

# Conteo Automático de Partículas y Medición Microscópica.

Mario Chirinos Colunga, Aurea – Desarrollo Tecnológico, Mérida, Yucatán, México. [chmario@aurea.8m.com](mailto:chmario@aurea.8m.com)  
Guillermo Valencia Palomo - Aurea – Desarrollo Tecnológico, Mérida, Yucatán, México. [chinovp@hotmail.com](mailto:chinovp@hotmail.com)  
José Ramón Atoche Enseñat. Instituto Tecnológico de Mérida. [jatoche@labna.itmerida.mx](mailto:jatoche@labna.itmerida.mx)  
Calle 3 #143 x 14A y 16 Colonia México norte, Mérida Yucatán México, CP: 97128.

**Resumen:** Una de las tareas sistemáticas más tediosas que realizan los técnicos de laboratorio es el conteo de partículas o células vistas en un microscopio, este proceso puede ser automatizado por medio de una computadora. En este artículo se describe la forma de desarrollar un sistema que permite adquirir una imagen digital de la muestra en el microscopio, analizarla con la computadora y reportar el total de partículas y la concentración por volumen de la muestra.

## 1. Introducción.

En muchas áreas profesionales los técnicos realizan tareas que requieren un análisis visual sistemático y repetitivo. Este tipo de tareas, en muchos casos, pueden ser automatizadas utilizando técnicas de visión por computadora. Una de estas tareas, es el conteo de cientos o miles de partículas o células con el apoyo de un microscopio e instrumentos como la cámara Neubauer. El conteo realizado tiene cierto margen de error aunque la muestra sea homogénea, ya que para agilizar el conteo normalmente solo se realiza en ciertas regiones del área total observada en el microscopio, asumiendo que estas regiones son representativas de la muestra.

Automatizar este proceso implica ciertas ventajas como: a) el tiempo de análisis se ve reducido drásticamente pues una computadora puede contar miles de partículas en unos cuantos segundos y b) se reduce el error, ya que al ser una máquina la que realiza el conteo se puede contar el total de partículas observadas en la muestra y no solo una porción del área, realizándose así un conteo más significativo de la muestra original.

El sistema consta de una cámara digital adaptada al microscopio, y de un software basado en técnicas sencillas de análisis de imágenes digitales, el cual cuenta el total de partículas en la imagen

y calcula la concentración de partículas por volumen en la muestra original.

## 2. El Software.

El algoritmo que se describe a continuación analiza la imagen, obtenida [Imagen 1] por una cámara digital, aplicando filtros y técnicas de segmentación de imágenes.

El algoritmo consta de los siguientes pasos básicos para obtener el resultado:

a) conversión de la imagen en color a escala de Grises, b) detección del fondo en la imagen, c) binarización de la imagen, d) segmentación de la imagen, e) conteo de partículas y f) cálculo de la concentración por volumen.

### 2.1 Escala de Grises.

El color de cada píxel en una imagen digital se indica generalmente en el estándar RGB, mediante la combinación de los tres colores primarios: rojo, verde y azul, cada canal de color contiene 256 niveles, los que combinados dan un total de 16,777,216 colores (16 millones de colores). La muestra [Imagen 2] deberá ser convertida a escala de grises para reducir la información de la imagen, y hacer los procesos siguientes en un solo canal de color o tonos de gris [1]. En una imagen en escala de grises [Imagen 3] los tres canales RGB tienen el mismo valor, por lo que deberán fusionarse en uno solo mediante su promedio.

## 2.2 Detección del fondo.

Para poder identificar correctamente las partículas es necesario identificar las tonalidades de grises que conforman el fondo y las que pertenecen a las partículas. En el histograma de frecuencias de la imagen [Imagen 4a] el eje horizontal indica el tono de gris del 0 a 255 y el eje vertical indica el número de píxeles con ese nivel de gris.

