

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

**MARCOS VINICIUS BANDEIRA**

**LOCALIZAÇÃO DE IMAGENS AO MICROSCÓPIO  
UTILIZANDO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGEM**

Porto Alegre

2005

**MARCOS VINICIUS BANDEIRA**

**LOCALIZAÇÃO DE IMAGENS AO MICROSCÓPIO  
UTILIZANDO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGEM**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica (PPGEE), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Automação e Instrumentação Eletro-Eletrônica

ORIENTADOR: Altamiro Amadeu Susin

CO-ORIENTADORA: Leticia Vieira Guimarães

Porto Alegre

2005

MARCOS VINICIUS BANDEIRA

## **LOCALIZAÇÃO DE IMAGENS AO MICROSCÓPIO UTILIZANDO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGEM**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Altamiro Amadeu Susin, UFRGS

Doutor pelo INPG - Grenoble, França

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Bampi, UFRGS

Doutor pela Stanford University – Stanford, EUA

Prof. Dr. Luigi Carro, UFRGS

Doutor pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Brasil

Prof. Dr. Marcelo Soares Lubaszewski, UFRGS

Doutor pelo INPG - Grenoble, FRANÇA.

Prof. Dr. Adalberto Schuck Junior, UFRGS

Doutor pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Brasil

Coordenador do PPGEE: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira

Porto Alegre, 18 de Agosto de 2005.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha esposa e filho, em especial pela dedicação e apoio em todos os momentos difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, PPGEE, pela oportunidade de realização de trabalhos em minha área de pesquisa.

Ao Professor Altamiro Amadeu Susin pela, orientação, paciência, dedicação e apoio.

À Professora Leticia Vieira Guimarães pela, co-orientação, paciência, dedicação e apoio.

Aos colegas do LaPSI e PPGEE pelo seu auxílio nas tarefas desenvolvidas durante o curso e apoio na revisão deste trabalho.

À CAPES pela provisão de nove meses de bolsa de mestrado.

## RESUMO

O exame de sangue é um dos procedimentos de análises clínicas mais utilizados pelo largo espectro de anomalias que consegue detectar. A contagem de células de sangue, objeto deste trabalho, é um destes exames. A contagem manual é feita por um operador que examina ao microscópio, com ampliação adequada, uma amostra eventualmente tratada ou colorida. Ainda hoje há casos em que contagem manual é necessária mas é cada vez mais freqüente a utilização da contagem automática, feita através de citômetro de fluxo. Esta dissertação aborda um sistema de contagem de células do sangue por processamento digital de imagens e pode ser automático ou semi-automático. O projeto é fruto de uma parceria entre o LaPSI-DELET e o HCPA. Deste projeto surgiu o SAIMO (Sistema de Aquisição de Imagens para uso em Microscopia Óptica). No estágio atual o SAIMO possui algumas limitações no controle de posicionamento e no campo de visão limitado. O controle de posicionamento atual fica a cargo do operador: não há informação sobre as imagens já adquiridas, podendo ocorrer sobreposição. Devido à limitação do campo de visão, várias aquisições devem ser feitas para se obter o número mínimo de células recomendado. Além disso, há um possível aumento de erro de contagem associado às imagens parciais de célula presentes nas bordas das imagens. Este trabalho tem como proposta solucionar o problema de controle de posicionamento das aquisições, com a localização da cena durante a captura da imagem. Além disso, é proposta uma técnica de composição de mosaico com as imagens adquiridas, reduzindo os problemas causados pelo campo de visão limitado. Também são propostos métodos de pré-processamento apropriados às imagens adquiridas, que proporcionam a redução do tempo das tarefas subseqüentes. O método de validação das localizações verifica se as coordenadas encontradas por este processo são consistentes. Os resultados obtidos mostraram que o método é rápido na localização e eficiente na composição do mosaico, podendo ser utilizado como parte de um sistema de contagem de células por processamento digital de imagens.

**Palavras-chaves:** processamento digital de imagens, aquisição de imagens por microscópio, detecção de similaridade, mosaico de imagens, soma das diferenças absolutas e controle de posicionamento.

## **ABSTRACT**

Blood tests are among the most frequently clinical procedures performed for health monitoring. Blood tests diagnose a wide range of disease stages and the functioning of inner organs. The counting of blood cells, object of this work, is one of these tests. The manual counting is made by an operator who examines the blood smears on a slide at the microscope, with appropriate magnification. The blood smears can be eventually stained or treated. Manual counting continues to be used nowadays and sometimes it may be necessary. The use of automatic counting is diffusing rapidly and is generally made by flow cytometer. This dissertation presents an image acquisition scheme for a blood cells counting system based on digital image processing. The system can be automatic or semi-automatic. The project is a partnership between the LaPSI-DELET laboratory and the HCPA hospital and, as one result the SAIMO (image acquisition system for use in optical microscopy) was created. The SAIMO system has some limitations in the positioning control and in the field view. The operator is in charge to select the sampling regions to count and undue overlapping can occur. Due to the limited field of view, many acquisitions must be made to get the recommended minimum number of cells. Moreover, there is a possible increase in counting error associated to the partial cell images at the picture borders. This work proposes a solution to these problems of image acquisition: positioning control with the scene registration during the image capture, a mosaicing technique to surpass the limited field of view, and, appropriated pre-processing methods. The aim of the pre-processing is to reduce the time necessary to the positioning control process. The validation of the localization method verifies if the coordinates, found by this process, are consistent. The results had shown that the method is fast and efficient for localization and mosaic composition. The method is intended as a front-end of a blood cells counting system by digital image processing.

**Keywords:** digital image processing, microscope images acquisition, sequential similarity detection algorithm, image mosaicing, sum of the absolute difference, positioning control.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>MÉTODOS DE CONTAGEM DE RETICULÓCITOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>IMAGENS MÉDICAS E MOSAICO DE IMAGENS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>REGISTRO DE IMAGENS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>LOCALIZAÇÃO COM SUB-AMOSTRAGEM DE IMAGEM .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>LOCALIZAÇÃO DE IMAGENS E COMPOSIÇÃO DO MOSAICO .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>AQUISIÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>PRÉ-PROCESSAMENTO .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Transformação: RGB para escala de cinza.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Extração do fundo .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Redução das imagens .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Estiramento do histograma .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Binarização.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3</b>	<b>LOCALIZAÇÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Sub-amostragem .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Soma das diferenças absolutas .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Validação .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>AJUSTE FINO .....</b>	<b>47</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Preparação .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Registro.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>BANCO DE IMAGENS .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE PONTOS ÓTIMO PARA A SUB-AMOSTRAGEM .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>LOCALIZAÇÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>VALIDAÇÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5</b>	<b>AJUSTE FINO .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama de blocos das etapas gerais do método proposto.....	28
Figura 2 – Instalação do SAIMO para a aquisição. Sensor acoplado ao ocular do microscópio e conectado ao microcomputador PC através de interface USB. ....	29
Figura 3 – Imagem adquirida com aumento de 5 vezes. ....	30
Figura 4 – Imagem adquirida com aumento de 40 vezes. ....	31
Figura 5 – (a) Fluxograma do pré-processamento do mapa de localização e (b) fluxograma do pré-processamento do mapa de localização.....	32
Figura 6 – Imagem original (a) e componente H da imagem original (b).....	33
Figura 7 – Histograma do componente H (Figura 6 (b)) da imagem da Figura 6 (a).....	33
Figura 8 – Esquema do espaço de cores HSI.....	34
Figura 9 – Conversão de RGB para escala de cinza.....	34
Figura 10 – Imagem após a subtração do fundo.....	36
Figura 11 – Fundo adquirido sem a presença da lâmina, já em escala de cinza.....	36
Figura 12 – Fundo gerado a partir de aquisições, já em escala de cinza.....	37
Figura 13 – Estiramento do histograma.....	38
Figura 14 – (a) Imagem reduzida com fator de escala 8, (b) submetida ao estiramento do histograma e (c) binarizada.....	38
Figura 15 – Escolha do limiar.....	39
Figura 16 – Diagrama de blocos da etapa de localização.....	40
Figura 17 – Gradiente da imagem binarizada.....	42
Figura 18 – Região 3x3 utilizada para fazer as máscaras Sobel.....	42
Figura 19 – Mapa de similaridade.....	44
Figura 20 – Exemplo de uma localização correta.....	45
Figura 21 – Exemplo de uma localização errada.....	45
Figura 22 – (a) Diagrama de setas, (b, c) condições de mínima para a vizinhança.....	47
Figura 23 – Mapa de enchente de um mapa de similaridade.....	47
Figura 24 – Diagrama de blocos do ajuste fino.....	48
Figura 25 – Curva média da família de vinte curvas.....	52
Figura 26 – Família de curvas geradas variando de 10 em 10 amostras até 1000.....	52
Figura 27 – Valores médios de erro e desvio padrão correspondente.....	53
Figura 28 – Tempo em segundos para a detecção da similaridade e término do processo todo.....	55
Figura 29 – Localização de cada uma das vinte imagens de teste.....	56
Figura 30 – Posição dos dez pontos de maior similaridade, utilizados na Tabela 3.....	57
Figura 31 – Representação de uma distribuição de oitenta pontos brancos da imagem zero do banco de imagens. Em (a) tamanho proporcional ao mapa da Figura 29 e ampliado em (b).....	57
Figura 32 – Mapa de mínimas do mapa de similaridade apresentado na Figura 30.....	58
Figura 33 – Curva de pontos de mínima de uma localização correta e validada.....	59
Figura 34 – Curva de pontos de mínima de uma localização correta e invalidada.....	59

Figura 35 – Curva de uma localização errada e invalidada. ....	60
Figura 36 – Imagens 14 (a) e 18 (b) em escala de cinza, mosaico das imagens 14 e 18 sem o ajuste fino (c), retirada de amostra das imagens 14 (d) e 18 (e), amostras pré-processadas (f) e (g), ajuste fino feito e aplicado sobre as amostras (h) e mosaico das imagens 14 e 18 com a aplicação do ajuste fino (i).....	62
Figura 37 – Mosaico de imagens sem a aplicação do ajuste fino. Imagem 13 à direita, imagens 18 e 19 à esquerda inferior e superior, respectivamente e imagem 14 ao centro. ...	63
Figura 38 – Mosaico de imagens com a aplicação do ajuste fino. Imagem 13 à direita, imagens 18 e 19 à esquerda inferior e superior, respectivamente e imagem 14 ao centro. ....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Erro e desvio padrão associado ao número de amostras utilizado. ....	54
Tabela 2: Tempos médios em segundos da detecção de similaridade e de todo o processo. ....	55
Tabela 3: Valores em ordem decrescente e coordenadas dos dez pontos de maior similaridade. .....	58
Tabela 4: Valores em ordem decrescente e coordenadas dos dez pontos de maior similaridade. .....	60
Tabela 5: Coordenadas originais e fatores de ajuste obtidos por detecção de similaridade. ....	65
Tabela 6: Coordenadas originais e fatores de ajuste obtidos por correlação de fase. ....	65

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ANSI: American National Standards Institute

bmp: bitmap

LaPSI: Laboratório de Processamento de Sinais e Imagens

CT: Computed Tomography

CV: Coeficiente de Variação

DC: direct current

DELET: Departamento de Engenharia Elétrica

FFT: Fast Fourier Transform

GB: Gigabyte

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSI: Hue Saturation Intensity

IFFT: Inverse Fast Fourier Transform

lil: LaPSI Image Processing Library

MHz: Megahertz

MRI: Magnetic Resonance Imaging

PC: Personal Computer

PET: Positron Emission Tomography

RAM: Random Access Memory

RGB: Red Green Blue

RNA: Ácido Ribonucléico

SAD: Sum of the Absolute Difference

SAIMO: Sistema de Aquisição de Imagens para uso em Microscopia Óptica

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

SSDA: Sequential Similarity Detection Algorithm

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

US: Ultrasound

## 1 INTRODUÇÃO

O processamento digital de imagens tem sido amplamente usado nas mais variadas áreas de conhecimento. Na área médica, o processamento digital de imagens é encontrado em diversas aplicações, como a construção de imagens a partir de raios-x, ultra-som, ondas eletromagnéticas e correntes elétricas, realce de imagens, localização de padrões, extração automática de informações, etc. Pesquisas envolvendo processamento digital de imagens tem possibilitado o surgimento de novos equipamentos, novas tecnologias e novas soluções nesta área.

Neste contexto, iniciou-se no Laboratório de Processamento de Sinais e Imagens (LaPSI) do Departamento de Engenharia Elétrica (DELET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em cooperação com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), um projeto de contagem automática de células de sangue, utilizando processamento digital de imagens. Este projeto denominado “Reticulócitos” (PROJETO RETICULÓCITOS, 2005), (KOYA, 2001), (GUIMARÃES, 2002), teve início em março de 1997. O projeto Reticulócitos tem por objetivo equipar o Departamento de Hematologia do hospital com o material necessário para a aquisição e processamento das imagens, assim como prover os programas de computador necessários à tarefa de automação do reconhecimento e contagem de reticulócitos.

A motivação para o projeto Reticulócitos surgiu da necessidade de uma alternativa confiável para a contagem de reticulócitos, que são células vermelhas do sangue (hemácias) ainda imaturas. As técnicas reconhecidas e utilizadas para a contagem de reticulócitos são: contagem manual e contagem automática por citômetro de fluxo (ARKIN, 2004). O citômetro de fluxo é um aparelho que se baseia em feixes de luz e sensores luminosos, e proporciona uma análise rápida de múltiplas características de células isoladas. Apesar de sua

crecente utilização em laboratórios clínicos, o citômetro de fluxo ainda não é considerado totalmente confiável para a detecção e contagem de reticulócitos. Problemas como falsa detecção de reticulócitos, causada pelo reconhecimento de células contaminadas por parasitas, e por não existir um outro método que possa aferi-lo, fazem com que este equipamento não seja reconhecido para este tipo de exame por grande parte da comunidade científica desta área da ciência. A aferição por contagem manual se torna difícil porque a contagem considerada normal de reticulócitos é em torno de 1/100 ou 1%. Esta proporção de reticulócitos sobre o número de eritrócitos existentes em uma amostra faz com que somente uma contagem acima de 10.000 células (dez mil) pudesse ser considerada estatisticamente confiável. Mesmo assim, quando o citômetro de fluxo apresenta uma contagem de reticulócitos acima de 1%, uma contagem manual é recomendada (ARKIN, 2004). A contagem manual, por sua vez, é muito laboriosa, pois para um exame de reticulócitos por contagem manual ser considerado válido, é necessário contar no mínimo 1000 (mil) células. O ideal seria a contagem manual de 10.000 células (dez mil), porém o que se consegue, na prática, é apenas a contagem mínima aceitável. Além disso, entidades internacionais que regulamentam este tipo de exame recomendam que cada técnico faça no máximo três exames por dia, devido ao erro que aumenta à medida que os olhos vão se cansando.

A proposta de contagem de reticulócitos através do processamento de imagem, é uma alternativa de custo mais baixo que o citômetro de fluxo, por utilizar equipamentos existentes em um ambiente de laboratório, como computadores e microscópios, e por combinar características da contagem automática e características da contagem manual, permitindo obter resultados situados entre os obtidos na contagem manual e os obtidos na contagem por citômetro de fluxo (KESSELER, 2005).

O Sistema de Aquisição de Imagens para uso em Microscopia Óptica (SAIMO), foi desenvolvido durante a pesquisa no projeto Reticulócitos. O SAIMO é composto de um *hardware*, uma webcam adaptada para ser acoplada a um dos oculares do microscópio, e um *software* adquire e orienta a aquisição das imagens. No estágio em que se encontra, o sistema possui algumas limitações, como a falta de controle de posicionamento, não permitindo saber se houve, ou não, sobreposição nas imagens adquiridas, podendo ocorrer resultados indesejados em ambos os casos. Como por exemplo, quando se quer compor um mosaico de imagens, onde a sobreposição de imagens é necessária, e o contrário, quando se quer apenas uma contagem de células distintas, onde a sobreposição de imagens resultaria em redundância de contagem. Outra limitação surge do número de imagens utilizadas para executar a contagem. Devido ao campo de visão do microscópio ser limitado, não é possível obter em apenas uma aquisição um número mínimo de células distinguíveis para um exame de contagem de reticulócitos. Por este motivo, são necessárias várias aquisições com uma ampliação adequada, para se obter o número mínimo de células para a contagem, o que acarreta em um grande número de imagens parciais de célula, presentes nas bordas das imagens, aumentando o erro de contagem.

Outro problema a ser superado, é a eliminação, e ou, redução de características indesejadas nas imagens adquiridas como: o baixo contraste, a distribuição não uniforme da luminosidade, e a presença de ruído.

Este trabalho tem por objetivo superar as limitações acima expostas utilizando técnicas de processamento digital de imagem. Para o problema de localização, se propõe o desenvolvimento de um método de controle de localização de imagens adquiridas ao microscópio, que seja rápido o suficiente para uma aplicação de tempo real, utilizando para isso, um algoritmo seqüencial de detecção de similaridade (SSDA) associado à aplicação de



técnica de sub-amostragem de imagem. Para o problema de redundância e redução do número de imagens parciais de célula, presentes nas bordas das imagens, se propõe a composição de um mosaico com as imagens adquiridas. E, para reduzir, e ou, eliminar os problemas de baixo contraste, distribuição não uniforme de luminosidade e presença de ruído nas imagens adquiridas, se propõe o pré-processamento das imagens antes passá-las às demais etapas do processo.

No capítulo dois deste trabalho é apresentada uma revisão bibliográfica, onde são apresentadas algumas referências para localizar este trabalho no contexto: de um trabalho de engenharia biomédica; das técnicas de processamento de imagem aplicadas ao registro de imagens médicas; do uso de sub-amostragem para otimizar o processo de localização de imagens ao microscópio.

No capítulo três é apresentado o método proposto, iniciando com uma visão geral do método e após, abordando cada etapa em maiores detalhes.

No capítulo quatro, são apresentados os resultados e no quinto capítulo são apresentadas a conclusão deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo são apresentadas algumas referências que visam contextualizar este trabalho nas três seguintes áreas: contagem automática de células, projeto Reticulócitos; técnicas de processamento digital de imagem aplicada ao registro de imagens médicas e; sub-amostragem para otimização do processo de localização de imagens ao microscópio.

### 2.1 MÉTODOS DE CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

Reticulócitos são células vermelhas de sangue (hemácias) imaturas, que saíram recentemente da medula óssea. Os reticulócitos se distinguem das células maduras de sangue (eritrócitos), por possuírem resquícios de RNA em seu núcleo. Clinicamente, a contagem de reticulócitos é usada para avaliar a atividade eritropoiética da medula óssea. A contagem de reticulócitos é essencial: para o diagnóstico e classificação de anemias; para monitorar o tratamento de pacientes anêmicos; no acompanhamento da regeneração da medula óssea após quimioterapia intensiva; em transplante de medula óssea; e no acompanhamento da restauração hematopoiética após, ou durante, o tratamento com eritropoietina (PRELOŽNIK-ZUPAN, 2000).

