

Identificación automática de nosemosis en imágenes microscópicas

Castro Patricio Nicolas¹, Cambarieri Mauro German¹, Abate Sergio Damián^{2,4}, Britos Paola Verónica^{1,3}, Vivas Hector Luis¹

¹ Laboratorio de Informática Aplicada LIA – Licenciatura en Sistemas - Universidad Nacional de Río Negro

² Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (Funbapa)

³ Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Tecnologías de Visualización, Computación Gráfica y Código Creativo - Universidad Nacional de Río Negro

⁴ Ingeniería Agronómica y Licenciatura en Cs. del Ambiente - Universidad Nacional de Río Negro - Sede Atlántica

{pcastro, mcambarieri, pbritos, lvivas, sabate}@unrn.edu.ar

Resumen. La nosemosis es una enfermedad que afecta a las abejas melíferas, se asocia al síndrome de mortandad de colmenas y a la disminución significativa de la producción de miel. *Nosema apis* y *Nosema ceranae* son los microsporidios que generan nosemosis cuando se reproducen en el intestino de las abejas y afectan su normal funcionamiento digestivo. Actualmente la detección y el recuento de esporas de nosemas por abeja constituye el diagnóstico: aquellas colmenas con recuentos de nosema superiores a un valor límite deben ser medicadas. Este diagnóstico se realiza de forma manual, mediante el uso de microscopio óptico para observar y contar el número de nosemas por abeja. Este método tiene diversas limitaciones, entre las que destacan la demanda de tiempo, y la alta variación inter-laboratorios debido a la elevada incertidumbre de medición y subjetividad del operario. El presente trabajo, busca diseñar un sistema innovador que pueda detectar y contar las esporas de *Nosemas spp.* automáticamente, utilizando métodos y técnicas de visión artificial, para superar así las limitaciones del método manual.

Keywords: Nosemosis, visión artificial, opencv.

1 Introducción

La nosemosis es una enfermedad ocasionada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, que afecta las funciones digestivas de las abejas productoras de miel (Fries, 2010). Las consecuencias de la enfermedad son tales que pueden afectar a colmenas enteras matando a todos sus individuos, un fenómeno conocido como Síndrome de despoblamiento de colmenas (Meana, Martin y Higes, 2009). Asimismo, es una enfermedad que ha generado preocupación a nivel mundial (OIE, 2013) sobre todo por la resistencia ambiental de las esporas formadas por estos microsporidios así como la facilidad para su difusión.

Las esporas de *Nosema spp* presentan una forma oval cuya medida varía entre 5-7µm x 3-4µm aproximadamente, con un contorno oscuro (OIE, 2013). Con el fin de confirmar el diagnóstico de la enfermedad, una muestra que contenga el tracto intestinal de las abejas melíferas es analizada mediante trituración y observación a 400 aumentos utilizando un microscopio óptico (OIE, 2013). La cantidad de esporas por abeja indica la gravedad de la infección: superado determinado índice, se indica realizar un tratamiento medicamentoso para evitar la mortalidad de la colmena, motivo por el cual el diagnóstico no solo consiste en determinar la presencia sino en cuantificar la concentración de esporas de nosemas por abeja, con el menor factor de error posible.

El método actualmente empleado y consensuado internacionalmente para laboratorios de diagnóstico se basa en identificar y contar el número de esporas de manera visual, colocando el macerado de abeja en una cámara de recuento celular (cámara de Neubauer) y observando mediante microscopía común. Este análisis es elevadamente subjetivo: por un lado, esta identificación depende de la capacidad y el criterio de cada laboratorista; por otro lado, la observación microscópica durante más de una hora constituye una causa de agotamiento visual y deterioro de la capacidad de concentración, y por ser una tarea repetitiva contribuye a que se cometan errores. Por consiguiente, es un trabajo tedioso, que consume mucho tiempo y genera resultados poco precisos. La demanda de tiempo, además, constituye una limitación que impide evaluar la totalidad de las colmenas de un apiario. Por este motivo usualmente se selecciona el 5% de las colmenas de un apiario para muestreo, extrapolando el resultado obtenido al resto de las colmenas del mismo. Este aspecto no es menor debido a que la nosemosis no se distribuye de manera homogénea en un apiario: los resultados obtenidos del análisis de algunas colmenas no son representativos de lo que ocurre en las restantes. En el caso en que fueran seleccionadas por azar colmenas con alto grado de infección, estaría indicada la medicación del total de las colmenas del apiario, aun cuando estas no tuviesen altos índices de infección de nosemosis, incurriendo en un elevado costo para el apicultor y generando problemas potenciales de salud pública y comercialización por presencia de residuos de antimicrobianos en miel. En sentido contrario, en el caso en que por azar el 5% de colmenas muestreadas no presentara un alto índice de infección de nosemosis, estaría contraindicada la medicación del apiario, en cuyo caso es altamente probable que algunas colmenas infectadas y no incluidas en el muestreo mueran por nosemosis en el curso del año.

