

استخراج اتوماتیک مرز اجسام لیشمن موجود در نمونه‌های مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیازیس احشایی

ماریا فرهی^۱، دکتر حسین ربانی^۲، دکتر اردشیر طالبی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تشخیص خودکار مرز در تکنیک‌های پردازش تصویر، یکی از مهم‌ترین مراحل تشخیص بیماری توسط کامپیوتر می‌باشد که دقت و صحت مراحل بعدی به طور حساسی به آن وابسته است. پس از رنگ‌آمیزی تصاویر میکروسکوپی میزان آرتیفکت‌های تصویر افزایش می‌یابد. از این رو، یافتن مرز دقیق اشیا به منظور استخراج ویژگی دقیق بسیار مهم می‌باشد.

روش‌ها: در این مقاله، با پردازش تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌های حاصل از اسپیراسیون مغز استخوان افراد مبتلا به بیماری لیشمانیازیس احشایی، به کمک روش‌های آستانه‌گذاری اوتسو (Otsu)، ساوولا (Sauvola) و k-میانگین، جسم لیشمن به صورت خودکار بخش‌بندی شد. به منظور جمع‌آوری مجموعه‌ی تصاویر، دوربین عکس‌برداری دیجیتال Sony DSC-H9 متصل به میکروسکوپ نوری Olympus-CH40-RF200 استفاده گردید. روش‌های پیشنهادی بر روی ۲۰ تصویر میکروسکوپی آزمایش گردید. جهت شناسایی اجسام لیشمن از بین موارد استخراج شده، برای هر کاندید ویژگی‌های هندسی مانند کشیدگی، نرخ مساحت، گردی، استحکام و ویژگی‌های بافتی مانند میانگین، واریانس، همواری، ممان سوم، یکنواختی و آنتروپی محاسبه شد. سپس با استفاده از طبقه‌بند شبکه‌ی عصبی جلوسو، اجسام موجود به دو گروه سالم و معیوب طبقه‌بندی شدند.

یافته‌ها: در هر روش، به منظور یافتن بهترین حالت اجرایی ممکن، مقایسه‌ی صورت گرفت و مشخص گردید که استفاده از سطح پنج برای روش اوتسو، مقدار آستانه ۰/۱ برای روش ساوولا و تعداد خوشه‌ی پنج برای روش k-میانگین، کمترین میزان خطای استخراج مرز را به دنبال دارند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده پس از مقایسه‌ی دستاوردها با نظر پزشک متخصص، نشان داد که روش ساوولا دارای کمترین خطای استخراج مرز و روش اوتسو بهترین روش برای شناسایی جسم لیشمن می‌باشد.

واژگان کلیدی: تشخیص بیماری توسط کامپیوتر، لیشمانیازیس احشایی، جسم لیشمن، بخش‌بندی، استخراج مرز

ارجاع: فرهی ماریا، ربانی حسین، طالبی اردشیر. استخراج اتوماتیک مرز اجسام لیشمن موجود در نمونه‌های مغز استخوان بیماران

مبتلا به لیشمانیازیس احشایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ۷۳۹-۷۲۶

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۷۲۶۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوالکترونیک، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین علوم پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوالکترونیک، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: h_rabbani@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین ربانی

مقدمه

لیشمانیازیس احشایی یک بیماری عفونی و بعد از مالاریا کشنده‌ترین بیماری انگلی است. دامنه‌ی تظاهرات بالینی آن از زخم جلدی خود محدود شونده تا تخریب دیررس مخاطی-جلدی و بیماری سیستمیک کشنده متغیر است. سالانه حدود دو میلیون مورد لیشمانیوز پوستی و پانصد هزار مورد لیشمانیوز احشایی در سطح جهان رخ می‌دهد. لیشمانیوز احشایی (کالآزار)، شدیدترین چهره‌ی بالینی لیشمانیوز است. در نوع کالآزار، تشخیص قطعی تنها بر اساس مشاهده‌ی مستقیم انگل لیشمانیا در مواد حاصل از آسپیراسیون مغز استخوان، امکان پذیر می‌باشد (۱).

از آن جا که ابعاد انگل‌های لیشمانیای موجود در نمونه‌های مغز استخوان بسیار کوچک هستند، تشخیص میکروسکوپی آن‌ها در نمونه وقت گیر است. رؤیت انگل در نمونه‌ها نیاز به شخصی خبره دارد و افرادی که با این انگل آشنا نباشند، نمی‌توانند انگل را تشخیص دهند. گاهی انگل در رابطه با دفاع بدن دچار تغییراتی می‌شود که شناختن آن مشکل‌تر می‌شود و این امر نیاز به افراد متخصص و خبره را بیشتر آشکار می‌کند. از این رو، احتمال عدم رؤیت این انگل‌ها توسط چشم و بدون واسط کامپیوتری بسیار زیاد است (۲-۴).

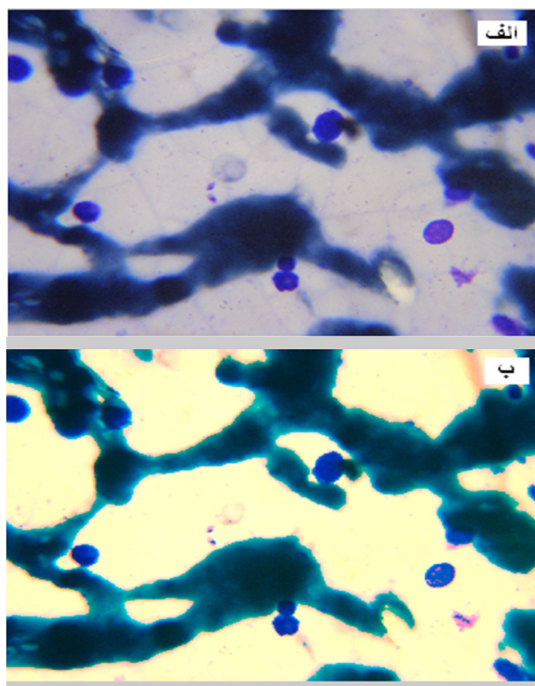
در این مقاله، چند روش سریع و بدون نظارت کاربر برای تشخیص مرز اجسام لیثمن موجود در نمونه‌های مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیازیس احشایی ارائه شده است. روش‌های پیشنهادی بر روی ۲۰ تصویر میکروسکوپی آزمایش شده‌اند. برای تعیین میزان خطای تشخیص مرز، مرز یافته شده با مرزهایی

