

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

PAMELA CAMPOS LEVY

RECONHECIMENTO E SEGMENTAÇÃO DO *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS EM IMAGENS DE MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO
UTILIZANDO AS CARACTERÍSTICAS DE COR E O ALGORITMO
BACKPROPAGATION

MANAUS
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

PAMELA CAMPOS LEVY

RECONHECIMENTO E SEGMENTAÇÃO DO *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS EM IMAGENS DE MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO
UTILIZANDO AS CARACTERÍSTICAS DE COR E O ALGORITMO
BACKPROPAGATION

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para obtenção de título
de Mestre em Engenharia Elétrica na área de
concentração Controle e Automação de Sistemas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marly Guimarães Fernandes Costa
Co-orientador: Prof. Dr. Cícero Ferreira Fernandes Costa Filho

MANAUS
2012

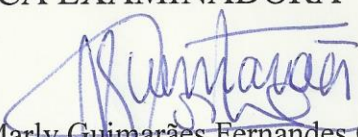
PAMELA CAMPOS LEVY

**RECONHECIMENTO E SEGMENTAÇÃO DO MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS EM IMAGENS DE MICROSCOPIA DE CAMPO
CLARO UTILIZANDO AS CARACTERÍSTICAS DE COR E O
ALGORÍTIMO BACKPROPAGATION**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Elétrica na área de
concentração Controle e Automação de Sistemas.

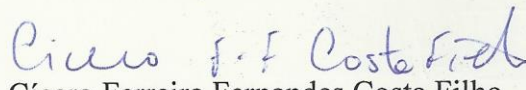
Aprovado em 24 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA



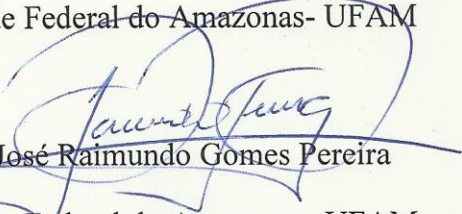
Profa. Dra. Marly Guimarães Fernandes Costa

Universidade Federal do Amazonas- UFAM



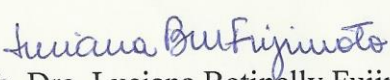
Prof. Dr. Cícero Ferreira Fernandes Costa Filho

Universidade Federal do Amazonas- UFAM



Prof. Dr. José Raimundo Gomes Pereira

Universidade Federal do Amazonas- UFAM



Profa. Dra. Luciana Botinelly Fujimoto

Universidade Federal do Amazonas- UFAM

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria do Socorro e Isaac Levy,
E ao meu amado, Renan Martins.*

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus. Coloquei o meu caminho em Suas mãos, confiei Nele e Ele fez com que tudo desse certo. Ele não me abandonou jamais, iluminou meus passos e me deu discernimento. São Dele as minhas vitórias porque sem Ele, provavelmente, em algum momento eu haveria desistido.

Aos meus orientadores Prof. Cícero Ferreira Fernandes Costa Filho e Profa. Marly Guimarães Fernandes Costa, porque sempre acreditaram em mim durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio e incentivo nestes dois anos de Mestrado.

À Dr^a. Luciana Fujimoto e Dr^a. Julia Salem que com seus conhecimentos estiveram sempre prontas a colaborar, tirar dúvidas e opinar. Obrigada pela dedicação e carinho demonstrado no decorrer do trabalho.

Ao Professor Wagner Coelho do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PEB) da COPPE/UFRJ, pela cordial acolhida e o auxílio oferecido durante o período de missão de estudo.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Eletrônica e da Informação (CETEL) e ao INPA por fornecer a infraestrutura necessária para a realização do trabalho.

À CAPES, através do PROGRAMA PROCAD-NF, coordenado pela Profa Marly Guimarães, pela viabilização de missão de estudo no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A toda minha família pelo incentivo, em especial aos meus pais, Isaac e Socorro e aos meus irmãos, Priscila e Isaac Júnior, pela inestimável companhia e apoio.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado, em especial, Nirvana, Samara, Gilskey, Débora, Antônio Júnior, Ingrid, Luísa, Clahildek e Tânia pela amizade, companhia e incentivo. Ao meu namorado Renan, por seu apoio e incentivo.

E a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, transmitida pelo bacilo de Koch, ou *Mycobacterium tuberculosis*. Estima-se que 1,4 milhões de pessoas morreram de tuberculose em 2010. Cerca de 95% dessas mortes ocorreram em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. No Brasil, a cada ano são registrados mais de 68 mil novos casos. Atualmente, o Amazonas é o estado brasileiro com a maior taxa de incidência da doença. Um dos métodos de diagnóstico da TB, adotado pelo Ministério da Saúde, é o exame de baciloscopia de campo claro. A baciloscopia consiste na contagem dos bacilos em lâminas contendo amostras de escarro do paciente, preparadas e coradas de acordo com metodologia padronizada. Nos últimos cinco anos, pesquisas relacionadas ao reconhecimento de bacilos da tuberculose, utilizando imagens obtidas por microscopia de campo claro, tem sido realizadas com vistas a automatização desse método diagnóstico, em face do fato de que o número elevado de exames de baciloscopia realizado pelos profissionais induzirem a fadiga visual e em consequência a erros diagnósticos. Esse trabalho apresenta um novo método de reconhecimento e segmentação de bacilos da tuberculose em imagens de campos de lâminas, contendo secreção pulmonar do paciente, coradas pelo método de *Kinyoun*. A partir dessas imagens foram extraídas amostras de *pixels* de bacilos e de fundo para treinamento do classificador. As imagens foram automaticamente discriminadas em dois grupos, de acordo com o conteúdo de fundo. O método desenvolvido seleciona um conjunto ótimo de características de cor do bacilo e do fundo da imagem, empregando o método de seleção escalar de características. Essas características foram utilizadas em um classificador de *pixels*, um *perceptron* multicamada, treinado pelo algoritmo *backpropagation*. O conjunto ótimo de características selecionadas, {G-I, Y-Cr, L-a, R-G, a}, proveniente dos espaços de cores RGB, HSI, YCbCr e Lab, combinado com a rede *perceptron* com 18 (dezoito) neurônios na primeira camada, 3 (três) na segunda e 1 (um) na terceira (18-3-1), resultou em uma acurácia de 92,47% na segmentação dos bacilos. O método de discriminação de imagens em relação ao conteúdo de fundo automatizado contribuiu para afirmar que o método descrito neste trabalho é mais adequado para segmentar bacilos em imagens com baixa densidade de conteúdo de fundo (fundo mais uniforme). Para os trabalhos futuros, novas técnicas para remover os ruídos presentes em imagens com alta densidade de conteúdo de fundo (fundo contendo muitos artefatos) devem ser desenvolvidas.

Palavras chave: segmentação de bacilos da tuberculose; reconhecimento de bacilos da tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; seleção de características; tuberculose; algoritmo *backpropagation*.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease transmitted by Koch's bacillus, or *Mycobacterium tuberculosis*. It is estimated that 1.4 million people died of tuberculosis in 2010, and 95% of them occurred in underdeveloped or developing countries. In Brazil are registered more than 68,000 new cases each year. Currently, Amazon is the Brazilian state with the highest incidence of the disease. One of the methods of tuberculosis diagnosis adopted by the Ministry of Health is the examination of sputum by bright field microscopy. Bacilloscopy is the count of bacilli in sputum slides containing samples of the patient, prepared and stained according to standard methodology. Over the past five years, research related to the recognition of tubercle bacilli using images obtained by bright field microscopy has been carried out aiming to automating this diagnostic method, due to the fact that the high number of smear tests performed by professionals induce visual fatigue and result in diagnostic errors. This work presents a new method for recognition and segmentation of tuberculosis bacilli images from slides containing the patient's pulmonary secretions, stained with Kinyoun. From these images were extracted pixel samples of bacilli responsible for training the classifier. The images were automatically grouped into two sets, according to the contents of the background. The proposed method selects an optimal set of color characteristics of the bacillus and background image, using the scalar feature selection method of characteristics. These characteristics were used in the input pixels multilayer perceptron classifier, trained by backpropagation algorithm. The optimal set of selected features, {G-I, Y-Cr, L-a, R-G, a}, from the color spaces RGB, HSI, YCbCr and Lab, combined with the perceptron network with 18 (eighteen) neurons in the first layer, 3 (three) in the second and 1 (one) in the third (03-01-18), resulted in an accuracy of 92.47% in the segmentation of the bacilli. The method performed better in images with low content density background (background more uniform). For future work, new techniques to remove the noise present in images with high content density of background should be developed.

Keywords: tuberculosis bacillus segmentation; tuberculosis bacillus recognition; *Mycobacterium tuberculosis*; feature selection; tuberculosis; backpropagation algorithm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa com a taxa de incidência da tuberculose no mundo em 2010.....	13
Figura 2 - Cubo de cores RGB.	20
Figura 3 - Representação gráfica do espaço de cores HSI.	21
Figura 4 - Espaço de cor $L^*a^*b^*$	23
Figura 5 - Hiperplano de decisão. Em um lado da linha $g(x) > 0$ e no outro $g(x) < 0$	28
Figura 6 - Interpretação geométrica do algoritmo <i>perceptron</i>	30
Figura 7 - Arquitetura do modelo <i>perceptron</i> básico.	31
Figura 8 - Classes w_1 e w_2 para o problema XOR.	32
Figura 9 - Linhas de decisão para um problema XOR utilizando um <i>perceptron</i> multicamada.	33
Figura 10 - Hiperplano formado por uma segunda camada para o problema XOR.....	34
Figura 11 - Arquitetura do <i>perceptron</i> de duas camadas para resolver o problema XOR.....	34
Figura 12 - Fluxo de processamento do algoritmo <i>backpropagation</i>	36
Figura 13 - Imagem obtida por microscopia de campo claro com os bacilos marcados por um especialista.	49
Figura 14 - Imagem R-G: As regiões claras são bacilos	49
Figura 15 - Imagem resultante do método de segmentação aplicado por Costa <i>et al.</i> (2008)..	50
Figura 16 - Imagens Originais.....	52
Figura 17 - Resultado da Segmentação.	52
Figura 18 - Resultado do método de segmentação proposto por Sadaphal <i>et al.</i>	53
Figura 19 - Resultado da Segmentação por Makkapati <i>et al</i> (2009).	55
Figura 20 - Resultados obtidos utilizando classificador de <i>pixel</i> de Mistura de Gaussianas sobreposto em 2 sub-imagens do conjunto de imagens teste.	61
Figura 21 - Porcentagem de <i>pixels</i> classificados corretamente para diferentes números de combinações de classificadores, adicionados em ordem decrescente de desempenho. ...	64
Figura 22 - Diagrama de blocos mostrando desde a etapa inicial de aquisição da imagem realizada em trabalho anterior por Kimura Junior (2010) até as etapas de reconhecimento de bacilos da TB em imagens baciloscópicas de campo claro.....	65
Figura 23 – Ambiente para a aquisição das imagens: um notebook, um monitor e uma máquina digital acoplada ao microscópio de campo claro.	68
Figura 24 - Diagrama de representação dos grupos de imagens de acordo com o conteúdo de fundo e densidade de bacilos.	69
Figura 25 - Exemplos de imagens de cada grupo.	70
Figura 26 - Diagrama de blocos com os métodos utilizados no trabalho de reconhecimento de bacilos da TB.	73
Figura 27 - (a) Imagem com alta densidade de conteúdo de fundo. (b) Imagem com baixa densidade de conteúdo de fundo.....	75
Figura 28 - Escala de tonalidade do espaço de cor HSI.	75
Figura 29 - Porcentagens em barra para todas as imagens dos grupos CFB e CFA.	76
Figura 30 - Exemplos de marcação: (a) bacilos; (b) bacilos duvidosos; (c) globia.....	78
Figura 31 – Imagens baciloscópicas: (a) Imagem original adquirida por Kimura Junior (2010). (b) Imagem com marcação dos bacilos, bacilos duvidosos e globias.....	78
Figura 32 - Exemplo de imagem com a contagem dos bacilos marcados.	79

Figura 33 - Utilização do comando <i>impixel</i> na ferramenta Matlab® para extração das amostras de <i>pixels</i> RGB de bacilos nas imagens.	80
Figura 34 - Amostras de <i>pixels</i> extraídas utilizando a ferramenta Matlab®	81
Figura 35 - (a) Imagem original do grupo CFAAD adquirida por Kimura Junior (2010). (b) Imagem resultado da aplicação do método de segmentação proposto neste trabalho.	89
Figura 36 - (a) Imagem resultado da classificação de bacilos sem utilizar filtro de área. (b) Imagem resultado da classificação de bacilos com pós-processamento utilizando filtro de área.	90
Figura 37 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFAAD.	97
Figura 38 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFABD.	98
Figura 39 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFBAD.	99
Figura 40 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFBAD.	100
Figura 41 - Aquecimento da Fucsina.	127
Figura 42 - Lavagem da Fucsina em água corrente.	127
Figura 43 - Formulário para Registro dos Resultados da Leitura.	130
Figura 44 - Campo microscópico dividido em quatro quadrantes.	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tabela-verdade para a função booleana XOR.....	32
Quadro 2 - Tabela-verdade para a execução das duas etapas de um problema XOR.	33
Quadro 3 - Critérios para Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia de escarro	41
Quadro 4 - Sumário da Revisão Bibliográfica.....	44
Quadro 5 - Resultado dos diagnósticos.	55
Quadro 6 - Resultados da primeira etapa de classificação.	62
Quadro 7 - Resultados da segunda etapa de classificação.....	62
Quadro 8 - Desempenho dos classificadores de pixel individualmente.	64
Quadro 9 - Distribuição das imagens nos grupos	71
Quadro 10 - Combinações de α_1 e α_2 utilizados na seleção de características	84
Quadro 11 - Seleção de quatro características utilizando diferentes	85
Quadro 12 - Conjunto de quatro características selecionadas de acordo com a frequência.	85
Quadro 13 - Combinações de n e m para formar 36 diferentes arquiteturas de rede.	87
Quadro 14 - Valores FDR calculados para cada característica	91
Quadro 15 - Conjuntos de características selecionadas para cada combinação de α_1 e α_2	92
Quadro 16 - Ranque das variáveis de acordo com a frequência com que foram selecionadas.	93
Quadro 17- Conjuntos de características selecionadas.....	94
Quadro 18 - Desempenho da melhor arquitetura da rede neural simulada (Arquitetura 18-3-1 combinada com o conjunto de 5 características).	94
Quadro 19 - Resultado da contagem dos bacilos por grupo de imagens e cálculo da sensibilidade.	95
Quadro 20 - Desempenho da segmentação de bacilos utilizando-se uma rede neural como classificador	96

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	17
CAPÍTULO II.....	19
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	19
2.1 INTRODUÇÃO	19
2.2 ESPAÇOS DE CORES.....	19
2.2.1 ESPAÇO DE COR RGB.....	19
2.2.2 ESPAÇO DE COR HSI	21
2.2.3 O ESPAÇO DE COR YCBCR.....	22
2.2.4 O MODELO DE COR LAB	23
2.3 SELEÇÃO ESCALAR DE CARACTERÍSTICAS.....	24
2.3.1 RAZÃO DE DISCRIMINAÇÃO DE FISCHER (FDR).....	24
2.3.2 CORRELAÇÃO CRUZADA	25
2.3.3 ALGORITMO DE SELEÇÃO ESCALAR DE CARACTERÍSTICAS	25
2.4 CLASSIFICADOR <i>PERCEPTRON</i> MULTICAMADA.....	26
2.4.1 INTRODUÇÃO	26
2.4.2 <i>PERCEPTRON</i>	28
2.4.3 <i>PERCEPTRON</i> MULTICAMADA	31
2.4.4 ALGORITMO <i>BACKPROPAGATION</i>	35
2.5 BACILOSCOPIA	39
2.5.1 MÉTODO DE COLORAÇÃO.....	40
2.5.2. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	40
CAPÍTULO III	42
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	42
3.1 INTRODUÇÃO	42
3.2 SEGMENTAÇÃO DE BACIOS DA TUBERCULOSE.....	48
3.3 CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS	56
3.4 TÉCNICAS DE SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ADOTADAS	58
3.5 MÉTODOS DE CLASSIFICAÇÃO UTILIZADOS	59
CAPÍTULO IV	65
MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1 MATERIAIS.....	66
4.1.1 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	66
4.1.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS.....	67
4.1.3 AVALIAÇÃO DO FOCO DAS IMAGENS.....	71
4.2 MÉTODOS	73
4.2.1 MÉTODO DE DISCRIMINAÇÃO DAS IMAGENS EM FUNÇÃO DO CONTEÚDO DO FUNDO.....	74
4.2.2 MARCAÇÃO DOS BACIOS NAS IMAGENS.....	77
4.2.3 COLETA DE AMOSTRAS DE <i>PIXEL</i>	79
4.2.4 SELEÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS.....	83
4.2.5 CLASSIFICAÇÃO DOS <i>PIXELS</i>	86
4.2.6 SEGMENTAÇÃO DOS BACIOS.....	88
4.2.7 PÓS-PROCESSAMENTO DAS IMAGENS.....	89
CAPÍTULO V.....	91

RESULTADOS	91
5.1 RESULTADOS DOS CONJUNTOS DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS	91
5.2 RESULTADOS DO CLASSIFICADOR DE <i>PIXELS</i>	94
5.3 RESULTADOS DA SEGMENTAÇÃO DOS BACILOS.....	95
CAPÍTULO VI	102
ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
CAPÍTULO VII.....	104
CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICE	109
ARTIGOS	109
ANEXOS	126
ANEXO A: DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE COLORAÇÃO <i>ZIEHL-NEELSEN</i>	126
ANEXO B: PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DA LEITURA E CONTAGEM DOS BACILOS	130

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença contagiosa que geralmente acomete os pulmões e é causada, na maioria dos casos, pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2010, 8,8 milhões de pessoas no mundo foram infectadas pela doença e 1,4 milhão de pessoas morreram (WHO, 2012). Apesar do número de casos de doenças e mortes por TB ter reduzido ao longo dos últimos anos, a doença ainda persiste como um grave problema de saúde nos países em desenvolvimento. Em 2010, 95% das mortes por TB foram registrados nestes países (WHO, 2012).

A Figura 1 mostra em destaque os 22 países com as maiores taxas de incidência de TB. A maioria dos casos de TB ocorre em países em desenvolvimento e representa 80% dos casos de TB no mundo (WHO, 2012).

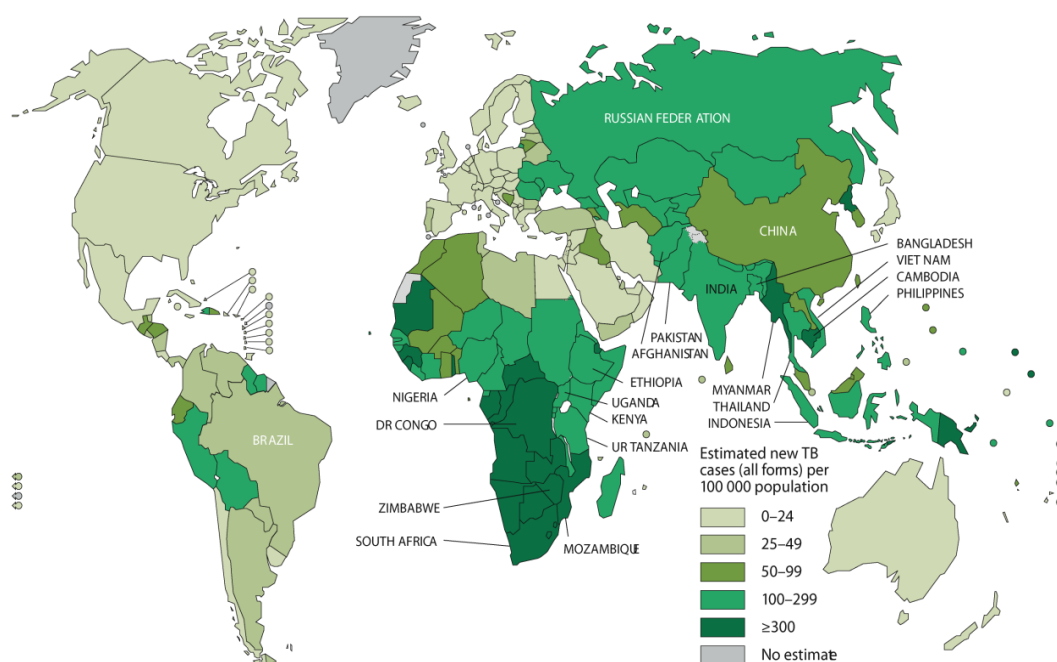


Figura 1 – Mapa com a taxa de incidência da tuberculose no mundo em 2010.

FONTE: WHO, 2012.

No Brasil são registrados mais de 68 mil novos casos de TB por ano. Entre os anos de 2001 e 2011, a região norte apresentou as maiores taxas de incidência da doença. Em 2011, o Amazonas apresentou a maior taxa de incidência do país, 62,6%, quando foram registrados 2.216 casos. No município de Manaus foram registrados, em 2011, 1.743 novos casos de TB (BRASIL, 2012).

Se mais de oito milhões de pessoas foram diagnosticadas em um ano, então, pode-se dizer que pelo menos oito milhões de exames diagnóstico foram realizados. A baciloscopia, um dos métodos de diagnóstico da TB, consiste na pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado segundo metodologia padronizada (BRASIL, 2001). Além de ser um método simples e seguro, a baciloscopia permite descobrir as fontes mais importantes de infecção da doença: os casos bacilíferos. Por isso esse método tem uma importância fundamental, tanto para o diagnóstico, como para o controle de tratamento e acompanhamento da doença (BRASIL, 2002).

A utilização rotineira do método de coloração de *Ziehl-Neelsen* ou de *Kinyoun* é recomendada pelo Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2001), pois utiliza microscopia de campo claro. A microscopia de campo claro é o método de utilização rotineira em países de alta incidência, tendo em vista que a microscopia de fluorescência exige equipamentos de alto custo, enquanto que os microscópios óticos de luz convencional, ou luz branca, possuem baixo custo (KUTLANG *et al.*, 2010).

Desses fatos, decorre a motivação dos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa em Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Amazonas (SENA, 2008; KIMURA JUNIOR, 2010; XAVIER, 2012) e, por conseguinte, o presente trabalho, qual seja, o de

contribuir para o desenvolvimento de métodos que auxiliem o diagnóstico da TB a partir de imagens baciloscópicas obtidas por meio da microscopia de campo claro.

O primeiro trabalho realizado pelo referido grupo, no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Amazonas (PPGEE-UFAM), em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), resultou em um método de identificação automática de *Mycobacterium tuberculosis* pela segmentação da imagem R-G, no qual R e G são componentes de cor do espaço de cores RGB (*Red, Green, Blue* – Vermelho, Verde, Azul). Nesse primeiro trabalho, a seleção das imagens em foco foi feita de forma manual por um especialista (SENA, 2008). O segundo trabalho consistiu em investigar nove métricas de autofoco, com o intuito de definir a melhor métrica para imagens de baciloscopia de tuberculose em microscopia de campo claro coradas pelo método de *Kinyoun* (KIMURA JUNIOR, 2010). O terceiro trabalho, desenvolvido paralelamente a este, utiliza uma máquina de vetores de suporte como classificador de *pixels* para segmentar os bacilos da TB, utilizando um vetor ótimo de características selecionadas como entrada (XAVIER, 2012).

Dessa forma, o trabalho proposto nessa dissertação tem por escopo o desenvolvimento de um novo método de reconhecimento de bacilos da tuberculose em imagens obtidas por microscopia de campo claro. A segmentação dos bacilos foi feita utilizando-se imagens com o foco previamente avaliado pela métrica de autofoco proposta por Kimura Junior (2010), a partir de lâminas de esfregaços corados pelo método *Kinyoun*. Uma vez que as imagens já foram capturadas e o foco avaliado, a primeira etapa do trabalho consistiu em estabelecer uma base de dados com informações de cor de *pixels* de bacilos e não-bacilos, extraídas de imagens com bacilos previamente identificados por um especialista. A segunda etapa abordou

a seleção de um conjunto de características que mais influenciam na diferenciação entre os bacilos e o fundo. Como etapa seguinte implementou-se um classificador de *pixels* empregando redes neurais artificiais para classificar os *pixels* como pertencentes ou não a um bacilo. A última etapa consistiu na segmentação dos bacilos em imagens de baciloscopia de campo claro, utilizando o classificador de redes neurais artificiais que obteve melhor resultado na etapa anterior.

1.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar e desenvolver uma nova técnica de reconhecimento de padrões para a segmentação e identificação de bacilos da tuberculose, em imagens de baciloscopia de campo claro, por meio do emprego de um método de classificação de *pixels*, bem como a utilização de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir uma base de dados com imagens de baciloscopia de campo claro no formato RGB, com os bacilos identificados e validados por um especialista em baciloscopia;
- Construir uma base de dados com informações RGB de *pixels* provenientes de imagens de baciloscopia de campo claro, de lâminas coradas segundo o método de *Kinyoun*;
- Selecionar um conjunto ótimo de características para o processo de reconhecimento de bacilos da tuberculose, utilizando seleção escalar de características;
- Estudar e propor o algoritmo *Backpropagation* como método de classificação de *pixels* provenientes de imagens de baciloscopia de campo claro, de modo a classificá-los em duas classes: bacilo e fundo (*background*).

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação estrutura-se da seguinte maneira:

- Capítulo I: Introdução;
- Capítulo II: Fundamentos Teóricos;
- Capítulo III: Revisão bibliográfica;
- Capítulo IV: Materiais e Métodos;
- Capítulo V: Resultados;
- Capítulo VI: Análise dos Resultados e Discussão;
- Capítulo VII: Conclusão;
- Referências;
- Apêndice;
- Anexos.

O Capítulo II esclarece os principais fundamentos teóricos necessários para o desenvolvimento deste trabalho: Os espaços de cores RGB (*Red, Green, Blue* – Vermelho, Verde, Azul), HSI (*hue, saturation, intensity* – matiz, saturação, intensidade), YCbCr (*Luminance, Chrominance Blue, Chrominance Red* – Luminância, Crominância Azul, Crominância Vermelha) e Lab (L = Luminosidade, a = tonalidade verde-vermelha e b = tonalidade azul-amarela); a técnica de seleção escalar de característica com as medidas de separabilidade Razão de Discriminação de Fischer (*Fisher's discriminant ratio* - FDR) e correlação cruzada; o classificador *perceptron* multicamada e o algoritmo *backpropagation*; e o exame microscópico de baciloscopia com o método de coloração de *Kinyoun* adaptado.

O Capítulo III apresenta os trabalhos pesquisados em bases de dados literárias relacionados ao reconhecimento de bacilos da TB em imagens de baciloscopia.

O Capítulo IV expõe os materiais utilizados e cada método empregado para o presente trabalho.

O Capítulo V mostra os resultados obtidos para a seleção do conjunto ótimo de características, classificação dos *pixels* e segmentação dos bacilos.

O Capítulo VI apresenta a discussão e análise dos resultados obtidos, comparando, quando possível, com os resultados obtidos na literatura relacionada.

O Capítulo VII aborda as conclusões, os trabalhos futuros e os objetivos alcançados neste trabalho.

Ao final, os Apêndices apresentam o artigo publicado no XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Computação (CSBC 2012) realizado em Curitiba, Paraná, de 16 a 19 de julho de 2012, e o artigo aceito no *34th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society “Engineering Innovation in Global Health”* (EMBC 2012) realizado em San Diego, Estados Unidos da América em 2012.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo, os principais conceitos necessários para o desenvolvimento deste trabalho serão apresentados. O primeiro momento tratará da temática a respeito dos espaços de cores investigados, isto é, RGB, HSI (*hue, saturation, intensity* – matiz, saturação, intensidade), YCbCr (*Luminance, Chrominance Blue, Chrominance Red* – Luminância, Crominância Azul, Crominância Vermelha) e Lab (L = Luminosidade, a = tonalidade verde-vermelha e b = tonalidade azul-amarela). A segunda análise buscará delinear a técnica de seleção escalar de característica e as seguintes medidas de separabilidade de classe: Razão de Discriminação de Fischer (*Fisher's discriminant ratio* - FDR) e correlação cruzada. E por último, realizar-se-á breve exposição acerca dos fundamentos relativos ao método de classificação adotado, o *perceptron* multicamada e o algoritmo *backpropagation*.

2.2 ESPAÇOS DE CORES

Um espaço ou modelo de cor constitui-se de uma especificação de um sistema de coordenadas e de um subespaço dentro desse sistema onde cada cor é representada por um único ponto (GONZALEZ; WOODS, 2008).

2.2.1 ESPAÇO DE COR RGB

O espaço de cor RGB é de grande relevância em processamento digital de imagens, pois a maioria das câmeras utiliza esse formato para aquisição de imagens digitais. Esse

espaço de cor é baseado em um sistema de coordenadas cartesianas onde o subespaço de cores é um cubo, como mostrado na Figura 2. Nos cantos (vértices) do cubo estão as cores primárias R (*red*, vermelho), G (*green*, verde) e B (*blue*, azul). As cores primárias complementares ciano, magenta e amarelo estão em outros três vértices. O preto encontra-se na origem do sistema; e o branco está no vértice mais afastado da origem. Neste modelo, a escala de níveis de cinza (pontos de valores R, G e B iguais) estendem-se do preto ao branco, ao longo da linha diagonal que une esse dois pontos. Geralmente assume-se que os valores de R, G e B estão normalizados, ou seja, estão no intervalo entre 0 e 1 (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

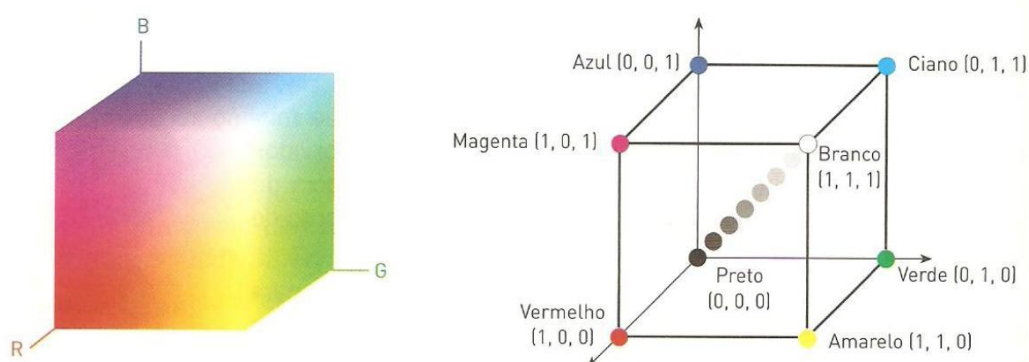


Figura 2 - Cubo de cores RGB.

FONTE: Adaptado de GONZALEZ e WOODS, 2008.

A imagem no formato RGB é constituída de três planos de imagens independentes, um plano para cada um dos componentes de cores primárias (R, G e B). Desse modo, as imagens no formato RGB são expressas em termos de três planos de cores (GONZALEZ; WOODS, 2008).

2.2.2 ESPAÇO DE COR HSI

O espaço de cor HSI consiste de três atributos correspondentes a cada uma dos componentes: H – tonalidade ou matiz (*hue*), S - saturação (*saturation*) e I – intensidade (*intensity*). A Tonalidade (ou matiz) é um atributo que descreve uma cor pura (amarelo puro, laranja ou vermelho) e a saturação refere-se à pureza ou quantidade de luz branca misturada a tonalidade. As cores puras do espectro são totalmente saturadas. O grau de saturação, portanto, é inversamente proporcional a quantidade de luz branca adicionada (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Uma representação gráfica do modelo HSI no espaço tridimensional consiste em uma estrutura piramidal como a mostrada na Figura 3.

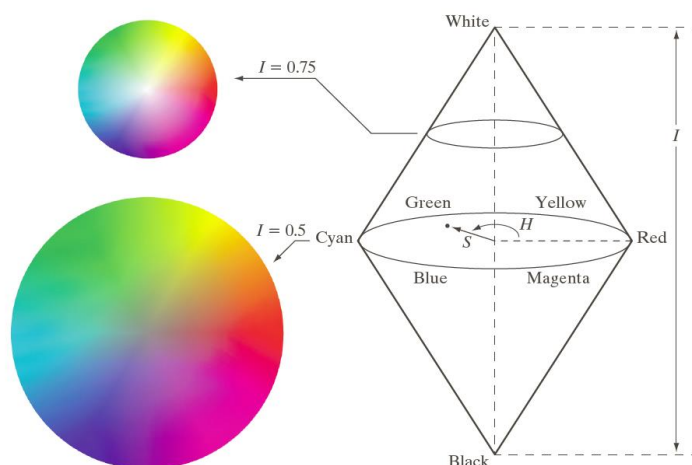


Figura 3 - Representação gráfica do espaço de cores HSI.

FONTE: Adaptado de GONZALEZ e WOODS, 2008.

Os componentes do espaço HSI são: o eixo vertical de intensidade (I), o comprimento do vetor (medido da origem a um ponto de cor) (S), e o ângulo que esse vetor faz com o eixo vermelho (H). Assim, quando $H = 0^\circ$, a cor é vermelha, quando $H = 120^\circ$, a cor é verde, e assim por diante. Ainda, quanto mais distante do centro estiver o ponto de cor, maior é a

saturação. Por fim, o componente de intensidade I é medida por uma linha perpendicular à base piramidal. Quanto mais próxima estiver do preto, a intensidade é mais escura, e quanto mais próxima do branco, a intensidade é mais clara (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Os componentes do espaço de cor HSI podem ser obtidos a partir dos componentes do modelo RGB, segundo as seguintes expressões (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008):

$$H = \cos^{-1} \left(\frac{(R-G) + (R-B)}{2\sqrt{(R-G)^2 + (R-B)(G-B)}} \right) \quad (1)$$

$$S = 1 - \frac{3 \min(R,G,B)}{R+G+B} \quad (2)$$

$$I = \frac{R+G+B}{3} \quad (3)$$

Se $B > G$, então $H = 360 - H$. Assume-se que R , G e B foram normalizados para o intervalo entre 0 e 1. A intensidade I e a saturação estão normalizadas entre 0 e 1 e o matiz H varia entre 0 e 360° (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

2.2.3 O ESPAÇO DE COR YCbCr

O espaço de cor YCbCr é mais utilizado em sistemas de vídeos digitais onde o componente Y representa a luminância e os componentes Cb e Cr representam a crominância. A Luminância, ou brilho, representa a noção de intensidade luminosa da radiação e a crominância é o matiz (ou tonalidade) e saturação tomados juntos. A informação de cor armazenada em Cb é a diferença entre a cor azul e um valor de referência, já em Cr , a informação armazenada é a diferença entre a cor vermelha e um valor de referência. Pode-se converter o espaço de cor RGB para o YCbCr utilizando a equação 4 (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008):

$$\begin{bmatrix} Y \\ Cb \\ Cr \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,299 & 0,587 & 0,114 \\ -0,169 & -0,331 & 0,5 \\ 0,5 & -0,419 & -0,081 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (4)$$

2.2.4 O MODELO DE COR Lab

A Comissão Internacional de Iluminação (CIE – do francês *Commission Internationale d'Eclairage*) desenvolveu, em 1931, um modelo de cor baseado na maneira como o homem percebe a cor, utilizando as faixas de cores vermelha (X), verde (Y) e azul (Z) do espectro visível. No modelo de cores XYZ, as cores primárias X, Y e Z estão linearmente relacionadas com o modelo RGB como mostra a equação (5) (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008):

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.490 & 0.310 & 0.200 \\ 0.177 & 0.813 & 0.010 \\ 0.000 & 0.010 & 0.990 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (5)$$

Em 1976, a CIE propôs dois sistemas de cores baseado no modelo XYZ, um deles é o CIE $L^*a^*b^*$. No espaço de cor Lab, L relaciona-se à luminosidade e varia do preto para o branco (0 – 100). A informação de cromaticidade está em a e b que correspondem às tonalidades verde-vermelha e azul-amarela, respectivamente (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008). A Figura 4 ilustra o espaço de cor $L^*a^*b^*$ com as representações das cores em cada canal.

