



Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP - Escola de Minas - Colegiado do curso de Engenharia de Controle e Automação - CECAU



Jéssica Ferreira Soares

Contagem Automática do Parasito *Trypanosoma cruzi* Utilizando Processamento de Imagens

Monografia de Graduação em Engenharia de Controle e Automação

Ouro Preto, 2017

Jéssica Ferreira Soares

**Contagem Automática do Parasito *Trypanosoma cruzi* Utilizando
Processamento de Imagens**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Controle e Automação da Universidade Federal de Ouro Preto como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Engenharia de Controle e Automação.

Orientador: Profa. Andrea Gomes Campos Bianchi, PhD.

Coorientador: Prof. Agnaldo José da Rocha Reis, PhD.

Ouro Preto, 2017

Jéssica Ferreira Soares

Contagem Automática do Parasito *Trypanosoma cruzi* Utilizando Processamento de Imagens/ Jéssica Ferreira Soares. – Ouro Preto, 2017-78 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Profa. Andrea Gomes Campos Bianchi, PhD.

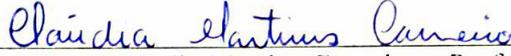
Monografia de Graduação em Engenharia de Controle e Automação – Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP - Escola de Minas - Colegiado do curso de Engenharia de Controle e Automação - CECAU, 2017.

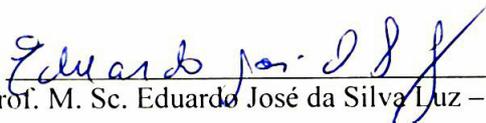
1. Detecção de movimento. 2. *Trypanosoma cruzi*. I. Profa. Andrea Gomes Campos Bianchi, PhD.. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Escola de Minas. IV. Contagem Automática do Parasito *Trypanosoma cruzi* Utilizando Processamento de Imagens

CDU 02:141:005.7

Monografia defendida e aprovada, em 19 de julho de 2017, pela comissão avaliadora constituída pelos professores:


Profª. Dra. Andrea Gomes Campos Bianchi - Orientadora


Profª. Dra. Cláudia Martins Carneiro – Professora Convidada


Prof. M. Sc. Eduardo José da Silva Luz – Professor Convidado


Profª. Dra. Karla Boaventura Pimenta Palmieri – Professora Convidada

Ouro Preto, 2017

*"Este trabalho é dedicado às crianças adultas que,
quando pequenas, sonharam em se tornar cientistas."(Autor desconhecido)*

Agradecimentos

Agradecimentos especiais à Profa Dra. Cláudia Martins Carneiro que forneceu todo o material necessário para a captura dos vídeos utilizados nesse trabalho, além de proporcionar grande suporte para a compreensão biológica do problema a ser abordado em conjunto com sua equipe do LIMP. Agradeço a minha orientadora Profa Dra. Andrea Gomes Campos Bianchi por todo conhecimento que adquiri nesses meses de trabalho, por me incentivar a seguir na carreira de pesquisadora e me fazer gostar cada vez mais de processamento digital de imagens e visão computacional. Agradeço ao meu co-orientador Prof Dr. Agnaldo José da Rocha Reis pelo suporte e orientações sobre pesquisa, carreira acadêmica e mercado de trabalho. Agradeço a Profa. Dra. Karla Boaventura Pimenta Palmieri, minha orientadora na equipe Rodetas, por acreditar no meu potencial desde o início do curso e sempre me estimular a ir além.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original" (Albert Einstein)

Resumo

A automação está se tornando a cada dia mais presente na vida das pessoas, otimizando processos, poupando profissionais na realização de tarefas repetitivas ou de auto risco. Nesse sentido, técnicas de processamento digital de imagens vem ganhando cada vez mais espaço, considerando o grande número de aplicações que vão desde o processamento de imagens médicas até o monitoramento de atividades industriais. Com o objetivo de automatizar um problema real através de técnicas de processamento de imagens, esse trabalho propõe uma solução automática para a contagem do parasito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em meio de cultura e uma breve análise do mesmo parasito em amostras de sangue para experimentos realizados no Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP. Atualmente esse procedimento é feito de forma manual, demandando envolvimento total do pesquisador que tem o auxílio de um contador estatístico para monitorar a tarefa. A solução para essa questão deve ser de baixo custo e prática para o pesquisador, porém existem poucas abordagens na literatura para identificação do *T. cruzi*, sendo elas baseadas na variação de velocidade do parasito. Todavia, tanto no vídeo de amostras de sangue quanto em meio de cultura, o parasito apresenta baixo contraste o que dificulta sua detecção. Para resolver o problema, serão usadas metodologias que possibilitem identificar uma característica inerente ao parasito: o seu movimento. Com o objetivo de identificar o deslocamento dos objetos na cena, foram utilizadas as abordagens de *background subtraction* combinada com *optical flow* e *Gaussian Mixture Model* (GMM) para comparar com a primeira solução. Foram feitos experimentos com diversas concentrações de amostras em meio de cultura, onde a principal, Berenice 78, foi diluída em proporções 1:2, 1:10 e 1:100. O resultado da sensibilidade obtido para cada um desses experimentos com o algoritmo de *background subtraction* com *optical flow* foi 40%, 91%, 85% e 45% respectivamente. Para o modelo de GMM, os valores de sensibilidade foram 73%, 90%, 81% e 86%. Apesar da boa performance do GMM, essa abordagem detecta um maior número de falsos positivos, sendo assim o primeiro método mais eficaz que o segundo.

Palavras-chaves: detecção de movimento. *Trypanosoma cruzi*. processamento de imagens. visão computacional. *tracking*. reconhecimento de padrões.

Abstract

Automation is becoming more and more present in people's lives, making processes safer, saving professionals in performing repetitive tasks or self-hazards. In this sense, digital image processing techniques have been gaining more and more space, considering a large number of applications ranging from medical image processing to monitoring industrial activities. In order to automate a real problem through image processing techniques, this work proposes an automatic solution for *T. cruzi* parasite counts in culture medium and a brief analysis of the same parasite in blood samples from experiments performed at the Laboratory of Immunopathology at NUPEB/UFOP. Nowadays this procedure is manually performed, demanding total involvement by the researcher who uses a statistical counter to help in the task supervision. The solution for this issue must be low cost and practical for the researcher however, there are few approaches in the literature to identify the parasite *T. cruzi*. For this, we will use methodologies that allow us to identify a characteristic inherent to *T. cruzi*: its movement. In order to identify the objects' displacement in the scene, the approach *background subtraction* was combined with *optical flow* and *Gaussian Mixture Model* was applied to the matter of comparison. Experiments were performed with different concentrations of samples in a culture medium, which Berenice 78 was diluted in proportions 1:2, 1:10, and 1:100. The results of the sensibility acquired for each one of these experiments with the algorithm *background subtraction* with *optical flow* were 40%, 91%, 85% e 45% respectively. For GMM, the values of sensibility were 73%, 90%, 81% e 86%. Despite the good performance of GMM, this methodology detects a higher number of false positives, therefore the first method is better than the second one.

Key-words: motion detection. *Trypanosoma cruzi*. image processing. computer vision. tracking.

Lista de ilustrações

Figura 1	Etapas do processamento de imagem para amostras de sangue com <i>T.cruzi</i>	28
Figura 2	Amostra de sangue infectado pelo <i>L.loa microfilariae</i>	30
Figura 3	Esquema do <i>hardware</i> - <i>CellScope Loa</i>	31
Figura 4	Fluxograma de funcionamento do algoritmo <i>L.loa microfilariae</i>	32
Figura 5	<i>Optic flow field</i>	40
Figura 6	Análise de amostra com parasito <i>T. cruzi</i>	44
Figura 7	Câmera anexada ao ocular do microscópio	44
Figura 8	Fluxograma do algoritmo de Subtração de Background	46
Figura 9	Resultado do método <i>background subtraction</i>	47
Figura 10	Identificação de objetos em movimento com <i>Gaussian Mixture Model</i>	48
Figura 11	Objeto se deslocando para baixo - <i>Optical Flow</i> Horn-Schunck	52
Figura 12	Objeto se deslocando para baixo - <i>Optical Flow</i> Lucas-Kanade	52
Figura 13	Objeto se deslocando para baixo - <i>Optical Flow</i> Lucas-Kanade com derivada Gaussiana (NumFrame = 3)	53
Figura 14	Mapa de cores - Propriedades <i>optical flow</i>	57
Figura 15	Gráfico <i>clusters K-means</i>	60
Figura 16	Amostra de parasitos <i>T. cruzi</i> em meio de cultura, sem hemácias	61
Figura 17	Resultados das técnicas para realçar o contraste dos parasitos	62
Figura 18	Subtração de imagem	63
Figura 19	Dilatação utilizando <i>kernel 3x3</i>	64
Figura 20	Dilatação da imagem diferença	64
Figura 21	<i>Optical Flow</i>	65
Figura 22	Detecção do parasito	66

Lista de tabelas

Tabela 1	Parâmetros para análise de algoritmos	69
Tabela 2	Resultado da análise dos algoritmos de detecção de movimento	69

Lista de abreviaturas e siglas

PDI	Processamento Digital de Imagens
NUPEB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
LIMP	Laboratório de Imunopatologia
FOV	<i>Field of View</i>
FBM	<i>Flesh Blood Mounts</i>
FOE	<i>Focus of Expansion</i>
MOROFA	<i>Moving Object Recognition by Optical Flow Analysis</i>
GMM	<i>Gaussian Mixture Model</i>
GT	<i>Ground Truth</i>
TP	<i>True positive</i>
TN	<i>True negative</i>
FN	<i>False negative</i>
FP	<i>False positive</i>
TPR	<i>True positive rate</i>
FPR	<i>False positive rate</i>

Sumário

1	Introdução	23
1.1	Motivação	23
1.2	Objetivo	24
1.3	Organização do texto	24
2	Trabalhos Relacionados	27
2.1	Detecção optica do <i>Trypanosoma cruzi</i> em amostra de sangue	27
2.2	Testes em laboratório remoto utilizando o <i>CellScope Loa</i>	29
2.3	Estudo da motilidade do <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
3	Referencial Teórico	37
3.1	<i>Gaussian Mixture Model</i>	37
3.2	<i>Optical Flow</i>	39
4	Metodologia	43
4.1	Aquisição de material biológico para análise	43
4.2	Análise do vídeo de amostra de sangue com parasitos	45
4.2.1	<i>Background Subtraction</i>	45
4.2.2	<i>Gaussian Mixture Model (GMM)</i>	47
4.2.3	<i>Tracking Kalman Filter</i>	49
4.2.4	<i>Optical Flow</i>	50
4.2.5	Rotina de Busca Robusta	54
4.2.6	Mapa de cores	55
4.2.7	Classificador	57
4.3	Análise do vídeo com parasitos em meio de cultura	60
4.3.1	Tratamento de imagens	60
4.3.2	<i>Background Subtraction</i>	62
4.3.3	<i>Optical Flow</i>	64
4.3.4	Combinação de Métodos para Detecção de Movimento	65
4.3.5	<i>Gaussian Mixture Model</i>	66
5	Resultados	67
6	Conclusão	71
6.1	Vídeos de amostra de sangue com parasitos	71
6.2	Vídeos de cultura com <i>Trypanosoma cruzi</i>	72

7 Sugestões de trabalhos futuros	73
7.1 Vídeos de amostra de sangue com parasitos	73
7.2 Vídeos de cultura com <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
Referências	77

1 Introdução

1.1 Motivação

A área de Processamento digital de Imagens (PDI) se refere ao processamento de imagens através de um computador tendo como retorno uma imagem modificada (GONZALEZ; WOODS, 2008). Por meio do PDI, é possível melhorar a qualidade de uma imagem, extrair características, e reconhecer objetos (análise de imagem), além de executar funções cognitivas geralmente associadas à visão (visão computacional) (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Sob o mesmo ponto de vista, a visão humana é sensorialmente avançada, portanto as imagens têm extrema importância na percepção das pessoas. Diferentemente dos seres humanos que só podem identificar uma faixa específica do espectro eletromagnético, existem máquinas que são capazes de cobrir praticamente todo o espectro. Entre elas estão os ultrassons, microscópios e os computadores geradores de imagem (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Em outras palavras, o uso de computadores e outros equipamentos é vantajoso para superar as limitações da visão humana, proporcionando o desenvolvimento de diversos campos, desde imagens industriais, de materiais até imagens biológicas. No que diz respeito a biologia, podemos destacar as análises microscópicas do sangue humano para a identificação de doenças. Nesse processo é possível identificar micro organismos que são importantes para a realização de diagnósticos em laboratórios (ALANIS et al., 2001).

Nesse contexto, o Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP tem trabalhado em amostras de sangue de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. O projeto investiga a resposta dos parasitos frente a atuação de diferentes medicamentos. Uma das atividades realizadas envolve a quantificação de parasitos no sangue dos camundongos antes, durante e após o tratamento, visando avaliar o efeito do tratamento sobre a carga parasitária. Para isso, camundongos são infectados com esse micro organismo e depois são submetidos aos diferentes protocolos de tratamento. Diariamente são coletados 5 microlitros de sangue de cada camundongo que é colocado entre lâmina e lamínula e manualmente são contados o número de parasitos em 50 campos microscópicos.

Para o procedimento descrito, tal tarefa requer várias horas de trabalho humano, que torna a pesquisa cansativa e suscetível a erros. Portanto um sistema de identificação e

contagem automática de parasitos seria ideal para essa aplicação (ALANIS et al., 2001).

De acordo com abordagens propostas na literatura, a identificação do parasito é geralmente feita com base na sua morfologia e cor. Entretanto, as imagens obtidas do parasito *T. cruzi* apresentam baixo contraste, sendo mais fácil identificar sua presença através do seu movimento, que é intenso em amostras de sangue recém coletadas.

Logo, afim de propor uma solução prática e de baixo custo como alternativa aos métodos já existentes, este projeto consiste no desenvolvimento de um algoritmo que seja capaz de analisar amostras de sangue provenientes de camundongos infectados com o parasito *T. cruzi* ou em meio de cultura de forma eficiente.

1.2 Objetivo

O objetivo desse trabalho é apresentar uma solução para a detecção do parasito *T. cruzi* utilizando métodos de detecção de movimento e processamento digital das imagens. Com base nas informações de velocidade, localização, e mudança nos valores de intensidade dos pixels, pretende-se definir qual conjunto de dados melhor define o movimento do objeto em questão.

Afim de automatizar a contagem que atualmente é feita de forma manual, é necessário fazer a análise computacional do vídeo que mostra os campos da lâmina de cultura ou sangue. Utilizando métodos de segmentação é possível distinguir o *T. cruzi* das hemácias presentes no meio, no caso das amostras em sangue. Para isso, observa-se uma característica inerente ao parasito: seu movimento com uma velocidade diferenciada dos demais elementos da amostra.

Para verificar a eficiência do método será feita uma contagem manual que sirva de comparação com a contagem realizada pelo algoritmo. As características extraídas de cada *frame* do vídeo devem ser combinadas para identificar, caracterizar e rastrear o *T. cruzi* na amostra de sangue ou cultura, sendo que esse segundo tipo de amostra não contém hemácias.

1.3 Organização do texto

Esse trabalho está organizado em sete capítulos, sendo que cada deles apresenta:

2. **Trabalhos Relacionados:** Trabalhos existentes na literatura para identificação e contagem do parasito *T. cruzi* ou similares através de técnicas de visão computacional e processamento de imagens em vídeos;
3. **Referencial Teórico:** Estudo dos métodos presentes na literatura para a detecção de objetos em movimento e informações sobre a motilidade do *T. cruzi*;

4. **Metodologia:** Métodos aplicados para implementar algoritmos para a detecção de parasitos em vídeos de amostras de sangue e de cultura;
5. **Resultados:** Análise dos vídeos e contagem automática dos parasitos, assim como a eficiência do algoritmo;
6. **Conclusão:** Considerações finais sobre o trabalho apresentado;
7. **Sugestões de trabalhos futuros:** Dicas sobre o que poderia ser implementado para obtenção de melhores resultados.

