

Contagem Automática de Ovos do Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em Imagens Microscópicas

Pedro V. V. Paiva, Fabiane Queiroz
Núcleo de Ciências Exatas - NCEX
Curso de Ciência da Computação
Universidade Federal de Alagoas
Arapiraca, Brasil

Aline Nunes Silva, Maria Josilaine M. S. Silva
Laboratório de Fisiologia e Parasitologia Animal
Curso de Zootecnia
Universidade Federal de Alagoas
Arapiraca, Brasil



Figura 1. Método Proposto: Imagem de entrada (esquerda), limiarização de regiões com incidência de ovos de carrapato (centro-esquerda), detecção de sobreposições utilizando Random Forest (centro-direita) e áreas em destaque para amontoados (direita).

Resumo—A identificação de pesticidas eficazes no combate ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* requer estudos sobre a eclodibilidade de seus ovos perante carrapaticidas. Parte desses estudos consiste na contagem dos ovos desse parasita. Devido ao pequeno tamanho e a grande quantidade de ovos postos, o método de contagem manual é exaustivo. Neste trabalho é proposto um método de contagem automática de ovos de carrapatos em imagens capturadas com microscópio estereoscópico. Tal método combina técnicas de detecção de bordas e operações morfológicas para identificar regiões com ovos, bem como aplica extratores de característica e técnicas de aprendizado de máquina para encontrar áreas de sobreposição de ovos. Resultados preliminares indicam um acerto médio de 93% na predição do número de ovos em uma fração de tempo significativamente menor em comparação à técnica tradicional de contagem manual.

Abstract—The identification of effective pesticides to combat parasites as the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* requires hatchability studies in the presence of acaricides, part of the process is the egg counting. Due to the small size and the large number of eggs placed, the counting task is laborious and demand long periods. We propose a method of automatic counting of eggs using images captured with stereoscopic microscope. The proposed method combines border detection techniques and morphological operations to identify eggs regions. Features extractors and machine learn techniques are used to identify eggs overlap regions. Preliminary results indicate an accuracy of 93 % in predicting the number of eggs in a much shorter time fraction compared to the traditional manual counting technique.

Keywords—Processamento de Imagens; Extração de características; Contagem automática; Contagem de Ovos de Carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

I. INTRODUÇÃO

Infestações do parasita *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, popularmente conhecido como do carrapato-de-boi, acarretam em perdas nas produções da bovinocultura de corte e leite no Brasil. Isso se dá devido ao seu impacto na qualidade do couro, quantidade do leite, transmissão de doenças, dentre outros fatores [1]. Um dano econômico estimado em 2 bilhões de dólares ao ano [2], demanda pesquisas relacionadas ao combate do parasita. Para avaliação em laboratório, objetivando analisar a resistência dos carrapatos aos carrapaticidas, diversas metodologias são utilizadas, dentre elas, a tradicional contagem manual de ovos [3]. Neste processo, a observação da oviposição¹ e contagem dos ovos são realizadas pelo pesquisador com o auxílio de microscópio. Entretanto a contagem manual pode acarretar em erro do observador, haja visto que uma teleóquina² pode pôr de 3.000 a 5.000 ovos, sendo assim a contagem manual torna-se uma tarefa exaustiva e demandando muito tempo, já que cada ovo é contado individualmente.

O uso de algoritmos de processamento de imagens e/ou aprendizado de máquina para realizar tarefas de contagem automática de objetos não é inédito no auxílio à análise de imagens obtidas através de microscópios [4][5]. Porém um desafio na contagem desse tipo de objeto (ovos de carrapato) está na forma de dispersão dos mesmos, ou seja, a contagem deve considerar que muitos desses ovos podem estar sobrepostos. A Figura 1 (a) ilustra regiões uma disposição normal dos ovos de carrapato, onde ocorre sobreposição.

¹Postura de ovos de um determinado inseto

²Fêmea adulta e repleta de sangue.

Neste trabalho, é proposto um método de contagem automática de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Este método produz resultados promissores sob condições em que ovos se encontram esparsamente distribuídos ou sobrepostos em até um nível de sobreposição.