En las últimas décadas el diagnóstico de enfermedades en el laboratorio ha usado sistemas informáticos desarrollados con técnicas de visión artificial, lo cual también puede aplicarse para la nosemosis. A medida que la tecnología avanza se hace posible encontrar una manera eficaz de identificar y contar las esporas de forma automática. Imágenes de muestras de abejas procesadas para el diagnóstico de nosemosis y tomadas desde el microscopio óptico, pueden proporcionar información cualitativa y cuantitativa importante que permita la sustitución de la visión humana por un método automático como el propuesto, brindando la posibilidad de obtener un criterio unificado y objetivo en el diagnóstico de nosemosis.

Contar con un método alternativo que permita estudiar la totalidad de las colmenas del apiario, brindaría una herramienta diagnóstica para el eficiente control de esta enfermedad. Esta tarea se podría realizar a través de la visión por computador, área de la inteligencia artificial, ya que permite a las computadoras entender el mundo visual al igual que los seres humanos. El objetivo de este trabajo se centra en la identificación de la forma y tamaño de las esporas de *nosemas* en las microfotografías digitales, para desarrollar un sistema automatizado que permita su identificación y cuantificación, usando la biblioteca OpenCV con el lenguaje de programación Java (Baggio, 2015).

2 Solución propuesta

Uno de los principales problemas al desarrollar un sistema de visión por computador es poder elegir las técnicas de procesamiento adecuadas para conseguir extraer la información necesaria (Gonzalez & Woods, 2008) y lograr el objetivo planteado. En consecuencia, se probaron distintas técnicas basadas en diferentes sistemas automatizados desarrollados precisamente en esta misma área (Alvarez-Ramos, 2010; Alvarez-Ramos, 2010). De ahí que se realizaron diferentes etapas para poder elaborar el trabajo, entre las cuales se encuentran la adquisición de la imagen, el pre-procesamiento, la segmentación, la búsqueda de contornos, la detección de elipses y, por último, el conteo de estas elipses que en este contexto representan las esporas de *nosemas*.

2.1 Adquisición de la imagen

La adquisición de la imagen se realizó a través de una cámara digital para microscopio marca Mikoba modelo DCM900 (USB2.0) de 9 Megapíxeles, con chip CMOS, montada a un microscopio óptico marca Leica modelo DM500 (ver figura 1). Las imágenes se obtuvieron con objetivo de microscopio seco de 40X, adquiriendo 400 aumentos totales, y se digitalizaron utilizando el software propio de la cámara fotográfica.



Fig. 1 – Elementos de adquisición de la imagen

Se tomó una muestra de abejas pertenecientes a un apiario de la localidad de Carmen de Patagones, que se conservaron con alcohol etílico hasta su procesamiento conforme método estandarizado (OIE, 2013), Con el fin de conocer aquellos parámetros dependientes de métodos de microscopía óptica que permitan obtener imágenes con menor ruido de fondo, se evaluaron imágenes directas (ver Figuras 9 y

10) e imágenes obtenidas luego de incluir diferentes modificaciones a las técnicas microscópicas básicas, como el agregado de colorantes (colorante azul número 2 del kit T15, Biopur) y uso de microscopía de contraste de fase (ver Figuras 7 y 8). Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica - Funbapa, laboratorio LR: 0016 (Red Nacional de Laboratorios del SENASA). Se seleccionaron 12 imágenes de un total de 24, obtenidas en la primera sesión de captura, para incluirlas en la primera etapa de pruebas y validación del método desarrollado, en base a su diversidad en calidad y cantidad de nospas según el método estándar o manual.

