

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

AVALIAÇÃO DAS MÉTRICAS DE AUTOFOCO PARA APLICAÇÃO EM
IMAGENS DE BACIOSCOPIA DE TUBERCULOSE OBTIDAS
UTILIZANDO MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

ALMIR KIMURA JUNIOR

MANAUS

2010

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

ALMIR KIMURA JUNIOR

AVALIAÇÃO DAS MÉTRICAS DE AUTOFOCO PARA APLICAÇÃO EM
IMAGENS DE BACILOSCOPIA DE TUBERCULOSE OBTIDAS
UTILIZANDO MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

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

Orientadora: Profa. Dra. Marly Guimarães Fernandes Costa

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

MANAUS

2010

ALMIR KIMURA JUNIOR

AVALIAÇÃO DAS MÉTRICAS DE AUTOFOCO PARA APLICAÇÃO EM
IMAGENS DE BACIOSCOPIA DE TUBERCULOSE OBTIDAS
UTILIZANDO MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

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

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr. Marly Guimarães F. Costa, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Eddie Batista de Lima Filho
Centro de Ciência, Tecnologia e Inovação do Pólo Industrial de Manaus

Prof. Dr. Waldir Sabino da Silva Júnior
Universidade Federal do Amazonas

MANAUS

2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Almir Kimura e Maria Filomena Kimura, pelo amor incondicional, por serem exemplos em todos os sentidos da minha vida, pelo apoio e sabedoria nos momentos mais difíceis. Agradeço todos os dias por ter pais tão maravilhosos.

Ao meu irmão Alan Kimura pelos momentos de alegria e pela certeza de que sempre estaremos unidos.

AGRADECIMENTO

À minha orientadora Profa. Dra. Marly Guimarães Costa agradeço pela amizade e por tudo o que representou pra mim neste tempo de mestrado, como modelo de honestidade intelectual e compromisso com a qualidade acadêmica e com a universidade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cícero Ferreira Fernandes Costa Filho por todos os conhecimentos transmitidos. Agradeço a amizade e o respeito mútuo; assim como a compreensão e a sabedoria nos momentos de decisão.

À Dra. Luciana Fujimoto e Dra. Julia Salem por toda a dedicação e carinho demonstrado no decorrer do trabalho.

Ao Centro de Tecnologia Eletrônica e da Informação CETELI-UFAM , a SUFRAMA e ao INPA , por toda a infra estrutura e suporte necessário para a realização do trabalho.

Ao apoio financeiro recebido do Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo concedida.

Agradeço a minha noiva Tatiana Nayara Libório, por todo o apoio e companheirismo nesse momento de transição na minha vida, pelos conselhos e carinhos inestimáveis.

A todos os meus amigos adquiridos no decorrer dessa trajetória, Claudio Pinheiro, Kelly Vinente, Charles Melo, Mitsuyoshi Nishi, Luciano Pinto, Hillermann Ferreira, Ricardo Erikson, Gisele Lira, Francisco Coelho e Rafael Padilha, tanto pela amizade como pelos momentos de descontração.

Agradeço a todas as pessoas especiais que não estão mais entre nós, mas que nunca serão esquecidas, em especial à Fernanda Okamura Abensur.

Aos meus companheiros e amigos, Edgar Mesquita, Bruno Amaral, Bruno Judiss e Raquel Okamura por mostrarem a importância da amizade verdadeira.

“Perguntaram ao Dalai Lama:

- O que mais te surpreende na humanidade?

E ele respondeu:

- Os homens... Porque perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem dinheiro para recuperar a saúde.

E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver nem o presente nem o futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.”

Dalai Lama

RESUMO

A tuberculose é considerada um problema público mundial. Estima-se que um terço da população mundial está infectado com o bacilo *Mycobacterium Tuberculosis*, podendo assim desenvolver a doença. A detecção da doença pode ser realizada pela baciloscopia, que consiste na contagem de bacilos em 100 campos distintos de uma lâmina contendo amostra de secreção pulmonar do paciente. A realização dessa tarefa exige muito treinamento e atenção do executor e, via de regra, apresenta taxa de falsos negativos alta. Para aumentar o desempenho da baciloscopia busca-se desenvolver um sistema automático de contagem de bacilos. O trabalho proposto fundamenta-se no estudo da etapa inicial do processo de automação, qual seja, o foco das imagens de campos das lâminas. Com o intuito de identificar qual métrica é mais adequada para avaliação do foco das imagens de baciloscopia de tuberculose em microscopia convencional, coradas pelo método de *Kinyoun*, foram investigadas nove métricas de autofoco (gradiente de Brenner, energia do Laplaciano da imagem, transformada de *wavelet*, variância do nível de cinza, variância normalizada pela média de intensidade, autocorrelação, correlação baseada em desvio padrão, variância do logaritmo do histograma e entropia), amplamente utilizadas na literatura. Para a definição da melhor métrica, curvas de foco foram obtidas e avaliadas utilizando cinco critérios (acurácia, faixa, picos falsos, largura e tempo) e duas análises (semiquantitativa e quantitativa). Essa metodologia foi aplicada a um conjunto representativo de 1800 imagens (- com alta densidade de conteúdo, com baixa densidade de conteúdo assim como em imagens com alta quantidade de bacilos e com baixa quantidade de bacilos). Esse estudo evidenciou que a métrica de melhor desempenho foi a variância do nível de cinza da imagem. A definição da casuística permitiu ainda a avaliação das métricas em imagens provenientes de lâminas preparadas sem o uso do contra corante azul de metileno. Para esse tipo de imagem a métrica que apresentou o melhor desempenho foi a baseada em Entropia.

Palavras Chaves: autofoco, tuberculose, baciloscopia, automação por imagem.

ABSTRACT

Tuberculosis is considered a world-wide political issue. It has been known that a third of the world population is infected with the *Mycobacterium Tuberculosis* bacillus and consequently can develop the disease. The finding of the disease is carried by bacilloscopy, which consists of the counting of bacilli in 100 different fields of a slide with sputum sample smear. This type of work demands a lot of training and has a high false negative rate. In order to increase the performance of the bacilloscopy, the development of an automated system to perform the counting of the bacilli is necessary. Our work is based on the study of initial stage of the automated process, emphasizing the autofocus (AF). We investigated nine autofocus functions (Brenner gradient, energy Laplace, wavelet transformation, variance, normalized variance, autocorrelation, standard-deviation-based correlation, variance of log histogram and entropy), widely used in literature, in order to define the best function for images of bacilloscopy of conventional microscopy stained with *Kinyoun* method. In order to identify the focus functions that had the best performance the focus curve was evaluated by five criteria (accuracy, range, number of false maxima, width and execution time) with two types of analysis (semiquantitative and quantitative). This methodology was performed on images with high and low density of contents, as well as on images with a lot and few amount of bacillus. The total images for the experiment was 1800. Through this study, it was determined that the best function for this type of image is based on Variance. In order to deepen the results, we performed the same study for *Kinyoun* images without the final step of staining, because it results in a background image more uniform, which can be used for future applications for the automation of counting of bacilli. For these types of images, the function that showed the best performance was based on Entropy.

Keywords: autofocus, tuberculosis, bacilloscopy, imaging

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE PROCURA DA POSIÇÃO NO EIXO Z DO VALOR MÁXIMO DE UMA MÉTRICA DE AUTOFOCO.....	23
FIGURA 2 - IMAGEM DE BACILOSCOPIA DE MICROSCÓPIO CONVENCIONAL ONDE UM ESPECIALISTA IDENTIFICOU A PRESENÇA DE BACILO.....	44
FIGURA 3 – IMAGEM DE DIFERENÇA R-G CORRESPONDENTE A IMAGEM MOSTRADA NA FIGURA 2.	44
FIGURA 4 - IMAGEM ORIGINAL COM OS BACILOS CIRCULADOS.....	45
FIGURA 5 - IMAGEM RESULTANTE DA DETECÇÃO DOS BACILOS DA IMAGEM DA FIGURA 4, NA QUAL OS BACILOS DETECTADOS PELO MÉTODO APRESENTAM-SE COMO REGIÕES BRANCAS NA IMAGEM.....	45
FIGURA 6 – EXEMPLO DE IMAGEM BACILOSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ONDE OS BACILOS SE APRESENTAM NA COR AMARELA.....	46
FIGURA 7 - (A) IMAGEM ORIGINAL, (B) DETECÇÃO DE BORDAS, (C) OPERAÇÃO DE FECHAMENTO MORFOLÓGICO, (D) PREENCHIMENTO DAS REGIÕES FECHADAS, (E) ABERTURA MORFOLÓGICA (F) SEGMENTAÇÃO.....	47
FIGURA 8 – ETAPA DE CLASSIFICAÇÃO: ARVORE DE DECISÃO.....	48
FIGURA 9 - ETAPAS METODOLÓGICAS PROPOSTA NA DISSERTAÇÃO.....	49
FIGURA 10 –CASUÍSTICA DO ESTUDO: REPRESENTAÇÃO DOS QUATRO GRUPOS DE IMAGENS CUJAS LÂMINAS FORAM PREPARADAS PELO MÉTODO DE KINYOUN COMPLETO, OU SEJA UTILIZANDO-SE COM FUNDO AZUL DE METILENO (CONTRA CORANTE).....	51
FIGURA 11 – CASUÍSTICA DO ESTUDO: REPRESENTAÇÃO DOS DOIS GRUPOS DE IMAGENS CUJAS LÂMINAS FORAM PREPARADAS PELO MÉTODO DE KINYOUN INCOMPLETO, OU SEJA SEM A FASE FINAL DE COLORAÇÃO DO FUNDO COM AZUL DE METILENO (CONTRA CORANTE).	51
FIGURA 12 – EXEMPLO DE IMAGEM DO GRUPO CFAAD.....	52
FIGURA 13 – EXEMPLO DE IMAGEM DO GRUPO CFABD.....	52
FIGURA 14 – EXEMPLO DE IMAGEM DO GRUPO CFBAD.....	53
FIGURA 15 - IMAGEM DO GRUPO CFBBDD.....	53
FIGURA 16 - IMAGEM DO GRUPO SFAD.....	54
FIGURA 17 - IMAGEM DO GRUPO SFBD.....	54
FIGURA 18 - AMBIENTE DE AQUISIÇÃO DAS IMAGENS.....	57
FIGURA 19- TÉCNICA PARA ACOPLAMENTO DA CÂMERA.....	57
FIGURA 20- ILUSTRAÇÃO DE CURVAS DE FOCO.....	59

FIGURA 21 – EXEMPLOS DE CURVA DE FOCO (A) COM ACURÁCIA IGUAL A -1 E (B) COM ACURÁCIA IGUAL A 0	60
FIGURA 22 - EXEMPLO DE CURVA DE FOCO COM FAIXA IGUAL A 3	61
FIGURA 23 - EXEMPLO DE CURVA DE FOCO ONDE TEMOS 4 PICOS FALSOS	61
FIGURA 24 - EXEMPLO DE CURVA DE FOCO ILUSTRANDO A DEFINIÇÃO DO CRITÉRIO LARGURA .	62
FIGURA 25 – ILUSTRAÇÃO DE UMA CURVA ROC	64
FIGURA 26 - VERDADEIROS POSITIVOS, VERDADEIROS NEGATIVOS, FALSOS POSITIVOS E FALSOS NEGATIVOS	65
FIGURA 27 – CURVAS ROC PARA O GRUPO CF (A) MÉTRICA MBRENNER (B) MÉTRICA M _{COR} .	80
FIGURA 28 - CURVAS ROC PARA O GRUPO SF (A) MÉTRICA M _{VAR} (B) MÉTRICA M _{ENTROP}	82

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - TAXA DE INCIDÊNCIA ANUAL DE TUBERCULOSE NO ESTADO DO AMAZONAS.....	17
TABELA 2 - EXEMPLO DE TABELA QUE SUMARIA OS RESULTADOS DE UMA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA.....	36
TABELA 3 - EXEMPLO DE TABELA QUE SUMARIA OS RESULTADOS DE UMA ANÁLISE QUANTITATIVA	37
TABELA 4- SUMÁRIO DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA SOBRE AUTOFOCO.....	41
TABELA 5 – CASUÍSTICA UTILIZADA PARA O ESTABELECIMENTO DA(S) MELHOR(ES) MÉTRICAS. O CONJUNTO DE GRUPOS QUE COMPÕEM ESSA CASUÍSTICA FOI DENOMINADO DE CONJUNTO DE TREINAMENTO	55
TABELA 6 – CASUÍSTICA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DA(S) MELHOR(ES) MÉTRICAS IDENTIFICADA(S), DENOMINADO DE CONJUNTO DE TESTE	55
TABELA 7 – SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA REFERENTE AO CONJUNTO DE IMAGENS 1 DO GRUPO CFAAD	66
TABELA 8 - SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA REFERENTE AO CONJUNTO DE IMAGENS 2 DO GRUPO CFAAD	67
TABELA 9 - SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA REFERENTE AO CONJUNTO DE IMAGENS 3 DO GRUPO CFAAD	67
TABELA 10 - SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA REFERENTE AOS 20 CONJUNTOS DE IMAGENS QUE CONSTITUEM O GRUPO CFAAD.....	68
TABELA 11 – SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DO GRUPO CFA (CFAAD + CFABD).	69
TABELA 12 –SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DO GRUPO CFB (CFBAD+CFBBD) .	69
TABELA 13 – SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA ORDENADO PARA O GRUPO CF.....	70
TABELA 14 –SUMÁRIO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DO GRUPO SF (SFAD + SFBD).....	70
TABELA 15 – SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO CFAAD	71
TABELA 16 – SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO CFABD	71
TABELA 17 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO CFA.....	72
TABELA 18 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA DO GRUPO CFA (CFAAD+CFABD).....	72
TABELA 19 – SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO CFBAD	73
TABELA 20 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO CFBBD	73
TABELA 21 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO CFB.....	73
TABELA 22 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA DO GRUPO CFB (CFBAD+CFBBD).....	74

TABELA 23 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO CF	74
TABELA 24 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA ORDENADO PARA O GRUPO CF.....	75
TABELA 25 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO SFAD	75
TABELA 26 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO SFBD	76
TABELA 27 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA PARA O GRUPO SF.....	76
TABELA 28 - SUMÁRIO DA ANÁLISE QUANTITATIVA DO GRUPO SF (SFAD+SFBD).....	76
TABELA 29 –SUMÁRIO DAS ANÁLISES SEMIQUANTITATIVA E QUANTITATIVA PARA A CASUÍSTICA DE TESTE DO GRUPO CF	77
TABELA 30 – SUMÁRIO DAS ANÁLISES SEMIQUANTITATIVA E QUANTITATIVA PARA A CASUÍSTICA DE TESTE DO GRUPO SF.....	77
TABELA 31 - TEMPO DE PROCESSAMENTO (S) DAS MÉTRICAS DE FOCO	78
TABELA 32 –SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC PARA O GRUPO CF	79
TABELA 33 –SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC PARA O GRUPO SF.....	80
TABELA 34 – SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA BRENNER NO GRUPO DE TREINAMENTO CF.....	83
TABELA 35 – SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA CORRELAÇÃO NO GRUPO DE TREINAMENTO CF.....	83
TABELA 36 - SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA ENTROPIA NO GRUPO DE TREINAMENTO SF	84
TABELA 37 - SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA VARIÂNCIA NORMALIZADA NO GRUPO DE TREINAMENTO SF.....	84
TABELA 38 – SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA BRENNER NO GRUPO DE TESTE CF	84
TABELA 39 – SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA CORRELAÇÃO NO GRUPO DE TESTE CF.....	84
TABELA 40 - SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA ENTROPIA NO GRUPO DE TESTE SF	85
TABELA 41 – SUMÁRIO DA ANÁLISE ROC REFERENTE A MÉTRICA VARIÂNCIA NORMALIZADA NO GRUPO DE TESTE SF.....	85
TABELA 42 - RESULTADOS HIPOTÉTICOS DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA	86

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo Alcool Ácido Resistente
BK	Bacilo de Koch
CI	Conjunto de Imagens
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Strategy</i>
Mbrenner	Métrica gradiente de Brenner
Mcor	Métrica autocorrelação
Mcordp	Métrica correlação baseada em desvio padrão
Mentrop	Métrica entropia
Mlaplaciano	Métrica energia do Laplaciano da imagem
Mlog	Métrica variância do logaritmo do histograma
Mvar	Métrica variância do nível de cinza
Mvarnorm	Métrica variância normalizada pela média da intensidade
Mwb	Métrica transformada de <i>wavelet</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Processamento Digital de Imagem
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
TB	Tuberculose
CFAAD	Imagens de baciloscopia de Tuberculose cujos campos apresentam alta densidade de conteúdo e grande quantidade de bacilos
CFABD	Imagens de baciloscopia de Tuberculose cujos campos apresentam alta densidade de conteúdo e pouca quantidade de bacilos
CFBAD	Imagens de baciloscopia de Tuberculose cujos campos apresentam baixa densidade de conteúdo e alta quantidade de bacilos
CFBBD	Imagens de baciloscopia de Tuberculose cujos campos apresentam baixa densidade de conteúdo e pouca quantidade de bacilos
SFAD	Imagens de baciloscopia de Tuberculose sem a utilização do contra corante azul de metileno, cujos campos apresentam grande quantidade de bacilos
SFBD	Imagens de baciloscopia de Tuberculose sem a utilização do contra corante azul de metileno, cujos campos apresentam pouca quantidade de bacilos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
1.3 ORGANIZAÇÃO	20
 CAPÍTULO II.....	 22
 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 22
2.1 INTRODUÇÃO	22
2.2 AUTOFOCO EM MICROSCOPIA	22
2.3 MÉTRICAS DE AUTOFOCO	24
2.3.1 Métricas baseadas na derivada da imagem.....	25
2.3.2 Métricas Baseadas na profundidade dos picos e vales da imagem	29
2.3.3 Métricas Baseadas em valores estatísticos da imagem.....	30
2.3.4 Medidas Baseadas no Histograma	32
2.3.5 Métricas baseadas na análise espectral da imagem.....	34
2.4 AVALIAÇÃO DAS MÉTRICAS DE FOCO UTILIZANDO ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA E QUANTITATIVA	34
2.5 BUSCA SISTEMÁTICA DA POSIÇÃO DA IMAGEM EM FOCO	37
2.6 SUMÁRIO DA REVISÃO BIBLIOGRAFICA SOBRE O TEMA AUTOFOCO.....	40
2.7 DIAGNÓSTICO AUTOMÁTICO DA TUBERCULOSE EM EXAME DE BACILOSCOPIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA	43
 CAPÍTULO III	 49
 MATERIAIS E MÉTODOS	 49
3.1 DEFINIÇÃO DA CASUÍSTICA.....	49
3.1.1 Preparação das Lâminas.....	55
3.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS.....	56
3.3 DEFINIÇÃO DAS MÉTRICAS DE AUTOFOCO	58
3.3.1 CÁLCULO DAS MÉTRICAS.....	59
3.4 CRITÉRIOS DA ANÁLISE DAS MÉTRICAS.....	60
3.4.1 Acurácia.....	60
3.4.2 Faixa.....	60

	15
3.4.3 Picos Falsos.....	61
3.4.4 Largura.....	62
3.4.5 Tempo	62
3.5 DESEMPENHO DAS MÉTRICAS	62
3.5.1 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA	63
3.5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	63
3.5.3 ANÁLISE ROC (<i>RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC</i>).....	64
CAPÍTULO IV.....	66
RESULTADOS	66
4.1 RESULTADOS DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA.....	66
4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA	71
4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA E QUANTITATIVA PARA O GRUPO DE TESTE	77
4.4 CRITÉRIO TEMPO DE PROCESSAMENTO	78
4.5 RESULTADOS DA ANÁLISE ROC (<i>RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC</i>)	79
4.5.1 Análise ROC: grupo de treinamento	83
4.5.2 Análise ROC: grupo de teste	84
ANÁLISE DE RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
CAPÍTULO VI.....	91
CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	97

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma das mais antigas doenças infecto-contagiosas já descritas. É transmitida, principalmente, pelas vias aéreas superiores por meio de gotículas salivares e acomete, sobretudo, os pulmões. Seu agente etiológico é o *Mycobacterium Tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch (BK). Desde os primeiros relatos, até a descoberta do bacilo por Robert Koch, em 1882, essa doença continua sendo considerada um grave problema de saúde pública no mundo inteiro. Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a tuberculose (TB) uma emergência mundial e, em 1995, sugeriu a adoção da Estratégia de Tratamento Diretamente Observado (*Directly Observed Treatment Strategy – DOTS*) como medida de controle da doença (WHO, 2008).

Em se tratando Aspectos epidemiológicos sobre a tuberculose, o texto Guia de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde Caderno 7 ano 2009, destaca que,

A tuberculose não apresenta variações cíclicas ou sazonais. A prevalência observada é maior em áreas de grande concentração populacional e precárias condições sócio-econômicas e sanitárias. A distribuição da doença é mundial, com tendência decrescente da morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos. (BRASIL, 2009, p. 51).

Em torno de um terço da população mundial possui o bacilo *Mycobacterium Tuberculosis*. Desse montante, 80% dos casos estão em somente 21 países, sendo o Brasil um deles. Anualmente há em torno de oito milhões de casos novos e quase 3 milhões de mortes por tuberculose. Em relação ao Brasil estima-se que mais de 50 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Mycobacterium Tuberculosis*, com aproximadamente 80 mil casos novos por ano. O número de mortes pela doença, é de 4 a 5 mil por ano (WHO, 2009).

Nos países desenvolvidos, a tuberculose apresenta-se mais restrita a três grupos (pessoas idosas, nas minorias étnicas e imigrantes estrangeiros). Nos países em desenvolvimento, a tuberculose está presente em todas as faixas etárias. No entanto, é mais freqüente em indivíduos entre 15 e 54 anos. No Brasil, os homens adoecem duas vezes mais do que as mulheres (BRASIL, 2009).

Ainda o texto Guia de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde Caderno 7 ano 2009, destaca que,

No Brasil, no ano de 2008, foram notificados 68.147 casos novos de tuberculose (coeficiente de incidência de 35,59 por 100.000 habitantes), dos quais. 56.172 foram formas pulmonares bacilíferas (coeficiente de incidência de 29,33 por 100.000 habitantes) e 9.712 extrapulmonares (coeficiente de incidência de 5,07 por 100.000 habitantes). Dadas as desigualdades socioeconômicas existentes, observa-se uma variação dessa taxa em diferentes regiões. (BRASIL, 2009, p. 51).

As maiores taxas de incidência são apresentadas pelo Amazonas e Rio de Janeiro (BRASIL, 2009).

Em particular, no estado do Amazonas, como visto na Tabela 1, esse índice vem decrescendo, porém ainda se encontra muito superior à média nacional. A maior incidência pode ser encontrada no município de São Gabriel da Cachoeira, onde a população predominante é a indígena, apresentando entre os anos 1999 e 2003 uma taxa média de 284 por 100.000 habitantes, 6,5 vezes maior que a incidência no país no ano de 2003 (44,44 por 100.000 habitantes) (MACHADO FILHO, 2008).

Tabela 1 - Taxa de Incidência anual de Tuberculose no Estado do Amazonas

Ano	Taxa de Incidência	População AM
1990	94,55	2.037.078
1991	93,66	2.103.243
1992	91,74	2.155.090
1993	93,34	2.217.585
1994	90,94	2.269.569
1995	87,10	2.320.229
1996	84,54	2.389.279
1997	79,90	2.460.606
1998	79,82	2.520.694
1999	79,16	2.580.839
2000	73,78	2.812.557
2001	78,37	2.900.218
2002	71,11	2.989.142
2003	67,14	3.068.681
2004	68,87	3.162.989
2005	64,50	3.232.330
2006	65,45	3.311.026
2007	66,66	3.341.096
2008	67,88	3.389.081

Fonte: MS/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN

Diagnóstico: O diagnóstico da tuberculose muitas vezes é complexo e exige a associação de diversas técnicas (VIERA, 2005).

A Baciloscopia direta do escarro é o método prioritário, porque permite descobrir a fonte mais importante de infecção, que é o doente bacilífero. De acordo com Vieira *et al.* 2005, esse exame de baixo custo permite a detecção de 70% a 80% dos casos de Tuberculose pulmonar com especificidade em torno de 84% a 100% . A baciloscopia consiste na análise microscópica direta do escarro do paciente com sintomas respiratórios suspeitos. Pequena fração da secreção é distendida em lâmina e, em seguida, corada pela utilização de soluções específicas; posteriormente essas lâminas são analisadas através de microscópios óticos convencionais. A análise é feita com a visualização das estruturas bacilares coradas em vermelho, em meio a um fundo azulado. O diagnóstico é dado pela ausência ou presença de bacilos, que quando presentes devem ser contados. Essa contagem deve ser confrontada com o escore estabelecido no protocolo de leitura padronizado pela OMS e adotado pelo Ministério da Saúde brasileiro. Esse protocolo estabelece que para o exame de uma única lâmina, seja realizada a análise de 100 campos microscópicos distintos. Essa tarefa demanda um tempo considerável, exigindo horas de concentração de um técnico capacitado (BRASIL, 2009).

Do exposto, vê-se que o principal problema do diagnóstico da tuberculose através da baciloscopia é a quantificação dos bacilos por inspeção visual. Nesse tipo de tarefa, a maioria dos diagnósticos falhos é atribuída a fatores humanos tais como critérios de decisão subjetivos ou variáveis, distração devido à presença de outras características mais marcantes na imagem ou simplesmente omissão causada por fadiga visual, por exemplo. Essas circunstâncias propiciam uma alta taxa de falsos negativos e uma grande variabilidade intra e inter observador. Estudos sugerem que esses erros são inevitáveis com observadores humanos e que são fortemente relacionados à experiência do interpretador (VIEIRA, 2008).

