

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ (UTFPR)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E
INFORMÁTICA INDUSTRIAL (CPGEI)

CLAUDIO ROBERTO MARQUETTO MAURICIO

**CONTADOR DE CÉLULAS VERMELHAS BASEADO EM
IMAGENS PARA MÚLTIPLAS ESPÉCIES DE ANIMAIS
SILVESTRES E DOMÉSTICOS**

Tese

Curitiba - PR
2017

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ (UTFPR)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E
INFORMÁTICA INDUSTRIAL (CPGEI)

TESE

apresentada à UTFPR para

OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

por

Claudio Roberto Marquette Mauricio

**Contador de células vermelhas baseado em imagens
para múltiplas espécies de animais silvestres e
domésticos**

Banca Examinadora

Presidência e Orientação

Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider

UTFPR

Examinadores:

Prof. Dra. Regina Kiomi Takahira

Unesp

Prof. Dra. Leonilda Correia dos Santos

Unioeste

Prof. Dr. João Alberto Fabro

UTFPR

Prof. Dr. Gilberto Branco

UTFPR

CURITIBA – PR

2017

CLAUDIO ROBERTO MARQUETTO MAURICIO

Contador de células vermelhas baseado em imagens para múltiplas espécies de animais silvestres e domésticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de “Doutor em Ciências” – Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson José da Silva

CURITIBA - PR
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M455c
2017

Mauricio, Claudio Roberto Marquette
Contador de células vermelhas baseado em imagens para
múltiplas espécies de animais silvestres e domésticos / Claudio
Roberto Marquette Mauricio.-- 2017.
92 f. : il. ; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês
Disponível também via World Wide Web
Tese (Doutorado) – Universidade Tecnológica Federal do Pa-
raná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e In-
formática Industrial, Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 77-81

1. Eritrócitos – Contagem. 2. Células sanguíneas – Contagem.
3. Processamento de imagens – Técnicas digitais. 4. Hemogra-
ma. 5. Animais – Exames médicos. 6. Animais silvestres – Exa-
mes médicos. 7. Engenharia elétrica – Teses. I. Schneider, Fábio
Kurt. II. Silva, Wilson José da. III. Universidade Tecnológica Fe-
deral do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 22 – 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

Título da Tese Nº. 153

Contador de Células Vermelhas Baseado em Imagens para Múltiplas Espécies de Animais Silvestres e Domésticos

por

Claudio Roberto Marquette Mauricio

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider (UTFPR)

Coorientador: Prof. Dr. Wilson José da Silva (UTFPR)

Esta tese foi apresentada como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: Engenharia Biomédica pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 09h do dia 31 de maio de 2017. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos doutores:

Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider
(Presidente – UTFPR)

Prof.^a Dr.^a Regina Kiomi Takahira
(Unesp - Botucatu)

Prof.^a Dr.^a Leonilda Correia dos Santos
(Unioeste)

Prof. Dr. Gilberto Branco
(UTFPR)

Prof. Dr. João Alberto Fabro
(UTFPR)

Visto da Coordenação:

Prof. Jean Carlos Cardozo da Silva, Dr.
(Coordenador do CPGEI)

“É obedecendo a esse princípio que os espíritos não livram o homem do trabalho de *pesquisar*, trazendo-lhe descobertas e invenções inteiramente feitas e prontas para serem produzidas, de maneira que ele só tivesse que pegar o que lhe pusessem nas mãos, sem ter a necessidade de se abaixar para apanhá-las e nem mesmo a de pensar. Se assim fosse, o mais preguiçoso poderia enriquecer, e o mais ignorante transformar-se em sábio, e tanto um como outro atribuiriam a si mesmos o mérito do que não fizeram. Não, os espíritos não vêm livrar o homem da lei do trabalho, mas mostrar-lhe o objetivo que deve alcançar e o caminho que a ele conduz, dizendo-lhe: Anda, e tu o atingirás. Encontrarás pedras sob os teus passos; olha, e afasta-as tu mesmo, nós te daremos a força necessária, se a quiseres empregar.”

E.S.E. Allan Kardec

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, Pai boníssimo que tem me abençoado diariamente com o dom da vida e me presenteado com todas as vidas ao meu redor. Pelas condições de crescimento que tem me ofertado todos os dias, algumas muito agradáveis e também pelas outras nem tanto.

Ao meu orientador, Professor Doutor Fábio Kurt Schneider, cuja orientação contribuiu muito para meu amadurecimento profissional e pessoal. Obrigado por não ter desistido de mim. A você Fábio, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores, Dra. Regina Kiomi Takahira, Dra. Leonilda Correia dos Santos, Dr. João Alberto Fabro e Dr. Gilberto Branco, pelo importantíssimo tempo que me ofertaram, sua atenção e pelas excelentes contribuições oferecidas ao trabalho.

À professora Doutora Regina Kiomi Takahira por todo o auxílio prestado em Botucatu. Durante uma semana inteira se dedicou integralmente para a contagem das amostras e captura das imagens, sempre atenciosa e gentil. Obrigado.

Aos professores João Alberto Fabro e Gilberto Branco pelos valiosos conselhos durante os anos do doutorado. Profissionais exemplares, humanos sensíveis, vocês me fortaleceram. Obrigado.

À professora Doutora Leonilda Correia dos Santos pelo amor à ciência e pelo entusiasmo pelos estudos interdisciplinares. Sua pesquisa deu origem ao meu trabalho de conclusão na graduação e hoje é tema central do meu doutorado. Que o brilho dos seus olhos ao discutir uma nova ideia nunca se apague. Muito obrigado.

Aos companheiros do doutorado, com os quais compartilhei os diversos desafios da pós. Um agradecimento especial ao Walter Duarte de Araújo que com sua alegria e disposição, me ajudou em alguns momentos difíceis e conquistou o posto de amigo. Um abraço seu Walter.

A UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Centro de Engenharias e Ciências Exatas, por permitirem meu afastamento para cursar o doutorado.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Unioeste, pela condução do afastamento para o doutorado. Em especial ao professor Doutor Silvio César Sampaio e Sônia Lemanski. A seriedade com que trataram o afastamento na instituição, aliada

à uma postura humana e interessada foram fundamentais para criar condições necessárias ao término do doutorado. Muito obrigado.

Aos amigos da UNIOESTE que me ampararam das mais variadas formas, para que o trabalho pudesse continuar. Que a nossa união possa continuar produzindo bons frutos para todos.

Aos professores Juan Carlos Sotuyo e Jorge Habib Hanna El Khouri, professores da minha graduação. Pessoas nas quais ainda hoje procuro me espelhar, pois sempre foram e ainda são, algo como mentores de minha vida profissional. O trabalho realizado por vocês, iniciado com a criação do curso de Ciência da Computação na Unioeste e desdobrado hoje em tantas outras iniciativas, permitiu que, não somente eu, mas também muitos outros, construíssemos nossas carreiras profissionais, guiados por uma postura ética, honrada e que não teme desafios.

Parabéns e obrigado aos dois!

Aos amigos pessoais que sempre estiveram na torcida. Perdoem-me a indisponibilidade de muitos momentos nos últimos anos, vocês mereciam mais, obrigado pela paciência. São muitos e para não correr o risco de esquecer ninguém agradeço a todos vocês. Obrigado Amigos.

Um agradecimento muito especial à minha família, que em todos os momentos, principalmente naqueles em que a esperança parecia desfalecer, foi recanto para reequilíbrio e fonte de coragem. À minha esposa, que esteve ao meu lado durante toda esta jornada, sempre me estimulando para o avanço do trabalho. Desde a primeira hora foi quem me incentivou a iniciar o doutorado. És, ainda mais, a musa inspiradora de meus passos, e nesta oportunidade um exemplo profissional para mim, pois além de esposa foi companheira de estudos no doutorado. Seu comprometimento e dedicação são exemplos que me inspiraram em muitos momentos, muito obrigado, o título também é seu. Aos meus filhos Stela, Sarah e João Guilherme, que em muitos momentos se viram privados de minha presença e melhor atenção, e mesmo assim mantiveram-se como geradores de alegria e paz em meu coração. Obrigado por suportarem a mudança de cidade e todas as dificuldades que enfrentamos juntos, que a doçura e alegria de suas almas não seja turvada por nada. Vocês são minhas melhores obras. À minha sogra e amiga Marilene, por abrir as portas de seu lar durante anos, facilitando nossa estadia em Curitiba. O que você fez por nós não tem preço, mas Deus saberá recompensar em seu coração. Suportaste bem de perto as nossas dificuldades, sempre encontrando maneiras de nos impulsionar. Você foi

fundamental, obrigado. Aos meus irmãos Márcia(tia Má), Marcio(tio Didi) e Carlos Renato (tio Nato), minhas cunhadas e cunhado Juliane, Michele, Juliane, Larissa, Paola e Joacir, meus sobrinhos Regina, Maiara, Júlia, Maria Luiza, Rennan, Melissa, Ana e Isadora. A todos meu muito obrigado, pois em seus pensamentos sempre estive a torcida e o carinho por mim. Ao “tio” e amigo Luiz Carlos e ao Diogo, pelas acolhidas em cada viagem para Florianópolis durante o mestrado, requisito fundamental para que eu pudesse cursar o doutorado. E por fim, aos meus pais Valentim e Alice, sempre preocupados e atenciosos, me incentivaram nesta jornada. Foram eles os primeiros, e mais importantes, professores de minha vida, as lições que deles recebi, possuem o maior valor de todos, pois me ensinaram a ser um homem de bem. Seu apoio e incentivo foram muito além do suporte moral, assumiram responsabilidades concretas junto de minha rotina e orçamento para permitir minha dedicação total aos estudos. Que a alegria do dever cumprido e do crescimento alcançado que carrego em meu coração seja sentida por todos vocês, o mérito é de todos nós.

Lista de Figuras

Figura 1- Câmara de Neubauer: formado por 9 quadrados de 1 mm ² de área e, portanto, tem 9 mm ² de superfície. A profundidade da câmara é de 0,1 mm. O volume total da câmara é de 0,9 mm ³ . Cada um dos nove quadrados é subdividido. Quatro quadrados são divididos em 16 partes resultando em partes de 1/16 do mm ² . O quadrado central é dividido em 25 partes medindo cada uma 1/25 do mm ² . Cada uma destas partes de 1/25 do mm ² por sua vez é dividida em outras 16 partes medindo 1/400 do mm ²	22
Figura 2 - Fotomicrografia de sangue de veado bororó em câmara de Neubauer.	23
Figura 3 - Convenção de eixos usados para representação de imagens digitais	26
Figura 4 - Cubo de cores RGB. Os pontos ao longo da diagonal principal têm valores de cinza, desde preto na origem até branco no ponto (1,1,1).	28
Figura 5 – Elementos estruturantes: (a) linha, (b) cruz e (c) diamante.	29
Figura 6 – Erosão por um EE em forma de diamante: (a) imagem original e (b) imagem resultante.	30
Figura 7 – Dilatação por um EE em forma de diamante: (a) imagem original e (b) imagem resultante.	31
Figura 8 – Microscópio Olympus BX-41 com câmera fotográfica digital Olympus DP12 acoplada ao mesmo.	35
Figura 9 – Microscópio Leica DMLS com câmera fotográfica Motic acoplada ao mesmo.	36
Figura 10 – Imagens adquiridas usando (a)F1 e (b)F2. (Sangue canino).	36
Figura 11 – Fotomicrografias de sangue de animais silvestres (200 X), (a) Quati, (b) Furão, (c) Capivara, (d) Veado Bororó, (e) Jaguatirica, (f) Cateto, (g) Gato Mourisco, (h) Macaco Prego. 200X	39
Figura 12 – Passos para captura das imagens no Foco 1 e no Foco 2.	40
Figura 13 - Amostra de sangue de macaco prego, recorte do quadrante 1A: (a) Foco 1; (b) Foco 2.	41
Figura 14 - Câmara de Neubauer.	42
Figura 15 - Retículo de Neubauer e regiões de interesse.	42
Figura 16 – O Microscópio e seus controles.	43
Figura 17 – Unidade de controle da Câmera Olympus DP-12.	44

Figura 18 – Telas de configuração da Câmera Olympus DP-12.....	45
Figura 19 – Marcas vermelhas identificam as células contadas com o software para contagem assistida por computador. 200X	48
Figura 20 – Região de interesse para contagem: (a) quadrante 3A; (b) quadrante 1B. 200X	49
Figura 21 – Etapas do algoritmo de contagem automática.....	50
Figura 22 – Elemento estruturante utilizado na Erosão e na Dilatação.	50
Figura 23 – Erosão: (a) Imagem no foco 1 e (b) Resultado da erosão. 200X	51
Figura 24 – Dilatação: (a) Imagem no foco 2 e (b) Resultado da dilatação. 200X	51
Figura 25 – Imagem Binária: (a) foco 1 e (b) foco 2.	52
Figura 26 – Lógica para classificação das regiões na contagem automática.	53
Figura 27 - Marcação das hemácias contadas: (a)“Macaco prego=63”; (b)“Quati=68”; (c) “Jaguaririca=109”. 200X.....	57
Figura 28 - Marcação das hemácias contadas: (a)“Macaco prego=104”; (b) ”Quati=126”; (c) ”Jaguaririca=163”. 200X.....	58
Figura 29 - Distribuição dos resultados: Contagens nos quadrantes internos.	59
Figura 30 - Distribuição dos resultados: Contagens nos quadrantes externos.	59
Figura 31 – Contagem manual comparada com os resultados das contagens automática e semiautomática.....	61
Figura 32 – Contagem assistida por computador comparada com os resultados da contagem automática. Resultados para a região A.	62
Figura 33 – Contagem assistida por computador comparada com os resultados da contagem automática. Resultados para a região B.	63
Figura 34 – Gráfico de diferenças para contagem RBC na região de interesse A(a) e região de interesse B(b). CABI e CAC com amostras de silvestres e domésticos, sem outliers.	64
Figura 35 – (a) células com aparência normal (b) células alteradas (maiores e transparentes) tiradas de parte das regiões de interesse 1A, 2A. 200X.....	64
Figura 36 – Gráfico de diferenças para contagem RBC na região de interesse B. Contagens CABI e CAC de amostras de silvestres e domésticos, com três outliers.	65
Figura 37 – Câmara de Neubauer: área preenchida.	75

Figura 38 – Exemplos de áreas da câmara de Neubauer sem a presença de linhas do retículo. 75

Figura 39 – Exemplos de contagem de cromossomos de peixes. 76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de Referência para Hemácias	37
Tabela 2. Contagem Visual, Assistida e Automática - Jaguaririca.	55
Tabela 3. Contagem Visual, Assistida e Automática - Macaco Prego	56
Tabela 4. Contagem Visual, Assistida e Automática - Quati.....	56
Tabela 5. Correlação de Pearson entre os três métodos aplicados em amostras de sangue de animais silvestres.	58
Tabela 6. Intervalos de referência para contagem RBC das espécies analisadas....	60
Tabela 7. Correlação de Pearson entre três observadores realizando a contagem assistida por computador	61
Tabela 8. Correlação de Pearson entre os quatro métodos para amostras de sangue de animais domésticos.....	63

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1. Tema	16
1.2. Descrição do Problema.....	16
1.3. Objetivo Geral	17
1.4. Objetivos específicos	17
1.4.1. Obtenção de um Banco de imagens.....	17
1.4.2. Contagem assistida por computador	18
1.4.3. Contagem automática	18
1.5. Organização dos Capítulos	18
2. Conceitos Gerais sobre Hemogramas.....	20
2.1. Hemograma.....	20
2.2. Hematologia em animais silvestres.....	24
3. Conceitos Gerais sobre Processamento Digital de Imagens	26
3.1. Representação Digital de Imagens	26
3.2. Processamento de imagens coloridas	27
3.2.1. Fundamentos.....	27
3.2.2. Modelo de cores	28
3.3. Erosão de imagens em escala de cinza.....	29
3.4. Dilatação de imagens em escala de cinza.....	30
3.5. Processamento Digital de Imagens.....	31
3.5.1. Aquisição da Imagem.....	31
3.5.2. Pré-Processamento.....	32
3.5.3. Segmentação	32
3.5.4. Representação e Descrição	33
3.5.5. Reconhecimento e Interpretação.....	33
4. Criação de um Banco de imagens	34

4.1.	Criação de um Banco de imagens	34
4.2.	Protocolo para a captura das imagens	40
4.3.	Documento de instruções para a captura de imagens	41
5.	Materiais e Métodos	46
5.1.	Métodos de contagem.....	46
5.1.1.	Contagem automática por impedância - CAI	46
5.1.2.	Contagem manual - CM.....	47
5.1.3.	Contagem assistida por computador - CAC.....	47
5.1.4.	Contagem automática baseada em imagens – CABI.....	49
6.	Resultados e Discussão	55
6.1.	Animais Silvestres	55
6.2.	Animais domésticos.....	60
6.3.	Considerações Gerais/Discussão	65
7.	Conclusão.....	69
7.1.	Considerações iniciais	69
7.2.	Principais resultados e contribuições.....	69
7.3.	Trabalhos futuros.....	72
7.3.1.	Simplificar o processo de captura de imagens	73
7.3.2.	Automatizar a varredura da câmara e a captura de imagens.....	73
7.3.3.	Avaliar novas técnicas de processamento de imagens.....	73
7.3.4.	Desenvolver soluções baseadas em eletrônica embarcada.....	74
7.3.5.	Avaliar a contagem de hemácias em áreas da câmara de Neubauer onde não haja linhas do retículo	74
7.3.6.	Aplicação do algoritmo de contagem em outros tipos amostras biológicas	76
8.	Referências Bibliográficas.....	77
	Apêndice A – Resultados das contagens realizadas nos diferentes métodos para amostras de animais silvestres.....	82
	Apêndice B – Dados do artigo publicado nos proceedings do “32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society-EMBC”	89

Apêndice C – Dados do artigo publicado no periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”	91
--	----

Resumo

A contagem de células vermelhas do sangue desempenha um papel importante no diagnóstico de animais silvestres e domésticos. Apesar da existência de muitas tecnologias em diferentes contadores automatizados para análise de sangue, quando se trata do sangue de animais silvestres ainda é difícil encontrar uma solução simples e economicamente viável para múltiplas espécies. O objetivo deste estudo é desenvolver um contador automático de células vermelhas. Amostras de sangue (1 jaguatirica - *Leopardus pardalis*, 1 macaco - *Cebus apella*, 1 quati - *Nasua nasua*, 62 cães - *Canis familiaris* e 5 cavalos - *Equus caballus*) foram analisadas usando três métodos: 1-contagem manual, 2-contagem automática por imagem e 3-contagem semiautomática por imagem; as amostras de cães e cavalos foram analisadas por um quarto método: 4-contagem automática por impedância. As contagens dos métodos 2 e 3 foram obtidas usando o contador de células vermelhas proposto. Os resultados foram comparados usando a correlação de Pearson e gráficos com diferentes métodos como valor de referência. As contagens dos métodos 1, 2 e 3 correlacionaram muito bem com as contagens do método 4 ($r \geq 0.94$). As contagens produzidas pelo método 2 apresentaram alta correlação com o método 3 ($r = 0.998$). Os resultados indicam que o contador proposto pode ser usado como um método de contagem automática ou semiautomática em clínicas que usam o método manual para contagem de células vermelhas do sangue de animais.

Palavras chave: Contagem automática baseada em imagens. Processamento de Imagens. Hemograma veterinário. Hemácias. Animais silvestres. Câmara de Neubauer. Hemocitômetro.

Abstract

A RBC count plays an important role in the diagnostic of wild and domestic animals. Despite the many technologies available in different automated hematology analyzers, when it comes to blood of wild animals it is still difficult to find an easy and affordable solution for multiple species. This study aims to develop an automatic red blood cell counter. Blood samples (1 ocelot - *Leopardus pardalis*, 1 monkey - *Cebus apella*, 1 coati - *Nasua nasua*, 62 dogs - *Canis familiaris* and 5 horses - *Equus caballus*) were analyzed using three methods: 1-manual count, 2-automatic count by image and 3-semi-automatic count by image; blood from dogs and horses were also analyzed by a fourth method: 4-automatic count by impedance. The counts of methods 2 and 3 were produced by the proposed red blood cell counter. Results were compared using Pearson's correlation and plots with different methods as the criterion standard. RBC counts of methods 1, 2 and 3 correlated very well with those on the method 4 ($r \geq 0.94$). RBC counts produced by method 2 were highly correlated with method 3 ($r = 0.998$). The results indicate that the proposed method can be used as an automatic or semi-automatic counting method in clinics that are currently using the manual method for RBC assessment.

Keywords: Automatic Image-based RBC counting. Image processing. Veterinary hemograma. Red blood cells. Wild Animals. Neubauer Chamber. Hemocytometer.

1. Introdução

1.1. Tema

O tema enfoca as atividades relacionadas com a identificação e quantificação de hemácias presentes no sangue periférico de animais silvestres na realização de exames usando hemocitômetros, também conhecidos como câmaras de contagem.

1.2. Descrição do Problema

Entre as diversas atividades realizadas por laboratórios de análises clínicas e laboratórios ambientais, o hemograma está entre as mais importantes. A sua realização fornece resultados importantes para o diagnóstico de diversos tipos de doenças e permite ao médico ou ao veterinário realizar um tratamento adequado à cada tipo de situação. A realização do hemograma requer a identificação e quantificação dos elementos figurados (e.g., hemácias, leucócitos e plaquetas) do sangue e no caso da hematologia humana, isso pode ser feito de maneira automatizada através de contadores eletrônicos.

Em pequenos laboratórios ou em exames de animais silvestres o hemograma ainda é realizado de maneira visual devido à dificuldade de acesso a equipamentos dedicados às diferentes espécies. A repetitividade das atividades na realização de diversos hemogramas, torna a tarefa desgastante para quem a executa, gerando estresse visual e aumentando a possibilidade de erro humano nos resultados. A contagem das hemácias auxilia no diagnóstico de doenças servindo, por exemplo, como possível indicador de anemia, hipotireoidismo, leucemia, linfomas, insuficiência renal quando da redução na quantidade das mesmas.

Para instituições que realizam a proteção de animais silvestres o hemograma assume destacada importância, visto que estes animais não costumam apresentar sintomatologia em caso de estados patológicos pois isto o colocaria em

situação de perigo perante predadores e o próprio grupo de convivência, desta forma o hemograma apresenta-se como uma ferramenta de diagnóstico importantíssima para os profissionais da área, permitindo a identificação de doenças que não são visualmente perceptíveis pelo comportamento do animal (ALMOSNY; SANTOS, 2001).

