

DOI: 10.22034/as.2021.36381.1528

شناسایی و شمارش گلبول‌های سفید جوجه گوشتی با استفاده از پردازش تصویر

رحیمه برومندپور^۱، محمد صدقی^{۲*} و امیر حسین مهدوی^۲

تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۲

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

^۲ به‌ترتیب استادیار و دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

*مسئول مکاتبه: Email:mo.sedghi@iut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: شمارش خودکار گلبول‌های سفید طیور به دلیل حضور گلبول‌های قرمز و ترومبوسیت‌های هسته‌دار بسیار مشکل است و شمارش، عموماً به صورت دستی انجام می‌شود. هدف: این مطالعه به منظور بررسی امکان استفاده از روش‌های پردازش تصویر جهت تشخیص گلبول‌های سفید خون طیور صورت گرفت. روش کار: در ابتدا ۴۲ عکس رنگی RGB با فرمت JPG از گسترش‌های خونی تهیه شده به روش لام به لام و با رنگ آمیزی گیمسا آماده شد. تصاویر به کمک نرم‌افزارهای MATLAB R2017a و CellProfiler 2.0 r10997 پردازش شدند. با استفاده از نرم‌افزار MATLAB تصاویر لایه a از فضای رنگی L^*a^*b انتخاب شدند و به چهار روش مورد بررسی قرار گرفتند. روش اول بررسی چهار شی بزرگ‌تر تصویر، روش دوم حذف مساحت‌های کمتر از ۵۰۰۰ پیکسل (به منظور حذف گلبول‌های قرمز که مساحت کوچکتری دارند)، روش سوم استفاده از بازه‌ی ۱-۱/۲۵ فاکتور شکل برای باقی ماندن اشیای گرد و روش چهارم تلفیق دو روش دوم و سوم (شکل و اندازه) بود. در نرم‌افزار CellProfiler به کمک ماژول‌های مختلف و در نظرگیری قطر عمومی ۱۸-۵۲ پیکسل تشخیص اشیاء بررسی شد. نتایج: بین روش‌های مورد استفاده با نرم‌افزار MATLAB، روش دوم یعنی حذف مساحت‌های کمتر از ۵۰۰۰ پیکسل، توانست بیشترین تعداد گلبول سفید را درست تشخیص دهد (۸۴ درصد). در حالی که روش‌های اول، سوم و چهارم به ترتیب ۳۵، ۴۸ و ۳۹ درصد از گلبول‌های سفید را تشخیص دادند. با استفاده از نرم‌افزار Cell Profiler نتایجی مشابه با روش دوم نرم‌افزار MATLAB بدست آمد. نتیجه‌گیری نهایی: هر دو نرم افزار مورد استفاده پتانسیل پردازش تصویر سلول‌های خونی طیور را دارند، اما استفاده از الگوریتم‌های پیشرفته‌تر یادگیری ماشین جهت شمارش گلبول‌های سفید مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: پردازش رنگی تصاویر، پردازش هندسی تصاویر، جوجه گوشتی، گلبول‌های سفید

مقدمه

نمک‌ها و ترکیبات شیمیایی) و نیز سلول‌های خونی شامل گلبول‌های قرمز (اریتروسیت‌ها)، پلاکت‌ها (ترومبوسیت-ها) و گلبول‌های سفید (لکوسیت‌ها) تشکیل شده است (نظیفی ۱۹۹۸). گلبول‌های سفید سلول‌های سیستم ایمنی با نقش محافظت از بدن در برابر بیماری‌های عفونی و

خون یک بافت همبندی تخصص‌یافته است که برخلاف سایر بافت‌های بدن، متحرک بوده و سلول‌های آن ثابت نیستند. منشأ این بافت مانند سایر بافت‌های همبند از مزودرم است. خون از مایعی به نام پلاسما (دربدارنده

جایگزین روش‌های دستی برای شمارش سلول‌های خونی، راهکاری سودمند است. از جمله این نرم-افزارها، Matlab و CellProfiler می‌باشند که با استفاده از فن پردازش تصاویر دیجیتال قادر به استخراج ویژگی‌های تصاویر هستند. پردازش تصویر روشی برای تبدیل یک تصویر به صورت دیجیتال و انجام برخی عملیات بر روی آن، به منظور دریافت یک تصویر بهبود یافته و یا برای استخراج برخی از اطلاعات مفید از آن است (گزنالس و همکاران ۲۰۰۹). در نهایت با استفاده از تهیه اسلایدهای خونی و تصویربرداری از آن‌ها می‌توان به کمک پردازش تصویر اطلاعات مفیدی همچون تعداد گلبول‌های سفید را از این تصاویر بدست آورد.

لین و هانگ (۲۰۱۲) شمارش افتراقی گلبول‌های سفید انسان در گسترش‌های خونی نويزدار را بررسی کردند. روش پردازش آن‌ها شامل چهار مرحله آنالیز و تنظیم کانال RGB^۶ تصویر، تقسیم‌بندی سلول‌های سفید خون، توصیف دوباره هسته‌های تقسیم‌بندی‌شده و طبقه بندی هسته‌های کامل بود. آن‌ها در شناسایی سلول‌های سفید برای نوتروفیل، بازوفیل، ائوزینوفیل، منوسیت و لنفوسیت به ترتیب دقت‌های ۹۵/۵، ۷۶/۴۷، ۸۹/۶۵، ۸۸/۲۳ و ۹۴/۶۳ درصد را به دست آوردند.

