

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Centro Universitario UAEM Texcoco



Que para obtener el título de
Ingeniera en Computación

Tesis

Sistema de conteo automático de células blancas
en el plasma sanguíneo con información del color

Presenta

Inés Jessica Ramos Meneses

Director de tesis

Dr. Farid García Lamont

Texcoco, Estado de México, Mayo de 2021

Contenido

Lista de figuras	4
Lista de tablas	6
Agradecimientos	8
Resumen	10
Introducción	12
Definición del problema	15
Propuesta de solución	17
Objetivos y alcance del proyecto	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	21
Marco teórico	23
Propuesta de segmentación	27
Espacio RGB	28
Covarianza en espacios vectoriales	30
Detección de bordes	34
Experimentos y resultados	39
Conteo de células	41
Evaluación cuantitativa de la segmentación en las imágenes del ALL-IDB	47
Imágenes resultantes	50
Funcionamiento del programa	74
Conclusiones	77
Referencias bibliográficas	80
Apéndice: Código desarrollado en Matlab	85

Lista de figuras

Fig. 1 Imagen de plasma sanguíneo	12
Fig. 2 Diagrama de flujo del enfoque propuesto.....	28
Fig. 3 Espacio de color RGB	29
Fig. 4 Imágenes obtenidas después de utilizar nuestro enfoque de segmentación en las imágenes de la Fig. 1	33
Fig. 5 Imágenes obtenidas después de eliminar pequeños objetos segmentados en las imágenes resultantes mostradas en la Fig. 4	34
Fig. 6 Imágenes obtenidas después de eliminar los bordes detectados en las imágenes de la Fig. 5 utilizando nuestro enfoque	37
Fig. 7 Ejemplos de imágenes obtenidas utilizando nuestro enfoque en diferentes bases de datos de imágenes; las imágenes (a), (b) y (c) se extraen del BMMD; las imágenes (f), (g) y (h) se extraen del WBC-IDB; las imágenes (d), (e), (i) y (j) se extraen del ALL-IDB; las imágenes etiquetadas con asterisco (*) son las imágenes respectivas obtenidas al procesar las imágenes de entrada.	42
Fig. 8 Imágenes de referencia segmentadas a mano de la base ALL-IDB respectivas de las imágenes (d), (e), (i) y (j) de la Fig. 7	48

Lista de tablas

Tabla 1 Precisión de recuento obtenida aplicando nuestro enfoque a las bases de datos ALL-IDB, WBC-IDB y BMMD	43
Tabla 2 Precisión de recuento de diferentes trabajos utilizando las imágenes de ALL-IDB.....	44
Tabla 3 Resultados de conteo de células obtenidos por cada imagen de la base de imágenes ALL-IDB.....	44
Tabla 4 Resultados obtenidos al procesar la ALL-IDB.....	50

Resumen

En el conteo automático y el reconocimiento de los sistemas de glóbulos blancos (WBC), utilizando imágenes de muestras de frotis de sangre (BS), el proceso de segmentación es una etapa importante porque la precisión del conteo y la clasificación depende, en cierta medida, de la precisión de la segmentación. Diferentes trabajos que abordan este problema se centran en algoritmos de segmentación basados en características de forma, pero estos algoritmos están diseñados, principalmente, para imágenes recortadas de WBC; es decir, la imagen de entrada contiene solo un WBC, mientras que generalmente en las imágenes BS contienen varios WBC. En este trabajo presentamos una propuesta para el conteo y reconocimiento de WBC en imágenes BS que contienen varios WBC dentro de la imagen, donde las contribuciones son: 1) una propuesta de segmentación que emula la percepción humana del color, donde los WBC están segmentados por la diferencia cromática con respecto a los otros elementos de la BS; 2) en las imágenes BS es común encontrar que los WBC están superpuestos, por lo tanto, presentamos un enfoque para separar los WBC superpuestos calculando sus diferencias de color, donde el tono y la intensidad se procesan por separado. Mostramos los resultados obtenidos al realizar experimentos con tres bases de datos de imágenes diferentes; Según los resultados obtenidos, afirmamos que nuestra propuesta es competitiva.

Palabras clave: Células blancas, segmentación, conteo de leucocitos

Introducción

La biometría es una disciplina que emplea diferentes técnicas para medir o extraer parámetros de ciertas características de los seres vivos; una de esas técnicas es para el conteo y clasificación de células blancas (CB) de muestras de plasma sanguíneo de seres humanos. El conteo y clasificación de CB es importante para que los médicos puedan determinar posibles infecciones en los pacientes y así ayudar a obtener un diagnóstico de la posible infección que puedan tener los pacientes.

Para el conteo y clasificación de CB un técnico en biometría extrae una muestra de plasma sanguíneo; aplica un reactivo a dicha muestra para que las CB se vuelvan visibles; esta muestra es analizada bajo un microscopio, en donde el técnico cuenta y clasifica, manualmente, las CB contenidas en la muestra. En la Fig. 1 se muestra un ejemplo de una imagen de plasma sanguíneo, en donde claramente se pueden apreciar las CB en color púrpura mientras, que los demás elementos del plasma con otras tonalidades.

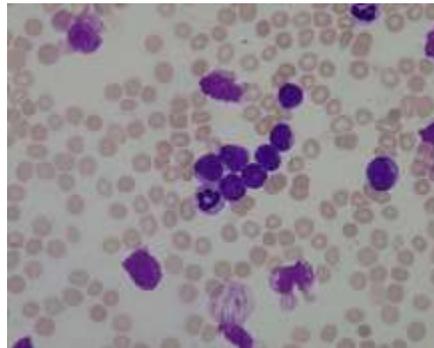


Fig. 1 Imagen de plasma sanguíneo

Este proceso usualmente es lento además de que el técnico con el tiempo se fatiga y puede cometer errores de conteo y clasificación si tiene que analizar muchas muestras. Si se implementa un sistema de visión artificial para el conteo y clasificación de CB, se puede aumentar el número de muestras analizadas, manteniendo el mismo desempeño y precisión. Además, al realizar

esta lo más rápido posible es importante para prevenir que la infección se expanda y así dar más tiempo a los médicos para estudiar y dar un diagnóstico acertado.