En una imagen de una muestra en la que la concentración de partículas es menor al 50%, la mayoría de los píxeles pertenecerán al fondo. Estos píxeles estarán dentro de un rango de tonos de gris indicado por el pico mayor en el histograma de frecuencias. Para que esto se cumpla es necesario que la iluminación de la imagen sea uniforme y que las partículas sean contrastantes con el fondo. La posición del pico correspondiente al fondo también permitirá determinar la cantidad de luz en la imagen, en una imagen con mucha luz el pico se encuentra hacia la derecha, nivel 255 correspondiente al blanco, si la imagen contiene poca luz el pico se encontrará a la izquierda, hacia el nivel 0 correspondiente al negro.

Debido al tipo de imágenes que se manejan, el fondo será más claro que las partículas, pues éstas obstruyen el paso de la luz, observándose casi negras. Para imágenes que contengan un solo tipo de partículas, la tonalidad de gris del extremo izquierdo del pico, su parte más oscura, indicará el umbral para el cual los tonos por debajo de éste pertenecen a las partículas y los que se encuentren sobre él pertenecerán al fondo.

Para evitar errores en la detección del fondo se debe difuminar la imagen, para poder identificar mejor los picos en el histograma de frecuencias [Imagen 4b].

Un conteo diferencial para muestras con más de un tipo de elementos, basado en el color de éstos, puede ser desarrollado con el perfeccionamiento de esta técnica, como podemos observar en la imagen sintética [Imagen 7a]. Los tonos

correspondientes a tipos de partículas distintas se identifican perfectamente en los tres picos más pequeños de su histograma de frecuencias [Imagen 7b]. El problema al hacer un conteo diferencial basado en color en imágenes reales es que debido a que se requiere contar la mayor cantidad de partículas posible su tamaño es reducido, y por la cantidad de luz proveniente del fondo el color de éstas es poco apreciable, por lo que aparecerán de un tono más oscuro que el fondo pero con tonos poco diferenciables entre ellas.

## 2.3 Binarización.

Con el valor de umbral obtenido anteriormente se polarizarán los tonos de la imagen en negro y blanco. Todos los tonos que se encuentren por debajo del umbral pertenecen a las partículas y la binarización los reducirá a negro. Los tonos por arriba del umbral corresponden al fondo y se convertirán blancos [Imagen 5]. Esto permitirá que el siguiente proceso pueda segmentar la imagen con facilidad.

## 2.4 Segmentación.

Para contar el total de partículas es necesario diferenciar unas de otras agrupando todos los píxeles que forman cada una de las partículas en segmentos diferentes unos de otros.

Para lograr eso se explora toda la imagen binarizada en búsqueda de píxeles negros, correspondientes a las partículas, que aún no hayan sido asignados a alguna región. Al encontrarlos se marcan como pertenecientes a una región nueva, junto con todos sus píxeles vecinos, y los vecinos de estos y se almacenan en una lista con la dirección  $x$ ,  $y$  de cada uno de ellos. Al terminar de explorar la imagen se tendrá una lista de todas las regiones de la imagen o partículas, donde cada elemento será, a su vez, una lista que contiene todas las direcciones de los píxeles que forman ese segmento o partícula de la imagen.

## 2.4 Conteo.

Aunque la muestra observada sea homogénea, algunas de las partículas se encontraran aglomeradas, por lo que el número de regiones encontradas no necesariamente corresponderá al número total de partículas en la imagen. Para corregir esto debemos calcular cuántas partículas se encuentran unidas en una sola región. La mayoría de las regiones contendrán solo una partícula y solo algunas de estas estarán formadas por más de una. Utilizaremos el área de una región, total de píxeles en ella, formada por una sola partícula para determinar cuántas partículas contiene una región con un área mayor. El área de una partícula será determinada por la mediana de todas las áreas de las regiones encontradas. Esta se encuentra ordenando por tamaño la lista de regiones y tomando como área de una partícula el tamaño de la región que se encuentre en medio de la lista.

El total de partículas en una región [Imagen 6] se obtiene dividiendo el área de dicha región entre el área mediana.

