

## NOTA TÉCNICA

### Método para contagem de células somáticas do leite bovino para imagens capturadas do microscópio óptico

#### Method for somatic cell count in bovine milk images captured from optical microscope

### Método de recuento de células somáticas de la leche de vaca para las imágenes capturadas del microscopio óptico

Gabriel Jesus Alves de Melo<sup>1\*</sup>, Viviani Gomes<sup>3</sup>, Luiz Alberto Luz de Almeida<sup>2</sup>, Antônio Cezar de Castro Lima<sup>1</sup>, Camila Costa Baccili<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia, Brasil. \*Correio eletrônico: gabrieluesc@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do ABC (UFABC), São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), São Paulo, Brasil.

#### RESUMO

Este trabalho apresenta um método de segmentação para a contagem de células somáticas em imagens do leite bovino, destinadas a detectar uma infecção conhecida como mastite, que é a maior causa de perda na pecuária leiteira. Através do processamento de imagens e, utilizando o padrão morfológico das células, um algoritmo foi criado para detecção e contagem das células. A segmentação é realizada utilizando um novo procedimento de limiarização de histogramas para eliminar o fundo das imagens. As células restantes ligadas são separadas na etapa final através da transformada de watershed. Os resultados experimentais foram obtidos utilizando um conjunto grande de imagens de diferentes fontes. Uma comparação entre o desempenho da contagem manual e o método proposto indica que este método é uma solução promissora para automatizar sistemas para detecção da mastite bovina através de microscopia óptica.

**Palavras-chave:** processamento de imagens, vídeo microscopia, transformada de watershed, células somáticas.

#### ABSTRACT

This work presents a hybrid segmentation method for counting somatic cells in bovine milk images, intended to detect an infection known as mastitis, which is the major cause of loss in dairy farming. By applying image processing techniques that use cell morphology it was possible to develop an algorithm capable of detecting and segmenting those cells. The segmentation is accomplished employing a new thresholding procedure to eliminate background and other residues. The remaining connected cells are separated in the final segmentation step, by the use of the watershed transform. The experimental results were obtained using a large set of images from different sources. A performance comparison between the manual counting and the proposed method indicates that the later one is a promising solution to automate systems for detection of bovine mastitis via optical microscopy.

**Key words:** image processing, microscopy video, watershed transform, somatic cells.

## RESUMEN

Este trabajo presenta un método de segmentación para el conteo de células somáticas en imágenes de la leche de bovino, destinadas a detectar una infección conocida como mastitis, que es la mayor causa de pérdida en la ganadería lechera. A través del procesamiento de imágenes y, utilizando el patrón morfológico de las células, un algoritmo fue creado para detección y conteo de las células. La segmentación es hecha por el uso de un nuevo algoritmo de umbralización de histogramas para eliminar el fondo de las imágenes. Las células restantes conectadas son separadas en la etapa final a través de la transformada de watershed. Los resultados experimentales fueron obtenidos por la utilización de un gran conjunto de imágenes de diferentes fuentes. Una comparación entre el desempeño del conteo manual y el método propuesto indica que este método es una solución prometedora para automatizar sistemas para detección de mastitis bovina a través de microscopía óptica.

**Palabras clave:** procesamiento de imágenes, microscopía de vídeo, transformar watershed, células somáticas.

## INTRODUÇÃO

As células somáticas fazem parte do mecanismo natural de defesa do animal e são representadas basicamente por leucócitos e células epiteliais. Um aumento do número destas células no leite é um indicativo do estado imunológico da vaca frente alguma uma infecção (Tangorra *et al.*, 2010). Do total de células somáticas presentes no leite, 75 a 98% correspondem a células de defesa (leucócitos) e 2 a 25% compreendem células epiteliais provenientes da descamação natural do tecido de revestimento e secretor da glândula mamária (Ribas, 2001).

A contagem de células somáticas pode ser realizada indiretamente, avaliando-se a viscosidade do leite após adição de um reagente próprio, ou diretamente, contando-se as células através do microscópio ou por meio de equipamentos eletrônicos (Richter *et al.*, 2013).

