Neste foco as hemácias apresentam um aspecto escuro em um fundo mais claro. A segunda imagem, *Img2*, é obtida com a região de foco deslocada de 15 μm e nesta situação as células apresentam um interior mais claro e as bordas mais escuras e levemente borradas (KOVALHUK, et al., 2012). Isto foi feito para facilitar a identificação, pelo algoritmo, das células que se situam sobre as linhas do reticulado.

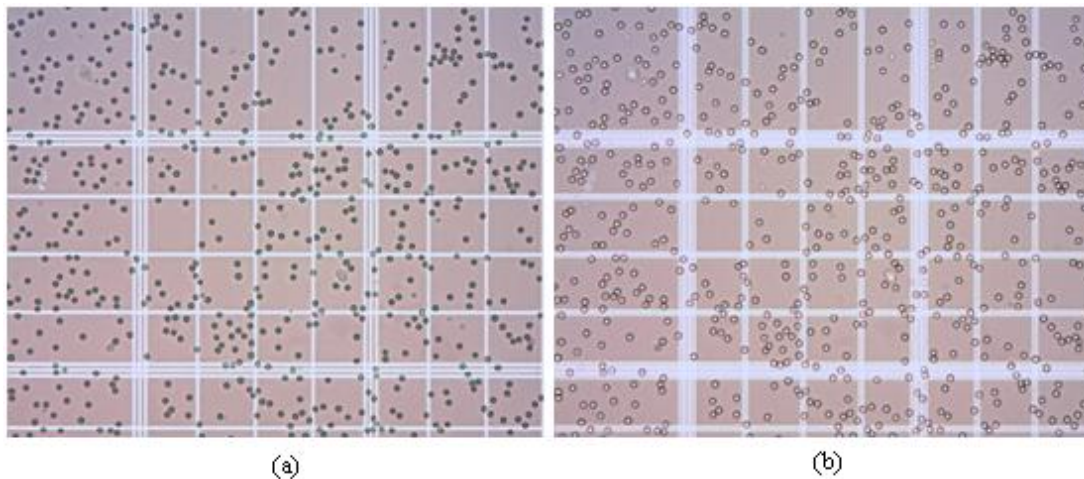


Figura 24. (a) Imagem *Img1*, capturada no foco. (b) Imagem *Img2*, capturada com um foco 15 micra acima da primeira imagem. Fonte: Autoria própria.

Uma copia da imagem *Img1* é armazenada para auxiliar na operação manual explicada adiante.

Estas imagens contêm uma região que abrange uma área maior que a região de interesse. Neste caso, a região de interesse é a região que compreende uma quadrícula de contagem (1A, 2A, 3A, 4A e 5A ou 1B, 2B, 3B e 4B na Figura 4b) onde serão contadas as hemácias segundo o método manual, já explicado no item 2.3.1. Portanto, após a captura das duas imagens, a região de interesse é selecionada através das

coordenadas do canto superior esquerdo e canto inferior direito. Este processo é especificado matematicamente pelas equações 24 e 25:

$$Iroi_1 = Img_1((i, j): (i + A, j + L)) \quad 24$$

$$Iroi_2 = Img_2((i, j): (i + A, j + L)) \quad 25$$

onde: $Iroi_1$ e $Iroi_2$ são as subimagens (região de interesse) das imagens Img_1 e Img_2 respectivamente;

i e j são as coordenada superior e esquerda, respectivamente, da região de interesse;

A e L são as dimensões (altura e largura respectivamente) da região de interesse;

A biblioteca OpenCV possui a função `cvSetImageROI` para realizar esta operação.

De acordo com o método (explicado no item 2.3.1), a região de interesse é obtida com as bordas esquerda e superior pelo lado de fora da quadrícula, deixando uma pequena margem e as bordas direita e inferior pelo lado de dentro da quadrícula. Por isso as imagens da Figura 25 apresentam as linhas laterais esquerda e superior da quadrícula e não apresentam as linhas laterais direita e inferior.

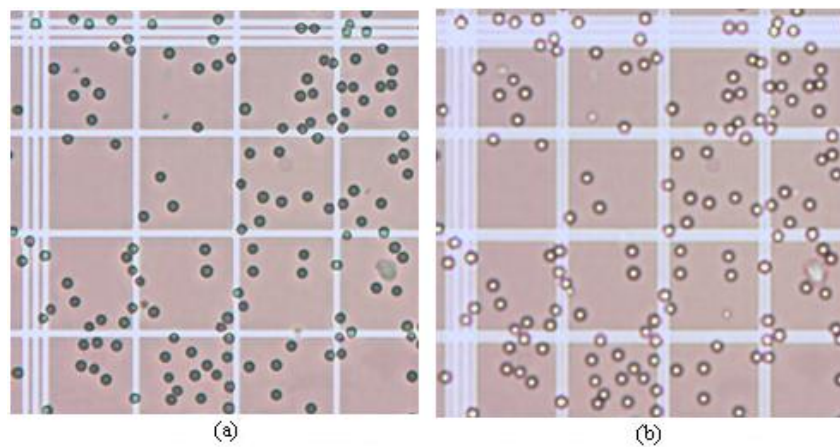


Figura 25. (a) $Iroi_1$, região de interesse da imagem Img_1 e (b) $Iroi_2$, região de interesse da imagem Img_2 . Fonte: Autoria própria.

A operação de seleção da região de interesse é feita pelo técnico, marcando o canto superior esquerdo e o canto inferior direito com o mouse. Esta região fica marcada em vermelho, como mostra a Figura 26.

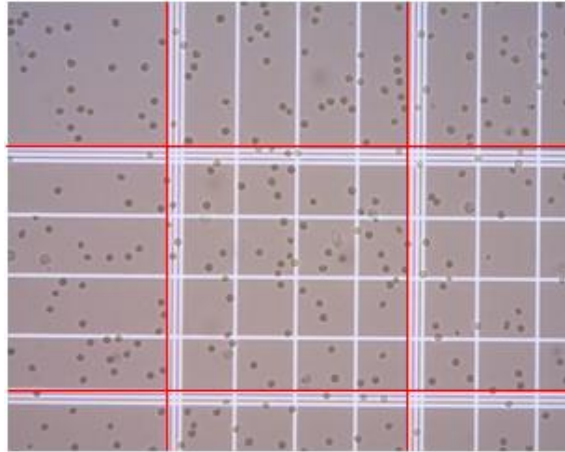


Figura 26. Imagem mostrando a seleção da região onde serão contadas as hemácias. Fonte: Autoria própria.

Se o técnico aprovar esta seleção, pode confirmá-la com um novo clique com o botão esquerdo do mouse em qualquer ponto da imagem. Se o técnico achar que a seleção ficou errada, pode rejeitar a seleção clicando com o botão direito do mouse. A seleção é feita apenas na Img_1 e as mesmas coordenadas são usadas para selecionar a região de interesse da Img_2

3.3.2.2 Pré-processamento das Imagens

Nesta etapa são executadas algumas operações nas imagens com a finalidade de facilitar a identificação das hemácias pelo algoritmo de limiarização.

Assim, após a seleção da região de interesse, a operação morfológica de dilatação é aplicada à imagem $Iroi_2$. O elemento estruturante usado possui uma forma elipsoidal de 5x5 pixel (Figura 27).

$$Idil_2 = Iroi_2 \oplus EE \quad 26$$

onde: EE é o elemento estruturante;

\oplus é o operador morfológico de dilatação.

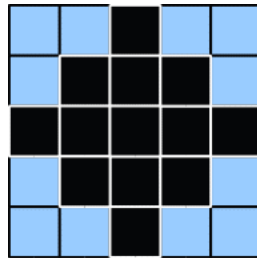


Figura 27. Elemento Estruturante. Fonte: Autoria própria

A Figura 28 apresenta a imagem $Iroi_2$ após a operação de dilatação.

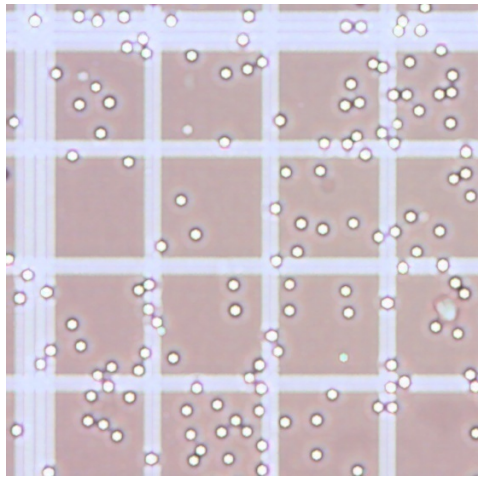


Figura 28. Imagem $Iroi_2$, após a operação de dilatação. Fonte: Autoria própria

Posteriormente à operação morfológica de dilatação, com o objetivo de realizar a limiarização, para separar as células do fundo, as imagens coloridas são transformadas em imagens em tons de cinza, usando o modelo YIQ. Para isto usa-se a função do OpenCV `cvCvtColor()`.

A Figura 29 mostra as duas imagens em tons de cinza, obtidas usando a função `cvCvtColor()`.

