

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA

LUCAS MASSARO HORI DE MIRANDA
RAFAEL DA COSTA ARARIPE

**ALGORITMO DE CONTAGEM DE CÉLULAS EM EXAMES DE URINA POR
ANÁLISE DE IMAGEM**

São Paulo
2021

LUCAS MASSARO HORI DE MIRANDA

RAFAEL DA COSTA ARARIPE

**ALGORITMO DE CONTAGEM DE CÉLULAS EM EXAMES DE URINA POR
ANÁLISE DE IMAGEM**

Versão Original

Trabalho de Formatura apresentado à
Escola Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do bacharelado em
Engenharia Mecatrônica.

Área de concentração: Engenharia
Mecatrônica

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Horikawa

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Miranda, Lucas Massaro Hori

Araripe, Rafael da Costa

Algoritmo de contagem de células em exames de urina por análise de imagem / Lucas Massaro Hori de Miranda, Rafael da Costa Araripe; orientador: Oswaldo Horikawa. – 2021, 48 fl.

Trabalho de Formatura – Programa de Graduação em Engenharia Mecatrônica, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Versão Original

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos nossos familiares e amigos que sempre nos apoiaram no decorrer do curso. Também aos professores, que serviram de inspiração e de fonte de conhecimento para que pudéssemos trilhar nosso caminho da graduação, em especial ao Prof. Dr. Oswaldo Horikawa, que nos orientou neste trabalho. Agradecemos aos funcionários do Hospital Universitário da USP, fundamentais no desenvolvimento do trabalho, sempre muito solícitos, fornecendo todo tipo de ajuda possível. Agradecemos especiais ao Prof. Dr. Ricardo Ambrosio Fock, que nos deu a oportunidade de realizar este projeto em parceria, e aos funcionários Valdir Azevedo dos Santos, que auxiliou imensamente no levantamento da fundamentação teórica, e aos técnicos do H.U., que participaram ativamente na coleta das imagens que utilizamos em nosso algoritmo. Sem o apoio e auxílio dessas e de muitas outras pessoas, não seríamos capazes de realizar este trabalho.

“Epígrafe”

*Remember then: there is only
one time that is important—
Now! It is the most important
time because it is the only time
when we have any power. The
most necessary man is he with
whom you are, for no man
knows whether he will ever
have dealings with any one
else: and the most important
affair is, to do him good,
because for that purpose alone
was man sent into this*

life! — Leo Tolstoy

RESUMO

O exame de urina é uma das principais ferramentas para o diagnóstico clínico. Esse exame é capaz de detectar doenças como anemia, hemorragias, infecções virais ou bacterianas, entre outras. Nele, é realizada a contagem de células e componentes da urina, como hemácias e leucócitos. O exame é realizado utilizando aparelhos específicos que liberam os resultados em instantes. Porém, caso ocorra alguma alteração no aparelho, indicando alguma variação anormal na urina, ou caso o exame seja realizado em laboratórios menores, em que a demanda não justifica o gasto com este tipo de aparelho, é necessário à realização do procedimento de contagem manual das células na lâmina utilizando um microscópio com auxílio do hemocitômetro. Trata-se de um processo manual trabalhoso, mas necessário para a verificação dos dados indicados pelo aparelho, o que torna o procedimento sujeito a erros. Tendo em vista essa situação, neste trabalho foi desenvolvido um programa, utilizando dois *softwares* para comparação: ImageJ e OpenCV. Eles são capazes de realizar a contagem automática das células presentes em exames de urina a partir da utilização de um microscópio e de fotografias tiradas com a câmera de um smartphone. O resultado obtido indicou que o OpenCV apresenta um menor erro percentual (cerca de 10%), por outro lado possui um comportamento sobreajustado, de modo que o sistema fica mais sensível a imagens que não sigam o padrão que foi estabelecido na calibragem dos parâmetros. Já o ImageJ possui uma maior consistência para diferentes amostras, porém possui menor flexibilidade, sendo mais difícil obter altas precisões para o caso de uso em questão. Um ponto de atenção é que com os recursos utilizados não foi possível fazer uma distinção com erros suficientemente baixos entre eritrócitos e leucócitos, de modo que essa tarefa se mostra como o próximo passo natural no que diz respeito à automação completa do processo.

Palavras-chave: Exame de urina. Processamento de imagem. ImageJ. OpenCV.

ABSTRACT

Urine testing is one of the main tools for clinical diagnosis. This exam is able to detect diseases such as anemia, internal bleeding, viral or bacterial infections, among others. In it, the count of urine components and cells, such as red blood cells and leukocytes is performed. The exam is analysed using specific devices that release results almost in real time. However, if there's any change in the device, indicating some abnormal variation in urine, or if the test is being performed in smaller laboratories, where demand does not justify the expense with this type of device, it's necessary to perform the procedure of manually counting the cells on the microscope slide using a microscope with the aid of the hemocytometer. A labor-intensive manual process required to verificate the data indicated by the device, which makes the procedure prone to errors. With that in mind, in this work a algorithm was developed using two softwares for comparison: ImageJ and OpenCV. They are able to carry out the automatic screening of cells present in urine tests using a microscope and images taken with the camera of a smartphone. The results indicated that OpenCV has a lower percentage error (about 10%). On the other hand, it has an over-adjusted behavior, so that the system is more sensitive to images that don't follow the standard that was established during the parameters calibration. ImageJ has greater consistency for different samples, but has less flexibility, making it harder to achieve high accuracies for the case used hereby. We shall mention yet, that with the resources used, it was not possible to make a distinction with sufficiently low errors between erythrocytes and leukocytes, what presents itself as the natural next step in order to fully automate the process.

Keywords: Urinalysis. Image processing. ImageJ. OpenCV.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Câmara de Neubauer.....	7
Figura 2 - Quadrantes da câmara de Neubauer.....	7
Figura 3 - Contador de boi.....	9
Figura 4 - Hemácias.....	12
Figura 5 - Leucócitos.....	12
Figura 6 - Cilindro de leucócitos.....	13
Figura 7 - Cristais de ácido úrico.....	13
Figura 8 - Cristais oxalato de cálcio.....	14
Figura 9 - Bactérias.....	14
Figura 10 - Células epiteliais.....	15
Figura 11 - Células de hemácias sem marcação.....	16
Figura 12 - Células de hemácias com marcação.....	17
Figura 13 - Tiras reagentes.....	19
Figura 14 - Microscópio Nikon Eclipse E200.....	26
Figura 15 - Grade de contagem da câmara de Neubauer.....	27
Figura 16 - Suporte para o celular.....	29
Figura 17 - Exemplo de imagem com ocular do microscópio.....	30
Figura 18 - Exemplo de imagem cortada.....	30
Figura 19 - Fluxo de implementação dos métodos do ImageJ.....	31
Figura 20 - Fluxo de implementação dos métodos do OpenCV.....	31
Figura 21 - Imagem original de uma amostra.....	34
Figura 22 - Escala cinza (ImageJ).....	34
Figura 23 - Escala cinza (OpenCV).....	34
Figura 24 - Aprimoramento (ImageJ).....	35
Figura 25 - Aprimoramento (OpenCV).....	35
Figura 26 - Removendo ruídos (ImageJ).....	36
Figura 27 - Limiarização (ImageJ).....	36
Figura 28 - Limiarização (OpenCV).....	36
Figura 29 - Removendo ruídos (OpenCV).....	36
Figura 30 - Contagem de células (ImageJ).....	37
Figura 31 - Contagem de células (OpenCV).....	37
Figura 32 - Etapas processamento de imagem (ImageJ).....	37
Figura 33 - Etapas processamento de imagem (OpenCV).....	38
Figura 34 - Histograma ImageJ.....	39
Figura 35 - Histograma OpenCV.....	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os <i>softwares</i> ImageJ e OpenCV.	25
Tabela 2 - Limites das classes.	38
Tabela 3 - Erro por amostra ImageJ.....	40
Tabela 4 - Erro por amostra OpenCV.....	40

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	6
1.1.	OBJETIVOS	7
1.2.	MOTIVAÇÃO	8
1.3.	ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO	10
1.4.	METODOLOGIA DO TRABALHO	10
2.	REVISÃO TEÓRICA.....	11
2.1.	SEDIMENTOS URINÁRIOS.....	11
2.1.1.	HEMÁCIAS.....	11
2.1.2.	LEUCÓCITOS	12
2.1.3.	CRISTAIS	13
2.1.4.	BACTÉRIAS	14
2.1.5.	CÉLULAS EPITELIAIS	15
2.2.	MODELO DE CONTAGEM DE CÉLULAS PELO MÉTODO MANUAL	15
3.	ESTADO DA ARTE	17
3.1.	MÉTODOS EXISTENTES DE CONTAGEM DE CÉLULAS	18
3.1.1.	LEITURA VISUAL DAS TIRAS REAGENTES.....	18
3.1.2.	CITOMETRIA DE FLUXO.....	19
3.1.3.	IMAGEM DIGITAL COM RECONHECIMENTO DE PARTÍCULAS	20
3.1.4.	MICROSCOPIA AUTOMATIZADA COM IMAGEM DIGITAL	20
3.1.5.	SISTEMA MODULAR MISTO.....	21
3.2.	ESTUDOS DESENVOLVIDOS.....	21
3.2.1.	UTILIZAÇÃO DO CONTEXTO NA ANÁLISE DE IMAGEM.....	21
3.2.2.	UTILIZAÇÃO DE APLICATIVO PARA REALIZAÇÃO DE LEITURA DE TIRAS REAGENTES	22
3.2.3.	APLICAÇÃO DE REDES NEURAIS E FRACTAIS PARA URINÁLISE	23
3.2.4.	CONTAGEM DE LEVEDURAS COM CÂMARA DE NEUBAUER.....	24
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1.	SOFTWARES PARA CONTAGEM DE CÉLULAS	24
4.2.	MICROSCÓPIO.....	26
4.3.	CÂMARA DE NEUBAUER	26
4.4.	SMARTPHONE E SUPORTE.....	27
4.4.1.	COLETA DE IMAGENS.....	28

4.5.	PROGRAMA.....	29
4.5.1.	EDIÇÃO E PRÉ-PROCESSAMENTO	30
4.5.2.	FLUXO DE PROCESSAMENTO	31
4.5.2.1.	IMPORTAÇÃO DA IMAGEM	32
4.5.3.	AJUSTE DA ESCALA.....	32
4.5.4.	ALTERANDO O TIPO DA IMAGEM / CONVERSÃO PARA ESCALA DE CINZA ₃₂	
4.5.5.	SHARPEN / APRIMORAMENTO DE CONTRASTE LOCAL (CLAHE)	32
4.5.6.	SUBTRACT BACKGROUND / REMOÇÃO DE RUIDOS	33
4.5.7.	THRESHOLD / LIMIAZIZAÇÃO	33
4.5.8.	ANALYSES PARTICLES / CONTAGEM DE CÍRCULOS	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1.	IMAGENS PROCESSADAS	33
5.2.	CÁLCULOS E COMPARAÇÕES.....	38
6.	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

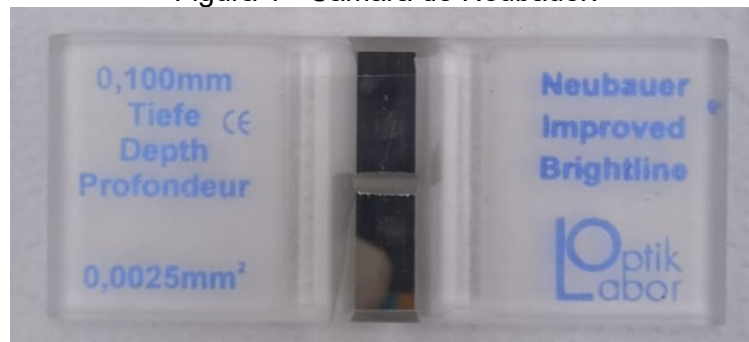
Conforme afirma (NEVES *et al.*, 2019), doenças renais constituem um problema de saúde no Brasil. E segundo o Censo Brasileiro de Diálise (2019), a análise de dados da década 2009-2018 apresentou um número total de pacientes em diálise (nome dado ao processo de filtração do sangue) superior a 130 mil, com um aumento anual, em por milhão da população (pmp), de 23,5 pmp e 6 pmp para prevalência e incidência, respectivamente. Além disso, a taxa anual de mortalidade bruta foi de 19,5% dos pacientes prevalentes. Diante desse cenário nacional, o exame de urina acaba sendo muito requisitado, sendo um dos principais exames de triagem utilizados em laboratórios, segundo informações de profissionais do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Apesar de rápido e simples, o exame de urina é capaz de fornecer uma série de diagnósticos sobre o funcionamento dos rins e trato urinário. A urina é um fluido muito reativo à presença de doenças, de forma que sua utilização para diagnósticos tem registros desde a Idade Antiga. Há registros de médicos sumérios e babilônicos em placas de argila, no qual eles relatam suas avaliações baseadas na urina. No final do século XIX, Thomas Addis utilizou o microscópio para realizar a contagem dos componentes da urina, dando os moldes iniciais aos exames que são realizados atualmente (NAKASATO *et al.*, 2019).