2.2 Preprocesamiento

Como se mencionó anteriormente, se aplicaron diversas técnicas de pre-procesamiento de imágenes microscópicas, tales como la conversión a escala de grises, filtro de desenfoque gaussiano, umbral adaptable y transformaciones morfológicas. Se pueden visualizar los resultados de estas en técnicas en las Figura 2 a la Figura 5.

El objetivo principal de aplicar estas técnicas es mejorar la calidad de la imagen. En principio se convirtió la imagen de la muestra a escala de grises, con el fin de eliminar los niveles de tono y saturación, manteniendo la luminancia. Después de eso, se aplicó el filtro de desenfoque gaussiano para hacer la imagen más suave usando un núcleo de convolución obtenido mediante experimentación. Así, al estar más suavizadas se detectan menos los bordes del fondo y se destacan los bordes de las esporas.

La técnica de umbral adaptable se utiliza para transformar las imágenes resultantes en imágenes binarias y eliminar la mayor parte del fondo de la misma. Las operaciones morfológicas, como la dilatación y la erosión se aplican a la imagen binaria para aumentar el relieve de los bordes y eliminar en mayor medida aquellos objetos que no se desean detectar para lograr una resultante más satisfactoria.

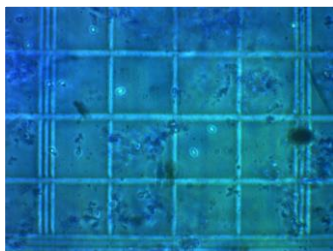


Fig. 2 – Imagen Original

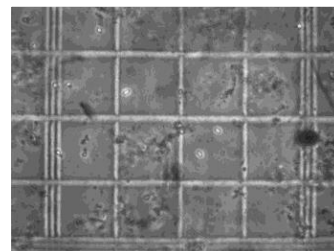


Fig. 3 – Imagen pre-procesada en escala de grises

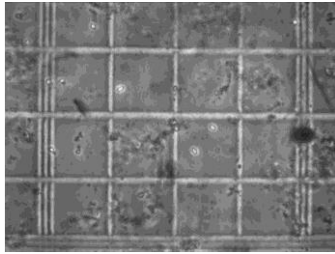


Fig. 4 – Imagen pre-procesada con el filtro Gaussian Blur

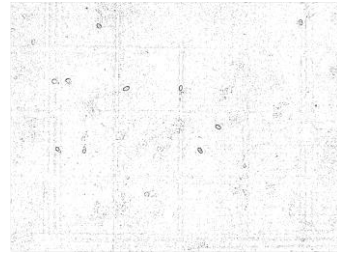


Fig. 5 – Imagen binarizada utilizada para encontrar los contornos

2.3 Búsqueda de contornos

Para llevar a cabo la tarea de encontrar los contornos de cada espora, se emplea la función de la biblioteca OpenCV llamada *findContours* (“Structural Analysis and Shape Descriptors — OpenCV 2.4.13.0 documentation,” n.d.-b) que utiliza algoritmo Suzuki (Suzuki, 1985) en su implementación. Esta es capaz de extraer todos los contornos de los pixeles presentes en la imagen con valor diferente a cero. Aquí sólo se utilizaron los bordes exteriores de las esporas que se encontraban en las imágenes (12 casos), y que esa información era necesaria para poder contabilizarla como una posible espora. En la Figura 6 se puede observar el resultado de los contornos obtenidos a partir de la imagen binarizada.



Fig. 6 – Búsqueda de los contornos

2.4 Detección de elipses

Como las esporas de nosemas pueden ser consideradas elipses, se aplicó la función *fitEllipse* (“Structural Analysis and Shape Descriptors — OpenCV 2.4.13.0 documentation,” n.d. -a) proporcionada por la librería OpenCV, que implementa el algoritmo de detección de elipses propuesto por Fitzgibbon (Fitzgibbon, 1995). Dado un conjunto de puntos retorna la elipse que mejor se adapta a estos puntos, en un término de mínimos cuadrados.

La imagen resultante devolverá una elipse para cada contorno, motivo por el cual en la siguiente etapa se filtra dicha imagen para descartar aquellas elipses que no tengan el tamaño deseado.

2.5 Conteo de esporas

Por lo general, las esporas de nosemas tienen una forma elíptica más alargada que circular y con un determinado tamaño que varía en un rango de 5-7 μ m x 3-4 μ m aproximadamente. Considerando estas medidas, se asumió que toda figura preseleccionada de forma elíptica con medidas de ancho y longitud de la elipse dentro del rango mencionado, correspondería a una espora de *Nosema* spp. En caso contrario, la parametrización descartó del conteo las elipses al no pertenecer al criterio de selección.

