

# CONTAGEM AUTOMÁTICA DE CÉLULAS UTILIZANDO MATLAB E MICROSCOPIAS DE FLUORESCÊNCIA

M. Del-Valle\*, NA. Daghastanli\*

\*Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil

e-mail: matheusdv@gmail.com

**Abstract** – *Cell counting is a useful method in fundamental or clinical evaluations. When manually performed, it turns into a subjective and extenuate method. In this work, it was developed an automated fluorescently stained cell counting routine using MATLAB. Image models of stained cell samples were used, comparing five different types of thresholding: intermodes, minimization of fuzziness, maximum variance, minimum cross entropy and maximum correlation, along with cell area related corrections, aiming for the minimization of errors due to cell overlap. The samples were counted manually by a group of five volunteers to compare with automated counts. The methods were analyzed by the coefficient of variation (CV), Bland-Altman graphs and Student's t-test. The study which presented the best result was given by the maximum variance method with 5% trimmed mean area correction (CV=5%, p=0,49 and average difference of 0,5 cells from the reference method), resulting in an effective routine for automated counting within these error proportions.*

**Palavras-chave:** *Automated cell counting, digital image processing, fluorescence microscopy.*

## Introdução

Uma das análises utilizadas para avaliar culturas celulares em pesquisa básica ou utilizadas em rotina clínica é a contagem de células, sendo empregados cálculos como de rendimento, proliferação e viabilidade celular [1,2]. Para isso, pode-se realizar a contagem manualmente, observando uma imagem de microscopia. A contagem manual é um procedimento extenuante e sua acurácia é comprometida, sendo subjetivos os critérios pelos quais as células serão contadas, tornando-se um processo com resultados variáveis [3], mesmo quando utilizados softwares que auxiliem a contagem manual, induzindo a erros de avaliação, uma vez que é rotineira a contagem de um grande número de células dispostas em diversas imagens, que demandam várias horas de trabalho.

A automatização da contagem de células obtida pelo processamento computacional das imagens é uma alternativa para assegurar resultados confiáveis e reprodutíveis. Um método eficaz é o thresholding,

onde um limiar é definido para a imagem, permitindo o isolamento do objeto de interesse do fundo da imagem [4], transformando a imagem numa matriz bitonal.

A proposta do presente estudo é a de desenvolver e testar um programa computacional para automatização da contagem de células obtidas por imagens de microscopias de fluorescência, comparando diferentes algoritmos computacionais com o método de contagem manual e utilizando conceitos de processamento de imagem em MATLAB.

## Materiais e métodos

Foram utilizadas 31 amostras de imagens de microscopias de fluorescência, divididas entre os seguintes microrganismos: 4 imagens de *C. albicans* (CA), 9 de *E. coli* (EC), 9 de *L. plantarum* (LA) e 9 de *S. aureus* (SA). A Figura 1 apresenta um exemplo de cada.

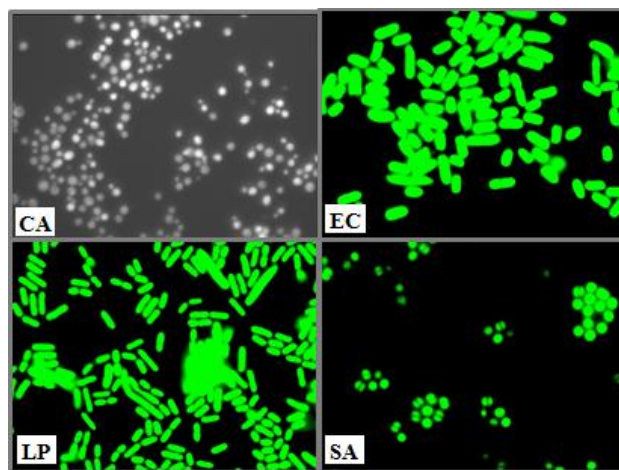


Figura 1. Microscopias de fluorescência de *C. albicans* (CA), *E. coli* (EC), *L. plantarum* (LA) e *S. aureus* (SA).

A contagem manual foi realizada por um grupo de 5 voluntários, utilizando a extensão *Cell Counter* do programa ImageJ para elevar sua acurácia, sob as mesmas condições de contagem (mesmo computador e aumento em tela). O intervalo total das contagens foi cronometrado, realizando pausas

entre as imagens de diferentes microrganismos para que o processo se tornasse menos extenuante.

As imagens foram transformadas em 8-bits para ser realizado o thresholding. Foram testados cinco algoritmos diferentes de thresholding para as contagens automáticas: intermodos [5], minimização de fuzificidade [6], máxima variância [7], mínima entropia cruzada [8] e máxima correlação [9].