Com o avanço da tecnologia, outros métodos foram desenvolvidos, como a utilização de fitas reativas. Essas novas tecnologias tornaram possível a obtenção de uma maior eficiência no diagnóstico dos exames, uma vez que seus resultados saem de maneira mais rápida e precisa. Por exemplo, a citometria de fluxo e análise de imagem digital resolveram o problema da subjetividade da interpretação das alterações de cores para diferentes reagentes (NAKASATO *et al.*, 2019), no entanto, sem abrir mão totalmente da atuação humana. Equipamentos de ponta são capazes de realizar até 1000 exames diários (ROCHE DIAGNOSTICS, 2013), valor que seria impraticável na análise manual padrão.

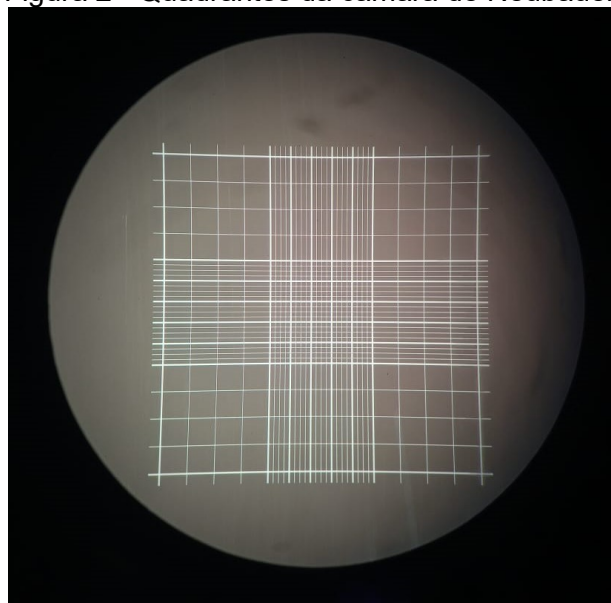
Ainda assim, muitos laboratórios seguem utilizando microscopia manual, com o auxílio da câmara de Neubauer (Figura 1), como ocorre, por exemplo, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. A Câmara auxilia na contagem de células uma vez que ela possui segmentos que separaram a amostra que será analisada no microscópio em quadrantes (Figura 2).

Figura 1 - Câmara de Neubauer.



Fonte: Autores.

Figura 2 - Quadrantes da câmara de Neubauer.



Fonte: Autores.

1.1.OBJETIVOS

Neste trabalho, será desenvolvido um programa capaz de realizar a contagem dos componentes da urina através da análise de imagem digital. Chien *et al.* (2007) verificaram que, na contagem de glóbulos vermelhos (RBC) e glóbulos brancos (WBC), a contagem de células por análise de imagem digital apresenta uma maior precisão quando comparada ao método manual e à citometria de fluxo. Assim, essas células serão nossos alvos iniciais.

Logrando chegar a um programa eficiente, que possibilite sua utilização em exames clínicos, barateando o custo e melhorando a precisão do exame em laboratórios que não possuem acesso a equipamentos mais caros, o objetivo deste projeto é solucionar um problema relatado por médicos do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo: a contagem manual de células em exames de urina.

Dessa forma, será desenvolvido um programa que realize a contagem de forma automática.

1.2. MOTIVAÇÃO

O sistema de saúde público é importante para a prosperidade de uma sociedade. Dessa forma, tecnologias que auxiliem tanto em tratamentos quanto em análise de exames são fundamentais.

Dois médicos do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (H.U.), Valdir Azevedo dos Santos e Ricardo Ambrosio Fock, foram contactados a fim de esclarecer o processo pelo qual se interpreta um exame de urina, e assim auxiliar no desenvolvimento de uma tecnologia capaz de otimizar os processos de interpretação desses exames.

Segundo explicações dos profissionais, o procedimento de análise da urina segue, em linhas gerais, as seguintes etapas:

1. Recebimento da amostra;
2. Registro no sistema;
3. Introdução da tira reativa na amostra;
4. Colocação da tira reativa no analisador de urina semiautomático (Cobas u 411);
5. Coleta de 10 mL da amostra para centrifugação;
6. Centrifugação por 10 minutos;
7. Anotar os resultados obtidos do analisador de urina;
8. Coleta de 10% da amostra para contagem de células no microscópio;
9. Contagem manual de células em um, dois ou quatro quadrantes da câmara de Neubauer;
10. Anotação do número de células; e
11. Liberação da amostra para próxima análise.

Ao avaliar o procedimento de análise do exame de urina, percebe-se que o item 9 é o procedimento mais sujeito a erros. Apesar da separação em quadrantes da câmara de Neubauer (Figura 1) e da utilização de um "contador de boi" (Figura 3), a contagem ainda está sujeita a erros. Um profissional experiente leva em média 5 minutos para contar todos os tipos de células. No entanto, em situações de urgência, a necessidade de avaliação rápida pode resultar em erros de contagem.

Figura 3 - Contador de boi.



Fonte: Autores.

Existem máquinas que automatizam esse processo, porém são tecnologias internacionais cujo custo acaba sendo elevado para a quantidade diária de exames.

Diante desse cenário, seria possível substituir o trabalho manual por um processo automático. E uma vez que o maquinário que automatiza esse tipo de processo tem um investimento elevado, já que a tecnologia existente não é nacional, identificou-se aqui uma oportunidade de auxiliar na interpretação dos exames de urina realizados no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Assim, dentre as motivações para realização deste trabalho estão:

- Interesse econômico/social: caso o objetivo seja alcançado, será possível aplicar uma solução automatizada de baixo custo na contagem de células do exame de urina. De modo que a contagem de células terá maior grau de precisão.
- Mérito técnico/científico: sob a ótica da mecatrônica, a utilização de ferramentas de desenvolvimento de *softwares* e programas para a automatização de um processo que envolve tratamento de imagem e programação orientada a objetos, representa uma aplicação em um problema real dos conhecimentos adquiridos no curso de graduação.

1.3. ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho é dividido em seis capítulos. Na “Introdução” (Capítulo 1) é apresentada uma visão global do trabalho, abordando brevemente o histórico do tema, o objetivo do trabalho e sua motivação.

Na “Revisão teórica” (Capítulo 2), são destrinchados os conceitos teóricos referentes ao tema de contagem de componentes encontrados na urina, onde são fornecidas as definições de cada um deles, além de conceitos referentes à análise de imagem.

Na avaliação do “Estado da arte” (Capítulo 3), as tecnologias já disponíveis são abordadas de modo mais amplo, referenciando os equipamentos já existentes, suas vantagens e desvantagens. Além dos estudos feitos na área de exames de urina, e as escolhas feitas para o desenvolvimento do programa.

Na descrição dos “Materiais e métodos” (Capítulo 4), são definidas as técnicas e ferramentas que foram utilizadas neste projeto, além da metodologia adotada para o tratamento de imagens e automação do processo de contagem de células.

Nos “Resultados e discussões” (Capítulo 5), são apresentados os resultados obtidos em cada programa desenvolvido, os quais são analisados, ponderando-se os aspectos positivos e negativos das soluções projetadas.

Por fim, nas “Conclusões” (Capítulo 6) é sumarizado o desenvolvimento que conseguimos obter, o quanto de nossos objetivos foi atingido e quais seriam os próximos passos para a continuidade do desenvolvimento deste projeto.

1.4. METODOLOGIA DO TRABALHO

Para desenvolvimento dos programas, foram seguidas as seguintes etapas:

1. Captura de imagem do microscópio;
2. Tratamento da imagem capturada;
3. Contagem de células; e
4. Comparação de resultados.

A fim de se seguirem as etapas acima, foram realizadas diversas visitas ao H.U. para melhor entender o procedimento do exame de urina e captura de fotos para os testes do programa.

Foi utilizada a linguagem Python com foco na biblioteca OpenCV e o *software* ImageJ para comparação.

2. REVISÃO TEÓRICA

O exame de urina é um dos exames mais frequentes em laboratórios. O Hospital Universitário chega a receber mais de 60 pedidos desse exame por dia. Ele consegue dar pistas de como está o metabolismo de uma pessoa, mostrando a densidade, pH, proteínas, glicose, cetona, bilirrubinas, sangue oculto, nitrito, urobilogeno, leucócitos, entre outros componentes presentes na urina (FUNCHARL *et al.*, 2008).

O exame é composto por três partes: a análise química (pH, glicose, urobilogeno *etc.*); a análise física (cor, aparência, cheiro); e conjuntamente, a análise microscópica do sedimento urinário (SU) em busca de elementos formados (eritrócitos, leucócitos, bactérias, cilindros *etc.*) (BAÑOS-LAREDO *et al.*, 2010).

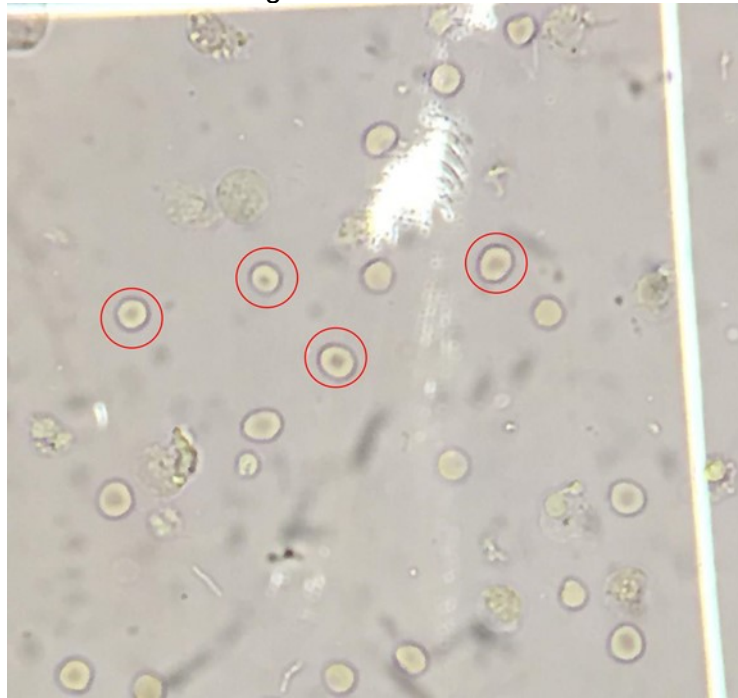
Neste trabalho, o foco foi direcionado à automatização da contagem de células presentes no sedimento urinário.

2.1. SEDIMENTOS URINÁRIOS

2.1.1. HEMÁCIAS

As hemácias (Figura 4) são células que se apresentam na forma de discos, com diâmetro de cerca de 7 μm e uma coloração em tom pálido de laranja-amarelado, devido a hemoglobina. Hemácias maiores e arredondadas são encontradas em amostras de urina diluída (PERES, 2010).

Figura 4 - Hemácias.



Fonte: Autores.