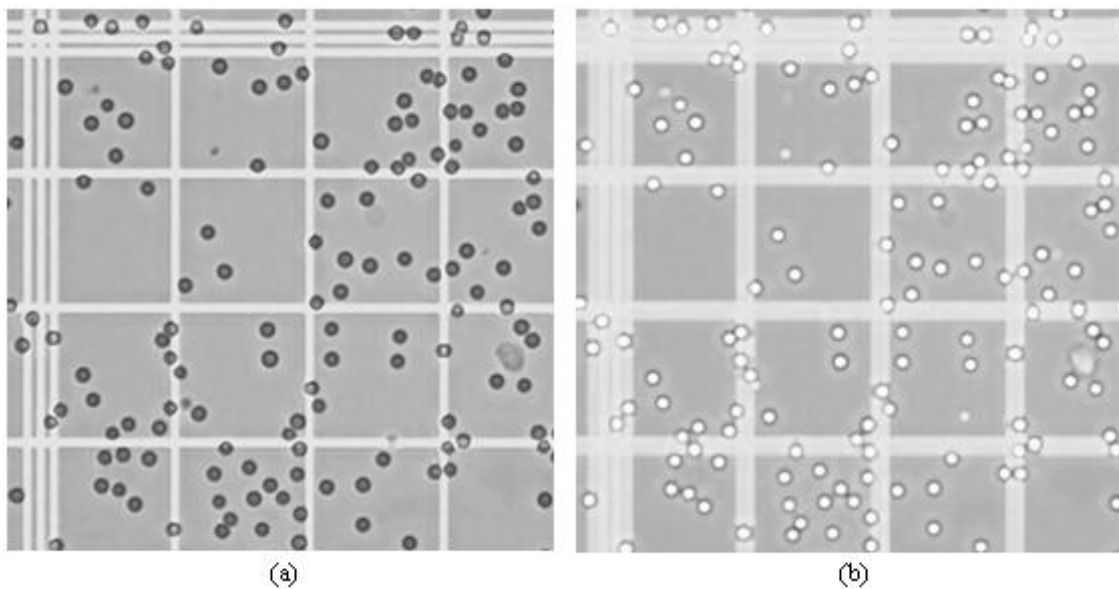


Figura 29. (a) Ibw_1 , imagem em tons de cinza da região de interesse da imagem Img_1 , (b) Ibw_2 , imagem em tons de cinza da região de interesse da imagem Img_2 . Fonte: Autoria própria.

3.3.2.3 Limiarização

A operação de limiarização é aplicada às duas imagens, com valores de limiar diferentes. A Figura 30 apresenta as duas imagens já binarizadas.

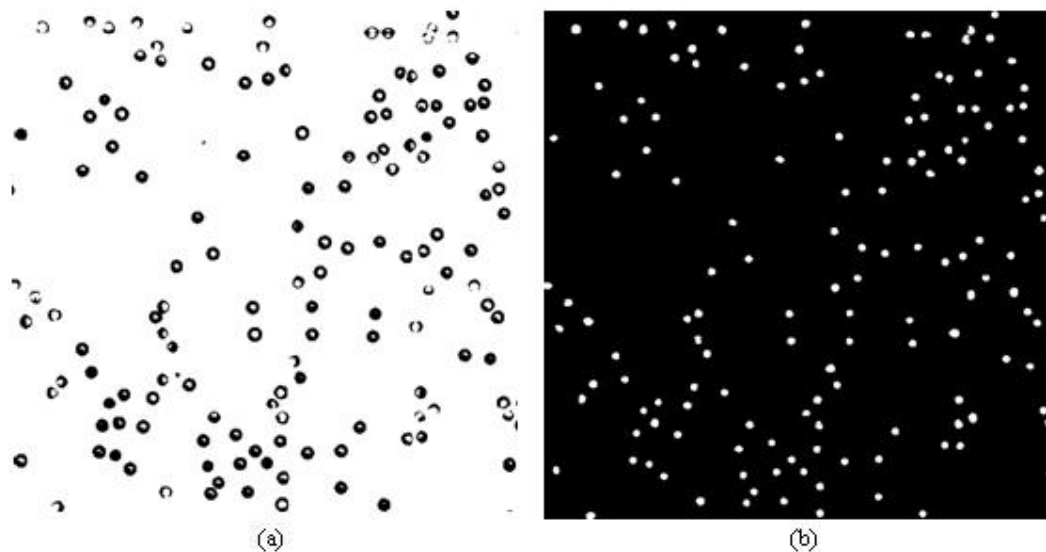


Figura 30. As imagens Ibw_1 e Ibw_2 após serem limiarizadas. Devido ao processo de aquisição a primeira apresenta os objetos em preto e o fundo branco e a segunda apresenta objetos em branco com fundo preto. Fonte: Autoria própria.

Observando-se a Figura 30a, pode-se verificar que a imagem Ibw_1 apresenta os objetos em preto com um fundo em branco e a imagem Ibw_2 da Figura 30b o contrário. Isto acontece, pois no processo de aquisição a primeira imagem foi adquirida no foco, capturando as hemácias com tonalidades mais escuras em um fundo mais claro. Já a segunda imagem, adquirida com um foco 15 μm acima da primeira, captura as hemácias com uma tonalidade mais clara em um fundo mais escuro.

Para que o processamento das duas imagens possa ser feito usando os mesmos algoritmos, a imagem Ibw_1 foi complementada, ou seja, tornada negativa, ficando com os objetos mais claros que o fundo. Isto é feito aplicando-se a operação lógica de negação (NOT) em cada pixel da imagem, através da função $cvNot()$ da biblioteca OpenCV. A Figura 31 mostra a imagem negativa:

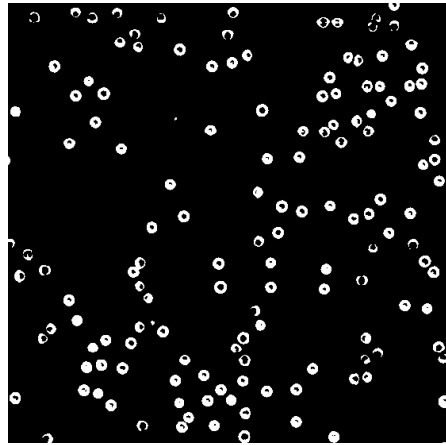


Figura 31. Imagem Ibw_1 complementada para que possam ser usados os mesmos algoritmos que para a imagem Ibw_2 . Fonte: Autoria própria.

3.3.2.4 Labeling

Com as imagens limiarizadas é feita a operação de etiquetagem (*labeling*), que no MATLAB é feita com a função *regionprops()* e na versão em C, para a plataforma BeagleBoard, foi implementada pelo próprio autor. A função *regionprops()*, além de fazer a etiquetagem, também calcula outros parâmetros com a área de cada objeto (hemácias), o seu centróide, perímetro, orientação, etc. Na versão em C, foi implementada apenas o cálculo da área e o do centróide de cada objeto etiquetado. Estes valores são armazenados em um vetor para uso em outras funções do algoritmo

O cálculo da área de cada célula é realizado contando-se a quantidade de pixels de cada objeto identificado pelo algoritmo de *labeling*. Para se calcular a área de um pixel, foi usada como referência a distância entre linhas internas da quadrícula Figura 32.

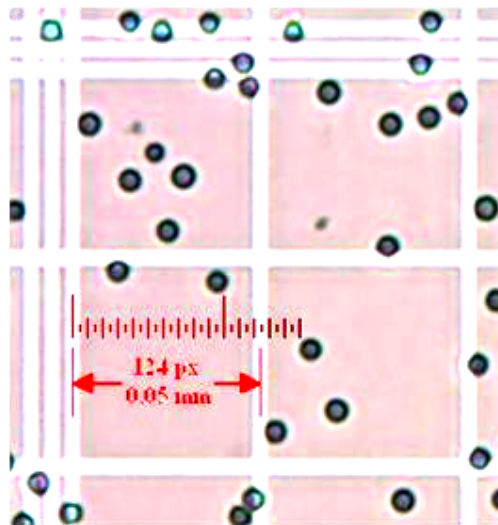


Figura 32. Região da imagem usada para cálculo da área de um pixel. Fonte: Autoria própria.

Sabendo-se que esta distância é de 0,05mm, conforme explicado no item 3.1 e mostrado na Figura 4b e que neste espaço possui 124 pixels como mostra a Figura 32, a largura do pixel será de 403 nm:

$$l_{px} = \frac{\text{dist. entre duas linhas}}{\text{quant. de pixels entre duas linhas}} = \frac{0,05mm}{124} = 403nm \quad 27$$

Portanto a área do pixel será de 16,259 μm^2 :

$$A_{px} = l_{px}^2 = (403)^2 = 16,259\mu\text{m}^2 \quad 28$$

O centroide (centro de massa) de cada célula é calculado pelas equações 29 e 30 a seguir:

$$C_X = \frac{\sum_i x_i}{A} \quad 29$$

$$C_Y = \frac{\sum_i y_i}{A} \quad 30$$

Usando a informação da área de cada célula é realizada uma filtragem dos elementos que, por suas características, não são hemácias. Esta filtragem é feita ordenando-se todos os objetos de acordo com a sua área e selecionando o objeto que se encontra no meio da lista (mediana) como referência. Os objetos com área fora da faixa entre 0,5 e 1,5 da referência são descartados, não sendo considerados como células válidas. Este valor de $\pm 50\%$ foi escolhido empiricamente, através de análise visual, de modo a classificar um maior número de células.

As células com área entre 0,5 e 1,5 da referência são então marcadas na imagem Img_I para indicar visualmente ao operador como células válidas. A marcação é feita colocando-se um pequeno quadrado vermelho de 20 por 20 pixels cujo centro é a coordenada do centróide calculado pelo algoritmo. A operação de *blending* é usada para adicionar o quadrado vermelho. Assim, a célula continua visível, mas com a marcação em vermelho de que foi identificada. A operação de *blending* é feita pela função *cvAddWeighted()* da biblioteca OpenCV.

A partir deste ponto, o algoritmo permite a interação do operador para selecionar as células que não foram marcadas no processo automático (falsos negativos) e desmarcar os objetos que não são considerados células válidas, mas foram identificadas pelo processo automático (falsos positivos).