A. Trabalhos Relacionados

No processo de análise de bioimagens, muitas vezes a contagem de objetos de interesse é feita apenas a partir de técnicas de processamento de imagens. Mollahosseini et al. [6] usou algoritmos de limiarização e cálculos de excentricidade de elipse para inferir o número de ovos postos por fêmeas do mosquito *Anopheles*, um vetor da malária em regiões tropicais e subtropicais. A taxa de acerto média obtida foi de 98% e, enquanto a contagem manual de uma única imagem leva até 30 minutos, o software estima o valor do número de ovos em poucos segundos.

Técnicas de aprendizado de máquina integram sistemas mais robustos, como é o caso do *QuantiFly*, proposto por Waithe et al. [7]. Neste caso, particularidades das imagens exigem técnicas de reconhecimento de padrões. Ao lidar com falta de uniformidade da superfície e detritos associados ao local onde ovos da mosca da fruta são depositados, foi desenvolvido um método onde o usuário alimenta um classificador *Extremely Randomized Tree* [8] com pontos de interesse na imagem. Alcançando uma acurácia entre 85% e 94% e levando em média 40 segundos durante o processo de contagem, uma vez que esta técnica exige a intervenção do usuário, é considerada semi-automática.

B. Contribuições

Os trabalhos acima apresentados se mostram eficientes em seus nichos, porém, nenhuma das técnicas, aqui citadas ou na literatura³, lida especificamente com a contagem de ovos de carrapatos ou com sobreposição de ovos, sendo estas as maiores contribuições do método aqui proposto. O método de contagem automática auxiliará diretamente os pesquisadores que trabalham com carrapatos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliação e aplicação do método de contagem automática dos ovos foi realizado um bioensaio, um teste de sobrevivência e oviposição, no Laboratório de Fisiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca. Foram coletados 50 carrapatos na fase de teleógina. As teleóginas foram alocadas em placas de Petri e aguardado a oviposição natural. Após a totalidade da postura foram contados manualmente e capturadas as imagens dos ovos, a contagem foi registrada. A captura das imagens foi realizada até a ocorrência da eclosão dos mesmos, aproximadamente 30 dias.

A técnica de contagem automática de ovos desenvolvida neste trabalho pode ser resumida em três etapas principais: (1) Estimação da área média de ovos, (2) estimativa do número de ovos sem considerar sobreposições; e (3) estimativa do número de ovos, considerando-se possíveis sobreposições.

³Em buscas realizadas até a presente data nas bases: IEEE Xplore, ACM Digital Library, Scopus e Springer.

A. Etapa 1: Estimação da Área Média de Ovos

Inicialmente, dada uma amostra de imagens contendo ovos distribuídos sem sobreposições, foi criado, através de marcações manuais, um conjunto de rótulos ou máscaras binárias (ver Figura 2). No total, foram extraídos 100 componentes conexos presentes nessas máscaras indicando regiões que representam ovos. Para cada componente conexo, sua área (número de pixels) foi computada e, por fim, um valor médio dessas áreas foi selecionado como referência para os cálculos de número de ovos que serão apresentados nas próximas subseções.

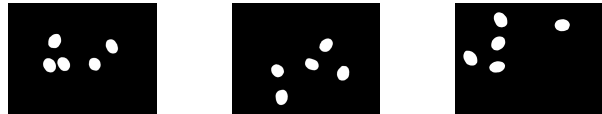


Figura 2. Exemplos de máscaras binárias com ovos distribuídos sem sobreposições utilizadas no cálculo da área média dos ovos.

B. Etapa 2: Estimação do Número de Ovos Desconsiderando Sobreposições

Nesta etapa, o objetivo é estimar o número de ovos presente em uma dada imagem desconsiderando possíveis regiões de sobreposição de ovos. Como ilustra a Figura 3 (a), de posse do valor médio estimado para a área de um único ovo, foi criado o protocolo de segmentação que consiste no seguintes passos:

- Aplicou-se uma máscara de suavização de mediana de tamanho 11x11 na imagem colorida de entrada para eliminar ruídos enquanto preserva as informações de contornos.
- Converteu-se a imagem obtida para o espaço HSV (*Hue, Saturation and Value*), e em seguida descartou-se os canais H e V, utilizando-se apenas o canal S. Este canal foi escolhido em detrimento dos outros pois nele percebeu-se uma maior distinção entre os objetos de interesse (ovos) e o fundo da imagem.
- Aplicou-se no canal S da imagem um detector de bordas de Canny [9].
- Por fim, sobre a imagem binária resultante da etapa acima, foram realizadas operações morfológicas como dilatação e preenchimento, gerando a **área de interesse**, ou seja, as regiões da imagem contendo apenas os ovos. Regiões com menos de 1/2 da área média dos ovos foram descartadas, devido a tais informações tenderem à ser ruído ou mesmo detritos.