3 Resultados

3.1 Comparación del tiempo para análisis de nosemosis entre ambos métodos

Se midió el tiempo empleado para identificar y contar las esporas de nosemas en cada una de las 12 muestras, utilizando el minuto como unidad de tiempo. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 – Comparación del tiempo insumido entre el método manual y el automático.

| Caso | Tiempo con método automático | Tiempo con método manual |
|---------------------|------------------------------|--------------------------|
| 1 | 0,1 | 3,8 |
| 2 | 0,1 | 4 |
| 3 | 0,1 | 4,3 |
| 4 | 0,1 | 3,5 |
| 5 | 0,1 | 4,4 |
| 6 | 0,1 | 4,7 |
| 7 | 0,1 | 4,8 |
| 8 | 0,1 | 5 |
| 9 | 0,1 | 5,1 |
| 10 | 0,1 | 4,3 |
| 11 | 0,1 | 3,9 |
| 12 | 0,1 | 3,5 |
| Tiempo Total | 1,2 | 51,3 |

3.2 Comparación de la eficiencia para análisis de nosemosis entre ambos métodos

Una vez que se llevaron a cabo todas las etapas, se validó la eficiencia del método propuesto, comparando los resultados del conteo de forma manual (método actualmente utilizado que se consideró como prueba de referencia o “gold standard”) con el conteo automático.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con uno de los casos estudiados (caso número 12), caracterizado por una diferencia mínima entre el número de esporas identificadas aplicando el método automático (ver Figura 7) y el método manual (ver Figura 8).

