

**HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GLÓBULOS  
ROJOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS**

LIZETH ANDREA CASTELLANOS BELTRÁN  
LUIS EDUARDO HASBÓN REYES

ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA

2012

# **HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS**

LIZETH ANDREA CASTELLANOS BELTRÁN

LUIS EDUARDO HASBÓN REYES

Trabajo de grado para optar al título de  
Ingeniero de Sistemas

Directora:

MSc. Lola Xiomara Bautista Rozo

Codirectores:

MSc(c)Lina María Garcés Rodríguez

MSc(c)Andrés Eduardo Gómez Hernández

ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA

2012

A mi familia por apoyarme en el camino que elegí y hacer de mí la persona que hoy soy. A mi madre Mariela por sus sabios consejos, a mi padre Marco por sus justos regaños (casi siempre) y a mis hermanos Elián y Cristián por ser pequeños mundos de ternura e inocencia.

A todas las personas con quienes compartí estos cinco años, y fueron mi apoyo mientras estuve lejos de casa, especialmente a: Andrea Marín, William Ardila, Emmanuell Díaz, John Lizarazo, Alexander Barbosa, Elkin Muñoz, Oscar Ardila y Jorge Ortíz. A todos mis compañeros de carrera con quienes inicié este camino y me brindaron su amistad incondicional a pesar de las distancias.

A mi codirector Andrés Gómez por ser el break en nuestros dilemas sistémicos, el  
GIIB te necesita!.

A mi compañero de tesis, mi directora Lola, mi codirectora Lina, al profe Mendoza y todos mis compañeros del GIIB: Hugo, Cindy, Yuly, Dario, Manuel, Wilfredo, Emir y Chaux por ser mis guías y con quienes fue realmente grato compartir ésta fase de mis estudios.

A quienes no menciono pero que de alguna u otra forma me apoyaron en esta etapa de mi vida.

Al Universo por ser la mayor representación de infinita perfección y belleza.

Lizeth Andrea Castellanos Beltrán

Dedico este libro primero a Dios, que con el mayor amor se entrego en una cruz por mi para darme vida verdadera, eterna, con propósito y libertad.

A mi padre Eduardo, por ser un gran padre, con pasión y empuje, esfuerzo y amor cada día para su familia, por sus consejos y correcciones, a mi madre Mariela, por el amor, cariño y ternura que coloca en cada gesto y palabra hacia sus hijos y familia, a mi hermana Diana, por su gran amistad, por la inocencia y dulzura con que cada día logra sacarme de la rutina y su paciencia para conmigo y mis regaños

A mi novia y mejor amiga, fiel y sabia compañera Alith, quien me ha apoyado constante e incondicionalmente, llenándome cada día con su ternura, inocencia, amor y alegría, motivándome a ser mejor y hacer todo de manera excelente a través de su ejemplo y sabiduría.

A mis abuelos por malcriarme de vez en cuando, aconsejarme y compartir mis alegrías y batallas, a mis primos, primas, tíos y tías, cerca o lejos, por formar parte de mi y en cada oportunidad posible compartir conmigo, llenando y alegrando mi vida con su presencia y cariño.

A mis amigos, mis hermanos en la fé, quienes han compartido mi lucha, mi vida, mis penas, mis sueños, y saben quien soy, es grato compartir con ustedes este triunfo y saber que han sido parte de mi vida, finalmente a mis compañeros del GIIB, por cada día construir sus sueños con pasión , trabajo en equipo y tenacidad, enseñándome que vale la pena investigar, gracias por haberme permitido hacer parte de ustedes y este proyecto.

Luis Eduardo Hasbón



## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus sinceros agradecimientos:

Al Grupo GIIB por confiar en nosotros para el desarrollo de este proyecto.

A nuestra directora, la profesora Lola Bautista por apoyarnos, brindarnos su ayuda en cada uno de los momentos que la necesitamos y motivarnos a ser mejores profesionales a través de su ejemplo.

A nuestros codirectores, Lina Garcés y Andres Gómez por proponer el desarrollo de este proyecto, enseñarnos que la investigación es el camino para lograr un mejor futuro y por guiarnos con sus consejos y experiencias de vida.

Al doctor Ernesto Rueda por recibirnos en su consultorio, por su paciencia para enseñarnos y solucionar nuestras dudas en el área de hematología.

Al Banco de Sangre y al Laboratorio Clínico de la UIS por suministrarnos las placas para la digitalización de las imágenes.

A Biosys Ltda por permitirnos sus equipos para realizar las primeras pruebas que fueron la base para dar forma a este proyecto y pensar en la continuidad del mismo.

Al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la UIS por permitirnos realizar la adquisición final de las imágenes.

A los ingenieros Hugo Gualdrón y Emir Galvis por compartirnos libremente sus conocimientos.

A nuestros compañeros del GIIB por apoyarnos en el proceso investigativo, por compartir con nosotros sus experiencias de vida y hacer su trabajo de la mejor manera.

# Índice general

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción</b>                                           | <b>24</b> |
| <b>2. Marco teórico</b>                                          | <b>26</b> |
| 2.1. La Sangre . . . . .                                         | 26        |
| 2.1.1. Glóbulos Rojos (Eritrocitos, RBC) . . .                   | 29        |
| 2.1.2. Extendido de Sangre Periférica (Frotis)                   | 29        |
| 2.1.3. Técnicas de Conteo Celular Sanguíneo                      | 31        |
| 2.2. Procesamiento Digital de Imágenes . . . . .                 | 34        |
| 2.2.1. Imagen Digital . . . . .                                  | 34        |
| 2.2.2. Modelos de Color . . . . .                                | 35        |
| 2.2.3. Etapas del Procesamiento Digital de<br>Imágenes . . . . . | 36        |

|           |                                                               |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.      | Herramientas para Procesamiento Digital de Imágenes . . . . . | 39        |
| 2.3.1.    | Matlab . . . . .                                              | 39        |
| 2.3.2.    | OpenCV . . . . .                                              | 40        |
| <b>3.</b> | <b>Planteamiento del problema y Justificación</b>             | <b>41</b> |
| <b>4.</b> | <b>Planteamiento de la solución</b>                           | <b>43</b> |
| 4.1.      | Objetivos . . . . .                                           | 43        |
| 4.1.1.    | Objetivo General . . . . .                                    | 43        |
| 4.1.2.    | Objetivos Específicos . . . . .                               | 43        |
| 4.2.      | Metodología . . . . .                                         | 44        |
| 4.2.1.    | Investigación-Acción . . . . .                                | 45        |
| 4.2.2.    | Metodología Adaptativa . . . . .                              | 47        |
| <b>5.</b> | <b>Estado del Arte</b>                                        | <b>48</b> |
| 5.1.      | Preprocesamiento . . . . .                                    | 48        |
| 5.2.      | Segmentación . . . . .                                        | 49        |
| <b>6.</b> | <b>Desarrollo de la Solución</b>                              | <b>53</b> |

|        |                                                                                                     |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1.   | Adquisición de las Imágenes . . . . .                                                               | 53 |
| 6.1.1. | Primer Montaje de Adquisición . . . .                                                               | 54 |
| 6.1.2. | Segundo Montaje de Adquisición . .                                                                  | 55 |
| 6.1.3. | Tercer Montaje de Adquisición . . . .                                                               | 56 |
| 6.1.4. | Selección del Aumento para la Captura                                                               | 58 |
| 6.1.5. | Defectos frecuentes en la tinción del<br>frotis y que afectan el procesamiento .                    | 60 |
| 6.2.   | Diseño del Algoritmo . . . . .                                                                      | 62 |
| 6.2.1. | Preprocesamiento HSV . . . . .                                                                      | 63 |
| 6.2.2. | Segmentación de núcleos de glóbu-<br>los blancos, plaquetas e impurezas . .                         | 64 |
| 6.2.3. | Preprocesamiento RGB . . . . .                                                                      | 66 |
| 6.2.4. | Eliminación de citoplasmas de Glóbu-<br>los Blancos y Segmentación de Glóbu-<br>los Rojos . . . . . | 68 |
| 6.3.   | Implementación en C# y Desarrollo de la In-<br>terfaz Gráfica . . . . .                             | 71 |
| 6.3.1. | Diagramas de Casos de Uso . . . . .                                                                 | 72 |

|           |                                                   |            |
|-----------|---------------------------------------------------|------------|
| 6.3.2.    | Diagramas de Clases . . . . .                     | 73         |
| 6.3.3.    | Demostración de la Herramienta Software . . . . . | 73         |
| 6.4.      | Pruebas del Algoritmo . . . . .                   | 82         |
| 6.4.1.    | Pruebas de Sensibilidad y Especificidad . . . . . | 82         |
| <b>7.</b> | <b>Conclusiones y Recomendaciones</b>             | <b>86</b>  |
| 7.1.      | Conclusiones . . . . .                            | 86         |
| 7.2.      | Recomendaciones . . . . .                         | 87         |
| <b>8.</b> | <b>Impactos en la Comunidad Científica</b>        | <b>89</b>  |
|           | <b>Bibliografía</b>                               | <b>108</b> |
|           | <b>Anexos</b>                                     | <b>114</b> |
| <b>A.</b> | <b>Enfermedades Asociadas a Glóbulos Rojos</b>    | <b>115</b> |
| A.1.      | Anemia . . . . .                                  | 115        |
| A.2.      | Malaria . . . . .                                 | 120        |

## Índice de figuras

- 2.1. Células sanguíneas: Glóbulo Blanco, Glóbulos Rojos y Plaquetas. Fuente: Autores del Proyecto . . . . . 27
- 2.2. Frotis.Fuente:<http://cafe.daum.net/clinical-immunology/Shmg/88?docid=1FCblShmg882010072317>
- 2.3. Ampliación: cuerpo, zona de morfología y cola. Fuente:<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/c>
- 2.4. Cámara de Neubauer Fuente: <http://lab-glassware.cn/co>
- 2.5. Recuento celular por Impedancia Eléctrica Fuente: Manual de operaciones del sistema CELL-DYN SapphireTM,56-0304/R1, Abbott Laboratories 2005. . . . . 33

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.  | Recuento celular por Citometría de Flujo. Fuente: <a href="http://www.sonyinsider.com/2010/02/12/sony-acquires-icyt-and-officially-enters-flow-cytometry-business/">http://www.sonyinsider.com/2010/02/12/sony-acquires-icyt-and-officially-enters-flow-cytometry-business/</a> . . . . . | 34 |
| 2.7.  | Modelo de color RGB. Fuente: <a href="http://www.cs.berkeley.edu">http://www.cs.berkeley.edu</a>                                                                                                                                                                                          |    |
| 2.8.  | Modelo de color HSV. Fuente: <a href="http://www.esacademic.com">http://www.esacademic.com</a>                                                                                                                                                                                            |    |
| 2.9.  | Etapas fundamentales del procesamiento digital de imágenes Fuente: González, Rafael C, Op, pp. 8. . . . .                                                                                                                                                                                 | 37 |
| 2.10. | Clasificación de la mejora de imágenes Fuente: Jain, Anil K. Fundamentals of Image Processing. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1989. p. 233 . . . . .                                                                                                                                    | 38 |
| 4.1.  | Metodologías Utilizadas . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                         | 45 |

|      |                                                                                                                                                                                              |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. | Metodología de la Investigación: Investigación-Acción Adaptación hecha de: Utilización de la Investigación Acción en un entorno para la gestión de mantenimiento del software [41] . . . . . | 46 |
| 4.3. | Metodología de Desarrollo: Metodología Adaptativa Fuente: Using Adaptive Software Development to meet the challenges of a high-speed, high-change environment [42]. . . . .                  | 47 |
| 5.1. | Resultados de la Revisión del Estado del Arte en las Técnicas de Segmentación Fuente: Autores del proyecto . . . . .                                                                         | 50 |
| 5.2. | Subclasificación de las Técnicas para Detección de Bordos Fuente: Autores del proyecto                                                                                                       | 51 |
| 5.3. | Subclasificación de la Técnica de las Transformadas Fuente: Autores del proyecto . . .                                                                                                       | 52 |



|      |                                                                                                                            |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1. | Imagen a 40x e Histograma obtenidos en el primer montaje de adquisición Fuente: Autores del Proyecto . . . . .             | 55 |
| 6.2. | Imagen a 100x e Histograma obtenidos en el segundo montaje de adquisición Fuente: Autores del Proyecto . . . . .           | 56 |
| 6.3. | Montaje Final usado para la Adquisición de las Imágenes. Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados UIS . . . . . | 57 |
| 6.4. | Imagen a 100x e Histograma obtenidos en el tercer montaje de adquisición Fuente: Autores del Proyecto . . . . .            | 58 |
| 6.5. | Captura a 40x: orientada al conteo manual de glóbulos blancos únicamente. Fuente: Autores del Proyecto . . . . .           | 59 |
| 6.6. | Captura a 100x: utilizada para observación de glóbulos rojos. Fuente: Autores del Proyecto . . . . .                       | 59 |

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.7. Defectos del frotis: Manchas del tinte. Fuente: Autores del Proyecto . . . . .               | 60 |
| 6.8. Defectos del frotis: Coloración excesiva Fuente: Autores del Proyecto . . . . .              | 61 |
| 6.9. Defectos del frotis: Superposición de glóbulos rojos. Fuente: Autores del Proyecto . . . . . | 61 |
| 6.10. Diagrama General de Proceso Fuente: Autores del proyecto. . . . .                           | 62 |
| 6.11. Imagen Adquirida. . . . .                                                                   | 63 |
| 6.12. Conversión RGB a HSV. . . . .                                                               | 63 |
| 6.13. Extracción y Suavizado del canal S. . . . .                                                 | 64 |
| 6.14. Conversión a Escala de Grises . . . . .                                                     | 64 |
| 6.15. Ajuste del Histograma . . . . .                                                             | 65 |
| 6.16. núcleos de glóbulos blancos . . . . .                                                       | 65 |
| 6.17. Detector de bordes de los núcleos de glóbulos blancos . . . . .                             | 65 |
| 6.18. Dilatación Morfológica . . . . .                                                            | 66 |
| 6.19. Extracción y suavizado del canal verde. . . . .                                             | 66 |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 6.20. Complemento de la Imagen anterior. . . . .                | 67 |
| 6.21. Máscara aproximada del fondo. . . . .                     | 67 |
| 6.22. Corrección de la Iluminación. . . . .                     | 67 |
| 6.23. Ajuste del histograma. . . . .                            | 68 |
| 6.24. Remoción de núcleos de glóbulos blancos. . .              | 68 |
| 6.25. Detección de citoplasmas de glóbulos blancos.             | 69 |
| 6.26. Remoción de citoplasmas de glóbulos blancos.              | 69 |
| 6.27. Remoción de plaquetas y elementos pequeños.               | 70 |
| 6.28. Detección de glóbulos rojos. . . . .                      | 70 |
| 6.29. Transformada Watershed. . . . .                           | 71 |
| 6.30. Diagramas de Casos de Uso. . . . .                        | 72 |
| 6.31. Diagrama de Clases. . . . .                               | 73 |
| 6.32. Ventana principal de la herramienta. . . . .              | 74 |
| 6.33. Opción Cargar Imagen. . . . .                             | 75 |
| 6.34. Selección del directorio de la imagen. . . . .            | 75 |
| 6.35. Visualización Imagen. Fuente: Este proyec-<br>to. . . . . | 76 |

|                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.36. Selección de aumento para la detección de eritrocitos. . . . .                                                                                                                                   | 77  |
| 6.37. Detección de eritrocitos. . . . .                                                                                                                                                                | 77  |
| 6.38. Selección de aumento para la detección de todas las células. . . . .                                                                                                                             | 78  |
| 6.39. Detección de eritrocitos, citoplasmas y núcleos de leucocitos. . . . .                                                                                                                           | 78  |
| 6.40. Opción Guardar Imagen. . . . .                                                                                                                                                                   | 79  |
| 6.41. Aviso de imagen guardada exitosamente. . .                                                                                                                                                       | 79  |
| 6.42. Opción de Ayuda. . . . .                                                                                                                                                                         | 80  |
| 6.43. Ayuda acerca de la herramienta. . . . .                                                                                                                                                          | 80  |
| 6.44. Resultados de la detección completa a 40x. .                                                                                                                                                     | 81  |
| A.1. Anemia Aplásica Fuente: <a href="http://www.drknp.com/wp-content/uploads/2010/12/Aplastic-Anemia-400x.jpg">http://www.drknp.com/wp-content/uploads/2010/12/Aplastic-Anemia-400x.jpg</a> . . . . . | 116 |
| A.2. Anemia Falsiforme Fuente: <a href="http://www.mybwmc.org/li">http://www.mybwmc.org/li</a>                                                                                                         |     |
| A.3. Talasemia Fuente: <a href="http://www.thalassemia.org">www.thalassemia.org</a> . . .                                                                                                              | 117 |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A.4. Anemia por grupos de edad. Fuente: ENSIN 2005, ICBF . . . . .                                                                                                               | 118 |
| A.5. Anemia por áreas y grupos de edad. Fuente: ENSIN 2005, ICBF . . . . .                                                                                                       | 119 |
| A.6. Anemia por edad y nivel del Sisben. Fuente: ENSIN 2005, ICBF . . . . .                                                                                                      | 119 |
| A.7. Distribución especie parasitaria de malaria en Colombia. Fuente: Boletín Malaria. Semana Epidemiológica, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2011. . . . .                | 122 |
| A.8. Casos de malaria por especie parasitaria según departamento de procedencia. Fuente: Boletín Malaria. Semana Epidemiológica, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2011. . . | 123 |
| A.9. Casos de malaria por grupo de edad y especie parasitaria Fuente: Boletín Malaria. Semana Epidemiológica, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2011. . . . .                | 124 |

## RESUMEN

### **TÍTULO:**

HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS \*

### **AUTORES:**

LIZETH ANDREA CASTELLANOS BELTRÁN \*\*

LUIS EDUARDO HASBÓN REYES \*\*

### **PALABRAS CLAVE:**

Glóbulos Rojos, Hematología, Procesamiento Digital de Imágenes, Morfología Matemática,

### **DESCRIPCIÓN:**

La biometría hemática o hemograma es uno de los estudios que con más frecuencia se solicita al laboratorio, tanto en los pacientes ambulatorios como en los hospitalizados; asimismo, es el primer examen al que se enfrenta el especialista en la valoración diagnóstica de un paciente. Aunque se considera como un solo examen de laboratorio, en realidad valora tres líneas celulares: serie roja, serie blanca y plaquetas. El análisis de los glóbulos rojos es utilizado para la detección y seguimiento de algunas enfermedades en el área de hematología e involucra dos procesos: el conteo y la inspección visual de las células. Existen equipos automatizados que dan soporte al conteo celular, sin embargo a pesar de su utilidad, representan un alto costo en mantenimiento, consumo de reactivos, y no permiten la observación celular. Por esta razón para emitir un diagnóstico acertado, el especialista debe complementar el conteo que arroja el equipo con un procedimiento manual bajo microscopio para verificar el estado de las células, lo cual implica mayor tiempo y esfuerzo físico dado el alto índice de hemogramas por día. Con el ánimo de dar soporte al proceso de lectura visual que realiza el especialista, se propone una solución mediante técnicas de Procesamiento Digital de Imágenes integradas en una herramienta computacional que permita realizar la detección de los glóbulos rojos, siendo esta la base para trabajos futuros en análisis de patologías.

---

\* TRABAJO DE GRADO

\*\* FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS. ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA. DIRECTOR: LOLA XIOMARA BAUTISTA. CODIRECTOR: LINA GARCÉS. CODIRECTOR: ANDRÉS GÓMEZ

## SUMMARY

**TITLE:**

SOFTWARE TOOL FOR RED BLOOD CELLS DETECTION IN MICROSCOPIC BLOOD CELLS IMAGES \*

**AUTHORS:**

LIZETH ANDREA CASTELLANOS BELTRÁN \*\*

LUIS EDUARDO HASBÓN REYES \*\*.

**KEYWORDS:**

Red Blood Cells, Hematology, Digital Image Processing, Mathematical Morphology.

**DESCRIPTION:**

The CBC (Complete Blood Count) is one of the most frequent test requested to a laboratory in both outpatients and hospitalized patients, also is the first test facing the specialist in order to diagnose a disease or any health issue in a patient. Although it is considered as just one laboratory test, in fact it analyses three blood components: Red Blood Cells, White Blood Cells and Platelets. Red Blood Cells are analyzed for detection and monitoring of RBC related diseases, it involves two procedures: RBC counting and visual inspection of cells. Nowadays there are automatic machines which support the counting procedure, despite their utility, they are expensive and represent high costs in their maintenance and reagent consumption, beside, they do not allow visual inspection of cells. To achieve an accurate and proper diagnosis, the specialist must complement the results of the counting procedure done by the automatic machines with a visual analysis through the microscope in order to verify the state and morphology of the cells, this process requires more time and physical effort due to the considerable amount of CBC tests requested every day. Looking forward to support the process of visual analysis done by the specialist, a solution is proposed using image processing techniques integrated in a software tool capable of detecting Red Blood Cells, establishing the knowledge base for future works in pathology diagnosis.

---

\* WORK DEGREE

\*\* PHYSICOMECHANICAL ENGINEERINGS FACULTY. SYSTEM ENGINEERING SCHOOL.  
DIRECTOR: LOLA XIOMARA BAUTISTA. CODIRECTOR: LINA GARCÉS. CODIRECTOR: ANDRÉS GÓMEZ

# 1. Introducción

El proceso de conteo celular sanguíneo (hemograma), se realiza de forma automática mediante equipos que funcionan bajo los principios de Impedancia Eléctrica [1] o Citometría de Flujo [2]. Estos equipos se encuentran calibrados de acuerdo a un rango de indicadores normales establecidos por el fabricante. Cuando el conteo se encuentra fuera de dicho rango, el especialista debe recurrir a la observación bajo microscopio, para verificar el estado de las células, invirtiendo mas tiempo y esfuerzo. La observación bajo microscopio se realiza a partir de un frotis de sangre periférica [3]. Este examen proporciona información acerca del número y la forma de las células sanguíneas a través de la observación de un extendido sanguíneo 2.2 por parte de un especialista. Asimismo, constituye un complemento muy útil del hemograma, pues apoya el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la mayoría de las enfermedades hematológicas. Este proceso depende de la habilidad del especialista y puede ser agotador debido a la gran demanda de hemogramas diarios en los centros clínicos.

El tratamiento digital de imágenes constituye una opción a considerar para dar soporte al proceso de lectura visual y apoyar así el diagnóstico por parte del especialista, ya que en los últimos 20 años varios grupos investigadores se han enfocado en el desarrollo de sistemas computarizados, que puedan analizar diferentes tipos



de imágenes médicas con el fin de extraer información útil al médico profesional [4]. En el presente documento se mostrará que por medio de algoritmos se puede desarrollar una herramienta que facilite la detección de glóbulos rojos en imágenes microscópicas. En el capítulo 2 se presenta la importancia de la sangre y los conceptos de procesamiento digital de imágenes que son aplicados para satisfacer el problema planteado en el capítulo 3. Con el objetivo de encontrar las técnicas más adecuadas para solucionar el problema, en el capítulo 5 se realiza un análisis del estado del arte, conocimiento que permite guiar la solución presentada en los capítulos 5 y 6 en donde se especifica cada una de las fases de Adquisición, Diseño, Implementación y Pruebas. Las conclusiones y recomendaciones son presentadas en el capítulo 7 seguido de los impactos generados en la comunidad científica a través de las publicaciones realizadas durante el desarrollo de este proyecto. Finalmente en el anexo se busca justificar la importancia de profundizar en el estudio de las células rojas y dar continuidad a trabajos futuros en el área.

## 2. Marco teórico

### 2.1. La Sangre

#### Función

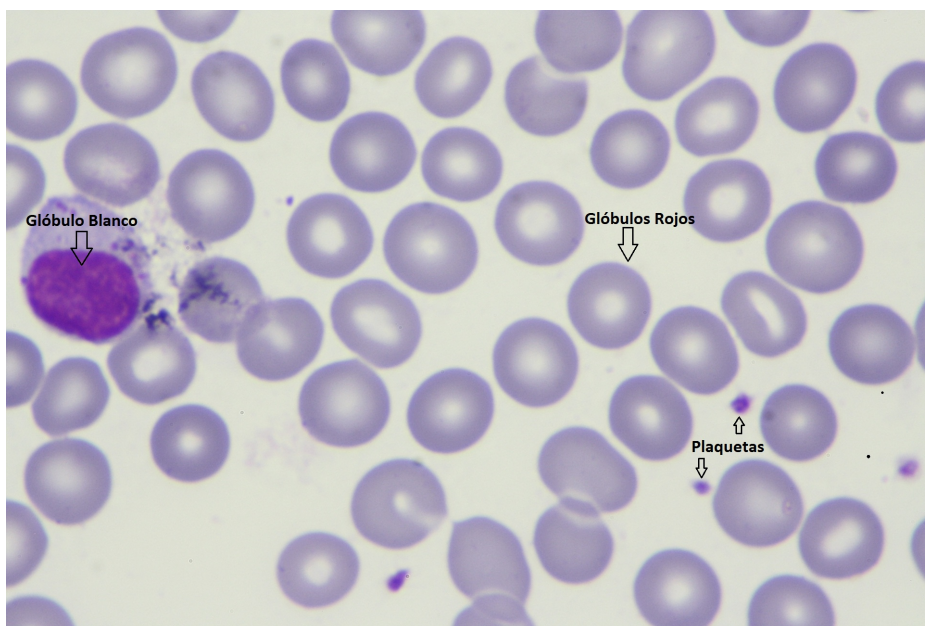
La sangre circula en el cuerpo y actúa como un medio de transporte para llevar el suministro de elementos esenciales y remover los productos de desecho de todas las células del cuerpo.

#### Composición

La sangre tiene una parte sólida compuesta por elementos con forma definida; esta parte sólida contiene a los glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC) y plaquetas (PLT) como se puede ver en la figura 2.1 ; también tiene una parte líquida compuesta por el plasma sanguíneo [5]. En la tabla 2.1 se aprecian los tamaños y proporciones de cada uno de estos elementos.

- **Glóbulos Rojos** (*Eritrocitos, RBC*): células anucleadas con función respiratoria.
- **Glóbulos Blancos** (*Leucocitos, WBC*): células nucleadas con función defensiva.

- **Plaquetas** (*Trombocitos, PLT*): fragmentos de citoplasma con función hemostática (reducen el sangrado y promueven la coagulación) [6].



**Figura 2.1:** Células sanguíneas: Glóbulo Blanco, Glóbulos Rojos y Plaquetas.  
Fuente: Autores del Proyecto

| Componente       | Densidad 1000/ $\mu$ l | Porción volumétrica | Diámetro     |
|------------------|------------------------|---------------------|--------------|
| Glóbulos Rojos   | 5000                   | 45 %                | 7-8 $\mu$ m  |
| Glóbulos Blancos | 7                      | 0.1 %               | 8-30 $\mu$ m |
| Plaquetas        | 300                    | 0.3 %               | 2-4 $\mu$ m  |
| Plasma           | —                      | 54.6 %              | —            |

**Cuadro 2.1:** Características típicas de los componentes sanguíneos.  
Fuente: Introduce to Hematology Cellcounting Diatron Ltd. 1996.

## Hemograma

El hemograma o CSC (conteo sanguíneo completo) o biometría hemática es uno de los elementos diagnósticos básicos. Es un cuadro o fórmula sanguínea en el que se expresan el número, proporción y variaciones de los elementos sanguíneos [2].