Y el total de partículas en la imagen se encuentra realizando la sumatoria de estas.

$$Total = \sum_{i=0}^{i=Lista.Longitud} \frac{Lista[i].Longitud}{mediana}$$

## 2.4 Cálculo de la concentración.

Es necesario conocer el volumen observado en la muestra para encontrar la concentración de partículas por volumen en ella. El área observada y la profundidad de la muestra se pueden obtener mediante instrumentos de precisión como la cámara Neubauer [Imagen 8], ésta contiene una retícula microscópica de medidas exactas que permiten determinar el área observada y garantiza una profundidad de 0.1mm entre la cámara y el cubreobjetos [2]. El área observada en la imagen dependerá del objetivo utilizado, la cámara digital y de su adaptador.

EL área total de la imagen se calcula encontrando la el valor de longitud de un píxel, contando el numero total de píxeles entre un extremo y otro de un segmento en la imagen cuya longitud se conozca. Para ello se puede utilizar la longitud de una celda de la cámara Neubauer [Imagen 9].

$$K = \frac{Longitud}{Píxeles}$$

Esta técnica, una vez encontrado el valor de la constante  $K$ , también permitirá medir cualquier objeto en la imagen, aun sin tener una referencia de longitud.

El error en la medición dependerá principal mente, además de la referencia utilizada, de la resolución de la cámara digital, pues entre mayor sea ésta más píxeles se tendrán para calcular  $K$  y menor será el error. El error de la medición se encuentra en el rango de +/- un píxel por  $K$ .

El volumen total se obtiene multiplicando las dimensiones de la imagen por la profundidad de la cámara Neubauer.

$$Volumen = K^2 \cdot Ancho \cdot Largo \cdot 0.1mm$$

La concentración por volumen es el número de partículas por unidad de volumen contenidas en la muestra.

$$Concentracion = \frac{Total}{Volumen}$$

## 3. El Hardware.

EL hardware requerido para este sistema además de la computadora es únicamente la cámara digital y su adaptador para el microscopio.

La selección de la cámara es critica para la calidad del los resultados. Para este artículo se utilizó una cámara digital como las utilizadas para videoconferencia en red. Estas cámaras presentan varias ventajas para este tipo de aplicación: a) Tienen una resolución media, la cual es más que suficiente para obtener buenos resultados en la

medición y conteo. B) Dependiendo del sensor que utilicen será la calidad de la imagen y su sensibilidad a la luz, por lo que se recomiendan cámaras con sensor CCD (Charged Cupled Device) sobre las que poseen un sensor CMOS. A diferencia de las cámaras digitales portátiles, éstas permiten visualizar en la pantalla de la computadora la imagen en vivo de lo observado en el microscopio, y su precio es significativamente más bajo que el de otras cámaras digitales.

#### 4. Resultados experimentales.

Las imágenes utilizadas fueron obtenidas mediante una cámara web con un sensor CCD de resolución 640x480 píxeles, Los resultados obtenidos son precisos y su exactitud dependerá de la resolución de la imagen y de la calidad de la base de calibración usada, el valor del error será de +/- un píxel de discrepancia, el error obtenido para las mediciones en cada objetivo usando un microscopio Olympus CX31 fue:

Objetivo	Medida Base	Error
4x	700 $\mu\text{m}$	+/- 615nm
10x	300 $\mu\text{m}$	+/- 226nm
40x	50 $\mu\text{m}$	+/- 53nm
100X	50 $\mu\text{m}$	+/- 24nm

La exactitud del conteo será determinada por un conteo "manual" del total de partículas en la imagen y no solo por la técnica de conteo rápido la cual solo requiere el conteo de las partículas que se encuentran en algunas regiones de la imagen.

El error en la concentración por volumen dependerá de los errores anteriores y de lo homogénea que sea la muestra analizada.

#### 5. Conclusiones

Con este método se obtiene una útil herramienta, precisa y con un error pequeño, para microscopia,

La selección de la cámara digital influirá en la calidad de la imagen y por tanto en la magnitud del error.