که پزشک متخصص تعیین کرده است، مقایسه شد. تاکنون روش‌های متنوع زیادی برای استخراج مرز ارائه شده‌اند که بسیاری از این روش‌ها مربوط به تصاویر بالینی بوده‌اند. Pagadala برای استخراج مرز تومور در تصاویر میکروسکوپی، یک روش بر اساس آستانه‌گذاری هیستوگرام توصیف کرد (۵). Schmid برای بخش‌بندی تصاویر میکروسکوپی مقطع درم در پوست، روشی بر اساس خوشه‌بندی رنگ معرفی کرد (۶). او در انجام روش خود از هیستوگرام دو مؤلفه‌ی اصلی در فضای رنگ L^*U^*V استفاده نمود و با رسم نمودارهای هیستوگرام، محل میانگین خوشه‌ها را در مکان قله‌های هیستوگرام نرم شده قرار داد (۷). برای استخراج مرز زخم‌های زیر پوستی، از روش مبتنی بر جریان بردار گرادیان مدل مارها استفاده کرد که در آن مقداردهی کانتور اولیه به صورت خودکار انجام شده بود. Cucchiara و همکاران به منظور استخراج مرز تومور، یک روش نظارتی مبتنی بر محاسبه‌ی مشخصات شعاعی شدت از مؤلفه‌ی شدت فضای رنگ (Hue, saturation and intensity) HSI ارائه دادند (۸).

روش‌ها

جهت جمع‌آوری داده، از مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی نمونه‌برداری گردید. از آن جایی که انگل‌های لیشمانیا در بین نمونه‌های مغز استخوان به راحتی قابل شناسایی نیستند، برای بررسی راحت‌تر آن‌ها، نمونه‌های گرفته شده در اختیار پاتولوژیست قرار داده شد تا با استفاده از رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی و تشخیص راحت‌تر شود. از این رو لام‌هایی که برای تصویربرداری مورد استفاده قرار گرفتند، رنگی بودند.

تصویر ورودی و s مربوط به شدت تصویر خروجی است و E شیب مربوط به تابع را کنترل می‌کند. نتایج حاصل از این مبحث در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. نتیجه‌ی افزایش کنتراست تصویر به صورت خطی. (الف) تصویر اصلی و (ب) تصویر بهبود یافته

ب- روش مورفولوژی

به دلیل رزولوشن بالای تصاویر، اگر تمام تصویر پردازش شود، مدت زمان اجرای برنامه بسیار زیاد می‌شود. از این رو، برای کاهش زمان اجرای مرحله‌ی پردازش، نیاز است تنها محل‌هایی که مشکوک به حضور جسم لیثمن هستند، دقیق‌تر بررسی شوند و محل‌هایی که مشکوک نیستند، نیازی به بررسی ندارند و می‌توانند حذف شوند. به این منظور، از روش‌های مورفولوژی استفاده و اشیای بزرگ تصویر حذف شدند. سپس با دانستن محل اشیای کوچک، تصویر اصلی به یک یا چند تصویر کوچک‌تر تقسیم

با کمک پزشک متخصص گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus CH40RF200 تنظیم شده بر بزرگ‌نمایی ۱۰۰ که دوربین عکس‌برداری دیجیتال Sony DSC-H9 بر روی آن سوار شد، مرحله‌ی تصویربرداری از لام‌های آزمایشگاهی صورت گرفت. برای اجرای این مقاله با توجه به فرمول حجم نمونه‌ی Cochran، از آن جا که حجم جامعه نامشخص بود، حجم نمونه به صورت رابطه‌ی (۱) تعریف شد:

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2} \quad (1)$$

در ضریب اطمینان ۹۵ درصد، $Z = 1/96$ است و در این مطالعه، چون نمونه‌ها به دو گروه انگل و غیر انگل تقسیم شدند، $p = q = 0/5$ خواهد بود. برای دستیابی به حد مجاز خطا در محاسبات (کمتر از ۰/۱۴)، مقدار حجم نمونه برابر با ۴۹ نمونه تعیین شد.

پیش پردازش تصاویر

الف- افزایش کنتراست

در این مقاله جهت بهبود تصویر از روش افزایش کنتراست نوع یکنواخت مکانی استفاده شد (۹). کنتراست هر سه زیر باند قرمز، سبز و آبی تصاویر با استفاده از تابع کشش کنتراست به صورت خطی افزایش داده شدند. این تابع به صورت رابطه‌ی (۲) تعریف شد:

$$S = T(r) = \frac{1}{1 + \left(\frac{m}{r}\right)^E} \quad (2)$$

که در آن ورودی‌های کمتر از m به محدوده‌ی باریک و تاریک و ورودی‌های بیشتر از m به محدوده‌ی باریک و روشن فشرده شدند و نتیجه‌ی کار یک تصویر با کنتراست بالاتر بود. r مربوط به شدت

که در آن σ_w^2 واریانس درون کلاسی، σ_1^2 واریانس کلاس اول و σ_2^2 واریانس کلاس دوم می‌باشد.

ب- آستانه‌گذاری ساوولا

یک تصویر مقیاس خاکستری که در آن $g(x, y) \in [0-255]$ ، شدت پیکسل در مکان (x, y) را نشان می‌دهد، در نظر بگیرید. در تکنیک‌های آستانه‌گذاری محلی، هدف محاسبه‌ی آستانه‌ی $t(x, y)$ برای هر پیکسل می‌باشد؛ به طوری که:

$$O(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{if } g(x, y) \leq t(x, y) \\ 255 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (5)$$

در روش ساوولا (Sauvola)، آستانه‌ی $f(x, y)$ با استفاده از میانگین $m(x, y)$ و انحراف معیار $s(x, y)$ شدت‌های پیکسل در یک پنجره‌ی $W \times W$ حول (x, y) محاسبه می‌شود (۱۱):

$$f(x, y) = m(x, y) \left[1 + k \left(\frac{s(x, y)}{R} - 1 \right) \right] \quad (6)$$

که R مقدار بیشینه‌ی انحراف معیار است $(R = 128)$ برای یک تصویر خاکستری، و k پارامتری است که مقادیر مثبتی در بازه‌ی $(0/5 - 0/2)$ را می‌دهد. میانگین محلی $m(x, y)$ و انحراف معیار محلی $s(x, y)$ مقدار آستانه را مطابق با کتتراست در همسایگی محلی پیکسل انطباق می‌دهد.