## Indicadores Normales

Los valores normales pueden variar de población a población. La siguiente es una tabla guía típica que contiene los rangos manejados por uno de los equipos tradicionales de conteo automático.

| Parámetro | Unidad             | Hombres        | Mujeres        |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|
| WBC       | 1000/ $\mu$ l      | 7.0 $\pm$ 3.0  | 7.0 $\pm$ 3.0  |
| RBC       | 1,000,000/ $\mu$ l | 5.0 $\pm$ 0.5  | 4.5 $\pm$ 0.5  |
| HGB       | g/dl               | 15.0 $\pm$ 2.0 | 13.0 $\pm$ 2.0 |
| HCT       | %                  | 45.0 $\pm$ 5.0 | 41.0 $\pm$ 5.0 |
| MCV       | fl                 | 90.0 $\pm$ 5.0 | 90.0 $\pm$ 5.0 |
| MCH       | pg                 | 30.0 $\pm$ 2.0 | 30.0 $\pm$ 2.0 |
| MCHC      | g/dl               | 33.5 $\pm$ 2.0 | 33.5 $\pm$ 2.0 |
| PLT       | 1000/ $\mu$ l      | 250 $\pm$ 100  | 250 $\pm$ 100  |

**Cuadro 2.2:** Rangos de Normalidad en Hematología.

Fuente: Introduce to Hematology Cellcounting Diatron Ltd. 1996.

| Parámetro | Significado                   |
|-----------|-------------------------------|
| WBC       | Glóbulos Blancos              |
| RBC       | Glóbulos Rojos                |
| HGB       | Hemoglobina                   |
| HCT       | Hematocrito                   |
| MCV       | Volumen Corpuscular Medio     |
| MCH       | Hemoglobina Corpuscular Media |
| MCHC      | Concentración de MCH          |
| PLT       | Plaquetas                     |

**Cuadro 2.3:** Descripción de los parámetros hematológicos.

Fuente: Introduce to Hematology Cellcounting Diatron Ltd. 1996.

### **2.1.1. Glóbulos Rojos (Eritrocios, RBC)**

#### **Definición**

Los glóbulos rojos, conocidos también como hematíes o eritrocitos constituyen alrededor del 96 % de los elementos formes; carecen de núcleo y orgánulos (en mamíferos). Su citoplasma está ocupado casi en su totalidad por la hemoglobina [7].

#### **Función**

Se encargan de distribuir el oxígeno a todos los tejidos del organismo donde sea necesario, esta función la cumplen por medio de la hemoglobina y la distribución casi total de éstos en todo el cuerpo por medio del torrente sanguíneo.

#### **Morfología**

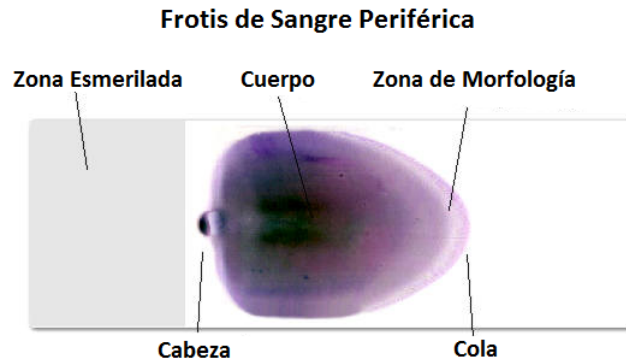
Tienen forma de disco bicóncavo, deprimido en el centro y aproximadamente 7-8  $\mu\text{m}$  de diámetro (ver figura 2.1 ). Carecen de núcleo, porque lo expulsan en la médula ósea antes de entrar en el torrente sanguíneo. Poseen un color rojizo debido a la hemoglobina que se encuentra en su interior y a que ésta contiene Hierro.

### **2.1.2. Extendido de Sangre Periférica (Frotis)**

El frotis sanguíneo, también llamado extendido, proporciona información acerca del número, forma y estructura de las células sanguíneas a través de una inspección visual con ayuda del microscopio. Constituye un complemento muy útil del hemograma, pues apoya el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la mayoría de las enfermedades hematológicas [3].

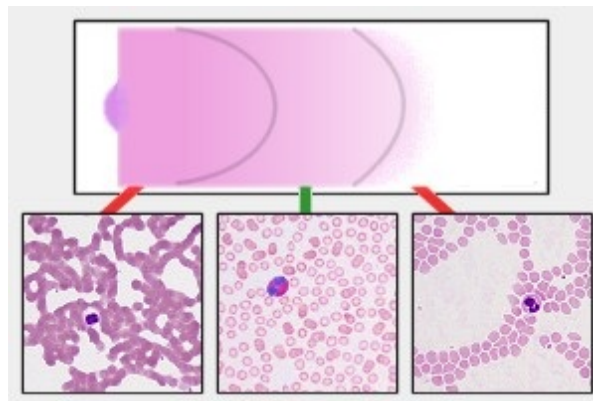
## Método de los dos portaobjetos

La sangre se coloca y extiende en un portaobjetos, se tiñe con colorante Wright y se examina al microscopio. (ver figura 2.2).



**Figura 2.2:** Frotis. Fuente: <http://cafe.daum.net/clinical-immunology/Shmg/88?docid=1FCblShmg8820100723170625>

Para una evaluación adecuada de la sangre periférica en el microscopio es importante tomar en cuenta algunos aspectos, como la técnica de la extensión, la calidad tanto del colorante como del proceso de tinción y la sección del frotis donde se realizará la evaluación [3]. En la figura 2.3 se presenta visualmente la razón por la cual la zona de morfología es la más adecuada.



**Figura 2.3:** Ampliación: cuerpo, zona de morfología y cola.

Fuente: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/blood/blood.htm>

## **Coloraciones Usadas**

Una vez seco el frotis, se procede a la tinción hematológica con el colorante constituido por la mezcla de eosina y azul de metileno. Dentro de éstas tenemos:

- **Colorante Giemsa:** para el estudio de hemoparásitos.
- **Colorante May Grunwald:** para casos especiales en que se desee observar con mayor claridad y especificidad los gránulos de los neutrófilos.
- **Colorante Wright:** para el estudio de células sanguíneas.
- **Colorante Leishman:** para el estudio de células sanguíneas [8].

### **2.1.3. Técnicas de Conteo Celular Sanguíneo**

#### **Técnica Manual**

Inicialmente se usaba la Cámara de Neubauer (ver figura 2.4), que consiste en una microcámara de cristal excavada en un portaobjetos especial. Esta cámara permite realizar una dilución de las células sanguíneas y su posterior visualización mediante un microscopio. Otro método manual es el extendido de sangre periférica o frotis (ver figura 2.2), el cual se ha empleado y continúa empleándose para realizar comprobaciones de los recuentos automatizados de plaquetas y leucocitos y para análisis morfológico [6].



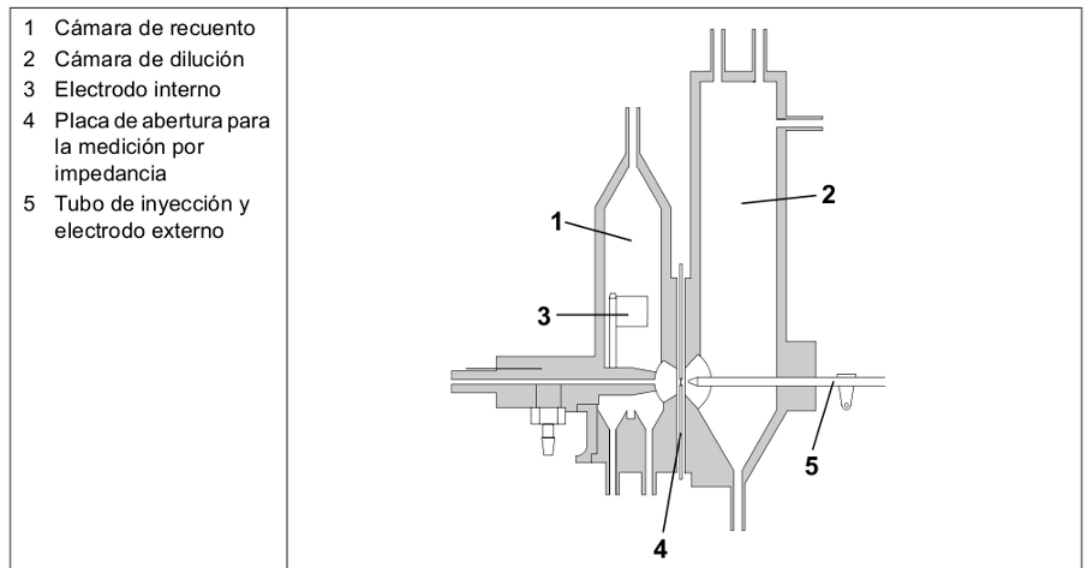
**Figura 2.4:** Cámara de Neubauer

Fuente: <http://lab-glassware.cn/counting%20chamber.htm>

### **Impedancia Eléctrica**

Surge como una forma de automatizar el proceso de conteo de células sanguíneas y actualmente está implementada en la mayoría de equipos utilizados en los análisis hematológicos. Se basa en la detección de los cambios de la resistencia eléctrica producidos por una partícula suspendida en un diluyente conductor a su paso por una abertura de dimensiones conocidas (ver figura 2.5). Para crear la corriente eléctrica se sumergen dos electrodos en el líquido, uno a cada lado de la abertura [1]. A medida que cada partícula pasa por la abertura, se produce un cambio en la resistencia entre los electrodos. Este cambio genera un impulso eléctrico mensurable. El número de impulsos se corresponde con el número de partículas que atraviesan la abertura.



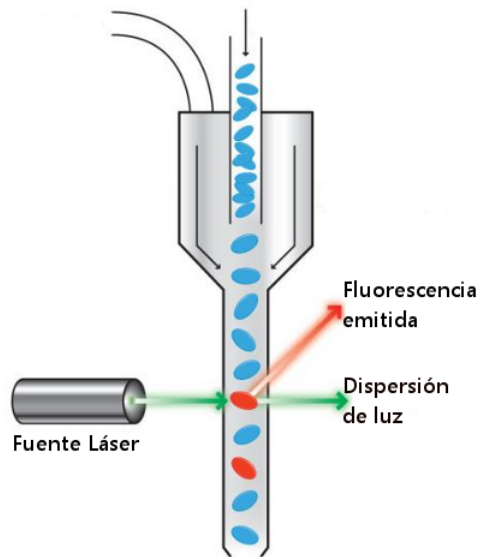


**Figura 2.5:** Recuento celular por Impedancia Eléctrica

Fuente: Manual de operaciones del sistema CELL-DYN Sapphire™, 56-0304/R1, Abbott Laboratories 2005.

### Citometría de Flujo

La técnica por Citometría consiste en un proceso de recuento y medición de las propiedades de las células o partículas que se transportan por medio de un flujo a través de una zona de detección. Este flujo enfocado alinea las células, u otras partículas biológicas, en una única fila para atravesar el centro de la zona de detección en donde son medidas las características físicas o químicas de las células (ver figura 2.6).



**Figura 2.6:** Recuento celular por Citometría de Flujo.

Fuente: <http://www.sonyinsider.com/2010/02/12/sony-acquires-icyt-and-officially-enters-flow-cytometry-business/>

## 2.2. Procesamiento Digital de Imágenes

Es un campo de investigación relacionado con la computación que nace del interés por mejorar la cantidad y calidad de la información que transmite una imagen para una mejor interpretación de ésta; y a su vez, el procesamiento de los datos de la imagen, para su transmisión, almacenamiento y representación por parte de sistemas especializados [9].

### 2.2.1. Imagen Digital

Se define como una función de dos dimensiones  $f(x,y)$  donde  $x$  y  $y$  son coordenadas espaciales en un plano, y donde para cualquier par de coordenadas  $x$  y  $y$ , el valor o amplitud de  $f(x,y)$  corresponde a la intensidad o al nivel de grises de la imagen en ese punto. Cuando las coordenadas  $x$  y  $y$  así como el valor o amplitud para  $f(x,y)$

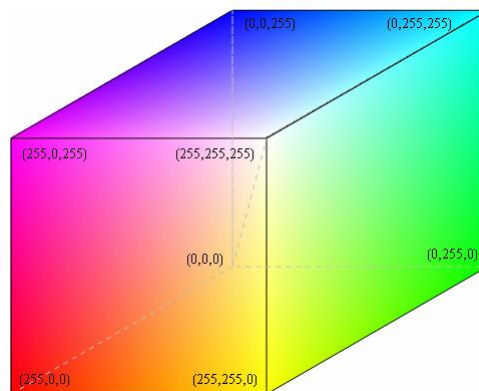
son valores finitos y discretos, la imagen se conoce como una imagen digital y cada conjunto de elementos  $x$ ,  $y$  y  $f(x,y)$  se conoce como elemento de la imagen o pixel [9].

### 2.2.2. Modelos de Color

Una imagen en color es una representación que posee tres componentes independientes. La mayoría de modelos de color empleados están orientados hacia el hardware, otros hacia aplicaciones que pretenden manipularlo. Se presentará una introducción a los espacios de color utilizados en esta investigación:

#### Modelo de Color RGB

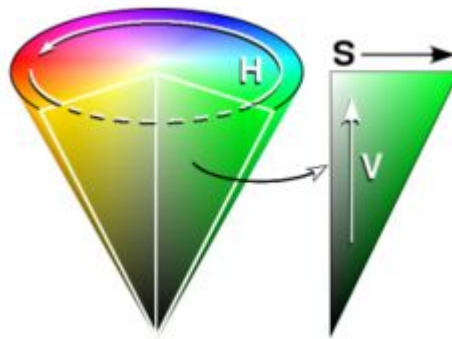
El color aparece con sus componentes espectrales primarias de rojo, verde y azul. En la figura 2.7 se observa que el subespacio de color de interés es un cubo. En este modelo los colores son definidos por todos los vectores que se extienden desde el origen hasta cualquier punto del cubo. Las imágenes de este modelo consisten en tres planos independientes, uno por cada color primario, los cuales se superponen para formar una imagen en color. La escala de grises estaría situada en la diagonal que une al color blanco con el negro [9].



**Figura 2.7:** Modelo de color RGB.  
Fuente: <http://www.cs.berkeley.edu/>

## Modelo de Color HSV

El modelo HSV se trata de una transformación no lineal del espacio de color RGB. La componente H representa el matiz del color (rojo, amarillo, verde, cian, azul, magenta) y está definida como un ángulo; La componente S o saturación es la cantidad del matiz que ha sido diluido en blanco. Mientras que la componente V o valor representa la altura en el eje blanco-negro (ver figura 2.8). En este modelo las componentes del matiz y saturación están íntimamente relacionadas con la forma en que los seres humanos perciben el color.

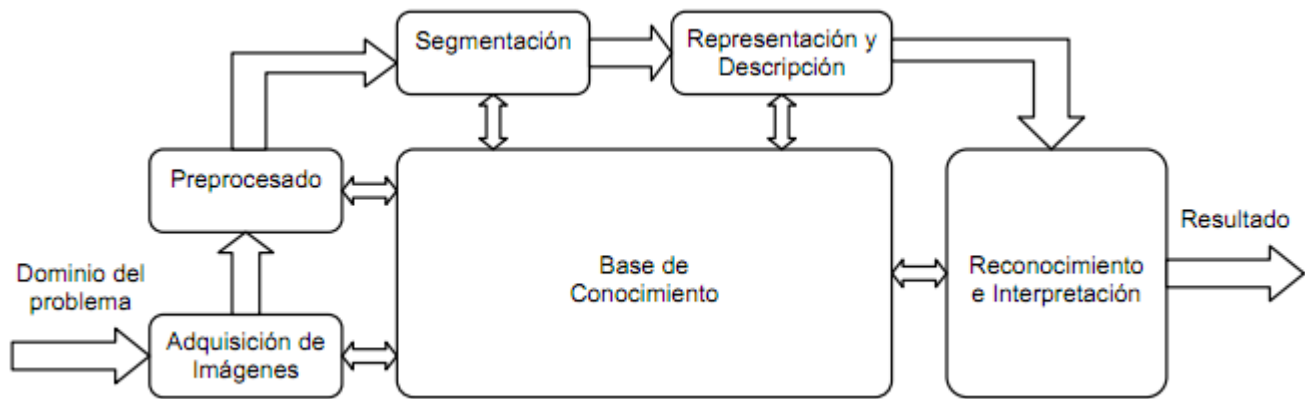


**Figura 2.8:** Modelo de color HSV.

Fuente: <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/445640>

### 2.2.3. Etapas del Procesamiento Digital de Imágenes

El procesamiento digital de imágenes se puede definir como la serie de operaciones a las cuales se somete la representación numérica de un objeto para obtener un resultado esperado. Estas acciones han sido estudiadas a lo largo del tiempo y han sido agrupadas en las siguientes etapas, de acuerdo con la figura 2.9.

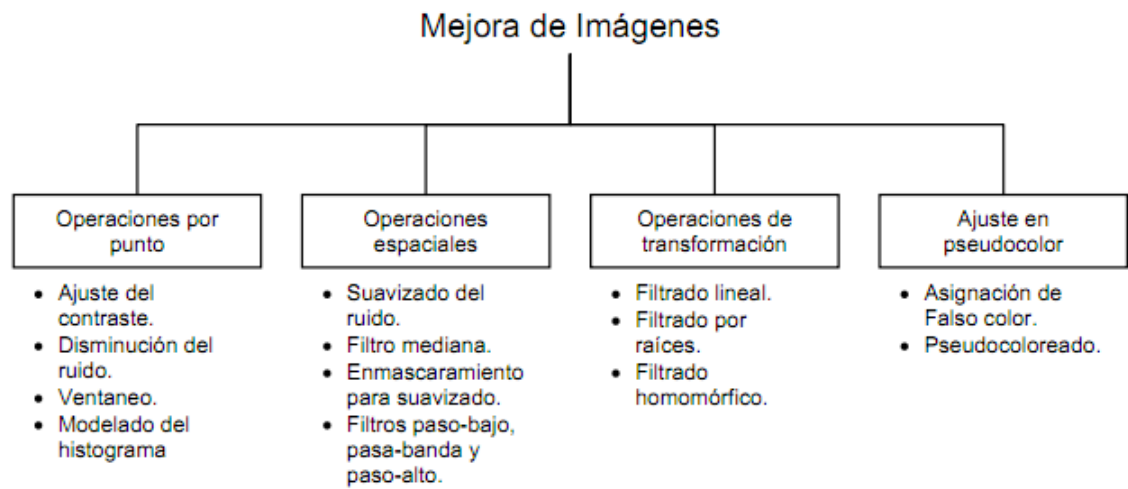


**Figura 2.9:** Etapas fundamentales del procesamiento digital de imágenes

Fuente: González, Rafael C, Op, pp. 8.

Para el desarrollo de este proyecto se realizarán las etapas de Adquisición, Preprocesamiento y Segmentación:

- **Adquisición:** Comprende todas las tareas para obtener la imagen digital, por diferentes dispositivos electrónicos (sensibles a la luz o a cualquier banda del espectro electromagnético). El digitalizador de imágenes debe ser capaz de dividir una imagen en los elementos fundamentales (píxeles) y asignarles una dirección a cada uno; finalmente debe proveerse la capacidad de guardar ese conjunto en un dispositivo de almacenamiento.
- **Preprocesamiento:** Aquí se agrupan las operaciones numéricas que tienden a mejorar la información presente en la imagen. Este proceso no incrementa la información inherente contenida en los datos, pero sí aumenta el rango dinámico de las características de una imagen de tal manera que pueden ser fácilmente manipulables. La dificultad en esta etapa es determinar el criterio para el ajuste, por lo que la mayoría de las técnicas de mejora son empíricas. En términos generales los algoritmos para preprocesamiento pueden ser agrupados de acuerdo con la figura 2.10.



**Figura 2.10:** Clasificación de la mejora de imágenes

Fuente: Jain, Anil K. Fundamentals of Image Processing. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1989. p. 233

- **Segmentación:** En términos generales, en esta etapa se busca separar cada una de las regiones u objetos que componen la imagen. Por ejemplo, en imágenes celulares se dividen las regiones que conforman los núcleos y los citoplasmas, las cuales son aisladas del fondo. Los algoritmos de segmentación pueden basarse en la discontinuidad o en la similaridad de los píxeles; en el primer caso, las principales áreas de interés son la detección de puntos aislados y la detección de bordes y líneas, en el segundo es usual utilizar algoritmos como la umbralización o aquellos orientados a regiones.

Una herramienta robusta dentro de este proceso es la **Morfología Matemática**. Sirve para simplificar los datos de una imagen preservando sus características esenciales de forma. Se basa en elementos estructurantes que representan una estructura geométrica asociada a la estructura predominante en los elementos de la imagen. Las operaciones básicas de la morfología matemática son la Erosión y la Dilatación, de las cuales surgen las demás operaciones:

- **Erosión:** reduce bordes y separa objetos próximos.
- **Dilatación:** amplía bordes y une objetos próximos.
- **Apertura:** corresponde a una erosión seguida de una dilatación.
- **Cierre:** corresponde a una dilatación seguida de una erosión.

## 2.3. Herramientas para Procesamiento Digital de Imágenes

### 2.3.1. Matlab

El Image Processing Toolbox es una colección de funciones que amplían la capacidad del entorno informático Matlab. La caja de herramientas soporta una amplia gama de operaciones de tratamiento de imágenes [10].

#### Ventajas y Desventajas

- Permite desarrollar aplicaciones computacionales sin ocupar mucho tiempo en detalles de la implementación como manejo de memoria, punteros, o librerías de inclusión entre otros detalles.
- Permite implementar algoritmos y operaciones matemáticas complejas sin mucho esfuerzo manejando un lenguaje estructurado de llamadas a funciones.
- Permite compilar las implementaciones que se hagan en la plataforma a otros lenguajes como C++ o java sin tener que hacer muchos cambios en el código y algoritmos, esto también la mantiene como una herramienta muy versátil pues se exporta a otras plataformas las aplicaciones.

- El código de Matlab, incluyendo su implementación y librería de funciones es de carácter privativo, se permite su manipulación bajo un ambiente académico o de investigación, no con fines comerciales.

### 2.3.2. OpenCV

OpenCV (Free Open Source Computer Vision) es una biblioteca de funciones de programación desarrollada por Intel y dirigida principalmente a la visión por computadora en tiempo real. Fue escrito en C, pero ahora tiene una implementación en C++ y C#.

#### Ventajas y Desventajas

- Cuenta con una licencia BSD (gratis para uso comercial o de investigación).
- Siendo OpenCV una biblioteca escrita en C++, permite que se aproveche en manejo optimizado de la memoria del computador, y permite que se migren las aplicaciones a distintos dispositivos; desde su origen OpenCV fue creado para ser rápido y para utilizar el hardware de una manera adecuada.
- Aunque tenga bastante optimización respecto al uso de hardware, la complejidad del lenguaje con el que fue implementada la biblioteca lo hace un poco complejo, debido a que entre otros factores, hay que conocer parte del funcionamiento del hardware y el manejo de la memoria en las aplicaciones.
- Permite desarrollar aplicaciones con bajas dependencias a nivel de software pues también fue diseñada para ser estándar y compilarse en la mayoría de los compiladores actuales; además de todo esto, las aplicaciones con OpenCV consumen pocos recursos [11].



### 3. Planteamiento del problema y Justificación

Actualmente el conteo celular sanguíneo (hemograma) es uno de los estudios que con más frecuencia se solicitan al laboratorio <sup>1</sup> y se realiza de forma automática mediante equipos que funcionan bajos los principios de Impedancia Eléctrica ó Citometría de Flujo. A pesar de su utilidad, estos equipos representan altos costos de mantenimiento por el consumo diario de reactivos y no permiten la observación celular. Se encuentran calibrados de acuerdo a un rango de indicadores normales establecidos por el fabricante y cuando el conteo se encuentra fuera de dicho rango, el especialista debe recurrir a la observación bajo microscopio, para verificar el estado de las células, por lo cual requiere invertir más tiempo y esfuerzo. Esta observación debe realizarse a partir de un extendido de sangre periférica, el cual depende de la habilidad del especialista y puede ser agotador debido a la demanda de hemogramas diarios en los centros clínicos.

A manera de síntesis las limitaciones de los equipos de conteo celular automático se resumen así:

- A pesar de ser útiles en el conteo celular, su principal limitación es que no per-

---

<sup>1</sup>J. Jaimes, D. Gómez. Hematología: la sangre y sus enfermedades, pag 15.

miten la observación morfológica de las células, por esta razón el especialista debe recurrir a procesos manuales para realizar una observación bajo microscopio (ver figura 2.2). Dada el alto número de hemogramas diarios, este proceso se convierte en una labor agotadora.

- Los equipos de conteo automático requieren un mantenimiento y control diario, este procedimiento debe realizarse mediante el uso de reactivos específicos que representan un costo significativo para los laboratorios clínicos.

A partir de las anteriores consideraciones este proyecto busca dar un aporte que permita a futuro dar soporte al proceso de lectura visual que realiza especialista. La detección de las células es el primer paso, para esto se ha abordado específicamente la detección de glóbulos rojos en imágenes microscópicas de extendidos sanguíneos. Con los resultados de este proyecto se espera que en trabajos futuros se puedan analizar las características morfológicas de los glóbulos rojos detectados pues estos son importantes en el diagnóstico de algunas enfermedades de alta incidencia en Colombia (ver Anexo A).

## **4. Planteamiento de la solución**

En los capítulos anteriores se presentaron las dos temáticas generales tenidas en cuenta en este proyecto: el área médica específica en la cual se detectó el problema y el área del procesamiento digital de imágenes como propuesta para generar una solución; ésto permitió plantear los siguientes objetivos:

### **4.1. Objetivos**

#### **4.1.1. Objetivo General**

Implementar una herramienta computacional que permita la detección de glóbulos rojos típicos en imágenes microscópicas de sangre periférica, utilizando técnicas de tratamiento digital de imágenes

#### **4.1.2. Objetivos Específicos**

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre algoritmos que permitan la detección de células en imágenes microscópicas
2. Implementar un algoritmo que permita la detección de glóbulos rojos en imágenes microscópicas de muestras sanguíneas.

3. Diseñar una interfaz gráfica que permita una fácil manipulación de la herramienta computacional por parte del profesional.
4. Calcular indicadores de especificidad y sensibilidad para el algoritmo implementado.