A estimativa do número de ovos, desconsiderando sobreposições foi realizada através do seguinte cálculo:

$$\text{Número de ovos} = \frac{\text{Área de interesse}}{\text{Área média dos ovos}}. \quad (1)$$

C. Etapa 3: Estimação do Número de Ovos Considerando Sobreposições

Como ilustra a Figura 3 (b), nesta etapa, foi desenvolvido um método de detecção de regiões de sobreposição.

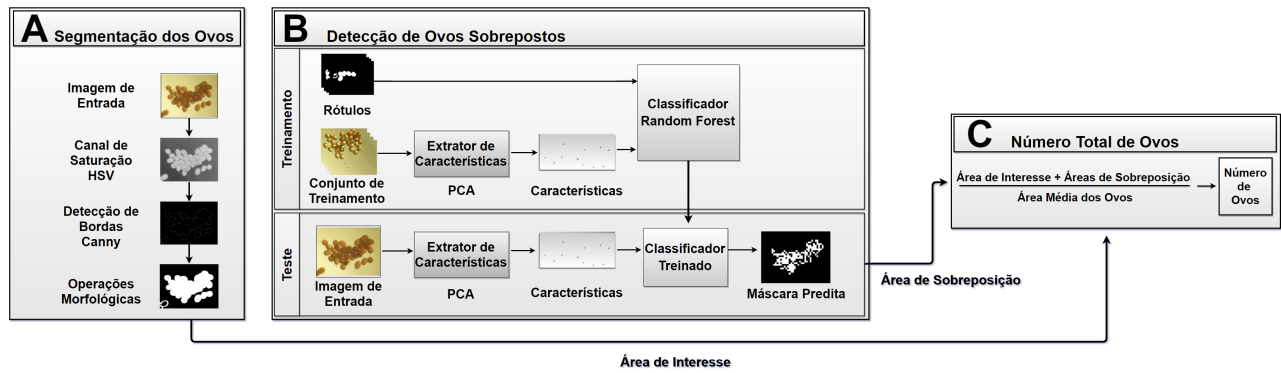


Figura 3. Abordagem de predição de número de ovos de carrapato baseada em segmentação e detecção de padrões de sobreposição.

Inicialmente, dado um conjunto de imagens coloridas, foram extraídos dos canais vermelho e verde das mesmas fragmentos de tamanho 25×25 , uma vez que esses canais representam bem a imagem original que possui uma coloração predominantemente amarelada. Dessa forma, o processo de detecção dessas regiões foi dividido em duas etapas: (1) Extração de características dos fragmentos e (2) treinamento de um classificador usado para determinar se um dado fragmento de entrada representa uma região de sobreposição de ovos ou não. Nessa etapa, foram geradas manualmente máscaras binárias para demarcar as regiões de sobreposição das imagens.

Extração de Características utilizando PCA: *Análise de Componentes Principais (PCA - Principal Component Analysis)* [10] é uma ferramenta estatística utilizada para encontrar padrões em dados de alta dimensão. Com aplicações em diversas subáreas de processamento de imagem, o PCA oferece uma estimativa otimizada do subespaço mesmo quando os dados são corrompidos por pequeno ruído Gaussiano.

Anteriormente à aplicação do PCA, cada fragmento da imagem foi convertido para escala de cinza, seguindo a equação:

$$I_i = 0.299 \times R_i + 0.587 \times G_i + 0.144 \times B_i, \quad (2)$$

onde R_i , G_i e B_i são os níveis de intensidade de vermelho, verde e azul, respectivamente, para o pixel I_i . O PCA é utilizado como forma de extrair característica desses fragmentos, reduzindo assim sua dimensionalidade de 625 valores para 75 valores referentes aos primeiros componentes que detinham cerca de 97% da variabilidade dos dados.