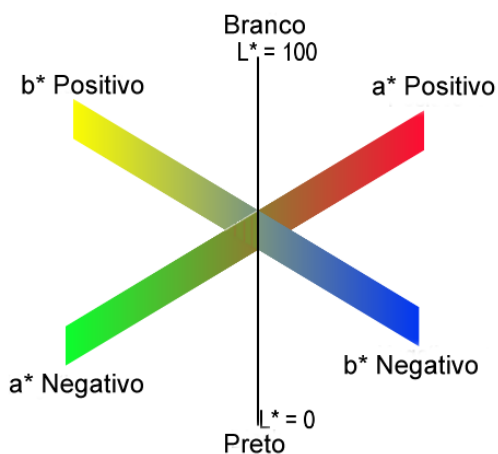


Figura 4 - Espaço de cor $L^*a^*b^*$.

FONTE: Adaptado de CRUSE, 1997.

Esse espaço de cor é definido pelas equações a seguir (OHTA; ROBERTSON, 2005):

$$L^* = 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16 \quad (6)$$

$$a * = 500\{(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}\} \quad (7)$$

$$b * = 200\{(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}\} \quad (8)$$

Onde:

$$X/X_n > (24/116)^3, Y/Y_n > (24/116)^3, Z/Z_n > (24/116)^3$$

$$\text{e } (24/116)^3 \approx 0.008856$$

2.3 SELEÇÃO ESCALAR DE CARACTERÍSTICAS

Esta técnica consiste na seleção de um subconjunto de características a partir de um conjunto de características, considerando-as de forma individual, ou seja, como escalares. Uma medida de separabilidade de classes é o critério utilizado nesse processo de seleção. Inicialmente, essa medida é calculada para cada característica. Em seguida esses valores são ordenados e as melhores características são selecionadas.

No processo de seleção escalar das características que melhor separam *pixels* de bacilos de *pixels* de fundo, no presente trabalho, foi utilizado a Razão de Discriminação de Fischer (FDR) para a seleção da primeira característica. Posteriormente, para selecionar as demais características que melhor complementam a primeira selecionada, empregou-se o conceito de correlação cruzada e o método de seleção escalar de características.

2.3.1 RAZÃO DE DISCRIMINAÇÃO DE FISCHER (FDR)

De acordo com Theodoridis e Koutroumbas (2006), FDR é utilizada para validar o grau de separação individual de características e é definido como:

$$FDR = \frac{(\mu_1 - \mu_2)}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2} \quad (9)$$

Onde μ_1 e σ_1^2 representam a média e o desvio padrão da amostra da classe ω_1 e μ_2 e σ_2^2 representam a média e o desvio padrão da amostra da classe ω_2 , respectivamente.

Para selecionar a primeira característica, calcula-se o valor FDR para todas as características, ordenam-se as mesmas em ordem decrescente, e seleciona-se a característica com o maior resultado.

2.3.2 CORRELAÇÃO CRUZADA

Adicionalmente, para se levar em conta a correlação existente entre as características, pode-se adotar o coeficiente de correlação cruzada (ρ_{ij}) (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006):

$$\rho_{ij} = \frac{\sum_{n=1}^N x_{ni}x_{nj}}{\sqrt{\sum_{n=1}^N x_{ni}^2 \sum_{n=1}^N x_{nj}^2}} \quad (10)$$

Onde:

x_{nk} é a k -ésima característica do n -ésimo padrão sendo $n = 1, 2, \dots, N$ e $k = 1, 2, \dots, m$.

i e j referem-se a padrões diferentes, ou seja, cada um representa uma classe.

2.3.3 ALGORITMO DE SELEÇÃO ESCALAR DE CARACTERÍSTICAS

De forma resumida, o processo para selecionar um subconjunto com l características de um conjunto com m características, envolve os seguintes passos:

- Para selecionar a primeira característica, calcula-se o valor FDR para todas as características $x_k, k = 1, 2, \dots, m$. Ordenam-se, decrescentemente, as mesmas em função do valor do FDR e escolhe-se a característica com o maior valor FDR.

- Para seleccionar a segunda característica leva-se em conta a correlação entre as características já seleccionadas. Valendo-se do coeficiente de correlação cruzada definido na equação 10, calcula-se a correlação entre a característica escolhida anteriormente e as $m-1$ demais características. A segunda característica é seleccionada utilizando a expressão 11:

$$i_2 = \arg \max_j \{ \alpha_1 C(j) - \alpha_2 |\rho_{i_1, j}| \} \quad \text{para todo } j \neq i_1 \quad (11)$$

Onde α_1 e α_2 são fatores de peso que determinam a relativa importância dos dois termos e $C(j)$ é o critério de separabilidade adotado para a característica j , ou seja o FDR.

- Para seleccionar as demais características, $x_{i_k}, k = 3, \dots, l$, utiliza-se a equação 12 que leva em conta a correlação média com todas as características seleccionadas previamente (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006):

$$i_k = \arg \max_j \left\{ \alpha_1 C(j) - \frac{\alpha_2}{k-1} \sum_{r=1}^{k-1} |\rho_{i_r, j}| \right\} \quad \text{para } j \neq i_r \quad (12)$$

$$r = 1, 2, \dots, k-1$$

2.4 CLASSIFICADOR *PERCEPTRON* MULTICAMADA

2.4.1 INTRODUÇÃO

Rede neural é uma ferramenta computacional poderosa para a solução de problemas complexos em aplicações do mundo real. As redes neurais são sistemas de processamento paralelo que tem o seu funcionamento inspirado na estrutura física do cérebro humano. O sistema é composto por unidades (neurônios ou nós) que ficam dispostos em uma ou mais camadas e se interligam por conexões que, na maioria dos modelos, estão associadas a pesos, os quais guardam o conhecimento que a rede adquiriu do ambiente. Seu maior atrativo está na

capacidade de aprender (aprendizagem) com exemplos e generalizar o que aprendeu dando respostas coerentes para dados não conhecidos (BRAGA *et al.*, 2000).

Em outras palavras, pode-se dizer que uma rede neural é um sistema composto por vários neurônios interligados por conexões sinápticas. Os neurônios que recebem estímulos do exterior são chamados neurônios de entrada, os que se comunicam o meio externo são chamados neurônios de saída e os demais são conhecidos como neurônios intermediários ou ocultos (*hidden*). Segundo Theodoridis e Koutroumbas (2006), essa camada confere à rede a capacidade de resolver problemas que não são linearmente separáveis.

A aprendizagem, ou treinamento, é um processo iterativo pelo qual os pesos das conexões da rede neural são ajustados através de uma forma de estímulo contínuo do ambiente no qual a rede está operando. A maneira particular de ajustar os pesos define o tipo específico de aprendizagem. Os métodos de aprendizagem podem ser divididos em dois grupos: aprendizado supervisionado e aprendizado não supervisionado. O aprendizado supervisionado é assim chamado por possuir um ‘supervisor’ externo que fornece a entrada e a saída desejada da rede, além de ajustar os pesos das conexões a fim de minimizar o erro. A medida do erro é efetuada comparando-se a saída obtida com a saída desejada. O aprendizado não supervisionado, como o próprio nome sugere, não possui um ‘supervisor’. Somente os padrões de entrada são disponíveis (BRAGA *et al.*, 2000).

O *perceptron* pode ser utilizado como classificador linear ou como um classificador para problemas que não são linearmente separáveis.

Para classes não separáveis utiliza-se uma importante categoria de rede neural, o *perceptron* multicamada. em conjunto com o algoritmo de treinamento supervisionado mais conhecido, o algoritmo *backpropagation* (HAYKIN, 1999).

Para entender melhor o *perceptron* multicamada, discorre-se inicialmente sobre o conceito de *perceptron*.

2.4.2 PERCEPTRON

Segundo Theodoridis e Koutroumbas (2006), em classes separáveis o hiperplano de separação para um vetor de características de tamanho l é definido pela equação 13.

$$g(\mathbf{x}) = \mathbf{w}^T \mathbf{x} + w_0 = 0 \quad (13)$$

Onde $\mathbf{w} = [w_1, w_2, \dots, w_l]^T$ é o vetor de pesos, $\mathbf{x}$ é o vetor de características, e w_0 a polarização. Para $\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2$, dois pontos no hiperplano de separação, tem-se

$$\begin{aligned} 0 &= \mathbf{w}^T \mathbf{x}_1 + w_0 = \mathbf{w}^T \mathbf{x}_2 + w_0 \Rightarrow \\ \mathbf{w}^T (\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_2) &= 0 \end{aligned} \quad (14)$$

A Figura 5 apresenta o gráfico do hiperplano de separação. Observa-se pela equação 14 e pela Figura 5 que $\mathbf{w}$ é ortogonal ao hiperplano de decisão.

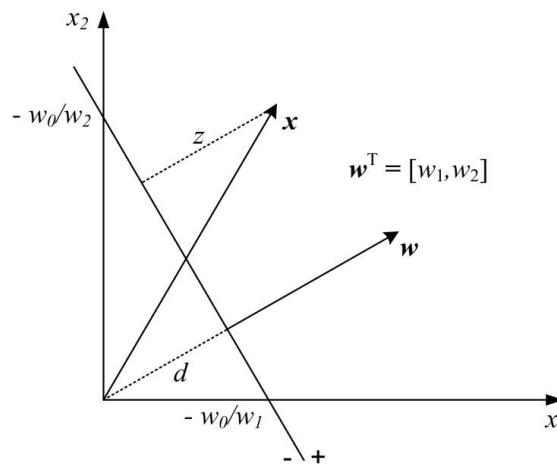


Figura 5 - Hiperplano de decisão. Em um lado da linha $g(\mathbf{x}) > 0$ e no outro $g(\mathbf{x}) < 0$.

FONTE: Adaptado de THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

Os valores de d e z podem ser calculados pelas equações 15 e 16.

$$d = \frac{|w_0|}{\sqrt{w_1^2 + w_2^2}} \quad (15)$$

$$z = \frac{|g(x)|}{\sqrt{w_1^2 + w_2^2}} \quad (16)$$

onde $|w_0|$ é a medida da distancia euclidiana do ponto $\mathbf{x}$ no hiperplano de separação. Um lado do plano $g(\mathbf{x})$ é positivo (+) e o outro é negativo (-). Quando $w_0 = 0$, o hiperplano passa pela origem.

O Algoritmo *perceptron* utiliza a equação 17 para estimar o vetor peso da interação $t+1$:

$$\mathbf{w}(t+1) = \mathbf{w}(t) - \rho_t \sum_{x \in Y} \delta_x \mathbf{x} \quad (17)$$

onde $\mathbf{w}(t)$ é o vetor peso estimado na t -ésima interação, ρ_t é a sequencia de números reais positivos, $\sum_{x \in Y} \delta_x \mathbf{x}$ o vetor de correção formado utilizando as características classificadas erroneamente.

O Algoritmo é inicializado com um valor do vetor de pesos $\mathbf{w}(0)$ arbitrário. O vetor de pesos é corrigido de acordo com a equação 17. O algoritmo é repetido até convergir para a solução, ou seja, até que todas as características sejam classificadas corretamente. A interpretação geométrica da implementação do algoritmo está representada no gráfico da Figura 6.

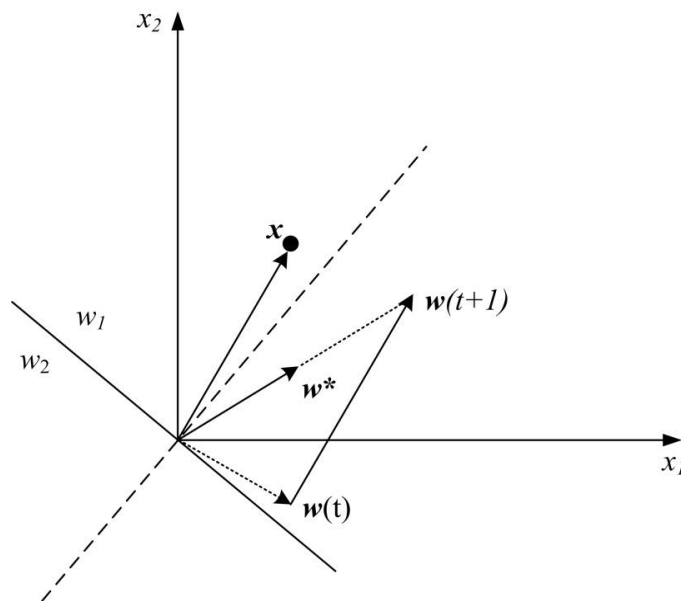


Figura 6 - Interpretação geométrica do algoritmo *perceptron*.

FONTE: THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

O algoritmo *perceptron* corrige o vetor de pesos na direção de $\mathbf{x}$. A intenção é girar o hiperplano para que $\mathbf{x}$ seja classificado na classe correta, e o modo para alcançar isto é realizando mais de uma interação.

Uma vez que o algoritmo *perceptron* convergiu para um vetor de pesos $\mathbf{w}$ e uma polarização w_0 , o objetivo é a classificação de um vetor de características desconhecido. As regras para a classificação em duas classes são descritas nas equações 18 e 19.

$$\text{se } \mathbf{w}^T \mathbf{x} + w_0 > 0 \quad \text{atribuir } x \text{ para } w_1 \quad (18)$$

$$\text{se } \mathbf{w}^T \mathbf{x} + w_0 < 0 \quad \text{atribuir } x \text{ para } w_2 \quad (19)$$

A arquitetura da rede que implementa essa operação é exibida na Figura 7.

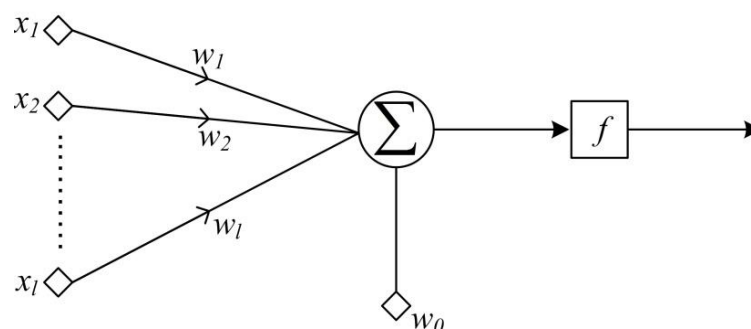


Figura 7 - Arquitetura do modelo *perceptron* básico.

FONTE: THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

As características $x_1, x_2, \dots, x_l$ são inseridas nos nós de entrada da rede. Então cada uma das características é multiplicada pelo correspondente peso w_i , $i = 1, 2, \dots, l$. Isso é conhecido como sinapse. Os produtos são adicionados junto com a polarização w_0 e o resultado então passa pela função de ativação $f(\cdot)$. Uma função de ativação comum é a função degrau [$f(x) = -1$ se $x < 0$ e $f(x) = 1$ se $x > 0$]. Em seguida, o correspondente vetor de características é classificado de acordo com o valor da saída. Além de 1 e -1, outros valores para rotular as classes também são possíveis (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

2.4.3 PERCEPTRON MULTICAMADA

Para entender melhor os problemas que não são separáveis linearmente, um típico exemplo de tal problema será apresentado, a função booleana **XOR**.

O problema de separação linear da função booleana XOR

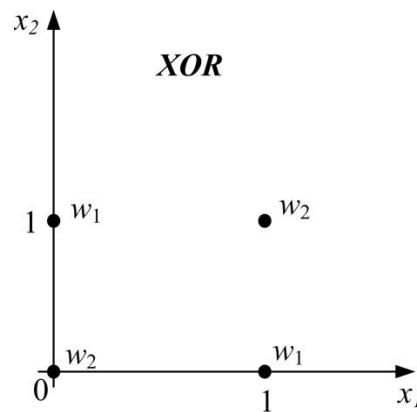
A função booleana **OU (OR) EXCLUSIVO (XOR)** pode ser interpretada como uma tarefa de classificação. Dependendo dos valores de uma entrada binária x , a saída pode ser 0 (zero) ou 1 (um), e x classificado em uma das duas classes. A tabela verdade da função **XOR** esta apresentada no Quadro 1 (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

Quadro 1 - Tabela-verdade para a função booleana XOR.

x_1	x_2	XOR	Classe
0	0	0	w_2
0	1	1	w_1
1	0	1	w_1
1	1	0	w_2

FONTE: Adaptado de THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

A Figura 8 mostra a posição das classes no plano espacial. É notável que não existe uma linha que separe as duas classes w_1 e w_2 .

Figura 8 - Classes w_1 e w_2 para o problema XOR.

FONTE: Adaptado de THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

Uma linha não separa a classe w_1 de w_2 , é necessário utilizar duas linhas. A Figura 9 mostra as possíveis linhas, $g_1(x)$ e $g_2(x)$, bem como as regiões para cada classe. A região, à direita de $g_1(x)$ e à esquerda de $g_2(x)$ (dentro da região sombreada), corresponde à classe w_1 . A classe w_2 corresponde às regiões à esquerda de $g_1(x)$ e $g_2(x)$, e à direita de $g_1(x)$ e $g_2(x)$ (fora da região sombreada) (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

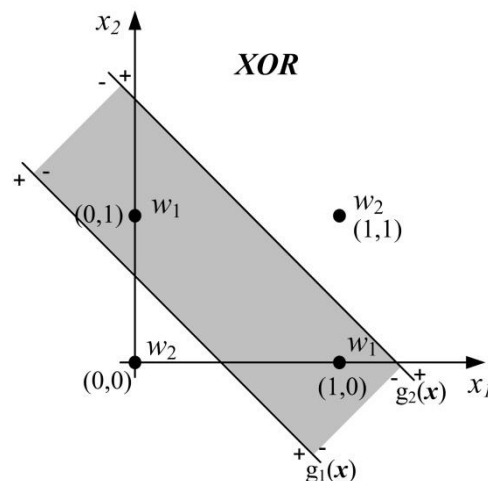


Figura 9 - Linhas de decisão para um problema XOR utilizando um *perceptron* multicamada.

FONTE: Adaptado de THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

Serão executadas duas etapas para obter as duas linhas de decisão (hiperplanos). Na primeira etapa calcula-se a posição de um vetor de características $\mathbf{x}$ em relação aos hiperplanos. Na segunda etapa combinam-se os resultados da primeira etapa e encontra-se a posição de $\mathbf{x}$ em relação aos hiperplanos. (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

Dois *perceptrons* com entradas x_1 e x_2 e apropriados pesos sinápticos são utilizados durante a primeira etapa. As saídas correspondentes são $y_1 = f(g_1(\mathbf{x}))$ e $y_2 = f(g_2(\mathbf{x}))$, onde a função de ativação $f(\cdot)$ é uma função degrau com níveis 0 (zero) e 1 (um). O Quadro 2 sintetiza os valores de saída para todas as combinações de entrada. Resumindo, a execução da primeira etapa realiza um mapeamento do vetor de entrada $\mathbf{x}$ para um novo vetor $\mathbf{y} = [y_1, y_2]^T$.

Quadro 2 - Tabela-verdade para a execução das duas etapas de um problema XOR.

Primeira etapa				Segunda etapa
x_1	x_2	y_1	y_2	
0	0	0	0	$w_2(0)$
0	1	1	0	$w_1(1)$
1	0	1	0	$w_1(1)$
1	1	1	1	$w_2(0)$

FONTE: Adaptado de THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

O próximo passo agora é separar a classe w_2 ($[y_1, y_2] = [0, 0]$ e $[y_1, y_2] = [1, 1]$) da classe w_1 ($[y_1, y_2] = [1, 0]$). A solução para essa etapa é traçar um terceiro hiperplano (vide Figura 10), que pode ser computado por uma segunda camada.

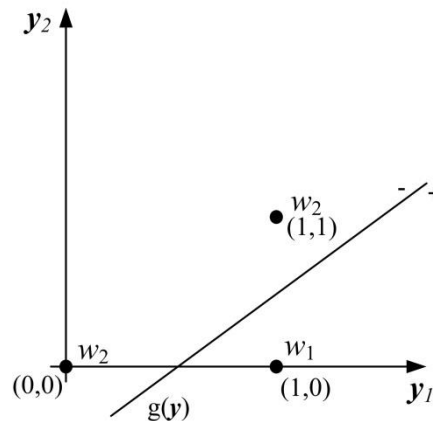


Figura 10 - Hiperplano formado por uma segunda camada para o problema XOR.

FONTE: Adaptado de THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

Cada um dos três hiperplanos é calculado através de um neurônio com o apropriado peso sináptico. A Figura 11 apresenta a arquitetura de uma rede multicamada que pode ser um possível resultado para essas etapas. Os dois neurônios da primeira camada executam a primeira etapa, eles constituem a chamada *camada intermediária* (ou oculta).

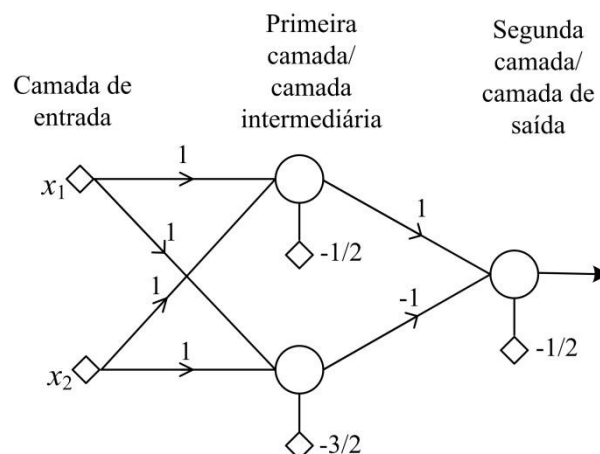


Figura 11 - Arquitetura do *perceptron* de duas camadas para resolver o problema XOR.

FONTE: Adaptado de THEODORIDIS e KOUTROUMBAS, 2006.

O neurônio da segunda camada realiza a segunda etapa e constitui a *camada de saída*. Os dados de entrada são aplicados na *camada de entrada*, onde o número de nós é igual a dimensão do espaço de entrada. As equações 20 e 21 representam os processamentos realizados para a primeira camada e a equação 22 representa o processamento realizado pela segunda camada do *perceptron*.

$$g_1(\mathbf{x}) = x_1 + x_2 - \frac{1}{2} = 0 \quad (20)$$

$$g_2(\mathbf{x}) = x_1 + x_2 - \frac{3}{2} = 0 \quad (21)$$

$$g(\mathbf{y}) = y_1 - y_2 - \frac{1}{2} = 0 \quad (22)$$

2.4.4 ALGORITMO BACKPROPAGATION

O Algoritmo *backpropagation* é o algoritmo de aprendizado supervisionado mais conhecido para treinamento de redes multicamadas. Esse algoritmo é utilizado para ajustar os pesos das camadas intermediárias com o objetivo de minimizar a função de custo da saída da rede. O treinamento ocorre em duas fases, que percorrem sentidos opostos: *forward* (para frente) e *backward* (para trás) (vide Figura 12). A fase *forward* utiliza um padrão de entrada para definir a saída da rede. Os dados seguem o sentido *forward* da entrada para a saída. A fase *backward* usa a saída desejada e a saída da rede para ajustar os pesos das conexões. Os erros seguem o sentido *backward* da saída para a entrada (BRAGA *et al.*, 2000).

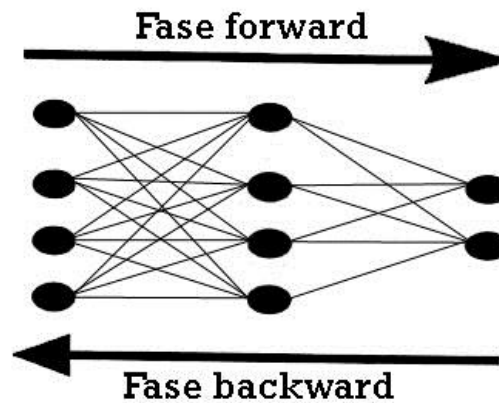


Figura 12 - Fluxo de processamento do algoritmo *backpropagation*.

FONTE: BRAGA *et al.*, 2000.

O objetivo agora é obter um algoritmo de treinamento iterativo que calcula os pesos sinápticos para que uma função de custo escolhida apropriadamente seja minimizada. Assume-se que a rede consiste de um número fixo L de camadas, com k_0 nós na camada de entrada e k_n neurônios na n -ésima camada, para $n = 1, 2, \dots, L$. Todos os neurônios empregam a mesma função de ativação, sendo esta uma função sigmoide (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

As funções sigmoides são funções que se aproximam da função degrau. A função logística apresentada na equação 23 é uma função sigmoide

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-ax}} \quad (23)$$

onde a é um parâmetro de inclinação.

Uma variação da função logística é o antissimétrico em relação à origem, tal que $f(-x) = -f(x)$ e é definida como apresentada na equação 24.

$$f(x) = \frac{2}{1 + e^{-ax}} - 1 \quad (24)$$

A minimização da função de custo J (equação 26) pode ser alcançada através de técnicas iterativas. O método de gradiente descendente será o método adotado para esta

minimização. Seja $\mathbf{w}_j^n$ o vetor de pesos (incluindo o limiar) o j -ésimo neurônio na n -ésima camada, o qual é um vetor de dimensão $k_{n-1} + 1$ e é definido como $\mathbf{w}_j^n = [w_{j0}^n, w_{j1}^n, \dots, w_{jk_{n-1}}^n]^T$. A expressão representada na equação 25 apresenta o passo de interação básico do algoritmo (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

$$\mathbf{w}_j^n(\text{novo}) = \mathbf{w}_j^n(\text{antigo}) + \Delta \mathbf{w}_j^n \quad (25)$$

$$\text{Com} \quad \Delta \mathbf{w}_j^n = -\mu \frac{\partial J}{\partial \mathbf{w}_j^n} \quad (26)$$

onde $\Delta \mathbf{w}_j^n$ é o termo de correção para obter o próximo valor estimado de pesos $\mathbf{w}_j^n(\text{novo})$ e $\mathbf{w}_j^n(\text{antigo})$ é o valor estimado atual dos pesos.

A equação 27 apresenta a função de custo

$$J = \sum_{i=1}^N \varepsilon(i) \quad (27)$$

onde ε é uma função que depende de $\hat{\mathbf{y}}(i)$ (saída da rede) e $\mathbf{y}(i)$ (saída desejada), $i = 1, 2, \dots, N$. Por exemplo, pode-se escolher $\varepsilon(i)$ como a soma dos erros quadráticos definida na equação 28 (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

$$\varepsilon(i) = \frac{1}{2} \sum_{m=1}^{k_L} (y_m(i) - \hat{y}_m(i))^2, \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (28)$$

Para o cálculo do termo de correção na equação 26 é necessário o cálculo do gradiente da função de custo J em relação aos pesos (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

A seguir será apresentado o cálculo dos gradientes.

Pela regra da cadeia tem-se

$$\frac{\partial \varepsilon(i)}{\partial \mathbf{w}_j^n} = \frac{\partial \varepsilon(i)}{\partial v_j^n(i)} \frac{\partial v_j^n(i)}{\partial \mathbf{w}_j^n} \quad (29)$$

Onde v_j^n é o argumento da função de ativação $f(\cdot)$ do ultimo neurônio e pode ser calculado como mostra a equação 30.

$$v_j^n = \sum_{k=1}^{k_{n-1}} w_{jk}^n y_k^{n-1}(i) + w_{j0}^n \equiv \sum_{k=0}^{k_{n-1}} w_{jk}^n y_k^{n-1}(i) \quad (30)$$

para o qual $y_k^{n-1}(i)$ é a saída do k -ésimo neurônio, $k = 1, 2, \dots, k_{n-1}$ na $(n-1)$ -ésima camada para o i -ésimo par de treinamento e w_{jk}^n o valor estimado atual do correspondente peso para o j -ésimo neurônio na n -ésima camada, com $j = 1, 2, \dots, k_n$. E por definição, $y_0^n(i) \equiv +1, \forall n, i$ (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

Da equação 29 obtém-se

$$\frac{\partial}{\partial w_j^n} v_j^n(i) \equiv \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial w_{j0}^n} v_j^n(i) \\ \vdots \\ \frac{\partial}{\partial w_{jk_{n-1}}^n} v_j^n(i) \end{bmatrix} = \mathbf{y}^{n-1}(i) = \begin{bmatrix} +1 \\ y_1^{n-1} \\ \vdots \\ y_{k_{n-1}}^{n-1}(i) \end{bmatrix} \quad (31)$$

A derivada $\frac{\partial \varepsilon(i)}{\partial v_j^n(i)}$ pode ser abreviada para $\frac{\partial \varepsilon(i)}{\partial v_j^n(i)} \equiv \delta_j^n(i)$. Então a equação 26 torna-se

$$\Delta \mathbf{w}_j^n = -\mu \sum_{i=1}^N \delta_j^n(i) \mathbf{y}^{n-1} \quad (32)$$

A Seguir utilizando as equações definidas por Theodoridis e Koutroumbas (2006), será calculado $\delta_j^n(i)$ para o caso especial dos mínimos quadrados.

O cálculo começa a partir de $n = L$ e propaga para trás (*backward*) para $n = L - 1, L - 2, \dots, 1$. Então tem-se que para $n = L$

$$\delta_j^n(i) = \frac{\partial \varepsilon(i)}{\partial v_j^L(i)} \quad (33)$$

$$\varepsilon(i) \equiv \frac{1}{2} \sum_{m=1}^{k_L} e_m^2(i) \equiv \frac{1}{2} \sum_{m=1}^{k_L} (f(v_m^L(i)) - y_m(i))^2 \quad (34)$$

Consequentemente

$$\delta_j^n(i) = e_j(i) f'(v_j^L(i)) \quad (35)$$

E para $n-1$ tem-se

$$\delta_j^{n-1}(i) = e_j^{n-1}(i) f'(v_j^{n-1}(i)) \quad (36)$$

onde $e_j^{n-1}(i) = \sum_{k=1}^{k_n} \delta_k^n(i) w_{kj}^n$.

Algoritmo Backpropagation

O algoritmo *backpropagation* de acordo com Theodoridis e Koutroumbas (2006) segue os seguintes passos:

- Inicializar todos os pesos com valores aleatórios pequenos.
- Para cada vetor de características de treinamento $\mathbf{x}, i = 1, 2, \dots, N$, calcular todos os $v_j^n(i)$ da equação 30 e calcular a função de custo para os pesos atuais estimados utilizando as equações 27 e 34.
- Para cada $i = 1, 2, \dots, N$ e $j = 1, 2, \dots, k_L$ calcular $\delta_j^L(i)$ da equação 35 e em seguida calcular $\delta_j^{n-1}(i)$ utilizando a equação 36 para $n = L, L - 1, \dots, 2$, e $j = 1, 2, \dots, k_n$.
- Atualizar os pesos calculando $\mathbf{w}_j^n(\text{novo})$ para $n = 1, 2, \dots, L$ e $j = 1, 2, \dots, k_n$, utilizando a equação 25.

Theodoridis e Koutroumbas (2006) sugerem como critério de convergência, para terminar a interação, utilizar um valor de limiar e comparar com a função de custo J , e quando ela torna-se menor que o valor de limiar escolhido, então se encerra a execução. Outra possibilidade é quando o gradiente em relação aos pesos tornar-se pequeno.

Finalmente, após a realização do treinamento da rede, os valores de cada sinapse são congelados e a rede está pronta para classificação. Então, um vetor de características é apresentado na entrada da rede e classificado na classe indicada pela saída da rede (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2006).

2.5 BACILOSCOPIA

A baciloscopia, ou exame microscópico direto do escarro, é um método de diagnóstico laboratorial da tuberculose que pesquisa o Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) utilizando

uma técnica padronizada de coloração das lâminas contendo amostra de escarro do paciente (BRASIL, 2001).

2.5.1 MÉTODO DE COLORAÇÃO

O processo de coloração das lâminas busca melhorar a identificação visual dos bacilos durante a fase de leitura das mesmas.

A parede celular das micobactérias, responsável pela morfologia bacilar, tem em sua constituição química diversos lipídeos, entre eles os ácidos micólicos. A ligação de alguns desses lipídios com o corante Fucsina gera complexos que são responsáveis pela característica tintorial de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas, apresentada pelas células bacterianas que são então designadas como BAAR (BRASIL, 2008, p. 155).

O método de coloração de *Ziehl-Neelsen* é o método indicado pelo Ministério da Saúde para a preparação das lâminas utilizadas pela baciloscopia de campo claro. Esse método é descrito em detalhes no Anexo A.

O método de coloração das lâminas utilizadas nesse trabalho foi uma das versões do método *Ziehl-Neelsen* (ZN), conhecida como método de *Kinyoun*. A diferença básica entre o *Ziehl-Neelsen* original e o *Kinyoun* é que o método de *Kinyoun* é de coloração a frio enquanto que o método ZN é um método a quente. Outra diferença reside na concentração de Fucsina Saturada utilizada, a qual é de 3% no método de *Kinyoun*, enquanto que o método ZN utiliza 0,3% (BRASIL, 2008).

2.5.2. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Na leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia realizada com escarro espontâneo distendido e corado pelo método de *Ziehl-Neelsen*, ou suas versões, são lidos no mínimo 100 (cem) campos úteis de microscópico, ou seja, aqueles campos nos quais se observam elementos celulares de origem pulmonar (leucócitos, fibras mucosas e células

ciliares). Os campos em que não aparecem esses elementos não devem ser contabilizados na leitura (BRASIL, 2008). A leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia realizada com lâmina corada pelo método de *Ziehl-Neelsen* equivalem também para a baciloscopia realizada pelo método de *Kinyoun*. Dessa forma, os critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia servem para qualquer método realizado conforme padronização do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) e estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Critérios para Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia de escarro

Em baciloscopia de escarro, quando:

não são encontrados BAAR em 100 campos = relata-se o resultado como NEGATIVO;

são encontrados de 1 a 9 BAAR em 100 campos = relata-se apenas a quantidade de BAAR encontrada;

são encontrados de 10 a 99 BAAR, em 100 campos = relata-se o resultado como POSITIVO +;

é encontrada em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO ++;

é encontrada em média mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO +++.

FONTE: BRASIL, 2001.