En el cuadro 4.1 se menciona explícitamente los resultados obtenidos en cada uno de los objetivos planteados en este proyecto y el respectivo capítulo en donde se encuentran plasmados.

| Objetivo  | Cumplimiento                                                                 |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------|
| Ojetivo 1 | Ver Capítulo 5 : Estado del Arte, figuras 5.1 5.2 5.3                        |
| Ojetivo 2 | Ver Capítulo 6.2 : Diseño del Algoritmo.                                     |
| Ojetivo 3 | Ver Capítulo 6.3 : Implementación en C# y desarrollo de la Interfaz Gráfica. |
| Ojetivo 4 | Ver Capítulo 6.4 : Pruebas del Algoritmo.                                    |

**Cuadro 4.1:** Cumplimiento de los Objetivos Específicos.

## 4.2. Metodología

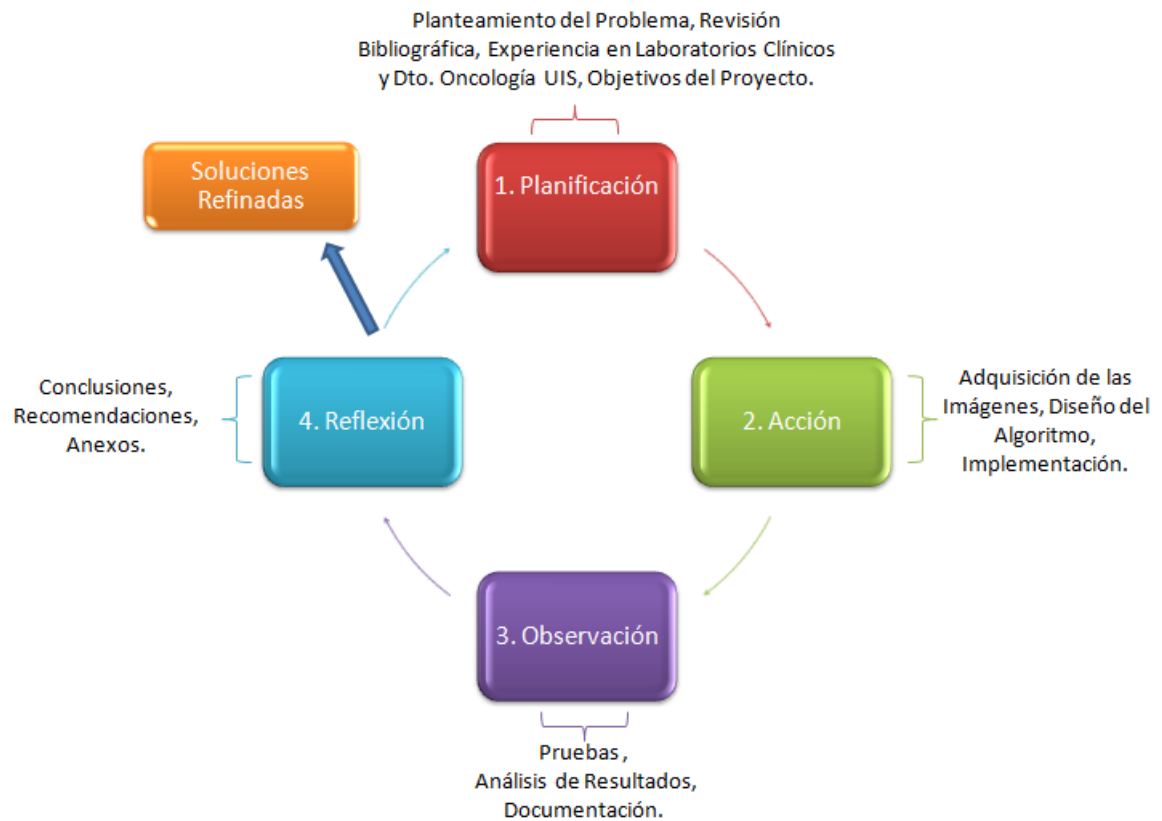
Para guiar el proyecto y dar cumplimiento a los objetivos propuestos, se han seguido dos metodologías: Una metodología principal que permite estudiar el dominio del problema y guiar el proceso de la investigación; dentro de ésta se encuentra una metodología de software que permite estudiar el dominio de la solución. En la figura 4.1 se presenta la forma en que estas dos metodologías han sido adaptadas para guiar de manera conjunta el desarrollo del proyecto.



**Figura 4.1:** Metodologías Utilizadas

#### **4.2.1. Investigación-Acción**

La Investigación Acción tiene dos objetivos: resolver un problema para una sociedad o cliente y contribuir al conocimiento científico. En [41] se presenta el ciclo de actividades propuesto para un caso específico orientado al software. Tomando dicho ciclo como guía, se ha ajustado a las necesidades del actual proyecto de la siguiente manera:



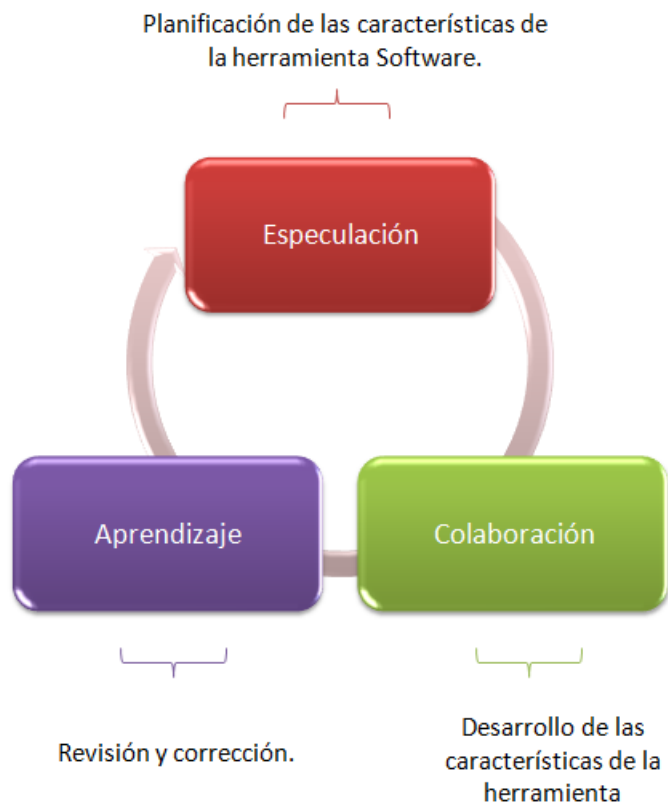
**Figura 4.2:** Metodología de la Investigación: Investigación-Acción  
Adaptación hecha de: Utilización de la Investigación Acción en un entorno para la gestión de mantenimiento del software [41]

De acuerdo con la metodología investigación acción se tienen los siguiente participantes:

- **El investigador:** los autores del proyecto.
- **El objeto investigado:** la detección de glóbulos rojos.
- **El grupo crítico de referencia:** Especialistas en hematología y Bacteriología.
- **El beneficiario:** Bacteriólogos.

### 4.2.2. Metodología Adaptativa

Dada la naturaleza cambiante en el proceso de desarrollo, se ha escogido la Metodología Adaptativa ASD (Adaptive Software Development) [42]. Su funcionamiento se muestra en la figura 4.3. Básicamente comprende un ciclo iterativo en donde se espera que en cada iteración se produzcan cambios.



**Figura 4.3:** Metodología de Desarrollo: Metodología Adaptativa

Fuente: Using Adaptive Software Development to meet the challenges of a high-speed, high-change environment [42].

## 5. Estado del Arte

La revisión del estado del arte realizada en esta investigación, se ha planteado con el fin de determinar las técnicas más adecuadas que permitan proponer un algoritmo para realizar la detección de glóbulos rojos en imágenes microscópicas de células sanguíneas. Se ha profundizado específicamente en las etapas de preprocesamiento y segmentación las cuales podrán ser desarrolladas después de adquirir las imágenes.

### 5.1. Preprocesamiento

El objetivo inicial del preprocesamiento es mejorar la calidad de la imagen adquirida. Esta etapa es necesaria debido a que en las imágenes microscópicas son frecuentes los siguientes defectos:

- Imágenes ruidosas, a causa de la deficiencia de luz o insuficiente tiempo de exposición.
- Iluminación no uniforme, debido a que las condiciones de tintura de las células, ocasiona que hayan variaciones en la intensidad capturada por el dispositivo.
- En las esquinas la iluminación no es uniforme a causa de las aberraciones oca-



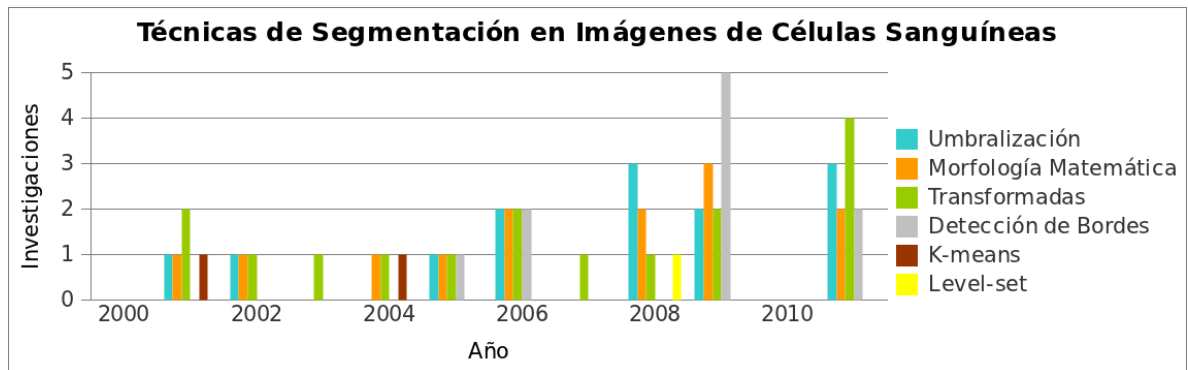
sionadas por la óptica del microscopio [12].

Algunos de los anteriores defectos son dependientes del equipo, por eso es importante escoger los elementos adecuados para la captura de la imagen y así facilitar las etapas posteriores de procesamiento. Sin embargo, en el tratamiento digital de imágenes existen algunas técnicas para mejorar la calidad de la imagen adquirida.

Dentro de esta investigación se encontró que el uso de filtros mejora la calidad de la imagen, el más utilizado para reducir el ruido es el *filtro de la mediana* [13],[14], [15], [16], [17], [18]. Este filtro es una técnica no lineal de filtrado digital, en donde la mediana es calculada, clasificando primero todos los valores de los píxeles de las vecindades cercanas en orden numérico [18]. En [19] se menciona el uso del *filtro kuwara* como alternativa para realizar el mismo proceso descrito, sin embargo no se encontró evidencia de su uso en otras investigaciones.

## 5.2. Segmentación

Es el proceso de particionar una imagen en diferentes segmentos. El campo de la segmentación es un área activa de investigación, especialmente en análisis de imágenes médicas [20]. Entre los métodos y técnicas que existen, cabe mencionar: umbralización, detección de bordes, clustering k-means y crecimiento de regiones. En la figura 5.1 se resúmen las técnicas de segmentación utilizadas en los trabajos de investigación de los últimos 11 años, específicamente para el tratamiento digital de imágenes microscópicas de células sanguíneas.



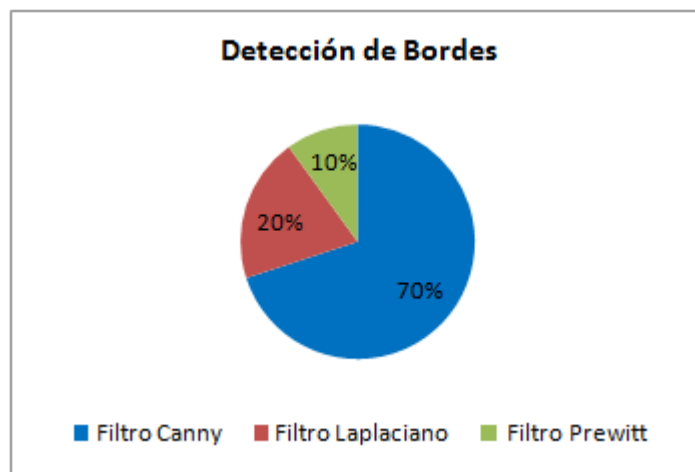
**Figura 5.1:** Resultados de la Revisión del Estado del Arte en las Técnicas de Segmentación  
Fuente: Autores del proyecto

Una de las técnicas que ha mantenido su uso ha sido la *umbralización*. El objetivo de la umbralización es extraer un objeto del fondo basado en la distribución de los niveles de grises. A menudo es usado como el paso inicial en la secuencia de las operaciones de procesamiento de imágenes. Aunque la umbralización es de las técnicas más utilizadas [13], [18], [19], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], algunos autores señalan que éstas deben ser combinadas con operaciones de morfología matemática para mejorar la segmentación [30].

La *Morfología Matemática* trabaja directamente sobre la escala de grises de la imagen y utiliza la información del tamaño de las células [4], [13], [16], [17], [18], [19], [21], [23], [24], [25], [28], [31], [32]. Esta técnica ofrece una fuerte herramienta para extraer componentes útiles en la representación y descripción de formas de una región tales como límites, estructuras y texturas [30]. En la actualidad este tipo de métodos computacionales y matemáticos, ha sido utilizado en aplicaciones médicas para el análisis de imágenes celulares [33].

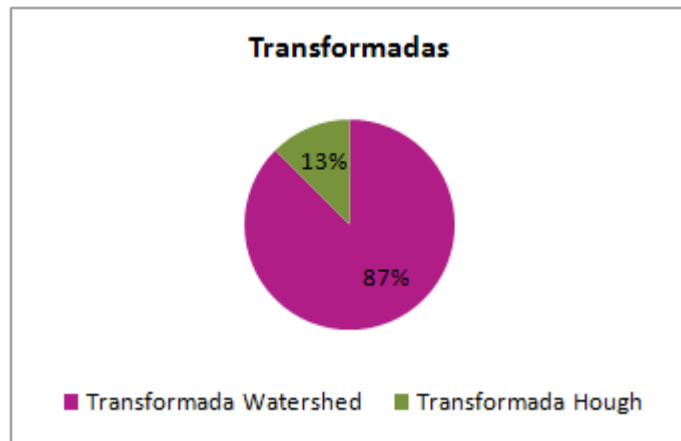
Dentro de la segmentación de células también se considera la *Detección de Bordes*, la cual es realizada mediante la aplicación de filtros sobre la imagen. De éstos

el detector de bordes *Canny* es el más potente, debido a su eficacia [31]. En la figura 5.1 se muestra el uso general de la técnica de detección de bordes en las investigaciones consultadas, en la figura 5.2 se especifica que el 70 % de esas investigaciones han hecho uso del *filtro canny* [13], [21], [23], [25], [31], [34], [35], el 20 % usó el *filtro laplaciano* [18], [23] y el 10 % usó el *filtro prewitt* [18].



**Figura 5.2:** Subclasificación de las Técnicas para Detección de Bordes  
Fuente: Autores del proyecto

El 87 % de las investigaciones que exploraron el uso de *Transformadas* (ver figura 5.1 con ampliación en 5.3 ), usaron la *Transformada Watershed* para solucionar el problema de la superposición de glóbulos rojos [4], [18], [21], [23], [25], [26], [27], [29], [32], [36], [37], [38],[39], [40], mientras el 13 % usó la *Transformada Hough* para detectar formas circulares de radio específico [13], [37], sin embargo esta técnica no funciona en todos los casos ya que la forma de los góbulos rojos no siempre es totalmente circular; por otro lado la Transformada Watershed presenta el problema de la sobresegmentación, lo cual ocasiona falsas divisiones.



**Figura 5.3:** Subclasificación de la Técnica de las Transformadas  
Fuente: Autores del proyecto

Algunos métodos de segmentación cuyo uso no fue tan frecuente encontrar, son el *k-meas* y *level-set*. El método *k-means* [27], [32], está basado en técnicas de clustering para segmentar los 3 tipos de células sanguíneas; en [32] la independencia del sistema de iluminación fue el criterio por el cual el autor escogió este método, el cual para esa investigación arrojó buenos resultados, sin embargo concluyó que los tiempos de procesamiento y análisis fueron altos. El método *level-set* fue utilizado en [19] para la segmentación de contornos de leucocitos.

## **6. Desarrollo de la Solución**

El desarrollo del proyecto gira alrededor de 3 etapas fundamentales: Adquisición, Preprocesamiento y Segmentación de las imágenes microscópicas. Cabe mencionar que la etapa de Adquisición no fue contemplada dentro de los objetivos, sin embargo dada la no existencia de una base de datos de imágenes para pruebas, se asumió la realización de ésta por parte de los autores. Una vez adquiridas las imágenes, se dió paso a una primera fase de diseño del algoritmo a partir de las técnicas resaltadas en el estudio del estado del arte y finalmente se implementó un prototipo.

### **6.1. Adquisición de las Imágenes**

Esta etapa es importante dado que de las condiciones iniciales de las imágenes determinan el tipo de procesamiento de deberá realizar el algoritmo. Con el objetivo de obtener una imagen con las mejores condiciones posibles en cuanto a iluminación y resolución se hicieron varias pruebas con diferentes microscopios y dispositivos de captura como se describe a continuación:

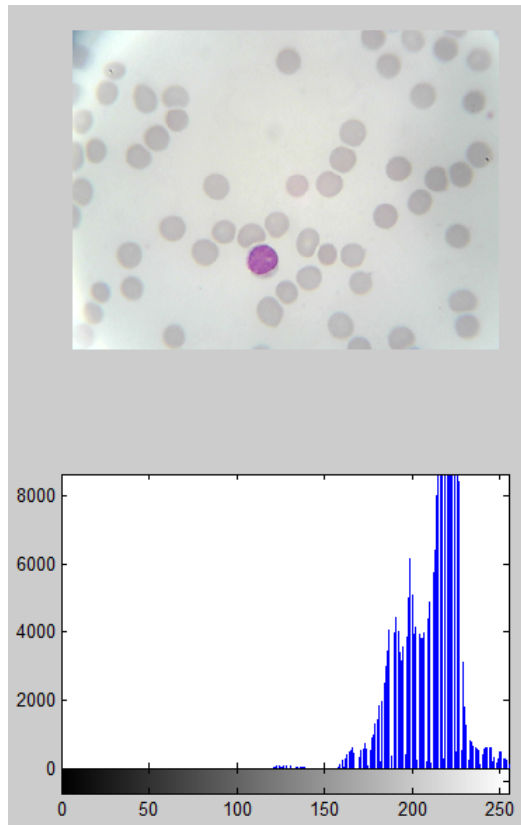
### 6.1.1. Primer Montaje de Adquisición

El primer montaje para la adquisición se llevó a cabo dentro del GIIB mediante dispositivos de propiedad de Biosys Ltda <sup>2</sup>. Se utilizó un microscopio óptico, binocular, de la serie G300 producidos por la empresa UNICO y una cámara usb Premiere, modelo MA88, 0.3 megapixel, especializada para adaptar al ocular del microscopio. El principal defecto observado es la iluminación no uniforme en las esquinas y los bordes de la imagen como se muestra en la figura 6.1. Este es un defecto común, causado por aberraciones <sup>3</sup> en la óptica del microscopio [12]. Además con el histograma de la imagen se puede notar que no presenta una diferenciación clara de los objetos. Por estas razones se decidió realizar pruebas con un segundo microscopio.

---

<sup>2</sup>Spin-Off del Grupo GIIB <http://biosys.com.co>

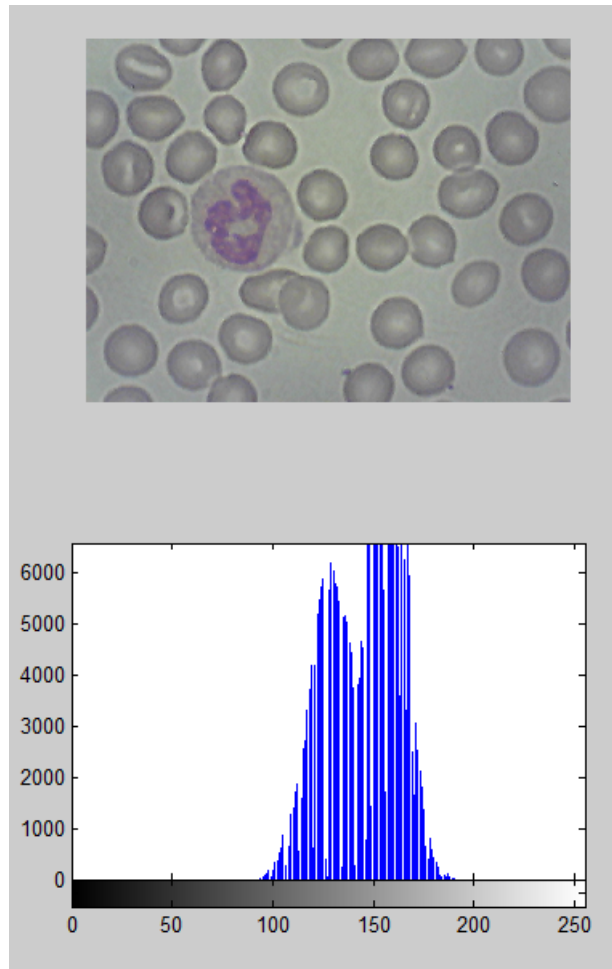
<sup>3</sup>Las aberraciones en sistemas ópticos como los lentes, ocurren cuando la luz proveniente de un punto de un objeto no converge hacia (o no diverge desde) un solo punto luego de transmitirse a través del sistema.



**Figura 6.1:** Imagen a 40x e Histograma obtenidos en el primer montaje de adquisición  
Fuente: Autores del Proyecto

### 6.1.2. Segundo Montaje de Adquisición

El segundo montaje de adquisición se llevó a cabo en el departamento de Oncología de la Facultad de Salud de la UIS. Se mantuvo la misma cámara pero esta vez se usó un microscopio de la serie G380 de la empresa UNICO. Aunque se observó una iluminación más uniforme de los bordes y las esquinas, el histograma no muestra una diferenciación clara de los objetos (ver figura 6.2). Este montaje no fué el utilizado para el desarrollo del proyecto.

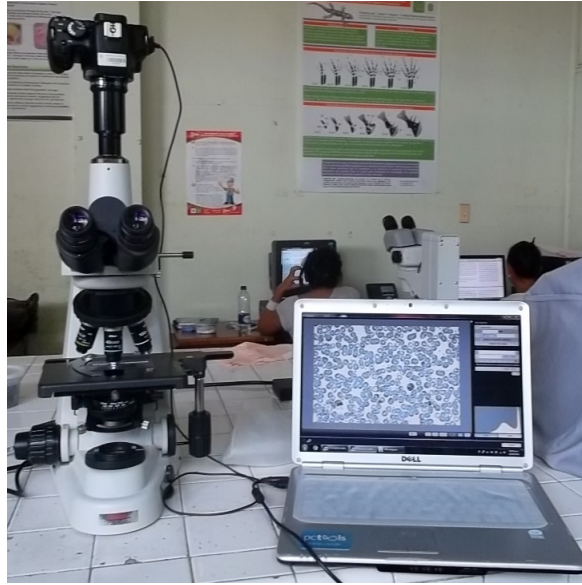


**Figura 6.2:** Imagen a 100x e Histograma obtenidos en el segundo montaje de adquisición  
Fuente: Autores del Proyecto

### **6.1.3. Tercer Montaje de Adquisición**

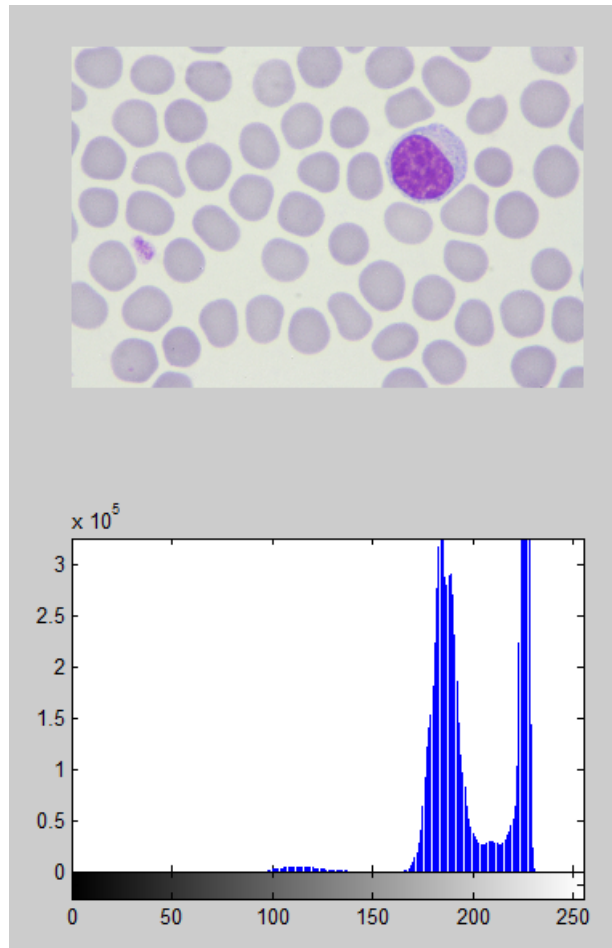
El tercer y final montaje, fue facilitado por el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Escuela de Biología de la UIS. Se contó con un microscopio triocular Nikon eclipse 55i, adaptado a una cámara digital cannon EOS REBELXS 1000D, 10.10 megapíxeles (ver figura 6.3).





**Figura 6.3:** Montaje Final usado para la Adquisición de las Imágenes.  
Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados UIS

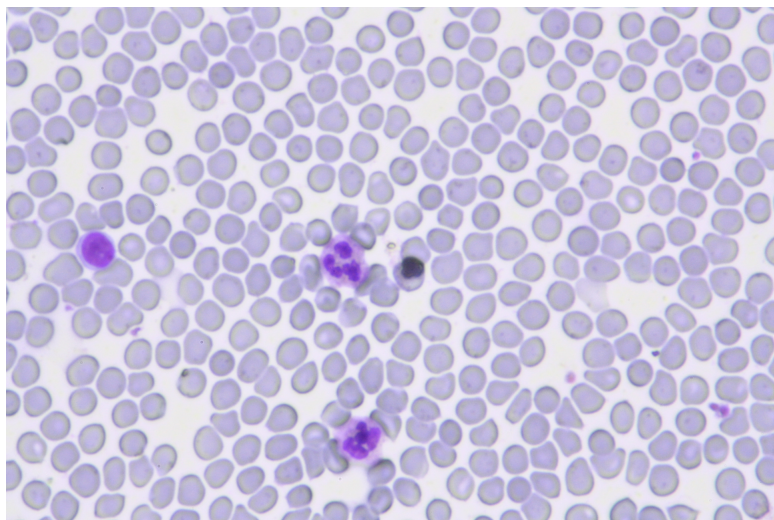
Las imágenes obtenidas con este montaje fueron las definitivas para usar en el desarrollo del algoritmo. Se observó mejores condiciones en la iluminación del fondo de la imagen y además el histograma muestra una mejor diferenciación de los objetos: el primer pico representa los núcleos de glóbulos blancos y las plaquetas, el segundo pico representa los glóbulos rojos y el tercer pico representa el fondo (ver figura 6.4).



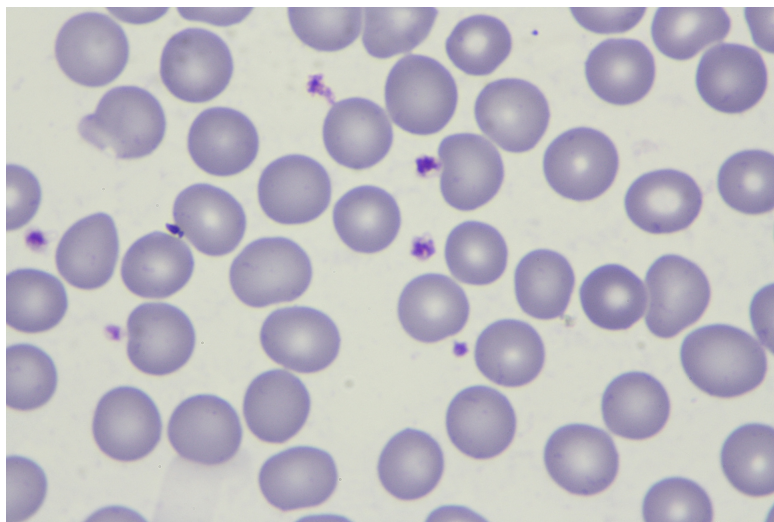
**Figura 6.4:** Imagen a 100x e Histograma obtenidos en el tercer montaje de adquisición  
Fuente: Autores del Proyecto

#### **6.1.4. Selección del Aumento para la Captura**

Dentro de los procedimientos de laboratorio se utilizan dos tipos de aumento para observar las células sanguíneas: con aumentos pequeños como el de 40x (ver figura 6.5 ) se realiza la inspección y el conteo aproximado de glóbulos blancos únicamente, luego se coloca una gota de aceite de inmersión y se enfoca a un aumento de 100x (ver figura 6.6 ) para observar la forma y color de los glóbulos rojos, así como la presencia de plaquetas [8].