Segundo Costa (1996), métodos automáticos de análise de imagens possuem vários méritos, como confiabilidade, reprodutibilidade e eliminação da variabilidade intra e inter observador. A utilização de um método desse tipo reduz, potencialmente, a taxa de erro dos observadores, particularmente, sob circunstâncias nas quais grandes volumes de casos são analisados. Erros diagnósticos podem ocorrer, porém os mesmos tendem a ser sistemáticos.

Aquisição automática de imagens microscópicas consiste em uma operação autônoma essencial de um sistema automático de análise de imagens. Para aplicar técnicas de processamento de imagens e reconhecimento de padrões nas imagens microscópicas, os pesquisadores necessitam adquirir imagens precisamente em foco. Um passo crítico nessa

tarefa, no entanto, é a triagem automática daquelas em foco. Métodos de autofoco confiáveis para a aquisição de imagens microscópicas são indispensáveis para o uso em rotina.

Embora o tema autofoco seja bastante estudado na literatura, não há ainda uma solução geral disponível. Os métodos desenvolvidos se aplicam a um tipo de imagem e foram testados em circunstâncias bem definidas. Os pressupostos feitos para determinar o plano focal em microscopia por fluorescência não são compatíveis com a microscopia de contraste de fase, por exemplo, e este fato se mantém verdadeiro até hoje.

Foram identificados vários trabalhos que tratam da automatização da análise baciloscópica do *Mycobacterium Tuberculosis*. À exceção de um, todos os trabalhos dizem respeito à microscopia por fluorescência. No entanto a microscopia por fluorescência, em geral, não é utilizada em países sub ou em desenvolvimento. De acordo com Palomino *et al.* (2009) a razão está no fato de que todo o aparato utilizado na microscopia por fluorescência apresenta custo maior do que aquele utilizado na microscopia convencional. O único trabalho encontrado na literatura, que reporta à automatização do processo de detecção do *Mycobacterium Tuberculosis* em microscopia convencional é o de Costa *et al.* (2008). No entanto, esse trabalho parte do pressuposto de que as imagens estão em foco.

A proposta desse trabalho de dissertação é a de contribuir com o trabalho de Costa *et al.* (2008) no sentido de desenvolver uma metodologia de avaliação do foco para aplicação em imagens de baciloscopia de tuberculose obtidas, utilizando microscopia de campo claro.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar sistematicamente o grau de foco de imagens de baciloscopia, utilizando métricas distintas, com o intuito de compará-las e determinar qual a melhor métrica para imagens de microscopia convencional (campo claro) provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da densidade de conteúdo (do fundo) da imagem na determinação do foco de imagens de microscopia convencional (campo claro) provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*;

- Analisar a influência da quantidade de bacilos na determinação do foco de imagens de microscopia convencional (campo claro) provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*;
- Analisar a influência do contra corante azul de metileno na determinação do foco das imagens de microscopia convencional (campo claro) provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*.

1.3 ORGANIZAÇÃO

Essa dissertação está organizada da seguinte forma:

- i. Introdução (Capítulo I);
- ii. Revisão Bibliográfica (Capítulo II);
- iii. Materiais e Métodos (Capítulo III);
- iv. Resultados (Capítulo IV);
- v. Discussão (Capítulo V);
- vi. Conclusão (Capítulo VI);
- vii. Referências;
- viii. Apêndice.

No Capítulo II, são abordados os seguintes tópicos: conceitos sobre autofoco em microscopia, principais métricas de autofoco, técnicas de avaliação das mesmas, busca sistemática da posição da imagem em foco e segmentação automática do *Mycobacterium Tuberculosis* em microscopia.

No Capítulo III, são detalhados os materiais utilizados para aquisição e captura das imagens de baciloscopia e descrito a casuística. Descrevemos ainda os procedimentos metodológicos empregados para a seleção das métricas de foco e análise dessas.

No Capítulo IV, apresentam-se os resultados obtidos nas análises efetuadas.

No Capítulo V, apresentam-se discussão e análise dos resultados obtidos, comparando-os, sempre que possível, com os resultados extraídos da literatura.

No Capítulo VI, apresentam-se as principais conclusões do trabalho e as sugestões de trabalhos futuros.

Por fim, apresenta-se no Apêndice, artigo publicado no EMBC 2010 (*32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society "Merging Medical Humanism and Technology"*) realizado na Argentina, Bueno Aires.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**2.1 INTRODUÇÃO**

A microscopia automatizada é usada em uma vasta gama de aplicações biomédicas. Um componente essencial e indispensável da microscopia automatizada é a focalização automática do microscópio para a aquisição automática de imagens dos espécimes com o melhor foco possível.

Inúmeros são os benefícios da análise automática de imagens, dentre os quais destacamos a possibilidade de realização de medidas de parâmetros consistentes e precisos que viabilizam a análise quantitativa. Um passo crítico nessa tarefa, no entanto, é a aquisição automática das imagens buscando o foco ótimo. Para essas aquisições, técnicas de autofoco precisas, confiáveis e rápidas são cruciais para as aplicações, onde um grande número de espécimes deve ser imageado e analisado rotineiramente. Métodos de autofoco confiáveis para a aquisição de imagens microscópicas são indispensáveis para o uso em rotina.

2.2 AUTOFOCO EM MICROSCOPIA

Há dois tipos primários de técnicas de autofoco usadas em instrumentos de microscopia automatizados. O primeiro tipo, denominado por focalização ativa, utiliza detecção ativa da superfície do espécime, através de energia dirigida, como um feixe de laser, em direção ao objeto. Esse método mede a distância do objeto e, automaticamente, ajusta o sistema ótico para o foco preciso. Ele é rápido e pode ser usado para o imageamento em tempo real, pois a captura de múltiplas imagens não é requerida. Entretanto, métodos ativos geralmente requerem calibração da posição da imagem em foco como uma superfície única a partir da qual o feixe de luz é refletido. Esses requisitos são impraticáveis para muitas aplicações biológicas, inclusive a de baciloscopia de tuberculose, uma vez que os espécimes tipicamente exibem profundidades variáveis e superfícies refletoras múltiplas.

O segundo tipo denomina-se como focalização passiva porque é baseado somente na análise do conteúdo da imagem capturada. A posição em foco é determinada pela procura do

máximo de uma função de autofoco em uma série de imagens capturadas em diferentes planos focais. Os métodos de autofoco passivo, embora mais lentos devido ao tempo requerido para a captura de múltiplas imagens, não são afetados por superfícies reflexivas do espécime em análise e, portanto, são frequentemente mais adequados para aplicações de microscopia biomédica.

De forma sucinta, pode-se descrever como a principal função de um sistema de autofoco passivo em microscopia como sendo a determinação da posição em foco de um campo de visão através da procura do valor máximo de uma métrica de autofoco sobre um intervalo de posições no eixo Z que corresponde a uma movimentação paralela ao tubo ótico. (observe a Figura 1) .

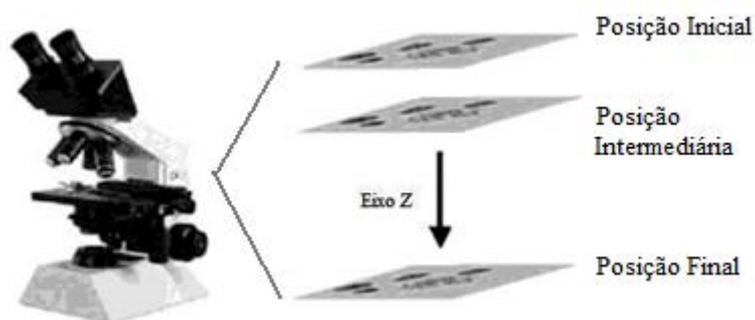


Figura 1 – Ilustração do processo de procura da posição no eixo z do valor máximo de uma métrica de autofoco.

Em relação às técnicas de microscopia óptica, as mais utilizadas em aplicações biomédicas são: a microscopia de campo claro e a microscopia por fluorescência. De forma geral, as principais diferenças entre essas técnicas concentram-se na iluminação utilizada e na preparação dos espécimes. Na microscopia de campo claro, utiliza-se iluminação convencional e os espécimes são preparados com colorações específicas que têm como características a absorção de luz. Já na microscopia de fluorescência, os espécimes são marcados com um composto fluorescente, com o objetivo de fazer suas estruturas absorverem e emitirem luz em diferentes comprimentos de onda. Jogos de filtros são utilizados, um que filtra a luz antes da mesma alcançar o material e outro que filtra a luz emitida pelo mesmo de tal forma que somente a luz emitida pelo objeto é observada (o objeto aparece brilhante em um fundo escuro).

Em relação à visualização e à focalização do *Mycobacterium Tuberculosis*, resultados superiores em relação ao autofoco e segmentação são obtidos com a microscopia de

fluorescência. No entanto, a microscopia com luz convencional ou luz branca, é o método primário recomendado pela OMS para o diagnóstico da tuberculose pulmonar em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde se concentram mais de 90% dos casos. A microscopia de campo claro é rápida, relativamente simples, e altamente específica em regiões onde a prevalência da tuberculose é alta (STEINGART *et al* 2006).

2.3 MÉTRICAS DE AUTOFOCO

Métricas de autofoco têm como objetivo avaliar numericamente o grau de foco de uma imagem. O conceito para utilização de métricas consiste no fato de imagens em foco possuírem mais informação, mais detalhes (bordas) do que imagens fora de foco.

Uma métrica de foco é calculada em um grupo de imagens capturadas em diversas distâncias focais, fornecendo assim uma avaliação quantitativa do foco da imagem em cada posição para um campo particular de visão. Variando o eixo Z e comparando os valores obtidos das métricas de autofoco, pode-se localizar a posição da imagem em foco como sendo aquela onde a métrica de foco apresenta o maior valor. De acordo com Kautsky *et al.* (2002) os requisitos básicos para qualquer métrica de foco são:

- a métrica deve ser independente do conteúdo da imagem;
- não deve se basear em alguma estrutura particular da imagem;
- deve ser monotônica em relação ao borramento e;
- deve ser robusta com respeito a ruído.

Adicionalmente, Geusebroek *et al.* (2002) descrevem que para uma métrica ser considerada satisfatória ela deve possuir os requisitos de acurácia e reprodutibilidade, além dos requisitos já mencionados como: ser de aplicação geral e ser insensível a outros parâmetros, tais como irregularidade do brilho na imagem e sujeira nas lâminas.

Realizando uma pesquisa bibliográfica sobre o tema, verificou-se que as métricas de foco podem ser classificadas em cinco grupos, quais sejam:

1. Grupo de métricas baseadas na derivada da imagem.
2. Grupo de métricas baseadas na profundidade dos picos e vales da imagem.
3. Grupo de métricas baseadas em valores estatísticos da imagem.
4. Grupo de métricas baseadas no histograma da imagem.
5. Grupo de métricas baseadas na análise espectral da imagem.

2.3.1 Métricas baseadas na derivada da imagem

A utilização de métricas baseadas em operadores derivativos, seja de primeira ou de segunda ordem para avaliação do foco de imagens, baseia-se no fato de que imagens em foco possuem mais conteúdo de alta frequência (bordas mais nítidas) que imagens fora de foco. No entanto, o uso dessas métricas deve levar em conta que, intrinsecamente, os operadores derivativos são sensíveis a ruídos (conteúdo indesejável de alta frequência).

Sabe-se que bordas em imagens digitais são geralmente representadas por rampas. Quanto mais inclinadas forem essas rampas mais em foco estarão as imagens. A utilização da primeira derivada digital nos fornece informações referentes às bordas. Há várias formas de se implementar a derivada digital em imagens. O gradiente digital é uma delas. (GONZALEZ, 2008)

Na literatura, foram encontradas sete métricas baseadas em operadores derivativos. Grande parte dessas métricas utiliza o operador gradiente como base teórica, o qual possui como características as capacidades de determinar mudanças no nível de cinza e, por conseguinte, de quantificar a nitidez das bordas das imagens.

Para uma imagem $g(x, y)$, de tamanho M por N, o vetor gradiente é dado:

$$\nabla g = \begin{bmatrix} G_x \\ G_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial g}{\partial x} \\ \frac{\partial g}{\partial y} \end{bmatrix} \quad (2.1)$$

Onde:

G_x = Operador gradiente na direção x .

G_y = Operador gradiente na direção y .

A magnitude do vetor gradiente definida em (2.2), indica de forma quantitativa o quão definidas são as bordas.

$$\nabla g = \text{mag}(\nabla g) = [G_x^2 + G_y^2]^{\frac{1}{2}} \quad (2.2)$$

Tendo em vista que a obtenção ∇g implica em uma operação de alto custo computacional, na prática costuma-se utilizar a seguinte aproximação:

$$\nabla g \approx |G_x| + |G_y| \quad (2.3)$$

A seguir apresentam-se as métricas que fazem uso desse conceito.

Gradiente absoluto com limiar

Essa métrica utiliza o conceito de gradiente. Os operadores gradiente G_x e G_y são obtidas pelas diferenças entre pixels vizinhos. A expressão do cálculo do gradiente absoluto utilizada é a seguinte (SANTOS *et al.* 1997) .

$$M_{limigrad(G_x)} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} |g(i, j+1) - g(i, j)| \quad (2.4)$$

Enquanto $|g(i, j+1) - g(i, j)| \geq v$.

$$M_{limigrad(G_y)} = \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} |g(i+1, j) - g(i, j)| \quad (2.5)$$

Enquanto $|g(i+1, j) - g(i, j)| \geq v$.

Onde v é um valor de limiar obtido experimentalmente.

A métrica então é definida por:

$$M_{limigrad} = \left| \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} |g(i, j+1) - g(i, j)| \right| + \left| \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} |g(i+1, j) - g(i, j)| \right| \quad (2.6)$$

Conforme pode ser observado, a diferença $|g(i+1, j) - g(i, j)|$ só integraliza o somatório se a mesma for superior ou igual ao limiar, v , previamente definido.

Gradiente quadrado

Semelhante à métrica anterior, porém a diferença entre os pixels é elevada ao quadrado. Em consequência, gradientes com valores elevados passam a ter mais influência no valor final (SANTOS *et al.* 1997). Dessa forma, essa métrica é definida por:

$$M_{gradquad} = \left| \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} |g(i, j+1) - g(i, j)|^2 \right| + \left| \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} |g(i+1, j) - g(i, j)|^2 \right| \quad (2.7)$$

Enquanto $|g(i, j+1) - g(i, j)| \geq v$ e $|g(i+1, j) - g(i, j)| \geq v$

Sendo v o limiar do gradiente obtido experimentalmente.

Gradiente de Brenner

De acordo com Brenner *et al.* (1971), essa métrica consiste na medida da variação média (derivada digital) do nível de cinza entre pares de pontos separados por n pixels. Da mesma forma que na métrica de Gradiente Quadrado, essa métrica enfatiza os valores elevados de gradientes. No entanto, a diferença principal entre essas métricas está na distância (n pixels) em que a derivada digital é obtida:

$$M_{brenner(Gx)} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} |g(i, j+n) - g(i, j)|^2 \quad (2.8)$$

$$M_{brenner(Gy)} = \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} |g(i+n, j) - g(i, j)|^2 \quad (2.9)$$

Enquanto $|g(i, j+n) - g(i, j)| \geq v$ e $|g(i+n, j) - g(i, j)| \geq v$ nas duas equações.

A métrica então é definida por:

$$M_{brenner} = \left| \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} |g(i, j+n) - g(i, j)|^2 \right| + \left| \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} |g(i+n, j) - g(i, j)|^2 \right|$$

No trabalho desenvolvido por Brenner *et al.* (1971) o valor de n , encontrado experimentalmente, visando a otimização da relação sinal-ruído foi igual a 2. Posteriormente esse valor foi utilizado nos trabalhos de Firestone *et al.* (1990), Santos *et al.* (1997) e Sun *et al.* (2005).

Gradiente de Tenenbaum

Essa medida, proposta por Tenenbaum, é descrita por Yeo *et al.* (1993) como:

$$M_{tenengrad} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} [T(i, j)]^2 \quad (2.10)$$

Enquanto $T(i, j) > v$. Sendo v o limiar do gradiente obtido de forma experimental.

Com $T(i, j) = \sqrt{[G_x(i, j)]^2 + [G_y(i, j)]^2}$ onde os valores de G_x e G_y são obtidos a partir da convolução da imagem com os operadores de Sobel, S_x e S_y , a seguir apresentados:

$$S_x = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad S_y = \begin{pmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{pmatrix} \quad (2.11)$$

Operador Gaussiano de primeira ordem

De acordo com Geusebroek *et al.* (2000) essa medida consiste na convolução da imagem g com a derivada de um filtro de suavização gaussiano, obtida a partir de:

$$M_{derivgaus}(\sigma) = \frac{1}{MN} \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} [g(i,j) * G_x(i,j,\sigma)]^2 + [g(i,j) * G_y(i,j,\sigma)]^2 \quad (2.12)$$

Onde $G_x(i,j,\sigma)$ e $G_y(i,j,\sigma)$ consiste na derivada Gaussiana de primeira ordem da imagem nas direções x e y em uma escala de σ (desvio padrão), respectivamente.

O valor do desvio padrão, (σ), deve ser escolhido com o intuito de maximizar a supressão de ruídos e a preservação dos detalhes de interesse (informações) da imagem.

De acordo com Steger (1998), para estruturas tipo “*bar-like*”, como os bacilos, o valor da escala, é obtido utilizando-se um valor aproximado de:

$$\sigma \approx \left(d/2\right) * \sqrt{3} \quad (2.13)$$

Onde d corresponde a espessura média das estruturas.

Energia do Laplaciano da Imagem

Para o estudo da métrica Energia do Laplaciano, é necessário rever alguns conceitos sobre a teoria do Laplaciano. De acordo com Subarao *et al.* (1998), o Laplaciano é um operador derivativo de segunda ordem que possui propriedades tais como simplicidade, simetria rotacional, eliminação de informação desnecessária e reabilitação de informações necessárias.

Para uma imagem $g(x,y)$, o laplaciano é definido por:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2 g}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 g}{\partial y^2} \quad (2.14)$$

O laplaciano digital é obtido a partir da obtenção das derivadas digitais de segunda ordem nas direções x e y , conforme mostrado a seguir:

$$\frac{\partial^2 g}{\partial x^2} = [g(i+1,j) + g(i-1,j)] - 2g(i,j) \quad (2.15)$$

$$\frac{\partial^2 g}{\partial y^2} = [g(i,j+1) + g(i,j-1)] - 2g(i,j) \quad (2.16)$$

$$\nabla^2 = [g(i+1,j) + g(i-1,j) + g(i,j+1) + g(i,j-1)] - 4g(i,j) \quad (2.17)$$

A Energia do Laplaciano é definida por:

$$M_{lapl.} = \sum_i^{M-1} \sum_j^{N-1} (g(i-1, j) + g(i+1, j) + g(i, j-1) + g(i, j+1) - 4g(i, j))^2 \quad (2.18)$$

Transformada de Wavelet

É uma métrica proposta por Kautsky *et al.* (2002) baseada na transformada discreta de *wavelet* (DWT). É dada pela relação da transformada de *wavelet* em alta e baixa frequências. A medida de *wavelet* proposta é baseada no *wavelet* absoluto:

$$M_{wb} = \frac{\|h_w(f)\|}{\|l_w(f)\|} \quad (2.19)$$

Onde: $\|\cdot\|$ representa norma discreta Euclidiana, $h_w(f)$ designa a transformada discreta de *wavelet* de alta frequência e $l_w(f)$ a transformada discreta de *wavelet* de baixa frequência.

Considerando que a DWT é ortogonal e que $\|f\|^2 = \|h_w(f)\|^2 + \|l_w(f)\|^2$ podemos então escrevê-la como:

$$M_{wb}^2 = \frac{\|h_w(f)\|^2}{\|f\|^2 - \|h_w(f)\|^2} \quad (2.20)$$

Quanto maiores os coeficientes do filtro passa alta, maior o valor da medida, o que intuitivamente presume uma imagem mais em foco. Ao contrário, caso a imagem esteja borrada seus coeficientes serão menores.

De forma antecipada, informa-se que a aplicação dessa métrica no presente trabalho se deu através da utilização da função do Matlab chamada de *wfilters*. Essa função tem como objetivo gerar máscaras associadas com *wavelet* ortogonais. Foi desenvolvida a partir dos trabalhos de Mallat (1989) e Daubechies (1992). A principal entrada dessa função é a definição de qual tipo de *wavelet* deve ser utilizada, no caso estudado foi a db (daubechies) ou *Haar*. As saídas dessa função são máscaras representando filtros passa alta e passa baixa.

Através da equação 2.20 observa-se a necessidade de somente encontrar a transformada discreta de *wavelet* de alta frequência.

2.3.2 Métricas Baseadas na profundidade dos picos e vales da imagem

Alguns autores como Sun *et al.* (2004) e Santos *et al.* (1997) quantificam o grau de focalização de uma imagem a partir da medida indireta dos picos e vales (da intensidade dos

níveis de cinza) da imagem. Três métricas na literatura foram encontradas baseadas na profundidade dos picos e vales dos níveis de cinza.

Essas métricas, classificadas como intuitivas, possuem como característica comum a necessidade do estabelecimento de um limiar para sua utilização.

Conteúdo de Intensidade da Imagem (com limiar)

Essa métrica soma os valores dos níveis de cinza dos pixels que estejam acima de um determinado limiar (GROEN *et al*, 1985).

$$M_{conteInt.} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} g(i, j) \quad (2.21)$$

Enquanto $g(i, j) \geq v$, onde v é o limiar de intensidade.

Contagem de Pixels (com limiar)

Essa métrica soma a quantidade de pixels cuja intensidade do nível de cinza está abaixo de um determinado limiar (GROEN *et al*, 1985).

$$M_{contpixels} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} s[g(i, j), v] \quad (2.22)$$

$$s[g(i, j), v] = \begin{cases} 0, & g(i, j) \geq v \\ 1, & g(i, j) < v \end{cases} \quad (2.23)$$

Onde v é o limiar de intensidade.

Poder da Imagem

Essa métrica é obtida a partir da soma do quadrado dos níveis de cinza da imagem que excedem um determinado limiar (GROEN *et al*, 1985).

$$M_{poderimag} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} g(i, j)^2 \quad (2.24)$$

Enquanto $g(i, j) \geq v$, onde v é o limiar de intensidade.

2.3.3 Métricas Baseadas em valores estatísticos da imagem

As métricas baseadas em abordagem estatísticas propiciam a descrição de imagens através de regras estatísticas que governam a distribuição e a relação entre os diferentes níveis de cinza. Inúmeras medidas podem ser extraídas da distribuição dos níveis de cinza, entre as

quais podemos citar: média, variância e desvio padrão. Por utilizarem conceitos estatísticos na sua análise essas métricas são geralmente menos sensíveis a ruídos. As mais utilizadas são:

Variância do nível de cinza

Proposta por Groen *et al.* (1993), utiliza como base teórica a variância, uma medida de dispersão estatística que indica quão distante em geral os valores da grandeza em avaliação se encontram do valor esperado. Em imagens digitais a variância pode ser definida por:

$$M_{var} = \frac{1}{MN} \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} (g(i,j) - \bar{g})^2 \quad (2.25)$$

Onde \bar{g} representa a média dos valores de nível de cinza da imagem.

Valores elevados de M_{var} representam imagens com grandes variações de níveis de cinza (propriedade de imagens focadas). De acordo com a equação (2.25) pode-se observar que os pixels claros e escuros possuem a mesma influência no resultado final.

Variância Normalizada pela média da intensidade

Dependendo da iluminação utilizada no processo de aquisição, as imagens podem apresentar problemas de brilho. Para compensar esse problema, Groen *et al.* (1993) propuseram uma compensação para a métrica de variância, que consistem em:

$$M_{varnorm} = \frac{1}{MN\bar{g}} \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} (g(i,j) - \bar{g})^2 \quad (2.26)$$

Onde \bar{g} representa a média dos valores de nível de cinza da imagem.

Autocorrelação

Proposta por Vollath *et al.* (1987), a função de autocorrelação mede o grau de correlação dos níveis de cinza de pixels adjacentes. É baseada no pressuposto de que quanto maior a diferença de intensidade entre pixels próximos melhor o foco da imagem. É definida por:

$$M_{cor} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} g(i,j)g(i+1,j) - \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} g(i,j)g(i+2,j) \quad (2.27)$$

O valor obtido pela métrica tem como característica não ser suscetível a influência de ruídos presentes na imagem, ou seja, possui bom desempenho em imagens com grande quantidade de ruído.

Correlação baseada em desvio padrão

Essa métrica também proposta por Vollath *et al.*(1987) implica em uma relação baseada em desvio padrão onde é medida a dispersão dos valores de níveis de cinza em torno da média.

$$M_{cordp} = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} g(i,j)g(i+1,j) - MN\bar{g}^2 \quad (2.28)$$

Onde \bar{g} representa a média dos valores de nível de cinza da imagem.

2.3.4 Medidas Baseadas no Histograma

Essas métricas usam as informações contidas no histograma da imagem para avaliação do foco. O histograma é simplesmente um gráfico de barras das intensidades dos pixels, no qual as intensidades são alocadas ao longo do eixo x e o número de ocorrências de cada uma delas é representado no eixo y (GONZALEZ, 2008).

A análise do foco através do histograma se baseia no conceito que imagens em foco possuem uma distribuição uniforme de pixels no histograma e uma grande variedade de tons de cinza, ou seja, maior quantidade de níveis de cinza e maior contraste resultando em um melhor foco.

Cinco métricas na literatura foram encontradas baseadas no histograma da imagem.