No Anexo B são apresentados os procedimentos passo a passo para a realização da leitura e contagem dos bacilos, segundo preconizado pelo Ministério da Saúde.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INTRODUÇÃO

Técnicas de reconhecimento de padrão em imagens para a identificação de bacilos da tuberculose possuem uma ampla relevância, pois podem viabilizar uma análise quantitativa mais precisa no diagnóstico da doença. Durante os últimos treze anos, alguns trabalhos relacionados ao reconhecimento de bacilos da TB em imagens têm sido propostos. As primeiras propostas de identificação de bacilos foram em imagens de baciloscopia de fluorescência por Veropoulos *et al.* (1998) e Forero *et al.* (2003, 2004, 2006). O primeiro trabalho proposto para a identificação de bacilos da TB em imagens de baciloscopia de campo claro foi em 2008 por Costa *et al.* (2008). A partir de então novas propostas de métodos de segmentação do bacilo da TB tem surgido.

A partir da realização de buscas em bases de dados literários, tais como o *IEEE xplore* e *Engineering Village*, foram identificados sete trabalhos que utilizam métodos de segmentação do bacilo da TB aplicados a imagens de baciloscopia de campo claro:

- ***Tuberculosis Bacteria in Conventional Microscopy Image*** (COSTA *et al.*, 2008);
- ***Color Thresholding Method For Image Segmentation Algorithm Of Ziehl-Neelsen Sputum Slide Images*** (RAOF *et al.*, 2008);
- ***Image Processing Techniques for Identifying Mycobacterium Tuberculosis in Ziehl-Neelsen Stains*** (SADAPHAL *et al.*, 2008);
- ***Segmentation and Classification of Tuberculosis Bacilli from ZN-stained Sputum Smear Images*** (MAKKAPATI *et al.*, 2009);

- *Detectetion of Tuberculosis in Sputum Smear Images Using Two One-Class Classifiers* (KHUTLANG *et al.*, 2009);
- *Detection and quantification of bacilli and clusters present in sputum smear samples: a novel algorithm for pulmonary tuberculosis diagnosis* (SOTAQUIRA *et al.*, 2009);
- *Classification of Mycobacterium Tuberculosis in Images of ZN-Stained Sputum Smears* (KHUTLANG *et al.*, 2010).

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica das técnicas de segmentação de bacilos da TB utilizadas nos trabalhos citados. Faz-se uma abordagem sobre o método de segmentação e as características utilizadas nos trabalhos relacionados à baciloscopia de campo claro, bem como as técnicas de seleção de características e métodos de classificação adotados.

O Quadro 4 apresenta um resumo geral de onze artigos revisados, que abordam o reconhecimento de bacilos da tuberculose em imagens de baciloscopia de campo claro e de fluorescência. Além disso, o Quadro 4 apresenta os materiais (imagens) utilizados em cada trabalho desenvolvido, as técnicas de segmentação, as características utilizadas, as técnicas de seleção de características e os métodos de classificação empregados.

Quadro 4 - Sumário da Revisão Bibliográfica.

Ano	Autor (es)	Título	Técnica de Microscopia	Materiais	Técnica de Segmentação	Características extraídas	Técnica de seleção de Características	Método de Classificação	Medidas de Desempenho	Resultados
1998	VEROPOULOS, K. CAMPBELL, C. LEARMONT, H. G. KNIGHT, B. SIMPSON, J.	<i>The Automated Identification of Tubercle Bacilli using Image Processing and Neural Computing Techniques</i>	Fluorescência	Conjunto de treinamento de 900 imagens; validação: 100 imagens; e teste: 147 imagens	Utiliza operador Canny para detecção de bordas e ligação de <i>pixel</i> de borda (<i>edge pixel linking</i>) para fechar os contornos abertos.	15 descritores de Fourier	Não utiliza técnica de seleção de características.	<i>Backpropagation</i> (BP), K-vizinho mais próximo (KNN), rede RBF e <i>Kernel Regression</i> (KR)	Acurácia	KNN = 91.80% RBF = 88.06% BP = 97.57% KR = 95.24%
2003	FORERO, M. G. CRISTÓBAL, G.	<i>Automatic Identification Techniques of Tuberculosis Bacteria</i>	Fluorescência	397 Imagens (RGB) negativas para teste; e 75 positivas: 15 para análise e 60 para teste	Utiliza operador Canny para detectar bordas e operador morfológico de fechamento e abertura para contornos quebrados. Em seguida aplica uma técnica de segmentação de cor utilizando os canais R e G	Canais R e G do espaço de cor RGB; Área, compactidade, tamanho do eixo maior, tamanho do eixo menor, excentricidade, perímetro, solidez, os 7 momentos de Hu e os 16 primeiros descritores de Fourier normalizados.	Não utiliza técnica de seleção de características.	Árvore de Classificação	Sensibilidade (S) Especificidade (E)	S = 93.30% E = 93.70%
2004	FORERO, M. G. SROUBEK, F. DESCO, M.	<i>Identification of Tuberculosis Bacteria Based on Shape and Color</i>	Fluorescência	397 Imagens (RGB) negativas para teste; e 75 positivas: 15 para análise e 60 para teste	Utiliza operador Canny para detectar bordas e operador morfológico de fechamento e abertura para contornos quebrados. Em seguida aplica uma operação de limiar adaptativo de cor utilizando o canal G do espaço de cor RGB.	Canal G do espaço de cor RGB; Área, compactidade, tamanho do eixo maior, tamanho do eixo menor, excentricidade, perímetro, solidez e 1º momento de Hu.	Não utiliza técnica de seleção de características.	Árvore de Classificação	Sensibilidade (S) Especificidade (E)	S = 100% E = 91.43%

Quadro 4 - Sumário da Revisão Bibliográfica. (Continuação)

Ano	Autor (es)	Título	Técnica de Microscopia	Materiais	Técnica de Segmentação	Características extraídas	Técnica de seleção de Características	Método de Classificação	Medidas de Desempenho	Resultados
2006	FORERO, M. G. CRISTÓBAL, G. DESCO, M.	<i>Automatic Identification of Mycobacterium Tuberculosis by Gaussian Mixture Models</i>	Fluorescência	473 imagens negativas de 35 indivíduos saudáveis e 308 imagens positivas de 8 pacientes.	Utiliza operador Canny para detectar bordas e operador morfológico de fechamento e abertura para contornos quebrados. Em seguida aplica uma operação de limiar adaptativo de cor utilizando o canal G.	Canal G do espaço de cor RGB; Área, compactidade, tamanho do eixo maior, tamanho do eixo menor, excentricidade, perímetro, solidez, 1º, 2º, 3º e 11º momentos de Hu e descritores de Fourier.	Não utiliza técnica de seleção de características.	O Modelo de Mistura de Gaussianas foi utilizado para caracterizar a classe de bacilos e o Classificador de erro mínimo Bayesiano para identificação.	Sensibilidade (S) Especificidade (E)	S = 94.67% E = 97.89%
2008	COSTA, M. F. C. FILHO, C. F. SENA, J. F. SALEM, J. DE LIMA, M. O.	<i>Tuberculosis Bacteria in Conventional Microscopy Images</i>	Campo Claro	50 imagens RGB de 10 pacientes	Utiliza operação de limiar adaptativo, obtido a partir do histograma da imagem R-G. Foram utilizados filtros morfológicos para remover os artefatos.	Característica R-G do espaço de cor RGB.	Não utiliza técnica de seleção de características.	Sem Classificador	Sensibilidade (S) e taxa de falsos positivos (FPR)	S = 76.65% FPR = 12%
2008	RAOF, R.A.A. SALLEH, Z. SAHIDAN, S.I. MASHOR, M.Y. MD NOOR, S.S. IDRIS, F. M. HASAN, H.	<i>Color Thresholding Method For Image Segmentation Algorithm Of Ziehl-Neelsen Sputum Slide Images</i>	Campo Claro	Foram utilizadas 5 Imagens para estudos iniciais e 15 imagens para teste.	Algoritmo de limiarização baseado na informação de cor	Canais R, G e B do espaço de cor RGB.	Não utiliza técnica de seleção de características.	Sem Classificador	NÃO TEM	Sem resultados numéricos

Quadro 4 - Sumário da Revisão Bibliográfica. (Continuação)

Ano	Autor (es)	Título	Técnica de Microscopia	Materiais	Técnica de Segmentação	Características extraídas	Técnica de seleção de Características	Método de Classificação	Medidas de Desempenho	Resultados
2008	SADAPHAL, P. RAO, J. COMSTOCK, G. W. BEG, M. F.	<i>Image Processing Techniques for Identifying Mycobacterium Tuberculosis in Ziehl-Neelsen Stains</i>	Campo Claro	Apenas as imagens nítidas. Não menciona quantidade.	Segmentação Bayesiana e Análise de Tamanho/Forma	Razão entre o comprimento dos eixos, excentricidade, média e desvio padrão e área.	Não utiliza técnica de seleção de características.	Sem Classificador Foram escolhidos limiares de corte empiricamente para classificar bacilos, possíveis bacilos e não-bacilos	NÃO TEM	Sem resultados numéricos
2009	MAKKAPATI, V. AGRAWAL, R. ACHARYA, R.	<i>Segmentation and Classification of Tuberculosis Bacilli from ZN-stained Sputum Smear Images</i>	Campo Claro	300 imagens RGB.	Utiliza o método Otsu para limiarização do componente S do espaço de cor HSV adotado, através da escolha de um intervalo adaptativo.	Componente H e S do espaço de cor HSV e o valor estimado da largura e altura do objeto (bacilo)	Não utiliza técnica de seleção de características.	Sem Classificador Pela segmentação do componente S obtém-se uma estrutura <i>beaded</i> que, quando presente, indica os bacilos, bem como os limiares escolhidos para os parâmetros de largura, comprimento e área.	NÃO TEM	Sem resultados numéricos
2009	KHUTLANG, R. KRISHNAN, S. WHITELAW, A. DOUGLAS, T. S.	<i>Detectetion of Tuberculosis in Sputum Semar Images Using Two One-Class Classifiers</i>	Campo Claro	28 imagens para treinar os classificadores e 5 imagens para avaliá-los	Utiliza os classificadores Gaussiano, Mistura de Gaussianas e KNN para segmentar.	Características de Fourier, Momentos invariantes, Excentricidade e Compacidade.	Não utiliza técnica de seleção de características.	Gaussiano (G), Mistura de Gaussianas (MG), e KNN	Acurácia (A) Sensibilidade (S) Especificidade (E) Área sob a curva ROC (AUC)	A (%); S (%); E (%) e AUC(%) G: 85.59; 91.07; 80.55 e 0.94 MG: 93.47; 90.88; 95.85 e 0.98 PCA: 81.00; 90.88; 71.91 e 0.90 kNN: 78.12; 94.08; 63.44 e 0.89

Quadro 4 - Sumário da Revisão Bibliográfica. (Continuação)

Ano	Autor (es)	Título	Técnica de Microscopia	Materiais	Técnica de Segmentação	Características extraídas	Técnica de seleção de Características	Método de Classificação	Medidas de Desempenho	Resultados
2009	SOTAQUIRÁ, M. RUEDA, L. NARVAEZ, R.	<i>Detection and quantification of bacilli and clusters present in sputum smear samples: a novel algorithm for pulmonary tuberculosis diagnosis</i>	Campo Claro	Imagens RGB de 14 pacientes. 100 imagens para cada paciente.	Calcula um limiar para o componente <i>Cr</i> , do espaço de cor YCbCr, e o componente <i>a</i> do espaço de cor Lab, baseado na primeira derivada do histograma. Utiliza o operador AND entre as duas imagens segmentadas.	Componente <i>Cr</i> , do espaço de cor YCbCr, e o componente <i>a</i> do espaço de cor Lab.	Não utiliza técnica de seleção de características.	Sem Classificador	Eficiência no estágio de segmentação (Ef), Sensibilidade (S) e Especificidade (E) no algoritmo, Acurácia (A) no diagnóstico e taxa de falsos positivos (FPR)	Ef. = 96.3% S = 90.9% E = 100% A = 85.7% FPR = 9.78%
2010	KHUTLANG, R. KRISHNAN, S. DENDERE, R. WHITELAW, A. VEROPOULO S, K. LEARMONT H, G. DOUGLAS, T. S.	<i>Classification of Mycobacterium Tuberculosis in Images of ZN-Stained Sputum Smears</i>	Campo Claro	Imagens RGB de 19 lâminas; Para segmentação foram utilizadas 28 imagens para treinar os classificadores e 5 para teste; Para a classificação, imagens de 11 lâminas foram utilizadas para treino e imagens de 8 lâminas para teste.	Utiliza a combinação de classificadores; o produto de 3 classificadores: de Bayes, regressão linear e Discriminante Quadrático.	5°, 7°, 9° e 11° coeficientes de <i>Fourier</i> ; Excentricidade; Compacidade; média e desvio padrão dos canais G e B, e valor de <i>pixel</i> central dos canais R e G.	<i>Population-based incremental learning</i> (PBIL); <i>Correlation-based feature selection</i> (CFS); <i>Sequential floating forward ou backward selection</i> (SFFS ou SBFS0); e <i>Branch and bound</i> (B&B) <i>feature selection</i> .	<i>kNN</i> , Bayes, Linear, Quadrático, <i>Probabilistic Neural Networks</i> (PNN) e SVM.	Acurácia (A) Sensibilidade (S) Especificidade (E)	A (%); S (%); E (%) kNN: 98.55; 97.77; 99.13 Bayes: 97.67; 95.32; 99.37 Linear: 98.51; 97.66; 99.13 Quad: 97.67; 95.32; 99.37 PNN: 98.53; 97.71; 99.13 SVM: 98.55; 97.67; 99.13

3.2 SEGMENTAÇÃO DE BACILOS DA TUBERCULOSE

A segmentação consiste na utilização de algoritmos para isolar os objetos de interesse na imagem, no caso os bacilos.

Em geral a segmentação automática é uma das tarefas mais difíceis em processamento de imagens. Esse passo determina o eventual sucesso ou fracasso na análise. De fato, a segmentação efetiva quase sempre garante sucesso no reconhecimento. Por essa razão, um cuidado considerável deve ser tomado para se melhorar as chances de uma segmentação robusta (GONZALEZ; WOODS, 2000, p. 295).

Os quatro primeiros trabalhos listados no Quadro 4 são os trabalhos pioneiros em segmentação de bacilos da tuberculose e estão relacionados à baciloscopia de fluorescência. Os demais trabalhos são relacionados à baciloscopia de campo claro - o método utilizado para este trabalho.

O método de segmentação adotado para a baciloscopia de fluorescência nos trabalhos de Veropoulos *et al.* (1998) e Forero *et al.* (2003, 2004, 2006) empregam um operador de detecção de bordas *Canny* e um operador de limiar adaptativo de cor utilizando o canal R (FORERO *et al.*, 2004, 2006) do espaço de cor RGB e o canal G (FORERO *et al.*, 2003) para segmentar os bacilos. Veropoulos *et al.* (1998) utilizam ligação de *pixel* de borda para fechar os contornos abertos, já Forero *et al.* (2003, 2004, 2006) utilizam os operadores morfológicos de abertura e fechamento para contornos quebrados. Em seguida, são utilizados os classificadores, vide seção 3.5. Contudo, nenhum critério para a seleção de variáveis foi utilizado nesses trabalhos.

Como pioneiros em segmentação de bacilos da TB em imagens de microscopia de campo claro (Figura 13), Costa *et al.* (2008) utilizaram a imagem de diferença R-G (componentes do espaço de cor RGB) como ponto chave do método de segmentação. Dessa forma, os autores fizeram um estudo de cor da imagem baciloscópica nos espaços HSI e RGB, buscando informações que distinguíssem o bacilo do fundo da imagem. Ao analisar os

histogramas do componente de tonalidade do espaço de cor HSI (*Hue-Saturation-Intensity*) em imagens de amostras baciloscópicas provenientes de 10 pacientes, os autores perceberam que a maioria das imagens apresentava as tonalidades ciano e verde como predominantes do fundo da imagem. Ainda, com respeito aos bacilos, a tonalidade observada não foi o vermelho como esperado. Analisando o espaço RGB, os autores observaram que as informações dos canais R, G e B individualmente, também eram irrelevantes para a segmentação do bacilo. Já a imagem R-G (formada pela subtração do componente G de R) foi aquela em que os bacilos melhor se distinguiam do fundo da imagem (vide Figura 14). Dessa forma, esta foi a imagem utilizada como ponto de partida para a segmentação. A segmentação dos bacilos, então, foi realizada utilizando-se um limiar adaptativo cujo valor para cada imagem era obtido a partir do histograma da imagem R-G.

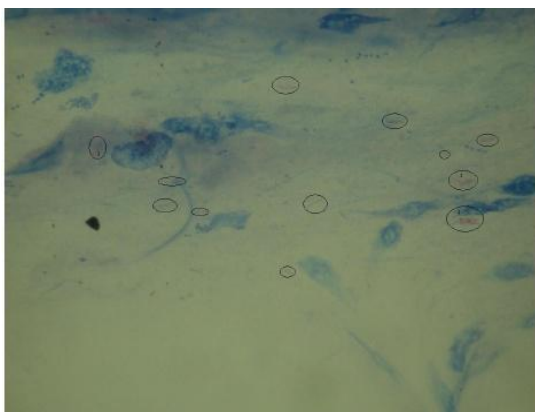


Figura 13 - Imagem obtida por microscopia de campo claro com os bacilos marcados por um especialista.

FONTE: COSTA *et al.*, 2008.

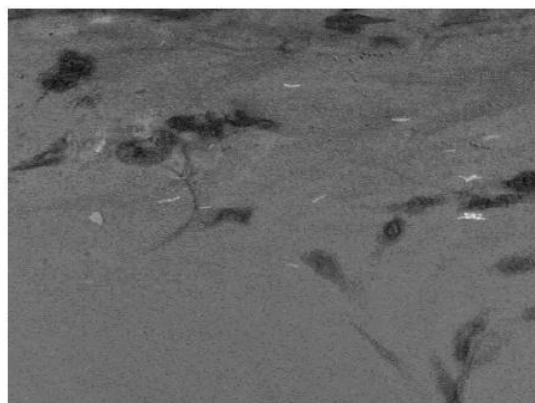


Figura 14 - Imagem R-G: As regiões claras são bacilos

FONTE: COSTA *et al.*, 2008.

Adicionalmente, para eliminar os ruídos presentes na imagem, resultante do processo de segmentação, Costa *et al.* (2008) utilizaram filtros morfológicos e filtros área. A técnica adotada pelos autores não utiliza classificadores, logo, não foi utilizado nenhum método de seleção de variáveis. A Figura 15, apresenta um exemplo de resultado do método. Nela podem-se verificar os bacilos detectados pelo método, onde as regiões brancas são os bacilos

segmentados. O método proposto apresentou 76,65% de sensibilidade e taxa de falso positivo de 12%.

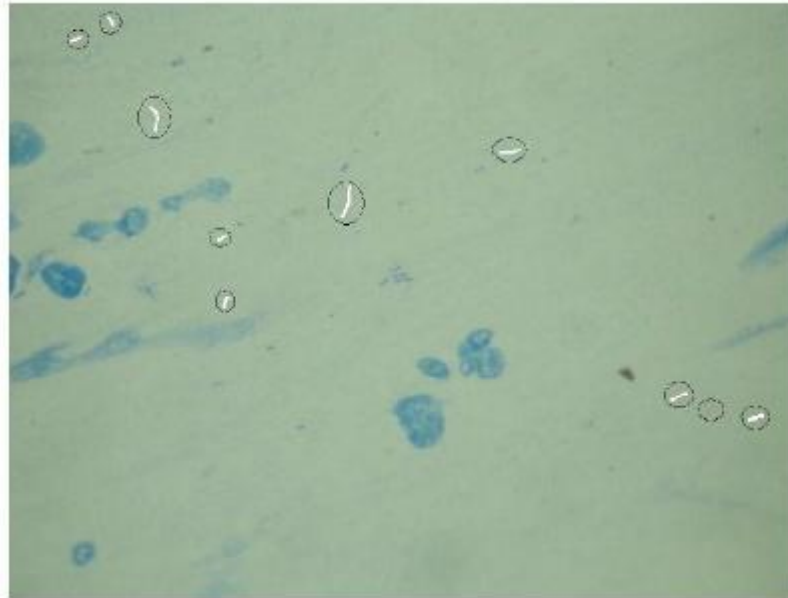


Figura 15 - Imagem resultante do método de segmentação aplicado por Costa *et al.* (2008)

As regiões brancas são os bacilos segmentados

FONTE: COSTA *et al.*, 2008.

Raof *et al.* (2008) extraíram amostras de cinco imagens, 25 *pixels* de bacilos para cada canal do espaço RGB e 25 *pixels* de fundo para cada canal. Após a análise dos valores de *pixel* máximo e mínimo obtidos para cada canal propuserem a aplicação de valores de limiar diferenciados conforme as equações 37, 38 e 39 para a segmentação:

$$g(x,y) = \begin{cases} 255, & red(x,y) \leq 26, \\ g(x,y), & 26 < red(x,y) < 239, \\ 255, & red(x,y) \geq 239. \end{cases} \quad (37)$$

$$g(x,y) = \begin{cases} g(x,y), & green(x,y) < 246, \\ 255, & green(x,y) \geq 246. \end{cases} \quad (38)$$

$$g(x,y) = \begin{cases} 255, & blue(x,y) < 121, \\ g(x,y), & blue(x,y) \geq 121. \end{cases} \quad (39)$$

Como são três componentes, o processo de segmentação foi feito pela combinação dos resultados das três equações, utilizando o operador lógico AND. Os autores observaram também nesse estudo, que a intensidade do componente verde (G) era sempre maior que a intensidade do componente vermelha (R). Além de esse fato estar evidenciado nos valores de limiar das equações 37, 38 e 39, acarretou, uma quarta regra para a obtenção da imagem, $g(x,y)$ de bacilos segmentados, qual seja (RAOF *et al.*, 2008):

$$g(x,y) = \begin{cases} 0, & \text{green}(x,y) < \text{red}(x,y), \\ 255, & \text{green}(x,y) \geq \text{red}(x,y). \end{cases} \quad (40)$$

A Figura 17 apresenta o resultado da segmentação utilizando o método proposto, aplicado nas imagens da Figura 16. O trabalho não apresenta medidas de desempenho para analisar os resultados.

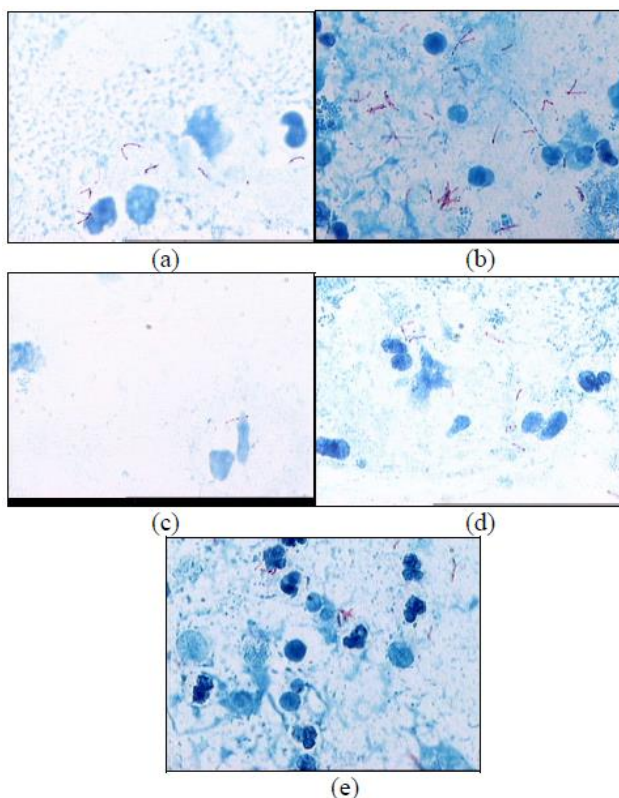


Figura 16 - Imagens Originais

(a) Imagem Normal (b) Imagem sub-exposta (c) Imagem super-exposta (d) Imagem ofuscada (e) Imagem sobreposta.

FONTE: RAOF *et al.*, 2008.

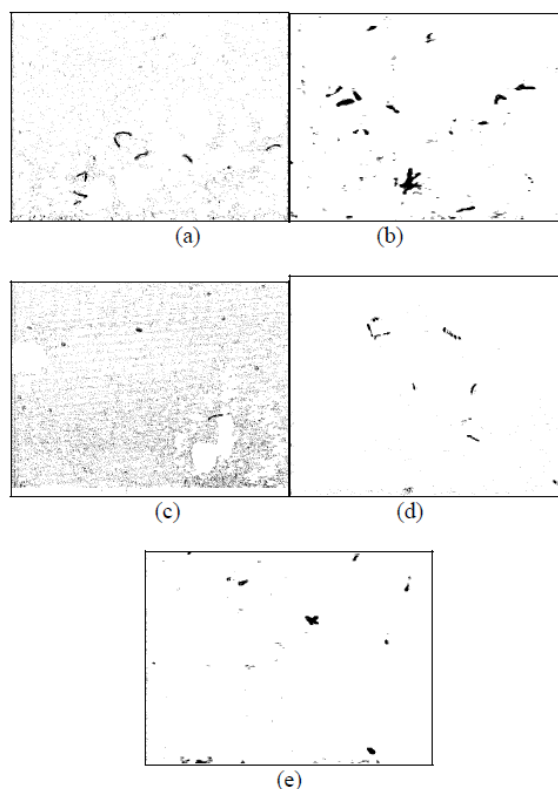


Figura 17 - Resultado da Segmentação.

(a) Imagem Normal (b) Imagem sub-exposta (c) Imagem super-exposta (d) Imagem ofuscada (e) Imagem sobreposta.

FONTE: RAOF *et al.*, 2008.

Sadaphal *et al.* (2008) desenvolveram um algoritmo baseado em limiares de corte utilizando informações de forma, tamanho e segmentação Bayesiana baseada em cor para identificar *Mycobacterium tuberculosis* em imagens de lâminas, coradas pelo método *Ziehl-Neelsen*. A Figura 18 apresenta o resultado do algoritmo aplicado em algumas imagens onde os objetos marcados com as cores verde, azul e vermelho foram segmentados pelo algoritmo proposto. Os objetos vermelhos são aqueles detectados pela segmentação Bayesiana, mas rejeitados como ‘objetos TB’ baseado na forma. Os objetos azuis são aqueles detectados pela segmentação Bayesiana e pela segmentação de forma, mas tem o tamanho incorreto e são

considerados como ‘possíveis objetos TB’. Os objetos verdes são definidos como ‘objetos TB’ que foram detectados pela segmentação Bayesiana, segmentação de forma e análise de tamanho. Os autores não utilizaram medidas de desempenho para avaliar o método proposto.

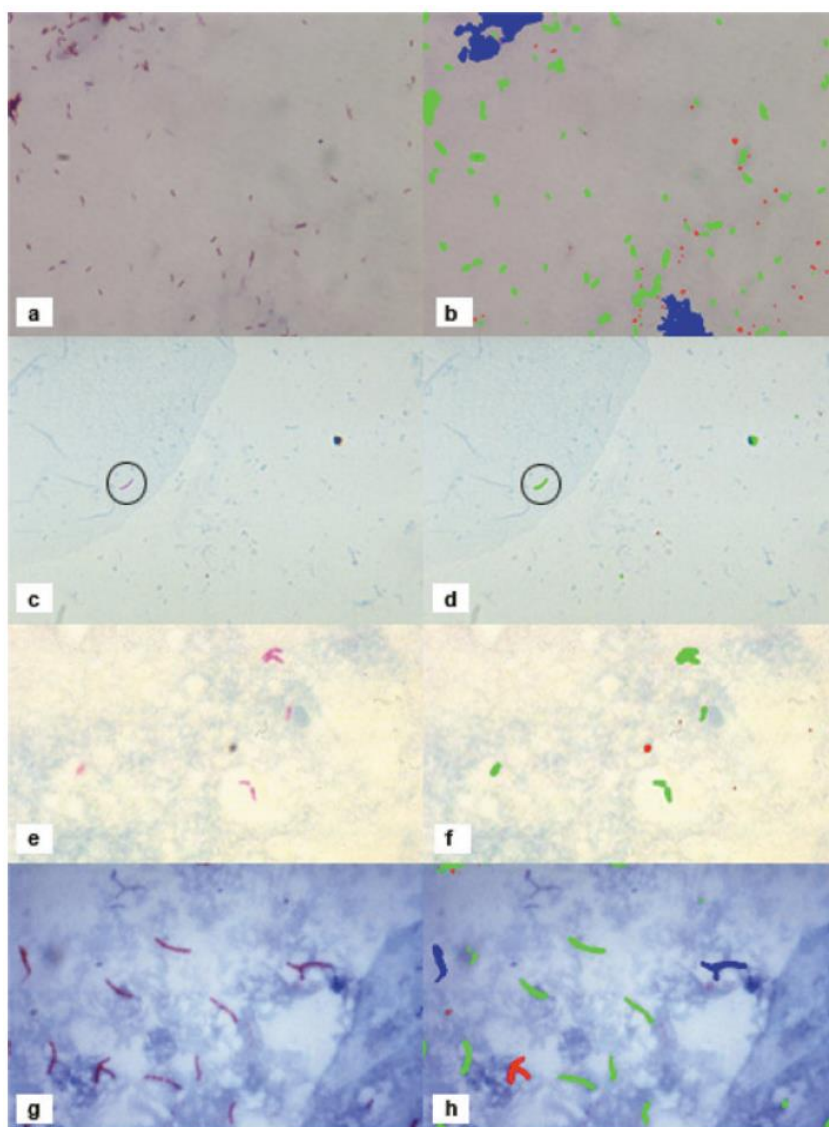


Figura 18 - Resultado do método de segmentação proposto por Sadaphal *et al.*

Na coluna à esquerda estão as imagens originais e na coluna à direita estão as imagens com o resultado da identificação. Os objetos vermelhos são aqueles detectados pela segmentação Bayesiana mas rejeitados como objetos TB baseados na forma. Os objetos azuis são aqueles detectados pela segmentação Bayesiana e pela segmentação de forma, mas tem o tamanho incorreto e são considerados

como possíveis objetos TB. Os objetos verdes são definidos como objetos TB que foram detectados pela segmentação Baysiana, segmentação de forma e análise de tamanho.

FONTE: SADAPHAL *et al.*, 2008.

Makkapati *et al.* (2009) utilizaram o espaço de cor HSV (*Hue, Saturation, Value* – Matiz ou Tonalidade, Saturação e Valor) para segmentar as imagens de baciloscopia de campo claro. No método proposto, os bacilos são segmentados pela limiarização do componente H (do espaço de cor HSV), através da escolha de uma faixa adaptativa apropriada. Como os bacilos obtidos após esta segmentação incluíam bacilos em foco, fora de foco e artefatos, foi necessária a utilização de uma estrutura que representa a não uniformidade na coloração dos bacilos, para detectar os bacilos válidos. Através do componente S (do espaço de cor HSV) foi possível observar estas estruturas, e pela limiarização deste componente foi possível obter estas estruturas segmentadas. A presença da estrutura dentro dos bacilos e os limiares calculados para os parâmetros de comprimento e largura são usados para identificar os bacilos válidos. A Figura 19 apresenta o resultado do método aplicado em uma imagem onde os bacilos válidos são identificados por retângulos, a estrutura segmentada está representada pela cor verde e os bacilos pela cor vermelha. Os resultados mostraram que apenas os bacilos em foco foram identificados como bacilos válidos. Daí a importância do desenvolvimento de algoritmos ou métricas de autofoco para esta área de pesquisa e desenvolvimento.

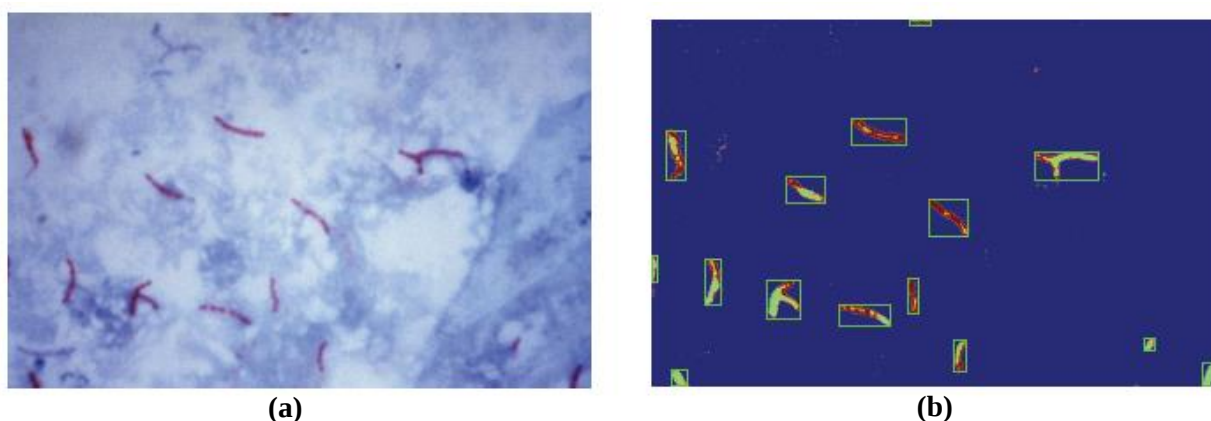


Figura 19 - Resultado da Segmentação por Makkapati *et al* (2009).

(a) Imagem original (b) Imagem segmentada

FONTE: MAKKAPATI *et al.*, 2009.

A técnica proposta por Sotaquirá *et al.* (2009) consiste em calcular os valores de limiar para os componentes Cr e *a* (dos espaços de cor YCbCr e Lab), baseados na primeira derivada do histograma. Após obter a imagem de cada componente segmentada pela aplicação de uma operação de limiarização, utiliza-se o operador lógico AND entre as duas imagens para obter a imagem final segmentada. Em seguida, foi determinado um tamanho médio de bacilo para as imagens que compunham o banco de imagens. Assim, foi possível quantificar os bacilos na imagem, ainda que houvesse aglomerados. A quantificação foi necessária, pois o trabalho propôs um algoritmo para diagnóstico da tuberculose, ou seja, um algoritmo para diagnosticar o nível de infecção da doença pela contagem dos bacilos presentes nas imagens. O Quadro 5 apresenta os resultados do diagnóstico feito por um especialista comparado ao diagnóstico realizado pelo algoritmo proposto. O estágio de segmentação apresentou eficiência de 96,3%; a sensibilidade e especificidade do algoritmo foram, respectivamente, 90,9% e 100%; a acurácia do diagnóstico foi de 85,7% e a taxa de falsos positivos 9,78%.

Quadro 5 - Resultado dos diagnósticos.

Nível de infecção: 3 - alto, 2 - médio, 1 - baixo, 0 - não-infectado.

Paciente	Diagnóstico do Especialista	Diagnóstico do Algoritmo
1	3	3
2	1	1
3	3	3
4	2	2
<u>5</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
6	3	3
7	0	0
8	3	3
9	2	2
10	1	1
11	2	2
12	0	0
<u>13</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
14	0	0

FONTE: Adaptado de SOTAQUIRÁ *et al.*, 2009.