Para marcar as células que não foram detectadas (falsos negativos) pelo algoritmo,

o operador seleciona a região da imagem sobre a célula acionando o botão esquerdo do *mouse*. O programa captura as coordenadas desta região e marca com um pequeno quadrado vermelho usando a operação de *blending*, como foi feito no processo automático.

Para desmarcar as células identificadas erroneamente pelo algoritmo (falsos positivos), o operador seleciona a região da imagem com esta célula marcada em vermelho acionando o botão esquerdo do mouse. O programa verifica se nestas coordenadas existe a marcação em vermelho e assim copia uma região de 24 por 24 pixels da imagem original (armazenada no início do programa) para a imagem *Img₁*, desmarcando assim a falsa hemácia.

No final, a imagem *Img₁* é armazenada com as hemácias válidas (obtidas pelo processo automático e corrigidas pelo operador) marcadas com um tom de vermelho e uma referência em texto com o total de células encontradas e a quantidade de falsos positivos e falsos negativos no canto superior esquerdo da imagem (Figura 33).

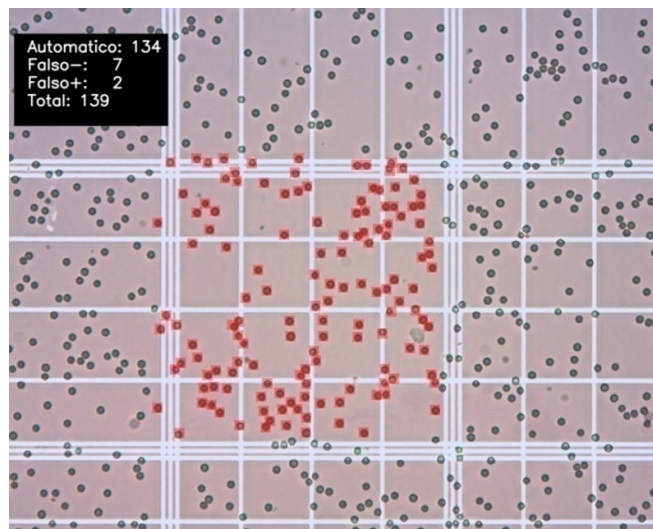


Figura 33: Imagem contendo os resultados da contagem: quantidade contabilizada pelo *software* (Automático), falsos negativos, falsos positivos e totais. Fonte: Autoria própria.

3.4 CONSIDERAÇÕES

Um sistema de contagem de células vermelhas foi desenvolvido e testado. Este sistema é composto de uma unidade óptica, em *hardware* e *software* para contagem de hemácias. No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos por este sistema, tanto da unidade óptica quanto do sistema.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na elaboração deste trabalho são mostrados neste capítulo. São apresentados os resultados obtidos pelo sistema óptico desenvolvido, mostrando o microscópio desenvolvido, o sistema montado e algumas imagens obtidas com este equipamento. Em seguida são mostrados os resultados obtidos pelo algoritmo de aquisição, reconhecimento e contagem das células vermelhas de sangue de cães e cavalos.

4.1 UNIDADE ÓPTICA

A foto do protótipo montado pode ser visualizada na Figura 34, a Figura 35 mostra os detalhes do microscópio, da placa BeagleBoard acoplada ao microscópio e a Figura 36 mostra uma amostra da câmara de Neubauer capturada com este microscópio.

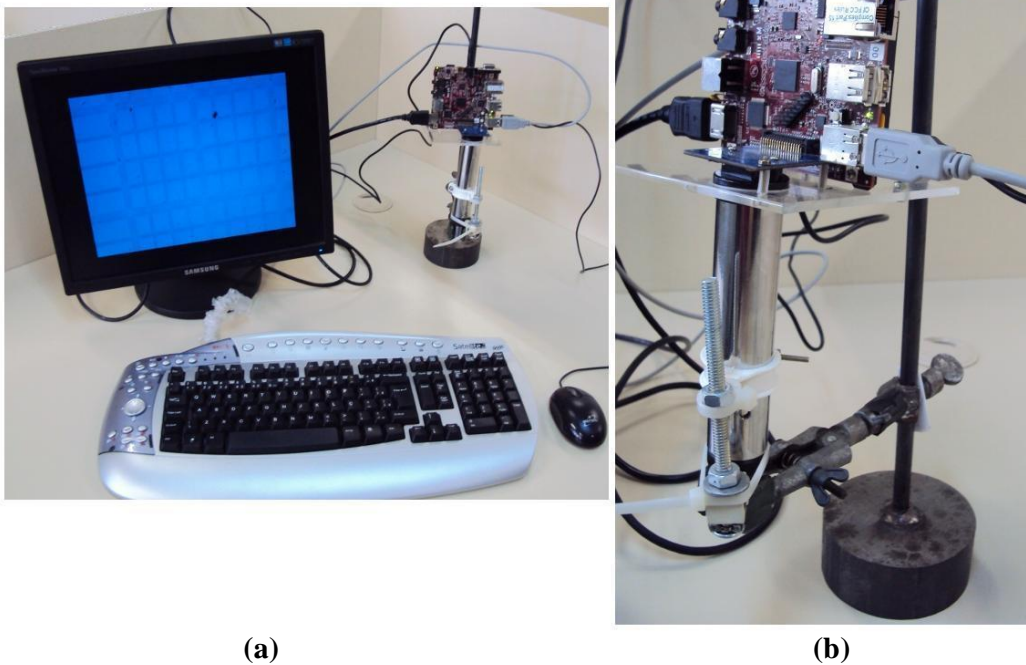
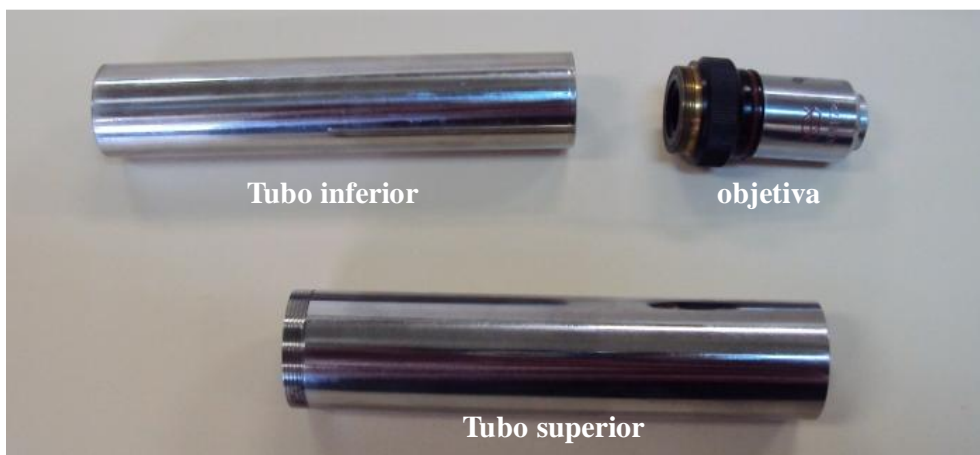


Figura 34. Foto do sistema montado. Em (a) o sistema completo e em (b) Detalhe do microscópio acoplado a BeagleBoard. Fonte: Autoria própria.



(a)



(b)

Figura 35. Fotos mostrando os componentes do microscópio. Em (a) conjunto montado e em (b) componentes separados. Fonte: Autoria própria.

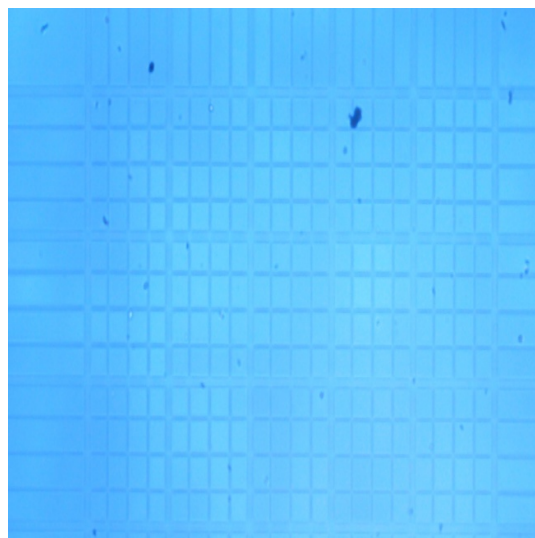


Figura 36. Câmara de Neubauer obtida com o microscópio proposto. Fonte: Autoria própria.

4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS

Devido a dificuldade de se obter amostras de sangue de animais silvestres, este trabalho foi validado com amostras de sangue de cães e cavalos obtidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu. Um conjunto de 67 amostras de sangue, sendo 62 de cães e 5 de cavalos (MAURICIO, et al., 2012), foi utilizado para realizar os testes do programa, que foi executado na plataforma RISC, a placa BeagleBoard. Cada amostra continha 9 imagens, das 9 quadrículas analisadas marcadas em azul e vermelho na Figura 4b. Para cada imagem analisada foram obtidos os valores da contagem automática, valor total depois do ajuste manual e os valores de falsos positivos (marcados pelo processo automático e desmarcados pelo operador) e falsos negativos (não foram marcados pelo processo automático e foram marcados pelo operador). Nestes procedimentos de teste foram utilizados os mesmos valores de limiar e das coordenadas de seleção da região de interesse do algoritmo executado em um computador pessoal usando o Matlab, como descrito em (MAURICIO, et al., 2012). Isto foi feito para se obter parâmetros de comparação da exatidão dos resultados obtidos usando a plataforma RISC.

Estes resultados foram apresentados com o objetivo de mostrar os parâmetros de comparação usados no algoritmo de referência para o proposto neste trabalho. A partir deste ponto serão mostrados os resultados obtidos neste trabalho e sua comparação com os resultados obtidos por (MAURICIO, et al., 2012).