De esta forma, en este trabajo se presenta una propuesta para la segmentación de CB de imágenes del plasma sanguíneo. Es fácil observar que la cromaticidad de las CB es muy diferente a la cromaticidad de los demás elementos del plasma sanguíneo. De ahí que esta propuesta se enfoca en encontrar los pixeles cuya cromaticidad tenga alta varianza respecto al promedio de la cromaticidad del resto de los pixeles de la imagen.

Por otra parte, se presenta una propuesta de detección de bordes para separar las células que puedan estar empalmadas; ya que las técnicas existentes para detección de bordes se basan solo en escala de grises, mientras que en este trabajo lo extendemos para el caso de imágenes de color.

Definición del problema

La segmentación de células blancas en imágenes de la sangre se ha abordado de diferentes formas; empleando características de intensidad en donde se utilizan principalmente el método de Otsu o técnicas de agrupamiento como k-means o fuzzy c-means, la desventaja con el método de Otsu es que no siempre puede segmentar las células debido a las diferentes condiciones de intensidad con que son adquiridas las imágenes; por otra parte, los métodos de agrupamiento requieren definir a priori la cantidad de grupos en que los datos son divididos, además el desempeño de estos métodos dependen de los valores iniciales de los centros, por lo que una misma imagen puede ser segmentada diferente si se procesa dos veces con estas técnicas.

Existen otros trabajos donde emplean características de forma para realizar la segmentación, pero los algoritmos suelen ser difícil de implementar. Otros trabajos previos, utilizan información del color, pero propiamente no se procesa el color como tal, ya que las componentes de color se procesan por separado como si fueran características de intensidad.

Otro aspecto de la problemática del conteo de células blancas es que actualmente en las imágenes obtenidas de diferentes bases de datos del plasma sanguíneo, se encuentran empalmadas las células blancas por lo cual es muy difícil llevar a cabo el conteo de estos mismos, por lo cual se plantea, mediante algoritmos llevar a cabo el tratamiento de estas imágenes para obtener un mejor resultado.

Propuesta de solución

Existen diferentes algoritmos para la segmentación de CB que están implementados en dispositivos automatizados, pero no siempre se pueden conocer su funcionamiento debido a restricciones de derechos de autor. Por una parte, existen en el estado del arte varios algoritmos, pero por una parte demandan que las imágenes sean capturadas bajo ciertas condiciones controladas; por otra parte, en otros trabajos se presentan técnicas que pueden ser costosas computacionalmente y en consecuencia tomar tiempo en procesar imágenes.

En este trabajo se propone implementar un sistema de visión artificial para la segmentación de CB, en donde con técnicas de procesamiento de imágenes se puedan procesar las imágenes en tiempos razonables. Con esto se ayudará a evitar que alguna infección se expanda y así dar más tiempo a los médicos para estudiar y dar un diagnóstico acertado.

Se presenta una propuesta de conteo de CB en imágenes de la sangre, en donde las CB son segmentadas por características de color, imitando la percepción humana del color, pero también se presenta una propuesta de detección de bordes para separar las células que puedan estar empalmadas; ya que las técnicas existentes para detección de bordes se basan solo en escala de grises, mientras que en este trabajo lo extendemos para el caso de imágenes de color.

Objetivos y alcance del proyecto

Objetivo general

Diseñar algoritmos basados en visión artificial para segmentar y contar las células blancas en imágenes de plasma sanguíneo utilizando información del color

Objetivos específicos

- Diseñar el método de segmentación
- Diseñar la técnica para la separación de células que estén sobrepuestas
- Implementar el método de segmentación y de separación en Matlab

Hipótesis

Cualquier persona sin ser experto puede ubicar las CB dentro de las imágenes de la sangre por el contraste de color entre las CB y los demás elementos de la sangre; de aquí que la propuesta se basa en imitar la percepción humana del color.

Normalmente en las imágenes del plasma sanguíneo, los glóbulos rojos son los elementos que más hay en las imágenes, por lo que las imágenes tienden a ser en su mayoría rojas. Las CB tienen un color que tiende a la tonalidad morada, pero la cantidad de estos elementos en el plasma sanguíneo es mucho menor a la cantidad de los elementos que hay en las imágenes. De ahí que la idea es buscar los pixeles cuya cromaticidad sea alta con respecto a la cromaticidad promedio de la imagen, ya que estos pertenecen a las CB.

Marco teórico

La segmentación, el recuento y la identificación de los glóbulos blancos son problemas desafiantes debido a su apariencia compleja, variaciones inconsistentes de tinción e iluminación, también debido a las etapas de maduración de las células. Las propuestas aprovechan las particularidades de los WBC, como la forma, la textura o el color para que la identificación sea más eficiente. A continuación, presentamos los trabajos relacionados que hemos revisado.

En la referencia [4] se desarrolla una estrategia para la segmentación de leucocitos para clasificar las células anormales y normales. La transformación de Fourier se utiliza para eliminar el ruido y luego la imagen se mejora mediante la aplicación de diferentes filtros de mediana. El usuario debe seleccionar bordes y no muestras de bordes dibujando rectángulos manualmente en las imágenes. Después de la extracción de las características morfológicas, un clasificador SVM se entrena con las características morfológicas extraídas.