2 Trabalhos Relacionados

2.1 Detecção óptica do *Trypanosoma cruzi* em amostra de sangue

De acordo com [Alanis et al. \(2004\)](#), existem diversos métodos de observações microscópicas com aplicações importantes na medicina. É possível citar como exemplo, a quantificação e análise de células de sangue em procedimentos de laboratório. Além disso, a detecção de microorganismos é importante para diagnósticos de doenças, sendo que algumas delas podem ser identificados no sangue. Hemoparasitas como *Trypanosoma cruzi* e Filária podem ser identificados pelo seu movimento em amostras de sangue fresco (FBM – *Fresh Blood Mounts*).

Em vista disto, o artigo *Optical detection of Trypanosoma cruzi in blood samples, for diagnosis purposes* foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores da Universidad Nacional de Salta, com o objetivo de detectar o parasito *T. cruzi* em amostras de sangue de camundongos infectados. Esse método foi elaborado para que futuramente, seja possível fazer diagnósticos de *T. cruzi* em sangue de seres humanos.

Na abordagem proposta pelos autores, a amostra de sangue é analisada pelo microscópio, e as imagens do campo de visão são capturadas por uma câmera CCD, que temporariamente armazena as imagens em um computador. Várias imagens são obtidas de cada campo de visão (FOV- *Field of View*), e as mesmas são submetidas a um processamento que executa a diferenciação temporal para detectar o parasito.

Assim, o processo continua até que toda área da amostra seja escaneada ou até que um parasito seja detectado. No último caso, um alerta é emitido para que um profissional possa conferir o resultado visualmente. A seguir, será apresentada a comparação entre o método visual e o automático para maior compreensão do funcionamento e dos desafios que cada um oferece e também como [Alanis et al. \(2004\)](#) utilizaram técnicas de processamento de imagens para automatizar o processo.

Método Visual

Durante os experimentos, os pesquisadores constataram que o microorganismo possui baixo contraste, o que dificulta a sua visualização. Entretanto, observa-se o seu movimento diferenciado afeta as hemácias ao seu redor que são originalmente estáticas, sendo essa informação útil para sua localização. Apesar do método manual ser empregado atualmente, ele possui desvantagens por ser cansativo e demorado, podendo ser simplificado

por um sistema optico automático.

Método Automático

Na análise automática, a amostra de sangue é deslocada com ajuda de dois motores de passo, de modo que eles se movimentem em um plano xy para escanear toda a amostra com intuito de fazer a aquisição de várias imagens através de um sensor CCD proveniente de uma câmera monocromática de TV. O método de detecção é baseado no movimento: A imagem do *frame* atual é subtraída da imagem anterior para se obter uma terceira imagem em nível de cinza onde os locais de maior intensidade representam a localização do parasito.

A aquisição e processamento de imagem pode ser descritos de acordo com os seguintes passos:

1. Subtração de *frames* em pares, que apresentam níveis de cinza mais altos em áreas onde o parasito *T. cruzi* se encontra;
2. Aplicar *convolution filter* para aumentar contraste; entre fundo e áreas de movimentação do parasito;
3. Fazer binarização da imagem;
4. Aplicar operação de dilatação.

Caso a imagem apresente o parasito *T. cruzi* ela terá áreas em branco como pode ser observado na *Figura 4(d)*; caso contrário a imagem será totalmente preta visto que não existe região com movimento.

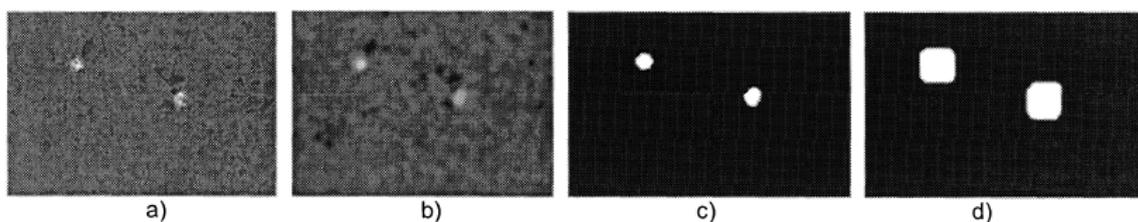


Figura 1 – Etapas do processamento de imagem para amostras de sangue com *T. cruzi*

Fonte: [Alanis et al. \(2004\)](#)

Resultados

O algoritmo leva 2s para processar cada campo FOV e todo o processo leva aproximadamente 1h30min, visto que para cobrir toda a área é necessário avaliar 2700 FOV. Esse tempo pode ser reduzido aumentando a área do campo de visão, usando um processador mais rápido ou otimizando o programa para trabalhos futuros.

Comparação com o problema abordado

Nos vídeos utilizados por [Alanis et al. \(2004\)](#), as hemácias são praticamente estáticas, portanto a operação de *background subtraction* irá resultar em uma imagem em nível de cinza onde apenas as hemácias com as quais o parasito se choca estarão visíveis. Entretanto, no problema apresentado nesse trabalho, as hemácias também se movimentam em um fluido devido a pressão entre lâmina e lamínula. Portanto, há movimento em várias regiões do campo de visão além daquelas que correspondem a localização do *T. cruzi*, o que torna o trabalho mais complexo e requer técnicas mais avançadas para a obtenção de resultados satisfatórios. Além disso, não foi possível encontrar a base de dados utilizada por [Alanis et al. \(2004\)](#) para a realização de experimentos iniciais e para ser utilizado como critério de comparação com as outras metodologias que serão propostas na seção 4 deste texto.

2.2 Testes em laboratório remoto utilizando o *CellScope Loa*

Doenças causadas por helmintos parasitários podem ser debilitantes e afetam milhões de pessoas, principalmente em lugares mais pobres e com poucos recursos. Esforços são feitos para erradicar oncocercose e filariase linfática na África do Central, através de programas de medicação em massa para pacientes infectados pelo parasito filarial *Loa loa*. Por isso, utiliza-se a estratégia *test and (not) treat*, cujo objetivo é quantificar os parasitos presentes no sangue de um indivíduo e a partir dessa informação decidir se ele deve ser tratado ou não. Pessoas com alto nível de *L. loa* podem correr risco de vida 2 ou 3 dias após a medicação e por isso devem ser excluídas do tratamento em massa ([D'AMBROSIO et al., 2015](#)).

De acordo com [D'Ambrosio et al. \(2015\)](#), os métodos existentes para quantificar o parasito *L.loa microfilariae* não são rápidos ou adequados. Atualmente o melhor método requer contagem manual dos parasitos em um volume definido de sangue, sendo executado por um profissional treinado que trabalha com auxílio da luz de um microscópio comum. Tal procedimento demanda equipamentos de laboratório que muitas vezes não estão disponíveis na região onde os programas de medicação são executados. Nesse contexto, o acompanhamento de pacientes se torna inviável.

Com o objetivo de propor uma alternativa para o procedimento de análise sanguínea em questão, outros métodos de quantificação foram desenvolvidos, dos quais podemos citar o método molecular. Entretanto, esse procedimento é custoso e requer transporte de amostras para laboratórios e uso de equipamentos caros, o que torna o processo impraticável (D'AMBROSIO et al., 2015).

Para solucionar o problema citado anteriormente, D'Ambrosio et al. (2015) desenvolveu um sistema para análise de imagens microscópicas obtidas por vídeo afim de quantificar automaticamente o número de *L. loa microfilariae*. Esse método foi proposto no artigo *Point-of-care quantification of blood-born filarial parasites with a mobile phone microscope* que será descrito ao decorrer dessa secção.

Primeiramente, amostras de sangue são coletadas no dedo dos pacientes e posteriormente, armazenadas em capilares de vidro para análise. Em seguida, o sistema de *Point-of-Care* (Testes laboratoriais remotos ou testes rápidos) captura e analisa o vídeo da movimentação microfilarial escaneando a amostra de sangue por completo automaticamente. Ele utiliza informações de movimento do parasito *L. loa* como alternativa à ensaios moleculares complexos, preparação de amostra e coloração.

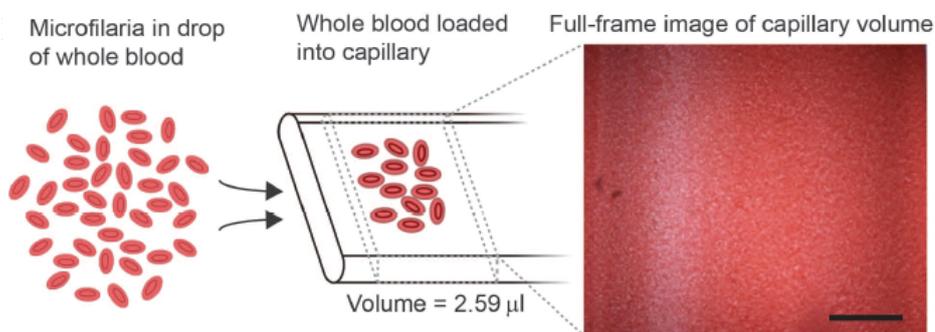


Figura 2 – Amostra de sangue infectado pelo *L.loa microfilariae*

Fonte: D'Ambrosio et al. (2015)

As imagens provenientes do vídeo se encontram ampliadas para análise e através delas, percebe-se que o parasito pode ser detectado pelo seu movimento.

Hardware

CellScope Loa é o nome dado ao dispositivo portátil criado pelos autores para capturar o movimento do *L.Loas* nos programas de medicação em massa. Ele pode ser definido como um microscópio portátil via celular, composto por um Apple iPhone 5s, fazendo uso da câmera desse mesmo dispositivo juntamente com um módulo de lentes reversas para iPhone para captura de imagem e um *array* de diodos emissores de luz

(LEDs) para iluminação.

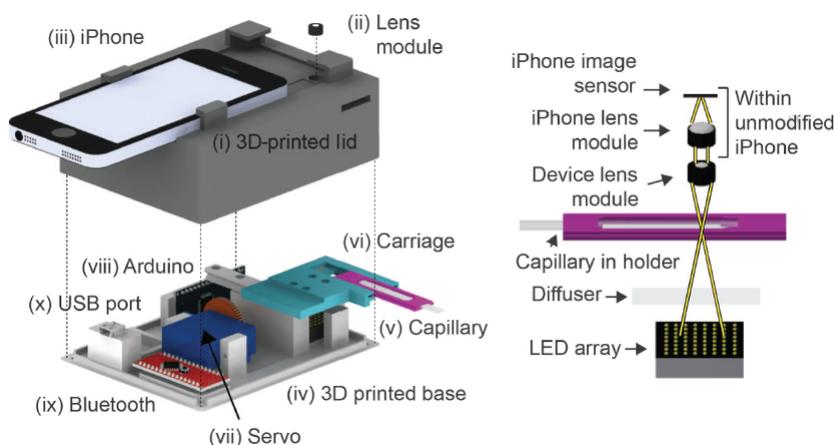


Figura 3 – Esquema do *hardware* - *CellScope Loa*

Fonte: D'Ambrosio et al. (2015)

Aplicativo de celular e descrição do *software*

O aplicativo foi construído através de ferramentas de desenvolvimento da Apple, apresentando diversas instruções ao usuário. O programa grava vídeos de 5s de duração para cada FOV do capilar carregado com sangue. Posteriormente, ele apresenta o resultado do exame (quantificação do *L. loa* e se o paciente deve ser submetido a tratamento ou não). Além disso, o vídeo é armazenado com os respectivos resultados do exame, informações do paciente em questão, informações de data e hora, e posição do GPS para futura avaliação e controle de qualidade.

Em adição à essa ferramenta, o *software* de processamento de imagens para detecção automática de movimento do *L. loa*, foi contruído com base em diversas operações aplicadas nos *frames* dos vídeos obtidos. A descrição desse procedimento, pode ser visto nos passos listados a seguir:

1. O vídeo original de 5s é dividido em 5 vídeos de 1s, para que a imagem diferencial fosse calculada para cada vídeo;
2. A convolução com *kernel* Gaussiano é aplicada na imagem diferencial de cada vídeo para remover ruídos;
3. Uma segunda convolução é aplicada utilizando *mean-subtracted Gaussian* afim de realçar os campos de diferença que se assemelham à uma minhoca ou larva;
4. O algoritmo scaneia toda a imagem com uma caixa de 17x17 pixels usando uma *local peak-finding routine*, de modo que cada parasito tenha apenas um máximo;

5. Soma-se o número de posições independentes dentro do FOV;
6. A estimativa de movimento através do *optical flow de Farneback* é utilizado opcionalmente para detecção de fluxo no capilar para eliminar a detecção de um falso parasito;
7. Esse processo é repetido para os 5 vídeos de 1s até que um número médio de parasitos possa ser estimado.

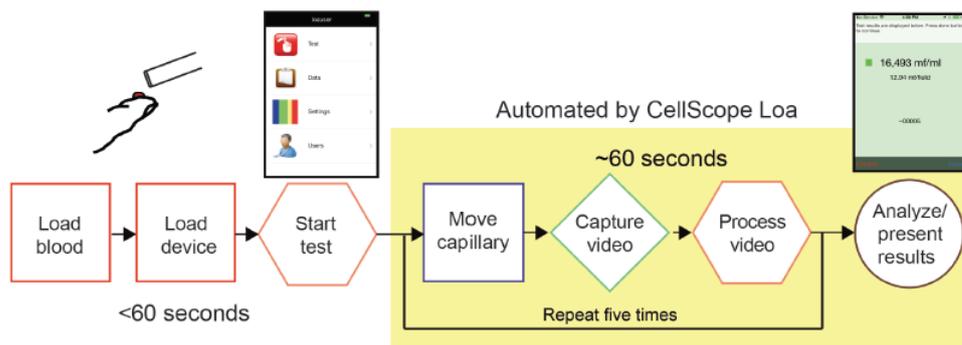


Figura 4 – Fluxograma de funcionamento do algoritmo *L.loa microfilariae*

Fonte: D’Ambrosio et al. (2015)

Durante esse processo, outros campos de visão são capturados ao longo do comprimento do capilar de vidro, que é deslocado através de um servo motor controlado por uma placa Arduino que também controla o *array* de LEDs. O Arduino recebe comandos do celular que envia os dados via *Bluetooth* para que todo o sistema funcione em harmonia.

Resultados

A contagem automatizada atinge 94% de especificidade e 100% de sensibilidade, além de alcançar uma taxa de falso negativo de 1 em 10 milhões.

Comparação com o problema abordado

É possível fazer uma analogia entre o problema abordado por (D’AMBROSIO et al., 2015) e a detecção do parasito *T. cruzi* que será discutido nesse trabalho, visto que o objetivo é analisar amostras de sangue e encontrar o objeto de interesse com base no seu movimento.

A principal diferença entre o problema a ser tratado e o *L. loa*, é que nos vídeos utilizados por (D’AMBROSIO et al., 2015), apenas o parasito *L. loa* se move, enquanto nos

vídeos disponibilizados pelo LIMP (Laboratório de Imunopatologia) para o desenvolvimento deste trabalho, as hemácias também se deslocam em flúido devido a pressão feita pela lamínula. Ou seja, o *T. cruzi* não pode ser visto na imagem a todo momento devido ao seu baixo contraste, sendo apenas detectado pelo movimento das hemácias com as quais se choca, apresentando um ambiente de extrema complexidade a ser analisado. No caso das culturas de *T. cruzi*, não existe hemácias mas os parasitos continuam quase que transparentes.