1.3. Objetivo Geral

Realizar a análise de imagens microscópicas para a identificação e quantificação de hemácias presentes em sangue periférico de animais silvestres em exames usando câmaras de contagem. Para alcançar este objetivo serão desenvolvidos métodos e algoritmos de processamento digital de imagens microscópicas que permitam então automatizar a identificação e quantificação destas células em situações saudáveis e patológicas, permitindo desta maneira automatizar os exames clínicos relacionados com o sangue. Esta pesquisa será realizada com o sangue de animais silvestres, onde a questão da variabilidade das formas e do tamanho dos elementos figurados do sangue gera uma dificuldade adicional para a sua realização.

Imagens das amostras em câmara de Neubauer serão processadas e as hemácias serão identificadas e contadas automaticamente. A solução deve contemplar múltiplas espécies de animais silvestres.

1.4. Objetivos específicos

1.4.1. Obtenção de um Banco de imagens

Obter um conjunto de imagens microscópicas com amostras de sangue de diferentes espécies em câmara de Neubauer. Este conjunto de imagens será usado no decorrer da pesquisa como fonte de dados para auxiliar no desenvolvimento da solução e também para realização de testes.

1.4.2. Contagem assistida por computador

Desenvolver métodos e algoritmos para auxiliar a realização da contagem manual de hemácias por um operador com o uso do computador. A contagem assistida por computador permitirá documentar adequadamente as contagens realizadas viabilizando conferências e comparações posteriores. Será possível ainda obter valores de referência mais confiáveis para poder analisar os resultados da contagem automática.

1.4.3. Contagem automática

Desenvolver métodos e algoritmos com potencial para qualificar e quantificar hemácias presentes nas amostras automaticamente. A automatização da contagem permitirá obter resultados mais rápidos e com menor risco de erros, auxiliando desta forma a encontrar mais rapidamente o tratamento adequado aos pacientes.

1.5. Organização dos Capítulos

No Capítulo 2 desta tese são apresentados os conceitos gerais sobre hemogramas com o objetivo de construir uma visão sobre a área do problema a ser resolvido. No Capítulo 3 abordam-se os temas associados ao processamento digital de imagens.

O Capítulo 4 trata da criação de um banco de imagens para a realização desta pesquisa, incluindo a definição de um protocolo de captura que foi aplicado para a coleta das imagens. No Capítulo 5 são apresentados materiais e métodos e o detalhamento de todos os métodos de contagem utilizados nesta tese.

No Capítulo 6 são expostos os resultados com a correspondente discussão, diferenciando-se os resultados para animais silvestres e domésticos.

Finalmente o Capítulo 7 apresenta as conclusões e as principais contribuições originadas no desenvolvimento desta tese, bem como a indicação de possíveis trabalhos futuros para a continuação da pesquisa sobre o tema.

2. Conceitos Gerais sobre Hemogramas

Neste capítulo apresenta-se uma introdução sobre os conceitos relacionados à realização de hemogramas. Estas informações estão relacionadas com os objetivos específicos “Obtenção de um Banco de imagens”, “Contagem assistida por computador” e “Contagem automática” apresentados no Capítulo 1.

2.1. Hemograma

O hemograma é considerado o meio mais direto e mais prático de se estudar os elementos figurados do sangue periférico. Estes elementos celulares apresentam alterações, às vezes muito acentuadas, no decurso de praticamente todas as doenças e por este motivo o hemograma é exame de rotina dos mais utilizados (ATHANASIOU et al., 2016; GUIMARAES; GUERRA, 1978).

Elementos figurados do sangue periférico são os componentes celulares do sangue, consistindo de células vermelhas (eritrócitos), células brancas (leucócitos) e plaquetas, que são encontrados no volume circulante do sangue e não estão sequestrados no sistema linfático, baço, fígado ou medula óssea (MOHAMMADI; MOHAMMADNEJAD; YAVARI, 2014).

Para realizar o estudo dos elementos figurados no sangue é necessário avaliar a quantidade dos mesmos na corrente sanguínea. Para a avaliação quantitativa dos glóbulos vermelhos, dos glóbulos brancos e das plaquetas, usa-se o método visual ou direto ou o método de contagem automática (MOURA, 1977).

O microscópio ótico foi o método inicial para classificação e contagem de células em humanos e animais. O método visual com o uso do microscópio é altamente dependente do especialista que realiza a análise, levando a uma possível variação dos resultados conforme a performance de um especialista e, portanto, entre diferentes especialistas.

Contadores automáticos que produzem resultados mais específicos com a aplicação de critérios menos específicos foram propostos. Um método que estabeleceu um marco na realização de hemogramas foi proposto por Wallace Coulter

em 1949 e a correspondente patente foi emitida em 1953 (COULTER, 1953). O método de contagem de células de Coulter baseia-se na variação da impedância elétrica das partículas suspensas no fluido sanguíneo ao atravessar uma abertura sensível em um capilar. Este método permite a determinação do número de células e uma estimativa do seu tamanho médio. Na década de 1970, equipamentos automáticos se tornaram comercialmente disponíveis para avaliação do sangue humano (PRESTON, 1986). Estes aparelhos são munidos de circuito eletrônico e contam as partículas que passam por um tubo capilar, sendo o impulso amplificado e registrado em um visor digital (princípio da impedância). São aparelhos de alto custo, muito úteis em laboratórios que possuam movimento hematológico compensatório (VALLADA, 2002).

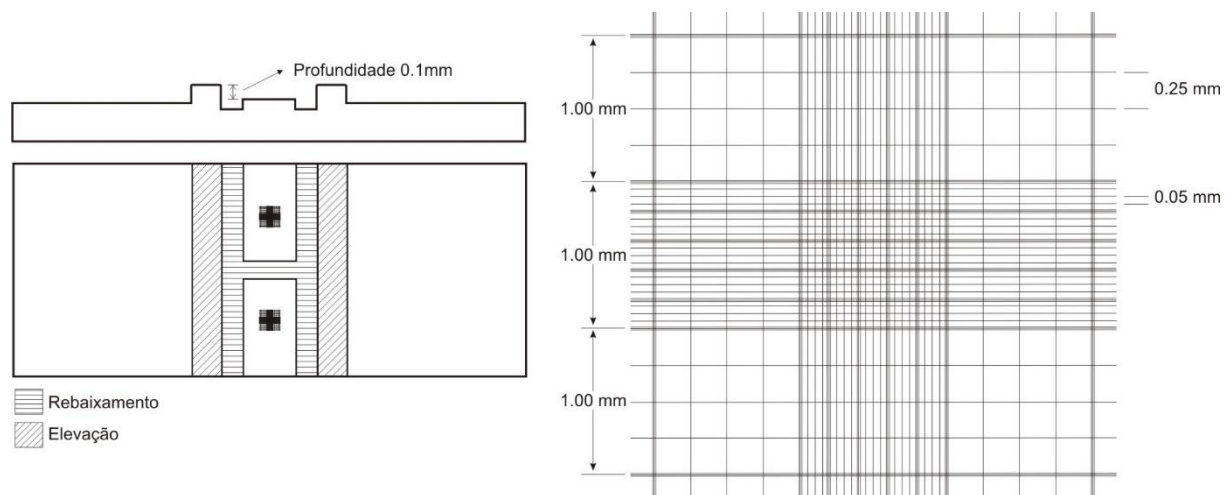
Para o funcionamento adequado dos contadores automáticos, são necessários reagentes químicos, geralmente de custo elevado, específicos para cada tipo de aparelho. Os reagentes são misturados com a amostra de sangue para criar condições adequadas ao funcionamento do aparelho contador. Apesar do avanço e do amplo uso dos contadores automáticos, existem ainda problemas quanto à sua utilização, sendo tema de pesquisa com relação à sua precisão e confiabilidade conforme pode ser observado em Buttarello (2004).

Apesar do sucesso desses equipamentos com análises economicamente viáveis, não há equipamentos viáveis economicamente para análise de diferentes espécies de animais silvestre disponíveis para uso em centros de proteção da vida selvagem e instituições como zoológicos. Isto se deve principalmente à variedade das espécies animais e da dificuldade de encontrar uma abordagem técnica economicamente viável, capaz de lidar com todas as variações (e.g., concentração, tamanho e forma) nestas amostras de sangue. Além disso, os exames realizados em equipamentos baseados na impedância elétrica requerem o uso de reagentes específicos para cada espécie animal (BECKER; MORITZ; GIGER, 2008). Este requisito leva à inexistência de reagentes para algumas espécies e a necessidade do laboratório manter um estoque de diferentes reagentes mesmo quando poucos exames são necessários para uma determinada espécie.

A contagem visual em câmara ainda é um método muito utilizado, existindo pequenas variações quanto ao tipo de câmara utilizado. Variações do método com uso de câmaras de contagem ainda são motivos de estudo como pode ser visto em (MATH et al., 2016). As câmaras de contagem, também conhecidas como

hemocitômetros, são geralmente construídas como uma peça de vidro espesso contendo um rebaixamento na parte central que é separado das partes laterais por duas pequenas valetas. Podem ter de um a quatro retículos todos separados por valetas para impedir que as suspensões de células se misturem. Os tipos de câmaras mais encontrados são: retículo de Neubauer, retículo de Burker e retículo de Fuchs-Rosenthal. O retículo de Neubauer é um dos mais utilizados na rotina laboratorial, pois apresenta áreas adequadas para contagem de células tanto em alta quanto em baixa concentração (MOURA, 1977). A Figura 1 apresenta uma representação esquemática da câmara de Neubauer. Para exemplificar seu uso, a Figura 2 apresenta uma fotomicrografia de sangue de veado bororó em câmara de Neubauer.

Figura 1- Câmara de Neubauer: formado por 9 quadrados de 1 mm^2 de área e, portanto, tem 9 mm^2 de superfície. A profundidade da câmara é de $0,1\text{ mm}$. O volume total da câmara é de $0,9\text{ mm}^3$. Cada um dos nove quadrados é subdividido. Quatro quadrados são divididos em 16 partes resultando em partes de $1/16$ do mm^2 . O quadrado central é dividido em 25 partes medindo cada uma $1/25$ do mm^2 . Cada uma destas partes de $1/25$ do mm^2 por sua vez é dividida em outras 16 partes medindo $1/400$ do mm^2 .

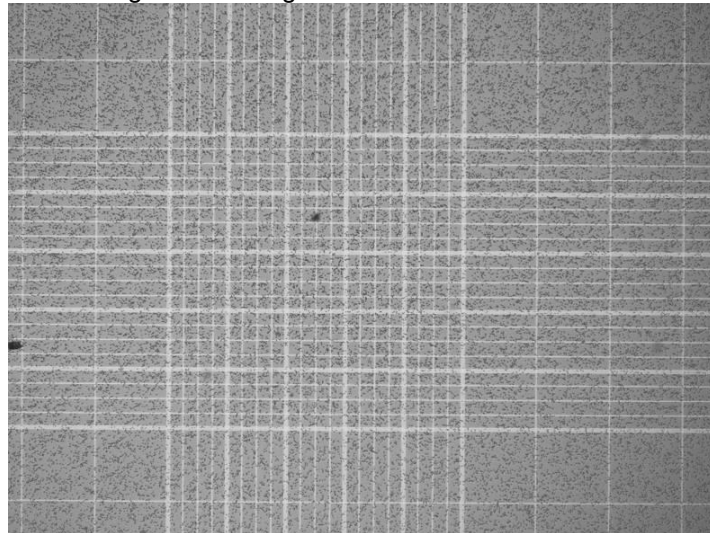


Basicamente, o princípio do uso das câmaras está baseado em área e profundidade padronizados, onde o sangue diluído é colocado e então a contagem das células é realizada visualmente com o auxílio de um microscópio tendo como resultado a concentração das células por mm^3 de sangue.

Hemocitômetros como a câmara de Neubauer, são ferramentas muito úteis para contagem de células em atividades laboratoriais (ALMOSNY; MONTEIRO, 2006; SANTOS, 1999). Estudos sobre animais silvestres frequentemente usam métodos manuais com hemocitômetros (ALMOSNY; SANTOS, 2001). Outros exemplos de

contagens de hemácias para diferentes espécies incluem Elefantes africanos (DEBBIE; CLAUSEN, 1975), Cervo chital (CHAPPLE et al., 1991), Vison marrom (WEISS et al., 1994), Quatis (SILVA et al., 1999), Veado-campeiro (UHART et al., 2003), Gato de pallas (BROWN et al., 2005), Capivaras (MADELLA et al., 2006), Ibex espanhol (CASAS-DÍAZ et al., 2008), Caprinos nativos e exóticos (SILVA et al., 2008), Pichi selvagem (SUPERINA; MERA Y SIERRA, 2008), Mico Leão de cara dourada (MONTEIRO; DIETZ; JANSEN, 2010), Lobo marinho do norte (NORBERG et al., 2011), Raposa das ilhas (INOUE et al., 2012), Alce (ROSTAL et al., 2012), Rena norueguesa (MILLER et al., 2013), Tamanduá gigante (SANCHES et al., 2013), Macaco bugio (SANTOS et al., 2013). Também é possível encontrar estudos sobre humanos e animais domésticos que usam o hemocitômetro, e.g. Humanos (BECK et al., 2009), Bovinos (BALDI et al., 2012; PAUL et al., 2016; SALEH, 2009) e Ovinos (SOUSA et al., 2013).

Figura 2 - Fotomicrografia de sangue de veado bororó em câmara de Neubauer.



A fórmula geral para contagem de células em câmaras de contagem é a seguinte:

$$\text{células/mm}^3 = \text{células por mm}^2 \times \text{profundidade da câmara} \times \text{diluição}$$

A grande dificuldade nesta técnica para a contagem de células se observa quando o volume de exames é muito grande, tornando a tarefa repetitiva e suscetível à erro humano, pois a contagem depende grandemente da acuidade visual e da

capacidade de concentração de quem efetua a contagem. O exame visual ou direto de amostras biológicas é muito útil, mas muitas tarefas envolvidas na realização destas análises de laboratório são repetitivas, entediantes e subjetivas (LAMPRECHT; SABATINI; CARPENTER, 2007).

A subjetividade, comum no exame visual de amostras biológicas, pode estar associada ao fato de que uma imagem visual pode ser considerada como uma representação mental de um objeto ou cena que preserva informações espaciais, construídas através de processos perceptivos. Isso significa que o espaço visual é produto dos processos sensoriais do indivíduo, levando à subjetividade (VALKOLA, 2012).

2.2. Hematologia em animais silvestres

O Hemograma veterinário resulta da análise das células sanguíneas: hemácias, leucócitos e plaquetas. É usado para detectar anormalidades que auxiliam no diagnóstico das anemias, infecções, doenças crônicas e plaquetopatias, entre outras. A importância do hemograma é ainda maior no caso de animais silvestres pois os mesmos geralmente não apresentam sintomas em casos de doenças para evitar riscos perante predadores e o próprio grupo de convivência.

O método mais usado para a realização do hemograma de animais silvestres é o método visual (manual). A realização dos exames pelo método visual é uma tarefa rotineira em laboratórios ambientais, exigindo do profissional grande experiência e concentração. A repetitividade destas tarefas acarreta desgaste visual para o profissional e aumenta a possibilidade de erro humano na realização dos exames gerando risco para os animais pela possibilidade de diagnóstico falho. A automatização desta contagem traria diversas vantagens destacando-se a rapidez e a confiabilidade.

No estudo das células vermelhas do sangue é importante lembrar que em casos de doenças estes elementos podem apresentar alterações quanto à sua forma e quantidade, levando a situações complexas no momento da análise e interpretação das informações.

Dentre as várias espécies existentes de animais silvestres é possível notar grande variação na quantidade, na forma e no tamanho dos elementos figurados do sangue o que dificulta ainda mais a realização dos exames por parte dos profissionais da área, pois os mesmos precisam conhecer os diversos elementos do sangue para cada espécie (REAGAN; ROVIRA; DENICOLA, 2008). A complexidade e a natureza não estruturada de imagens biológicas apresentam um conjunto único de desafios na análise e interpretação dos dados (SWEDLOW, 2003).

Os métodos indiretos para estimar matematicamente o número de células vermelhas usando o hematócrito podem induzir a erros (STRAUSS et al., 2003). As células vermelhas de animais silvestres apresentam variações no número, tamanho e forma quando comparadas com outras espécies. O número de células vermelhas é inversamente proporcional ao seu tamanho, espécies como *Mazama rufina* (Veadobororó) possuem células pequenas, mas em grandes quantidades. Portanto, o percentual de células vermelhas no volume do sangue total não varia muito entre as espécies (ALMOSNY; SANTOS, 2001) apesar da grande variação no número de células. Hemoparasitas também podem interferir no hematócrito e na determinação da hemoglobina (SANTOS, 1999). Estes fatores podem levar a erros quando se estima o número de células usando métodos indiretos.

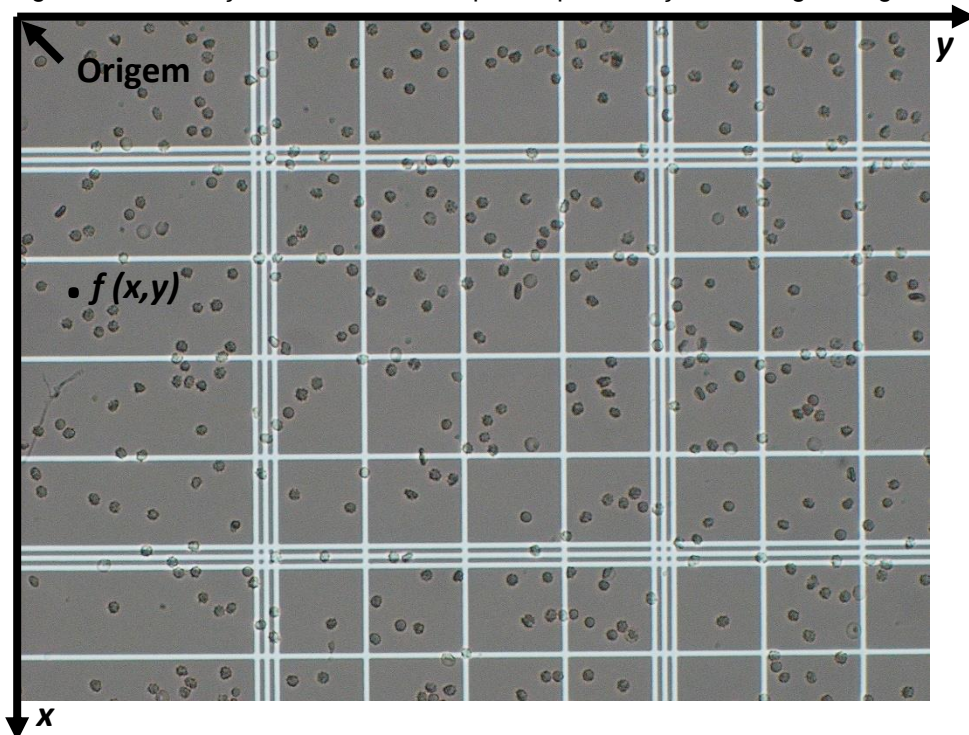
3. Conceitos Gerais sobre Processamento Digital de Imagens

Neste capítulo será apresentada uma visão geral sobre conceitos relacionados com processamento digital de imagens. Estas informações estão relacionadas com os objetivos específicos “Obtenção de um Banco de imagens”, “Contagem assistida por computador” e “Contagem automática” apresentados no capítulo 1.

3.1. Representação Digital de Imagens

Uma imagem é uma função $f(x,y)$ bidimensional, onde x e y são coordenadas espaciais e o valor de f em qualquer ponto (x,y) é proporcional a cor da imagem naquele ponto. Nas imagens monocromáticas cada ponto (x,y) é dado por uma função f de intensidade de luz e o valor de f é proporcional ao brilho da imagem naquele ponto. A Figura 3 ilustra como é estruturada a imagem.

Figura 3 - Convenção de eixos usados para representação de imagens digitais



Uma imagem digital bidimensional é uma imagem $f(x,y)$ que foi discretizada em suas coordenadas espaciais e no brilho. Uma imagem digital pode ser considerada como uma matriz M cujos índices de linhas e colunas, i e j respectivamente, identificam pontos na imagem e o valor de um elemento ($M(i,j)$) da matriz é o valor de um ponto ($f(x,y)$) na imagem. Os elementos de uma matriz digital são comumente chamados de pixels (do inglês *picture cells*).

3.2. Processamento de imagens coloridas

3.2.1. Fundamentos

O termo níveis de cinza refere-se a uma medida escalar de intensidade que varia do preto ao branco, passando pelos tons de cinza (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Devido à estrutura do olho humano, todas as cores são vistas como combinações variáveis das três cores primárias: vermelho (R do inglês “red”), verde (G do inglês “green”) e azul (B do inglês “blue”). Esses três componentes são tidos como padrão, porém, isto não significa que agindo sozinhos possam gerar todo o espectro de cores, ou seja, quando os três padrões primários são misturados em diversas proporções de intensidade os mesmos não conseguem produzir todas as cores visíveis (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Para que as cores sejam distinguidas uma das outras três características são usadas: brilho, matiz e saturação. O brilho incorpora a noção cromática da intensidade. O matiz é um atributo associado com o comprimento de onda dominante em uma mistura de ondas de luz. Já a saturação, refere-se à quantidade de luz branca misturada com um matiz.

Desta maneira, o matiz e a saturação quando tomados juntamente são chamados de cromotividade e, portanto, uma cor pode ser caracterizada por seu brilho e cromotividade. As quantidades de vermelho, verde e azul necessárias para formar qualquer cor em particular são denominadas valores triestímulo e são denotadas X , Y e Z (GONZALEZ; WOODS, 2008).