Faixa

Firestone *et al.*(1991) propuseram a métrica faixa que consiste na diferença entre os níveis de cinza máximo e mínimo de uma imagem. Sendo H_k o número de pixels com intensidade k , essa função é expressa por:

$$M_{faixa} = \max\{k|H_k > 0\} - \min\{k|H_k > 0\} \quad (2.29)$$

Tal métrica baseia-se no fato de que quanto mais em foco estiver a imagem, maior será a faixa do seu histograma.

Histograma de Mendelsohn e Mayall

A métrica de Mendelsohn e Mayall é calculada através da soma ponderada dos pixels nos *bins* do histograma que estejam acima de um determinado limiar de nível de cinza. Esse

limiar é escolhido para ser um valor próximo da média do nível de cinza da imagem (MENDELSON; MAYALL, 1972).

$$M_{menmay} = \sum_{k>v} k H_k \quad (2.30)$$

O limiar v é definido como o primeiro valor numérico inteiro maior ou igual ao valor médio do nível de cinza da imagem.

Histograma de Mason e Green

A métrica de Mason e Green difere da métrica de Mendelsohn e Mayall somente no procedimento de seleção do limiar. O cálculo do limiar, T , é realizado através das seguintes expressões (MASON; GREEN, 1975).

$$T = (\sum_i \sum_j \Delta_{ij} G_{ij}) / (\sum_i \sum_j \Delta_{ij}) \quad (2.31)$$

Em que Δ_{ij} é determinado através da expressão a seguir:

$$\begin{aligned} \Delta_{i,j} = & 2[g(i, j - 1) - g(i, j + 1)]^2 + 2[g(i - 1, j) - g(i + 1, j)]^2 \\ & + [g(i - 1, j - 1) - g(i + 1, j + 1)]^2 \\ & + g(i - 1, j + 1) \\ & + g(i + 1, j - 1)^2 \end{aligned} \quad (2.32)$$

Após o cálculo do limiar T , a métrica é calculada por:

$$M_{masgrn} = \sum_{k>T} H_k (k - T) \quad (2.33)$$

Entropia

A entropia, métrica proposta por Firestone *et al.* (1991), é utilizada para indicar a quantidade de informação contida em uma determinada fonte. Na teoria da informação também é utilizada para graduar a desordem (incerteza) de um conjunto de dados (GONZALEZ, 2008).

Para uma imagem em foco a probabilidade de ocorrência de um mesmo nível de cinza tende a ser baixa. Imagens desfocadas tendem a possuir menos diversidade de níveis de cinza, diminuindo o conteúdo de informações da imagem. A métrica de entropia é definida por:

$$M_{entrop} = - \sum_k p_k \log_2 p_k \quad (2.34)$$

O menor valor para a entropia é zero, isso ocorre quando todos os pixels são de uma mesma intensidade k , isto é, a probabilidade $p_k = 1$ e $p_i = 0$ para i diferente de k , deixando

de existir incerteza. Resumidamente a entropia para análise de imagens digitais mede quantitativamente a incerteza de ocorrência de um nível de cinza. Quanto maior a entropia, maior a quantidade de níveis de cinza e maior o contraste, resultando em um foco melhor.

Variância do logaritmo do histograma

Essa métrica desenvolvida por Forero *et al.* (2004) consiste no cálculo da variância do histograma da imagem, ou seja, uma medida de quanto os níveis de cinza diferem da média. Na expressão dessa métrica os níveis de cinza claros na imagem são enfatizados pela aplicação do logaritmo.

$$M_{log} = \sum_l (l - E_{log}\{l\})^2 \log(p_l) \quad (2.35)$$

Onde p_l é a probabilidade do nível de cinza l e $E_{log}\{l\}$ é igual a $\sum_l l \log(p_l)$.

2.3.5 Métricas baseadas na análise espectral da imagem

Momento do logaritmo

Essa métrica quantifica o grau de foco da imagem através da estimativa da energia do espectro da imagem. Os autores utilizam técnicas padrões para analisar a energia espectral das imagens. A métrica baseada nos momentos espectrais desenvolvida por Firestone *et al.* (1991) é dada por:

$$M_{espc} = \sum_i P_i \log_{10}(i) \quad (2.36)$$

Sendo P_i = porcentagem de energia do i -ésimo componente espectral.

2.4 AVALIAÇÃO DAS MÉTRICAS DE FOCO UTILIZANDO ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA E QUANTITATIVA

Da pesquisa bibliográfica realizada, observou-se que, em geral o desempenho das métricas é avaliado segundo critérios qualitativos e quantitativos da sua respectiva curva de foco. Para esse tipo de avaliação, dado um conjunto de imagens (obtidas em várias profundidades focais) de um mesmo campo obtém-se uma curva de foco resultante. Na microscopia de campo claro, uma curva de foco (gráfico dos valores de uma métrica versus profundidade focal) é tipicamente unimodal, com caldas que se estendem sobre uma faixa

ampla de profundidades focais. Nos trabalhos de Firestone *et al* (1991) e Santos *et al* (1997) os autores analisaram as curvas de foco através dos seguintes critérios:

Acurácia: expressa em número de passos (profundidades focais), tem como objetivo verificar se o ponto máximo da curva de foco é encontrado pela métrica.

Faixa: Representa a distância em passos entre dois pontos locais mínimos em volta do máximo global da curva de foco.

Picos Falsos: quantifica o número de falsos picos máximos da curva de foco.

Largura: mede o quão fino ou espesso é o pico da curva de foco referente a uma dada métrica. Quanto mais fino for o pico mais fácil será a localização do máximo global.

Tempo de processamento: tempo necessário para o cálculo da métrica em uma imagem.

Alguns autores como Sun *et al.* (2005) e Firestone *et al.* (1990) limitam-se a efetuar uma análise, denominada de semiquantitativa, que consiste em ordenar os resultados das n métricas numericamente de 1 a n . Nessa ordenação, o valor 1 representa o melhor resultado e n o pior. No caso das métricas apresentarem o mesmo valor, as mesmas serão ranqueadas na mesma posição. Para ilustrar, apresentamos um exemplo dessa situação na Tabela 2, na qual as métricas F_{voll} e F_{var} apresentam o mesmo valor, 76, no critério relativo a “faixa”. Nesse caso as duas métricas foram ranqueadas na posição 2. A métrica que apresenta o valor inferior mais próximo (faixa=74), F_{sq_grad} , é ranqueada na pontuação 4.

Na busca de um resultado global do desempenho de cada métrica é obtido um valor final que consiste na somatória dos valores de todos os critérios apresentados por cada uma das métricas. Nesse caso, a métrica que apresentar a menor pontuação (ou a melhor posição no ranque) é considerada a melhor.

Na análise quantitativa, os pesos dos critérios são levados em consideração. Essa ponderação consiste na obtenção da distância euclidiana de cada métrica em relação ao seu valor ideal. A análise quantitativa do desempenho das métricas segue os seguintes passos metodológicos, de acordo com o trabalho de Santos *et al.*(1997).

Em cada conjunto de imagens de um dado campo obtém-se os valores de cada métrica;

- 1- Caracteriza-se cada métrica segundo critérios previamente estabelecidos;
- 2- Obtém-se os valores médios e o desvio padrão de cada critério para cada uma das métricas;
- 3- Realiza-se a normalização desses valores através da subtração da média e a divisão pelo respectivo desvio padrão. Após esse procedimento os critérios podem ser

comparados entre si, pois todos possuem a média igual a zero e desvio padrão unitário;

- 4- Em cada uma das métricas e para cada critério, a distância euclidiana do valor normalizado para o valor ideal é calculada. Para calcular esse valor a diferença entre o valor de cada critério e do valor ideal é obtida. Em seguida a raiz quadrada da adição dos quadrados desses resultados é calculada;
- 5- Com o intuito de obter o resultado global para cada métrica, a média das distâncias euclidianas dos critérios é encontrada.

A métrica de desempenho superior corresponde a que apresenta a menor média geral. A Tabela 3 apresenta um resumo da análise de desempenho segundo os passos metodológicos referidos anteriormente.

Tabela 2 - Exemplo de tabela que sumaria os resultados de uma análise semiquantitativa

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Tempo(ms)	Pontuação
F_{voll4}	0 (1)	80 (1)	1 (2)	8 (2)	1 846 (7)	13
F_{voll5}	2 (5)	76 (2)	0 (1)	18 (6)	2 677 (10)	24
F_{var}	2 (5)	76 (2)	2 (3)	18 (6)	2 030 (9)	25
F_{num_ptx}	1 (2)	64 (7)	4 (5)	28 (11)	788 (2)	27
F_{nor_var}	2 (5)	70 (5)	2 (3)	26 (9)	2 028 (8)	30
F_{th_cont}	2 (5)	28 (10)	10 (12)	8 (2)	704 (1)	30
F_{power}	2 (5)	32 (8)	7 (9)	12 (5)	982 (4)	31
$F_{brenner}$	1 (2)	16 (12)	4 (5)	6 (1)	3 054 (12)	32
$F_{tenengrad}$	1 (2)	28 (10)	7 (9)	8 (2)	29 324 (13)	36
F_{sq_grad}	3 (10)	74 (4)	5 (7)	24 (8)	3 020 (11)	40
F_{th_grad}	4 (11)	70 (5)	6 (8)	32 (12)	1 842 (6)	42
$F_{entropy}$	5 (12)	32 (8)	8 (11)	26 (9)	1 020 (5)	45
F_{range}	* (13)	* (13)	25 (13)	* (13)	876 (3)	55

Fonte: Santos *et al* 1997.

Tabela 3 - Exemplo de tabela que sumaria os resultados de uma análise quantitativa

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Tempo	Pontuação
F_{voll4}	0,85	1,15	1,12	2,85	0,78	1,35
F_{voll5}	2,41	1,11	1,15	6,72	1,13	2,51
$F_{\text{nor_var}}$	2,41	0,92	1,51	7,42	0,86	2,62
F_{var}	2,63	1,20	2,35	6,88	0,86	2,78
F_{power}	2,95	4,50	2,19	6,38	0,37	3,28
F_{brenner}	2,70	6,68	1,76	5,48	1,31	3,59
$F_{\text{th_grad}}$	4,39	5,28	3,83	4,70	0,84	3,81
$F_{\text{sq_grad}}$	3,25	5,45	2,65	7,04	1,26	3,93
$F_{\text{num_pix}}$	5,12	3,95	1,74	9,42	0,33	4,11
$F_{\text{th_cont}}$	4,00	6,67	3,20	7,70	0,30	4,37
F_{entropy}	6,95	7,58	2,13	5,94	0,43	4,61
$F_{\text{tenengrad}}$	0,85	5,38	3,71	2,74	12,49	5,03
F_{range}	—	—	11,23	—	0,37	—

Fonte: Santos *et al* 1997.

2.5 BUSCA SISTEMÁTICA DA POSIÇÃO DA IMAGEM EM FOCO

A definição da melhor métrica de autofoco para uma determinada aplicação consiste na etapa primária para o desenvolvimento do foco automático em microscopia. A segunda etapa consiste em obter a posição no eixo Z do microscópio onde a métrica apresenta o valor máximo (posição da imagem em foco). O procedimento considerado robusto consiste em realizar o cálculo da métrica em cada um dos pontos da faixa do eixo Z, porém o tempo gasto pelo uso de tal metodologia seria muito alto, impossibilitando a utilização da mesma em larga escala. Objetivando diminuir o tempo de busca do eixo Z, várias metodologias na literatura foram propostas. Dessas, três metodologias mais eficientes foram selecionadas para serem mais aprofundadas:

- “*Robust Autofocusing in Microscopy*” (Geusebroek *et al*, 1999)
- “*Robust Autofocusing for Automated Microscopy Imaging of Fluorescently Labelled Bacteria*” (Hilsenstein *et al*, 2005)
- “*Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy*” (Russell *et al*, 2007).

No trabalho de Geusebroek *et al.*(1999) o sistema de hardware é definido por: um microscópio acoplado com um controlador de posição (coordenadas enviadas via

computador), uma câmara posicionada no microscópio (que captura o campo de visão) e um digitalizador de vídeo conectado ao computador.

Considerando que o ponto de foco do microscópio se encontra em um intervalo pré-determinado, Δz , em torno da posição inicial Z , tem-se inicialmente que o controlador de posição move o eixo Z para a posição mínima definida por: $Z_{min} = z - \frac{1}{2}\Delta z$.

Em $t = 0$ ms, o controlador começa a mover o eixo Z objetivando varrer completamente o intervalo de foco Δz . Nesse procedimento a cada 40ms são capturadas sucessivas imagens. A métrica de foco é calculada para cada imagem obtida até completar a varredura Δz . Uma estimativa da curva de foco é obtida para o intervalo focal completo. Devido à movimentação do eixo Z ser linear, cada posição pode ser relacionada com o seu respectivo tempo pela fórmula:

$$z_i = \frac{t_i}{t_d} \Delta z + z_{min} \quad (2.37)$$

Onde, t_d corresponde a duração total da movimentação, Δz o intervalo de foco e Z_{min} a posição inicial em $t = 0$ ms.

A curva de foco obtida caracteriza-se por ser parabólica, na qual o ponto de foco pode ser determinado com precisão através de interpolação quadrática. Assumindo o movimento do controlador linear temos $z = vt + z_{min}$. Assim, a curva de foco em torno do ponto focal pode ser aproximada por:

$$s(t) = c + bt + at^2 \quad (2.38)$$

O ponto exato do foco é obtido levando em conta os seguintes aspectos: o ponto ótimo detectado é $s(t_0) = s_0$, no tempo $t = t_0$. O eixo do tempo é redefinido de tal forma que o tempo de detecção ótimo é $t = 0$, então as medidas de vizinhança são chamadas de (S_n, t_n) e (S_p, t_p) respectivamente. Calculando c, b, a temos:

$$c = s_0 \quad (2.39)$$

$$b = \frac{-s_0 t_n^2 + s_p t_n^2 + s_0 t_p^2 - s_n t_p^2}{t_n^2 t_p - t_n t_p^2} \quad (2.40)$$

$$a = \frac{s_0 t_n - s_p t_n - s_0 t_p + s_n t_p}{t_n^2 t_p - t_n t_p^2} \quad (2.41)$$

O tempo final obtido no pico da parábola, ou seja, no ponto de foco é dado por:

$$t_f = -\frac{b}{2a} + t_0 = \frac{-s_0 t_n^2 + s_p t_n^2 + s_0 t_p^2 - s_n t_p^2}{2(s_0 t_n - s_p t_n - s_0 t_p + s_n t_p)} + t_0 \quad (2.42)$$

O ponto de foco é obtido através da fórmula:

$$z_f = \left(\frac{t_f}{t_d}\right) \Delta z + z_{\min} \quad (2.43)$$

Assim, através da metodologia (interpolação quadrática) proposta por Geusebroek *et al.*(1999) não é necessário calcular todos os pontos do eixo Z para encontrar a posição em foco.

No trabalho de Hilsenstein *et al.* (2005), é realizada uma busca em um intervalo do eixo Z. Onde z_l , é a menor posição do eixo Z e z_u corresponde à posição máxima no eixo Z.

Esse intervalo é dividido em $n - 1 > 3$ espaços uniformemente separados. São adquiridas n imagens, I_1, \dots, I_n , nas posições $z_1 = z_l, \dots, z_n = z_u$. Em cada uma das imagens adquiridas é calculada a métrica de foco. A imagem que apresenta a melhor métrica de foco é chamada de z_m . Em seguida define-se um novo intervalo de busca no eixo Z. Esse novo intervalo é dado por $[z_{m-1}, z_{m+1}]$. Todo o processo é repetido até que o intervalo de busca seja menor que um comprimento pré-definido. Atingido esse ponto, os autores encontram o ponto da imagem em foco.

Já no trabalho de Russell *et al.* (2007), desenvolveu-se um algoritmo de busca dividido em cinco etapas. Na primeira etapa, um método de diferença de sinais foi utilizado com o objetivo de mover o eixo Z para a direção correta (sentido onde a métrica apresenta o maior valor).

A segunda etapa consiste em uma busca sequencial movendo o eixo Z em passos de $25\mu\text{m}$ na direção proposta pelo método de diferença de sinais. Em cada um dos passos é adquirida uma imagem e calculado o valor da métrica. A posição D1 é encontrada quando o valor da métrica apresentar um valor menor que um limiar pré-determinado. O intervalo de busca é reduzido em $50\mu\text{m}$ antes do ponto D1, ou seja, o novo intervalo foi definido como sendo $[D1-50; D1]$. Esse novo intervalo foi proposto para assegurar que a posição em foco se encontra entre esse intervalo.

A terceira etapa desse algoritmo realiza outra busca sequencial utilizando passos menores de $10\mu\text{m}$ no novo intervalo até que o valor da métrica diminua, a posição onde o valor da métrica diminuiu é chamado de D2. Novamente o intervalo de busca é reduzido em $20\mu\text{m}$ anteriores a D2, gerando um novo intervalo definido por $[D2-20; D2]$. A última etapa desse algoritmo de busca se resume na utilização de três pontos dentro desse novo intervalo para gerar uma curva quadrática. Analisando-se essa curva pode-se encontrar o ponto máximo. Esse ponto corresponde ao ponto da imagem em foco.

Todos os trabalhos estudados buscam, através de várias metodologias, um método mais rápido e preciso para encontrar o ponto da imagem em foco, sem que haja necessidade de determinar a métrica de foco em todos os pontos do eixo Z.

2.6 SUMÁRIO DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O TEMA AUTOFOCO

Objetivando contextualizar o tema autofoco, a Tabela 4 foi elaborada. Nela, tem-se os principais resultados obtidos pelos autores estudados, o resumo da metodologia e as aplicações em que o estudo se insere. Da tabela podem-se tecer as seguintes observações:

- O autofoco é um tema bastante explorado na literatura. Os trabalhos mais antigos identificados na busca bibliográfica, datam de 20 anos atrás;
- Observa-se que na literatura a análise de autofoco é encontrada em uma vasta série de aplicações como, por exemplo, em imagens de morfologia neural quantitativa, análise citogenética molecular e tuberculose;
- Observa-se que a determinação da melhor métrica depende do tipo de aplicação desenvolvida;
- A avaliação das métricas de autofoco é realizada normalmente por análise gráfica da curva de foco ou através de análise numérica dessa curva baseada em critérios;
- Vários tipos de técnicas de microscopia de luz foram utilizados na análise do autofoco, entre elas temos: Campo Claro, Fluorescência, Contraste de Fase;
- Nota-se também que somente dois trabalhos foram encontrados sobre o tema autofoco em tuberculose e somente um utiliza microscopia de campo claro. Nesse trabalho foi realizada a análise de apenas três métricas de autofoco.

Tabela 4- Sumário da pesquisa bibliográfica sobre Autofoco.

Título do Artigo	Primeiro Autor	Ano	Técnica da microscopia	Métricas de Auto Foco	Aplicações	Avaliação	Definição da posição em foco do eixo Z	Resultados
<i>Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy</i>	Megan J. Russell	2007	Campo Claro	a)Energia do Laplaciano da imagem b)Variância do logaritmo do histograma c)Operador Gaussiano de primeira ordem	Baciloscopia de Tuberculose	Monotocidade das curvas de foco e tempo de processamento	Busca sequencial no eixo Z com interpolação quadrática da curva de foco	Melhor métrica: Energia do Laplaciano da imagem, t=20 a 30s, Erro médio de Autofoco versus Observador = 1,45 μm com um desvio padrão de 1,88 μm , diferença máxima de 4 μm
<i>Robust Autofocusing for Automated Microscopy Imaging of Fluorescently Labelled Bacteria</i>	Volker Hilsenstein	2005	Fluorescência	Autocorrelação	Em aplicações onde há presença de bactérias.	Não houve avaliação (a utilização da métrica autocorrelação foi baseada em resultados encontrados na literatura)	Busca Interativa no eixo Z	Bons resultados na utilização de técnicas de morfologia matemática na etapa de pré-processamento. Faltam resultados quantitativos no trabalho
<i>Autofocusing Algorithm Selection in Computer Microscopy</i>	Yu Sun	2005	Campo Claro, Contraste de Fase e DIC (Contraste de interferência diferencial)	Dezoito métricas, divididas em quatro grupos: a)baseadas em operadores derivativos b)baseadas em estatística, c)baseadas em histograma d)baseadas intuitivamente	a)Amostras de Adenoma de Colo b)Músculos de um bebê cobra c)Amostras de Células do fígado d)Amostrad de Células do Pancreas e)Amostrad de Células do Rim	Tabela Comparativa das métricas de auto foco, utilizando 5 critérios: a) Acuracidade b) Faixa c) Número de falso máximo d) Largura do Pico e) Nível de ruído	Oa autores não realizam uma busca automática no eixo Z para definir a posição em foco.	Melhor métrica: Variância Normalizada
<i>Identification of tuberculosis bacteria based on shape and color</i>	Manuel G. Forero	2004	Fluorescência	a)Variância b)Energia do Laplaciano da Imagem c)Autocorrelação d)Variância do Logaritmo do Histograma	Baciloscopia de Tuberculose	Análise gráfica do comportamento da curva de foco em imagem inteiras (1600x1200 pixels) e em sub imagens (256x256 pixels)	Oa autores não realizam busca automática no eixo Z para definir a posição em foco.	Melhor métrica: Variância do Logaritmo do Histograma

Título do Artigo	Primeiro Autor	Ano	Técnicas da microscopia	Métrica de Auto Foco	Aplicações	Avaliação	Definição da posição em foco do eixo Z	Resultados
<i>Robust Autofocusing in Microscopy</i>	Jan-Mark Geusebroek	2000	Campo Claro e Fluorescência	Operador Gaussiano de primeira Ordem	a)Morfologia neural quantitativa, b)Experimentos (time-lapse) de diferenciação de miócitos cardíacos, c)Detecção imunoistoquímica marcada de tecidos fixados, d)Varredura GFP-VM de C. elegans, e)Aquisição de células musculares lisas f)Detecção imunocitoquímica marcada de células fixadas	Escolha da métrica baseada na teoria de Fourier	Busca sequencial no eixo Z com interpolação quadrática da curva de foco	Taxa média de acerto: 99,2%, tempo médio para realização do foco de 1,98s, Erro médio de Autofoco versus observador = 0,423 μm , Erromáximo do Observador versus autofocus= 1,12 μm
<i>Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis</i>	A. Santos	1997	Fluorescência	Treze métricas, divididas nos seguintes grupos: a)baseadas em operadores derivativos b)baseadas na profundidade de picos e vales, c)baseadas no contraste da imagem d)baseadas no histograma da imagem e) baseadas em correlação	Citogenética molecular	Análise Semiquantitativa e Quantitativa da curva de foco.	Os autores nao realizam uma busca automática no eixo Z para definir a posição em foco.	Melhor métrica: Autocorrelação
<i>Comparison of Autofocus Methods for Automated Microscopy</i>	Lawrence Firestone	1990	Campo Claro	a)Análise Espectral b)Variância c) Brenner d)Faixa e)Histograma de Mendelsohn e Mayall f)Histograma de Mason e Green g)Entropia	a)Tecido de amostra de linfonodo b) Imagens artificiais senoidais c) Imagens artificiais de ruído randômicas	Análise semiquantitativa da curva de foco.	Os autores nao realizam uma busca automática no eixo Z para definir a posição em foco.	Melhores métricas: Variância e Brenner

2.7 DIAGNÓSTICO AUTOMÁTICO DA TUBERCULOSE EM EXAME DE BACILOSCOPIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA

Tendo em vista que o objetivo da presente dissertação é contribuir para o desenvolvimento da análise automática da baciloscopia de tuberculose de campo claro, apresenta-se a seguir a análise de dois trabalhos, identificados na busca bibliográfica realizada, que tratam do diagnóstico automático da tuberculose em exame de baciloscopia através de microscopia. Esses são:

- “*Neuro computer processing of the images in the task of tuberculosis contagions identification*” dos autores Tumian *et al.* (2002).
- “*Image Processing and Neural Computing used in the Diagnosis of Tuberculosis*” dos autores Veropulos *et al.* (1998).
- “*Identification of tuberculosis bacteria based on shape and color*” dos autores Forero *et al.* (2004)
- “*Automatic identification of mycobacterium tuberculosis with conventional light microscopy*” dos autores Costa *et al.* (2008).

Os três primeiros trabalhos utilizam imagens de microscopia por fluorescência. Somente o trabalho de Costa *et al.* (2008) utiliza imagens de microscopia de campo claro.

A metodologia empregada nos trabalhos de Costa *et al.* (2008) e Forero *et al.* (2004) foi aprofundada.

No trabalho de Costa *et al.* (2008) , imagens de 5 campos de cada lâmina contendo escarros de 10 pacientes infectados pelo bacilo de tuberculose foram adquiridas. Essas lâminas foram preparadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) utilizando o método de coloração *Ziehl-Neelsen* (Zn).

Um microscópio convencional.(AxioplanTM) e uma máquina digital (*PowerShot* de 7,1 *Mpixels*) foram utilizados na captura das imagens dos campos. A resolução espacial das imagens adquiridas foi de 3074x2304 pixels. Um especialista identificou do total de imagens quais imagens estavam em foco e dessas imagens identificou os bacilos presentes. As imagens fora de foco foram descartadas e a leitura do especialista foi o padrão de referência para o estudo. A Figura 2 mostra um exemplo de imagem utilizada pelos autores. Imagens com problema devido ao preparo inadequado da lâmina (excesso de resíduos ou coloração, por exemplo) são eliminadas automaticamente pelo método de Costa *et al.*(2008).