Os analisadores eletrônicos são mais precisos e baseiam-se em diferentes técnicas de análises. Dentre os mais utilizados, destacam-se os

aparelhos Fossomatic™ (Foss, Dinamarca) e Somacount™ (Bentley Instruments, USA) (Silveira *et al.*, 2005). No entanto, devido ao alto custo destes equipamentos, a contagem manual das células somáticas por meio do microscópio ainda se faz necessária (Melo *et al.*, 2014). Por outro lado, a contagem realizada através da microscopia óptica é o método de referência adotado pela Federação Internacional do Leite (FIL) e é utilizado, inclusive, para calibração de contadores eletrônicos mais modernos (Berry e Broughan, 2007).

Diversos *softwares* baseados em técnicas de processamento de imagens são utilizados para contagem de alguns tipos de células, partículas e objetos. No entanto, como estes *softwares* possuem funções para aplicações específicas, o surgimento de novos problemas requer o desenvolvimento de novos algoritmos (Melo *et al.*, 2014). Por exemplo, novos algoritmos de processamento de imagens para contagem de células do sangue humano foram propostos por Sadeghian *et al.* (2009), Hiremath *et al.* (2010) e Arslan *et al.* (2014).

No campo da biologia e da medicina, o processamento de imagens baseado em técnicas de limiarização de histogramas é um tema comum e muito utilizado para o reconhecimento de células e outros tipos de partículas (Wu *et al.*, 2000; Qian *et al.*, 2009; Moo, 2013). Por outro lado, técnicas de limiarização para segmentação de células somáticas do leite é um tema novo e ainda não discutido na literatura.

Existem diversas técnicas de limiarização desde as baseadas em critérios entrópicos ou estatísticos da imagem (Jawahar *et al.*, 2000) até as que utilizam sofisticados mecanismo de busca mais avançados (Yin, 2002). Segundo Gonzalez *et al.* (2004), a limiarização é o estágio primário em problemas de segmentação de imagens e, devido à simplicidade destes algoritmos, outras técnicas devem ser tentadas quando esta não apresentar resultados satisfatórios.

Devido à importância do desenvolvimento de novas tecnologias para contagem de células somáticas (CCS) no leite, o objetivo desta pesquisa é apresentar um método para contagem de células somáticas em imagens digitais por meio do algoritmo de limiarização

de Rosin (2001) combinado com a transformada *dewatershed* (Edinns, 2002). Para verificar a eficiência da técnica, o método proposto (modelo híbrido) foi comparado ao método de limiarização de Otsu (1975).

## MATERIAIS E MÉTODOS

No estudo realizado, procedeu-se a análise de 400 imagens provenientes de amostras de leite dos quartos mamários de duas vacas da raça Holandesa oriundas de propriedade localizada no estado de São Paulo (Brasil). Inicialmente foi realizada a higienização dos tetos com solução clorada, secagem com papel toalha individual e antissepsia com álcool 70%. Após o descarte dos primeiros jatos de leite, as amostras foram colhidas em tubos de vidro com capacidade para 5mL, imersos em gelo triturado e encaminhados ao laboratório em caixa de material isotérmico. Em seguida, os esfregaços lácteos foram confeccionados e examinados via microscopia óptica de acordo com os procedimentos descritos Berry e Broughan (2007).

O sistema para captura e contagem de células somáticas presentes nos esfregaços lácteos (Figura 1) foi constituído por uma câmera fotográfica digital (CoolSnap Color, Media Cybernetics™, USA) acoplada ao microscópio óptico (Eclipse 800, Nikon®, Japan) no aumento de 1000x e um computador que executa o algoritmo desenvolvido em linguagem Matlab®, versão 7.8 (licença concedida ao Instituto Federal de Educação da Bahia).