2.1.2. LEUCÓCITOS

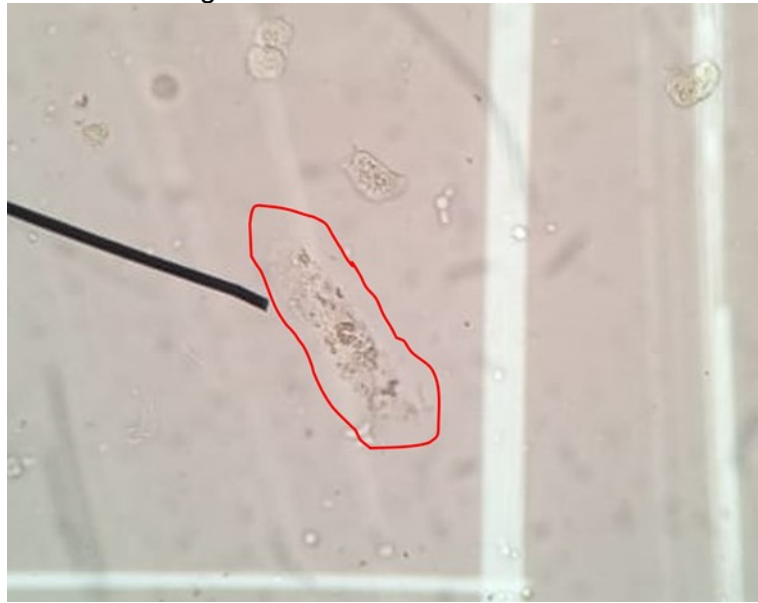
Os leucócitos (Figura 5) são importantes na quantidade ou número em que se encontram e podem ser um indicador de dano ou cronicidade de um processo patológico (BAÑOS-LAREDO *et al.*, 2010). Muitas vezes podem formar cilindros devido a uma junção das células (Figura 6).

Figura 5 - Leucócitos.



Fonte: Autores.

Figura 6 - Cilindro de leucócitos.

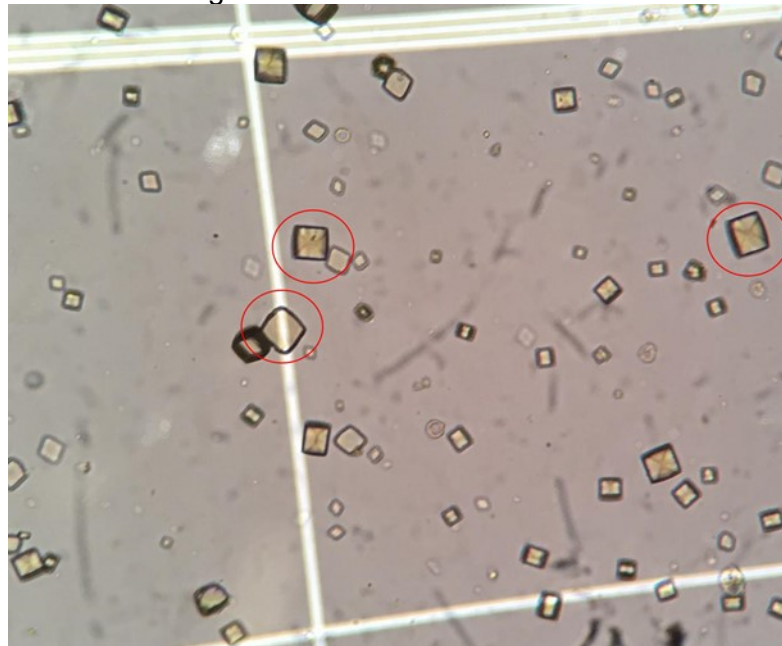


Fonte: Autores.

2.1.3. CRISTAIS

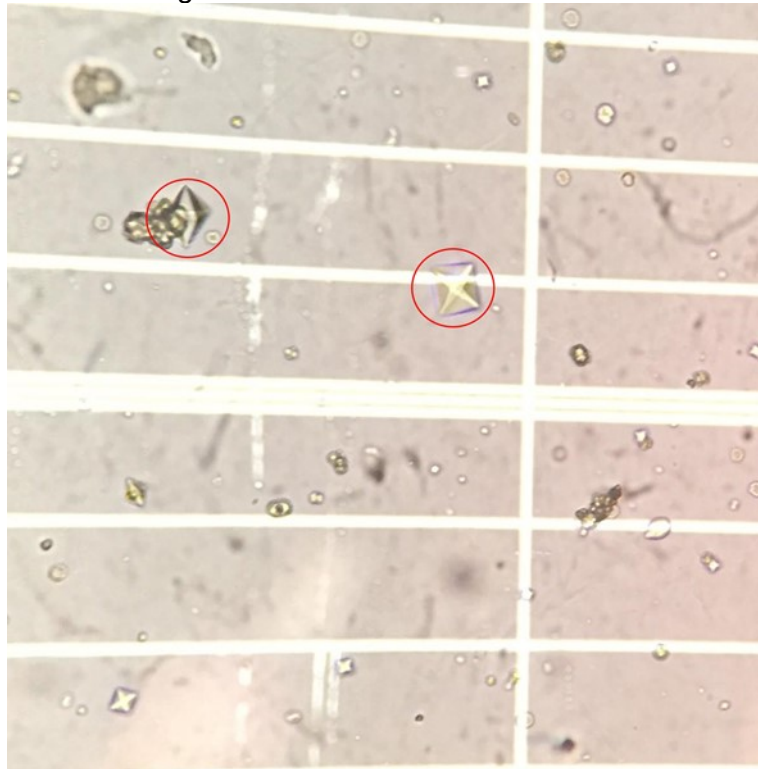
Os cristais podem assumir várias formas que dependem do composto químico e do pH da urina (BAÑOS-LAREDO *et al.*, 2010). Existindo diversos tipos, como o de ácido úrico (Figura 7) e o de oxalato (Figura 8).

Figura 7 - Cristais de ácido úrico.



Fonte: Autores.

Figura 8 - Cristais oxalato de cálcio.

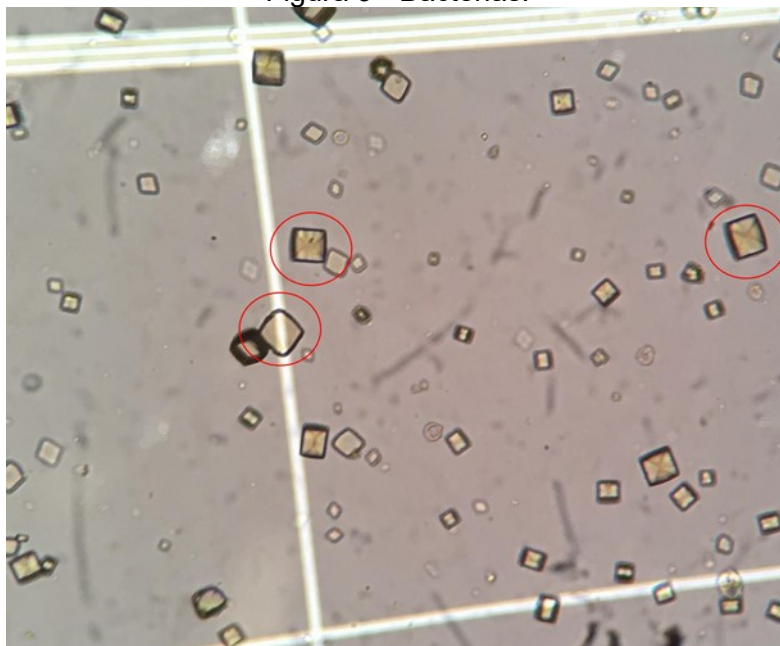


Fonte: Autores.

2.1.4. BACTÉRIAS

As bactérias (Figura 9) ocorrem com frequência em sedimentos urinários devido à contaminação uretral ou vaginal. Sua presença em grandes quantidades sugere um processo infeccioso do trato urinário (BAÑOS-LAREDO *et al.*, 2010).

Figura 9 - Bactérias.

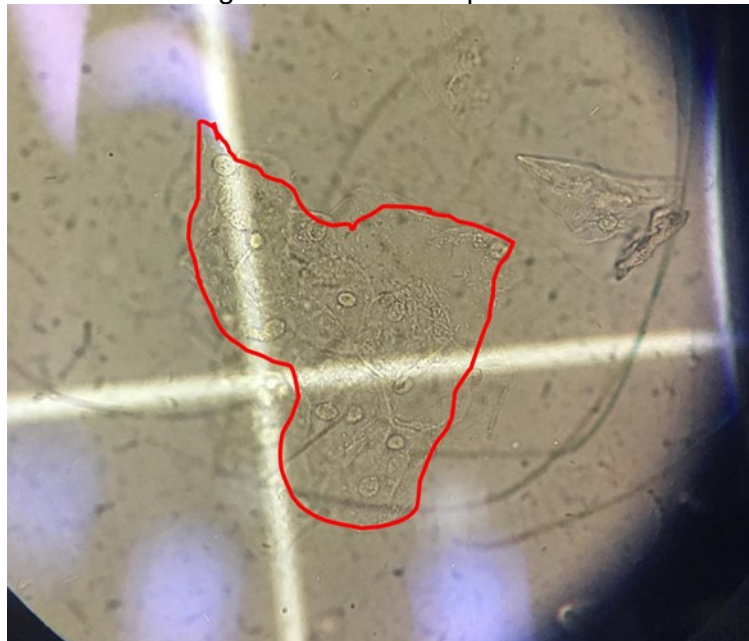


Fonte: Autores.

2.1.5. CÉLULAS EPITELIAIS

Em condições normais, células epiteliais (Figura 10) podem ser observadas no sedimento urinário em maior ou menor quantidade, o que dependerá das condições fisiológicas e do sexo do paciente (BAÑOS-LAREDO *et al.*, 2010).

Figura 10 - Células epiteliais.



Fonte: Autores.

2.2. MODELO DE CONTAGEM DE CÉLULAS PELO MÉTODO MANUAL

Para realizar a contagem, o H.U. segue os procedimentos tal como definido pela Norma Brasileira 15.268 (ABNT, 2005 *apud* PERES, 2010), a qual descreve os seguintes procedimentos para preparação da urina para a análise clínica:

1. Homogeneizar a amostra de urina e transferir para um tubo de ensaio um volume de 10 mL;
2. Centrifugar de 1.500 a 2.000 rpm (rotações por minuto), o que corresponde a 400 FCR (força de centrifugação relativa), durante 5 minutos;
3. Retirar 9,8 mL do sobrenadante, com cuidado para não ressuspender o sedimento, deixando um volume de 0,2 mL de sedimento no tubo de centrifugação;
4. Ressuspender o sedimento com leves batidas no fundo do tubo;
5. Transferir 0,02 mL (20 μ L) desta suspensão de sedimento para uma lâmina de microscopia;

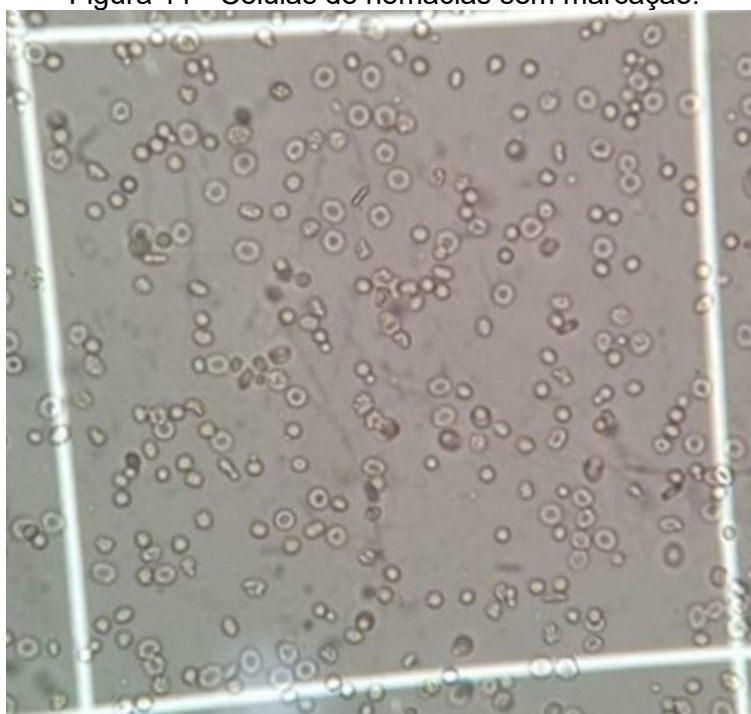
6. Colocar sobre o sedimento uma lamínula-padrão de 22 x 22 mm; e
7. Realizar a avaliação em, no mínimo, 10 campos microscópicos, calcular a média e expressar os resultados de acordo com os procedimentos implantados (por campo ou por mililitro).