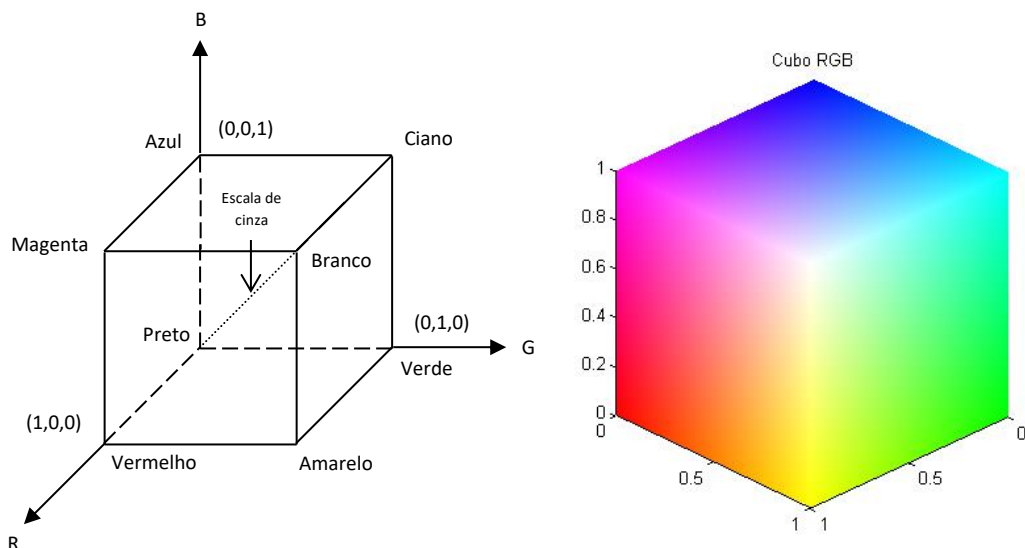
3.2.2. Modelo de cores

O modelo de cores tem como objetivo facilitar a especificação das cores em uma forma padrão. Essencialmente, um modelo de cor é uma especificação de um sistema de coordenadas tridimensionais e um subespaço dentro deste sistema, onde cada cor é representada por um único ponto (GONZALEZ; WOODS, 2008).

A maioria dos modelos de cores em uso é orientada para hardware, tais como para monitores coloridos, impressoras, etc. O modelo orientado para hardware mais usado na prática é o RGB (“red, green, blue”), sendo utilizado em monitores coloridos e em uma ampla classe de câmeras de vídeo a cores. O RGB também é muito usado para o processamento de imagens, assim como o YIQ, que é o padrão para transmissão de TV colorida, e o HSI (“matiz, saturação, intensidade”), usado para a manipulação de imagens coloridas.

O modelo de cores RGB baseia-se num sistema de coordenadas cartesianas. O subespaço de cores de interesse é o cubo mostrado na Figura 4, no qual os valores RGB estão nos três cantos, ciano, magenta e amarelo estão nos outros três cantos, preto está na origem e o branco está no canto mais distante da origem. Nesse modelo, a escala de cinza estende-se do preto até o branco ao longo da linha juntando estes dois pontos.

Figura 4 - Cubo de cores RGB. Os pontos ao longo da diagonal principal têm valores de cinza, desde preto na origem até branco no ponto (1,1,1).



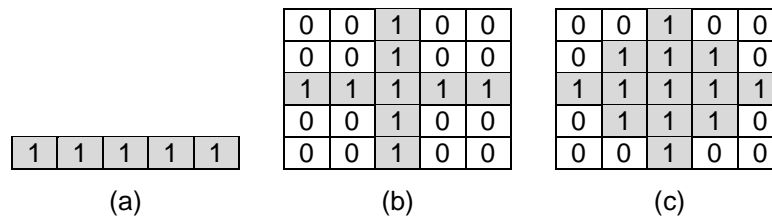
As imagens no modelo RGB consistem de três planos de imagens independentes, uma para cada cor primária. Quando alimentadas num monitor RGB, essas três imagens combinam-se sobre a tela, produzindo uma imagem de cores compostas. Assim, o uso do modelo RGB para processamento de imagens faz sentido quando as imagens são expressas nos três planos de cores. Também, a maioria das câmeras coloridas usadas para a aquisição de imagens digitais utiliza o formato RGB, o que por si só torna este modelo importante para o processamento de imagens.

3.3. Erosão de imagens em escala de cinza

A erosão é uma operação que compreende o deslocamento de um elemento estruturante (EE) sobre uma imagem encontrando o valor mínimo da imagem na sub-região gerada pela sobreposição do EE na imagem (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Um EE pode ter várias formas e sua aplicação gera resultados diferentes. A Figura 5 apresenta um EE em forma de linha, em forma de cruz e em forma de diamante. A origem de cada EE está em seu centro.

Figura 5 – Elementos estruturantes: (a) linha, (b) cruz e (c) diamante.



Matematicamente, a erosão, representada por \ominus , em qualquer posição (x, y) de uma imagem f por um EE b é dada por

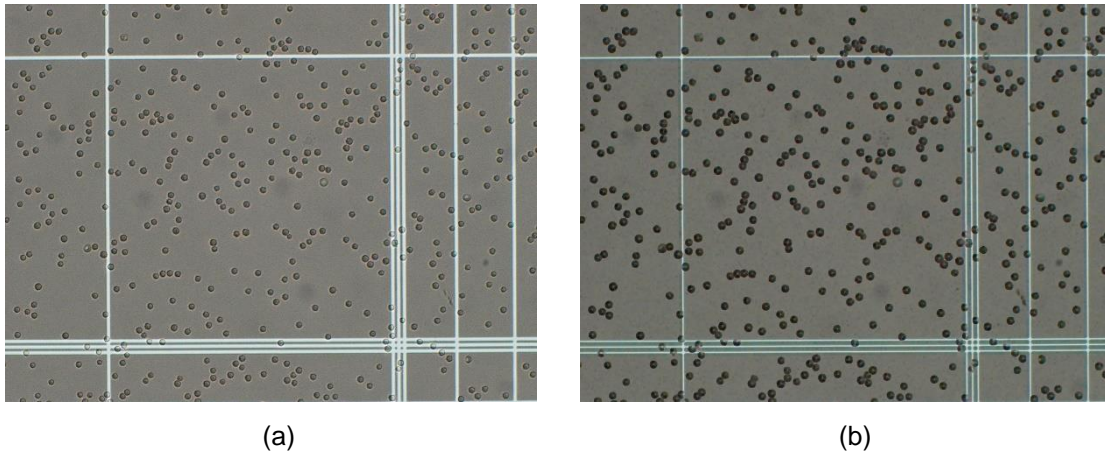
$$[f \ominus b](x, y) = \min_{(s,t) \in b} \{f(x + s, y + t)\}$$

Onde s e t variam de acordo com as dimensões da matriz que contém o EE.

Como a operação de erosão calcula o valor mínimo em cada sub-região, a imagem resultante geralmente é mais escura que a original, o tamanho das regiões

claras é reduzido e o tamanho das regiões escuras é aumentado. Um exemplo das alterações geradas pela erosão pode ser visto na Figura 6, onde um EE em forma de diamante foi aplicado na imagem. Percebe-se que as linhas claras foram reduzidas e as células em tons mais escuros foram aumentadas.

Figura 6 – Erosão por um EE em forma de diamante: (a) imagem original e (b) imagem resultante.



3.4. Dilatação de imagens em escala de cinza

A dilatação ocorre de maneira similar à erosão, a diferença está no fato de que ao invés de calcular o valor mínimo da imagem na sub-região gerada pela sobreposição do EE, calcula-se o valor máximo. Ao calcular o valor máximo, o resultado esperado é a redução do tamanho das áreas escuras e o aumento do tamanho das áreas claras, conforme pode ser visto na Figura 7 (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Matematicamente, a dilatação, representada por \oplus , em qualquer posição (x, y) de uma imagem f por um EE b é dada por

$$[f \oplus b](x, y) = \max_{(s,t) \in b} \{f(x - s, y - t)\}$$

Onde s e t variam de acordo com as dimensões da matriz que contém o EE.

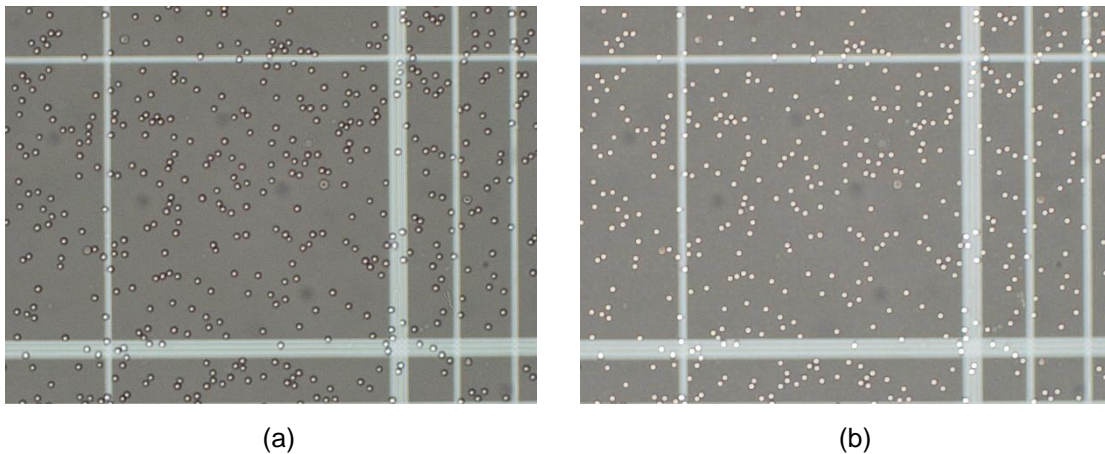
3.5. Processamento Digital de Imagens

Processamento de imagens digitais envolve uma série de questões como hardware, software e conhecimento teórico do domínio das informações no qual a imagem se encontra. Para realizar o processamento de imagens algumas fases fundamentais devem ser consideradas:

- Aquisição da imagem
- Pré-processamento
- Segmentação
- Representação e Descrição
- Reconhecimento e Interpretação

Os dois primeiros passos pertencem a área de pré-processamento, já os três últimos pertencem a área de análise de imagem (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Figura 7 – Dilatação por um EE em forma de diamante: (a) imagem original e (b) imagem resultante.



3.5.1. Aquisição da Imagem

A aquisição de imagens é realizada através de algum tipo de sensor de imagens. Existem basicamente dois tipos de sensores: os sensores do tipo scan-line e os sensores do tipo matriz.

Os sensores do tipo scan-line operam com apenas um "vetor" de sensores que é transladado durante a aquisição da imagem. Este tipo de sensor é utilizado em scanners e em alguns satélites artificiais. Os sensores do tipo matriz operam com uma "matriz" de sensores. Este tipo de sensor é utilizado na maioria das câmeras digitais. Uma aquisição adequada é fundamental para o sucesso das demais fases.

3.5.2. Pré-Processamento

O pré-processamento consiste em utilizar alguma técnica de melhoramento de imagens específica para uma dada aplicação. Existem várias técnicas de melhoramento de imagem e como exemplo pode-se citar: técnicas de melhoria de contraste, remoção de ruídos, isolamento de regiões similares na imagem, destacamento de bordas, etc.

3.5.3. Segmentação

A segmentação de imagens consiste em particionar a imagem em partes ou objetos que a compõem. Na maioria das aplicações a segmentação é a fase mais importante e mais difícil no processamento de imagens digitais.

O resultado de um procedimento de segmentação geralmente é constituído de pixels da imagem, constituindo os limites de uma região ou todos os pontos na região propriamente dita. Em ambos os casos é necessário converter os dados para uma forma computacionalmente processável. Em primeiro lugar deve-se escolher se os dados devem ser representados como bordas ou como uma região inteira. A representação por bordas é mais apropriada quando o objetivo está nas características externas de uma forma como cantos e falhas. Já a representação por regiões é mais apropriada quando o objetivo está em conhecer características internas como estrutura interna ou texturas. Em algumas situações as duas representações são necessárias.

3.5.4. Representação e Descrição

Escolher uma representação adequada é apenas parte da solução, métodos devem ser especificados para descrever os dados para que as características importantes sejam destacadas. Descrição ou seleção de características é responsável por extrair características que resultem em informações quantitativas ou características que são base para diferenciação de classes de objetos.

3.5.5. Reconhecimento e Interpretação

Reconhecimento é o processo que identifica objetos com base nas informações fornecidas pelos seus descritores. Interpretação é a parte que deve dar significado para um conjunto de objetos reconhecidos.

4. Criação de um Banco de imagens

Neste capítulo serão apresentados conceitos gerais e os resultados para o objetivo específico “Obtenção de um Banco de imagens” conforme apresentado no Capítulo 1.

4.1. Criação de um Banco de imagens

Em diversas áreas do conhecimento, pesquisas são realizadas utilizando dados disponíveis em bases públicas de modo que a pesquisa concentre-se na solução de um determinado problema e os resultados possam ser comparados com outras abordagens. Para o desenvolvimento deste trabalho foi necessário coletar informações para viabilizar a pesquisa, pois não foram encontradas bases de dados publicamente disponíveis com imagens de hemácias de animais silvestres em câmaras de contagem. No caso de espécies silvestres, muitas vezes ainda não foram nem mesmo determinados valores de referência, como concentração e tamanho das células, desta forma foi necessário obter as imagens usadas para a pesquisa.

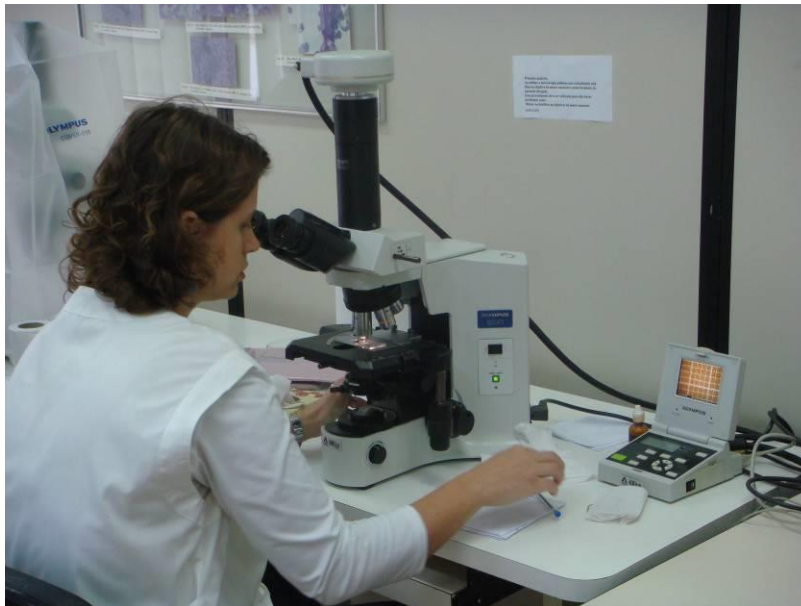
A composição do banco de imagens usou dois grupos de amostras de sangue, um consistindo de animais silvestres e outro de animais domésticos. A coleta de dados foi amparada no pedido 31/2013 do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESP-Botucatu. Todas as contagens e registro de imagens foram realizados em menos de 24 horas após a coleta das amostras (BROWN et al., 2005; DEBBIE; CLAUSEN, 1975; SANCHES et al., 2013; WEISS et al., 1994).

As amostras de sangue de animais silvestres foram obtidas no Refúgio Biológico da Itaipu Binacional, onde existem animais silvestres de diferentes espécies da fauna da brasileira. Estas amostras foram manipuladas no Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, qualificado como laboratório de pesquisa. Neste laboratório existem equipamentos adequados para a manipulação das amostras e para o registro das imagens microscópicas.

Para a obtenção das imagens microscópicas o equipamento utilizado foi um microscópio óptico Olympus BX41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) com

objetivas planas de 4X, 10X, 20X, 40X e uma objetiva de imersão de 100X. Todas as imagens foram registradas utilizando-se a lente plana de 20X. Para a aquisição das imagens, foi utilizada uma câmera fotográfica digital Olympus DP12 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio. As imagens capturadas tem resolução de 2048x1536 e foram gravadas usando o formato JPG (Joint Photographic Experts Group) com compressão sem perda. O microscópio e a câmera fotográfica podem ser vistos na Figura 8.

Figura 8 – Microscópio Olympus BX-41 com câmera fotográfica digital Olympus DP12.



A diluição usada para todas as amostras de animais silvestres foi feita na proporção 1/200 com solução fisiológica de acordo com o método apresentado em (SANTOS, 1999).

As amostras de sangue de animais domésticos foram coletadas no Laboratório Clínico Veterinário do Departamento Clínico do Hospital Veterinário da FMVZ-Unesp, Botucatu. Ao longo de uma semana foram coletadas amostras de animais saudáveis e doentes de diferentes raças, idades e sexos. Todas as amostras foram coletadas em tubos com (EDTA) como parte dos procedimentos de diagnóstico para pacientes do Laboratório.

Um total de 67 amostras foram coletadas, sendo 62 amostras de cães e 5 amostras de cavalos.

Um microscópio óptico DMLS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) com uma objetiva planar de 20X foi usado para estas amostras. Uma câmera digital

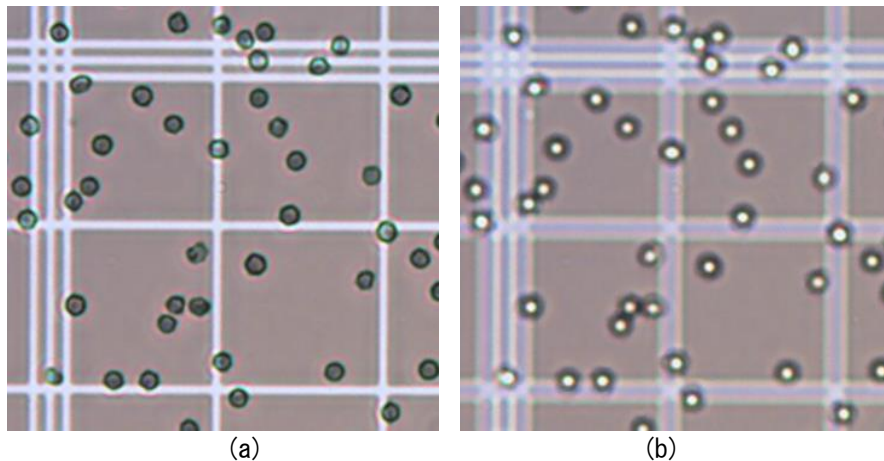
Motic (Motic, Hong Kong, China) acoplada ao microscópio, com resolução de 1280x1024 foi usada para salvar imagens no formato JPG (Joint Photographic Experts Group). As amostras de sangue de animais domésticos foram preparadas na proporção 1:201, usando 10 μ l da amostra de sangue e 2000 μ l de solução salina (NaCl 0,9%).

Figura 9 – Microscópio Leica DMLS com câmera fotográfica Motic.



As imagens foram registradas usando Foco 1 (F1) e Foco 2 (F2). Exemplos das imagens resultantes podem ser vistos na Figura 10.

Figura 10 – Imagens adquiridas usando (a)F1 e (b)F2. (Sangue canino).



Para organizar a captura das imagens buscando uma padronização foi definido um protocolo para captura. Neste protocolo vários parâmetros foram definidos e os passos para a captura descritos de modo que imagens capturadas em diferentes momentos tenham características similares, favorecendo assim a análise e uso das mesmas.

Imagens de oito espécies de animais silvestres estão presentes no banco, são elas: Furão, Quati, Gato Mourisco, Veado Bororó, Jaguatirica, Macaco Prego, Capivara, Cateto. A seleção das espécies foi realizada considerando características como o tamanho das células e a concentração das mesmas, buscando um conjunto com diferenças significativas em relação a estas características. Além das oito espécies de animais silvestres, foram usadas duas espécies de animais domésticos para ampliar o número de imagens disponíveis e permitir a realização de testes estatisticamente mais significativos gerando um repositório de dados que poderá ser utilizado em novas pesquisas sobre o tema. Formou-se assim um banco que viabilizou o desenvolvimento das soluções e a realização de testes de contagem. A Tabela 1 apresenta os valores de referência para hemácias das espécies presentes no banco de imagens (JAIN, 1993; MADELLA et al., 2006; SANTOS, 1999).

Tabela 1. Valores de Referência para Hemácias

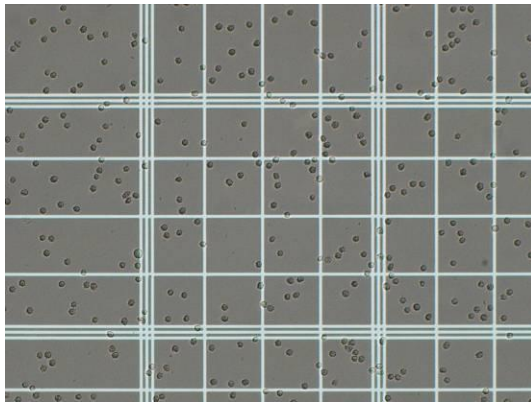
Animal	RBC (MILHÕES DE CÉLULAS/ μ L)
Cão	5.5 – 8.5
Capivara	4,3 – 4,7
Cateto (macho)	7,27 – 8,77
Cateto (fêmea)	7,27 – 9,65
Cavalo	6.1 – 11
Furão (macho)	5,81 – 7,49
Furão (fêmea)	5,66 – 7,40
Gato Mourisco (macho)	6,30 – 7,20
Gato Mourisco (fêmea)	5,17 – 7,29
Jaguatirica (macho)	4,90 – 6,22
Jaguatirica (fêmea)	4,24 – 6,16
Macaco Prego (macho)	4,34 – 5,98
Macaco Prego (fêmea)	3,47 – 5,33
Quati (macho)	4,21 – 5,35
Quati (fêmea)	3,88 – 4,26
Veado Bororó (macho)	13,43 – 17,31
Veado Bororó (fêmea)	13,20 – 15,00

A Figura 11 apresenta, para exemplo, fotomicrografias de amostras de sangue, de diferentes espécies de animais silvestres, (a) a (h), em câmara de Neubauer presentes no banco de imagens, todas em aumento de 200 X.

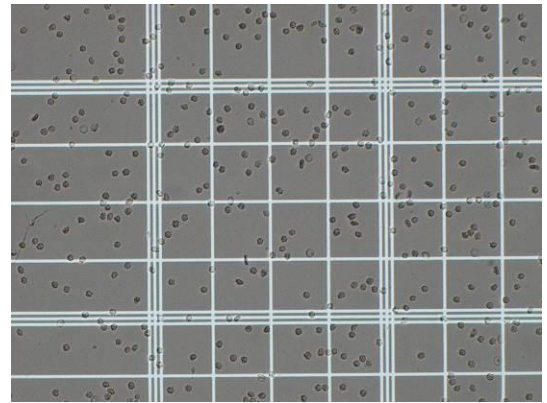
É possível notar nessas imagens a variação existente entre tamanho, quantidade e forma para cada espécie, em especial na Figura 11(d) que possui alta concentração de hemácias de tamanho reduzido enquanto nas outras imagens observa-se que a concentração é menor e o tamanho das células é maior. Outra variação presente refere-se à “cor de fundo” das câmaras de contagem, dependendo do fabricante da câmara a cor de fundo tem características diferentes.

O limiar para a binarização das imagens sofre alterações dependendo, não somente da iluminação do microscópio e seus ajustes, mas também da marca da Câmara de contagem utilizada, pois para cada fabricante a “cor de fundo” das lâminas é diferente, e da espécie sob análise pois a opacidade das células é variável dependendo, entre outros fatores, da quantidade de hemoglobina presente nas mesmas, influenciando o processo de limiarização.