Além disso, é possível observar que o parasito *L. loa* é visível e tem forma de um filamento, o que pode vir a facilitar sua detecção.

2.3 Estudo da motilidade do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, agente causador da doença de Chagas, uma doença debilitante e fatal que infecta 20 milhões de pessoas na América Latina. Como qualquer outra célula flagelada, o flagelo do *T. cruzi* impulsiona o parasito através da ação do seu oscilador mecânico, responsável por gerar forças para o seu movimento (BALLESTEROS-RODEA et al., 2012).

Abordagens genéticas possibilitaram um aumento considerável do conhecimento sobre diversos aspectos da função do flagelo e movimento. Apesar da importância da mobilidade no ciclo de vida do parasito, pouco se sabe sobre seus padrões de mobilidade e do batimento do flagelo (BALLESTEROS-RODEA et al., 2012).

Com intuito de explorar o problema citado anteriormente, Ballesteros-Rodea et al. (2012) propuseram em seu artigo *Flagellar Motility of Trypanosoma cruzi Epimastigotes*, um estudo da distância, velocidade e ângulo rotacional para descrever o movimento das formas epimastigotas do *T. cruzi*, afim de analisar a mobilidade e o batimento de seu flagelo, de acordo com a metodologia detalhada nos tópicos seguintes.

Metodologia

Para realizar o experimento, imagens de epimastigotas que se movimentam livremente são capturadas através de um vídeo de microscopia. Através desse material, uma análise quantitativa da distância percorrida pelas epimastigotas é realizada. A trajetória do tempo de cada parasito foi decomposta em distância, velocidade e ângulo rotacional, para facilitar análises vetoriais quantitativas mais detalhadas e análise de populações.

1. Ensaios de motilidade

Os parasitos foram marcados com éster succinimidil de carboxifluoresceína o que torna a identificação do *T. cruzi* possível através da cor verde fluorescente. Logo após,

as espiroplasmas foram colocadas em lâminulas, onde podiam se mover livremente .

2. Vídeo de microscopia

O vídeo de microscopia foi obtido através de um microscópio de laser confocal invertido (Leica SP5, DM16000, M). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando o LAS AF software (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite/1.7.0 build 1240 Leica Microsystems*). Salienta-se ainda que as imagens foram capturadas em uma taxa de 10 frames/s e gravados em 10s/amostra.

3. Processamento de imagens e tratamento estatístico de medições

• Cálculo da distância

Por questões de ensaio de motilidade, o movimento das células identificadas foi analisado pelo programa Image-Pro plus V 6.0 Media Cybernetics. Para fins de análise de trajetória, uma base de dados obtida do primeiro estudo com informações sobre x_i e y_i , que representam as coordenadas horizontais e verticais respectivamente, a um dado momento t_i , depois do início da gravação do vídeo. O primeiro passo para realizar a análise de trajetória é calcular a distância percorrida entre dois momentos consecutivos, t_i e t_{i+1} . Esse cálculo foi implementado utilizando o MATLAB 7.1, de acordo com a seguinte fórmula:

$$d_i = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} \quad (2.1)$$

• Cálculo da velocidade

Visto que os intervalos de tempo entre dois pontos consecutivos são de 1 segundo, cada distância d_i é numericamente igual a um valor correspondente de velocidade v_i . Uma vez que todas as velocidades instantâneas v_i foram calculadas, a velocidade média de cada parasita \bar{v} , e o correspondente histograma de velocidades foi calculado.

• Cálculo do ângulo de rotação

Em seguida, os ângulos entre dois deslocamentos consecutivos $[t_{i-1}, t_i]$ e $[t_i, t_{i+1}]$ foi calculado para cada parasita utilizando a equação a seguir (algoritmo implementado no MATLAB 7.1):

$$\theta_i = s_i \cos^{-1} \left(\frac{(x_{i+1} - x_i)(x_i - x_{i-1}) + (y_{i+1} - y_i)(y_i - y_{i-1})}{d_{i-1}d_i} \right) \quad (2.2)$$

Onde d_{i-1} e d_i são as distâncias percorridas pelo parasita durante o deslocamento $[t_{i-1}, t_i]$ e $[t_i, t_{i+1}]$ respectivamente.

- *Cálculo do sentido de rotação*

Si, valor que corresponde ao sentido de rotação, é dado pela fórmula:

$$s_i = \frac{(x_i - x_{i-1})(y_{i+1} - y_i) - (y_i - y_{i-1})(x_{i+1} - x_i)}{|(x_i - x_{i-1})(y_{i+1} - y_i) - (y_i - y_{i-1})(x_{i+1} - x_i)|} \quad (2.3)$$

Do teorema de análise vetorial, é conhecido que $s_i = 1$ para rotação anti-horária e $s_i = -1$ para rotação no sentido horário.

3 Referencial Teórico

3.1 *Gaussian Mixture Model*

De acordo com [Stauffer e Grimson \(1999\)](#), a maioria das abordagens para realizar a segmentação de regiões em movimento de uma sequência de imagens em tempo real, envolvem o método *background subtraction*. Essa metodologia também é conhecida como *thresholding* do erro entre a estimativa de uma imagem sem objetos móveis e a imagem atual.

Em síntese, o *background subtraction* tem o objetivo de determinar quais *pixels* correspondem ao *background* (fundo) e quais são parte do *foreground* (objetos de interesse) da cena. Nesse sentido, [Zivkovic \(2004\)](#) descreve a função de densidade probabilidade como um método básico aplicado na cena para realizar o *background subtraction*. Desta maneira, para uma cena estática, esse modelo simples seria o suficiente para resolver o problema. Entretanto, para valores de *pixel* que possuem uma distribuição complexa, modelos mais robustos são necessários.

O número de técnicas utilizadas para resolver esse tipo de problema se diferenciam pelo tipo de modelo de *background subtraction* e pelo procedimento escolhido para atualizá-lo. A maioria dos pesquisadores abandonaram os métodos não adaptativos para encontrar o *background* da imagem, porque ele necessita de inicialização manual. Sem esse procedimento, os erros do cálculo se acumulam com o tempo, fazendo com que esses métodos sejam úteis apenas em ambientes controlados, que exigem um curto período de *tracking* e não apresentam mudanças significativas no cenário ([STAUFFER; GRIMSON, 1999](#)).

Outra abordagem padrão para realizar um cálculo adaptativo de *background* consiste em fazer a média de imagens ao decorrer do tempo, com o intuito de criar uma aproximação de *background* que é similar à imagem estática atual, exceto onde os objetos se movimentam. Apesar de ser uma técnica eficiente para situações nas quais os objetos se movem constantemente e o fundo é visível na maior parte do tempo, ela não apresenta bons resultados para cenários em que os objetos se movimentam vagarosamente ou para *background* bimodais. Além disso possui um único *threshold* para todo o vídeo, e reage lentamente quando o fundo está ocluso e posteriormente, exposto. Ademais, vários outros métodos de detecção de *background* sofrem negativamente com mudanças de iluminação durante o vídeo ([STAUFFER; GRIMSON, 1999](#)).

Com o objetivo de resolver as deficiências dos métodos citados previamente, [Stauffer](#)

e Grimson (1999) propõe em seu artigo *Adaptive background mixture models for real-time tracking* um modelo para avaliar os valores de *pixels* específico através da mistura de Gaussianas. Com base na persistência e variância de cada mistura de Gaussianas, é possível determinar se o *pixel* pertence ao *background*; caso contrário, a distribuição é considerada como *foreground* (objeto de interesse em movimento). Essa abordagem é capaz de lidar com mudanças de iluminação, movimento repetitivo de elementos no vídeo, *tracking* de objetos que se deslocam em regiões de agrupamento, objetos que se deslocam lentamente e inserção e retirada de objetos na cena.

Metodologia

Para Stauffer e Grimson (1999), *pixel process* corresponde aos valores assumidos pelo *pixel* na escala níveis de cinza (de 0 a 255) para uma imagem *grayscale*. Em qualquer momento t , é conhecido o valor do *pixel* $\{x_0, y_0\}$, denominado como história do *pixel*.

$$\{X_1, \dots, X_t\} = \{I(x_0, y_0, i) : 1 \leq i \leq t\} \quad (3.1)$$

Onde I é a sequência de imagens.

O valor de cada *pixel* representa a radiância detectada pela câmera em determinada direção. Considerando o caso em que a iluminação e o fundo permanecem estáticos, os valores dos *pixels* praticamente não mudam. Nesse caso, apenas uma curva Gaussiana seria necessária para descrever os valores médios dos *pixels*. Entretanto, cenários reais apresentam situações mais complexas e dinâmicas onde há variação de iluminação e objetos são inseridos na imagem e a partir de algum momento passam a fazer parte do *background*.

Com o propósito de evitar acúmulos de erros devido às variações que ocorrem nos cenários vídeos, Stauffer e Grimson (1999) descreve a história de cada pixel, $\{X_1, \dots, X_t\}$, modelada por uma mistura de K distribuições de Gaussianas (*Gaussian Mixture Model*). A probabilidade de se observar um pixel é dada por:

$$P(X_t) = \sum_{i=1}^K \omega_{i,t} * \eta(X_t, \mu_{i,t}, \sum_{i,t}) \quad (3.2)$$

Onde:

- K = número de distribuições que deve ser determinado de acordo com a memória disponível no computador;
- $\omega_{i,t}$ = peso estimado correspondente a porção dos dados a ser considerado para o cálculo da i_{th} Gaussiana na mistura dado um tempo t ;
- $\mu_{i,t}$ = valor médio da i_{th} gaussiana na mistura dado um certo tempo t ;

- $\Sigma_{i,t}$ = matriz de covariância da i_{th} Gaussiana dado um tempo;
- η = Função de densidade probabilidade da Gaussiana.

Nesse contexto, η é dado por:

$$\eta(X_t, \mu, \Sigma) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{n}{2}} |\Sigma|^{\frac{1}{2}}} e^{-\frac{1}{2}(X_t - \mu)^T \Sigma^{-1} (X_t - \mu)} \quad (3.3)$$

Em suma, a distribuição da observação de cada *pixel* é caracterizada por uma mistura de Gaussianas, como foi descrito nas equações anteriores. O valor de um novo *pixel* vai ser gerado por uma componente principal da mistura de Gaussianas, que será utilizada para atualizar o modelo.

3.2 Optical Flow

Quando um observador se move no ambiente em que se encontra, o movimento das imagens na retina geram um padrão dinâmico conhecido como (*optic flow field*). Esse movimento contém uma rica informação sobre o mundo ao seu redor, incluindo dados sobre a direção do deslocamento do observador, a distância relativa dos objetos no campo visual, e se objetos estão se movendo relativos ao resto da cena. Estudos psicofísicos mostram que, as pessoas podem identificar objetos com base na velocidade ou direção do seu movimento relativo ao campo óptico gerado pelo deslocamento do observador (ROYDEN; HOLLOWAY, 2014).

Para entender como esse padrão dinâmico funciona e possibilita a identificação de objetos móveis, é preciso compreender o conceito de *optical flow*. Segundo MathWorks (), *optical flow* pode ser definido como a distribuição das velocidades aparentes de um objeto em uma imagem. Ao estimar o *optical flow* entre os *frames* de um vídeo, é possível medir a velocidade de um objeto nele presente. Em geral, objetos que se movem perto da câmera apresentam maior movimento aparente quando comparado com objetos distantes.

Assim sendo, o cálculo do *optical flow* é utilizado em visão computacional para caracterizar e quantificar o movimento de objetos no fluxo de um vídeo, e frequentemente realizar a detecção de objetos baseadas em movimento e sistemas de *tracking* (MATHWORKS,).

Além disso, existem métodos convencionais de reconhecimento de objetos que utilizam extrações de *features* de imagens baseando-se no formato dos objetos presentes na cena. Esses sistemas consistem em processos complexos, que inclui extração de características, geração de descrição e processos de *matching*. O resultado do reconhecimento é satisfatório quando todas as etapas do sistema apresentam boas soluções, pois não há acúmulo de erros entre uma etapa e outra. Todavia, isso raramente acontece em situações reais porque existem diversos fatores externos proporcionados pelo ambiente que forcem variáveis

adicionais a serem analisadas na solução do problema. Ademais, o reconhecimento de objetos não rígidos como humanos, é altamente suscetível à falhas porque sua forma se modifica com o decorrer do tempo (WATANABE; TAKEDA; ONOGUCHI, 1996).

Em contrapartida, o método de reconhecimento de objetos móveis através da análise do *Optical Flow* (MOROFA – *Moving Object Recognition by Optical Flow Analysis*) é mais estável contra a oclusão parcial de objetos em movimento em cenários reais porque a diferença de padrões do *optical flow* é usado apenas para o reconhecimento de objetos. Ademais, o método MOROFA é capaz de reconhecer eficientemente objetos não rígidos, ao contrário das abordagens baseadas em *features* (WATANABE; TAKEDA; ONOGUCHI, 1996).

Em virtude das suas características, Watanabe, Takeda e Onoguchi (1996) afirmam que a análise de objetos móveis baseada em *Optical Flow* pode ser aplicada em diversas áreas, como por exemplo em sistemas inteligentes de vigilância, detecção de obstáculos para veículos autônomos, uma vez que esse método não requer o ajuste de muitos parâmetros para realizar o reconhecimento de objetos.

Para Royden e Holloway (2014), quando um observador se move em linha reta em uma cena estacionária, o *optic flow field* forma um padrão radial. *Figura (a)* - O centro desse campo, onde a velocidade da cena é igual a zero, é chamado de foco de expansão (FOE – *focus of expansion*). Um objeto em movimento na cena introduz velocidades inconsistentes com esse padrão, sendo que essa inconsistência serve como indício para detectar a presença de um objeto. *Figura (b)*.

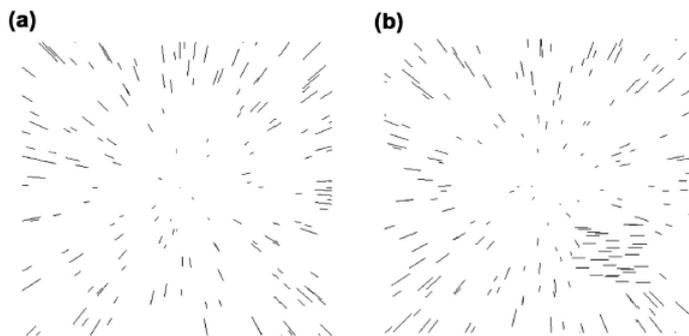


Figura 5 – *Optic flow field*

Fonte: Royden e Holloway (2014)

(a) *Optical flow* radial gerado pelo observador se movendo em direção ao centro da cena. (b) *Optical flow* radial com um objeto localizado na parte inferior direita;

No seu estudo apresentado no artigo *Detecting moving objects in an optic flow field using direction- and speed-tuned operators*, Royden e Holloway (2014) mostra um modelo baseado em propriedades das respostas de neurônios no campo primário visual, usando operadores de resposta de velocidade e direção em resposta ao movimento, que pode ser estendido para detectar objetos em movimentos. As análises realizadas estão descritas por etapas, como pode ser visto nos tópicos a seguir.

- *Detecção de objeto utilizando apenas o ângulo de direção*

Royden e Holloway (2014) realizaram experimentos para identificar as bordas dos objetos em movimentos baseando-se no ângulo de uma direção de deslocamento preferencial, diferente do padrão de *optical flow* radial. Esse modelo teve mais dificuldades de detectar quinas, pois os operadores de direção não foram distribuídas igualmente na borda dessas regiões.