Como em (MAURICIO, et al., 2012) foi mostrado que os resultados obtidos com o auxílio do computador são viáveis, comparando-se estes resultados com os obtidos neste trabalho mostra-se que também são viáveis.

A Figura 37 mostra os resultados obtidos nas contagem das células vermelhas para as regiões 1A a 5A. Estes valores obtidos através da equação (3).

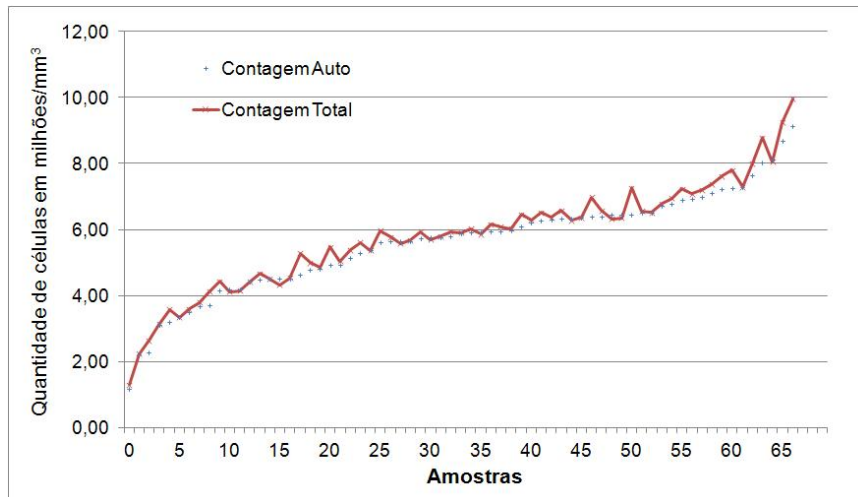


Figura 37. Contagem de células vermelhas estimadas a partir da contagem de células nas quadrículas 1A a 5A. Fonte: Autoria própria.

A Figura 38 mostra os resultados obtidos para a contagem das células vermelhas nas quadrículas 1B a 4B, usando a equação (4).

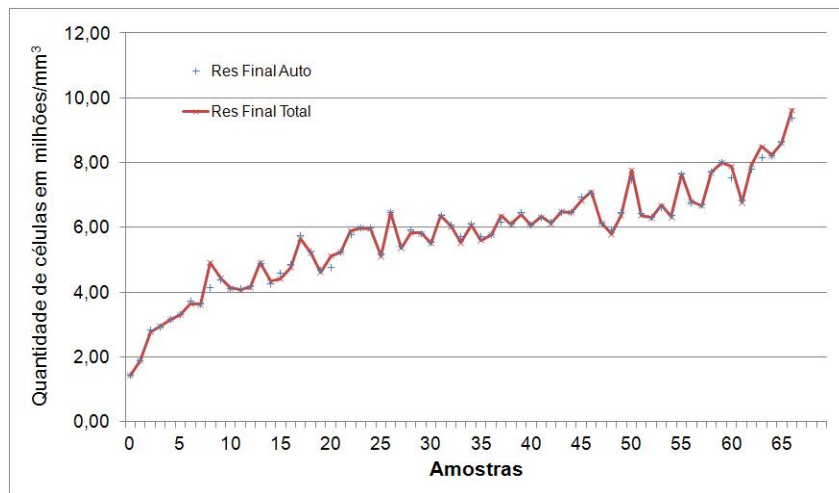


Figura 38. Contagem de células vermelhas estimadas a partir da contagem de células nas quadrículas 1B a 4B. Fonte: Autoria própria.

Nas figuras 37 e 38 são comparados os resultados obtidos na primeira parte do algoritmo, ou seja, na fase automática, e os resultados finais, após a correção efetuada pelo operador. Na Tabela 2 são apresentados os valores do erro médio e do desvio padrão para as regiões 1A a 5A e 1B a 4B na fase automática do algoritmo.

Tabela 2. Erro médio e desvio padrão da contagem realizada nas regiões 1A a 5A e 1B a 4B.

| Região | Média | Desvio Padrão |
|---------|-------|---------------|
| 1A a 5A | 3,51% | 0,035 |
| 1B a 4B | 1,51% | 0,022 |

A Tabela 3 apresenta a correlação entre os resultados do algoritmo de referência e os resultados obtidos por este sistema para as regiões 1A a 5A e 1B a 4B:

Tabela 3. Correlação entre os resultados do algoritmo de referência e os resultados obtidos pelo sistema proposto.

| Região 1A a 5A | Região 1B a 4B |
|----------------|----------------|
| 0,994 | 0,999 |

A região composta pelas quadrículas 1A a 5A apresentam uma correlação menor que a região composta pelas quadrículas 1B a 4B devido às linhas de referência internas das quadrículas 1A a 5A.

A Figura 39 apresenta os erros de contagem do processo automático e que foram corrigidos pelo operador, ou seja, apresenta os falsos negativos (células não contadas pelo processo automático) e falsos positivos (objetos que não eram células mas foram contadas pelo processo automático). Estes resultados são referentes as quadrículas 1A a 5A.

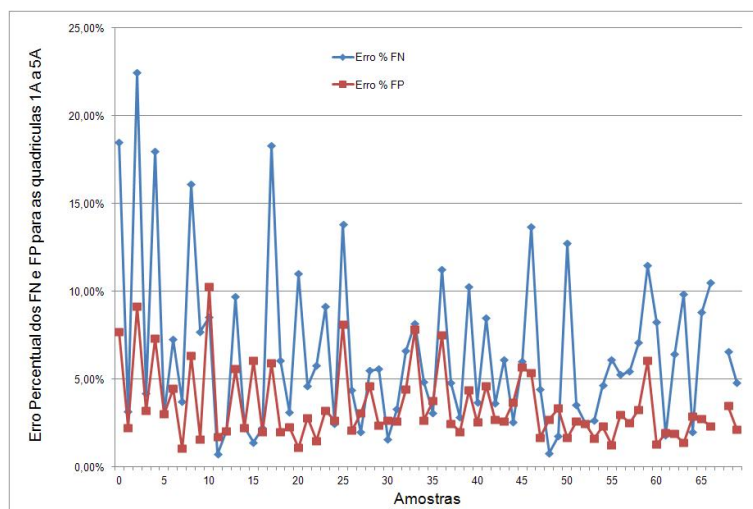


Figura 39. Erros de contagem do processo automático e corrigidos pelo operador (falsos negativos em azul e falsos positivos em vermelho) para as quadrículas 1A a 5A. Fonte: Autoria própria.

Os erros devido aos falsos negativos foram, em média, de 6,41% com desvio padrão de 0,048 e os erros devido aos falsos positivos foram, em média, de 3,39% com desvio padrão de 0,021. Para estas quadrículas os erros devidos aos falsos negativos são, em sua maioria, por causa das linhas de referência do reticulado de Neubauer.

A Figura 40 apresenta os erros de contagem, os falsos negativos e falsos positivos para as quadrículas 1B a 4B. Para estas quadrículas os erros médios foram de 1,88% para os falsos negativos, com desvio padrão de 0,025 e de 1,82% para os falsos positivos, com desvio padrão de 0,014. Como para as quadrículas 1B a 4B não existem linhas de referência centrais (apenas as linhas delimitadoras das quadrículas) os erros foram menores. Observa-se que neste caso, os erros devidos aos falsos negativos praticamente anulam os erros devidos aos falsos positivos.

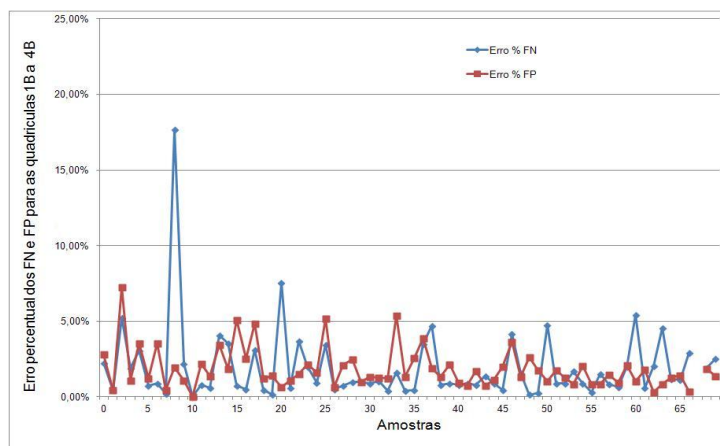


Figura 40. Erros de contagem do processo automático e corrigidos pelo operador (falsos negativos em azul e falsos positivos em vermelho) para as quadrículas 1B a 4B. Fonte: Autoria própria.

Além dos resultados de exatidão, foram obtidos valores de tempo de execução da contagem, sendo obtidos o tempo gasto pelo programa para realizar a contagem automática e o tempo gasto para fazer as correções de contagem pelo operador. Estes resultados foram obtidos para o programa sendo executado no sistema RISC proposto e também para o programa sendo executado em um notebook com processador Athlon 64x2 Dual Core (Advanced Micro Devices, CA, U.S.A.), 1,9 GHz, memória L2 de 2x 256kB e memória RAM 2GB). Para este teste foram usadas apenas 5 amostras, das 67 disponíveis. A comparação entre o tempo de execução na plataforma RISC e no notebook pode ser visualizada na tabela 4.

Em média obteve-se um tempo médio de 4,36 e 16,48 segundos com desvio padrão de 5,77 e 1,54 segundos para a parte de contagem automática de células na

imagem quando o mesmo é realizado em um computador pessoal e na plataforma proposta, respectivamente.

