

Sistema automático para la adquisición y análisis de imágenes de micobacterias

R. Nava¹, G. Cristóbal², E. Gil², B. Escalante-Ramírez¹, M. Desco³

¹Posgrado en Ciencia e Ingeniería de la Computación, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, urielrnav@uxmcc2.iimas.unam.mx

²Instituto de Óptica (CSIC), Serrano 121, 28006 Madrid, España {gabriel, elena}@optica.csic.es

³Unidad de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, España

Resumen

Los sistemas de microscopía industrial y de laboratorio son ampliamente utilizados en investigación biomédica. En concreto, los microscopios de fluorescencia son empleados para analizar organismos y células biológicas y en el estudio de las propiedades de sustancias orgánicas e inorgánicas. Un área de aplicación de interés consistiría en el desarrollo de sistemas de ayuda a la detección de tuberculosis y otras micobacteriosis que faciliten su análisis y así poder proporcionar un diagnóstico precoz. Desafortunadamente este tipo de microscopios son generalmente muy costosos, el proceso de captura de las imágenes no es trivial debido a los bajos niveles de luminosidad de los fluoróforos y consecuentemente a la presencia de elevados niveles de ruido. Además se presenta el problema del autoenfoco debido por un lado a las limitaciones físicas de los sistemas y por otro a las dificultades intrínsecas debidas a la escasez de puntos de referencia en las imágenes. En este trabajo presentamos una herramienta desarrollada en lenguaje Java que permite la automatización funcional del microscopio y el procesamiento posterior de las imágenes adquiridas. El prototipo desarrollado es modular, adaptable a cualquier microscopio y permite el trabajo cooperativo entre grupos para facilitar la incorporación de mejoras y extensiones y de ese modo facilitar la labor del microbiólogo.

1. Introducción

A primera vista, la adquisición de imágenes es una simple tarea de transformación del mundo real a un mundo digital. Sin embargo, la etapa de adquisición de imágenes es crucial para el éxito en el análisis del objeto de estudio, ya que se encarga de asegurar la calidad en las imágenes adquiridas para tareas subsecuentes de procesamiento. Esto es particularmente importante cuando se utilizan microscopios de fluorescencia, debido a que el nivel de luminosidad con el que se trabaja es escaso, lo que conlleva un aumento de ruido en las imágenes adquiridas[1].

El microscopio de fluorescencia es una herramienta utilizada ampliamente en el estudio de las propiedades de los organismos orgánicos e inorgánicos. El microscopio aprovecha el fenómeno de la fluorescencia mediante el cual se pueden observar imágenes producto de la radiación elec-

tromagnética emitida por las moléculas que han sido absorbidas previamente como excitación[2].

En este tipo de estudios, el objeto de interés es etiquetado con una molécula llamada fluoróforo que absorbe energía de una longitud de onda específica y la emite en otra longitud de onda (de diferente color al de la luz absorbida) que depende del ambiente químico y la propia molécula.

El proceso de captura de las imágenes debe realizarse en un periodo de tiempo breve, ya que la excitación de las moléculas con fotones provoca una degradación. Este proceso de degradación en la capacidad de fluorescencia conocido como *photobleaching* puede prevenirse utilizando fluoróforos más robustos o minimizando la iluminación. Sin embargo, el *photobleaching* se puede aprovechar para estudiar el movimiento o difusión de las moléculas mediante técnicas de cuantificación conocidas como *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP)[3].

Un factor crítico en la etapa de adquisición de imágenes es la obtención de un plano focal óptimo. Los actuales diseños de los microscopios son adecuados para obtener imágenes de organismos que pueden desplazarse rápidamente en un sólo plano focal. Además, la sensibilidad de los dispositivos de cargas acopladas (CCD) permiten altas tasas de muestreo. Sin embargo, existen ciertos organismos que se pueden desplazar a través de distintos planos focales, lo que representa una dificultad significativa[4].

Existen también dispositivos que permiten autoenfocar mediante hardware. Sin embargo, son relativamente lentos. Típicamente, toma al rededor de 10 milisegundos cambiar el plano focal. Como consecuencia, algunos eventos importantes no quedan capturados en las imágenes[4], [5]. Debido a esto, se han propuesto múltiples algoritmos de autoenfoco, algunos métodos como los basados en wavelets utilizan varios planos focales para generar una sola imagen totalmente enfocada y que perceptualmente tiene mayor calidad visual[6]. Otros métodos realizan cálculo de variancias para estimar el grado de desenfoque en las imágenes. Puede encontrarse una revisión de los algoritmos de autoenfoco en [6], [7],[8] y [10].