- *Detecção de objeto utilizando apenas velocidade*

Teoricamente, alguém pode usar diferenças de velocidade para identificar bordas de objetos em movimento. Entretanto, há situações quando os vetores associados ao movimento do objeto é próximo da direção do campo radial gerado pelo observador e, nesse caso, é possível usar as diferenças de velocidade para identificar objetos em movimento. Todavia, a velocidade é em alguma instância ambígua, pois ela pode variar devido à profundidade da cena por causa do movimento do objeto (ROYDEN; HOLLOWAY, 2014).

- *Detecção de objeto utilizando ângulo de direção e velocidade*

Royden e Holloway (2014) combinaram as informações de ângulo e velocidade para maximizar a precisão do algoritmo, afim de aumentar o número de operadores de velocidade e direção nas bordas e afim de indicar a presença de um objeto em movimento. Como resultado, as bordas foram muito bem identificadas e a incidência de *background* identificado incorretamente diminuiu.

4 Metodologia

A pesquisa sobre detecção e contagem automática do *T. cruzi* foi baseada em duas abordagens experimentais, sendo a primeira a análise do parasito em amostra de sangue e a segunda em meio de cultura. Ambas tem o objetivo de fazer a detecção através do movimento, porém resultaram em diferentes metodologias que serão descritas no decorrer desse capítulo. A seção 4.1 apresenta a descrição do procedimento de coleta do material biológico; as seções 4.2 e 4.3 descrevem os métodos utilizados para detecção do parasito em amostra de sangue e cultura respectivamente.

Na seção 4.2 também apresentamos alguns resultados que foram obtidos ao longo das implementações e que nos auxiliaram a evoluir na metodologia a ser aplicada. Os resultados intermediários foram apresentados juntamente com a metodologia, pois descrevem o processo científico de descoberta do algoritmo que é utilizado para a detecção do parasito.

4.1 Aquisição de material biológico para análise

As amostras usadas para obtenção dos vídeos empregados nesse trabalho foram produzidas no LIMP/NUPEB/UFOP (Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto) por um grupo de alunos de graduação, mestrado e doutorado coordenados pela Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.

Com o objetivo de testar a eficácia de medicamentos para combater a doença de Chagas e também analisar os efeitos colaterais causados por esses fármacos, camundongos são infectados pelo parasito *T. cruzi* e posteriormente medicados. Para determinar a parasitemia, ou seja, o número de parasitos no sangue circulante, em diferentes fases do tratamento, é necessário analisar amostras de sangue dos camundongos e fazer a contagem dos *T. cruzi* ali presentes.

As amostras do parasito em meio de cultura (5 micro litros) são depositadas em lamínulas que são posicionadas no microscópio Nikon Eclipse E200 para análise (figura 6). A câmera SONY DSC-W320/W330 Cyber-shot é posicionada no ocular do microscópio através de um adaptador como mostra a figura 7, para a captura dos vídeos a serem utilizados no *software* de contagem automática.

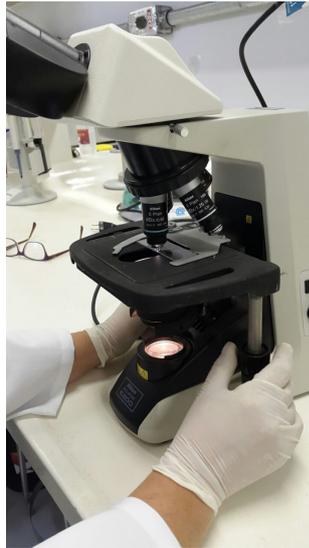


Figura 6 – Análise de amostra com parasito *T. cruzi*



Figura 7 – Câmera anexada ao ocular do microscópio

A partir do material adquirido durante o experimento, foram gerados vídeos de 5s de duração da amostra Berenice 78 e das suas diluições na proporção 1:2, 1:10 e 1:100, havendo um vídeo para cada uma dessas amostras de acordo com as melhores gravações obtidas. Para gerar um base de dados maior e de qualidade para experimentos futuros, é necessário melhorar o processo de captura dos vídeos. Isso pode ser feito utilizando uma câmera com melhor resolução, microscópio com iluminação uniforme, ajuste de foco, entre outros equipamentos. Também seria interessante automatizar todo o processo, para que a aquisição de imagens pudesse ser padronizada sem necessidade de interferência humana.

4.2 Análise do vídeo de amostra de sangue com parasitos

4.2.1 *Background Subtraction*

Considerando que uma imagem é composta por *pixels* e que eles possuem valores numéricos de intensidade de luz captados por uma câmera, é possível detectar mudanças durante o tempo através da análise desses valores em uma sequência de imagens que compõe os *frames* de um vídeo.

Essas mudanças podem ser constatadas pelo resultado da subtração de duas imagens. Se elas forem iguais, a operação resultará em uma matriz de intensidade composta de zeros, visto que não existe nenhuma diferença entre as duas variáveis comparadas. Porém, se na segunda imagem algum objeto se desloca em relação ao primeiro cenário, a matriz resultante terá uma região diferente de zero que corresponde ao objeto em movimento, enquanto o fundo ou *background* (que corresponde ao grupo de elementos estáticos) será igual a zero.

Com base nessas informações, uma vez que é conhecido que o *T. cruzi* apresenta baixo contraste e frequentemente não pode ser visto nas amostras de sangue há não ser pelo seu movimento diferenciado quando se choca com as hemácias ao seu redor, o primeiro método escolhido para analisar o problema foi o *background subtraction*, visto que o movimento é um fator de extrema importância na identificação do parasito. Além disso, o *background subtraction* é um dos métodos mais simples presentes na literatura que permite a futura compreensão de soluções mais complexas que fazem uso do mesmo.

Algoritmo

Para facilitar as operações entre *frames*, as imagens são primeiramente convertidas de RGB para *grayscale*. Esse procedimento é realizado devido ao fato da imagem RGB ser um tipo de dado tridimensional, onde cada uma das matrizes corresponde à valores de *pixel* correspondente as cores *red*, *blue* e *green* respectivamente, enquanto a imagem grayscale é composta por apenas uma matriz. Posteriormente, o *frame* atual é subtraído do anterior (exceto na primeira vez que o vídeo é lido pois não existe *frame* anterior ao primeiro).

Conseqüentemente, a imagem a ser exibida na tela deve apresentar um nível de cinza resultante da operação de diferença e valores iguais a zero para regiões onde não há movimento. Para filtrar ainda mais essa saída, utiliza-se valores de *threshold* de modo a determinar qual será a faixa mínima de valores que o *pixel* deve possuir para aparecer na imagem final, onde tudo o que aparece como branco é classificado como região em movimento.

Nesse cenário, o *threshold* é útil para ignorar ruídos provenientes da iluminação ambiente e de outras fontes que alteram os valores dos *pixels* e podem ser conseqüentemente

interpretados erroneamente como objeto em movimento. Por outro lado, um valor de *threshold* muito elevado pode vir a ignorar informações importantes sobre o movimento dos objetos. Assim sendo, encontrar um valor adequado para cada situação é necessário para evitar resultados indesejados. Essas operações podem ser representadas em forma de fluxograma, como pode ser visto da figura 8.

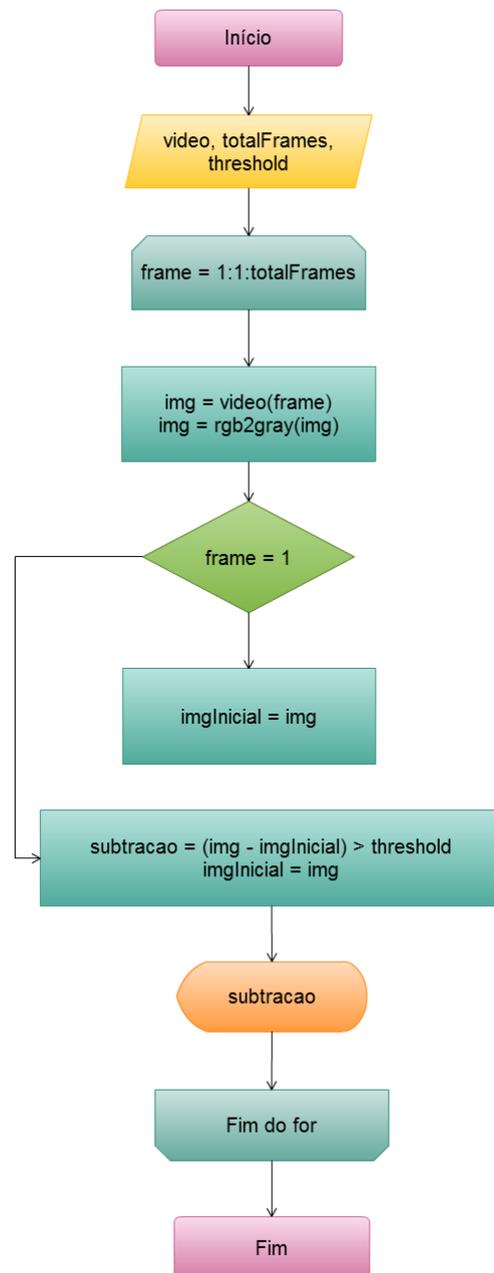


Figura 8 – Fluxograma do algoritmo de Subtração de Background

Resultados

Através dos experimentos realizados, pode-se perceber que a detecção do *T. cruzi* é muito custosa, já que ainda não é possível detectar seu formato na imagem binária e o movimento das hemácias ao seu redor muitas vezes não é tão claro com o uso do *threshold*.

Variando-se os valores de *threshold*, tem-se:

- 10 – 20: A maioria das hemácias são detectadas. Há muita informação na imagem;
- 30 – 40: Se vê o contorno das hemácias;
- *threshold* > 50: imagem é preta e apresenta pontos brancos que se movem aleatoriamente.

As imagens resultantes desses experimentos poder ser vistas na figura 9.

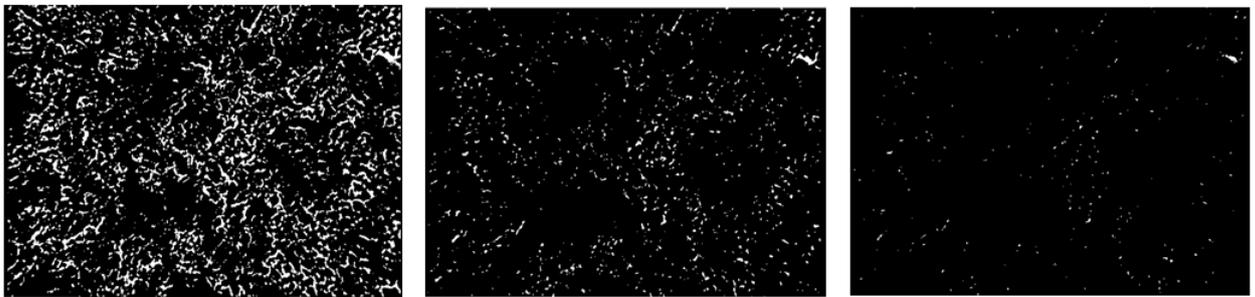


Figura 9 – Resultado do método *background subtraction*

(a) Imagem binária com *threshold* igual a 20 (b) Imagem binária com *threshold* igual a 40 (c) Imagem binária com *threshold* igual a 60

4.2.2 Gaussian Mixture Model (GMM)

Algoritmo

Diante dos resultados obtidos pelo método *background subtraction*, é necessário buscar uma alternativa mais robusta para resolver o problema de detecção. A solução pode ser propiciada pelo modelo GMM, que tem como objetivo diferenciar os objetos pertencentes ao fundo da imagem dos objetos de interesse em movimento, baseado na variância dos valores dos *pixels* de uma imagem diferença. Ao aplicar essa abordagem, pretende-se identificar as hemácias em movimento no vídeo com foco naquelas que se chocam com o parasito, afim de se obter sua localização para *tracking* e contagem.

Para realizar a identificação do parasito, primeiramente deve-se ler o vídeo a ser analisado, e posteriormente criar o objeto de detecção de objetos móveis utilizando o

comando Matlab *vision.ForegroundDetector*. Ele nada mais é que um detector com uma máscara de *foreground*, calculada por meio do GMM. Nesse processo, é possível definir parâmetros importantes como o número de *frames* para treinamento e a variância inicial do modelo.

Como o GMM é baseado em *background subtraction*, as intensidades resultantes dessa operação podem ser analisadas pela função de *Blob Analysis* que irá obter as estatísticas e características de determinadas regiões na imagem, possibilitando a demarcação de caixas delimitadoras (*bouding box*) de acordo com as coordenadas das regiões identificadas.

Resultados

O vídeo da amostra de sangue com o *T. cruzi* contém muitas hemácias que se encontram aglomeradas em praticamente todo o campo de visão, se movimentado devido à pressão imposta pela lamínula. Devido a alta sensibilidade do GMM à pequenas variações de movimento, vários objetos são demarcados na imagem como pode ser visto na figura 10.

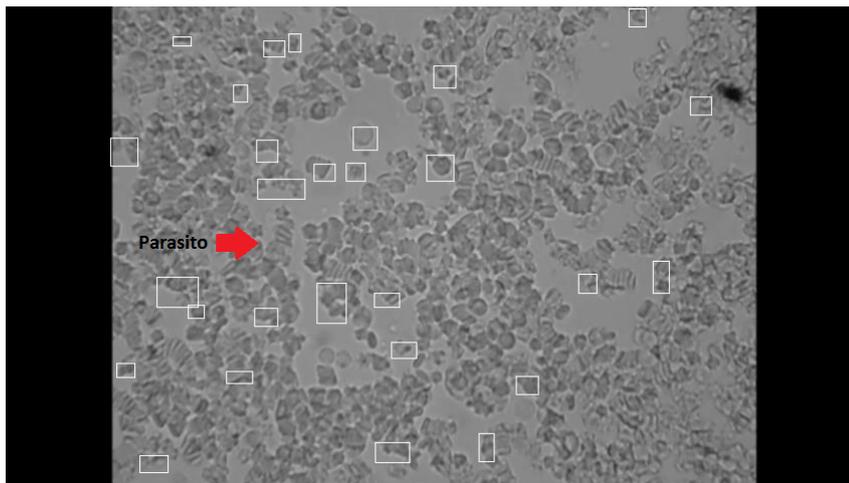


Figura 10 – Identificação de objetos em movimento com *Gaussian Mixture Model*

Apesar da identificação de diversas regiões em movimento, o local de interesse que se encontra ao redor do parasito não é detectado. Uma possível explicação para esse fenômeno é que o GMM tende a encontrar regiões de maior contraste por se tratar de uma subtração de imagens, e por isso acaba ignorando as hemácias com baixo contraste e o parasita que quase não pode ser visto nessa situação.

Outro ponto importante para a obtenção desse resultado é o valor da variância. Inicialmente, ela é definida como 30 (padrão), mas fazendo testes para diferentes valores, observou-se que, quanto maior a variância, menor o número de objetos identificados. Isso acontece porque um objeto deve possuir maior variação na sua intensidade para ser considerado parte do *foreground*. Por outro lado, quanto menor o valor da variância inicial,

mais sensível é o modelo e maior o número de objetos identificados pois basta uma pequena variação no movimento e na intensidade daquele objeto para que ele seja considerado *foreground*.