بیفر و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از تصاویر سیتومتری^۷ حاصل از گسترش خونی، شمارش گلبول‌های سفید طوطی‌ها را انجام دادند. آن‌ها ۷۰ گسترش رنگ-آمیزی شده به روش رایت-گیمسا تهیه و تک تک اسلایدها را اسکن نمودند. این محققین از نرم‌افزارهای CellProfiler و CellProfiler Analyst، برای تجزیه و تحلیل عکس‌ها و طبقه‌بندی فنوتیپ سلولی استفاده کردند. روش شمارش تام لکوپت (شمارش هتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها با لام هموسایتومتر) و شمارش افتراقی دستی نیز برای مقایسه

ذرات خارجی هستند. این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک مشتق می‌شوند و به وسیله مغز استخوان، کبد، بافت لنفاوی، بورس فابریسیوس^۵، تیموس و بافت لنفوئیدی مرتبط با دستگاه گوارش تولید می‌شوند. به علاوه در صورت سلامتی پرنده، گلبول‌های سفید به طور میانگین به مقدار ۲۰۰۰۰ عدد در هر میلی‌متر مکعب خون حضور دارند. گلبول‌های سفید به دو دسته کلی گرانولوسیت‌ها^۲ (هتروفیل، ائوزینوفیل و بازوفیل) و آگرانولوسیت‌ها^۳ (منوسیت و لنفوسیت) تقسیم می‌شوند (نظیفی ۱۹۹۸).

شمارش گلبول‌های سفید برای ارزیابی بیماری‌های عفونی و التهابی دارای اهمیت است (هریسون و لایت فوت ۲۰۰۵). شمارش سلول‌ها به دو صورت تام (کل گلبول‌های سفید) و افتراقی (درصد پنج نوع گلبول سفید) انجام می‌گیرد. معمولاً شمارش تام و افتراقی گلبول‌های سفید طیور در آزمایشگاه‌های تشخیص دامپزشکی با استفاده از تکنیک-های دستی توسط میکروسکوپ نوری و به کمک لام هموسایتومتر^۴ انجام می‌شود. به دلیل وجود گلبول‌های قرمز و ترومبوسیت‌های هسته‌دار، روش‌های شمارش گلبول‌های سفید که در مورد پستانداران به کار می‌رود، در طیور امکان‌پذیر نمی‌باشد (بیفر و همکاران ۲۰۱۳).

در حال حاضر با گسترش علم و فناوری، روش‌های خودکار برای جایگزینی با روش دستی پیشنهاد شده‌اند که برخی از آن‌ها نتایج سودمندی را به همراه داشته‌اند. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش سیستم همتولوژی CELL-DYN (ویوز و همکاران ۱۹۹۶) و روش پردازش تصویر^۸ (بیفر و همکاران ۲۰۱۳) اشاره کرد.

با توجه به پیشرفت چشمگیر علوم کامپیوتری و نقش غیر قابل انکار این دستگاه در زندگی بشر امروز، استفاده از روش‌های کامپیوتری و نرم‌افزارهای مختلف به عنوان

^۵ Image processing^۶ Red green blue^۷ Image cytometry^۵Bursa fabricius^۲ Granulocytes^۳ Agranulocytes^۴ Hemocytometer

با روش تصاویر سیتومتری انجام شدند. شمارش نرم-افزاری گلبول‌های سفید در مقایسه با روش لکوپت و روش دستی موفقیت آمیز نبود. در حالی که شمارش نرم-افزاری گلبول‌های قرمز و ترومبوسیت‌های خون طوطی‌ها درست در محدوده‌ای بود که عموماً در پرندگان مشاهده می‌شود. بنابراین در استفاده از این روش تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

اسپاروایچنا (۲۰۱۷) روشی را برای اندازه‌گیری سلول‌های خون انسان و جوجه با استفاده از تقسیم‌بندی تصویر ارائه کرد. این محقق پردازشی براساس جداسازی تصویر به کمک آستانه‌گیری انجام داد. در این روش از نرم‌افزار GIMP برای تبدیل تصویر رنگی به خاکستری و نرم‌افزار Image J برای جداسازی سلول‌ها استفاده شد. به کمک این روش بعد از جداسازی، سطح سلول‌ها قابل ارزیابی است. همچنین محیط گلبول‌های قرمز جوجه به کمک جهات رزی^۱ محاسبه می‌شود.

الخفاجی و الخفاجی (۲۰۱۸) با استفاده از روش‌های مختلف پردازش تصویر همچون انتقال هاف^۲ توانستند شمارش گلبول‌های قرمز پنج گونه‌ی شتر، بز، سگ، طیور و ماهی‌ها را انجام دهند. آن‌ها دقت بالای ۹۵ درصد را برای هر یک از گونه‌های ذکر شده بدست آوردند و بیان داشتند استفاده از الگوریتم‌های پیشنهادی برای شمارش هر چه سریع‌تر گلبول‌های قرمز سودمند می‌باشد.