A detecção de fronteiras foi realizada pelo algoritmo de Moore-Neighbor com o critério de parada de Jacob, resultando em uma quantidade  $n$  de células contabilizadas.

Foi calculado o valor médio da área das células contabilizadas, onde a área de uma região é definida como a quantidade de pixels dentro dos limites de uma fronteira. A área de cada célula ( $A_i$ ) foi normalizada pelo valor de área média ( $\bar{A}$ ) obtido e arredondado para o número inteiro mais próximo. Caso este número fosse maior que um, isso indicava que havia mais de uma célula nesta região, acrescentando o valor normalizado. Desta forma, o número  $n$  de células pôde ser corrigido conforme a Equação 1.

$$\begin{cases} \text{Round}\left(\frac{A_i}{\bar{A}}\right) > 1, & n = n + \text{round}\left(\frac{A_i}{\bar{A}}\right) \\ \text{Round}\left(\frac{A_i}{\bar{A}}\right) \leq 1, & n = n \end{cases} \quad (1)$$

Além do cálculo utilizando a média, foram utilizadas as médias aparadas, onde foram descartados  $x\%$  dos valores extremos das áreas ( $x\%$  menores e  $x\%$  maiores) e então calculada a média. Os valores de  $x\%$  utilizados foram de: 5%, 10%, 15%, 20% e 25%.

Um procedimento similar de correção por área foi apresentado em Al-Khazraji et al [10], porém sendo somados os valores inteiros obtidos pela normalização da área ao invés de o incremento condicional conforme descrito na equação acima, além de utilizar apenas um tipo de thresholding.

Foi implementada a possibilidade de contagem de todas as imagens contidas em uma pasta e geração de um documento do tipo *.txt* com os resultados finais.

As contagens automáticas foram comparadas ao método manual pelas análises do coeficiente de variância (CV), gráficos de Bland-Altman e teste *t-Student* ao nível de 5%.

## Resultados

A Figura 2 compara uma das amostras de *C. albicans* antes e após o processamento pelo método de thresholding de variância, exemplificando o resultado do processo de thresholding e detecção de

fronteiras.

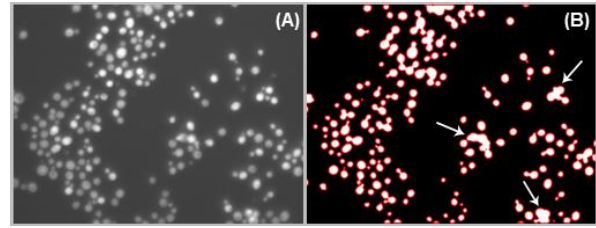


Figura 1. Comparação entre a imagem original de *C. albicans* (A) e sua imagem bitonal (B). Estão evidenciadas as fronteiras detectadas na imagem bitonal (linha vermelha) e algumas das sobreposições de células (setas).

A Tabela 1 apresenta os coeficientes de variância entre o método manual e os métodos automatizados.

Método	Grupo	N	Méd	A5	A10	A15	A20	A25
Inter-modos	CA	143%	143%	143%	143%	143%	143%	143%
	EC	68%	41%	25%	23%	18%	18%	13%
	LP	60%	31%	24%	17%	12%	9%	7%
	SA	25%	9%	6%	8%	8%	8%	8%
	Geral	82%	56%	50%	45%	42%	41%	40%
Fuzifi-cidade	CA	51%	24%	21%	19%	18%	18%	18%
	EC	79%	54%	54%	30%	30%	28%	25%
	LP	100%	77%	65%	60%	53%	49%	43%
	SA	45%	18%	13%	12%	10%	9%	8%
	Geral	101%	72%	63%	56%	51%	47%	42%
Vari-ância	CA	31%	8%	4%	4%	6%	7%	7%
	EC	45%	17%	11%	10%	10%	9%	9%
	LP	28%	6%	3%	4%	5%	7%	7%
	SA	21%	6%	6%	7%	7%	7%	7%
	Geral	35%	8%	5%	5%	7%	8%	9%
Entro-pia	CA	38%	11%	8%	7%	6%	5%	5%
	EC	83%	58%	58%	36%	36%	36%	31%
	LP	106%	85%	71%	64%	58%	55%	50%
	SA	65%	35%	30%	29%	25%	23%	20%
	Geral	106%	79%	68%	61%	56%	53%	48%
Corre-lação	CA	30%	14%	17%	21%	23%	23%	24%
	EC	116%	130%	252%	190%	188%	187%	187%
	LP	102%	115%	251%	277%	278%	278%	278%
	SA	99%	123%	150%	174%	170%	159%	153%
	Geral	112%	125%	295%	278%	269%	261%	254%

Tabela 1. Coeficientes de variância (CV), dados em porcentagem, entre o método manual e os métodos automatizados sem correção (N) e com correções por média comum (Méd) e médias aparadas por 5% (A5), 10% (A10), 15% (A15), 20% (A20) e 25% (A25).