4.2.3 Tracking Kalman Filter

Visando melhorar os resultados obtidos na secção 4.2.2, foi realizada uma combinação entre o GMM e o *tracking Kalman Filter*. De acordo com a descrição da classe *vision.KalmanFilter* do Matlab, o objeto de *Kalman Filter* é utilizado para *tracking* predizendo posição futura de um objeto além de reduzir ruído. Para realizar essa operação, é necessário que os múltiplos objetos se movam com velocidade e aceleração constante. Em ordem de realizar a tarefa de rastreamento, o algoritmo executa dois passos:

1. *Prediction*: Utiliza estados passados para predizer o estado atual;
2. *Correction*: Emprega o estado atual (ex.:localização do objeto) para fazer correção.

Algoritmo

O algoritmo de *Kalman Filter* desenvolvido para esse trabalho foi baseado no exemplo *TrackAnOccludedObjectExample*, disponibilizado da página oficial do Matlab. O programa consiste nas etapas abaixo:

1. Criar objetos de sistema para executar as seguintes funções:
 - Ler de vídeo;
 - Exibir vídeo;
 - Detecção de *foreground* utilizando o método GMM;
 - *Blob Analysis* dos objetos na imagem binária.
2. *Loop* para ler vídeo e fazer análise *frame a frame*:
 - Verificar se objeto foi criado pela primeira vez; caso isso seja verdade, inicializar *Kalman Filter*;
 - Depois da primeira detecção, continuar verificando se objeto foi detectado;
 - Caso positivo, corrigir localização;
 - Caso negativo (objeto não está presente na imagem), predizer localização.

Resultados

Em suma, os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois como o GMM gerava um numero muito grande de falsos positivos, fazendo com que o *tracking* acabasse se confundindo.

4.2.4 *Optical Flow*

Ainda com o objetivo de identificar o *T. cruzi* considerando o seu movimento, busca-se obter informações sobre a velocidade dos objetos em movimento na cena utilizando *optical flow*. Para compreender como esse método se comporta no vídeo de amostras com hemácias e parasitos, desenha-se vetores de velocidade que estão presentes no contorno dos objetos em movimento. Como é conhecido que o *T. cruzi* tem movimento diferenciado em relação as hemácias, pressupõe-se que o parasito se encontra na região onde há maior movimentação.

Devido ao seu baixo contraste, o parasito não é demarcado por vetores, todavia é possível perceber o seu movimento através das hemácias com as quais se choca, sendo essas demarcadas com vetores de velocidade. Por causa das características da movimentação do objeto de interesse na cena, levantou-se as seguintes hipóteses, que são possíveis propostas de análise dos dados obtidos pelo *optical flow* para solucionar problema:

Hipótese 1: A região de localização do *T. cruzi* é ponto de maior velocidade na matriz módulo gerada pelo *optical flow*.

Com base nessa informação, o primeiro algoritmo é construído para resolver o problema. Inicialmente, é realizada uma busca na matriz de módulo para encontrar seu maior valor e a partir das coordenadas daquela posição, demarcar a localização do parasito. Esse procedimento é necessário para evitar que vários objetos em movimento sejam demarcados, como foi visto na seção sobre *Gaussian Mixture Model*.

Resultado hipótese 1: É importante destacar que, em alguns momentos, as hemácias deslizam na lamínula de modo com que sua velocidade é maior do que aquelas que se encontram ao redor do parasito, o que dificulta na localização e identificação correta do *T. cruzi*. Portanto, conclui-se que buscar pelo ponto de maior velocidade na matriz de módulos não é o suficiente para resolver o problema apresentado, visto que a informação relativa à um único *pixel* é insuficiente quando se trata de uma área maior. Para solucionar essa questão, outras hipóteses foram levantadas.

Hipótese 2: A localização do parasito corresponde a região de maior velocidade, que pode ser analisada por uma sub matriz (20x20px) que é deslizada por toda a imagem para encontrar tal local.

Resultado hipótese 2: A análise por regiões tem um resultado melhor do que a abordagem que considera um único *pixel*, porém não é o suficiente para fazer o *tracking* do parasito pois, a caixa de detecção se perde frequentemente, marcando objetos incorretos. Isso ocorre porque as hemácias também se movimentam por estarem sofrendo pressão da lamínula e o movimento do *T. cruzi* não possui maior velocidade em relação à esses objetos todo o tempo.

Além disso a função utilizada para varrer a imagem faz com que o algoritmo fique muito lento, já que estruturas de repetição são utilizadas para percorrer todas as colunas

e linhas da matriz de intensidade que forma a imagem. Ademais, um vídeo é constituído por centenas de *frames*, o que torna esse processo ainda mais inviável. Mediante o exposto, uma proposta para diminuir o tempo computacional gasto pelo algoritmo será descrita na secção 4.2.5, denominada Rotina de Busca Robusta.

Hipótese 3: O *T. cruzi* se encontra na região onde há maior variação de velocidade. Tal variação pode ser encontrada através do cálculo da derivada da velocidade, onde o resultado encontrado corresponde a aceleração dos objetos que se encontram no local avaliado.

Resultado hipótese 3: A caixa de identificação encontra o parasito mais frequentemente do que nos dois métodos citados anteriormente. As regiões analisadas são de tamanho 20x20 px e é necessário percorrer toda a matriz (linhas e colunas) através de estruturas de repetição. Por isso o código ainda continua lento e inviável para testes. Em vista disso, uma proposta para diminuir o tempo computacional gasto pelo algoritmo será descrita na secção 4.2.5, denominada Rotina de Busca Robusta.

Como os vídeos de amostras de sangue com parasitos são muito complexos e demandam um longo tempo de execução devido as dimensões das suas imagens, um vídeo simples de quadrados brancos que se movem em fundo preto foi gerado no Matlab, produzindo *frames* de apenas 100x100 px para analisar detalhadamente como o *optical flow* se comporta na situação mais simples possível e como usar essas informações para detectar objetos em movimento. Durante o estudo, descobriu-se que existem vários métodos que computam o *optical flow*, surgindo assim a necessidade de investigar como eles se comportam diante de uma situação elementar e também avaliar qual deles é o melhor. Cada método utiliza uma abordagem matemática diferente, e por isso o resultado dos vetores plotados no objeto em movimento também muda. Entretanto, todas as abordagens tem o objetivo de estimar a velocidade e a direção de um objeto móvel. Nesse contexto, foram analisados os seguintes métodos:

- **Horn-Shunck:**

- *Análise:* Alguns parâmetros podem ser alterados de acordo com as características da cena, como:
 - * Smoothness: aumentar valor quando há aumento de velocidade entre *frames* consecutivos;
 - * MaxIteration: aumentar valor para estimar objeto de baixa velocidade;
 - * VelocityDifference: diferença de velocidade absoluta mínima para parar computação iterativa. Diminuir esse valor para objetos de baixa velocidade.
- *Resultados:* Observando os vetores plotados no vídeo onde só um quadrado se move, é possível perceber que eles tem origem no centro do objeto e descrevem o

movimento em todas as direções considerando o plano x,y e z (que corresponde aos vetores que vão em direção ao olhos do observador). Apesar de todos os vetores serem plotados constantemente, é possível perceber que apenas os maiores correspondem a direção atual do objeto de interesse, como pode ser visto na figura 11.

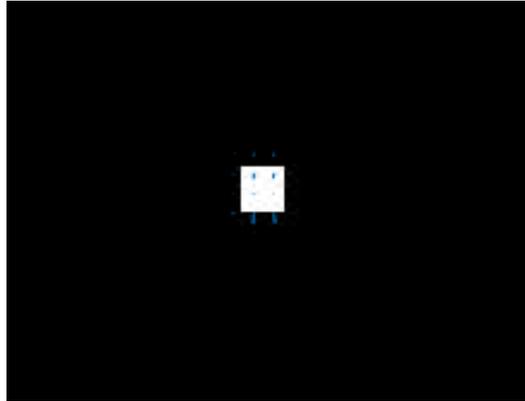


Figura 11 – Objeto se deslocando para baixo - *Optical Flow* Horn-Schunck

- **Lucas Kanade:**

- *Análise:* Alguns parâmetros podem ser alterados de acordo com as características da cena, como:
 - * *NoiseThreshold: Threshold* para redução de ruído.
- *Resultados:* Os vetores tem origem nas bordas do objeto e são plotados em direção ao seu movimento no plano x,y, mas não há vetores que estão em direção aos olhos do observador, como mostra a figura 12. Quanto maior o valor do parâmetro *NoiseThreshold*, menor é o número de vetores plotados.

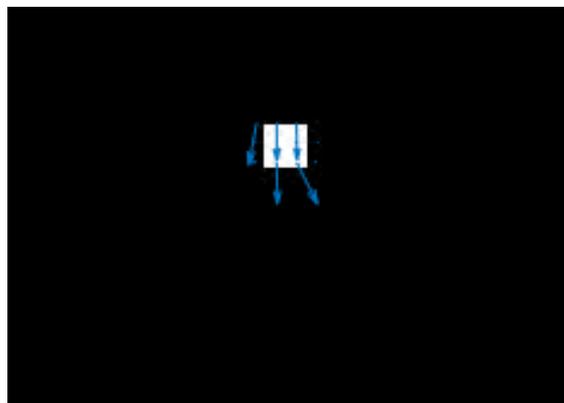


Figura 12 – Objeto se deslocando para baixo - *Optical Flow* Lucas-Kanade

- **Lucas Kanade com derivada Gaussiana:**

- *Análise:* Alguns parâmetros podem ser alterados de acordo com as características da cena, como:
 - * NumFrames: Número de *frames* usados para temporal suavização. Aumentando esse valor diminui-se a interferência do movimento abrupto do objeto no cálculo do *optical flow*. O atraso no cálculo do método depende do *NumFrames*;
 - * ImageFilterSigma: Desvio padrão para filtro de suavização de imagem;
 - * GradientFilterSigma: Desvio padrão para o gradiente do filtro de suavização;
 - * NoiseThreshold: *Threshold* para redução de ruído.
- *Resultados:* Os vetores tem origem em uma das bordas no objeto, passando por dentro dele e seguindo o seu contorno em direção ao movimento. O parâmetro *NumFrames* deve ser um número ímpar, por padrão esse valor é 3. Quanto maior o valor de *NumFrames*, menor o número de vetores e maior o seu tamanho, como pode ser visto na figura 13.



Figura 13 – Objeto se deslocando para baixo - *Optical Flow* Lucas-Kanade com derivada Gaussiana (Num-Frame = 3)

- **Farneback:**

- *Análise e resultados:* Esse método só se encontra disponível na versão do Matlab 2015b e o *software* utilizado durante a pesquisa foi Matlab2015a.

Considerando as imagens resultantes das diversas abordagens de *optical flow* previamente apresentados, observa-se que a que melhor descreve a trajetória do objeto no vídeo de simulação que se desloca para baixo é o método de Lucas-Kanade com derivada Gaussiana, e por isso, ele foi escolhido para ser usado nos experimentos desse trabalho.

4.2.5 Rotina de Busca Robusta

Em decorrência dos melhores resultados obtidos utilizando o método de *optical flow* de Lucas-Kanade com derivada Gaussiana em relação às demais técnicas avaliadas, essa metodologia foi escolhida para ser utilizada. Todavia, devido ao tempo computacional gasto para fazer a análise de regiões com maior velocidade ou regiões com maior aceleração (variação de velocidade), se torna inviável aplicar essa solução em um procedimento em tempo real como foi descrito nas hipóteses 2 e 3 da seção 4.2.4. Isso ocorre porque a análise é feita escaneando toda a imagem de cada *frame* analisando uma pequena submatriz 20x20 px até que toda a matriz de intensidade seja percorrida. Esse procedimento é feito por todos os *frames* do vídeo.

Com o intuito de resolver o problema acima, foi criado um algoritmo de busca robusta cuja o objetivo é escanear a imagem nos primeiros *loops* e após detectar a área de maior velocidade, tentar estimar sua próxima localização fazendo apenas uma busca local no redor da região inicial. Como resultado, espera-se que o tempo de processamento gasto para fazer a operação de busca seja menor, o que muito importante para imagens de dimensões grandes como o vídeo original do parasito.

Algoritmo

O rotina desenvolvida pode ser descrita como mostram os passos a seguir:

1. O programa faz a leitura do vídeo e durante os 3 primeiros *frames* a função *campoVetorial1* é chamada;
2. A função *campoVetorial1* faz o scanner de toda a imagem de acordo com o tamanho da área de busca predefinido pelo usuário no início do programa pelo usuário (testes feitos para área de 20x20 px);
3. Depois que o algoritmo encontrou uma região de maior velocidade na imagem (onde supostamente se encontra o objeto de interesse) através da função *campoVetorial1*, deve-se pesquisar apenas nas regiões próximas ao objeto encontrado;
4. A partir do quarto *frame*, a função *subBusca* é chamada. Ela recebe como parâmetros a matriz com os módulos de velocidade, a coordenada (x,y) do objeto encontrado pela função *campoVetorial1* e a área de busca a ser utilizada. *CampoVetorial1* não será utilizada a partir daqui;
5. A função *subBusca* gera uma área maior ao redor do objeto encontrado para fazer a busca nos *frames* seguintes. A área de busca se desloca nessa região *pixel a pixel* para que o quadro de detecção seja marcado com maior precisão na tela.

Resultados

O algoritmo gerado melhorou o tempo computacional da busca, visto que ele não faz a pesquisa na imagem por completo, apenas em uma região pré-determinada como resultado do processamento dos primeiros *frames* do vídeo. Todavia, esse método é muito sensível à qualquer erro de detecção que aconteça nos primeiros segundos de processamento, já que a análise da região geral não acontece novamente.

Outro ponto a ser analisado é que, quando se busca pelo ponto (ou região) de maior velocidade ou aceleração da matriz do *optical flow*, o resultado será apenas uma localização (coordenada x,y) de interesse. Entretanto, pode haver dezenas de parasitos em um único campo de visão, e selecionar apenas aquele que tem maior motilidade irá levar à contagem incorreta do número de *T. cruzi*.

4.2.6 Mapa de cores

Como foi visto no resultado da rotina de busca robusta, definir a localização do parasito como região de maior velocidade ou aceleração não é uma proposta eficiente, considerando que existem campos de visão onde se localizam vários *T. cruzi* e além disso, pode haver hemácias que se movem em um fluxo intenso de velocidade maior que o parasito. Para encontrar uma solução, é necessário entender a fundo as propriedades oferecidas pelo objeto *optical flow* disponível na versão do Matlab 2015a. Com base na documentação disponibilizada pelo *software*, sabe-se que fluxo óptico fornece três informações básicas sobre um vídeo:

- *flow.Vx*: Componente x do vetor velocidade;
- *flow.Vy*: Componente y do vetor velocidade;
- *flow.Orientation*: Ângulo de fase do vetor velocidade;
- *flow.Magnitude*: Módulo do vetor velocidade.

Cada uma dessas propriedades é uma matriz contendo informações que descrevem o movimento de um objeto na cena. Com o intuito de analisar a motilidade do *T. cruzi* e possivelmente descobrir um padrão de movimento diferente do restante da cena, utiliza-se o mapa de cores para fazer uma avaliação visual do problema abordado.

De acordo com a descrição de *colormap* disponibilizada pelo Matlab, a análise por mapa de cores ilustra o relacionamento entre a paleta de cores RGB e os dados a serem avaliados visualmente. Para realizar essa tarefa, emprega-se a função *imagesc* que tem por finalidade exibir um *array* como uma imagem, utilizando todas as tonalidades disponíveis no mapa de cores.

Análise

Para analisar e comparar os resultados, criou-se um vídeo com as imagens de todas as propriedades do *optical flow* exibidas lado a lado. A escala de cores que representa a intensidade (valor numérico) de cada propriedade, varia de azul escuro a amarelo. O azul escuro representa os valores menores e o amarelo, os valores mais altos.