**Figura 6.5:** Captura a 40x: orientada al conteo manual de glóbulos blancos únicamente.  
Fuente: Autores del Proyecto



**Figura 6.6:** Captura a 100x: utilizada para observación de glóbulos rojos.  
Fuente: Autores del Proyecto

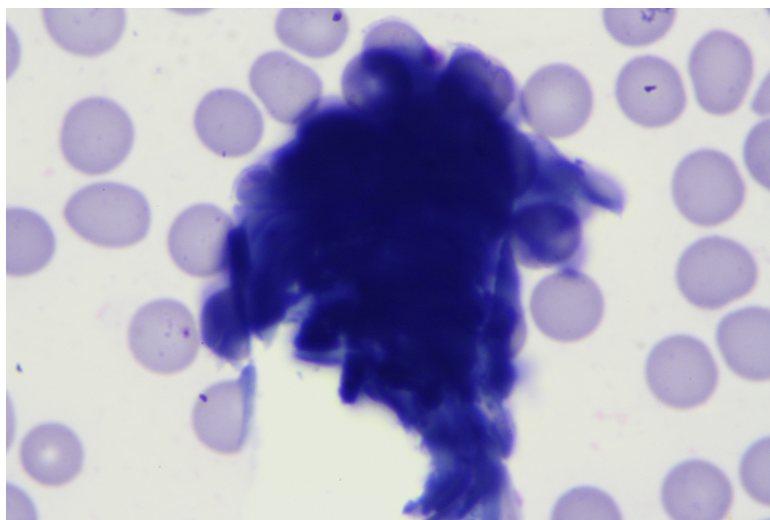
A nivel clínico se utiliza un aumento de 100x para observar los glóbulos rojos ya que permite apreciar mejor los detalles en cuanto a su forma y coloración. Al visualizar las figuras 6.5 y 6.6 se puede notar esta diferencia, adicionalmente a 100x se puede observar mayor separación entre las células, lo cual facilita su detección.

Estas razones determinaron que para este proyecto la adquisición de las imágenes se realizara a 100X.

#### **6.1.5. Defectos frecuentes en la tinción del frotis y que afectan el procesamiento**

En la etapa de captura se evidenció otro tipo de problema que no fue posible corregir con el cambio del microscopio, dado que constituyen defectos relacionados con la calidad del extendido y la tinción de la placa. Principalmente se encontró:

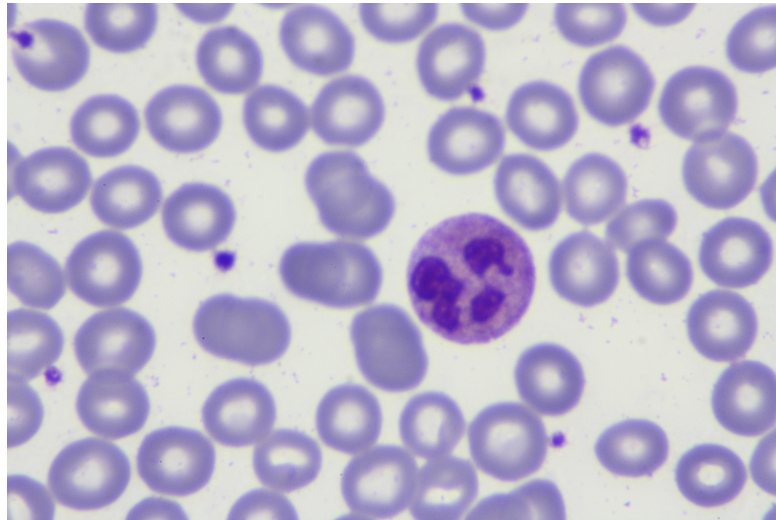
- Manchas y/o grumos de tinte sobre las células (ver figura 6.7 ). Según la literatura esta condición obedece a una acción excesiva del colorante [8].



**Figura 6.7:** Defectos del frotis: Manchas del tinte.

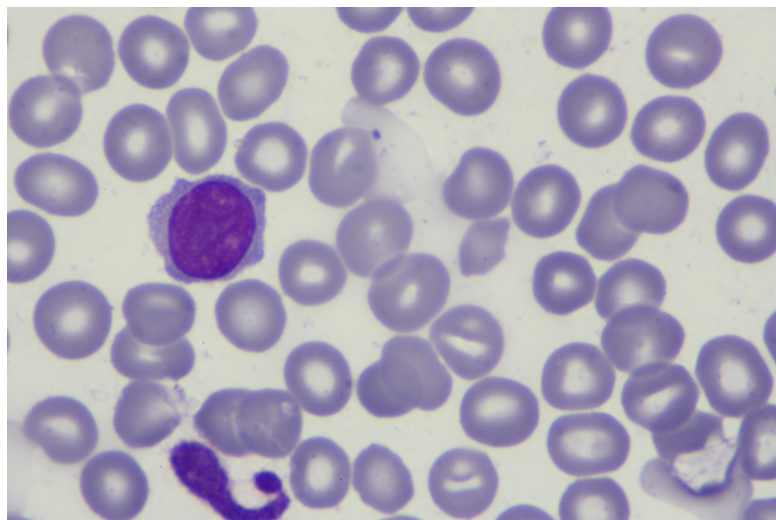
Fuente: Autores del Proyecto

- Coloración excesivamente azul ( ver figura 6.8 ), la cual se puede originar por un frotis demasiado grueso, condiciones del tinte y tiempos de tinción muy prolongados [8].



**Figura 6.8:** Defectos del frotis: Coloración excesiva  
Fuente: Autores del Proyecto

- Superposición de glóbulos rojos (ver figura 6.9 ), dada generalmente al inicio de la placa aunque también puede presentarse en otras regiones cuando el frotis ha quedado demasiado grueso [8].

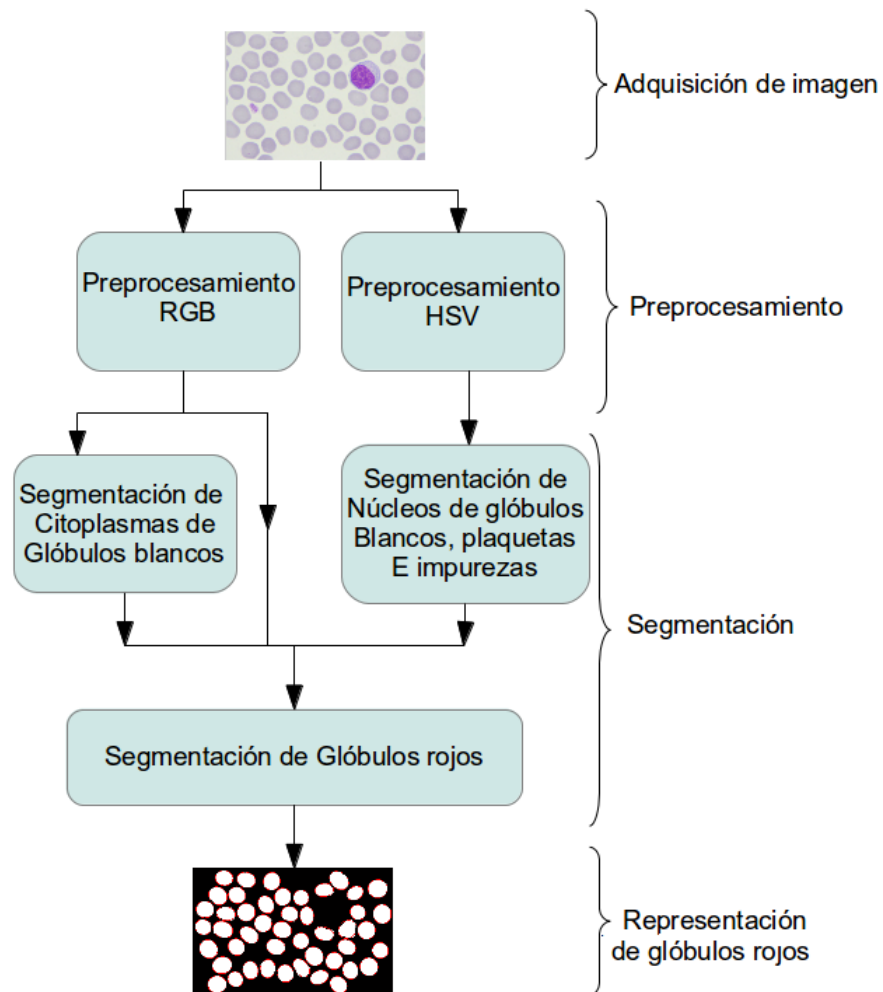


**Figura 6.9:** Defectos del frotis: Superposición de glóbulos rojos.  
Fuente: Autores del Proyecto



## 6.2. Diseño del Algoritmo

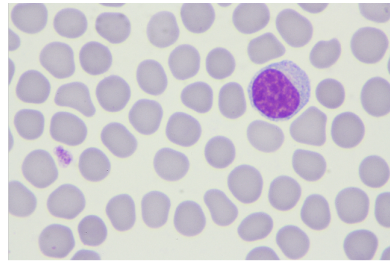
A partir de las técnicas resaltadas en el estudio del estado del arte, se planteó un algoritmo que tiene como objetivo realizar la detección de los glóbulos rojos. En la figura 6.10 se presenta a modo general el proceso seguido en esta etapa.



**Figura 6.10:** Diagrama General de Proceso  
Fuente: Autores del proyecto.

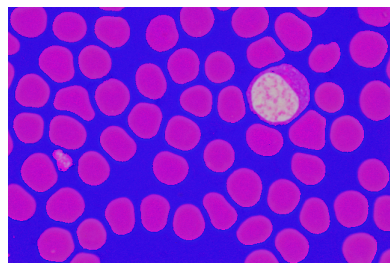
### 6.2.1. Preprocesamiento HSV

Dentro de las imágenes capturadas se encontraron aberraciones cromáticas, como puntos negros manchas y en ocasiones suciedad. También se notó variación en la iluminación a causa de la técnica de tinción usada para colorear la placa. Estos defectos se tratan de disminuir en la etapa del preprocesamiento. A partir del modelo de color HSV se realiza el preprocesamiento de la imagen para resaltar los glóbulos blancos y plaquetas con el fin de facilitar su segmentación tal y como se describe a continuación:



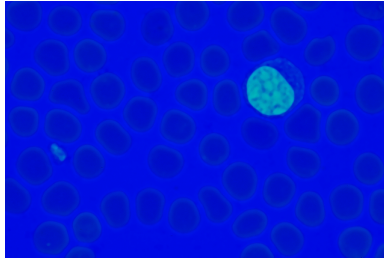
**Figura 6.11:** Imagen Adquirida.

- La imagen adquirida se convierte del modelo de color RGB al modelo HSV.



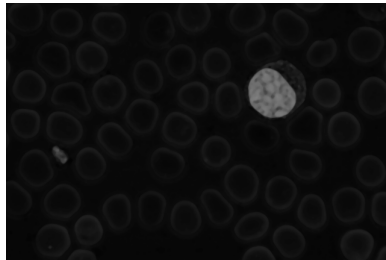
**Figura 6.12:** Conversión RGB a HSV.

- Se extrae el canal S por tener mayor contraste en la distribución del histograma. De esta forma se logra resaltar los núcleos de los glóbulos blancos y las plaquetas. En este paso se realiza el filtrado sobre el canal S, utilizando el filtro de la mediana para eliminar el ruido y suavizar la imagen.



**Figura 6.13:** Extracción y Suavizado del canal S.

- La imagen es convertida a escala de grises para reducir el tiempo de cómputo en la segmentación, en este paso se halla la imagen complemento para resaltar con altas intensidades los objetos de interés.



**Figura 6.14:** Conversión a Escala de Grises

### **6.2.2. Segmentación de núcleos de glóbulos blancos, plaquetas e impurezas**

Con los resultados obtenidos en el preprocesamiento HSV se procede a realizar la segmentación para separar los elementos de mayor intensidad como los núcleos de glóbulos blancos, plaquetas y algunas impurezas.

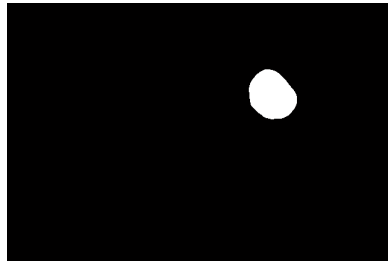
- Con un ajuste del histograma sobre la imagen 6.14 se resaltan los objetos de mayor intensidad como núcleos de glóbulos blancos y plaquetas.





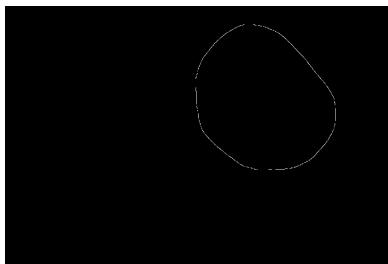
**Figura 6.15:** Ajuste del Histograma

- Con morfología matemática se filtran las plaquetas y posibles residuos pequeños, para esto se define un elemento estructurante tipo disco y se realiza una apertura sobre la imagen binaria de la figura 6.15. El tamaño del elemento estructurante depende del aumento que en este caso sería de 100x .



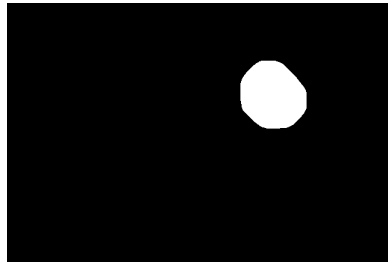
**Figura 6.16:** núcleos de glóbulos blancos

- Una vez obtenidos los núcleos, se definen sus contornos mediante el filtro canny. La figura 41 se encuentra ampliada para observar de mejor manera los resultados.



**Figura 6.17:** Detector de bordes de los núcleos de glóbulos blancos

- La segmentación de los glóbulos blancos finaliza con una dilatación morfológica, para esto se define un elemento estructurante tipo disco con el fin de dilatar los núcleos y así eliminar parte del citoplasma que los contiene.

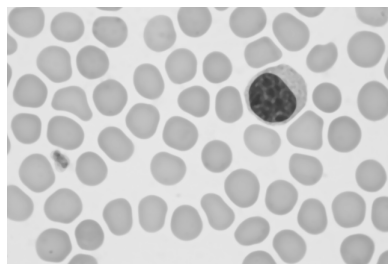


**Figura 6.18:** Dilatación Morfológica

### 6.2.3. Preprocesamiento RGB

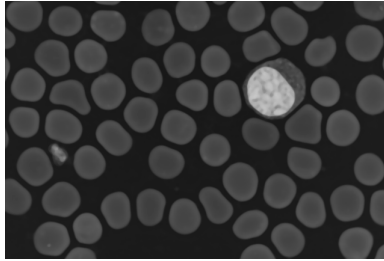
El preprocesamiento en el canal RGB se realiza para facilitar la segmentación de glóbulos rojos. El proceso seguido se describe a continuación:

- Del modelo de color RGB se extrae el canal verde por ser el que mejor contraste ofrece para observar los glóbulos rojos. Sobre el canal verde, se aplica el filtro de la mediana para suavizar la imagen.



**Figura 6.19:** Extracción y suavizado del canal verde.

- Se halla el complemento de la imagen anterior para obtener altas intensidades en los glóbulos rojos.



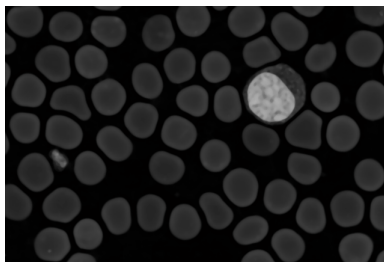
**Figura 6.20:** Complemento de la Imagen anterior.

- Se realiza una apertura morfológica sobre toda la imagen con el fin de extraer una máscara aproximada del fondo.



**Figura 6.21:** Máscara aproximada del fondo.

- Sustrayendo el fondo de la imagen se logra una mejora en la iluminación de la imagen.



**Figura 6.22:** Corrección de la Iluminación.

#### 6.2.4. Eliminación de citoplasmas de Glóbulos Blancos y Segmentación de Glóbulos Rojos

A partir de la imagen obtenida en el preprocesamiento RGB, se da paso a la detección de glóbulos rojos. La identificación de glóbulos blancos y plaquetas también representa información útil en esta etapa

- A partir de la imagen 6.22 se inicia con un ajuste del histograma para eliminar intensidades menores a la intensidad de los glóbulos rojos.

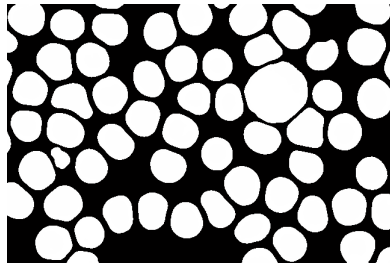


Figura 6.23: Ajuste del histograma.

- Mediante restas binarias entre las imágenes se procede a eliminar todos los elementos que no son glóbulos rojos. De esta manera una resta binaria entre las imágenes 6.23 y 6.18 permite eliminar los núcleos de los glóbulos blancos.

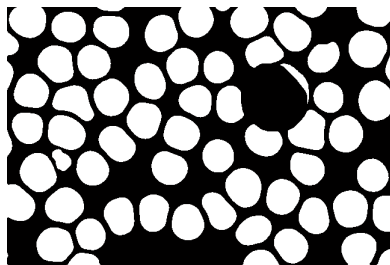
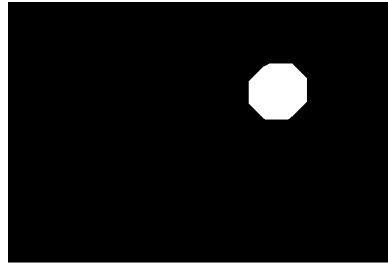


Figura 6.24: Remoción de núcleos de glóbulos blancos.

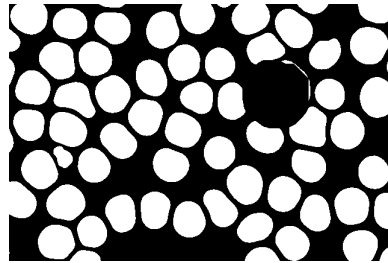
- Como se observa en la figura 6.24, es posible que queden restos de citoplasmas de glóbulos blancos. Para eliminarlos en su totalidad, se realiza la detección de

los citoplasmas con ayuda de una apertura morfológica y un elemento estructurante tipo disco.



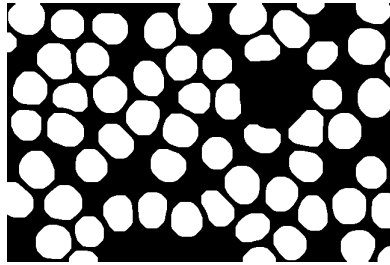
**Figura 6.25:** Detección de citoplasmas de glóbulos blancos.

- Después de detectar los citoplasmas, se realiza una resta binaria entre las imágenes de la figura 6.24 y 6.25.



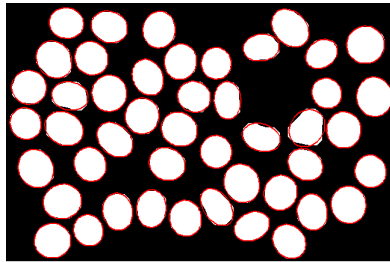
**Figura 6.26:** Remoción de citoplasmas de glóbulos blancos.

- Para eliminar las plaquetas, residuos pequeños de citoplasmas y los huecos dentro de los glóbulos rojos se aplican operaciones de morfología matemática: mediante un cierre morfológico se rellenan los huecos de los glóbulos rojos, esto se hace con el fin de facilitar la detección de sus bordes; con una apertura morfológica se eliminan los elementos pequeños.



**Figura 6.27:** Remoción de plaquetas y elementos pequeños.

- Una vez removidos los anteriores elementos se realiza la detección de glóbulos rojos, esto se logra tomando cada región como una célula lo cual permite obtener de forma adicional el conteo de las regiones detectadas.

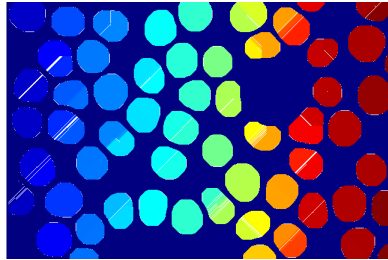


**Figura 6.28:** Detección de glóbulos rojos.

- Algunas veces la detección se ve afectada por la superposición de glóbulos rojos. Esta condición puede variar dependiendo de la región de la placa, y está directamente relacionada con la técnica de preparación del extendido. Así por ejemplo cuando el extendido queda demasiado grueso no se genera una adecuada separación entre las células y por lo tanto se ocasiona superposición; ésta condición hace que exista alta variación en cuanto a la presencia de glóbulos superpuestos dado que depende de un proceso manual en su totalidad.

Teniendo en cuenta la literatura, una técnica para abordar la superposición de elementos en imágenes es la Transformada Watershed. Se presentan los resultados del uso de esta transformada en donde se evidencia el problema de la

sobresegmentación lo cual genera falsas divisiones. Por esta razón el uso de ésta transformada no se tuvo en cuenta para esta fase.



**Figura 6.29:** Transformada Watershed.

### 6.3. Implementación en C# y Desarrollo de la Interfaz Gráfica

Una vez diseñado el algoritmo, se procedió a realizar una implementación utilizando el entorno de desarrollo Visual Studio 2010, con el lenguaje C# y la biblioteca de funciones OpenCV bajo las librerías de Emgu.

*Open CV* es una biblioteca libre de visión artificial que ha sido utilizada en infinidad de aplicaciones como: sistemas de seguridad con detección de movimiento y control de procesos donde se requiere reconocimiento de objetos. Esto ha sido posible debido a que su licencia permite que sea utilizada con fines comerciales. Lo anterior mencionado motivó la exploración de esta biblioteca, en el desarrollo de este proyecto.

*Emgu CV* es una plataforma cruzada .Net ligada a Open CV, permitiendo que las funciones de Open CV sean llamadas desde .Net. Emgu es compatible con lenguajes como C#.

### 6.3.1. Diagramas de Casos de Uso

A continuación se presenta la descripción de los diagramas de casos de uso que se crearon para orientar el desarrollo y la planificación de las características de la herramienta software.

Pensando en la continuidad de la línea de hematología del grupo GIIB, se ha dejado planteado la consideración de ampliar la detección también a 40x (ver figura 6.5 ) para realizar a futuro conteo de glóbulos blancos. Para el actual proyecto se consideró sólo aumentos de 100x (ver capítulo 6.1.4 Seleccione el Aumento).

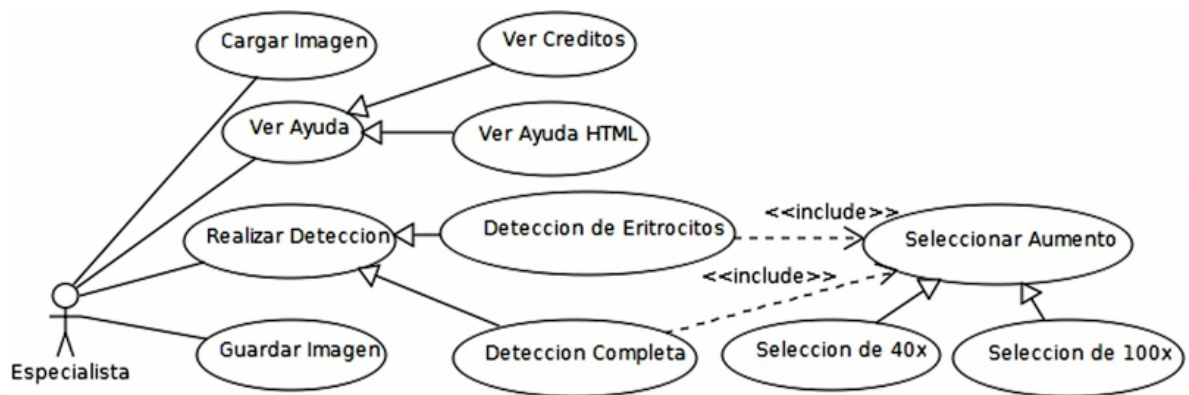


Figura 6.30: Diagramas de Casos de Uso.



### 6.3.2. Diagramas de Clases

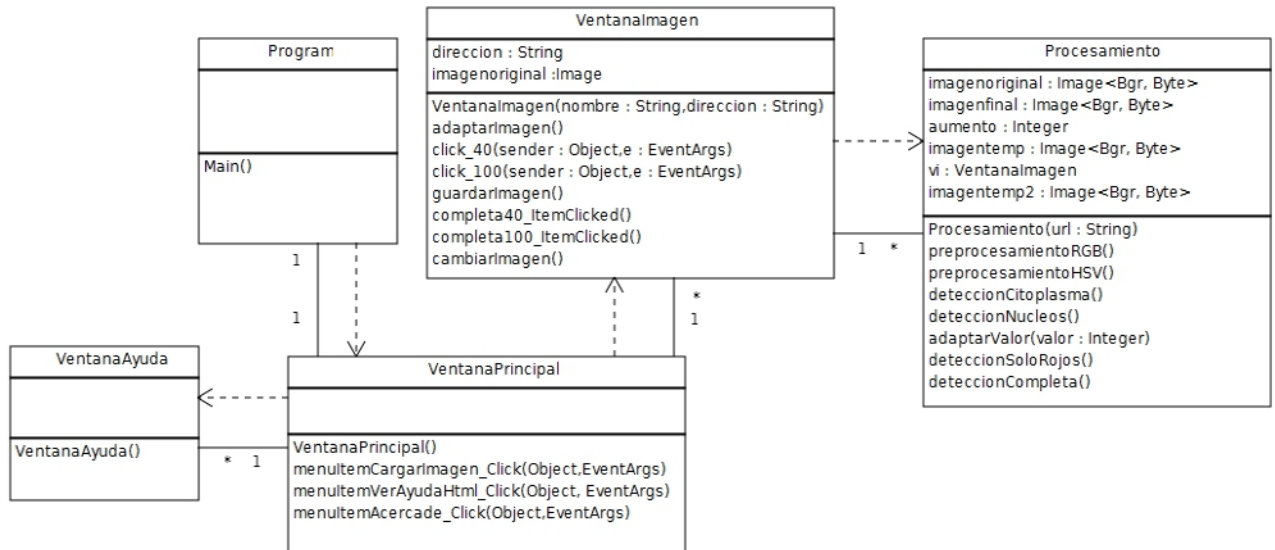


Figura 6.31: Diagrama de Clases.

### 6.3.3. Demostración de la Herramienta Software

La interfaz gráfica fue creada pensando en una fácil manipulación por parte del usuario. Consta de una ventana principal que se mantiene durante toda la ejecución (figura 6.32 ) y una ventana secundaria donde se realiza la detección celular y visualización de resultados (figura 6.35 ).

La ventana principal presenta un sencillo menú para acceder al directorio de las imágenes que se desean cargar y a la ayuda acerca de la herramienta (figura 6.42).

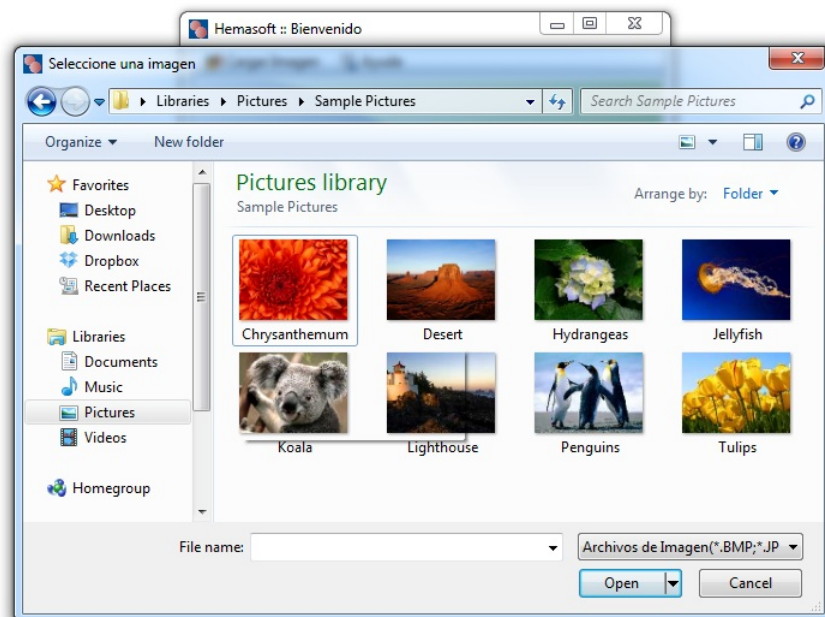


**Figura 6.32:** Ventana principal de la herramienta.

Con la opción **Cargar Imagen** (figura 6.33) se accede al directorio de la imagen que se desea analizar. La herramienta soporta los formatos JPG, PNG ó BMP ya que estos son los formatos que normalmente arrojan las cámaras de adquisición.