Mohd y col. [5] presentan un sistema de conteo de WBC. Se aplica un procesamiento de color a las imágenes BS utilizando el espacio de color $L^*a^*b^*$; a continuación, los WBC se segmentan utilizando el umbral de Otsu y la combinación de análisis de espacio de color RGB, CMYK y HSV para eliminar RBC y el fondo. Los objetos no deseados restantes después del proceso de segmentación se eliminan aplicando erosión, dilatación y etiquetado de componentes conectados. La transformación Circle Hough se emplea para detectar y contar círculos en las imágenes y también en las celdas superpuestas. El método exige que las imágenes se capturen con el mismo factor de aumento para funcionar correctamente.

En [6] se propone segmentar los WBC sobre la base de una SVM. Utilizaron píxeles tomados de imágenes segmentadas manualmente para entrenar el SVM. Después de la etapa de entrenamiento, el clasificador produce una imagen con diferentes etiquetas para cada componente de la imagen. Alomari y col. [8] presentan un enfoque de segmentación de WBC, donde la imagen dada se segmenta con un valor umbral obtenido manualmente. La imagen que resulta de la resta de la imagen binaria y la segmentada se procesa previamente usando el operador de erosión para obtener la imagen de borde usando el operador Canny. Los WBC se cuentan mediante un método basado en la detección aleatoria de círculos.

López-Puigdollers y col. [10] proponen evitar la segmentación utilizando oFAST, SIFT y CenSurE, junto con un SVM como clasificador. Aunque los descriptores de imágenes locales son robustos en el contexto, pueden no funcionar bien en las imágenes celulares, como señalan Cao et al. [22] En la referencia [14] se propone un algoritmo de clasificación WBC basado en las características del núcleo. Uno de los pasos más importantes del método es la detección de núcleos; para este propósito, los componentes R, G y B de una imagen en color se separan; El componente R se reemplaza con el componente G mejorado con contraste. El efecto de este proceso mejora el color del núcleo y la eliminación del componente rojo en la imagen.

Cuevas y col. [18] presentan un método basado en la evolución diferencial para detectar formas de elipse en imágenes. Se aplica un algoritmo difuso de maximización de expectativas, este paso produce diferentes puntos de umbral para los WBC, glóbulos rojos (RBC) y el fondo, el detector de elipse se utiliza para identificar formas elipsoidales. En [21] se utiliza una combinación del método de umbral óptimo y la técnica de representación de bajo rango basada en múltiples para agrupar los píxeles. El método puede

segmentar bien el núcleo celular; sin embargo, los contornos del WBC deben ser dibujados manualmente por un experto durante el entrenamiento.

Al aplicar el análisis estadístico y el algoritmo K-means, Cao et al. [22] obtener tres valores para cubrir todas las clases de los diámetros de los glóbulos blancos; Se considera que estos valores establecen el tamaño de tres ventanas deslizantes, que se utilizan para atravesar las imágenes BS. La densidad del borde, el contraste del degradado, las características de color y el borde canny se calculan para medir la diferencia entre las áreas. Estas características se envían a un SVM para clasificar los WBC.

En la referencia [24] se presenta una propuesta de segmentación inspirada en la teoría caótica y el comportamiento de alimentación de los animales. Chaos simula sistemas no lineales que funcionan de manera dinámica; Durante la búsqueda de alimento, los animales resuelven cómo encontrar el mejor campo con abundantes presas. La emulación de la estrategia de alimentación puede ayudar a resolver problemas de optimización. Cao y col. [25] utiliza los espacios de color RGB y HSI para crear imágenes con combinaciones lineales de componentes H, S y G (HSG). HSG destaca la región del núcleo leucocitario; por lo tanto, se emplea para segmentar la periferia de los leucocitos.

Tenga en cuenta que los trabajos revisados se centran en segmentar los WBC principalmente por características de forma. Las obras que usan características de color, las emplean para pre procesar las imágenes, no como una característica de segmentación, ni emulando la percepción humana del color como presentamos en la siguiente sección.

Propuesta de segmentación

Nuestra propuesta se basa en imitar la percepción humana del color; los humanos reconocen los colores primero por la cromaticidad, luego por la intensidad. Por lo tanto, cualquier persona, a pesar de no ser un experto, puede ubicar los WBC dentro de las imágenes BS debido a su contraste de cromaticidad con respecto a los otros elementos de la BS; por lo tanto, seleccionamos los píxeles con alta variación cromática. Para los WBC superpuestos, proponemos separarlos calculando las diferencias de color entre WBC, porque en tales diferencias de color se ubican los bordes de los WBC.

Los pasos de nuestra propuesta se resumen a continuación, ver Fig. 2:

- (1) A partir de la imagen de entrada, se obtiene la cromaticidad de los colores de los píxeles.
- (2) Se seleccionan los píxeles de alta varianza cromática
- (3) Los WBC superpuestos se separan y luego la imagen resultante se binariza
- (4) Los WBC se extraen aplicando la técnica de etiquetado de objetos y luego se cuentan
- (5) Las características de los WBC segmentados se extraen para su clasificación.