شد و تنها از این تصاویر کوچک (زیر تصویر) جهت پردازش اصلی استفاده گردید.

روش مورفولوژی استفاده شده عبارت از عنصر ساختمانی بیضی شکلی است که تصویر به وسیله‌ی آن باز و بسته و ماسک اولیه تولید شد. این ماسک نشان دهنده‌ی محل‌هایی است که مشکوک به حضور انگل می‌باشد و برای بررسی بیشتر به مرحله‌ی پردازش فرستاده می‌شود. مطالب ارایه شده در این قسمت در شکل ۲ آمده است.

بخش بندی تصویر

الف- آستانه‌گذاری اوتسو

یک تصویر مقیاس خاکستری که در آن $g(x, y) \in [0-255]$ ، شدت پیکسل در مکان (x, y) را نشان می‌دهد، در نظر بگیرید. در تکنیک‌های آستانه‌گذاری کلی، هدف محاسبه‌ی آستانه‌ی t برای پیکسل‌ها می‌باشد؛ به طوری که:

$$O(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{if } g(x, y) \leq t \\ 255 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3)$$

در روش اوتسو (Otsu)، مقدار t با استفاده از حداقل سازی واریانس درون کلاسی به دست می‌آید (۱۰):

$$\sigma_w^2(t) = q_1(t)\sigma_1^2(t) + q_2(t)\sigma_2^2(t) \quad (4)$$



شکل ۲. روند تولید ماسک اولیه و زیر تصویرهای کاندید. از راست به چپ: تصویر اصلی، ماسک اولیه و زیر تصویرهای مورد بررسی

$$J = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n \|x_i^{(j)} - C_j\|^2 \quad (7)$$

که در آن $\| \cdot \|$ معیار فاصله‌ی بین نقاط و C_j مرکز خوشه‌ی j ام است.

با وجود این که خاتمه پذیرگی الگوریتم بالا تضمین شده است؛ اما جواب نهایی آن واحد نیست و همواره جوابی بهینه نمی‌باشد. به طور کلی، روش K-means دارای مشکلات زیر است.

- جواب نهایی به انتخاب خوشه‌های اولیه وابسته است.
- روالی مشخص برای محاسبه‌ی اولیه‌ی مراکز خوشه‌ها وجود ندارد.
- اگر در تکراری از الگوریتم تعداد داده‌های متعلق به خوشه‌ای صفر شد، راهی برای تغییر و بهبود ادامه‌ی روش وجود ندارد.

۴-۱ استخراج ویژگی

ویژگی‌های استخراج شده در این مقاله، به دو دسته تقسیم می‌شوند: ویژگی‌های هندسی (Geometric features) و ویژگی‌های بافت (Texture features) (۱۳). در مجموع، تعداد ۶۵ ویژگی برای هر کاندید به شرح زیر استخراج شد.

الف- ویژگی‌های هندسی

ویژگی‌های هندسی استخراج شده در این تحقیق به قرار زیر هستند:

- ۱- مساحت (Area) شیء مورد بررسی: از این ویژگی برای حذف اشیای یافت شده‌ی بسیار بزرگ و یا بسیار کوچک استفاده می‌شود.
- ۲- نسبت مساحت هسته‌ی انگل به کل انگل (Nucleus-Parasite ratio): از نظر مورفولوژی، هسته‌ی جسم لیشمن سه تا چهار برابر کوچک‌تر از کل آن می‌باشد.

زمانی که کنتراست بالا در بعضی مناطق تصویر وجود دارد، $s(x, y)$ به طور تقریبی برابر R است که در نتیجه‌ی آن، $t(x, y)$ به طور تقریبی برابر با $m(x, y)$ می‌شود. با این وجود، تفاوت زمانی به وجود می‌آید که در همسایگی محلی، کنتراست بسیار کم باشد. در این صورت، آستانه $t(x, y)$ کمتر از مقدار میانگین می‌شود. در نتیجه مناطق به نسبت تاریک از پس زمینه با موفقیت حذف می‌شوند. پارامتر K مقدار آستانه را در پنجره‌ی محلی تنظیم می‌کند؛ به طوری که هر چقدر مقدار k بیشتر شود، مقدار آستانه از میانگین محلی $m(x, y)$ نیز کمتر می‌شود. در کل، الگوریتم به مقدار k استفاده شده خیلی حساس نیست.

ج- خوشه‌بندی k-میانگین

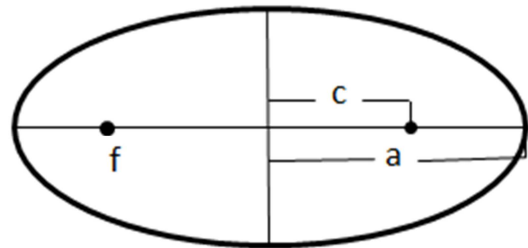
در خوشه‌بندی سعی می‌شود تا داده‌ها به خوشه‌هایی تقسیم شوند که شباهت بین داده‌های درون هر خوشه حداکثر و شباهت بین داده‌های درون خوشه‌های متفاوت حداقل شود. روش خوشه‌بندی K-means، یک روش پایه برای بسیاری از روش‌های خوشه‌بندی دیگر (مانند خوشه‌بندی فازی) محسوب می‌شود (۱۲). برای این الگوریتم شکل‌های مختلفی بیان شده است؛ اما همه‌ی آن‌ها دارای روالی تکراری هستند که برای تعدادی ثابت از خوشه‌ها سعی در تخمین موارد زیر دارند:

- به دست آوردن نقاطی به عنوان مراکز خوشه‌ها که این نقاط در واقع همان میانگین نقاط متعلق به هر خوشه هستند.
- نسبت دادن هر نمونه‌ی داده به یک خوشه که آن داده کمترین فاصله تا مرکز آن خوشه را دارا باشد.
- در این روش، تابع زیر به عنوان تابع هدف مطرح است.