Resultados

- *Vídeo módulo*: A região onde o parasito se encontra tende a ser aquela com maior módulo de velocidade. Isso pode ser observado devido ao maior número de pontos amarelos na região do seu movimento. Entretanto, as hemácias presentes na amostra estão movimento através do fluxo imposto pela pressão da lamínula, o que inviabiliza generalizar o maior valor do módulo da velocidade como parâmetro de detecção do parasito para todas as situações, ou pelo menos como parâmetro único.
- *Vídeo componente V_x* : Apresenta cores extremas (amarelo ou azul escuro) nas região onde o parasito se movimenta. Em alguns momentos, as cores parecem ser opostas ao vídeo de V_y (quando V_x é amarelo V_y é azul) mas essa informação também não pode ser generalizada.
- *Vídeo componente V_y* : Mesma observação feita para componente V_x .
- *Vídeo orientação*: Não foi observado nenhum padrão para o movimento do parasito nessa propriedade. As regiões do vídeo apresentam pontos amarelos e azuis bem distribuídos em toda a imagem, o que não ocorre nos outros vídeos.

O resultado visual das matrizes geradas pelo *optical flow*, pode ser visto na imagem a seguir:

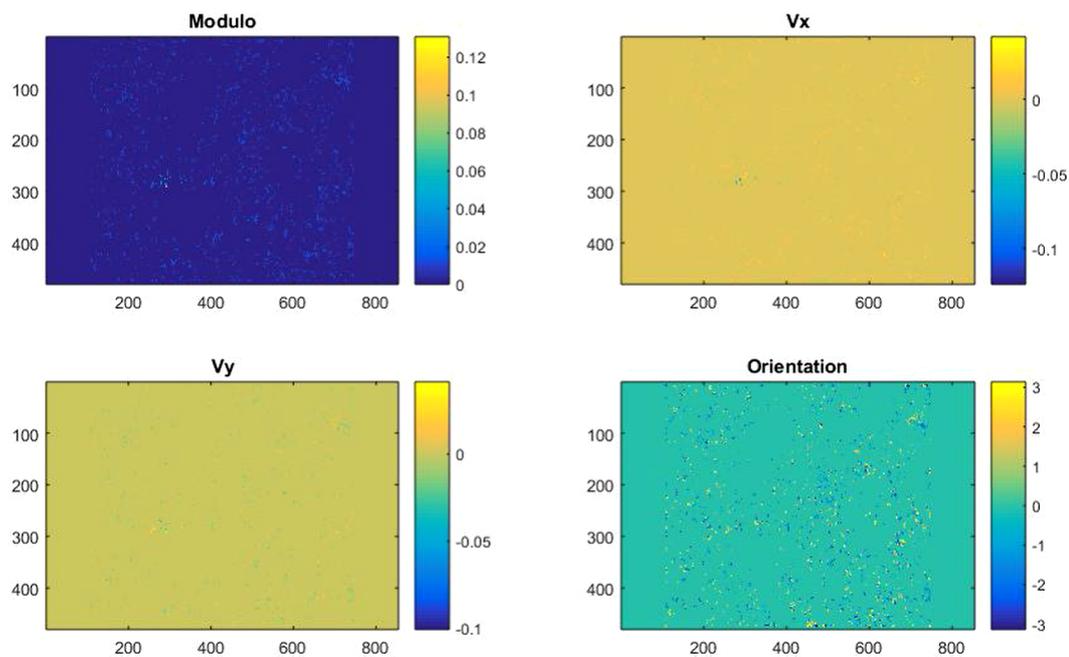


Figura 14 – Mapa de cores - Propriedades *optical flow*

Diante dos resultados analisados anteriormente, não foi possível encontrar nenhum padrão com base nas propriedades do *optical flow* que pode ser generalizado para encontrar qualquer parasito presente na amostra. Como pode ser visto, o método *optical flow* retorna matrizes com informações de velocidade de todos os objetos do *frame*, e como o vídeo das amostras de sangue contém várias hemácias com uma certa movimentação, se torna difícil estabelecer um critério que possa determinar qual região corresponde a localização do parasito. Desta forma, o capítulo 4.2.7 apresenta uma proposta diferenciada para realizar a análise de dados do movimento dos objetos.

4.2.7 Classificador

Afim buscar uma alternativa à análise por mapa de cores, é necessário conhecer sobre técnicas de reconhecimento de padrão (*pattern recognition*) e como a classificação de características ocorre para dividir o objetos da cena em categorias e dessa forma, encontrar resultados que correspondam ao *T. cruzi*.

Nesse contexto, *pattern recognition* pode ser definido como o estudo sobre como as máquinas analisam e percebem um ambiente, aprendendo como distinguir padrões interessantes do *background* e a partir do conhecimento das categorias de padrões, ser capaz de tomar decisões automáticas (JAIN; DUIN; MAO, 2000).

Igualmente, para Jain, Duin e Mao (2000), o design de sistemas de reconhecimento deve ser cauteloso com os seguintes critérios: definição de padrões de classe, ambiente de detecção, representação de padrão, extração e seleção de *features*, análise de *clus-*

ters, classificação e aprendizado, seleção de amostras para treinamento e avaliação de performance.

De acordo com Jain, Duin e Mao (2000), o reconhecimento e classificação consiste nas seguintes tarefas básicas:

1. *Supervised classification*: Classificação na qual o padrão é uma classe pré definida pelo designer do sistema;
2. *Unsupervised classification*: Nesse caso, o padrão é atribuído à uma classe até então desconhecida, gerada por similaridade de padrões.

Como pode ser observado nos experimentos realizados com mapas de cores, não é possível encontrar um padrão de módulo de velocidade, componentes x,y e ângulo de orientação que definam o movimento do parasito (ou das hemácias ao seu redor) de forma generalizada para distingui-los dos demais elementos da imagem. Tendo isso em vista, o emprego de um método de *unsupervised classification* seria interessante para obter o agrupamento de características que venham a representar o *T. cruzi*.

Uma das abordagens populares nessa categoria é a análise por *clustering* que pode ser definida como o estudo de métodos e algoritmos para agrupamento de objetos de acordo com características implícitas e similaridade sem usar características pré-definidas para identificar objetos. O objetivo do *clustering* de dados é descobrir agrupamentos naturais de um conjunto de padrões (JAIN, 2010).

De acordo com (JAIN, 2010), existem vários tipos de algoritmos de *clustering*, mas a solução por *k-means* tem sido empregada por mais de 50 anos devido a sua eficiência. Ela realiza uma classificação estatística comparando múltiplas características quantitativamente para subdividir a população em grupos diferentes.

K-means clustering

Dado uma representação de n objetos, deve se encontrar k grupos baseado em uma medida de similaridade, onde a similaridade de objetos dentro do mesmo grupo é alta e entre grupos diferentes é baixa. Matematicamente, dado $X = \{x_i\}, i = 1, \dots, n$ o conjunto de d-dimensões a ser agrupado e K o conjunto de grupos $C = \{c_k\}, k = 1, \dots, K$. O algoritmo de *k-means* encontra a partição a qual o erro quadrático entre média empírica e os pontos do *cluster* são minimizados. Sabendo que μ_k é a média do *cluster* c_k , o erro quadrático entre μ_k e os pontos desse agrupamento c_k pode ser definido como:

$$J(c_k) = \sum_{x_i \in c_k} \|x_i - \mu_k\|^2$$

Onde o objetivo é minimizar a soma do erro quadrático em todos os *clusters*.

Algoritmo

Utilizando o algoritmo de *K-means* nos vídeos de amostras de sangue com *T. cruzi*, espera-se encontrar 3 agrupamentos que representam os seguintes objetos:

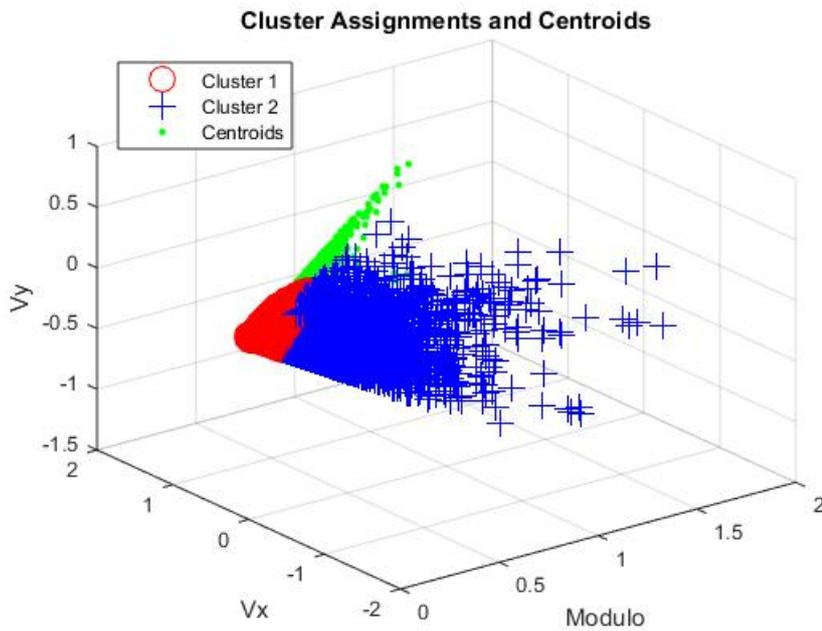
- Fundo;
- Hemácias;
- Parasitos (representado pelo movimento diferenciado das hemácias ao seu redor).

O código elaborado para análise de *clusters* consiste em ler o vídeo *frame a frame* e calcular o *optical flow* do mesmo. Deve-se extrair as matrizes de módulo da velocidade, componente V_x e V_y , já que foi visto que os dados da orientação não são muito relevantes de acordo com a análise do mapa de cores.

Após a obtenção das matrizes de *optical flow*, aplica-se o *clustering* através da função *k-means* disponível no Matlab, na qual deve-se definir o número de *clusters* desejados (nesse caso três). O resultado será a distribuição dos dados separados em três grupos.

Resultados

Os agrupamentos foram analisados de forma visual através da plotagem dos *clusters* no plano x , y e z para melhor compreensão dos objetos representados. O vídeo utilizado para esse experimento só possuía um parasito no campo visual e um número grande de hemácias. Com base nessa informação, era esperado que houvesse um *cluster* com poucos pontos que representassem o movimento das hemácias ao redor do parasito. Entretanto, novamente nenhum padrão interessante foi encontrado, como pode ser visto na imagem abaixo:

Figura 15 – Gráfico *clusters K-means*

Após a obtenção desse gráfico e de outros similares, estudos foram realizados para compreender mais sobre a motilidade do parasito. Em decorrência disso, outras fontes foram encontradas sobre o assunto como foi apresentado na secção 3.3, onde descobrimos que os parasitos de uma mesma amostra não apresentam um movimento padrão e esse fato pode justificar os valores obtidos na classificação por *clusters*.

Em razão dos resultados obtidos, é possível concluir que as imagens são bastante desafiadoras, dado o número de abordagens propostas nessa secção e nas anteriores, com soluções insatisfatórias. Desse modo, optamos por analisar vídeos do parasito em meio de cultura para averiguar se as metodologias que se baseiam no movimento dos objetos é eficiente para um cenário mais simples que o atual.

4.3 Análise do vídeo com parasitos em meio de cultura

4.3.1 Tratamento de imagens

Nas amostras em que o *T. cruzi* está presente em um meio sem hemácias, é possível visualizar a sua forma como pode ser visto na imagem a seguir:

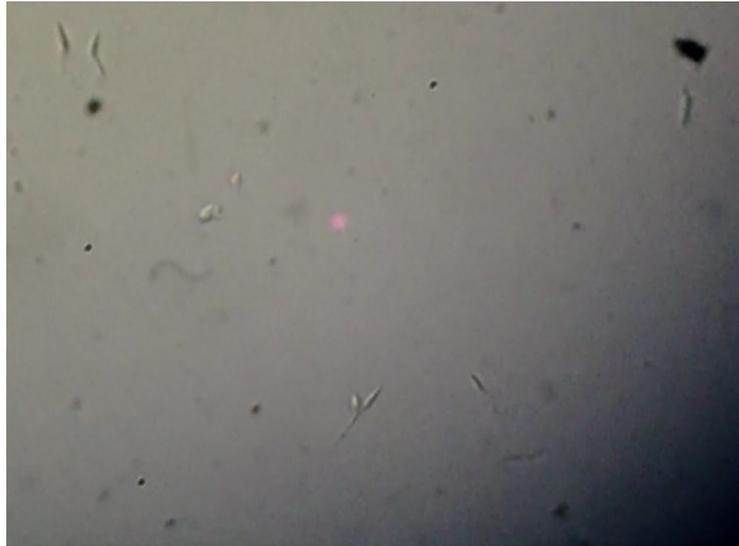


Figura 16 – Amostra de parasitos *T. cruzi* em meio de cultura, sem hemácias

Como pode ser observado na *figura 17* anterior, alguns fatores podem dificultar a visualização dos parasitos como a iluminação do microscópio que não é uniforme no campo de visão, a presença de impurezas na ocular e/ou objetivas do microscópio que introduz objetos na imagem e o baixo contraste do *T. cruzi* em relação a cenário como um todo.

Com o propósito de solucionar os problemas citados acima, é necessário fazer o tratamento de imagens como etapa de pré-processamento para que o algoritmo obtenha resultados satisfatórios.

Algoritmo

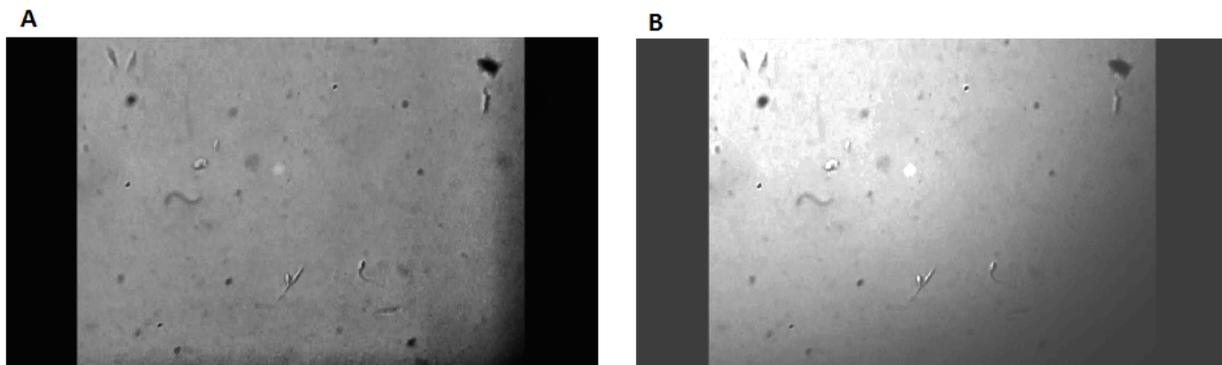
Inicialmente, cada *frame* é convertido do formato RGB para *grayscale* afim de facilitar as operações com os valores de *pixel*. Com a intenção de solucionar o problema de baixo contraste dos parasitos, a equalização de histograma foi o método escolhido para teste devido a sua simplicidade e eficiência.

Diante disso, a equalização de histograma ajusta os valores de intensidade dos *pixels* de acordo com a distribuição da função de probabilidade. Dessa maneira, aumenta a variação dos níveis de cinza cuja a finalidade é melhorar a qualidade dos efeitos visuais na imagem (ZHU; HUANG, 2012).

Outra variação desse método é conhecida como equalização de histograma adaptativo. De acordo com Zhu e Huang (2012), essa técnica identifica automaticamente os níveis de cinza da imagem e ajusta a distância entre níveis adjacentes em um novo histograma conforme o parâmetro adaptativo β , que será usado para fazer o mapeamento dos valores de *pixel* desse processo.