با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت شمارش گلبول‌های سفید به جهت ارزیابی وضعیت سلامت طیور، مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان استفاده از پردازش تصویر جهت شناسایی و شمارش گلبول‌های سفید جوجه گوشتی با استفاده از نرم‌افزارهای MATLAB و CellProfiler طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

روند کلی طرح

در این مطالعه از سیاهرگ بال^۳ ۱۵۲ جوجه مرغ گوشتی ۲۱ روزه به صورت تصادفی خون‌گیری شد. برای جلوگیری از انعقاد خون، سرنگ‌های آغشته به هپارین مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۳۰ گسترش خونی به روش لام به لام^۴ تهیه شد و گسترش‌ها بعد از تثبیت با متانول در محلول گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. گسترش‌ها با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر توسط میکروسکوپ Nikon Eclipse (E600) بررسی شدند و از نقاط دارای گلبول سفید با دوربین Canon E500 متصل به کامپیوتر عکس‌برداری انجام گرفت. تمامی عکس‌ها در شرایط محیطی و آزمایشگاهی یکسان تهیه شدند. در نهایت ۴۲ تصویر رنگی RGB با فرمت JPG و سایز ۱۲۸KB به انتخاب کارشناس ماهر خون‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمایش روش شمارش چشمی که روش معمول شمارش تعداد گلبول‌های سفید خون طیور می‌باشد، به عنوان روش استاندارد در نظر گرفته شد و داده‌های بدست آمده با سایر روش‌ها، به صورت درصدی از اعداد بدست آمده با شمارش چشمی محاسبه شد.

پردازش تصویر با نرم‌افزار MATLAB

در این پژوهش از نرم‌افزار MATLAB R2017a استفاده شد. برای تشخیص خودکار گلبول‌های سفید با استفاده از نرم‌افزار، از ویژگی‌های ظاهری این سلول‌ها استفاده شد. این ویژگی‌ها عبارتند از:

- ۱- رنگ هسته گلبول‌های سفید
- ۲- اندازه بزرگ‌تر گلبول‌های سفید در مقایسه با ترومبوسیت‌ها و گلبول‌های قرمز.
- ۳- اشکال متفاوت گلبول‌های سفید در مقایسه با گلبول‌های قرمز (گلبول‌های سفید دارای ظاهر گرد و گلبول‌های قرمز بیضی شکل هستند).

آشکارسازی هسته گلبول‌های سفید به وسیله پردازش رنگی تصاویر

^۳ Wing vein

^۴ Slide to slide

^۱ Rose direction

^۲ Haugh transform

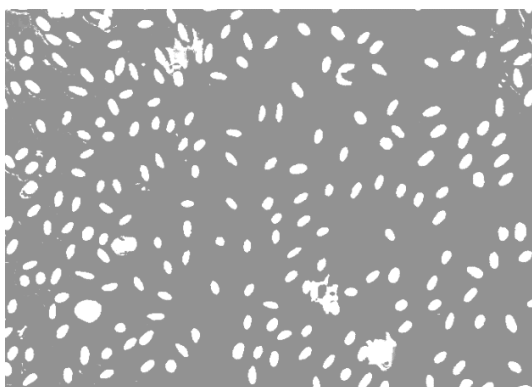


Figure4- L*a*b color space

آشکارسازی هسته گلبول‌های سفید به وسیله پردازش هندسی تصاویر

به این منظور تصاویر در سه فضای رنگی RGB، HSV و L*a*b به صورت چشمی و به منظور انتخاب فضای رنگی مناسب مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت تصاویر لایه a فضای رنگی L*a*b به دلیل تمایز هسته‌ها انتخاب شدند (شکل ۵).

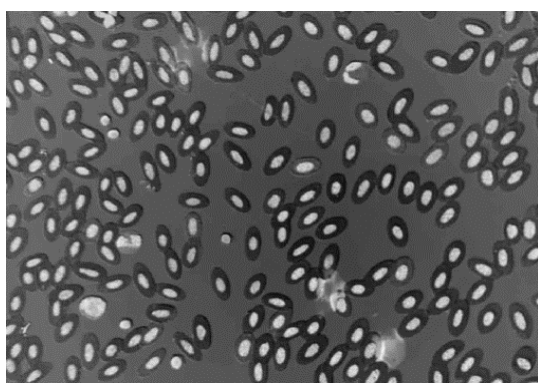


Figure5- a layer

تصاویر لایه a با یک سطح آستانه خودکار و به روش Otsu به تصویر دوسطحی تبدیل شدند (شکل ۶).

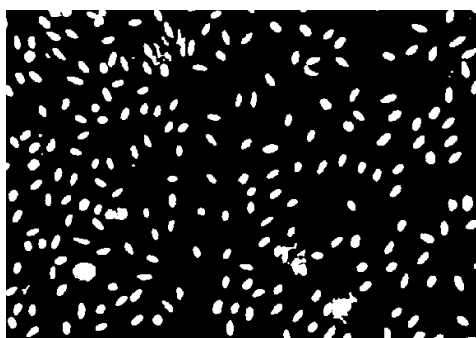


Figure6- Binary image

برای نیل به این منظور تمامی تصاویر پایگاه داده در سه فضای رنگی RGB، HSV و L*a*b بررسی شدند. ارزش‌های پیکسلی نقاط هسته‌ها نیز با ابزار Data Cursor مقایسه قرار گرفتند. شکل ۱ نمونه‌ای از تصاویر پایگاه داده می‌باشد و شکل‌های ۲، ۳ و ۴ سه فضای رنگی شکل ۱ را نشان می‌دهند.