Inicialmente, as imagens RGB obtidas com tamanho 1392 x 1040 foram reduzidas para 278 X 208 (sem perdas para identificação das células) e convertida para o espaço monocromático (256 níveis de tons de cinza) seguindo procedimento apresentado por Gonzalez *et al.* (2004). Nesta etapa, o algoritmo de limiarização proposto, analisa o histograma da imagem monocromática e determina o limiar que será utilizado para converter imagem para o formato preto e branco (binária). Ao final, os objetos não conectados resultantes da etapa anterior, foram rotulados e contados por meio do algoritmo de clusterização apresentado por Gonzalez *et al.* (2004) e, classificados de acordo com seu tamanho, seguindo as orientações apresentadas por Berry e Broughan (2007). A Figura 2 ilustra o

procedimento para segmentação e contagem das células somáticas em imagens digitais.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A Tabela mostra os resultados para contagem do número total de células, correlação e taxa de acerto utilizando o método proposto através da limiarização de Rosin (2001) algoritmo da Figura 2 e de Otsu (1975). A correlação de Pearson foi obtida através da relação entre a contagem por imagem de células somáticas realizadas pelo especialista e pelo método proposto. A precisão é definida por  $\frac{100N_p}{N_e}$ , onde  $N_e$  representa o número total de células somáticas contadas pelo especialista e  $N_p$  o número de células contadas por meio da metodologia proposta. O número de células contabilizadas pelo especialista após analisar 400 imagens foi 1316 células.

De acordo com a Tabela, o método de limiarização Otsu (1975) foi ineficiente para esta aplicação com correlação não aceitável de 0,16. Segundo NG (2006) a técnica de limiarização de Otsu (1975) é muito utilizada e proporciona resultados satisfatórios para limiarização de imagens com histograma de distribuição bimodal podendo falhar se o histograma for unimodal ou perto de unimodal. Portanto, como nesta aplicação uma proporção maior de apenas uma classe de pixels (por exemplo, o fundo) está presente na imagem formando histogramas predominantemente unimodal, justifica-se a limitação do algoritmo de Otsu (1975) para limiarização de células somáticas.

A correlação entre a contagem manual realizada por imagem e o método proposto foi de 0,96, com taxa de acerto de 99,77%. A escolha do algoritmo de Rosin (2001) para esta aplicação se justifica, pois as imagens com células somáticas produzem histogramas que apresentam distribuição predominantemente unimodal, conforme aplicação semelhante apresentada por Vallotton e Olivier (2013). O método de Rosin (2001) assume que existe uma população dominante na imagem (*background*), que produz um pico principal único, localizado no extremo inferior do histograma relativo à população secundária (células). O limiar escolhido por este método é o valor do histograma que maximiza a distância

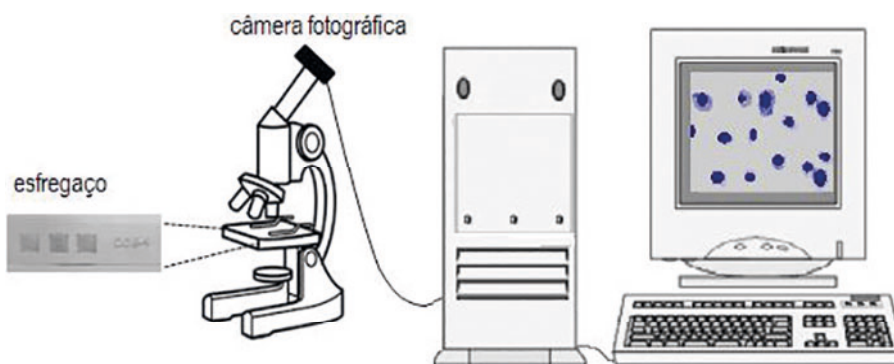


Figura 1. Sistema para contagem células somáticas do leite de vacas em imagens capturadas do microscópio óptico.