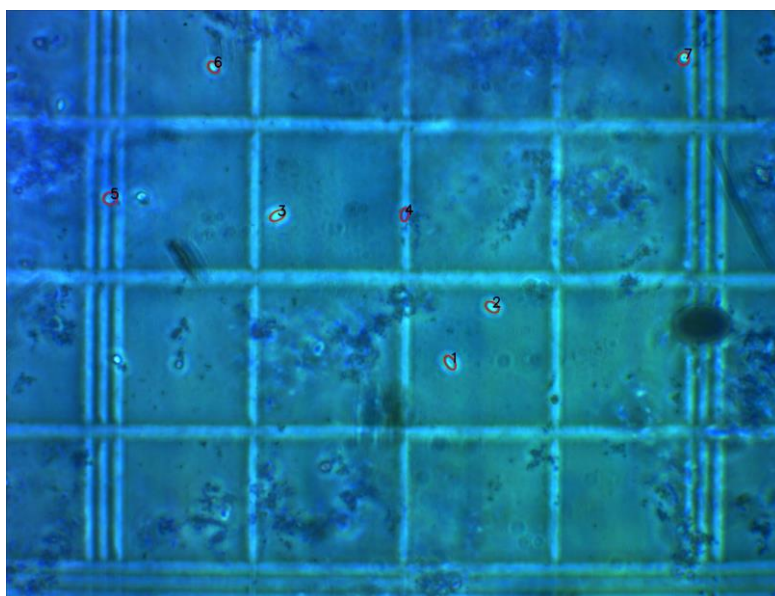


Fig. 7 – Imagen con las esporas etiquetas aplicando el método automático

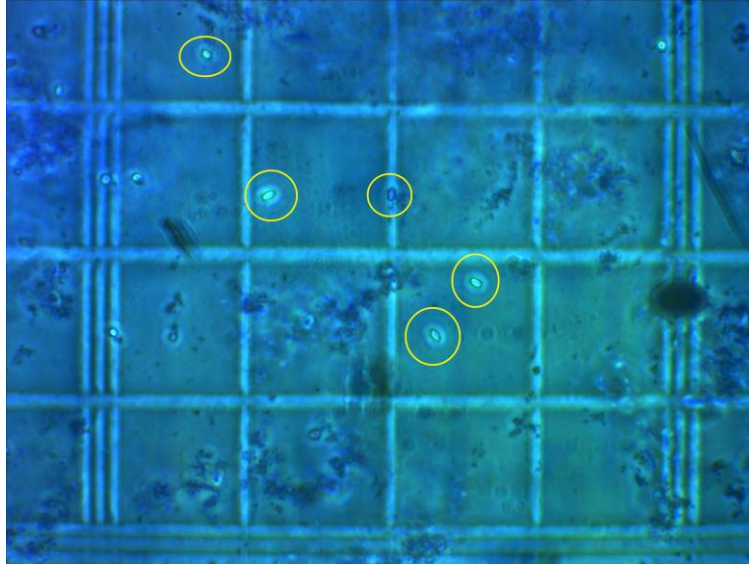


Fig. 8 – Imagen con las esporas etiquetas aplicando el método manual

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con otro de los casos (caso número 8), con el que se observó la mayor diferencia entre el número de esporas identificadas aplicando el método automático (ver Figura 9) y el método manual (ver Figura 10).

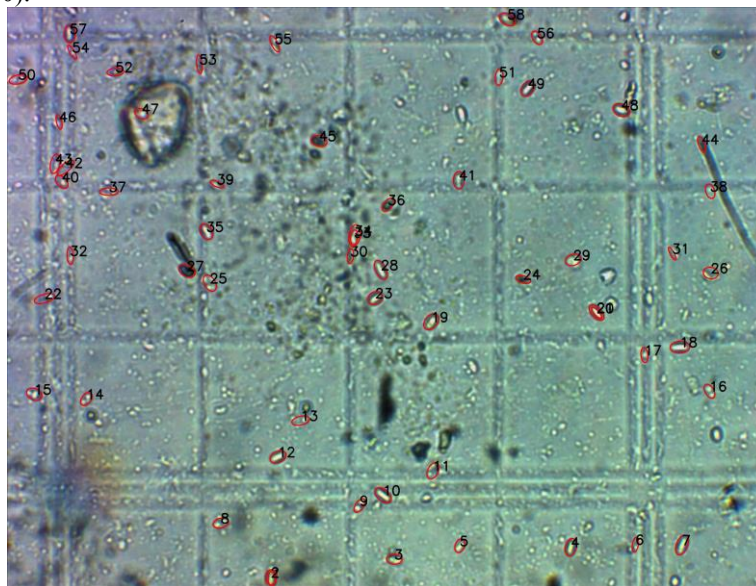


Fig. 9 – Imagen con las esporas etiquetas aplicando el método automático

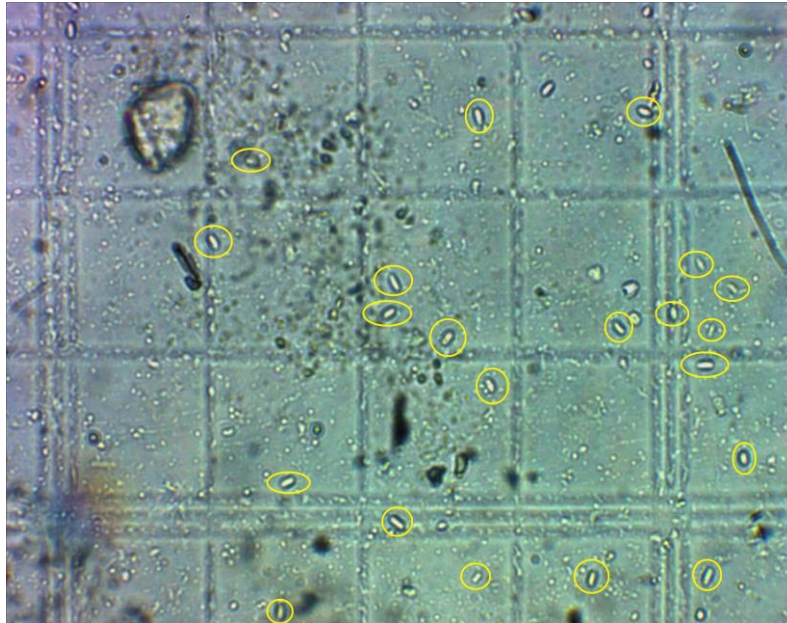


Fig. 10 – Imagen con las esporas etiquetas aplicando el método manual

Los resultados de los 12 casos tratados (imágenes), comparando identificación y recuento por ambos métodos, se muestran en la Figura 11.