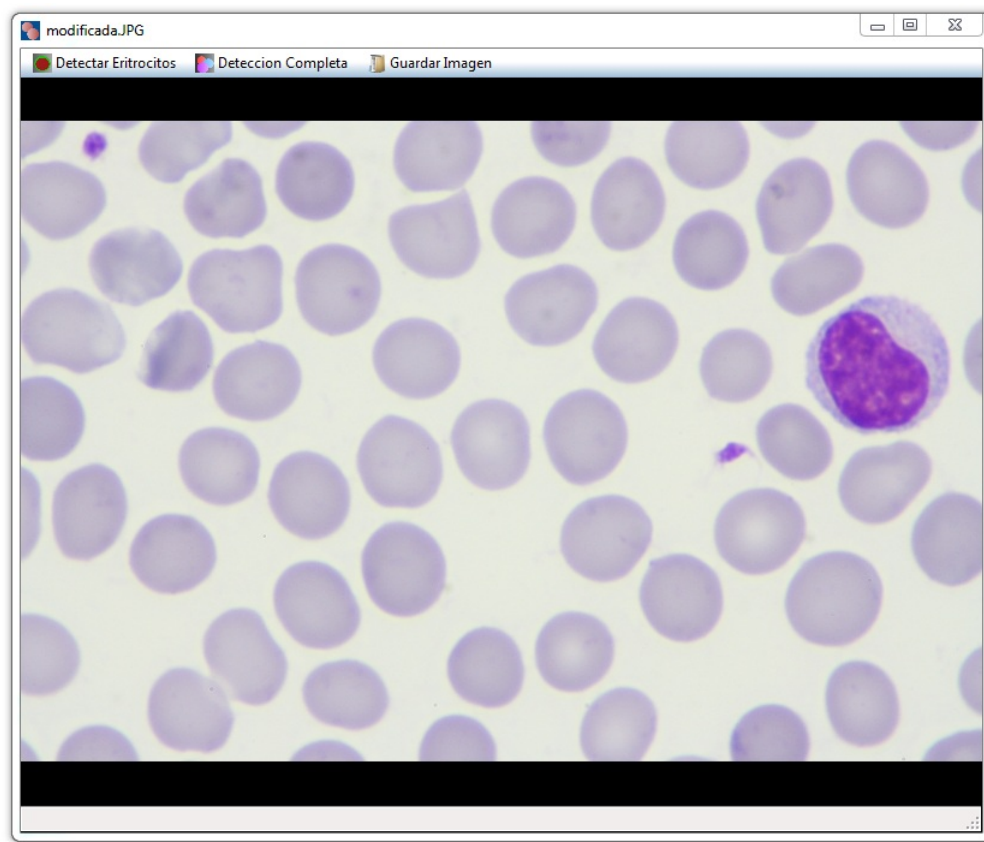


**Figura 6.33:** Opción Cargar Imagen.



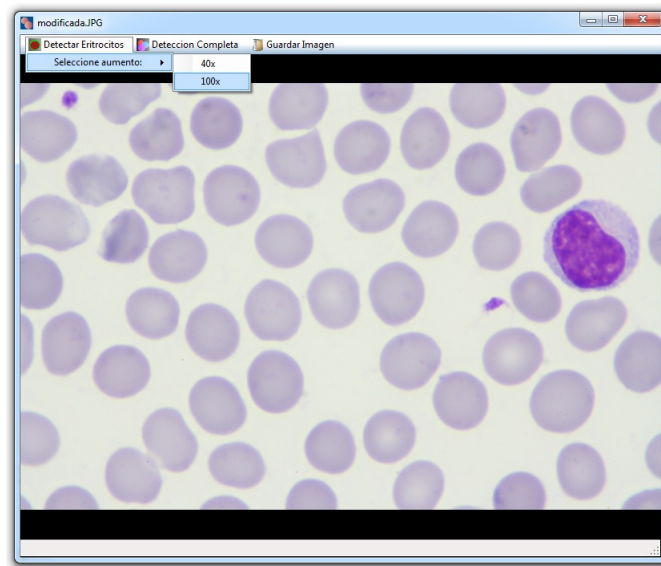
**Figura 6.34:** Selección del directorio de la imagen.

Una vez seleccionada la imagen, se activa la ventana secundaria donde se realiza la visualización (figura 6.35 ) y se dispone de un menú para realizar las operaciones de detección. Se plantearon dos tipos de detección: la **Detección de Eritrocitos** que enmarca el objetivo de este proyecto y de manera agregada se presenta la opción para visualizar una **Detección Completa** que muestra la detección de los eritrocitos y leucocitos (núcleos y citoplasmas).

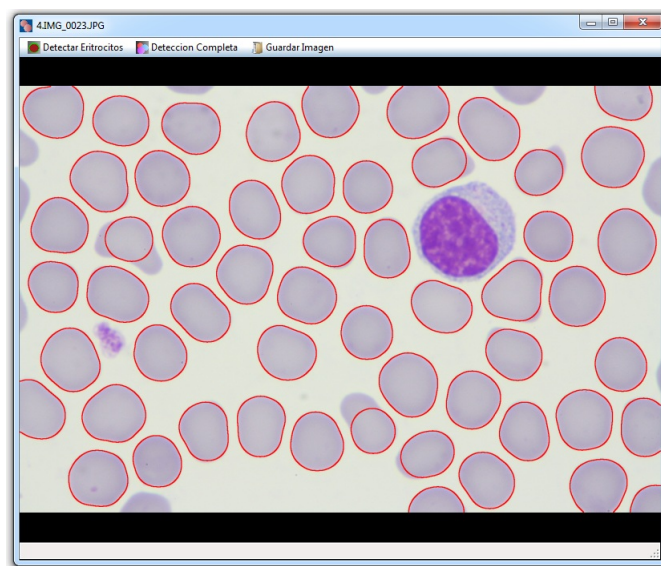


**Figura 6.35:** Visualización Imagen.  
Fuente: Este proyecto.

Ejemplo de la Detección de Eritrocitos en una imagen tomada a 100X de aumento:

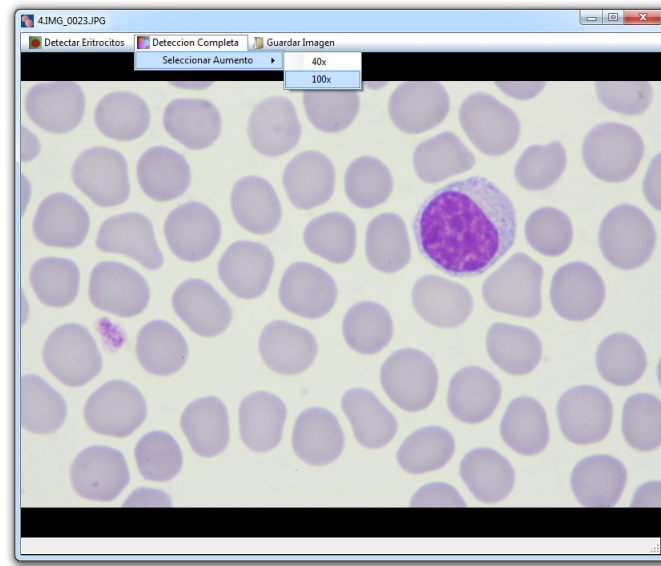


**Figura 6.36:** Selección de aumento para la detección de eritrocitos.

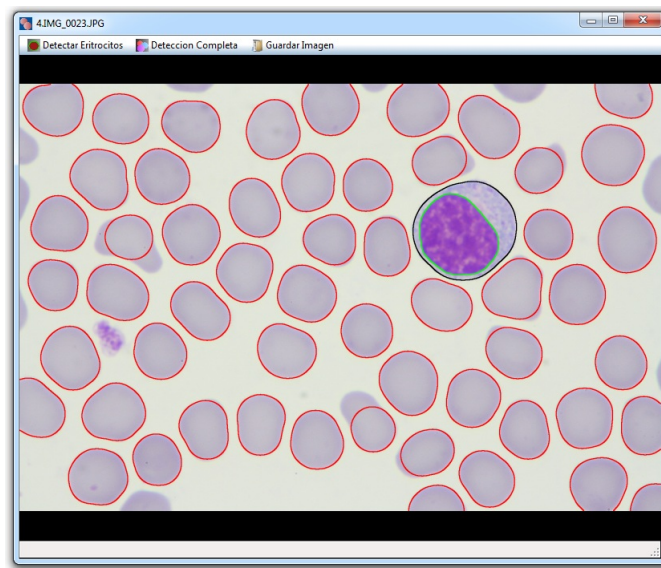


**Figura 6.37:** Detección de eritrocitos.

Ejemplo de la Detección de Completa en una imagen tomada a 100X de aumento:



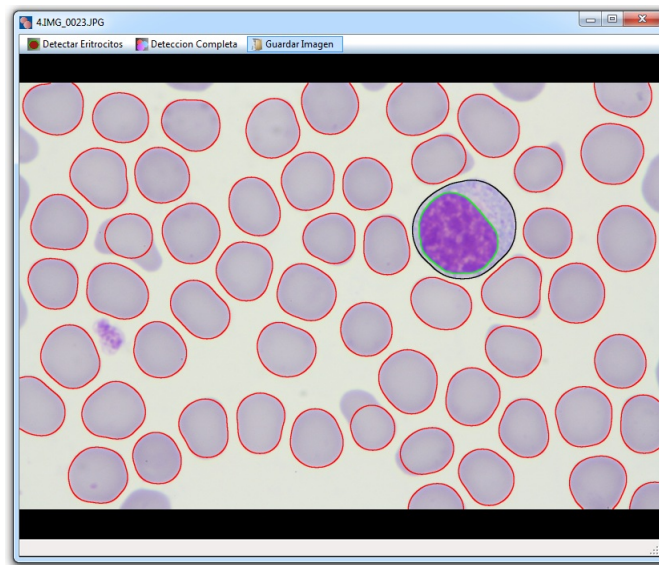
**Figura 6.38:** Selección de aumento para la detección de todas las células.



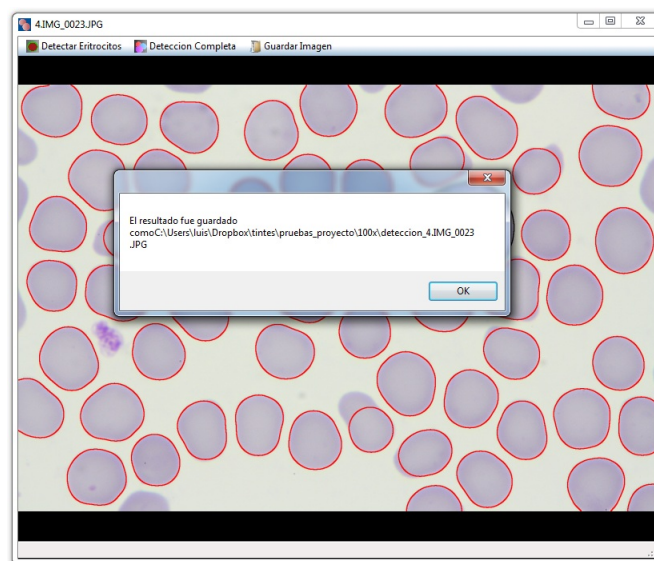
**Figura 6.39:** Detección de eritrocitos, citoplasmas y núcleos de leucocitos.

Si se desea guardar los resultados, se puede realizar a través del menú **Guardar Imagen** (figura 6.40 ), se escoge el directorio y finalmente la herramienta muestra un mensaje confirmando que la imagen ha sido guardada exitosamente (figura 6.41 )





**Figura 6.40:** Opción Guardar Imagen.



**Figura 6.41:** Aviso de imagen guardada exitosamente.

La ayuda acerca de la herramienta se presenta en la ventana principal de la siguiente forma:



**Figura 6.42:** Opción de Ayuda.



**Figura 6.43:** Ayuda acerca de la herramienta.

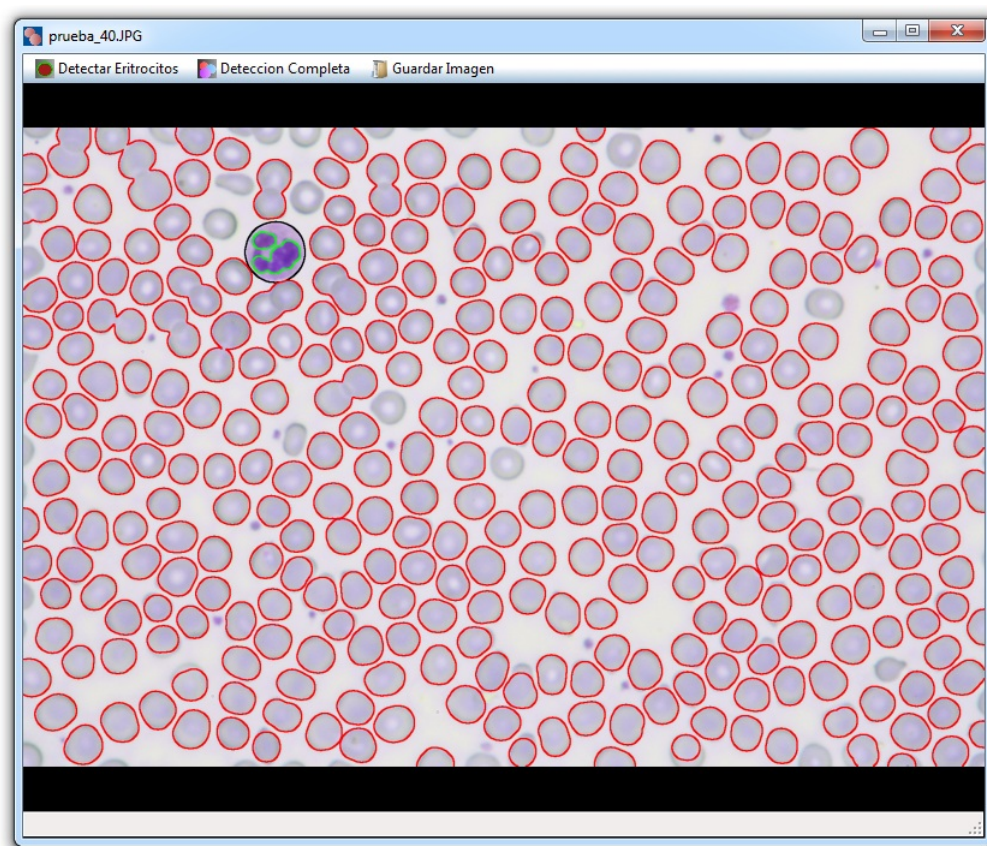
Para los fines de este proyecto, tanto en la Detección de Eritrocitos (figura 6.36)



como en la Detección Completa (figura 6.38) se debe especificar el aumento de 100x tal y como se definió en la etapa de adquisición (ver capítulo 6.1.4 Selección de Aumento para la Captura).

Sin embargo y aunque no es considerado objetivo de este proyecto, se ha dejado indicada la opción a 40x para su ampliación en trabajos futuros que analicen otro tipo de células sanguíneas como los glóbulos blancos, los cuales si se visualizan a 40x para conteos.

A continuación se muestra los resultados del algoritmo usando una imagen a 40x:



**Figura 6.44:** Resultados de la detección completa a 40x.

## 6.4. Pruebas del Algoritmo

### 6.4.1. Pruebas de Sensibilidad y Especificidad

Para las pruebas se seleccionaron 50 imágenes a 100x teniendo en cuenta que representaran los tres tipos de células sanguíneas e incluso manchas y/o partículas. La tabla 6.2 indica los parámetros tenidos en cuenta en la detección para los calcular los índices de sensibilidad y especificidad y en las tablas 6.1 y 6.3 se presentan los indicadores obtenidos en cada una de las imágenes. La **sensibilidad** indica la capacidad del algoritmo para detectar como glóbulos rojos aquellas células que realmente lo son , y la **especificidad** indica la capacidad de no detectar como glóbulos rojos a los organismos que no lo son.

| Indicador         | Descripción                                           |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| VP (Verdaderos +) | Glóbulos Rojos detectados.                            |
| VN (Verdaderos -) | Organismos que NO son GR, y NO se detectaron como GR. |
| FP (Falsos +)     | Organismos que NO son GR, y SE detectaron como GR.    |
| FN (Falsos -)     | Glóbulos Rojos NO detectados.                         |

**Cuadro 6.2:** Descripción de Indicadores.

| Aumento | Muestra    | VP | VN | FP | FN |
|---------|------------|----|----|----|----|
| 100X    | Muestra 1  | 45 | 3  | 0  | 6  |
|         | Muestra 2  | 37 | 3  | 0  | 9  |
|         | Muestra 3  | 42 | 3  | 0  | 5  |
|         | Muestra 4  | 54 | 3  | 0  | 0  |
|         | Muestra 5  | 38 | 3  | 0  | 1  |
|         | Muestra 6  | 54 | 5  | 0  | 2  |
|         | Muestra 7  | 48 | 3  | 0  | 1  |
|         | Muestra 8  | 48 | 0  | 0  | 2  |
|         | Muestra 9  | 52 | 4  | 0  | 3  |
|         | Muestra 10 | 54 | 2  | 0  | 4  |
|         | Muestra 11 | 48 | 3  | 0  | 1  |
|         | Muestra 12 | 45 | 2  | 0  | 2  |
|         | Muestra 13 | 40 | 7  | 0  | 0  |
|         | Muestra 14 | 42 | 2  | 0  | 1  |
|         | Muestra 15 | 42 | 1  | 0  | 0  |
|         | Muestra 16 | 40 | 4  | 0  | 0  |
|         | Muestra 17 | 34 | 4  | 0  | 4  |
|         | Muestra 18 | 41 | 6  | 0  | 2  |
|         | Muestra 19 | 30 | 7  | 0  | 15 |
|         | Muestra 20 | 19 | 9  | 0  | 8  |
|         | Muestra 21 | 24 | 3  | 1  | 16 |
|         | Muestra 22 | 20 | 3  | 2  | 18 |
|         | Muestra 23 | 27 | 6  | 2  | 12 |
|         | Muestra 24 | 29 | 3  | 0  | 7  |
|         | Muestra 25 | 32 | 5  | 1  | 2  |

**Cuadro 6.1:** Pruebas del Algoritmo en C#.

| Aumento | Muestra    | VP   | VN  | FP | FN  |
|---------|------------|------|-----|----|-----|
| 100X    | Muestra 26 | 35   | 2   | 0  | 2   |
|         | Muestra 27 | 37   | 3   | 0  | 3   |
|         | Muestra 28 | 30   | 1   | 0  | 2   |
|         | Muestra 29 | 34   | 1   | 2  | 7   |
|         | Muestra 30 | 20   | 1   | 1  | 12  |
|         | Muestra 31 | 28   | 3   | 0  | 6   |
|         | Muestra 32 | 12   | 3   | 0  | 15  |
|         | Muestra 33 | 16   | 5   | 0  | 10  |
|         | Muestra 34 | 20   | 1   | 0  | 12  |
|         | Muestra 35 | 30   | 4   | 0  | 4   |
|         | Muestra 36 | 38   | 2   | 0  | 3   |
|         | Muestra 37 | 28   | 3   | 1  | 10  |
|         | Muestra 38 | 20   | 4   | 0  | 10  |
|         | Muestra 39 | 15   | 2   | 0  | 14  |
|         | Muestra 40 | 18   | 3   | 0  | 12  |
|         | Muestra 41 | 17   | 5   | 0  | 20  |
|         | Muestra 42 | 28   | 4   | 0  | 4   |
|         | Muestra 43 | 30   | 1   | 0  | 4   |
|         | Muestra 44 | 36   | 2   | 0  | 0   |
|         | Muestra 45 | 38   | 1   | 0  | 1   |
|         | Muestra 46 | 17   | 1   | 0  | 20  |
|         | Muestra 47 | 31   | 4   | 0  | 1   |
|         | Muestra 48 | 22   | 1   | 2  | 1   |
|         | Muestra 49 | 35   | 4   | 0  | 1   |
|         | Muestra 50 | 30   | 2   | 0  | 1   |
|         | TOTAL      | 1650 | 157 | 12 | 296 |

**Cuadro 6.3:** Pruebas del Algoritmo en C#.

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{1650}{1650 + 296} * 100 = 84,78 \% \quad (6.1)$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{157}{157 + 12} * 100 = 92,89 \% \quad (6.2)$$

Las pruebas realizadas arrojaron un 84,78 % de sensibilidad, esto evidencia que

los defectos en la tinción del frotis (ver capítulo 6.1.5 ) ocasiona que en algunos casos el algoritmo no detecte correctamente la totalidad de glóbulos rojos, sin embargo la especificidad del 92,89 % indica que la gran mayoría de las células que fueron detectadas como glóbulos rojos, en realidad lo eran.

## 7. Conclusiones y Recomendaciones

### 7.1. Conclusiones

- La calidad del extendido sanguíneo, las características ópticas del microscopio y las condiciones de iluminación son parámetros esenciales a tener en cuenta para garantizar el éxito en la captura de las imágenes y mejoran el resultado en las etapas posteriores de preprocesamiento y segmentación.
- Las imágenes capturadas a 100x poseen mejor separación entre las células, ofrecen mayor detalle en cuanto a la forma, color y presentan mayor diferenciación entre los glóbulos rojos y el fondo respecto a las imágenes capturadas a 40X; esto hizo que para el desarrollo de este proyecto resultara más útil utilizar el aumento de 100x.
- Con las pruebas realizadas se encontró que la Morfología Matemática y la Umbralización por sí solas no constituyen una técnica efectiva para la segmentación de células, sin embargo la combinación entre ellas, si se complementan logrando mejores resultados.
- La presencia de glóbulos rojos superpuestos se da en regiones específicas de la placa sanguínea y está directamente relacionada con la técnica de preparación

del extendido. Dado que éste último proceso es realizado de forma manual, la superposición constituyó un fenómeno no cuantificable dentro de los alcances de este proyecto.

- Matlab permitió realizar pruebas y simulaciones de las técnicas seleccionadas para realizar procesamiento de imágenes, esto facilitó guiar su posterior implementación en C# y desarrollo de la herramienta.

## 7.2. Recomendaciones

- La no existencia de una base de datos de imágenes estándar en el área de hematología hizo necesario llevar a cabo el proceso adquisición por parte de los autores. Se recomienda la divulgación y libre uso de las imágenes generadas en este proyecto para efectos de facilitar pruebas y contrastar resultados con otros métodos <sup>4</sup>.
- Se recomienda la automatización del barrido de la placa bajo microscopio con el fin de apoyar el recorrido visual que debe realizar el especialista para la observación de la morfología de las células.
- Actualmente las condiciones de los extendidos son muy variables y no en todos los casos se logra una distribución adecuada de las células ni condiciones óptimas de coloración; se recomienda la automatización de éste proceso con el fin de lograr extendidos más uniformes, reducir el tiempo que el especialista dedica a ésta labor dejándole más espacio el análisis y diagnóstico.
- Se recomienda estudiar a profundidad la Transformada Watershed con el fin de abordar el problema de la superposición de glóbulos rojos.

---

<sup>4</sup>Disponible en las Bases de Datos del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica

- El tinte de mayor uso en los laboratorios es el Wright. Sin embargo en el desarrollo de esta investigación se encontró evidencia de la realización de pruebas utilizando el tinte May Grunwald Giemsa. Se recomienda hacer pruebas con imágenes de células teñidas con este tinte, el cual ofrece mayor diferenciación de color en los glóbulos rojos.



## 8. Impactos en la Comunidad Científica

En desarrollo de este proyecto se realizaron 3 artículos que fueron aceptados en los eventos descritos a continuación:

- *SIPAIM 2011: VII Seminario Internacional de Procesamiento y Análisis de Información Médica.*

*Título del Artículo:* Detección de Glóbulos Rojos en Imágenes Microscópicas de Células Sanguíneas.

*Modalidad:* Poster.

*Autores:* Lizeth Castellanos, Luis Hasbón y Lina Garcés.

*Ciudad y fecha:* Bucaramanga, Colombia, 5-7 de diciembre del 2011.

# VII Seminario Internacional de Procesamiento y Análisis de Información Médica

## DETECCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Lizeth Castellanos <sup>a,\*</sup>, Luis Hasbón <sup>a,\*</sup>, Lina Garcés <sup>a</sup>  
<sup>a</sup> Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica, GIB, Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática  
 Universidad Industrial de Santander  
 Bucaramanga, Colombia  
<sup>\*</sup>castellanoslizeth@gmail.com, <sup>\*</sup>luishasbon@gmail.com

### RESUMEN

El análisis de los glóbulos rojos es utilizado a nivel clínico para el diagnóstico de enfermedades en el área de hematología. Aunque en sus inicios era realizado de forma manual, hoy en día existen equipos automatizados que dan soporte al conteo celular, parte importante de este análisis. A pesar de su utilidad, representan un alto costo en mantenimiento, consumo de reactivos y no permiten la observación celular. Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones se propone un método computacional para la detección de glóbulos rojos basado en tratamiento digital de imágenes utilizando técnicas de segmentación y morfología matemática.

**Palabras Claves:** Hematología, Glóbulos Rojos, Segmentación, Morfología Matemática.

### INTRODUCCIÓN

Los laboratorios clínicos de Colombia tienen gran demanda de hemogramas, como parte del diagnóstico de un paciente. Este examen expresa el número, proporción y variaciones de los elementos sanguíneos: recoge el número de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina e índices eritrocitarios [1], los cuales son importantes en la determinación de enfermedades pues representan la proporción de los glóbulos rojos en la sangre. Los glóbulos rojos constituyen alrededor del 98% de los elementos formes, carecen de núcleo, tienen forma de disco bicóncavo y su radio varía entre 5 y 7,5  $\mu\text{m}$  [2].

En sus inicios los conteos celulares se realizaban mediante la técnica manual por medio de la observación a través de un microscopio, utilizando un teclado conocido como contador hematológico para registrar el número de células contadas, y una placa rectangular de cristal conocida como cámara de Neubauer [3]. Esta placa posee unas divisiones en las cuales se pueden observar y contar células de acuerdo a estándares médicos ya definidos [4].

En la actualidad el proceso de conteo se realiza de forma automática mediante equipos que funcionan bajo los principios de Impedancia Eléctrica [5] o Citometría de Flujo [1]. Estos equipos se encuentran calibrados de acuerdo a rangos de indicadores normales establecidos por el fabricante, cuando un resultado se encuentra fuera de dicho rango, el especialista debe recurrir a la observación bajo microscopio para verificar el conteo y estado de las células, por lo cual se requiere invertir más tiempo y esfuerzo. Esto evidencia la necesidad de un método que permita la observación celular. Como aporte inicial a este propósito se ha planeado este trabajo para realizar detección de glóbulos rojos a partir de técnicas para el tratamiento digital de imágenes [6].

Existen estudios orientados a la detección de células sanguíneas [7], [8] y casos documentados en donde aún es necesario la observación por microscopio [9].

### METODOLOGÍA

Para la selección de las técnicas adecuadas en el tratamiento digital de imágenes, fue necesaria la revisión del estado del arte relacionado con el análisis de imágenes microscópicas [10]. En el desarrollo del método se utilizó matlab y el Toolbox de procesamiento de imágenes [11].

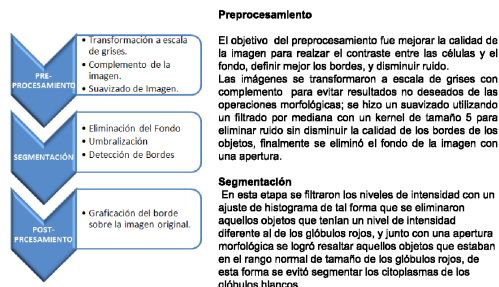


Figura 2. Diseño del Algoritmo

#### Post-Procesamiento

Se utilizó la información contenida en la matriz de los bordes y se graficaron los puntos sobre la imagen original.