Kutlang *et al.* (2010) utilizaram classificadores de *pixel* para segmentar as imagens de baciloscopia de campo claro. Cada classificador atribuiu duas probabilidades para um *pixel*, a probabilidade do *pixel* pertencer a classe bacilo e a probabilidade do *pixel* pertencer a classe não-bacilo; o *pixel* assume o rótulo da classe que tem a maior probabilidade de pertencer. Os classificadores utilizados serão discutidos com mais detalhe na seção 3.5.

3.3 CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS

As características mais representativas do objeto na imagem podem ser escolhidas para formar um conjunto de características e algoritmos de extração de características e seleção de características podem ser aplicados. Em síntese, a extração de características cria vetores com novas características utilizando transformações ou combinações do conjunto original de características e a seleção de características seleciona o melhor subconjunto do conjunto original de características (BIANCHI, 2006).

Para o trabalho de Costa *et al.* (2008), as características escolhidas para o processo de segmentação dos bacilos foram os componentes R e G do espaço de cor RGB. A variável R-G foi a característica chave utilizada na segmentação.

Raof *et al.* (2008) e Sadaphal *et al.* (2008) também utilizaram características de cor para segmentar o *Mycobacterium tuberculosis*. O primeiro não menciona o espaço de cor utilizado e o último utiliza o espaço de cor RGB. Raof *et al.* (2008) utilizaram, também, características de forma e tamanho: razão entre o comprimento dos eixos, excentricidade, área, média e desvio padrão.

Makkapati *et al.* (2009) utilizaram características de cor (espaço de cor HSV) e de forma para segmentar as imagens de baciloscopia de campo claro. As características de cor utilizadas foram os componentes H e S do espaço de cor HSV. O valor estimado da largura e altura (vide equações 41 e 42) do bacilo foram as características de forma utilizadas.

$$largura = \frac{p + \sqrt{p^2 - 16a}}{4} \quad (41)$$

$$altura = \frac{p - \sqrt{p^2 - 16a}}{4} \quad (42)$$

Onde: a = área e p = perímetro do objeto.

O método de segmentação proposto por Sotaquirá *et al.* (2009) utilizou o componente Cr do espaço de cor YCbCr e o componente a do espaço de cor Lab.

Kutlang *et al.* (2009) utilizaram características do espaço de cor RGB. Além dessas características, utilizaram características de forma e aplicaram algoritmos de extração de características:

- Características de Fourier que podem ser invariantes a translação e rotação usando a

transformação $r(u) = \sqrt{|a_x(u)|^2 + |a_y(u)|^2}$, onde $a_x(u)$ é a parte real e $a_y(u)$ a

parte imaginária dos descritores;

- Características de momento invariante derivadas de momento de cor generalizado, que também são invariantes a mudança geométrica;
- Excentricidade – razão entre maior e menor eixo; e
- Compacidade – medida de quanto a forma do objeto se aproxima de um círculo definida pela razão entre o perímetro e a área do objeto;

Os conjuntos de características extraídas no trabalho proposto por Khutlang *et al.* (2010) foram: 5º, 7º, 9º e 11º coeficientes de Fourier; Excentricidade; Compacidade; média e desvio padrão dos canais G e B, e valor de *pixel* central dos canais R e G.

Excentricidade e compacidade são características úteis por causa da forma longa e fina do bacilo. Para determinar o coeficiente de Fourier foi utilizado o classificador *k-nearest neighbour* ou k-vizinhos mais próximos (kNN). O mapeamento linear de Fisher foi aplicado ao conjunto de todas as características extraídas (KHUTLANG *et al.* 2009, 2010).

Khutlang *et al.* (2010) consideraram, para cada componente do espaço de cor RGB, o valor do *pixel* central como uma característica. Para não influenciar na tomada de decisão do classificador, as características foram normalizadas pela subtração da característica pela média da característica. Em seguida dividiu-se cada característica pelo seu desvio padrão. O conjunto de características mais descritivo foi selecionado a partir das características normalizadas.

3.4 TÉCNICAS DE SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ADOTADAS

A seleção de características seleciona o melhor subconjunto do conjunto original de características. Geralmente, a técnica de extração de características é realizada inicialmente e em seguida a técnica de seleção é aplicada nos dados extraídos para selecionar as características mais relevantes (BIANCHI, 2006).

Apenas o trabalho de Khutlang *et al.* (2010) utilizou técnicas de seleção de características:

- *Population-based incremental learning* (PBIL);
- *Correlation-based feature selection* (CFS);
- *Sequential floating forward ou backward selection* (SFFS ou SBFS0); e
- *Branch and bound* (B&B) *feature selection*.

O algoritmo PBIL seleciona subconjuntos de características probabilisticamente. No método CFS uma característica é selecionada utilizando-se a equação 43:

$$Merit = \frac{kr_{rc}}{\sqrt{k+k(k-1)r_{ff}}} \quad (43)$$

onde r_{rc} é a média de correlações entre o subconjunto de características e a classe, r_{ff} é a média das correlações entre as características do subconjunto e k é o número de características do subconjunto de características.

Um número fixo de F passos para frente (*forward*) e para trás (*backward*) são desempenhados por SFFS ou SBFS para encontrar a próxima característica. Esse algoritmo é executado até que se obtenha o número desejado de características. A seleção de características utilizando B&B modela uma árvore para selecionar um subconjunto de características d , a partir de um conjunto de características M . A raiz da árvore representa todas as características e as folhas são os subconjuntos com d características. Uma função de estimação calcula os caminhos da árvore e o que apresenta maior valor tem sua folha selecionada como melhor subconjunto (KHUTLANG *et al.*, 2010).

3.5 MÉTODOS DE CLASSIFICAÇÃO UTILIZADOS

Para o reconhecimento dos bacilos, alguns autores utilizam classificadores. Para identificar os bacilos na imagem segmentada, Veropoulos *et al.* (1998), utilizando imagens de

baciloscopia de fluorescência, empregaram diferentes classificadores: *Backpropagation* (BP), *kNN*, rede RBF e *Kernel Regression* (KR).

Forero *et al.* (2006) utilizam o classificador de erro mínimo Bayesiano para a identificação dos bacilos. O primeiro trabalho apresentou melhor resultado para o classificador BP com a acurácia igual a 97,57%. O segundo trabalho apresentou sensibilidade com 94,67% e especificidade com 97,89% como resultado. Apesar destas técnicas apresentarem um bom resultado, elas não garantem o mesmo desempenho para imagens de microscopia de campo claro.

Sadaphal *et al.* (2008) utilizaram os limiares de corte para as características de forma e tamanho, escolhidos empiricamente, para classificar os objetos segmentados nas imagens de baciloscopia de campo claro em: bacilos, possíveis bacilos e não-bacilos. A Figura 18, na seção 2.5, apresenta o resultado do método aplicado em algumas imagens.

Para identificar os objetos bacilo em uma imagem, Khutlang *et al.* (2009) empregaram duas etapas de classificação. Na primeira etapa foi utilizado o algoritmo PCA e os seguintes classificadores de *pixel*: Gaussiano e Mistura de Gaussianas. A classe objeto do classificador Gaussiano é modelada como uma distribuição Gaussiana e os objetos com características fora do limiar são rotulados como *outliers*. O classificador Mistura de Gaussianas utiliza um número de Gaussianas para criar uma descrição mais robusta da classe objeto. O algoritmo PCA permite a escolha de autovetores da matriz de covariância para serem usados na descrição dos dados de destino; selecionando autovetores de variância alta (removendo dados com baixa dimensionalidade) usualmente melhora-se o desempenho de um classificador.

Imagens segmentadas manualmente foram utilizadas para avaliar se os *pixels* foram classificados de maneira correta. O classificador Mistura de Gaussianas apresentou melhor

resultado para esta etapa da classificação (vide Figura 20) com uma taxa de 75.74% corretamente classificado (KHUTLANG *et al.*, 2009).



Figura 20 - Resultados obtidos utilizando classificador de *pixel* de Mistura de Gaussianas sobreposto em 2 sub-imagens do conjunto de imagens teste.

FONTE: KHUTLANG *et al.*, 2009.

Na segunda etapa, Khutlang *et al.* (2009) utilizaram classificadores de objeto que empregam características invariantes a mudança geométrica, para identificar objetos no formato de bastonete. Além dos classificadores utilizados na etapa anterior, nesta etapa também foi utilizado o classificador kNN. Os classificadores Gaussiano e Mistura de Gaussianas são baseados em densidade. O classificador kNN descreve os limites da classe. O conjunto de dados de entrada da segunda etapa são os objetos selecionados na primeira etapa de classificação. Esses objetos são submetidos a um processo de filtragem de área. A faixa de seleção foi fixada entre um mínimo de 50 *pixels* e um máximo de 400 *pixels*.

O desempenho dos classificadores foi comparado para diferentes conjuntos de características. O Quadro 6 mostra o desempenho da classificação na primeira etapa, enquanto que o Quadro 7 mostra o desempenho de diferentes classificadores com diferentes características na segunda etapa. O classificador Mistura de Gaussianas obteve melhor desempenho tanto na primeira quanto na segunda etapa (KHUTLANG *et al.*, 2009).

Quadro 6 - Resultados da primeira etapa de classificação.

	Gaussiano	Mistura de Gaussianas
Proporção de <i>pixels</i> classificados corretamente	0,5056	0,7574
Proporção de <i>pixels</i> classificados incorretamente	0,4337	0,3454

FONTE: Adaptado de KHUTLANG *et al.*, 2009.

Quadro 7 - Resultados da segunda etapa de classificação.

Características	Medidas de desempenho	Classificador		
		Gaussiano	Mistura de Gaussianas	kNN
Características de Fourier	Acurácia (%)	73,75	84,33	71,41
	Sensitividade (%)	90,32	90,51	92,20
	Especificidade (%)	58,51	78,65	52,29
Momento invariante	Acurácia (%)	51,91	50,88	50,74
	Sensitividade (%)	94,55	94,36	94,83
	Especificidade (%)	12,71	10,89	10,20
Excentricidade e compacidade	Acurácia (%)	85,59	90,18	87,12
	Sensitividade (%)	94,36	98,21	93,99
	Especificidade (%)	77,53	82,80	80,81

FONTE: Adaptado de KHUTLANG *et al.*, 2009.

Kutlang *et al.* (2010) utilizaram os seguintes classificadores de *pixel* para segmentar as imagens de baciloscopia de campo claro: classificador de Bayes, classificador de regressão linear Euclidiano, classificador de regressão linear logístico e classificador discriminante quadrático. Cada classificador foi utilizado para atribuir duas probabilidades para um *pixel*: a probabilidade de o *pixel* pertencer a classe bacilo; e a probabilidade do *pixel* pertencer a classe não-bacilo. O *pixel* assume o rótulo de bacilo se tiver maior probabilidade de pertencer a classe bacilo, caso contrário, recebe o rótulo de não-bacilo.

Além de empregar os classificadores de *pixel* individualmente, Kutlang *et al.* (2010) utilizaram diferentes esquemas de combinação de classificadores: média, mediana, mínimo, máximo e produto das probabilidades *a posteriori* dos classificadores. Além disso, para validar os resultados das segmentações, criaram versões de imagens segmentadas manualmente, para serem utilizadas como imagens referência.

Com o fim de prover porcentagens de classificação verdadeira e falsa, Kutlang *et al.* (2010) calcularam dois valores de taxas: taxa comum, referente aos *pixels* classificados corretamente, e taxa de diferença, referente aos *pixels* classificados incorretamente. A taxa comum é calculada pelo número de *pixels* que são classificados como objetos na imagem segmentada e que, de fato, pertencem a um objeto na imagem referência. A taxa de diferença é calculada pelo número de *pixels* que pertencem a um objeto na imagem referência e não são classificados como objetos na imagem segmentada, somado ao número de *pixels* que pertencem ao fundo da imagem referência e são identificados como objetos na imagem segmentada. Os objetos podem ser bacilos ou não; uma etapa de classificação foi utilizada após a segmentação para classificar os objetos segmentados em bacilos e não-bacilos. Para avaliar a concordância entre as imagens segmentadas pela melhor combinação e as imagens referência foi utilizada a distância de Hausdorff.

O Quadro 8 apresenta o resultado do desempenho individual de cada classificador de *pixel*. Os classificadores de Bayes e quadrático obtiveram melhor desempenho com 88,39% dos *pixels* classificados corretamente e 38,08% dos *pixels* classificados incorretamente. A Figura 21 apresenta o resultado para o desempenho de diferentes números de combinações dos classificadores. Os dois primeiros classificadores combinados foram os classificadores de Bayes e quadrático. Em seguida, foram combinados os classificadores de Bayes, quadrático e de regressão linear logístico. Por último foram combinados todos os quatro classificadores. A

melhor segmentação foi produzida pelo produto dos classificadores de Bayes, quadrático e de regressão linear logístico, onde nenhum bacilo deixou de ser classificado como tal (KUTLANG *et al.*, 2010).

Quadro 8 - Desempenho dos classificadores de pixel individualmente.

Classificador	Bayes	Regressão linear Euclidiano	Regressão Linear Logístico	Quadrático
Classificado corretamente	0.8839	0.8573	0.8770	0.8839
Classificado incorretamente	0.3808	0.3733	0.4259	0.3808

FONTE: Adaptado de KUTLANG *et al.*, 2010

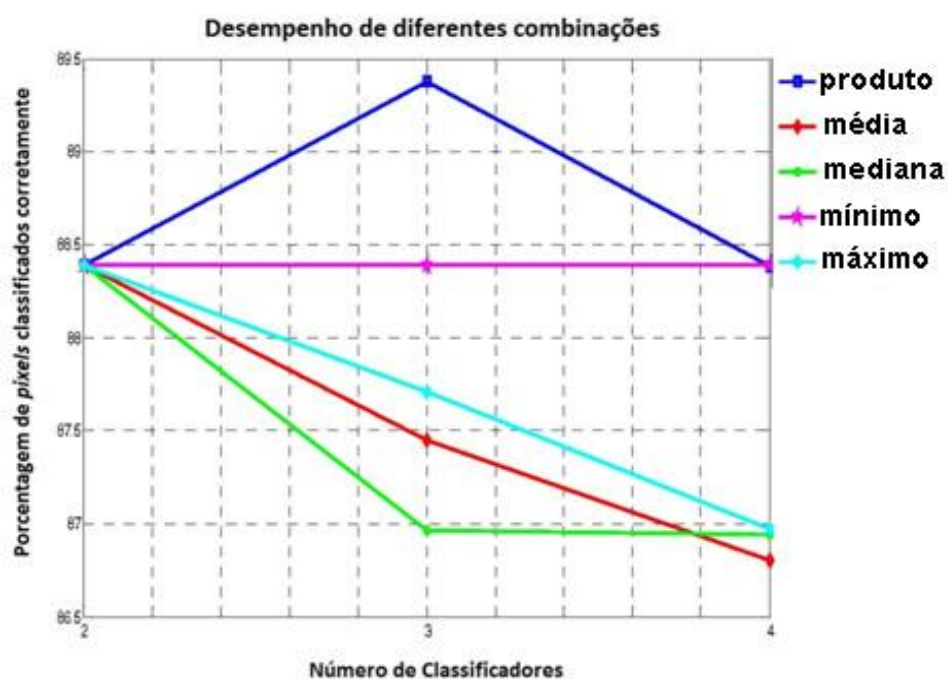


Figura 21 - Porcentagem de *pixels* classificados corretamente para diferentes números de combinações de classificadores, adicionados em ordem decrescente de desempenho.

FONTE: Adaptado de KUTLANG *et al.*, 2010

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do trabalho de identificação automática de bacilos da TB desenvolvido para a realização da segmentação de bacilos pode ser representada pelo diagrama de blocos apresentado na Figura 22. As três primeiras etapas foram realizadas em trabalho anterior por Kimura Junior (2010). Todas as etapas serão apresentadas com mais detalhes a seguir.

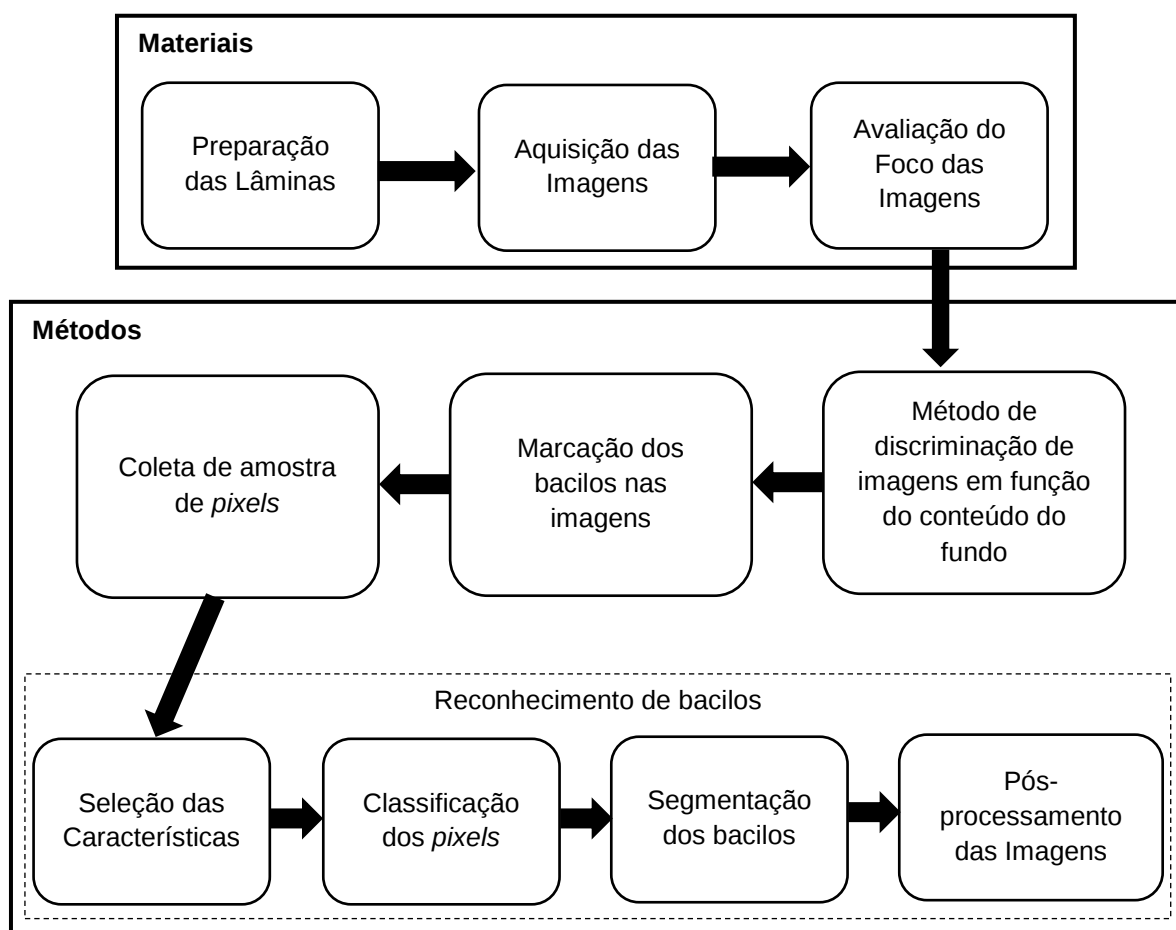
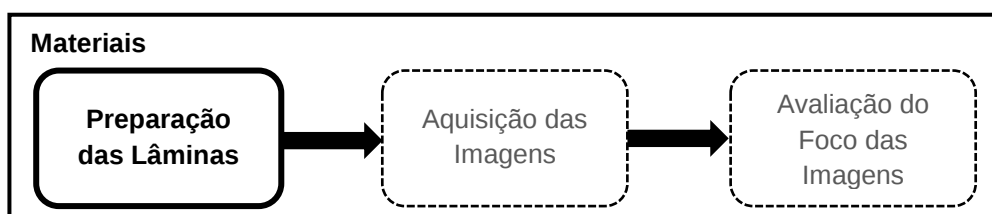


Figura 22 - Diagrama de blocos mostrando desde a etapa inicial de aquisição da imagem realizada em trabalho anterior por Kimura Junior (2010) até as etapas de reconhecimento de bacilos da TB em imagens baciloscópicas de campo claro.

4.1 MATERIAIS



Para este trabalho foram utilizadas 120 imagens de microscopia de campo claro adquiridas por Kimura Junior (2010) provenientes de 12 lâminas de pacientes com baciloscopia positiva. A resolução espacial das imagens adquiridas pelo referido autor é de 2816×2112 *pixels*. Para o presente trabalho foi obtida uma versão destas imagens, com uma resolução espacial menor (640×480 *pixels*), a fim de agilizar o processamento. Desta forma, foi utilizado o conjunto de imagens de alta resolução (2816×2112 *pixels*) para a marcação dos bacilos pelo especialista e o conjunto de imagens de baixa resolução (640×480 *pixels*) para o processamento do método proposto.

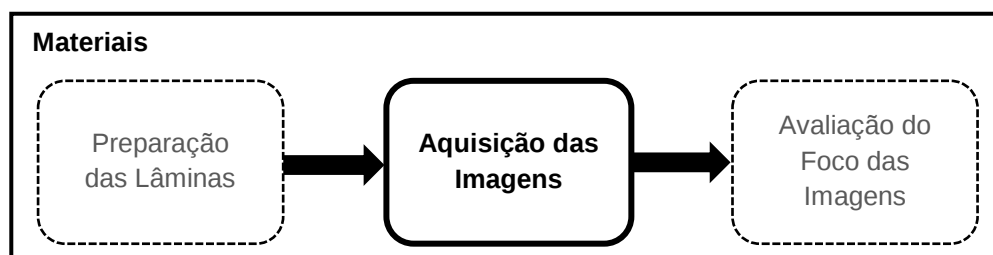


4.1.1 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas contendo secreção pulmonar de 12 pacientes foram preparadas no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. O método de coloração utilizado foi o método de coloração de

Kinyoun, variante do método ZN, que consiste num método de coloração a frio, usando Fucsina saturada a 3,0% (BRASIL, 2008). Este método foi utilizado por ser a técnica de rotina utilizada no laboratório de pesquisas onde foram preparadas as lâminas. Portanto, as imagens adquiridas de lâminas que utilizam o método de *Kinyoun* são equivalentes a imagens adquiridas de lâminas coradas utilizando o método de *Ziehl-Neelsen*.

Kimura Junior (2010) selecionou as 12 lâminas de tal forma que pudessem ser classificadas em grupos específicos de acordo com a uniformidade do fundo e a quantidade dos bacilos. Esses grupos, bem como a distribuição das imagens neles, serão descritos na seção a seguir.



4.1.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS

Para aquisição das imagens Kimura Junior (2010) utilizou uma câmera digital modelo *Canon PowerShot A640* de 10 megapixels e um microscópio ótico de campo claro da marca *Zeiss Axioskop 40* com lente objetiva de imersão com aumento de 100 vezes.

A câmera digital foi acoplada através de um tubo extensor em uma saída ótica do microscópio, como mostrado na Figura 23. O binóculo do microscópio

amplifica em 10 vezes a imagem para o observador, enquanto que o tubo de acoplamento possui um fator de ampliação de 2,5 vezes. Para compensar essa discrepância entre o observador e a câmera digital, esta foi configurada com um zoom ótico de quatro vezes. Assim tanto a câmera digital como o observador ao microscópio percebem uma ampliação de dez vezes. No entanto, a imagem adquirida não abrange a mesma área do campo percebido pelo observador pelo fato do conjunto que forma o tubo de acoplamento possuir um jogo de lentes interno com área diferente do binóculo frontal.

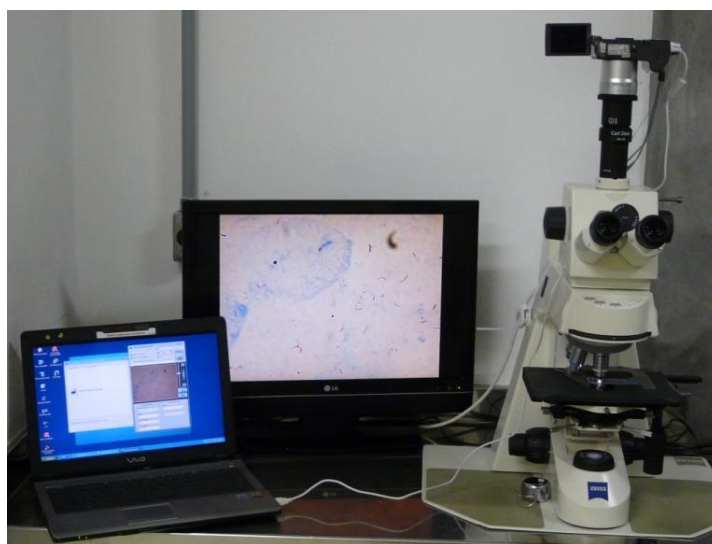


Figura 23 – Ambiente para a aquisição das imagens: um notebook, um monitor e uma máquina digital acoplada ao microscópio de campo claro.

FONTE: KIMURA JUNIOR, 2010.

As imagens adquiridas foram classificadas em quatro grupos como mostra a Figura 24, e para cada grupo foi criado uma nomenclatura, onde **(CF)** retrata a característica do fundo da lâmina com a coloração azul de metileno, a terceira letra representa alta **(A)** ou baixa **(B)** densidade de fundo, e as duas últimas letras retratam a densidade de bacilos, se alta densidade **(AD)** ou baixa densidade **(BD)**.

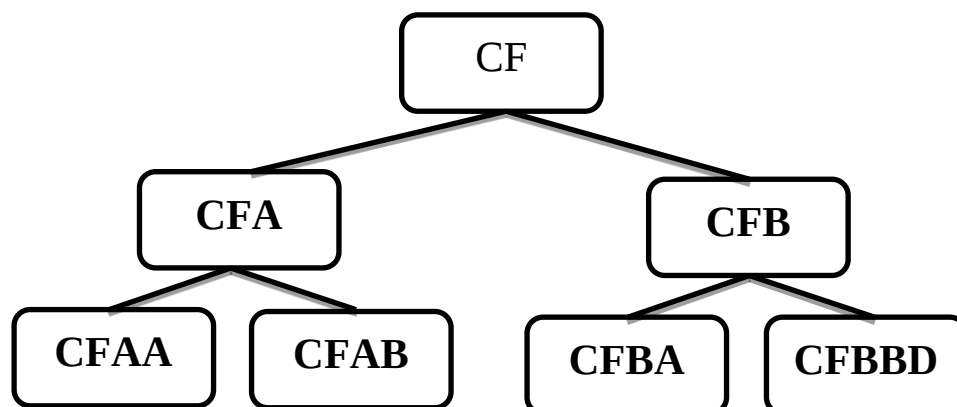


Figura 24 - Diagrama de representação dos grupos de imagens de acordo com o conteúdo de fundo e densidade de bacilos.

Esses quatro grupos são caracterizados da seguinte forma:

- Grupo CFAAD: contendo imagens de campos de lâminas com alta densidade de conteúdo de fundo e alta densidade de bacilos, vide Figura 25 (a);
- Grupo CFABD: contendo imagens de campos de lâminas com alta densidade de conteúdo de fundo e baixa densidade de bacilos, vide Figura 25 (b);
- Grupo CFBAD: contendo imagens de campos de lâminas com baixa densidade de conteúdo de fundo e alta densidade de bacilos, vide Figura 25 (c);
- Grupo CFBBBD: contendo imagens de campos de lâminas com baixa densidade de conteúdo de fundo e baixa densidade de bacilos, vide Figura 25 (d);

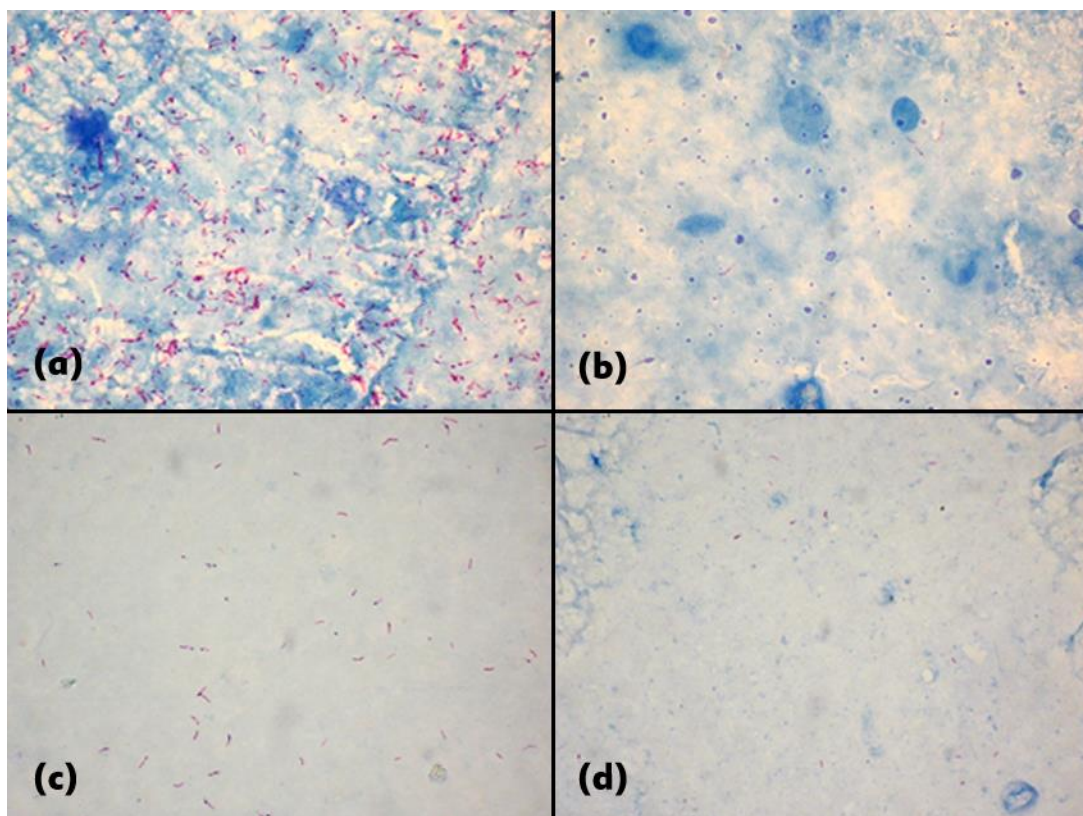


Figura 25 - Exemplos de imagens de cada grupo.

(a) Imagem do grupo CFAAD (b) Imagem do grupo CFABD (c) Imagem do grupo CFBAD (d) Imagem do grupo CFBBBD.

FONTE: Adaptado de KIMURA JUNIOR, 2010.

Para cada um dos grupos de imagens, Kimura Junior (2010) utilizou três lâminas e em cada lâmina capturou imagens de dez campos diferentes. Dez imagens de cada campo foram capturadas. Contudo, para este trabalho apenas uma imagem de cada campo foi utilizada, a imagem com melhor qualidade de foco (ver seção 4.1.3).

O Quadro 9 a seguir apresenta a distribuição das 120 imagens nos grupos de imagens apresentados anteriormente:

Quadro 9 - Distribuição das imagens nos grupos

GRUPOS	Lâminas	Quantidade de imagens						
CFAAD	Lâmina 1	10	30	60	120			
	Lâmina 2	10						
	Lâmina 3	10						
CFABD	Lâmina 4	10	30	60		120		
	Lâmina 5	10						
	Lâmina 6	10						
CFBAD	Lâmina 7	10	30	60			120	
	Lâmina 8	10						
	Lâmina 9	10						
CFBBD	Lâmina 10	10	30	60				120
	Lâmina 11	10						
	Lâmina 12	10						

4.1.3 AVALIAÇÃO DO FOCO DAS IMAGENS



O autofoco é a primeira etapa para a microscopia automática, uma vez que a qualidade do foco da imagem influi diretamente na qualidade da automação em imagens de microscopia.

As imagens utilizadas no presente trabalho tiveram o foco avaliado previamente por Kimura Junior (2010), a partir de um estudo sistemático em que se buscou selecionar a melhor métrica para avaliação de foco em imagens de microscopia de campo claro provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*.

A partir dos resultados desse estudo verificou-se que as melhores métricas identificadas para definição do foco foram aquelas baseadas em Variância, seguida pela Entropia. Além disso, o estudo evidenciou que a quantidade de bacilos não interfere diretamente na definição das métricas de autofocus.

4.2 MÉTODOS

A metodologia deste trabalho, de acordo com o diagrama de blocos apresentado na Figura 26, seguiu as seguintes etapas:

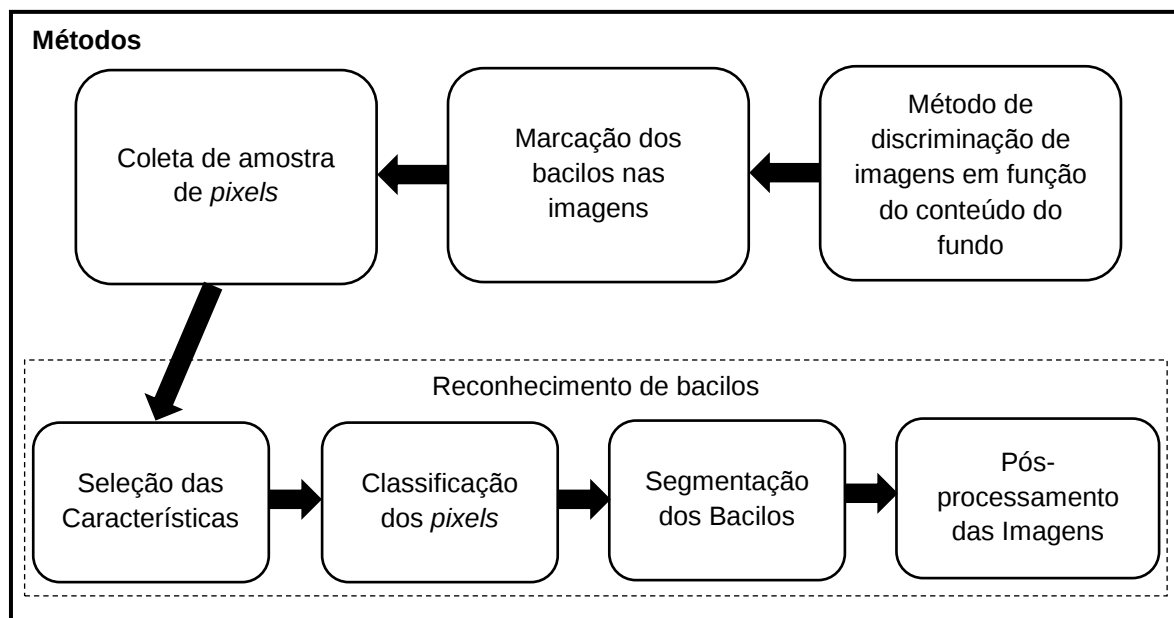


Figura 26 - Diagrama de blocos com os métodos utilizados no trabalho de reconhecimento de bacilos da TB.