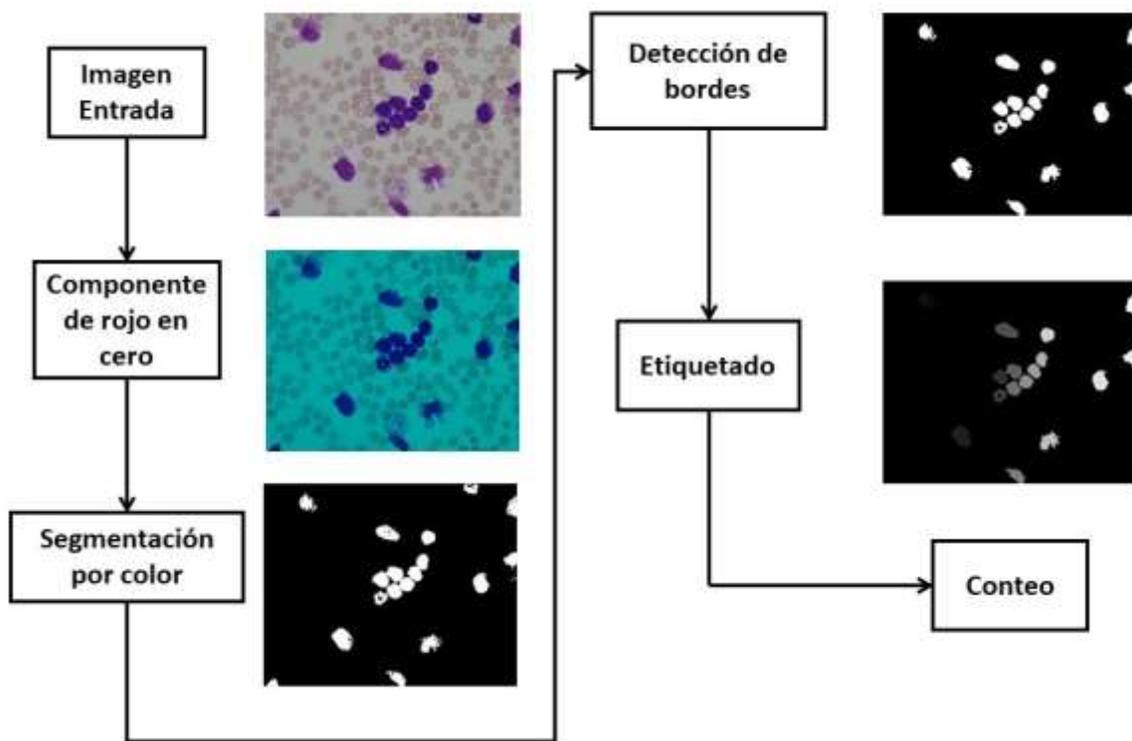


Fig. 2 Diagrama de flujo del enfoque propuesto

En las siguientes subsecciones describimos más detalladamente las operaciones matemáticas para realizar los pasos mencionados anteriormente de nuestra propuesta.

Espacio RGB

El espacio RGB es un sistema de coordenadas cartesianas donde los colores están definidos por vectores que se extienden desde el origen, ver Fig. 3.

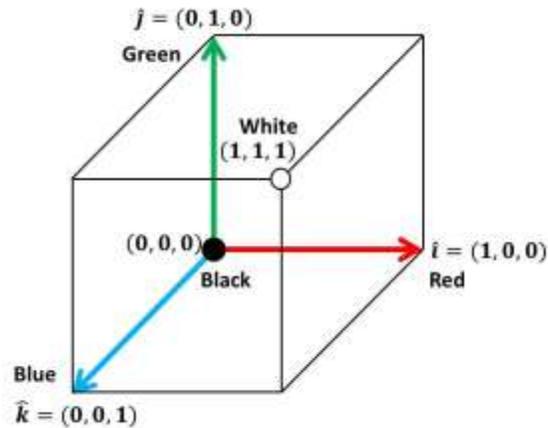


Fig. 3 Espacio de color RGB

El color de un píxel t se escribe como [26]:

$$\phi_t = [r_t, g_t, b_t] \quad (1)$$

Donde r_t, g_t y b_t son los componentes rojo, verde y azul, respectivamente. Por lo general, el rango de cada componente es $[0, 255] \subset \mathbb{Z}$. Las características de los vectores de color [26] son:

- 1) La orientación representa la cromaticidad
- 2) La magnitud modela la intensidad

A pesar de que el espacio RGB se acepta para representar colores y se emplea en la mayoría del hardware de adquisición de imágenes, no es adecuado para el procesamiento del color, porque la cromaticidad y la intensidad no están desacopladas, y las diferencias de color no se pueden medir utilizando la distancia euclidiana [26] Sin embargo, las diferencias de

color se pueden calcular procesando el tono y la intensidad por separado, donde se crea un canal de intensidad y los vectores se normalizan [27].

Covarianza en espacios vectoriales

Sin ser un experto, la primera característica que un humano percibe en una imagen BS es la diferencia cromática entre los WBC y los otros elementos dentro de la imagen. Por lo tanto, cualquier humano puede localizar los glóbulos blancos.

Los glóbulos rojos son los elementos más comunes dentro de una imagen BS; por lo tanto, el tono de la mayoría de los píxeles tiende al tono de los glóbulos rojos. Mientras que el tono de los píxeles del WBC tiende a un tono muy diferente; pero el número de píxeles que dan forma a los WBC es menor que el número de píxeles de los otros elementos de BS.

Por ejemplo, a pesar de que las imágenes que se muestran en la Fig. 1 se adquieren con diferentes condiciones de aumento e iluminación, los glóbulos rojos son los elementos más abundantes, mientras que los glóbulos blancos tienen un tono diferente. Es decir, hay más píxeles que pertenecen a los glóbulos rojos que los píxeles que dan forma a los glóbulos blancos.

Por lo tanto, el tono promedio es la cromaticidad de los glóbulos rojos, pero la cromaticidad de los píxeles de WBC tiene una gran variación con respecto al tono promedio. Por lo tanto, los WBC se pueden segmentar seleccionando los píxeles cuya varianza cromática es alta. Por lo tanto, el enfoque de segmentación propuesto se realiza de la siguiente manera.