#### Preprocesamiento

El objetivo del preprocesamiento fue mejorar la calidad de la imagen para realizar el contraste entre las células y el fondo, definir mejor los bordes, y disminuir ruido. Las imágenes se transformaron a escala de grises con complemento para evitar resultados no deseados de las operaciones morfológicas; se hizo un suavizado utilizando un filtro por mediana con un kernel de tamaño 5 para eliminar ruido sin disminuir la calidad de los bordes de los objetos, finalmente se eliminó el fondo de la imagen con una apertura.

#### Segmentación

En esta etapa se filtraron los niveles de intensidad con un ajuste de histograma de tal forma que se eliminaron aquellos objetos que tenían un nivel de intensidad diferente al de los glóbulos rojos, y junto con una apertura morfológica se logró resaltar aquellos objetos que estaban en el rango normal de tamaño de los glóbulos rojos, de esta forma se evitó segmentar los citoplasmas de los glóbulos blancos.

En la umbralización de la imagen se utilizó el método de umbralización estadística Otsu [12]; culminados los anteriores procesos, quedaron algunas deficiencias en la imagen que fueron solucionadas con relleno de imágenes a partir de la función imfill [13] y operaciones morfológicas como apertura y cierre utilizando elementos estructurales tipo disco. Para la detección de bordes se usó un filtro espacial con el kernel conocido como 'Laplacian of gaussian' o 'log' [14].



### RESULTADOS

Se utilizó un conjunto de 30 imágenes para realizar las pruebas del algoritmo, éstas fueron adquiridas con una cámara especializada en fotografías microscópicas. Se usaron placas de muestras de sangre periférica teñidas con tinte Wright a una resolución de 640x480 píxeles y un aumento de 100x en un microscopio óptico utilizando líquido de inmersión; en las imágenes se encontraban presentes glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y algunos residuos celulares.

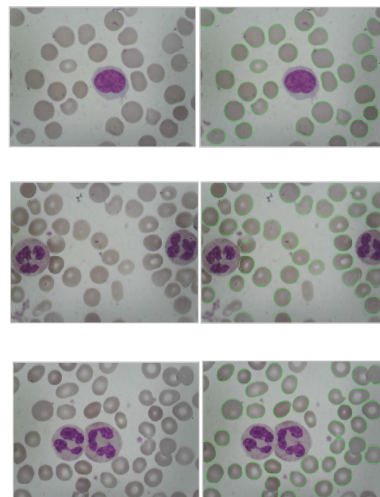


Figura 3. Detección de glóbulos rojos en presencia de leucocitos y otros organelos celulares

### DISCUSIÓN

Este trabajo estuvo orientado a la detección de glóbulos rojos en imágenes microscópicas y aún no permite la clasificación de las diferentes patologías asociadas a estas células, sin embargo la detección constituye el primer avance para poder realizar a futuro conteo celular y estudios morfológicos.

### REFERENCIAS

- [1] Manual de operaciones del sistema CELL-CYN SapphireTM, 96-0304R1, Abbott Laboratories, Junio, 2005.
- [2] S. P. Kirkham, Cells in focus, Red blood cells, The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2002.
- [3] J. Lehnert, B. Greve, U. Casasens, Automation in Hematology, Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2007.
- [4] Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de Hematología, Red Nacional de Laboratorios de Salud pública, Perú, 2005.
- [5] B. J. Ford, From Dilatant to Diligent Experimentar, a Reappraisal of Leeuwenhoek as microscopist and investigator, Biology History, 1992.
- [6] R. C. González, Digital Image Processing, Segunda Edición, Prentice Hall, 2002.
- [7] T. Bergen, D. Sheckman, T. Wittenberg, T. Zarfa, Segmentation of leucocytes and erythrocytes in blood smear images, 2008.
- [8] G. Priyankara, O. Seneviratne, R. Silva, W. Soyes, C. D. Silva, An extensible computer vision application for blood cell recognition, 2007.
- [9] B. J. BAIN, Morphology in the diagnosis of red cell disorders, 2005.
- [10] J. Rojas, Segmentación y reconocimiento de patrones en imágenes de histología, 2005.
- [11] The Mathworks, Inc., 1998, Image Processing Toolbox User's Guide Version 2.1, The Mathworks.
- [12] J. Zhang, J. Hu, Image Segmentation Based on 2D Otsu Method with Histogram Analysis, 2008.
- [13] P. Soille, Morphological Image Analysis: Principles and Applications, Springer-Verlag, 1999, pp. 173-174.
- [14] J. Wan, X. He, P. Shi, An iris Image Quality Assessment Method Based on Laplacian of Gaussian, 2007.

- ***SICOTEL 2012: Seminario Taller Latinoamericano de Instrumentación Control y Telecomunicaciones***

*Título del Artículo:* Detección de Glóbulos Rojos usando Técnicas de Procesamiento y Análisis de Imágenes Microscópicas.

*Modalidad:* Ponencia Oral.

*Autores:* Lizeth Castellanos, Luis Hasbón y Lola Bautista.

*Ciudad y fecha:* Armenia, Colombia, 2-4 de mayo del 2012.

# DETECCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS USANDO TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS

Castellanos, Lizeth., Hasbón, Luis y Bautista Lola.  
castellanoslizan@gmail.com, luishasbon@gmail.com  
Universidad Industrial de Santander  
Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica GIIIB

**Resumen**— El número, tamaño y distribución de células sanguíneas proporciona información importante para el diagnóstico médico. Los tres tipos de células presentes en la sangre son: eritrocitos (glóbulos rojos), leucocitos (glóbulos blancos) y trombocitos (plaquetas).

Entre las técnicas existentes para el análisis de estas células se encuentra el método manual o convencional y los equipos automatizados. A pesar de su utilidad, estos equipos representan un alto costo en mantenimiento y consumo de reactivos para los centros de diagnóstico, además, no permiten la observación celular. Para ayudar a solucionar parte de este problema, se hizo una revisión del estado del arte de las técnicas de procesamiento digital de imágenes utilizadas en microscopía, para aplicarlas en la detección de eritrocitos, ya que éstos, en conjunto con la hemoglobina y el hematócrito, se utilizan para diagnosticar normalidad, anemia o policitemia en pacientes. Se presentan los algoritmos encontrados en la literatura, y el método propuesto a partir de las técnicas seleccionadas para finalmente llegar a la detección y conteo de eritrocitos.

## *Índice de Términos*—

Detección, Glóbulos Rojos, hematología, Procesamiento digital de Imágenes.

## I. INTRODUCCIÓN

El proceso de conteo celular sanguíneo (hemograma), se realiza de forma automática mediante equipos que funcionan bajo los principios de Impedancia Eléctrica [1] ó Citometría de Flujo [2]. Estos equipos se encuentran calibrados de acuerdo a un rango de indicadores normales establecidos por el fabricante. Cuando el conteo se encuentra fuera de dicho rango, el especialista debe recurrir a la observación bajo microscopio, para verificar el estado de las células, por lo cual requiere invertir más tiempo y esfuerzo.

La observación bajo microscopio se realiza a partir de un frotis de sangre periférica [3]. El frotis proporciona información acerca del número y la forma de las células sanguíneas y constituye un complemento del hemograma, en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la mayoría de las enfermedades hematológicas. Este proceso depende de la habilidad del especialista y puede ser agotador debido a la gran demanda de hemogramas diarios en los centros clínicos.

El tratamiento digital de imágenes constituye una opción para dar soporte al proceso de lectura visual y apoyar así el diagnóstico por parte del especialista. En los últimos 20 años varios grupos investigadores se han enfocado en el desarrollo de sistemas computarizados, que puedan analizar imágenes médicas con el fin de extraer información útil al médico profesional [4].

De acuerdo con la revisión del estado del arte realizada en esta investigación, se determinaron las técnicas más adecuadas con el fin de proponer un algoritmo que permita realizar la detección de glóbulos rojos en imágenes de células sanguíneas.

## II. REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

Para llegar hasta una adecuada segmentación se hace necesario abarcar las primeras etapas del procesamiento digital de imágenes: Adquisición, Preprocesamiento y Segmentación [5]

### A. Preprocesamiento

En las imágenes microscópicas son frecuentes los siguientes defectos:

- Imágenes ruidosas.
- Iluminación no uniforme.

- Insuficiente iluminación en las esquinas [6].

Una técnica común para mejorar la imagen son los filtros, dentro de esta investigación se encontró que el más utilizado para reducir el ruido es el filtro de la mediana [7-12]. Este filtro es una técnica no lineal, en donde la mediana es calculada, clasificando primero todos los valores de los píxeles de las vecindades cercanas en orden numérico [12]. En [13] se menciona el uso del filtro kuwahara para realizar el preprocesamiento.

En esta etapa es importante definir el modelo de color. En [14] se afirma que la representación en escala de grises es la más adecuada dada la variación cromática que se presenta en el frotis. En [13] el autor utiliza el modelo de color HSI, con el cual se mejora la robustez contra fluctuaciones de la tinción e iluminación, logrando en todas las imágenes el mismo color y brillo.

### **B. Segmentación**

La segmentación es un área activa de investigación en análisis de imágenes médicas [14]. Entre los métodos y técnicas que existen, cabe mencionar: umbralización, detección de bordes, clustering k-means, y crecimiento de regiones. En la figura 1(a) se resumen las técnicas de segmentación utilizadas en los últimos 11 años, específicamente para el tratamiento digital de imágenes microscópicas de células sanguíneas.

Una de las técnicas que ha mantenido su uso ha sido la *umbralización*. Su objetivo es extraer un objeto del fondo basado en la distribución de los niveles de grises. Aunque ha sido una de las técnicas más utilizadas [7]-[12]-[13]-[15]-[16]-[17]-[18-23], algunos autores señalan deben ser combinadas con operaciones de morfología matemática para mejorar la segmentación [24].

La *Morfología Matemática* trabaja directamente sobre la escala de grises de la imagen y utiliza la información del tamaño de las células [4]-[7]-[10]-[11]-[12]-[13]-[15]-[17]-[18]-[19]-[22]-[26]-[27]. Esta técnica ofrece una fuerte herramienta para extraer componentes útiles en la representación y descripción de formas de una región tales como límites, estructuras y texturas [24]. En la actualidad ha sido utilizada en aplicaciones médicas para el

análisis de imágenes celulares [25].

Dentro de la segmentación de células también se considera la *Detección de Bordes*. El detector de bordes Canny es reconocido por su eficacia [26]. En la figura 1(a) se muestra el uso general de la técnica de detección de bordes en las investigaciones consultadas, en la figura 1(b) se especifica que el 70% de esas investigaciones han hecho uso del filtro canny [7]-[15]-[17]-[19]-[26]-[33]-[34], el 20% han usado el filtro laplaciano [12]-[17], y el 10% el filtro prewit [12].

El 87% de las investigaciones que exploraron el uso de transformadas (Fig.1(a) y Fig.1(c)) usaron la transformada watershed para solucionar el problema de la superposición de glóbulos rojos [4]-[12]-[15]-[17]-[19]-[20]-[21]-[23]-[27-32], mientras que el 13% usó la transformada Hough para detectar formas circulares de radio específico [7]-[29], sin embargo esta técnica no funciona en todos los casos ya que la forma de los glóbulos rojos no siempre es totalmente circular.

Algunos métodos de segmentación cuyo uso no fue tan frecuente encontrar, son el *k-means* y *level-set*. El método k-means [21]-[27], está basado en técnicas de clustering para segmentar todos los 3 tipos de células sanguíneas; en [27] este método arrojó buenos resultados, sin embargo los tiempos de procesamiento y análisis fueron altos. El método level-set fue utilizado en [13] para la segmentación de contornos de leucocitos.

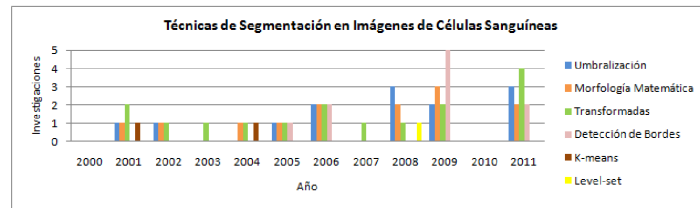
## **III. MÉTODO PROPUESTO**

### **A. Adquisición de la Imagen**

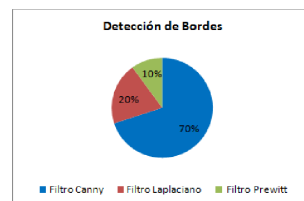
Se usó extendidos de sangre periférica teñidos con Wright y una cámara digital adaptada a un microscopio óptico.

- Referencia microscopio: Nikon eclipse 55i
- Referencia cámara: Cannon EOS REBELXS 1000D, aprox 10.10 megapíxeles efectivos, formato de imagen JPEG.

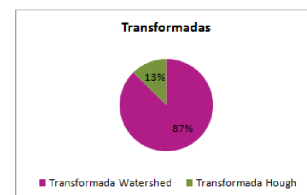
Se hicieron capturas a 40X y a 100X.



(a). Vista general técnicas de segmentación



(b). Ampliación Técnica Detección de Bordes.



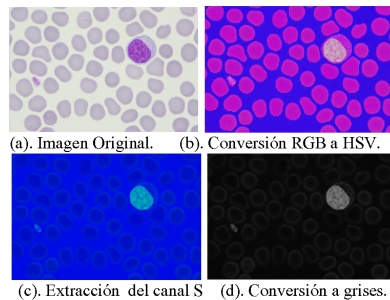
(c). Ampliación uso de Transformadas.

**Fig. 1.** Técnicas de Segmentación usadas en Imágenes de células sanguíneas.

### B. Preprocesamiento de Glóbulos Blancos y Plaquetas

Para esta investigación se usó Matlab 7.13 (R2011b). La imagen adquirida se convierte del modelo de color RGB al modelo HSV, se extrae el canal S por tener mayor contraste en la distribución del histograma. Así se facilita la segmentación.

Se realiza un filtrado sobre el canal S utilizando el filtro de la mediana para eliminar el ruido y suavizar la imagen. Finalmente se convierte la imagen a escala de grises para reducir el tiempo de cómputo y se determina la imagen complemento para resaltar con altas intensidades los objetos de interés, frente al fondo con bajas intensidades (Fig.2).



**Fig. 2.** Preprocesamiento de Glóbulos Blancos y Plaquetas

### C. Segmentación de Glóbulos Blancos y Plaquetas.

Con los resultados obtenidos en el preprocesamiento se procede a realizar la segmentación para separar y agrupar los elementos. Con un ajuste del histograma se resaltan los objetos de mayor intensidad como núcleos y plaquetas (Fig.3).



**Fig. 3.** Ajuste del histograma.

Se filtran las plaquetas y posibles residuos pequeños con morfología matemática: un elemento estructural tipo disco y una operación de apertura (Fig.4).



**Fig. 4.** Núcleos de los glóbulos blancos

Una vez agrupados los núcleos, se procede a definir sus contornos con el uso del filtro canny. La figura 5 se encuentra ampliada para observar de mejor forma los resultados.



Fig. 5. Detector de Bordes Canny

La segmentación de los glóbulos blancos finaliza con una dilatación morfológica, para esto se define un elemento estructurante tipo disco con el fin de dilatar los núcleos y así eliminar parte del citoplasma que los contiene (Fig. 6).

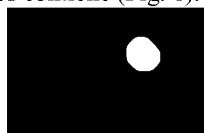
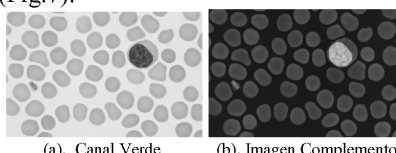


Fig. 6. Dilatación morfológica.

#### D. Preprocesamiento de Glóbulos Rojos

Para los glóbulos rojos se trabaja en el modelo de color RGB de la imagen original y se extrae el canal verde por ser el que mejor contraste ofrece para observar este tipo de células. Sobre este canal, se aplica el filtro de la mediana para realizar el suavizado y se halla el complemento de la imagen para obtener altas intensidades en las células de interés (Fig.7).



(a). Canal Verde (b). Imagen Complemento  
Fig. 7. Preprocesamiento de Glóbulos Rojos

Se realiza una apertura morfológica sobre toda la imagen con el fin de extraer una máscara aproximada del fondo. Sustrayendo dicho fondo de la Fig 7(b) se mejora la iluminación (Fig.8).

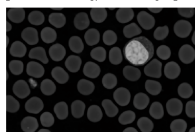


Fig. 8. Corrección de la iluminación.

#### E. Segmentación de Glóbulos Rojos

A partir de la imagen obtenida en el preprocesamiento anterior, se da paso a la detección de los glóbulos rojos. Se inicia con un ajuste del histograma para eliminar intensidades menores a la intensidad presente en los glóbulos rojos (Fig.9).

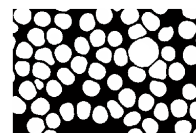


Fig. 9. Ajuste del histograma

Después se procede a eliminar todos los elementos que no son glóbulos rojos. Para esto se realiza una resta binaria entre las imágenes de la figura 9 y 6, logrando así eliminar los núcleos (Fig.10).

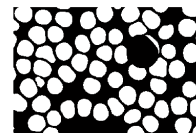


Fig. 10. Remoción de núcleos de glóbulos blancos

Se procede a realizar la detección de los citoplasmas con ayuda de una apertura morfológica y un elemento estructurante tipo disco (Fig.11). Con una resta binaria sobre la imagen de las figuras 10 y 11 se realiza la remoción de citoplasmas de glóbulos blancos (Fig.12).

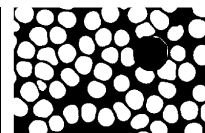


Fig. 11. Detección citoplasmas. Fig. 12. Remoción de citoplasmas

En esta etapa aún es posible que queden pequeños residuos de citoplasma, cúmulos de plaquetas y pequeños huecos dentro de los glóbulos rojos. Aplicando morfología matemática se corrigen estos detalles: con un cierre morfológico se rellenan los centros que quedan dentro de los glóbulos rojos y con esto se facilita la detección de bordes; con una apertura morfológica se eliminan los elementos pequeños (Fig.13).

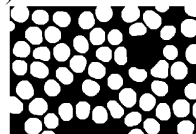


Fig. 13. Remoción de plaquetas y elementos pequeños.

Finalmente se realiza el conteo de los glóbulos rojos detectados, esto se logra realizando la detección de cada región blanca como una célula. (Fig.14).

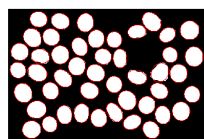


Fig. 14. Conteo de Glóbulos Rojos

#### IV. PRUEBAS

Se seleccionaron 10 imágenes de diferentes placas a diferente aumento (40X y 100X).

El método propuesto posee una sensibilidad máxima, esto indica que las células que fueron identificadas como glóbulos rojos, realmente lo eran. La especificidad de 0,9233 representa que en algunos casos no se detectó la totalidad de los glóbulos rojos presentes.

| Aumento | Muestra    | Verdaderos + | Verdaderos - | Falsos + | Falsos - |
|---------|------------|--------------|--------------|----------|----------|
| 40X     | Muestra 1  | 173          | 11           | 0        | 32       |
|         | Muestra 2  | 243          | 21           | 0        | 6        |
|         | Muestra 3  | 260          | 10           | 0        | 7        |
|         | Muestra 4  | 242          | 12           | 0        | 18       |
|         | Muestra 5  | 251          | 14           | 0        | 0        |
| 100X    | Muestra 6  | 22           | 3            | 0        | 16       |
|         | Muestra 7  | 19           | 1            | 0        | 10       |
|         | Muestra 8  | 16           | 3            | 0        | 17       |
|         | Muestra 9  | 46           | 2            | 0        | 1        |
|         | Muestra 10 | 28           | 2            | 0        | 1        |
|         | Total      | 1300         | 79           | 0        | 108      |

(a). Indicadores de Conteo de Glóbulos Rojos

|               |        |
|---------------|--------|
| Especificidad | 0.9233 |
| Sensibilidad  | 1      |

(a). Índices de Especificidad y Sensibilidad

Fig. 16. Análisis de Resultados.

#### V. CONCLUSIONES

Con la realización de esta investigación y las pruebas realizadas se encontró que no existe un único método efectivo en la segmentación de células sanguíneas, ya que los métodos más complejos requieren mayor tiempo computacional tal y como se encuentra referenciado en la literatura, y en cuanto a los métodos rápidos se encontró que deben ser combinados entre sí para obtener el resultado deseado.

Las condiciones de captura de las imágenes microscópicas determinan la complejidad en el preprocesamiento. Para este trabajo la no existencia de una base de datos de imágenes estándar hizo necesario llevar a cabo este proceso por parte de los autores. Se recomienda la creación de una base de

datos de imágenes hematológicas estándar y de libre uso para efectos de pruebas en esta área.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores dan sus agradecimientos al Ing. Andrés Gómez cuya experiencia en el área de diagnóstico dio origen a este trabajo. A los especialistas en hematología: Dr. Ernesto Rueda y al Dr. Nelson Daza pertenecientes al Departamento de Oncología y al Banco de Sangre de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander; de igual forma al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados y el Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica del campus principal de la Universidad Industrial de Santander.

#### REFERENCIAS

- [1] B. J. Ford, "From Dilettante to Diligent Experimenter, a Reappraisal of Leeuwenhoek as microscopist and investigator", *Biology History*, December 1992.
- [2] CELL-DYN Sapphire TM,56-0304/R1, "Manual de operaciones del sistema", Abbott Laboratories, Junio 2005.
- [3] J. Pérez, D. Gómez, "Hematología: La sangre y sus enfermedades", 1st Ed, Mc Graw Hill, 2005.
- [4] R. Adollah, M.Y. Mashor, N.F. Mohd Nasir, H. Rosline, H. Mahsin, H. Adilah, "Blood Cell Image Segmentation: A Review", *4th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering*, vol. 21, pp. 141-144, 2008.
- [5] R. Gonzalez, "Digital image Processing", 2nd ed, New Jersey, Prentice Hall, 2002.
- [6] E. A. Silva, "Detección de cáncer de cuello uterino usando técnicas de procesamiento y análisis de imágenes microscópicas", Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander, 2006.
- [7] G.P. M. Priyankara, O.W. Seneviratne, R.K.O.H Silva, W.V.D Soysa and C. R. D. Silva, "An Extensible Computer Vision Application for Blood Cell Recognition and Analysis", 2006.
- [8] V.V.Kimbahune, Mr. N. J. Uke, "Red Blood Cell Image Segmentation and counting", *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2011.
- [9] H. Berge, D. Taylor, S. Krishnan, T.S. Douglas, "Improved red blood cell counting in thin blood smears", *International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, IEEE*, pp.204-207, March 30 2011-April 2 2011.
- [10] C. D. Ruberto, A. Dempster, S. Khan, and B. Jarra, "Morphological Image Processing for Evaluating Malaria Disease", *IWVF*, pages 739-748, 2001.
- [11] C. D. Ruberto, A. Dempster, S. Khan, and B. Jarra, "Analysis of infected blood cell images using



- morphological operators”, *Image Vis. Computing*, vol. 20, pp. 133–146, 2002.
- [12] S. S. Savkare, S. P. Narote, “Automatic Classification of Normal and Infected Blood Cells for Parasitemia Detection”, *International Journal of Computer Science and Network Security*, vol.11 No.2, February 2011.
- [13] T. Bergen, D. Steckhan, T. Wittenberg, T. Zerfass, “Segmentation of leukocytes and erythrocytes in blood smear images”, *Engineering in Medicine and Biology Society, 30th Annual International Conference of the IEEE*, pp.3075-3078, 20-25 Aug. 2008.
- [14] N. T. Nguyen, A. D. Duong, H. Q. Vu, “A New Method for Splitting Cuple cells in Red Blood Images” *Second International Conference on Knowledge and Systems Engineering*, pp.3-8, 7-9 Oct. 2010.
- [15] J. Rojas, “Segmentación y reconocimiento de patrones en imágenes de histología”, octubre 2005.
- [16] B. F. Buxton, H. Abdallahi, D. Fernandez, W. Jarra “Development of an Extension of the Otsu Algorithm for Multidimensional Image Segmentation of Thin-film Blood Slides” *IEEE International Conference on Computing: Theory and Applications*, 2007.
- [17] Zhen Ma, J. M. R. S. Tavares, R. M. Natal Jorge, “A review on the current segmentation algorithms for medical images”, *1st International Conference on Imaging Theory and Applications*, Lisboa Portugal, pp. 135-140, 2009.
- [18] N.E. Ross, C.J. Pritchard, D.M. Rubin, A.G. Dusé, “Automated image processing method for the diagnosis and classification of malaria on thin blood smears”, *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol 44, pp. 427–436, 2006.
- [19] V. Špringl, “Automatic Malaria Diagnosis through Microscopy Imaging”, Thesis, Prague, 2009.
- [20] J. Serra, J. Angulo, “Aplicación de la morfología matemática aplicada a la telemedicina y la biotecnología: caracterización morfológica de células de sangre y análisis de cDNA microarrays”, 2002.
- [21] K. Kim, J. Jeon, W. Choi, P. Kim and Y. Ho, “Automatic Cell Classification in Human’s Peripheral Blood Images Based on Morphological Image Processing”, *Advances in Artificial Intelligence*, vol. 2256, pp.165-178, 2001.
- [22] S.Kareem, R.C.S Morling and I.Kale, “A Novel Method to Count the Red Blood Cells in Thin Blood Films”, *IEEE International Symposium on Circuits and Systems*, pp.1021-1024, 15-18 May 2011.
- [23] Y. Karunakar, Dr. A. Kuwadekar, “An unparagoned application for Red Blood Cell Counting using Marker Controlled Watershed Algorithm for Android Mobile”, *5th International Conference on Next Generation Mobile Applications, Services and Technologies*, pp.100-104, 14-16 Sept. 2011.
- [24] C. D. Ruberto, A. Dempster, S. Khan, and B. Jarra, “Segmentation of blood images using morphological operators”, *15th International Conference on Pattern Recognition*, vol.3, pp.397-400, 2000.
- [25] S. Chen, M. Zhao, G. Wu, C. Yao, and J. Zhang, “Recent Advances in Morphological Cell Image Analysis”, *Computational and Mathematical Methods in Medicine Volume 2012*, 10 pages, 2012.
- [26] J. J. Moreira y P.V. Valencia, “Implementación de un algoritmo para la detección y conteo de células en imágenes microscópicas”, Tesis de grado, ESPOL Ecuador, 2009.
- [27] C. Zambrano, F. Correa, P. Fierro, L. Pencue, M. Patino, J. Leon, “Digital analysis of microscopic images of blood cells for pathological diagnostics”, Tesis de grado Unicauca, 2004.
- [28] L. B. Dorini, R. Minetto, N. J. Leite, “White blood cell segmentation using morphological operators and scale-space analysis”, *XX Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing*, pp.294-304, 7-10 Oct, 2007.
- [29] P. P. Guan, H. Yan, “Blood cell image segmentation based on the Hough transform and fuzzy curve tracing”, *International Conference on Machine Learning and Cybernetics*, vol.4, pp.1696-1701, 10-13 July 2011.
- [30] K. Jiang, QM. Liao, SY. Dai, “A novel white blood cell segmentation scheme using scale-space filtering and watershed clustering”, *International Conference on Machine Learning and Cybernetics*, vol.5, pp. 2820- 2825 Vol.5, 2-5 Nov. 2003.
- [31] F. Boray Tek, Andrew G. Dempster and Izzet Kale, “Malaria Parasite Detection in Peripheral Blood Images”, 2006.
- [32] F. B. Tek, A. G. Dempster, and I. Kale, “Blood cell segmentation using minimum area watershed and circle radon transformations”, In *Proc. Int. Symp. on Mathematical Morphology*, vol.1, pages 739–752, April 2005.
- [33] J. Vromen, B. McCane, “Red blood cell segmentation using guided contour tracing”, *18th Annual Colloquium of the Spatial Information Research Centre*, 2006.
- [34] J. Cheng, R. Xue, W. Lu, R. Jia, “Segmentation of medical images with Canny operator and GVF snake model”, *7th World Congress on Intelligent Control and Automation*, pp.1777-1780, 25-27 June 2008.