A contagem de reticulócitos, usando método manual e visual, é uma das últimas medidas comuns de hematologia que ainda é feita desta maneira (ARKIN, 2004). Na maioria dos laboratórios, o reconhecimento e a contagem de reticulócitos ainda é feita através do método tradicional com o uso de microscópio. Apesar de ser um método barato e relativamente simples de fazer, o método possui certas limitações. A técnica demanda tempo e é sujeita a erros estatísticos. Segundo a literatura o coeficiente de variação (CV) varia entre

25% a 48%. As principais fontes de erro são o pequeno número de células contadas, a distribuição variável de reticulócitos no esfregaço de sangue na lâmina, e a significativa variação entre os técnicos que fazem a observação, quanto à identificação morfológica e a enumeração dos reticulócitos (LAMCHIAGDHASE, 2000), (PRELOŽNIK-ZUPAN, 2000).

A citometria de fluxo tem sido usada amplamente em laboratórios clínicos na última década. A citometria de fluxo proporciona uma análise rápida, de características múltiplas de células isoladas, através da medida das características ópticas e de fluorescência, das mesmas. A fluorescência da célula ocorre devido ao uso de corante fluorescente no preparo da solução para a análise no citômetro de fluxo (BROWN, 2000). Na contagem de reticulócitos, os métodos de citometria de fluxo, desenvolvidos: reduziram significativamente o tempo gasto para um especialista realizar esta medida e mostraram ser mais preciso que os métodos de contagem manual e visual (ARKIN, 2004). Porém, as possíveis desvantagens deste método na contagem de reticulócitos são: o alto custo, preparação demorada, e a necessidade de operadores altamente qualificados (KESSELER, 2005).

A proposta de contagem de reticulócitos por análise de imagem, por sua vez, é de baixo custo e combina a automação com a interação subjetiva de um operador, obtendo uma precisão de resultados localizada entre os resultados da contagem manual e os resultados da contagem por métodos de citometria de fluxo (KESSELER, 2005). Esta combinação proporciona: o aumento no número de exames realizados, por reduzir a intervenção do técnico de laboratório na contagem; a diminuição do erro de contagem, por aumentar o número de células contadas; e, o armazenamento da amostra no formato digital para posterior consulta, pois a lâmina com a amostra de sangue se deteriora com o tempo.

## 2.2 IMAGENS MÉDICAS E MOSAICO DE IMAGENS

Imagens médicas são de vital importância para um vasto número de aplicações, tais como o monitoramento clínico de eventos, não somente em diagnósticos, mas também na área de planejamento, realização e avaliação de procedimentos cirúrgicos e radioterapêuticos. Segundo (MAINTZ, 1998), as modalidades de aplicação das imagens médicas são divididas em duas grandes categorias: anatômicas e funcionais. As imagens anatômicas descrevem primeiramente morfologia, inclui o raio-x, a tomografia computadorizada (CT), a ressonância magnética (MRI) e o ultra-som (US) dentre outras. As imagens funcionais descrevem primeiramente metabolismo, inclui a tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia por emissão de pósitron (PET), dentre outras. Também em (MAINTZ, 1998), é apresentado um levantamento de técnicas de registro, aplicadas a imagens médicas, classificando-as em nove critérios básicos: dimensionalidade, natureza da base de registro, natureza da transformação, domínio da transformação, interação, procedimento de otimização, modalidades envolvidas, assunto e objeto.

No trabalho desenvolvido por (KOYA, 2001), é apresentado um sistema de contagem automática de células sanguíneas, baseado em imagens adquiridas por microscópio, como uma alternativa à contagem manual, que é muito laboriosa e o erro estatístico é muito alto, como no caso de uma contagem de reticulócitos de um indivíduo normal, que tem um erro estatístico de aproximadamente 30%. Em (GUIMARÃES, 2002), são apresentadas técnicas de segmentação e decomposição aplicadas à imagens de células de sangue, para o reconhecimento confiável dessas imagens.

Dependendo da aplicação, a pequena abrangência da área visível disponibilizada pelo microscópio pode ser um problema. O trabalho apresentado por (HOGE, 2003) mostra um caso onde ocorre este problema. No referido trabalho o autor apresenta um método, quase

totalmente automático, para a união de imagens de alta resolução, obtidas de lâminas histológicas, para a composição de uma imagem única da amostra do tecido. O método consiste no uso de técnicas de correlação de fase com resolução de sub-pixel para a construção do mosaico de imagens. Os resultados são monitorados através do uso de múltiplos algoritmos de registro de imagem para a identificação de erros durante o registro das imagens. As imagens foram adquiridas a partir de uma câmera digital acoplada a um microscópio, com uma magnificação de 10x, e uso de um micrômetro para controlar o posicionamento da lâmina e garantir alguma sobreposição entre as imagens.

Em (BOSSERT, 2004), o autor apresenta um software em java, para a criação de mosaico de imagens a partir de imagens adquiridas com microscópio. A implementação proposta consiste no uso de dois métodos operando em paralelo, a correlação de fase e a correlação cruzada. A validação do resultado é feita de três maneiras: primeiro, comparando-se a saída da correlação de fase de cada um dos canais de cor da imagem (RGB) onde, se houver falha em um dos canais o resultado é rejeitado; segundo, através da monitoração da diferença média das cores, na correlação cruzada onde, se o valor for muito alto indica um possível erro; e, por último são comparados os resultados dos dois métodos, sendo considerado válido apenas se ambos derem o mesmo resultado. Os testes foram feitos com 50 pares de imagem adquiridas por microscópio.

### **2.3 REGISTRO DE IMAGENS**

Composição de mosaico de imagens “*image mosaicing*”, consiste na agregação de múltiplas imagens, parcialmente sobrepostas, de uma mesma cena em uma única imagem maior. Sua aplicação abrange várias áreas de pesquisa, tais como a união de imagens aéreas,

imagens do fundo do mar, recomposição de documentos digitalizados (PILU, 2002), detecção de movimentos (HSIEH, 2004), etc.

Em (GLEDHILL, 2003), é apresentada uma revisão sobre imagens panorâmicas, abordando as técnicas de registro de imagem correspondentes.

O principal problema na composição de mosaico de imagens é a obtenção do registro das imagens (BAO, 1998), que é o processo de obtenção dos pontos de equivalência entre as imagens de uma mesma cena.

Devido à variedade de condições em que as imagens podem ser obtidas, como por exemplo, tempos diferentes, diferentes pontos de vista, e ou, por diferentes sensores, as imagens podem ter diversos tipos de distorção, acarretando, conseqüentemente, um maior ou menor grau de complexidade nas transformações a que as imagens estarão sujeitas no alinhamento geométrico entre duas imagens (ZITOVÁ, 2003).

Ainda, em (ZITOVÁ, 2003) é apresentada uma visão geral das técnicas de registro de imagem, classificadas de acordo com a natureza da técnica (baseada em área ou baseada em características) e de acordo com quatro etapas básicas do procedimento de registro de imagem: detecção de característica, casamento de características, desenvolvimento das funções de mapeamento e transformação da imagem e re-amostragem.

A característica fundamental de qualquer técnica de registro de imagem é o tipo de transformação espacial ou mapeamento que será usado para sobrepor as duas imagens. As transformações mais comuns são a rígida, a paralelograma, a projetiva e a curva, ou polinomial. Quanto ao domínio, essas transformações podem ser globais ou locais (BROWN, 1992). Em (BROWN, 1992), também é apresentada uma visão geral das técnicas de registro

de imagem, expondo a teoria, os métodos e as características dos métodos de registro de imagem.

Em (COX, 1992) é apresentada uma visão geral de técnicas de localização de padrão de pontos e introduz uma abordagem geral sobre o problema de reconhecimento de padrão de pontos.

Em (SHEKARFOROUSH, 1996) os autores propõem um método para registro de imagens com exatidão em nível de subpixel, através da estimativa da decomposição polifásica do espectro de potência cruzado.

Em (KHOSRAVI, 1996) os autores apresentam uma classe de critérios rank-order-based para detecção de similaridade, sem multiplicador e independente das variações de nível DC da imagem.

Em (REDDY, 1996) os autores apresentam uma técnica baseada em FFT para registro de imagens transladadas, rotacionadas ou com variações de escala.

Em (MOUNT, 1998) os autores apresentam dois algoritmos para detecção de similaridade através de pontos característicos usando a distância parcial de Hausdorff.

Em (MUSTAFA, 1998) o autor apresenta uma ampliação de um método de registro de imagens, baseado em uma nova métrica para a detecção de similaridade entre um modelo e uma imagem, proposto anteriormente. Para tanto, o autor introduz o uso do Número de Variação de Intensidade, que é uma medida de informação da imagem altamente relacionada à entropia, e aplica a técnica à otimização de seleção de modelo para o método de registro de imagens.

Em (FONSECA, 1999) são apresentados dois métodos de seleção de pontos de controle para aplicação em registro de imagens. Em (MEIJERING, 1999) é apresentada uma técnica rápida de registro de imagens onde os pontos de controle são selecionados a partir de máximas locais da magnitude do gradiente da imagem.

Em (KANATANI, 1999) é apresentado um algoritmo teórico para computar a homografia entre duas imagens, onde primeiramente é calculado um limiar de exatidão teórico, baseado em um modelo matemático do ruído da imagem. Após, é feita uma simulação para confirmar que a técnica de renormalização, proposta, efetivamente alcança o limiar de exatidão. Por fim, a técnica para a composição de mosaico proposta é aplicada sobre pequenas sobreposições de imagem. Homografia é um mapeamento entre duas imagens em perspectiva de uma superfície planar em uma cena. Em (KANATANI, 2000) é apresentado um algoritmo teórico para computação de homografia entre duas imagens com uma medida de confiança.

Em (KOUROGI, 1999) é apresentado um método de registro de imagens de tempo real a partir de seqüências de vídeo, onde, para a estimativa dos parâmetros de alinhamento para o registro de imagem o método calcula vetores de pseudomovimento. Para esse cálculo, são selecionados pixels de acordo com o gradiente do brilho da imagem e o número de pixels é controlado para garantir o processamento em tempo real.

Em (MCGUIRE, 2000) os autores descrevem e comparam técnicas de registro de imagem para situações onde uma ou ambas imagens candidatas ao registro estão parcialmente oclusas.

Em (STONE, 2001) é apresentado um algoritmo para realizar registro de imagens, onde as diferenças entre as imagens estão restritas a translações e variações uniformes de iluminação, com exatidão ao nível de subpixel, baseado na transformada de Fourier.



Em (FEDOROV, 2002) é apresentado um sistema para registro e construção de mosaico, automático e semi-automático, para imagens de sensoriamento remoto, onde o registro de imagens pode ser feito a partir de pequenas porções da imagem ao invés de procurar pontos de controle em toda a imagem.

Em (FOROOSH, 2002) é apresentada uma extensão da correlação de fase para o registro de imagens ao nível de subpixel, através da dedução analítica de expressões para a correlação de fase de imagens sub-amostradas.

Em (TIAN, 2003) é apresentado um método automático de criação de mosaico de imagens, baseado em pontos de interesse. O método é composto de quatro etapas: identificação de pontos de interesse, localização da correspondência entre os pontos, criação das matrizes de transformação e montagem do mosaico com suavização da imagem nos pontos de encaixe.

Em (KIN, 2003) é apresentado um algoritmo para registro automático de imagens de satélite, composto de duas etapas. Primeiro a geração automática de pontos de controle por similaridade baseado em correlação cruzada normalizada e segundo, estimação robusta das funções de mapeamento a partir dos pontos de controle.

Em (HOGUE, 2003) o autor apresenta uma extensão para o método de correlação de fase usando a identificação do subespaço da correlação de fase, permitindo identificar deslocamento não inteiro de pixel sem interpolação.

Em (MACHADO, 2004) é apresentado um método de auxílio à construção de mosaico de imagens em plataformas robóticas utilizando informações sensoriais para contornar problemas de disparidade entre as imagens na composição de um mosaico.

Em (KANAZANA, 2004) é apresentado um método automático de união de pontos equivalentes entre duas imagens para composição de mosaico. O método inicia com a detecção de pontos característicos e após, faz a estimação progressiva da rotação, mudança de escala e distorção projetiva entre as duas imagens através de sorteio aleatório e teste de similaridade com um modelo variável.

Em (LOPES, 2004) é apresentado um método semi-automático de alinhamento de imagens baseado em *three-step search*, *template matching* e coeficiente de correlação, para uso em ecografia por contraste de microbolhas.

Em vista das técnicas de registro de imagens apresentadas e devido ao tipo de deslocamento encontrado entre as imagens deste trabalho (apenas translação), optou-se por usar como técnica de registro de imagem a correlação de fase, feita através transformada rápida de Fourier (FFT), e a detecção de similaridade, feita através da soma das diferenças absolutas (SAD), apresentadas por (BROWN, 1992), por se adaptarem melhor às necessidades deste trabalho.

## **2.4 LOCALIZAÇÃO COM SUB-AMOSTRAGEM DE IMAGEM**

No trabalho apresentado por (SCHILS, 1992), o autor apresenta um método estatístico para obter uma aproximação da correlação, aplicado à localização de padrões em imagens binárias. O método consiste no uso da amostragem de Bernoulli para gerar um modelo binário, ou máscara de correlação, que dependendo do projeto, permite se obter vários níveis de aproximação. O procedimento de amostragem mostrou produzir uma estimativa não tendenciosa do sinal de correlação, com uma complexidade computacional de implementação da ordem de  $N^2$ , onde  $N$  é a dimensão linear da imagem.

Em (HADJIDEMETRIOU, 1998) são apresentados critérios para a seleção de subconjuntos de pixels através de uma análise sensitiva do subespaço e são propostos dois algoritmos de reconhecimento de aparência baseados nesses critérios.

Em (NAIR, 1999), os autores mostram uma nova e promissora área de pesquisa no campo do processamento de imagens, o uso de seqüências de baixa discrepância, ou seja, seqüências quase-aleatórias para caracterização de imagens, compreensão e reconhecimento de objetos. Para ilustrar é apresentada a aplicação da teoria de seqüências de baixa discrepância em experimentos como a estimativa das estatísticas de tons de cinza de uma imagem, localização rápida de objetos em uma imagem binária e a reconstrução de imagens a partir de um conjunto esparsos de pontos. Os experimentos mostraram que, comparados aos métodos tradicionais, os novos algoritmos propostos são mais rápidos e estatisticamente mais robustos.

A partir destes trabalhos, optou-se por fazer uso de sub-amostragem nas imagens para acelerar o processo de localização e utilizar a técnica de obtenção da aproximação da correlação proposta por (SCHILS, 1992) para avaliar o compromisso entre a qualidade da localização e o número de amostras utilizado.

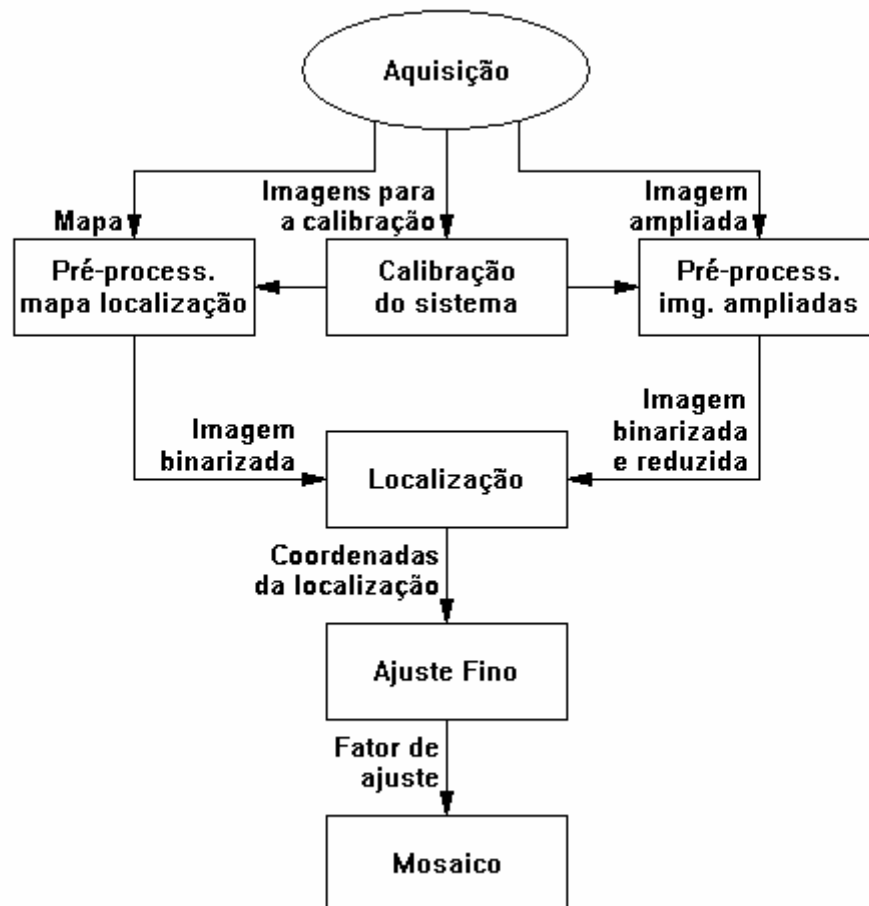
### 3 LOCALIZAÇÃO DE IMAGENS E COMPOSIÇÃO DO MOSAICO

O método de localização de imagens adquiridas ao microscópio proposto neste trabalho utiliza técnicas de processamento digital de imagem consiste no uso de uma imagem como “mapa de localização”, ou simplesmente “mapa”, adquirida com uma ampliação pequena, onde são localizadas as imagens adquiridas com ampliações maiores, aqui denominadas de “imagens ampliadas”. O mapa deverá ter ampliação suficiente para abranger uma área de interesse da lâmina, para ser utilizada como base de orientação para localização de aquisições de imagens com ampliação maior. As “imagens ampliadas”, devem ter resolução suficiente para atender as aplicações finais a que se destinam. Neste trabalho, adotou-se a ampliação de 5 vezes para a imagem de mapa, por facilitar a localização mediante a preservação da forma das células e por conter um número satisfatório de células, em torno de 2000, e a ampliação de 40 vezes para as imagens ampliadas, por apresentar as células em tamanho adequado ao reconhecimento automático de reticulócitos, a aplicação a que se destina.

O método está dividido em quatro etapas: aquisição, pré-processamento, localização e ajuste fino. Na primeira etapa são adquiridas as imagens para calibração do sistema, a imagem de mapa e as imagens ampliadas. Na segunda etapa a imagem de mapa e as imagens ampliadas são pré-processadas para a redução de ruído e uniformização da luminosidade. Ainda nesta etapa, as imagens ampliadas são reduzidas por processamento de imagens, na razão da maior (imagem ampliada) para a menor (mapa) para serem localizadas no mapa. Na terceira etapa, as imagens reduzidas são sub-amostradas e localizadas no mapa. A seguir as coordenadas encontradas são submetidas a um processo de validação, para determinar se a localização é verdadeira ou falsa. Na quarta e última etapa é feito um ajuste fino em nível de pixel entre as imagens ampliadas, em seu tamanho normal, para montar o mosaico com as

imagens. No ajuste fino é corrigido o erro de alinhamento causado pelo descarte de informações ocorrido na etapa de pré-processamento e na sub-amostragem das imagens ampliadas.