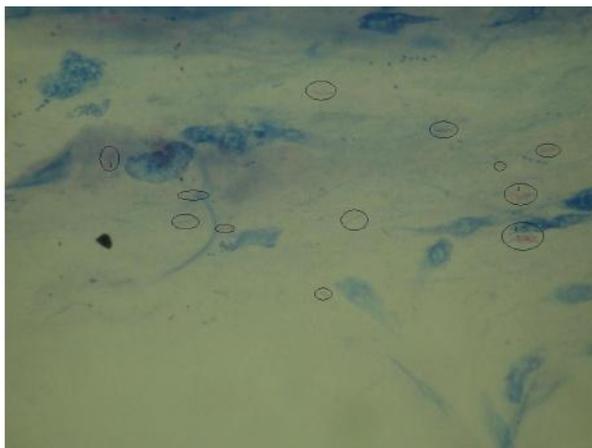


Figura 2 - Imagem de bacilosopia de microscópio convencional onde um especialista identificou a presença de bacilo.

Fonte: Costa *et al.* (2008).

A partir de experimentos realizados com as imagens capturadas nos espaços de cores HSI e RGB, elegeu-se a imagem resultante da subtração do canal R pelo canal G como a mais adequada para a tarefa de segmentação dos bacilos. Nessa imagem, os bacilos aparecem como regiões claras (vide exemplo na Figura 3). Assim, a etapa de segmentação é realizada utilizando-se como ponto de partida a imagem (R-G). O processo de segmentação utiliza o histograma da imagem de diferença R-G e, a partir deste, obtém-se automaticamente um valor de limiar para cada imagem. A imagem limiarizada é submetida a um processo de filtragem com o intuito de eliminar artefatos presentes na mesma. Esses ruídos foram retirados gradativamente com a utilização de várias técnicas propostas pelos autores.

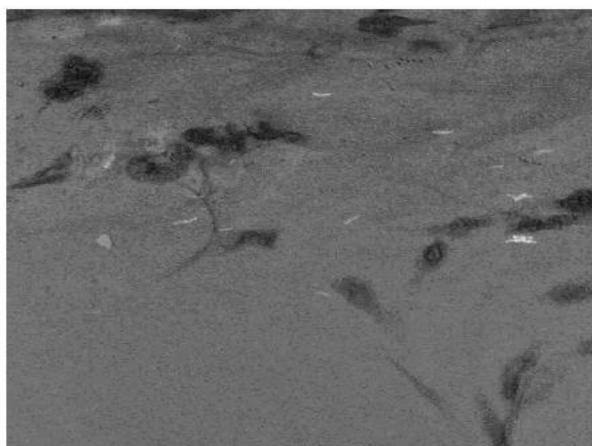


Figura 3 – Imagem de diferença R-G correspondente a imagem mostrada na figura 2.

Fonte: Costa *et al.* (2008).

Costa e colaboradores conseguiram, utilizando a segmentação proposta, resultados que dispensaram as etapas de classificação. Na Figura 4, apresenta-se uma imagem com os bacilos circutados pelo especialista e na Figura 5 a imagem processada pelo método proposto. (COSTA *et al*, 2008).

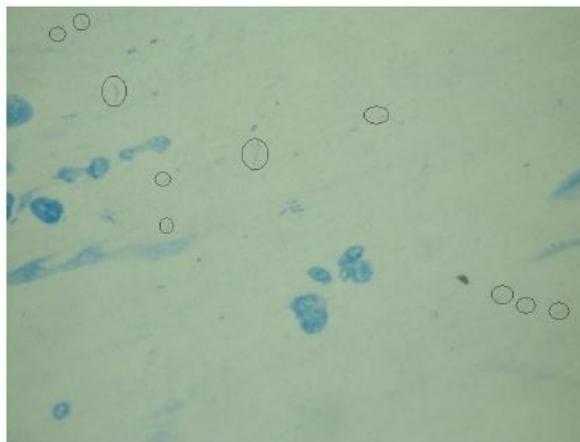


Figura 4 - Imagem Original com os bacilos circutados.

Fonte: Costa *et al.* (2008).

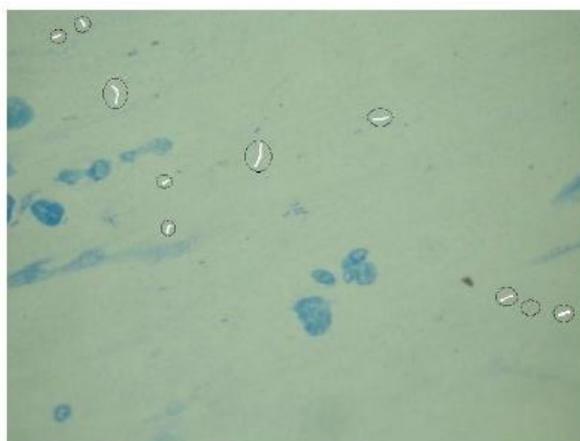


Figura 5 - Imagem resultante da detecção dos bacilos da Imagem da Figura 4, na qual os bacilos detectados pelo método apresentam-se como regiões brancas na imagem.

Fonte: Costa *et al.* (2008).

As taxas de sensibilidade e falso positivo para imagens de microscopia convencional obtidas por Costa *et al.* (2008) foram 76,65% e 12%, respectivamente. Não há resultados de outros trabalhos para se efetuar a comparação. No entanto, quando esses resultados são comparados aos encontrados na literatura para os métodos de microscopia por fluorescência, eles são inferiores.

No trabalho Forero *et al.* (2004) as lâminas foram coradas por *fluorochrome auramina O*. Um microscópio de fluorescência com a ampliação de 250x e uma máquina digital *Spot Insight* da *Diagnostic Instruments, Inc.* foram utilizados na captura das imagens. O tempo de exposição foi de 0,9 s/ imagem. Um conjunto de 397 imagens negativas de 31 pacientes e um conjunto de 75 imagens positivas de 4 pacientes foram adquiridos. A resolução espacial das imagens foi de 1600x1200 pixels. A Figura 6 mostra um exemplo de imagem utilizada pelos autores.

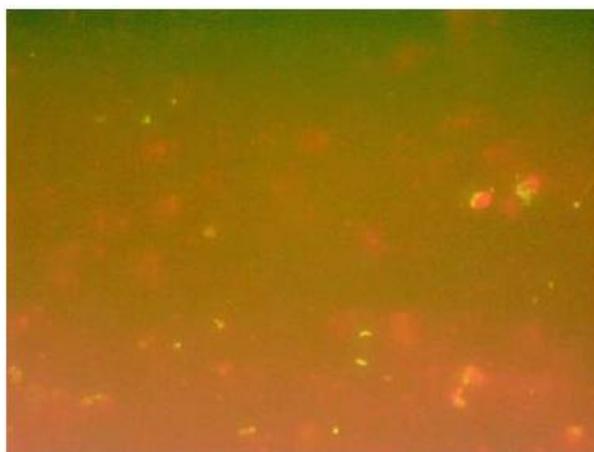


Figura 6 – Exemplo de Imagem baciloscopia de Fluorescência onde os bacilos se apresentam na cor amarela.

Fonte: Forero *et al.*(2004).

Forero *et al.* (2004) realizam a avaliação automática do foco das imagens adquiridas utilizando como métrica a variância do logaritmo do histograma da imagem. A imagem de intensidade do canal verde (G) do espaço de cor RGB foi utilizada para a detecção do bacilo.

A primeira etapa do processo de segmentação dos bacilos consiste na detecção de bordas utilizando um operador de Canny. Esse procedimento é seguido por processo de supressão não-máxima e um limiar de histerese. A segunda etapa consiste na segmentação através de um limiar de cor adaptativo que tem como objetivo extrair as regiões que apresentem características de cor semelhantes as do bacilo. O valor desse limiar t para a segmentação da cor é dado por: $t = \alpha (G_{max} - \bar{G}) + \bar{G}$, onde α é a média de intensidade da amostra do bacilo e G_{max} e \bar{G} correspondem à representação dos valores máximo e médio da componente verde da imagem. Após a segmentação, somente os objetos que possuem as características de cor semelhantes as do bacilo são mantidos. Como última etapa da segmentação é realizada uma filtragem na imagem eliminando-se os objetos muito pequenos ou muito grandes. A Figura 7 ilustra a técnica proposta.

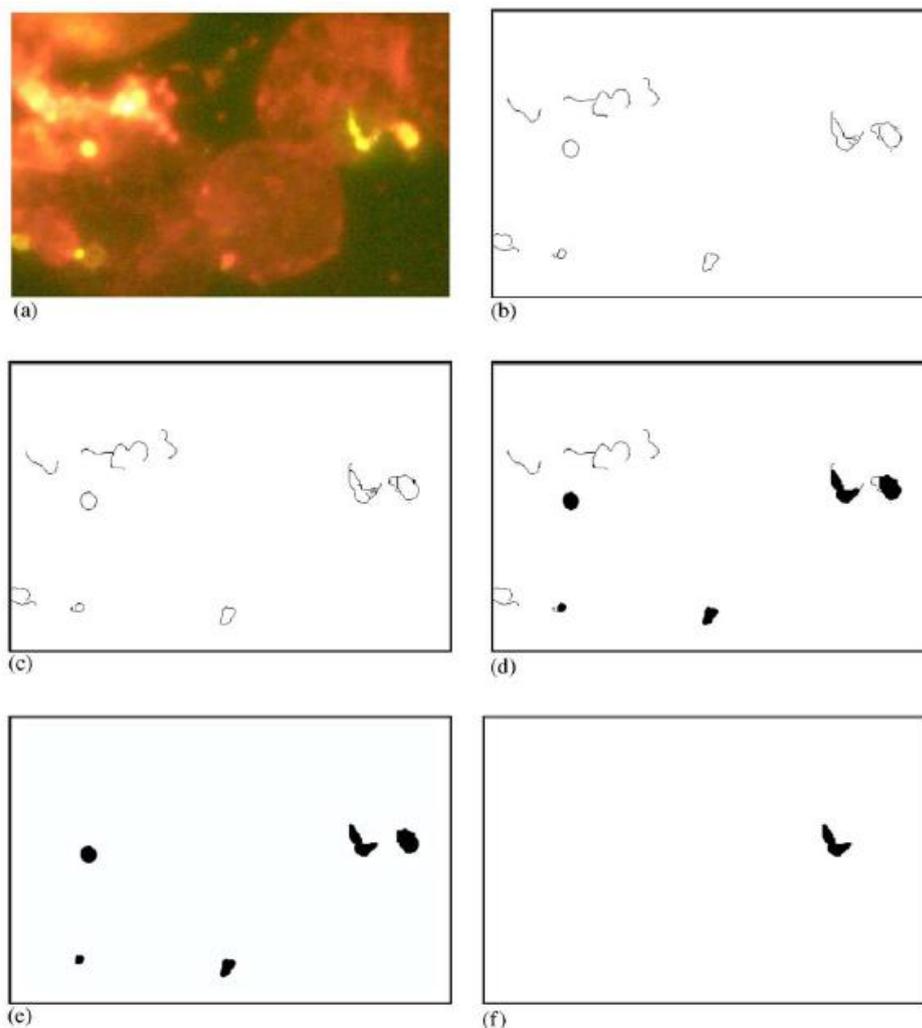


Figura 7 - (a) Imagem Original, (b) Detecção de bordas, (c) Operação de Fechamento Morfológico, (d) Preenchimento das regiões fechadas, (e) Abertura Morfológica (f) Segmentação.

Fonte: Forero *et al.* (2004).

No trabalho de Forero *et al.* (2004) várias características foram avaliadas para a caracterização do bacilo: área, solidez, eixo maior, eixo menor, excentricidade, perímetro, firmeza e os momentos Hu. Em face da necessidade dessas características serem invariantes à rotação, translação e escala, somente as características: momentos Hu, excentricidade e firmeza foram utilizadas. Na avaliação das características escolhidas os autores, assumindo que essas possuem distribuição Gaussiana, analisam a média, a variância e o grau de dependência dessas características.

Sete técnicas de agrupamento (*clustering*) foram testados (*adaptive, chained distances, sequential, maxdistance, k-means, sequential, maxdistance, ISODATA e matrix of similarity*). Após vários testes realizados pelo autor, o algoritmo de *clustering* escolhido foi o *k-means*,

para validar a definição de quantos *clusters* devem ser formados nesse algoritmo a plotagem de *silhouette* e o coeficiente de *silhouette* (*CS*) foram utilizados. O primeiro tem a função de definir o quanto os *clusters* estão separados entre si, e o segundo quantifica a semelhança de um objeto *i* com os outros do seu próprio *cluster*, comparando-o com os objetos de outros *clusters*. Se o valor de *CS* se situar no intervalo $[0,7, 1]$, conclui-se que o agrupamento dos dados estão corretos. O resultado dessa análise resultou na criação de 4 *clusters*. Deles uma árvore de decisão foi gerada como demonstrado na Figura 8. Se o nó for verdadeiro, o caminho esquerdo é escolhido, do contrário escolhe-se o caminho da direita. Na árvore de decisão, B significa Bacilo, R objeto rejeitado, *d* é a distância de Mahalanobis entre o objeto e o *cluster* mais próximo e *t* é a distância limiar do *cluster* que foi fixado pelo autor como 10. Os melhores valores de sensibilidade e especificidade conseguidos foram de 94,96% e 86,66%, respectivamente.

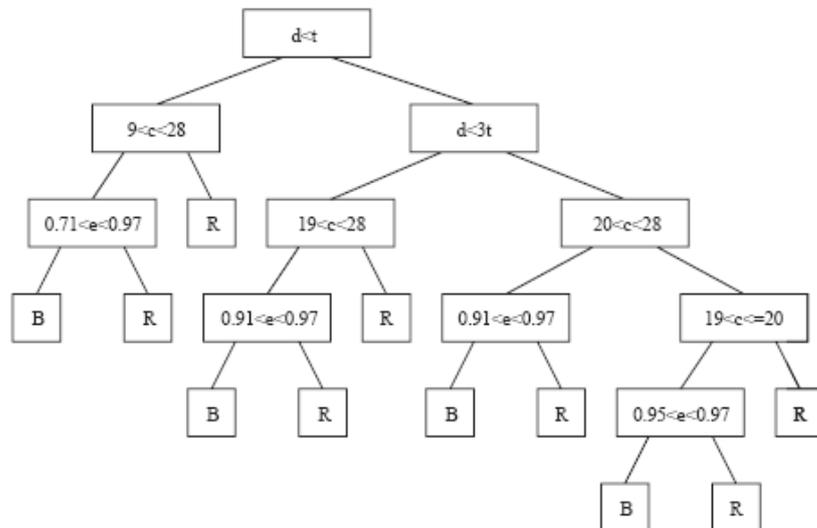


Figura 8 – Etapa de classificação: árvore de decisão

Fonte: Forero *et al.* (2004)

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do trabalho objeto da presente dissertação foram realizadas as etapas especificadas no diagrama mostrado na Figura 9. A seguir, apresentam-se detalhadamente cada uma dessas etapas.

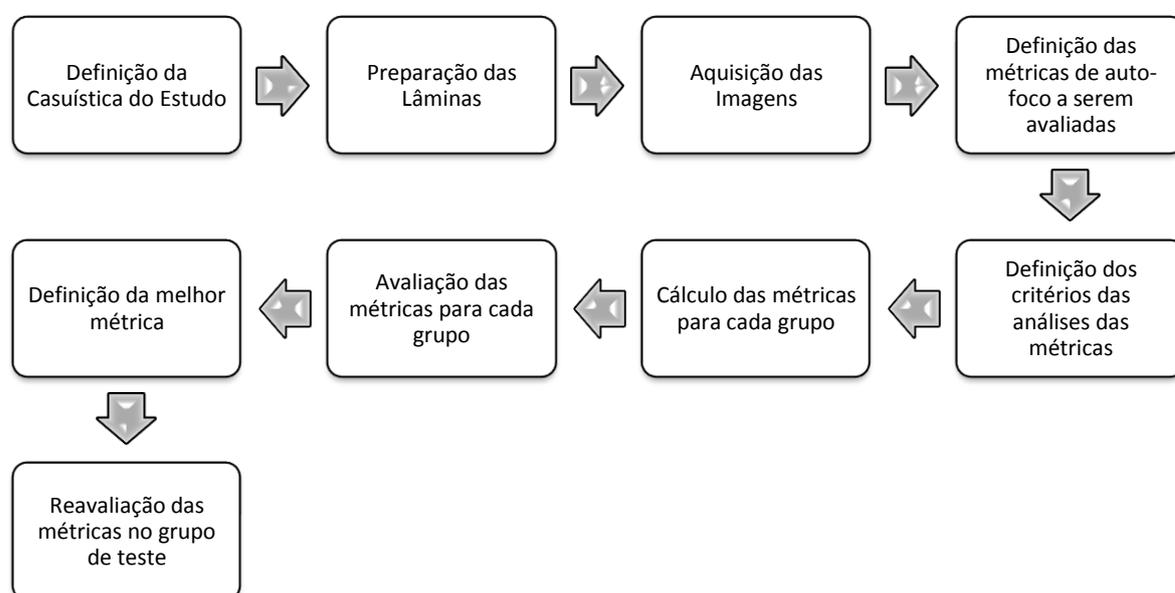


Figura 9 - Etapas metodológicas proposta na dissertação

3.1 DEFINIÇÃO DA CASUÍSTICA

Definição da Casuística do Estudo

Para a análise do foco em imagens de microscopia convencional (campo claro) de tuberculose, buscou-se desenvolver uma casuística que englobasse as principais variações encontradas nas lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*. A descrição do método de preparação da lâmina é apresentada no sub-item 3.1.1. É possível notar que as imagens de campos das lâminas coradas apresentam variações da densidade de conteúdo do fundo (*background*). Algumas exibem fundo mais uniforme, outras apresentam

um fundo menos uniforme. As primeiras referir-nos-emos, a partir de então, de imagens de densidade de conteúdo baixa e as últimas de imagens densidade de conteúdo alta. Constadas essas variações, procurou-se avaliar o quanto essa característica interfere na definição da métrica de autofoco e, por conseguinte, na determinação do foco da imagem.

Outra variação a ser considerada no presente estudo é a da quantidade de bacilos no campo da lâmina que está sendo imageado. Nesse caso, buscar-se-á avaliar se a quantidade de bacilos pode interferir na definição do foco da imagem. Assim foram criados dois grupos de imagens; um com a presença de 10 ou mais bacilos por campo, outro com menos de 10 bacilos por campo. Ressalta-se que a contagem de bacilos por campo é o método primário para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

A definição da casuística buscou, adicionalmente, verificar se a utilização do contra corante azul de metileno (que na análise visual, realizada pelos baciloscopistas, tem o intuito de facilitar a contagem dos bacilos) interfere na avaliação automática do foco da imagem, através da comparação das lâminas preparadas com e sem o contracorante azul de metileno. Aparentemente, as lâminas sem o fundo azul de metileno apresentam um fundo mais uniforme.

O estudo da influência dessas três principais variações viabilizará a análise do foco em imagens de microscopia convencional (campo claro) de tuberculose.

A casuística do trabalho proposto, segundo as considerações anteriormente apresentada está dividida em 6 (seis) grupos de imagens. As Figura 10 e 11 sumarizam os seis grupos.

Por praticidade, a nomenclatura dos grupos foi abreviada. As duas primeiras letras se referem à presença ou não de coloração de fundo azul de metileno: **(CF)** representa com fundo azul de metileno e **(SF)** representa ausência fundo azul de metileno (contra corante). Somente para o grupo **(CF)**, a terceira letra representa alta **(A)** ou baixa **(B)** densidade de fundo e as duas últimas letras para os dois grupos representam alta densidade de bacilos **(AD)** e baixa densidade de bacilos **(BD)**.

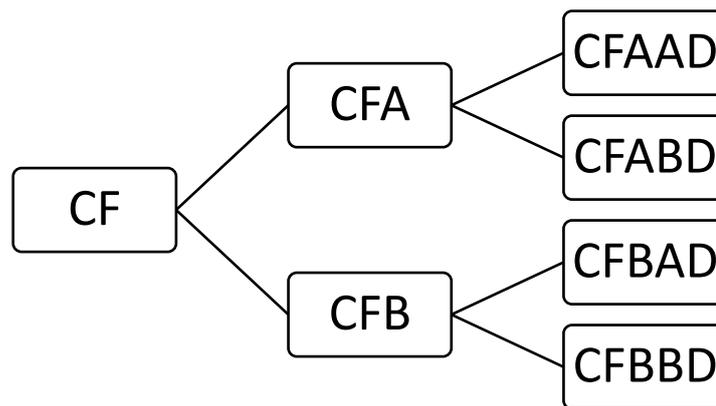


Figura 10 – Casuística do Estudo: representação dos quatro grupos de imagens cujas lâminas foram preparadas pelo método de Kinyoun completo, ou seja utilizando-se com fundo azul de metileno (contra corante).

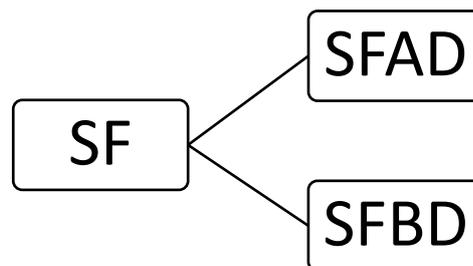


Figura 11 – Casuística do Estudo: representação dos dois grupos de imagens cujas lâminas foram preparadas pelo método de Kinyoun incompleto, ou seja sem a fase final de coloração do fundo com azul de metileno (contra corante).

Após a definição dos seis grupos, as lâminas foram preparadas. Dessas lâminas foram adquiridas 1800 imagens de baciloscopia: 1200 para análise das métricas de autofocus (conjunto de treinamento) e 600 para testes das métricas (conjunto de teste).

As imagens de cada grupo foram capturadas de campos provenientes de 3 (três) lâminas, 2 (duas) foram utilizadas para constituir o conjunto de treinamento e 1 (uma) para o conjunto de teste. Em cada um das lâminas, 10 campos de baciloscopia foram capturados, e em cada campo 10 imagens com diferentes distâncias focais foram adquiridas. Essas 10 imagens de um mesmo campo constituem um conjunto que será designado como CI.

Para a variação da distância focal, utilizou-se o ajuste fino do microscópio. Cada passo do ajuste representa um incremento de 2,5 μm . A quinta imagem capturada é definida como a

imagem em foco. Essa avaliação da imagem em foco foi realizada por um especialista em microscopia de campo claro de tuberculose. A primeira imagem e a décima imagem são as imagens mais desfocadas de cada grupo.

As imagens e a nomenclatura dos seis grupos definidos na casuística do trabalho serão mostradas a seguir:

- Grupo 1: Imagens de Baciloscopia de Tuberculose obtidas campos de lâminas preparadas segundo o método de *Kinyoun* (com a utilização do contra-corante azul de metileno), cujos campos apresentam alta densidade de conteúdo (fundo não uniforme) e grande quantidade de bacilos (CFAAD), vide Figura 12.

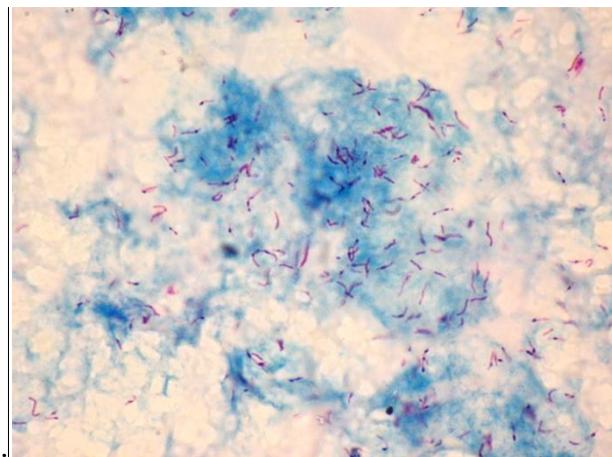


Figura 12 – Exemplo de imagem do grupo CFAAD

- Grupo 2: Imagens de Baciloscopia de Tuberculose obtidas campos de lâminas preparadas segundo o método de *Kinyoun* (com a utilização do contracorante azul de metileno), cujos campos apresentam alta densidade de conteúdo e baixa quantidade de bacilos (CFABD), vide Figura 13.

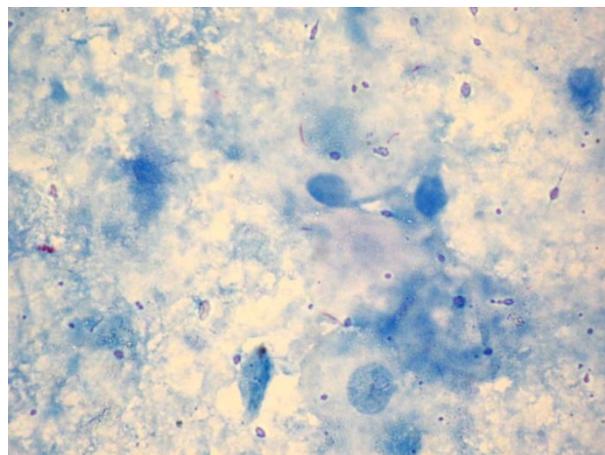


Figura 13 – Exemplo de imagem do grupo CFABD

- Grupo 3: Imagens de Baciloscopia de Tuberculose obtidas campos de lâminas preparadas segundo o método de *Kinyoun* (com a utilização do contra-corante azul de metileno), cujos campos apresentam baixa densidade de conteúdo e alta quantidade de bacilos (CFBAD), vide Figura 14.

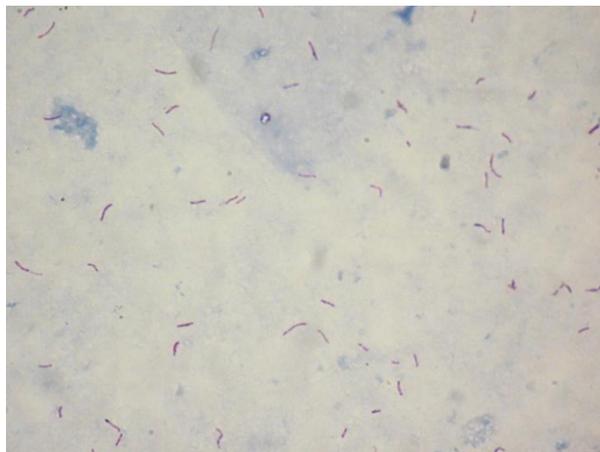


Figura 14 – Exemplo de imagem do grupo CFBAD

- Grupo 4: Imagens de Baciloscopia de Tuberculose obtidas campos de lâminas preparadas segundo o método de *Kinyoun* (com a utilização do contra-corante azul de metileno), cujos campos apresentam baixa densidade de conteúdo e baixa quantidade de bacilos (CFBBD), vide Figura 15.