Imágenes.



Computación gráfica y Simulación Digital.



Industrial de Santander. Sus áreas de interés son Procesamiento Digital de Señales, Procesamiento Digital de Imágenes y Minería de Datos.

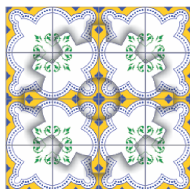
■ ***CONEM 2012: VII Congreso Nacional de Ingeniería Mecánica***

*Título del Artículo:* Detección de Glóbulos Rojos en una Placa Virtual de Sangre Periférica.

*Modalidad:* Aceptación del Artículo. Actualmente en espera de confirmación de la modalidad

*Autores:* Lizeth Castellanos, Luis Hasbón, Lina Garcés y Lola Butista.

*Ciudad y fecha:* São Luis, Maranhão, Brasil, 31 julio-2 de agosto del 2012.



CONEM 2012 «Engenharia em destaque»  
VII Congresso Nacional de Engenharia Mecânica  
São Luís - Maranhão - Brasil  
31 de julho a 03 de agosto  
www.abcm.org.br/conem2012

## DETECCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS EN UNA PLACA VIRTUAL DE SANGRE PERIFÉRICA.

Lizeth Castellanos<sup>1</sup>, castellanoslizan@gmail.com  
Luis Hasbón<sup>1</sup>, luishasbon@gmail.com  
Lina Garcés<sup>1</sup>, lng.linagarcés@gmail.com  
Lola Bautista<sup>1</sup>, lxbautis@uis.edu.co

<sup>1</sup>Universidad Industrial de Santander, Cra 27 calle 9, Escuela de Ingeniería de Sistemas, Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica GIIIB, Of 338 pbx: (57)(7) 6344000 ext 2476, Bucaramanga Colombia.

**Resumen:** La biometría hemática es uno de los estudios que con más frecuencia se solicita al laboratorio, tanto en los pacientes ambulatorios como en los hospitalizados; asimismo, es el primer examen al que se enfrenta el especialista en la valoración diagnóstica de un paciente. Aunque se considera como un solo examen de laboratorio, en realidad valora tres líneas celulares: serie roja, serie blanca y plaquetas. El análisis de la serie roja involucra el conteo celular como proceso importante previo al diagnóstico de enfermedades sanguíneas. Existen equipos automatizados que brindan soporte a este proceso, sin embargo no permiten la observación de la morfología celular, por esta razón para emitir un diagnóstico acertado, el especialista debe complementar el análisis del equipo con la inspección visual de las células a través de un frotis de sangre periférica. El objetivo de este trabajo es realizar la detección de glóbulos rojos y dar soporte al proceso de lectura de la placa, para esto, se capturan imágenes parciales de la región óptima donde se suele realizar la observación. A partir de estas imágenes se se procede a realizar la detección y conteo de glóbulos rojos utilizando técnicas de procesamiento digital de imágenes y finalmente se obtiene una placa virtual de la imagen completa de la región utilizando algoritmos de reconstrucción.

**Palabras-clave:** Glóbulos Rojos, Morfología, Placa Virtual, Procesamiento de imágenes, Sangre periférica.

### 1. INTRODUCCIÓN

El proceso de conteo celular sanguíneo (hemograma), se realiza de forma automática mediante equipos que funcionan bajo los principios de Impedancia Eléctrica Ford (1992), ó Citometría de Flujo CELL-DYN (2005). Estos equipos se encuentran calibrados de acuerdo a un rango de indicadores normales establecidos por el fabricante. Cuando el conteo se encuentra fuera de dicho rango, el especialista debe recurrir a la observación bajo microscopio, para verificar el estado de las células, por lo cual se requiere invertir más tiempo y esfuerzo.

La observación bajo microscopio se realiza a partir de un frotis de sangre periférica Pérez (2005). Este examen proporciona información acerca del número y la forma de las células sanguíneas a través de la observación de un extendido sanguíneo por parte de un especialista. Asimismo, constituye un complemento muy útil del hemograma, pues apoya el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la mayoría de las enfermedades hematológicas. Este proceso depende de la habilidad del especialista y puede ser agotador debido a la gran demanda de hemogramas diarios en los centros clínicos de Colombia.

El tratamiento digital de imágenes constituye una opción para dar soporte al proceso de lectura visual y apoyar así el diagnóstico por parte del especialista. En los últimos 20 años varios grupos de investigadores se han enfocado en el desarrollo de sistemas computarizados, que puedan analizar diferentes tipos de imágenes médicas con el fin de extraer información útil al médico profesional Adollah et al (2008). Existen estudios orientados a la detección de células sanguíneas Bergen et al (2008), Priyankara et al (2007) y casos documentados en donde aún es necesario la observación por microscopio Bain (2005).

### 2. PROBLEMÁTICA

A pesar de su utilidad, los equipos de conteo automático representan un alto costo en mantenimiento y consumo de reactivos para centros de diagnóstico en zonas apartadas de Colombia, y no permiten el análisis visual de las células. Para este análisis es necesario realizar un extendido de sangre periférica Muñoz et al (2005) donde se analiza la morfología celular; el esfuerzo y tiempo invertido por un especialista en este proceso es agotador y puede llevar a

errores, pero es necesario cuando se desea verificar los resultados de un equipo que presenta alarmas, o se desconfía de sus resultados.

Debido a la condición geográfica de Colombia, son frecuentes los casos de enfermedades tropicales como la malaria en zonas apartadas del país; la falta de especialistas y equipos adecuados en estos lugares, y los tipos de análisis que requieren estas enfermedades, llevan a que los extendidos de sangre periférica sean enviados a laboratorios especializados en las ciudades principales, generando allí, una carga laboral para los especialistas, aumentando la posibilidad del error humano, y disminuyendo la calidad de los resultados.

Además de lo anterior, al enviar los extendidos desde lugares remotos del país, recorren grandes distancias antes de llegar a los laboratorios, ocasionando un retraso en el diagnóstico y tratamiento del paciente y se exponen a daños físicos que alteran los resultados de los análisis.

### 3. METODOLOGÍA

En el desarrollo de este trabajo se hace uso de técnicas para el tratamiento digital de imágenes González et al (2004) y se hace uso especial de las técnicas que han sido utilizadas en imágenes de histología Rojas (2005). El tratamiento digital de imágenes es un campo de investigación relacionado con la computación que nace del interés por mejorar la cantidad y calidad de la información que transmite una imagen para una adecuada interpretación de ésta; y a su vez, el procesamiento de los datos de la imagen, para su transmisión, almacenamiento y representación por parte de sistemas especializados González (2002).

La metodología propuesta está dividida en cuatro etapas orientadas a los procesos principales que se realizaron en este trabajo; adquisición de las imágenes, preprocesamiento, segmentación, conteo de glóbulos rojos y pruebas del algoritmo Fig.(1) y una etapa de reconstrucción placa virtual Fig.(17). Se presenta un enfoque mixto, en principio cualitativo en las etapas de adquisición y parte del preprocesamiento y en etapas posteriores de carácter cuantitativo como es en la segmentación y análisis de resultados.

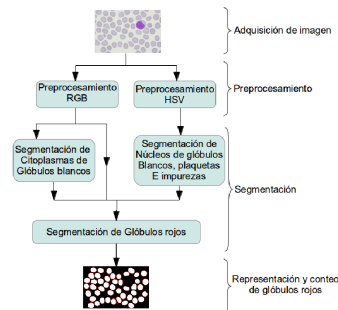


Figura 1. Diagrama de Proceso de Segmentación de Glóbulos Rojos

#### 3.1. Adquisición de la Imagen

Las imágenes fueron adquiridas a partir de extendidos de sangre periférica humana tinturadas previamente con Wright, dichas muestras fueron facilitadas por el banco de sangre del Hospital Universitario de Santander. La captura de las imágenes se realizó en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander, con una cámara profesional adaptada a un microscopio óptico utilizando un aumento de 40 y 100x sobre el objetivo, luz artificial y una conexión por interfaz USB a un computador con software especializado Fig.(2).

- Referencia microscopio: Nikon eclipse 55i
- Referencia cámara: Cannon EOS REBELXS 1000D.



Figura 2. Montaje para la Adquisición de Imágenes

### 3.2. Preprocesamiento y Segmentación.

El objetivo inicial del preprocesamiento es mejorar la calidad de la imagen adquirida. Esta etapa es necesaria debido a que en las imágenes microscópicas es frecuentes encontrar defectos como: Imágenes ruidosas, Iluminación no uniforme, variaciones en la intensidad causadas por las condiciones de tintura Silva (2006).

En computación visual, la segmentación se refiere al proceso de particionar una imagen digital dentro de múltiples regiones. Su objetivo es simplificar y/o cambiar la representación de la imagen en algo más significativo y fácil de analizar Adollah et al (2008). En estas dos etapas se usó Matlab 7.13 (R2011b) y el Toolbox de procesamiento de imágenes The Mathworks Inc (1998).

#### 3.2.1. Preprocesamiento de Glóbulos Blancos y Plaquetas.

Dentro de las imágenes capturadas se encontraron aberraciones cromáticas, como puntos negros, manchas y suciedad, así como el ruido originado por los glóbulos blancos, las plaquetas y la variación en la iluminación debido a la técnica de tinción usada en cada placa.

La imagen adquirida se convierte del modelo de color RGB al modelo HSV, se extrae el canal S por tener mayor contraste en la distribución del histograma y de esta forma se logra resaltar las impurezas antes mencionadas debido a que estas presentan los colores con mayor saturación en el canal S. Así se facilita la segmentación.

Se realiza un filtrado sobre el canal S utilizando el filtro de la mediana para eliminar parte del ruido de la imagen original y suavizarla. Finalmente después de realizar esta mejora, se convierte la imagen a escala de grises para reducir el tiempo de cómputo en la segmentación, y se determina la imagen complemento para resaltar con altas intensidades los objetos de interés, frente al fondo con bajas intensidades Fig.(3).

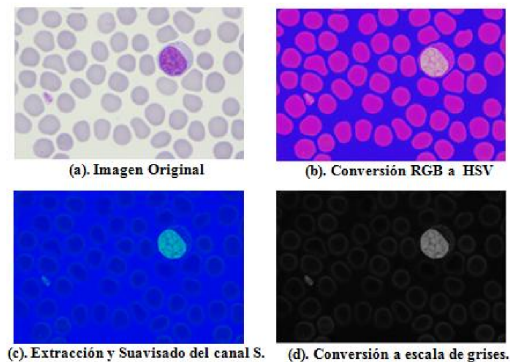


Figura 3. Preprocesamiento de Glóbulos Blancos y Plaquetas

#### 3.2.2. Segmentación de Glóbulos Blancos y Plaquetas.

Con los resultados obtenidos en el preprocesamiento se procede a realizar la segmentación para separar y agrupar los elementos en el siguiente orden: primero los elementos de mayor intensidad como núcleos de glóbulos blancos y plaquetas para después los de menor intensidad como citoplasmas de glóbulos blancos y los glóbulos rojos. Con un ajuste del histograma se resaltan los objetos de mayor intensidad como núcleos y plaquetas Fig.(4).

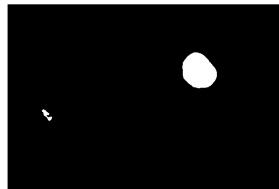
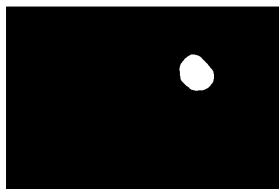


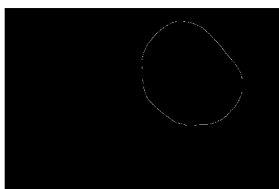
Figura 4. Ajuste del histograma.

Con morfología matemática se filtran las plaquetas y posibles residuos pequeños, para esto se define un elemento estructurante de tipo disco y se realiza una apertura sobre la imagen binaria de la figura 4. El tamaño del elemento estructurante se encuentra en función del aumento que está definido como entrada del usuario (puede ser de 40X ó 100X) y la resolución de la imagen Fig.(5).



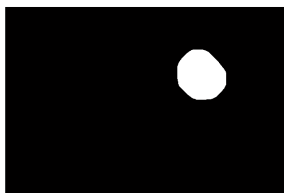
**Figura 5. Núcleos de los glóbulos blancos**

Una vez agrupados los núcleos, se procede a definir sus contornos, mediante detección de bordes con el uso del filtro canny. La figura 6 se encuentra ampliada para observar de mejor forma los resultados.



**Figura 6. Detector de Bordes Canny**

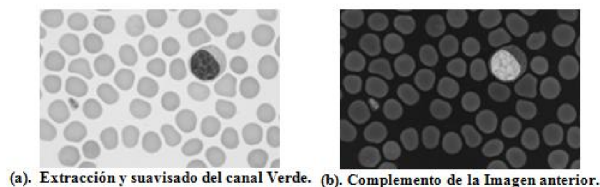
La segmentación de los glóbulos blancos finaliza con una dilatación morfológica, para esto se define un elemento estructurante tipo disco con el fin de dilatar los núcleos y así eliminar parte del citoplasma que los contiene Fig.(7).



**Figura 7. Dilatación morfológica.**

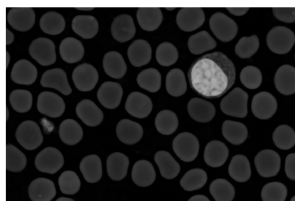
### **3.2.3. Preprocesamiento de Glóbulos Rojos.**

Para los glóbulos rojos se trabaja en el modelo de color RGB de la imagen original y se extrae el canal verde por ser el que mejor contraste ofrece para observar este tipo de células. Una vez extraído el canal verde, se aplica el filtro de la mediana para realizar el suavizado y se halla el complemento de la imagen para obtener altas intensidades en las células de interés Fig.(8).



**Figura 8. Preprocesamiento de Glóbulos Rojos.**

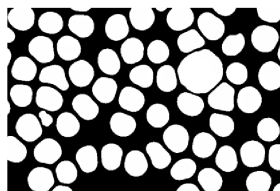
Se realiza una apertura morfológica sobre toda la imagen con el fin de extraer una máscara aproximada del fondo. Sustrayendo dicho fondo de la Fig.8(b) se mejora la iluminación Fig.(9).



**Figura 9. Corrección de la iluminación.**

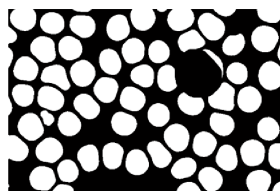
### 3.2.4. Segmentación de Glóbulos Rojos.

A partir de la imagen obtenida en el preprocesamiento anterior, se da paso a la detección de los glóbulos rojos. Sin embargo la identificación de glóbulos blancos y plaquetas en el proceso inicial también representa información útil para obtener una adecuada segmentación en esta etapa. Se inicia con un ajuste del histograma para eliminar intensidades menores a la intensidad presente en los glóbulos rojos Fig.(10).



**Figura 10. Ajuste del histograma**

Después se procede a eliminar todos los elementos que no son glóbulos rojos. Para esto se realiza una resta binaria entre las imágenes de la figura 10 y 7, logrando así eliminar los núcleos de los glóbulos blancos Fig.(11).



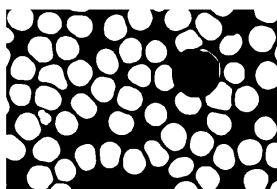
**Figura 11. Remoción de núcleos de glóbulos blancos**

Como se observa en la figura 11, aun quedan restos de los citoplasmas de los glóbulos blancos así que se procede a realizar la detección de los citoplasmas con ayuda de una apertura morfológica y un elemento estructurante tipo disco

Fig.(12). Después se realiza la remoción de los citoplasmas mediante una resta binaria, que en este caso sería sobre la imagen de las figuras 11 y 12. Fig.(13).

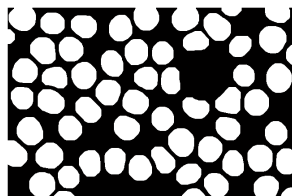


**Figura 12. Detección citoplasmas de glóbulos blancos.**



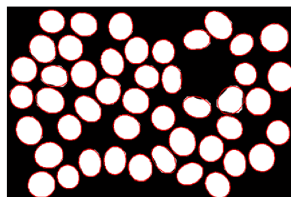
**Figura 13. Remoción de citoplasmas**

En esta etapa aún es posible que queden pequeños residuos de citoplasma y cúmulos de plaquetas, además de pequeños huecos dentro de los glóbulos rojos. Aplicando morfología matemática se corrigen estos detalles: mediante un cierre morfológico se rellenan los centros que quedan dentro de los glóbulos rojos y con esto se facilita la detección de bordes; con una apertura morfológica se eliminan los elementos pequeños Fig.(14).



**Figura 14. Remoción de plaquetas y elementos pequeños.**

Para efectos de las pruebas de especificidad y sensibilidad del algoritmo se realiza el conteo de los glóbulos rojos detectados, esto se logra tomando cada región como una célula y realizando la detección de las mismas Fig.(15).



**Figura 15. Conteo de Glóbulos Rojos**

Algunas veces se presenta un inconveniente que puede modificar los resultados en el conteo: la superposición de glóbulos rojos, la cual puede variar dependiendo de la región de la placa en la cual se haya realizado la captura. Una forma de abordar este problema es a partir de la Transformada Watershed. En Matlab se encuentra implementada una función que permite el uso de esta transformada



Se presentan los resultados visuales del uso de esta transformada en los cuales se evidencian el problema de la sobresegmentación, generando falsas divisiones por lo tanto para la fase de conteo no se tuvo en cuenta el uso de esta transformada Fig.(16).

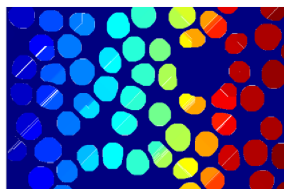


Figura 16. Transformada Watershed sobre glóbulos rojos.

### 3.3. Análisis de Resultados

Para las pruebas del algoritmo de detección se seleccionaron 10 imágenes de diferentes placas a diferente aumento (40X y 100X) y teniendo en cuenta que representaran los tres tipos de células. Los cálculos de los índices de especificidad y sensibilidad se muestran a continuación.

Tabla 1. Resultados de la detección y conteo de glóbulos rojos. Valores obtenidos con 10 muestras.

| Aumento | Muestra      | Verdaderos+ | Verdaderos - | Falsos + | Falsos -   |
|---------|--------------|-------------|--------------|----------|------------|
| 40X     | Muestra 1    | 173         | 11           | 0        | 32         |
|         | Muestra 2    | 243         | 21           | 0        | 6          |
|         | Muestra 3    | 260         | 10           | 0        | 7          |
|         | Muestra 4    | 242         | 12           | 0        | 18         |
|         | Muestra 5    | 251         | 14           | 0        | 0          |
| 100X    | Muestra 6    | 22          | 3            | 0        | 16         |
|         | Muestra 7    | 19          | 1            | 0        | 10         |
|         | Muestra 8    | 16          | 3            | 0        | 17         |
|         | Muestra 9    | 46          | 2            | 0        | 1          |
|         | Muestra 10   | 28          | 2            | 0        | 1          |
|         | <b>Total</b> | <b>1300</b> | <b>79</b>    | <b>0</b> | <b>108</b> |

|                      |        |
|----------------------|--------|
| <b>Sensibilidad</b>  | 0,9233 |
| <b>Especificidad</b> | 1      |

El método propuesto posee una especificidad máxima, esto indica que las células que fueron identificadas como glóbulos rojos, realmente lo eran. La sensibilidad de 0,9233 representa que en algunos casos no se detectó la totalidad de los glóbulos rojos presentes. Se recomienda la creación de una base de datos de imágenes hematológicas estándar y de libre uso para efectos de pruebas en esta área con el fin de permitir comparar los resultados obtenidos con otros métodos.

### 3.4. Placa Virtual

Una vez diseñado el algoritmo de preprocesamiento y segmentación, se realizan pruebas sobre una región más amplia de la placa, para esto es necesario tener una imagen completa de la región a analizar. A partir del algoritmo Bay et al (2008), implementado en java para este trabajo junto con una modificación del mismo utilizando alineamiento de descriptores sobre la imagen y Stitching Szeliski (2006); realizada por miembros de Biosys Ltda (Spin-off del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica de la Universidad Industrial de Santander), y la base de imágenes recolectada durante la etapa de captura, se logra construir una imagen total de la región analizada. Esta imagen reconstruida se encuentra disponible en <http://biomedica.uis.edu.co/rojos/>

Se puede considerar esta imagen reconstruida como una representación virtual de la información contenida en una zona efectiva de la placa; una ventaja que tiene esta forma de almacenar la información del extendido es la facilidad para analizar y observar su contenido sin exponerlo a un daño físico y disminución de la calidad de la información, también presenta una ventaja al facilitar su difusión, acelerando el proceso de análisis por parte de especialistas que se encuentren en otras locaciones por medio de la internet. Permite también conocer la información de la placa sin la

necesidad de acceder directamente al medio físico, por lo que se reduce el impacto de manipulación sobre la muestra, hecho que permite realizar un mayor número de análisis por parte de distintos especialistas.

Debido a imperfecciones en el movimiento de la placa al realizar el barrido y captura de las imágenes en el microscopio, es necesario hacer un recorte del área total de la reconstrucción para entregar una imagen adecuada sin secciones que no contengan información verdadera de los objetos en la imagen.

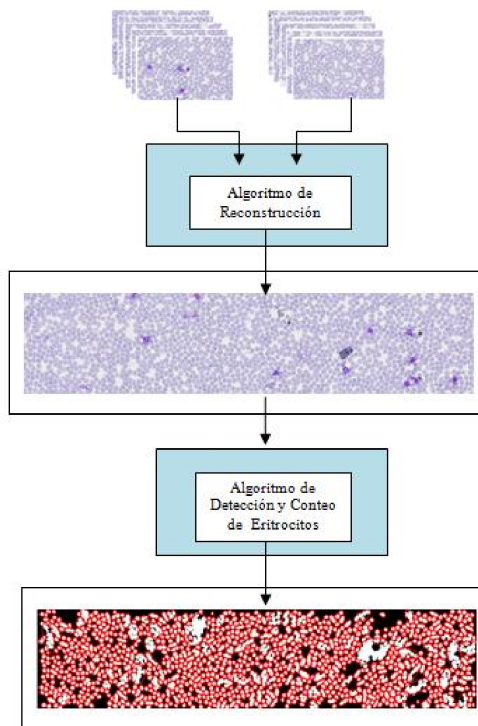


Figura 17. Detección y Conteo de Eritrocitos en una Placa Virtual

#### 4. CONCLUSIONES

Las condiciones de captura de las imágenes microscópicas determinan la complejidad en el preprocesamiento y la segmentación. Para este trabajo la no existencia de una base de datos de imágenes estándar hizo necesario llevar a cabo este proceso por parte de los autores. Se recomienda la creación de una base de datos de imágenes hematológicas estándar y de libre uso para efectos de pruebas en esta área.

El número de glóbulos superpuestos depende de la región de la placa en la cual se haya realizado la captura y está directamente relacionado con la técnica de tinción usada en el frotis. Dado que el proceso de tinción es realizado de forma manual, constituye un fenómeno difícil de cuantificar dentro de los alcances de esta investigación.

El uso combinado de técnicas de procesamiento digital de imágenes junto con el uso de algoritmos de reconstrucción ofrece una visión de campo mayor en la placa sanguínea que el apreciado bajo microscopio. Esto se puede observar en una placa virtual lo cual facilita la observación por parte del especialista a la hora de emitir un diagnóstico y facilita la disponibilidad de la imagen virtual de la placa, permitiendo así que otros especialistas puedan consultarla independientemente de la ubicación geográfica.

## 5. AGRADECIMENTOS

Los autores dan sus agradecimientos al Ing. Andrés Gómez cuya experiencia en el área de diagnóstico dió origen a este trabajo. A los especialistas en hematología: Dr. Ernesto Rueda y al Dr. Nelson Daza pertenecientes al Departamento de Oncología y al Banco de Sangre de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander; de igual forma al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, y al Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica junto con Biosys Ltda de la Universidad Industrial de Santander.

## 6. REFERENCIAS

- Adollah, R., Mashor, M.Y., Mohd Nasir, N.F., Rosline, H., Mahsin, H. and Adilah, H., 2008, "Blood Cell Image Segmentation: A Review", 4th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering, vol. 21, pp. 141-144.
- Bain, B.J., 2005, "Morphology in the diagnosis of red cell disorders", Hematology, 10 Supplement 1: 178 /181, Taylor & Francis.
- Bay, H., Tuytelaars, Tinne. and Gool, L.V., 2008, "SURF: Speeded Up Robust Features", Computer Vision and Image Understanding, Volume 110, Issue 3, Pages 346-359, Elsevier.
- Bergen, T., Steckhan, D., Wittenberg, T. and Zerfa, T., 2008, "Segmentation of leukocytes and erythrocytes in blood smear images", Engineering in Medicine and Biology Society, 30th Annual International Conference of the IEEE.
- Castellanos, Lizeth., Hasbón, Luis. and Garcés, Lina., 2011, "Detección de Glóbulos Rojos en Imágenes Microscópicas de Células Sanguíneas", VII Seminario Internacional de Procesamiento y Análisis de Información Médica.
- CELL-DYN Sapphire TM,56-0304/R1, 2005, "Manual de operaciones del sistema", Abbott Laboratories.
- Ford, B.J., 1992, "From Dilettante to Diligent Experimenter, a Reappraisal of Leeuwenhoek as microscopist and investigator", Biology History.
- Gonzalez, R.C., 2002, "Digital image Processing", Segunda Edición, New Jersey, Prentice Hall.
- Gonzalez, R.C., Woods, R.E., Eddins, S.L., 2004, "Digital Image Processing using Matlab", Prentice Hall.
- Klinken, S.P., 2002, "Cells in focus, Red blood cells". The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.
- Muñoz, María. and Morón, Cecilia., 2005, "Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología", Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.
- Pérez, J. and Gómez, D., 2005. "Hematología: La sangre y sus enfermedades", 1st Ed, Mc Graw Hill.
- Priyankara, G., Seneviratne, O., Silva, R., Soysa, W., Silva, C.D., 2007, "An extensible computer vision application for blood cell recognition".
- Rojas, J., 2005, "Segmentación y reconocimiento de patrones en imágenes de histología".
- Silva, E.A., 2006, "Detección de cáncer de cuello uterino usando técnicas de procesamiento y análisis de imágenes microscópicas", Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander.
- Szeliski, R., 2006, "Image Alignment and Stitching: A Tutorial", Foundations and Trends in Computer Graphics and Vision Vol. 2, No 1, 1-104.
- The Mathworks, Inc, 1998, "Image Processing Toolbox User's Guide" (Version 2.1).

# Bibliografía

- [1] Brian J. Ford. From dilettante to diligent experimenter, a reappraisal of leeuwenhoek as microscopist and investigator. *Biology History*, December 1992.
- [2] Abbott Laboratories. *Manual de operaciones del sistema CELL-DYN Sapphire TM,56-0304/R1*, Junio 2005.
- [3] José Carlos Jaime Pérez and David Gomez Almaguer. *Hematología: La sangre y sus enfermedades*. Mc Graw Hill, 2005.
- [4] Robiyanti Adollah, M.Y Mashor, N.F Mohd Nasir, H. Rosline, H. Mahsin, and H. Adilah. Blood cell image segmentation: A review. *4th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering*, vol. 21, pp. 141-144, 2008.
- [5] Diatron Ltda. *Introduce to Hematology Cellcounting*, 1st edition, 1996.
- [6] Joan Lluís Vives and Josep Lluís Aguilar. *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología*. Elsevier, 3ra edition, 2006.
- [7] S Peter Klinken. Red blood cells. *The international journal of biochemistry and cell biology* , 34(12):1513-8, 2002.
- [8] María Munoz and Cecilia Morón. *Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología*. Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública del Perú, serie de normas técnicas número 40 edition, 2005.