Sea $\Phi = \{\phi_t | \forall t \in T\} \subset \mathbb{R}^3$ el conjunto de vectores de color de píxeles de la imagen dada representada en el espacio RGB, donde $T = \{1, \dots, n\} \times \{1, \dots, m\}$, n y m son el número de filas y columnas, respectivamente.

El componente rojo de los vectores de color se establece en cero para mejorar el tono del WBC. Se obtiene el conjunto $\Phi^* = \{\phi_t^* | \forall t \in T\}$ donde $\phi_t^* = [0, g_t, b_t]$. Como estamos interesados en la cromaticidad de los colores, solo necesitamos la orientación de los vectores de color; por lo tanto, los vectores de color se normalizan con:

$$\hat{\phi}_t = \frac{\phi_t^*}{\|\phi_t^*\|} \quad (2)$$

Los vectores resultantes se colocan en el conjunto $\hat{\Phi} = \{\hat{\phi}_t | \forall t \in T\}$. Observe que los cosenos directores de $\hat{\phi}_t$ son $\cos \alpha_r = r_t / \|\hat{\phi}_t\|$, $\cos \alpha_g = g_t / \|\hat{\phi}_t\|$ y $\cos \alpha_b = b_t / \|\hat{\phi}_t\|$. Pero $\|\hat{\phi}_t\| = 1$, por lo tanto, los componentes del vector $\hat{\phi}_t$ son los cosenos de los ángulos entre el vector y los vectores base. Entonces, la orientación de ϕ_t^* está implícita en $\hat{\phi}_t$.

El vector medio se calcula con:

$$\mu_{\hat{\Phi}} = \frac{1}{n \times m} \sum_{\hat{\phi}_t \in \hat{\Phi}} \hat{\phi}_t \quad (3)$$

La matriz de covarianza se calcula con la siguiente formula:

$$\Omega = \frac{1}{n \times m} \Psi \Psi^T \quad (4)$$

donde $\Psi = [\hat{\phi}_{(1,1)} - \mu_{\hat{\phi}}, \dots, \hat{\phi}_{(n,m)} - \mu_{\hat{\phi}}]$. La varianza de los vectores se obtiene calculando la norma de la matriz de covarianza [28]; es decir $\|\Omega\| = \sigma_{\hat{\phi}}^2$, donde:

$$\|\Omega\| = \sqrt{\lambda(\Omega^T \Omega)} \quad (5)$$

Donde λ es el mayor valor propio obtenido de la matriz $\Omega^T \Omega$. Finalmente, los píxeles con alta varianza corresponden a los píxeles de los WBC, por lo tanto, dichos píxeles se seleccionan usando la ecuación (6):

$$\varphi_t = \begin{cases} \phi_t^*, & \|\hat{\phi}_t - \mu_{\hat{\phi}}\|^2 > \sigma_{\hat{\phi}}^2, \|\phi_t^*\| > \delta_\phi \\ \mathbf{0}, & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (6)$$

Donde $\mathbf{0} = [0,0,0]$. La segunda condición, $\|\phi_t^*\| > \delta_\phi$, se agrega porque los tonos del citoplasma y el núcleo de los glóbulos blancos son similares, pero la intensidad del color del citoplasma es mayor que la intensidad del núcleo. Debido a que todos los vectores de color están normalizados, no es posible diferenciar los píxeles que dan forma al citoplasma de los que dan forma al núcleo. Por lo tanto, la segunda condición verifica la intensidad del vector de color sin normalizarse.

Las imágenes (a1) y (b1) de la Fig. 4 se obtienen poniendo a cero el componente rojo en todos los vectores de color de las imágenes (a) y (b) de la

Fig. 1, respectivamente. Al aplicar nuestro enfoque de segmentación a las imágenes (a1) y (b1), se obtienen las imágenes (a2) y (b2) de la Fig. 4, respectivamente.