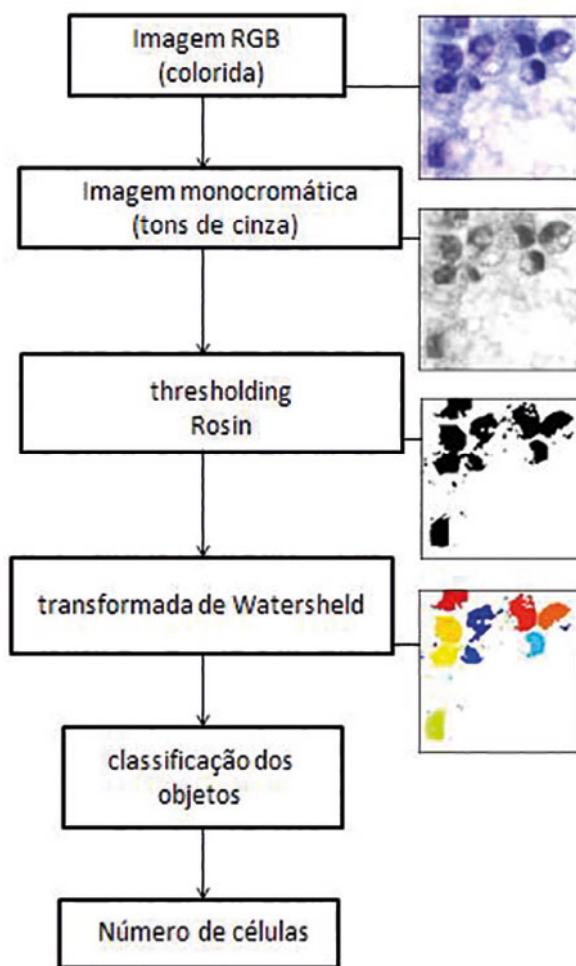


Figura 2. Procedimento para contagem de células somáticas.

Tabela . Comparação entre os métodos de contagem.

Métodos	Número de células	Correlação de Pearson	Acerto (%)
Proposto	1313	0,96	99,77
Otsu (1975)	2302	0,16	0

Fonte: Autoria própria (2014).

perpendicular entre a curva que representa distribuição de frequência dos níveis de cinza da imagem e a reta que passa pelo valor mínimo e máximo do histograma.

As células que permanecem conectadas em aglomerações após a limiarização de Rosin (2001), tal como aparece em la Figura 2, foram separadas por meio da transformada de *watershed* apresentado por Eddins (2002). Esta ferramenta determina as linhas que delimitam a transição entre os vales de uma imagem representada na forma topográfica e tem sido amplamente utilizada em muitos campos de processamento de imagem para separação de objetos conectados, tais como, apresentado por Tulsani (2013) para segmentação de células do sangue humano e Grau *et al.* (2004) para segmentação imagens do cérebro. O resultado da transformada de *watershed* aplicado sobre a imagem binária para separação das células conectadas pode ser verificado na Figura 2.

O parâmetro adotado para classificar e contar os objetos resultantes da segmentação final (objetos coloridos) como célula somática (Figura 2) foi o tamanho espacial de cada objeto por meio do algoritmo de contagem de Gonzalez *et al.* (2004) seguindo as orientações para identificação morfológicas das células somáticas apresentadas por (Berry e Broughan, 2007).

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o método desenvolvido é capaz de identificar células somáticas presentes em imagens capturadas por meio da microscopia direta. Portanto, o algoritmo apresentado pode ser parte integrante de um sistema de vídeo microscopia baseado em processamento de imagens para contagem de células somáticas do leite bovino. Como

isso, busca-se minimizar os erros causados pela fadiga do técnico responsável em realizar a contagem manual através do microscópio.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos financiamentos necessários para execução desse trabalho.