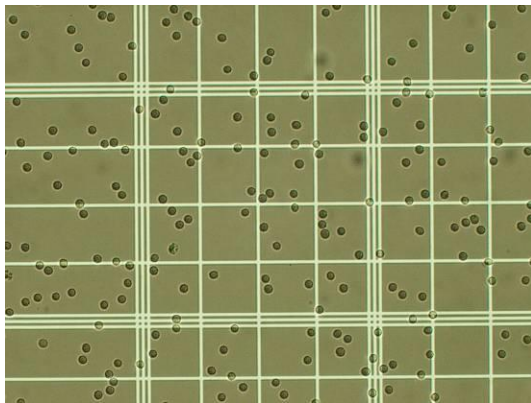
Figura 11 – Fotomicrografias de sangue de animais silvestres (200 X), (a) Quati, (b) Furão, (c) Capivara, (d) Veado Bororó, (e) Jaguatirica, (f) Cateto, (g) Gato Mourisco, (h) Macaco Prego. 200X



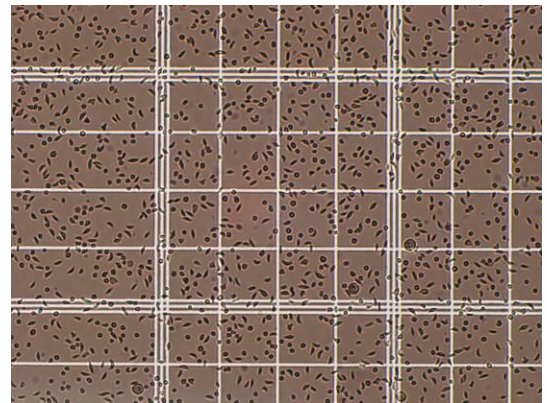
(a)



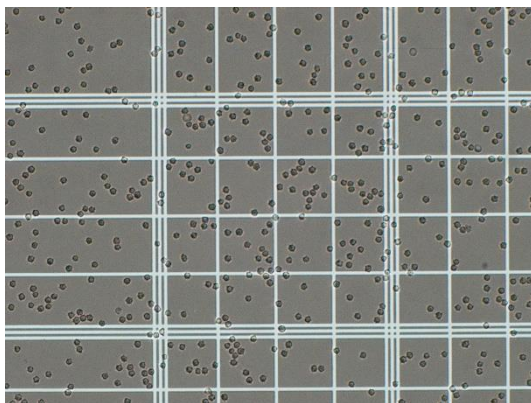
(b)



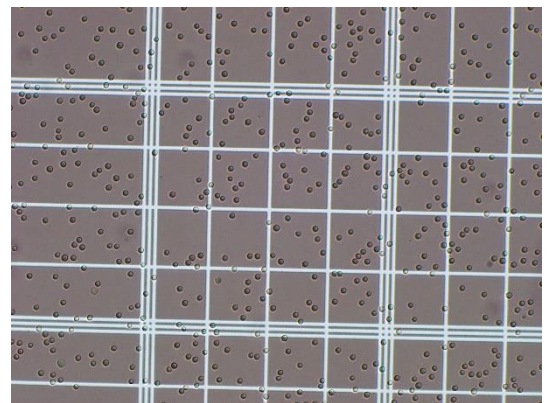
(c)



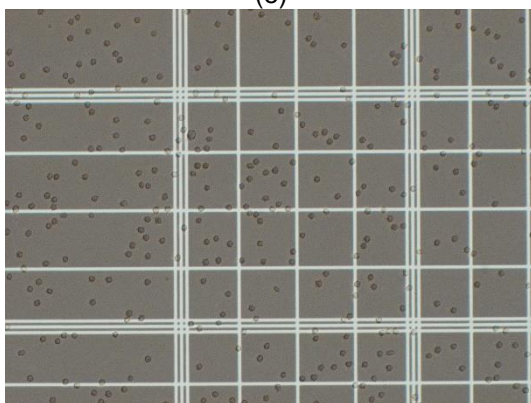
(d)



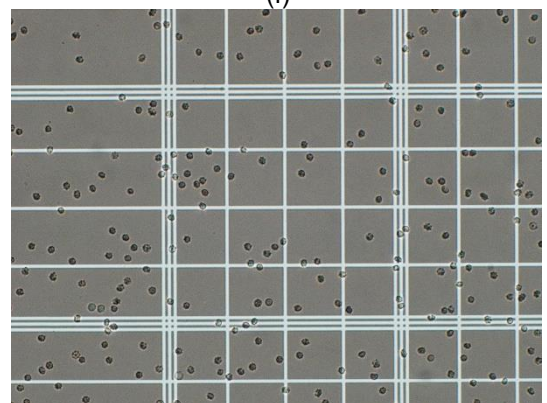
(e)



(f)



(g)



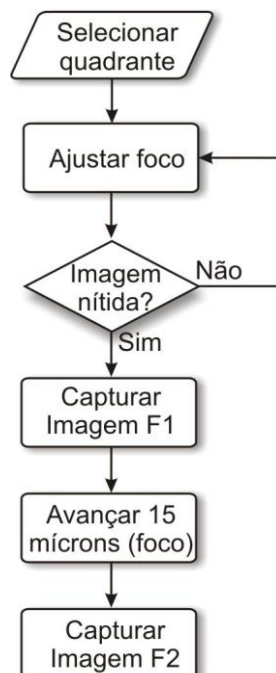
(h)

4.2. Protocolo para a captura das imagens

Objetivando padronizar a geração de imagens microscópicas de amostras de sangue em câmara de Neubauer foi criado um protocolo de captura. Esta padronização permitiu a criação de um banco de imagens com maior controle dos parâmetros de captura e conseqüentemente menores variações de contraste, escala e foco.

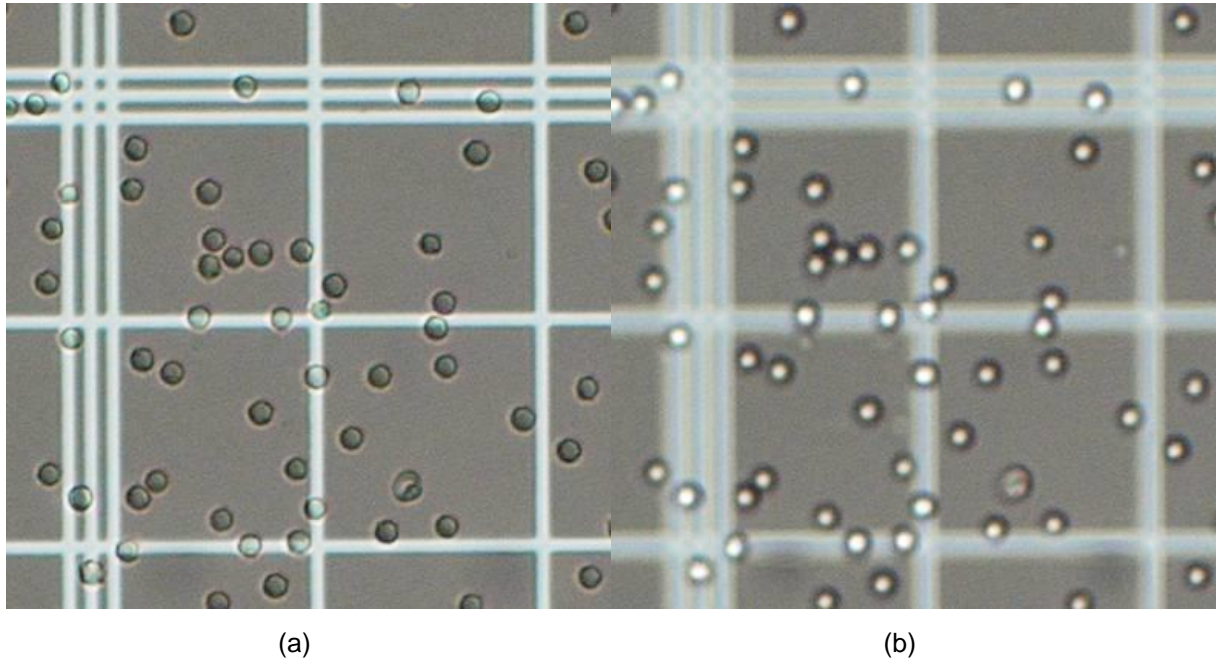
Os quadrantes registrados são: 1A, 2A, 3A, 4A e 5A; 1B, 2B, 3B e 4B, cujas posições podem ser verificadas na Figura 15. Foram capturadas duas imagens para cada quadrante, cada uma delas com um foco diferente para permitir a avaliação de diferentes funções para processamento de imagens. O foco inicial é ajustado para deixar as células com um aspecto "escuro" e o mais nítido possível (foco 1 - F1). O segundo foco é obtido a partir do foco inicial, incrementando-se o micrômetro em 15 microns. As células neste foco apresentam interior "mais claro" com bordas escuras levemente borradas (foco 2 - F2). Os passos para a captura dos dois focos podem ser vistos na Figura 12.

Figura 12 – Passos para captura das imagens no Foco 1 e no Foco 2.



Percorreu-se todos os quadrantes de interesse repetindo o processo de registro, capturando 2 imagens em cada um deles, mantendo os mesmos valores dos dois níveis focais em todas as imagens de uma mesma amostra. Na Figura 13 pode-se observar 2 imagens, de um mesmo quadrante, capturadas nos referidos níveis focais.

Figura 13 - Amostra de sangue de macaco prego, recorte do quadrante 1A: (a) Foco 1; (b) Foco 2.



4.3. Documento de instruções para a captura de imagens

Protocolo para captura de imagens de amostra de sangue em Câmaras de Contagem

Este documento descreve um protocolo de captura de imagens criado com o objetivo de padronizar a geração de imagens microscópicas de amostras de sangue em câmaras de contagem, Figura 14. Esta padronização permitirá a criação de um conjunto de imagens com maior controle dos parâmetros da captura e conseqüentemente menor variação de contraste, escala, foco, entre diferentes imagens.

Figura 14 - Câmara de Neubauer.

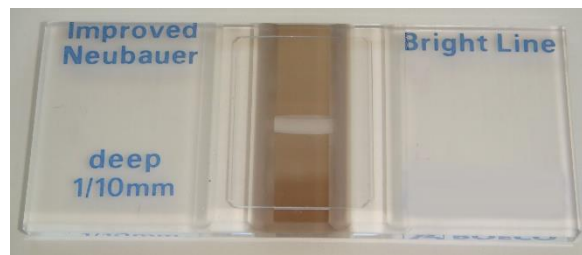
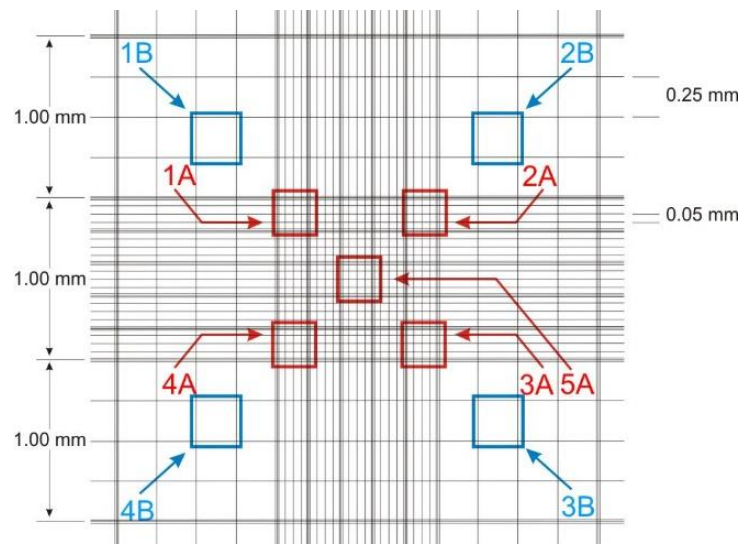


Figura 15 - Retículo de Neubauer e regiões de interesse.



Os quadrantes a serem registrados são 1A, 2A, 3A, 4A e 5A na região central e 1B, 2B, 3B e 4B nas regiões externas conforme apresentado na Figura 15:

Para cada quadrante deve-se obter o foco inicial com lentes de menor aumento como 4X ou 10X somente depois mudando para a lente de 20X, este procedimento visa evitar acidentes com a lente tocando a lamínula e quebrando-a.

Cada quadrante será fotografado 2 vezes, cada uma destas vezes com um foco diferente. Na lente de 20X obter o foco inicial procurando deixar as células com um aspecto “escuro” e o mais nítido possível. Registrar uma imagem neste nível focal. Manipulando o micrômetro (Ajuste de foco fino), Figura 16, avançar (somar) 15 microns ao ponto de foco inicial, registrar mais uma imagem.

Deve-se percorrer todos os quadrantes de interesse repetindo o processo de registro, sempre de 2 imagens para cada quadrante. Importante manter os mesmos níveis focais em todas as imagens.

Operação do Microscópio

A “Controle de intensidade de luz” deve estar sempre fixo, recomenda-se o valor 4,5.

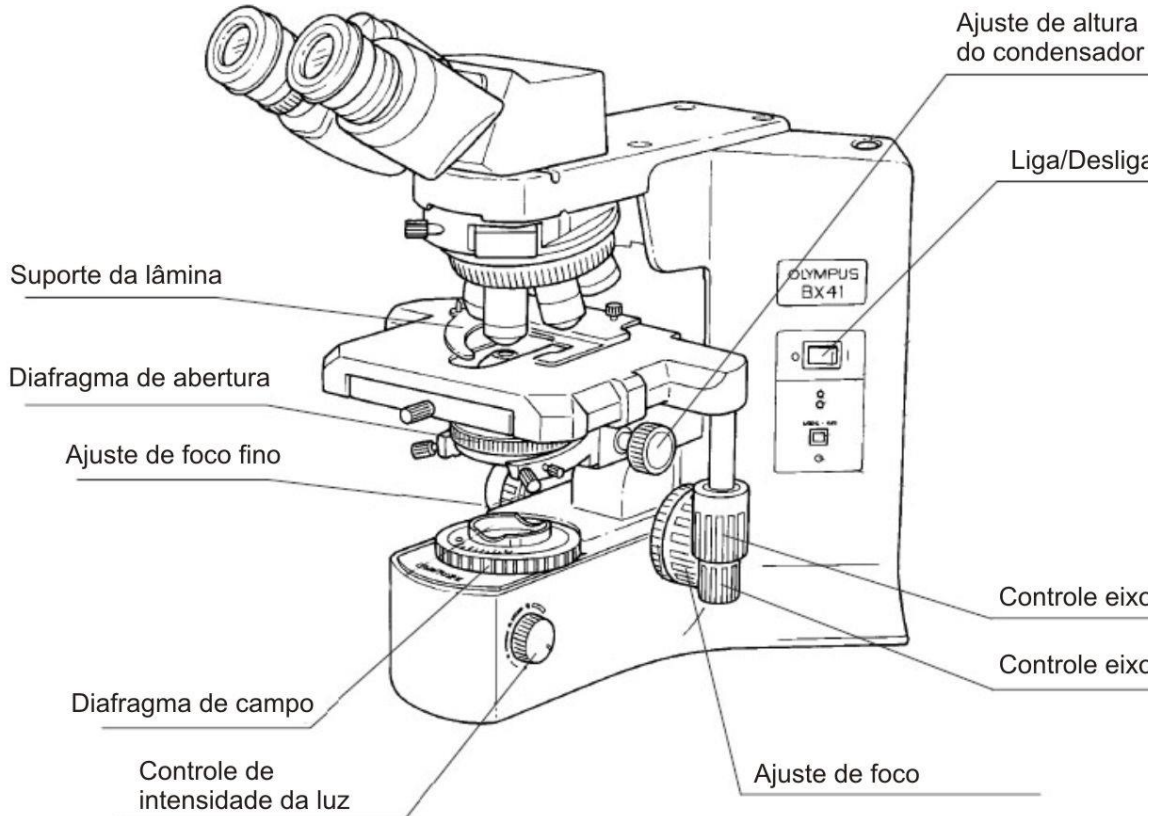
O controle “Diafragma de campo” deve estar totalmente aberto, girar para esquerda até o final.

O controle “Diafragma de abertura” também deve estar totalmente aberto, girar para esquerda até o final.

O condensador deve ser usado, posicionar corretamente.

Os controles citados podem ser vistos na Figura 16.

Figura 16 – O Microscópio e seus controles.



Fonte: Modificado de Olympus Corporation, Tokyo, Japan

Câmera Olympus DP12

O modo de registro das imagens deve ser realizado usando o modo *Rec Auto*, para ativar este modo pressiona-se o botão 2, “Modo da câmera” na unidade de controle da câmera Olympus DP12, Figura 17. Após a obtenção do foco inicial no microscópio o botão 6 *AE Lock* deve ser ativado para permitir que todas as imagens registradas tenham o mesmo tempo de exposição no CCD.

Figura 17 – Unidade de controle da Câmera Olympus DP-12.



Fonte: Modificado de Olympus Corporation, Tokyo, Japan

A configuração dos menus deve seguir o padrão apresentado na Figura 18.

Figura 18 – Telas de configuração da Câmera Olympus DP-12.



5. Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados Materiais e Métodos, envolvendo todo o processo para desenvolvimento da pesquisa considerando-se os diferentes métodos de contagem utilizados.

5.1. Métodos de contagem

Quatro métodos de contagem foram utilizados para avaliar o método proposto.

5.1.1. Contagem automática por impedância - CAI

As amostras foram analisadas usando um Contador automático de células (Hemascreen 18, Ebram, São Paulo, Brasil), Figura 19, para a contagem de células vermelhas. Amostras de sangue de cães e cavalos foram diluídas usando o diluente isotônico padrão (Ebraton, Ebram).

Figura 19 – Hemascreen 18



5.1.2. Contagem manual - CM

Amostras de sangue foram contadas manualmente usando câmaras de Neubauer de acordo com o protocolo descrito por Santos (1999). Especialistas do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ – Unesp – Botucatu contaram as células vermelhas das amostras de animais domésticos e os especialistas do Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional contaram as amostras de animais silvestres. Em ambos os casos seguiu-se o procedimento padrão recomendado pelo *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) (ENGLAND et al., 1994).

O procedimento padrão para contagem manual em câmara de Neubauer recomenda considerar (1) células que tocam uma linha da região de interesse e (2) somente uma das linhas horizontais e uma das linhas verticais como parte da região de interesse. Por exemplo, pode-se considerar as linhas superior e esquerda como parte da região de interesse e as linhas inferior e direita não devem ser consideradas. Esta recomendação reduz o risco de obter diferentes resultados a partir de diferentes observadores contando a mesma amostra, garantindo que todos considerem a mesma área de contagem.

5.1.3. Contagem assistida por computador - CAC

Para assistir especialistas e leigos na realização da contagem de células vermelhas o método de contagem assistida por computador foi desenvolvido.

A contagem das hemácias auxilia no diagnóstico de doenças servindo, por exemplo, como indicador de anemia quando da redução na quantidade das mesmas.

CAC é um método semiautomático que conta as células presentes na imagem, então a imagem focada em F1, com as células contadas marcadas (e.g., marcas vermelhas), é apresentada ao usuário que pode corrigir a contagem deletando artefatos contados ou incluindo as células que não foram contadas. Depois das correções realizadas, as imagens processadas incluindo coordenadas das células e o valor da contagem são salvas para comparação posterior.

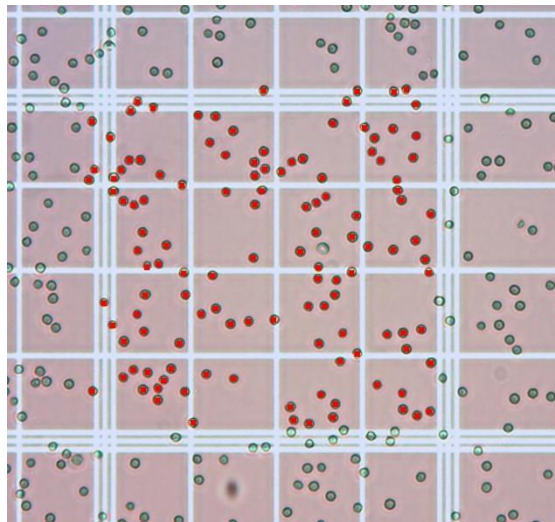
As células contadas são marcadas em tempo real para evitar a ocorrência

de células não contadas ou contadas duplamente. Este feedback instantâneo permite ao usuário corrigir prontamente uma marcação que foi adicionada equivocadamente para uma célula ou uma marcação que foi esquecida para uma célula. Por prover tal controle de erros, este método gera resultados mais confiáveis quando comparado com os resultados dos métodos manuais típicos usados em laboratórios onde nenhuma imagem é registrada.

Um exemplo de imagem resultante desta contagem pode ser visto na Figura 20, onde o marcador utilizado para indicar as células contadas é um quadrado vermelho.

A contagem foi realizada por um profissional experiente e dois colaboradores leigos onde também foi seguido o protocolo recomendado pelo ICSH (ENGLAND et al., 1994).

Figura 20 – Marcas vermelhas identificam as células contadas com o software para contagem assistida por computador. 200X



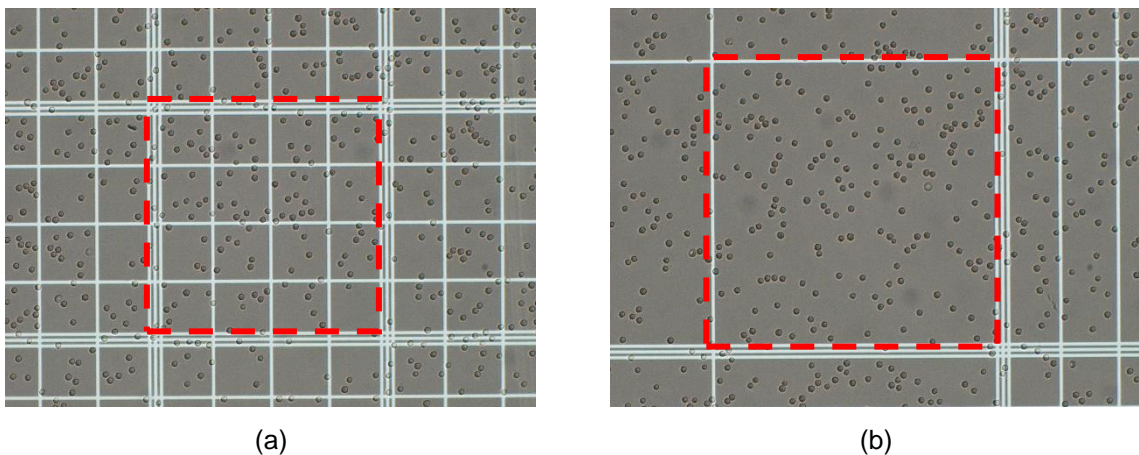
Considerando os dois grupos de imagens para as regiões de interesse A e B, os resultados para a contagem assistida por computador (CAC) nestas áreas diferentes serão chamados de CAC A e CAC B. As áreas das regiões A e B podem ser vistas na Figura 15.