۳- استحکام (Solidity): از آن جا که اجسام لیشمن دوکی شکل می‌باشند، نسبت به آرتیفکت‌های موجود در تصویر از استحکام بیشتری برخوردار هستند. مقدار مستحکم بودن (یا متخلخل نبودن) شیء مورد بررسی به صورت زیر محاسبه می‌شود.

$$\text{Solidity} = \frac{\text{Convex hull area}}{\text{area}} \quad (8)$$

۴- کشیدگی: با توجه به دوکی شکل بودن اجسام لیشمن، میزان کشیدگی آن‌ها قابل توجه است. ضریب کشیدگی نسبت میان فاصله‌ی کانونی بیضی و شعاع بزرگ آن تعریف می‌شود و به صورت زیر است:



شکل ۳. فاصله‌ی کانونی و شعاع بزرگ بیضی

$$\text{Eccentricity} = \frac{c}{a} \quad (9)$$

۵- میزان گردی هسته: هسته‌ی اجسام لیشمن در مقایسه با هسته‌ی تعریف شده برای سایر آرتیفکت‌ها گردتر می‌باشد. میزان گردی هسته با توجه به مساحت و قطر محیط آن با استفاده از رابطه‌ی (۱۰) محاسبه می‌شود.

$$\text{Roundness} = \frac{4\pi A}{p^2} \quad (10)$$

ب- ویژگی‌های بافت

یک روش مهم برای توصیف یک ناحیه، یافتن کمیت‌های مربوط به بافت آن ناحیه می‌باشد. یکی از روش‌های پرکاربرد در تحلیل بافت بر مبنای خصوصیات آماری هیستوگرام

$$\mu_n = \sum_{i=0}^{L-1} (z_i - m)^n p(z_i) \quad (11)$$

که در آن Z_i متغیر تصادفی مربوط به شدت، $p(z)$ هیستوگرام سطوح شدت در یک ناحیه، L تعداد سطوح شدت ممکن می‌باشد. لازم به ذکر است که ممان دوم یعنی $\mu_2(z)$ همان واریانس σ^2 است.

ویژگی‌های بافتی به کار رفته در این تحقیق به شرح زیر می‌باشند:

۱- میانگین: مقدار میانگین شدت بافت را اندازه‌گیری می‌کند و به صورت زیر محاسبه می‌شود.

$$m = \sum_{i=0}^{L-1} z_i p(z_i) \quad (12)$$

۲- انحراف معیار: مقدار میانگین کنتراست بافت را اندازه‌گیری می‌کند و به صورت زیر به دست می‌آید:

$$\sigma = \sqrt{\mu_2(2)} = \sqrt{\sigma^2} \quad (13)$$

۳- همواری: میزان صافی نسبی مربوط به شدت یک ناحیه را اندازه‌گیری می‌کند و از رابطه‌ی (۱۴) محاسبه می‌شود:

$$R = 1 - \frac{1}{(1+\sigma^2)} \quad (14)$$

R برای یک ناحیه با شدت ثابت، صفر و برای

مناسب از جعبه‌ی ابزار تشخیص الگو با شبکه‌ی عصبی موجود در متلب استفاده شد. شبکه‌ی طراحی شده از نوع شبکه‌های عصبی جلوسو می‌باشد. این شبکه از دو لایه‌ی مخفی از نورون‌های سیگموئید تشکیل می‌شود و هر دو لایه، از تابع انتقال Tansig استفاده می‌کند. تعداد نورون‌های ورودی با توجه به تعداد ویژگی‌ها، ۶۵ نورون، تعداد نورون‌های لایه‌ی مخفی اول ۱۰ نورون و تعداد نورون‌های خروجی یک نورون می‌باشد.

یافته‌ها

روش پیشنهادی در این تحقیق با توجه به حجم نمونه‌ی تعیین شده با روش حجم نمونه‌ی Cochran، بر روی ۲۰ تصویر که حاوی ۴۹ انگل می‌باشند، پیاده‌سازی شد. تعداد کل اشیای یافت شده در این ۲۰ تصویر، برابر با ۲۶۳ شیء بود که برای تصمیم‌گیری به مرحله‌ی استخراج ویژگی و طبقه‌بندی برده شدند. روش‌های مورد بررسی در نرم‌افزار متلب R2009b با استفاده از لپ‌تاپ مدل Sony با مشخصات پردازنده‌ی Core ۲ due و ۲/۴ گیگا بایت حافظه‌ی RAM، اجرا شدند. زمان اجرای روش پیشنهادی برای هر تصویر با توجه به تعداد کاندیدهای انتخاب شده در تصویر متفاوت بود.

نتایج حاصل از روش پیشنهادی به دو دسته تقسیم می‌شود: نتایج مربوط به بخش‌بندی اجسام لیثمن و نتایج مربوط به شناسایی این اجسام. در ادامه این نتایج توضیح داده شده‌اند.

نتایج حاصل از بخش‌بندی

به منظور بررسی دقت بخش‌بندی، مقایسه‌ای بین مرز مشخص شده توسط روش‌های بخش‌بندی خودکار

یک ناحیه با سطوح شدت متغیر، یک است. در عمل واریانس مورد استفاده در این اندازه‌گیری در بازه‌ی (۰-۱) نرمال می‌شود. این کار با تقسیم واریانس بر $(L-1)^2$ انجام می‌شود.

۴- ممان سوم: میزان تقارن یک هیستوگرام را اندازه‌گیری می‌کند و به صورت زیر به دست می‌آید:

$$\mu_3 = \sum_{i=0}^{L-1} (z_i - m)^3 p(z_i) \quad (15)$$

این مقدار در مورد یک هیستوگرام متقارن، صفر؛ در مورد یک هیستوگرام متمایل به راست، مثبت و در مورد یک هیستوگرام متمایل به چپ، منفی است. برای این که مقادیر حاصل با سایر اندازه‌گیری‌های انجام شده قابل مقایسه باشد، کلیه‌ی مقادیر با تقسیم بر $(L-1)^2$ نرمال می‌شوند.

۵- یکنواختی: میزان یکنواختی بافت را اندازه‌گیری می‌کند. این مقدار با استفاده از رابطه‌ی (۱۶) محاسبه می‌شود:

$$U = \sum_{i=0}^{L-1} p^2(z_i) \quad (16)$$

در صورتی که کلیه‌ی سطوح خاکستری برابر باشند، این مقدار حداکثر خواهد بود.