Os métodos de máxima variância com correções de médias A5 e A10 apresentaram os menores valores de CV (5%). As Figuras 3 e 4 apresentam, respectivamente, os gráficos de Bland-Altman para

estes métodos de A5 e A10. A Tabela 2 apresenta os valores do teste *t-Student* entre o método manual e o de máxima variância, onde há distribuição normal dos dados, ao nível de significância de 5%.

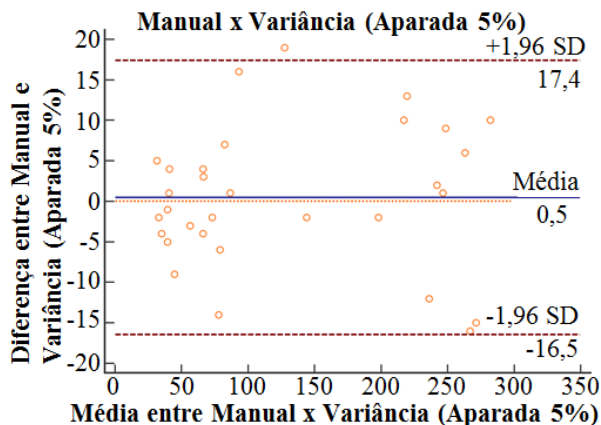


Figura 3. Comparação por gráficos de Bland-Altman entre o método manual e o método de máxima variância com correção por média aparada de 5% (A5).

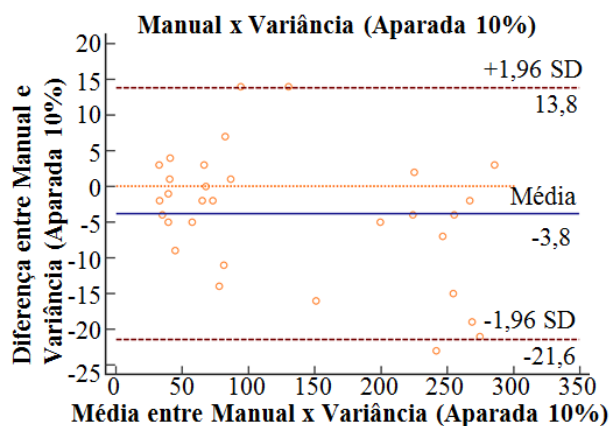


Figura 4. Comparação por gráficos de Bland-Altman entre o método manual e o método de máxima variância com correção por média aparada de 10% (A10).

Grupo	N	Méd	A5	A10	A15	A20	A25
CA	0,03	0,32	0,42	0,47	0,39	0,34	0,33
EC	0,02	0,26	0,47	0,49	0,45	0,43	0,41
LP	0,00	0,05	0,48	0,15	0,04	0,01	0,01
SA	0,00	0,26	0,37	0,30	0,29	0,29	0,30
Geral	0,00	0,34	0,49	0,44	0,38	0,35	0,33

Tabela 2. Valores de *p* do teste *t-Student* entre o método manual e o método de máxima variância.

Para todo o conjunto de 31 imagens, as contagens

manuais foram realizadas, em média, em 40 minutos, enquanto as automáticas duraram, em média, 20 segundos (apresentando as contagens de um método de thresholding sem correção e com as correções), utilizando um computador com processador de 4 núcleos de 1.90 GHz.

## Discussão

As amostras de CA possibilitaram a análise do poder de distinção de intensidades dos métodos, onde as células apresentadas nas imagens possuíam uma ampla faixa de variação de intensidade e um fundo com intensidade próxima ao de algumas células, o que implica em um histograma sem picos e vales (não bimodal). Já as imagens de bactérias (EC, LP e SA) possuíam maior variação de intensidade entre o fundo e as células, tomando um histograma com perfil bimodal, porém com variações de tamanhos e formatos, além de maior variedade em quantidade de células totais e de células sobrepostas.

O método de intermodos apresentou CV maior que 100% para a contagem de CA, pois o método necessita de um histograma bimodal para seu funcionamento adequado, não apresentado nas imagens de CA.