Como se pode observar, a tarefa de reconhecimento de bacilos compreende quatro processos:

- i. Seleção das características, onde conjuntos de características ótimos são selecionados para a entrada do classificador de *pixels*;
- ii. Classificação dos *pixels* na classe bacilo e na classe fundo, utilizando classificador de redes neurais;
- iii. Segmentação dos bacilos nas imagens de baciloscopia de campo claro utilizando o classificador de redes neurais com o melhor desempenho na etapa anterior.

- iv. Pós-processamento para remover os ruídos na imagem resultado.

Cada etapa da metodologia empregada está detalhada a seguir.

4.2.1 MÉTODO DE DISCRIMINAÇÃO DAS IMAGENS EM FUNÇÃO DO CONTEÚDO DO FUNDO



Kimura Junior (2010) realizou essa distribuição das imagens por grupo com o auxílio de um especialista através de inspeção visual. No entanto, com o fim de possibilitar que novas imagens possam ser agregadas a cada um dos grupos de forma sistemática, buscou-se o desenvolvimento de um método de discriminação de imagens em função do conteúdo do fundo. O método apresentado foi desenvolvido em conjunto com Xavier (2012), tendo em vista que o referido autor utilizou o mesmo conjunto de dados para validar outra técnica de identificação automática de bacilos.

Como mencionado anteriormente, as imagens foram separadas em dois grupos baseado no conteúdo de fundo:

- a) imagens com alta densidade de conteúdo de fundo (CFA);
- b) imagens com baixa densidade de conteúdo de fundo (CFB).

A Figura 27 (a) mostra um exemplo de imagem do grupo CFA e a Figura 27 (b) mostra um exemplo de imagem do grupo CFB. Analisando as imagens, nota-se que no fundo das imagens CFA há uma predominância da cor azul, enquanto que no fundo das imagens CFB não há predominância da cor azul. Além disso, os fundos das imagens do grupo CFB se apresentam mais uniformes.

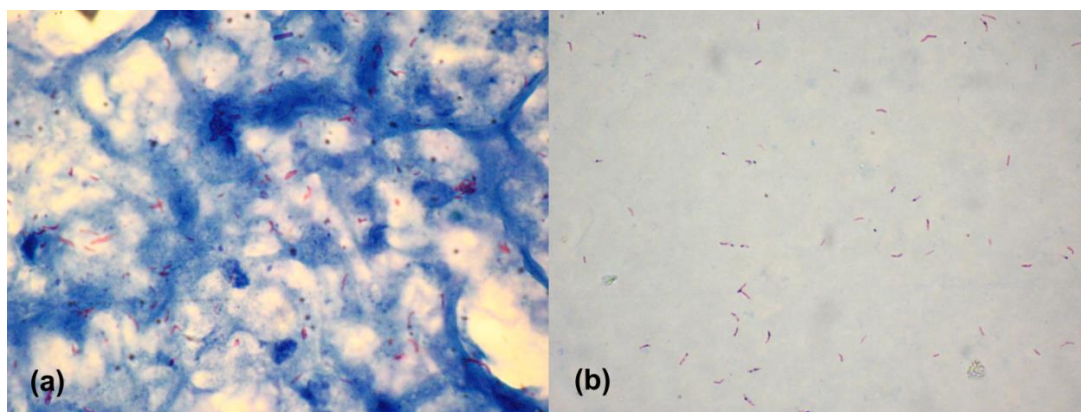


Figura 27 - (a) Imagem com alta densidade de conteúdo de fundo. (b) Imagem com baixa densidade de conteúdo de fundo.

FONTE: KIMURA JUNIOR, 2010.

Para classificar as imagens nesses dois grupos de forma automatizada, o componente H, do espaço de cor HSI, foi utilizada. Os valores do componente H foram escalonados entre 0 (zero) e 1 (um) como mostrado na Figura 28.

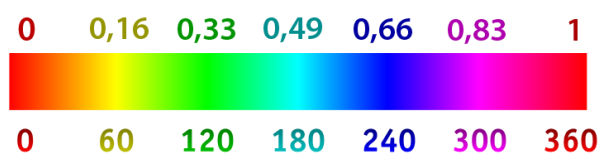


Figura 28 - Escala de tonalidade do espaço de cor HSI.

Uma faixa de cor azul do matiz (componente H) foi selecionada experimentalmente. Considerou-se a faixa entre 0,5 e 0,7 como sendo a faixa que representa a cor azul do fundo. Para cada imagem HSI, utilizando o componente

H, calculou-se o percentual de *pixel* com valores na faixa da cor azul do fundo, ou seja, a quantidade de *pixels* cujo componente H possuía valores entre 0,5 e 0,7.

A Figura 29 mostra os percentuais de *pixel* para cada imagem em um gráfico com barras. As barras foram organizadas de forma que as 60 primeiras imagens correspondessem a imagens consideradas, por inspeção manual, do grupo CFA e as últimas 60 imagens correspondessem a imagens consideradas, por inspeção manual, do grupo CFB.

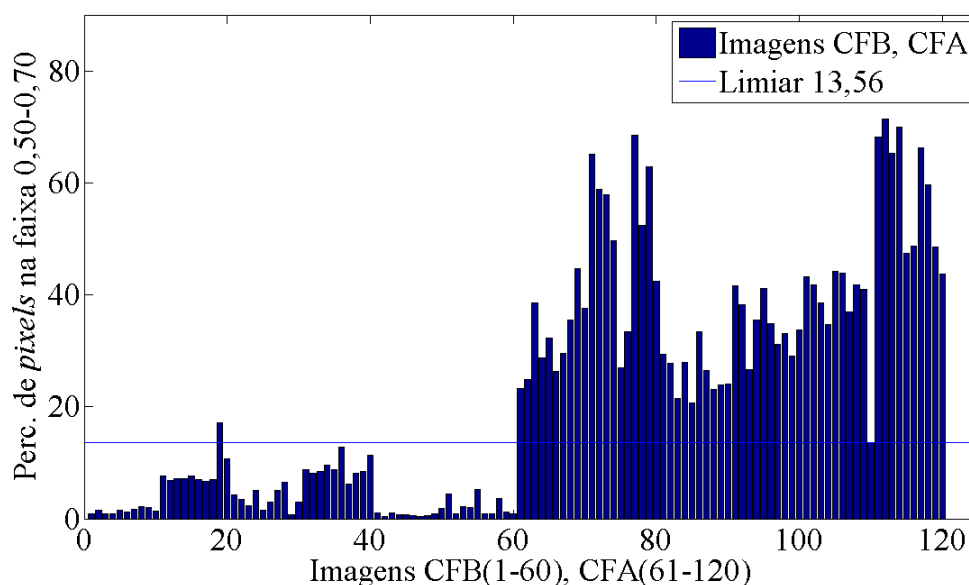
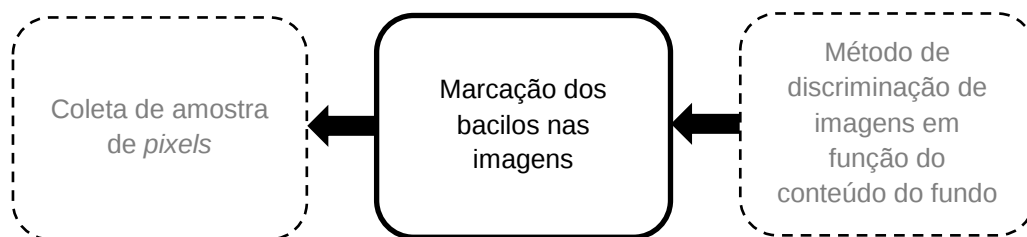


Figura 29 - Porcentagens em barra para todas as imagens dos grupos CFB e CFA.

Um limiar experimental de 13,56 foi estabelecido para separar imagens como pertencentes ao grupo CFB ou ao grupo CFA. Esse valor de limiar é mostrado como uma linha na Figura 29. Quando a porcentagem de *pixels* azuis na imagem é menor que o limiar, a mesma é considerada como pertencente ao grupo CFB. Quando o valor da porcentagem de *pixels* azuis é maior que o limiar, a imagem é considerada como pertencente ao grupo CFA.

4.2.2 MARCAÇÃO DOS BACILOS NAS IMAGENS



Uma vez que as imagens em foco já foram adquiridas, esta etapa do trabalho consistiu na marcação dos bacilos com o suporte de um especialista. A presença do especialista confere confiabilidade tanto na coleta das amostras dos *pixels* de bacilos e fundo, como na avaliação do processo de reconhecimento. Esta etapa do trabalho, assim como a anterior, foi realizada em conjunto com Xavier (2012).

As imagens de baciloscopia de campo claro apresentam, em muitos casos, além dos bacilos individualizados, aglomerados de bacilos. Tais objetos são denominados **globias**. Além disso, quando a espessura da secreção na lâmina não é uniforme, o foco não se ajusta em toda a lâmina, por isso, alguns objetos que possivelmente eram bacilos não foram classificados como tal, ou foram classificados como **bacilos duvidosos**. Em outros casos, a morfologia e a coloração deixaram dúvidas quanto à interpretação.

Dessa forma, os objetos identificados pelo especialista foram classificados em três categorias: bacilos, bacilos duvidosos e globia. Para os **bacilos** utilizou-se a marcação em forma de uma elipse, para as **globias** um retângulo, e para os **bacilos duvidosos** um polígono. As imagens (a), (b) e (c) mostradas na Figura 30

apresentam exemplos de marcação de bacilos, bacilos duvidosos e globia, respectivamente.

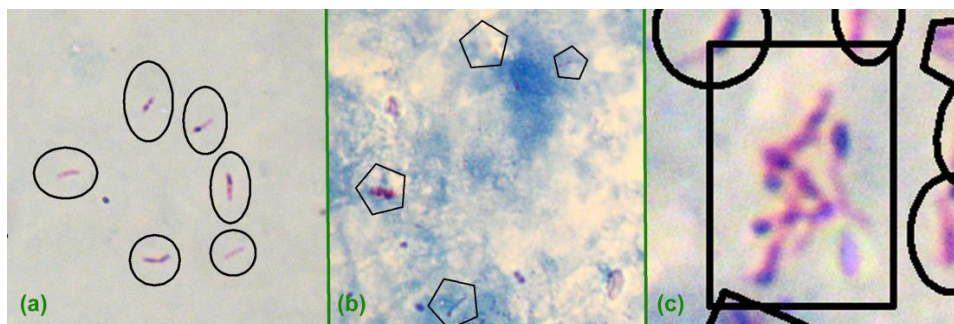


Figura 30 - Exemplos de marcação: (a) bacilos; (b) bacilos duvidosos; (c) globia.

O número total de imagens marcadas foi de 120, sendo 60 imagens com alta densidade de bacilos e 60 imagens com baixa densidade de bacilos. Um total de 2456 bacilos isolados foram marcados e validados pelo especialista. Bacilos duvidosos, globias e bacilos que se tocam não foram considerados nesta contagem. A Figura 31 (b) apresenta um exemplo de imagem com marcação validada pelo especialista.

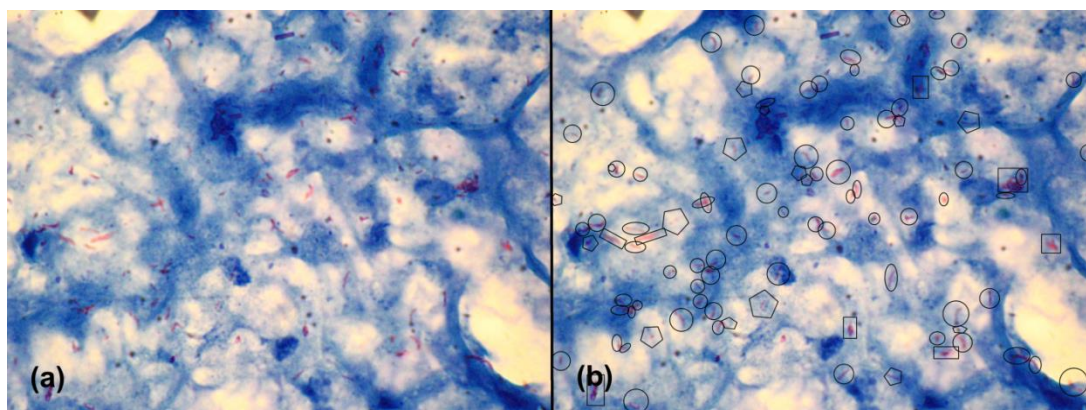


Figura 31 – Imagens baciloscópicas: (a) Imagem original adquirida por Kimura Junior (2010). (b) Imagem com marcação dos bacilos, bacilos duvidosos e globias.

A contagem dos bacilos validados na imagem foi realizada de forma manual, utilizando uma ferramenta de contagem do programa Adobe Photoshop

CS5[®], como mostra a Figura 32. Para cada imagem foram armazenadas as quantidades de bacilos, considerando a validação de apenas um especialista.

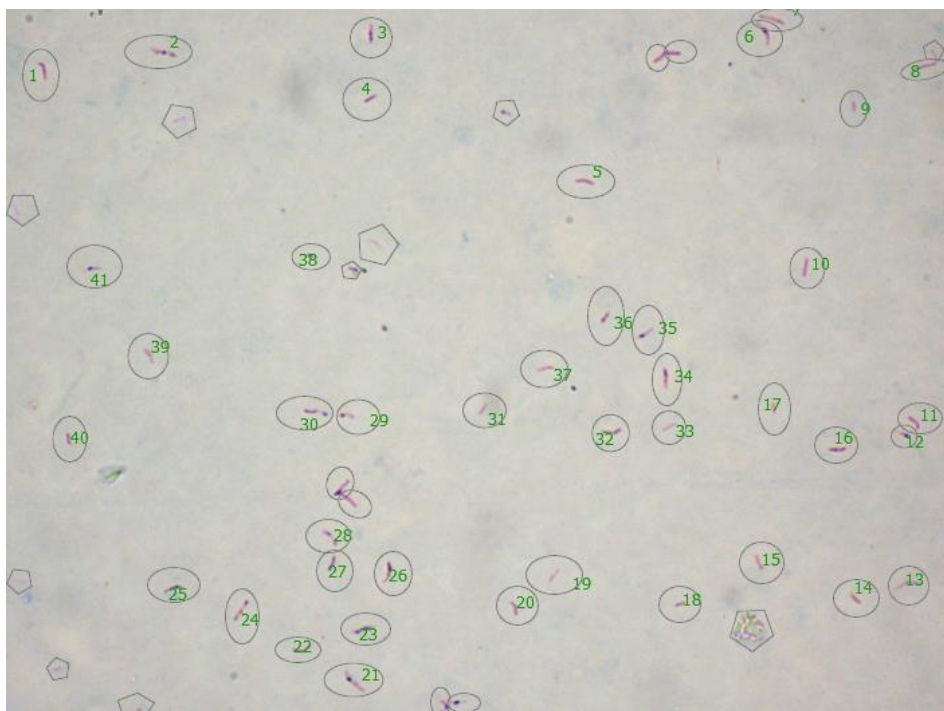


Figura 32 - Exemplo de imagem com a contagem dos bacilos marcados.

4.2.3 COLETA DE AMOSTRAS DE *PIXEL*



Nesta etapa foram construídas duas bases de dados, uma correspondente a valores dos componentes R, G e B de *pixels* pertencentes a bacilos previamente marcados e validados por especialista e a outra correspondente a *pixels* de fundo. Essas bases foram construídas em conjunto com Xavier (2012). Para cada imagem

foram extraídos vinte valores de *pixels* pertencentes a regiões de bacilos e vinte valores de *pixels* não pertencentes a regiões de bacilos. No total foram extraídos 4800 *pixels* de amostras RGB, sendo 2400 para amostra de bacilos e 2400 para amostra de fundo. A ferramenta empregada para a seleção e a coleta das amostras dos *pixels* foi o Matlab®, utilizando o comando *impixel* como mostra a Figura 33.

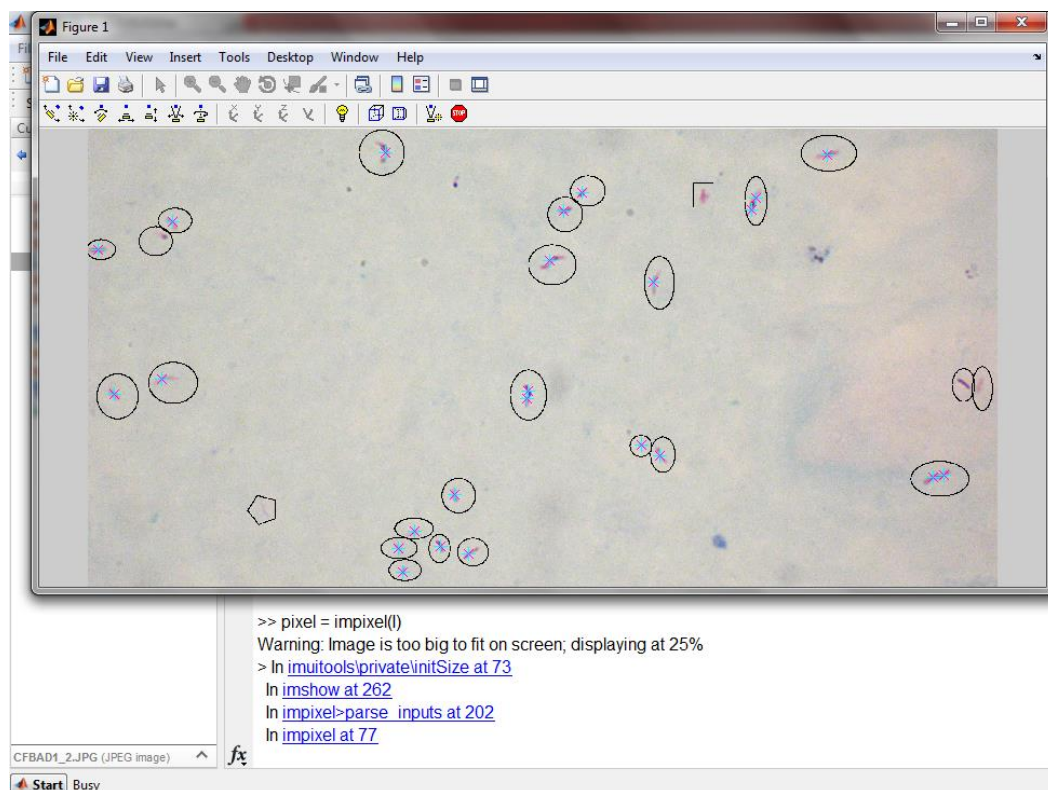


Figura 33 - Utilização do comando *impixel* na ferramenta Matlab® para extração das amostras de *pixels* RGB de bacilos nas imagens.

As amostras de *pixels* extraídas foram armazenadas em arquivos de dados *.mat*. Cada arquivo com matrizes de três colunas, onde cada coluna representa uma dos componentes do espaço de cor RGB. A Figura 34 apresenta a matriz (200x3) com a amostra de *pixels* de bacilos para o grupo de imagens CFAAD – lâmina 1, e mostra os arquivos *.mat* para cada grupo de imagens.

A nomenclatura CFXXX_LY_B refere-se a amostras de bacilos e a nomenclatura CFXXX_LY_NB refere-se a amostras de não-bacilos ou de fundo. Como pode-se observar na seção 4.1.2, cada grupo possui três lâminas, logo Y discrimina a lâmina podendo assumir os valores 1, 2 ou 3. Como para cada uma das doze lâminas tem-se dez imagens e para cada imagem extraíram-se vinte *pixels*, tem-se, então, doze matrizes de dimensão 200x3 com amostras de *pixels* de bacilos e doze matrizes de dimensão 200x3 com amostras de *pixels* de fundo (vide Figura 34).

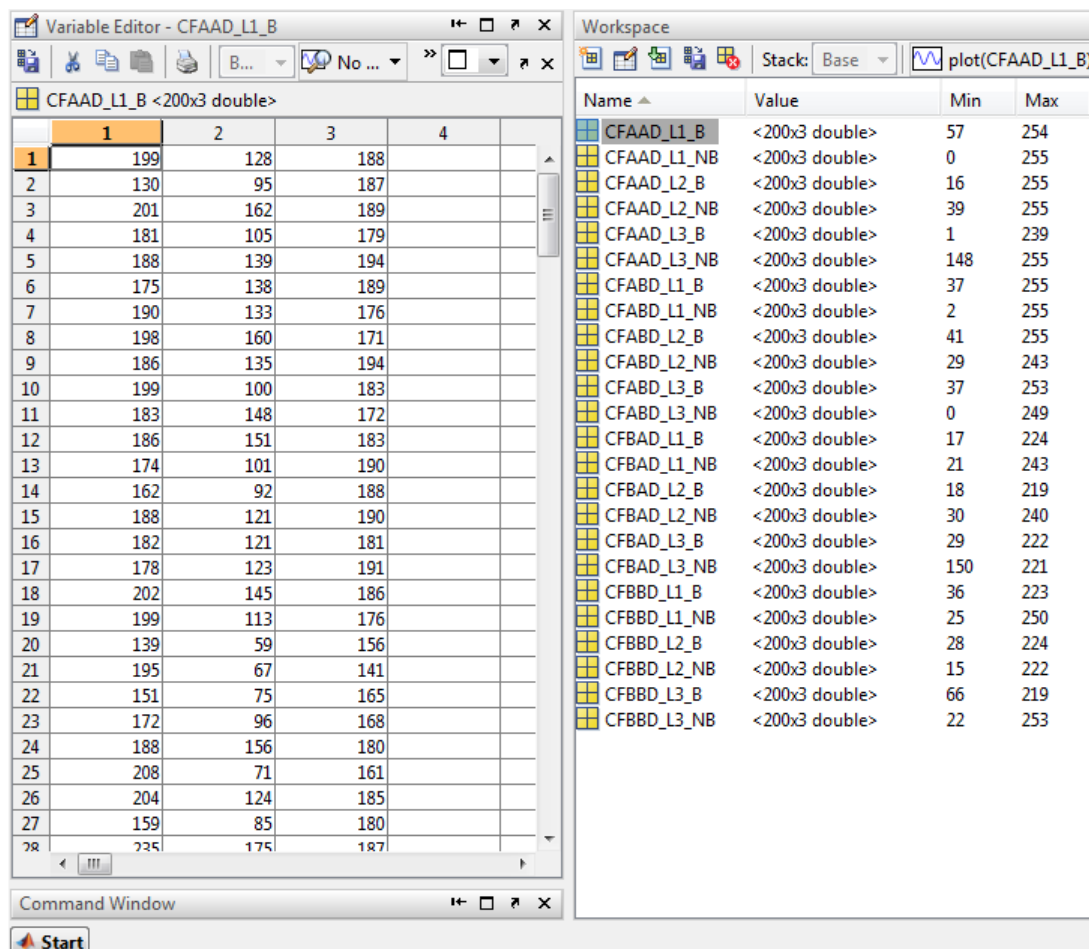


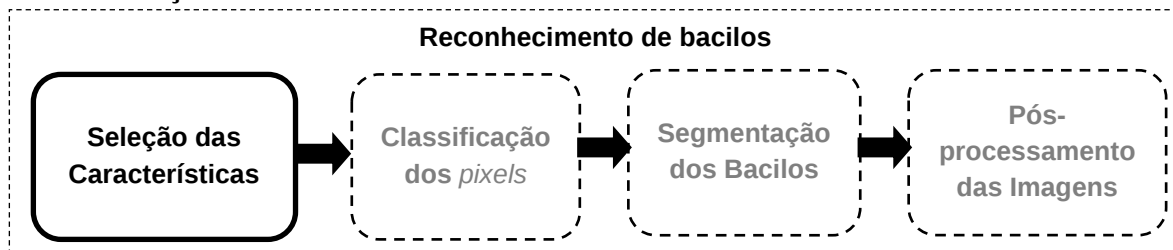
Figura 34 - Amostras de *pixels* extraídas utilizando a ferramenta Matlab®

Após concatenar as matrizes obteve-se uma matriz de dimensão 1200x3 para amostras de *pixel* de bacilos para treinamento, e uma matriz de dimensão 1200x3 para amostras de bacilos para teste. Procedimento idêntico foi realizado para a obtenção das matrizes correspondentes às amostras de *pixel* de fundo, sendo metade da amostra para treinamento e metade para teste.

A partir dos valores RGB foram derivados os valores dos espaços de cores HSI, YCbCr e Lab. Desses espaços de cores foram criados 30 vetores de características para bacilos e 30 vetores de características para o fundo. Os vetores de características foram: R, G, B, $\sim R$, $\sim G$, $\sim B$, R-G, R-B, G-B, H, S, I, H-S, H-I, S-I, Y, Cb, Cr, Y-Cb, Y-Cr, Cb-Cr, L, a, b, L-a, L-b, a-b, R-I, G-I e B-I, onde $\sim R$, $\sim G$ e $\sim B$ são os valores complementares de R, G e B, respectivamente, ou seja, $\sim R = (255-R)$, $\sim G = (255-G)$ e $\sim B = (255-B)$.

Foram então obtidos 30 vetores de características de bacilos com dimensão 1200 para treinamento e 30 vetores de características de bacilos com a mesma dimensão para teste. Procedimento idêntico foi realizado para a constituição dos vetores de treinamento e de teste relativos a *pixels* de fundo. Vale ressaltar que essas mesmas bases de dados, tanto para amostras de treinamento como para amostras de teste, foram utilizada para validar outro método de segmentação realizado por Xavier (2012), com o fim de possibilitar a comparação entre o método aqui proposto e o do referido autor.

4.2.4 SELEÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS



Para selecionar um conjunto ótimo de características dentre as 30 características citadas na seção anterior, optou-se por utilizar a técnica de seleção escalar de características (vide seção 2.3.3). Foram selecionados cinco conjuntos de características. O primeiro conjunto com as quatro primeiras características selecionadas, o segundo com as cinco primeiras características selecionadas, o terceiro com as seis primeiras características selecionadas, o quarto com as sete primeiras características selecionadas, e por fim o último conjunto com as oito primeiras características selecionadas.

De acordo com o algoritmo de seleção de características descrito anteriormente, para a seleção da primeira característica calculou-se o valor da Razão de Discriminação de Fischer (FDR) para cada uma das 30 características extraídas e a característica com maior valor FDR foi selecionada como primeira. Para a seleção da segunda característica utilizou-se a equação 3 da seção 2.3.3 (o algoritmo de seleção escalar) e para a seleção das demais características utilizou-se a equação 4.

Como se pode observar anteriormente, as equações 3 e 4 utilizam os parâmetros α_1 e α_2 . Para definir quais valores adotar para estes parâmetros utilizou-se diferentes combinações de α_1 e α_2 , e para cada combinação foi

selecionado um grupo de características. O Quadro 10 mostra as cinco diferentes combinações utilizadas para os parâmetros α_1 e α_2 .

Quadro 10 - Combinações de α_1 e α_2 utilizados na seleção de características

α_1	α_2
0,2	0,8
0,4	0,6
0,6	0,4
0,8	0,2
1	1

Para a seleção de características utilizaram-se os parâmetros α_1 e α_2 da seguinte maneira:

- Para cada par combinado α_1 e α_2 selecionou-se um grupo de características com a quantidade de características definida de acordo com o conjunto desejado;
- Para cada característica selecionada calculou-se a frequência com que ela foi selecionada em todos os grupos, ou seja, se a característica foi selecionada em todas as cinco combinações então a sua frequência foi de 100%;
- Por último as características foram apresentadas em ordem decrescente em relação ao seu valor de frequência. As características com as maiores frequências foram selecionadas.

Por exemplo, para selecionar um conjunto com quatro características, primeiramente seleciona-se as quatro características para cada uma das cinco combinações de α_1 e α_2 , como apresentado no Quadro 11.

Quadro 11 - Seleção de quatro características utilizando diferentes combinações de α_1 e α_2 .

<i>Características</i>	$\alpha_1=1$ e $\alpha_2=1$	$\alpha_1=0,2$ e $\alpha_2=0,8$	$\alpha_1=0,8$ e $\alpha_2=0,2$	$\alpha_1=0,4$ e $\alpha_2=0,6$	$\alpha_1=0,6$ e $\alpha_2=0,4$
Característica 1	G-I	G-I	G-I	G-I	G-I
Característica 2	Y-Cr	Y-Cr	a	Y-Cr	a
Característica 3	a	R-G	L-a	a	Y-Cr
Característica 4	L-a	L-a	Y-Cr	L-a	L-a

Em seguida, para cada característica calcula-se a sua frequência nos cinco grupos, como mostrado no e quatro características.

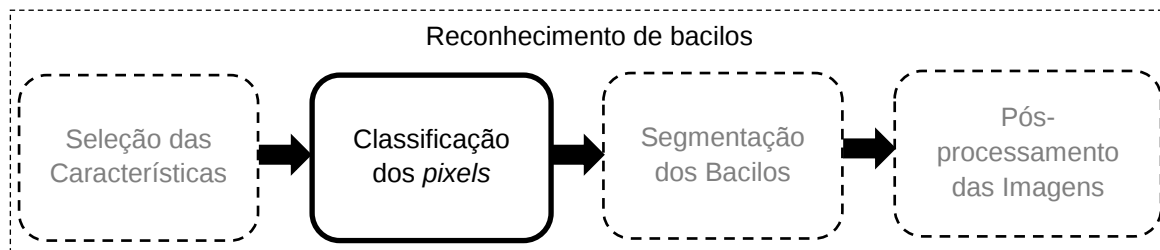
Quadro 12. As quatro características com maiores frequências são as características selecionadas para o conjunto de quatro características.

Quadro 12 - Conjunto de quatro características selecionadas de acordo com a frequência.

	<i>Características</i>	<i>Frequência (%)</i>
Características selecionadas	G-I	100%
	Y-Cr	100%
	L-a	100%
	a	80%
	R-G	20%

Os cinco conjuntos de características selecionadas foram utilizados para combinar com as diferentes arquiteturas de rede e após simulações adquirir o melhor vetor de características para a segmentação do bacilo.

4.2.5 CLASSIFICAÇÃO DOS *PIXELS*



A etapa de classificação dos *pixels* consiste, basicamente, na classificação dos *pixels* na classe bacilo ou na classe fundo. Para esta classificação adotou-se como classificador uma rede neural *perceptron* multicamada.

A rede neural utilizou uma arquitetura $n-m-1$ com n neurônios na primeira camada, m neurônios na segunda e um neurônio na camada de saída. Para ajustar a melhor arquitetura, as camadas n e m assumiram valores do seguinte conjunto: $C = \{3, 6, 9, 12, 15, 18\}$. Trinta e seis diferentes arquiteturas resultaram da combinação de n e m , como mostra o Quadro 13.

As trinta e seis arquiteturas de redes apresentadas no Quadro 13 foram avaliadas utilizando-se cada um dos cinco conjuntos de características selecionadas, resultando em 180 simulações para a amostra de treinamento e igual número para a amostra de teste.

Quadro 13 - Combinações de n e m para formar 36 diferentes arquiteturas de rede.

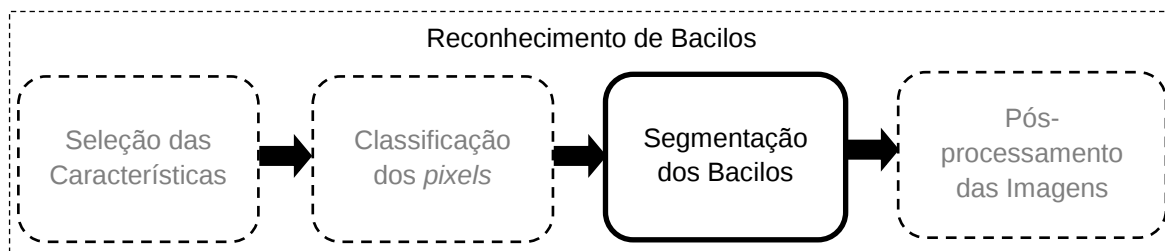
Arquitetura	n	m	Saída
1	3	3	1
2	3	6	1
3	3	9	1
4	3	12	1
5	3	15	1
6	3	18	1
7	6	3	1
8	6	6	1
9	6	9	1
10	6	12	1
11	6	15	1
12	6	18	1
13	9	3	1
14	9	6	1
15	9	9	1
16	9	12	1
17	9	15	1
18	9	18	1

Arquitetura	n	m	Saída
19	12	3	1
20	12	6	1
21	12	9	1
22	12	12	1
23	12	15	1
24	12	18	1
25	15	3	1
26	15	6	1
27	15	9	1
28	15	12	1
29	15	15	1
30	15	18	1
31	18	3	1
32	18	6	1
33	18	9	1
34	18	12	1
35	18	15	1
36	18	18	1

O algoritmo de treinamento usado foi o *backpropagation*. A função de ativação utilizada nos neurônios de todas as camadas foi a tangente hiperbólica e o critério de convergência utilizado foi um erro quadrático de 10^{-4} .

Ao fim das 180 simulações foram obtidos os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia para cada combinação. A arquitetura escolhida para o classificador foi aquela que obteve o maior valor de acurácia no treinamento.

4.2.6 SEGMENTAÇÃO DOS BACILOS



Depois o classificador com a melhor combinação de arquitetura de rede foi obtido juntamente com o conjunto de características. Utilizou-se tal classificador para segmentar as imagens de baciloscopia de campo claro. Todos os *pixels* de cada imagem foram varridos e cada *pixel* foi classificado na classe bacilo ou na classe fundo. Para cada imagem, uma nova matriz de mesma dimensão foi criada e os *pixels* classificados como bacilos assumiram o valor 1 (um) na mesma posição da nova matriz, e os *pixels* classificados como fundo assumiram o valor 0 (zero). As matrizes resultantes correspondem a imagens binárias, onde os *pixels* brancos representam objetos classificados como bacilo e os *pixels* pretos representam o fundo.

Utilizando as marcações dos bacilos nas imagens originais, realizou-se uma contagem manual dos objetos classificados como bacilos na técnica de segmentação adotada. Foram contadas as quantidades de bacilos classificados corretamente (verdadeiro positivo) em cada imagem e as quantidades de objetos classificados como bacilos, mas que eram ruídos (falso positivo). Como não foi possível obter a quantidade de verdadeiros negativos, a especificidade e a acurácia não foram utilizadas como medidas de desempenho para esta etapa.

A Figura 35 (b) apresenta um exemplo de uma imagem segmentada utilizando o método de segmentação proposto neste trabalho.