Cada etapa do processo é descrita, em maiores detalhes, no decorrer deste capítulo. Na Figura 1 é mostrado o diagrama criado para demonstrar o fluxo de todo o processo.



**Figura 1 – Diagrama de blocos das etapas gerais do método proposto.**

O programa do processo foi implementado em linguagem C, utilizando funções da lili (LaPSI Image Processing Library) (LILI, 2005), biblioteca de processamento de imagens em ANSI C, desenvolvida no LaPSI (FIGUEIRO, 2004), para o pré-processamento e auxílio às demais etapas e funções específicas para a localização, validação e composição de mosaico.

O hardware utilizado foi um microcomputador PC Pentium III de 900 MHz e com 1 (um) GB de memória RAM.

### 3.1 AQUISIÇÃO

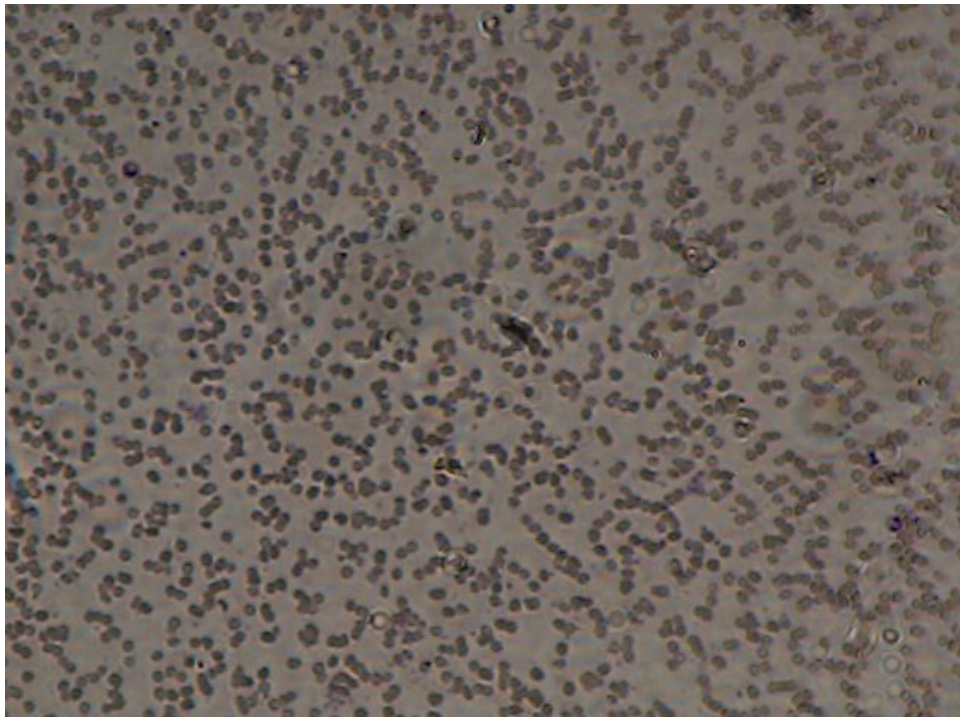
A aquisição das imagens foi feita através do SAIMO (Sistema de Aquisição de Imagens para uso em Microscopia Óptica). O SAIMO (SCHUCH, 2004) foi desenvolvido no LaPSI, laboratório vinculado ao DELET - UFRGS. É composto de um hardware, formado de um sensor de imagem de uma câmera do tipo *webcam*, conectado a um microcomputador PC através da interface USB e adaptado mecanicamente para ser fixado através de um dos oculares do microscópio (Figura 2), e um software desenvolvido para Windows que executa as funções de aquisição e processamento de imagens, como a filtragem temporal da imagem, além de permitir ao usuário a inserção de dados relacionados ao exame, em formato texto, no mesmo arquivo que contém as imagens.



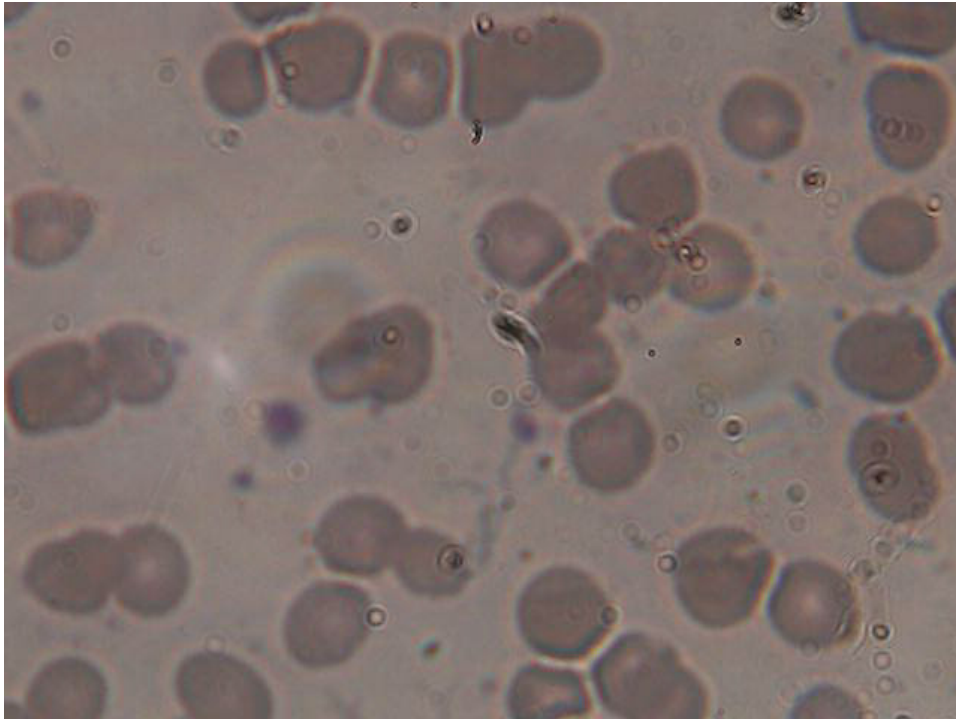
**Figura 2 – Instalação do SAIMO para a aquisição. Sensor acoplado ao ocular do microscópio e conectado ao microcomputador PC através de interface USB.**

A aquisição foi feita a partir de uma lâmina com amostra de sangue humano, utilizando um microscópio STUDAR lab da PZO Warszawa, binocular, de uso acadêmico,

com iluminação invertida. Para a aquisição da imagem de mapa foi utilizada uma lente de aumento nominal de 5 vezes (Figura 3) e para a aquisição das imagens ampliadas, foi utilizada uma lente de aumento nominal de 40 vezes (Figura 4), com vistas à composição de um mosaico com as imagens adquiridas, para posterior análise, e ou contagem de células. O deslocamento da lâmina no plano cartesiano deste microscópio é mecânico e é acionado manualmente.



**Figura 3 – Imagem adquirida com aumento de 5 vezes.**



**Figura 4 – Imagem adquirida com aumento de 40 vezes.**

Todas as imagens, para cada fator de ampliação, foram submetidas às mesmas condições de aquisição de forma a possuírem as mesmas características. Foram mantidos fixos, o foco e a distribuição de iluminação, além disso, foi aplicado o recurso de filtragem temporal disponível no SAIMO. A filtragem temporal consiste no uso da média dos quadros capturados pela câmera ao invés de apenas um quadro, na aquisição. Neste trabalho, a filtragem temporal está ajustada para usar três quadros (*frames*) para cada aquisição, ou seja, cada aquisição é uma média de três imagens do mesmo local. O sistema de cores das imagens, adotado, foi o RGB. A resolução escolhida foi a de 640X480 pixels, a máxima disponível no SAIMO. O formato de arquivo de saída utilizado foi o bmp (*bitmap* do Windows).

### **3.2 PRÉ-PROCESSAMENTO**

O pré-processamento tem por objetivo a preparação das imagens para a subamostragem e a detecção de similaridade. As etapas do pré-processamento são: transformação



de RGB para escala de cinza; extração do fundo das imagens; redução da imagem (apenas nas imagens ampliadas para adequá-las à dimensão do mapa); estiramento do histograma; e binarização. Na Figura 5 (a) e (b) são mostradas as etapas e a seqüência do pré-processamento aplicado na imagem de mapa e nas imagens ampliadas, respectivamente.

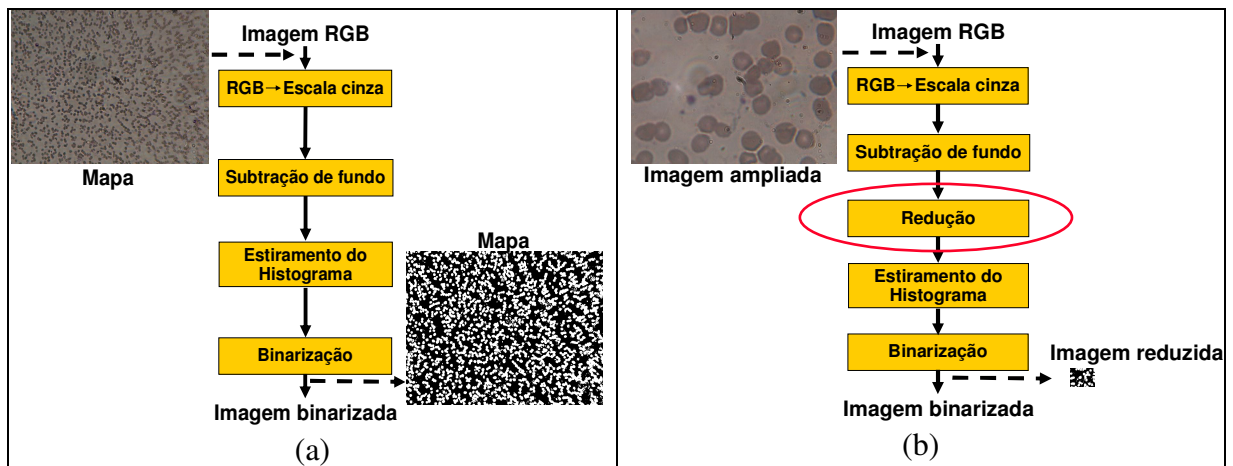


Figura 5 – (a) Fluxograma do pré-processamento do mapa de localização e (b) fluxograma do pré-processamento do mapa de localização.

### 3.2.1 Transformação: RGB para escala de cinza

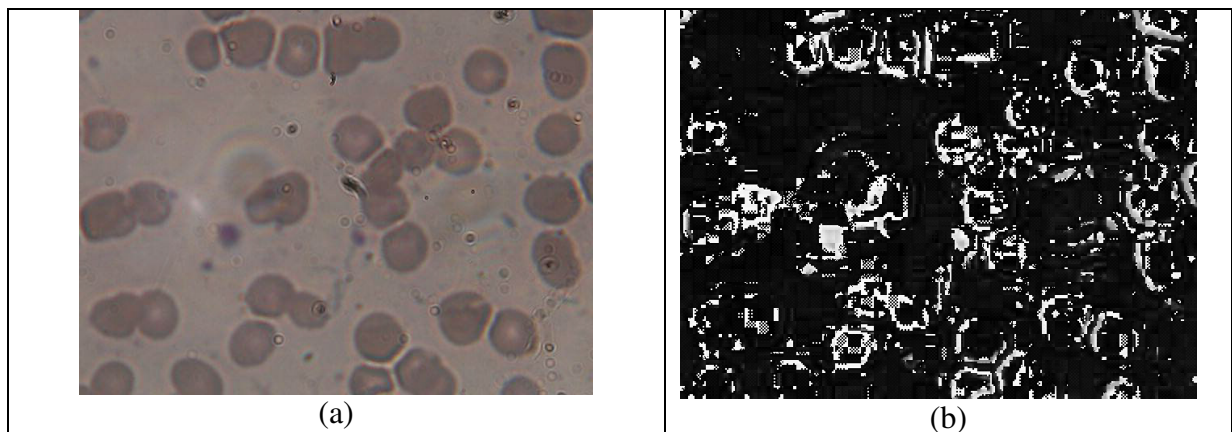
Fazendo uma análise do espaço de cores HSI (Hue, Saturation, Intensity), das imagens adquiridas, observou-se que o componente H (matiz), do fundo e das células é praticamente a mesmo, ou seja, ambos possuem praticamente a mesma cor, diferenciando-se apenas na componente I (intensidade). Na Figura 6 (a) é mostrada uma imagem típica das aquisições feitas, na Figura 6 (b) é mostrado o componente H desta imagem e na Figura 7 é mostrado o histograma do componente H da imagem da Figura 6 (a). Apesar de aparecerem picos em cada uma das extremidades do histograma, estes picos devem ser interpretados como sendo parte de um mesmo pico, pois o histograma está representando, na escala que vai de 0 à 255, uma circunferência de 360°. No espaço de cores HSI, a componente H (matiz), que é calculada por [1], descreve a cor, e é representada por um ângulo que vai de 0° à 360°, onde 0°

é o vermelho,  $120^\circ$  é o verde e  $240^\circ$  é o azul. A componente S (saturação), que é calculada por [2], representa a quantidade de cor, podendo variar de 0 (zero) a 1 (um), a mesma variação da componente I (intensidade), que é calculada por [3], onde porém 0 (zero) significa a cor preta e 1 (um) significa a cor branca (GONZALES, 1992). Na Figura 8 é apresentado um esquema do espaço de cores HSI.

$$H = \cos^{-1} \left\{ \frac{\frac{1}{2}[(R-G) + (R-B)]}{\left[ \frac{1}{4}[(R-G)^2 + (R-B)(G-B)] \right]^{1/2}} \right\} \quad [1]$$

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

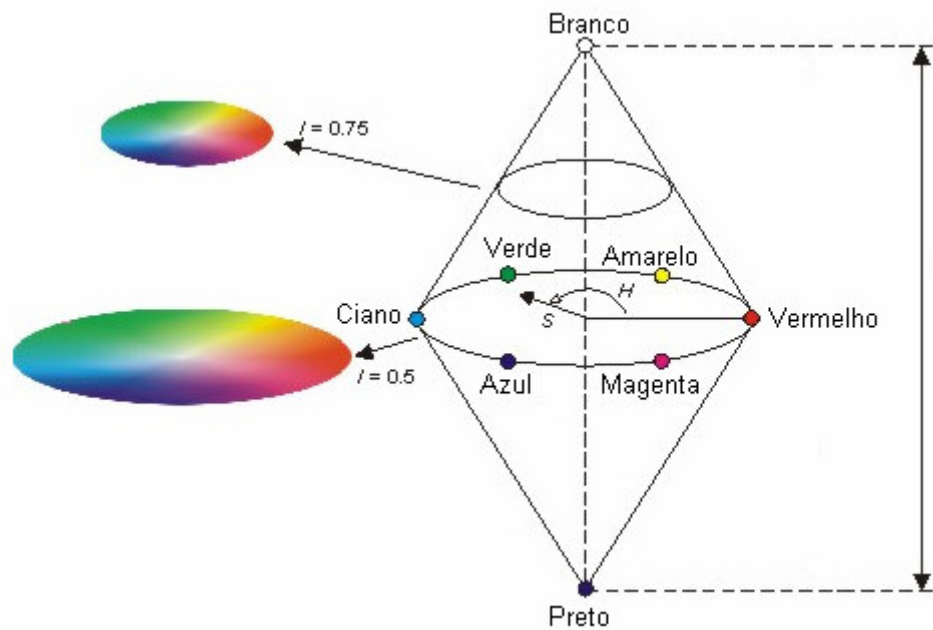
$$I = \frac{1}{3}(R+G+B) \quad [3]$$



**Figura 6 – Imagem original (a) e componente H da imagem original (b).**

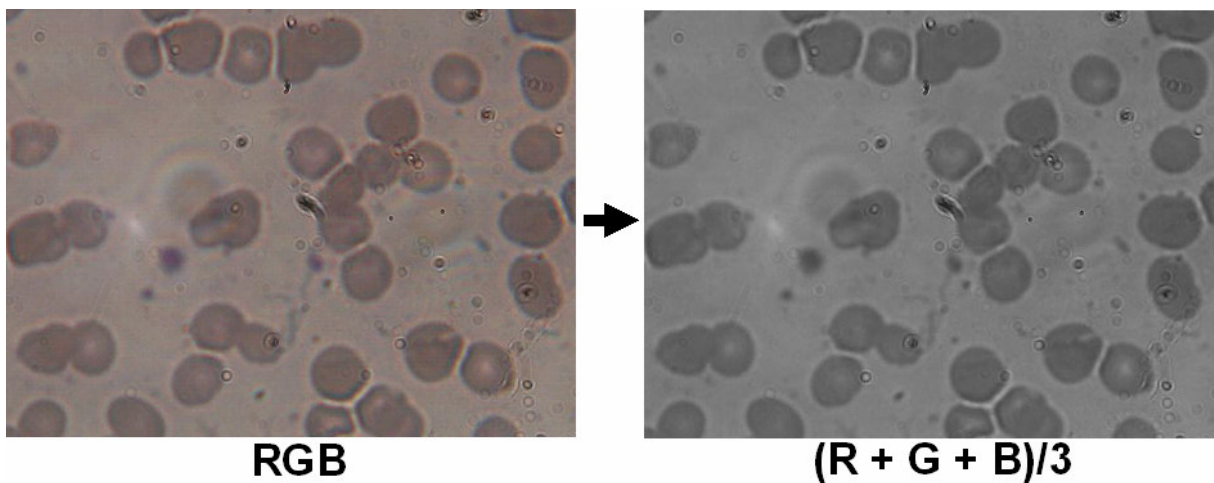


**Figura 7 – Histograma do componente H (Figura 6 (b)) da imagem da Figura 6 (a).**



**Figura 8 – Esquema do espaço de cores HSI.**

Em vista da constatação de que a informação de cor não seria relevante para este trabalho, optou-se por converter todas as imagens para escala de cinza, a fim de reduzir o tempo de processamento para  $1/3$  do tempo que levaria para processar os 3 canais de cor (RGB). A conversão foi feita através da função *lconvert\_gray*, da biblioteca de processamento de imagens, em ANSI C, *lil* (LILI, 2005), que retorna a média da soma dos canais de cor R (red), G (green) e B (blue) (Figura 9).