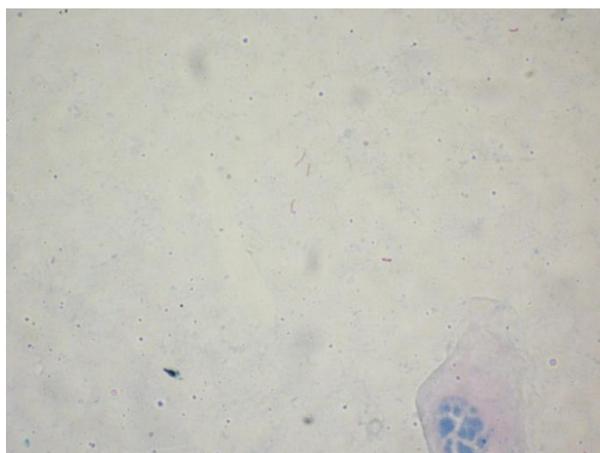


Figura 15 - Imagem do grupo CFBBD

- Grupo 5: Imagens de Baciloscopia de Tuberculose obtidas campos de lâminas preparadas segundo o método de *Kinyoun* (sem a utilização do contra corante azul

de metileno), cujos campos apresentam grande quantidade de bacilos (SFAD), vide Figura 16 .

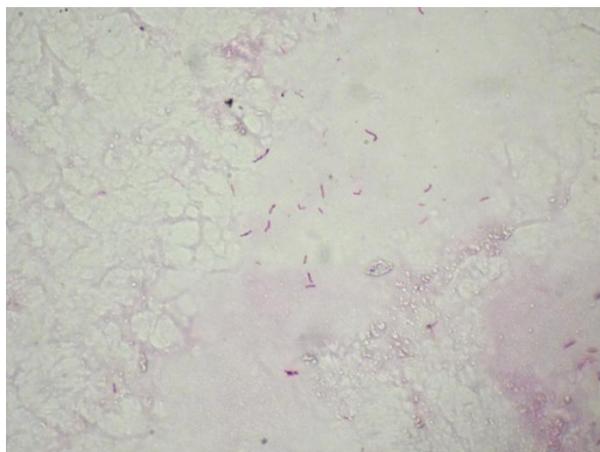


Figura 16 - Imagem do grupo SFAD

- Grupo 6: Imagens de Baciloscopia de Tuberculose obtidas campos de lâminas preparadas segundo o método de *Kinyoun* (sem a utilização do contra corante azul de metileno), cujos campos apresentam baixa quantidade de bacilos (SFBD), vide Figura 17 .

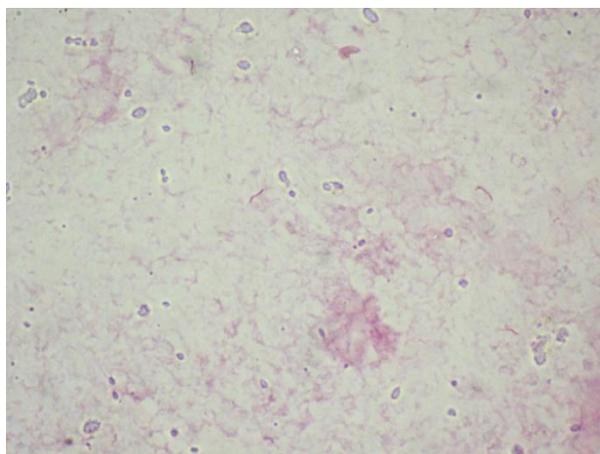


Figura 17 - Imagem do grupo SFBD

O total de imagens capturadas para o grupo de treinamento pode ser visto na Tabela 5. Conforme já mencionado essas imagens foram utilizadas para definição da melhor métrica e para a definição de um limiar de avaliação dessa métrica (caso o valor da métrica obtido esteja acima de um determinado limiar a imagem é dita em foco, do contrário a imagem está

fora de foco). Na Tabela 6 está representado o grupo de teste utilizado para a confirmação da melhor métrica.

Tabela 5 – Casuística utilizada para o estabelecimento da(s) melhor(es) métricas. O conjunto de grupos que compõem essa casuística foi denominado de conjunto de treinamento

Grupo	Quantidade de Lâminas	Quant. de Campos por Lâmina	Quant. de imagens em foco	Quant. de imagens fora de foco	Total Imagens
CFAAD	2	10	20	180	200
CFABD	2	10	20	180	200
CFBAD	2	10	20	180	200
CFBBD	2	10	20	180	200
SFAD	2	10	20	180	200
SFBD	2	10	20	180	200
Total	12	60	120	1080	1200

Tabela 6 – Casuística utilizada para a avaliação da(s) melhor(es) métricas identificada(s), denominado de conjunto de teste

Grupo	Quantidade de Lâminas	Quant. de Campos por Lâmina	Quant. de imagens em foco	Quant. de imagens fora de foco	Total Imagens
CFAAD	1	10	10	90	100
CFABD	1	10	10	90	100
CFBAD	1	10	10	90	100
CFBBD	1	10	10	90	100
SFAD	1	10	10	90	100
SFBD	1	10	10	90	100
Total	6	60	60	540	600

3.1.1 Preparação das Lâminas

Preparação das Lâminas

As lâminas contendo secreção pulmonar do paciente são preparadas com o intuito de realçar o bacilo *Mycobacterium Tuberculosis* e facilitar a contagem dos mesmos com o fim de se realizar um diagnóstico.

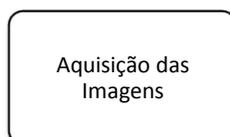
Na microscopia de campo claro, os dois principais métodos de preparação das lâminas são coloração de *Ziehl Neelsen* e coloração de *Kinyoun*. Tais processos de coloração se dividem em três etapas:

Na primeira etapa, a lâmina é tratada pelo corante fucsina fenicada, tingindo as bactérias de vermelho. Na segunda etapa é utilizada uma solução de álcool-ácido forte, um diferenciador com o intuito de descorar as bactérias da lâmina. Entretanto o bacilo *Mycobacterium Tuberculosis* não sofre a descoloração pelo álcool em função da presença de paredes celulares com alto teor de lipídios, pertencendo ao grupo dos chamados Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR). A coloração das outras bactérias, que não possuem tais paredes celulares ricas em lipídeos, são decorrentes da descoloração da fucsina pela solução álcool-ácido. A etapa final do processo resume-se em tingir essas bactérias de azul com a coloração de fundo Azul de metileno (contra corante). Com isso, têm-se, idealmente, lâminas com fundo corado de azul e os bacilos corados de vermelho.

No método de *Ziehl Neelsen*, a lâmina é aquecida até a emissão de vapores (método de coloração a quente), enquanto que o método de *Kinyoun* a coloração é a frio.

Para o presente trabalho, as lâminas utilizadas foram todas preparadas no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA utilizando-se o método de *Kinyoun*.

3.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS



A aquisição das imagens foi realizada no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA através de uma estação de trabalho composta por uma câmera digital, um microscópio, um monitor e um computador, conforme mostrado na Figura 18.

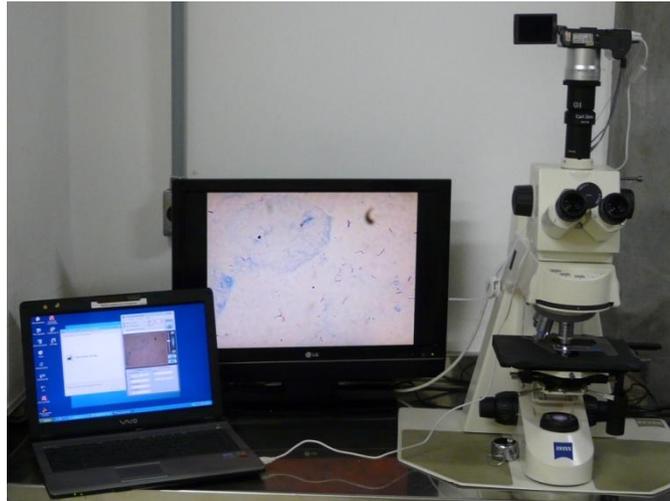


Figura 18 - Ambiente de aquisição das imagens.

O modelo de câmera digital utilizada no trabalho foi a *Canon PowerShot A640* de 10 megapixels, sensor CCD, zoom óptico de 4x e resolução máxima espacial de 3648 x 2736 *pixels*. No trabalho proposto, a máquina digital foi configurada para realizar aquisição de imagens na resolução de 2816 x 2112 *pixels*. Essa máquina digital foi acoplada através de um tubo extensor em uma saída ótica do microscópio da marca *Zeiss Axioskop 40* (vide Figura 19).

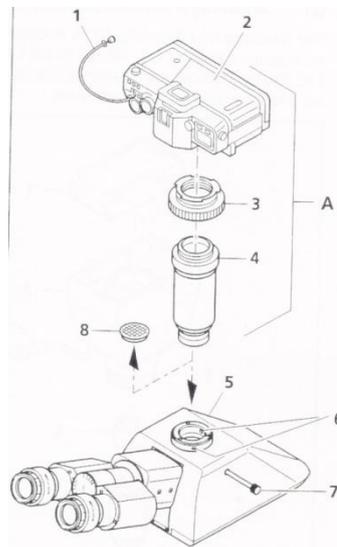


Figura 19- Técnica para acoplamento da câmera.

Fonte: Manual do Microscópio *Zeiss Axioskop*.

Na análise de baciloscopia de tuberculose, utilizou-se um microscópio ótico de campo claro com lente objetiva de imersão com aumento de 100 vezes. O binóculo do microscópio amplifica em 10 vezes a imagem para o observador, enquanto que o tubo de acoplamento

possui um fator de ampliação de 2,5 vezes. Para compensar essa discrepância entre o observador e a câmera digital, esta foi configurada com um zoom ótico de 4 vezes. Assim tanto a câmera digital como o observador percebem uma ampliação de 10 vezes. No entanto, a imagem adquirida não abrange a mesma área do campo percebido pelo observador pelo fato do conjunto que forma o tubo de acoplamento possuir um jogo de lentes interno com aumento diferente do binóculo frontal.

3.3 DEFINIÇÃO DAS MÉTRICAS DE AUTOFOCO

Definição das métricas de autofoco a serem avaliadas

Na revisão da literatura apresentada no Capítulo II foram apresentadas 20 métricas de autofoco divididas em cinco grupos distintos. Dessas, nove métricas foram selecionadas para o desenvolvimento do trabalho proposto, levando em consideração quatro principais requisitos:

- Desempenho da métrica: Foram selecionadas as métricas que apresentaram os melhores resultados nos trabalhos científicos revisados;
- Frequência de utilização da métrica: Em quantos artigos a métrica foi utilizada.
- Complexidade de implementação.
- Desempenho computacional.

As nove métricas selecionadas foram:

Métricas baseadas na derivada da Imagem:

- 1) Métrica gradiente de Brenner (Mbrenner)
- 2) Métrica energia do Laplaciano da imagem (Mlaplaciano)
- 3) Métrica transformada de *wavelet* (Mwb)

Métricas baseadas na estatística da Imagem:

- 4) Métrica variância do nível de cinza (Mvar)
- 5) Métrica variância normalizada pela média da intensidade (Mvarnorm)
- 6) Métrica autocorrelação (Mcor)
- 7) Métrica correlação baseada em desvio padrão (Mcordp)

Métricas baseadas no histograma da Imagem:

- 8) Métrica variância do logaritmo do histograma (Mlog)
- 9) Métrica entropia (Mentrop)

As métricas baseadas em picos e vales não foram selecionadas no trabalho proposto devido a três fatores: baixo desempenho, pouca utilização e necessidade de obtenção de limiar de forma experimental. As métricas baseadas na análise espectral da imagem não foram selecionadas por conta dos resultados não muito expressivos, da pouca utilização (somente em um artigo) e da sua difícil implementação.

É importante ressaltar que, na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho que abranja a utilização dessas nove métricas selecionadas para análise do foco em imagens de baciloscopia de tuberculose.

3.3.1 CÁLCULO DAS MÉTRICAS

Inicialmente, obtêm-se os valores das métricas de cada imagem. Em seguida, para cada conjunto de imagens (CI) de um mesmo campo (imagens adquiridas em várias profundidades focais) e para cada métrica é obtida uma curva de foco (gráfico dos valores obtidos para a métrica versus profundidade focal), vide Figura 20. Pode-se também, no eixo x de uma curva de foco em vez da posição Z usa-se o número de ordem de captura da imagem. Nesse último caso tem-se indiretamente a relação da ordem com a posição Z. No presente trabalho, será utilizada a ordem de captura da imagem.

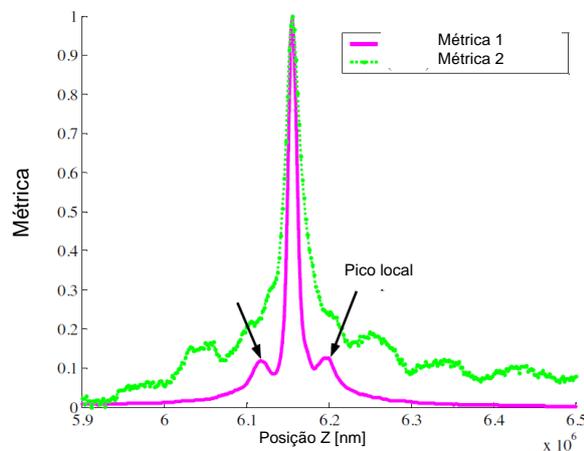


Figura 20- Ilustração de curvas de foco.

3.4 CRITÉRIOS DA ANÁLISE DAS MÉTRICAS

Definição dos
critérios das
análises das
métricas

Conforme pesquisa bibliográfica apresentada no Capítulo II, observou-se que, em geral o desempenho das métricas é avaliado segundo cinco critérios os quais veremos a seguir.

3.4.1 Acurácia

A acurácia é um critério que tem como objetivo verificar se o ponto máximo da curva de foco representa a imagem focalizada. No trabalho proposto, a quinta imagem é a imagem em foco. Se a métrica apresentar o valor máximo na quinta imagem o valor da acurácia é 0, significando que a métrica identificou a imagem em foco. Se a métrica errou em um passo para a esquerda, o valor da acurácia é -1; se erra em dois passos para a direita, acurácia=2, por exemplo. A Figura 21 mostra exemplos de curva de foco nas quais a acurácia da métrica é igual a -1 e 0, respectivamente.

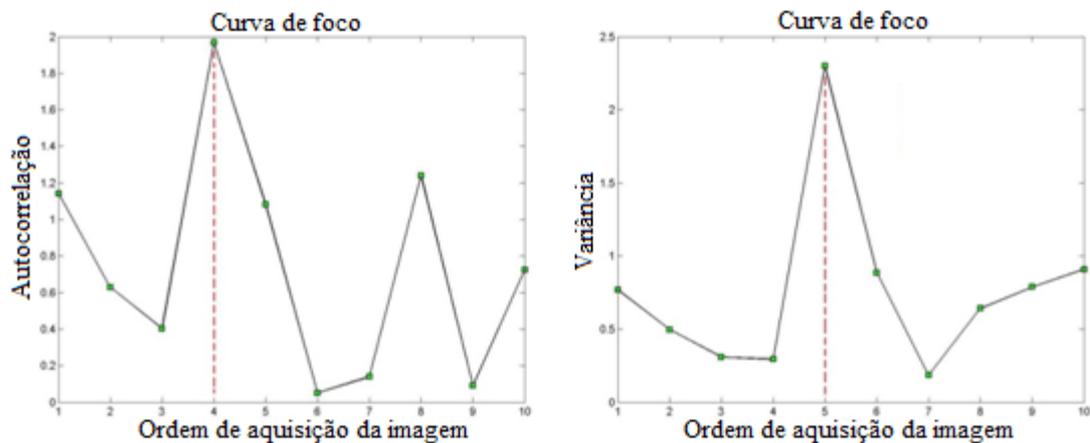


Figura 21 – Exemplos de curva de foco (a) com Acurácia igual a -1 e (b) com Acurácia igual a 0 .

3.4.2 Faixa

O critério faixa representa a distância em passos entre dois pontos locais mínimos em volta do máximo global da curva de foco. Quanto maior for essa distância, maior a probabilidade de se encontrar o máximo global, em vez do máximo local. Esse critério também representa o quanto a métrica é monotonicamente decrescente. Na Figura 22, temos

um exemplo de curva de foco no qual o valor da faixa é igual a 3, referente a três passos onde a curva se encontra monotonicamente decrescente.

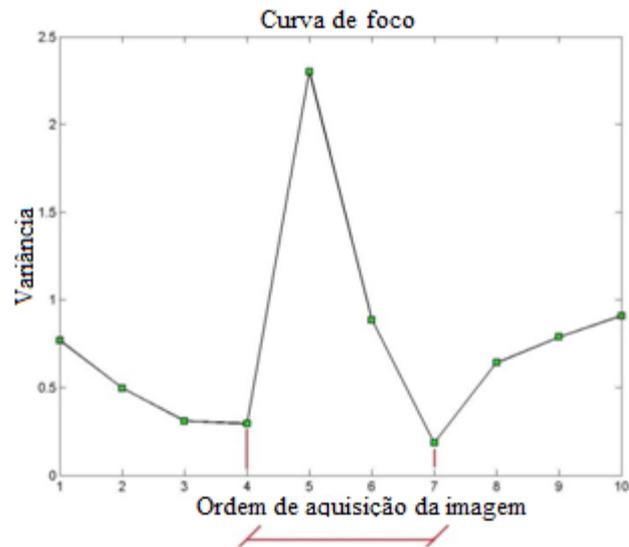


Figura 22 - Exemplo de curva de foco com Faixa igual a 3

3.4.3 Picos Falsos

Esse critério tem como objetivo quantificar os picos máximos falsos presentes na curva de foco. Para tal, todos os picos máximos são calculados. Um pico máximo na posição da imagem em foco é desconsiderado. Na Figura 23, observa-se um exemplo de curva de foco no qual temos 4 picos falsos (considerando que a imagem em foco é a quinta imagem).

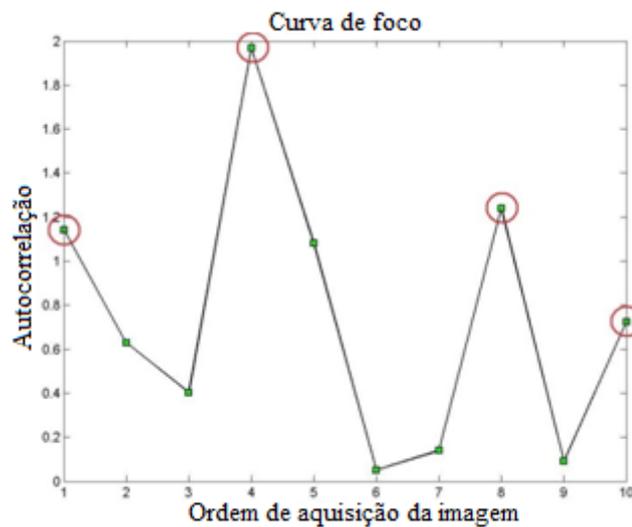


Figura 23 - Exemplo de curva de foco onde temos 4 picos falsos

3.4.4 Largura

Esse critério tem como objetivo medir o quão fino ou espesso é o pico da curva de foco. Para tal, mede-se a largura do pico na metade do valor máximo da métrica, conforme demonstrado na Figura 24. Quanto mais fino for o pico da curva de foco, mais fácil será a localização do máximo global.

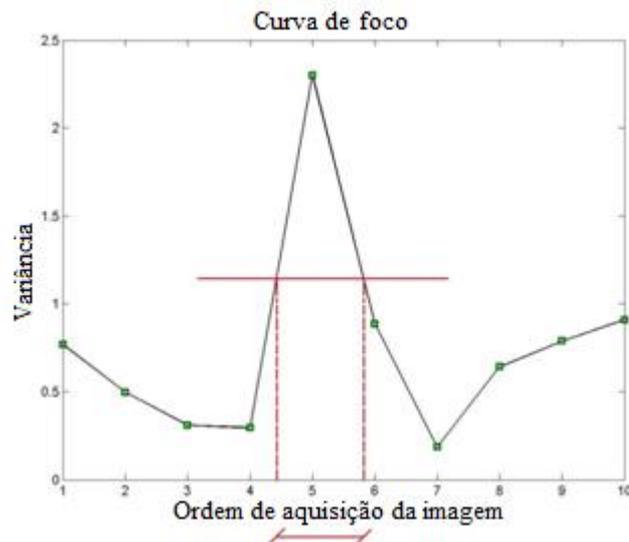
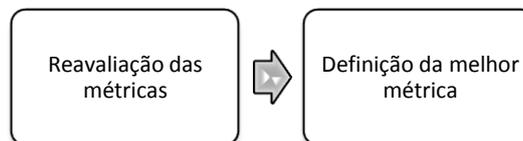


Figura 24 - Exemplo de curva de foco ilustrando a definição do critério largura

3.4.5 Tempo

O critério tempo consiste na mensuração do tempo (em segundos) necessário para o cálculo da métrica em uma imagem.

3.5 DESEMPENHO DAS MÉTRICAS



Para a avaliação dos desempenhos das métricas de autofocus definiu-se três tipos de análises:

1. Análise semiquantitativa;
2. Análise quantitativa;
3. Análise ROC (*Receiver Operating Characteristics*)

A seguir apresenta-se os passos metodológicos realizados em cada uma das análises. Apesar do fato de na literatura, as análises realizadas com vistas a avaliação de desempenho de métricas restringirem-se as duas primeiras, realizou-se, adicionalmente a análise ROC. A motivação para tal deve-se ao fato de que, enquanto o resultado das duas primeiras nos fornece a informação da melhor métrica a ser utilizada na busca sistemática da imagem em foco ao longo do eixo Z, a qual consiste em um segundo passo para a automatização do foco, na análise ROC buscamos avaliar as métricas e a possibilidade de obtenção de um valor de limiar para o qual uma imagem em análise seria considerada em foco.

3.5.1 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA

As nove métricas em análise, através de suas respectivas curvas de foco, são caracterizadas pelos valores de acurácia, faixa, largura, pico falso e tempo. Na análise semiquantitativa, obtém-se para cada um desses critérios, uma lista das métricas numericamente ordenada. Em cada uma dessas listas, o valor 1 é designado a métrica que apresenta o melhor resultado relativo ao critério ao qual a lista ordenada se refere, enquanto que o valor 9 será designado a métrica com o pior resultado relativo ao critério ao qual a lista ordenada se refere. No caso de haver mais de uma métrica com o mesmo valor do critério, as mesmas serão ranqueadas na mesma posição.

O resultado global do desempenho de cada métrica é dado pela somatória dos valores correspondentes nas listas ordenadas relativa aos 5 critérios.

A métrica que obtiver a menor pontuação (ou a melhor posição no ranque) é considerada a melhor.

3.5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

Conforme citado no Capítulo II, na análise quantitativa para a obtenção do desempenho de cada uma das métricas, pondera-se os resultados apresentados por cada um dos cinco critérios. Essa ponderação consiste na obtenção da distância euclidiana de cada métrica em relação ao seu valor ideal. Para tal, realizam-se os seguintes passos metodológicos adicionais:

- 1- Com o fim de se realizar uma comparação entre critérios, realiza-se a normalização desses valores:

- a. Obtêm-se os valores médios e o desvio padrão de cada critério para cada uma das métricas;
 - b. Subtraem-se os valores de cada critério das respectivas médias e divide-se o resultado obtido pelos respectivos desvios padrões.
- 2- Após esse procedimento todos os valores dos critérios possuem média igual a zero e desvio padrão unitário;
 - 3- Em cada uma das métricas e para cada critério, a distância euclidiana do valor normalizado para o valor ideal é calculada. Para calcular esse valor a diferença entre o valor de cada critério e do valor ideal é obtida. Em seguida a raiz quadrada da adição dos quadrados desses resultados é calculada;
 - 4- Com o intuito de obter o resultado global para cada métrica, a média das distâncias euclidianas dos critérios é encontrada.

A métrica de melhor desempenho corresponde a que apresenta a menor média geral.

3.5.3 ANÁLISE ROC (*RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC*)

O resultado final de uma análise ROC de decisão de desempenho se expressa através de um gráfico denominado curva ROC. Essencialmente, uma curva ROC descreve o compromisso entre a sensibilidade e a especificidade de um sistema, quando um limiar de decisão é variado. Convencionalmente, uma curva ROC é um gráfico da taxa de VP (verdadeiro positivo), isto é, a sensibilidade, em função da taxa de FP (falso positivo), isto é, 1-especificidade (COSTA, 1996). Particularmente nesse estudo busca-se, através da curva ROC, avaliar o poder de uma dada métrica de detectar se a imagem está ou não em foco. Antes de iniciar a teoria de análise ROC é necessário rever alguns conceitos como sensibilidade e especificidade, pois esses são a base para a geração da curva ROC.