4.3 DISCUSSÃO

As figuras 39 e 40 apresentam resultados com erros médios de 3,51% e desvio padrão de 0,035 para as quadrículas 1A a 5A e 1,51% com desvio padrão de 0,022 para as quadrículas 1B a 4B. Porém, depois de uma segunda análise, verificou-se que deveria haver uma correção das marcações das células quanto aos falsos negativos e falsos positivos para se obter uma contagem mais precisa e para que as imagens sejam armazenadas com as marcações corretas. Assim observa-se, na Figura 39, que podem ocorrer erros isolados de falsos negativos maiores que 15% e erros de falsos positivos maiores que 5% para as quadrículas 1A a 5A. Desta maneira, em alguns casos pode ser necessária uma correção de até 20% das células em algumas amostras. De forma geral, os erros considerando devidos aos falsos negativos foram de 6,41% na média e devido aos falsos positivos foram de 3,39%. Para as quadrículas 1B a 4B, sem as linhas de referência internas, os erro devido aos falsos negativos foram, em média, de 1,88% e de 1,82% para os falsos positivos. Para estas quadrículas a correção necessária seria de 3,70% das células. Assim, embora as linhas de referência internas auxiliem na contagem manual pelo técnico, elas interferem negativamente na contagem automática realizada pelo computador.

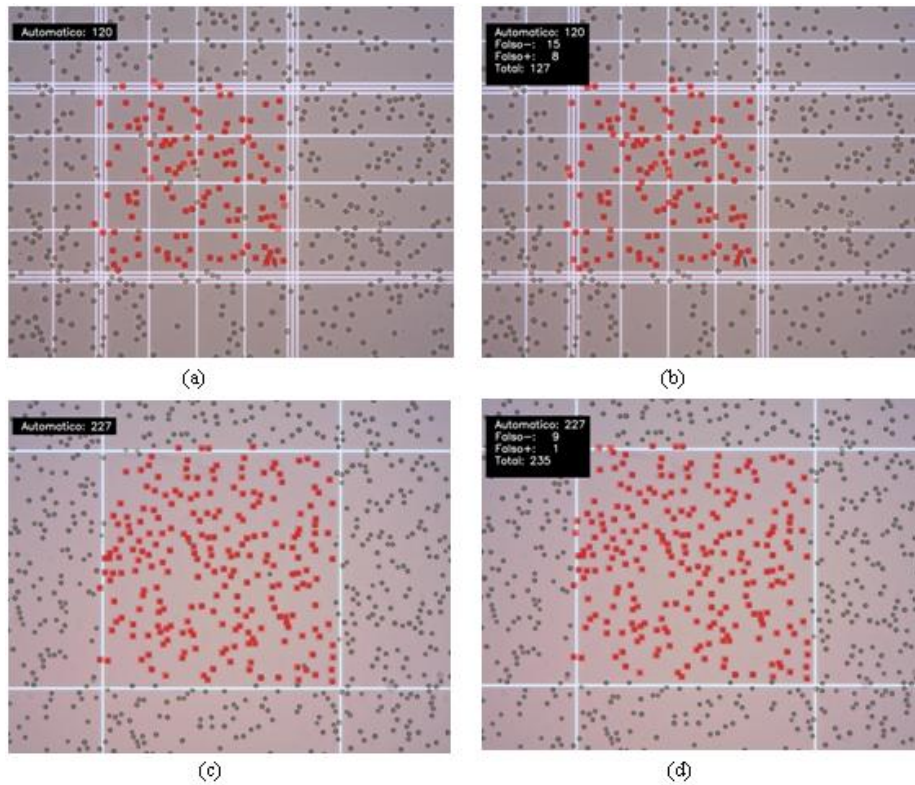


Figura 41. Contagem automática (coluna da esquerda) e corrigida (coluna da direita) consideradas as quadriculas 1A a 5A para as figuras (a) e (b) e as quadriculas 1B a 4B para as figuras (c) e (d).

Apesar da necessidade de correção manual, somente os resultados da contagem automática já são clinicamente úteis, pois os erros de contagem, mesmo se não corrigidos são em média menores que aqueles reportados para a variação entre a contagem de diversos contadores experientes utilizando o método tradicional de contagem visual.

Uma vez que o sistema possui uma interface gráfica que permite visualizar as amostras e permitir uma correção da contagem automática com a marcação das células de maneira a identificar o que já foi contabilizado do que ainda falta ser contabilizado, o erro de contagem é minimizado. Ainda é possível manter as amostras armazenadas permitindo que estas possam ser verificadas posteriormente em caso de dúvidas sem que seja necessário o preparo de uma nova lâmina.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou o projeto de um sistema para contagem semi-automática de células vermelhas de sangue de animais de várias espécies. O sistema é capaz de realizar a aquisição, contagem das hemácias e armazenamento das imagens para documentação. As amostras de sangue preparadas em uma câmara de Neubauer, seguindo mesmos os protocolos para a contagem manual aplicados em laboratório. A aquisição das imagens pode ser feita usando-se um microscópio típico de uso em laboratórios, que contenham o terceiro tubo para acoplar uma câmera, mas também foi construído um protótipo de microscópio mais simples e de menor custo.

O sistema foi construído baseado em uma plataforma de desenvolvimento que utiliza um processador RISC e que suporta diversos sistemas operacionais. Esta plataforma chama-se BeagleBoard e possui uma licença livre, permitindo que seja replicada ou mesmo alterada. O sistema operacional utilizado foi a distribuição Angstrom Linux, com uma licença livre. Para implementar o algoritmo de aquisição, contagem e armazenamento das células, foi utilizada uma biblioteca de visão computacional de código aberto, chamada OpenCV. A opção por utilizar licenças livres permite obter um sistema com custos reduzidos, uma vez que não é necessário pagar pelo seu direito de uso.

O *software* de contagem das células realiza a contagem automática da maioria das células, apresentando um erro menor que 3,51% e permite que o operador possa corrigir a contagem marcando as células não identificadas automaticamente, chamadas de falsos negativos e desmarcar as células identificadas de maneira errada, chamadas de falsos positivos. Após a correção da contagem a imagem da amostra contendo uma etiqueta com os resultados da contagem automática, da contagem corrigida e a quantidade de falsos positivos e falsos negativos é armazenada no cartão microSD.

O sistema apresenta um grande potencial de ser construído com baixo custo, reduzir significativamente o trabalho de contagem pelo bioquímico e melhorando a taxa de confiabilidade da contagem. Também apresenta o potencial de ser facilmente utilizado para a contagem de células vermelhas de diversas espécies.

5.2 TRABALHOS FUTUROS

Dentro de um hemograma completo, além da avaliação das hemácias, também é feito a contagem e a análise de outros elementos figurados do sangue. Esse método e aparelho podem ser adaptados para a contagem de células brancas, as quais aparecem em número bem inferior comparada às células vermelhas, ou seja, entre 5.000 e 10.000 leucócitos por milímetro cúbico de sangue. Neste caso, uma menor diluição da amostra de sangue é necessária para permitir a visualização de mais células brancas dentro da câmara e permitir melhor estimativa de valores. Essa nova etapa do projeto terá como desafio a caracterização morfológica das células brancas que apresentam maior variabilidade, comparado com as células vermelhas.

O aumento das células brancas caracterizam processos inflamatórios, doenças infecciosas e danos aos tecidos. Por outro lado, a diminuição das células brancas indica insuficiência da medula óssea, doenças hepáticas e a presença de substâncias tóxicas no organismo (GUIMARÃES, 1978).

REFERÊNCIAS

- ANGSTROM.** Angstrom Manual. GoWiki. Disponível em: <<http://www.linuxtogo.org/gowiki/AngstromManual>>. Acessado em 29 de julho de 2012.
- BECKER,** Martina. A Comparative Study of Seven In-House and Two Laboratory Hematology Instruments. s.l. : VVB LAUFERSWEILER VERLAG, 2007.
- BRADSKI,** Gary e **KAEHLER,** Adrian. Learning OpenCV. Sebastopol : O'Reilly Media Inc., 2008.
- BROWN,** M. e **WITTNER,** C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. August. 2000. pp. 1221-1229. Vol. 46. 8.
- COLEY,** Gerald. BeagleBoard-xM System Reference Manual. San Francisco - CA : Creative Commons, 2010.
- COULTER,** W. H. Means for counting particles suspended in a fluid. 2,656,508 U. S. A., 20 de October de 1953.
- FISCHER,** A. Laboratório: análises clínicas. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1948.
- GARCIA-NAVARRO,** Carlos Eugenio Kantek e **PACHALY,** Jose Ricardo. Manual de hematologia veterinária. São Paulo : Varela, 1994.
- GENOVESE,** W. J. Exames complementares na clínica odontológica. Uberaba, MG : Peirópolis, 1996.
- GIVAN,** Alice Longobardi. Flow Citometry: First Principles. s.l. : Wiley-Liss Inc., 2001.
- GONZALES,** Rafael C. e **WOODS,** Richard E. Digital Image Processing. Upper Saddle River, New Jersey : Prentice-Hall, 2001.
- GUIMARÃES,** R. X. e **GUERRA,** C. C. D. C. clínica e Laboratório, Interpretação Clínica das Provas Laboratoriais. São Paulo : Sarvier, 1978.
- HENNESSY,** M. Buckley, T. C. Leadon, D. P. Scott, C. S. Automated analysis of blood samples from thoroughbred horses with the Abbott DYN 3500 (CD3500) haematology analyser. 1998.
- IDEXX.** IDEXX LaserCyte Hematology Analyzer – Case Study Book and Technical Guide. Westbrook, Maine: IDEXX Laboratories, 2008
- KOVALHUK,** Gabriel, et al. Contador de Células Vermelhas de Sangue de Animais Sívestres Baseado em Plataforma com Processador RISC. Porto de Galinhas - PE : CBEB 2012, 2012.
- KRICKA,** L. J., **PHIL,** F. A. C. B.,. Fundamentos de Química Clínica. São Paulo : Elsevier Editora LTDA, 2008, 4.