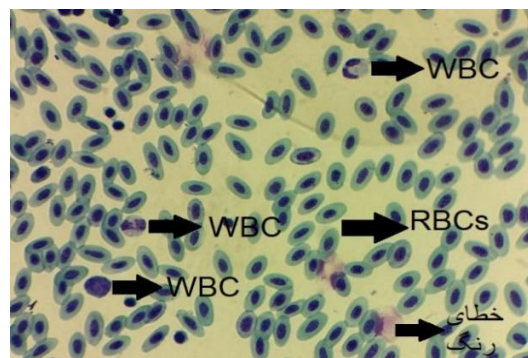


Figure 1- one image of database

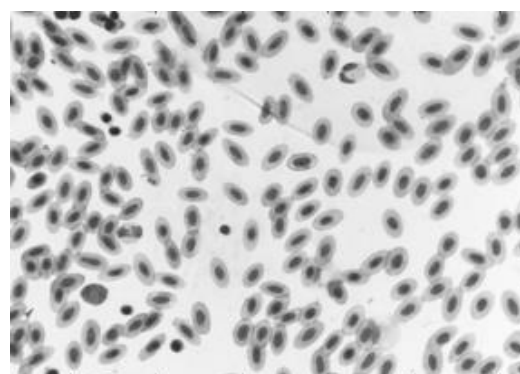


Figure2- RGB color space

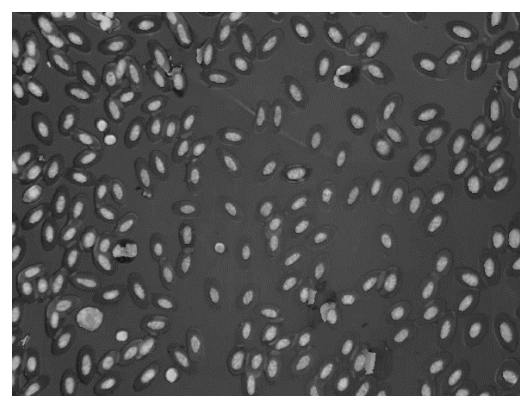


Figure3- HSV color space

گلبول‌های سفید و حذف گلبول‌های قرمز پردازش انجام شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ درصد تشخیص تعداد کل گلبول‌های سفید به روش‌های مختلف را نشان می‌دهد. در این جدول تعداد گلبول‌های سفید شمارش شده به روش دستی به عنوان استاندارد (عدد ۱۰۰) در نظر گرفته شد و سایر روش‌ها به صورت درصد نسبت به روش دستی محاسبه شدند. بین روش‌های مورد استفاده با نرم‌افزار MATLAB، روش دوم یعنی حذف مساحت‌های کمتر از ۵۰۰۰ پیکسل، توانست بیشترین تعداد گلبول سفید را درست تشخیص دهد (۸۴ درصد نسبت به روش چشمی). در حالی‌که روش‌های اول، سوم و چهارم به ترتیب ۳۵، ۴۸ و ۳۹ درصد از گلبول‌های سفید را تشخیص دادند. با استفاده از نرم‌افزار Cell Profiler نیز ۸۴ درصد گلبول‌های سفید شمارش شده توسط روش چشمی، درست تشخیص داد شد و نتایجی مشابه با روش دوم نرم‌افزار MATLAB بدست آمد.

Table 1- Percent of detected white blood cells by MATLAB and CellProfiler softwares.

Detection Methods	%
Manual detection (reference method)	100
MATLAB ^a 1	35
MATLAB ^b 2	84
MATLAB ^c 3	48
MATLAB ^d 4	39
CellProfiler ^e	84

^a = remained four larger objects in each picture.

^b = removed the areas less than 5000 pixels.

^c = Remained the objects with the form factor 1 to 1.25.

^d = Removed the areas less than 5000 pixels and remained the objects with the form factor 1 to 1.25.

^e = Image processing using cell profiler.

با توجه به درصد های بدست آمده با روش های مختلف پردازش تصویر و مقایسه آن با روش استاندارد می‌توان گفت، به دلیل محدود بودن تعداد گلبول‌های سفید، استفاده

تصاویر دوسطحی حاصل با ۴ روش برای تشخیص گلبول‌های سفید استفاده شدند (MATLAB 2017).

روش اول (MATLAB 1): در این روش کد دستوری بر مبنای اندازه اشیای موجود در تصویر اجرا شد. این کد با هدف نشان دادن اشیای بزرگتر موجود در تصویر اجرا شد؛ زیرا گلبول‌های سفید نسبت به سایر اشیای موجود در عکس اندازه بزرگتری داشتند.