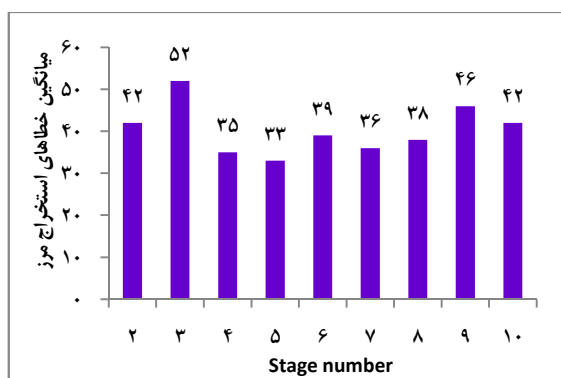
۶- آنتروپی: میزان ماهیت تصادفی بافت را اندازه‌گیری می‌کند.

$$e = \sum_{i=0}^{L-1} p(z_i) \log_2 p(z_i) \quad (17)$$

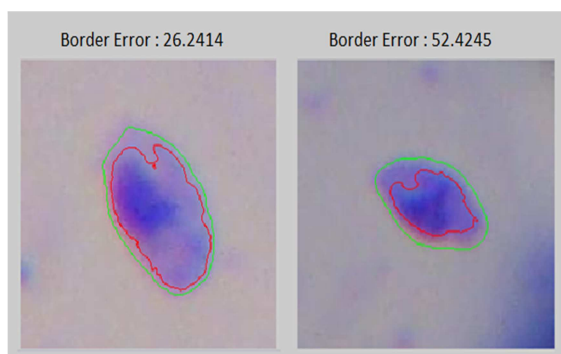
طبقه‌بندی کاندیدها

پس از استخراج ویژگی‌های مناسب از کاندیدها، لازم است سالم یا معیوب بودن هر کاندید مشخص شود. اگر تعداد ویژگی‌های مورد بررسی در هر کاندید زیاد باشد، می‌توان برای طبقه‌بندی کاندیدها، از روش‌های طبقه‌بندی کننده استفاده نمود. در این تحقیق، برای طبقه‌بندی کاندیدها از شبکه‌های عصبی مصنوعی استفاده شده است. در این تحقیق، برای ایجاد شبکه‌ی

شکل ۵ نمونه‌هایی از نتایج این آستانه‌گذاری آمده است.



شکل ۴. میزان میانگین خطاهای استخراج مرز محاسبه شده در هر سطح به روش اوتسو



شکل ۵. مقایسه‌ی مرز استخراج شده توسط روش آستانه‌گذاری اوتسو با مرز تعیین شده توسط پزشک متخصص. میزان خطای محاسبه شده برای هر تصویر بر حسب درصد بیان شده است.

در شکل ۵، در هر تصویر، منحنی سبز رنگ مرزی است که توسط پزشک متخصص به صورت دستی تعیین شده و منحنی قرمز رنگ، مرز استخراج شده با روش آستانه‌گذاری اوتسو است.

ب- آستانه‌گذاری ساوولا

ابتدا برای تعیین بهترین مقدار آستانه و بهترین ماسک اولیه، میزان خطای مرز استخراج شده با توجه به مقادیر آستانه‌ی مختلف (از صفر تا یک با گام ۰/۱) و ماسک‌های اولیه‌ی متفاوت (مربعی با ابعاد ۳ تا ۲۵۶

ذکر شده در قسمت ۲ و مرز تعیین شده توسط پزشک صورت گرفته است. میزان خطای موجود با استفاده از رابطه‌ی (۱۸) به دست آمده است (۱۴):

(۱۸)

$$\text{Border Error} = \frac{\text{Area}(\text{Automatic Border} \oplus \text{Manual Border})}{\text{Area}(\text{Manual Border})} \times 100$$

که در آن Automatic Border تصویر باینری حاصل از شناسایی خودکار توسط روش‌های بخش‌بندی می‌باشد. Manual Border تصویر باینری تعیین شده توسط پزشک متخصص است و \oplus نشان دهنده‌ی عملگر «یا انحصاری» (XOR یا Exclusive OR) است.

الف- آستانه‌گذاری اوتسو

در این تحقیق، عملیات آستانه‌گذاری اوتسو برای سطوح ۲ تا ۱۰ انجام شده است و در هر سطح، میزان خطای استخراج مرز به دست آمده است. لازم به ذکر است که در این روش، از اطلاعات اولیه‌ی تصویر یعنی مکان هسته، استفاده شده است تا مواردی که در تصویر باینری خروجی تابع اوتسو وجود دارند و انگل به شمار نمی‌آیند، حذف شود. به عبارت دیگر، میزان خطای الگوریتم استخراج مرز اوتسو، برای سطوح ۲ تا ۱۰ و فقط برای انگل‌ها محاسبه شده است. شکل ۴ نشان دهنده‌ی میزان میانگین خطاهای استخراج مرز محاسبه شده در هر سطح می‌باشد. در این نمودار، محور افقی نشان دهنده‌ی سطح آستانه‌گذاری و محور عمودی میزان میانگین خطاهای محاسبه شده در هر سطح است.

با توجه به نمودارهای قبل، حداقل میانگین خطا در سطح پنج اتفاق می‌افتد. از این رو، از سطح پنج در آستانه‌گذاری به روش اوتسو، استفاده می‌شود. در

با گام مشخص)، برای تک تک تصاویر موجود بررسی شده است. لازم به ذکر است که در این روش نیز از اطلاعات اولیه‌ی تصویر یعنی مکان هسته، استفاده شده است تا مواردی که در تصویر باینری خروجی وجود دارد و انگل به شمار نمی‌آید، حذف شود. به عبارت دیگر، میزان خطای محاسبه شده‌ی الگوریتم استخراج مرز به روش آستانه‌گذاری ساوولا، برای مقادیر آستانه‌ی مختلف، ماسک‌های اولیه‌ی متفاوت و فقط برای انگل‌ها می‌باشد.