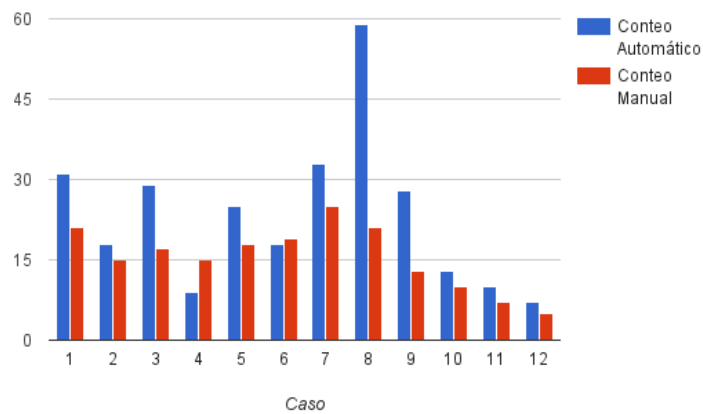


Fig. 11. Comparación de recuentos de esporas de *Nosema* spp por método automático y manual

4 Conclusión

En este trabajo se presentó un método para la identificación y conteo de esporas de *nosemas* de forma automática en imágenes microscópicas basado en su forma y tamaño.

En 11/12 casos estudiados (aproximadamente el 92 %), los resultados obtenidos al comparar ambos métodos fueron similares (ver figura número 11). En 1/12 casos estudiados (aproximadamente el 8 %) se observó una diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos (ver caso número 8 en la figura número 11). En este caso, el método automático identificó 59 esporas, de las cuales 38 fueron falsos positivos al comparar con el método manual que identificó solo 21 esporas. Se asumió que el método automático identificó falsos positivos debido a que el método manual fue considerado como método de referencia. Este criterio se confirmó aplicando el método manual a la imagen del caso 8 procesada por el método automático, y confirmando que el mismo contabilizó como esporas a objetos diferentes.

La imagen del caso número 8 se obtuvo luego de realizar un procesamiento estándar y mínimo de la muestra: mortereado de abejas, suspensión en agua usando un volumen en mililitros igual al número de abejas mortereadas. Esta suspensión se homogeneizó y se sometió a observación microscópica, para obtener la imagen digital final sin aplicar procesamientos adicionales tendientes a eliminar cualquier ruido de fondo sobre la imagen de la muestra, conforme recomendaciones estandarizadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2013). En este tipo de imágenes, el ojo humano debe realizar un gran esfuerzo para discernir, reconocer y contar las esporas de *nosemas*. Evidentemente, en este tipo de situaciones, el cerebro humano pone en juego simultáneamente muchos otros criterios además del reconocimiento de tamaño y forma, para discernir entre un caso positivo (espora) de un caso negativo (no espora), como el brillo, el aspecto de la superficie de la espora, la homogeneidad de la refringencia, etc. Dado que hasta el momento el diagnóstico de *nosemosis* se realiza por observación microscópica mediante visión humana, se comprende que los procedimientos de procesamiento de muestras de abejas no hayan reparado en la necesidad de mejorar los protocolos de procesamiento para obtener imágenes con menos factores de confusión, con el fondo más claro y libre de objetos que no sean esporas de *nosemas*, situación que con el uso de la visión artificial se ha identificado como un problema. En el resto de los casos, antes de obtener las imágenes digitales se realizaron procesamientos adicionales a las recomendaciones de la OIE, que mejoraron la calidad de las mismas. Podemos concluir que el método automatizado que se describe en este trabajo, conforme la parametrización aplicada, es de utilidad solo para imágenes con bajo nivel de ruido de fondo (ver figuras 7 y 8), y es aplicable para muestras de abejas procesadas con pasos adicionales a los sugeridos por la OIE.

El método automático se mostró significativamente más veloz que el método manual: para la observación de 12 muestras, consumió 50 veces menos tiempo (ver tabla número 1). Asumiendo que en 1,2 minutos el método pudo procesar 12 muestras, en una jornada de 8hs de trabajo el método sería capaz de procesar al menos

4.800 muestras, mientras que el método manual solo podría procesar 90. Considerando apiarios promedio de 100 colmenas, en un día de trabajo el método automático sería capaz de procesar las muestras de todas las colmenas de 48 apiarios, mientras que el método manual no alcanzaría a procesar la totalidad de las colmenas de un solo apiario. Si este análisis se traduce en costo económico del análisis de nosemosis, se puede pensar en que el método automatizado podría disminuirlo en 50 veces la fracción del costo debida a gastos por recursos humanos vinculados al análisis (horas de trabajo). Estos dos aspectos (mayor rapidez y menor costo) hacen del método automatizado una herramienta aplicable para estudios epidemiológicos a escala provincial o nacional.