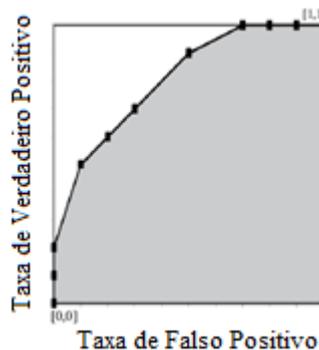


Figura 25 – Ilustração de uma curva ROC

No desenvolvimento do projeto, a taxa VP, verdadeiro positivo, corresponde ao percentual de imagens em foco classificadas corretamente na análise; a taxa VN (verdadeiro negativo) consiste no percentual de imagens fora de foco classificadas corretamente; a taxa FP corresponde ao percentual de imagens fora de foco classificadas erroneamente como em foco e, por último, a taxa FN (falso negativo) corresponde ao percentual de imagens em foco classificadas erroneamente como fora de foco.

A Figura 26 mostra uma tabela de contingência ilustrando os conceitos de verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos.

		Decisão da Análise	
		Imagem em Foco	Imagem Fora de Foco
S i t u a ç ã o	Imagem em Foco	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Negativo (FN)
	Imagem Fora de Foco	Falso Positivo (FP)	Verdadeiro Negativo (VN)

Figura 26 - Verdadeiros Positivos, Verdadeiros Negativos, Falsos Positivos e Falsos Negativos

A casuística utilizada nessa análise envolveu os grupos CF (CFAAD+CFABD+CFBAD +CFBBD) e SF (SFAD+SFBD). Para cada um dos grupos foi obtida uma curva ROC para cada métrica, variando o limiar de decisão. Cada ponto da curva corresponde ao par (VP, FP) obtido com um dado limiar.

A figura de mérito usual dessa análise é a área sob a curva ROC resultante. Através dessa medida, denotada de AUC (*Area Under Curve*), o desempenho das métricas será avaliado. De acordo com Slaby *et al.* (2007) quanto maior for o valor da área sob essa curva melhor o desempenho. A métrica que apresentar o maior valor de AUC é, segundo a análise ROC, a de maior desempenho.

Nessa curva a melhor combinação de (VP, FP), ou seja, o ponto mais a esquerda (menor valor de FP) e mais alto (maior valor de VP) da curva denota o melhor valor de limiar para a métrica em estudo. Esse limiar é definido como sendo o limiar de autofocus da métrica.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os principais resultados do presente trabalho, tal como o desempenho das análises semiquantitativa, quantitativa e ROC das métricas de autofoco avaliadas em imagens de campos de lâminas de baciloscopia de tuberculose, tanto na casuística de treinamento como na de teste.

4.1 RESULTADOS DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA

Para cada um dos 20 conjuntos de imagens (CI) de cada um dos 6 grupos correspondentes a casuística denominada “casuística de treinamento”, a análise semiquantitativa foi sumariada em uma tabela de resultados. Dessa forma, foram geradas 120 tabelas (20 tabelas por grupo). As Tabela 7, 8 e 9, são exemplos de resultados gerados no âmbito do grupo CFAAD. As mesmas são referentes aos três primeiros conjuntos de imagens (CI) desse grupo. As colunas denominadas de “Pont.” (pontuação), referem-se a ordenação das métricas em relação a um critério específico, tal como acurácia, enquanto que a coluna “Pont. Total” das referidas tabelas correspondem à somatória das pontuações obtidas pela métrica em cada um dos parâmetros (acurácia, faixa, picos falsos e largura). Por fim, a última coluna apresenta o ranque do desempenho das métricas (para os conjuntos de imagens 1, 2 e 3 do Grupo CFAAD, respectivamente).

Tabela 7 – Sumário da análise semiquantitativa referente ao conjunto de imagens 1 do Grupo CFAAD

Métrica	Acurácia	Pont.	Faixa	Pont.	Picos Falsos	Pont.	Largura	Pont	Pont. Final	Ranque
Mbrenner	0	1	2	1	1,03	1	2	8	11	3
Mcor	0	1	3	6	1,04	2	2	8	17	4
Mcordesv	1	7	3	6	1,49	5	3	6	24	5
Mentrop	0	1	2	1	1,87	7	4	2	11	3
Mlap	4	9	3	6	2,07	8	3	6	29	6
Mlog	1	7	4	9	1,68	6	4	2	24	5
Mvar	0	1	2	1	1,44	4	4	2	8	2
Mvarnorm	0	1	2	1	1,42	3	4	2	7	1
Mwb	0	1	2	1	2,07	8	6	1	11	3

Tabela 8 - Sumário da análise semiquantitativa referente ao conjunto de imagens 2 do Grupo CFAAD

Métrica	Acurácia	Pont.	Faixa	Pont.	Picos Falsos	Pont.	Largura	Pont.	Pont. Total	Ranque
Mbrenner	0	1	2	1	1,16	3	5	1	6	1
Mcor	0	1	3	5	1,13	1	3	6	13	5
Mcordesv	3	8	3	5	1,13	1	2	7	21	6
Mentrop	0	1	2	1	2,41	8	4	2	12	4
Mlap	-1	6	4	8	3,4	9	4	2	25	7
Mlog	3	8	3	5	1,66	7	2	7	27	8
Mvar	0	1	2	1	1,31	5	4	2	9	3
Mvarnorm	0	1	2	1	1,3	4	4	2	8	2
Mwb	1	6	5	9	1,4	6	2	7	28	9

Tabela 9 - Sumário da análise semiquantitativa referente ao conjunto de imagens 3 do Grupo CFAAD

Métrica	Acurácia	Pont.	Faixa	Pont.	Picos Falsos	Pont.	Largura	Pont.	Pont. Total	Ranque
Mbrenner	0	1	2	1	1,46	3	3	6	11	2
Mcor	0	1	2	1	1,46	3	3	6	11	2
Mcordesv	0	1	3	7	1,51	5	2	8	21	4
Mentrop	0	1	2	1	2,48	8	5	1	11	2
Mlap	1	8	3	7	2,71	9	5	1	25	5
Mlog	4	9	3	7	0,6	1	2	8	25	5
Mvar	0	1	2	1	1,83	7	4	3	12	3
Mvarnorm	0	1	2	1	1,81	6	4	3	11	2
Mwb	0	1	2	1	1,32	2	4	3	7	1

As métricas com melhor desempenho, portanto, são aquelas melhor posicionadas (menores valores de pontuação total) nesse processo de ordenação. A Tabela 10 mostra o resultado final do grupo CFAAD, constituído pela consolidação das 20 análises semiquantitativas relativas aos 20 conjuntos de imagens.

Tabela 10 - Sumário da análise semiquantitativa referente aos 20 conjuntos de imagens que constituem o Grupo CFAAD

Métrica	Pontuação Final	Ranque
Mbrenner	210	1
Mcor	231	4
Mcordesv	331	6
Mentrop	283	5
Mlap	408	8
Mlog	513	9
Mvar	219	2
Mvarnorm	229	3
Mwb	357	7

Na análise da Tabela 10, observa-se que a métrica de melhor desempenho na análise semiquantitativa para o grupo de imagens CFAAD de treinamento é a métrica Mbrenner com a pontuação de 210, seguida pela Mvar com a pontuação de 219.

A mesma metodologia foi utilizada para os 9 grupos restantes, ou seja, foram geradas tabelas de análise semiquantitativa para todos os conjuntos de imagens de cada grupo. Em seguida, o resultado global de cada grupo foi encontrado. Para facilitar a visualização dos resultados, foram desenvolvidas tabelas-resumo nas quais são mostrados os resultados das análises semiquantitativos ordenados e separados por grupo:

Na Tabela 11, são apresentados os resultados dos grupos que possuem como principal característica o fundo azul de metileno com alta densidade de conteúdo (CFAAD). Na análise dessa tabela, observa-se que a melhor métrica foi a baseada na teoria de Brenner (Mbrenner), seguida da Mvar. Já no grupo CFABD, a melhor métrica foi baseada em Autocorrelação (Mcor), seguida pela Mvarnorm. Os resultados gerais mostram que a melhor métrica para o grupo com fundo de alta densidade de conteúdo, independente da densidade de bacilos por campo (CFA) foi a métrica baseada em Autocorrelação (Mcor), seguida pela Variância Normalizada (Mvarnorm).

Tabela 11 – Sumário da análise semiquantitativa do grupo CFA (CFAAD + CFABD).

	Métrica	Pontuação Total		Métrica	Pontuação Total		Métrica	Pontuação Total
	CFAAD	Mbrenner		210	CFABD		Mcor	209
Mvar		219	Mvarnorm	235		Mvarnorm	464	
Mvarnorm		229	Mentrop	241		Mvar	468	
Mcor		231	Mvar	249		Mbrenner	475	
Mentrop		283	Mbrenner	265		Mentrop	524	
Mcordesv		331	Mlap	347		Mlap	755	
Mwb		357	Mwb	416		Mcordesv	759	
Mlap		408	Mcordesv	428		Mwb	773	
Mlog		513	Mlog	450		Mlog	963	

Na Tabela 12, apresentam-se os resultados do grupo de imagens de campos de lâminas com baixa densidade de conteúdo, preparadas segundo o método de Kinyoun com a utilização do contra-corante azul de metileno (CFB). Na análise dessa tabela, observa-se que no grupo CFBAD, a melhor métrica foi a baseada na teoria da Variância Normalizada (Mvarnorm), seguida da Mvar. Também no grupo CFBBDD, a melhor métrica foi baseada em Variância Normalizada (Mvarnorm), enquanto que a segunda melhor posicionada foi a Mentrop, baseada em conceitos de Entropia. Os resultados gerais mostram que a melhor métrica para o grupo CFB foi a baseada em Variância Normalizada (Mvarnorm) seguida pela Variância (Mvar).

Tabela 12 – Sumário da análise semiquantitativa do grupo CFB (CFBAD+CFBBDD)

	Métrica	Pontuação Total		Métrica	Pontuação Total		Métrica	Pontuação Total
	CFBAD	Mvarnorm		206	CFBBDD		Mvarnorm	235
Mvar		210	Mentrop	250		Mvar	469	
Mbrenner		249	Mvar	259		Mentrop	513	
Mentrop		263	Mbrenner	273		Mbrenner	522	
Mcor		305	Mcor	298		Mcor	603	
Mcordesv		376	Mlog	376		Mcordesv	765	
Mlog		392	Mwb	379		Mlog	768	
Mwb		410	Mcordesv	389		Mwb	789	
Mlap		428	Mlap	427		Mlap	855	

A Tabela 13 mostra o resultado global da análise Semiquantitativa para o grupo CF, tem-se que as melhores métricas são a variância normaliza (Mvarnorm) seguida pela Variância (Mvar).

Tabela 13 – Sumário da análise semiquantitativa ordenado para o grupo CF

Métrica	Pontuação Total
Mvarnorm	905
Mvar	937
Mbrenner	997
Mentrop	1037
Mcor	1043
Mcordesv	1524
Mwb	1562
Mlap	1610
Mlog	1731

Na Tabela 14 são apresentados os resultados dos grupos de imagens de Baciloscopia de Tuberculose obtidas de campos de lâminas preparadas segundo o método de *Kinyon* (sem a utilização do contra corante azul de metileno). Na análise dessa tabela, observa-se que no sub-grupo SFAD (imagens de campos com alta densidade de bacilos) a melhor métrica foi a baseada na teoria de Variância Normalizada (Mvarnorm), seguida da Entropia (Mentrop). Já no grupo SFBD (imagens de campos com baixa densidade de bacilos), a melhor métrica foi baseada em Entropia (Mentropia), seguida pela Variância (Mvar).

Para o grupo de imagens sem fundo azul de metileno (SF), observa-se que a melhor métrica é a baseada em Entropia (Mentrop) seguida pela baseada em Variância (Mvar).

Tabela 14 – Sumário da análise semiquantitativa do grupo SF (SFAD + SFBD)

	Métricas	Pontuação Total		Métricas	Pontuação Total		Métricas	Pontuação Total
	SFAD	Mvarnorm		239	SFBD		Mentrop	254
Mentrop		245	Mvar	257		Mvar	506	
Mvar		249	Mvarnorm	272		Mvarnorm	511	
Mcor		271	Mcor	287		Mcor	558	
Mbrenner		283	Mbrenner	291		Mbrenner	574	
Mlog		337	Mcordesv	347		Mcordesv	732	
Mcordesv		385	Mwb	361		Mlog	736	
Mlap		421	Mlap	368		Mwb	784	
Mwb		423	Mlog	399		Mlap	789	

4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA

O resultado da análise quantitativa para os grupos CFAAD, CFABD e CFA é mostrado nas Tabela 15, 16 e 17, respectivamente. Ressalta-se que a média geral refere-se a média da distância Euclidiana de cada critério. Os resultados ordenados desses grupos estão expostos na Tabela 18. Nessa tabela, nota-se que a melhor métrica para o grupo CFA é a baseada em Variância (Mvar) seguida pela Variância Normalizada (Mvarnorm).

Tabela 15 – Sumário da análise quantitativa para o grupo CFAAD

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	3,46	2,95	3,82	45,11	13,84
Mcor	3,46	2,86	4,03	45,64	14,00
Mcordesv	4,76	4,31	3,69	45,63	14,60
Mentrop	3,65	2,78	3,97	43,77	13,54
Mlap	4,67	5,12	5,45	45,68	15,23
Mlog	6,38	7,24	5,87	47,02	16,63
Mvar	2,95	2,92	2,81	42,83	12,88
Mvarnorm	2,83	2,78	2,81	43,11	12,88
Mwb	4,55	4,69	4,46	45,31	14,75

Tabela 16 – Sumário da análise quantitativa para o grupo CFABD

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	3,40	3,78	3,94	47,14	14,56
Mcor	3,52	3,67	3,96	45,60	14,19
Mcordesv	5,58	4,62	4,54	46,37	15,28
Mentrop	3,57	3,67	3,85	41,40	13,12
Mlap	3,80	5,01	4,66	47,59	15,27
Mlog	6,29	5,22	4,93	45,87	15,58
Mvar	2,81	3,30	3,00	41,24	12,59
Mvarnorm	2,91	3,09	2,95	41,56	12,63
Mwb	4,66	4,97	5,44	46,88	15,49

Tabela 17 - Sumário da análise quantitativa para o grupo CFA

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	4,85	4,79	5,49	65,25	20,10
Mcor	4,94	4,65	5,65	64,51	19,94
Mcordesv	7,33	6,31	5,85	65,06	21,14
Mentrop	5,10	4,60	5,53	60,25	18,87
Mlap	6,02	7,16	7,17	65,97	21,58
Mlog	8,96	8,92	7,67	65,69	22,81
Mvar	4,08	4,41	4,11	59,45	18,01
Mvarnorm	4,06	4,16	4,07	59,88	18,04
Mwb	6,52	6,83	7,03	65,20	21,40

Tabela 18 - Sumário da análise quantitativa do grupo CFA (CFAAD+CFABD)

CFAAD	Métrica	Média Geral	CFABD	Métrica	Média Geral	CFA	Métrica	Média Geral
	Mvar	12,88		Mvar	12,59		Mvar	18,01
Mvarnorm	12,88	Mvarnorm	12,63	Mvarnorm	18,04			
Mentrop	13,54	Mentrop	13,12	Mentrop	18,87			
Mbrenner	13,84	Mcor	14,19	Mcor	19,94			
Mcor	14,00	Mbrenner	14,56	Mbrenner	20,10			
Mcordesv	14,60	Mlap	15,27	Mcordesv	21,14			
Mwb	14,75	Mcordesv	15,28	Mwb	21,40			
Mlap	15,23	Mwb	15,49	Mlap	21,58			
Mlog	16,63	Mlog	15,58	Mlog	22,81			

O resultado da análise quantitativa para os grupos CFBAD, CFBBD e CFB são mostrados nas Tabela 19, 20 e 21 respectivamente. Os resultados ordenados desses grupos estão expostos na Tabela 22. Nessa tabela, nota-se que a melhor métrica para o grupo CFB é a baseada em Entropia (Mentrop) seguida por Variância (Mvar).

Tabela 19 – Sumário da análise quantitativa para o grupo CFBAD

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	3,32	3,84	3,79	45,51	14,12
Mcor	3,49	4,79	3,70	47,14	14,78
Mcordesv	5,56	3,69	3,98	45,73	14,74
Mentrop	3,37	3,27	4,43	41,83	13,22
Mlap	5,30	5,18	4,18	45,63	15,07
Mlog	3,47	4,46	7,14	43,97	14,76
Mvar	3,64	3,86	2,53	44,19	13,55
Mvarnorm	3,53	4,46	2,85	43,59	13,61
Mwb	5,35	4,07	3,68	46,46	14,89

Tabela 20 - Sumário da análise quantitativa para o grupo CFBBD

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	4,29	4,32	5,68	45,48	14,94
Mcor	3,15	4,83	4,29	46,31	14,64
Mcordesv	5,32	4,60	5,75	46,15	15,45
Mentrop	3,54	4,13	3,49	42,38	13,39
Mlap	5,62	4,51	4,00	46,26	15,10
Mlog	4,64	4,58	3,53	44,73	14,37
Mvar	3,59	3,52	2,80	43,88	13,45
Mvarnorm	3,16	3,32	3,15	43,92	13,39
Mwb	3,86	3,88	4,23	45,00	14,24

Tabela 21 - Sumário da análise quantitativa para o grupo CFB

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	5,43	5,78	6,83	64,34	20,59
Mcor	4,70	6,80	5,67	66,08	20,81
Mcordesv	7,70	5,89	6,99	64,97	21,39
Mentrop	4,89	5,27	5,64	59,55	18,84
Mlap	7,73	6,87	5,78	64,98	21,34
Mlog	5,79	6,39	7,97	62,72	20,72
Mvar	5,11	5,22	3,77	62,27	19,09
Mvarnorm	4,74	5,56	4,25	61,88	19,11
Mwb	6,59	5,62	5,61	64,69	20,63

Tabela 22 - Sumário da análise quantitativa do grupo CFB (CFBAD+CFBBD)

CFBAD	Métricas	Média Geral	CFBBD	Métricas	Média Geral	CFB	Métricas	Média Geral
	Mentrop	13,22		Mentrop	13,39		Mentrop	18,84
Mvar	13,55	Mvarnorm	13,39	Mvar	19,09			
Mvarnorm	13,61	Mvar	13,45	Mvarnorm	19,11			
Mbrenner	14,12	Mwb	14,24	Mbrenner	20,59			
Mcordesv	14,74	Mlog	14,37	Mwb	20,63			
Mlog	14,76	Mcor	14,64	Mlog	20,72			
Mcor	14,78	Mbrenner	14,94	Mcor	20,81			
Mwb	14,89	Mlap	15,10	Mlap	21,34			
Mlap	15,07	Mcordesv	15,45	Mcordesv	21,39			

O resultado da análise quantitativa para o grupo CF (CFA+CFB) é mostrado na Tabela 23. Os resultados ordenados estão expostos na Tabela 24. Nessa tabela, nota-se que a melhor métrica para o grupo CF é baseada em Variância (Mvar) seguida pela Variância Normalizada (Mvarnorm).

Tabela 23 - Sumário da análise quantitativa para o grupo CF

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	7,28	7,51	8,76	91,63	28,80
Mcor	6,82	8,24	8,00	92,35	28,85
Mcordesv	10,63	8,64	9,12	91,94	30,08
Mentrop	7,07	7,00	7,89	84,71	26,67
Mlap	9,80	9,93	9,21	92,60	30,39
Mlog	10,67	10,98	11,06	90,82	30,88
Mvar	6,54	6,83	5,58	86,10	26,26
Mvarnorm	6,24	6,94	5,89	86,11	26,30
Mwb	9,27	8,85	8,99	91,84	29,74

Tabela 24 - Sumário da análise quantitativa ordenado para o grupo CF

Métrica	Média Geral
Mvar	26,26
Mvarnorm	26,30
Mentrop	26,67
Mbrenner	28,80
Mcor	28,85
Mwb	29,74
Mcordesv	30,08
Mlap	30,39
Mlog	30,88

O resultado da análise quantitativa para os grupos SFA, SFB e SF é mostrado nas Tabelas 25, 26 e 27, respectivamente. Os resultados ordenados desses grupos estão expostos na Tabela 28. Nessa tabela, nota-se que a melhor métrica para o grupo SF é a baseada em Entropia (Mentrop) seguida pela Variância Normalizada (Mvarnorm).

Tabela 25 - Sumário da análise quantitativa para o grupo SFAD

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	4,65	4,14	4,77	43,95	14,38
Mcor	4,20	4,25	3,34	44,39	14,05
Mcordesv	5,35	4,55	5,28	46,22	15,35
Mentrop	3,05	4,00	4,45	41,11	13,15
Mlap	5,08	4,77	4,45	47,71	15,50
Mlog	4,00	3,33	4,14	44,85	14,08
Mvar	3,49	4,33	2,61	43,36	13,45
Mvarnorm	3,29	4,40	2,35	42,93	13,24
Mwb	4,24	4,02	5,39	49,21	15,72

Tabela 26 - Sumário da análise quantitativa para o grupo SFBD

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	3,22	4,03	3,32	46,96	14,38
Mcor	3,37	3,57	3,42	45,77	14,03
Mcordesv	4,23	4,24	4,46	48,39	15,33
Mentrop	3,42	4,16	4,34	41,10	13,26
Mlap	3,99	4,91	3,90	46,47	14,82
Mlog	6,45	5,37	5,50	44,71	15,51
Mvar	3,66	4,00	4,15	41,29	13,27
Mvarnorm	3,66	2,97	4,20	41,48	13,08
Mwb	4,94	4,25	4,26	47,37	15,21

Tabela 27 - Sumário da análise quantitativa para o grupo SF

Métrica	Acurácia	Faixa	Picos Falsos	Largura	Média Geral
Mbrenner	5,66	5,78	5,81	64,32	20,39
Mcor	5,39	5,55	4,79	63,76	19,87
Mcordesv	6,82	6,21	6,91	66,92	21,72
Mentrop	4,59	5,77	6,21	58,13	18,67
Mlap	6,46	6,84	5,92	66,60	21,45
Mlog	7,59	6,32	6,89	63,33	21,03
Mvar	5,05	5,89	4,90	59,87	18,93
Mvarnorm	4,92	5,31	4,82	59,69	18,69
Mwb	6,51	5,85	6,88	68,31	21,89

Tabela 28 - Sumário da análise quantitativa do grupo SF (SFAD+SFBD)

SFAD	Métrica	Média Geral	SFBD	Métrica	Média Geral	SF	Métrica	Média Geral
	Mentrop	13,15		Mvarnorm	13,08		Mentrop	18,67
Mvarnorm	13,24	Mentrop	13,26	Mvarnorm	18,69			
Mvar	13,45	Mvar	13,27	Mvar	18,93			
Mcor	14,05	Mcor	14,03	Mcor	19,87			
Mlog	14,08	Mbrenner	14,38	Mbrenner	20,39			
Mbrenner	14,38	Mlap	14,82	Mlog	21,03			
Mcordesv	15,35	Mwb	15,21	Mlap	21,45			
Mlap	15,50	Mcordesv	15,33	Mcordesv	21,72			
Mwb	15,72	Mlog	15,51	Mwb	21,89			

4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA E QUANTITATIVA PARA O GRUPO DE TESTE

Para o grupo de teste, constituído por 600 imagens distribuídas nos 6 grupos pré-definidos, foram realizadas uma nova análise (Semiquantitativa e Quantitativa) com o fim de validar a análise e os resultados obtidos.

A Tabela 29 e a Tabela 30 mostram os resultados ordenados das análises semiquantitativa e quantitativa.

Tabela 29 – Sumário das análises semiquantitativa e quantitativa para a casuística de teste do grupo CF

Análise Semiquantitativa		Análise Quantitativa	
Métrica	Pontuação Total	Métrica	Média Geral
Mvar	431	Mvar	18,38
Mvarnorm	438	Mvarnorm	18,42
Mcor	439	Mentrop	19,29
Mbrenner	519	Mcor	19,76
Mentrop	551	Mbrenner	20,00
Mcordesv	761	Mcordesv	20,77
Mlap	791	Mlog	21,66
Mwb	830	Mwb	21,97
Mlog	859	Mlap	22,02

Tabela 30 – Sumário das análises semiquantitativa e quantitativa para a casuística de teste do grupo SF

Análise Semiquantitativa		Análise Quantitativa	
Métrica	Pontuação Total	Métrica	Média Geral
Mentrop	213	Mentrop	13,51
Mvar	246	Mvar	13,51
Mvarnorm	250	Mvarnorm	13,52
Mcor	266	Mbrenner	13,53
Mbrenner	287	Mcor	13,86
Mlog	359	Mlog	14,30
Mcordesv	387	Mlap	14,81
Mlap	406	Mcordesv	15,40
Mwb	423	Mwb	16,31

Dessa forma, reafirma-se que a melhor métrica para o grupo com fundo azul de metileno é a Variância; e para o grupo sem fundo azul de metileno, a Entropia.

Validado a Variância como melhor métrica do grupo CF, realizou-se análise adicional, utilizando-se conjuntamente a casuística de treinamento e de teste. Essa análise consistiu na obtenção da taxa de acerto dessa métrica de auto foco segundo o critério de acurácia. No cálculo dessa taxa, considerou-se como aceitável um erro de até um passo na profundidade do foco da imagem identificada como em foco. Dessa forma, obteve-se um percentual de acerto de 96%, que corresponde a 115 acertos num total de 120 conjuntos de imagens. Já na análise para imagens SF a métrica Entropia obteve um percentual de acerto de 88%, que corresponde a 53 acertos num total de 60 conjuntos de imagens.

4.4 CRITÉRIO TEMPO DE PROCESSAMENTO

O critério tempo de processamento foi analisado de forma o particular. Conforme mostra a Tabela 31, todas as métricas, excluindo a baseada na transformada de *Wavelet*, apresentaram tempos de processamento inferiores 1,5 segundos, independentes do grupo de imagem. O *hardware* utilizado foi um PC marca Philips com um processador core 2 duo, 2.0 GHz com 3GB de memória RAM, sistema operacional Windows Vista Basic Edition.