En la siguiente sección presentamos el microscopio de

fluorescencia con el que se han realizado las pruebas y las modificaciones realizadas al hardware. Se muestra la herramienta de desarrollo que permite la automatización en la adquisición de datos y el posterior procesamiento de las imágenes adquiridas para la autodetección de micobacterias de tuberculosis (TB).

2. Automatización del microscopio

La automatización del microscopio puede dividirse en dos etapas. La primera etapa consiste en motorizar las partes móviles del microscopio para controlar el desplazamiento de las muestras en los ejes coordenados X-Y-Z. La adición de motores permite que el desplazamiento de la pletina sea más preciso.

La segunda etapa consiste en reemplazar el control manual de los motores por un software que controle las partes motorizadas del microscopio de forma remota.

2.1. Hardware

El equipo con el que contamos en el Instituto de Óptica es un microscopio de fluorescencia estandar de la marca MOTIC, modelo BA-400. Posee un sistema de objetivos de contraste de fase de 10X, 20X, 40X y 100X (para el estudio de la TB es suficiente el objetivo de 20X). El microscopio incorpora un sistema de iluminación Koehler que proporciona una mayor uniformidad en la iluminación y una lámpara halógena de 6V@30W centrable, Figura 1a. El equipo se completa con una fuente de alimentación y lámpara de mercurio de 100W así como un filtro para auramina 460/550.

Las Figuras 1b y 1c muestran las modificaciones que se realizaron para agregar la etapa de motorización. La pletina motorizada es un modelo H101 de la marca PRIOR SCIENTIFIC y sus motores de paso permiten un desplazamiento independiente del eje Z con un incremento mínimo de 1 μ metro en los ejes X-Y y un incremento mínimo de 0.01 μ m en el eje Z. La velocidad de desplazamiento máximo es de 60 $\frac{mm}{s}$. La etapa de motorización se controla a través el puerto RS232C (serial).

Para la captura de las imágenes se utilizó una cámara MOTICAM refrigerada de alta resolución MC-3000 de 3.3 Mpixeles con refrigeración Peltier y conexión mediante IEEE 1394 (Firewire).

2.2. Herramienta de desarrollo

Para la segunda parte de la automatización, se ha desarrollado una herramienta en código Java que está encargada de mover los motores de pasos, controlar la adquisición del flujo de video y proporciona herramientas para la etapa de postprocesado de las imágenes. El desarrollo del software está orientado hacia la construcción de "plugins" e implementa el *framework* Java Plugin (JPF)[9].

Un plugin es un componente estructurado que contribuye con código y recursos y define un punto de extensión de la aplicación base. Este enfoque permite a los desarrolladores construir aplicaciones modulares y fácilmente extensibles, obteniendo un nivel de abstracción mayor. Otra forma de



(a)



(b)



(c)

Figura 1. (a) Vista de la pletina motorizada H101 colocada sobre el microscopio Motic BA-400 (b) Motor de pasos para el movimiento en el eje de coordenadas Z (c) Vista inferior de la pletina y del colector del microscopio.

ver este enfoque es que la modularidad divide en varios componentes a una aplicación a través del uso de plugins. Esto significa que un plugin es una colección de clases y recursos que son administrados por un cargador de clases.

En la Figura 2 se muestra el esquema de la herramienta mediante el uso de diagramas de bloques. El programa base, Microscopio Virtual (MV), utiliza al *Administrador de plugins* para registrar y publicar todos los plugins que se encuentren en la carpeta `..\plugins`.

Al utilizar este enfoque, obtenemos las siguientes ventajas:

- Favorece la cooperación en el desarrollo del software.
- Los desarrolladores sólo necesitan concentrarse en el desarrollo de algoritmos de procesamiento de imágenes.

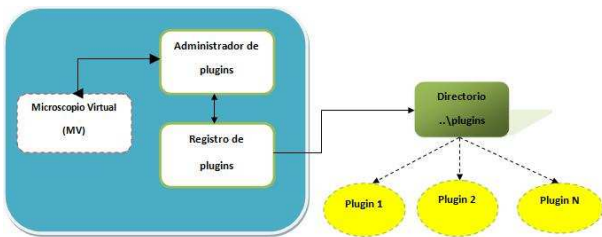


Figura 2. Diagrama de bloques de la herramienta "Microscopio Virtual".

- Inclusión de nuevos plugins a través de archivos Jar que se agregan al directorio ..\plugins.