LEOPARDIMAGING. Leopard Imaging. Leopard Imaging. Disponível em: <https://www.leopardimaging.com/Leopardboard_365.html>. Acessado em 15 de julho de 2012.

LIMA, A. O. Métodos de laboratório aplicados a clínica: técnica de interpretação. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1985.

MARQUES Filho, Ogê e VIEIRA Neto, Hugo. Processamento Digital de Imagens. Rio de Janeiro : Brasport Livros e Multimídia, 1999.

MAURICIO, C. R. M., SCHNEIDER, F. K. e SANTOS, L. C. Evaluation of an image-based red blood cell counter for animals blood. s.l. : Submitted to Veterinary Clinical Pathology, 2012.

MOLDAVAN, A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. 1934. pp. 188-189. Vol. 80.

MOURA, R. de A. Técnicas de Laboratório 3ª Edição. Rio de Janeiro : Livraria Atheneu, 1987.

MURRAY, Patrick R., ROSENTHAL, Ken S., PFALLER, Michael A. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro : Elsevier, 2006.

ORMEROD, Michael G. Flow Cytometry - A Basic Introduction. 2008.

OXFORD SCIENCE. Oxford Science - Genesis. Oxford Science. Disponível em: <<http://www.oxfordsciencecenter.com/products.php>>. Acessado em 01 de agosto de 2012.

REAGAN, Willian J., ROVIRA, Armando R. Irizarry, DENICOLA, Dennis B. Veterinary Hematology: atlas of common domestic and non-domestic species. Ames Iowa : Wiley-Blackwell, 2008.

ANEXO – Artigo publicado no XXIII CBEB

CONTADOR DE CÉLULAS VERMELHAS DE SANGUE DE ANIMAIS SILVESTRES BASEADO EM PLATAFORMA COM PROCESSADOR RISC

G. Kovalhuk*, C. R. M. Mauricio**, H. R. Gamba* e F. K. Schneider*

*CPGEI/UTFPR, Curitiba, Brasil

**CECE/UNIOESTE, Foz do Iguaçu, Brasil

kovalhuk@utfpr.edu.br

Abstract: A RISC-based platform is proposed for supporting the counting of red blood cells of wild animals. The platform is aimed for semi-automatic counting of cells from different species of animals where size and volume of cells can greatly differ. The results show the potential of using the low cost platform to automatically count most of the cells correctly with an average error of only 1,88% of false negatives and 1,82% of false positives. Although this error is usually smaller than the typical error for visual counting when laboratory personnel are considered, the storage of appropriate counted images would still require some action by the system user. With this low-cost RISC-based system, the task of visual counting would be reduced to correct at most 3,70% of the cells.

Palavras-chave: hemograma de animais silvestres, processador RISC, *Beagleboard*, sistema de baixo custo.

Introdução

O hemograma consiste de um conjunto de exames complementares com o objetivo de oferecer uma visão panorâmica, qualitativa e quantitativa dos elementos figurados do sangue [1] tipicamente usados para auxiliar o diagnóstico de pacientes. Tradicionalmente a contagem de elementos periféricos do sangue é realizada utilizando um corante apropriado para realçar a célula a ser contada. Essa lâmina é então inspecionada por um operador treinado em um microscópio óptico. Para obter resultados de elevada exatidão e confiabilidade, esse método exige elevado treinamento do técnico que realiza o preparo da lâmina e a contagem das células. Esse método requer um grande consumo de tempo e, uma vez que apenas algumas centenas de células são contadas, pode sofrer de falta de robustez

estatística ao realizar a estimativa de células presentes em um volume da amostra [2]. Para a análise de sangue humano algumas técnicas foram propostas e vários equipamentos foram desenvolvidos. Dentre os métodos de contagem amplamente utilizados para contagem e classificação de células estão aqueles baseados em impedância elétrica e espalhamento de luz. O primeiro é baseado na medição da impedância elétrica quando uma célula atravessa um tubo capilar [3]. O segundo está baseado em medições ópticas de espalhamento de luz ou de medição de fluorescência de indicadores ligados às células sob análise [2].

Embora muitos equipamentos estejam disponíveis para a contagem de células de humanos e esse seja um problema considerado resolvido para a análise de sangue humano, a grande variedade de espécies de animais torna difícil a adaptação de um sistema para atender as diversas demandas decorrentes da variabilidade de concentração e tamanho de células das diversas espécies. Dessa forma, ainda é um desafio encontrar equipamentos de baixo custo para soluções de contagem de células de sangue de animais silvestres e domésticos. Em função do crescimento das investigações dos parâmetros sanguíneos na medicina veterinária em animais domésticos, pecuária e animais de competição, existe a necessidade de se verificar a viabilidade de se desenvolver sistemas automáticos e semi-automáticos para realizar exames em substituição aos métodos manuais usados nos laboratórios veterinários [4].

Um algoritmo previamente desenvolvido demonstrou que é possível contar células de vários animais com exatidão de 97% [5]. Como o algoritmo de contagem não apresenta um grande desafio computacional, é possível implementá-lo em plataformas de menor poder computacional e menor custo com pequenas modificações. Esse artigo propõe um sistema

semi-automático de contagem de células vermelhas baseado em uma plataforma com processador RISC. Essa plataforma, com a adição de óptica de baixo custo pode ser usada como uma solução de contagem de células de animais silvestres a um custo acessível mesmo quando considerado seu uso no local de interesse (e.g., pequenas clínicas veterinárias, zoológicos, etc.).

Materiais e Métodos

A. Contagem de células - As câmaras de contagem são tipicamente construídas em uma lâmina de vidro retangular com retículos que servem como referência espacial para a contagem. Dentre os retículos mais conhecidos estão *Thoma*, *Türk*, *Fuchs-Rosenthal* e *Neubauer* [6]. O modelo de *Neubauer* apresentado na figura 1 é um dos mais usados [6], pois permite a contagem em reticulados de maior (0,25 mm de lado) e menor área (0,05 mm de lado). Em geral, utilizam-se as regiões maiores para a contagem de células com menor concentração e as regiões menores para a contagem de maiores concentração de células. A Câmara de *Neubauer* possui nove regiões de 1x1 mm², a profundidade da câmara é 0,1 mm resultando em regiões com volume de 0,1 mm³. As quatro regiões nos vértices são divididas em regiões de 1/16 mm² (i.e., regiões 1B, 2B, 3B e 4B). O quadrado de 1x1 mm² central é composto de 25 regiões com 1/25 mm² (e.g., 1A e 2A), onde cada um desses pequenos quadrados é subdividido em 16 regiões com 1/400 mm².

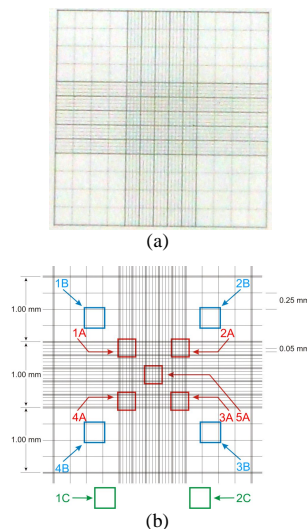


Fig. 1. (a) Imagem negativa de uma câmara de *Neubauer*, (b) Câmara de *Neubauer* com nove regiões de 1x1 mm². A profundidade da câmara é 0,1 mm resultando em regiões com volume de 0,1 mm³. As regiões nos quatro cantos são divididas em regiões de 1/16 mm² (i.e., regiões 1B, 2B, 3B e 4B). O quadrado de 1x1 mm² central é composto de 25 regiões com 1/25 mm² (e.g., 1A e 2A), onde cada um desses pequenos quadrados é subdividido em 16 regiões com 1/400 mm².

Em uma contagem manual, dilui-se um volume conhecido de sangue com uma quantidade conhecida do líquido diluidor obtendo-se uma concentração b . Se uma região de 1 mm² é considerada para a contagem, sabendo-se que a profundidade da câmara é d , basta realizar a contagem das células vermelhas (CCV) na área de 1 mm² (CCV/mm²) e obter CCV/mm³ utilizando a equação 1.

$$CCV/mm^3 = CCV/mm^2 \cdot d \cdot b \quad (1)$$

Para a câmara de *Neubauer*, a contagem dos glóbulos vermelhos é feita exclusivamente no retículo central, utilizando cinco grupos de quadrados médios (i.e., 1A, 2A, 3A, 4A e 5A) apresentado na figura 1(b)) [6]. Quando a contagem é manual, por inspeção visual, os 16 quadrados pequenos que compõem o quadrado médio são contados respeitando uma ordem em zigue-zague [6]. Consideram-se as hemácias que tocam as linhas à esquerda e acima e descartam-se as hemácias que tocam as linhas à direita e abaixo [6]. Para realizar a correção da contagem, a qual foi feita em 5 áreas de 1/25 mm² onde cada uma dessas áreas fornece a contagem $CCV_{1/25mm^2}$, tem-se que multiplicar o resultado obtido na somatória das cinco regiões por 5. Desta forma, considerando a profundidade igual a 1 mm, tem-se a equação (2) que é utilizada para encontrar o valor de CCV/mm^3 :

$$CCV/mm^3 = n \cdot b \cdot \sum_{1A}^{5A} CCV_{1/25mm^2} \quad (2)$$

Por exemplo, para uma diluição 1:200 (i.e., $b=200$), para as quadrículas 1A a 5A ($n=5$) e quadrículas 1B a 4B ($n=4$) tem-se $n \cdot b$ igual a 1000 e 800, respectivamente.

B. Sistema de Aquisição e Processamento de Imagens – O sistema de aquisição de imagens é composto por óptica e sensor de imagem. O sistema de processamento de imagem é composto por um processador RISC e periféricos que permitem a comunicação com o sensor de imagem e com monitor LCD, mouse e teclado.