Tabela 31 - Tempo de processamento (s) das Métricas de foco

Métrica Grupo	Mbrenner	Mcor	Mcor desv	Mentrop	Mlap	Mlog	Mvar	Mvarnorm	Mwb
CFAAD	1,28	1,10	0,81	0,03	0,96	0,04	0,65	0,65	105,36
CFABD	1,28	1,09	0,81	0,03	0,95	0,03	0,65	0,67	103,41
CFBAD	1,28	1,09	0,81	0,03	0,95	0,03	0,64	0,74	112,50
CFBBD	1,27	1,10	0,82	0,03	0,96	0,03	0,65	0,67	106,44
SFAD	1,27	1,10	0,81	0,03	0,96	0,03	0,71	0,67	108,16
SFBD	1,27	1,11	0,81	0,03	0,96	0,03	0,65	0,69	102,98
Tempo de proc. médio (s)	1,28	1,10	0,81	0,03	0,96	0,03	0,66	0,68	106,47

4.5 RESULTADOS DA ANÁLISE ROC (*RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC*)

Nessa análise, foram utilizadas oito das nove métricas de foco selecionadas. A métrica baseada em *wavelet* não foi aproveitada por ter apresentado um tempo de processamento muito elevado.

A casuística utilizada nessa análise envolveu os grupos CF (CFAAD+CFABD+CFBAD+CFBBD) e SF (SFAD+SFBD). Para cada um dos grupos foi obtida uma curva ROC para cada métrica, variando o limiar de decisão. Cada ponto da curva corresponde ao par (TVP, TFP) foi obtido com um dado limiar.

A figura de mérito usual dessa análise é a área sob a curva ROC resultante. Através dessa medida, denotada de AUC (*Area Under Curve*), o desempenho das métricas será avaliado. De acordo com Slaby et al. (2007) quanto maior for o valor da área sob essa curva melhor o desempenho. A métrica que apresentar o maior valor de AUC é, segundo a análise ROC, a de maior desempenho.

Nessa curva a melhor combinação de (VP, FP), ou seja, o ponto mais a esquerda (menor valor de FP) e mais alto (maior valor de VP) da curva denota o melhor valor de limiar para a métrica em estudo. Esse limiar é definido como sendo o limiar de auto foco da métrica.

Através da curva ROC, buscou-se encontrar um limiar que classificasse as imagens de microscopia em foco ou fora de foco.

As Tabela 32 e 33 sumarizam os resultados das oito métricas analisadas. Nas tabelas são mostrados os valores da área da curva ROC (AUC), a taxa de verdadeiro positivo (TVP), a taxa de verdadeiro negativo (TVN), a taxa de falso positivo (TFP) e a taxa de falso negativo (TFN).

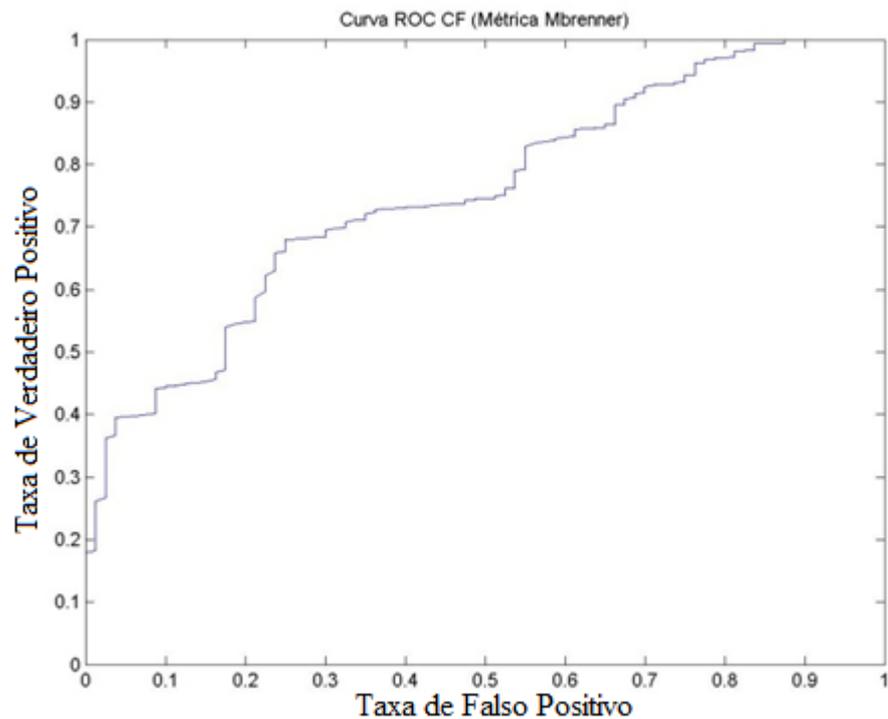
Tabela 32 – Sumário da análise ROC para o grupo CF

Métrica	AUC	TVP	TVN	TFN	TFP
Mbrenner	0,75	0,70	0,69	0,30	0,31
Mcor	0,80	0,70	0,68	0,30	0,32
Mcordesv	0,52	0,54	0,52	0,46	0,48
Mentrop	0,60	0,52	0,51	0,48	0,49
Mlap	0,48	0,50	0,50	0,50	0,50
Mlog	0,48	0,50	0,49	0,50	0,51
Mvar	0,62	0,52	0,51	0,48	0,49
Mvarnorm	0,62	0,53	0,51	0,47	0,49

Tabela 33 – Sumário da análise ROC para o grupo SF

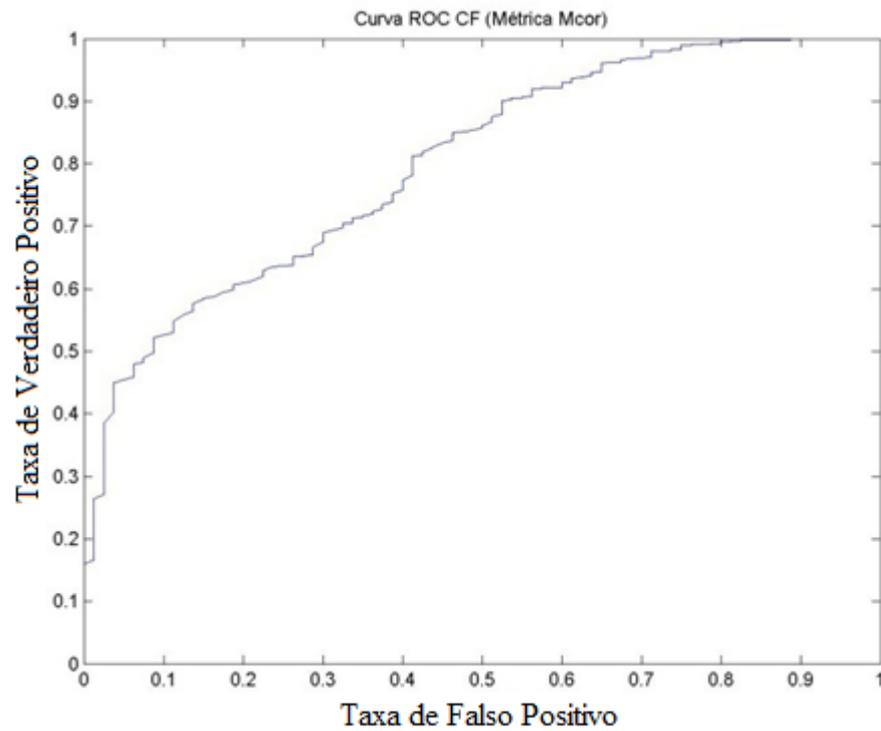
Métrica	AUC	TVP	TVN	TFN	TFP
Mbrenner	0,64	0,50	0,50	0,50	0,50
Mcor	0,64	0,50	0,50	0,50	0,50
Mcordesv	0,53	0,50	0,50	0,50	0,50
Mentrop	0,65	0,52	0,53	0,48	0,47
Mlap	0,51	0,50	0,50	0,50	0,50
Mlog	0,45	0,48	0,48	0,52	0,52
Mvar	0,65	0,56	0,55	0,44	0,45
Mvarnorm	0,64	0,50	0,51	0,50	0,49

Nessa análise inicial, as melhores métricas para o grupo CF foram a AUCorrelação (Mcor) e a Brenner (Mbrenner), com valores de AUC, respectivamente, de 0,80 e 0,75. Na Figura 27, podemos observar as curvas ROC dessas duas métricas para o grupo CF.



(a)

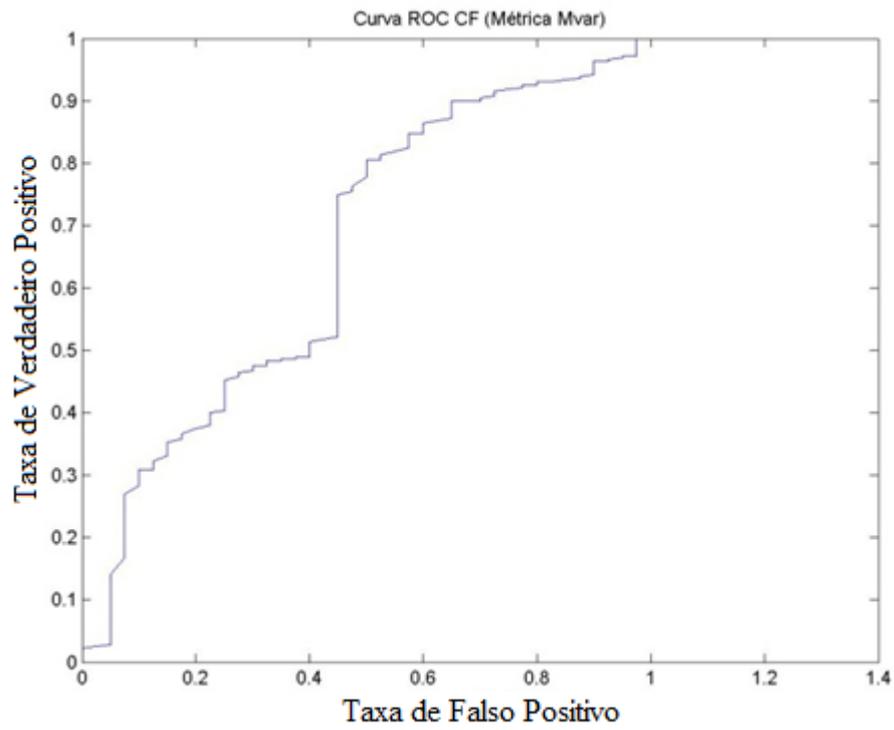
Figura 27 – Curvas ROC para o grupo CF (a) métrica Mbrenner (b) métrica Mcor



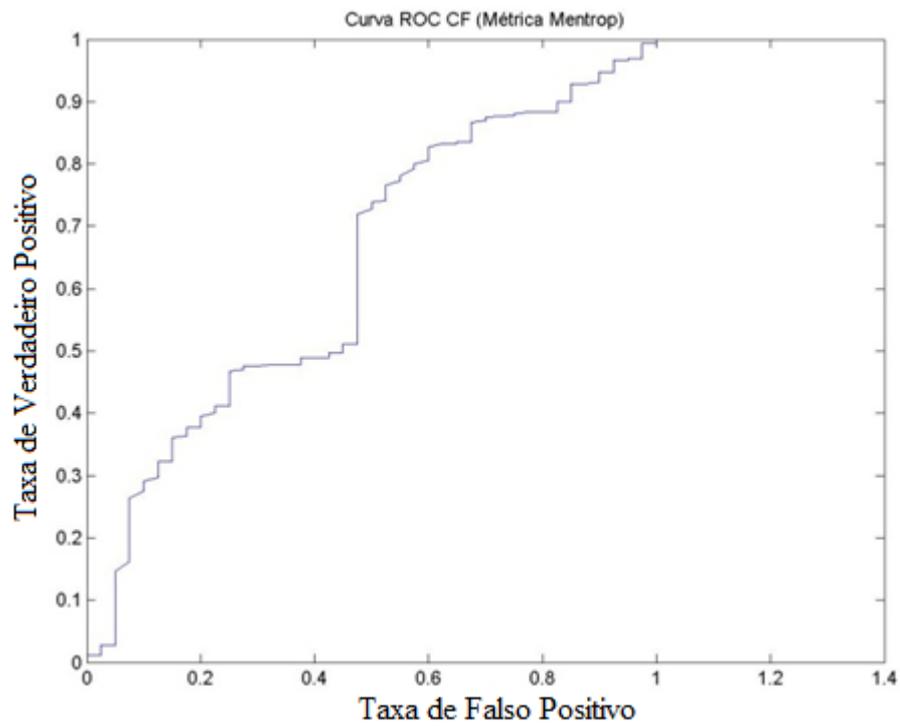
(b)

Figura 27- (continuação) Curvas ROC para o grupo CF (a) métrica Mbrenner (b) métrica Mcor

Já para o Grupo SF, as duas métricas que obtiveram a maior área sob a curva, foram as métricas Variância (Mvar) e Entropia (Mentrop). A Figura 28 mostra as curvas ROC das métricas Mvar e Mentrop para o grupo SF.



(a)



(b)

Figura 28 - Curvas ROC para o grupo SF (a) métrica Mvar (b) métrica Mentrop

Após a definição das duas melhores métricas para os grupos CF e SF correspondentes àquelas que apresentaram o maior valor de AUC, buscou-se avaliar se seria possível a obtenção de um valor de limiar único que pudesse ser utilizado para definir automaticamente se uma dada imagem está ou não em foco. Para tal, em uma primeira etapa a análise foi realizada no grupo de treinamento. Os valores de limiares identificados na primeira etapa foram aplicados ao grupo de teste.

4.5.1 Análise ROC: grupo de treinamento

Para a casuística de treinamento, as análises ROC relativas às duas melhores métricas identificadas no item anterior são apresentadas nas Tabelas 34 até 37. Nessas tabelas, o valor de limiar apresentado corresponde ao valor que resulta no ponto da curva ROC que apresenta a melhor combinação de (TVP, TFP), ou seja, o ponto mais a esquerda (menor valor de TFP) e mais alto (maior valor de TVP) da curva.

Tabela 34 – Sumário da análise ROC referente a métrica Brenner no grupo de treinamento CF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
CF	0,75	8488,96	0,70	0,30
CFA	0,83	8587,75	0,70	0,30
CFAAD	0,94	11184,12	0,85	0,15
CFABD	0,91	8041,20	0,80	0,20
CFB	0,68	8452,55	0,68	0,32
CFBAD	0,75	8280,30	0,62	0,38
CFBBD	0,68	8766,41	0,55	0,45

Tabela 35 – Sumário da análise ROC referente a métrica Correlação no grupo de treinamento CF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
CF	0,80	2346,22	0,70	0,30
CFA	0,89	2418,87	0,83	0,17
CFAAD	0,91	2418,87	0,85	0,14
CFABD	0,87	2420,81	0,80	0,19
CFB	0,77	2314,97	0,73	0,27
CFBAD	0,89	2302,81	0,80	0,18
CFBBD	0,71	2358,62	0,60	0,39

Tabela 36 - Sumário da análise ROC referente a métrica Entropia no grupo de treinamento SF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
SF	0,63	5,60	0,53	0,47
SFAD	0,75	5,72	0,65	0,35
SFBD	0,75	5,23	0,70	0,30

Tabela 37 - Sumário da análise ROC referente a métrica Variância Normalizada no grupo de treinamento SF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
SF	0,65	14053,02	0,55	0,45
SFAD	0,80	16462,47	0,63	0,37
SFBD	0,74	8150,93	0,70	0,30

4.5.2 Análise ROC: grupo de teste

Identificados os valores de limiares esses foram aplicados ao grupo de teste com o fim de avaliar o desempenho das métricas. O resultado é apresentado nas Tabela 38 a 40.

Tabela 38 – Sumário da análise ROC referente a métrica Brenner no grupo de teste CF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
CF	0,75	8488,97	0,90	0,10
CFA	0,83	8587,75	0,95	0,05
CFAAD	0,94	11184,12	0,00	1,00
CFABD	0,91	8041,20	1,00	0,00
CFB	0,68	8452,56	0,85	0,15
CFBAD	0,75	8280,30	0,90	0,10
CFBBD	0,68	8766,41	1,00	0,00

Tabela 39 – Sumário da análise ROC referente a métrica Correlação no grupo de teste CF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
CF	0,80	2346,22	0,63	0,28
CFA	0,89	2418,87	0,60	0,25
CFAAD	0,91	2418,87	1,00	0,40
CFABD	0,87	2420,81	0,20	0,10
CFB	0,77	2314,97	0,70	0,29
CFBAD	0,89	2302,81	0,60	0,11
CFBBD	0,71	2358,62	0,90	0,22

Tabela 40 - Sumário da análise ROC referente a métrica Entropia no grupo de teste SF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
SF	0,63	5,60	0,30	0,70
SFAD	0,75	5,71	0,30	0,70
SFBD	0,74	5,22	1,00	0,00

Tabela 41 – Sumário da análise ROC referente a métrica Variância Normalizada no grupo de teste SF

Grupo	AUC	Limiar	TVP	TFP
SF	0,65	14053,02	0,35	0,65
SFAD	0,80	16462,47	0,50	0,50
SFBD	0,74	8150,93	1,00	0,00

ANÁLISE DE RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, as métricas de autofoco foram avaliadas com o objetivo de selecionar a melhor métrica para aplicações de autofoco em imagens de microscopia convencional (campo claro) provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*. Objetivou-se também avaliar a possibilidade de identificação de uma métrica e um correspondente valor de limiar de decisão se uma dada imagem de baciloscopia está ou não em foco.

Conforme já mencionado anteriormente, o autofoco é a primeira etapa para a microscopia automática, uma vez que a qualidade do foco da imagem influi diretamente na qualidade da automação em imagens de microscopia. A escolha da utilização de microscopia de campo claro se deve ao fato desse tipo de microscopia ser amplamente utilizada na rede pública de saúde no Brasil.

Após definir as nove métricas de autofoco, fez-se necessário o uso de uma ferramenta capaz de avaliar e selecionar a métrica ideal para a aplicação proposta no trabalho. A análise semiquantitativa foi inicialmente escolhida devido a sua maior utilização na literatura. Essa visa tão somente ordenar as métricas em relação aos cinco critérios selecionados. Para visualizar a limitação dessa análise, supõe-se um exemplo em que há somente três métricas chamadas de M1, M2 e M3; um só critério, no caso a “acurácia”, em dois grupos de imagens fictícios: G1 e G2. Geram-se hipoteticamente tabelas com resultados para medir o desempenho da análise semiquantitativas, vide tabela 42.

Tabela 42 - Resultados hipotéticos da Análise Semiquantitativa

G1	Acurácia	Pont	G2	Acurácia	Pont	G 1 e G2	Acurácia	Pont
M1	1	1	M1	1	1	M1	2	2
M2	5	3	M2	4	2	M2	9	5
M3	4	2	M3	6	3	M3	10	5

Ao observar a Tabela 42, verifica-se que no grupo G1 a métrica M1 no critério acurácia apresentou um erro de um passo do valor ideal. Em seguida, observa-se uma segunda métrica, que apresentou um erro de quatro passos. Por último, há uma terceira cujo erro de

acurácia equivale a cinco passos. Utilizando a análise semiquantitativa, o resultado seria, 1º: M1, 2º: M3 e 3º: M2. Porém a informação referente ao valor de quantos passos cada uma das três métricas divergiram da posição ideal de foco é perdida na análise.

No grupo G2 é realizada a mesma ordenação. O resultado final é proveniente da soma das pontuações dos grupos G1 e G2. Nesse resultado, observa-se que a métrica M1 ficou em primeiro lugar com 2 pontos e as métricas M2 e M3 ficaram empatadas, ambas com 5 pontos. Porém, se observarmos os valores da discrepância dos passos nos dois grupos, fica claro que a métrica M3 possui um desempenho inferior à métrica M2. Mesmo sabendo que a análise encontrou a melhor métrica de foco, essa pequena simulação é suficiente para questionar o quanto precisa é a análise semiquantitativa.

Após obter todos os resultados em relação aos seis grupos definidos na casuística, utilizando a análise semiquantitativa, foi necessário realizar uma nova análise, a quantitativa, nos seis grupos com o objetivo de confirmar os resultados obtidos na análise semiquantitativa. Conforme já mencionado, a principal vantagem dessa análise é a disponibilização de um resultado absoluto do desempenho das métricas de autofoco. Assim, a melhor métrica selecionada é a que apresenta um conjunto de critérios ótimos, que redundam em uma curva de foco próxima da curva ideal. A escolha da métrica a partir do desempenho dos cinco critérios é importante para futuras aplicações, como a busca sistemática da imagem em foco do eixo Z, que seria o segundo passo para a automatização do foco.

A partir dos resultados das análises semiquantitativas e quantitativas apresentados nas seções 4.1 e 4.2, verifica-se que a quantidade de bacilos não interfere diretamente na definição das métricas de auto foco, visto que os estudos comparativos entre os grupos de imagens: CFAAD versus CFABD, CFBAD versus CFBBDD e SFAB versus SFBD, as métricas de melhor desempenho identificadas foram as mesmas (tanto nos grupos com alta quantidade de bacilos quanto no grupo de baixa quantidade de bacilo). Isso ocorre face aos bacilos (mesmo em imagens com alta densidade deles) ocuparem uma área muito pequena em relação ao tamanho da imagem (2816x2112 pixels). Em outras palavras, o grau de enfermidade do paciente e portanto, o número de bacilos presente na amostra não influencia no foco da imagem.

Em seguida, buscou-se determinar a melhor métrica para imagens com alta e baixa densidade de conteúdo em imagens com fundo azul de metileno. Observando a Tabela 18 da análise quantitativa, verifica-se que para o grupo de imagens com alta densidade, a melhor métrica foi a baseada em Variância (Mvar). Já para imagens com baixa densidade como mostrado na Tabela 22, a melhor métrica foi baseada na Entropia (Mentrop). Considerando o

princípio dessas métricas, o resultado se torna coerente. Ruídos e bordas (componentes de alta frequência) presentes em imagens com alta densidade de conteúdo produzem altos valores de Variância (Mvar). Em se tratando de imagens com fundo uniforme ou com baixa densidade de conteúdo, métricas que caracterizam o foco dessas imagens através de uma medida da distribuição de níveis de cinza são mais adequadas, como é o caso da Entropia.

Esse resultado nos levou a acreditar que seria necessário desenvolver um algoritmo baseado em textura com o objetivo de realizar uma separação inicial para determinar o grau de densidade das imagens para uma futura automação. Dessa forma, dependendo do grau de densidade, seria utilizado a métrica baseada em Variância (Mvar) ou Entropia (Mentrop). No entanto, ao se fazer nova análise dos resultados das Tabela 18 e 22, percebemos que as métricas Variância e Entropia, independente do grupo de imagem, sempre se apresentaram como as melhores métricas. Procurando generalizar o resultado e determinar somente uma métrica para a aplicação geral de microscopia de tuberculose, foi realizada a análise das métricas em todas as imagens simultaneamente, independente do grau de densidade. Os resultados podem ser observados na Tabela 13 para análise semiquantitativa, e na Tabela 24 para análise quantitativa.

As tabelas mostram que as melhores métricas são baseadas em Variância (Mvar), seguida pela Entropia (Mentrop). A definição da Variância (Mvar) como melhor métrica para a aplicação consiste no fato de que, dos cinco critérios estudados, essa apresentou melhor desempenho em três deles (acurácia, faixa, quantidade de picos), só perdendo em tempo de processamento e largura de pico.

Para imagens de microscopia convencional (campo claro) sem a utilização do contra corante azul de metileno, foram realizadas a análise semiquantitativa e quantitativa das métricas. O resultado obtido mostra que a métrica baseada em Entropia (Mentrop) foi selecionada como sendo a melhor para esse tipo de imagem, que apresenta como características o fundo mais uniforme, semelhantes às imagens obtidas com baixa densidade de conteúdo. A definição dessa métrica para esse grupo de imagens será utilizada para futuras aplicações na automação da contagem dos bacilos de tuberculose.

A validação dos resultados foi obtida com nova rodada de análises, desta feita com nova casuística (grupo de teste). As Tabela 29 e 30 mostram os resultados ordenados e nelas confirmam-se a definição das duas métricas.

A validade das análises realizadas pode ser reforçada pelo fato da Variância (Mvar), independente da aplicação, ser amplamente usada na literatura (FORERO *et al* 2005, SUN *et al* 2004, SANTOS *et al* 1997 e FIRESTONE *et al* 1990).

O único trabalho na literatura sobre auto foco em imagens de microscopia de tuberculose em campo claro foi o de Russell *et al.* (2007). Nesse trabalho, três métricas foram utilizadas: métricas baseadas em Energia do Laplaciano (Mlap), Variância do Logaritmo do Histograma (Mlog) e o Operador Gaussiano de Primeira Ordem (Mderivgaus). Para a determinação da melhor métrica, o autor realiza uma análise levando em consideração o tempo de processamento e comportamento da curva de foco. Dessa análise, a melhor métrica encontrada foi a Energia do Laplaciano (Mlapl), que obteve as melhores curvas de foco e o melhor tempo de processamento.

O presente trabalho foi mais abrangente, pois realizou a análise para 9 (nove) métricas de auto foco, entre elas a Energia do Laplaciano (Mlapl) e a Variância de Logaritmo do Histograma (Mlog) também utilizadas por Russel *et al.* (2007). Adicionalmente, as avaliações realizadas foram mais abrangentes (análises semiquantitativa e quantitativa e análise ROC).