روش دوم (MATLAB 2): حداکثر مساحت گلبول‌های قرمز ۵۰۰۰ پیکسل تخمین زده شد. کد دستوری این روش، حذف مساحت‌های کمتر از ۵۰۰۰ پیکسل جهت حذف گلبول‌های قرمز و باقی‌ماندن گلبول‌های سفید در تصویر است.

روش سوم (MATLAB 3): در این روش از فرمول فاکتور شکل استفاده شد (گزنالس و همکاران ۲۰۰۹).

$$\text{Form factor}_{(i)} = 4\pi (\text{Area}_{(i)} / (P_{(i)})^2$$

در این رابطه Area بیانگر مساحت و P بیانگر محیط است. برای اشکال کاملاً گرد و دایره‌ای این فاکتور برابر ۱ است. بررسی‌ها در این مطالعه نشان داد که بهترین فاکتور شکل برای گلبول‌های سفید بازه ۱-۱/۲۵ می‌باشد. بنابراین همین بازه در کد دستوری قرار گرفت و روی تصاویر اجرا شد.

روش چهارم (MATLAB 4): این روش تلفیقی از روش دوم و سوم یعنی حذف مساحت‌های کمتر از ۵۰۰۰ پیکسل به همراه بازه شکل ۱-۱/۲۵ برای شمارش گلبول‌های سفید می‌باشد.

پردازش تصویر با نرم‌افزار CellProfiler

در این مطالعه نرم‌افزار (CellProfiler 2.0 r10997) (۲۰۰۳) مورد استفاده قرار گرفت. این نرم‌افزار دارای ماژول‌های مختلف پردازش تصویر می‌باشد. در این مطالعه با استفاده از ماژول‌های تغییر کیفیت تصویر و با توجه به ماده رنگی مصرفی (گیمسا)، بهترین تصاویر که هسته‌ها در آنها کاملاً متمایز بودند انتخاب شدند و در نهایت با در نظر گرفتن قطر عمومی ۵۲-۱۸ پیکسل برای باقی‌ماندن

از این روش‌ها برای تشخیص گلبول‌های سفید سودمند نمی‌باشد؛ چرا که وجود گلبول‌های قرمز هم‌پوشان، بد-شکل و حتی خطاهای رنگ حاصل از رنگ‌آمیزی از نظر اندازه و حتی شکل با گلبول‌های سفید برابری می‌کنند و در الگوریتم پیشنهادی تداخل ایجاد می‌نمایند.

خطاهای رنگی حاصل از گسترش‌سازی نامناسب یکی از علل ایجاد خطا در الگوریتم‌های پیشنهادی می‌باشند. میریچ و جورجوانوویچ (۲۰۰۶) برای حل این مشکل یک شبکه عصبی با ۴ نورون در لایه خروجی که متناظر با انواع گلبول سفید بود، به همراه یک نورون خروجی اضافی برای زمانی که تصویر تجزیه شده شامل اجزای دیگری به جای سلول‌های سفید باشد در نظر گرفتند. آنها به کمک این روش دقت ۸۶ درصد برای تعداد کل گلبول‌های سفید مورد تست به دست آوردند.

مشکل اصلی در پردازش تصویر سلول‌های خونی طیور وجود گلبول‌های قرمز هسته‌دار است. زیرا اگرچه خطاهای رنگی با افزایش دقت در ساخت گسترش به حداقل می‌رسند، اما گلبول‌های قرمز هسته‌دار برای همیشه در خون طیور حضور دارند. در گونه‌های دیگر همچون انسان الگوریتم‌های پردازش تصویر برای شمارش سلول‌های خونی بسیار کارآمد هستند. دلیل اصلی این موفقیت هسته‌دار نبودن گلبول‌های قرمز انسان است. چندین نمونه الگوریتم تشخیصی برای شمارش سلول‌های خونی انسان معرفی شده است که هر کدام دارای دقت‌های بالایی می‌باشند.

خان و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از آستانه‌گیری دوسطحی به روش Otsu توانستند تصاویر را به سه بخش گلبول سفید، قرمز و زمینه تقسیم‌بندی کنند و با حذف قسمت‌های مورد نظر شمارش گلبول‌های سفید را انجام دهند. اما در مطالعه حاضر آستانه‌گیری دوسطحی برای جداسازی تصویر به سه بخش پاسخگو نبود.

در مطالعه رامش و همکاران (۲۰۱۲) بر روی خون انسان با کمک اطلاعات مربوط به رنگ و شکل گلبول‌های سفید و لبه‌یابی برای تشخیص هسته سلول، پردازش تصویر با

کمک نرم‌افزار MATLAB انجام شد. آنها به کمک این الگوریتم توانستند انواع گلبول‌های سفید را تشخیص دهند و به دقت ۹۳/۰۸ درصد دست یابند.

زانگ و همکاران (۲۰۱۴) نیز با استفاده از خوشه‌بندی k-mean، روشی را برای شمارش گلبول‌های سفید انسان ارائه کردند و توانستند گلبول‌های سفید را در پنج دسته طبقه‌بندی کنند و دقتی معادل ۹۳ درصد را به دست آوردند. بهات و پرابا (۲۰۱۵) به کمک فرمول فاکتور شکل و با روش پردازش تصویر توسط نرم‌افزار MATLAB توانستند چهار نوع سلول غیر طبیعی موجود در تصاویر خون انسان را تشخیص دهند. آنها بیان داشتند فاکتور شکل برای سلول‌های خونی در حدود ۰/۸-۱ و برای دیگر اشکال موجود در خون ۰/۶-۰/۴ است و بر این اساس توانستند کل تعداد سلول‌ها را تخمین بزنند. مطالعه‌ی آنها نشان داد که شمارش کامپیوتری با شمارش دستی برابری دارد.