Treinamento Supervisionado utilizando Random Forest: Uma vez que para cada fragmento, um conjunto de características foi devidamente extraído utilizando-se o PCA, é associado um rótulo com o auxílio da máscara binária contendo marcações de sobreposição que é definido pela moda da área corresponde ao fragmento na máscara. Esses rótulos são então usados como atributos de classe, dividindo os dados entre a classe 0 (fragmento de uma região sem sobreposição) e 1 (fragmento de uma região com sobreposição). Esses dados são então enviados para um classificador *Random Forest* [11].

Existia uma grande diferença entre as proporções das entidades de classe com e sem sobreposição, já que regiões sobrepostas são em média 7,28% do total da área de uma

imagem, o que gera um desbalanceamento entre as classes. Para minimizar esse problema, foi feita uma amostragem aleatória sem reposição no conjunto de fragmentos rotulados sem sobreposição, aproximando a representatividade das classes. Uma vez que o classificador foi treinado, dado um conjunto de fragmentos de teste (retirados dos canais vermelho e verde de uma imagem de teste), foi aplicado, para cada canal separadamente, a extração de características desses fragmentos usando-se PCA e em seguida foram preditas as classes a que estes fragmentos pertencem. Após a estimação da classe dos fragmentos, foram geradas duas máscaras (uma para cada canal processado) com o mesmo tamanho da imagem de teste. Essas máscaras foram unidas por uma operação de conjunção, gerando uma máscara final sobre a qual foram realizadas operações para detecção de ruídos como o cálculo da distância de *Cook* [12] e para detecção de *outliers*, geralmente onde a sobreposição ocorre. Sobre essa máscara final, calculou-se o valor da **área de sobreposição** necessária para estimação final do número de ovos.

De posse das áreas herdadas dos passos anteriores, a estimação do número de ovos foi feita adicionando-se o valor de área de sobreposição à Equação 1 e assumindo-o como o valor inteiro menor que o valor encontrado:

$$\lfloor \text{Número de ovos} \rfloor = \frac{\text{Área de interesse} + \text{Área de sobreposição}}{\text{Área média dos ovos}}. \quad (3)$$

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como ilustra a Tabela I, para os valores estimados para o grupo de imagens testado observou-se que o erro entre os valores preditos e os reais variaram entre -7,692% e 9,756%. Com desvio padrão e 7.101 e intervalo de confiança entre -12,104 e 15,492 para o nível de confiança de 95%. O tempo gasto nesse processo, foi aproximadamente 4 vezes menor que a tradicional contagem manual⁴. Ambas afirmações justificam a eficácia da técnica proposta.

⁴O tempo médio para contagem manual dos ovos contidos em uma única imagem foi de aproximadamente 1 minuto e 40 segundos, já o tempo do cálculo para método proposto, mesmo sendo executado em uma plataforma que não preconiza o desempenho, foi de cerca de 24 segundos.

Nos experimentos realizados, os dados obtidos da contagem manual dos ovos foram precisos, além de serem poucas observações, no máximo foram contabilizados 49 ovos por imagem. Em uma contagem usual para bioensaios com carrapatos, este valor pode alcançar até 5 mil ovos por teleógena causando o efeito de fadiga ao contador. É sabido da possibilidade de dois tipos de erros grosseiros no processo de contagem manual: uma região ser contada mais de uma vez, ou não ser contada, assim como é afirmado em outros estudos para diferentes parasitas [7, 6, 13].

Tabela I
VALORES ESTIMADOS E OBSERVADOS DA CONTAGEM MANUAL E AUTOMATIZADA DE OVOS DE CARRAPATOS.

Imagens	Num. Observado	Num. Estimado	Erro (%)
04	26	24	- 7,692
14	45	43	- 4,444
18	31	33	+ 6,451
19	49	52	+ 6,122
17	40	38	- 5,000
20	30	32	+ 6,666
16	41	45	+ 9,756

Considerando-se os possíveis erros humanos da contagem manual, o intervalo de confiança alcançado pela técnica proposta se mostra uma opção mais confiável para tal tarefa. A Figura 1 e a Figura 4 ilustram o resultado do processo de detecção das regiões de interesse e sobreposição de ovos.