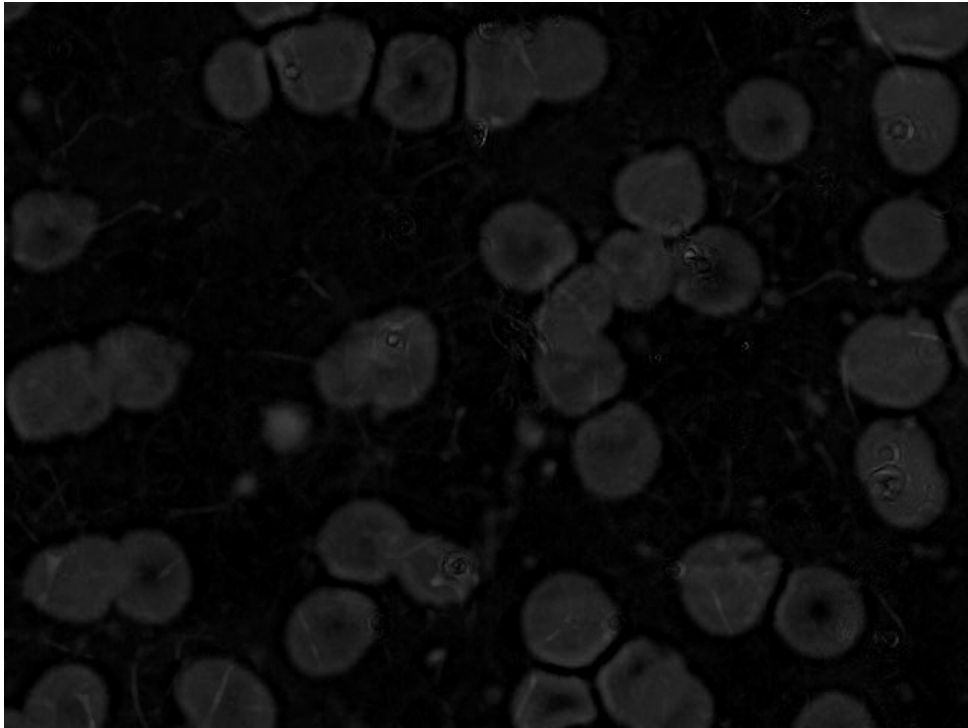


**Figura 9 – Conversão de RGB para escala de cinza.**

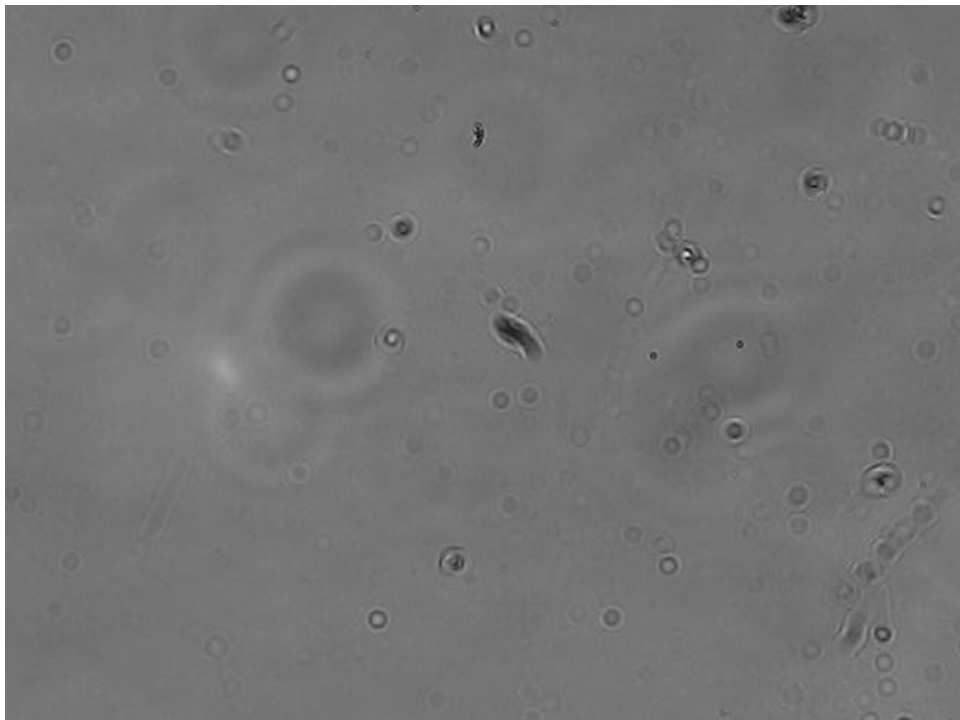
### 3.2.2 Extração do fundo

A extração do fundo é realizada para amenizar as diferenças na distribuição de luminosidade da imagem e destacar a parte útil da imagem, ou seja, as células (Figura 10). O fundo das imagens foi subtraído através da função *ldifference\_gray* da *lili* (LILI, 2005), que retorna o valor absoluto da subtração de uma imagem pela outra.

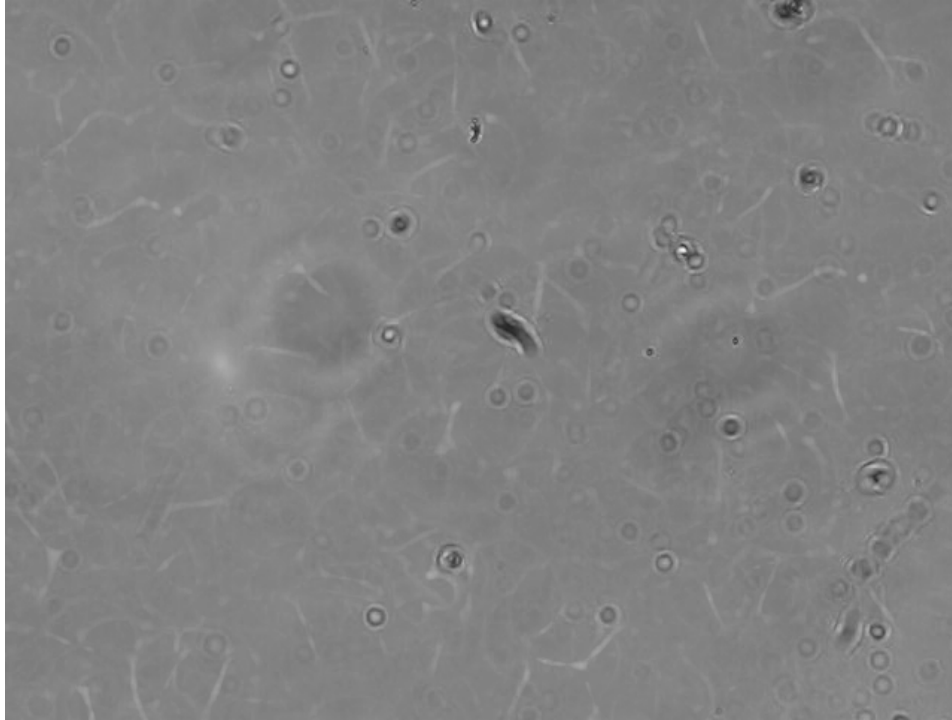
Foram testados dois métodos para a obtenção da imagem de fundo: a simples captura de uma imagem sem a presença da lâmina (Figura 11) e a geração de um fundo (Figura 12). A geração do fundo foi feita a partir do armazenamento do maior valor de pixel, dentre os pixels de mesma posição em diversas imagens adquiridas. As aquisições das imagens para a obtenção do fundo são feitas em posições aleatórias da lâmina sob exame. Os pixels de maior valor foram escolhidos devido ao fundo ser mais claro que as células nesta etapa do processo. Neste trabalho foram utilizadas dez imagens para a geração do fundo, pois o uso de mais de 10 aquisições não apresentou mudança significativa e o uso de menos de 10 aquisições apresentou um fundo com presença de fragmentos de célula. O fundo escolhido para ser utilizado foi o fundo gerado, pois o mesmo representava melhor a real intensidade do fundo, produzindo melhores resultados.



**Figura 10 – Imagem após a subtração do fundo.**



**Figura 11 – Fundo adquirido sem a presença da lâmina, já em escala de cinza.**



**Figura 12 – Fundo gerado a partir de aquisições, já em escala de cinza.**

### 3.2.3 Redução das imagens

A redução das imagens é feita para adequar as dimensões da imagem ampliada às dimensões do mapa para a localização. A redução é realizada atribuindo para cada pixel da imagem reduzida, o valor da média dos pixels da área que os representa na imagem original, conforme a equação [4]. A área que cada pixel da imagem reduzida representa é do tamanho do fator de escala pelo próprio fator de escala, ou seja, uma área quadrada. Neste trabalho, o fator de escala é 8, pois as imagens ampliadas foram adquiridas com ampliação de 40 vezes e o mapa de localização foi adquirido com uma ampliação de 5 vezes. Este método de redução foi escolhido por ser simples, de fácil implementação e atender às necessidades deste trabalho. O resultado da redução são imagens com a dimensão de 80x60 pixels (Figura 14 (a)).

$$I_{red}(x, y) = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N I_{orig}(x+i, y+j) \quad [4]$$

onde N é o fator de escala.

### 3.2.4 Estiramento do histograma

O estiramento (*stretch*) do histograma (GONZALES, 1992) é usado para otimizar a escolha do limiar para a binarização, que é baseada no histograma, e melhorar o contraste das imagens (Figura 14 (b)). O estiramento do histograma é feito normalizando os valores dos pixels da imagem de forma que o maior valor de pixel seja igualado a 255, o menor valor a 0 (zero) e os demais sejam distribuídos proporcionalmente neste intervalo, como é mostrado na Figura 13.

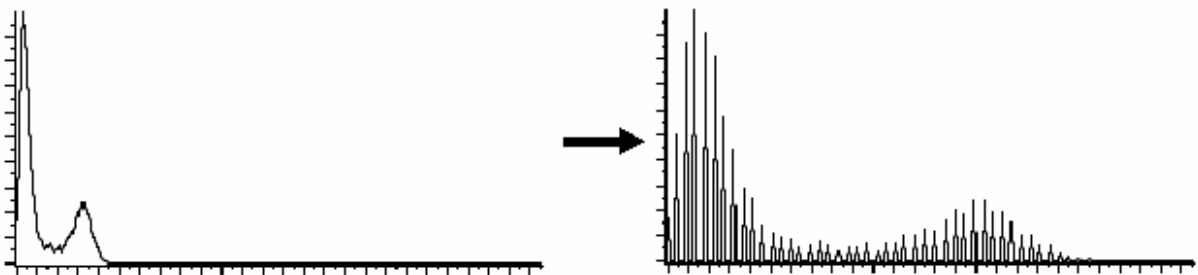


Figura 13 – Estiramento do histograma.

### 3.2.5 Binarização

As imagens são binarizadas (SCHILS, 1992), (NAIR, 1999), com vistas a reduzir tempo no processo de localização, descartando as informações de tons de cinza que não serão mais usados. A binarização é feita através da função *lbinarization\_gray* da *lili* (LILI, 2005) que a partir de um limiar, atribui o valor de 255 (branco em escala de cinza) a todos os pixels cujos valores estão acima deste limiar e 0 (zero) (preto em escala de cinza) aos pixels cujos valores estão abaixo (Figura 14 (c)).

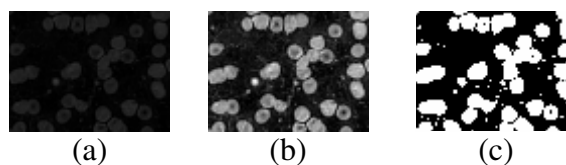


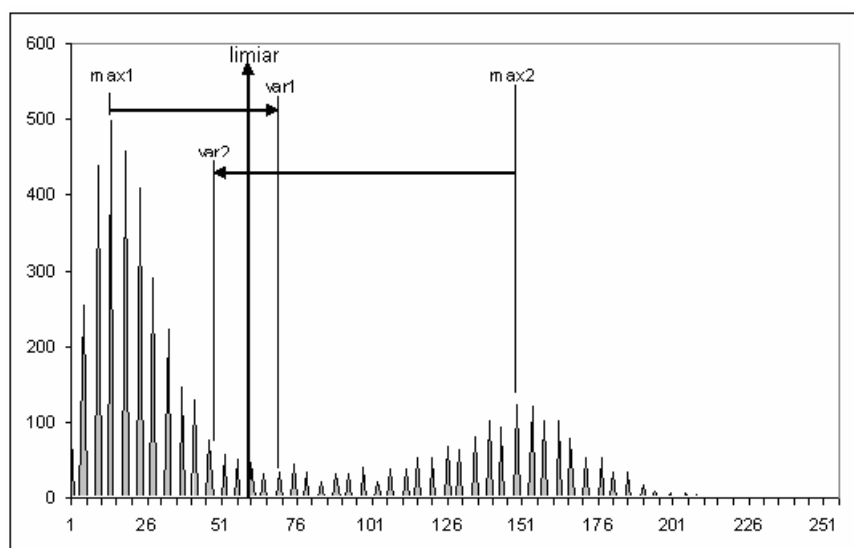
Figura 14 – (a) Imagem reduzida com fator de escala 8, (b) submetida ao estiramento do histograma e (c) binarizada.

O limiar, por sua vez, é obtido através da função *lthreshold* da *lili* (LILI, 2005), que primeiramente calcula o histograma da imagem, depois localiza dois pontos máximos locais, dividindo o histograma em dois e modelando as duas curvas a uma distribuição normal. Para tanto, considerando que os picos são a média, calcula-se as variâncias e aplica-se o seguinte critério: se o valor de pixel associado ao ponto máximo1 (ponto mais alto do histograma) for menor que o valor de pixel associado ao ponto máximo2, a escolha será feita conforme [5], se não, será feita conforme [6].

$$\text{limiar} = (\text{pto\_max1} + \text{var1} + \text{pto\_max2} - \text{var2}) / 2 \quad [5]$$

$$\text{limiar} = (\text{pto\_max1} - \text{var1} + \text{pto\_max2} + \text{var2}) / 2 \quad [6]$$

Na Figura 15 é mostrada a escolha do limiar para a imagem apresentada na (Figura 14 (b)), cuja característica típica, bem como das demais imagens, nesta etapa do processo, é possuir o fundo mais escuro que as células, ou seja, o valor de pixel associado ao ponto máximo1 (ponto mais alto do histograma) é menor que o valor de pixel associado ao ponto máximo2.



**Figura 15 – Escolha do limiar.**



### 3.3 LOCALIZAÇÃO

O processo de localização está dividido em três etapas: 1) sub-amostragem das imagens reduzidas, para reduzir o tempo de processamento da localização; 2) aplicação de um algoritmo de detecção de similaridade, para realizar a localização; e 3) validação da localização, para garantir que a localização foi correta. Na Figura 16 é apresentado o diagrama de blocos da etapa de localização.

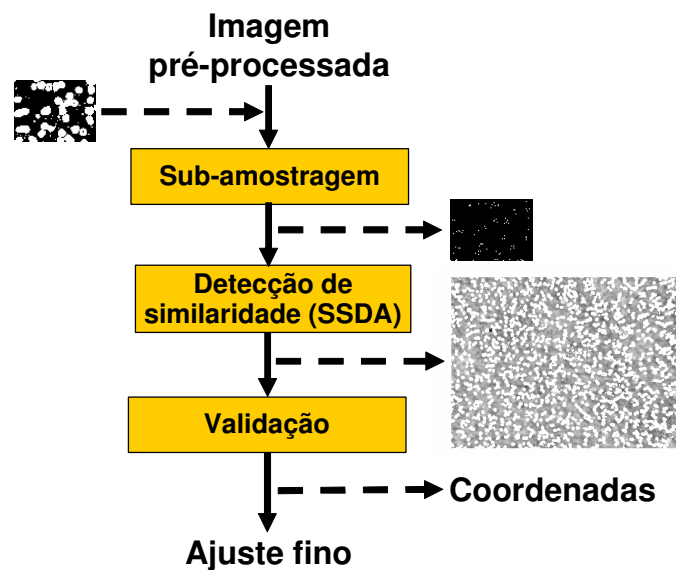


Figura 16 – Diagrama de blocos da etapa de localização.

#### 3.3.1 Sub-amostragem

A sub-amostragem da imagem reduzida é feita para reduzir o tempo de processamento da localização. O resultado da sub-amostragem é um conjunto de coordenadas de pontos brancos, aleatoriamente escolhidas, que pode ser representado por um modelo com fundo preto e pontos brancos.

O número de pontos ótimo, para a sub-amostragem da imagem reduzida, é determinado empiricamente. Esta determinação se baseia na proposta de (SCHILS, 1992), que utiliza a amostragem de Bernoulli para gerar um modelo binário e utiliza a razão da média pelo desvio padrão, dos valores de correlação, calculado pela equação [7], relacionado ao número de pontos utilizados para definir o nível de aproximação da correlação exata, que se deseja. Neste trabalho de dissertação, porém, foi utilizado um algoritmo de detecção de similaridade ao invés da correlação, por ter um melhor desempenho e ser de mais fácil implementação (BROWN, 1992). Os resultados dos experimentos para fazer esta determinação podem ser vistos no capítulo de resultados deste trabalho.

$$\frac{\mu}{\sigma} = \frac{\sum_{i=1}^N S_{\min}(i)}{\sum_{i=1}^N |S_{\min}(i) - \mu|} \quad [7]$$

onde  $N$  é o número total de pontos de mínima (pontos de maior similaridade) do mapa de mínimas e  $S_{\min}$  é o valor de similaridade no ponto de posição  $i$ , correspondente à uma mínima do mapa de mínimas.

A sub-amostragem das imagens é feita através de um sorteio pseudo-aleatório, utilizando a função `rand()` do ANSI-C. Para a realização do sorteio foram adotados os seguintes critérios: o ponto deve ser branco, ou seja, um ponto pertencente a uma célula; o ponto não pode ser de borda, para fugir de pontos que não pertençam às células, e por consequência, não pertençam simultaneamente à imagem de mapa e à imagem reduzida, como por exemplo ruídos e diferenças de limiar de binarização; e o ponto deve ser distinto, para garantir o número de pontos determinado, descartando sorteios do mesmo ponto. Quanto à eficácia do descarte de pontos de borda, foram feitos testes que mostraram que a presença de tais pontos no sorteio aumentou o erro.

Para eliminar os pontos de borda do sorteio, foi feito o gradiente da imagem reduzida. O gradiente foi feito através da função *lgrad\_sobel\_gray* da *lili* (LILI, 2005), que faz a diferenciação da imagem, através do operador Sobel (GONZALES, 1992), utilizando duas máscaras 3x3, sendo uma para cada eixo cartesiano, conforme [8] e [9]. O resultado é uma imagem só com as bordas, estas com espessura média de dois pixels (Figura 17).



**Figura 17 – Gradiente da imagem binarizada.**

$$G_x = (z_7 + 2z_8 + z_9) - (z_1 + 2z_2 + z_3) \quad [8]$$

$$G_y = (z_3 + 2z_6 + z_9) - (z_1 + 2z_4 + z_7) \quad [9]$$

onde  $G_x$  e  $G_y$  são os gradientes no sentido do eixo X e do eixo Y, respectivamente, e  $Z_n$ ,  $n = 1$  a 9, é a posição do valor na máscara, conforme a Figura 18.

$Z_1$	$Z_2$	$Z_3$
$Z_4$	$Z_5$	$Z_6$
$Z_7$	$Z_8$	$Z_9$

**Figura 18 – Região 3x3 utilizada para fazer as máscaras Sobel**

Valores de Z utilizados para a máscara  $G_x = [-0.25, -0.5, -0.25, 0, 0, 0, 0.25, 0.5, 0.25]$  e para a máscara  $G_y = [-0.25, 0, 0.25, -0.5, 0, 0.5, -0.25, 0, 0.25]$ .

Após a obtenção do gradiente da imagem, é feito o sorteio dos pontos segundo os critérios mencionados anteriormente, ou seja: o ponto deve ser branco, não pode ser de borda e deve ser distinto.