5.1.4. Contagem automática baseada em imagens – CABI

Foram desenvolvidos métodos e algoritmos para identificar e quantificar automaticamente hemácias presentes nas amostras. Imagens das amostras em câmara de Neubauer são processadas e as hemácias são identificadas e contadas automaticamente. A solução contempla múltiplas espécies de animais silvestres.

Para a realização da contagem das células presentes em um determinado quadrante, é necessário selecionar a região de interesse na imagem. A seleção desta área é feita pelo usuário com o uso do mouse. Nos quadrantes internos, 1A, 2A, 3A, 4A e 5A, esta área é de $1/25 \text{ mm}^2$ e para os quadrantes externos, 1B, 2B, 3B e 4B, esta área é de $1/16 \text{ mm}^2$. Isto é necessário para que a área contada seja conhecida permitindo ao final das contagens calcular o número de células em 1 mm^2 . A Figura 21 apresenta a região de interesse para os quadrantes internos e externos.

Figura 21 – Região de interesse para contagem: (a) quadrante 3A; (b) quadrante 1B. 200X

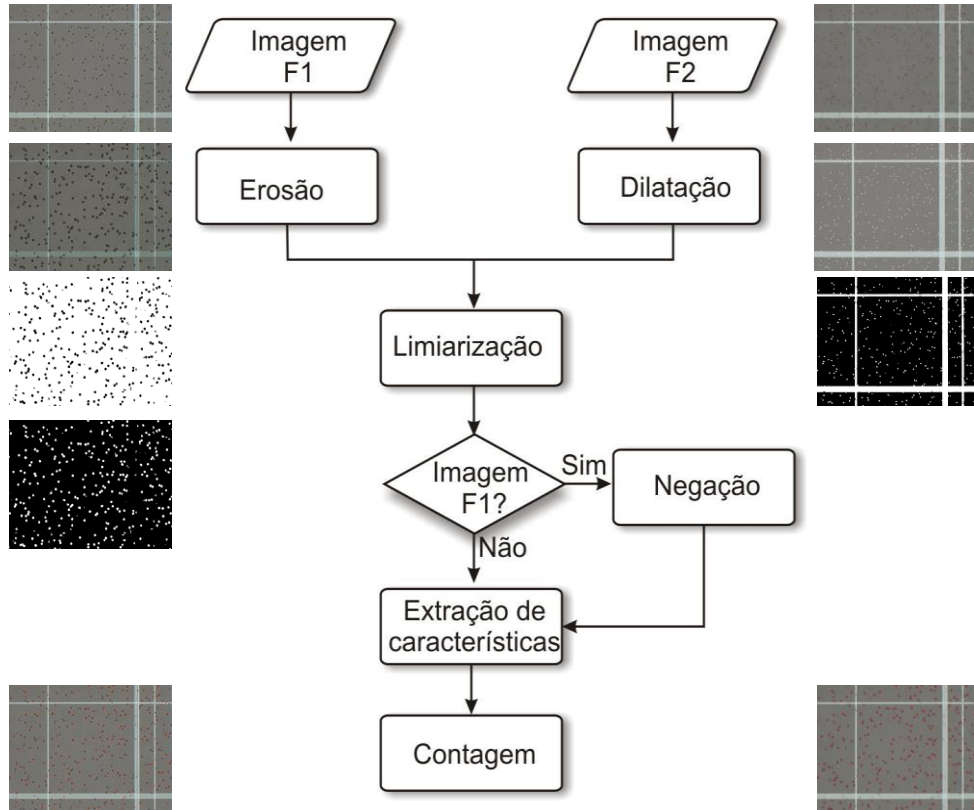


O algoritmo desenvolvido faz uso de duas imagens com diferentes contrastes capturados em duas configurações focais F1 e F2 para realizar a contagem das células. A combinação dos resultados das imagens F1 e F2, permite otimizar a identificação de células que estão sobre as linhas do retículo visto que adquirem aspectos diferentes em cada foco. As etapas do algoritmo podem ser vistas na Figura 22 (MAURICIO; SCHNEIDER; CORREIA DOS SANTOS, 2010).

Inicialmente aplica-se duas vezes o operador morfológico erosão à imagem obtida para o foco 1 e o operador de dilatação à imagem obtida para o foco 2. O

elemento estruturante usado nas duas operações, erosão e dilatação, pode ser visto na Figura 23.

Figura 22 – Etapas do algoritmo de contagem automática.

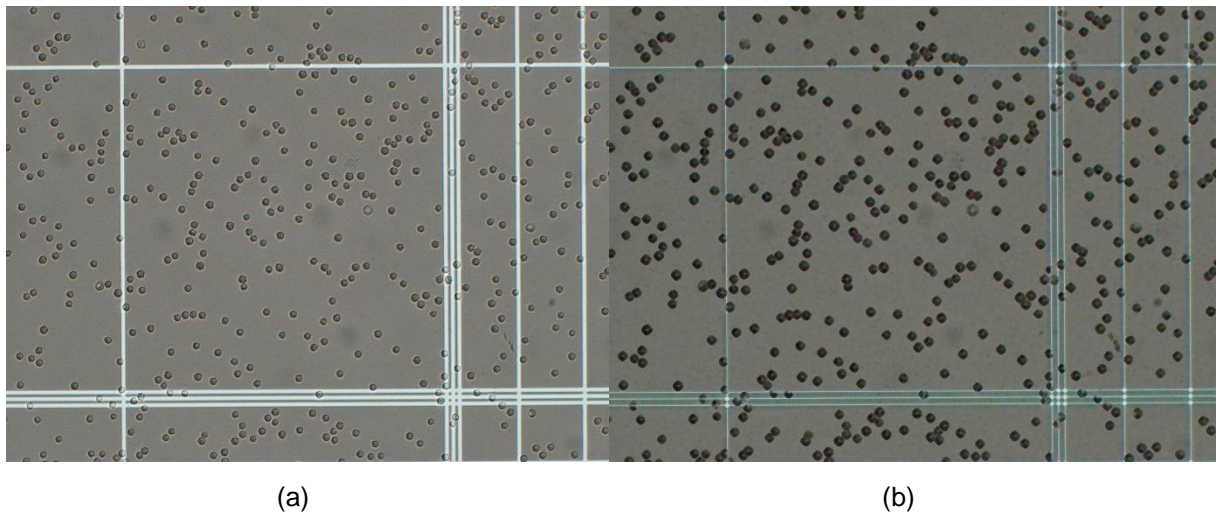


A erosão é aplicada com o objetivo de evidenciar as células que estão sobrepostas às linhas do reticulado de Neubauer conforme pode ser visto na Figura 24. Isto se torna necessário, pois nestes casos de sobreposição estas células adquirem um aspecto mais "claro" que as demais, dificultando o processo de segmentação. Na Figura 24 (b) é possível perceber que aplicação da erosão causa um efeito indesejado que é a fusão de células que encontram-se muito próximas umas das outras. O uso da imagem obtida para o foco 2 na contagem, onde as células que foram fundidas na imagem de foco 1, apresentam-se separadas, resolve este problema.

Figura 23 – Elemento estruturante utilizado na Erosão e na Dilatação.

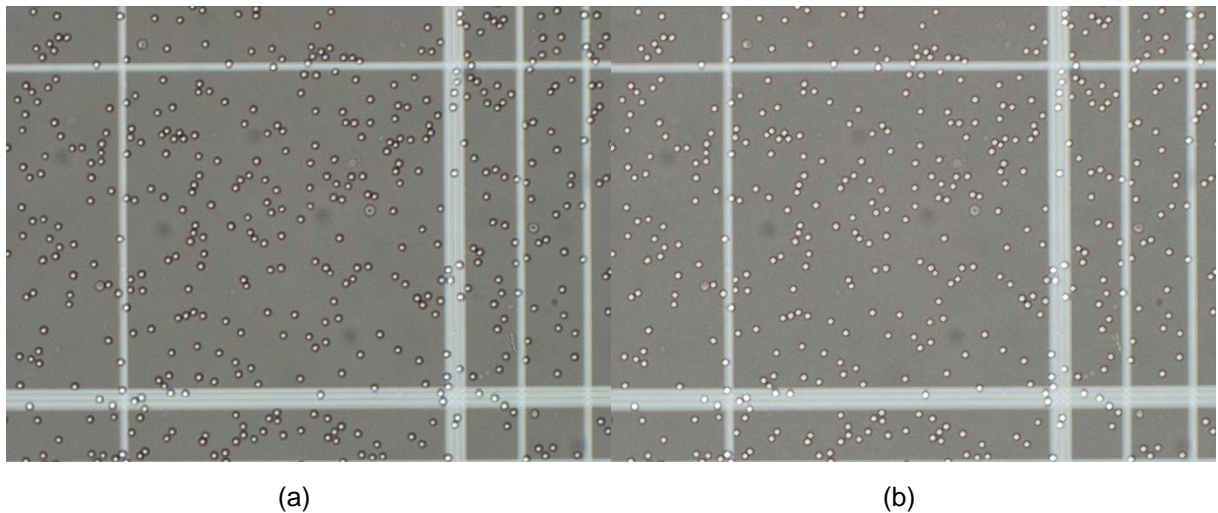
0	0	0	1	0	0	0
0	0	1	1	1	0	0
0	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	0
0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	1	0	0	0

Figura 24 – Erosão: (a) Imagem no foco 1 e (b) Resultado da erosão. 200X



O operador de dilatação é aplicado na imagem obtida para o foco 2 com o objetivo de evidenciar as áreas claras da imagem, neste caso a parte interior das células, isto pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 – Dilatação: (a) Imagem no foco 2 e (b) Resultado da dilatação. 200X



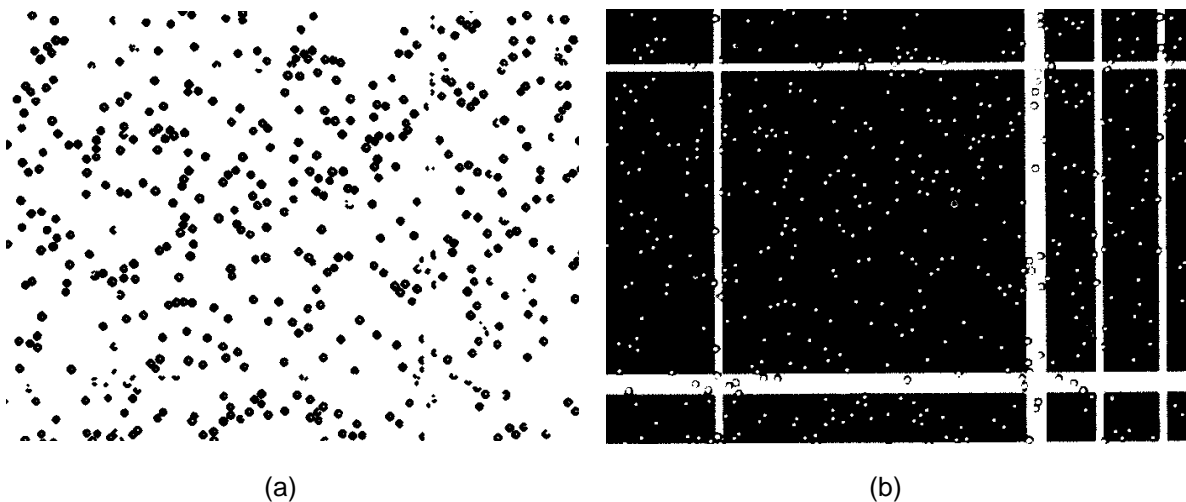
Na sequência, as imagens são submetidas a uma limiarização para obter imagens binárias nas quais as células apresentam-se isoladas do fundo. Matematicamente a limiarização pode ser definida como:

$$g(x,y) = \begin{cases} 1 & \text{se } f(x,y) > T \\ 0 & \text{se } f(x,y) \leq T \end{cases}$$

Onde: $g(x, y)$ é a imagem binária resultante, $f(x, y)$ é a imagem original e T é o valor do limiar escolhido.

O valor do limiar foi definido empiricamente para cada imagem com o intuito de maximizar o número de células e minimizar o ruído na imagem binária resultante. O limiar assume valores entre 0.7 e 0.95 para as imagens do foco 1 e 0.45 e 0.6 para as imagens do foco 2 em uma escala normalizada. No caso da imagem obtida para o foco 2, onde as células apresentam-se com o interior mais claro, a imagem binária resultante apresenta fundo preto e objeto (células) branco. No entanto, a imagem obtida para o foco 1 erodida, que apresenta células mais escuras que o fundo, resulta em uma imagem binária com fundo branco e objeto (células) preto. Sendo assim, esta imagem foi complementada (negação) para adequá-la às etapas subsequentes, onde as duas imagens binárias são processadas de maneira idêntica. A Figura 26 (a) apresenta a imagem binária obtida para o foco 1 e (b) para o foco 2.

Figura 26 – Imagem Binária: (a) foco 1 e (b) foco 2.



A etapa seguinte, Extração de características, consiste na localização de todas as regiões conexas presentes na imagem binária, obtendo para cada uma delas as coordenadas do centro e sua área em pixels. Para obter-se um valor padrão de área, que servirá de referência para classificar uma região como célula, ordena-se um vetor com todas as áreas e toma-se o valor central do vetor como área padrão, esta operação é conhecida como mediana. Matematicamente:

$$A_p = \text{mediana}\{V(i)\}$$

Onde: A_p é a área padrão, V é o vetor com as áreas em pixels e i é o tamanho do vetor.

A mediana de um conjunto de valores é tal que metade dos valores do conjunto são menores ou iguais à mediana e a outra metade são maiores ou iguais, ou seja, em um vetor ordenado a mediana é o valor da posição central (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Esta abordagem é viabilizada pelo fato de que o maior número de regiões na imagem refere-se às hemácias e, após a ordenação do vetor os valores presentes na região central do vetor pertencem às regiões correspondentes às células. Uma vantagem desta abordagem está no fato de que não há necessidade de conhecimento prévio do tamanho das células para escolher um valor padrão para a contagem, visto que o algoritmo utiliza as próprias células presentes na imagem para a escolha deste valor. Esta abordagem viabiliza desta forma a contagem para múltiplas espécies, adaptando-se ao tamanho das células de cada espécie analisada selecionando a área padrão a partir das próprias células presentes na imagem.

Na etapa **Contagem**, usando o valor de área padrão como base para a identificação das células, avaliam-se todas as regiões para encontrar quais as que tem áreas que se aproximam deste valor padrão. Quando uma região possui área compatível com o valor padrão, então ela é marcada como célula e adicionada à contagem. Esta compatibilidade considera ainda uma margem de tolerância em relação ao valor da área. Observando os testes realizados, definiu-se empiricamente uma margem de tolerância de 50% de variação no valor da área de modo a classificar o maior número de células presentes de forma que toda região na faixa $0.5 A_p$ até $1.5 A_p$ é considerada uma célula para compensar a variação no tamanho das células e a presença de artefatos do retículo.

A lógica usada para classificação das células é apresentada na Figura 27:

Figura 27 – Lógica para classificação das regiões na contagem automática.

<pre> Se (área <= áreaPadrão+tolerância) e (área >= áreaPadrão-tolerância) então Marcar região como célula Senão Descartar região </pre>
--

Usando as coordenadas do centro, o algoritmo marca (vermelho) na imagem, as células que foram incluídas na contagem. O resultado final é obtido fazendo a união das duas contagens, no foco 1 e 2.

A ferramenta Matlab¹ foi utilizada para o desenvolvimento do algoritmo e para a realização dos testes.

Os resultados para a contagem automática baseada em imagens serão chamados de CABI A e CABI B, representando respectivamente os resultados para as regiões de interesse A e B. As áreas das regiões A e B podem ser vistas na Figura 15.

¹The MathWorks, Inc., Massachusetts, EUA

6. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados para amostras de animais silvestres e os resultados dos testes de validação relativos ao objetivo geral seguidos de discussões sobre os mesmos.

6.1. Animais Silvestres

Para avaliar o desempenho dos métodos de contagem diversos testes foram realizados. O primeiro teste, realizado por um profissional experiente, foi feito com o método manual, e a seguir com o método de contagem assistida por computador e os respectivos resultados armazenados. Por fim, o teste da contagem automatizada foi realizado através do algoritmo.

No primeiro teste, usando o método manual, apenas os quadrantes 1A, 2A, 3A, 4A e 5A (Quadrantes internos) foram contados pois os quadrantes 1B, 2B, 3B e 4B (Quadrantes externos) não são adequados para contagem de material com alta concentração de células.

Tabela 2. Contagem Manual, Assistida e Automática - Jaguatirica.

Jaguaririca		Câmara 1	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	5.510.000	6.100.000	5.220.000
Quadrantes externos		6.064.000	5.712.000
Jaguaririca		Câmara 2	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	5.230.000	6.350.000	5.460.000
Quadrantes externos		5.688.000	5.504.000
Jaguaririca		Câmara 3	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	5.190.000	6.080.000	5.330.000
Quadrantes externos		6.128.000	5.968.000

No método assistido por computador, a contagem das amostras foi realizada por outro profissional experiente, e os resultados obtidos foram adotados

como referência para efeito de comparação com os demais resultados e métodos de contagem. Os resultados das contagens dos três testes para a amostra de sangue de Jaguatirica são apresentados na Tabela 2, para o Macaco Prego na Tabela 3 e para o Quati na Tabela 4. Os valores apresentados nas tabelas correspondem ao número de hemácias/mm³. O detalhamento das contagens por quadrante para as amostras de animais silvestres pode ser visto no Apêndice A.

Tabela 3. Contagem Manual, Assistida e Automática - Macaco Prego

Macaco Prego		Câmara 1	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	3.000.000	3.320.000	3.050.000
Quadrantes externos		3.288.000	3.352.000
Macaco Prego		Câmara 2	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	2.600.000	2.690.000	2.440.000
Quadrantes externos		2.696.000	2.664.000

Tabela 4. Contagem Manual, Assistida e Automática - Quati

Quati		Câmara 1	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	3.300.000	3.770.000	3.460.000
Quadrantes externos		3.848.000	3.808.000
Quati		Câmara 2	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	3.300.000	3.770.000	3.390.000
Quadrantes externos		3.640.000	3.432.000
Quati		Câmara 3	
	Manual	Assistida	Automática
Quadrantes internos	3.130.000	3.500.000	3.160.000
Quadrantes externos		3.928.000	3.912.000

Para os quadrantes internos a fórmula aplicada para obter o número de hemácias/mm³ é a seguinte:

$$\text{hemácias/mm}^3 = (\text{hemácias nos quadrantes 1A, 2A, 3A, 4A e 5A}) \times 5 \times 10 \times 200$$

Nos quadrantes externos a fórmula muda para considerar os valores dos quatro quadrados de 1/16mm²:

$$\text{hemácias/mm}^3 = (\text{hemácias nos quadrantes 1B, 2B, 3B e 4B}) \times 4 \times 10 \times 200$$

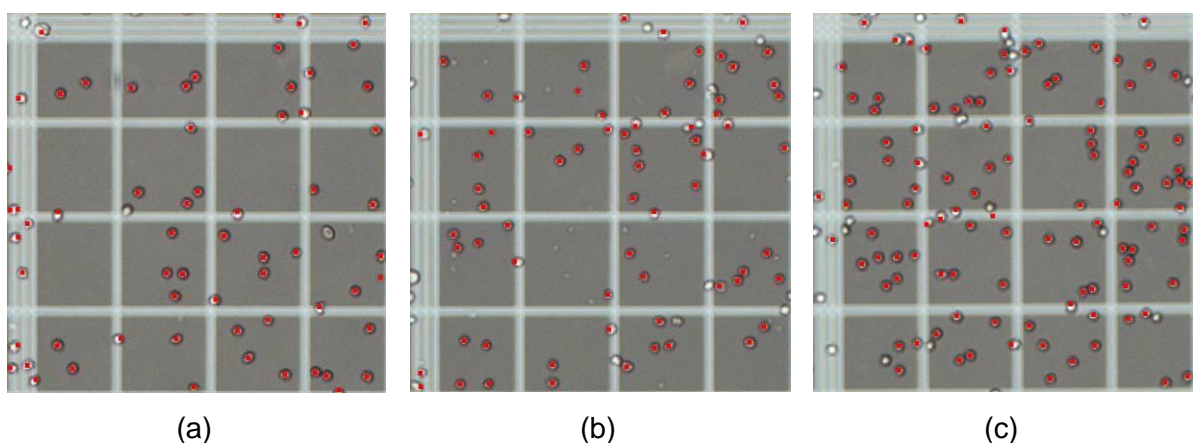
Na contagem automatizada e também na assistida, foram geradas imagens com os resultados, o que permitiu, além da comparação numérica destes, realizar a comparação visual dos mesmos. Tal fato contribuiu para a análise do comportamento do algoritmo de contagem automatizada, uma vez que possibilitou a inspeção das imagens resultantes para identificar falhas no processo de contagem das células, bem como suas respectivas causas.

Em relação à contagem assistida, que foi adotada como referência, nos quadrantes internos o erro percentual médio para a contagem manual é de 12,4% enquanto para a contagem automatizada é de 10,9%.

No uso de técnicas manuais com câmaras para contagem é comum a variação dos resultados em até 10% (LEHNER, 2007). No caso da contagem visual existem diversos fatores, inerentes ao método, que influenciam diretamente nos resultados. Quanto à contagem automatizada, através da análise das imagens com os resultados geradas pelo algoritmo, foi possível constatar que os erros são causados pela sobreposição de células com as linhas do retículo, dificultando a segmentação das mesmas pelo algoritmo. Este fato pode ser observado na Figura 28.