A Etapa 6 é realizada no Hospital Universitário utilizando uma câmara de Neubauer (Figura 1). Ao colocar o composto para análise na câmara, utiliza-se o microscópio para analisar as imagens, realizando a contagem manual em cada um dos quadrantes da câmara. Sendo utilizados 1, 2 ou 4 dos 9 quadrantes, utilizando-se necessariamente os quadrantes que se encontram nos cantos, ou utilizando apenas o do meio (Figura 2).

Por fim, é realizada a contagem utilizando um contador de células manual ou um simples contador de boi (Figura 3). Sendo que, caso seja contado apenas um quadrante é multiplicado por 1000, se forem 2, por 500 e 4, por 250. Esse método leva cerca de 5 minutos por exame para um profissional experiente, segundo relatos dos técnicos em análise do Hospital Universitário.

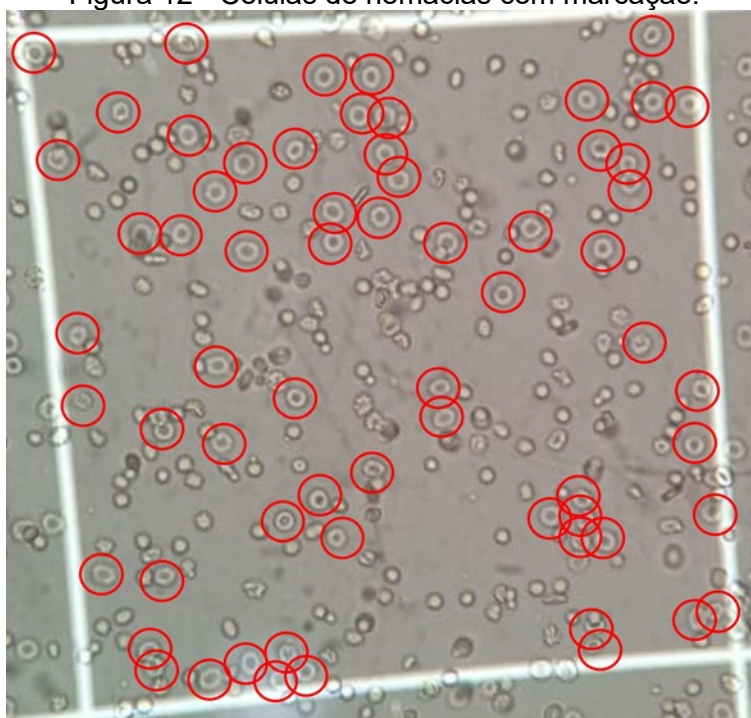
A Figura 11 a seguir mostra a contagem de células de hemácias em um exame de urina de apenas um quadrado do quadrante 4x4. Na Figura 12 é possível identificar as células que devem ser contadas.

Figura 11 - Células de hemácias sem marcação.



Fonte: Autores.

Figura 12 - Células de hemácias com marcação.



Fonte: Autores.

3. ESTADO DA ARTE

Ao longo dos anos, diversas técnicas foram desenvolvidas para a contagem de células, desde o sistema mais simples de verificação manual com o uso de microscópio, até análises mais complexas, como a citometria de fluxo, que verifica a refração de um laser ou fonte de luz sobre um fluxo laminar contínuo de urina.

Outras formas de automatização também são empregadas para diferentes formas de avaliação de exames urinários. A análise química é uma delas, que atualmente possui alto grau de automatização, seja com o uso de tiras reagentes ou de módulos automatizados, capazes de realizar a análise completa.

Trabalhos relevantes foram realizados na área, seja visando à otimização dos processos existentes, à criação de novas metodologias ou à avaliação comparativa entre processos já existentes. Neste item serão abordados os estudos que possuem maior interface com o trabalho aqui desenvolvido.

3.1. MÉTODOS EXISTENTES DE CONTAGEM DE CÉLULAS

Para o desenvolvimento deste item, a principal base foi o trabalho de NAKASATO *et al.* (2019), que visou justamente apresentar uma análise dos sistemas automatizados disponíveis, comparando-os. Para isso foram compilados trabalhos, manuais de equipamentos e experiência de profissionais da área.

3.1.1. LEITURA VISUAL DAS TIRAS REAGENTES

As tiras (Figura 13) contêm em si reagentes para diferentes componentes contidos na urina, e o gabarito comparador permite verificar as quantidades desses componentes. Apesar de possuir gabarito, a análise visual pode gerar divergências. Isso se dá porque técnicos diferentes podem interpretar um mesmo exame de forma distinta. Essa divergência pode ocorrer também por outros fatores, como luminosidade no ambiente e tempo incorreto de reação.

A fim de resolver esse problema, gerando uma maior padronização, foram criados os dispositivos leitores de tiras, como o CLINITEK 50 - Bayer®. Esses dispositivos utilizam o método da fotometria por reflectância, no qual luzes geradas por LEDs são emitidas sobre as tiras, e a reflexão é analisada de forma comparativa com uma referência pré-estabelecida na máquina.

Atualmente, existem versões desses dispositivos que digitalizam a imagem antes de transmiti-la aos sensores e realizar a análise. Assim, tornou-se possível fazer avaliações mais precisas e distinguir componentes que outrora não eram identificados.

Figura 13 - Tiras reagentes.



Fonte: Autores.

3.1.2. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é um processo que visa medir individualmente os componentes enquanto eles escoam, em regime laminar, por uma câmara de contagem. O líquido utilizado é condutor de eletricidade e como as células não são boas condutoras, quando elas passam na câmara causam uma alteração na diferença de potencial, cujo sinal é relacionado com as diferentes morfologias dos componentes. Essa característica é chamada de bioimpedância.

Além da bioimpedância, um laser é direcionado à parte frontal da câmara, permitindo identificar com precisão o tamanho das células, uma vez que ele é capturado por um sensor frontal. Em exames de sangue, também é possível capturar a dispersão lateral da luz, que fornece informações sobre o conteúdo celular. Porém, na urina isso não é possível, uma vez que diferentemente do sangue, ela possui componentes não celulares, como cristais, cilindros, bactérias, fungos, entre outros.

A principal desvantagem da citometria de fluxo, é que ela exige um alto grau de revisão (da ordem de 50-60%), pois alguns elementos não são diferenciáveis, demandando avaliação de um analista. Além disso, esse método possui erros em

duas condições: contagem de leucócitos quando há muitas células pequenas e arredondadas, e contagem de eritrócitos em amostras com muitos microrganismos.

3.1.3. IMAGEM DIGITAL COM RECONHECIMENTO DE PARTÍCULAS

Utilizando uma câmera digital de alta precisão acoplada ao microscópio, foi possível desenvolver um novo método de contagem de células. Esse método representou um grande progresso na urianálise. Um dos principais equipamentos que utilizam esta tecnologia é o iQ®200 da Iris Diagnostics. Esta máquina utiliza o *software Auto-Particle Recognition (APR™)*, que classifica as células nas imagens capturadas de acordo com seu tamanho, formato, contraste e estrutura, utilizando algoritmos de redes neurais. As imagens podem ser ainda conferidas em um monitor e editadas pelo operador.

Além disso, é utilizado o DFM (morfologia de fluxo digital), que consiste em alinhar os elementos antes de fotografá-los. Esse processo foi criado com grande influência da citometria de fluxo, mas não exige centrifugação. O fluído é aspirado e passa pela lente objetiva do microscópio em regime laminar. São capturados 500 quadros por amostra, que são analisadas pelo APR™.

Esse sistema é capaz de identificar eritrócitos, leucócitos, bactérias, cilindros hialinos, cilindros patológicos, cristais, células epiteliais escamosas, células epiteliais não escamosas, leveduras, espermatozoides e muco.

O sistema pode ser acoplado ao equipamento AUTION MAX® para que seja realizada a análise química, fornecendo um diagnóstico mais completo. Assim como na citometria de fluxo, esse procedimento exige uma validação humana ao final do processo.

3.1.4. MICROSCOPIA AUTOMATIZADA COM IMAGEM DIGITAL

Este processo surgiu como uma evolução natural da imagem digital com reconhecimento de partículas. A principal diferença é a centrifugação automática da amostra. Posteriormente, é formada uma camada de sedimento em um dispositivo chamado cuvete, que faz o papel da lâmina. E então, são tiradas as fotografias digitais das camadas.

É utilizado o módulo automático de avaliação de imagem (AIEM), *software* de alta qualidade, capaz de identificar eritrócitos, leucócitos, cilindros hialinos, cilindros patológicos, células epiteliais escamosas, células epiteliais não escamosas,

bactérias, leveduras, cristais (oxalato de cálcio mono hidratado, oxalato de cálcio diidratado, ácido úrico, fosfato triplo), muco e espermatozoides. O sistema também permite reclassificação manual caso haja discordância.

Os principais equipamentos que utilizam esta tecnologia são UriSed® II (AlereTM) e Cobas® 6500 (ROCHE). Ambos podem ser acoplados a outros módulos para que seja realizada também a análise química.

3.1.5. SISTEMA MODULAR MISTO

São sistemas que combinam mais de um método, de modo que a avaliação conjunta dos resultados proporciona diagnósticos mais precisos. Um equipamento que exemplifica esse sistema é o Série-Um da Sysmex®, tal equipamento possui três módulos: citometria de fluxo, análise físico-química e análise de imagem digital.

3.2. ESTUDOS DESENVOLVIDOS

3.2.1. UTILIZAÇÃO DO CONTEXTO NA ANÁLISE DE IMAGEM

Song *et al.* (2000) abordaram a importância do entendimento do contexto do exame para obtenção de melhores resultados na análise de imagem. Tendo isso em mente, foi proposta uma nova técnica de incorporação do contexto no processo de tomada de decisão da análise de imagem.

Em seu trabalho, são abordadas formas já existentes da aplicação do contexto em análises de dados, porém reforça que as análises exigem um grande aumento na demanda de poder computacional. O método proposto, em contrapartida, apresenta complexidade linear, tornando a análise mais rápida e acessível, e comportando a leitura de um maior volume de dados.

A técnica incorpora o chamado "contexto parcial" na análise. Esse nome é dado pois, diferente das formas explícitas, que derivam a posteriori da classificação de todos objetos, o contexto parcial deriva somente dos *labels* de classe. Desse modo, o contexto passa a ser uma das *features* utilizada para a classificação dos objetos.

A área utilizada por Song *et al.* (2000) para exemplificar sua tese é justamente a análise de urina por microscopia com reconhecimento de imagem, uma vez que o contexto apresenta grande relevância nessa área. Isso ocorre pelo fato de algumas combinações de componentes serem mais prováveis que outras. Por exemplo, bactérias e glóbulos brancos, uma vez que a presença de bactérias no organismo

estimula uma resposta do sistema imunológico caso elas gerem algum tipo de infecção, resultando na produção de glóbulos brancos (MACHADO *et al.*, 2004).

Como resultado, o trabalho de Song *et al.* (2000) demonstra que a incorporação do chamado "contexto parcial" acarretou, de fato, resultados mais precisos. Considerando uma análise elemento a elemento, o erro sem utilização do contexto foi de 44,48%, com a utilização do contexto parcial, este erro caiu para 36,66%. Além disso, o algoritmo foi desenvolvido de forma generalizada, de modo que pudesse ser aplicado também a outros contextos.

Os resultados obtidos por Song *et al.* (2000) representaram um grande avanço no que diz respeito à classificação de componentes, entretanto, nota-se que ainda assim, o erro da classificação é significativo. Devido a isso, diferentemente do que foi realizado por Song *et al.* (2000), este trabalho visa atuar sobre componentes específicos do sangue e realizar sua contagem. Com menos classes possíveis, a tendência é que haja uma maior assertividade na identificação e contagem dessas classes.

3.2.2. UTILIZAÇÃO DE APLICATIVO PARA REALIZAÇÃO DE LEITURA DE TIRAS REAGENTES

Ra *et al.* (2017) propuseram uma nova forma da utilização de tiras reagentes para diagnóstico de exames de urina. Sua proposta consistiu na modificação do formato das tiras, que atualmente são lineares tendo o gabarito na embalagem (Figura 13). A mudança visava coloca-las em "formato de *donut*", de modo que a tira reagente ficasse no centro e as cores do gabarito ao redor, facilitando a leitura comparativa das cores e proporcionando, assim, resultados mais precisos.