Este trabajo se realizó en un solo laboratorio. Debiera tenerse en cuenta que el método manual es susceptible de subjetividad del laboratorista, razón por lo cual es esperable que se presenten variaciones en los resultados para la misma muestra, cuando ésta es procesada en diferentes laboratorios. Al respecto, se prevee realizar una validación de método incluyendo la participación de diversos laboratorios con muestras de las mismas colmenas, para confirmar la fortaleza del método automático con respecto a la repetibilidad de resultados y unificación de criterio de discriminación de esporas. Como trabajos futuros, además, se tiene previsto la optimización del método automático mejorando cada una de las etapas, en especial la segmentación y los filtros en la detección de contornos y conteo de elipses. Se deberá incorporar además una capa de persistencia de datos para llevar un registro de las imágenes analizadas, poder identificar a que colmena pertenece cada imagen y a partir de ello calcular estadísticamente el nivel de incidencia de nosemosis por colmena, la necesidad de tratamiento antimicrobiano, y la eficiencia de dicho tratamiento realizando análisis posteriores. El método manual (actualmente utilizado) no cuenta con un registro inequívoco de resultados al que se pueda recurrir en aquellos casos de conflicto entre el propietario del apiario y los laboratorios de diagnóstico, cuando los resultados de análisis no correspondan con el criterio del propietario del apiario en casos de compra, venta, así como movimiento de colmenas en el marco de la trashumancia, cada vez más frecuente ante el cambio del ecosistema agrícola en respuesta a la fuerte sojización y pérdida de zonas con floración aptas para apicultura. El resguardo de las imágenes en una base de datos ofrece una solución a este problema, sumando trazabilidad al diagnóstico de esta enfermedad, de aplicación para los controles sanitarios de organismos oficiales. Por otro lado, se buscará generalizar el método para la detección de otras enfermedades similares, en abejas u otras especies, basados en las características de forma y tamaño del agente etiológico.

Referencias

1. Alvarez-Ramos, C. M., Nino, E., & Santos, M. (2013). *Automatic Classification of Nosema Pathogenic Agents through Machine Vision techniques and Kernel-based Vector Machine*. In 2013 8th Computing Colombian Conference (8CCC).
2. Alvarez-Ramos, C. M., Peñas, M. S., & Meana, A. (2010). *Sistema de reconocimiento y clasificación de agentes patógenos de Nosemosis*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Complutense de Madrid

3. Baggio, D. L. (2015). *OpenCV 3.0 Computer Vision with Java*. Packt Publishing Ltd.
4. Fitzgibbon, A., & Fisher, R. (1995). *A Buyer's Guide to Conic Fitting*. *Proc. of the British Machine Vision Conference 1995*. 513-22
5. Fries, I. (2010, 01). *Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera)*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103. S73–S79. doi:10.1016/j.jip.2009.06.017
6. Gonzalez, R. C. and Woods, R. E. (2008). *Digital Image Processing 3rd edition*. Pretince-Hall
7. Meana, A.; Martín, R.; Higes, M. (2009) *La silenciosa pandemia de las abejas*. M. Investigación y ciencia. Edición Española de Scientific American, págs 8-10.
8. OIE - *World Organisation for Animal Health*. *Manual de la OIE* (2013). Capítulo 2.2.4. Nosemosis de las abejas melíferas. Consultado el 10 de mayo de 2016 desde http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf
9. Structural Analysis and Shape Descriptors. (n.d. -b). Consultado el 15 de abril de 2016 desde http://docs.opencv.org/2.4/modules/imgproc/doc/structural_analysis_and_shape_descriptors.html#fitzgibbon95. OpenCV 2.4.13.0 documentation.
10. Structural Analysis and Shape Descriptors. (n.d. -b). Consultado el 15 de abril de 2016 desde http://docs.opencv.org/2.4/modules/imgproc/doc/structural_analysis_and_shape_descriptors.html#suzuki85. OpenCV 2.4.13.0 documentation.
11. Suzuki, S., & Abe, K. (1985). *Topological structural analysis of digitized binary images by border following*. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 32-46.