De posse do conjunto de coordenadas de pontos brancos, obtidos na sub-amostragem da imagem reduzida, é dado início ao processo de localização.

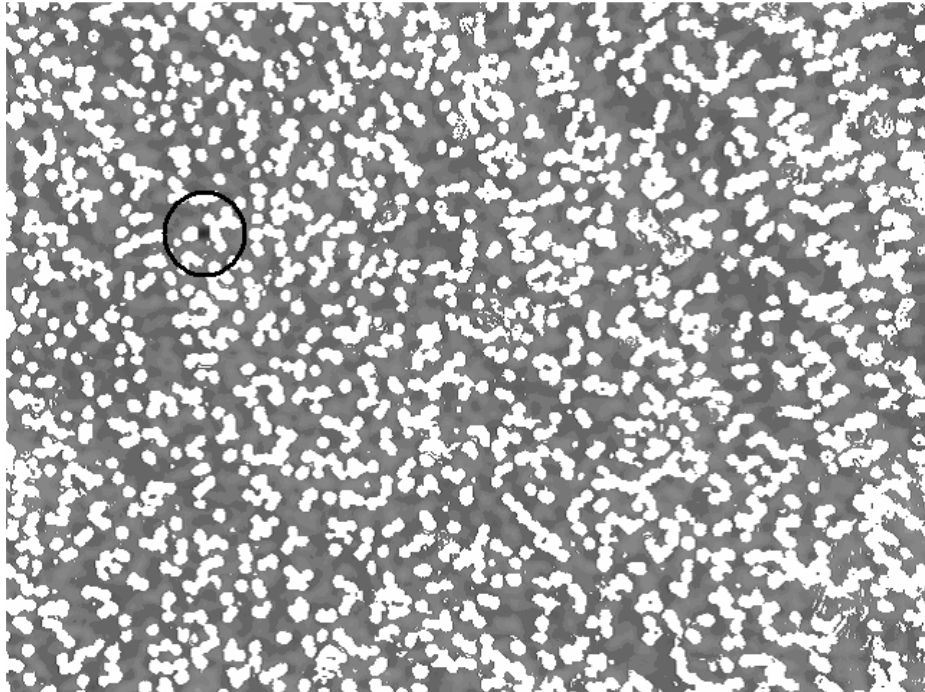
### 3.3.2 Soma das diferenças absolutas

Para realizar a localização optou-se por utilizar o método da soma das diferenças absolutas (SAD), como implementação do algoritmo sequencial de detecção de similaridade (SSDA), por ser computacionalmente simples (BROWN, 1992). A soma das diferenças absolutas é calculada por [10], porém, para reduzir ainda mais o tempo do processo de localização, foi criado um critério que a detecção de similaridade será feita somente onde houver a coincidência entre o valor do pixel central da imagem reduzida e o pixel em que se está calculando a similaridade no mapa de localização. Para isso, é feita a coleta do valor do pixel central da imagem reduzida antes da mesma ser sub-amostrada.

$$SAD(u, v) = \sum_x \sum_y |f(x - u, y - v) - t(x, y)| \quad [10]$$

onde  $f$  é o mapa de localização e  $t$  são os pontos da imagem reduzida. Para  $(x, y)$  pertencentes ao conjunto dos pontos sorteados.

O resultando da rotina de localização é um mapa de similaridade em escala de cinza onde quanto menor o valor do pixel (mais escuro), maior a similaridade e quanto mais claro, menor a similaridade no ponto. Na Figura 19, a maior similaridade está destacada com um círculo.



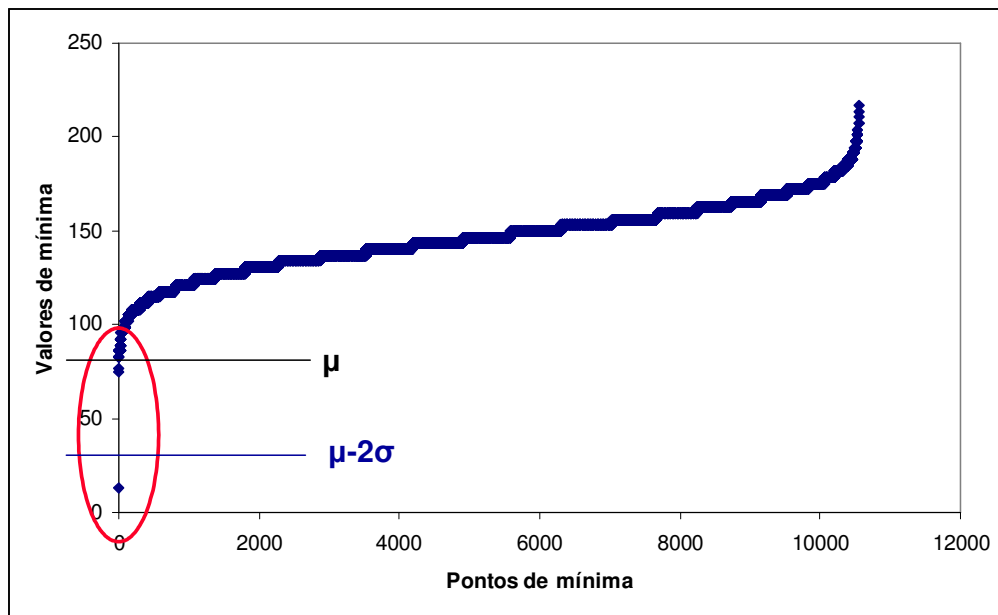
**Figura 19 – Mapa de similaridade.**

### 3.3.3 Validação

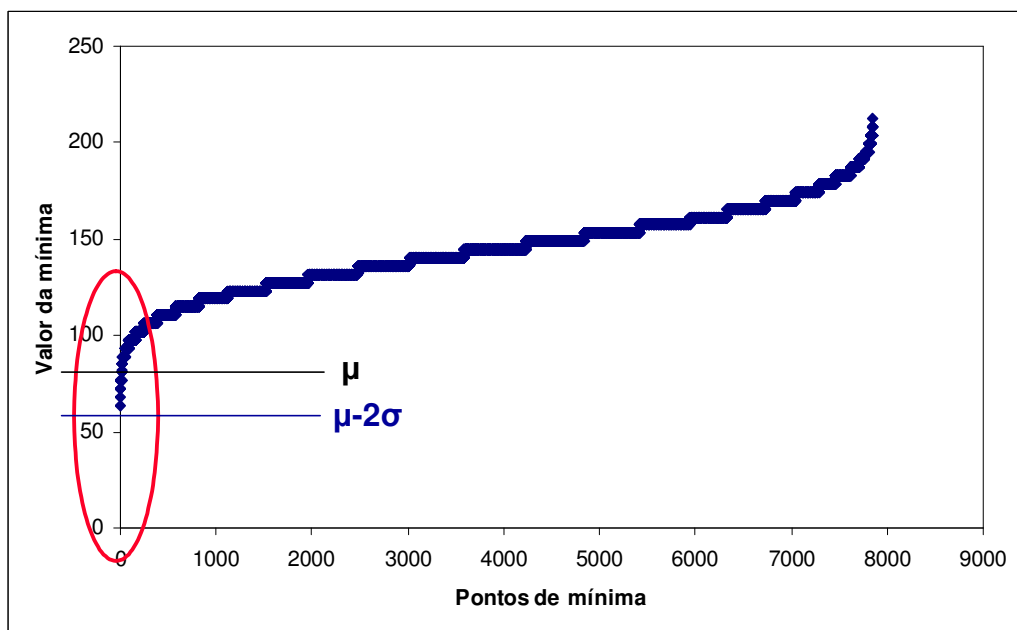
A validação da localização da imagem ampliada na imagem de mapa verifica se a imagem faz parte, ou não, do mapa e descarta as falsas localizações. A técnica consiste na comparação do valor do ponto de maior similaridade, mínima global, com os valores de similaridade das demais mínimas locais. No mapa de similaridade todos os pontos de maior similaridade são mínimas locais. As mínimas locais são localizadas através do mapa de mínimas. O mapeamento das mínimas é feito através da função *lminima* da lili (LILI, 2005), que tem como entrada o mapa de similaridade.

As curvas com os valores de mínima resultantes do cruzamento das informações do mapa de mínimas com o mapa de similaridade apresentaram o mesmo traçado quando ordenadas de forma crescente, com os valores de SAD no eixo das ordenadas. Os valores de mínima têm uma variação média constante, porém, quando há uma localização correta o valor da mínima do ponto de maior similaridade se destaca consideravelmente dos demais. Baseado

neste comportamento, observou-se que selecionando apenas os dez pontos de mínima de menor valor, calculado a média, e o desvio padrão destes pontos é possível validar a localização aplicando o seguinte critério: se o mínimo global estiver abaixo da média menos duas vezes o desvio padrão, pode-se afirmar que a imagem faz parte do mapa de localizações e a localização foi correta (Figura 20), se não, a imagem ou não faz parte do mapa ou a localização está errada (Figura 21).



**Figura 20 – Exemplo de uma localização correta.**



**Figura 21 – Exemplo de uma localização errada.**

O mapa de mínimas é um mapa de gradiente onde cada pixel aponta para o pixel de menor valor em sua vizinhança, tendo como entrada uma imagem em tons de cinza, que neste caso, é o mapa de similaridade. A geração do mapa de mínimas é feita em três etapas: 1) construção de um mapa de enchente; 2) detecção de platôs de não-mínima; e 3) detecção de mínima (FIGUEIRO, 2003).

O mapa de enchente é construído a partir da análise do valor de similaridade do ponto e nas suas vizinhanças. Na posição correspondente do ponto analisado, o mapa de enchente recebe uma seta que aponta para o vizinho de menor valor, como apresentado no diagrama de setas da Figura 22 (a). Se o valor de correspondência do ponto analisado é menor ou igual ao valor de ponto vizinho, então ele se torna um platô, ou seja, não há outro ponto vizinho com valor menor que o ponto analisado. A seguir, os platôs são classificados em mínima e não-mínima, tornando necessário detectar os platôs de não-mínima para eliminá-los. Para detectar os platôs de não-mínima, cada platô do mapa de enchente tem seus vizinhos analisados em ambos os mapas (de enchente e de similaridade). Se pelo menos um dos pontos vizinhos tiver o mesmo valor de similaridade do platô e seu vizinho não é um platô, então o platô analisado é um platô não-mínimo. Neste caso, o platô não-mínimo recebe uma seta com a mesma direção de seus vizinhos não-platô.

Após a detecção e eliminação dos platôs de não-mínima, as setas devem ser analisadas para detectar a posição das mínimas. Se um ponto do mapa de enchente tem pelo menos quatro das setas de seus vizinhos apontando para si, então o ponto é considerado uma mínima. Estas setas devem estar nas disposições mostradas na Figura 22 (b) e (c).

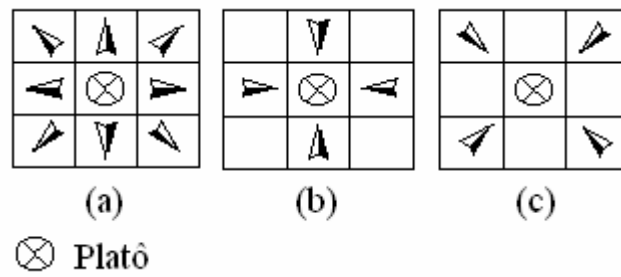


Figura 22 – (a) Diagrama de setas, (b, c) condições de mínima para a vizinhança.

Na Figura 23 é mostrado um exemplo de mapa de enchente feito a partir de um mapa de similaridade.

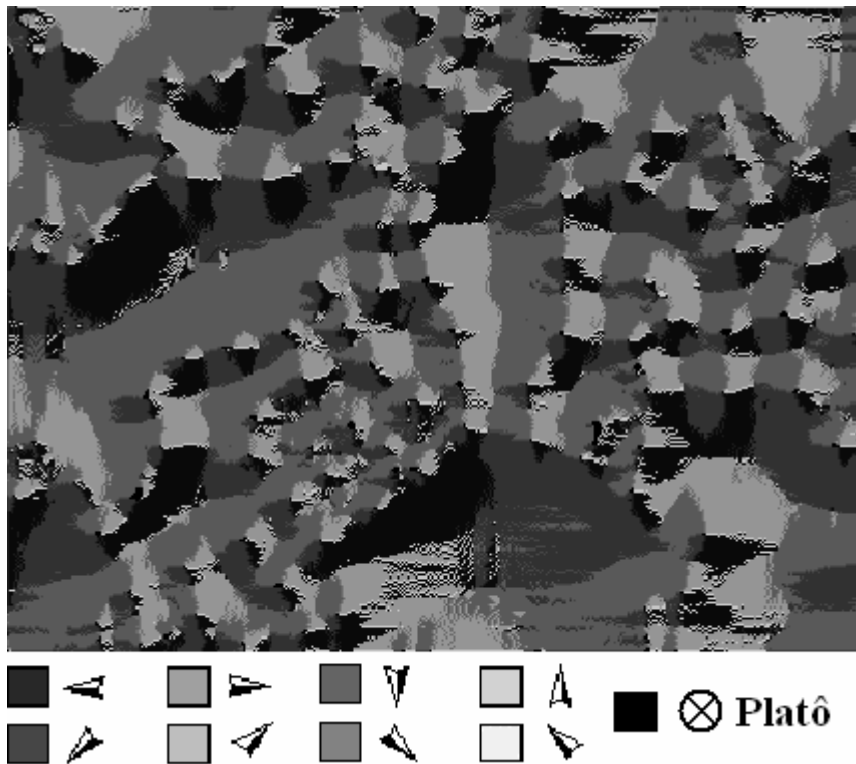


Figura 23 – Mapa de enchente de um mapa de similaridade.

### 3.4 AJUSTE FINO

O ajuste fino é a última etapa do processo, é feito em nível de pixel entre as imagens ampliadas, onde se busca a exata posição de cada imagem com relação umas às outras, para possibilitar a montagem de um mosaico de imagens. Porém, para fazê-lo é necessário que haja



sobreposição mínima de uma área de 128x128 pixels, o equivalente à 20% de 640 (eixo X) e aproximadamente 30% (26,67%) de 480 (eixo Y), para a retirada de amostras. Este tamanho de amostra foi escolhido para facilitar a aplicação da FFT, que trabalha com valores de potência de 2. Devido a características como tamanho das células e número de células nas imagens, amostras de tamanhos menores não continham informações suficientes para o cálculo e amostras de tamanhos maiores não apresentaram resultados com melhoras significativas.

O ajuste fino foi dividido em duas etapas: preparação para o ajuste fino e registro das imagens, que é o processo de obtenção dos pontos de equivalência entre as imagens de uma mesma cena. Na Figura 24 é mostrado o diagrama de blocos desta etapa.



Figura 24 – Diagrama de blocos do ajuste fino.

### 3.4.1 Preparação

A preparação para o ajuste fino consiste em cinco fases: 1) adequação das coordenadas de localização das imagens localizadas, redimensionando-as para o tamanho original das imagens ampliadas, no caso deste trabalho, aumentá-las 8x; 2) escolha de uma imagem de referência para a partir dela ajustar todas as demais; 3) avaliação da distância euclidiana entre a imagem de referência e as demais imagens, para ordenar a seqüência de ajuste das imagens; 4) retirada das amostras (imagem de referência e imagem a ser ajustada)

para realizar o ajuste; 5) pré-processamento das amostras, para eliminar os problemas de baixo contraste, distribuição não uniforme de luminosidade e presença de ruído, utilizando o mesmo pré-processamento abordado no item 3.2 deste trabalho, aplicado nas imagens antes da etapa de localização.

### 3.4.2 Registro

O registro foi obtido aplicando-se dois métodos, para comparação de desempenho. Primeiro, a correlação de fase, que é feita através do espectro de potência cruzado das duas amostras, fazendo uso da transformada rápida de Fourier (FFT) (KUGLIN, 1975), (BROWN, 1992). Segundo, a aplicação de um algoritmo seqüencial de detecção de similaridade (SSDA), feito com o uso da soma das diferenças absolutas (SAD) (BROWN, 1992).

O registro das duas amostras de imagem, através da correlação de fase é obtido com o cálculo da transformada inversa de Fourier (IFFT), do espectro de potência cruzado entre as duas imagens, dado por [11] (BROWN, 1992).

$$\frac{F_1(\omega_x, \omega_y)F_2^*(\omega_x, \omega_y)}{|F_1(\omega_x, \omega_y)F_2^*(\omega_x, \omega_y)|} = e^{(\omega_x d_x + \omega_y d_y)} \quad [11]$$

onde  $F_1$  e  $F_2$  são as amostras de imagem, da área de sobreposição, no domínio da frequência e  $F_2^*$  é o complexo conjugado de  $F_2$ .

O resultado obtido apresenta o deslocamento exato entre as duas imagens, possibilitando a correção das coordenadas da segunda imagem, com relação à primeira (imagem de referência).

O registro das duas amostras de imagem, através da soma das diferenças absolutas é obtido com o uso da equação [12]. Com a localização do ponto de maior similaridade, é possível calcular o deslocamento de uma imagem com relação à outra.

$$SAD(u, v) = \sum_x \sum_y |f_1(x - u, y - v) - f_2(x, y)| \quad [12]$$

onde  $f_1$  e  $f_2$  são as amostras de imagem da área de sobreposição.

O resultado do ajuste fino, independente do método, é um fator de correção, que deve ser aplicado às coordenadas da imagem que se quer ajustar à imagem de referência.

Este procedimento é repetido sucessivamente, sempre usando como referência as imagens já ajustadas, até que todas as localizações sejam corrigidas.

Finalmente, de posse das coordenadas corretas de todas as imagens, basta apenas uni-las, para a obtenção do mosaico composto por todas as imagens.

## 4 RESULTADOS

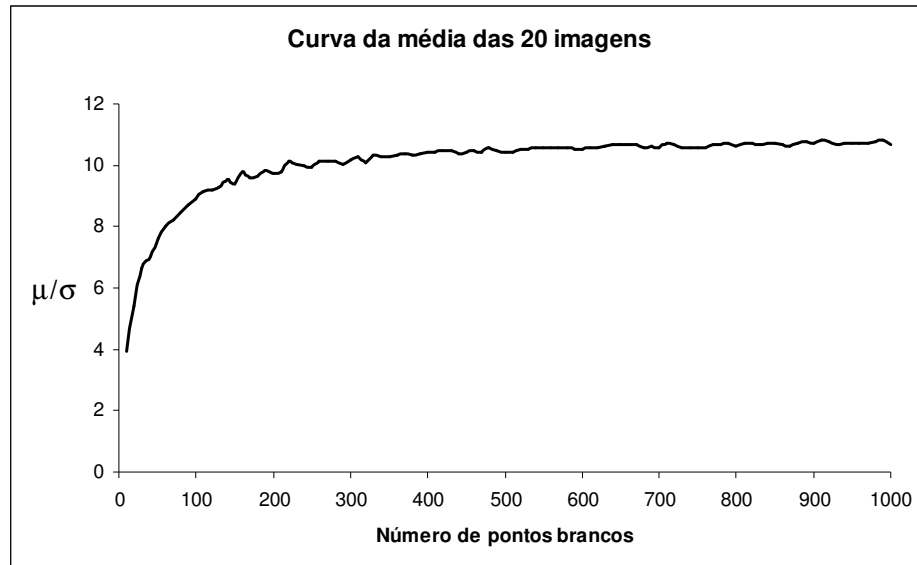
### 4.1 BANCO DE IMAGENS

Os experimentos foram feitos com um total de vinte e uma imagens para testes de localização no mapa e vinte imagens para testes de calibração (geração de fundos). Todas as imagens foram adquiridas em RGB, com resolução de 640X480 pixels. Para os testes de localização, vinte imagens foram adquiridas com ampliação de 40X (imagens ampliadas) e numeradas de zero a dezenove para a monitoração do processo, e uma imagem foi adquirida com ampliação de 5X (mapa de localização ou simplesmente, mapa). Para os testes de calibração foram adquiridas dez imagens com ampliação de 40X e dez com ampliação de 5X. As aquisições foram feitas com o SAIMO, utilizando um microscópio STUDAR lab da PZO Warszawa, binocular, de uso acadêmico. A ampliação de 40X e 5X referem-se ao valor nominal inscrito nas lentes do microscópio.