La herramienta cuenta con un archivo 'template' que permite generar los plugins de forma sencilla, Figura 3. Con esto se asegura un comportamiento homogéneo de las extensiones del programa.

```
public class Autofocus extends Plugin implements Plugins {
    protected void doStart() throws Exception
    protected void doStop() throws Exception
    public JMenuItem getMenu()
    public String getName()
}
```

Figura 3. Template para generar un plugin.

En la Figura 4a se muestra una captura de pantalla de la herramienta de automatización con el módulo de control de movimiento del microscopio de fluorescencia. La Figura 4b muestra la interfaz de comunicación con el puerto serie (RS232), mientras que en la Figura 4c aparece el control virtual para mover los motores de pasos.

3. Algoritmos de autoenfoque

La tuberculosis y otras micobacteriosis son enfermedades serias que pueden controlarse mediante un diagnóstico precoz. Una técnica comúnmente empleada es el análisis de esputos. Sin embargo, su análisis se efectúa manualmente lo cual produce que sea una tarea rutinaria que consume mucho tiempo y que requiere personal altamente capacitado [11].

Las técnicas más sofisticadas de detección de micobacterias asumen que las imágenes están enfocadas o que el plano focal de la imagen es óptimo. Aquí radica la importancia de seleccionar algoritmos de autoenfoque eficientes. Los métodos de autoenfoque están basados en el análisis de su resolución espacial (o espectral). Cuando una imagen se encuentra desenfocada, su resolución espacial (o espectral) disminuye. La pérdida de resolución espacial se manifiesta en una pérdida del contenido de altas frecuencias. De aquí que la mayoría de los algoritmos cuantifiquen el contenido de altas frecuencias en cada plano de la imagen para determinar un foco óptimo.

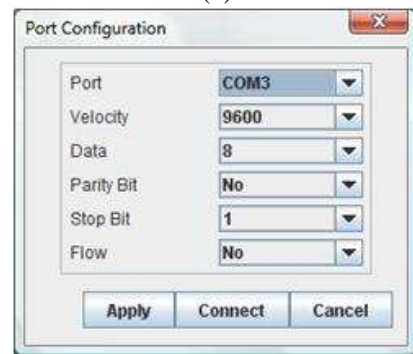
Con la variación de distancia en el eje Z entre el objetivo y la muestra, podemos obtener una pila de imágenes con planos focales distintos. En la primera versión de la herramienta de automatización hemos implementando un algoritmo que aparece descrito en[8] y que nos permite encon-



(a)



(b)



(c)

Figura 4. (a) Captura de pantalla de la interfaz que controla al microscopio (b) Control virtual para mover los motores de pasos (c) Ventana de comunicación con el puerto serie

trar el mejor plano focal en la pila de imágenes i_z mediante la ecuación (1).

$$F(z) = \frac{\sum_{x,y} [f(x,y) \otimes i_z(x,y)]^2}{[\sum_{x,y} i_z(x,y)]^2} \quad (1)$$

donde x, y son las coordenadas de la imagen, $f(x, y)$ es un filtro paso altas o paso banda (generalmente un filtro Laplaciano) y \otimes es el operador de convolución.

Adicionalmente, para las imágenes positivas de TB, se implementó un algoritmo de autoenfoque que aparece en[8] y que se basa en la obtención del histograma de la imagen, Figura 5. Cuando la bacteria de la tuberculosis está mejor enfocada, ello se manifiesta en una mayor contribución en la parte superior del histograma (Figura 5d). Por ello la varianza de dicha parte del histograma puede ser utilizada como medida de autoenfoque. Sin embargo y con objeto

de poder realzar la importancia de los pequeños bacilos es preciso considerar el logaritmo del histograma:

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

en donde p_l representa la probabilidad del nivel de intensidad l y $E_{log}\{l\} = \sum_l l \log(p_l)$ representa el valor esperado del logaritmo del histograma.