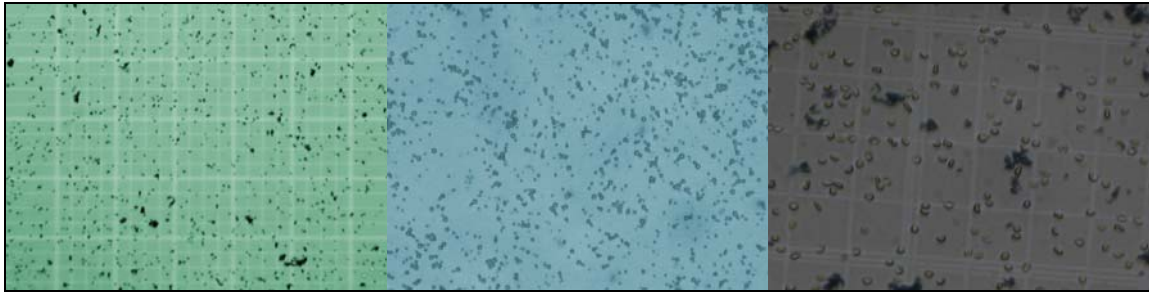
La técnica de conteo se puede perfeccionar para lograr un conteo diferencial discriminando entre colores o formas.

#### 6. Referencias

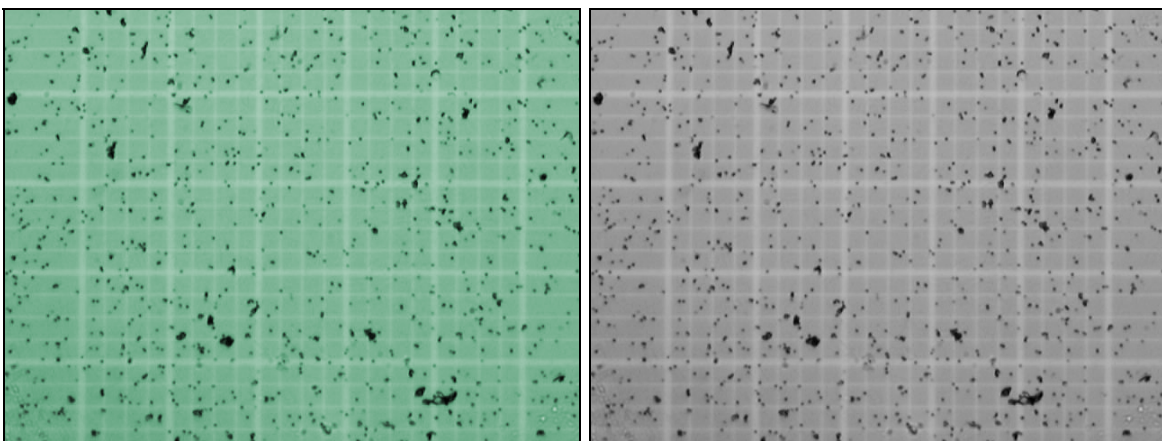
[1] Computer Vision: A Modern Approach by David A. Forsyth, Jean Ponce

[2] "HemoSurf" Dr. med. U. Woermann, Mrs. M. Montandon, Dr. med. A. Tobler. by AUM, Bern 2002

## Imágenes

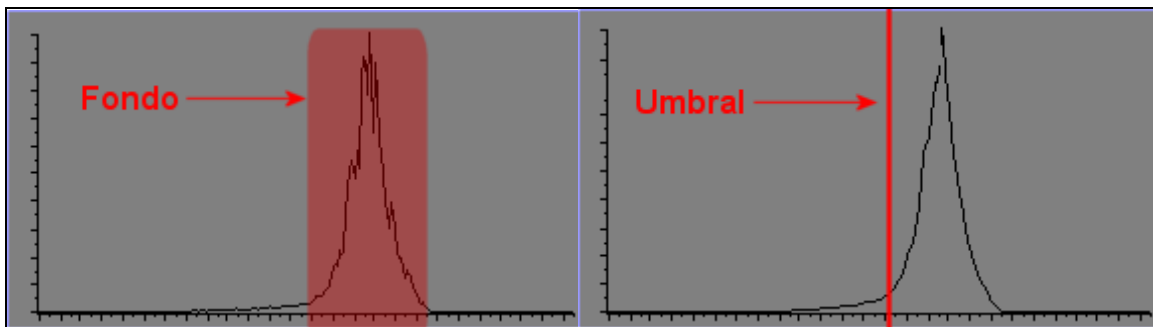


**Imagen 1.** Las imágenes para analizar deberán solo contener un tipo de partículas, ser de una muestra homogénea, tener una iluminación uniforme y no tener una concentración de más del 50%.