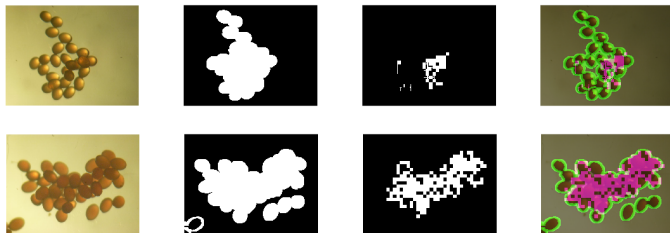


Figura 4. Da esquerda para a direita: Imagem de entrada, limiarização de regiões com incidência de ovos de carrapato, detecção de sobreposições utilizando Random Forest e áreas em destaque para amontoados.

A. Limitações

Devido ao ciclo biológico e o período chuvoso em que o estudo foi realizado, não foi possível a criação de uma base de imagens com um número maior de ovos, o que limita em parte a análise dos resultados.

IV. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi proposto um método para contagem automática de ovos de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em imagens de microscopia ótica. Tal método é baseado em segmentação de áreas com ovos utilizando algoritmos de detecção de bordas, operadores morfológicos, extração de características via PCA e aprendizado supervisionado com *Random Forest*.

Como principais contribuições destacam-se: a introdução de um procedimento para quantificação automática de ovos de

carrapato e detecção automática de padrões de sobreposição. O erro entre os valores preditos e os reais variaram entre -7,692% e 9,756% e o tempo gasto nesse processo, foi aproximadamente 4 vezes menor que o processo tradicional de contagem manual. Ambas afirmações justificam a eficácia da técnica proposta.

Como trabalhos futuros, busca-se avaliar o uso de outros extratores de características além do PCA afim de desenvolver meios de computar mais de um nível de sobreposição para aumentar a acurácia do método proposto.

REFERÊNCIAS

- [1] A. Gomes, "Carrapato-de-boi: prejuízos e controle," *Embrapa Gado de Corte-Séries Anteriores (INFOTECA-E)*, 2003.
- [2] L. Grisi, C. L. Massard, G. Moya Borja, and J. Pereira, "Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil," *A hora veterinária*, vol. 21, no. 125, pp. 8–10, 2002.
- [3] S. M. F. Broglio-Micheletti, N. d. S. Dias, E. C. N. Valente, L. A. d. Souza, D. O. P. Lopes, and J. M. d. Santos, "Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório," *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, vol. 19, no. 1, pp. 44–48, 2010.
- [4] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri *et al.*, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nature methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, 2012.
- [5] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid *et al.*, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nature methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, 2012.
- [6] A. Mollahosseini, M. Rossignol, C. Pénnetier, A. Cohuet, A. dos Anjos, F. Chandre, and H. R. Shahbazkia, "A user-friendly software to easily count anophelid egg batches," *Parasites & vectors*, vol. 5, no. 1, p. 1, 2012.
- [7] D. Waithe, P. Rennert, G. Brostow, and M. D. Piper, "Quantify: Robust trainable software for automated *Drosophila* egg counting," *PLoS one*, vol. 10, no. 5, p. e0127659, 2015.
- [8] P. Geurts, D. Ernst, and L. Wehenkel, "Extremely randomized trees," *Machine learning*, vol. 63, no. 1, pp. 3–42, 2006.
- [9] J. Canny, "A computational approach to edge detection," *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, no. 6, pp. 679–698, 1986.
- [10] I. Jolliffe, *Principal component analysis*. Wiley Online Library, 2002.
- [11] L. Breiman, "Random forests," *Machine learning*, vol. 45, no. 1, pp. 5–32, 2001.
- [12] R. D. Cook and S. Weisberg, "Residuals and influence in regression," 1982.
- [13] A. K. O. Tiba, H. F. Aluizio F. R. Araújo, Bassani, and T. I. Ren, "Sistema autônomo de reconhecimento e contagem de ovos de *Aedes aegypti*," *X Congresso Brasileiro de Inteligência Computacional*, 2011.