O método de máxima correlação demonstrou CV maiores que 100% para as imagens de bactérias devido ao fato do cálculo de correlação ter dividido uma célula em diversas áreas de poucos pixels após o thresholding, sendo identificada uma quantidade de até 10 vezes mais células que a contagem manual.

O método de máxima variância apresentou os menores valores de CV, sendo os melhores valores as correções de A5 e A10. As diferenças médias entre os métodos de máxima variância e manual apresentadas nos gráficos de Bland-Altman foram de 0,5 células para a A5 e de -3,8 células para a A10, indicando o método de máxima variância com correção A5 ser o melhor e com uma diferença significativamente aceitável para a contagem automática. O teste *t-Student* apresentou valores de *p* menores que 0,05 para as contagens sem correções, concluindo que há diferença significativa entre este método e a contagem manual ao nível de 5%. Apenas as correções de A5 e A10 não apresentaram diferenças significativas para todos os grupos de imagens ( $p \geq 0,05$ ).

As correções por área diminuíram os valores de CV de todos os métodos, exceto para o método de máxima correlação para imagens de bactérias, onde as correções apenas agravaram o erro de contagem excessiva. Este fato comprova a utilidade das correções para células sobrepostas.

O tempo de execução da contagem foi reduzido em cerca de 120 vezes da manual para a automática. Esta proporção tende a aumentar com o também aumento do número de amostras. Além disso, a geração de um arquivo *.txt* com o resultados facilita a posterior manipulação dos dados. Estes fatos tornam a contagem automática um método mais ágil em comparação a contagem manual, eliminando o fator extenuante do processo manual.

Os métodos automáticos eliminaram a subjetividade do método manual (onde se obteve desvio padrão entre as contagens de uma mesma imagem de até 15 células), resultando sempre no mesmo número de células contabilizadas por cada métodos.

Deve ser evitado o uso de imagens com baixas resoluções, onde as células apareçam distorcidas ou “pixeladas”, pois estas podem comprometer o thresholding e a detecção de fronteiras.

Todos os métodos de thresholding apresentados são relacionados ao cálculo de um threshold global, pois estes possuem aplicabilidade significativa com imagens de alta luminosidade e variações significativas entre os níveis de cinza dos objetos e do fundo, como é o caso das microscopias de fluorescência utilizadas.

A detecção de fronteiras utilizando apenas o método de Moore-neighbor possibilitou diminuir as variáveis que poderiam afetar a contagem, fazendo com que apenas os métodos de thresholding e as correções por área fossem comparados. Outros estudos com comparação de diferentes métodos de detecção de fronteiras serão adicionados para uma maior aplicabilidade da rotina desenvolvida. Além disso, serão estudadas as contagens automáticas com variações de outros parâmetros apresentados neste trabalho, abrangendo outros tipos celulares e de microscopias, análises adicionais numa maior quantidade de amostras e outros métodos de thresholding.

## Conclusões

A contagem utilizando o método de máxima variância com correção por média aparada de 5% apresentou os melhores resultados, com  $CV=5\%$ , diferença média de 0,5 células, e  $p = 0,49$ , resultando em um método eficaz para a contagem automática de células de microscopias de

fluorescência, reduzindo significativamente o tempo de execução do processo e eliminando erros devido a fatores humanos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à UFABC.

## Referências

- [1] Jorge TCA, Castro SL. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000.
- [2] Soares DM, Ginani F, Barboza CAG. Rendimento de células mesenquimais do ligamento periodontal humano submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. *Revista de Odontologia da UNESP*, 2012; 41(6):415-419.
- [3] Piuri V, Scotti F. Morphological classification of blood leucocytes by microscope images. Milan: Computational Intelligence for Measurement Systems and Applications, 2004; 103-108.
- [4] Gonzalez RC, Woods RE. Digital Image Processing. 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002.
- [5] Prewitt JMS, Mendelsohn ML. The analysis of cell images. *Annals New York Academy of Sciences*, 1996; 128:1035-1053.
- [6] Huang L, Wang MJ. Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness. *Pattern Recognition*, 1995; 28:41-51.
- [7] Otsu N. A threshold selection method from gray-scale histograms. *IEEE Transactions on systems, man, and cybernetics*, 1979; SMC-9(1):62-66
- [8] Li CH, Lee CK. Minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition*, 1992; 26(4):617-625.
- [9] Yen J, Chang F, Chan S. A new criterion for automatic multilevel thresholding. *IEEE Transactions of Image Processing*, 1995; 4(3):370-378.
- [10] Al-Khazraji BK, et al. An automated cell-counting algorithm for fluorescently-stained cells in migration assay. *Biological Procedures Online*, 2011; 13:9.