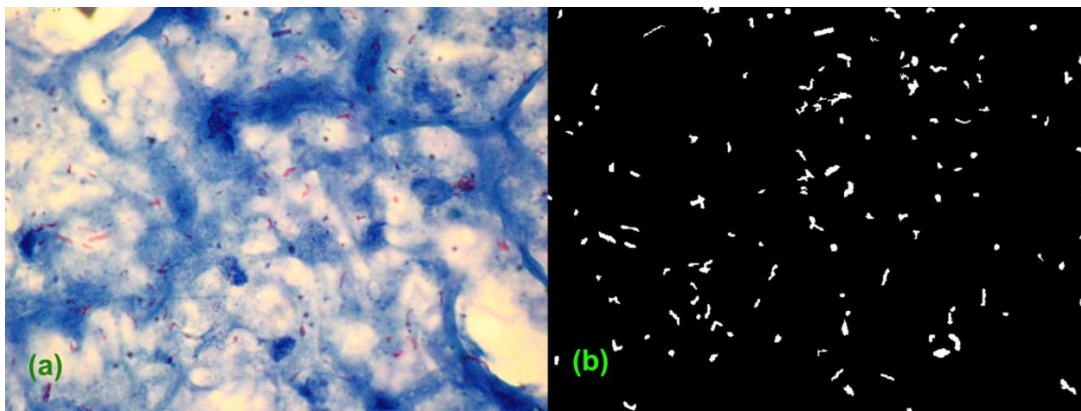
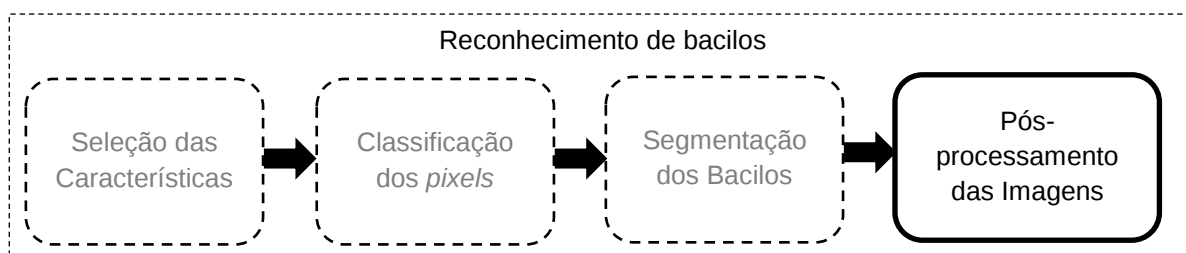


Figura 35 - (a) Imagem original do grupo CFAAD adquirida por Kimura Junior (2010).
(b) Imagem resultado da aplicação do método de segmentação proposto neste trabalho.

4.2.7 PÓS-PROCESSAMENTO DAS IMAGENS



Após a classificação dos bacilos nas imagens, um filtro morfológico foi aplicado para remover os ruídos e as globias. Considerando que foram utilizadas imagens com resolução 640x480 para a classificação de bacilos, aplicou-se um filtro de área para remover objetos maiores que 150 *pixels* e menores que 20 *pixels*. De forma experimental, observou-se que os objetos segmentados maiores do que 150 *pixels* não correspondiam a bacilos isolados e os objetos segmentados menores do que 20 *pixels* correspondiam a ruídos na imagem.

A Figura 36 (a) mostra a imagem resultante da aplicação do classificador na imagem da Figura 35 (a), sem a etapa do pós-processamento, ou seja, sem utilização do filtro de área. A imagem apresentada na Figura 36 (b) representa uma imagem resultado da aplicação do método completo de segmentação, proposto nesta dissertação, com a etapa de pós-processamento utilizando o filtro de área.

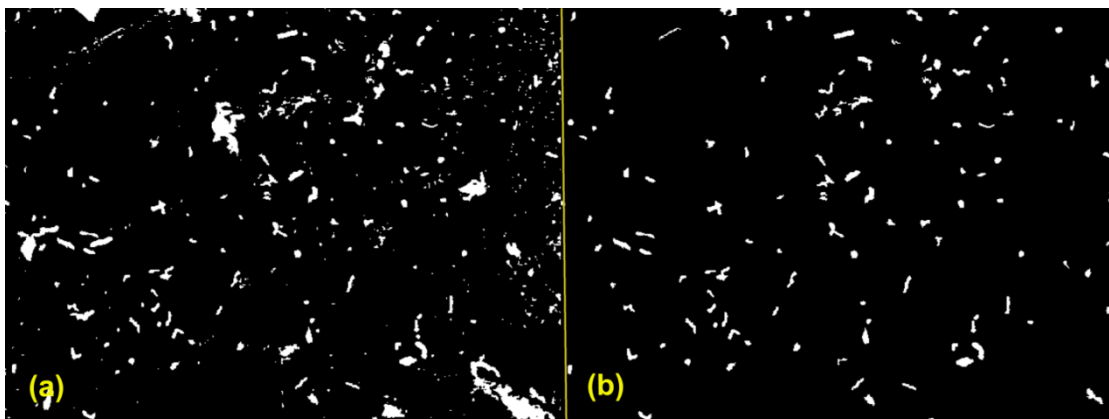


Figura 36 - (a) Imagem resultado da classificação de bacilos sem utilizar filtro de área. (b) Imagem resultado da classificação de bacilos com pós-processamento utilizando filtro de área.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DOS CONJUNTOS DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS

As características utilizadas para a classificação de *pixel* foram os componentes dos espaços de cores: RGB, HSI, YCbCr e Lab, bem como os seus complementos e suas combinações. O Quadro 14 apresenta para o conjunto das 30 características utilizado, o valor de FDR correspondente. Como pode ser observada, a característica G-I, aquela que obteve o maior valor FDR, foi a primeira variável selecionada.

Quadro 14 - Valores FDR calculados para cada característica

Ordem	Característica	Valor FDR	Ordem	Característica	Valor FDR
1	G-I	2,5212	16	Y-Cb	0,5172
2	a	2,0578	17	S-I	0,4463
3	L-a	1,5719	18	I	0,3801
4	R-G	1,5136	19	B	0,3726
5	Y-Cr	1,4992	20	S	0,3526
6	H-I	1,2531	21	Cb	0,3066
7	a-b	1,214	22	R-I	0,2961
8	H	1,1704	23	B	0,2209
9	G	1,1069	24	~B	0,2209
10	~G	1,1069	25	B-I	0,1437
11	Cr	1,0137	26	R	0,0301
12	G-B	0,871	27	~R	0,0301
13	L	0,5578	28	Cb-Cr	0,0264
14	Y	0,5539	29	R-B	0,0037
15	H-S	0,5474	30	L-b	0,0002

Utilizando a técnica de seleção escalar de características, conjuntos com 4, 5, 6, 7 e 8 características foram obtidos. O Quadro 15 tabela os resultados obtidos nas seleções de características para as diferentes combinações entre α_1 e α_2 .

Quadro 15 - Conjuntos de características selecionadas para cada combinação de α_1 e α_2 .

Número de características dos conjuntos	$\alpha_1=1$ $\alpha_2=1$	$\alpha_1=0,2$ $\alpha_2=0,8$	$\alpha_1=0,8$ $\alpha_2=0,2$	$\alpha_1=0,4$ $\alpha_2=0,6$	$\alpha_1=0,6$ $\alpha_2=0,4$
4 características	G-I	G-I	G-I	G-I	G-I
	Y-Cr	Y-Cr	a	Y-Cr	a
	a	R-G	L-a	a	Y-Cr
	L-a	L-a	Y-Cr	L-a	L-a
5 características	G-I	G-I	G-I	G-I	G-I
	Y-Cr	Y-Cr	a	Y-Cr	a
	a	R-G	L-a	a	Y-Cr
	L-a	L-a	Y-Cr	L-a	L-a
6 características	R-G	H-I	R-G	R-G	R-G
	G-I	G-I	G-I	G-I	G-I
	Y-Cr	Y-Cr	a	Y-Cr	a
	a	R-G	L-a	a	Y-Cr
7 características	L-a	L-a	Y-Cr	L-a	L-a
	R-G	H-I	R-G	R-G	R-G
	H-I	a	H-I	H-I	H-I
	G-I	G-I	G-I	G-I	G-I
8 características	Y-Cr	Y-Cr	a	Y-Cr	a
	a	R-G	L-a	a	Y-Cr
	L-a	L-a	Y-Cr	L-a	L-a
	R-G	H-I	R-G	R-G	R-G
8 características	H-I	a	H-I	H-I	H-I
	a-b	R-B	a-b	H	a-b
	G-I	G-I	G-I	G-I	G-I
	Y-Cr	Y-Cr	a	Y-Cr	a
8 características	a	R-G	La	a	Y-Cr
	L-a	L-a	Y-Cr	L-a	L-a
	R-G	H-I	R-G	R-G	R-G
	H-I	a	H-I	H-I	H-I
8 características	a-b	R-B	a-b	H	a-b
	H	H	H	a-b	H

O Quadro 16 apresenta o ranque das variáveis selecionadas no Quadro 15 de acordo com a frequência ($f\%$), ou seja, de acordo com o número de vezes, que elas foram selecionadas ao variar os valores e combinações de α_1 e α_2 .

Quadro 16 - Ranque das variáveis de acordo com a frequência com que foram selecionadas.

Número de características dos conjuntos	Características	f%
4 características	1. G-I	100%
	2. Y-Cr	100%
	3. L-a	100%
	4. a	80%
	R-G	20%
5 características	1. G-I	100%
	2. Y-Cr	100%
	3. L-a	100%
	4. R-G	100%
	5. a	80%
	H-I	20%
6 características	1. G-I	100%
	2. Y-Cr	100%
	3. L-a	100%
	4. R-G	100%
	5. a	100%
	6. H-I	100%
7 características	1. G-I	100%
	2. Y-Cr	100%
	3. L-a	100%
	4. R-G	100%
	5. a	100%
	6. H-I	100%
	7. a-b	60%
	H	20%
8 características	R-B	20%
	1. G-I	100%
	2. Y-Cr	100%
	3. L-a	100%
	4. R-G	100%
	5. a	100%
	6. H-I	100%
	7. H	100%
	8. a-b	80%
	R-B	20%

O Quadro 17 apresenta as características que foram selecionadas para cada um desses conjuntos.

Quadro 17- Conjuntos de características selecionadas

Número de características	Conjuntos de características selecionadas
4	{G-I, Y-Cr, L-a, a}
5	{G-I, Y-Cr, L-a, R-G, a}
6	{G-I, Y-Cr, L-a, R-G, a, H-I}
7	{G-I, Y-Cr, L-a, R-G, a, H-I, a-b}
8	{G-I, Y-Cr, L-a, R-G, a, H-I, H, a-b}

5.2 RESULTADOS DO CLASSIFICADOR DE *PIXELS*

Para cada uma das arquiteturas do classificador de rede neural simuladas, foram calculados valores de acurácia, sensibilidade e especificidade. A acurácia foi o parâmetro utilizado para eleger a melhor arquitetura para o classificador.

A combinação de uma arquitetura com 18 (dezoito) neurônios na primeira camada, 3 (três) na segunda e 1 (um) na terceira (18-3-1), combinada com o conjunto de cinco características selecionadas, obteve a maior acurácia tanto para a amostra de treinamento, quanto para a amostra de teste. O Quadro 18 mostra os valores de acurácia, sensibilidade e especificidade da melhor arquitetura.

Quadro 18 - Desempenho da melhor arquitetura da rede neural simulada (Arquitetura 18-3-1 combinada com o conjunto de 5 características).

Tipo de Amostra	Acurácia (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Treinamento	90,87	92,75	89,00
Teste	91,45	93,41	89,50

5.3 RESULTADOS DA SEGMENTAÇÃO DOS BACILOS

Foram adotadas três medidas de desempenho para avaliar os resultados da segmentação: sensibilidade = $VP / (VP+FN)$, percentual de erro = $FP / (FP+VP)$ e percentual de acerto = $VP / (FP+VP)$. Onde VP é número de verdadeiros positivos, FP é o número de falsos positivos e FN a quantidade de falsos negativos. Ou seja, VP é a quantidade de bacilos identificados pela técnica de segmentação, FP é a quantidade de ruídos (objetos que são classificados como bacilos, mas não o são de fato), FP+VP é a quantidade total de objetos segmentados (tanto bacilos como ruídos) e VP+FN é o número total de bacilos identificados pelo especialista.

A contagem dos bacilos nas imagens foi realizada de forma manual. O Quadro 19 apresenta a contagem dos bacilos nas imagens segmentadas utilizando o classificador de rede neural onde são apresentados: o número de bacilos identificados pela especialista, número de bacilos segmentados, número de ruídos segmentados e a sensibilidade para cada um dos grupos de imagens.

Quadro 19 - Resultado da contagem dos bacilos por grupo de imagens e cálculo da sensibilidade.

Grupo	VP+FN	VP	FP	Sensibilidade
CFAAD	1326	1236	338	93,21%
CFABD	45	42	196	93,33%
CFBAD	912	832	10	91,23%
CFBBD	173	138	16	79,77%

O Quadro 20 mostra os resultados da segmentação de bacilos, em termos de sensibilidade e taxa de acerto para as imagens dos grupos CFA, CFB e CFA+CFB, respectivamente.

Quadro 20 - Desempenho da segmentação de bacilos utilizando-se uma rede neural como classificador

Grupo	Sensibilidade (%)	Taxa de acerto (%)
CFA	94,16	50,63
CFB	90,32	94,78
CFA+CFB	92,47	63,36

No Quadro 20 nota-se que o grupo CFA apresenta a maior sensibilidade na classificação do bacilo. Contudo, é notável que a taxa de acerto para o grupo CFB é muito maior do que para o grupo CFA.

A Figura 37, a Figura 38, a Figura 39 e a Figura 40 mostram imagens originais de microscopia de campo claro pertencentes aos grupos CFA com alta densidade de bacilos, CFA com baixa densidade de bacilos, CFB com alta densidade de bacilos e CFB com baixa densidade de bacilos, respectivamente, com as correspondentes imagens de bacilos segmentados.

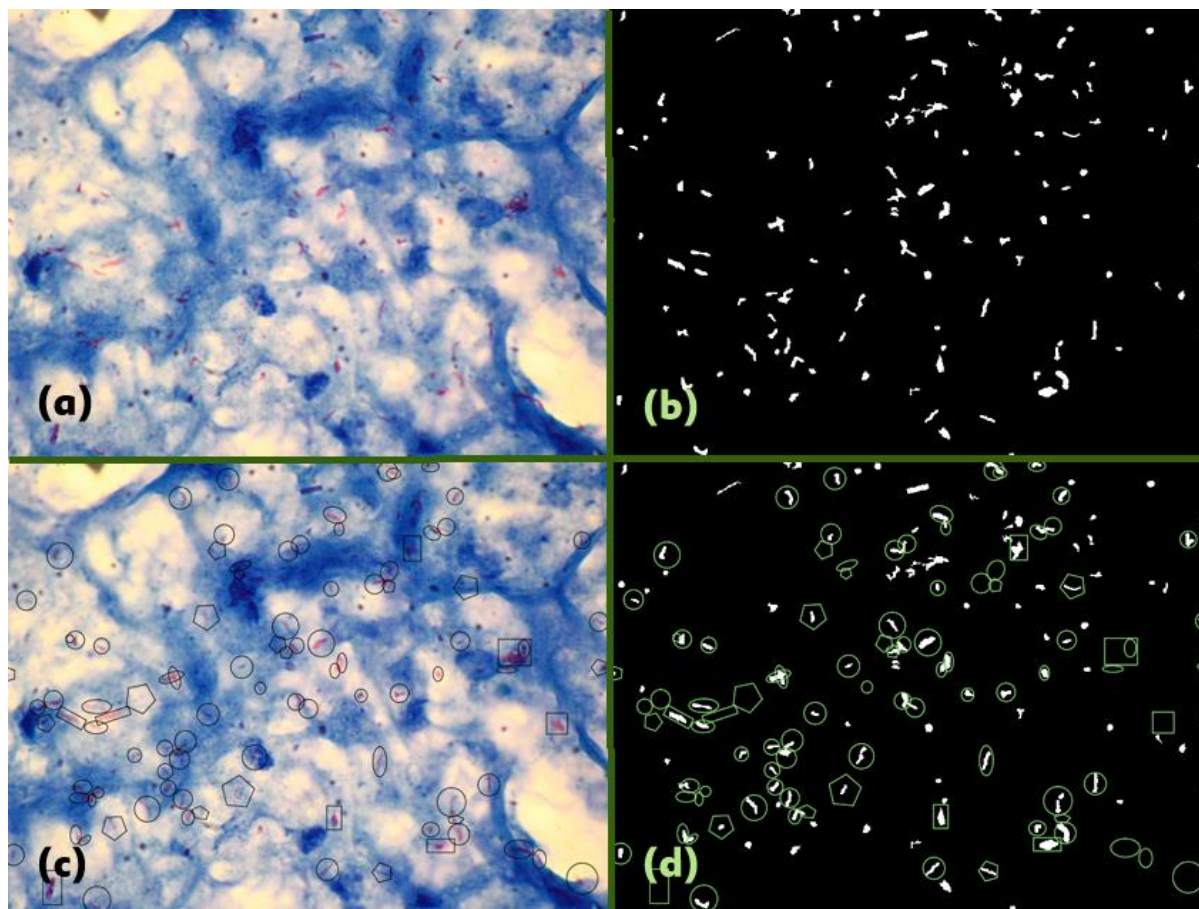


Figura 37 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFAAD.

(a) Imagem original do grupo CFAAD. (b) imagem com os bacilos segmentados. (c) imagem original com os bacilos marcados. (d) imagem segmentada com os bacilos marcados.

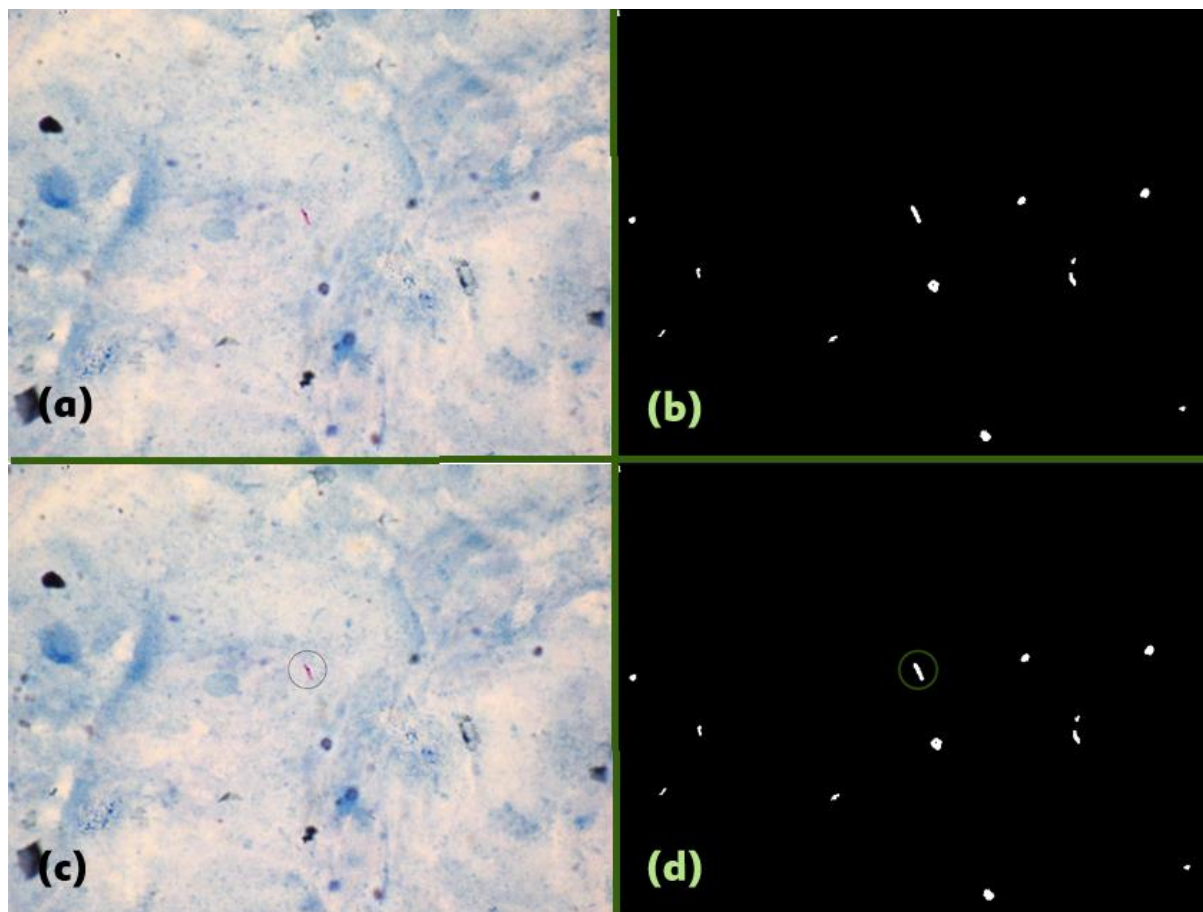


Figura 38 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFABD.

(a) Imagem original do grupo CFABD. (b) imagem com os bacilos segmentados. (c) imagem original com os bacilos marcados. (d) imagem segmentada com os bacilos marcados.

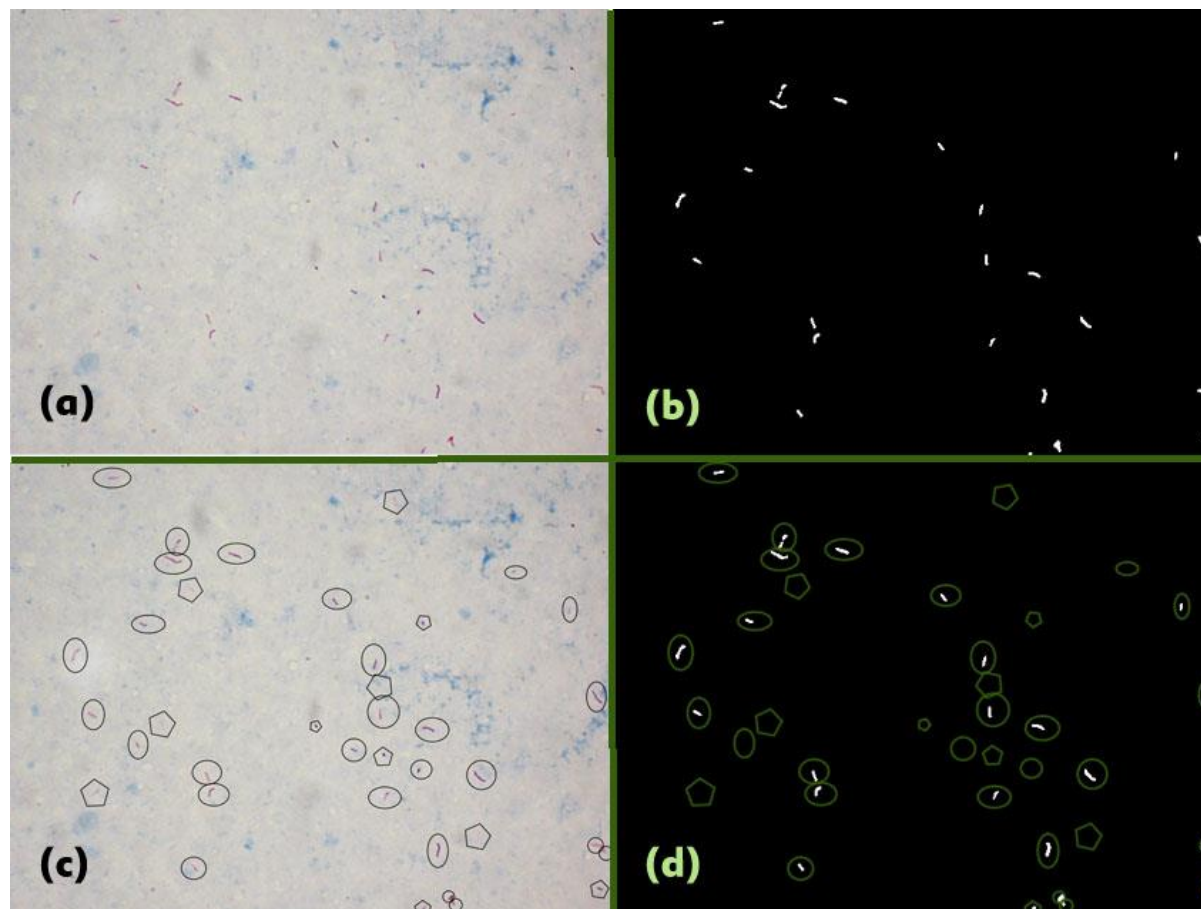


Figura 39 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFBAD.

(a) Imagem original do grupo CFBAD. (b) imagem com os bacilos segmentados. (c) imagem original com os bacilos marcados. (d) imagem segmentada com os bacilos marcados.

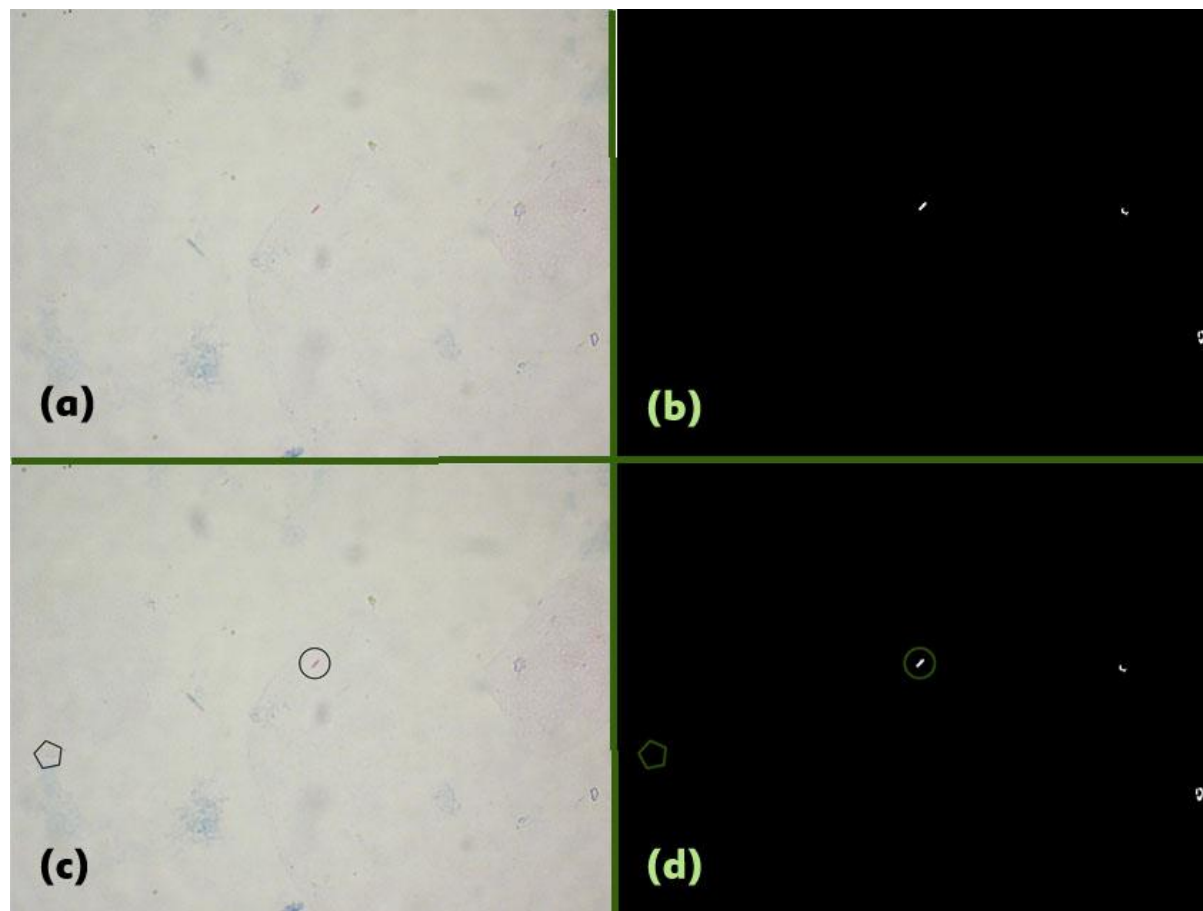


Figura 40 - Resultado da segmentação em imagens do grupo CFBAD.

(a) Imagem original do grupo CFBAD. (b) imagem com os bacilos segmentados. (c) imagem original com os bacilos marcados. (d) imagem segmentada com os bacilos marcados.

As imagens originais são apresentadas com os bacilos marcados (vide Figura 37(a), Figura 38(a), Figura 39(a) e Figura 40(a). Uma elipse envolve bacilos verdadeiros. Um retângulo envolve um aglomerado de bacilos. Um polígono envolve bacilos duvidosos (pois o foco ou a morfologia não permitem identificar, com certeza, se o objeto é um bacilo).

Na determinação da acurácia, sensibilidade e taxa de acerto, os aglomerados de bacilos ou bacilos duvidosos não foram levados em consideração. O primeiro foi excluído porque não é possível saber o número exato de bacilos quando estão em aglomerados. O último foi excluído porque não é possível afirmar, com certeza, que o objeto é um bacilo.

Como mostrado, a imagem resultado CFB apresenta uma pequena quantidade de ruídos, enquanto que a imagem resultado CFA possui uma grande quantidade de ruídos.

CAPÍTULO VI

ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho, desde o início, almejou segmentar bacilos da TB em imagens de baciloscopia de campo claro classificando os *pixels* das imagens em bacilo ou fundo.

Utilizaram-se, para a entrada do classificador, características de cor provenientes dos quatro espaços de cores empregados na seleção de características. As características selecionadas pela técnica de seleção escalar de características incluíram pelo menos um componente de cada espaço de cor empregado.

Os resultados mostraram que o melhor classificador de *pixels* foi obtido com um conjunto de cinco características e uma arquitetura com 18 (dezoito) neurônios na primeira camada, 3 (três) na segunda e 1 (um) na terceira. Com este classificador, obteve-se uma sensibilidade superior a 93% na fase de treinamento. Em se tratando de imagens de baciloscopia de campo claro, considera-se um bom resultado.

Ao Aplicar o classificador nas imagens, obteve-se uma taxa de acerto em imagens com um fundo de baixa densidade, significativamente, maior do que em imagens com uma alta densidade de conteúdo de fundo. A baixa taxa de acerto em imagens com alta densidade de conteúdo de fundo foi consequência ao fato de que nesse tipo de imagem existem muitos ruídos com a mesma tonalidade do bacilo.

Em relação aos quatro grupos de imagens, a maior sensibilidade foi alcançada para o grupo CFABD e a menor para o grupo CFBBBD. O classificador aplicado ao grupo CFBBBD conseguiu um valor de sensibilidade abaixo de 90% diferentemente de quando aplicado aos demais grupos. As imagens do grupo CFBBBD são imagens com o fundo mais uniforme, mas,

apesar disto, alguns dos bacilos nestas imagens estão presentes em regiões mais espessas da lâmina, e, por conseguinte, apresentam-se fora de foco (mais ‘apagados’) nas imagens.

Ao analisar a Figura 38, percebe-se que alguns objetos que não são bacilos, mas possuem um pouco da coloração vermelha, foram classificados como bacilos na imagem resultado da segmentação. Para este caso pode-se utilizar um filtro de forma, como excentricidade, por exemplo, para remover estes ruídos.

A sensibilidade obtida, considerando todas as imagens, foi de 92,47%, um resultado adequado tendo em vista que se utilizou apenas características de cor. Diferente de Khutlang *et. al* (2010), calculou-se a acurácia por bacilos e não por imagem.

Uma importante diferença entre este trabalho e outros relacionados, é que as características utilizadas como entradas nos classificadores foram selecionadas de quatro diferentes espaços de cores.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÃO

Esta dissertação reflete um trabalho de investigação de um novo método de segmentação de bacilos da TB empregando redes neurais artificiais. Levando-se em conta a pesquisa bibliográfica de trabalhos relacionados, e analisando os aspectos desenvolvidos no método proposto neste trabalho, pode-se perceber que o método automático desenvolvido de discriminação das imagens em relação ao conteúdo de fundo foi uma contribuição relevante. Ainda, em função dos resultados apresentados, é-se levado a acreditar que o método descrito neste trabalho é mais adequado para segmentar bacilos em imagens com baixa densidade de conteúdo de fundo.

Além disso, outra contribuição, diz respeito à construção de um banco de imagens de baciloscopia de campo claro, com imagens validadas por um especialista em baciloscopia. Desse modo, novos métodos a serem desenvolvidos poderão usar a mesma casuística para fins de comparação de desempenho. Ainda, em face de se ter desenvolvido um método automático de classificação de imagens, em função de seu conteúdo de fundo, novas imagens podem ser agregadas ao banco, aumentando assim a casuística de novos estudos.

Ademais, os esforços estão, a partir de agora, concentrados em técnicas para remover ruídos presentes em imagens com alta densidade de conteúdo de fundo e em classificar os bacilos não identificados pelo classificador.

A classificação correta de bacilos não identificados pelo classificador pode ser melhorada pelo realce dos bacilos mais apagados nas imagens. Uma maneira de realçar os bacilos é utilizar múltiplas imagens do mesmo campo com a distância focal variante, de tal

forma que cada um dos bacilos presente no campo possa estar em foco em pelo menos uma das imagens daquele campo. Outra opção seria a divisão de um campo do microscópio em quatro ou mais quadrantes e obter o melhor ajuste de foco possível para cada quadrante.

Os bacilos conectados ou bacilos que se tocam, é um importante aspecto que a literatura não leva em consideração e que deve ser analisado. Uma alternativa seria o emprego do algoritmo de esqueletização a fim de obter o esqueleto da região, ou seja, uma representação estrutural da forma do bacilo.

O método de segmentação dos bacilos proposto neste trabalho pode ser aplicado para imagens de baciloscopia com um fundo mais claro e uniforme (grupo CFB), e tais imagens podem ser caracterizadas de forma automática pelo método de discriminação automático das imagens desenvolvido. Todavia, espera-se, nos próximos trabalhos, aumentar a sensibilidade nos dois grupos e mostrar resultados mais animadores em relação ao grupo de imagens com o fundo de conteúdo mais denso (CFA) ao combinar informações de cor e forma do bacilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**. Apostila ANVISA Módulo 06. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/4128955/Biologia-Apostila-ANVISA-Modulo-06>>. Acesso em: 12 Agosto 2012.

BIANCHI, Marcelo Franceschi de. **Extração de características de imagens de faces humanas através de wavelets, PCA e IMPCA**. São Carlos: USP, 2006. 137 p. Dissertação de mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

BRAGA, Antônio de Pádua; LUDERMIR, Teresa Bernarda; CARVALHO, André Ponce de Leon E de. **Redes Neurais Artificiais: Teoria e Aplicações**. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO NACIONAL DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS E AIDS. SÉRIE TELELAB. **Tuberculose - Diagnóstico Laboratorial - Baciloscopia**. Brasília, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Tuberculose – Guia De Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS. **SINAM - Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Tabulação de dados. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 12 Agosto 2012.

COSTA, Marly G. F.; COSTA FILHO, Cícero F. F.; SENA, Juliana F.; SALEM, Julia; LIMA, Mari O. de. **Automatic identification of mycobacterium tuberculosis with conventional light microscopy**. In the 30th Annual International IEEE EMBS Conference Vancouver, British Columbia, Agosto, p. 382-385, 2008.

CRUSE, Phil. **Introduction to Colour Spaces** - CIE Lab & LCH, 1997. Disponível em: <http://www.colourphil.co.uk/lab_lch_colour_space.html>. Acesso em: 7 Junho 2012.

FORERO, M.; CRISTÓBAL, G. **Automatic identification techniques of tuberculosis bacteria**. *Proc. SPIE*, v. 5203, p. 71–81, 2003.