Sistema de aquisição de imagem – A Figura 2 apresenta um sistema de aquisição composto por uma fonte de iluminação com controle de intensidade de luz e condensador óptico, uma lente objetiva típica de microscópio com distância focal de 160 mm e um sensor de imagem do tipo CMOS.

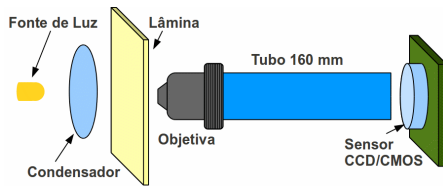


Figura 2. Diagrama do sub-sistema de captura da imagem.

Sistema de Processamento de Imagem – Para o processamento de imagens foi utilizado uma plataforma computacional de pequeno porte chamada de *Beagleboard XM* (*BeagleBoard Org*, U.S.A. Essa plataforma contém componentes importantes para o protótipo desenvolvido. Ela utiliza o processador *DM3730CBP-1GHz* (*Texas Instruments*, Dallas-TX, U.S.A.), memória RAM de 512 Mbytes, interface de vídeo HDMI, interface USB, interface para memória flash microSD (SD Association, CA, U.S.A.), interface de rede ethernet 10/100, interface para câmera de vídeo compatível com os módulos da *Leopard Imaging* (*Leopard Imaging INC*, CA, U.S.A.) [7]. Vários módulos de câmera com resoluções VGA, 2MP, 3MP e 5MP podem ser usados, bastando desenvolver software dos *drivers*. Um monitor LCD com interface DVI-D usando representação de cores em 24 bits pode ser ligado à placa através de um conector tipo HDMI. Essa plataforma e processador suportam vários sistemas operacionais, entre eles o Linux.

O processador *DM3730*, presente na placa *Beagleboard XM*, possui duas unidades de processamento de alto desempenho desenvolvido para aplicações multimídia com baixo consumo de energia, conforme mostra a figura 3. A primeira unidade de processamento é um processador *ARM Cortex-A8* (*ARM*, Cambridge, UK) e a segunda unidade é especializada em processamento digital de sinais e imagens do tipo *TMS320DMC64X+* (*Texas Instruments*, Dallas-TX, U.S.A.). O *DM3730* possui ainda características internas que facilitam a implementação do sistema com o potencial de elevado desempenho tais como hardware para aceleração gráfica em 2D e 3D, interface para câmera e outros [8].

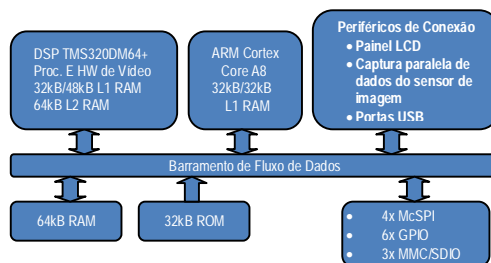


Figura 3. Diagrama em blocos do processador *DM3730CBP*

C. Biblioteca de Funções de Processamento de Imagem - Para a implementação dos algoritmos

de processamento de imagem, foi utilizado uma biblioteca livre com funções para visão computacional escrita em linguagem C e C++ denominada *OpenCV* (*Intel*, Santa Clara-CA, U.S.A.). Exemplos de funções utilizadas são *cvShowImage*, para apresentar a imagem no display; *cvThreshold*, para realizar a limiarização da imagem; *cvDilate*, para realizar a operação de dilatação da imagem [9]. No sistema de processamento de imagens implementado o sistema operacional utilizado foi *Angstrom Linux*®, *kernel* versão 2.6.32.

D. Protocolo de Aquisição de Imagem e Algoritmo de Processamento Os quadrantes registrados são: 1A, 2A, 3A, 4A e 5A; 1B, 2B, 3B e 4B, cujas posições podem ser verificadas na Figura 1. Foram capturadas duas imagens para cada quadrante, cada uma delas com um foco diferente para permitir a avaliação de diferentes funções para processamento de imagens. O foco inicial é ajustado para deixar as células com um aspecto "escuro" e o mais nítido possível (foco 1 - F1). O segundo foco é obtido a partir do foco inicial, incrementando-se o micrômetro em 15 micra. As células neste foco apresentam interior "mais claro" com bordas escuras levemente borradas (foco 2 - F2). As imagens são obtidas com objetiva 20x. Detalhes do algoritmo são apresentados em [5].

A combinação das imagens F1 e F2, permite otimizar a identificação de células que estão sobre as linhas do retículo visto que adquirem aspectos diferentes em cada foco. No algoritmo são utilizados o operador morfológico de erosão à imagem obtida para o foco 1 e o operador de dilatação à imagem obtida para o foco 2. A erosão é aplicada com o objetivo de evidenciar as células que estão sobrepostas às linhas do retículo de *Neubauer*. Isto se torna necessário, pois nestes casos de sobreposição estas células adquirem um aspecto mais "claro" que as demais, dificultando o processo de segmentação. O operador de dilatação é aplicado na imagem obtida para o foco 2 com o objetivo de evidenciar as áreas claras da imagem, neste caso a parte interior das células. Na sequência, as imagens são submetidas a uma limiarização para obter imagens binárias nas quais as células apresentam-se isoladas do fundo. A etapa seguinte, extração de características, consiste na localização de todas as regiões conexas presentes na imagem binária, obtendo para cada uma delas as coordenadas do centro e sua área em pixels. Para obter-se um valor padrão de área, que servirá de referência para classificar uma região como célula, ordena-se um vetor com todas as áreas e toma-se o valor central do vetor como área padrão, esta operação é conhecida como mediana. A mediana de um conjunto de valores é tal que metade dos

valores do conjunto são menores ou iguais à mediana e a outra metade são maiores ou iguais, ou seja, em um vetor ordenado a mediana é o valor da posição central [10]. Esta abordagem é fundamentada no fato de que o maior número de regiões na imagem refere-se às hemácias e, após a ordenação do vetor os valores presentes na região central do vetor pertencem às regiões correspondentes às células. Uma vantagem desta abordagem está no fato de que não há necessidade de conhecimento prévio do tamanho das células para escolher um valor padrão para a contagem, visto que o algoritmo utiliza as próprias células presentes na imagem para a escolha deste valor. Esta abordagem viabiliza desta forma a contagem para múltiplas espécies, adaptando-se ao tamanho das células de cada espécie analisada selecionando a área padrão a partir das próprias células presentes na imagem.

Na etapa de contagem, usando o valor de área padrão como base para a identificação das células, avaliam-se todas regiões para encontrar quais as que tem áreas que se aproximam deste valor padrão. Quando uma região possui área compatível com o valor padrão, então ela é marcada como célula e adicionada à contagem. Esta compatibilidade considera ainda uma margem de tolerância em relação ao valor da área. Observando os testes realizados, definiu-se empiricamente uma margem de tolerância de $\pm 50\%$ de variação no valor da área de modo a classificar o maior número de células presentes. Essa tolerância escolhida empiricamente a partir de análises visuais pode ser futuramente substituída pelo resultado de uma análise de sensibilidade relacionada ao valor da tolerância.

Usando as coordenadas do centro, o algoritmo marca (em vermelho) na imagem, as células que foram incluídas na contagem. O resultado final é obtido fazendo a união das duas contagens, no foco 1 e 2.

Resultados

Utilizando uma biblioteca de imagens previamente adquirida [11], é possível comparar os resultados obtidos a partir de um sistema computacional baseado em um computador pessoal de maior porte e custo [5] com os obtidos no sistema aqui proposto. Esta biblioteca possui amostras de sessenta e dois cães e de cinco cavalos, totalizando sessenta e sete amostras, obtidas no Laboratório de Clínica Veterinária do Departamento de Clínicas Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu [11].

A figura 4 apresenta os valores obtidos para a contagem de células utilizando a equação (2),

usando $b=200$ e $n=5$ para a figura 4(a) e $b=200$ e $n=4$ para a figura 4(b), para estimar a quantidade de células vermelhas por amostra.

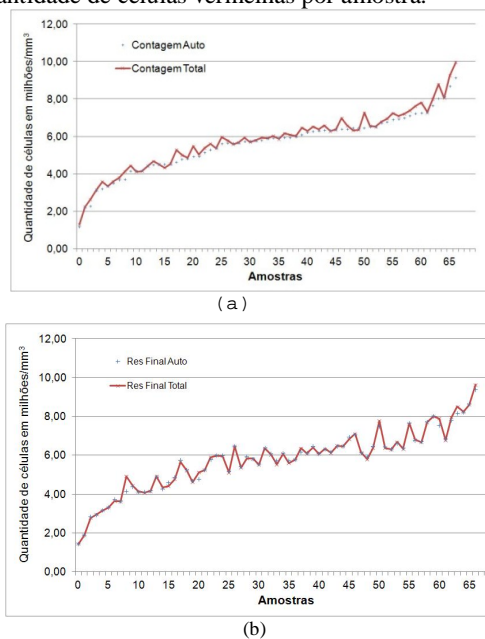


Figura 4. Contagem de células vermelhas estimadas a partir da contagem de células nas (a) quadrículas 1A a 5A e (b) quadrículas 1B a 4B.

A figura 5 apresenta o erro em termos de falsos negativos (i.e., objetos na imagem que não foram contados como células vermelhas mas deveriam ter sido identificados e contados) e falsos positivos (i.e., objetos na imagem que foram contados como células vermelhas mas não deveriam ter sido contados). As figuras 4(a) e 5(a) apresentam os resultados para a contagem utilizando as quadrículas 1A a 5A e as figuras 4(b) e 5(b) apresentam os resultados a partir da contagem das quadrículas 1B a 4B, para as quais não há linhas internas à quadrícula.