باگواتی و توماس (۲۰۱۶) با استفاده از منطق فازی و به کمک نرم‌افزار MATLAB روشی را برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید انسان ارائه کردند. آنها با استفاده از این روش یک واسطه گرافیکی کاربر ایجاد کردند که تعداد گلبول‌های قرمز و سفید را نشان می‌داد.

قانع و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از الگوریتم ترکیبی خوشه‌بندی k-means و آستانه‌گیری اصلاح شده، شمارش سلول‌های سفید خون انسان را انجام دادند. روش آنها شامل سه مرحله بود که عبارتند از: جداسازی گلبول‌های سفید از تصاویر میکروسکوپی، استخراج هسته‌ها از تصاویر سلول‌ها و جداسازی سلول‌ها و هسته‌های هم‌پوشان. آنها دقت ۹۲/۰۷، ۹۶/۰۷ و ۹۴/۳۰ برای جداسازی هسته‌ها و دقت ۹۲/۹۳، ۹۷/۴۱ و ۹۳/۷۸ را برای جداسازی سلول‌ها بدست آوردند.

ادراکی و رزمی نیا (۲۰۱۷) از روش خوشه‌بندی k-means برای بخش‌بندی تصاویر سلول‌های خونی انسان استفاده کردند. آنها همچنین یک شبکه عصبی کانولوشنی عمیق را برای طبقه‌بندی گلبول‌های سفید

مورد استفاده قرار دادند و در نهایت به دقت ۹۹ درصد در بخش طبقه‌بندی دست یافتند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش پیشنهادی ما با شمارش گلبول‌های سفید به صورت شمارش دستی اختلاف داشت (جدول ۱). بیفرر و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از نرم افزار CellProfiler شمارش سلول‌های خونی نوعی طوطی را انجام دادند و گزارش کردند که هیچ روشی جایگزین روش چشمی نمی‌شود.

به همین دلیل با اینکه شمارش‌گرهای خودکار خون-شناسی (برای مثال CellaVisionDM96)، برای پستانداران تجاری‌سازی شده‌اند؛ اما گزارشی مبتنی بر استفاده از این تکنیک برای شمارش سلول‌های خونی پرندگان در دسترس نیست. این ماشین از گسترش‌های خونی، یادگیری ماشین و بازخورد تکرارشونده استفاده می‌کند و قادر به تعیین انواع سلول‌های ناهنجار مثل سلول‌های نئوپلاستیک^۱ است (کراتز و همکاران ۲۰۰۵). لیلی‌هوک و تی‌وتن (۲۰۱۱) شمارش افتراقی سلول‌های خونی سگ را به سه روش خودکار در مقایسه با روش دستی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که شمارش سلول‌ها با CellaVisionDM96 مشابه با شمارش آنها در روش دستی است.

تعیین دلایل اختلاف مشاهده شده در گزارشات مربوط به طيور با پستانداران دقیق مشخص نیست؛ اما می‌توان گفت ویژگی‌های گسترش خونی مثل ضخامت، مساحت سلول-ها، توزیع فضای سلولی (بسته به سطح گسترش خونی)، ظاهر مشابه ترومبوسیت‌ها و لنفوسیت‌های کوچک و هسته چند قسمتی هتروفیل پرندگان می‌تواند بر نتایج تاثیر بگذارند. بعلاوه آماده‌سازی گسترش‌ها به روش دستی باید دارای کمترین خطای ممکن باشد و زمان رنگ-آمیزی برای تمامی اسلایدها یکسان در نظر گرفته شود. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که روش‌های نرم-افزاری مورد استفاده، جایگزین خوبی برای تخصص و

تجربه یک فرد آموزش‌دیده نمی‌باشند. از طرفی شمارش سلول‌های خونی به روش دستی زمان‌بر و تا حدودی ذهنی و سلیقه‌ای است. با وجود پیشرفت‌های فوق‌العاده در یادگیری ماشین، تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که بشر توانایی بینایی بهتری نسبت به ماشین دارد. با این حال ماشین‌ها در مواردی مانند محاسبه خواص پیچیده هندسی، انجام اندازه‌گیری‌های دقیق، ارزیابی‌های آماری و ارزیابی مجموعه‌ای از قوانین پیچیده توانایی بالاتری دارند و می‌توانند به سرعت با نمونه‌های آموزشی منطبق شوند. انسان و ماشین تفاوت‌هایی در الگوی توانایی‌های شناختی و ادراک تصویر نیز دارند. ماشین‌ها وظایف‌شان را سریع‌تر انجام می‌دهند، قادر به نگهداری حجم بالایی از اطلاعات می‌باشند، قادر به اندازه‌گیری ویژگی‌هایی هستند که انسان توانایی آن را ندارد، هرگز فراموش نمی‌کنند و باعث کاهش نیاز به پرسنل آموزش‌دیده می‌شوند.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد استفاده از روش-های پردازش تصویر برای شمارش سلول‌های خونی طيور ارزشمند بوده و نیاز به تحقیقات بیشتری برای استفاده از روش‌های شبکه عصبی و یادگیری ماشین در جهت شمارش صحیح سلول‌های خونی می‌باشد.