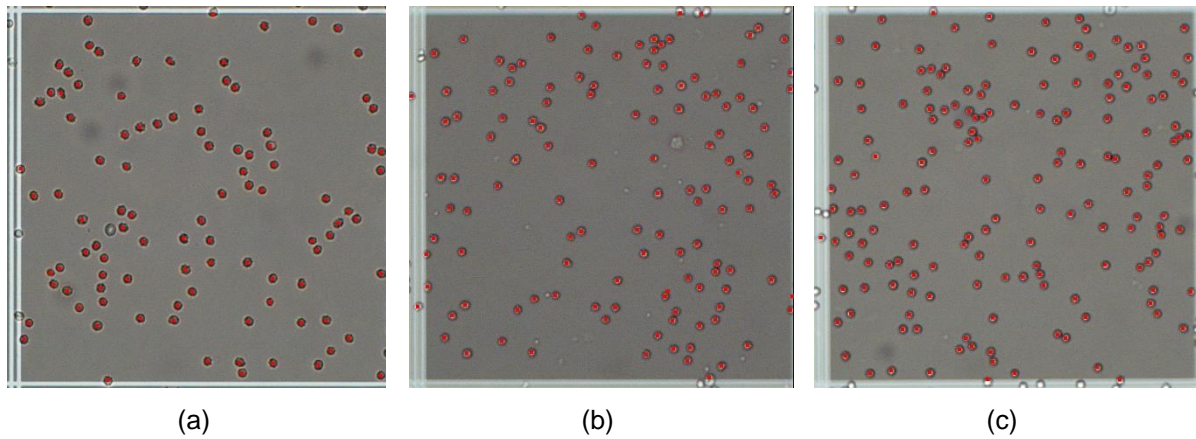
Um exemplo do resultado dos testes realizados nos quadrantes internos pode ser visto nas três imagens da Figura 28. Os resultados da contagem nestas imagens são 63 células, 68 células e 109 células.

Figura 28 - Marcação das hemácias contadas: (a)“Macaco prego=63”; (b)“Quati=68”; (c) “Jaguaririca=109”. 200X



A Figura 29 apresenta resultados da contagem automática nos quadrantes externos.

Figura 29 - Marcação das hemácias contadas: (a) "Macaco prego=104"; (b) "Quati=126"; (c) "Jaguaririca=163". 200X



A Tabela 5 apresenta a correlação de Pearson para os três métodos aplicados para as amostras de sangue de animais silvestres.

Tabela 5. Correlação de Pearson entre os três métodos aplicados em amostras de sangue de animais silvestres.

	CM ^a	CAC ^b	CABI ^c
CM ^a	1.000	0.954	0.940
CAC ^b	0.954	1.000	0.989
CABI ^c	0.940	0.989	1.000

^a Contagem Manual

^b Contagem assistida por computador

^c Contagem automática baseada em imagens

Nos quadrantes externos, o erro percentual médio para a contagem automatizada é de 3%. A redução deste valor em relação ao erro nos quadrantes internos se deve ao fato de que nestes quadrantes, pela menor presença de linhas do retículo, a segmentação das células produz melhores resultados, isto pode ser visto comparando a Figura 30 com a Figura 31.

Figura 30 - Distribuição dos resultados: Contagens nos quadrantes internos.

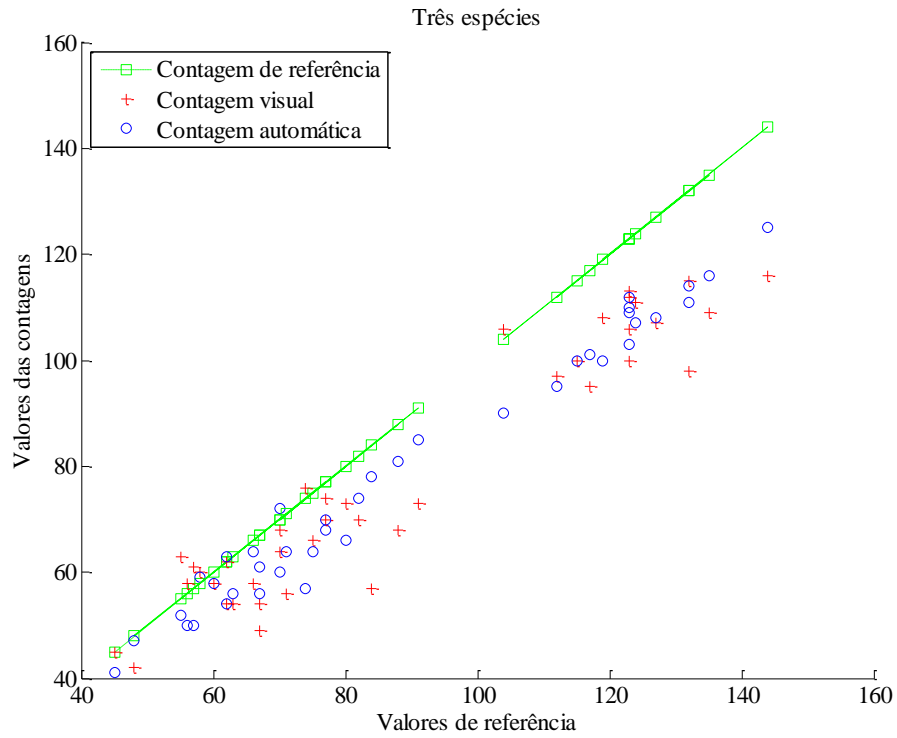
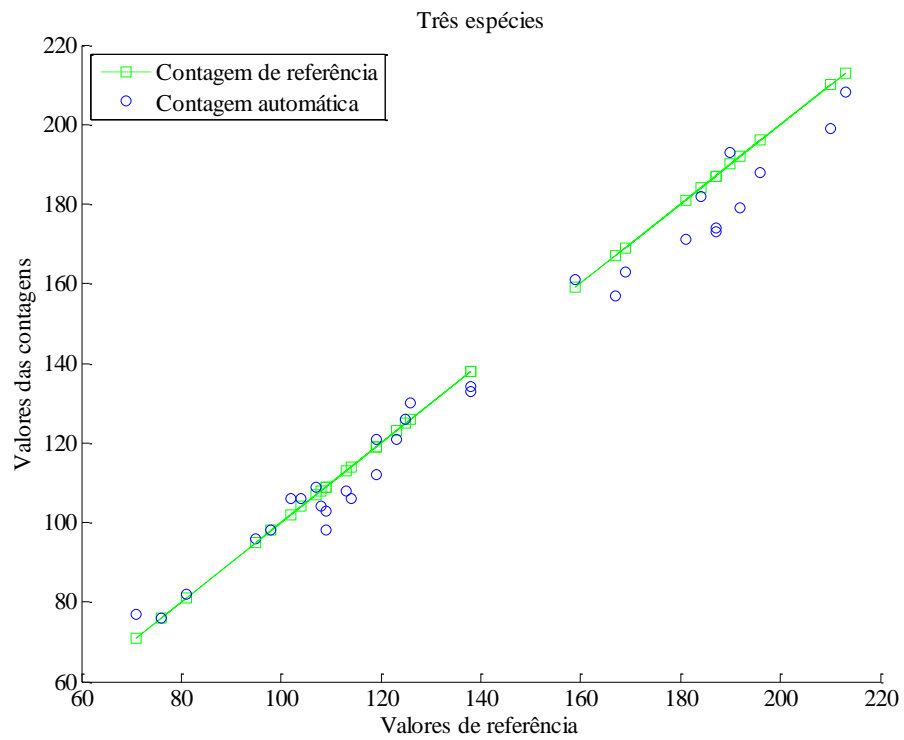


Figura 31 - Distribuição dos resultados: Contagens nos quadrantes externos.



Os resultados da análise das amostras de animais silvestres foram publicados em um artigo apresentado em 2010. Informações sobre o referido artigo

está disponível no Apêndice B – Dados do artigo publicado nos proceedings do “32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society-EMBC”.(MAURICIO; SCHNEIDER; CORREIA DOS SANTOS, 2010)

6.2. Animais domésticos

Os resultados dos testes com amostras de animais silvestres indicam a viabilidade da abordagem, porém, para poder comparar os resultados da contagem automática baseada em imagens com os resultados de um contador automático convencional foi necessário utilizar amostras de espécies animais para as quais existam contadores automáticos convencionais disponíveis.

Para a validação do sistema foram usadas amostras de sangue de caninos e equinos por serem espécies frequentemente presentes em clínicas veterinárias. O uso de amostras de animais silvestres para tal fim se torna inviável pela dificuldade de obtenção de amostras em quantidade adequada e pela indisponibilidade de contadores automáticos convencionais capazes de realizar a contagem de células de sangue de animais silvestres. Pela frequência de caninos e equinos na Clínica do Hospital Veterinário da FMVZ-Unesp, a clínica possui equipamentos automáticos calibrados para a contagem de células de amostras de sangue destes animais, isto viabiliza o uso dos resultados destes equipamentos como valores de referência para a validação do sistema.

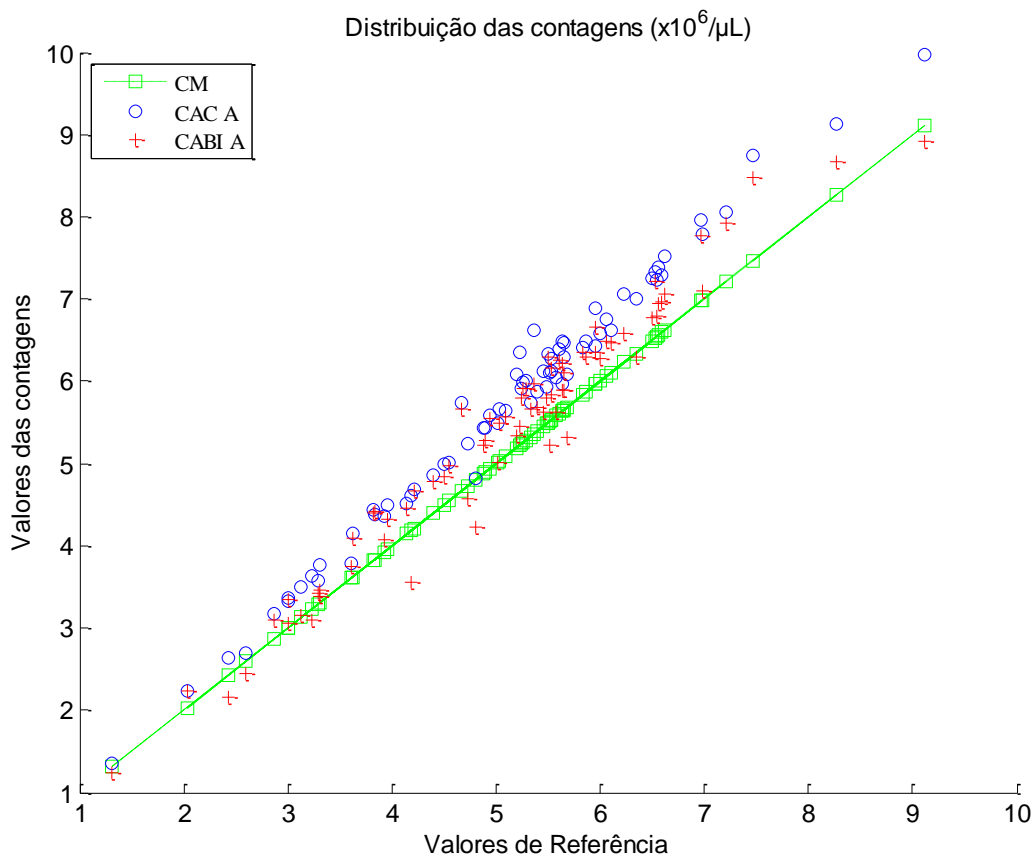
Foram realizados diversos testes usando métodos diferentes para a validação. A contagem foi realizada usando quatro métodos diferentes: contador automático de células (Hemascreen 18, Ebram, São Paulo, Brazil); método manual; contagem assistida por computador e contagem automática baseada em imagens.

Tabela 6. Intervalos de referência para contagem RBC das espécies analisadas.

Animal	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)
<i>Canis familiaris</i>	5.50-8.50
<i>Equus caballus</i>	6.10-11.0
<i>Leopardus pardalis</i>	4.07-6.16
<i>Cebus apella</i>	3.47-5.48
<i>Nasua nasua</i>	3.88-5.35

Os testes foram realizados com a aplicação dos quatro métodos citados no capítulo 5. A correlação e os gráficos de distribuição e diferença para os quatro métodos são apresentados. A Figura 32 apresenta a distribuição da contagem para três métodos, i.e., contagem manual, contagem automática baseada em imagens e contagem semiautomática.

Figura 32 – Contagem manual comparada com os resultados das contagens automática e semiautomática.



A Tabela 7 apresenta a correlação de Pearson para as contagens realizadas por um profissional experiente e dois colaboradores leigos usando a contagem assistida por computador.

Tabela 7. Correlação de Pearson entre três observadores realizando a contagem assistida por computador

Profissional	Leigo1	Leigo2
1.000	0.999	0.999

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram uma correlação muito alta para os três operadores (Profissional, Leigo1 e Leigo2), portanto a média da contagem assistida por computador foi tomada para comparação com os outros métodos.

O resultado da contagem assistida por computador comparado com o resultado da contagem automática nas regiões A e B é apresentado nas Figuras Figura 33 e Figura 34 respectivamente. A Tabela 8 apresenta a correlação entre os quatro métodos. A região A é usada para a contagem manual, assistida por computador e automática baseada em imagens.

Figura 33 – Contagem assistida por computador comparada com os resultados da contagem automática. Resultados para a região A.

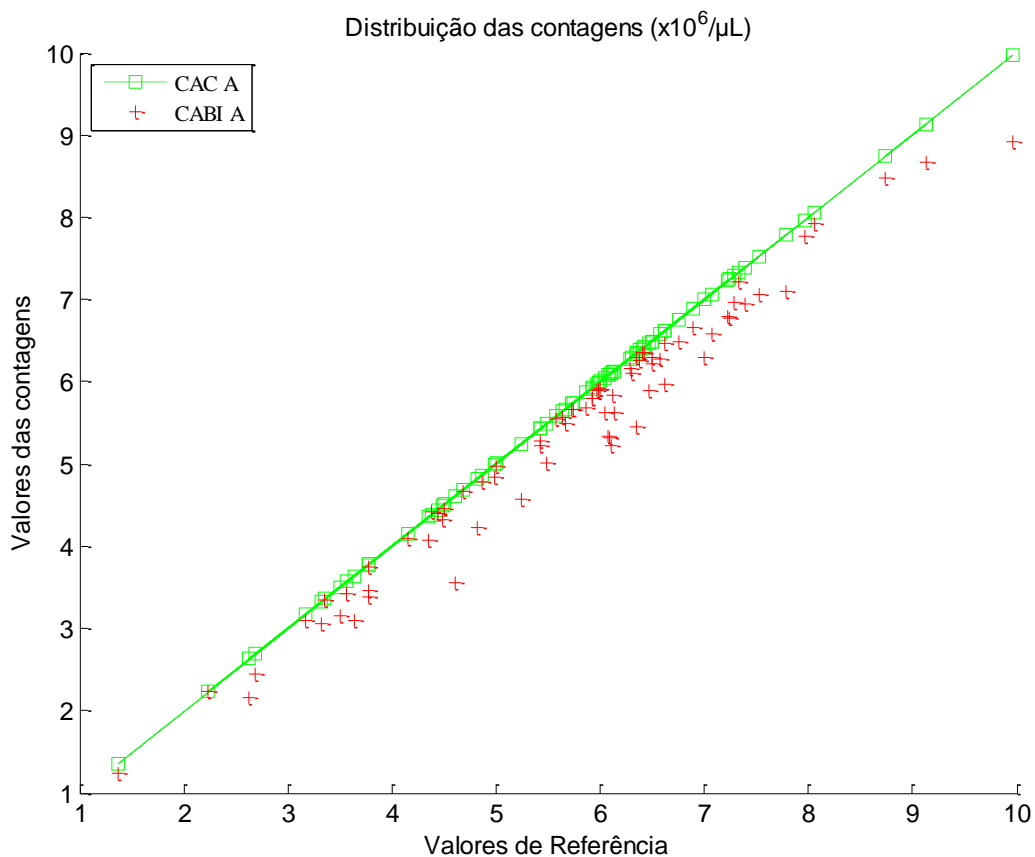


Figura 34 – Contagem assistida por computador comparada com os resultados da contagem automática. Resultados para a região B.

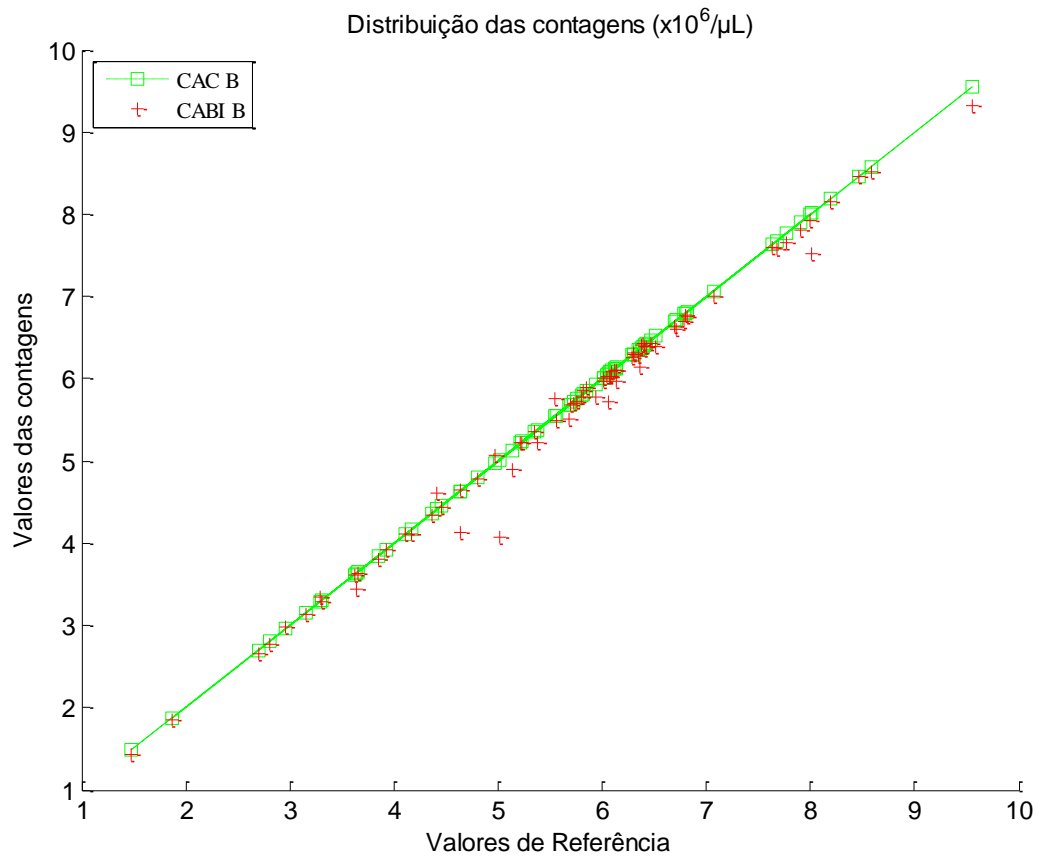


Tabela 8. Correlação de Pearson entre os quatro métodos para amostras de sangue de animais domésticos.

	CM ^a	CAC ^b	CABI ^c	CAI ^d
CM ^a	1.000	0.994	0.979	0.958
CAC ^b	0.994	1.000	0.986	0.953
CABI ^c	0.979	0.986	1.000	0.944
CAI ^d	0.958	0.953	0.944	1.000

^a Contagem Manual

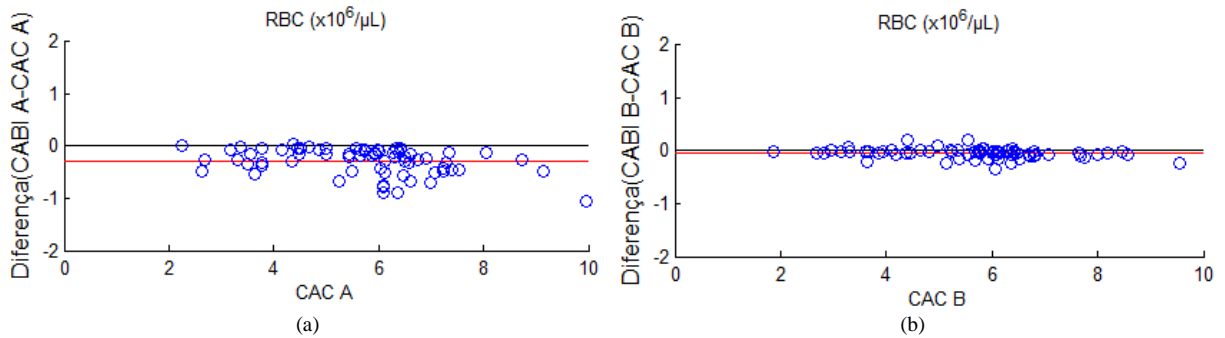
^c Contagem automática baseada em imagem

^b Contagem assistida por computador

^d Contagem automática por impedância

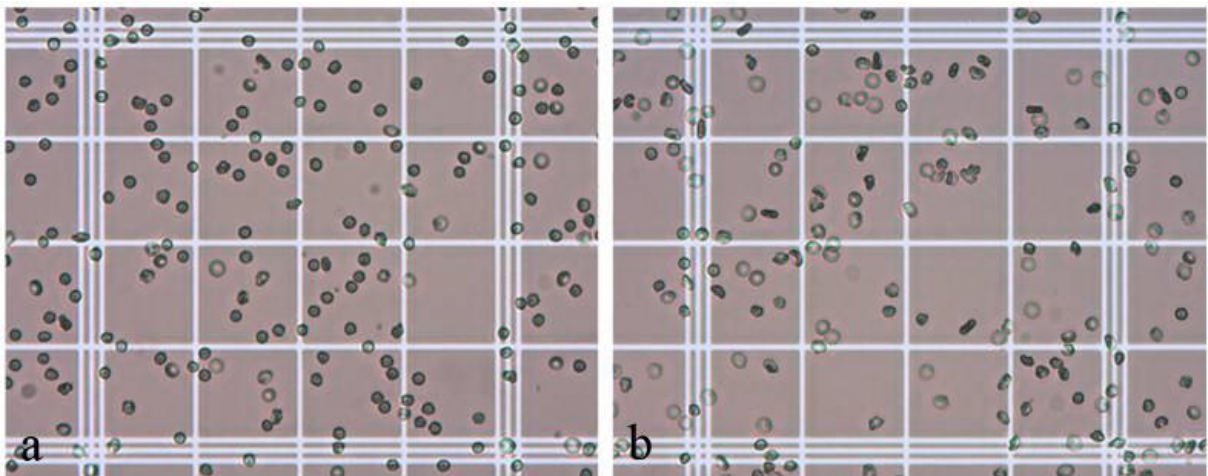
Gráfico de diferenças para os métodos CM, CAC, CABI são apresentados na Figura 35(a) e Figura 35 (b).