Além da alteração de formato, foi desenvolvido um aplicativo para celular capaz de realizar a comparação de forma automática. Desse modo, laboratórios que não possuíam o equipamento de leitura de tiras automático poderiam se beneficiar dele, já que envolveria menores custos. O aplicativo funciona utilizando as tiras com os novos formatos propostos, de modo que seu algoritmo identifica os círculos nas tiras e realiza a comparação com o gabarito, fornecendo os resultados de modo imediato.

Os resultados demonstraram que, de fato, esse novo método apresentou melhores resultados, principalmente em análises que possuíam mais categorias possíveis. Os componentes com menos categorias apresentaram resultados muito compatíveis com os exames convencionais.

Além dessa comparação, foram verificadas também mudanças com base no modelo do celular utilizado e comparadas a análise humana com a do aplicativo. Notou-se que celulares diferentes geraram resultados muito próximos, o que demonstra a efetividade do método. E comparando os resultados da análise humana com a automatizada, notou-se que a primeira gerou resultados mais precisos, apesar da diferença não ser tão significativa.

No trabalho de Ra *et al.* (2017), a análise de imagem foi utilizada de forma diferente, sendo aplicada para realizar a comparação de cores das tiras ao invés da classificação ou contagem. Seu trabalho propõe uma solução aplicável e efetiva para a parte química da urinálise, porém tal solução não contempla a contagem de alguns componentes, como hemácias e leucócitos, que é o caso deste trabalho.

3.2.3. APLICAÇÃO DE REDES NEURAI E FRACTAIS PARA URINÁLISE

Um dos trabalhos que apresenta um estudo muito próximo do que se deseja realizar aqui é o desenvolvido por Méndez *et al.* (2004). Nele, foi realizada a classificação de elementos do sedimento de urina utilizando tanto redes neurais quanto geometria fractal.

Esse trabalho afirma que a aplicação da geometria fractal, de modo a entender a estrutura interna dos componentes urinários, possibilita um aumento na efetividade dos métodos já existentes, o que foi comprovado em alguns dos testes realizados.

O sistema implementado foi capaz de obter altos níveis de eficiência, chegando em 98% ao combinar a análise de imagem com a análise química. Um dos limitantes comentados é que a rede neural elaborada exige uma grande capacidade computacional. Além disso, foi necessário utilizar outros fatores além dos parâmetros dos fractais para realização da análise, como detalhes da morfologia e estatísticas do ramo. Por fim, era necessário que os componentes caracterizados estivessem agrupados e apresentassem algum tipo de textura em sua estrutura.

Assim, o trabalho de Méndez *et al.* (2004) possui uma grande interface com o que se deseja realizar aqui, uma vez que utiliza redes neurais para realizar a classificação de componentes presentes no sedimento urinário. A diferença é que o foco deste trabalho reside especificamente na contagem de estruturas específicas ao invés de realizar a classificação em si. Por conta disso, não será necessária aplicação de geometria fractal.

3.2.4. CONTAGEM DE LEVEDURAS COM CÂMARA DE NEUBAUER

Souza (2020) realizou um processo similar ao que se deseja executar aqui. Em seu estudo, foi feita a identificação e contagem de leveduras utilizadas na produção de fermentados.

Assim como no caso deste trabalho, foi utilizada a câmara de Neubauer para realizar a contagem de leveduras. Essa contagem é importante porque permite saber se o processo foi executado de maneira adequada, sem ultrapassar os limites de biossegurança definidos.

Em seu estudo, Souza (2020) desenvolveu uma técnica de processamento de imagem capaz de realizar a contagem de leveduras de maneira mais rápida e precisa do que a microscopia manual. Seu trabalho gerou resultados positivos, uma vez que obteve uma eficácia aproximada de 92,4%, além da capacidade de avaliar 5 amostras por segundo.

Assim, esse estudo se mostrou compatível com o que se desejou realizar aqui, sendo que a principal diferença é que, no contexto da urina, existem mais componentes em suspensão na análise, de modo que, para este trabalho, se faz necessário identificar o alvo, diferenciando-o dos demais componentes. Devido a isso, a metodologia utilizada por Souza (2020) apresenta uma das bases do tratamento de imagem em que este trabalho irá se basear para o desenvolvimento do processo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. SOFTWARES PARA CONTAGEM DE CÉLULAS

Embora existam diversos *softwares* e bibliotecas em Python no mercado que realizem contagem de células e sejam de domínio público, para o desenvolvimento deste trabalho era necessário um *software* que fosse de fácil manipulação, boa documentação e, principalmente, que atendesse às rotinas desejadas, possuindo uma ampla gama de algoritmos de tratamento de imagem.

Além disso, buscou-se comparar tais resultados com aqueles obtidos em uma ferramenta já estruturada na forma de aplicação, sobre a qual fosse possível realizar as mesmas operações, porém com menor grau de liberdade em sua calibração.

Levando isso em consideração, foram estudados dois *softwares open source* de análise e processamento de imagens: ImageJ e OpenCV. Além dos *softwares*

possuírem códigos-fonte livres, ambos possibilitaram o desenvolvimento de aplicações que se adequassem à necessidade do usuário. A seguir são dados maiores detalhes sobre cada um:

- ImageJ: programa de processamento de imagem Java de domínio público inspirado no NIH Image para Macintosh. Pode ser executado como um miniaplicativo *online* ou como um aplicativo para *download* em qualquer computador com uma máquina virtual Java 1.4 ou posterior. Seu funcionamento utiliza um *core* central que pode ser aprimorado de acordo com as necessidades do usuário (RASBAND, 2018).
- OpenCv (*Open Source Computer Vision Library*): uma biblioteca de *software* de visão computacional e aprendizado de máquina de código aberto. A biblioteca tem mais de 2.500 algoritmos otimizados, que incluem um conjunto abrangente de algoritmos de visão computacional e aprendizado de máquina clássicos e de última geração (TEAM, 2021).

Na Tabela 1 abaixo é apresentada uma comparação entre os softwares utilizados, conforme exposto acima.

Tabela 1 - Comparação entre os *softwares* ImageJ e OpenCV.
Fonte: Autores.

Características	Image J	OpenCV
Suporte de sistema	Windows, Linux e Mac OS	Windows, Linux, Android e Mac OS
Memoria	70MB	30MB
Memoria RAM	640MB (Padrão) até 1500MB	Depende da aplicação
Linguagem desenvolvida	JAVA 1.4 ou superior	C++
Linguagem script	- Devem ser desenvolvidas em JAVA - Comandos próprios do <i>software</i> - <i>Plugin</i> desenvolvido pode ser alocado no menu	- Desenvolvimento em C++, Python, Java e Matlab
Suporte	- Possui documentação de ajuda - Comunidade ativa - Utilizada principalmente no universo acadêmico	- Possui documentação de ajuda - Cursos online pagos - Utilizada por empresas como Google, Yahoo, Microsoft, Intel, IBM, Sony e diversas <i>startups</i>

4.2. MICROSCÓPIO

O laboratório de análises do exame de urina do Hospital Universitário utiliza o microscópio da marca Nikon Eclipse E200 (Figura 14), que foi o instrumento utilizado ao longo de todo o trabalho.

Figura 14 - Microscópio Nikon Eclipse E200.



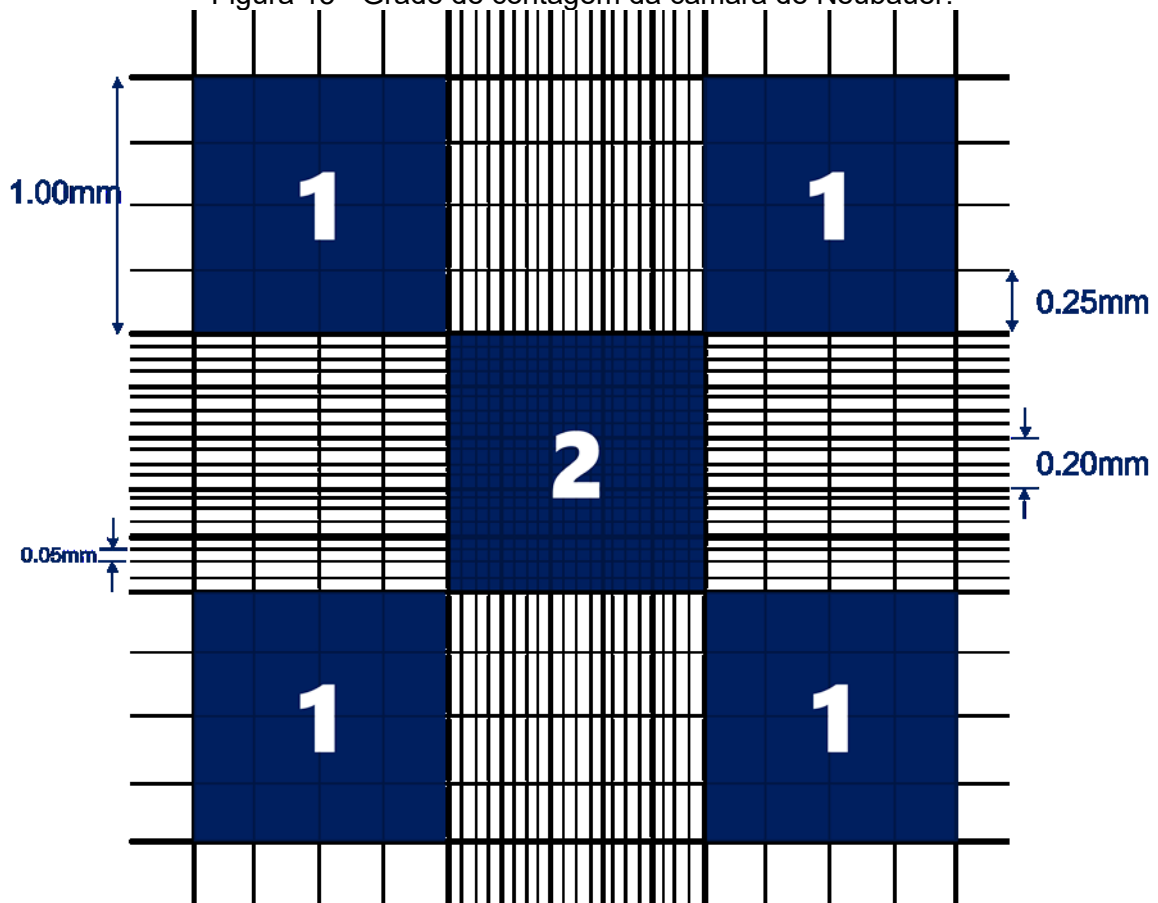
Fonte: Autores.

4.3. CÂMARA DE NEUBAUER

Como apresentado anteriormente, o laboratório do Hospital Universitário da USP utiliza a câmara de Neubauer (Figura 1) para contagem de células das amostras de urina no microscópio.

A câmara possui 4 quadrantes de 1 x 1 mm (local 1 na Figura 15) subdivididos em 16 quadrados de 0,25 mm e um quadrante central (local 2 na Figura 15) subdividido em quadrados de 0,05 mm.

Figura 15 - Grade de contagem da câmara de Neubauer.



Fonte: Autores.

Para garantir a padronização e por indicação dos técnicos do laboratório, foram coletadas imagens de apenas de um dos quadrantes 4 x 4. Dessa forma as imagens obtidas tiveram o mesmo dimensionamento.

4.4. SMARTPHONE E SUPORTE

As técnicas de processamento de imagem tendem a apresentar melhores resultados com imagens de alta qualidade, pois uma imagem com muita interferência prejudica o entendimento do programa dificultando sua análise.

Diversos microscópios da Nikon apresentam peças complementares para facilitar a captura de imagens do microscópio ou tirar fotos de forma digital sem necessidade de uma máquina. Porém esses dispositivos têm preço muito elevado, por não ser uma tecnologia nacional é necessário importação, e a análise da imagem e o processamento devem ser feitos em *software* próprio da empresa, inviabilizando seu uso neste projeto.

Dessa forma, a melhor estratégia foi a utilização de um *smartphone*, devido a sua maior acessibilidade e por não depender, de modo geral, de investimentos adicionais.