سپاسگزاری

با تشکر و سپاس ویژه از مسئولین محترم آزمایشگاه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان و همچنین آقای دکتر میران زاده به دلیل مساعدت در تهیه گسترش‌های خونی و شناسایی سلول‌های خونی که در انجام این پژوهش از هیچگونه زحمتی دریغ نکردند.

^۱ Neoplastic cells

منابع مورد استفاده

- Al-Khafaji KH and Al-Khafaji AH, 2018. Diagnoses of blood disorder in different animal species depending on counting methods in blood cell images. *International Journal of Engineering and Technology* 7: 660-664.
- Beaufriere H, Ammersbach M and Tully Jr TN, 2013. Complete blood cell count in psittaciformes by using high throughput image cytometry: a pilot study. *Avian Medicine and Surgery* 27: 211-217.
- Bhagavati SL and Thomas N, 2016. An automatic system for detection and counting rbc and wbc using fuzzy logic. *Engineering of Application Science* 11: 6891-6894.
- Bhatt M and Prabha S, 2015. Detection of abnormal blood cells using image processing technique. *International Journal of Electrical and Electronics Engineers* 7: 89-94.
- Edraki A and Razminia A, 2017. Classification of white blood cells using convolutional neural network. *Iran South Medical Journal* 21(1): 65-80.
- Gonzalez RC, Woods RE and Eddins SL, 2009. *Digital image processing using matlab*. Gatesmark Publishing.
- Ghane N, Vard A, Talebi A and Nematollahy P, 2017. Segmentation of white blood cells from microscopic images using an ovel combination of k-means clustering and modified watershed algorithm. *Journal of Medical Signals & Sensors* 7: 92-101.
- Harrison G and Lightfoot T, 2005. *Diagnostic value of hematology*. Pp. 587-610. Avian medicine press.
- Khan S, Khan A, Khattak FS and Naseem A, 2012. An accurate and cost effective approach to blood cell count. *International Journal of Computer Application* 50: 18-24.
- Kratz A, Bengtsson H and Casey J, 2005. Performance evaluation of the cellavision dm96 system; wbc differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network. *Clinical Pathology* 124: 770-781.
- Lillihook IE and Tvedten HW, 2011. Canine differential leukocyte counting with the cellavision dm96 vision, sysmex xt-2000iv and advia 2120 hematology analyzers and a manual method. *Veterinary Clinical Pathology* 40: 324-339.
- Lin SF and Hong YB, 2012. Differential count of white blood cell in noisy normal blood smear. Pp. 1784-1789. *Proceedings of the 7th ICIEA Conference*. Singapore, Singapore.
- Maitra M, Kumar Gupta R and Mukherjee M, 2012. Detection and Counting of Red Blood Cells in Blood Cell Images using Hough Transform. *International Journal of Computer Applications* 53: 18-22.
- Massachusetts Institute of Technology, 2003. *CellProfiler cell image analysis Software Version 2.0* (r10997), NC: Massachusetts Institute of Technology Inc.
- MathWorks Institute, 2017. *MATLAB R2017a* (9.2.0.538062), NC: MathWorks Institute.
- Mircic S and Jorgovanovic N, 2006. Automatic classification of leukocytes. *Automatic Control* 16: 29-32.
- Naazifi S, 1998. *Hematology and clinical bio chemistry of avian*. Shiraz university press, Shiraz, Iran.
- Ramesh N, Dangot B, Salama ME and Tasdizen T, 2012. Isolation and two-step classification of normal white blood cells in peripheral blood smears. *Pathology Information* 36: 3-13.
- Sakas P, 2002. *Essentials of avian medicine: a practitioner's guide* (2nd ed). AAHA press, USA.
- Sparavigna AC, 2017. Measuring the blood cells by means of an image segmentation. *Philicia* 4: 40-49.
- Vives-corrons JL, Besson I, Mariajou J and Gutierrez G, 1996. Evaluation of the abbott cell-dyn 3500 hematology analyzer in a university hospital. *Clinical Pathology* 105: 553-559.
- Zhang C, Xiao X, Li X, Chen Y, Zhen W, Chang J, Zheng C and Liu Z, 2014. White blood cell segmentation by color-space-based k-means clustering. *Sensors* 14: 16128-16147.