Mediante a escolha dos métodos de melhoria da qualidade da imagem citados anteriormente, operações foram aplicadas no vídeo de parasitos em meio de cultura. Cada uma delas pode ser vista a seguir:

- *Equalização de histograma*: Essa técnica é muito útil para realçar o contraste dos parasitos, entretanto também realça os efeitos da iluminação desigual no campo de visão, o que não é um resultado interessante pois aumenta o ruído gerado pela luz.
- *Equalização de histograma adaptativo*: Esse método proporciona o realce do contraste do parasito de modo que a iluminação da imagem tenha uma distribuição mais uniforme que a original. Por essa razão, essa técnica foi escolhida como uma das etapas de pré-processamento de imagem. As imagens resultantes dessas operações podem ser vistas na figura abaixo.



(a) Equalização de histograma adaptativo (b) Equalização de histograma

Figura 17 – Resultados das técnicas para realçar o contraste dos parasitos

4.3.2 Background Subtraction

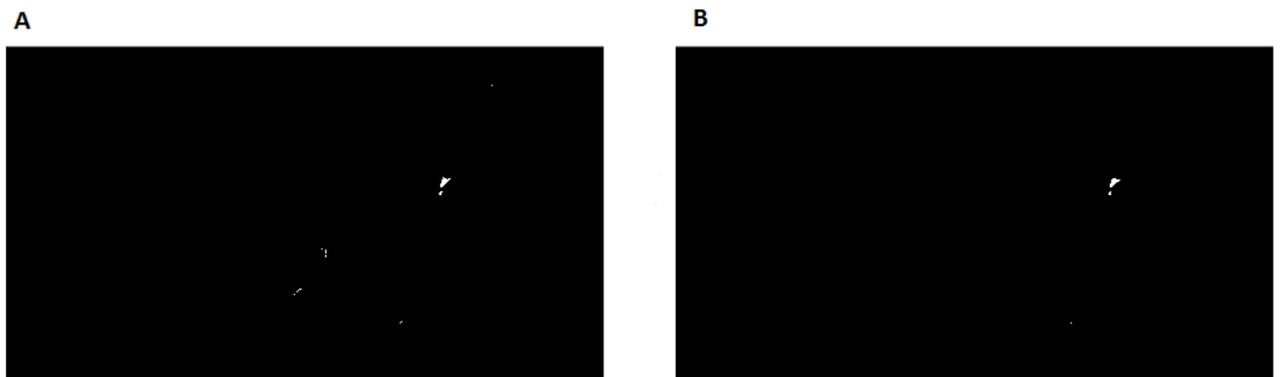
Após realizar a equalização de histograma adaptativo, a subtração de imagens é o próximo método escolhido para extrair apenas as regiões em movimento no vídeo que correspondem a presença de um parasito. É importante lembrar que na amostra com *T. cruzi* em cultura, não há hemácias.

Durante o processo, a cada *frame* par, a imagem atual é subtraída da imagem anterior para se obter uma diferença. Com o propósito de eliminar ruídos, principalmente aqueles resultantes da variação de iluminação no campo de visão, um *threshold* é aplicado para ignorar os *pixels* que se encontram abaixo de um determinado limiar, o que irá gerar uma imagem binária onde os valores selecionados se encontram em branco. O valor do

threshold foi definido empiricamente, sendo os testes feitos com valores menores, dado que o *T. cruzi* apresenta baixo contraste e se deseja manter as informações correspondentes a esse parasito. Visto que a intensidade do *pixel* varia de 0 a 255, definiu-se que o melhor valor de *threshold* para os vídeos utilizados é 20.

Diante dos pequenos ruídos que ainda aparecem na imagem binária, é necessário realizar um novo tratamento para evitar detecção de objetos inexistentes. Para solucionar esse problema, aplica-se o filtro da média em toda a imagem diferença. De acordo com Schulze (2001), o filtro da média é uma janela (ou *kernel*) que desliza pela imagem com o intuito de substituir o valor do centro do *kernel* pela média dos valores de toda a janela.

Os resultados podem ser avaliados pela figura abaixo. Ela apresenta imagens diferença, sendo que a imagem *a* apresenta alguns ruídos e após a aplicação do filtro da média esses pontos desaparecem (imagem *b*).



(a) Imagem diferença gerada para um *threshold* igual a 20 (b) Imagem *a* depois do filtro da média

Figura 18 – Subtração de imagem

É possível observar que mesmo com todas as operações anteriores, um parasito pode se encontrar dividido na imagem binária devido há alguma região do seu flagelo com baixo contraste. Essa situação pode ocasionar a detecção de falsos parasitos. Com a finalidade de solucionar esse problema, a operação de dilatação é aplicada na imagem binária de subtração.

A dilatação é uma das suas operações matemáticas morfológicas, sendo a segunda, a erosão. O objetivo é aumentar as barreiras dos *pixels* de *foreground* (região de interesse) de forma a ampliar a área desse objeto e diminuir ou eliminar qualquer tipo de orifício ou espaço vago nessa região (FISHER S. PERKINS; WOLFART, 2003). Um exemplo de dilatação pode ser visto na imagem a seguir:

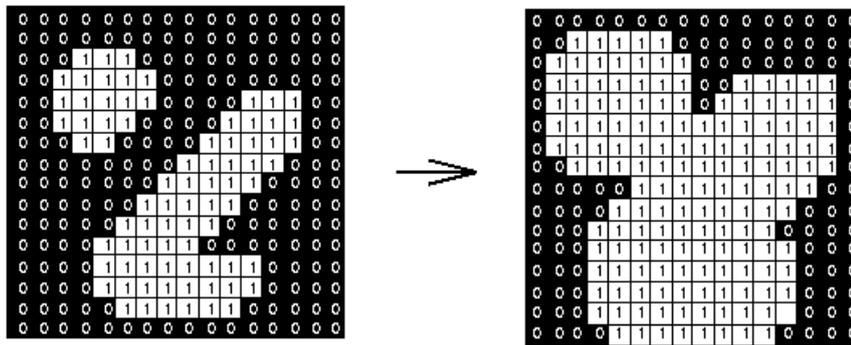


Figura 19 – Dilatação utilizando *kernel* 3x3

Fonte: Fisher S. Perkins e Wolfart (2003)

Com efeito, a figura abaixo mostra que os *pixels* que correspondem ao parasito ficam unidos como resultado da operação de dilatação, como era esperado.

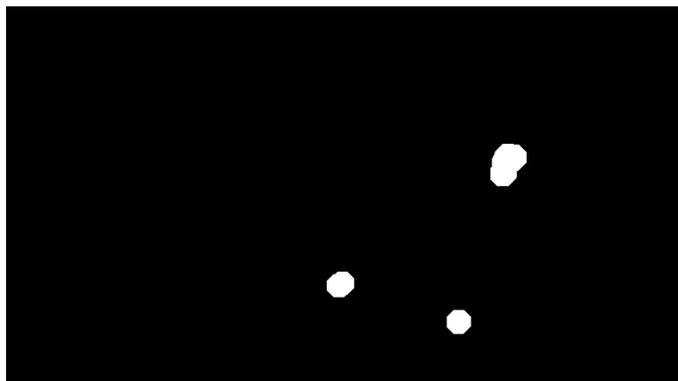


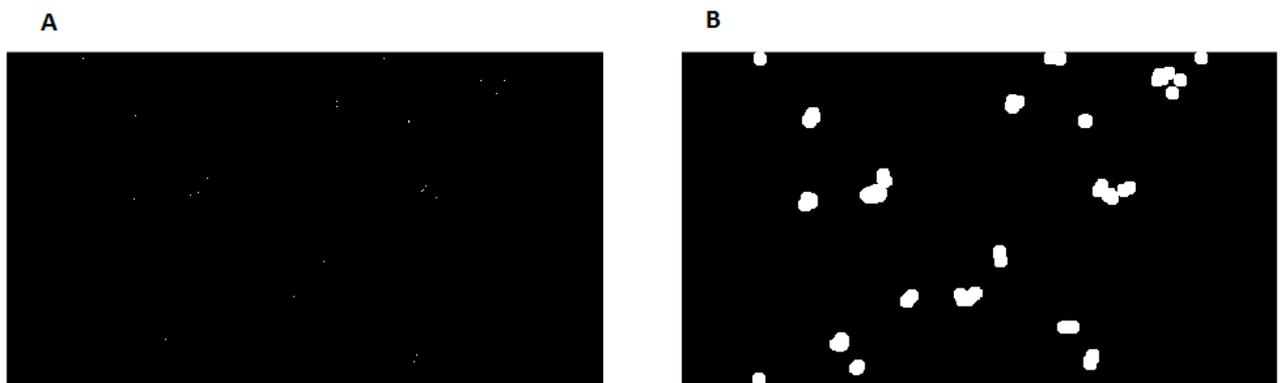
Figura 20 – Dilatação da imagem diferença

4.3.3 *Optical Flow*

Além do processo de subtração de imagens, calcula-se o *optical flow* da imagem de Lucas-Kanade com Gaussiana para se obter os vetores de velocidade dos objetos em movimento no vídeo sob a imagem resultante do processo de equalização de histograma adaptativo.

Em seguida, considera-se que o parasito apresenta o maior valor de velocidade na cena, já que não há hemácias nesse tipo de amostra. Assim, através da função *imregional-max()* é possível obter uma imagem binária onde os pontos brancos representam os valores máximos do módulo de velocidade. Essa função considera que a região de máximo são valores conectados ("vizinhos") com um valor constante de intensidade t , sendo os valores das bordas desse região, menor que t . Logo, os valores determinados como 1 na imagem binária são as regiões de máximo.

No entanto, esses pontos estão distribuídos em uma determinada área, o que pode levar a identificação de um número de *T. cruzi* maior do que realmente existe. Portanto, aplica-se a operação de dilatação nessa imagem para unir os pontos de velocidade máxima de modo que eles representem apenas um objeto. O resultado dessa operação pode ser vista da figura a seguir:



(a) Imagem gerada a partir das regiões de máximo do módulo de velocidade calculado pelo *Optical Flow* (b) Dilatação da imagem *a*

Figura 21 – *Optical Flow*

4.3.4 Combinação de Métodos para Detecção de Movimento

O método de subtração de imagens gera uma imagem *img1* e o *optical flow* produz uma segunda imagem *img2*. Esses dois resultados podem ser combinados através da operação AND para adquirir os objetos em comum detectados pelos dois métodos afim de minimizar o erro.

Para obter as coordenadas dos objetos encontrados a partir dessa informação e fazer a contagem e *tracking* dos parasitos, utiliza-se a função *Blob Analysis* disponibilizada pelo Matlab. Ela é responsável por computar estatísticas de regiões conectadas em uma imagem binária como área, centroide, *bounding box*, etc., sendo que as informações do *bounding box* fornecem as coordenadas do parasitos. Deste modo, os objetos são marcados e contados pelo algoritmo, como ilustra a imagem abaixo.

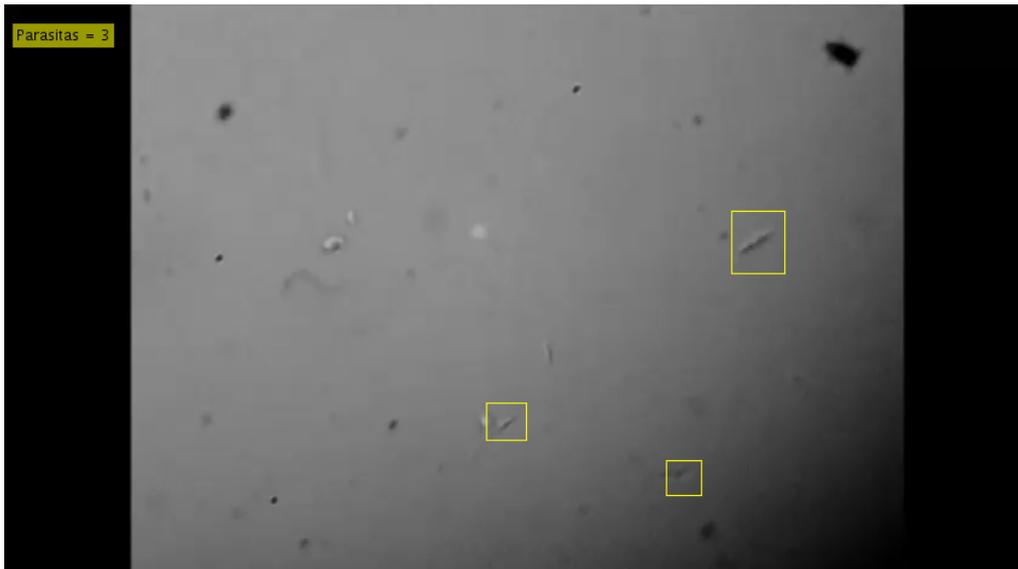


Figura 22 – Detecção do parasito

Parasito detectado pelo *bounding box*

Em resumo, a proposta apresentada mantém a hipótese de variação de velocidade para a detecção do parasito e além disso desconsidera informações de gradiente de intensidade. Os resultados obtidos pela metodologia proposta pode ser visto no capítulo 5.

4.3.5 *Gaussian Mixture Model*

Com o objetivo de comparar o resultado do algoritmo que combina os métodos de *optical flow* e *background subtraction* com uma segunda abordagem, foi implementada uma solução de detecção que utiliza o método GMM. Considerando que na amostra em cultura só o *T. cruzi* se move, o GMM tende a se mostrar eficiente para esse tipo de cenário, o que não aconteceu para amostras de sangue. O algoritmo utilizado foi o mesmo implementado na seção 4.2.2, com adição da equalização de histograma adaptativo para realçar o contraste dos parasito e por isso, não será discutido em detalhes nessa seção.

5 Resultados

A avaliação de sistemas de segmentação de imagens médicas é uma tarefa importante, não só quando estes são introduzidos em procedimentos clínicos mas também durante a fase de *design* do algoritmo. A validação realizada no processamento de imagens médicas é extremamente importante, pois apresenta impacto no resultado clínico e conseqüentemente na saúde dos pacientes (POPOVIC et al., 2007). Analogamente, é indispensável realizar a avaliação dos resultados encontrados pelo algoritmo de detecção do *T. cruzi*, afim de garantir a qualidade dos dados que serão utilizados na pesquisa desenvolvida pelo LIMP/UFOP.

De tal modo, se torna evidente a necessidade de calcular métricas que permitam averiguar a habilidade do programa em classificar os objetos como parasito ou não. Nesse contexto, Zhu et al. (2010) afirmam que sensibilidade, especificidade e acurácia são estatísticas comumente usadas para descrever a eficiência de um diagnóstico médico, que sob o mesmo ponto de vista, podem ser aplicadas na avaliação desse trabalho.

Nesse contexto, acurácia é responsável por medir o quão corretamente o programa identifica ou exclui a possibilidade de um objeto ser o *T. cruzi*, e é determinada pelos parâmetros de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade avalia o quão bem o algoritmo detecta um parasito verdadeiro, enquanto a especificidade estima qual é a probabilidade de um objeto que não é um parasito ser corretamente classificado (ZHU et al., 2010).

Além disso, existem vários termos que são comumente usados para descrever a sensibilidade, especificidade e acurácia (ZHU et al., 2010). Esses termos podem ser vistos a seguir, já adaptados ao problema de detecção do *T. cruzi*:

- *True positive (TP)*: Existe um parasito e este foi corretamente identificado;
- *True negative (TN)*: O objeto não é um parasito e ele foi corretamente rejeitado;
- *False negative (FN)*: Rejeita um objeto que é um parasito;
- *False positive (FP)*: Marca um objeto que não é um parasito como tal.