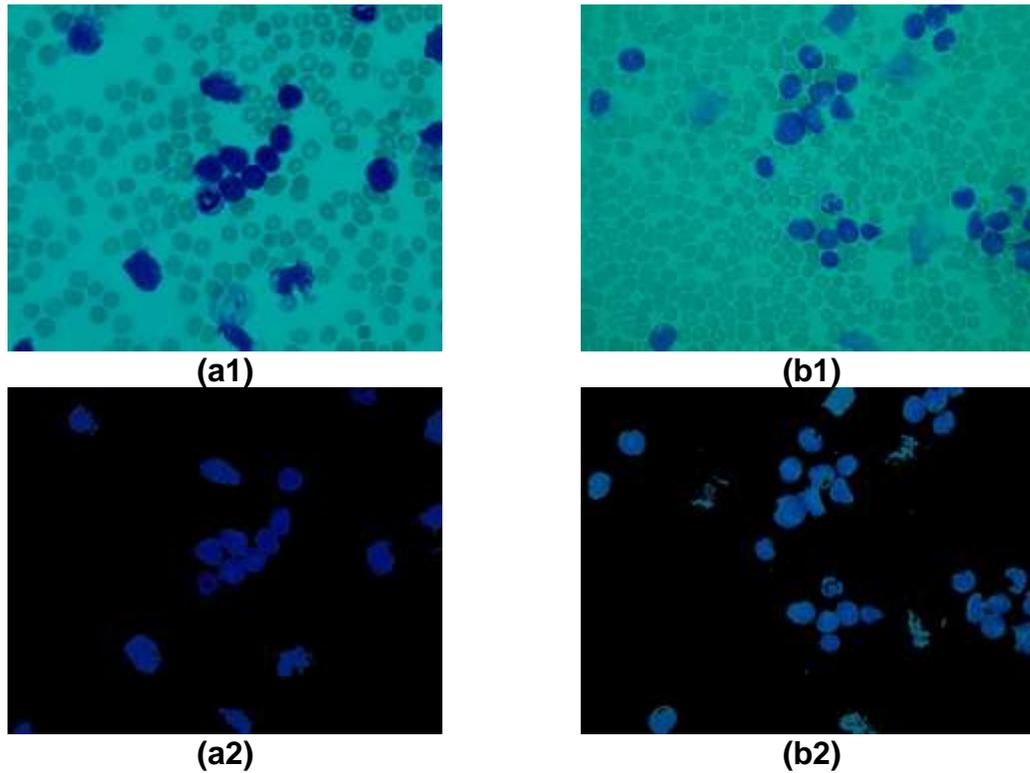


Fig. 4 Imágenes obtenidas después de utilizar nuestro enfoque de segmentación en las imágenes de la Fig. 1

Es fácil apreciar que en las imágenes resultantes (a2) y (b2) de la Fig. 4, hay píxeles segmentados que no pertenecen a los WBC. Para superar este problema, la imagen se binariza y los objetos más pequeños que un umbral dado δ_s se eliminan. Los píxeles eliminados de las imágenes binarias se eliminan, en la posición respectiva, de las imágenes (a2) y (b2) de la Fig. 4. El valor umbral δ_s se establece considerando el tamaño promedio de los WBC. La Fig. 5 muestra las imágenes resultantes después de eliminar los objetos pequeños de las imágenes (a2) y (b2) de la Fig. 4.

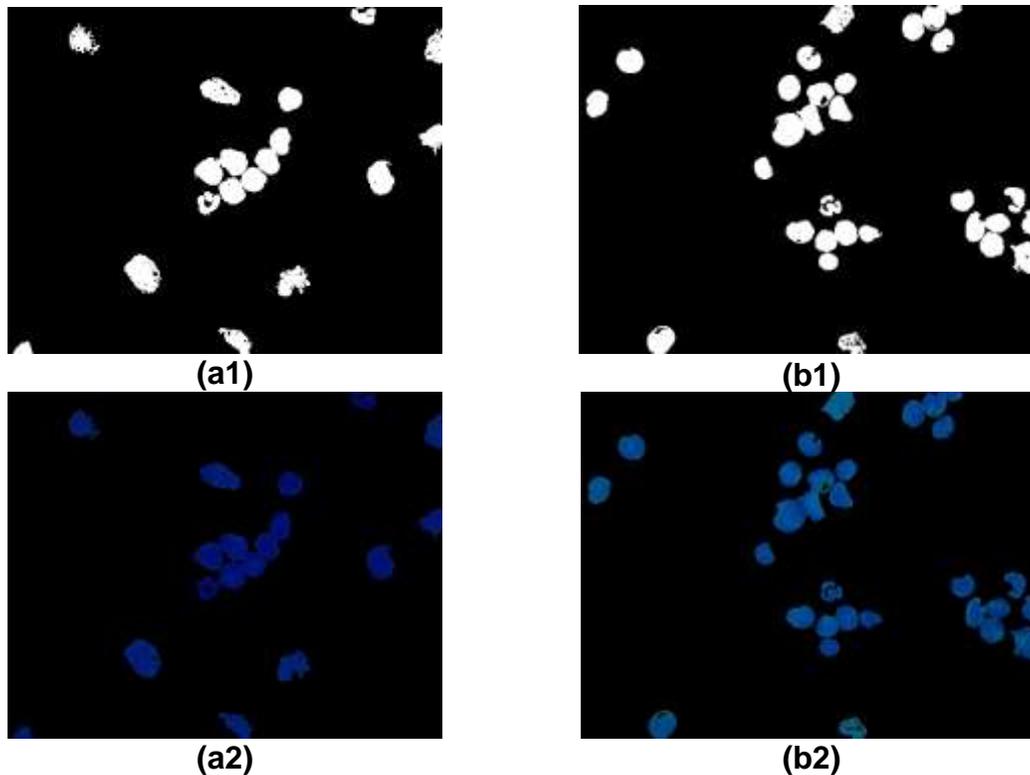


Fig. 5 Imágenes obtenidas después de eliminar pequeños objetos segmentados en las imágenes resultantes mostradas en la Fig. 4

Aunque los WBC están segmentados de los otros elementos de la BS, no pueden contarse ni clasificarse porque puede haber WBC superpuestos. Por lo tanto, es necesario aplicar una técnica para separar los WBC superpuestos; A continuación, presentamos nuestra propuesta.

Detección de bordes

Entre los WBC superpuestos hay pequeñas diferencias de color, por lo tanto, se pueden detectar como bordes para separar los WBC. Las técnicas habituales empleadas para la detección de bordes están diseñadas para procesar los cambios de intensidad, no los cambios de cromaticidad. Por lo tanto, proponemos procesar la intensidad y la cromaticidad por separado de la siguiente manera.