Durante o período de estudo de caso foram tomadas diversas fotografias utilizando a câmera do celular de um dos autores deste trabalho e de um dos técnicos do laboratório. Sobre essas imagens buscou-se identificar as células presentes no exame de urina. Chegando-se a conclusão de que seria necessário um *smartphone* que possuísse câmera traseira de resolução mínima de 12 MP para obter imagens com a qualidade necessária para a correta funcionalidade do programa.

4.4.1. COLETA DE IMAGENS

A coleta das imagens pode ser feitas de duas formas:

1. Segurando o celular com as mãos: aponta-se a câmera para os oculares do microscópio. É necessário ir ajustando a posição até que se possa ver um feixe de luz no centro da câmera, e em seguida ir aproximando o celular com calma em direção ao microscópio, até que se possam ver as imagens nitidamente.
2. Utilizando um suporte de plástico de baixo custo para fixar o celular às lentes do microscópio (Figura 16): é necessário que o ajuste seja feito apenas uma vez. Tal montagem possibilita a captura de todos os quadrantes de modo rápido e efetivo, além de garantir uma maior padronização entre as imagens coletadas.

Figura 16 - Suporte para o celular.



Fonte: Autores.

Durante o estudo foi analisado qual seria a melhor técnica considerando os seguintes critérios:

- Facilidade de ajuste para tirar a foto;
- Custo; e
- Velocidade para tirar diversas fotos seguidas.

Os resultados mostraram que apesar de o equipamento plástico necessitar de apenas um ajuste e tirar diversas fotos seguidas de forma eficiente, ele apresenta uma dificuldade de ajuste muito elevada, que poderia provocar possíveis danos ao microscópio, uma vez que para que o ajuste seja bem feito é necessário retirar os tubos oculares, fixar o dispositivo e em seguida o *smartphone*, e então colocar de volta o tubo ocular. Esse procedimento se mostrou prejudicial às peças do microscópio no longo prazo. Além disso, seria necessário realizar a compra desse suporte, aumentando os custos. Por consequência, as fotos utilizadas neste trabalho foram tomadas segurando o celular com as mãos.

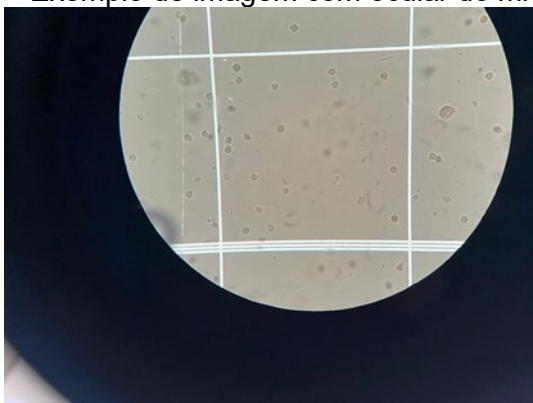
4.5. PROGRAMA

Destaca-se que o desenvolvimento do programa foi feito utilizando-se concomitantemente o ImageJ e a biblioteca OpenCV, a fim de se obterem comparações imediatas.

4.5.1. EDIÇÃO E PRÉ-PROCESSAMENTO

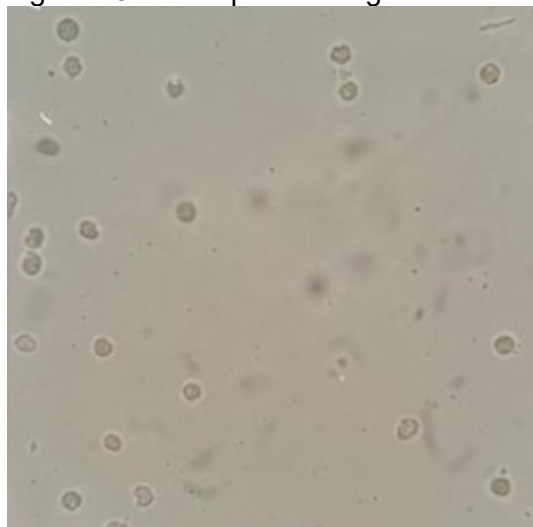
Por terem sido tiradas apontando a câmera do celular para a ocular do microscópio, muitas das imagens têm a visão de uma ocular, como apresentado na Figura 17. Portanto, antes de colocar o programa em prática, é necessário realizar um pré-processamento das imagens, realizando o corte do que se deseja verificar da imagem, e deixando em foco apenas a parte na qual se deseja realizar a contagem, como mostrado na Figura 18.

Figura 17 - Exemplo de imagem com ocular do microscópio.



Fonte: Autores.

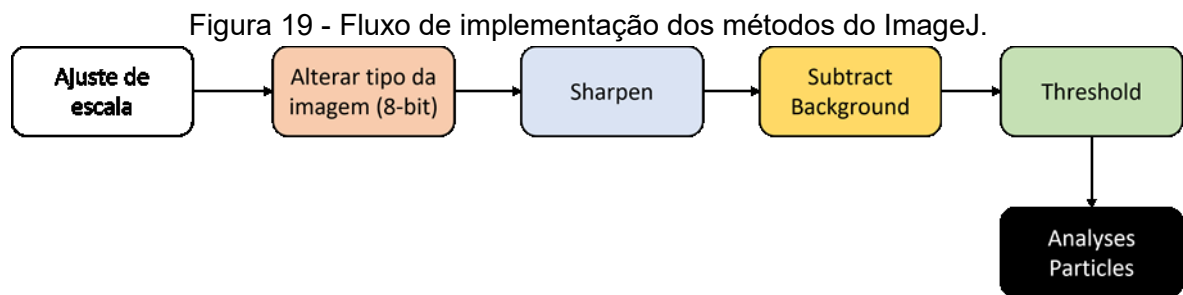
Figura 18 - Exemplo de imagem cortada.



Fonte: Autores.

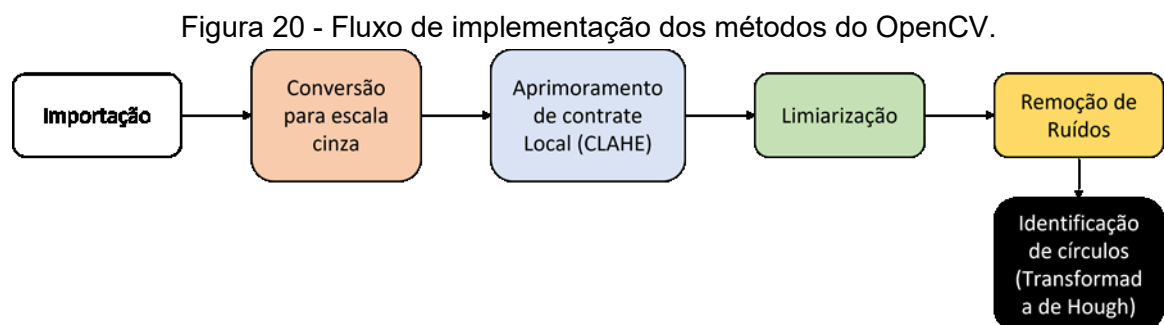
4.5.2. FLUXO DE PROCESSAMENTO

O *software* ImageJ possui diversos *plugs* internos em seu sistema que possibilitam a contagem de células, porém devem ser realizados os procedimentos e métodos de processamento de imagem para se obter uma contagem satisfatória. O fluxo dos procedimentos está apresentado na Figura 19.



Fonte: Autores.

Já a biblioteca OpenCV fornece uma ampla quantidade de possibilidade de tratamentos de imagens, que podem ser utilizados em cada caso de acordo com a necessidade. Nota-se que algumas etapas são recorrentes em trabalhos que envolvem identificação e contagem de componentes, e neste trabalho foram adicionados ainda outros processos na tentativa de otimizar o algoritmo para a solução desejada. Na Figura 20 é apresentado um diagrama que sumariza o processo completo.



Fonte: Autores.

Como se pode observar na Figura 19 e na Figura 20, os métodos são basicamente os mesmos, alterando apenas o nome e a ordem em que são executados. Cada um dos procedimentos envolvidos será detalhado a seguir.

4.5.2.1. IMPORTAÇÃO DA IMAGEM

Nesta etapa, a imagem coletada é trazida para o programa utilizando a função *cv2.imread* da biblioteca OpenCV, que importa a imagem na forma de matriz para que ela possa ser processada.

4.5.3. AJUSTE DA ESCALA

É necessário estabelecer a relação correta entre pixels e mm.

Considerando-se que cada uma das imagens já cortadas representa 250 μm e que a média do tamanho de imagem foi de 340 x 340 pixels, foi estabelecida a escala de 1.36 pixels/ μm .

4.5.4. ALTERANDO O TIPO DA IMAGEM / CONVERSÃO PARA ESCALA DE CINZA

A contagem de células se torna mais eficiente quando feita na escala cinza, o que pode ser obtido por cada *software* da seguinte maneira:

- O ImageJ disponibiliza a funcionalidade de alterar o tipo da imagem para 8-bits, deixando a imagem em escala cinza.
- O OpenCV utiliza a função *cv2.cvtColor* que recebe como parâmetros a imagem a ser alterada e o tipo de transformação, no caso *cv2.COLOR_BGR2GRAY*.

4.5.5. SHARPEN / APRIMORAMENTO DE CONTRASTE LOCAL (CLAHE)

Esta transformação tem como objetivo ressaltar o contraste local das imagens, de modo a facilitar a identificação posterior das bordas. Para isso, é realizada uma interpolação bilinear de pixels da vizinhança, o que gera uma diminuição na existência de limites artificiais.

O procedimento de *sharpen* é mais uma funcionalidade do ImageJ, enquanto no OpenCV utiliza-se a função *cv2.createCLAHE*, na qual se definem os parâmetros referentes à transformação e cria-se o objeto que realiza a transformação, depois chama-se o método *apply* do programa, executando a transformação sobre a imagem.

4.5.6. SUBTRACT BACKGROUND / REMOÇÃO DE RUÍDOS

Nas imagens ocorrem ruídos que geralmente estão desconectados dos outros componentes, mas que podem interferir em processos posteriores.

De modo a otimizar a contagem, é necessário remover tais ruídos, retornando uma segmentação de todos componentes da imagem em diferentes matrizes que representam alguns atributos. Uma delas é a matriz de tamanhos. Varrendo-a, podemos decidir quais componentes devem ser mantidos e quais devem ser removidos, comparando o tamanho obtido com um valor de referência.

O ImageJ possui uma funcionalidade para isso e o OpenCV utiliza a função *cv2.connectedComponentsWithStats*.

4.5.7. THRESHOLD / LIMIAÇÃO

Consiste no processo de transformar uma imagem na escala cinza em imagem binária. Existem diferentes métodos de limiarização. Neste trabalho foi escolhida a limiarização adaptativa gaussiana, uma vez que ela mostrou melhores resultados, preservando as estruturas da imagem e sem causar distorções significativas.

No ImageJ, utiliza-se para isso a funcionalidade *threshold*. No OpenCV, a função responsável por esse processo é *cv2.adaptiveThreshold*.

4.5.8. ANALYSES PARTICLES / CONTAGEM DE CÍRCULOS

Por fim, é realizada a contagem de círculos, para a qual o ImageJ utiliza a funcionalidade *Analyses Particles* e o OpenCV utiliza a Transformada de Hough, implementada pela função *cv2.HoughCircles*.