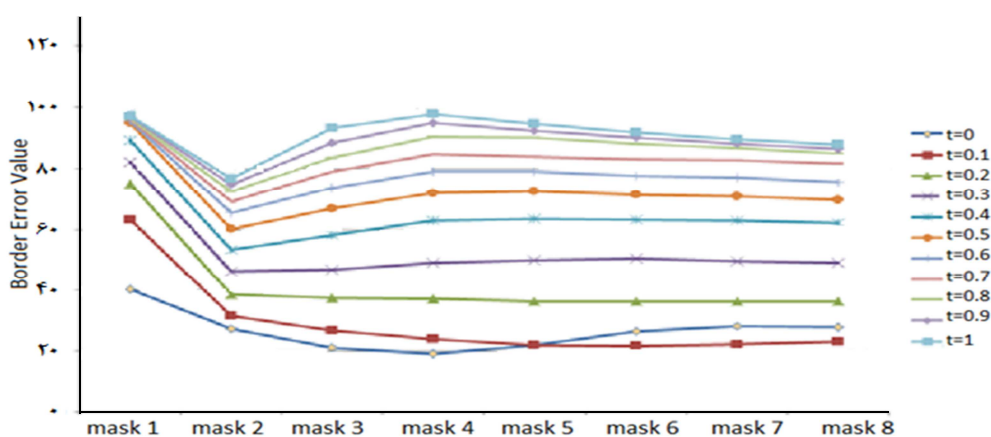
شکل ۶ نشان دهنده‌ی نتیجه‌ی حاصل از این بررسی برای یک تصویر می‌باشد. با توجه به نمودار موجود در شکل ۶، واضح است که در مقادیر آستانه‌ی صفر تا ۰/۲ و ماسک‌های اولیه‌ی ۳-۶ کمترین میزان خطا برای این تصویر رخ داده است. با بررسی نمودار مربوط به تمام تصاویر، کمترین میزان خطا در بین مقادیر آستانه ۰/۱-۰/۲ با ماسک‌های اولیه‌ی ۳-۶ به دست آمد. از این رو، بین مقادیر آستانه‌ی ۰/۱-۰/۲ و ماسک‌های اولیه‌ی ۳-۶، برای انتخاب بهترین مقدار آستانه و مناسب‌ترین ماسک نمودار میانگین خطا برای تمام تصاویر موجود برای ماسک‌های ۳-۶ و سطح آستانه‌های ۰/۱-۰/۲ رسم شد. شکل ۷، نتیجه‌ی

حاصل از این بررسی را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار موجود در شکل ۷، در مقدار آستانه‌ی ۰/۱ و با ماسک پنجم کمترین میزان خطا رخ می‌دهد. از این رو برای بررسی بخش‌بندی به روش آستانه‌گذاری ساوولا، از مقدار آستانه‌ی ۰/۱ و ماسک اولیه‌ی ۵ استفاده می‌شود. در شکل ۸، نمونه‌هایی از نتایج این آستانه‌گذاری آمده است.

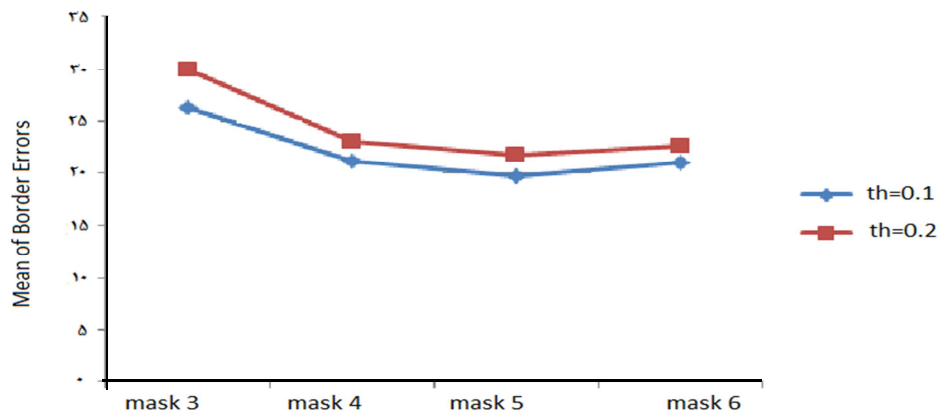
در شکل ۸، در هر تصویر، منحنی سبز رنگ مرزی است که توسط پزشک متخصص به صورت دستی تعیین شده و منحنی قرمز رنگ، مرز استخراج شده با روش آستانه‌گذاری ساوولا است.

ج- خوشه‌بندی k-میانگین

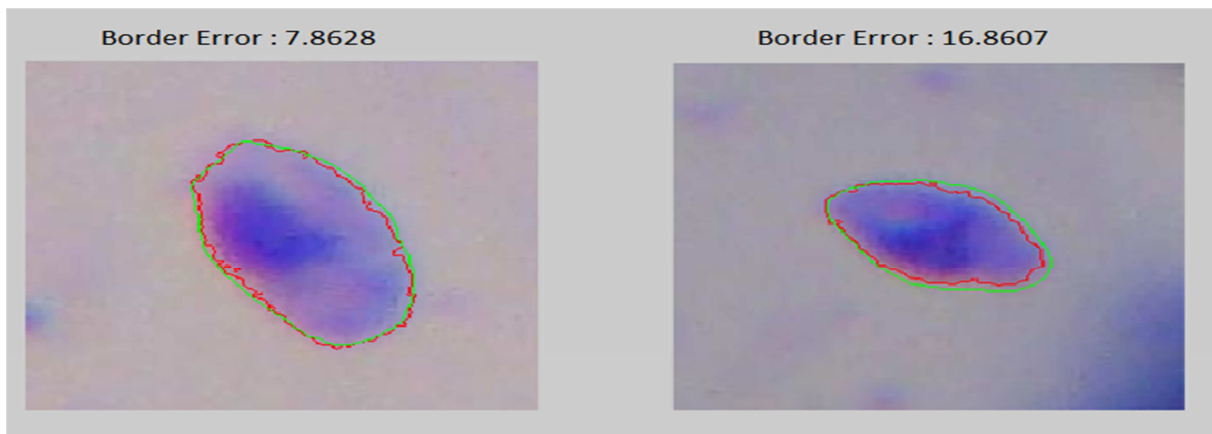
در این قسمت برای تعداد خوشه‌ی ۲ تا ۶ در روش k-میانگین عملیات خوشه‌بندی انجام شده است و با هر تعداد خوشه‌ی تعیین شده، میزان خطای استخراج مرز به دست آمده است. شکل ۹ نشان دهنده‌ی میزان میانگین خطاهای استخراج مرز محاسبه شده در هر خوشه می‌باشد. در این شکل، محور افقی بیانگر تعداد خوشه و محور عمودی میزان میانگین خطاهای محاسبه شده در هر خوشه را نشان می‌دهند.