Se crea un canal de intensidad calculando las magnitudes de los vectores de color $\varphi_{(i,j)}$:

$$I_{(i,j)} = \|\varphi_{(i,j)}\|, \forall (i,j) \in T \quad (7)$$

La diferencia de intensidad se obtiene calculando la magnitud del laplaciano de cada elemento del canal de intensidad. En otras palabras, para todos $(i,j) \in T$:

$$|\nabla^2 I_{(i,j)}| = \left| \frac{\partial^2 I_{(i,j)}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I_{(i,j)}}{\partial y^2} \right| \quad (8)$$

El Laplaciano se calcula convolucionando el canal de intensidad con la siguiente máscara que proponemos:

$$H = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \\ 2 & -14 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (9)$$

Dado que la orientación de los vectores de color modela la cromaticidad, la diferencia de tono entre dos píxeles se obtiene calculando la diferencia de orientación entre sus respectivos vectores de color. Por lo tanto, los cambios cromáticos entre píxeles se calculan en las direcciones horizontal y vertical, respectivamente, con las ecuaciones (10) y (11):

$$\theta_{(i,j)}^x = \cos^{-1}(\hat{\phi}_{(i,j)} \cdot \hat{\phi}_{(i+1,j)}) \quad (10)$$

$$\theta_{(i,j)}^y = \cos^{-1}(\hat{\phi}_{(i,j)} \cdot \hat{\phi}_{(i,j+1)}) \quad (11)$$

Los bordes están ubicados en los píxeles cuyos cambios cromáticos y de intensidad son significativos, con respecto a sus píxeles vecinos, por lo tanto, dichos píxeles se ponen a cero con la ecuación (12).

$$\varphi_{(i,j)}^* = \begin{cases} \varphi_{(i,j)}, & \theta_{(i,j)}^x < \delta_\theta, \theta_{(i,j)}^y < \delta_\theta, |\nabla^2 I_{(i,j)}| < \delta_I \\ \mathbf{0}, & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (12)$$

Para todos $(i, j) \in T$. La Fig. 6 muestra las imágenes resultantes (a1) y (b1), y sus respectivas imágenes binarias (a2) y (b2), aplicando nuestro enfoque de detección de bordes a las imágenes (a2) y (b2) mostradas en la Fig. 5.

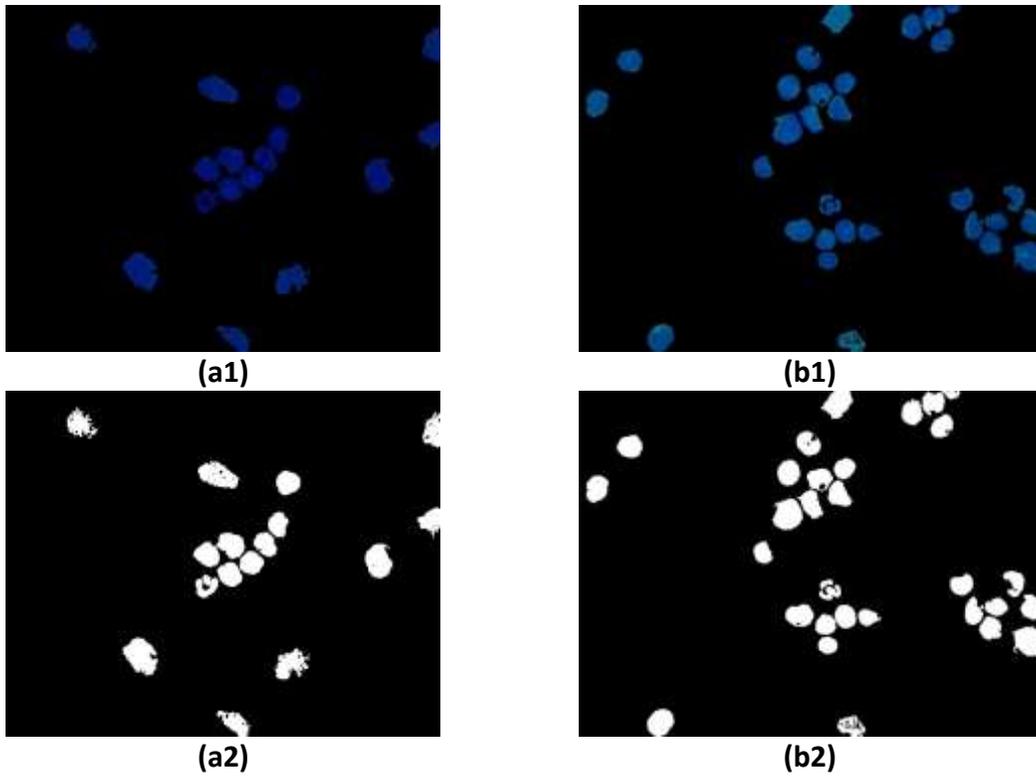


Fig. 6 Imágenes obtenidas después de eliminar los bordes detectados en las imágenes de la Fig. 5 utilizando nuestro enfoque

Es fácil apreciar que los WBC no están superpuestos. A partir de la imagen binarizada, los WBC se cuentan aplicando el etiquetado de componentes conectados. Pero también, se pueden extraer para su clasificación.

Experimentos y resultados

Para los experimentos buscamos bases de datos de imágenes empleadas como puntos de referencia para probar algoritmos para el conteo y clasificación de WBC; sin embargo, no encontramos un punto de referencia estándar. En [17] se comparan varios algoritmos para la clasificación de WBC utilizando diferentes bases de datos de imágenes; sin embargo, en todas las imágenes de estas bases de datos contienen solo un WBC en un área recortada, por lo tanto, las imágenes de estas bases de datos son útiles para probar algoritmos de clasificación, no para contar. Si bien proponemos contar y clasificar automáticamente los WBC en imágenes que contienen varios WBC.

Varios de los trabajos revisados emplean sus propias bases de datos de imágenes [13,14,16,22]. Sin embargo, encontramos que la Base de datos de imágenes de leucemia linfoblástica aguda¹ (ALL-IDB) se ha empleado a menudo para probar algoritmos para la detección de células cancerosas [30]; pero también, el ALL-IDB se ha utilizado para realizar experimentos con algoritmos para el recuento y/o clasificación de WBC [5-8,16,24]. Seleccionamos ALL-IDB porque sus imágenes contienen más de un WBC y / o los WBC están superpuestos. El ALL-IDB contiene un subconjunto de 33 imágenes de 1368 × 1712 píxeles y un segundo subconjunto con 75 imágenes de 1944 × 2592 píxeles. Las imágenes (a) y (b) de la Fig. 1 pertenecen al primer y segundo subconjuntos, respectivamente.