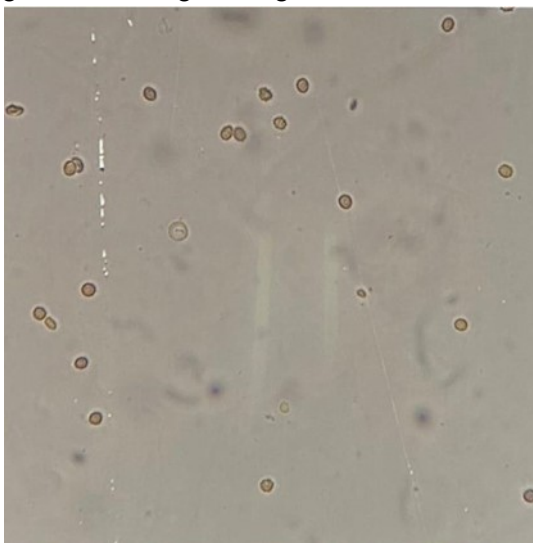
Nesta etapa foi necessário calibrar os parâmetros de modo a adaptar para o caso em uso. Ao final, destacam-se os círculos encontrados nas imagens, que representam os leucócitos e as hemácias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. IMAGENS PROCESSADAS

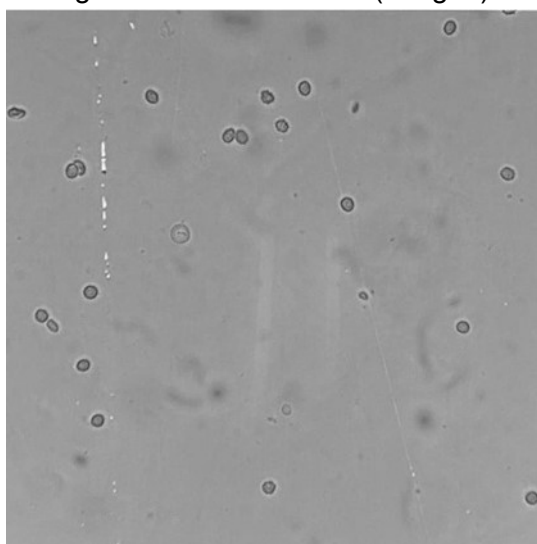
Primeiramente, foi realizada a mudança de escala, passando de RGB para escala cinza, como mostrado na Figura 22 e na Figura 23. Vale destacar que a Figura 21 é uma imagem da amostra sem nenhum processamento.

Figura 21 - Imagem original de uma amostra.



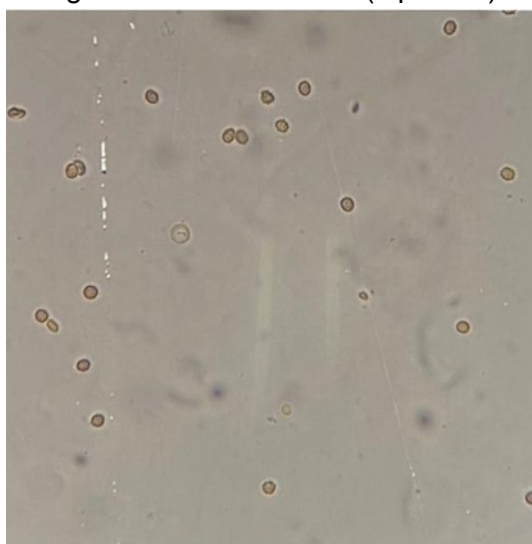
Fonte: Autores.

Figura 22 - Escala cinza (ImageJ).



Fonte: Autores.

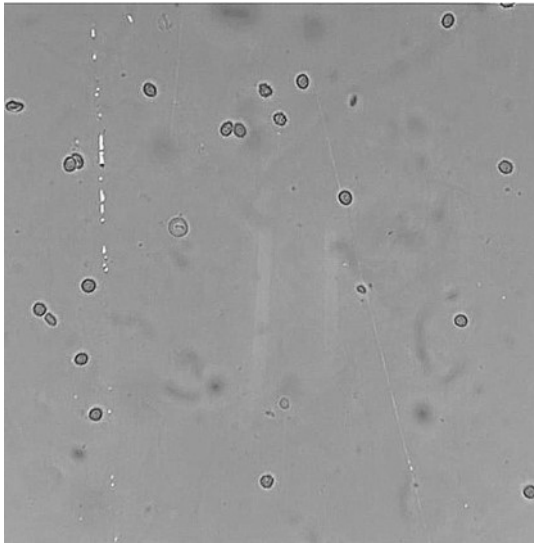
Figura 23 - Escala cinza (OpenCV).



Fonte: Autores.

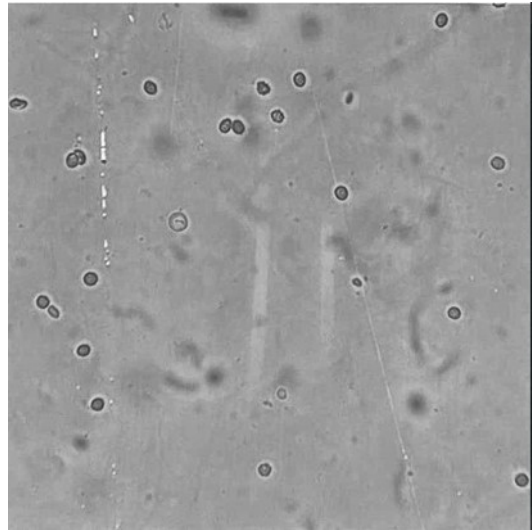
Uma vez em posse da imagem em escala cinza, é possível realizar o aprimoramento do contraste local, que destaca as bordas dos componentes, melhorando a qualidade da imagem para as próximas etapas, como mostram a Figura 24 e a Figura 25.

Figura 24 - Aprimoramento (ImageJ).



Fonte: Autores.

Figura 25 - Aprimoramento (OpenCV).

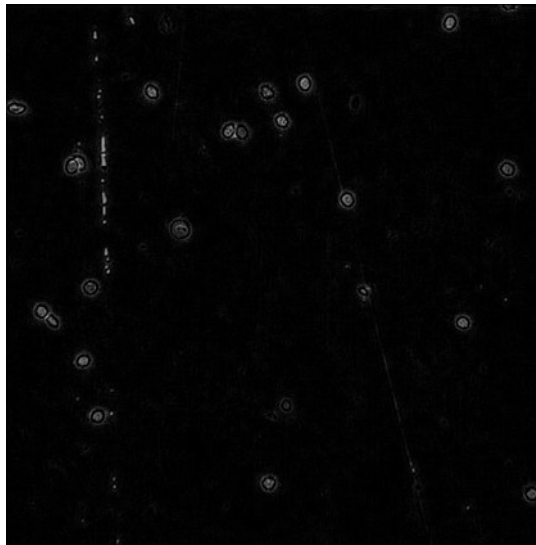


Fonte: Autores.

Com os contrastes reforçados, pode-se realizar o processo de limiarização de maneira mais consistente, diminuindo as chances de que os contornos das células sejam fundidos a ruídos, perdendo sua forma. Após esse processo as imagens tornam-se binárias, possuindo somente cor branca ou preta, como podemos ver na Figura 27 e na Figura 28.

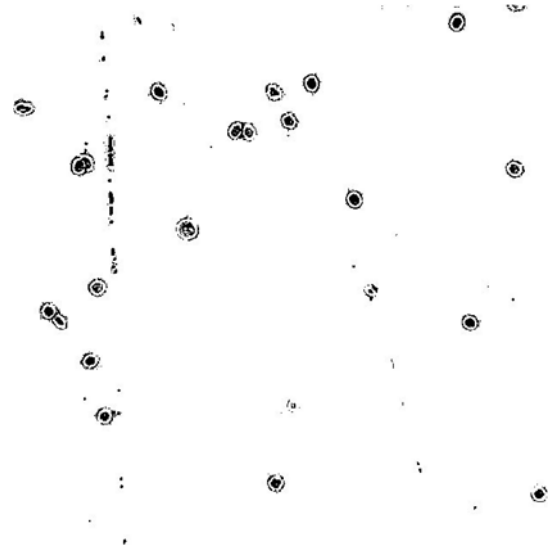
Uma diferença entre os softwares utilizados, é que no ImageJ a remoção do fundo é realizada antes da limiarização (Figura 26), o que por si só diminui os ruídos na imagem, enquanto no OpenCV, essa remoção é realizada após a limiarização (Figura 29), uma vez que o segundo processo tende a gerar ruídos após sua execução, mesmo que o fundo seja retirado aprioristicamente.

Figura 26 - Removendo ruídos (ImageJ).



Fonte: Autores.

Figura 27 - Limiarização (ImageJ).



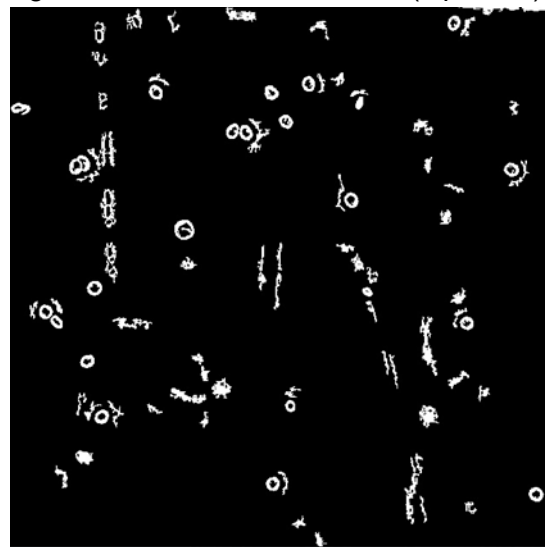
Fonte: Autores.

Figura 28 - Limiarização (OpenCV).



Fonte: Autores.

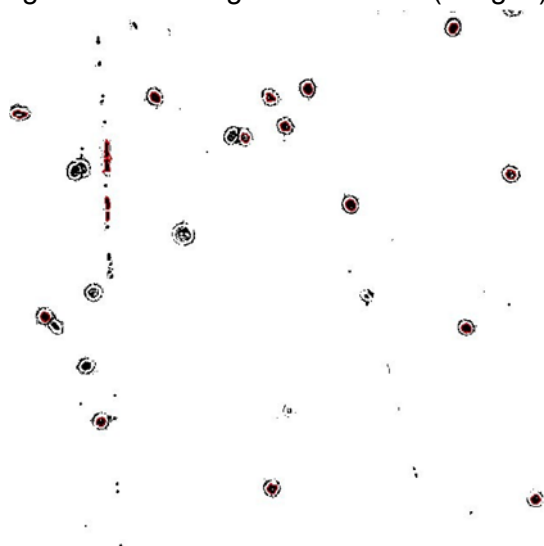
Figura 29 - Removendo ruídos (OpenCV).



Fonte: Autores.

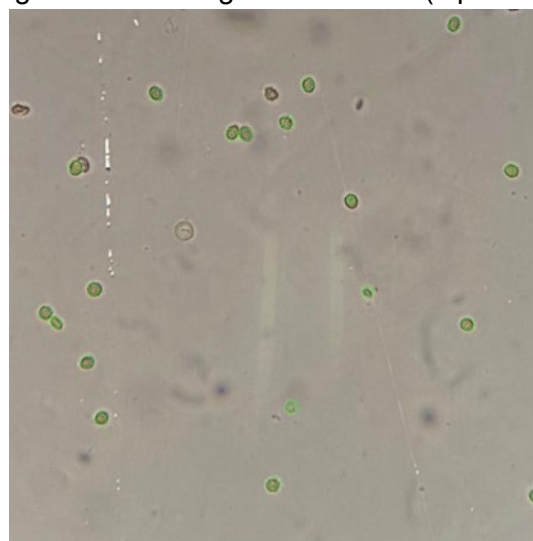
Com as imagens devidamente limiarizadas e tendo diminuído os ruídos, pode-se realizar, por fim, a contagem de células de acordo com o método fornecido por cada ferramenta, cuja exibição se encontra na Figura 30 e na Figura 31.

Figura 30 - Contagem de células (ImageJ).



Fonte: Autores.

Figura 31 - Contagem de células (OpenCV).



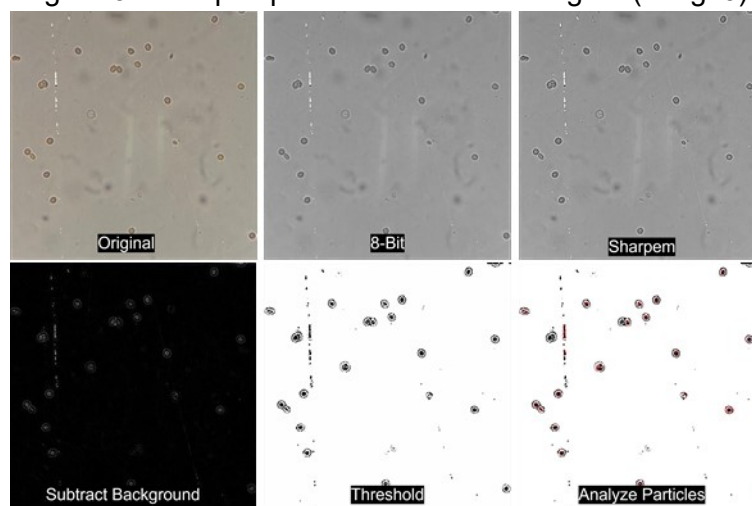
Fonte: Autores.