FORERO, M.; SROUBEK, F.; CRISTÓBAL, G. **Identification of tuberculosis bacteria based on shape and colour**. *Real-Time Imaging*, v. 10, p. 251–262, Ago. 2004.

FORERO, M.; CRISTOBAL, G.; DESCO, M. **Automatic identification of Mycobacterium tuberculosis by gaussian mixture models.** *Journal of Microscopy*, v. 223, p. 120–132, Ago. 2006.

GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, R. E; tradução JUNIOR, Roberto Marcondes Cesar e Costa, Luciano da Fontoura. **Processamento de Imagens Digitais.** São Paulo: Editora Blucher, 2000.

GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing.** 3rd ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2008.

KHUTLANG, Rethabile; KRISHNAN, Sriram; DENDERE, Ronald; WHITELAW, Andrew; VEROPOULOS, Konstantinos; LEARMONTH, Genevieve; DOUGLAS, Tania S. **Classification of Mycobacterium Tuberculosis in Images of ZN-Stained Sputum Smears.** *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, v. 14, n. 4, Jul. 2010.

KHUTLANG, Rethabile; KRISHNAN, Sriram; WHITELAW, Andrew; DOUGLAS, Tania S. **Automated detection of tuberculosis in Ziehl-Neelsen stained sputum smears using two one-class classifiers.** *J. Microscopy*, v. 237, p. 96–102, 2010.

KIMURA JUNIOR, Almir. **Avaliação das métricas de autofocus para aplicação em imagens de baciloscopia de tuberculose obtidas utilizando microscopia de campo claro.** 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em engenharia elétrica) - Faculdade de Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

HAYKIN, Simon. **Neural Networks: A comprehensive foundation.** New Jersey: Prentice Hall, 1999.

MAKKAPATI, Vishnu; AGRAWAL, Ravindra; ACHARYA, Raviraja. **Segmentation and Classification of Tuberculosis Bacilli from ZN-stained Sputum Smear Images.** *5th Annual IEEE Conference on Automation Science and Engineering*, Bangalore-India, Ago. 2009.

OHTA, Noburu; ROBERTSON, Alan R. **Colorimetry: Fundamentals and Applications.** England: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

PEDRINI, Hélio; SCHWARTZ, William Robson. **Análise de Imagens Digitais: Princípios, Algoritmos e Aplicações.** São Paulo: Thomson Learning, 2008.

RAOF, R. A. A.; SALLEH, Zaleha; SAHIDAN, S. I.; MASHOR, M. Y.; MD NOOR, S. S.; MOHAMAD Idris, F.; HASAN, H. **Color Thresholding Method For Image Segmentation Algorithm Of Ziehl-Neelsen Sputum Slide Images.** *5th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control*, 2008.

SADAPHAL, P.; RAO, J.; COMSTOCK, G.; BEG, M. **Image processing techniques for identifying Mycobacterium tuberculosis in Ziehl–Neelsen stains.** *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 12, n. 5, p. 579–582, Mai. 2008.

SENA, Juliana. F. **Deteção automática do Mycobacterium tuberculosis em imagens de microscopia convencional através da utilização de segmentação de cor e limiar global**

adaptativo. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Faculdade de Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SOTAQUIRÁ, M.; RUEDA, L. e NARVAEZ, R. ***Detection and quantification of bacilli and clusters present in sputum smear samples: a novel algorithm for pulmonary tuberculosis diagnosis.*** *International Conference on Digital Image Processing.* 2009

STEINGART, K.; HENRY, M.; NG, V.; HOPEWELL, P.; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J.; URBANCZIK, R.; PERKINS, M.; AZIZ, M.; PAI, M. ***Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: A systematic review.*** *Lancet Infect. Dis.*, setembro, vol. 6, 2006.

THEODORIDIS, Sergios; KOUTROUMBAS, Konstantinos, ***Pattern Recognition - 3th Edition.*** San Diego: Elsevier Academic Press, 2006.

VEROPOULOS, K.; CAMPBELL, C.; LEARMONTH, G.; KNIGHT, B.; SIMPSON, J. ***The Automated Identification of Tubercle Bacilli using Image Processing and Neural Computing Techniques.*** *8th International Conference on Artificial Neural Networks*, Skövde - Sweden, v. 2, p. 797-802, Set. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. ***Tuberculosis. Global tuberculosis control 2011.*** Disponível em: < http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 16 Agosto 2012.

XAVIER, Clahildek M. ***Segmentação, classificação e quantificação de bacilos de tuberculose em imagens de baciloscopia de campo claro através do emprego de uma nova técnica de classificação de pixels utilizando máquinas de vetores de suporte.*** 2012. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

APÊNDICE

ARTIGOS

Este apêndice contém os artigos publicados/aceitos resultantes desta pesquisa:

1. Artigo publicado e apresentado no XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Computação (CSBC 2012) realizado em Curitiba, Paraná, de 16 a 19 de julho de 2012:
 - Segmentação do *Mycobacterium Tuberculosis* através de Novas Técnicas de Classificação de *Pixel*.
2. Artigo publicado no 34th *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society “Engineering Innovation in Global Health”* (EMBC 2012) realizado em San Diego, Estados Unidos da América:
 - *Mycobacterium Tuberculosis Recognition with Conventional Microscopy*

Segmentação do *Mycobacterium Tuberculosis* através de Novas Técnicas de Classificação de Pixel

Pamela C. Levy¹, Clahildek M. Xavier¹, Marly G. F. Costa¹, Cícero F. F. C. Filho¹,
Luciana B. M. Fujimoto², Julia I. do N. Salem José²

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologia Eletrônica e da Informação –
Universidade Federal do Amazonas (CETELI/UFAM)
CEP 69077-000 – Manaus – AM – Brazil

²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
Manaus – AM – Brazil

{pamela.levy, clahildek, olfujimoto}@gmail.com, {mcosta,
ccosta}@ufam.edu.br, salem@inpa.gov.br

Abstract. *This paper presents a new method for segmentation of tuberculosis bacillus in conventional sputum smear microscopy. The method comprises two main steps. In the first step, a scalar feature selection is performed. In the second step, two types of pixel classifiers are optimized, using these selected features as inputs: a support vector machine classifier and a feedforward neural network classifier. The inputs for classifiers are selected from features extracted from four color spaces: RGB, HSI, YCbCr and Lab. A sensitivity of 94% is achieved in pixel classification. Nevertheless, as shown, further steps for noise reduction are necessary to minimize the bacilli classification errors.*

Resumo. *Este artigo descreve um novo método para segmentação de bacilos da tuberculose em baciloscopia de campo claro. O método compreende duas etapas principais. Na primeira etapa é realizado uma seleção escalar de características. Na segunda etapa, usando as características selecionadas como entrada, dois classificadores de pixel são otimizados: uma máquina de vetores de suporte e um classificador neural. As entradas para os classificadores são selecionadas a partir de características extraídas de quatro espaços de cor: RGB, HSI, YCbCr e Lab. Uma sensibilidade de 94% é alcançada na classificação dos pixels. No entanto, novas etapas para a redução de ruído são necessárias para minimizar os erros de classificação dos bacilos.*

1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa que acomete, geralmente, os pulmões e é causada, na maioria dos casos, pelo *Mycobacterium tuberculosis*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2010, 8,8 milhões de pessoas no mundo foram infectadas e 1,4 milhões destas pessoas morreram de TB [WHO 2012]. Apesar do número de casos de doenças e mortes por TB terem caído ao longo dos últimos seis anos, a doença ainda persiste como grave problema de saúde nos países em desenvolvimento onde, em 2010, ocorreram 95% das mortes por TB [WHO 2012].

A OMS sugere a baciloscopia como o método de diagnóstico principal para TB. Em países em desenvolvimento, devido ao baixo custo, prefere-se a baciloscopia de

campo claro à baciloscopia de fluorescência. Devido à sua alta sensibilidade, a última é o método utilizado em países desenvolvidos [Luna 2004].

Diversas técnicas de reconhecimento de padrão em imagens baciloscópicas obtidas por meio da microscopia de campo claro têm sido registradas na literatura: [Costa 2008], [Sadaphal 2008], [Raof 2008], [Sotaquirá 2009], [Khutlang 2009], [Makkapati 2009] e [Khutlang 2010]. Como pioneiros em segmentação de bacilos da TB em imagens de microscopia de campo claro, Costa *et al.* (2008) utilizaram a imagem de diferença R-G (*Red – Green*: componentes do espaço de cor RGB) como ponto chave do método de segmentação. Sadaphal *et al.* (2008) e Raof *et al.* (2008) também utilizaram informações de cor, do espaço de cor RGB (*Red, Green, Blue – Vermelho, Verde, Azul*), para segmentar o *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, Sadaphal *et al.* (2008) utilizaram análise de forma e tamanho. O método de segmentação proposto por Sotaquirá *et al.* (2009) utiliza a componente Cr do espaço de cor YCbCr (*Luminance, Chrominance Blue, Chrominance Red – Luminância, Crominância Azul, Crominância Vermelha*) e a componente *a* do espaço de cor Lab (*L = Luminosidade, a = tonalidade verde-vermelha e b = tonalidade azul-amarela*). A técnica consiste em calcular os valores de limiar para as componentes *Cr* e *a*, baseados na primeira derivada do histograma. Makkapati *et al.* (2009) segmentaram os bacilos por limiarização da componente H do espaço de cor HSV (*hue, saturation, value – matiz, saturação, valor*), escolhendo uma faixa adaptativa apropriada baseada na imagem de entrada.

Khutlang *et al.* (2010) utilizaram classificadores de *pixel*, no espaço de cor RGB, para segmentar bacilos em imagens de microscopia de campo claro. Em [Khutlang 2009], foram empregadas duas etapas de classificação. Na primeira etapa, uma classificação de pixels, foi utilizado o algoritmo de Análise de Componentes Principais (PCA - *Principal Component Analysis*) e os classificadores de *pixel*: Gaussiano e Mistura de Gaussianas. Na segunda etapa, para remoção de ruídos, e para identificar objetos no formato de bastonete, foram utilizados classificadores com entradas invariantes a mudanças geométricas: classificador kNN; Gaussiano; Mistura de Gaussianas; e o algoritmo PCA. Combinações de classificadores, tais como o classificador de *Bayes*, regressão linear e discriminante quadrático, também foram utilizadas para obter uma melhor remoção dos ruídos.

Este artigo propõe um novo método para segmentação de bacilos em imagens de baciloscopia de campo claro. Essa segmentação utilizou classificadores de *pixel*. Os *pixels* foram classificados como pertencentes ao bacilo ou pertencentes ao fundo. As variáveis de entrada para os classificadores foram selecionadas a partir das componentes dos seguintes espaços de cor: RGB, HSI (*hue, saturation, intensity – matiz, saturação, intensidade*), YCbCr e Lab. A seleção do conjunto ótimo de variáveis foi feita utilizando a técnica de seleção escalar de características. As técnicas de classificação empregadas foram uma máquina de vetores de suporte (SVM - *support vector machine*) e uma rede neural multicamada treinada pelo algoritmo *Backpropagation*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Foi utilizado um total de 120 imagens com resolução de 2816x2112 *pixels*, obtidas de campos de lâminas com esfregaço de 12 pacientes. As lâminas foram preparadas

utilizando o método de coloração de *Kinyoun*. As imagens foram capturadas a partir de uma câmera digital modelo Canon PowerShot A640 de 10 *megapixels*, acoplada a um microscópio ótico de campo claro da marca Zeiss Axioskop 40. As lâminas foram preparadas no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil. As imagens adquiridas tiveram o foco avaliado previamente por Kimura *et al.* (2010) que, a partir de um estudo sistemático, buscaram selecionar a melhor métrica para aplicações de autofocus em imagens de microscopia de campo claro.

Para a classificação dos bacilos, as imagens foram separadas em dois grupos, baseado no conteúdo de fundo: a) imagens com alta densidade de conteúdo de fundo (CFA); b) imagens com baixa densidade de conteúdo de fundo (CFB). Como mostrado na seção resultados, imagens do grupo CFB apresentam menos ruídos do que imagens do grupo CFA. A Figura 1 (a) mostra uma imagem do grupo CFA e a Figura 1 (b) mostra uma imagem do grupo CFB. Como mostrado, no fundo das imagens CFA, há uma predominância da cor azul, enquanto que no fundo das imagens CFB há uma predominância da cor branca.

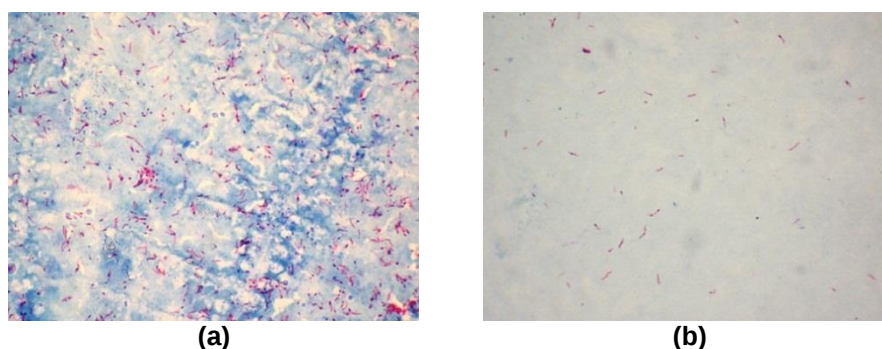


Figura 1. (a) Imagem com alta densidade de conteúdo de fundo. (b) Imagem com baixa densidade de conteúdo de fundo.

Para classificar as imagens nesses dois grupos, a componente H, do espaço de cor HSI, foi utilizada, como mostrado na Figura 2. Para cada imagem foi calculado o percentual de *pixel* na faixa que representa o azul do fundo (0,50 – 0,70).

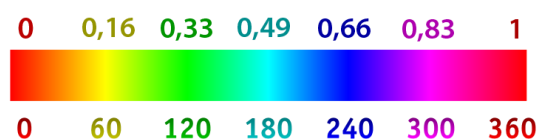


Figura 2. Escala de tonalidade do espaço de cor HSI

Para cada imagem foi obtida a percentagem de *pixels* com o matiz na faixa da cor azul. A Figura 3 mostra esta porcentagem, para imagens de ambos os grupos, representada com barras. As barras foram organizadas de forma que as 60 primeiras imagens têm as barras correspondentes a valores de porcentagem baixos e as últimas 60 imagens têm barras correspondentes a valores de porcentagem altos. Um limiar experimental de 13,56 foi estabelecido para separar imagens como pertencentes ao grupo CFB ou ao grupo CFA. Esse valor de limiar é mostrado como uma linha na Figura 3. Quando o valor da barra é menor que o limiar, a imagem é considerada como pertencente ao grupo CFB. Quando o valor da barra é maior que o limiar, a imagem é considerada como pertencente ao grupo CFA.

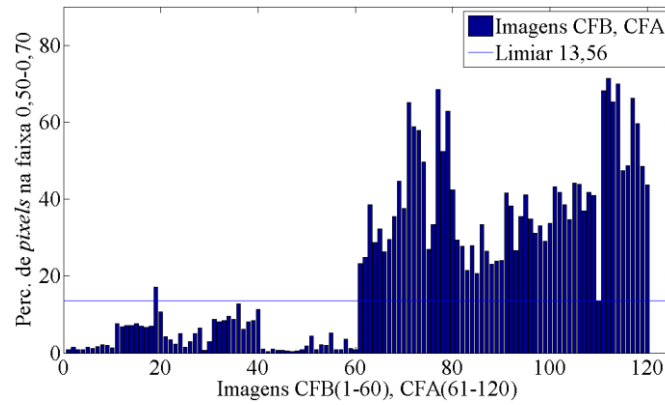


Figura 3. Porcentagens em barra para todas as imagens dos grupos CFB e CFA.

2.2. Métodos

O método de segmentação do bacilo é mostrado no diagrama em blocos na Figura 4. As principais etapas do método são: seleção de características, classificação de *pixel* e pós-processamento. As três etapas são descritas a seguir.



Figura 4. Etapas do método de segmentação do bacilo

2.2.1. Seleção de Características

As características utilizadas para a classificação de *pixel* foram as componentes e subtração das componentes dos espaços de cores: RGB, HSI, YCbCr e Lab. O Conjunto C de 30 características foi utilizado: $C = \{R, G, B, R-B, R-G, G-B, \sim R, \sim G, \sim B, H, S, I, H-S, H-I, S-I, R-I, G-I, B-I, Y, Cb, Cr, Y-Cb, Y-Cr, Cb-Cr, L, a, b, L-a, L-b, a-b\}$.

A técnica usada para selecionar as melhores características foi a de seleção escalar de características, descrita em Theodoridis e Koutroumbas (2006). Essa é uma técnica “ad-hoc” que incorpora informação de correlação combinada com critérios adaptados para características escalares. A escolha da técnica de seleção escalar de características em detrimento da técnica vetorial deveu-se a complexidade computacional dessa última. O processo é dividido em três partes, conforme descrito a seguir:

- A. Utilizar uma medida de separação de classes para selecionar a primeira característica. Nesse trabalho usamos a medida FDR (FDR - Fisher’s Discriminant Ratio), definida como:

$$FDR = \frac{(\mu_1 - \mu_2)^2}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2} \quad (1)$$

Em que: μ_1 e σ_1^2 representam a média e o desvio padrão, respectivamente, da característica na classe ω_1 ; μ_2 e σ_2^2 representam respectivamente a média e o desvio padrão da mesma característica na classe ω_2 .

A medida FDR é calculada para cada característica x_k , sendo seu valor $C(k)$, $k=1,2,...m$. A característica com maior valor de $C(k)$ é a primeira característica selecionada. Essa característica é denominada x_{i1} .

- B. Seja x_{nk} a k -ésima característica do n -ésimo padrão, com $n=1, 2,...N$ e $k=1, 2,...m$. Define-se o coeficiente de correlação cruzada entre duas características i e j como:

$$\rho_{ij} = \frac{\sum_{n=1}^N x_{ni} x_{nj}}{\sqrt{\sum_{n=1}^N x_{ni}^2 \sum_{n=1}^N x_{nj}^2}} \quad (2)$$

Calcular ρ_{ij} entre a primeira característica selecionada x_{i1} e as outras $m - 1$ características, isto é ρ_{i1j} , $j \neq i_1$.

Selecionar a segunda característica x_{i2} para a qual

$$i_2 = \arg \max_j \{ \alpha_1 C(j) - \alpha_2 |\rho_{i_1 j}| \}, \text{ for all } j \neq i \quad (3)$$

Em que: α_1 e α_2 são fatores que regulam a importância relativa de cada um dos termos. Nesse trabalho utilizou-se $\alpha_1 = 0,5$ e $\alpha_2 = 0,5$.

- C. Selecionar as outras características x_{ik} , $k=3, ...m$ de tal forma que:

$$i_k = \arg \max_j \left\{ \alpha_1 C(j) - \frac{\alpha_2}{k-1} \sum_{r=1}^{k-1} |\rho_{i_r j}| \right\} \quad (4)$$

2.3. Classificação

Na etapa de classificação os *pixels* de uma imagem são classificados como pertencentes ao bacilo ou ao fundo. Dois métodos de classificação foram empregados: SVM e redes neurais artificiais. O treinamento dos classificadores foi feito utilizando 1200 *pixels* pertencentes a bacilos e 1200 *pixels* pertencentes ao fundo. O conjunto de teste foi composto, também, por 1200 *pixels* de bacilos e 1200 *pixels* de fundo. Esses *pixels* foram extraídos de todas as 120 imagens.

2.3.1. Máquina de Vetores de Suporte

Máquinas de vetores de suporte são máquinas de aprendizado binárias usadas para separar dados pertencentes a duas classes, a partir de um hiperplano que maximiza a margem de separação [Haykin 1999].

De acordo com Theodoridis e Koutroumbas (2006), para classes separáveis, os parâmetros do hiperplano que maximizam a margem são calculados através da determinação do vetor de pesos $\mathbf{w}$ e da polarização $\mathbf{w}_0$, tal que a expressão (5) seja minimizada satisfazendo as condições de *Karush-Kuhn-Tucker* (KKT).

$$J(\mathbf{w}) \equiv \frac{1}{2} \|\mathbf{w}\|^2 \quad (5)$$

Para classes não separáveis, os mesmos parâmetros podem ser calculados minimizando a expressão (6), onde novas variáveis ξ_i , conhecidas como variáveis de folga são introduzidas. O objetivo agora é tornar a margem tão grande quanto possível,

mas ao mesmo tempo manter o número de pontos com $\xi > 0$ tão pequeno quanto possível [Theodoridis e Koutroumbas 2006].

$$J(\mathbf{w}, w_0, \xi) = \frac{1}{2} \|\mathbf{w}\|^2 + C \sum_{i=1}^N \xi_i \quad (6)$$

O parâmetro C na expressão (7) é uma constante positiva que estabelece um compromisso entre a variável de folga e a margem [Bishop 2006].

SVMs utilizam *kernels* para mapear o vetor de características para um espaço de dimensão maior e dessa forma permitir a classificação em espaços não separáveis linearmente. A Tabela 1 ilustra os *kernels* utilizados nesse artigo [Theodoridis e Koutroumbas 2006], [Bishop 2006], [Abe 2010] e [Taylor 2004].

Os valores do parâmetro C utilizados foram: 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,8, 25,6, 51,2 e 102,4. A fim de obter o melhor classificador SVM, 250 simulações foram realizadas, combinando cada um dos *kernels* mostrados na Tabela 1 com os valores escolhidos para o parâmetro C .

2.3.2. Redes Neurais Artificiais

A rede neural utilizou uma arquitetura $n-m-l$. Para ajustar a melhor arquitetura, os valores de n e m assumiram valores do seguinte conjunto: {3,6,9,12,15,18}. Foi realizado um total de 180 simulações combinando diferentes valores de n e m . O algoritmo de treinamento usado foi o *backpropagation* associado ao método de otimização *Levenberg-Marquardt* [Cichoki e Unbehauen 1993]. A função de ativação utilizada nos neurônios de todas as camadas foi a tangente hiperbólica. O critério de convergência utilizado foi um erro quadrático de 10^{-4} .

2.4. Pós-processamento

Após todos os *pixels* serem classificados como pertencentes ao bacilo ou ao fundo, um filtro morfológico foi aplicado para remover ruídos maiores que 150 *pixels* e menores que 20 *pixels*. Experimentalmente, para as dimensões das imagens utilizadas, observou-se que objetos maiores do que 150 *pixels* e menores do que 20 *pixels*, não correspondem a bacilos.

Tabela 1. Kernels utilizados

Kernel	Função/Método
Linear	$K(\mathbf{x}, \mathbf{z}) = \mathbf{x}^T \mathbf{z}$
Polynomial	$K(\mathbf{x}, \mathbf{z}) = (\gamma \mathbf{x}^T \mathbf{z} + r)^d, \gamma > 0$
Radial	$\exp(-\gamma \ \mathbf{x} - \mathbf{z}\ ^2)^d, \gamma > 0$
Quadratic	$\hat{K}(\mathbf{x}, \mathbf{z}) = K(\mathbf{x}, \mathbf{z})^2$
<i>perceptron</i> multicamada	$\mathbf{w}^T \mathbf{x} + \mathbf{w}_0$

3. Resultados

3.1. Conjunto de Características Seleccionadas

A seleção das melhores características foi feita utilizando o conjunto de características F, descrito previamente, como ponto de partida. De cada uma das 120 imagens, 20 *pixels* pertencentes a bacilos e 20 *pixels* pertencentes ao fundo foram extraídos.

Utilizando uma técnica de seleção escalar de características, conjuntos com 4, 5, 6, 7 e 8 características foram selecionados. A Tabela 2 mostra as características selecionadas para cada um desses conjuntos.

Tabela 2. Conjuntos de características selecionadas

Número de características	Conjuntos de características
4	$\{G-I, L-a, Y-Cr, a\}$
5	$\{G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G\}$
6	$\{G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G, H-I\}$
7	$\{G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G, H-I, a-b\}$
8	$\{G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G, H-I, a-b, H\}$

3.2. Classificação

Para cada simulação (com uma combinação diferente do *kernel* e do parâmetro C) com o classificador SVM, a acurácia foi calculada, e para cada simulação (com uma arquitetura diferente) com o classificador de rede neural, o mesmo parâmetro também foi calculado.

A melhor acurácia da rede neural foi combinada com uma arquitetura 18-3-1 e com o conjunto de cinco características selecionadas. A melhor acurácia de SVM foi obtida com o *kernel* quadrático, $C=1,6$ e com o conjunto de sete características selecionadas. A Tabela 3 mostra os valores de acurácia, sensibilidade e especificidade dos melhores classificadores. A Tabela 4 mostra os resultados dos melhores classificadores quando aplicados à classificação dos bacilos em todas as 120 imagens utilizadas nesse estudo (imagens do grupo CFB e imagens do grupo CFA). A taxa de acerto é definida como a razão entre a quantidade de bacilos classificados corretamente e o número total de objetos classificados como bacilo. A taxa de erro é definida como a razão entre a quantidade de ruídos classificados como bacilo e número total de objetos classificados como bacilo.

Tabela 3. Desempenho dos melhores classificadores

Classificador	Amostra	Acurácia (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
SVM	Treino	93,08	93,58	92,58
	Teste	93,25	93,75	92,75
Rede Neural	Treino	90,87	92,75	89,00
	Teste	91,45	93,41	89,50

A Tabela 3 mostra que, na classificação de *pixel*, os melhores valores da sensibilidade, especificidade e acurácia foram obtidos para o classificador SVM. Por outro lado, a Tabela 4 mostra que, na classificação de bacilo, a melhor taxa de acerto para o grupo CFA e a melhor taxa de acerto global foi obtida com a rede neural, enquanto que a melhor taxa de acerto para o grupo CFB foi obtida com o classificador SVM. As diferenças de porcentagens entre os dois classificadores, todavia, são pequenas. É notável que a taxa de erro no grupo CFB é muito menor do que no grupo CFA.

Tabela 4. Desempenho dos classificadores na segmentação do bacilo

Classificador	Grupo	Sensibilidade (%)	Taxa de acerto (%)	Taxa de erro (%)
SVM	CFA	95,77	49,42	50,58
	CFB	93,92	96,13	3,87
	Todas	94,95	62,74	37,26
Rede Neural	CFA	94,16	50,63	49,37
	CFB	90,32	94,78	5,22
	Todas	92,47	63,36	36,64

As Figuras 5 e 6 mostram imagens originais de microscopia de campo claro pertencentes aos grupos CFB e CFA, respectivamente, com as correspondentes imagens de bacilos segmentados. Como mostrado, a imagem CFB apresenta uma pequena quantidade de ruídos, enquanto que a imagem CFA possui uma grande quantidade de ruídos. As imagens originais são apresentadas com os bacilos marcados. Um círculo envolve bacilos verdadeiros. Um retângulo envolve um aglomerado de bacilos. Um polígono envolve bacilos duvidosos (o foco ou a geometria não permite identificar se o objeto é, de fato, um bacilo). Quando determinados a acurácia, sensibilidade, especificidade, taxa de acerto e taxa de erro, os aglomerados de bacilos ou bacilos duvidosos não foram levados em consideração. O primeiro foi excluído porque não é possível saber o número exato de bacilos quando estão em aglomerados. O último foi excluído porque não é possível dizer com certeza que o objeto é realmente um bacilo.

4. Conclusão

Uma nova técnica para identificação de bacilos foi apresentada. A principal diferença entre este trabalho e outros já apresentados é que as características utilizadas como entradas nos classificadores foram selecionadas de quatro diferentes espaços de cores. Um total de 30 características foi utilizado. Incluas nessas características estão subtrações de componentes de diferentes espaços de cores. Dois tipos de classificadores foram utilizados: SVM e rede neural. Os resultados mostraram que o melhor classificador SVM foi obtido com um conjunto de sete características, enquanto que o melhor classificador neural foi obtido com um conjunto de cinco características. Outro ponto chave foi a separação de imagens de microscopia em dois grupos: o primeiro apresentando um fundo com alta densidade de conteúdo e o segundo apresentando um fundo com baixa densidade de conteúdo. A taxa de erro em imagens com um fundo de baixa densidade é significativamente menor que em imagens com uma alta densidade de conteúdo de fundo. A maior taxa de erro em imagens com alta densidade de conteúdo de fundo foi devido ao fato de que, nesse tipo de imagem, existem muitos ruídos com a mesma tonalidade do bacilo. O método descrito neste trabalho é adequado para segmentar bacilos em imagens com baixa densidade de conteúdo de fundo. Novos esforços estão, agora, concentrados em técnicas de filtro para remover ruídos presentes em imagens com alta densidade de conteúdo de fundo. Um próximo trabalho mostrará resultados promissores de filtros que combinam informações de cor e de geometria.

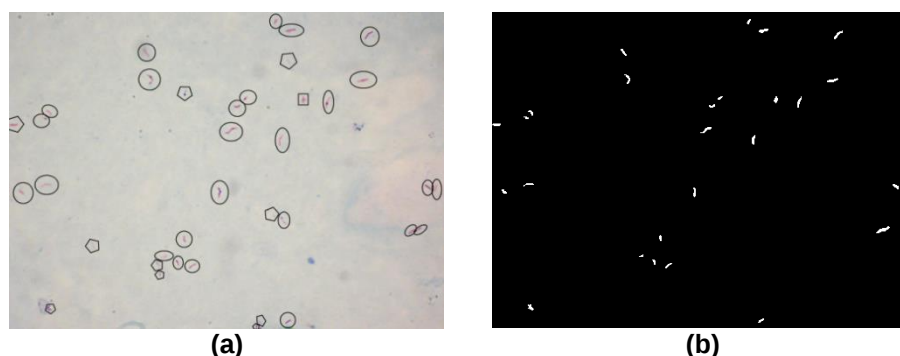


Figura 5. Exemplo de imagem CFB com a correspondente imagem de bacilo segmentado. (a) Imagem original com o bacilo marcado. (b) Resultado da aplicação da melhor rede neural na segmentação do bacilo.

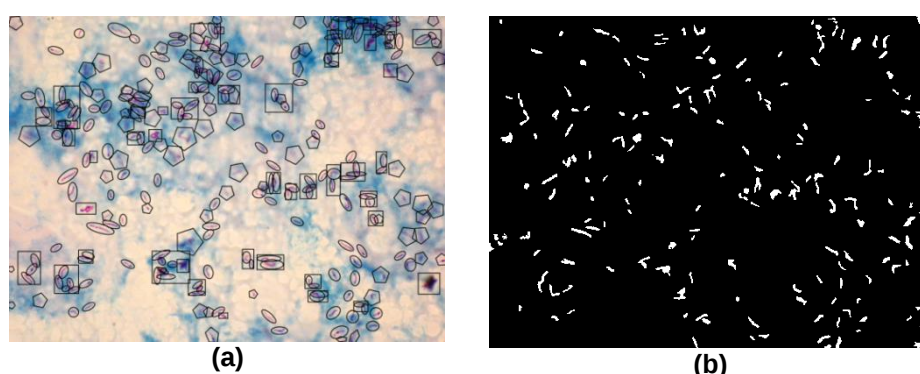


Figura 6. Exemplo de imagem CFA com a correspondente imagem de bacilo segmentado. (a) Imagem original com o bacilo marcado. (b) Resultado da aplicação da melhor rede neural na segmentação do bacilo.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a CAPES (PROCAD-Novas Fronteiras) e CNPq (Processo 470972/2011-4), pelo apoio financeiro.

Referências

- Abe, S. (2010) Support Vector Machines for Pattern Classification: Advances in Pattern Recognition, Springer, London.
- Bishop, C. M. (2006) Pattern Recognition and Machine Learning, Springer Science Business Media, Singapore.
- Cichoki, A., Unbehauen, R. (1993), Neural Networks for Optimization and Signal Processing, John Wiley & Sons ltd., New York.
- Costa, M. G. F., Costa Filho, C. F. F., Sena, J. F., Salem, J., and de Lima, M. O. (2008) "Automatic Identification of Mycobacterium Tuberculosis with Conventional Light Microscopy", In: 30th Annual International Conference of the IEEE EMBS, pp. 382-385, Vancouver.
- Haykin, S. (1999) Neural Networks and Learning Machines, Pearson Prentice Hall, New Jersey.

- Khutlang, R., Krishnan, S., Dendere, R., Whitelaw, A., Veropoulos, K., Learmonth, G., Douglas, T. S. (2010) "Classification of Mycobacterium Tuberculosis in Images of ZN-Stained Sputum Smears" In: IEEE transactions on information technology in biomedicine, v. 14, p. 949-957.
- Kimura, A., Costa, M.G.F., Filho, C.F.F.C., Fujimoto, L.B.M., Salem, J. (2010) "Evaluation of Autofocus Functions of Conventional Sputum Smear Microscopy for Tuberculosis", In: Annual International Conference of the IEEE EMBS, p. 3041-3044, Buenos Aires.
- Luna, J. A. C. (2004) "A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians", International Union against Tuberculosis and Lung Disease.
- Makapati, V., Agrawal, R., Acharya, R. (2009) "Segmentation and Classification of Tuberculosis Bacilli from ZN-stained Sputum Smear Images", In: 5th Annual IEEE Conference on Automation Science and Engineering CASE, p. 217-220.
- Raof, R.A.A., Salleh, Z., Sahidan, S.I., Mashor, M.Y., Noor, S.S. Md., Mohamad Idris F., Hasan, H. (2008) "Color Thresholding Method for Image Segmentation Algorithm of Ziehl-Neelsen Sputum Slide Images", In: 5th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control CCE, p. 212-217, Mexico City.
- Sadaphal, P., Rao, J., Comstock, G.W., Beg, M.F. (2008) "Image Processing Techniques for Identifying Mycobacterium Tuberculosis in Ziehl-Neelsen Stains", Int. J. of Tuberculosis and Lung Disease, v. 12, p. 579 – 582.
- Sotaquirá, M., Rueda, L., Narvaez, R. (2009) "Detection and Quantification of Bacilli and Clusters Present in Sputum Smear Samples: A Novel Algorithm for Pulmonary Tuberculosis Diagnosis", In: International Conference on Digital Image Processing, p. 117-121, Bangkok.
- Taylor, J. S., Cristianini, N. (2004) Kernel Methods for Pattern Analysis, Cambridge University Press, New York.
- Theodoridis, S., Koutroumbas, K. (2006) Pattern Recognition, Elsevier Academic Press, San Diego.
- Who (2012) "Tuberculosis facts 2011/2012", <http://www.who.int/tb/publications/factsheets/en/index.html>, January.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RECOGNITION WITH CONVENTIONAL MICROSCOPY

Cicero F. F. CostaFilho, Pamela C. Levy, Clahildek M. Xavier,

Marly G. F. Costa, Luciana B.M.Fujimoto, Julia Salem

Abstract — this paper presents a new method for segmentation of tuberculosis bacillus in conventional sputum smear microscopy. The method comprises two main steps. In the first step is accomplished a scalar selection of characteristics from the following color spaces: RGB, HSI, YCbCr and Lab. In the second step two types of pixel classifiers, using these selected characteristics as inputs, are optimized: a support vector machine classifier and a feedforward neural network classifier. The classifiers with optimized architectures are then used to bacilli segmentation. A sensitivity of 94% is achieved in bacilli detection.