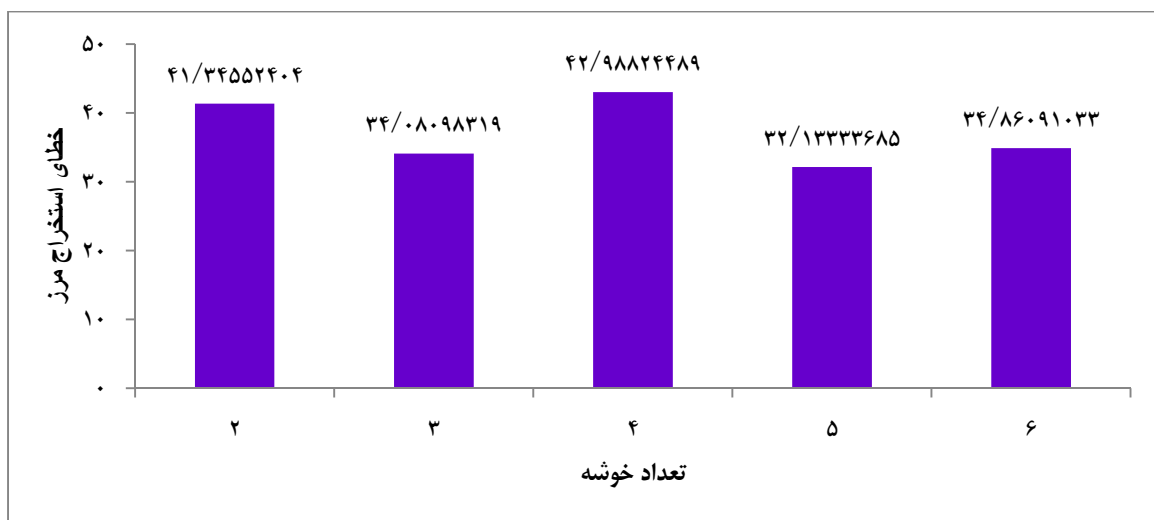
شکل ۶. میزان تغییرات خطای مرز استخراج شده با توجه به افزایش مقدار آستانه و اندازه‌ی ماسک اولیه در روش ساوولا



شکل ۷. نمودار میانگین خطای استخراج مرز حاصل از اعمال روش آستانه‌گذاری ساوولا بر روی تمام تصاویر برای دو مقدار آستانه‌ی ۰/۱، ۰/۲ ماسک‌های ۳ تا ۶



شکل ۸. مقایسه‌ی مرز استخراج شده توسط روش آستانه‌گذاری ساوولا با مرز تعیین شده توسط پزشک متخصص. میزان خطای محاسبه شده برای هر تصویر بر حسب درصد بیان شده است.



شکل ۹. میانگین خطای استخراج مرز محاسبه شده در خوشه‌های ۲ تا ۶

بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک جسم لیثمن می‌باشند و توسط روش به درستی به عنوان جسم لیثمن شناخته شده‌اند. مثبت کاذب (Tn یا True negative) بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک جسم لیثمن نمی‌باشند و توسط روش به درستی به عنوان جسم لیثمن شناخته نشده‌اند. منفی درست (Fp یا False positive) بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک جسم لیثمن نمی‌باشند و توسط روش به اشتباه به عنوان جسم لیثمن شناخته شده‌اند و منفی کاذب (Fn یا False negative) بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک، جسم لیثمن می‌باشند و توسط روش به اشتباه به عنوان جسم لیثمن شناخته نشده‌اند.

نسبت احتمال تشخیص (DOR) یا Diagnosis odds ratio) نسبتی است که احتمال مثبت بودن بیماری را به احتمال مثبت بودن عدم بیماری بررسی می‌کند و به صورت رابطه‌ی (۲۲) تعریف می‌شود (۱۵):

$$DOR = \frac{\left(\frac{Tp}{Fn}\right)}{\left(\frac{Fp}{Tn}\right)} = \left(\frac{Sens}{1-Sens}\right) / \left(\frac{1-Spec}{Spec}\right) \quad (22)$$

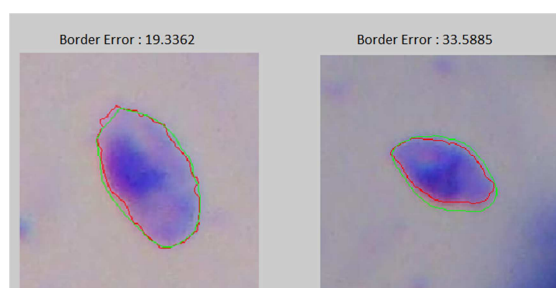
هر چه مقدار DOR بیشتر از یک باشد، دلیل بر میزان تشخیص صحیح‌تر است.

بحث

شکل ۱۱ میانگین خطای مرزهای استخراج شده توسط سه روش آستانه‌گذاری اوتسو، آستانه‌گذاری ساوولا و k-میانگین را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، روش ساوولا کمترین میانگین خطا را دارد.

همان‌طور که در شکل ۹ آمده است، تعداد خوشه‌ی برابر با ۵، کمترین مقدار میانگین خطا را دارد؛ از این رو، در مطالعه‌ی حاضر از ۵ خوشه استفاده شد. در زیر نمونه‌هایی از نتایج این خوشه‌بندی دیده می‌شود.

در شکل ۱۰ در هر تصویر، منحنی سبز رنگ مرزی است که توسط پزشک متخصص به صورت دستی تعیین شده است و منحنی قرمز رنگ، مرز استخراج شده با روش k-میانگین می‌باشد.



شکل ۱۰. مقایسه‌ی مرز استخراج شده توسط روش k-میانگین با مرز تعیین شده توسط پزشک متخصص. میزان خطای محاسبه شده برای هر تصویر، بر حسب درصد بیان شده است.

نتایج حاصل از شناسایی جسم لیثمن

جهت بررسی آماری، خروجی روش‌های بررسی شده، خروجی هر روش به صورت جداگانه با نظر پزشک متخصص مقایسه و معیارهای ارزیابی از قبیل حساسیت (Sensitivity)، ویژگی (Specificity) و دقت (Accuracy) محاسبه شد. این مقادیر با استفاده از روابط (۱۹)، (۲۰) و (۲۱) به دست می‌آیند (۱۵):

$$Sensitivity = \frac{Tp}{Tp+Fn} \quad (19)$$

$$Specificity = \frac{Tn}{Tn+Fp} \quad (20)$$

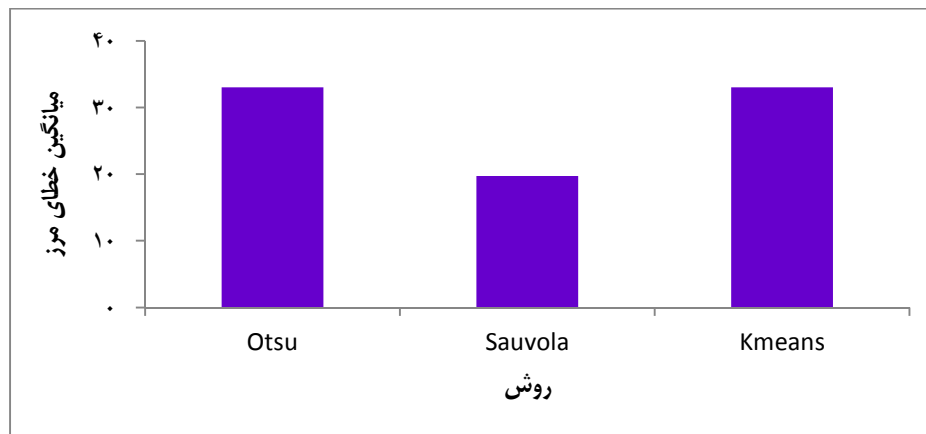
$$Accuracy = \frac{Tp+Tn}{Tp+Fp+Tn+Fn} \quad (21)$$