Note-se que os resultados se mostraram satisfatórios e coerentes, com baixa incidência de falsos positivos ou falsos negativos.

Para uma melhor visualização das modificações feitas, basta conferir a

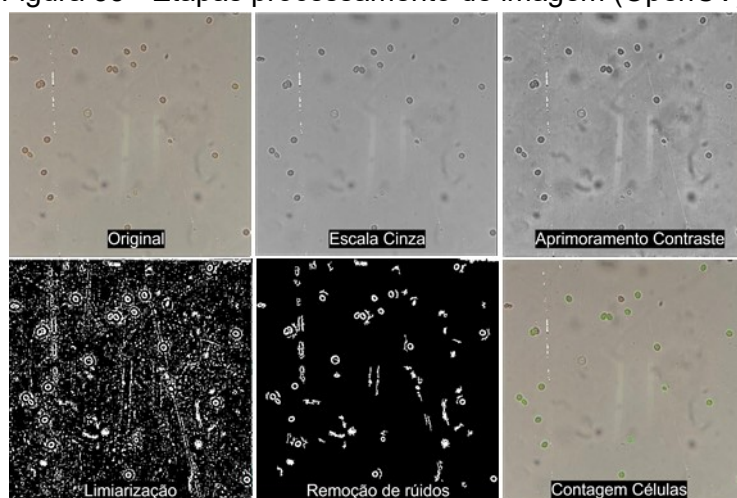
Figura 32 e a Figura 33, que compilam a sequência de imagens obtidas após cada processo para cada um dos *softwares* utilizados.

Figura 32 - Etapas processamento de imagem (ImageJ).



Fonte: Autores.

Figura 33 - Etapas processamento de imagem (OpenCV).



Fonte: Autores.

5.2. CÁLCULOS E COMPARAÇÕES

Para calcular o erro, adotou-se como premissa que a contagem manual era a “correta”. A partir dos valores de contagem manual (CM) e de contagem automatizada (CA), foi possível calcular o erro percentual (e%) pela seguinte fórmula:

$$e\% = |CM - CA| * 100/CM \quad (5.1)$$

Foram analisadas 50 imagens e foram calculadas tanto as precisões individuais quanto agrupadas, uma vez que foram selecionadas 10 fotos de cada amostra. Deste modo, puderam-se avaliar os erros tanto individualmente quanto inseridos em um contexto.

Foram estabelecidas faixas de precisão considerando os erros percentuais, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Limites das classes.

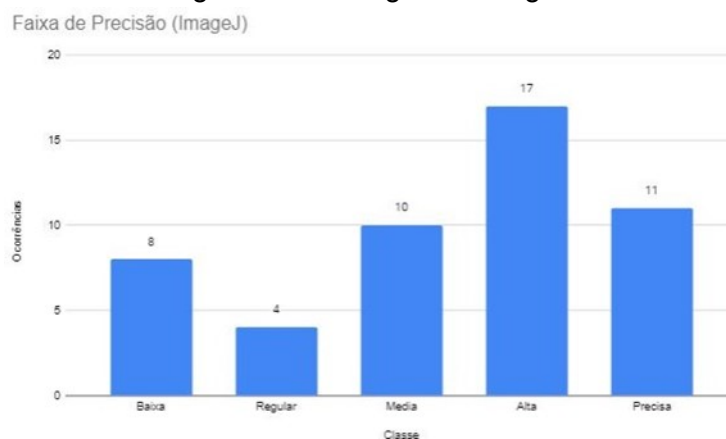
Fonte: Autores.

Classes	Limite Inferior	Limite Superior
Baixa	80%	100%
Regular	60%	80%
Média	40%	60%
Alta	20%	40%
Precisa	0%	20%

No que diz respeito aos erros individuais, obtiveram-se os resultados apresentados nos histogramas da Figura 34 e da Figura 35. O erro percentual médio

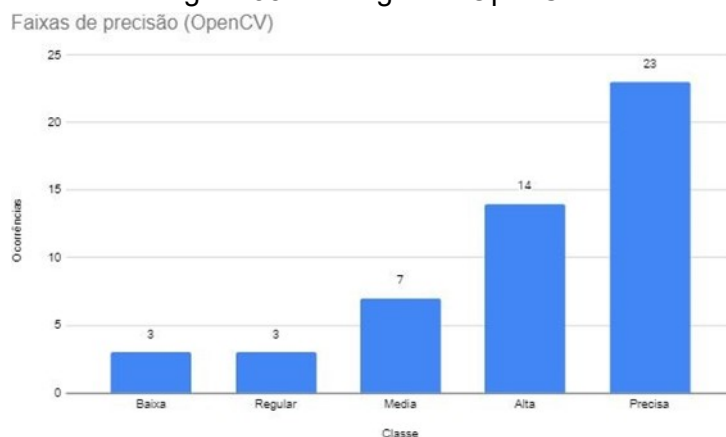
individual foi 61,98% no caso da solução com ImageJ e 26,53% no caso da solução com OpenCV.

Figura 34 - Histograma ImageJ.



Fonte: Autores.

Figura 35 - Histograma OpenCV.



Fonte: Autores.

Em relação à contagem agrupada, isto é, considerando a quantidade de células em toda amostra, obtiveram-se os resultados mostrados na Tabela 3 e na Tabela 4. Nota-se que ao analisar os dados em conjunto, o erro sofre uma grande redução, sendo o erro percentual médio do conjunto 23,07% no caso do ImageJ e 10,72% no caso do OpenCV. Este método exemplifica um caso real, em que a contagem é feita sobre todo conjunto, somando cada uma das partes ao invés de analisa-las individualmente.

Tabela 3 - Erro por amostra ImageJ.

Fonte: Autores.

Amostra	Erro
Amostra 01	19,31%
Amostra 02	2,76%
Amostra 03	22,45%
Amostra 04	56,52%
Amostra 05	14,29%

Tabela 4 - Erro por amostra OpenCV.

Fonte: Autores.

Amostra	Erro
Amostra 01	2,07%
Amostra 02	0,55%
Amostra 03	42,86%
Amostra 04	2,00%
Amostra 05	6,12%

Com estes resultados, percebe-se que a solução desenvolvida utilizando o *software* OpenCV apresentou resultados com menores erros em relação ao ImageJ. Isso ocorre porque com a primeira solução existe maior flexibilidade com relação ao balanceamento de cada etapa do processo, definindo com maior precisão os parâmetros desejados e garantindo uma maior adaptação ao caso de uso do sistema.

Por outro lado, nota-se que a Amostra 3 apresentou um comportamento bastante distinto, tendo sido um dos fatores de aumento considerável no erro da solução com o OpenCV, enquanto no caso do ImageJ esse impacto foi menor. Este comportamento indica que, por apresentar maior ajuste, o primeiro sistema fica mais sensível a oscilações. No caso da Amostra 3, as imagens estão menos nítidas, de modo que a identificação do contorno se faz mais complexa.

Um ponto que merece destaque é a impossibilidade de diferenciar leucócitos e hemácias com as ferramentas utilizadas. Para o nível de aumento aplicado, que foi o máximo possível para que a contagem de um dos setores fosse viável, essas células apresentam morfologia, tamanho e coloração muito semelhantes, de modo que a partir do levantamento dos diferentes atributos da imagem (raio, coloração e espessura da borda, por exemplo), não foi possível fazer uma distinção suficientemente satisfatória entre elas.

Como citado no Capítulo 3, alguns trabalhos que visavam exclusivamente identificação de componentes relatam dificuldades em distinguir leucócitos e

eritrócitos e, devido a isso, entende-se que havia a possibilidade de encontrar aqui o mesmo desafio. Possibilidades para contornar este empecilho são abordadas como próximos passos nessa linha de pesquisa.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi dada a oportunidade de utilizar diretamente o conhecimento adquirido no curso de graduação na área da saúde, que é uma das mais cruciais da sociedade.

O desenvolvimento de tecnologias que melhorem a eficiência de processos mostrou-se essencial, uma vez que diagnósticos equivocados ou a falta de agilidade pode ter muitas vezes um caráter crítico. Na uranálise em especial, ainda existem muitas oportunidades de melhoria, e com este projeto foi possível demonstrar que utilizando ferramentas disponíveis no mercado, é possível automatizar etapas do processo, economizando tempo, e garantindo uma maior produtividade aos laboratórios e uma maior agilidade em diagnósticos.

Obtiveram-se resultados palpáveis no que diz respeito à identificação celular utilizando visão computacional, tendo a melhor solução chegado a erros percentuais de aproximadamente 10%. Pode-se notar ainda que há espaço para evolução em diferentes etapas do processo demonstrado neste trabalho.

Em termos de montagem, o desenvolvimento de um dispositivo específico para o modelo de microscópio utilizado, poderia garantir um ajuste mais adequado, conferindo maior padronização às imagens e possibilitando que algoritmos mais ajustados fornecessem erros mais baixos.

No que diz respeito ao algoritmo, poderiam ser utilizadas metodologias que visem otimizar a configuração dos parâmetros de cada etapa do processo, de modo que a análise seja ainda mais precisa, diminuindo as taxas de falsos positivos e falsos negativos.

E por fim, a respeito da identificação das células, podem ser utilizados algoritmos de *Machine Learning*, visando treinar modelos capazes de identificar tipos diferentes de células. Por mais que tal abordagem exija uma quantidade de dados massiva, há evidências de que um trabalho dedicado a esse objetivo poderia se mostrar eficaz, completando a automação de ponta a ponta do processo que se buscou estudar neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BAÑOS-LAREDO, M. E.; NÚÑEZ-ÁLVAREZ, C. A.; CABIEDES, J. **Análisis de sedimento urinario**. Reumatología Clínica, v. 6, n. 5, p. 268–272. 2010. ISSN 1699-258X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1699258X10000987>>.
- FUNCHARL, C.; MASCARENHAS, M.; GUEDES, R. **Correlação clínica e técnicas de uroanálise - Teoria e prática**. [S.l.]: Editora Universitária Metodista IPA, 2008.
- MACHADO, P. R.; ARAÚJO, M. I. A.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. **Mecanismos de resposta imune às infecções**. Anais Brasileiros de Dermatologia, SciELO Brasil, v. 79, p. 647–662, 2004.
- MÉNDEZ, D. C.; QUEZADA, A. L.; LEHMAN, M. **Application of neural networks and fractals for urinalysis**. 2004.
- NAKASATO, J. M. E.; KUSSEN, G.; HAUSER, A. B. **Sistemas automatizados em urinálise: Aplicação na rotina laboratorial das novas tecnologias**. Universidade Federal do Paraná, v. 20, n. 2, p. 89–99, 2019.
- NEVES, P. D. M.; SESSO, R. C. C.; THOME, F. S.; NASCIMENTO, M. M. **Censo brasileiro de diálise: análise de dados da década 2009-2018**. 2019.
- PERES, B. F. **Hematúria: tipos, análise, valor diagnóstico**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- RA, M.; MUHAMMAD, M. S.; LIM, C.; HAN, S.; JUNG, C.; KIM, W.-Y. **Smartphone-based point-of-care urinalysis under variable illumination**. IEEE journal of translational engineering in health and medicine, IEEE, v. 6, p. 1–11, 2017.
- RASBAND, W. **Introduction ImageJ**. 2018. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/docs/intro.html>>.
- ROCHE DIAGNOSTICS INTERNATIONAL LTD. **Especificação técnica: Cobas® 6500 urine analyzer series**. Switzerland, 2013.
- SONG, X.; SILL, J.; ABU-MOSTAFA, Y.; KASDAN, H. **Image recognition in context: application to microscopic urinalysis**. MIT Press, 2000.
- SOUZA, Y. **Processamento de imagem aplicado à detecção e contagem celular**. Universidade Federal de Santa Catarina, n. 1, p. 1–42, 2020.
- TEAM, O. **OpenCV About**. 2021. Disponível em: <<https://opencv.org/about/>>.