- [9] Rafael C. Gonzalez and Richard E Woods. *Digital image Processing*. Prentice Hall, New Jersey, 2002.
- [10] The Mathworks, Inc. *Image Processing Toolbox User Guide*, 1998.
- [11] Gary Bradski and Adrian Kaehler. *Learning OpenCV*. O Reilly Media, Inc., 1005 Gravenstein Highway North, Sebastopol, CA 95472, 1st edition, 2008.
- [12] Edwin Alberto Silva. Detección de cáncer de cuello uterino usando técnicas de procesamiento y análisis de imágenes microscópicas. 2006.
- [13] G.P. M. Priyankara, O.W Seneviratne, R.K.O.H Silva, W.V.D Soysa, and C. R. D. Silva. An extensible computer vision application for blood cell recognition and analysis. 2006.
- [14] Vinod V. Kimbahune and Nelesh J.Uke. Red blood cell image segmentation and counting. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2011.
- [15] H. Berge, D. Taylor, S. Krishnan, and T.S. Douglas. Improved red blood cell counting in thin blood smears. *International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, IEEE*, pp.204-207, 2011.
- [16] Cecilia Di Ruberto, Andrew Dempster, Shahid Khan, and Bill Jarra. Morphological image processing for evaluating malaria disease. page pages 739–748, 2001.
- [17] Cecilia Di Ruberto, Andrew Dempster, Shahid Khan, and Bill Jarra. Analysis of infected blood cell images using morphological operators. *Image Vis. Computing*, vol. 20, pp. 133–146, 2002.
- [18] S. Savkare and S. P. Narote. Automatic classification of normal and infected blood cells for parasitemia detection. *International Journal of Computer Science and Network Security*, vol.11 No.2, 2011.

- [19] Tobias Bergen, Steckhan Dirk, Thomas Wittenberg, and Horsten Zerfass. Segmentation of leukocytes and erythrocytes in blood smear images. *Engineering in Medicine and Biology Society, 30th Annual International Conference of the IEEE*, pp.3075-3078, 2008.
- [20] N T Nguyen, A D Duong, and H Q Vu. A new method for splitting cuple cells in red blood images. *Second International Conference on Knowledge and Systems Engineering*, 2010.
- [21] Javier Rojas. Segmentación y reconocimiento de patrones en imágenes de histología. 2005.
- [22] Bernard F Buxton, Houari Abdallahi, Delmiro Fernandez, and William Jarra. Development of an extension of the otsu algorithm for multidimensional image segmentation of thin film blood slides. *IEEE International Conference on Computing: Theory and Applications*, 2007.
- [23] Zhen Ma, Joao Manuel Tavares, and R M Natal. A review on the current segmentation algorithms for medical images. *1st International Conference on Imaging Theory and Applications*, pp. 135-140, 2009.
- [24] Nicholas E Ross, Charles J Pritchard, David M Rubin, and Adriano G Duse. Automated image processing method for the diagnosis and classification of malaria on thin blood smears. *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol 44, pp.427-436, 2006.
- [25] Vít Springl. Automatic malaria diagnosis through microscopy imaging. 2009.
- [26] Jean Serra and Jesus Angulo. Aplicación de la morfología matemática aplicada a la telemedicina y la biotecnología: caracterización morfológica de células de sangre y análisis de cdna microarrays. 2002.

- [27] Kyungsu Kim, Jeonghee Jeon, WanKyoo Choi, Pankoo Kim, and Yo-Sung Ho. Automatic cell classification in human peripheral blood images based on morphological image processing. *Advances in Artificial Intelligence*, vol. 2256, pp.165-178, 2001.
- [28] S Kareem, R C S Morling, and I Kale. A novel method to count the red blood cells in thin blood films. *IEEE International Symposium on Circuits and Systems*, pp.1021-1024, 15-18, 2011.
- [29] Y Karunakar and A Kuwadekar. An unparagoned application for red blood cell counting using marker controlled watershed algorithm for android mobile. *5th International Conference on Next Generation Mobile Applications, Services and Technologies*, pp.100-104, 14-16, 2011.
- [30] Cecilia Di Ruberto, Andrew Dempster, Shahid Khan, and Bill Jarra. Segmentation of blood images using morphological operators. *5th International Conference on Pattern Recognition*, vol.3, pp.397-400, 2000.
- [31] José Moreira, Vladimir Valencia, and Patricia Chávez. Implementación de un algoritmo para la detección y conteo de células en imágenes microscópicas. 2009.
- [32] Carlos Zambrano, Franklin Correa, Edgar Pencue, Mario Patino, and Jauri Leon. Digital analysis of microscopic images of blood cells for pathological diagnostics. 2004.
- [33] Shengyong Chen, Mingzhu Zhao, Guang Wu, and Jianwei Zhang Chunyan Yao. Recent advances in morphological cell image analysis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012.

- [34] Joost Vromen and Brendan McCane. Red blood cell segmentation using guided contour tracing. *18th Annual Colloquium of the Spatial Information Research Centre*, 2006.
- [35] Jinyong Cheng, Ruojuan Xue, Wenpeng Lu, and Ruixiang Jia. Segmentation of medical images with canny operator and gvf snake model. *7th World Congress on Intelligent Control and Automation*, pp.1777-1780, 25-27, 2008.
- [36] Leyza B Dorini, Rodrigo Minetto, and Neucimar J Leite. White blood cell segmentation using morphological operators and scale-space analysis. *XX Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing*, pp.294-304, 7-10, 2007.
- [37] P P Guan and Hong Yan. Blood cell image segmentation based on the hough transform and fuzzy curve tracing. *International Conference on Machine Learning and Cybernetics vol.4*, pp.1696-1701, 10-13, 2011.
- [38] Kan Jiang, Qing-Min Liao, and Sheng-Yang Dai. A novel white blood cell segmentation scheme using scale-space filtering and watershed clustering. *International Conference on Machine Learning and Cybernetics, vol.5*, pp. 2820- 2825, 2003.
- [39] F Boray Tek, Andrew Dempster, and Izzet Kale. Malaria parasite detection in peripheral blood images. 2006.
- [40] F Boray Tek, Andrew Dempster, and Izzet Kale. Blood cell segmentation using minimum area watershed and circle radon transformations. *In Proc. Int. Symp. on Mathematical Morphology, vol.1*, pages 739–752, 2005.
- [41] Francisco Ruiz, Macario Polo, and Mario Piattini. Utilización de investigación-acción en la definición de un entorno para la gestión del proceso de mantenimiento del software. *Universidad de Castilla-La Mancha*.



- [42] Jim Higs Smith. Retiring lifecycle dinosaurs: Using adaptive software development to meet the challenges of a high-speed, high-change environment. *Software Testing and Quality Engineering (SQET) magazine*, 2000.
- [43] National health lung and blood institute: Anemia de células falciformes, 2011.
- [44] National health lung and blood institute: Talassemia, 2011.
- [45] Medline plus: Anemia hemolítica, 2011.
- [46] Revista del observatorio de salud pública de santander, año 4 número 2, 2009.
- [47] Boletín malaria instituto nacional de salud colombia. *Semana Epidemiológica* 19 (8 de mayo –14 mayo de 2011).

## **Anexos**

# **A. Enfermedades Asociadas a Glóbulos Rojos**

## **A.1. Anemia**

### **Definición**

La anemia entraña un recuento bajo de eritrocitos y un nivel de hemoglobina o hematocrito menor de lo normal [3]. La deficiencia de hierro en la sangre es la característica más correspondiente a ésta, manifestándose en una disminución de los eritrocitos y en los niveles de hemoglobina

### **Causas**

La anemia tiene tres causas principales: la pérdida de sangre, la falta de producción de glóbulos rojos y/o el aumento en la velocidad de destrucción de los glóbulos rojos.

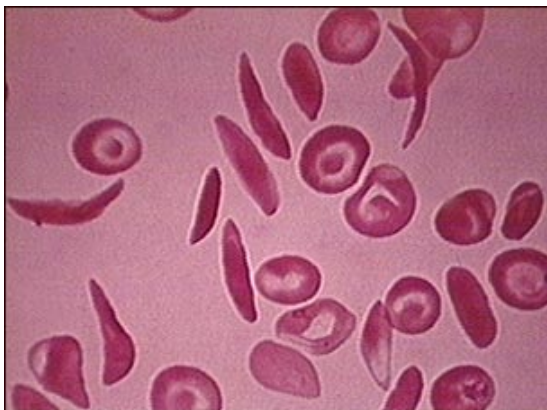
## Diagnóstico

Existen varios tipos de anemia. Algunos niños nacen sin la capacidad de producir suficientes glóbulos rojos (Anemia aplásica). Entre los ejemplos de enfermedades hereditarias que hacen que el cuerpo destruya demasiados glóbulos rojos están la anemia de células falciformes [43] y las talasemias [44]. La anemia hemolítica [45] es otro ejemplo de enfermedad en la que el cuerpo destruye demasiados glóbulos rojos.



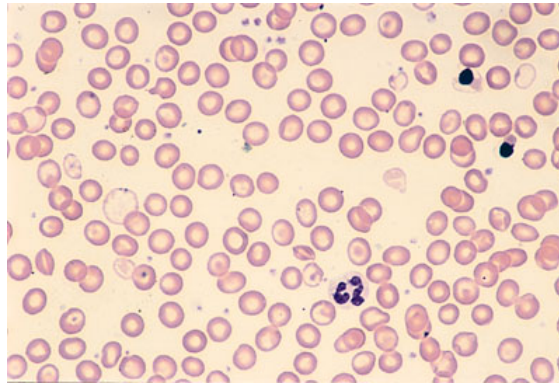
**Figura A.1:** Anemia Aplásica

Fuente: <http://www.drknp.com/wp-content/uploads/2010/12/Aplastic-Anemia-400x.jpg>



**Figura A.2:** Anemia Falsiforme

Fuente: <http://www.mybwmc.org/library/6/1223>



**Figura A.3:** Talasemia  
Fuente: [www.thalassemia.org](http://www.thalassemia.org)

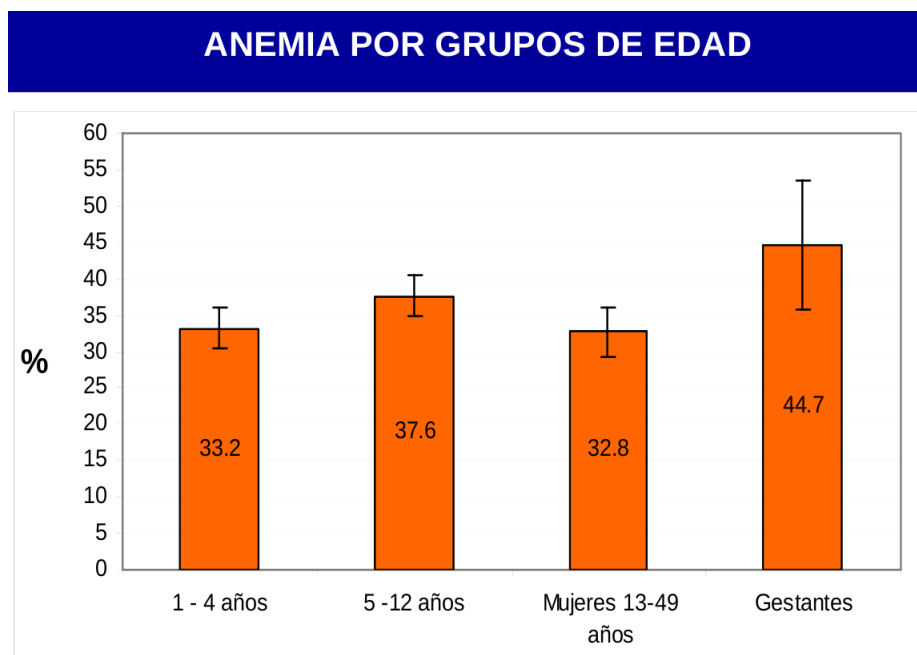
### **Diagnóstico**

El hemograma es el primer procedimiento médico que se debe realizar cuando se sospecha de un caso de anemia, sin embargo para determinar con exactitud el tipo de anemia presente, se deben analizar las características morfológicas de los glóbulos rojos (ver frotis de sangre periférica), esto debido a que enfermedades como la talasemia, anemia aplásica o anemia falsiforme que presentan su caracterización sólo cuando se observan los glóbulos rojos por el microscopio.

### **Importancia**

La anemia es una sintomatología de gran importancia en Colombia y en Santander; representa una porción grande en las causas de consulta externa de individuos pediátricos en Santander. Durante el 2007 fueron reportadas 2,057 casos de anemia en sus diferentes tipos en pacientes pediátricos de tipo femenino que estaban subscritos bajo el régimen subsidiado de salud, además otros 498 casos se reportaron en la población sin aseguramiento en salud [46]. Según la ENSIN- encuesta a nivel nacional sobre el estado nutricional de los Colombianos-, existe información que permite estimar de forma numérica la incidencia de la anemia en Colombia con un estudio

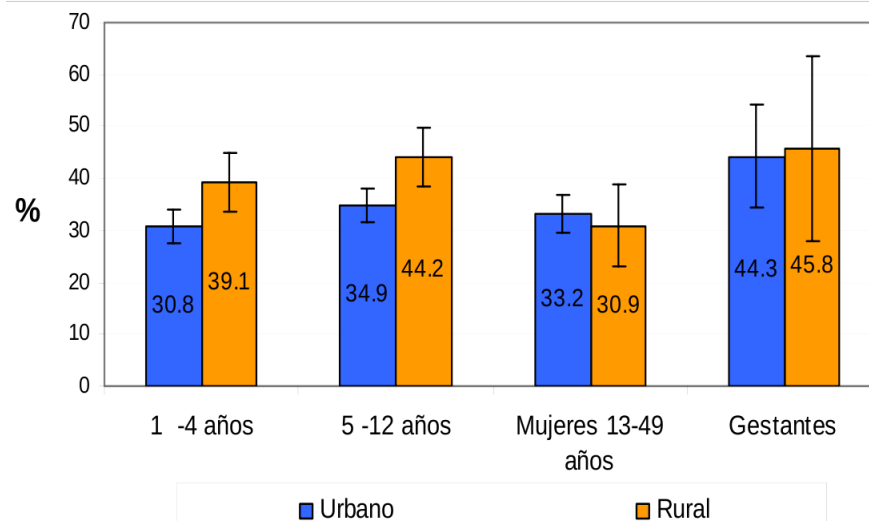
estadístico sobre una población de 15908 personas.



**Figura A.4:** Anemia por grupos de edad.

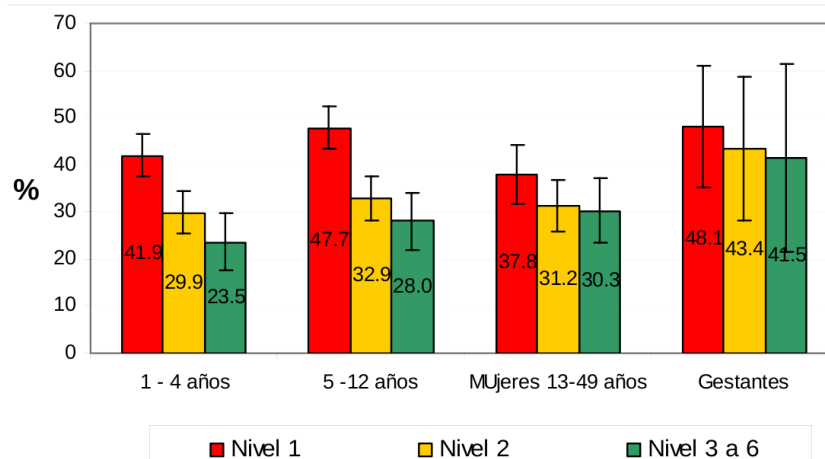
Fuente: ENSIN 2005, ICBF

## ANEMIA SEGÚN ÁREA Y GRUPOS DE EDAD



**Figura A.5:** Anemia por áreas y grupos de edad.  
Fuente: ENSIN 2005, ICBF

## ANEMIA GRUPOS DE EDAD Y NIVEL DEL SISBEN



**Figura A.6:** Anemia por edad y nivel del Sisben.  
Fuente: ENSIN 2005, ICBF

## **A.2. Malaria**

### **Introducción**

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria causada por la picadura del mosquito anófeles infectado con el virus Plasmodium y sus variaciones. Esta enfermedad por lo general afecta a países tropicales como Colombia y sobre todo a las poblaciones rurales [47].

### **Causas**

La malaria es transmitida de un humano a otro por la picadura del mosquito anófeles infectado. En los humanos, los parásitos migran hacia el hígado, donde maduran para después penetrar el torrente sanguíneo e infectan los glóbulos rojos. Los parásitos se multiplican dentro de los glóbulos que, al cabo de 48 a 72 horas, se rompen e infectan más glóbulos rojos. Los primeros síntomas se presentan por lo general de 10 días a 4 semanas después de la infección, aunque pueden aparecer incluso a los 8 días o hasta 1 año después de ésta. La mayoría de los síntomas son causados por la liberación masiva de parásitos en el torrente sanguíneo, la anemia resultante de la destrucción de glóbulos rojos y los problemas ocasionados por las grandes cantidades de hemoglobina liberada en la circulación sanguínea luego de la ruptura de los glóbulos rojos.

### **Diagnóstico**

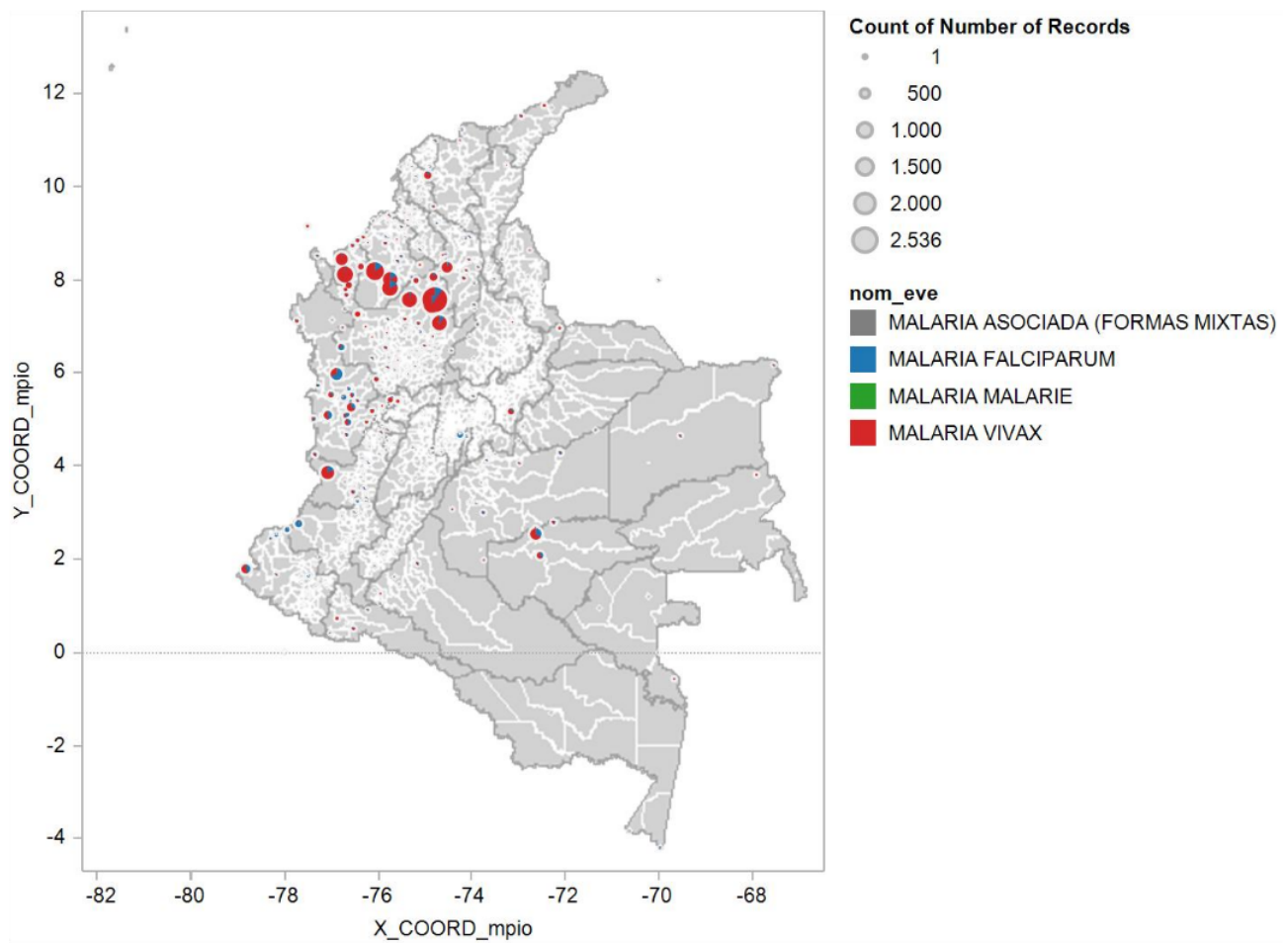
El diagnóstico de malaria se hace en el laboratorio por la identificación de la especie de parásito presente en la sangre mediante examen microscópico de gota gruesa (ver frotis de sangre periférica), con recuento parasitario (Análisis visual). El parásito puede ser detectado en la gota gruesa con un orden de 5 a 10 parásitos/microlitro



de sangre [47].

### **Importancia**

La malaria causa entre 300 y 500 millones de casos de fiebre y aproximadamente de 2 a 3 millones de muertes anuales [18], lo que evidencia una muerte cada 15 segundos. La mayoría de los casos ocurre en menores de 5 años; las mujeres embarazadas son también vulnerables. Las estadísticas precisas se desconocen porque muchos casos ocurren en áreas rurales, donde las personas no tienen acceso a hospitales o recursos para garantizar cuidados de salud. Como consecuencia, la mayoría de los casos permanece sin registrar. En Mayo de 2011 se hizo un estudio epidemiológico que arrojó resultados importantes en el país. Se notificaron al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud 21512 casos de malaria, de los cuales 16744 (77,8 %) correspondieron a *P. vivax*, 4545 (21,1 %) a *P. falciparum*, 218 (1,0 %) a la asociación y 5 (0,02 %) a *P. malariae*. De malaria complicada se han notificado 200 casos. Se han reportado 8 defunciones.



**Figura A.7:** Distribución especie parasitaria de malaria en Colombia.  
Fuente: Boletín Malaria. Semana Epidemiológica, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2011.

| Entidad territorial de procedencia | Malaria asociada (Formas mixtas) | Malaria por <i>P. falciparum</i> | Malaria por <i>P. malariae</i> | Malaria por <i>P. vivax</i> | Total  |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------|
| Amazonas                           | 1                                | 3                                |                                | 22                          | 26     |
| Antioquia                          | 34                               | 746                              |                                | 8.512                       | 9.292  |
| Arauca                             |                                  |                                  |                                | 1                           | 1      |
| Atlántico                          |                                  | 1                                |                                | 2                           | 3      |
| Barranquilla                       | 1                                |                                  |                                | 5                           | 6      |
| Bogotá                             |                                  | 1                                |                                | 2                           | 3      |
| Bolívar                            | 48                               | 98                               |                                | 836                         | 982    |
| Boyacá                             |                                  |                                  |                                | 39                          | 39     |
| Caldas                             |                                  | 2                                |                                | 58                          | 60     |
| Caquetá                            |                                  | 3                                |                                | 7                           | 10     |
| Cartagena                          |                                  |                                  |                                | 4                           | 4      |
| Casanare                           | 1                                | 1                                |                                | 17                          | 19     |
| Cauca                              | 3                                | 374                              |                                | 42                          | 419    |
| Cesar                              |                                  | 2                                |                                | 10                          | 12     |
| Choco                              | 62                               | 1.393                            | 2                              | 1.535                       | 2.992  |
| Cordoba                            | 32                               | 580                              |                                | 3.143                       | 3.755  |
| Cundinamarca                       | 1                                | 1                                |                                | 18                          | 20     |
| Exterior                           | 2                                | 2                                |                                | 11                          | 15     |
| Guainía                            |                                  |                                  |                                | 30                          | 30     |
| Guajira                            |                                  | 7                                |                                | 107                         | 114    |
| Guaviare                           | 14                               | 303                              | 1                              | 779                         | 1.097  |
| Huila                              | 1                                |                                  |                                | 4                           | 5      |
| Magdalena                          |                                  |                                  |                                | 13                          | 13     |
| Meta                               | 3                                | 88                               | 1                              | 157                         | 249    |
| Nariño                             | 1                                | 754                              | 1                              | 297                         | 1.053  |
| Norte Santander                    |                                  |                                  |                                | 20                          | 20     |
| Putumayo                           |                                  | 4                                |                                | 103                         | 107    |
| Quindío                            | 1                                | 3                                |                                | 19                          | 23     |
| Risaralda                          | 3                                | 3                                |                                | 90                          | 96     |
| Santander                          |                                  |                                  |                                | 25                          | 25     |
| Santa Marta                        |                                  | 1                                |                                | 2                           | 3      |
| Sucre                              |                                  | 6                                |                                | 66                          | 72     |
| Tolima                             | 1                                |                                  |                                | 11                          | 12     |
| Valle                              | 7                                | 159                              |                                | 682                         | 848    |
| Vaupés                             |                                  |                                  |                                | 27                          | 27     |
| Vichada                            | 2                                | 6                                |                                | 33                          | 41     |
| Sin información                    |                                  | 4                                |                                | 15                          | 19     |
| Total                              | 218                              | 4.545                            | 5                              | 16.744                      | 21.512 |

**Figura A.8:** Casos de malaria por especie parasitaria según departamento de procedencia.  
Fuente: Boletín Malaria. Semana Epidemiológica, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2011.

| Grupos de edad<br>(años) | Malaria asociada<br>(Formas mixtas) |      | <i>Malaria por<br/>P. falciparum</i> |      | <i>Malaria por<br/>P. malariae</i> |      | <i>Malaria por<br/>P. vivax</i> |      | Total  |       |
|--------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------------|------|------------------------------------|------|---------------------------------|------|--------|-------|
|                          | n                                   | %    | n                                    | %    | n                                  | %    | n                               | %    | n      | %     |
| 0 a 2                    | 10                                  | 0,05 | 158                                  | 0,7  |                                    | 0,0  | 828                             | 3,8  | 996    | 4,6   |
| 3 a 4                    | 7                                   | 0,03 | 180                                  | 0,8  |                                    | 0,0  | 747                             | 3,5  | 934    | 4,3   |
| 5 a 9                    | 15                                  | 0,07 | 476                                  | 2,2  |                                    | 0,0  | 1.653                           | 7,7  | 2144   | 10,0  |
| 10 a 14                  | 17                                  | 0,08 | 491                                  | 2,3  |                                    | 0,0  | 1.851                           | 8,6  | 2359   | 11,0  |
| 15 a 17                  | 13                                  | 0,06 | 362                                  | 1,7  |                                    | 0,0  | 1315                            | 6,1  | 1690   | 7,9   |
| Resto                    | 156                                 | 0,7  | 2.878                                | 13,4 | 5                                  | 0,02 | 10.350                          | 48,1 | 13.389 | 62,2  |
| <b>Total</b>             | 218                                 | 1,0  | 4.545                                | 21,1 | 5                                  | 0,02 | 16.744                          | 77,8 | 21.512 | 100,0 |

**Figura A.9:** Casos de malaria por grupo de edad y especie parasitaria

Fuente: Boletín Malaria. Semana Epidemiológica, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2011.