که در آن مثبت درست (Tp یا True positive)

اوتسو بیشترین دقت را دارد و با توجه به نسبت تشخیص صحیح، مشاهده می‌شود که روش اوتسو نسبت به سایر روش‌های بررسی شده، کارا تر است.

همچنین در قسمت شناسایی جسم لیشمن، با توجه به نتایج حاصل از شناسایی جسم لیشمن توسط سه روش بررسی شده، جدول ۱ حاصل شد.

با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود که روش



شکل ۱۱. میانگین خطای مرزهای استخراج شده توسط سه روش مورد بررسی

جدول ۱. مقایسه‌ی نتایج شناسایی جسم لیشمن در سه روش مورد بررسی

روش	نسبت احتمال تشخیص	ویژگی درصد	حساسیت درصد	دقت درصد
Otsu	۱۳/۷۲	۹۳/۲۰	۵۰/۰۰	۸۳/۹۸
Sauvola	۷/۴۴	۸۶/۲۰	۵۴/۳۴	۷۹/۵۴
K-means	۹/۳۴	۸۸/۲۰	۵۵/۰۰	۸۱/۶۱

References

- Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007.
- Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. Am Fam Physician 2004; 69(6): 1455-60.
- World Health Organization. Strategic Direction for Research: Leishmaniasis [Online]. [cited 2002 Feb]; Available from: URL: www.who.int/tdr
- Talari SA, Sadr F. Treatment of cutaneous Leishmaniasis: effectiveness, and adverse effects of the drugs. Feyz 2001; 5(1): 85-94. [In Persian].
- Pagadala P. Tumor border detection in epiluminescence microscopy images [Thesis]. Columbia, MO: Department of Electrical and Computer Engineering, University of Missouri 1998.
- Schmid P. Segmentation of digitized dermatoscopic images by two-dimensional color clustering. IEEE Trans Med Imaging 1999; 18(2): 164-71.
- Erkol B, Moss RH, Stanley RJ, Stoecker WV, Hvatum E. Automatic lesion boundary detection in dermoscopy images using gradient vector flow snakes. Skin Res Technol 2005; 11(1): 17-26.
- Cucchiara R, Grana C, Seidenari S, Pellacani G. Exploiting color and topological features for region segmentation with recursive fuzzy C-

- means. *Machine Graphics & Vision International Journal* 2002; 11(2-3): 169-82.
9. Wan Y, Shi D. Joint exact histogram specification and image enhancement through the wavelet transform. *IEEE Trans Image Process* 2007; 16(9): 2245-50.
 10. Otsu N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Systems, Man, and Cybernetics Society* 1979; 9(1): 62-6.
 11. Sauvola J, Pietikäinen M. Adaptive document image binarization. *Pattern Recognition* 1999; 33(2000): 225-36.
 12. Alpaydin E. Introduction to machine learning. Cambridge MA: The MIT Press; 2004.
 13. Gonzalez R, Woods R, Eddins S. Digital image processing using MATLAB. 2nd ed. Knoxville, TN: Gatesmark Publishing; 2009.
 14. Celebi ME, Kingravi HA, Iyatomi H, Aslandogan YA, Stoecker WV, Moss RH, et al. Border detection in dermoscopy images using statistical region merging. *Skin Res Technol* 2008; 14(3): 347-53.
 15. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossuyt PM. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003; 56(11): 1129-35.

Automatic Boundary Extraction of Leishman Bodies in Bone Marrow Samples from Patients with Visceral Leishmaniasis

Maria Farahi¹, Hossein Rabbani PhD², Ardeshir Talebi MD³

Original Article

Abstract

Background: According to the progress of microscopic imaging technology and suitable image processing techniques in the past decade, there is a tendency to use computer for automatic diagnosis of microscopic diseases. Automatic border detection is one of the most important steps in computer diagnosis that accuracy and specificity of the subsequent steps crucially depends on it. Microscopic images are colored to be seen more accurate and easier; after coloring, the image artifacts increases, so the boundary detection of objects is very important in order to find the exact feature extraction.

Methods: In this study, leishman bodies existed in microscopic images taken from bone marrow samples of patients with visceral leishmaniasis underwent automatic-segmentation using Otsu and Savoulla thresholding methods besides K-means clustering method. For data acquisition, a digital camera (Sony DSC-H9) coupled on an optical microscope (Olympus-CH40RF200) were used. Proposed method was tested on 20 images. For automatic diagnosis of the leishman bodies from all found objects, some geometric features like eccentricity, area ratio, roundness and solidity and some texture features like mean, variance, smoothness, third moment, uniformity and entropy were extracted. Found objects were classified into healthy and non-healthy groups using Feed-Forward Neural Network classifier.

Findings: To find the best mode for each method, a comparison were made and determined that using stage 5 for Otsu, threshold 0.1 for Sauvola and 5 clusters for k-means had minimum automatic boundary extraction error.

Conclusion: After comparison of obtained result with specialist, we found that Sauvola method had minimum error of border detection, and Otsu method was more accurate for automatic detection of leishman bodies.

Keywords: Automatic disease diagnosis, Visceral leishmaniasis, Leishman body, Segmentation, Border detection

Citation: Farahi M, Rabbani H, Talebi A. Automatic Boundary Extraction of Leishman Bodies in Bone Marrow Samples from Patients with Visceral Leishmaniasis. J Isfahan Med Sch 2014; 32(286): 726-39

* This paper is derived from a MSc thesis No. 392269 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Bioelectrical Engineering, School of Advanced Medical Technology AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Bioelectrical Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hossein Rabbani PhD, Email: h_rabbani@med.mui.ac.ir