Keywords — image segmentation, conventional sputum smear microscopy, tuberculosis, feature selection, pixel classifiers, SVM, backpropagation.

I. INTRODUCTION

According to the Global TB control report of 2010 of the World Health Organization-WHO [1], the global burden of disease caused by Tuberculosis - TB in 2009 is as follows: 9.4 million incident cases, 14 million prevalent cases, 1.3 million deaths among non HIV-positive people and 0.38 million deaths among HIV positive people.

To stop TB WHO adopted a Partnership Global Plan, launched in January 2006, which includes smear sputum microscopy as the main diagnostic tool.

Two techniques are used for TB diagnostic with sputum smear microscopy: Fluorescence microscopy and conventional microscopy. Fluorescence microscopy uses an acid-fast fluorochrome dye (eg, auramine O or auramine-rhodamine), while conventional microscopy uses the carbolfuchsin Ziehl-Neelsen - ZN or Kinyoun acid-fast stains.

C. F. F. Costa Filho is with *Universidade Federal do Amazonas/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Eletrônica e da Informação – UFAM/CETELI*. Manaus. Amazonas. Brasil (tel.: +55 92 91464954; e-mail: cfffilho@gmail.com).

Pamela C. Levy is with *Universidade Federal do Amazonas/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Eletrônica e da Informação – UFAM/CETELI*. Manaus. Amazonas. Brasil (tel: +55 92 8414 1406; e-mail: pamela.levy@gmail.com).

Clahildek M. Xavier is with *Universidade Federal do Amazonas/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Eletrônica e da Informação – UFAM/CETELI*. Manaus. Amazonas. Brasil (tel: +55 92 8414 1406; e-mail: clahildek@gmail.com).

M. G. F. Costa is with *Universidade Federal do Amazonas/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Eletrônica e da Informação – UFAM/CETELI*. Manaus. Amazonas. Brasil (tel: +55 92 9128 2404; e-mail: mcosta@ufam.edu.br).

L. B. M. Fujimoto is with *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA*. Manaus. Amazonas. Brasil (tel: +55 92 9981 4649; e-mail: olfujimoto@vivax.com.br)

Julia Salem is with *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA*. Manaus. Amazonas. Brasil (tel: +55 92 9981 4649; e-mail: salem@inpa.gov.br)

While the first one uses an intense light source, such as a halogen or high-pressure mercury vapor lamp, the second one uses a conventional artificial light source.

Fluorescence microscopy has the following main advantages over conventional microscopy: 1) Fluorescence microscopy uses a lower power objective lens (typically 25x), while conventional microscopy uses a higher power objective lens (typically 100x). As a consequence fluorescence microscopy allows the same area of a smear to be scanned in a much shorter time than with conventional microscopy [2];

2) Fluorescence microscopy is on average 10% more sensitive than conventional microscopy [3].

The main shortcomings of fluorescence microscopy are: 1) The relatively high costs of the microscopy unit and its maintenance when compared with the conventional microscopy unit; 2) The handling and maintenance of the optical equipment require advanced technical skill [4].

TB diagnosis in sputum smear microscopy is performed by counting the number of bacilli present in approximately 100 fields. This counting can be done manually or automatically.

Some authors [5-7] claimed that the main advantages of an automatic bacilli screening over a manual one are better reproducible values for sensitivity and specificity and a faster screening process.

Steps involved in automated microscopy include those shown in Figure 1.

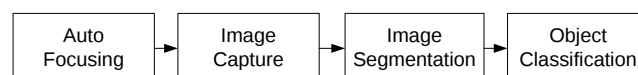


Fig. 1 Steps involved in bacilli segmentation

In fluorescence microscopy images, the bacilli are easily separated from the background with a threshold operation. Afterwards, the segmentation is performed using edge detection operators, such as canny operators (Veropoulos et. al., 1998; Forero et. al., 2004) [8-9]. Intermediate steps for edge linking and boundary tracing are also employed. In conventional microscopy images, the bacilli are not easily separated from the background with a threshold operation. In this case, for bacilli segmentation, color space techniques are used. The techniques found in the literature vary: histogram based techniques, Bayesian pixel classifiers, KNN pixel classifiers, etc. The color spaces used also vary: RGB, YCbCr and Lab. The majority of the authors used the RGB color

space. Only Sotaquirá et. al. [6] used a combination of components of color spaces YCbCr and Lab.

This paper proposes a new method for bacilli segmentation in sputum smear microscopy. The main features of the proposed method that distinguish it from the others are:

- 1) Classify the images according to the background content, as belonging to a group of high background density or to a group of a low background density.
- 2) The input variables to the segmentation classifier were selected from the components and subtraction of components of the following color spaces: RGB, HSI, YCbCr e Lab.
- 3) For bacilli classification, associated with geometric variables, a new parameter of color measure, called *color reason*.

In the sequence is described this new method.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Materials

It was used 120 images with a spatial resolution of 2816x2112 pixels, obtained from sputum smear microscopy slices of 12 patients. The slices were prepared using the Kinyoun acid-fast stain and counterstained with methylene blue solution. The images were captured using a digital camera model Canon Power Shot A640 of 10 megapixels, attached to a conventional microscope model Zeiss Axioskop 4 (second block of Fig.1).

The slices were prepared in Micobacteriology Laboratory of Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA), Manaus, Brazil. The image focus (first block of Fig.1) was established in a previously work of Kimura et al. [10].

B. Images Groups

For bacilli segmentation, based in the background content, the images were divided in two main groups: a) high density of background content (HDB) and b) low density of background content (LDB). The HDB group is characterized by a strong presence of counterstain with methylene blue solution in the background, while the LDB group is characterized by a weak presence of this same counterstain. Fig. 2 shows one image of HDB type and other image of LDB type. As shown, the background of HDB images there is a prevalence of the blue color while in the background of LDB images there is a prevalence of white color.

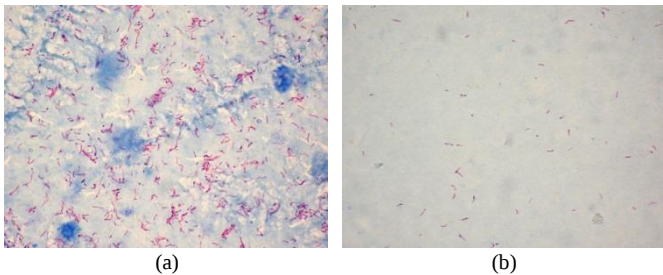


Fig. 2 (a) Image with high density of background content; (b) Image with low density of background density.

To classification of the images in these two groups was used the hue component of the HSI space. For each image was calculated the percentage of pixels in the range of blue color (0.5-0.7). For each image was obtained the percentage of pixels with hue component in blue color range. Fig. 3 shows this percentage, for images of both groups, represented with bars. The bars were organized so that the first sixty images have bars corresponding to low percentage values and the sixty last images have bars corresponding to high percentage values. An experimental threshold of 13.56 was established to separate images as belonging to group LDB or to group HDB. This threshold value is shown as a horizontal line in Fig. 3. When the bar value was less than this threshold the image was considered as belonging to LDB group. When the bar value was higher than this threshold the image was considered as belonging to HDB group.

C. Segmentation

The features used for pixels classification in the segmentation step were the components and subtraction of components of the following color spaces: RGB, HSI, YCbCr and Lab. A set, F , of 30 features was used: $F = \{R, G, B, R-B, R-G, G-B, \sim R, \sim G, \sim B, H, S, I, H-S, H-I, S-I, R-I, G-I, B-I, Y, Cb, Cr, Y-Cb, Y-Cr, Cb-Cr, L, a, b, L-a, L-b, a-b\}$. The technique used to select the best features was the scalar feature selection one [11]. For application of this technique, from each one of the 120 images were extracted 20 pixels belonging to bacilli and 20 pixels belonging to background. Sets with 4,5,6,7 and 8 features were produced as a result. Table I shows the selected feature of each one of these sets.

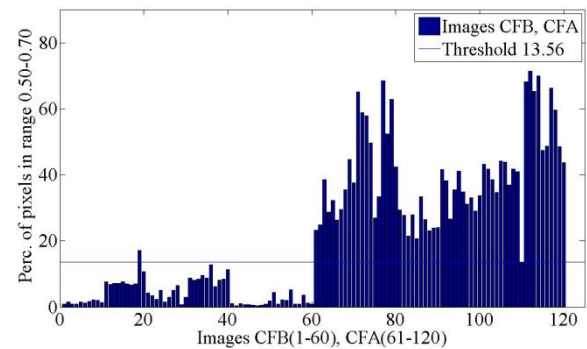


Fig. 3 Histograma de limiarização entre os grupos de alta e baixa densidade.

TABLE I
SETS OF SELECTED FEATURES

Number of features	Sets of selected features
4	$G-I, L-a, Y-Cr, a$
5	$G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G$
6	$G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G, H-I$
7	$G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G, H-I, a-b$
8	$G-I, L-a, Y-Cr, a, R-G, H-I, a-b, H$

Two classification methods were employed: support vector machine (SVM) and neural network (NN). The training of the classifiers was done using 1200 pixels belonging to bacilli and 1200 pixels belonging to the background. The test set was also comprised of 1200 pixels belonging to bacilli and 1200 pixels

belonging to background. These pixels were extracted of all 120 images.

The following kernels were used with SVM's: linear, polynomial, radial, quadratic and perceptron. The values of the C parameter used were: 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6, 51.2 and 102.4. In order to obtain the best SVM classifier it was performed 250 simulations combining one of the kernels with foregoing values of the C parameter.

The NN used had an architecture $n-m-1$. To adjust the best architecture the values of n and m assumed values of the following set: {3,6,0,12,15,19}. A total of 180 simulations were done combining different values of n and m . The training algorithm used was the backpropagation one associated with the Levenberg-Marquardt optimization method [12]. The convergence criteria used was a quadratic error of 10^{-4} .

D. Classification

For bacilli classification a combination of geometric characteristics and a parameter called *color ratio* was used. The following geometric characteristics were investigated: area, perimeter, compactness, eccentricity and the Hu's moments of first, second and third order: $\mu_{10}, \mu_{02}, \mu_{20}, \mu_{11}, \mu_{12}, \mu_{21}, \mu_{30}, \mu_{03}$. The idea was select one best geometric characteristic to classify bacilli. For this purpose was extracted the contour of 500 bacilli [13] and calculated the following parameters for each one of these geometric characteristics: average value (η), standard deviation (σ) and variation coefficient (v), defined as:

$$v = \frac{\sigma}{\eta} \cdot 100 \quad (1)$$

The best geometric characteristic chosen was the one with low value of v . Table II shows these parameters values. As shown, the best geometric characteristic determined was the eccentricity. In order of minimizing the false positive value in classification, a threshold value of 0.77 for the eccentricity was used to bacilli and noise classification. Objects with eccentricity higher than 0.77 were considered bacilli, otherwise were considered noise.

TABLE II
GEOMETRIC CHARACTERISTICS PARAMETERS

Parameter Geometric Characteristic	Average value	Standard Deviation	Variation Coefficient
Area	625.34	232.09	37.12
Perimeter	126.03	34.08	27.04
Excentricity	0.95	0.03	2.96
Compactness	0.51	0.12	23.11
μ_{10}	1.06	0.27	25.31
μ_{02}	24.47	0.73	29.46
μ_{20}	7.61	1.39	18.32
μ_{11}	8.73	1.17	13.38
μ_{12}	17.60	2.06	11.68
μ_{21}	5.23	1.27	24.34
μ_{22}	17.66	2.23	12.61

For images of group 1 the eccentricity was enough to obtain good classification rates. For images of group 2,

nevertheless, another parameter, the *Color Ratio (CR)* was employed. This parameter is defined with the aid of Fig. 4. Two points are initially defined C_p and B_p . The first one corresponds to the center of bacillus. The second one is the first point out of bacillus, in the same horizontal, in left or right side of center point, if the bacillus major axis is vertical. If bacillus major axis is horizontal, second point is the first point out of bacillus, in the same vertical, in up or down side of center point, if the bacillus major axis is vertical. Fig.4 shows a bacillus with vertical major axis and B_p was chosen in left side of center point C_p (it also could be in right side).

To definition of CR in expression (4), is used the intensity differences of red and green component in center point and border point, as defined in expression (2) and (3):

$$dif_R = R_{C_p} - R_{B_p} \quad (2)$$

$$dif_G = G_{C_p} - G_{B_p} \quad (3)$$

$$CR = \frac{dif_R}{dif_G} \quad (4)$$

Where: R_{C_p} - value of R component in C_p .

R_{B_p} - value of G component in B_p .

G_{C_p} - value of green component in C_p

G_{B_p} - value of green component in B_p

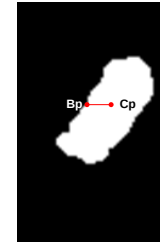


Fig. 4 Figure used to definition of color reason. C_p - bacillus center point, B_p - bacillus border point.

The following set or rules, *color ratio* filter, are used to decide in an object is a bacillus or a noise:

```

if  $R_{C_p} > G_{C_p}$  and  $R_{C_p} > B_{C_p}$ 
    object is bacillus
elseif  $R_{C_p} > G_{C_p}$  and  $R_{C_p} < B_{C_p}$ 
    if  $dif_R > 0$  and  $dif_G > 0$  and  $CR > 2$ 
        object is a bacillus
    elseif  $dif_R > 0$  and  $dif_G > 0$ 
        object is a bacillus
    elseif  $dif_R < 0$  and  $dif_G < 0$  and  $CR < 0.5$ 
        object is a bacillus
    else
        object is not a bacillus
elseif  $R_{C_p} < G_{C_p}$  and  $R_{C_p} < B_{C_p}$ 
    object is not a bacillus

```

Where: B_{C_p} - value of green component in C_p

The idea explored with the *CR* filter is the following. Due to Kinyoun acid-fast stain, when bacillus is over a white background (with weak presence of counterstain with methylene blue solution), its color is light fuchsia. When the bacillus is over a blue background (with strong presence of counterstain with methylene blue solution), its color is dark purple. In the first case there is a predominance of the red component over the green and blue components. In the second case there is a predominance of the blue component over the other two components. The red component, nevertheless, is predominant over the green component. These observations are summarized in the rules just presented.

To demonstrate the application of these rules, we use the following figures: Fig. 5(a) shows an original group 2 image, Fig 5(b) shows the output of segmentation; Fig. 5(c) shows the output of the eccentricity filter and Fig 5(d) shows the output of the *color ratio* filter. Fig. 5(b) shows four marked objects: O_1 and O_2 – these objects are not bacilli and are eliminated with eccentricity filter. O_3 and O_4 – these objects are not bacilli and are eliminated only with *CR* filter; O_5 – is a bacillus, not eliminated in both filters. Fig 6(a), Fig 6(b) and Fig 6(c) show a profile of component intensity of objects O_3 , O_4 and O_5 . In each graph, the coordinate $x = 0$ corresponds to point B_p and the right coordinate of the graph, to C_p . Table III shows values of dif_R , dif_G and CR for objects O_3 and O_4 .

TABLE III
VALUES OF dif_R , dif_G AND CR FOR OBJECTS O_3 AND O_4

Object	Characteristic		
	dif_R	dif_G	CR
O_3	-65	-85	0.76
O_4	-62	-86	0.72

III. RESULTS

First of all we will comment about the segmentation results. The best accuracy of the neural network was obtained with an architecture 18-3-1 and with the set of 5 selected features.

The best accuracy of SVM was obtained with a quadratic kernel, $C=1.6$ and with the set of 7 selected features.

Table III shows the values of accuracy, sensitivity and specificity of the best classifiers.

TABLE IV
PERFORMANCE OF THE BEST CLASSIFIERS

Classifier	Sample	Accuracy (%)	Sens. (%)	Espec. (%)
SVM	Train	93.08	93.58	92.58
	Test	93.25	93.75	92.75
Backpropagation	Train	90.87	92.75	89.00
	Test	91.45	93.41	89.50

Table V shows the results of best classifiers when applied to bacilli classification when all 120 images are used. The precision is defined as the ratio of quantity of bacilli correctly classified and number of objects classified as bacilli. The false

detection is defined as the ratio of quantity of noise classified as bacilli and number of objects classified as bacilli.

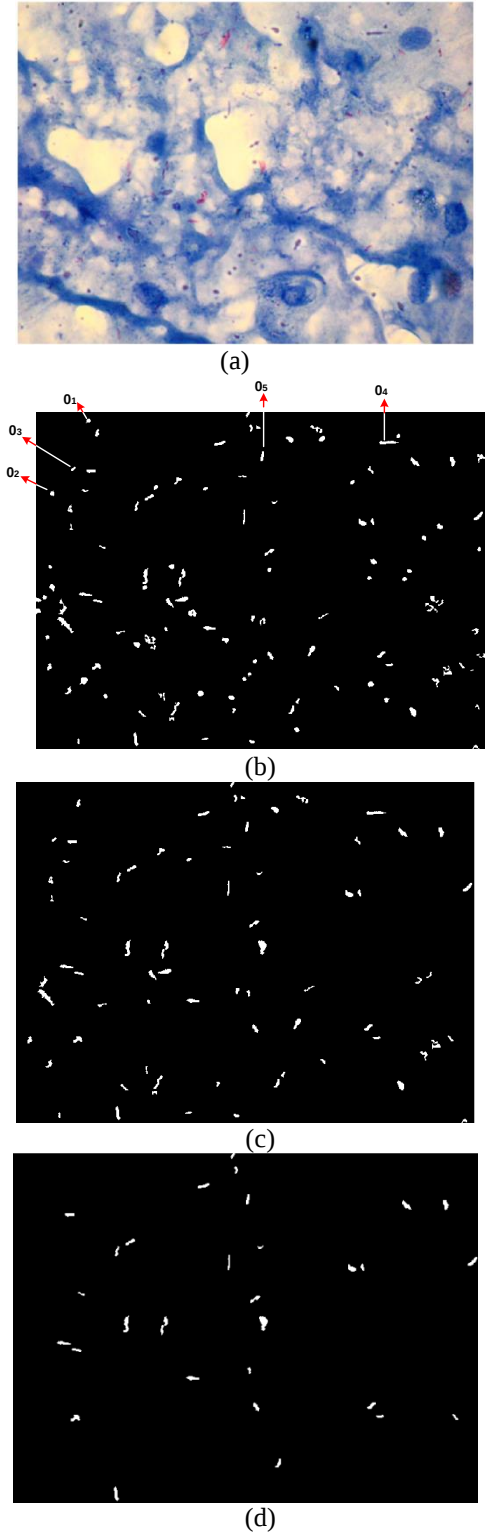


Fig. 5: (a) original image; (b) output of segmentation; (c) output of eccentricity filter; (d) output of Color Reason filter.

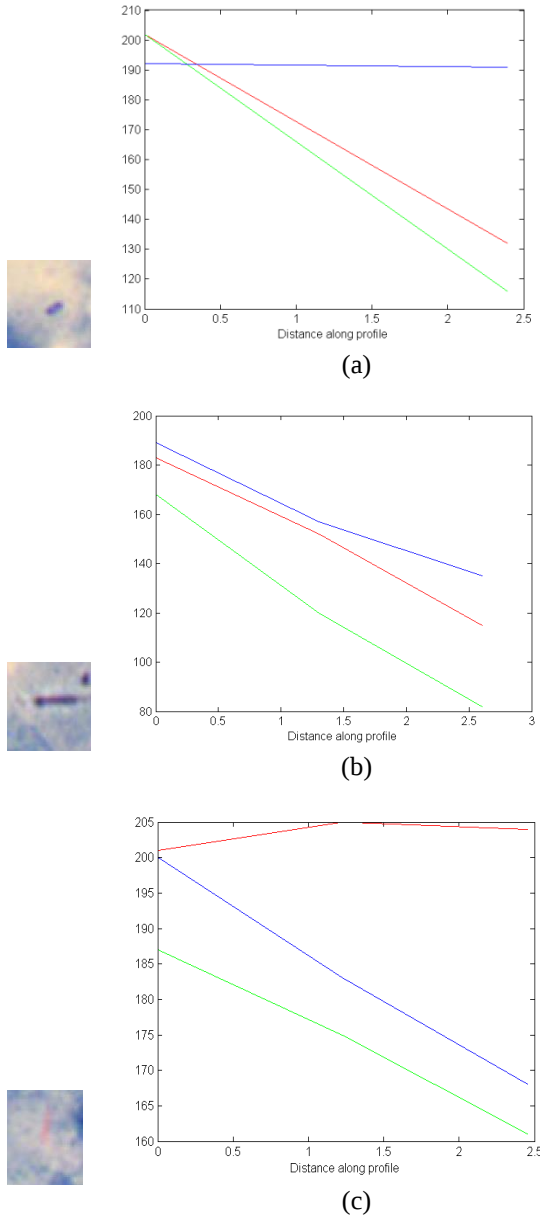


Fig. 6: (a) object O_3 with corresponding profile RGB; (b) object O_4 with corresponding profile RGB; (c) object O_5 with corresponding profile RGB

TABLE V
PERFORMANCE OF THE CLASSIFIERS IN BACILLI SEGMENTATION

Classifier	Group	Sensitivity (%)	Precision (%)	False detection (%)
SVM	HDB	95.77	49.42	50.58
	LDB	93.92	96.13	3.87
	All images	94.95	62.74	37.26
Neural network	HDB	94.16	50.63	49.37
	LDB	90.32	94.78	5.22
	All images	92.47	63.36	36.64

Table VI shows the result after eccentricity filter application, while Table VII shows the result after CR filter application.

TABLE VI
PERFORMANCE AFTER ECCENTRICITY FILTER APPLICATION

Classifier	Group	Sensitivity (%)	Precision (%)	False detection (%)
SVM	HDB	95.62	64.84	35.16
	LDB	92.07	98.62	1.38
	All images	94.06	76.11	23.89
Neural network	HDB	93.22	70.53	29.47
	LDB	89.40	97.39	2.61
	All images	91.53	80.06	19.94

TABLE VII
PERFORMANCE AFTER COLOR RATIO FILTER APPLICATION

Classifier	Group	Sensitivity (%)	Precision (%)	False detection (%)
SVM	HDB	95.62	85.31	14.69
	LDB	92.07	100	0
	All images	94.06	86.28	13.72
Neural network	HDB	93.22	92.8	7.2
	LDB	89.40	99.1	0.9
	All images	91.53	91.49	8.51

IV. CONCLUSION

A new technique of bacilli recognition was presented in this paper. The main difference of this paper from others previously presented is that the features used as input of classifiers were selected from four different space colors. A total of 30 features were used. Included in these features are subtractions of color components of different color spaces. Two types of classifiers were used: SVM and neural network. The results showed that the best SVM classifier was obtained with a group of 7 features, while the best neural network classifier was obtained with a group of 5 features. Another key point was the separation of sputum smear microscopy images in two groups: the first one presenting a high density background and the second one presenting a low density background. The best sensitivity, 95.62% was obtained with HDB images and SVM classifier, while the best false detection, 0%, was obtained with LDB images and SVM classifier. The best overall sensitivity, 94.06%, was obtained with SVM classifier. The best overall false detection, 8.51%, was obtained with NN classifier. Khutlang et al [7] reported a sensitivity of 97.77%, while Sotaquira et al. [6] reported a false detection of 9.78%.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank FAPEAM and CNPq (process 470972/2011-4), for financial support and the company FabriQ, to the partial release of student Clahildek Matos Xavier.

REFERENCES

- [1] World Health Organization (2011) Facts sheets on tuberculosis. [Online]. Available: http://www.who.int/tb/publications/2011/factsheet_tb_2011.pdf

- [2] J. Bennedsen, S. O. Larsen, “Examination for tubercle bacilli by fluorescence”, *Scandinavian Journal of Respiratory Disease*, Vol. 47, pp.114–20, 1966.
- [3] K. R. Steingart, M. Henry, P.C. Hopewell, A. Ramsay, J. Cunningham, R. Urbanczik, M. Perkins, M. A. Aziz, M. Pai, “Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review”, *Lancet Infectious Diseases*, Vol. 6, pp. 570-581, 2006.
- [4] K.Toman, “What are the advantages and disadvantages of fluorescence microscopy?”, In: *Toman’s Tuberculosis Case detection, treatment, and monitoring –questions and answers*, T. Frieden, pp. 7-10, World Health Organization, Hong Kong, China , 2004.
- [5] M. G. Forero, G. Cristóbal, M. Desco, “Automatic identification of Mycobacterium tuberculosis by Gaussian mixture models”, *Journal of Microscopy*, Vol. 223, pp. 120–132, 2006.
- [6] M. Sotaquirá, L. Rueda, R. Narvaez, “Detection and quantification of bacilli and clusters present in sputum smear samples: a novel algorithm for pulmonary tuberculosis diagnosis”, *Proceedings of International Conference on Digital Image Processing*, Bangkok, Thailand, pp. 117-121, 2009.
- [7] R. Khutlang, S. Krishnan, R. Dendere, A. Whitelaw, K. Veropoulos, G. Learmonth, T. S. Douglas, “Classification of Mycobacterium tuberculosis in Images of ZN-Stained Sputum Smears”, *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, Vol. 14, No. 4, pp. 949-957, 2010.
- [8] K. Veropoulos, C. Campbell, G. Learmonth, B. Knight, J. Simpson, “The Automated Identification of Tubercle Bacilli using Image Processing and Neural Computing Techniques”, *Proceedings of 8th International Conference on Artificial Neural Networks*, Vol. 2, pp. 797-802, 1998.
- [9] M. G. Forero, F. Sroubek, G. Cristóbal, “Identification of tuberculosis bacteria based on shape and color”, *Real Time Imaging*, Vol. 10, pp. 251–262, 2004.
- [10] A. Kimura, M.G. Costa, C.F. Costa Filho, L.B.M. Fujimoto and J. Salem, “Evaluation of autofocus functions of conventional sputum smear microscopy for tuberculosis,” *32th Annual International Conference of the IEEE EMBS Buenos Aires, Argentina*, Aug. 31 – Sept. 4, 2010.
- [11] S. Theodoridis and K. Koutroumbas, *Pattern Recognition*, 3th ed., Ed. Elsevier Academic Press, 2009.
- [12] A. Cichoki, R. Unbehauen, *Neural Networks for Optimization and Signal Processing*, 2003.
- [13] F. L de A. Andrade, *Graduation Thesis, Computer Engineering Course, Federal University of Amazonas*, 2011.

ANEXOS

ANEXO A: DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE COLORAÇÃO ZIEHL-NEELSEN

De acordo com BRASIL (2008) o procedimento detalhado para a realização do método de ZN segue os seguintes passos:

❖ **Coloração do esfregaço pelo Método de Ziehl-Neelsen:**

1. Colocar as lâminas com o esfregaço voltado para cima, sem encostar umas nas outras e de acordo com o número de ordem de registro no suporte para corar.
2. Forrar um funil de vidro com papel de filtro e filtrar a Fucsina Fenicada a 0,3% para dentro do frasco conta-gotas. Filtrar apenas o volume suficiente para cobrir os esfregaços das lâminas que você vai corar.
3. Cobrir com a Fucsina filtrada, todo o esfregaço de cada uma das lâminas.

OBS.: É fundamental filtrar a Fucsina, na hora do uso, para retirar os cristais que se formam quando a mesma está em repouso.

4. Enrolar um chumaço de algodão na ponta de uma haste de metal com proteção contra aquecimento numa das extremidades.
5. Umedecer o algodão com álcool etílico. Cuidado para não escorrer álcool etílico na haste.
6. Colocar fogo no algodão umedecido com álcool etílico.
7. Passar a chama lentamente por debaixo das lâminas até que ocorra a emissão de vapores visíveis, conforme Figura 41. Retirar imediatamente a chama para evitar que a Fucsina ferva.



Figura 41 - Aquecimento da Fucsina.

FONTE: BRASIL, 2008.

Marcar o tempo de 5 minutos assim que ocorrer a primeira emissão de vapores, e repita o passo 7 mais duas vezes. Isso significa que, ao todo, deve-se passar três vezes a chama lentamente até a emissão de vapores e essa operação deve durar 5 minutos, a contar da primeira emissão de vapores.

8. Inclinar cada uma das lâminas e derramar a Fucsina na pia.
9. Abrir devagar a torneira até obter um filete de água corrente para lavar as lâminas.

Deixar o filete de água cair em cima do número de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço até eliminar todo o corante, conforme Figura 42.



Figura 42 - Lavagem da Fucsina em água corrente.

FONTE: BRASIL, 2008.

10. Lavar também o lado oposto ao esfregação de cada lâmina para eliminar a Fucsina ali depositada, se necessário passar uma gaze para retirar a fuligem do fogo, aderida no lado de baixo da lâmina.
11. Colocar cada lâmina novamente no suporte com o esfregação voltado para cima.
12. Repetir os itens de 10 a 12 para todas as lâminas que estão com fucsina.

❖ **Descoloração do esfregação pelo Método de Ziehl-Neelsen:**

1. Cobrir completamente cada lâmina com a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%, e esperar 1 minuto.
2. Segurar cada lâmina pela borda numerada, inclinar e derramar a solução descorante na pia.
3. Deixar o filete de água corrente cair em cima do número de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregação e eliminar o Álcool-Ácido.
4. Verificar se os esfregaços ficaram descorados. Considera-se descorado o esfregação que apresentar coloração esbranquiçada ou levemente rosada.

OBS.: Os procedimentos de 1 a 3 não devem ultrapassar 3 minutos, considerando os esfregaços de todas as lâminas que estão sendo descoradas.
5. Repetir os itens de 2 a 4 para todas as lâminas que estão com a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%.

❖ **Coloração de fundo pelo Método de Ziehl-Neelsen:**

1. Forrar um funil de vidro com papel de filtro e filtre o Azul de Metileno a 0,3% num frasco conta-gotas. Filtrar apenas o volume suficiente para cobrir o esfregação das lâminas que vão ser coradas.
2. Cobrir o esfregação de cada uma das lâminas com o Azul de Metileno já filtrado. Esperar 30 segundos.

3. Segurar, com uma pinça anatômica e pela borda numerada, e inclinar cada lâmina para derramar o Azul de Metileno na pia.
4. Deixar cair um filete de água corrente em cima do número da lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregão até eliminar todo o Azul de Metileno a 0,3%.
5. Girar cada lâmina e lavar também o lado oposto ao esfregão para eliminar o Azul de Metileno a 0,3% depositado ali.
6. Colocar cada uma das lâminas em pé, para secar em uma estante de tubos. Essa estante deve estar forrada com papel absorvente, de preferência papel de filtro.

As etapas do método de coloração de *Ziehl-Neelsen* são as mesmas para o método de *Kinyoun* que, por ser um método de coloração a frio, utiliza uma concentração diferente do corante Fucsina Saturada (3%) e não utiliza o aquecimento.

ANEXO B: PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DA LEITURA E CONTAGEM DOS BACILOS

De acordo com BRASIL (2008), o procedimento para a realização da leitura e contagem dos bacilos segue os seguintes passos:

- Registrar, no formulário papel quadriculado de registro dos resultados, o número da lâmina e se é para diagnóstico ou controle conforme Figura 43.



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Papel Quadriculado
para Registro dos Resultados

Laboratório: Controle

Lâmina nº : _____

Nº de Bacilos: _____

Nº de Campos: _____

Resultado/cruzes: _____

Laboratório: Controle

Lâmina nº : _____

Nº de Bacilos: _____

Nº de Campos: _____

Resultado/cruzes: _____

Figura 43 - Formulário para Registro dos Resultados da Leitura.

FONTE: BRASIL, 2008.

Dividir mentalmente o campo microscópico, que está visualizando, em quatro quadrantes, utilizando os números 12, 3, 6 e 9, como um relógio conforme Figura 44.

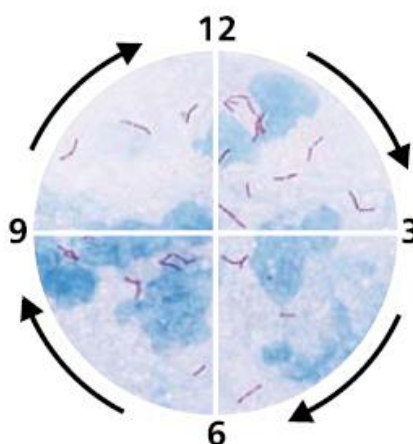


Figura 44 - Campo microscópico dividido em quatro quadrantes.

FONTE: BRASIL, 2008.

- Iniciar a leitura pelo quadrante superior direito, entre os números 12 e 3. Utilizar o botão micrométrico para verificar a presença de BAAR na superfície e em profundidade. Contar os bacilos, se os mesmos forem visualizados.
- Continuar a leitura dos outros quadrantes no sentido dos ponteiros do relógio. Contar os bacilos presentes em todos os quatro quadrantes e anotar no papel quadriculado o número total de bacilos que foram encontrados nesse campo.
- Repetir os 2 itens anteriores até completar 20 campos, seguindo os mesmos procedimentos.
- Somar os resultados dos 20 campos e calcular a média.
- Analisar a média obtida para os resultados nos 20 primeiros campos observados, considerando as seguintes possibilidades:
 1. Se a média for maior que 10 BAAR por campo, encerrar a leitura. Essa amostra é positiva +++;
 2. Se a média for inferior a 10 BAAR por campo, continuar a leitura até completar 50 campos.

- Fazer a leitura e anotar os resultados até completar 50 campos, seguindo os mesmos procedimentos.
- Somar os resultados dos 50 campos e calcular a média.
- Analisar a média obtida para os resultados dos 50 campos observados, considerando as seguintes possibilidades:
 1. Se a média obtida for de 1 a 10 BAAR por campo, encerrar a leitura. Essa amostra é positiva ++.
 2. Se a média obtida for inferior a 1 BAAR por campo, continuar a leitura até completar 100 campos.
- Fazer a leitura e anotar os resultados até completar 100 campos, seguindo os mesmos procedimentos.
- Somar e analisar os resultados dos 100 campos considerando as seguintes possibilidades:
 1. Se for encontrado um total de 10 a 99 BAAR nos 100 campos examinados, encerrar a leitura. Essa amostra é positiva +.
 2. Se for encontrado um total de 1 a 9 BAAR nos 100 campos examinados, relatar o número exato de BAAR encontrados.
 3. Se não forem encontrados BAAR, nos 100 campos observados, essa amostra é negativa.
- Repetir os procedimentos para cada uma das lâminas a serem lidas.

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Levy, Pamela Campos

L664r Reconhecimento e segmentação do *Mycobacterium tuberculosis* em imagens de microscopia de campo claro utilizando as características de cor e o algoritmo *backpropagation* / Pamela Campos Levy. - Manaus: UFAM, 2012.
132 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof^a Dra. Marly Guimarães Fernandes Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Cícero Ferreira Fernandes Costa Filho

1. Processamento de imagens – Técnicas digitais 2. Tuberculose – Diagnóstico 3. Algoritmos de seleção 4. Baciloscopia I. Costa, Marly Guimarães Fernandes (Orient.) II. Costa Filho, Cícero Ferreira Fernandes (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 004.932:616.24-002.5(043.3)