Ao se comparar os resultados de tempo de processamento com os dados da literatura, o *hardware* e o tamanho das imagens devem ser considerados, porém como na maioria dos artigos não especifica o *hardware* utilizado a comparação foi somente através do tamanho da imagem. No presente trabalho foram utilizadas imagens de resolução espacial de 2816x2112 pixels. No artigo de Russel *et al.* (2007) não é comentado o tamanho das imagens e as métricas são processadas em 20- 30 segundos. Já no artigo de Yun *et al.* (2004), a resolução espacial é de 640x494 pixels e o tempo para cada métrica foi de 0,3 segundos. Em proporção linear, se o tamanho da imagem fosse de 2816x2112 pixels o tempo seria em torno de 5,6 segundos. No trabalho de Santos *et al.* (1997), os tempos das métricas variam de 1,02 a 3 segundos, para imagens com resolução espacial de 672x519 pixels. No trabalho de Firestone *et al.* (1990), a resolução espacial é de 64x64 pixels e o tempo de processamento é de 0,15 a 0,20 segundos. Proporcionalmente, se as imagens tivessem a resolução de 2816x2112 pixels, o tempo de processamento variaria de 217,8 a 290,8 segundos.

Comparando os resultados de tempo de processamento da Tabela 31 na seção de resultados com os encontrados na literatura, concluímos que, excluindo a métrica baseada em *wavelet*, todas as outras métricas utilizadas no presente trabalho obtiveram um desempenho melhor do que encontrado na literatura.

A avaliação da possibilidade de identificação de uma métrica e um correspondente valor de limiar de decisão se uma dada imagem de baciloscopia está ou não em foco foi realizada através da análise ROC. As métricas selecionadas na análise foram a Autocorrelação (Mcor) e a Brenner (Mbrenner) para o grupo com fundo, e as métricas Variância (Mvar) e

Entropia (Mentrop) para os grupos sem fundo. Esse resultado é devido ao fato da análise de ROC somente visar o critério acurácia, ou seja, a capacidade da métrica de encontrar a imagem em foco. Após a definição dessas quatro métricas, buscou-se um limiar para cada uma delas relacionados com os melhores pontos de sensibilidade e especificidade das mesmas. Esses limiares foram testados nos grupos de treinamento e de teste.

Ao analisar os resultados obtidos e apresentados nas Tabela 34, 35, 36 e 37, verifica-se que a busca de um limiar generalizado, para definir se as imagens estavam em foco ou não, mostrou-se ineficaz. Credita-se tal resultado ao fato de que para uma mesma lâmina, os campos escolhidos para a aquisição das imagens possuem características muito distintas entre si.

Em relação ao *Hardware* do ambiente de aquisição, verificou-se que, devido ao fato do microscópio utilizado no desenvolvimento do trabalho, não ser equipado com um controlador de posições conectado ao computador, não foi possível desenvolver um algoritmo de busca para encontrar o ponto de foco no eixo Z.

Outra limitação pertinente é o fato de que, na etapa de aquisição das imagens, a seleção dos campos nas lâminas foi realizada de forma manual, ou seja, cada campo da imagem foi selecionado por um especialista que classificava o campo em relação à sua densidade de conteúdo e quantidade de bacilo. Devido à metodologia adotada, o tempo de aquisição das 1800 imagens foi relativamente maior que o esperado.

CONCLUSÃO

O trabalho realizado tem como contribuição a elucidação do tema autofoco em imagens de baciloscopia de tuberculose de campo claro. A casuística definida no trabalho tem como diferencial do encontrado na literatura o fato de englobar todas as variações possíveis (densidades de fundo e a quantidade de bacilos) que podem aparecer na preparação das lâminas de tuberculose. Através da utilização dessas variações foi possível definir com uma maior confiabilidade qual a melhor métrica de autofoco. A utilização das nove melhores métricas encontradas na literatura sobre o tema autofoco e validação dessas através de cinco critérios e duas análises também foi um diferencial do trabalho, pois na literatura somente um autor analisou imagens de baciloscopia de tuberculose de campo claro e esse somente analisou três métricas e dois critérios (comportamento qualitativo da curva de foco e tempo de processamento) sem considerar as variações das características das lâminas.

Observou-se no decorrer do trabalho que a análise quantitativa tem como característica ser mais completa e confiável em relação à análise semiquantitativa.

As principais contribuições do presente trabalho são:

- 1) A quantidade de bacilos não influencia a seleção da melhor métrica para aplicações de auto foco em imagens de microscopia convencional (campo claro) provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*;
- 2) A métrica que obteve o melhor desempenho nas análises semiquantitativas e quantitativas para aplicações de auto foco em imagens de microscopia convencional (campo claro), provenientes de lâminas preparadas segundo o método de coloração de *Kinyoun*, é a baseada em Variância;
- 3) A melhor métrica para imagens de baciloscopia de tuberculose proveniente de microscopia convencional (campo claro) sem a etapa final de coloração de azul de metileno é a baseada em Entropia;

- 4) Não foi possível a identificação de uma métrica e um correspondente valor de limiar de decisão se uma dada imagem de baciloscopia está ou não em foco.

Para a continuidade dos trabalhos na área, recomenda-se a utilização de um microscópio com controlador de posição e, assim, com o conhecimento da métrica mais adequada, se possa implementar um método automático que identifique a posição no eixo Z que produz a imagem em foco, sem a necessidade do cálculo da métrica (a métrica previamente identificada como a melhor) em todos os pontos do eixo Z. Esse protótipo deve ser acoplado aos métodos já existentes de contagem automática de bacilos, como o de Costa *et al.*(2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 7. ed. – Brasília :Ministério da Saúde, 2009.

BRENNER, J. F. *et al.*, **An automated microscope for cytologic research**, *J. Histochem. Cytochem*, Vol. 24, p. 100-111, 1971.

COSTA, M. G. F., **Detecção e classificação automática de lesões em cintilografias de mama com MIBI -^{99m}TC usando um filtro de novidade**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, 1996.

COSTA, M. G. F. *et al.*, **Automatic identification of mycobacterium tuberculosis with conventional light microscopy**. In the 30th Annual International IEEE EMBS Conference Vancouver, British Columbia, Agosto, p. 382-385, 2008.

CROFT, W.J. **Under the Microscope: A Brief History of Microscopy**. World Scientific Publishing Company, 2006.

DAUBECHIES, I. **Ten lectures on wavelets**. CBMS-NSF conference series in applied mathematics. SIAM ed. 1992

FIRESTONE, L. *et al.* **Comparison of autofocus methods for automated microscopy**. *Cytometry*, Vol. 12, p.195-206, 1991.

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

GEUSEBROEK, J. *et al.* **Robust autofocus in microscopy**. *Cytometry*, Vol. 39, p. 1-9, 2000.

GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, R. E. ***Digital Image Processing***. New Jersey: Prentice Hall Inc, 2008.

GROEN, F.; YOUNG, I.T.; LIGTHART, G. **A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms**. *Cytometry*, Vol. 12, p. 81-91, 1985.

HILSENSTEIN, V. **Robust Autofocusing for Automated Microscopy Imaging of Fluorescently Labelled Bacteria**. CSIRO Mathematical and Information Sciences. Proceedings of the Digital Imaging Computing: Techniques and Applications, 2005.

KAUTSKY, J; FLUSSER, J. **A new wavelet-based measure of image focus**. *Pattern Recognition Letters* , Vol. 23, p. 1785-94, 2002.

LEVINO, A.; MARTINS, R. **Tuberculose na População Indígena de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil**. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Vol.23, n. 7, p. 1728-1732, Julho 2007.

MACHADO FILHO, A. C. **Incidência da tuberculose em indígenas do município de São Gabriel da Cachoeira, AM**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Julho, p. 243-246, 2008.

MALLAT, S. **A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation**. *IEEE Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 11, no.7, pp. 674-693, 1989.

MASON, D.C.; GRENN D.K. **Automatic focusing of a computer controlled microscope**. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering BME*, Vol 22, p. 312-317, 1975.

MENDELSON, M.L.; MAYALL B.H. **Computer-oriented analysis of human chromosomes**. *Computers in Biology and Medicine* Vol 2, p. 137--150, 1972

PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V.; **Tuberculosis 2007 -From basic science to patient care**, 2007. Disponível em: <http://www.tuberculosisistextbook.com>. Consultado em fevereiro de 2009.

RUSSELL, M. J.; DOUGLAS, T. S. **Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy**. Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, p. 23-26, 2007.

SANTOS, A.; ORTIZ-SOLORZANO, C.; VAQUERO, J.; MALPICA, N.; POZO, F. DEL **Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis**. Journal of Microscopy, Vol. 188, p. 264–72, 1997.

SLABY, A. **ROC Analysis with Matlab**. 29th International Conference on Information Technology Interfaces, Junho 2007.

STEINGART, R. K. *et al.*, **Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review**, Lancet Infect Disease Vol 6, p. 570–81, 2006.

STEGER, C. **An unbiased detector of curvilinear structures**, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machines Intelligence, Vol. 20, p. 113-125, 1998.

SUBARAO, M; TYAN, J. **Selecting the optimal focus measure for autofocusing and depth-from-focus**. IEEE Transactions of Pattern Analysis and Machine Intelligence. Vol. 20, p. 864-70, 1998.

SUN, Y.; DUTHALER, S.; NELSON, B.J. **Autofocusing in computer microscopy: Selecting the optimal focus algorithm**. Microscopy Research and Technique. Vol. 65, p.139–149, 2004.

TUMOIAN, E. P., *et al.* **Neurocomputer processing of the images in the task of tuberculosis contagions identification: Neural information processing**, Moscow, Rússia, Vol. 4, p.18-22. 2001

VEROPOULOS, K., *et al.* **The Automated Identification of Tubercle Bacilli using Image Processing and Neural Computing Techniques.** Proceedings of the 8th International Conference on Artificial Neural Networks (ICANN98) Skövde, Sweden. Vol. 2, p. 797-802. 2-4 September 1998.

VIEIRA, F. D. **Análise de uma metodologia para caracterização de proficiência de leitores de baciloscopia para a Tuberculose.** Manaus: UFAM, 2005. 113p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005.

VIEIRA, F. D.; SALEM, J. I., *et al.* **Metodologia para caracterização de proficiência em leitura de resultados baciloscópicos para o diagnóstico da tuberculose.** Jornal Brasileiro de Pneumologia. Vol. 34, p. 304-311, 2008.

VOLLATH, D. **Automatic focusing by autocorrelative methods.** Journal of Microscopy , Vol 147, p. 279–88, 1987.

WHO - World Health Organization. **Global Health Atlas**, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/globalatlas/>. Consultado em 23 de novembro de 2009.

YEO, T.; JAYASOORIAH, S.O.; SINNIAH, R. **Autofocusing for tissue microscopy**, Image Vision Computer., Vol. 11, p. 629-639, 1993.

APÊNDICE

Evaluation of autofocus functions of conventional sputum smear microscopy for tuberculosis

Almir Kimura Junior, Marly G. F. Costa, Cicero F. F. Costa Filho, Luciana B.M.Fujimoto, Julia Salem

Abstract— This article presents a systematic analysis of focus functions in conventional sputum smear microscopy for tuberculosis. This is the first step in the development of automatic microscopy. Nine autofocus functions are analyzed in a set of 1200 images with varying degrees of content density. These functions were evaluated using quantitative procedures. The main accomplishment of this work was to show that an autofocus function based on variance measures produced the best results for tuberculosis images.

I. INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is an infectious bacterial disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, typically affecting the lungs. It is transmitted from person to person via air-borne droplets from the throat and lungs of people with the active respiratory disease. Most tuberculosis cases occur in developing or moderately developed nations, where sputum microscopy with a conventional light microscope is the primary method for diagnosing pulmonary tuberculosis [1]. Manual identification and counting of TB bacilli is tiring and time-consuming, and requires a trained operator and, presents a high false-negative rate. To reduce this rate and speed up the process, automation of screening is necessary [2].

We found several automatic systems for identifying TB in the literature. However most were designed for fluorescence microscopy of auramine-stained sputum specimens [2,3]. The only work for light microscopy was developed by Costa et al [4]. The quality and complexity of the images is the main problem for automation in conventional light microscopy.

An essential and critical step in automatic microscopy is focusing. Determining the optimal focus in an optical

microscope is based on a mathematical function that is applied to images acquired from the same field with different focuses. The maximum value of the function corresponds to the point of optimal focus. Many autofocus functions have been proposed in the literature [5]-[11]. Despite the variety of focus functions, there is no solution generally applicable for microscopy [5]. In the case of sputum smear microscopy for tuberculosis, only Russel et al [12] analyzed the autofocus in conventional sputum smear microscopy; however, only three autofocus functions were analyzed. The aim of our work is to contribute to Costa et al [4] who accomplished automatic detection of bacilli in conventional sputum smear microscopy presupposing that the image was in focus. In this paper, we present the systematic evaluation of the nine most efficient and used focus function methods published in the literature. We applied these nine functions in conventional sputum smear microscopy for tuberculosis stained with the Kinyoun method. The focus function performance is analyzed and an overall ranking was obtained.

II. MATERIALS AND METHODS

The acquisition of the images was accomplished at the *Micobacteriologia* Laboratory of National Research Institute of the Amazonian- INPA. For the development of the proposed work, an acquisition station was set up (a digital camera, a light microscope and a computer). The digital camera used in this work was a Canon PowerShot A640, which couples a 10-megapixel CCD imager sensor with a 4x optical zoom. We set up the spatial resolution to 2816 x 2112 pixels. The microscope used was a Zeiss Axioshop 40 with a magnification of 100x and numerical aperture of 1.25. The PC used had a core 2 duo 2.0 GHz with 3GB RAM.

The sputum samples from patients suspected of pulmonary TB cases were prepared by the Kinyoun stain method.

Three groups of images were created: the first group of images was acquired from fields of slides stained with the standard Kinyoun method, featuring high density of background content. In contrast to the first, the images of the second group were taken from fields of slides with low density background content, and in the third group images were acquired from fields of slides stained with the modified Kinyoun method, without being counterstained with methylene blue solution. These groups were created with the aim of identifying the influence of the density of background content and the absence of a counterstain in the focus of the image.

Figure 1 shows examples of images from three groups

Manuscript received March, 31, 2010. This work was supported by Technology Development & Research Center – CETELI/UFAM and CAPES.

A. Kimura Jr is with *Universidade Federal do Amazonas/Centro de P&D em Tecnologia Eletrônica e da Informação* – UFAM/CETELI. Manaus, Amazonas, Brasil (tel: +55 92 8414 1406; e-mail: akimurajr@gmail.com).

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

C. F. F. Costa Filho is with *Universidade Federal do Amazonas/Centro de P&D em Tecnologia Eletrônica e da Informação* – UFAM/CETELI. Manaus, Amazonas, Brasil (tel: +55 92 91464954; e-mail: ccosta@ufam.edu.br).

L. B. M. Fujimoto is with *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA*. Manaus, Amazonas, Brasil (e-mail: olfujimoto@vivax.com.br)

J. Salem is with *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA*, Manaus, Amazonas, Brasil (e-mail: salem@inpa.gov.br)

used in the experiment.

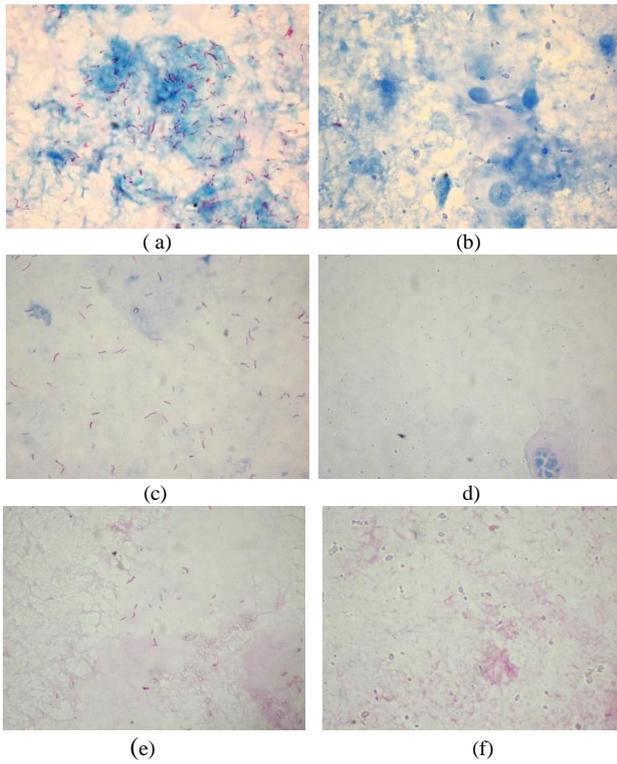


Fig. 1. Examples of microscopy images from: (a) and (b) first group, (c) and (d) second group, (e) and (f) third group

Each group contained 4 slides. From each slide, 10 fields were selected, and from each field 10 samples were acquired with different focal lengths. The focal length step was 2.5 μm . The ten samples acquired from one field constitute one set of images. A trained operator found the sample in focus. We set the sample in focus at image five, and the sharpness decreased moving in the direction toward images one and ten. The total image sets for the experiment was 120 (40 per group) totaling 1200 images.

I. AUTOFOCUS FUNCTIONS

The autofocus function applied to an image results in a mathematical value that shows the degree of focus for each image of the same sample. The best behavior an autofocus function should display is when a maximum value is at the best-focused image position and decreases monotonically as defocus increases. Another attribute that the autofocus function should have is to quantify the contrast and high frequency components of an image. The nine autofocus functions used in this work can be classified into three groups: Derivative-Based, Statistics-Based, and Histogram-Based Functions.

To simplify the nomenclature used in all functions $g(i, j)$ represents the gray level intensity of pixel (i, j) .

A. Derivative-Based Functions

Functions based on a derivative assume that images in focus have more high-frequency content than defocused images. These functions are sensitive to high-frequency noise. To obtain a derivative-based measure, the image is convolved with the focus measure mask (FMM).

- 1) Brenner gradient [9]: This function computes the first difference between a pixel and its neighbor with a distance of 2.

$$AF1 = \sum_i \sum_j |g(i, j + 2) - g(i, j)|^2 \quad (1)$$

while $|g(i, j + 1) - g(i, j)| \geq \theta(\text{threshold value})$.

- 2) Energy Laplace [3]: This function implements the image convolution with Laplace mask.

$$AF2 = \sum_{i,j} (g(i - 1, j) + g(i + 1, j) + g(i, j - 1) + g(i, j + 1) - 4g(i, j))^2 \quad (2)$$

- 3) Wavelet Transformation [8]: is based on discrete wavelet transformation. The more focused the image, the larger the function. The wavelet focus function calculates the energy in low and high pass bands.

$$AF3 = \frac{\|h_w(f)\|}{\|l_w(f)\|} \quad (3)$$

where $h_w(f)$ is the discrete Wavelet transformation in high pass band, and $l_w(f)$ is the discrete Wavelet transformation in the low pass band.

B. Statistics-Based Functions

Statistics-Based Functions use features such as variance and standard variation to calculate how well focused the image is. Generally Statistics-based functions are less sensitive to noise than derivative-based functions.

- 1) Variance [6]: This function measures the variations in the gray level among the image pixels. In this measure, bright and dark pixels have the same influence.

$$AF4 = \frac{1}{MN} \sum_{i,j} (g(i, j) - \bar{g})^2 \quad (4)$$

where \bar{g} is the mean gray level value g , and M and N are the length and width of the image, respectively.

- 2) Normalized Variance [6]: By normalizing the function with the \bar{g} , this function compensates for the differences in image brightness among different images.

$$AF5 = \frac{1}{MN\bar{g}} \sum_{i,j} (g(i, j) - \bar{g})^2 \quad (5)$$

- 3) Autocorrelation [7]: This function together with the standard-deviation based correlation performs well in the presence of noise.

$$AF6 = \sum_{i,j} g(i, j)g(i + 1, j) - \sum_{i,j} g(i, j)g(i + 2, j) \quad (6)$$

respectively.

TABLE IV
GLOBAL RESULTS OF QUANTITATIVE ANALYSIS FOR GROUP 1

Function	Accuracy	Range	False max	Width	Global Score
AF4	4.08	4.41	4.11	59.45	18.01
AF5	4.06	4.16	4.07	59.88	18.04
AF8	5.10	4.60	5.53	60.25	18.87
AF6	4.94	4.65	5.65	64.51	19.94
AF1	4.85	4.79	5.49	65.25	20.10
AF7	7.33	6.31	5.85	65.06	21.14
AF3	6.52	6.83	7.03	65.20	21.40
AF2	6.02	7.16	7.17	65.97	21.58
AF9	8.96	8.92	7.67	65.69	22.81

TABLE V
GLOBAL RESULTS OF QUANTITATIVE ANALYSIS FOR GROUP 2

Function	Accuracy	Range	False max	Width	Global Score
AF8	4.89	5.27	5.64	59.55	18.84
AF4	5.11	5.22	3.77	62.27	19.09
AF5	4.74	5.56	4.25	61.88	19.11
AF1	5.43	5.78	6.83	64.34	20.59
AF3	6.59	5.62	5.61	64.69	20.63
AF9	5.79	6.39	7.97	62.72	20.72
AF6	4.70	6.80	5.67	66.08	20.81
AF2	7.73	6.87	5.78	64.98	21.34
AF7	7.70	5.89	6.99	64.97	21.39

TABLE VI
GLOBAL RESULTS OF QUANTITATIVE ANALYSIS FOR GROUP 3

Function	Accuracy	Range	False max	Width	Global Score
AF8	4.59	5.77	6.21	58.13	18.67
AF5	4.92	5.31	4.82	59.69	18.69
AF4	5.05	5.89	4.90	59.87	18.93
AF6	5.39	5.55	4.79	63.76	19.87
AF1	5.66	5.78	5.81	64.32	20.39
AF9	7.59	6.32	6.89	63.33	21.03
AF2	6.46	6.84	5.92	66.60	21.45
AF7	6.82	6.21	6.91	66.92	21.72
AF3	6.51	5.85	6.88	68.31	21.89

Table VII shows the mean execution time of all autofocus functions.

TABLE VII
MEAN EXECUTION TIME OF ALL AUTOFOCUS FUNCTIONS

Function	AF1	AF2	AF3	AF4	AF5	AF6	AF7	AF8	AF9
Time (s)	1.20	0.96	106.5	0.66	0.68	1.10	0.81	0.03	0.03

I. DISCUSSION AND CONCLUSION

The semiquantitative analysis provides a list of focus functions ranked, according to the four criteria. Considering the autofocus function of group 1 and 2, it is clear that the function Variance (AF4) and Normalized Variance (AF5)

were consistently among the best function. The quantitative analysis provided an absolute indication of the adequacy of the focus function. From this analysis, in group 1, the best autofocus function was the Variance (AF4), and in group 2, it was Entropy (AF8) followed by Variance (AF4). Evaluating the results we can say that there is no significant influence on the density of background content in the definition of the best autofocus function. It can be concluded that the best function for sputum smear microscopy for tuberculosis is the Variance (AF4).

The definition of variance (AF4) as the best autofocus function is noteworthy because the only article found in the literature [12] regarding tuberculosis microscopy in a bright field did not use this function in the analysis.

Another conclusion drawn from the analysis is that for group 3, the best function is Entropy (AF8), since in the two analyses, this function performed best. This finding is important because these types of images present a uniform background, facilitating the future segmentation of the bacilli *Mycobacterium Tuberculosis*.

The fastest function was Entropy (AF8) and the slower function was the Wavelet Transformation (AF3). Table VII shows the mean execution time of all functions.

REFERENCES

- [1] K. R. Steingart, M. Henry, V. Ng, P. C. Hopewell, A. Ramsay, J. Cunningham, R. Urbanczik, M. Perkins, M. Abdel Aziz, Madhukar Pai. "Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review," *Lancet Infect Diseases*, vol. 6, pp. 570-81, 2006.
- [2] K. Veropoulos, G. Learmonth, C. Campbell, B. Knight, J. Simpson. "Automatic identification of tubercle bacilli in sputum. A preliminary investigation," *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, vol. 21, no. 4, pp. 277-281, August 1999.
- [3] M. G. Forero, G. Cristóbal, M. Desco, "Automatic identification of mycobacterium tuberculosis by Gaussian mixture models," *Journal of Microscopy*, vol. 223 (2), pp. 120-132, August 2006.
- [4] M. G. F. Costa, C. F. F. Costa Filho, J. F. Sena, J. Salen, M. O. Lima, "Automatic identification of mycobacterium tuberculosis with conventional light microscopy," in *Proceedings of the 30th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, Vancouver, British Columbia, Canada, 2008, pp. 382-385.
- [5] Y. Sun, S. Duthaler, B. J. Nelson, "Autofocusing in computer microscopy: selecting the optimal focus algorithm," *Microscopy Research and Technique*, vol. 65, pp. 139-149, 2004.
- [6] F. Groen, I. T. Young, G. Ligthart, "A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms," *Cytometry*, vol. 12, pp. 81-91, 1985.
- [7] D. Vollath, "Automatic focusing by correlative methods," *Journal of Microscopy*, vol. 147, pp. 279-288, 1987.
- [8] J. Kautsky, J. Flusser, B. Zitove, S. Simberova, "A new wavelet based measure of image focus," *Pattern Recognition Letters*, vol. 23, pp. 1785-94, 2002.
- [9] J. F. Brenner, B. S. Dew, J. B. Horton, J. B. King, P. W. Neirath, W. D. Sellers, "An automated microscope for cytologic research," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 24, pp. 100-111, 1971.
- [10] L. Firestone, K. Cook, K. Culp, N. Talsania, K. Preston Jr "Comparison of autofocus methods for automated microscopy," *Cytometry*, vol. 12, pp. 195-206, 1991.
- [11] A. Santos, C. O. Solórzano, J. J. Vaquero, J. M. Peña, N. Malpica, F. Pozo, "Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis," *Journal of Microscopy*, vol. 188, pp. 264-272, 1997.
- [12] M. J. Russell, T. S. Douglas, "Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy," in *Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, Cité Internationale, Lyon, France, 2007, pp. 23-26.