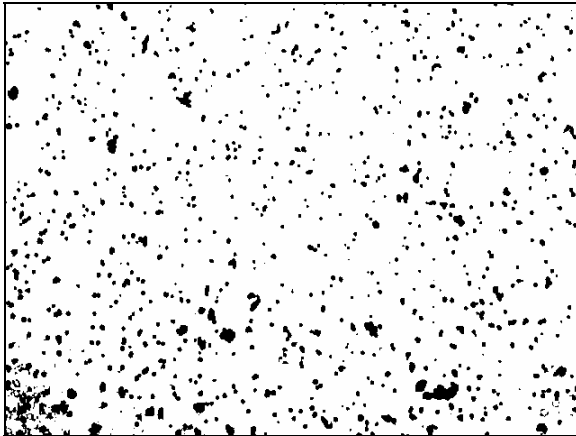


**Imagen 2** Muestra de Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en cámara Neubauer observada con objetivo de 4X

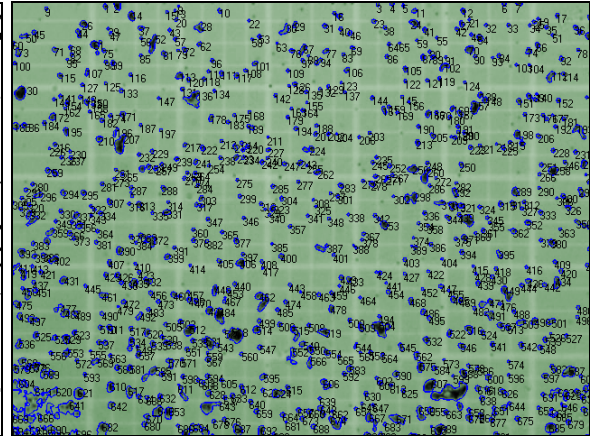
**Imagen 3.** Imagen en escala de grises



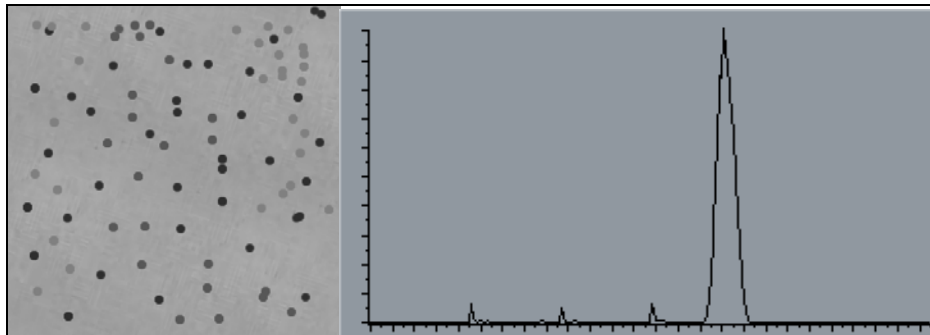
**Imagen 4.** El histograma de frecuencias de una imagen permite determinar los tonos que tienen mayor presencia en la imagen. En la imagen, izquierda, se puede observar que existe un pico que contiene la mayoría de los píxeles de la imagen. Este pico corresponde a las tonalidades del fondo en la imagen. Este pico se puede determinar mejor si se le pasa a la imagen un filtro que elimine el ruido, como se muestra en la imagen de la derecha.