## LITERATURA CITADA

- Arslan, S., E. Ozyurek and C. Gunduz-Demir. 2014. A color and shape based algorithm for segmentation of white blood cells in peripheral blood and bone marrow images. *Cytometry Part A*, 85(6), 480-490.
- Berry, E. and J. Broughan. 2007. Use of the DeLaval cell counter (DCC) on goats' milk. *Journal of dairy research*, 74(03): 345-348.
- Eddins, S. 2002. The *watershed* Transform: Strategies for Image Segmentation. *The Mathworks Journal, Matlab®, News and Notes*, 47-48.
- Gonzalez, R. C., R. E. Woods and S. L. Eddins. 2004. Digital image processing using MATLAB®. Ed. Pearson Education, Índia.
- Grau, V., A. U. J. Mewes, M. Alcaniz, R. Kikinis and S. K. Warfield. 2004. Improved *watershed* transform for medical image segmentation using prior information. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 23(4): 447-458.
- Hiremath, P. S., P. Bannigidad and S. Geeta. 2010. Automated identification and classification of white blood cells (leukocytes) in digital microscopic images. *IJCA special issue*

- on "recent trends in image processing and pattern recognition" *RTIPPR*, 59-63.
- Jawahar, C. V., P. K. Biswas and A. K. Ray. 2000. Analysis of fuzzy thresholding schemes. *Pattern Recognition*, 33(8):1339-1349.
- Melo, G. J. A., B. A. Melo Neto, V. Gomes, L. A. L. Almeida and A. C. C. Lima. 2014. Method thresholding automatic for somatic cell count in microscopic images. *Revista Geintec: gestão, inovação e tecnologias*, v. 4, p. 1283-1291.
- Moo, E. K., Z. Abusara, N. A. Abu Osman, B. Pingguan-Murphy and W. Herzog. 2013. Dual photon excitation microscopy and image threshold segmentation in live cell imaging during compression testing. *Journal of biomechanics*, 46(12), 2024-2031.
- NG, H. F, 2006. Automatic thresholding for defect detection. *Pattern Recognition Letters*, 27: 1644-1649.
- Otsu, N. 1975. A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica*, 11(285): 23 - 27.
- Qian, X., C. Peng, X. Wang and D. Ye. 2009. Self-organizing map-based multi-thresholding on neural stem cells images. *Medical & biological engineering & computing*, 47(7): 801-808.
- Ribas, N. P. Valor e uso da contagem de células somáticas no manejo de rebanhos leiteiros. 2001. Congresso holstein de las americas, São Paulo, São Paulo. 110 p.
- Richter, E. M., T. Melo, M. Ruoso, N. Zeolla e V. Groenwold. 2013. Ações de manejo e sanitárias no controle de CCS em rebanhos leiteiros agroecológicos. *Cadernos de Agroecologia*, 8(2).
- Rosin, P. L. 2001. Unimodal thresholding. *Pattern Recognition*, 34(11): 2083-2096.
- Sadeghian, F., Z. Seman, A. R. Ramli, B. A. Kahar and M. I. Saripan. 2009. A framework for white blood cell segmentation in microscopic blood images using digital image processing. *Biological procedures online*, 11(1): 196 - 206.
- Silveira, T. M., L. M. Fonseca, T. B. Lago e D. R. Veiga. 2005. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(1): 128 -132.
- Tangorra, F. M., M. Zaninelli, A. Costa, A. Agazzi and G. Savoini. 2010. Milk electrical conductivity and mastitis status in dairy goats: Results from a pilot study. *Small ruminant research*, 90(1): 109-113.
- Tulsani, H. 2013. Segmentation using morphological watershed transformation for counting blood cells. *IJCAIT*, 2(3): 28-36.
- Vallotton, P. and S. Olivier. 2013. Tri-track: Free Software for Large-Scale Particle Tracking. *Microscopy and Microanalysis*, 19(02): 451-460.
- Wu, H. S., J. Berba and J. Gil. 2000. Iterative thresholding for segmentation of cells from noisy images. *Journal of microscopy*, 197(3), 296-304.
- Yin, P. Y. 2002. Maximum Entropy-Based Optimal Threshold Selection Using Deterministic Reinforcement Learning With Controlled Randomization. *Signal Processing*, 82:993-1006.