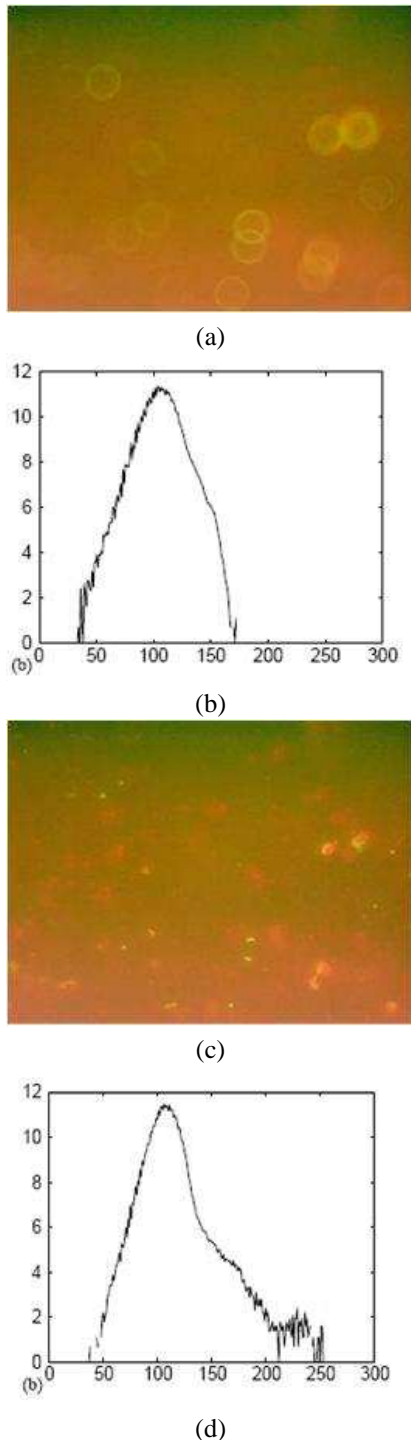


Figura 5. (a) Imagen desenfocada de TB. (b) Histograma de TB desenfocada. (c) Imagen enfocada de TB. (d) Histograma de TB enfocada

4. Conclusiones

En este trabajo se ha presentado una herramienta desarrollada en lenguaje Java basada en el framework JPF que permite la cooperación y expansión de librerías en forma modular. La herramienta automatiza la captura de imágenes del microscopio de fluorescencia e incorpora herramientas de autoenfoco que se utilizan para la autodetección de micobacterias de tuberculosis. Se han implementado varios algoritmos de autoenfoco si bien cabe indicar que es preciso realizar un estudio más exhaustivo de cual sería la mejor técnica de autoenfoco a utilizar en ausencia de bacilos (imágenes negativas) en donde la casi ausencia de información estructural dificulta enormemente el establecimiento de una métrica robusta de autoenfoco.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por los proyectos TEC2007-67025/TCM y TEC2007-30709E.

Referencias

- [1] Kozubek M. Image acquisition and its automation in fluorescence microscopy. In from cells to proteins: Imaging nature across dimensions. Springer, 2005. NATO Science Series, (ISBN 1-4020-3615-9).
- [2] Boddeke FR, Schenkeveld VME, vanGeest LK, Young IT. Fluorescence lifetime determination for application in microscopy. *International Conference on Pattern Recognition*, vol 3, 1996, pp 854-5
- [3] Braeckmans KB, Stubbe K, Remaut JD, De Smedt SC. Anomalous photobleaching in fluorescence recovery after photobleaching measurements due to excitation saturation: a case study for fluorescein. *J. Biomed. Opt.*, vol 11, sup 4, 2006
- [4] Prabhat P, Ram S, Sally Ward E, Ober RJ. Simultaneous imaging of different focal planes in fluorescence microscopy for the study of cellular dynamics in three dimensions. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, vol 3, sup 4, 2004, pp 237-6
- [5] Birer A, Ghohestani M, Cathignol D. Compact self focusing piezoelectric generator using electrically pre-stressed transducer for strong sound pulses in therapy. *IEEE Proceedings Ultrasonics Symposium*, vol 2, 2002, pp 1281-4
- [6] Nava R, Escalante-Ramírez, B, Cristóbal G. A novel multi-focus image fusion algorithm based on feature extraction and wavelets. *Proceedings of the SPIE*, vol 7000, 2008, pp 700028-10
- [7] Russell MJ, Douglas TS. Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy. *International Conference of Engineering in Medicine and Biology Society*, 2007, pp 3489-3492
- [8] Forero MG, Sroubek F, Cristóbal G. Identification of tuberculosis bacteria based on shape and color *Real-Time Imaging*, vol 10, 2004, pp 251-12
- [9] Página del proyecto de código libre Java Plug-in Framework <http://jpf.sourceforge.net/> (Consultada: Abril 2008).
- [10] Shen F, Hodgson L, Hahn K. Digital autofocus methods for automated microscopy. *Methods in Enzymology*, vol 414, 2006, pp 620-13
- [11] Forero, M.G., Cristóbal, G., Desco, M. Automatic identification of Mycobacterium tuberculosis by Gaussian mixture models. *J. of Microscopy*, vol 223, 2006, pp 120-32