A figura 4 apresenta erros de contagem pequenos se comparados o valor total após a contagem com auxílio do computador com a contagem automática. Mais especificamente os erros de contagem tiveram média de 3,51% e 1,51% e desvio padrão de 0,035 e 0,022 para as quadrículas 1A-5A e 1B-4B, respectivamente.

A figura 5 apresenta erros de contagem quando se consideram os falsos negativos (FN) e os falsos positivos (FP). Ou seja, apesar da figura 4 apresentar os erros de contagem final, ao se analisar os erros separadamente é possível que se constate que um erro (e.g., FN) anule parcialmente o outro (e.g., FP) quando a contagem é totalizada. Os erros de contagem considerando os FN tiveram média de 6,41% e 1,88% e desvio padrão de 0,048 e 0,025 para as quadrículas 1A-5A e 1B-4B, respectivamente. Os erros de contagem considerando os FP tiveram média de 3,39% e 1,82% e desvio

padrão de 0,021 e 0,014 para as quadrículas 1A-5A e 1B-4B, respectivamente.

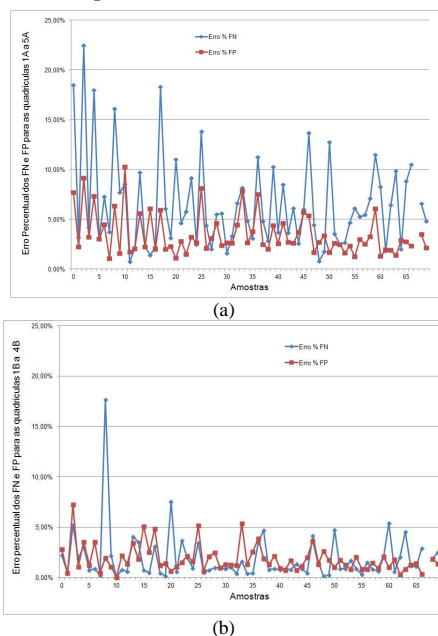


Figura 5. Erros de contagem a serem corrigidos pelo usuário do sistema após a etapa de contagem automática considerando as (a) quadrículas 1A a 5A e (b) quadrículas 1B a 4B.

Outro resultado importante é o tempo consumido pelo usuário para a contagem de cada quadrícula. Em média obteve-se um tempo médio de 4,36 segundos e 16,48 segundos com desvio padrão de 5,77 e 1,54 para a parte de contagem automática de células na imagem quando o mesmo é realizado em um computador pessoal (i.e., processador *Athlon* 64x2 Dual Core (*Advanced Micro Devices*, CA, U.S.A.), 1,9 GHz, memória L2 de 2x 256kB e memória RAM 2GB) e na plataforma RISC, respectivamente.

Discussão

Embora os erros de contagem apresentados na figura 5 não fossem muito elevados, uma análise mais detalhada dos erros fez-se necessária. Em uma primeira análise, o erro médio de 3,51% e desvio padrão de 0,035 para contagem nas quadrículas 1A-5A não seria elevado. Ainda, mostrou-se que o erro médio caía para 1,51% com desvio padrão de 0,022 ao considerar as quadrículas 1B-4B. Por outro lado, em uma segunda análise observou-se que a contagem deveria ser corrigida quanto aos falsos negativos e falsos positivos para permitir uma correta contagem e armazenamento de imagens marcadas. Nessa análise observaram-se erros FN isolados maiores que 15% conforme apresentado na figura 5(a) associados a erros FP maiores que 5%. Ou seja, uma correção de contagem de 20% das células pode ser necessária em algumas situações isoladas. De

forma geral, os erros considerando FN e FP foram na média de 6,41% e 3,39%, respectivamente quando consideradas as quadrículas 1A-5A. Enquanto que para a contagem visual humana a existência de linhas de referência internas às quadrículas 1A a 5A, para a contagem automática a existência das linhas auxiliares internas (*grids*) não existe a necessidade de tais linhas. Ainda, ao observar que grande parte das contagens que precisam ser refeitas estão na região onde há presença de linhas de referência, como pode ser observado na figura 6, o sistema realiza as contagens com melhores resultados nas quadrículas 1B a 4B. Dessa forma, a contagem a partir das quadrículas sem *grid* interno apresenta erros consideravelmente menores, ou seja, 1,88% e 1,82% ao considerar FN e FP, respectivamente. Dessa forma, obtém-se que em média, um usuário desse sistema, na versão atual, deveria corrigir a contagem de 3,70% das células. Esse resultado é clinicamente útil pois os erros de contagem, mesmo se não corrigidos são em média menores que aqueles reportados para a variação entre a contagem de diversos contadores experientes utilizando o método tradicional de contagem visual.

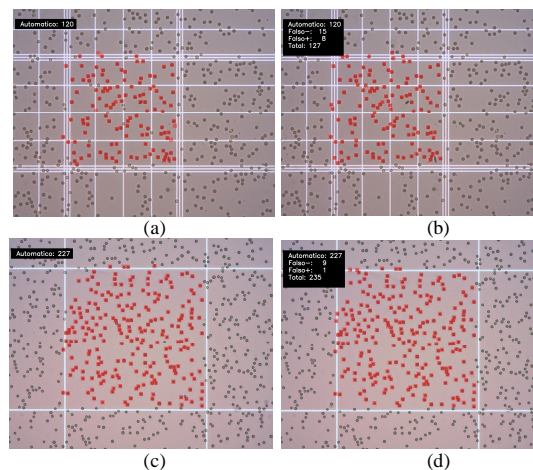


Figura 6. Contagem automática (coluna da esquerda) e corrigida (coluna da direita) consideradas as quadrículas 1A a 5A para as figuras (a) e (b) e as quadrículas 1B a 4B para as figuras (c) e (d).

Ao fornecer uma interface gráfica para auxiliar a visualização das células de forma ampliada e garantir a marcação das células de forma a diferenciar o que foi contado do que não foi contado, o sistema permite a redução de erros de contagem ao custo de o usuário ter que corrigir a contagem de aproximadamente apenas 4% das células. O sistema comporta o armazenamento de 44 imagens em um cartão microSD (SD Association, CA, U.S.A.) de 4GB antes de ser necessário a transferência dos dados para outra plataforma, assim liberando a memória da plataforma RISC para novas análises. O armazenamento de imagens é uma

característica importante do sistema pois tais imagens podem ser verificadas posteriormente no caso de dúvidas enquanto que no método tradicional, uma nova lâmina com amostra deveria ser preparada e contada.

As principais vantagens em se optar por uma plataforma RISC no lugar de um sistema baseado em um computador pessoal são dimensões físicas, consumo de energia e custos menores associados a disponibilidade de um sistema dedicado para executar esta tarefa no laboratório.

Esse método e aparelho podem ser adaptados para a contagem de outros tipos de elementos figurados do sangue. Por exemplo, o método pode ser adaptado para a contagem de células brancas, as quais aparecem em número bem inferior comparada às células vermelhas, ou seja, entre 5.000 e 10.000 leucócitos por milímetro cúbico de sangue. Neste caso, menor diluição é necessária para permitir a visualização de mais células brancas dentro da câmara para permitir melhor estimativa de valores.

Conclusão

Esse trabalho apresentou o projeto e implantação de um sistema de aquisição e processamento de imagens microscópicas que permite a contagem semi-automática de células vermelhas de sangue de animais de várias espécies. O protótipo do equipamento é capaz de realizar contagens de forma independente com o potencial de ser realizado com baixo custo, reduzindo significativamente o trabalho manual de contagem e permitindo documentação apropriada da informação através do armazenamento de imagens marcadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao DAELN/UTFPR pelo apoio aos seus docentes e à Fundação Araucária pelo apoio à Verticalização do Ensino Superior Estadual - Edital 16/2008.

Referências

- [1] Genovese, W. J., (1996), *Exames Complementares na Clínica Odontológica*, Uberaba, MG: Peirópolis.
- [2] DeNicola, D. (2008), "IDEXX LaserCyte Hematology Analyzer - Case Study Book and Technical Guide". Disponível em http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/smallanimal/vetlab/lasercyte/lasercyte-case-study-technical-guide.pdf. Acesso em 20 jun. 2012.
- [3] Coulter WH. (1953), "Means for counting particles suspended in a fluid" *US Patent - US patent 2 656 508*.
- [4] Hennessy, M., Buckley, T., Leadon, D., Scott, C. (1998), "Automated analysis of blood samples from thoroughbred horses with the abbott cell DYN 3500 (CD3500) haematology analyser", In *Comparative Haematology International*, v. 8, n. 3, p. 150-158.
- [5] Mauricio, C. R. M.; Schneider, F. K.; Santos, L. C. dos.

(2010), "Image-based red cell counting for wild animals blood", In *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE*, Buenos Aires, Argentina, n. 11660146, p. 438-441.

- [6] LIMA, A. O. (1985), *Metodos de laboratorio aplicados a clinica: tecnica e interpretacao*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- [7] beagleboard.org (2010), BeagleBoard-xM System Reference Manual, rev C1.0, U.S.A.
- [8] Texas Instruments (2010), AM/DM37x Multimedia Device -Silicon Revision 1.x -Version P -Technical Reference Manual - SPRUGN4P, Dallas.
- [9] Bradski, G., Kaehler, A. (2008), *Learning OpenCV's 1st Edition*, Sebastopol: O'Reilly Media.
- [10] Gomzales, R. C.; Woods, R. E.(2002), *Digital image processing. 2nd ed*, Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.
- [11] Mauricio, C. R. M.; Schneider, F. K.; Takahira, R. K.; Santos, L. C. dos. (2012), Evaluation of an image-based red blood cell counter for animals blood. Submitted to *Veterinary Clinical Pathology*.