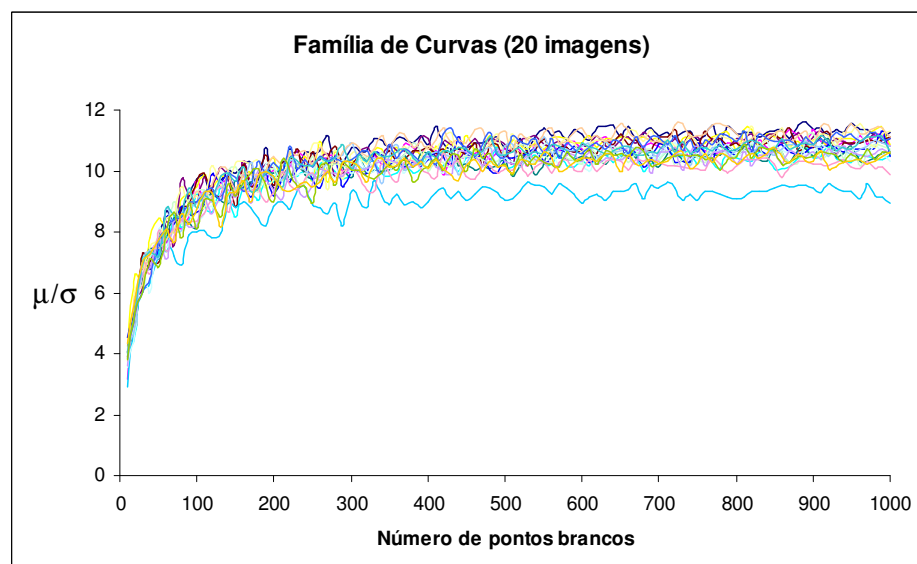
### 4.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE PONTOS ÓTIMO PARA A SUB-AMOSTRAGEM

A determinação do número de pontos ótimo é feita a partir de uma curva média de compromisso entre o nível de aproximação do maior grau de similaridade, dado pela razão da média ( $\mu$ ) pelo desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de similaridade ( $S_{min}$ ), calculado pela equação [7], e o número de pontos brancos, utilizados para representar cada imagem (Figura 25).

A curva média foi originada a partir da família de curvas, geradas em experimentos com cada uma das vinte imagens de teste (Figura 26). Vale ressaltar que as imagens, após reduzidas e binarizadas, possuem em média 33,2% de pontos brancos, com desvio padrão de 1,8%.



**Figura 25 – Curva média da família de vinte curvas.**



**Figura 26 – Família de curvas geradas variando de 10 em 10 amostras até 1000.**

Paralelamente à geração de cada curva, foi gerado um relatório de erro, reportando apenas a localização ou não da imagem. O critério para esta consideração é a comparação do ponto encontrado com o padrão ouro, obtido previamente a partir da medição da similaridade utilizando a imagem com todos os pontos. Por se tratar de uma localização aproximada, foi dada uma margem de cinco pixels em torno do padrão ouro para o ponto ser considerado ponto válido. Desta avaliação constatou-se que utilizando-se 80 (oitenta) pontos ou mais, se obtém em média acima de 98% de acerto de localização, por exemplo.

### 4.3 LOCALIZAÇÃO

Para a obtenção do erro médio de localização, foram realizados vinte experimentos, ou seja, um para cada imagem.

Na Figura 27 são mostrados os valores médios de erro e o desvio padrão correspondente, associados ao número de amostras utilizadas para representar cada imagem. O erro, refere-se à distância euclidiana entre o ponto localizado e o padrão ouro, obtido com a medição da similaridade utilizando-se todos os pontos da imagem. A distância euclidiana de um ponto a outro é calculada pela equação [13] e o resultado é dado em pixels.

$$Erro = \sqrt{(x_{po} - x_{pl})^2 + (y_{po} - y_{pl})^2} \quad [13]$$

onde  $(x_{po}, y_{po})$  é a coordenada de localização do padrão ouro e  $(x_{pl}, y_{pl})$  é a coordenada de localização do ponto localizado.

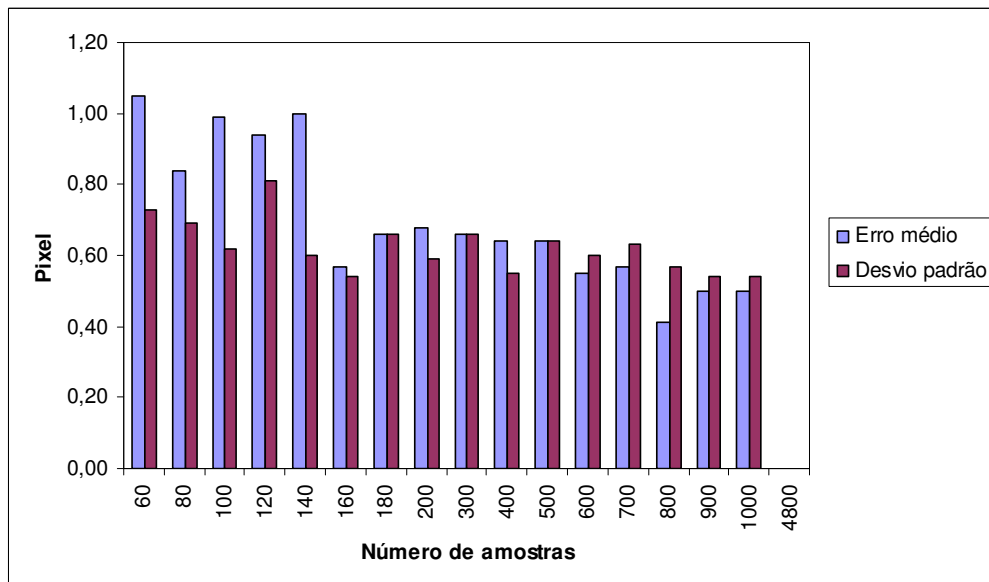


Figura 27 – Valores médios de erro e desvio padrão correspondente.

Na Tabela 1 são mostrados os valores médios de erro e de desvio padrão, associados ao número de amostras utilizadas para representar cada imagem, que deram origem ao gráfico da Figura 27.

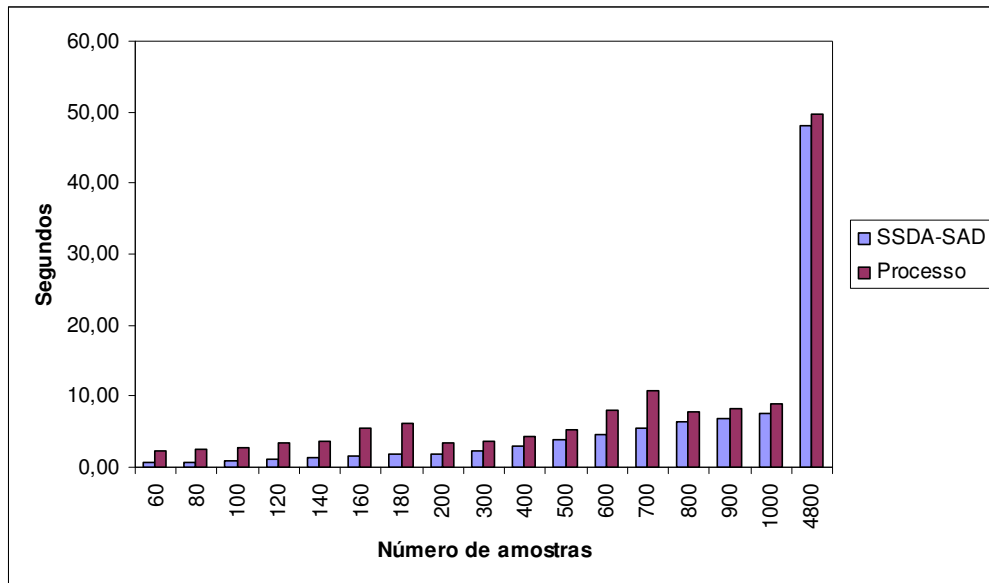
**Tabela 1: Erro e desvio padrão associado ao número de amostras utilizado.**

Numero de Pontos	Erro Médio	Desvio Padrão
60	1,05	0,73
80	0,84	0,69
100	0,99	0,62
120	0,94	0,81
140	1,00	0,60
160	0,57	0,54
180	0,66	0,66
200	0,68	0,59
300	0,66	0,66
400	0,64	0,55
500	0,64	0,64
600	0,55	0,60
700	0,57	0,63
800	0,41*	0,57*
900	0,50*	0,54*
1000	0,50*	0,54*
4800 (Todos os pontos)	0,00	0,00

Os experimentos com 800, 900 e 1000 pontos foram feitos com a omissão da restrição de região com gradiente diferente de zero na etapa do sorteio dos pontos, pois o número total de pontos brancos contidos na imagem era menor que os requeridos. A omissão da restrição acarretou no erro de localização de uma das imagens (imagem de teste número 8). Assim, para não prejudicar os resultados, optou-se por excluir os experimentos com localização errada dos resultados assinalados com asterisco (\*).

O hardware utilizado foi um microcomputador PC com um processador Intel Pentium III de 900 MHz com 1 (um) GB de memória RAM. Para a obtenção dos valores médios de tempo, foram realizados vinte experimentos, ou seja, um para cada imagem.

Na Figura 28 são mostrados os valores médios de tempo em segundos para a detecção de similaridade, através da soma das diferenças absolutas (SAD), associados ao número de amostras utilizadas para representar cada imagem.



**Figura 28 – Tempo em segundos para a detecção da similaridade e término do processo todo.**

Na Tabela 2 são apresentados os tempos médios que deram origem ao gráfico da Figura 28.

**Tabela 2: Tempos médios em segundos da detecção de similaridade e de todo o processo.**

Número de pontos	Tempo médio da detecção de similaridade (s)	Tempo médio de todo o processo (s)
60	0,60	2,26
80	0,76	2,45
100	0,97	2,73
120	1,19	3,38
140	1,36	3,72
160	1,54	5,57
180	1,73	6,16
200	1,89	3,51
300	2,28	3,61
400	3,04	4,37
500	3,86	5,19
600	4,59	7,96
700	5,39	10,86
800	6,46	7,89
900	6,85	8,20
1000	7,57	8,90
4800 (Todos os pontos)	48,08	49,73

Na Figura 29 é apresentado o resultado de localização de cada uma das vinte imagens.



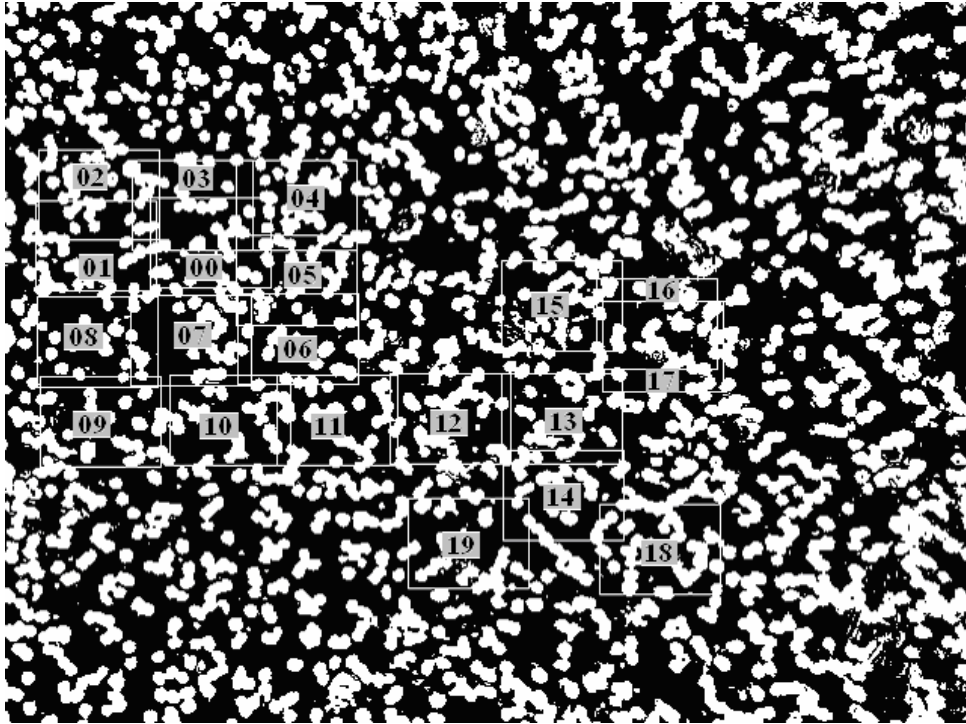
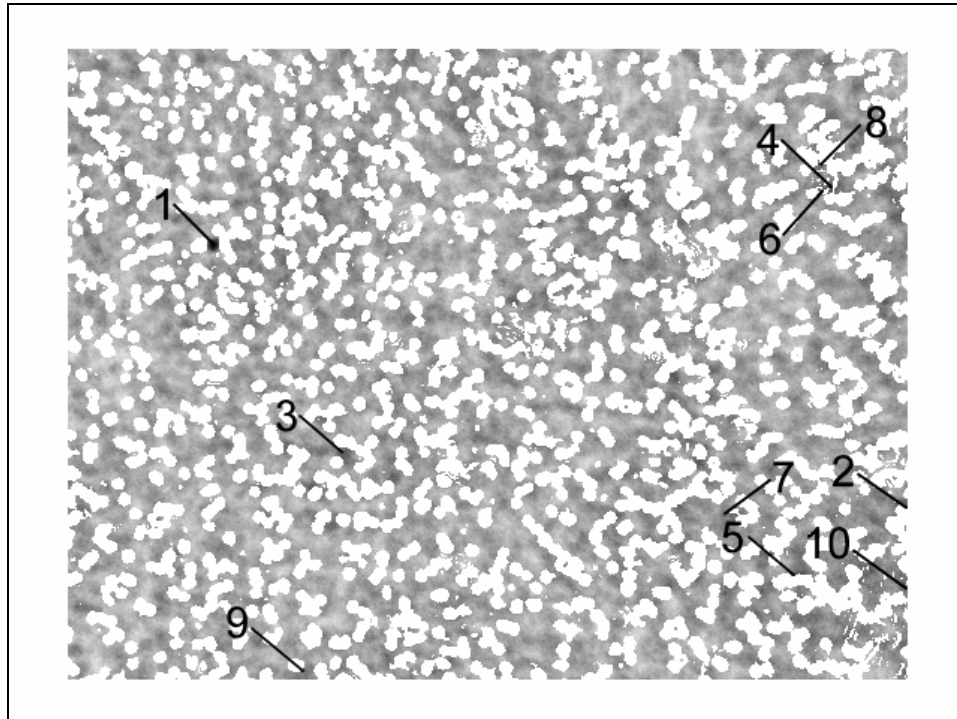


Figura 29 – Localização de cada uma das vinte imagens de teste.

#### 4.4 VALIDAÇÃO

A evolução do processo de validação é apresentada através de um exemplo de validação. A seguir é detalhada a validação da imagem zero do banco de vinte imagens de teste, que foi localizada e validada segundo os critérios propostos.

Na Figura 30 é mostrado o mapa de similaridade resultante da detecção de similaridade entre oitenta pontos brancos da imagem zero do banco de imagens, ilustrados pela Figura 31, e o mapa de localizações. Ainda na Figura 30, é mostrada a localização dos dez pontos de maior similaridade, numerados da maior para a menor.



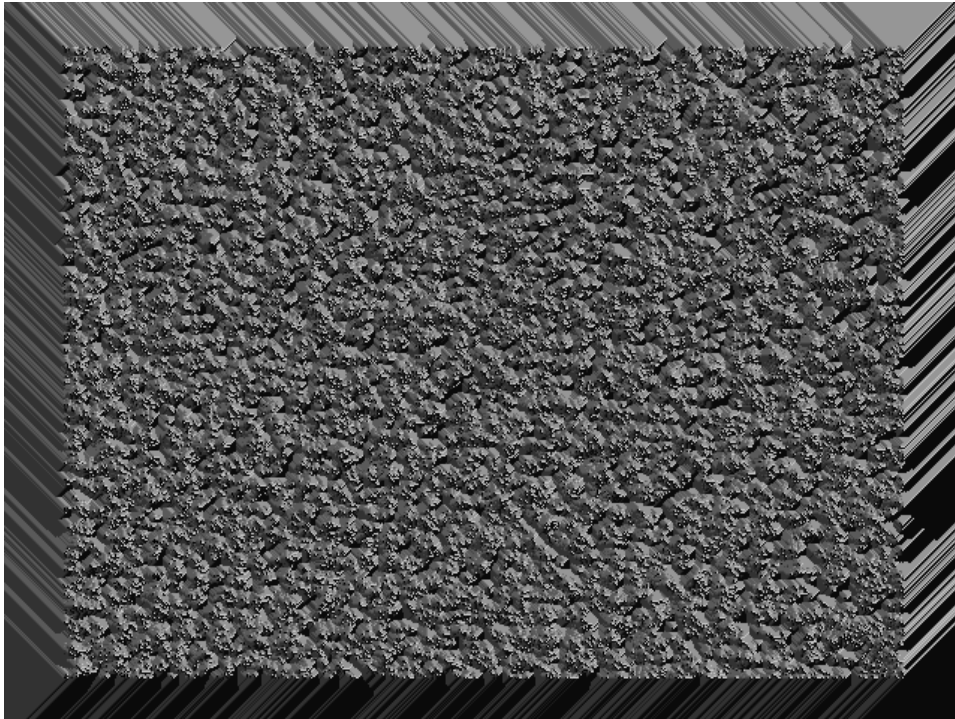
**Figura 30 – Posição dos dez pontos de maior similaridade, utilizados na Tabela 3.**

Os pontos brancos que aparecem na Figura 30 (células), e a faixa branca que contorna a Figura 30, representam os locais onde não foi calculada a similaridade.