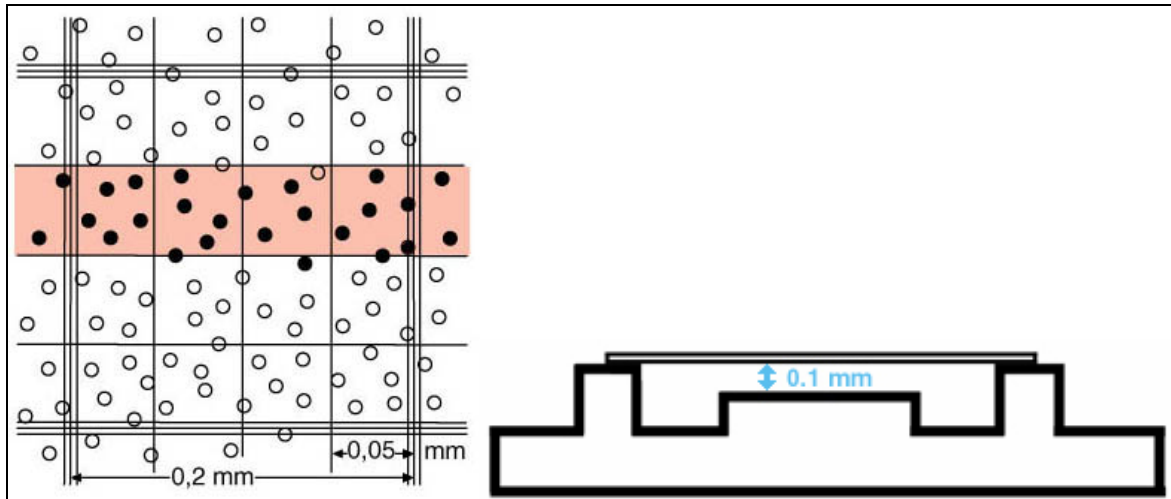
**Imagen 5** Muestra de Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* en cámara Neubauer observada con objetivo de 4X



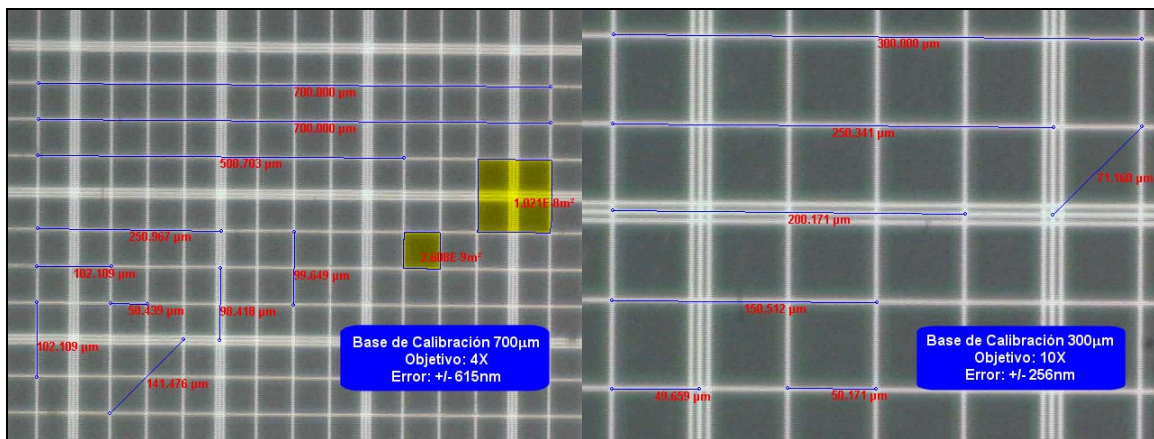
**Imagen 6.** Imagen segmentada y contada.



**Imagen 7.** A, izquierda, imagen sintética con tres tipos de partículas en tres tonos diferentes de gris. b, derecha, en el histograma de frecuencias los tres tipos de células aparecen como los 3 picos mas pequeños.



**Imagen 8.** La retícula de la cámara Neubauer permite conocer el área observada y garantiza una profundidad de 0.1mm entre la cámara y el cubre objetos [2].



**Imagen 9.** Mediciones realizadas después de encontrar el valor de  $k$ .