Detection, and counting of white blood cells in broiler chickens using image processing

R Borumand Poor¹, M Sedghi^{2*} and AH Mahdavi²

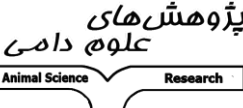
Received: November 20, 2019

Accepted: September 2, 2020

¹MSc Student, Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran 84156-83111

²Assistant Professor and Associate Professor, Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran 84156-83111

* Corresponding author: Email: Mo.Sedghi@iut.ac.ir

	Journal of Animal Science/vol.31 No.1/ 2021/pp 27-36 https://animalscience.tabrizu.ac.ir	
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/as.2021.36381.1528		

Introduction: The analysis of blood cells is used for detecting several diseases in human and animals. White blood cells, also called leukocytes, are an important part of the body's defense system against disease. In response to infection, the white blood cells (WBC) count typically increases (Sparavigna 2017). Therefore, measurement of the WBC count able to give an indication if there is infection or inflammation occurring. Increases in WBC can also occur in some cancer conditions such as leukemia. A bird under stress may also have a high level WBC, but greater elevations are a definite indication of disease. Reduced numbers of WBCs can occur due to bone marrow disease, severe acute disease and other conditions. White blood cell counts can be determined by various methods either through estimation or varied counting techniques. At this time, there is no automated system, such as is used with humans or dogs and cats that has proven effective for determining avian white blood cell counts (Sakas 2002); this is because of avian blood cells are nucleated, therefore, leukocytes cannot be separated from other blood cells. Bare nuclei from lysed cells, nucleated thrombocytes, and lymphocytes are all of similar sizes and difficult to distinguish by impedance or light scatter properties, and the contents of the leukocyte granules of birds differ from those of mammals. In addition, morphologic differences between avian species commonly limits the development of automatic protocols. These qualities limit the use of centrifugal hematologic analyzers such as quantitative buffy coat analysis, impedance, and laser cytometry tools to differentiate all types of cells (Harrison and Lightfoot 2005). Total WBC count is usually performed in laboratory by using manual techniques and hemocytometer. Differential counting has also been done by stained blood smear and light microscopy. Present of nucleated erythrocytes and thrombocytes in avian blood prevents from automated method that have been developed for mammals. Also, manual counting is time-consuming and requires to an experienced technician (Beaufriere and et al. 2013). The evaluation of blood smears for cell differentiation and detection of anomalies is a complex process and many morphological aspects of the cells are assessed and analyzed. Therefore, because human visual perception is a type of computation, it is possible that digital images can be analyzed by using a similar process. Content-based image indexing and retrieval has been an important research area in computer science for the last few decades. Many digital images are being captured and stored such as medical images, architectural, advertising, design and fashion images, etc. As a result large image databases are being created and being used in many applications (Maitra and et al. 2012). Therefore, this project carried

out to examine the applicability of image processing system for rapid detection of white blood cell in broiler chickens.

Material and methods: Blood samples were taken from 15 broiler chicks, and then blood smears stained with Giemsa color and finally were photographed by Canon E500. A total number of 80 RGB color image were created in jpg format, 42 images were selected and WBC counted by confirmation hematology expert. After that the images were processed by MATLAB R2017a and CellProfiler (CP 2.0 r10997) softwares. The appearance of WBC such as the color, shape and size were considered by MATLAB software. The images were examined in RGB, HSV and L*a*b color spaces. Visual examination and index recording showed that the color feature in all color spaces is not useful for detecting WBC. Since the cell nucleus was more distinct in a-layer images than other layers, the image of this layer was used for further processing. The a-layer images converted to binary images by a threshold. Then obtained binary image examined by the implementation of different conditional ring based on their size and shape. Two methods were used based on size; the first method is based on remaining four larger objects, and the second method removed the areas less than 5000 pixels in the image. In the shape method the interval 1-1.25 was considered to be form a factor for remaining the round objects and in the combined method, the removal of area less than 5000 pixels with an interval 1-1.25 have been considered. In the image processing by cellProfiler software, different modules and typical diameter 18-52 pixel for objects were used.

Results and discussion: Among the different methods, the image processing with MATLAB software, and the use of second method (removed areas less than 5000 pixels in the image) had the highest number of diagnostic cells (84% of WBC were correctly detected). The rate of diagnostic cells of other method (first, third and fourth) were 35, 48 and 39% respectively. In the image processing by cellProfiler software, by using various modules and typical diameter 18-52 pixel for objects, WBC was identified in the rate of 84%. The results of our study show that our methodology was not consistent enough to agree with WBC counts obtained by using manual differential, which invalidates our initial hypothesis. Therefore, it is speculated that variability in the blood smear features, such as smear thickness, cell spread, and, therefore, surface area, cell touching, uneven spatial cell distribution (depending on areas of the blood smears), and the similar appearance of thrombocytes and small avian lymphocytes could contribute to the results. Color error and nucleated red blood cells are the biggest problem in this project and more advance algorithms are required to solve this problem. Based on our results it seems that nothing can replace the expertise of a trained technician or veterinarian, but manual CBC determination is time consuming, partially subjective, and semi quantitative. Despite tremendous advances in the machine learning, recent investigations have shown that humans have better visual categorization abilities than machines. However, machines are better, for instance, at computing complex geometric properties, performing more precise measurements and statistical evaluation, and evaluating complex sets of rules, and they can adapt quickly from training samples.

Conclusion: Although our technique did not provide satisfactory results in its present form, we hope that this approach can still stimulate further research in the application of digital image analysis. Generally, the results showed that more advanced machine-learning algorithms and neural networks are required to be test for counting and differential white blood cell diagnostics.

Keywords: Broiler, Color image processing, Morphological image processing, White blood cells