**Figura 31 – Representação de uma distribuição de oitenta pontos brancos da imagem zero do banco de imagens. Em (a) tamanho proporcional ao mapa da Figura 29 e ampliado em (b).**

Na Figura 32 é mostrado o mapa de mínimas gerado a partir do mapa de similaridade apresentado na Figura 30. Fazendo-se o cruzamento das informações do mapa de mínimas e do mapa de similaridade, é possível assegurar quais pontos eram verdadeiramente pontos de mínima.



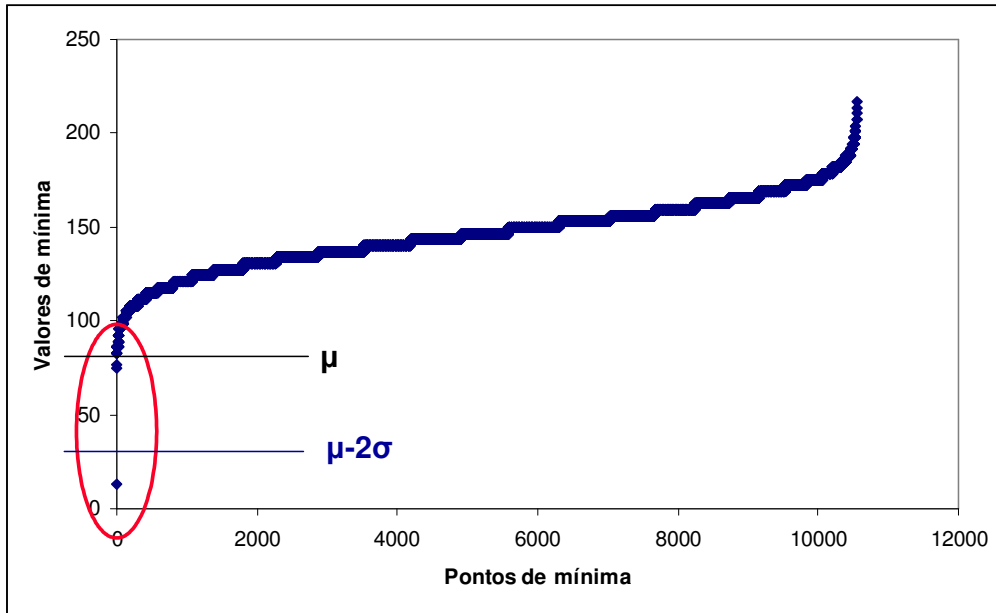
**Figura 32 – Mapa de mínimas do mapa de similaridade apresentado na Figura 30.**

Na Tabela 3 são mostrados os valores e coordenadas dos dez pontos, distintos, de maior similaridade, obtidos da detecção de similaridade com os oitenta pontos brancos da imagem zero.

**Tabela 3: Valores em ordem decrescente e coordenadas dos dez pontos de maior similaridade.**

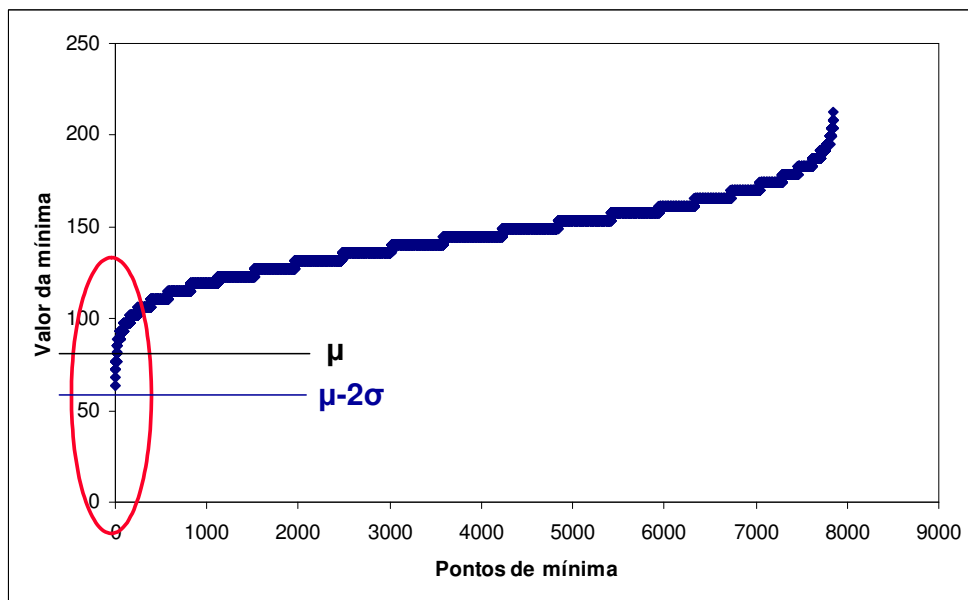
Valor de similaridade	Localização no eixo X	Localização no eixo Y
12,75	137	160
75,19	600	336
76,50	223	299
82,88	550	122
86,06	525	381
89,25	544	124
92,44	478	340
95,63	542	107
98,81	197	445
101,35	600	390

O valor médio de similaridade ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ) obtidos a partir dos dados da tabela foram respectivamente 81,09 e 25,57. A localização foi validada pelo critério adotado (maior similaridade  $< \mu - 2\sigma$ ), onde maior similaridade = 12,75 e  $\mu - 2\sigma = 29,94$ ), como pode ser visto no gráfico da Figura 33. O gráfico da Figura 33 é composto por 10545 valores de ponto de mínima.



**Figura 33 – Curva de pontos de mínima de uma localização correta e validada.**

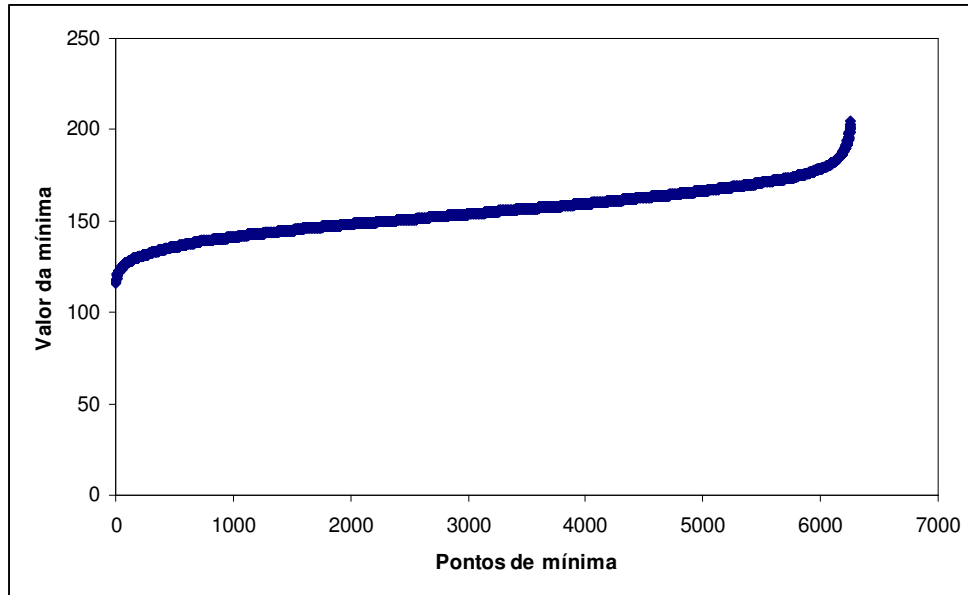
Na Figura 34 é apresentada uma curva de valores de mínimas locais, provenientes da detecção de similaridade com sessenta amostras da imagem oito do banco de imagens, que resultou em uma localização correta, sendo invalidada devido à imagem estar fora de foco.



**Figura 34 – Curva de pontos de mínima de uma localização correta e invalidada.**

Na Figura 35 é apresentada uma curva de valores de mínimas locais, provenientes da detecção de similaridade com oitocentas amostras da imagem oito do banco de imagens, que

resultou em uma localização errada. Neste caso a localização da imagem foi invalidada pelo critério adotado.



**Figura 35 – Curva de uma localização errada e invalidada.**

A Tabela 4 mostra os valores e coordenadas dos dez pontos de maior similaridade da localização da imagem oito do banco de imagens, sub-amostrada em sessenta pontos brancos. Esta imagem foi localizada, porém o resultado foi invalidado devido à imagem estar fora de foco. Este resultado mostra que o método de validação não só detecta falsas localizações, como também detecta aquisições feitas com parâmetros fora da tolerância desejável.

**Tabela 4: Valores em ordem decrescente e coordenadas dos dez pontos de maior similaridade.**

Valor de similaridade	Localização no eixo X	Localização no eixo Y
63,75	62	225
68,00	175	394
72,25	337	76
76,50	547	398
80,75	338	78
81,96	150	450
85,00	336	74
89,25	600	405
93,50	304	42
97,75	305	31

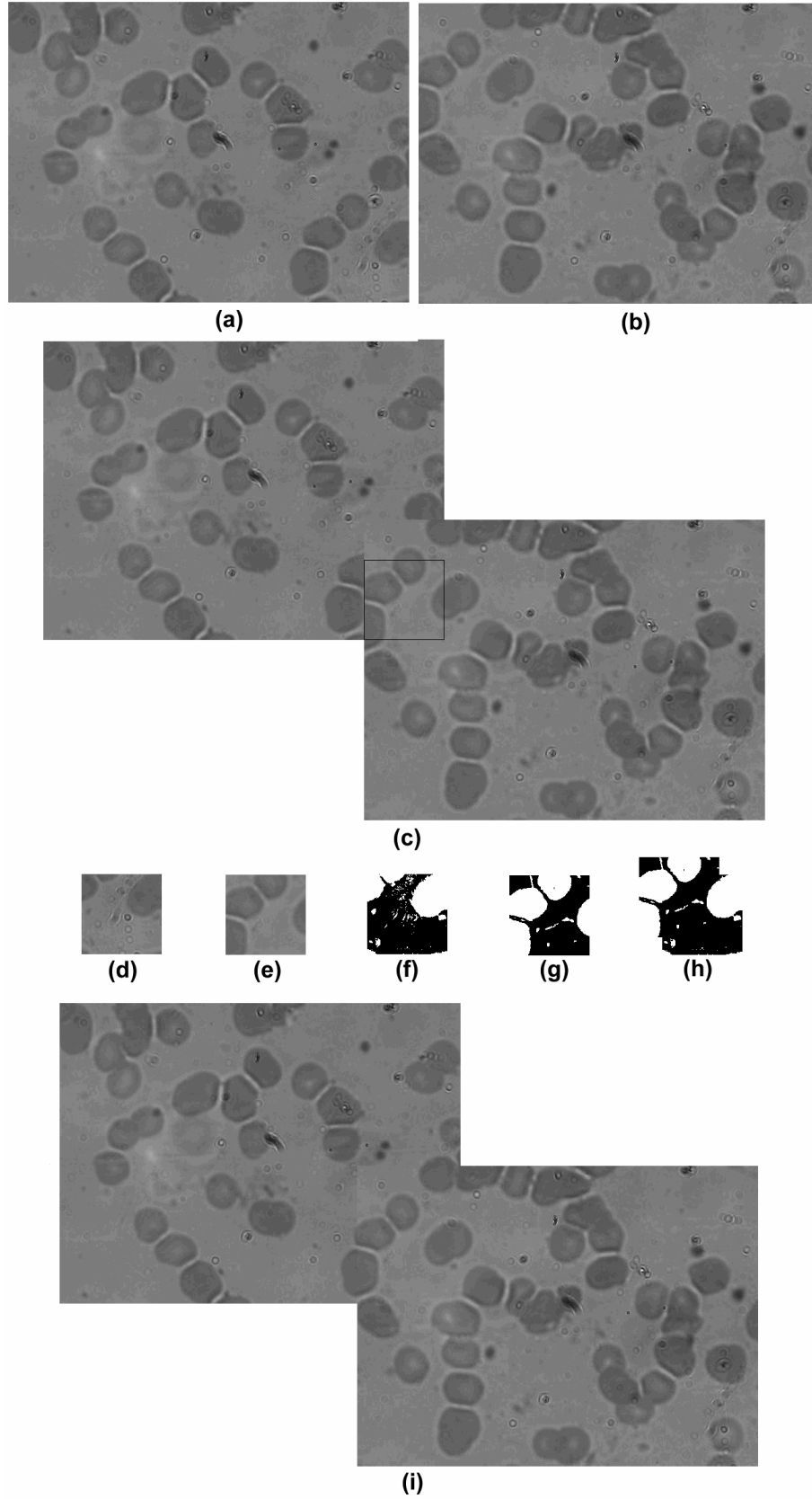
A média dos valores de similaridade ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ) obtidos a partir dos dados da tabela foram respectivamente 80,87 e 10,98, assim, não satisfazendo o critério de validação adotado.

#### 4.5 AJUSTE FINO

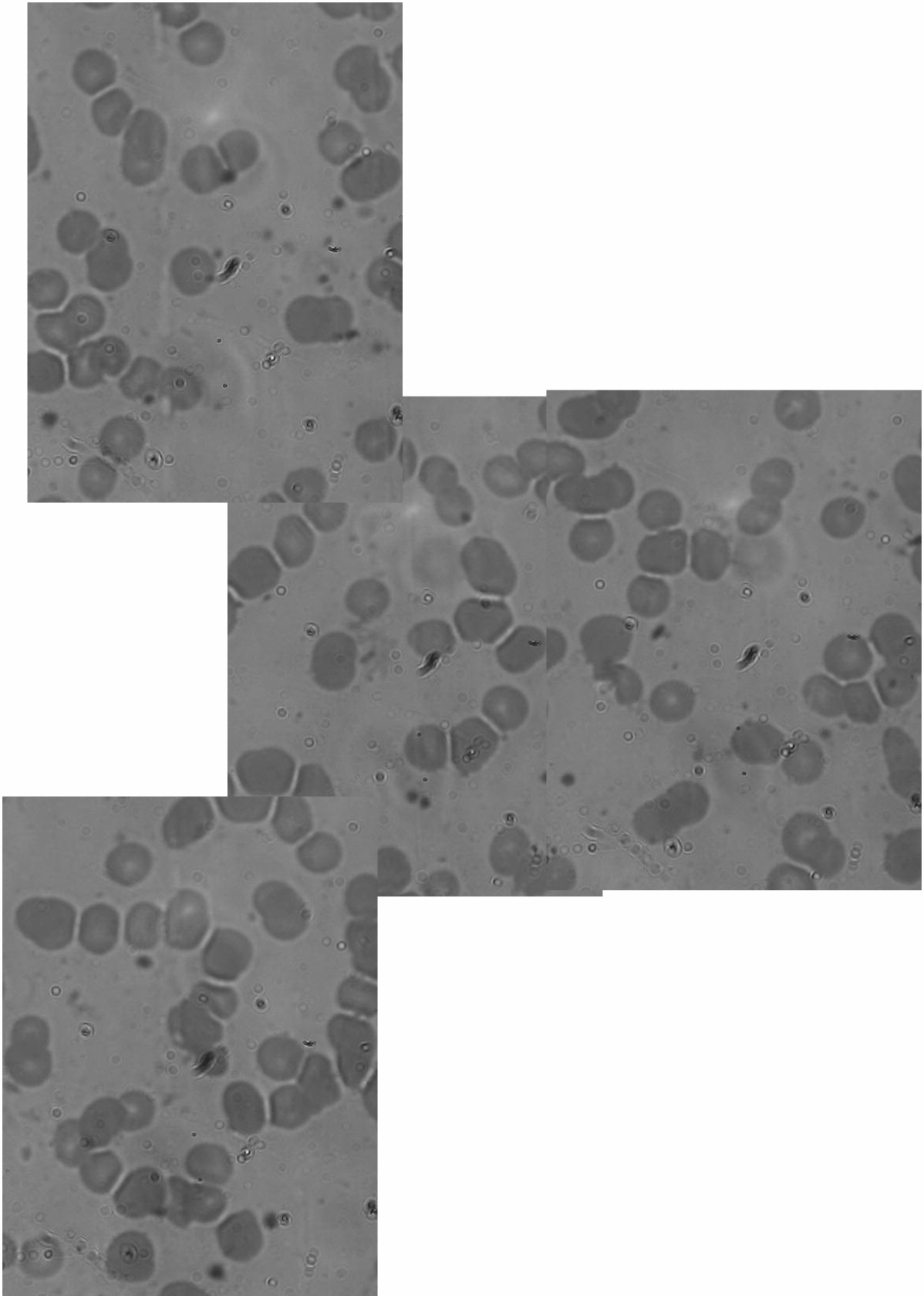
As coordenadas utilizadas nos experimentos de ajuste fino foram as coordenadas obtidas na detecção de similaridade utilizando as imagens completas, ou seja, com o uso de todos os pontos. Optou-se por estas coordenadas por representarem as melhores aproximações das localizações exatas.

Na Figura 36 é mostrada a seqüência do processo de ajuste fino, onde a imagem 18, Figura 36 (b) é ajustada à imagem 14, Figura 36 (a), que é utilizada como imagem base. Primeiramente as imagens são unidas usando as coordenadas da localização multiplicadas pelo fator de escala utilizado para reduzir as imagens ampliadas (8x) (Figura 36 (c)). Após, é retirada uma amostra da região de sobreposição, de 128x128 pixels, da imagem 14 (Figura 36 (d)) e uma amostra da imagem 18 (Figura 36 (e)). Depois, as amostras são pré-processadas (Figura 36 (f) e (g)) e submetidas ao ajuste fino. Na Figura 36 (h) é mostrada a união das amostras já com o ajuste fino e na Figura 36 (i) o mosaico composto pela união da imagem 18 com a imagem 14, feito com a aplicação dos fatores de correção.

Na Figura 37 é mostrado um mosaico composto com as imagens 14, 13, 18 e 19, utilizando as coordenadas da localização multiplicadas pelo fator de escala (8x), sem a aplicação do ajuste fino. Na Figura 38 é mostrado um mosaico feito com as mesmas imagens anteriores (14, 13, 18 e 19), porém agora com a aplicação do ajuste fino, utilizando a imagem 14 como base para o ajuste. A posição destas imagens no mapa de localização pode ser conferida na Figura 29.