Logo, sensibilidade, especificidade e acurácia podem ser descritos como:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{TP}{(TP+FN)}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{TN}{(TN+FP)}$$

$$Acurácia = \frac{(TN+TP)}{(TN+TP+FN+FP)}$$

Onde sensibilidade também é conhecida como *true positive rate* (TPR) e especificidade é denominada *true negative rate* (TNR). Nesse contexto, para que o detector de parasitos seja considerado bom, ele deve apresentar uma alta taxa de TP e baixa taxa de FP.

É importante ressaltar que os valores de TP, TN, FN e FP só podem ser obtidos através de uma contagem manual que possa ser usada como critério de comparação com os resultados encontrados pelo algoritmo. Essa contagem é conhecida com *ground truth* (GT) ou verdade terrestre. Nesse trabalho, foi adquirido um GT para cada amostra descrita na seção 4.1. Com o propósito de encontrar o número de parasitos em cada frame do vídeo, outro algoritmo foi desenvolvido para possibilitar ao usuário realizar a contagem manual e salvar o resultado em um arquivo de Excel, sem levar em conta a coordenada xy da cada *T. cruzi*. O GT foi gerado a partir da contagem de um único especialista para o desenvolvimento deste trabalho.

Experimentos

Para analisar a eficiência do algoritmo, diversos vídeos de 5s de duração foram examinados, sendo que cada um deles corresponde à amostras de culturas com diferentes concentrações. A medida que o material da amostra foi diluído para gerar uma concentração diferente, o número de parasitos presentes do campo de visão (FOV) diminui. Nesse contexto, é interessante avaliar como a qualidade de detecção do programa varia de acordo com cada situação.

Os vídeos obtidos no LIMP foram gerados a partir das seguintes amostras:

- Berenice 78 (amostra original sem diluição)
- Concentração 1:2 (Berenice 78 na diluição de 1 para 2)
- Concentração 1:10 (Berenice 78 na diluição de 1 para 10)
- Concentração 1:100 (Berenice 78 na diluição de 1 para 100)

Utilizando o material coletado, foi feita a contagem manual que é empregada como verdade terrestre (*ground truth*) com a finalidade de servir como base para a comparação dos resultados encontrados na análise automática. Esse procedimento foi realizado através de um programa desenvolvido durante a pesquisa que pergunta ao usuário qual o número de *T. cruzi* presente a cada dois *frames* do vídeo. As respostas obtidas são armazenadas em uma tabela do Excel para que possam ser lidos a qualquer momento pela função de detecção.

A contagem dos parasitos foi realizada pelo algoritmo de subtração de imagens com *optical flow* e também pelo método GMM para critério de comparação de ambas abordagens. A cada dois *frames* do vídeo (quando é realizada a subtração de imagens), informações sobre a detecção são arquivadas como: número do *frame* atual, TP, FP e TN, também em um arquivo do Excel. O valor de FN que representa o número de parasitos que foram rejeitados, não pode ser calculado. Sendo assim, não é possível estimar o valor da especificidade, que depende diretamente de FN. Os demais parâmetros podem ser visto na tabela abaixo:

Tabela 1 – Parâmetros para análise de algoritmos

Amostras	Subtração de imagens com optical flow			GMM		
	TP	FP	TN	TP	FP	TN
Diluição 1:2	26,25	0,53	1,58	25,97	3,68	0,70
Diluição 1:10	2,55	0,24	1,08	2,42	0,04	1,54
Diluição 1:100	0,45	0,08	0,37	0,86	1,18	0,10
Berenice78	5,57	0,00	0,00	10,17	0,29	0,97

Afim de comparar os resultados de todos os vídeos, calcula-se a média das medidas de todos os *frames* por vídeo, para que a partir desses valores seja possível calcular o TPR (*true positive rate* - sensibilidade) e o FPR (*false positive rate*), como pode ser visto na tabela 1. Esse cálculo é feito pois o GT foi baseado no número de parasitos detectados sem considerar sua posição no plano xy. A tabela abaixo mostra os resultados obtidos para todas as amostras:

Tabela 2 – Resultado da análise dos algoritmos de detecção de movimento

Amostras	<i>Background subtraction</i> com <i>optical flow</i>		GMM	
	TPR	FPR	TPR	FPR
Diluição 1:2	91%	25%	90%	84%
Diluição 1:10	85%	18%	81%	2%
Diluição 1:100	45%	17%	86%	92%
Berenice78	40%	-	73%	23%

Na tabela 2, o TPR aumenta ao mesmo passo que a concentração de parasitos, exceto para a amostra Berenice 78 de ambos os métodos. Também é possível observar que o TPR do GMM é melhor do que a abordagem que combina *background subtraction* com *optical flow* para as concentrações 1:100 e Berenice 78, porém os valores de FPR são mais altos.

6 Conclusão

Esse trabalho apresentou uma solução automática para contagem de *T. cruzi* por meio de técnicas de Processamento Digital de Imagens. Entre as hipóteses utilizadas para resolver esse problema, utilizou-se informações de velocidade dos objetos para detectar a região onde os parasitos se localizam. Além disso, foi necessário levar em consideração o baixo contraste do parasito, tanto na amostra de sangue quanto em meio de cultura e a sua oclusão por hemácias no caso da primeira amostra. A conclusão foi dividida em duas secções para melhor compreensão das características de cada experimento.

6.1 Vídeos de amostra de sangue com parasitos

De acordo com os resultados citados nas metodologias aplicadas para a detecção e contagem do *T. cruzi* em amostras de sangue, é possível perceber que a determinação das *features* necessárias para identificação do parasito e como elas devem ser combinadas para tal tarefa é um trabalho extremamente complexo pois o cenário do vídeo possui diversas variáveis que não permitem a generalização do caso.

Por exemplo, depois de ler o artigo *Flagellar motility of Trypanosoma cruzi epimastigotes* de Ballesteros-Rodea et al. (2012) onde foram avaliados vários parâmetros como velocidade, trajetória e ângulo de direção em uma situação ideal onde os parasitos se moviam livremente e tinha sua posição identificada devido à marcadores fluorescentes aplicados no *T. cruzi*, concluiu-se que não existe um padrão definido de motilidade para o parasito. Isso explica porque a classificação por *clustering* e mapa de cores não forneceram informação importantes para realizar reconhecimento de padrão.

Outros fatores importantes que devem ser considerados é que o parasito reduz o seu movimento a partir do momento que a amostra de sangue é coletada. Como os pesquisadores também utilizam a informação de motilidade para realizar a contagem manual, a amostra não deve ser analisada depois de duas horas após a coleta. Esse fato explica porque determinar um certo limiar (de velocidade ou aceleração por exemplo) pode ser arriscado já que parasitos de outras amostras podem possuir motilidades diferentes.

Ademais, o número de hemácias distribuídas ao redor do parasito representa um obstáculo ao movimento, proporcionando uma diversidade ainda maior dos valores de velocidade do *T. cruzi* em diferentes cenários. Ainda salienta-se que é necessário testar outros métodos de classificação de dados diferentes do *clustering*, usar informações e

velocidade, componente V_x , V_y e aceleração.

6.2 Vídeos de cultura com *Trypanosoma cruzi*

De acordo com a tabela do capítulo de Resultados, é possível perceber que quanto maior a concentração da amostra (onde o número de parasitos é alto), melhor o número de acertos de detecção, representados pela taxa TPR. Inicialmente, era esperado que ambos algoritmos (subtração de imagens com *optical flow* e GMM) apresentassem melhor resultado para amostras com poucos parasitos, entretando o contrário foi provado.

Esse resultado pode ser justificado pelo fato que, os parasitos presentes no vídeos de amostras de maior concentração, apresentam alto grau de motilidade em relação aos parasitos de outras amostras. Essa característica aumenta a probabilidade do *T. cruzi* ser identificado como objeto de interesse e não como *background*.

Além disso, em amostras onde há poucos parasitos, como na concentração 1:100, é necessário movimentar a lamínula e fazer ajustes de foco para encontrar os parasitos quase inexistente. Esse tipo de alteração frequente causa perda de intensidade no contraste do *T. cruzi*, e falsa detecção do *foreground* devido à impurezas presentes na lente do ocular, já que toda a imagem se movimenta durante a busca de um FOV ideal para análise.

Comparando as duas abordagens, é possível perceber que a combinação dos métodos de *background subtraction* e *optical flow* apresentam melhor resultado que o GMM, visto que a taxa FPR (que representa o número de parasitos identificados incorretamente) é alta para o método GMM. Uma possível justificativa para esse resultado é que o método de mistura de Gaussianas é altamente sensível ao valor definido como variância, podendo ele ser responsável pela baixa detecção de parasitos ou pela detecção exagerada ocasionando falsos positivos. É possível que o GMM venha a apresentar resultados melhores se combinado com outros métodos e melhor definição do parâmetro de variância.

7 Sugestões de trabalhos futuros

7.1 Vídeos de amostra de sangue com parasitos

A variação da aceleração em diferentes regiões foi a abordagem que gerou melhores resultados em relação aos outros métodos testados, mas ainda não foi satisfatório. É necessário investigar métodos para avaliar regiões da imagem sem utilizar estruturas de repetições para percorrer as linhas e colunas dessa matriz. Uma possível solução seria utilizar a função *imregionalmax* e avaliar como os dados resultantes se comportam.

A matriz de aceleração provavelmente deve ser combinada com outras *features* da cena para classificar uma região como parasito ou não. A hipótese de que o parasito se encontra onde há maior variação de velocidade não é válida em situações que existem vários parasitos no mesmo campo de visão e em que o fluxo das hemácias é intenso. É possível que técnicas de *machine learning* mais robustas sejam capazes de gerar resultados satisfatórios.

Para melhorar o tempo de processamento do programa e gerar um executável que possa ser utilizado pelos pesquisadores do LIMP, é aconselhável transcrever o código para outra linguagem de programação como C, C++ ou Python por exemplo.

7.2 Vídeos de cultura com *Trypanosoma cruzi*

Para fazer a avaliação mais precisa da eficiência do algoritmo deve-se considerar não somente se o número de parasitos detectados pelo programa é similar à contagem manual, mas também a sua localização. Durante os experimentos realizados nesse trabalho, a ferramenta *Ground Truth Labeler* disponibilizada para o Matlab foi utilizada durante a etapa de geração do *ground truth*. O resultado obtido não foi satisfatório, visto que a marcação das regiões de interesse é um processo demorado e cansativo devido a performance da ferramenta.

Esse processo também foi realizado em um computador com a capacidade de processamento avançada, mas nenhuma melhora significativa foi alcançada em relação ao tempo de processamento dos *frames* pelo *Ground Truth Labeler*. Foi possível obter o GT de um vídeo, que foi salvo em um arquivo de extensão *.mat()*. Ao ser lido pelo *script* do Matlab para ser utilizado como parâmetro de comparação com o método automático, as coordenadas obtidas são incorretas, sendo deslocadas da posição real por um valor no

constante para todos os objetos. Por isso, há a necessidade de encontrar um procedimento mais eficaz para realização de *ground truth* de qualidade.

Outra abordagem que pode gerar bons resultados, é o algoritmo de Kalman Filter, que utiliza GMM para identificar o *foreground* e técnicas de previsão e correção para melhorar a localização das coordenadas x,y do pasito. Devido ao seu movimento ondulado, mesmo quando isolado em meio de cultura, o *T. cruzi* pode perder um pouco do seu contraste em determinadas situações de acordo com a posição de seu flagelo. Estimar sua possível localização seria um fator interessante para evitar erros de detecção e conseqüentemente contagem.

—

Referências

- ALANIS, E. et al. Detection of motile micro-organisms in biological samples by means of a fully automated image processing system. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. *IV Iberoamerican Meeting of Optics and the VII Latin American Meeting of Optics, Lasers and Their Applications*. [S.l.], 2001. p. 22–25. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 24.
- ALANIS, E. et al. Optical detection of trypanosoma cruzi in blood samples for diagnosis purpose. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. *5th Iberoamerican Meeting on Optics and 8th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Their Applications*. [S.l.], 2004. p. 24–28. Citado 3 vezes nas páginas 27, 28 e 29.
- BALLESTEROS-RODEA, G. et al. Flagellar motility of trypanosoma cruzi epimastigotes. *BioMed Research International*, 2012. Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 71.
- D'AMBROSIO, M. V. et al. Point-of-care quantification of blood-borne filarial parasites with a mobile phone microscope. *Science translational medicine*, 2015. American Association for the Advancement of Science, v. 7, n. 286, p. 286re4–286re4, 2015. Citado 4 vezes nas páginas 29, 30, 31 e 32.
- FISHER S. PERKINS, A. W. R.; WOLFART, E. *Dilation*. 2003. <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/dilate.htm>. Acessado em 24/06/2017. Citado 2 vezes nas páginas 63 e 64.
- GONZALEZ, R.; WOODS, R. *Digital Image Processing*. Pearson/Prentice Hall, 2008. ISBN 9780131687288. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=8uGOnjRGEzoC>>. Citado na página 23.
- JAIN, A. K. Data clustering: 50 years beyond k-means. *Pattern recognition letters*, 2010. Elsevier, v. 31, n. 8, p. 651–666, 2010. Citado na página 58.
- JAIN, A. K.; DUIN, R. P. W.; MAO, J. Statistical pattern recognition: A review. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 2000. Ieee, v. 22, n. 1, p. 4–37, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 57 e 58.
- MATHWORKS. *Optical flow for motion estimation in video*. <https://www.mathworks.com/discovery/optical-flow.html>. Acessado em 17/04/2017. Citado na página 39.
- POPOVIC, A. et al. Statistical validation metric for accuracy assessment in medical image segmentation. *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, 2007. Springer, v. 2, n. 3, p. 169–181, 2007. Citado na página 67.
- ROYDEN, C. S.; HOLLOWAY, M. A. Detecting moving objects in an optic flow field using direction-and speed-tuned operators. *Vision research*, 2014. Elsevier, v. 98, p. 14–25, 2014. Citado 3 vezes nas páginas 39, 40 e 41.

- SCHULZE, M. A. *What are the mean and median filters?* 2001. <https://www.markschulze.net/java/meanmed.html>. Acessado em 24/06/2017. Citado na página 63.
- STAUFFER, C.; GRIMSON, W. E. L. Adaptive background mixture models for real-time tracking. In: IEEE. *Computer Vision and Pattern Recognition, 1999. IEEE Computer Society Conference on*. [S.l.], 1999. v. 2, p. 246–252. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 38.
- WATANABE, M.; TAKEDA, N.; ONOGUCHI, K. A moving object recognition method by optical flow analysis. In: IEEE. *Pattern Recognition, 1996., Proceedings of the 13th International Conference on*. [S.l.], 1996. v. 1, p. 528–533. Citado na página 40.
- ZHU, W. et al. Sensitivity, specificity, accuracy, associated confidence interval and roc analysis with practical sas implementations. *NESUG proceedings: health care and life sciences, Baltimore, Maryland*, 2010. v. 19, 2010. Citado na página 67.
- ZHU, Y.; HUANG, C. An adaptive histogram equalization algorithm on the image gray level mapping. *Physics Procedia*, 2012. Elsevier, v. 25, p. 601–608, 2012. Citado na página 61.
- ZIVKOVIC, Z. Improved adaptive gaussian mixture model for background subtraction. In: IEEE. *Pattern Recognition, 2004. ICPR 2004. Proceedings of the 17th International Conference on*. [S.l.], 2004. v. 2, p. 28–31. Citado na página 37.
- ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (roc) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical chemistry*, 1993. Clinical Chemistry, v. 39, n. 4, p. 561–577, 1993. Nenhuma citação no texto.