Figura 35 – Gráfico de diferenças para contagem RBC na região de interesse A(a) e região de interesse B(b). CABI e CAC com amostras de silvestres e domésticos, sem outliers.



Algumas amostras apresentaram alterações de qualidade durante o registro das imagens. Um exemplo de alteração pode ser visto na Figura 36. Na Figura 36 (a), a maioria das células está de acordo com o esperado e na Figura 36 (b) várias células apresentaram alterações, tornando-se maiores e mais transparentes.

Figura 36 – (a) células com aparência normal (b) células alteradas (maiores e transparentes) tiradas de parte das regiões de interesse 1A, 2A. 200X

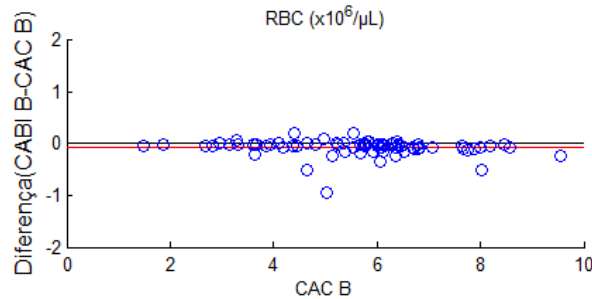


O impacto do uso de amostras com tais alterações pode ser visto no gráfico de diferenças na Figura 37. Três amostras adicionais que apresentaram alterações são consideradas, resultando em três outliers, todos abaixo da linha identidade.

Os resultados da análise das amostras de animais domésticos foram publicados em um artigo no periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”. Detalhes da publicação podem ser vistos no Apêndice C – Dados do artigo

publicado no periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”. (MAURICIO et al., 2017)

Figura 37 – Gráfico de diferenças para contagem RBC na região de interesse B. Contagens CABI e CAC de amostras de silvestres e domésticos, com três outliers.



6.3. Considerações Gerais/Discussão

O método manual de contagem em microscópio é susceptível a erros, devido a diversos fatores, principalmente os relacionados ao profissional que realiza tal contagem (experiência prática, condições físicas, concentração, ...). Portanto, a confiabilidade dos resultados obtidos depende da habilidade/experiência de quem conta. A contagem mesmo sendo feita por um profissional habilitado apresenta resultados diferentes, devido à subjetividade inerente ao procedimento de contagem (e.g., contar células que já foram contadas e/ou deixar de contar as que ainda não foram), pois não se dispõe de uma maneira de identificar as células que já foram contadas. Outro fato que prejudica este método está relacionado à ausência de imagens geradas e/ou armazenadas durante o processo de contagem. Isto torna praticamente impossível a realização de uma nova contagem (recontagem) ou uma avaliação/comparação da mesma amostra, nas mesmas condições de diluição, preenchimento da câmara, entre outras.

O método manual é usado para a contagem de hemácias em hemogramas de animais silvestres em vários projetos de pesquisa recentes (GOLDSTEIN et al., 2011; INOUE et al., 2012; MILLER et al., 2013; NORBERG et al., 2011; ROSTAL et al., 2012; SANCHES et al., 2013; SANTOS et al., 2013), e é frequentemente usado como o padrão de referência. O método manual foi usado como referência na Figura 32 para a comparação com os métodos CAC e CABI onde é possível perceber que

há uma boa concordância entre os três. A Tabela 7 e a Tabela 8 apresentam os coeficientes da correlação de Pearson. Em todos os casos, a correlação é superior a 0,9, ou seja, todos possuem uma correlação muito forte.

Na comparação de diferentes métodos para a contagem de hemácias, é importante encontrar um único padrão de referência. Esta é uma tarefa importante e difícil, pois cada método possui vantagens e limitações. Portanto, para selecionar um método para referência, diversos fatores foram considerados.

As contagens manuais são afetadas por erros humanos (BECKER; MORITZ; GIGER, 2008). Logo, comparar os resultados do método CABI com o CM, traria mais incertezas para o processo de comparação. Compará-los com os resultados da contagem por impedância, também poderia incluir uma variação da preparação da amostra, devido ao fato que a preparação da amostra é automática neste método em oposição a preparação manual para todos os outros métodos discutidos (i.e., métodos CM, CAC, CABI). Preparações diferentes de amostras podem levar a diferentes resultados devido a pequenas variações na diluição do sangue e do preenchimento da câmara de Neubauer. Considerando-se todos estes fatores o método de contagem assistida por computador foi adotado como padrão de referência.

O coeficiente de correlação de Pearson para o método CM é melhor para o CAC do que para o CAI (i.e., $r = 0.994$ e $r = 0.958$ respectivamente)(Tabela 8). Adicionalmente, todos os três métodos da Figura 32 são clinicamente válidos pois o desvio entre eles é pequeno. O método CAC reduz os erros humanos na contagem provendo ao usuário o auxílio de uma interface gráfica que facilita a documentação e a diferenciação de células contadas e não contadas e permite a correção em tempo real de possíveis erros.

Uma causa das diferenças normalmente notadas entre diferentes observadores na contagem manual, mesmo com a adoção do procedimento padrão de contagem manual, deve-se ao fato que é desafiador levar todas as pessoas a considerar as mesmas células como válidas em uma dada região de interesse. Mesmo com esta dificuldade, três diferentes observadores (e.g. profissional experiente e dois colaboradores leigos) usando o método CAC para contar as células, produziram resultados com correlação muito forte, $r \geq 0.99$, como mostrado na Tabela 7. Este resultado demonstra que o método CAC apresenta potencial para evitar erros comuns na contagem manual, permitindo o registro dos resultados com a possibilidade de

verificação posterior da contagem, o que não é possível no método manual onde nenhum registro visual é feito.

Em relação à contagem assistida por computador, o uso de marcadores para identificar as células contadas facilita o procedimento de contagem, bem como aumenta a confiabilidade dos resultados, uma vez que minimiza os erros decorrentes da contagem dúbia. Ao usuário cabe apenas marcar as células a serem contadas, seguindo o mesmo procedimento padrão empregado na contagem visual em microscópio, recomendado pelo ICSH - International Council for Standardization in Haematology (ENGLAND et al., 1994). Neste método, como são geradas imagens das contagens dos quadrantes para cada amostra, torna-se possível conferir e/ou avaliar uma determinada contagem ou mesmo compará-la com outra.

As correlações CM-CAI, CAC-CAI e CABI-CAI foram de 0.958, 0.953 e 0.944, respectivamente. Quando a mesma preparação da amostra foi usada, como no caso dos métodos CM, CAC e CABI, resultados similares para a correlação foram encontrados.

Comparando-se os resultados das regiões de interesse A e B, nota-se uma melhoria quando utilizada a região de interesse B (Figura 33, Figura 34 e Figura 35). A inspeção visual das imagens para os resultados CABI, indica que a presença de linhas do retículo nas imagens pode levar a perda de algumas células na contagem. Estes indícios são confirmados no gráfico de diferenças, onde imagens com menor número de linhas do retículo apresentam resultados melhores do que imagens com mais linhas (Figura 35(a) e Figura 35(b)).

Durante os experimentos, três amostras apresentaram alterações no tamanho, opacidade e forma das células. Estas amostras não foram consideradas na Figura 35(a) e Figura 35(b). As alterações foram detectadas por inspeção visual. As alterações e resultados para estas amostras podem ser vistos na Figura 36 e na Figura 37. Este tipo de inspeção visual pode prover informações adicionais para o clínico que pode ser útil no processo de diagnóstico, mas esse resultado também indica uma possível desvantagem do método CABI pois células anormais podem levar a erros maiores. Erros na faixa apresentada na Figura 37 (e.g., 0.94 milhões de células por μL em uma contagem de 5.02 milhões de células por μL) representa um erro máximo de 18%, que é maior do que o erro conhecido para a contagem manual (LEHNER; GREVE; CASSENS, 2007). Quando somente amostras normais são usadas, o maior erro percentual é 5% (Figura 35 (b)).

Considerando-se que o objetivo principal do método proposto é substituir ou auxiliar a contagem manual, é importante observar que a correlação entre a CM e CABI é $r=0.940$ e 0.979 (Tabela 5 e Tabela 8 respectivamente) levando a resultados confiáveis e clinicamente úteis. Adicionalmente, para o método CAC a correlação cresce para 0.994 . O esforço adicional, para o uso do método CAC, refere-se a incluir um observador humano para corrigir a contagem de poucas células depois que o método CAC apresenta a imagem preliminar com as células contadas. Este procedimento é auxiliado pela navegação do usuário na interface gráfica.

7. Conclusão

7.1. Considerações iniciais

Os resultados indicam que ambos os métodos desenvolvidos, automático e semiautomático, podem prover resultados clinicamente úteis, melhorando a eficiência e a confiança nos resultados especialmente em clínicas que trabalham com múltiplas espécies de animais visto que o método é auto adaptável para variações no tamanho e quantidade de células. A Tabela 6 mostra que as espécies usadas nos testes apresentam uma faixa de $3.47-11.0 \times 10^6/\mu\text{L}$, este intervalo habilita o método a contar as células de várias espécies silvestres. Os métodos são ainda capazes de registrar as imagens, o que permite boa documentação dos exames e recontagens posteriores quando necessário.

Considerando-se que o ambiente para o qual a solução foi desenvolvida já possui uma metodologia e ferramentas estabelecidas, procurou-se guiar a pesquisa e o desenvolvimento desta solução pela simplicidade, procurando sempre que possível manter os procedimentos e equipamentos já em uso. Desta forma a adoção da solução desenvolvida encontrará menos resistência e se dará com relativa facilidade.

7.2. Principais resultados e contribuições

Durante o desenvolvimento do trabalho vários resultados foram produzidos. A seguir são listadas as principais contribuições:

- **Protocolo para captura de imagens**

Um documento descritivo para padronizar a captura de imagens foi criado para uniformizar os resultados dos trabalhos de captação de imagens de

amostras de sangue em câmaras de contagem. Destaca-se a padronização do registro de imagens em dois níveis focais (F1 e F2) onde uma mesma amostra gera duas imagens com características de contraste diferenciadas oferecendo maiores opções para o processamento digital da imagem. A possibilidade de gerar imagens com diferentes contrastes beneficia não somente este trabalho. Trabalhos que façam uso de imagens microscópicas com partículas em suspensão podem utilizar a abordagem proposta na captação de imagens.

O foco da imagem F1 é natural, pois é obtido a partir da visualização nítida das células sendo usado em diversos trabalhos, porém o foco da imagem F2 é obtido a partir de uma nova abordagem, proposta a partir da experiência adquirida através de observações realizadas durante atividades de captura.

Esta abordagem em dois focos torna a contagem baseada em imagens mais robusta, maximizando a identificação das células a serem contadas em imagens geradas em diferentes microscópios.

- **Banco de imagens**

Para o desenvolvimento do algoritmo de contagem automática e a realização de testes de contagem, um banco de imagens foi organizado. As imagens foram capturadas de acordo com o protocolo para captura de imagens proposto neste trabalho. Estão presentes imagens de amostras de sangue de animais silvestres e domésticos. O Banco de Imagens constituído poderá ser utilizado para novas pesquisas visto que a obtenção de amostras de sangue de animais silvestres é relativamente difícil, pois não há cobaias de espécies silvestres. As imagens poderão ser usadas também em aulas de hematologia veterinária contribuindo para a formação mais ampla dos alunos, permitindo o contato com amostras incomuns na rotina laboratorial de hospitais veterinários universitários.

- **Abordagem multi-espécies auto-configurável**

O algoritmo desenvolvido é capaz de lidar com múltiplas espécies de animais, sem necessidade de intervenção adicional do usuário, visto que o método é auto adaptável para variações no tamanho e quantidade de células. Esta adaptabilidade explora as características observadas nas próprias imagens, tornando-se sempre específicas para cada uma delas, evitando assim a necessidade de configurar o sistema para cada espécie analisada.

- **Algoritmo para contagem semi-automática**

O método de contagem semi-automática permite a realização da contagem das células vermelhas mantendo a segurança da supervisão de um profissional, sem exigir deste todo o esforço comum às atividades repetitivas da rotina laboratorial. Com o apoio da contagem automática, realizada previamente pelo algoritmo, o profissional pode concentrar-se apenas na validação ou nas pequenas correções, melhorando a confiabilidade dos resultados.

- **Algoritmo para contagem automática**

A contagem automática foi desenvolvida para auxiliar na rotina laboratorial, liberando o profissional para outras atividades e aumentando a produtividade da equipe. Os resultados atestam a possibilidade de aplicação do algoritmo para contagem autônoma, sem necessidade de acompanhamento humano para sua realização. A obtenção dos resultados de maneira automática diminui drasticamente o tempo para a realização dos exames, contribuindo assim para um diagnóstico rápido, melhorando as chances de tratamento e recuperação de animais doentes.

Destacando-se ainda a face multi-espécies auto-configurável da contagem automática, pode-se afirmar que a solução atende de maneira especial os laboratórios que trabalham com diferentes espécies animais, espaços onde a solução tradicional de contagem por impedância ainda não foi capaz de atender de maneira economicamente viável.

- **Contribuições para a rotina laboratorial**

Manutenção dos procedimentos operacionais já padronizados.

Apoio para o profissional: redução da fadiga e repetição, tempo ganho, confiabilidade, simplicidade de aplicação por se basear em métodos já em uso.

Contagem das amostras em tempo posterior agilizando a manipulação das amostras favorecendo a qualidade do material considerando a redução do tempo de manuseio da amostra.

Simplificação de treinamento para novos profissionais para execução da contagem das células com o uso da ferramenta semi-automática.

7.3. Trabalhos futuros

A análise do sangue para diagnóstico do estado de saúde do paciente é uma atividade complexa e com vários componentes afetando diretamente nos resultados. O sistema proposto para a contagem automática das hemácias em hemogramas realizados visualmente é um resultado inicial que pode ser ampliado de diversas formas, tanto no que se refere ao protocolo para captura de imagens, quanto às técnicas de processamento utilizadas e plataforma de hardware e software.

Algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas a seguir, organizadas por assunto. Estas sugestões servem também para demonstrar que o desenvolvimento deste trabalho cria possibilidades para continuação da pesquisa

permitindo o seu avanço através de trabalhos de iniciação científica, trabalhos de conclusão de curso, dissertações de mestrado e, possivelmente, teses de doutorado.

7.3.1. Simplificar o processo de captura de imagens

A captura de imagens para realizar a contagem automática envolve o registro de imagens em dois níveis focais com o objetivo de minimizar o erro na contagem de células, em especial aquelas que se sobrepõem às linhas do retículo de Neubauer. Apesar de melhorar os resultados, a necessidade de se registrar duas imagens para cada campo a ser contado, gera um esforço adicional para o operador do sistema. Estudos para simplificar esta tarefa, eliminando a necessidade de captura dupla, ou automatizando-a, podem ser realizados.

7.3.2. Automatizar a varredura da câmara e a captura de imagens

A captura de imagens para realizar a contagem automática envolve também a varredura da câmara para enquadrar os campos de interesse para realizar o registro das imagens. Estudos para automatizar esta tarefa podem ser realizados. Duas linhas iniciais podem ser estudadas, sendo: 1) desenvolver uma “mesa de suporte da lâmina” motorizada controlada digitalmente e 2) avaliar a adoção de microscópios automáticos para realizar o enquadramento e registro dos campos de interesse.

7.3.3. Avaliar novas técnicas de processamento de imagens

A solução proposta faz uso de técnicas de processamento de imagens para preparar a imagem da amostra e para realizar a contagem automática. Esta área de pesquisa possui inúmeras técnicas para solução de diferentes problemas. Um estudo

para avaliar outras opções, para a preparação da imagem e para a realização da contagem, pode ser conduzido para avaliar possíveis vantagens como desempenho computacional e índice de acerto da contagem. Estudos de técnicas de morfologia matemática para avaliar combinação de diferentes tipos de elementos estruturantes e operadores morfológicos já foram realizados em um trabalho de conclusão de curso orientado pelo autor deste trabalho.

7.3.4. Desenvolver soluções baseadas em eletrônica embarcada

Equipamentos de diagnóstico em geral fazem uso de soluções computacionais dedicadas, desenvolvidas para simplificar a operação do sistema na realização de suas tarefas. A criação de um equipamento independente, compreendendo hardware dedicado e software embarcado facilitaria a utilização da solução na rotina laboratorial. Um trabalho de mestrado foi realizado para adaptar o sistema para contagem automática das células vermelhas para execução em uma plataforma computacional de pequeno porte baseada em processador RISC (KOVALHUK, 2012). Além da adaptação, o trabalho propôs um subsistema para auxiliar a captura de imagens.

7.3.5. Avaliar a contagem de hemácias em áreas da câmara de Neubauer onde não haja linhas do retículo

Realizar testes de contagens em áreas da câmara de Neubauer onde não haja presença de linhas do retículo. Esta proposta surge a partir da observação dos resultados da contagem automática onde pode-se perceber que o principal motivo de erros deve-se à sobreposição de células com as linhas do retículo, desta forma, espera-se que realizando a contagem em uma área da câmara sem linhas o erro obtido esteja na mesma faixa do erro observado entre diferentes operadores na contagem assistida por computador. Na Figura 38 é possível observar a área preenchida na câmara onde não há presença de linhas do retículo.

Para viabilizar a abordagem da contagem sem linhas do retículo será necessário encontrar a área da câmara apresentada em uma imagem, pois o uso das câmaras de contagem está baseado em área e profundidade conhecidos. Podem ser avaliadas duas formas para estabelecer uma relação entre área da câmara e os pixels da imagem, na primeira o próprio retículo pode ser usado como referência para calcular esta relação e na segunda uma régua micrométrica pode ser utilizada para estabelecer esta relação. Nas duas abordagens serão obtidas imagens das áreas conhecidas do retículo e da régua, estas imagens podem ser avaliadas para encontrar o número de pixels existentes na área conhecida e assim será possível calcular qual a área de uma imagem mesmo que não haja a presença de linhas do retículo. Os resultados destas duas abordagens podem ser comparados para identificar o método mais adequado. Exemplos de áreas da câmara de Neubauer onde não existem linhas do retículo podem ser vistos na Figura 39.

Figura 38 – Câmara de Neubauer: área preenchida.

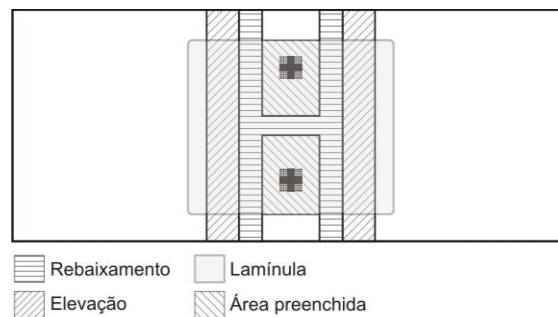
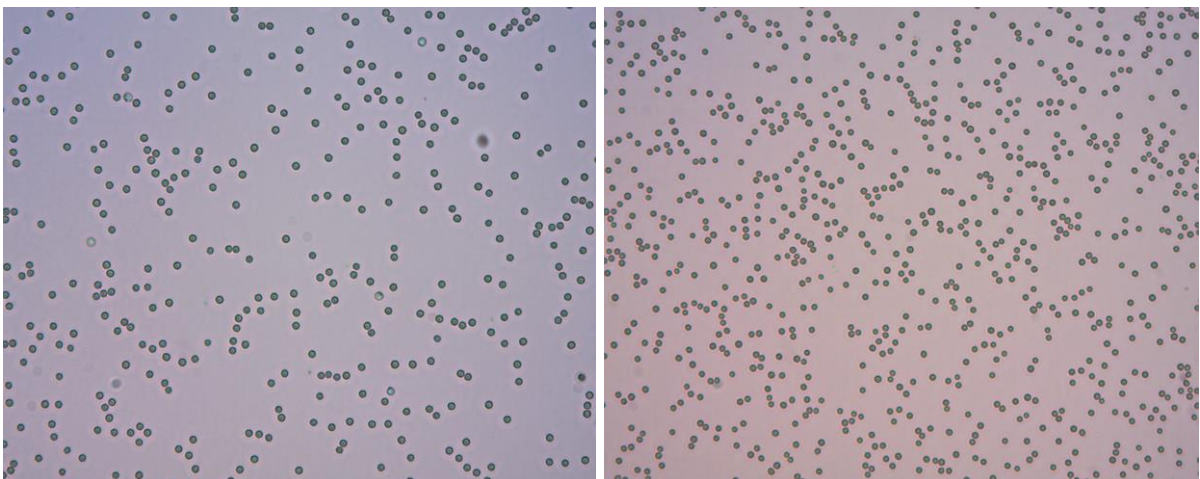


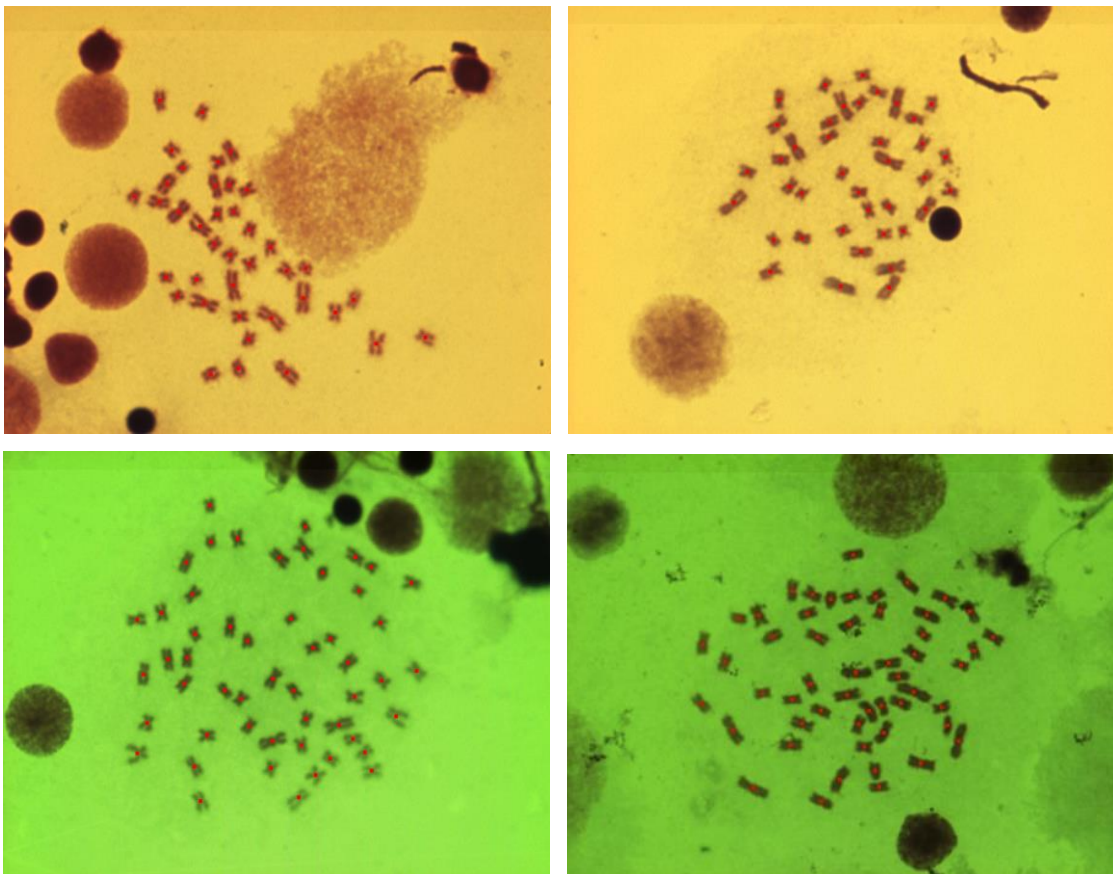
Figura 39 – Exemplos de áreas da câmara de Neubauer sem a presença de linhas do retículo.