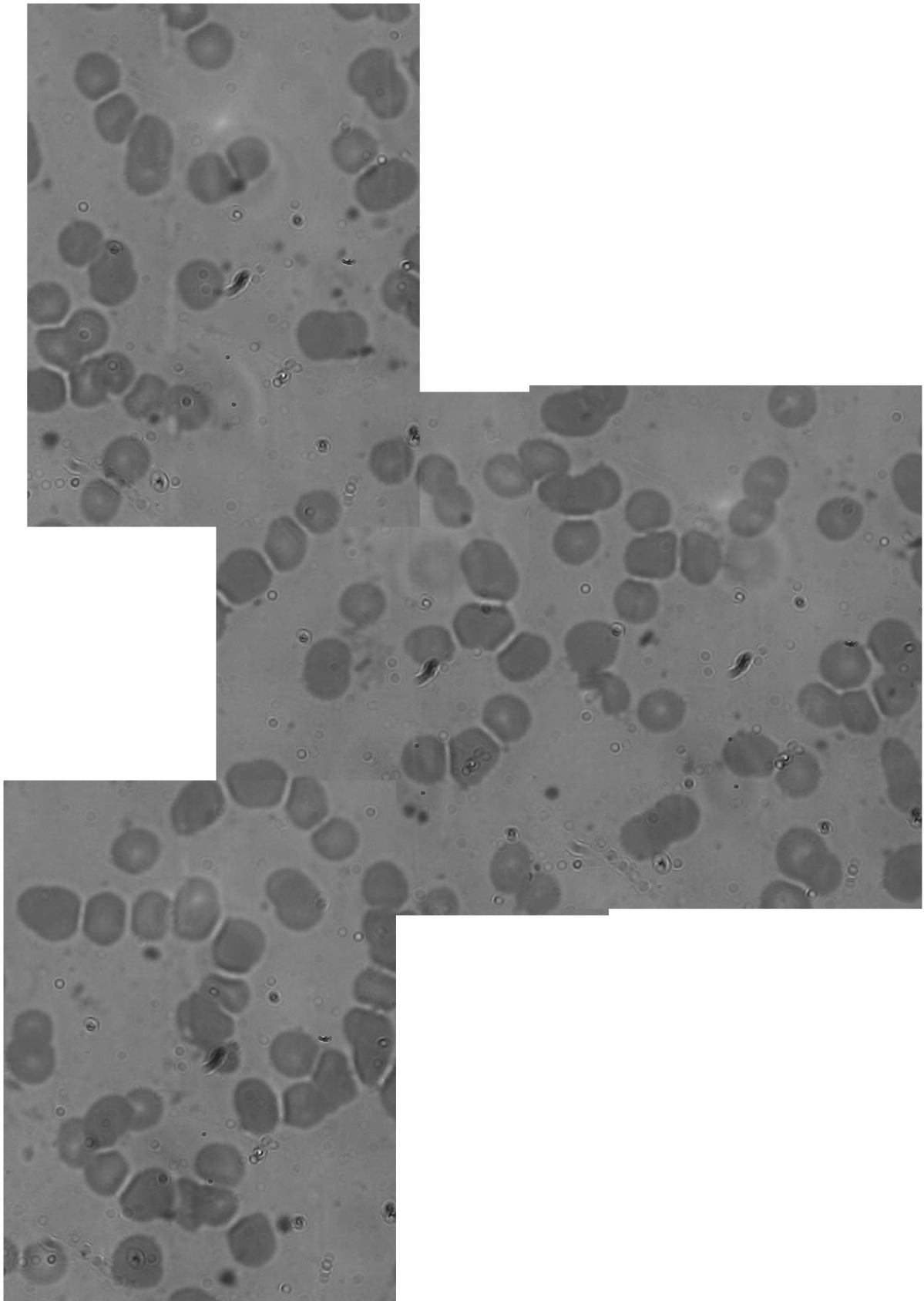


**Figura 36 – Imagens 14 (a) e 18 (b) em escala de cinza, mosaico das imagens 14 e 18 sem o ajuste fino (c), retirada de amostra das imagens 14 (d) e 18 (e), amostras pré-processadas (f) e (g), ajuste fino feito e aplicado sobre as amostras (h) e mosaico das imagens 14 e 18 com a aplicação do ajuste fino (i).**



**Figura 37 – Mosaico de imagens sem a aplicação do ajuste fino. Imagem 13 à direita, imagens 18 e 19 à esquerda inferior e superior, respectivamente e imagem 14 ao centro.**





**Figura 38 – Mosaico de imagens com a aplicação do ajuste fino. Imagem 13 à direita, imagens 18 e 19 à esquerda inferior e superior, respectivamente e imagem 14 ao centro.**

O critério usado para a aprovação do ajuste fino, ou seja, a validação do fator de ajuste encontrado, foi a inspeção visual da união das imagens após a aplicação do fator de ajuste.

Tanto o mosaico apresentado na Figura 36 quanto o mosaico apresentado na Figura 38, foram gerados utilizando-se fatores de ajuste obtidos pela detecção de similaridade através da soma das diferenças absolutas, por este método apresentar resultados melhores que a correlação de fase por FFT.

Na Tabela 5 são mostradas as coordenadas originais das imagens 14, 13, 18 e 19, bem como os fatores de ajuste obtidos através da detecção de similaridade entre as amostras.

**Tabela 5: Coordenadas originais e fatores de ajuste obtidos por detecção de similaridade.**

Imagem	Coordenada em X	Fator de Correção a ser aplicado em X	Coordenada em Y	Fator de Correção a ser aplicado em Y
14	2960	0	2624	0
13	2952	-1	2216	+28
18	3472	-37	2912	-28
19	2456	+31	2880	-25

Na Tabela 6 são mostradas as coordenadas originais das imagens 14, 13, 18 e 19, bem como os fatores de ajuste obtidos através da correlação de fase entre as amostras. Dentre os quatro experimentos mostrados na Tabela 6, apenas a imagem 18 obteve resultado satisfatório, mostrando que o método da correlação de fase não foi robusto o suficiente para superar o ruído encontrado nestas imagens.

**Tabela 6: Coordenadas originais e fatores de ajuste obtidos por correlação de fase.**

Imagem	Coordenada em X	Fator de Correção a ser aplicado em X	Coordenada em Y	Fator de Correção a ser aplicado em Y
14	2960	0	2624	0
13	2952	-127	2216	+48
18	3472	-35	2912	-26
19	2456	+85	2880	+3

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho é proposto um método de controle de posicionamento para aquisição de imagens ao microscópio através da localização de imagens usando processamento de imagens. O método abrange a solução dos problemas de: falta de controle de posicionamento para a aquisição de imagens ao microscópio; limitação do campo de visão do microscópio; e redução de características indesejadas das imagens adquiridas ao microscópio.

A aplicação de sub-amostragem mostrou-se eficiente na redução de tempo no processamento. Por exemplo, com o uso de 80 pontos brancos na sub-amostragem obteve-se a redução do tempo de 48s (todos os pontos) para 0,8s, apresentando um erro médio, de distância euclidiana entre a localização exata e o ponto localizado, de 0,70 pixel, com desvio padrão de 0,62 pixel. Este experimento foi feito em um microcomputador Pentium III de 900 MHz com 1 GB de memória RAM.

O método de validação desenvolvido para o monitoramento da qualidade das localizações obteve o desempenho esperado. Constatou-se a ocorrência de três tipos de resultado na validação: validação de localização correta, invalidação de localização correta e invalidação de localização errada. Os experimentos realizados mostraram a seletividade quanto à qualidade da imagem. Por exemplo, a invalidação de uma localização correta devido à qualidade inferior da imagem utilizada no teste (imagem 8 do banco de imagens). A imagem 8 apresenta estar levemente fora de foco em comparação com as demais imagens do banco de teste, tornando aceitável o comportamento do programa ao rejeitar esta aquisição.

A composição de mosaico com as imagens adquiridas mostrou ser uma solução apropriada para a limitação do campo de visão do microscópio, além disso, é eficaz na redução do número de imagens parciais de células, presente nas bordas das imagens. O ajuste

fino, necessário para composição do mosaico, feito por detecção de similaridade através da soma das diferenças absolutas, obteve melhores resultados que o ajuste fino feito por correlação de fase usando a FFT. O ajuste fino feito por correlação de fase usando a FFT apresentou falha devido ao ruído, presente nas imagens utilizadas.

A transformação das imagens de RGB para escala de cinza reduziu em 66,66% o tempo do processamento da localização, a subtração de fundo eliminou artefatos e melhorou a distribuição de iluminação das imagens, a redução das imagens ampliadas adequou as mesmas às dimensões do mapa para a localização, o estiramento do histograma aumentou o contraste das imagens melhorando a escolha do limiar para a binarização e a binarização reduziu ainda mais o tempo do processamento da localização, com uma redução de 37,66%.

Os trabalhos futuros sugeridos são: o teste do limiar de erro em lugar do critério do valor de ponto central, na detecção de similaridade; a implementação de um método para a homogeneização da luminância na área de sobreposição das imagens que compõe o mosaico, reduzindo as diferenças de luminosidade entre as imagens; a avaliação de qual a melhor seqüência para a montagem do mosaico e; teste em outras aplicações para o método.

## REFERÊNCIAS

- ARKIN, C. F. et al. Methods for reticulocyte counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline-Second Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS)**. Pennsylvania, USA, v. 24, n. 8, 2004.
- BAO, P.; XU, D. Panoramic image mosaics via complex wavelet pyramid. In: IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON SYSTEMS, MAN, AND CYBERNETICS, 1998, Piscataway. **Proceedings...** Piscataway: IEEE, oct. 1998, p. 4614-19, v.5.
- BOSSERT, O. A Java software for creation of image mosaics. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**. Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 159-161, agu. 2004.
- BROWN, L. G. A Survey of image registration techniques. **ACM Computing Surveys**, [S.l.], v. 24, n. 4, p. 325-376, dec. 1992.
- BROWN, M.; WITTWERA, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry**. Washington, v.46, p.1221-1229, agu. 2000.
- COX, G. S.; DE JAGER, G. A Survey of point pattern matching techniques and a new approach to point pattern recognition. In: SYMPOSIUM ON COMMUNICATIONS AND SIGNAL PROCESSING, (COMSIG), 1992, Cape Town. **Proceedings...** New York: IEEE, p. 243-248, sept. 1992.
- FEDOROV, D., et al. System for automatic registration of remote sensing images. In: IEEE INTERNATIONAL GEOSCIENCE AND REMOTE SENSING SYMPOSIUM, (IGARSS), 2002, Toronto. **Proceedings...** Piscataway: IEEE, p. 2459-2461, june 2002, v.4.
- FIGUEIRO, T., et al. A Method for automatic detection of blood cells on images using image correlation and connected components. In: WORKSHOP DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM COMPUTAÇÃO GRÁFICA E PROCESSAMENTO DE IMAGENS (WICCGPI), 1., 2003, São Carlos. **Anais...**, São Carlos: [s.n.], oct. 2003. 1 CD-ROM.
- FIGUEIRO, T., et al. LaPSI image processing library: lili. In: SEMINÁRIO INTERNO DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA. **Anais...**, Porto Alegre: SIDEE, set. 2004.
- FONSECA, L. M. G.; KENNEY, C. S. Control point assessment for image registration. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON COMPUTER GRAPHICS AND IMAGE PROCESSING, 12., (SIBGRAPI), 1999, Campinas. **Proceedings...** Campinas: SIBGRAPI, p.125-132, oct. 1999.
- FOROOSH, H.; ZERUBIA, J. B.; BERTHOD, M. Extension of phase correlation to subpixel registration. **IEEE Transactions on Image Processing**, New York, v. 11, p. 188-200, mar. 2002.

GONZALES, R. C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. Massachusetts: Addison - Wesley Pub. Company, 1992. 716p. ISBN 0-201-50803-6

GLEDHILL D., et al. Panoramic imaging: a review. **Computers & Graphics**. Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 435-445, june 2003.

GUIMARÃES, L. V. **Segmentation and Decomposition Techniques Applied to Blood Cell Images**. 2002. (Doctor thesis), Muroran Institute of Technology, Muroran, Japan, mar. 2002.

HADJIDEMETRIOU, E.; NAYAR, S. K. Appearance matching with partial data, In: DARPA IMAGE UNDERSTANDING WORKSHOP, 1998, Monterey, CA. **Proceedings...** Monterey: Ed. San Francisco - Morgan Kaufmann Publishers, p. 1071-1078, nov. 1998.

HOGUE, W. S. A Subspace identification extension to the phase correlation method. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, New York, v. 22, p. 277-280, feb. 2003.

HOGUE, W. S.; MAMATA, H.; MAIER, S. E. Efficient construction of histology slide mosaics via phase correlation registration of high resolution tiles. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON IMAGE PROCESSING, IEEE, 2003, Barcelona, Spain. **Proceedings...** Piscataway: IEEE, p. 1117-1120, sept. 2003.

HSIEH, Jun-Wei Fast stitching algorithm for moving object detection and mosaic construction. **Image and Vision Computing**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 291-306, apr. 2004.

KANATANI, K.; OHTA, N. Accuracy bounds and optimal computation of homography for image mosaicing applications. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTER VISION, 7., (ICCV), 1999, Kerkyra, Greece. **Proceedings...** Kerkyra, Greece: IEEE, p. 73-78, sept. 1999, v.1.

KANATANI, K.; OHTA, N.; KANAZAWA, Y. Optimal homography computation with a reliability measure. **IEICE Transactions on Information and Systems**, Tokyo, v. E83-D, n. 7, p.1369-1374, 2000.

KANAZAWA, Y.; KANATANI, K. Image mosaicing by stratified matching. **Image and Vision Computing**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 93-103, feb. 2004.

KESSLER, C. et al. Immature reticulocyte fraction and reticulocyte maturity index. **Beckman Coulter, Inc.** Disponível em: <<http://www.beckman.com/literature/ClinDiag/recticliterature.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2005.

KHOSRAVI, M.; SCHAFER, R. W. Template matching based on a grayscale hit-or-miss transform. **IEEE Transactions on Image Processing**, New York, v. 5, n. 6, p. 1060-1066, june 1996.

KIM, T.; IM, Yong-Jo. Automatic satellite image registration by combination of matching and random sample consensus. **IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing**. New York, v. 41, n. 5, Part 2, p. 1111-1117, may 2003.

KOYA, T. K. **Sistema Automático de Contagem de Células Sangüíneas**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia), PPGEM, UFRGS, Porto Alegre, 2001.

KOUROGI, M., et al. Real-time image mosaicing from a video sequence. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON IMAGE PROCESSING, (ICIP), 1999, Kobe, Japan. **Proceedings...** Kobe, Japan: p. 133-137, oct. 1999, v.4.

KUGLIN, C. D.; HINES, D. C. The phase correlation image alignment method. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CYBERNETICS AND SOCIETY, 1975, San Francisco, CA. **Proceedings...** Pistaway: IEEE, p. 163-165, setp. 1975.

LAMCHIAGDHASE, P.; PATTANAPANYASAT, K.; MUANGSUP, W. Reticulocyte counting in thalassemia using different automated technologies. **Laboratory Hematology**. Charlottesville, VA, USA: Carden Jennings Publishing Co., Ltd., v. 6, n. 2, p. 73-78, july 2000.

LILI **Biblioteca de Funções para Processamento de Imagens**. LaPSI, DELET, UFRGS. Disponível em <<http://www.lapsi.eletr.ufrgs.br/lili/>>. Acesso em: 08 fev. 2005.

LOPES, M. L. Método para alinhamento rápido e robusto de imagens de ecocardiografia por contraste de microbolhas. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 3., (CLAEB), 2004, João Pessoa. IFMBE **Anais...** João Pessoa: IFMBE, set. 2004. 1 CD-ROM.

MACHADO, E. de L.; FREITAS, R. A. C.; SCHNEEBELI, H. A. Construção de mosaicos de imagens em plataformas robóticas com auxílio de informações sensoriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AUTOMÁTICA, 15., (CBA), 2004, Gramado. **Anais...** Gramado: CBA, Gramado, set. 2004. 1 CD-ROM.

MAINTZ, J. B. A.; VIERGEVER, M. A. A Survey of medical image registration. **Medical Image Analysis**. [s.l.]: Oxford University Press, v.2, n.1, pp.1-37, 1998. Disponível em: <<http://citeseer.ist.psu.edu/maintz98survey.html>>. Acesso em: 20 Apr. 2005.

MCGUIRE, M.; STONE, H. S. Techniques for multiresolution image registration in the presence of occlusions. **IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing**. New York, v. 38, n. 3, p. 1476-1479, may 2000.

MEIJERING, E. H. W. A Fast image registration technique for motion artifact reduction in DSA, In: IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON IMAGE PROCESSING, (ICIP), 1999, Los Alamitos. **Proceedings...** Pistaway: IEEE, p. 435-439. oct. 1999. v.3.

MOUNT, D. M.; NETANYAHU, N. S.; MOIGNE, J. L. Efficient algorithms for robust feature matching. **Pattern Recognition**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 17-38, jan. 1999.

MUSTAFA A. A. Y. Optimum template selection for image registration using ICMM. In: BRITISH MACHINE VISION CONFERENCE, 9., 1998, Southampton, Hampshire, UK. **On-Line Proceedings...** Disponível em: <<http://www.bmva.ac.uk/bmvc/1998/papers/d130/h130.htm>>. Acesso em: 26 de Janeiro de 2005.

NAIR, D.; WENZEL, L. Image processing and low discrepancy sequences. In: ADVANCED SIGNAL PROCESSING ALGORITHMS, ARCHITECTURES, AND IMPLEMENTATIONS, 9., 1999, [S.l.]. **Proceedings...** [S.l.]: SPIE, p. 102-111, july 1999. v. 3807.

PILU, M.; ISGRO', F. Fast and robust planar registration by early consensus with applications to document stitching. In: WORKSHOP ON APPLICATIONS OF COMPUTER VISION, 6., (WACV), 2002, [S.l.]. **Proceedings...** Piscataway: IEEE, p. 245-250, dec. 2002.

PRELOŽNIK-ZUPAN, I.; ČERNELČ, P.; ŽONTAR, D. Reticulocyte analysis using light microscopy and two different flow cytometric procedures. **European Journal of Physiology**. Berlin, Germany: Springer-Verlag GmbH, v. 440, n. 7, p. R185-R187, jan. 2000.

PROJETO RETICULÓCITOS. **Ferramenta de Auxílio à Identificação e Contagem de Células do Sangue.**, em desenvolvimento no LaPSI, DELET, UFRGS. Disponível em: <<http://www.lapsi.eletr.ufrgs.br/projetos/reticulocitos/retic.htm>>. Acesso em: 08 fev. 2005.

REDDY, B. S.; CHATTERJI, B. N. An FFT-based technique for translation, rotation, and scale-invariant image registration. **IEEE Transactions on Image Processing**, New York, v. 5, n. 8, p. 1266-1271, aug. 1996.

SCHILS, G. F. A statistical algorithm for efficient computation of correlations. **IEEE Transactions on Signal Processing**, New York, v. 40, n. 11, p. 2857-2863, nov. 1992.

SCHUCH, N. et al. Sistema de aquisição de imagens para uso em microscopia óptica. In: SEMINÁRIO INTERNO DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA. **Anais...** Porto Alegre: SIDEE, set. 2004.

SHEKARFOROUSH, H.; BERTHOD, M.; ZERUBIA, J. Subpixel image registration by estimating the polyphase decomposition of cross power spectrum. In: COMPUTER VISION AND PATTERN RECOGNITION, (CVPR), 1996, San Francisco. **Proceedings...** Piscataway: IEEE, june 1996.

STONE, H. S. A Fast direct fourier-based algorithm for subpixel registration of images. **IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing**. New York, v. 39, n. 10, p. 2235-2243, oct. 2001.

TIAN, G. Y.; GLEDHILL, D.; TAYLOR D. Comprehensive interest points based imaging mosaic. **Pattern Recognition Letters**. Amsterdam, v. 24, n. 9-10, p. 1171-1179, june 2003.

ZITOVÁ, B.; FLUSSER, J. Image registration methods: a survey. **Image and Vision Computing**, Amsterdam, v. 21, n. 11, p. 977-1000, oct. 2003.