7.3.6. Aplicação do algoritmo de contagem em outros tipos amostras biológicas

O algoritmo de contagem, com destaque para o processo de seleção dos objetos de interesse, se mostrou promissor na aplicação em outros tipos de amostras biológicas. Além das amostras de sangue em câmara de Neubauer, testes iniciais foram realizados em amostras de sangue à fresco entre lâmina e lamínula, sangue em lâmina corada e também em amostras de cromossomos de peixe usando o método descrito por Blanco (BLANCO, 2012) para o preparo das lâminas. Neste último caso o algoritmo foi aplicado em 100 imagens com resultados positivos na identificação dos cromossomos. A Figura 40 apresenta exemplos de contagem de cromossomos.

Figura 40 – Exemplos de contagem de cromossomos de peixes.



8. Referências Bibliográficas

ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. M. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. (Eds.). . **Tratado de Animais Selvagens**. 1st ed. ed. São Paulo: Editora Roca, 2006. p. 939–966.

ALMOSNY, N. R. P.; SANTOS, L. C. DOS. Laboratory Support in Wild Animal Medicine. In: **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. 1st ed. ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 2001. p. 500–505.

ATHANASIOU, L. V. et al. Effects of pre-analytical handling on selected canine hematological parameters evaluated by automatic analyzer. **Veterinary Research Forum**, v. 7, n. 4, p. 281–285, 2016.

BALDI, A. et al. Effect of Escherichia coli lipopolysaccharide on u-PA activity and u-PA and u-PAR RNA expression in a bovine mammary epithelial cell line. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 758–762, out. 2012.

BECK, Z. et al. Human Erythrocytes Selectively Bind and Enrich Infectious HIV-1 Virions. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8297, 14 dez. 2009.

BECKER, M.; MORITZ, A.; GIGER, U. Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers. **Veterinary clinical pathology**, v. 37, n. 4, p. 373–84, dez. 2008.

BLANCO, D. R. **Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero Harttia (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2012.

BROWN, M. et al. EXPLORING THE ECOLOGIC BASIS FOR EXTREME SUSCEPTIBILITY OF PALLAS' CATS (OTOCOLOBUS MANUL) TO FATAL TOXOPLASMOSIS. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 691–700, out. 2005.

BUTTARELLO, M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, n. 1, p. 45–54, ago. 2004.

CASAS-DÍAZ, E. et al. HEMATOLOGIC AND BIOCHEMICAL VALUES FOR SPANISH IBEX (CAPRA PYRENAICA) CAPTURED VIA DRIVE-NET AND BOX-TRAP. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 4, p. 965–972, out. 2008.

CHAPPLE, R. S. et al. Haematology and serum biochemistry of captive unsedated chital deer (*Axis axis*) in Australia. **Journal of wildlife diseases**, v. 27, n. 3, p. 396–406, jul. 1991.

COULTER, W. H. **Means for counting particles suspended in a fluid**. United States United States Patent Office, , 1953. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US2656508>>

DEBBIE, J. G.; CLAUSEN, B. SOME HEMATOLOGICAL VALUES OF FREE-RANGING AFRICAN ELEPHANTS. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 11, n. 1, p. 79–82, jan. 1975.

ENGLAND, J. M. et al. Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes. International Council for Standardization in Haematology; prepared by the Expert Panel on Cytometry. **Clinical and laboratory haematology**, v. 16, n. 2, p. 131–8, jun. 1994.

GOLDSTEIN, T. et al. ASSESSMENT OF CLINICAL PATHOLOGY AND PATHOGEN EXPOSURE IN SEA OTTERS (*ENHYDRA LUTRIS*) BORDERING THE THREATENED POPULATION IN ALASKA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 3, p. 579–592, jul. 2011.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. [s.l.] Pearson/Prentice Hall, 2008.

GUIMARAES, R. X.; GUERRA, C. C. D. C. **Clinica e Laboratório, Intepretação Clínica das Provas Laboratoriais**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1978.

INOUE, H. et al. BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGIC REFERENCE INTERVALS FOR THE ENDANGERED ISLAND FOX (*UROCYON LITTORALIS*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 3, p. 583–592, jul. 2012.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. [s.l.] Wiley, 1993.

LAMPRECHT, M. R.; SABATINI, D. M.; CARPENTER, A. E. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. **BioTechniques**, v. 42, n. 1, p. 71–5, jan. 2007.

LEHNER, J.; GREVE, B.; CASSENS, U. Automation in Hematology. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 328–339, 27 set. 2007.

MADELLA, D. A. et al. Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) Rodentia:Hydrochoeridae) de vida livre na região de Campinas-SP. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1321–1324, ago. 2006.

MATH, M. V et al. Red Blood Cell Count : Brief History and New Method. **MGM Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 116–119, 2016.

MAURICIO, C. R. M. et al. Image-based red blood cell counter for multiple species of wild and domestic animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)**, v. 69, n. 1, p. 75–84, 2017.

MAURICIO, C. R. M.; SCHNEIDER, F. K.; CORREIA DOS SANTOS, L. **Image-based red cell counting for wild animals blood**. 2010 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology. **Anais...IEEE**, ago. 2010Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/5627383/>>

MILLER, A. L. et al. BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGIC REFERENCE VALUES FOR FREE-RANGING, CHEMICALLY IMMOBILIZED WILD NORWEGIAN REINDEER (*RANGIFER TARANDUS TARANDUS*) DURING EARLY WINTER. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 2, p. 221–228, abr. 2013.

MOHAMMADI, H.; MOHAMMADNEJAD, J.; YAVARI, K. Human Peripheral Blood Derived Hematopoietic Stem Cell: History, the Isolation Methods and Investigation of Different Parameters Effects on Their Differentiation to the Body Cells. **International Journal of Stem Cell Research and Transplantation**, p. 59–62, 3 abr. 2014.

- MONTEIRO, R. V.; DIETZ, J. M.; JANSEN, A. M. The impact of concomitant infections by *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminths on the health of wild golden and golden-headed lion tamarins. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 1, p. 27–35, ago. 2010.
- MOURA, R. A. D. A. **Técnicas de Laboratório**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1977.
- NORBERG, S. E. et al. Hematology of Free-Ranging, Lactating Northern Fur Seals, *Callorhinus ursinus*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 1, p. 217–221, jan. 2011.
- PAUL, B. T. et al. Risk factors of haemoparasites and some haematological parameters of slaughtered trade cattle in Maiduguri, Nigeria. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 8, n. 8, p. 83–88, 31 ago. 2016.
- PRESTON, K. High-resolution image analysis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 67–74, jan. 1986.
- REAGAN, W. J.; ROVIRA, A. R. I.; DENICOLA, D. B. **Veterinary Hematology: Atlas of Common Domestic and Non-Domestic Species**. 2. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2008.
- ROSTAL, M. K. et al. HEMATOLOGY AND SERUM CHEMISTRY REFERENCE RANGES OF FREE-RANGING MOOSE (*ALCES ALCES*) IN NORWAY. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 3, p. 548–559, jul. 2012.
- SALEH, M. A. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 43–48, fev. 2009.
- SANCHES, T. C. et al. Hematology values of captive giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) and collared anteaters (*Tamandua tetradactyla*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 557–560, abr. 2013.
- SANTOS, L. C. et al. Hemotropic *Mycoplasma* in a Free-ranging Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 3, p. 728–731, jul. 2013.
- SANTOS, L. C. D. **Laboratório Ambiental**. Cascavel: Edunioeste, 1999.

SILVA, R. A. M. S. et al. Hematological and blood chemistry alterations in coatis (*Nasua nasua*) naturally infected by *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v. 52, n. 2, p. 199–122, 1999.

SILVA, E. M. N. DA et al. Avaliação hematológica de caprinos exóticos e nativos no semi-árido paraibano. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 561–566, abr. 2008.

SOUSA, R. S. et al. Evaluation of hematologic, blood gas, and select biochemical variables in ovine whole blood stored in CPDA-1 bags. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 1, p. 27–30, mar. 2013.

STRAUSS, R. G. et al. Circulating RBC volume, measured with biotinylated RBCs, is superior to the Hct to document the hematologic effects of delayed versus immediate umbilical cord clamping in preterm neonates. **Transfusion**, v. 43, n. 8, p. 1168–72, ago. 2003.

SUPERINA, M.; MERA Y SIERRA, R. L. HEMATOLOGY AND SERUM CHEMISTRY VALUES IN CAPTIVE AND WILD PICHIS, *ZAEDYUS PICHII* (MAMMALIA, DASYPODIDAE). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 4, p. 902–910, out. 2008.

SWEDLOW, J. R. Informatics and Quantitative Analysis in Biological Imaging. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 100–102, 4 abr. 2003.

UHART, M. M. et al. Health Evaluation of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 4, p. 887–893, out. 2003.

VALKOLA, J. **Thoughts on images: a philosophical evaluation**. [s.l.] Zeta Books, 2012.

VALLADA, E. P. **Manual de Técnicas Hematológicas**. São Paulo: Atheneu, 2002.

WEISS, D. J. et al. Hematologic and serum chemistry reference values for adult brown mink. **Journal of wildlife diseases**, v. 30, n. 4, p. 599–602, out. 1994.

Apêndice A – Resultados das contagens realizadas nos diferentes métodos para amostras de animais silvestres.

Contagem Assistida - Jaguatirica

Jaguatirica	Câmara 1			
	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	124	125	124	124
2A	123	123	123	125
3A	132	132	133	137
4A	104	103	103	103
5A	127	131	132	131
Total	610	614	615	620
Hemácias/mm ³	6.100.000	6.140.000	6.150.000	6.200.000
1B	187	180	184	188
2B	169	167	170	174
3B	192	186	191	191
4B	210	208	208	206
Total	758	741	753	759
Hemácias/mm ³	6.064.000	5.928.000	6.024.000	6.072.000
Jaguatirica	Câmara 2			
	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	144	147	149	155
2A	119	120	117	123
3A	123	120	123	121
4A	132	132	134	142
5A	117	118	120	119
Total	635	637	643	660
Hemácias/ mm ³	6.350.000	6.370.000	6.430.000	6.600.000
1B	184	187	188	195
2B	187	188	189	188
3B	159	163	162	163
4B	181	175	179	184
Total	711	713	718	730
Hemácias/ mm ³	5.688.000	5.704.000	5.744.000	5.840.000
Jaguatirica	Câmara 3			
	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	135	137	132	134
2A	123	126	126	124

3A	112	111	111	113
4A	123	128	126	129
5A	115	118	117	118
Total	608	620	612	618
Hemácias/ mm ³	6.080.000	6.200.000	6.120.000	6.180.000
1B	196	191	194	201
2B	167	168	165	172
3B	213	215	214	217
4B	190	193	195	196
Total	766	767	768	786
Hemácias/ mm ³	6.128.000	6.136.000	6.144.000	6.288.000

Contagem Assistida – Macaco Prego

Macaco Prego	Câmara 1			
	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	62	61	62	61
2A	55	55	56	56
3A	71	70	72	71
4A	67	67	68	71
5A	77	76	77	78
Total	332	329	335	337
Hemácias/ mm ³	3.320.000	3.290.000	3.350.000	3.370.000
1B	98	95	95	98
2B	104	104	105	108
3B	107	105	106	108
4B	102	98	102	102
Total	411	402	408	416
Hemácias/ mm ³	3.288.000	3.216.000	3.264.000	3.328.000
Macaco Prego	Câmara 2			
	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	48	48	48	47
2A	56	55	53	58
3A	57	57	58	57
4A	63	62	62	61
5A	45	46	46	47
Total	269	268	267	270
Hemácias/ mm ³	2.690.000	2.680.000	2.670.000	2.700.000
1B	71	68	70	72

2B	81	79	81	83
3B	76	76	77	77
4B	109	104	105	109
Total	337	327	333	341
Hemácias/ mm ³	2.696.000	2.616.000	2.664.000	2.728.000

Contagem assistida - Quati

Quati	Câmara 1			
	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	77	75	75	75
2A	75	75	75	76
3A	70	71	71	75
4A	88	88	87	88
5A	67	65	65	64
Total	377	374	373	378
Hemácias/ mm ³	3.770.000	3.740.000	3.730.000	3.780.000
1B	123	117	122	124
2B	125	122	125	125
3B	95	93	92	96
4B	138	133	131	137
Total	481	465	470	482
Hemácias/ mm ³	3.848.000	3.720.000	3.760.000	3.856.000
Quati	Câmara 2			
	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	58	60	61	61
2A	91	92	95	93
3A	84	85	86	86
4A	74	74	76	76
5A	70	71	72	71
Total	377	382	390	387
Hemácias/ mm ³	3.770.000	3.820.000	3.900.000	3.870.000
1B	119	112	114	117
2B	114	114	108	115
3B	113	113	109	116
4B	109	110	111	114
Total	455	449	442	462
Hemácias/ mm ³	3.640.000	3.592.000	3.536.000	3.696.000
Quati	Câmara 3			

	Especialista	Leigo 1	Leigo 2	Leigo 3
1A	80	81	80	79
2A	60	62	63	67
3A	66	65	64	69
4A	62	61	61	63
5A	82	77	77	81
Total	350	346	345	359
Hemácias/ mm ³	3.500.000	3.460.000	3.450.000	3.590.000
1B	138	136	135	141
2B	126	125	124	130
3B	108	104	108	108
4B	119	118	118	120
Total	491	483	485	499
Hemácias/ mm ³	3.928.000	3.864.000	3.880.000	3.992.000

Contagem Visual, Assistida e Automática - Jaguaritica

Jagaritica	Câmara 1		
	Visual	Assistida	Automática
1A	111	124	107
2A	112	123	103
3A	115	132	114
4A	106	104	90
5A	107	127	108
Total	551	610	522
Hemácias/ mm ³	5.510.000	6.100.000	5.220.000
1B		187	173
2B		169	163
3B		192	179
4B		210	199
Total		758	714
Hemácias/ mm ³		6.064.000	5.712.000
Jagaritica	Câmara 2		
	Visual	Assistida	Automática
1A	116	144	125
2A	108	119	100
3A	106	123	109
4A	98	132	111
5A	95	117	101

Total	523	635	546
Hemácias/ mm3	5.230.000	6.350.000	5.460.000
1B		184	182
2B		187	174
3B		159	161
4B		181	171
Total		711	688
Hemácias/ mm3		5.688.000	5.504.000
Jaguatirica	Câmara 3		
	Visual	Assistida	Automática
1A	109	135	116
2A	113	123	112
3A	97	112	95
4A	100	123	110
5A	100	115	100
Total	519	608	533
Hemácias/mm3	5.190.000	6.080.000	5.330.000
1B		196	188
2B		167	157
3B		213	208
4B		190	193
Total		766	746
Hemácias/mm3		6.128.000	5.968.000

Contagem Visual, Assistida e Automática – Macaco Prego

Macaco Prego	Câmara 1		
	Visual	Assistida	Automática
1A	62	62	63
2A	63	55	52
3A	56	71	64
4A	49	67	56
5A	70	77	70
Total	300	332	305
Hemácias/ mm3	3.000.000	3.320.000	3.050.000
1B		98	98
2B		104	106
3B		107	109
4B		102	106

Total		411	419
Hemácias/mm3		3.288.000	3.352.000
Macaco Prego	Câmara 2		
	Visual	Assistida	Automática
1A	42	48	47
2A	58	56	50
3A	61	57	50
4A	54	63	56
5A	45	45	41
Total	260	269	244
Hemácias/mm3	2.600.000	2.690.000	2.440.000
1B		71	77
2B		81	82
3B		76	76
4B		109	98
Total		337	333
Hemácias/mm3		2.696.000	2.664.000

Contagem Visual, Assistida e Automática - Quati

Quati	Câmara 1		
	Visual	Assistida	Automática
1A	74	77	68
2A	66	75	64
3A	68	70	72
4A	68	88	81
5A	54	67	61
Total	330	377	346
Hemácias/ mm3	3.300.000	3.770.000	3.460.000
1B		123	121
2B		125	126
3B		95	96
4B		138	133
Total		481	476
Hemácias/ mm3		3.848.000	3.808.000
Quati	Câmara 2		
	Visual	Assistida	Automática
1A	60	58	59
2A	73	91	85

3A	57	84	78
4A	76	74	57
5A	64	70	60
Total	330	377	339
Hemácias/ mm3	3.300.000	3.770.000	3.390.000
1B		119	112
2B		114	106
3B		113	108
4B		109	103
Total		455	429
Hemácias/ mm3		3.640.000	3.432.000
Quati	Câmara 3		
	Visual	Assistida	Automática
1A	73	80	66
2A	58	60	58
3A	58	66	64
4A	54	62	54
5A	70	82	74
Total	313	350	316
Hemácias/ mm3	3.130.000	3.500.000	3.160.000
1B		138	134
2B		126	130
3B		108	104
4B		119	121
Total		491	489
Hemácias/ mm3		3.928.000	3.912.000

Apêndice B – Dados do artigo publicado nos proceedings do “32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society-EMBC”

Dados bibliográficos do artigo:

MAURICIO, Claudio RM; SCHNEIDER, Fábio K.; DOS SANTOS, Leonilda Correia. Image-based red cell counting for wild animals blood. In: **Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE**. IEEE, 2010. p. 438-441.

Citações a este artigo por artigos publicados em periódicos indexados e patentes:

BARBEDO, Jayme Garcia Arnal. A review on methods for automatic counting of objects in digital images. **IEEE Latin America Transactions**, v. 10, n. 5, p. 2112-2124, 2012.

NIKOLAEVA, Tatiana Yu; PETROV, Nikolay V. Characterization of particles suspended in a volume of optical medium at high concentrations by coherent image processing. **Optical Engineering**, v. 54, n. 8, p. 083101-083101, 2015.

BARBEDO, Jayme Garcia Arnal. Automatic object counting in Neubauer chambers. In: **Embrapa Informática Agropecuária-Artigo em anais de congresso (ALICE), SIMPÓSIO BRASILEIRO DE TELECOMUNICAÇÕES**. 2013.

ROJAS, L. D.; MARTÍNEZ, Geovanni; SCHEPER, Thomas. Cell counting based on local intensity maxima grouping for in-situ microscopy. In: **Biomedical Imaging (ISBI), 2014 IEEE 11th International Symposium on**. IEEE, 2014. p. 1344-1347.

PERERA, P. H. et al. A generic object counting algorithm under partial occlusion conditions. In: **Industrial and Information Systems (ICIIS), 2013 8th IEEE International Conference on**. IEEE, 2013. p. 554-559.

EHANG, Thang et al. Autofocus microscope system using contrast measurement approach. **Jurnal Teknologi**, v. 74, n. 6, 2015.

LI, Qingli et al. Red Blood Cell Count Automation Using Microscopic Hyperspectral Imaging Technology. **Applied spectroscopy**, v. 69, n. 12, p. 1372-1380, 2015.

L. D. Rojas, G. Martinez, T. Scheper, "Cell counting based on local intensity maxima grouping for in-situ microscopy", *Biomedical Imaging (ISBI) 2014 IEEE 11th International Symposium on*, pp. 1344-1347, 2014.

ÖZKAN, Akın; İŞGÖR, S. Belgin; ŞENGÜL, Gökhan. Method proposal for distinction of microscope objectives on hemocytometer images. In: **Signal Processing and Communication Application Conference (SIU), 2016 24th**. IEEE, 2016. p. 1305-1308.

MAURICIO, C. R. M. et al. Image-based red blood cell counter for multiple species of wild and domestic animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 75-84, 2017.

ZLATEV, Zlatin et al. Analysis methods and tools for evaluating the quality of yogurt. Applied science magazine, Innovation and Entrepreneurship, Year III, issue, p. 1-2, 2015.

PETEV, Antoaneta Dimitrova et al. INNOVATION AND ENTREPRENEURSHIP. Vol. III, Number 1-2, 2015

SUN, Yu et al. **System And Method For Fetal And Maternal Red Blood Cell Counting**. U.S. Patent Application n. 14/422,291, 6 set. 2013.

Apêndice C – Dados do artigo publicado no periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”.

Dados bibliográficos do artigo:

MAURICIO, C.R.M. et al . Image-based red blood cell counter for multiple species of wild and domestic animals. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 69, n. 1, p. 75-84, Fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8544>.

Informações básicas sobre o periódico

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins.

Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

O Corpo Editorial é formado por especialistas nas diversas áreas da medicina veterinária e zootecnia.

A abreviatura de seu título é Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., que deve ser usada em bibliografias, notas de rodapé e em referências bibliográficas.

Classificação Qualis (Classificação de Periódicos 2015)

ENGENHARIAS IV	B2
INTERDISCIPLINAR	B2
MEDICINA VETERINÁRIA	A2

Indexadores

A revista é indexada por:

SCIELO - Scientific Electronic Library Online

ISI - Institute for Scientific Information

AGRIS - Base de datos en agricultura de la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación) - Food and Agriculture Organization)

CAB - Base de datos en agricultura y ciencias de la vida (produzida por CABI Publishing)

CAS - Chemical Abstract Service

MEDLINE - MEDlars on line - base de datos creada y mantenida por la Biblioteca Nacional de los Estados Unidos, National Library of Medicine - NLM)

Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinaria y Zootecnia

LILACS - Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud

Direitos autorais

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia reserva todos os direitos autorais do artigo publicado, inclusive a tradução.

Reprodução dos artigos

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

Propriedade intelectual

Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons do tipo atribuição BY. A revista on-line tem o acesso aberto e gratuito.