Para realizar una evaluación más extensa, encontramos las siguientes dos bases de datos proporcionadas por la Universidad de Ciencias Médicas de Irán; los datos microscópicos de médula ósea² (BMMD) y la base de datos de

¹ <https://homes.di.unimi.it/scotti/all/>

² <https://hrabbani.site123.me/available-datasets/bone-marrow-microscopic-data-plasma-cell-lineage-images>

imágenes WBC³ (WBC-IDB). El BMMD contiene 50 imágenes de 3872×2592 píxeles, mientras que el WBC-IDB contiene 343 imágenes de 775×519 píxeles.

En las imágenes de las tres bases de datos, los WBC no están etiquetados o clasificados; por lo tanto, le pedimos a un experto en reconocimiento de WBC que clasifique y etiquete los WBC de las imágenes de acuerdo con su experiencia y antecedentes. De este modo, podemos tener una referencia para calcular el rendimiento de nuestra propuesta en la etapa de clasificación.

Es importante señalar que las imágenes de las bases de datos se capturan bajo diferentes condiciones de iluminación y aumento; En nuestra propuesta, este aspecto influye en los valores de los umbrales δ_ϕ , δ_I y δ_s . Experimentalmente encontramos que los valores más adecuados para estos umbrales son: para BMMD $\delta_I = 35$ y $\delta_s = 14000$; para el WBC-IDB $\delta_I = 35$ y $\delta_s = 3500$; para ALL-IDB, las primeras 33 imágenes $\delta_I = 30$ y $\delta_s = 7600$ y las siguientes 75 imágenes $\delta_I = 45$ y $\delta_s = 10000$; para todas las bases de datos $\delta_\theta = 5^\circ$; el valor de δ_ϕ se calcula con $\delta_\phi = \mu - \alpha\sigma$ donde μ y σ son la media y la desviación estándar del canal de intensidad; para BMMD $\alpha = 1.25$, para WBC-IDB $\alpha = 2$, para las primeras 33 imágenes de ALL-IDB $\alpha = 2.5$ y para las siguientes 75 imágenes $\alpha = 1.5$.

Es importante señalar que en varias imágenes del ALL-IDB y el BMMD, los WBC se superponen, mientras que en el WBC-IDB los WBC no se superponen.

³ <https://misp.mui.ac.ir/fa/white-blood-cells-wbcs>

Conteo de células

La Fig. 7 muestra algunas imágenes obtenidas con el método propuesto. La imagen de entrada se refiere a las originales en el conjunto de datos, la imagen de salida corresponde a la producida con nuestro enfoque, marcada con un *. Las imágenes (a), (b) y (c) se extraen de la BMMD; las imágenes (f), (g) y (h) son muestras extraídas del WBC-IDB; las imágenes (d), (e), (i) y (j) se extraen de ALL-IDB. Aunque estas imágenes tienen diferentes aumentos e intensidades, el método propuesto segmenta con éxito los WBC.

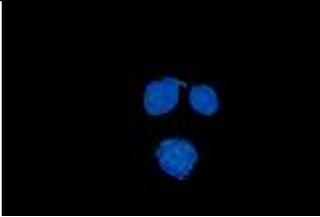
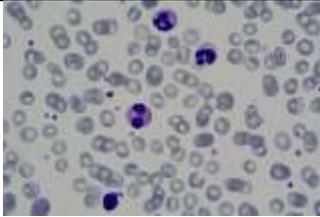
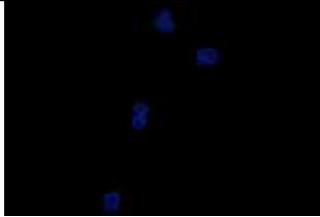
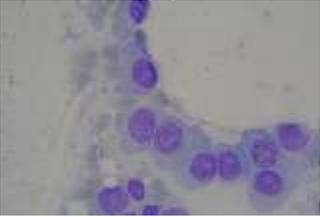
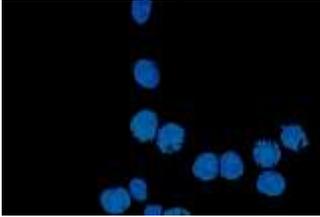
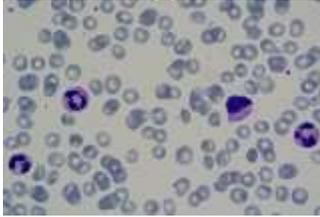
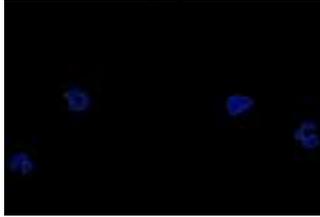
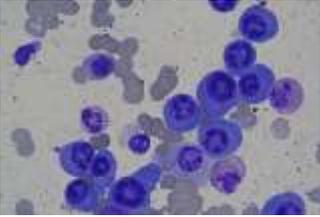
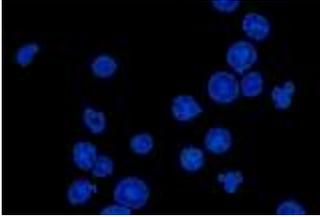
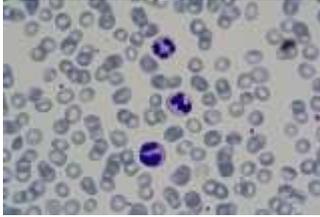
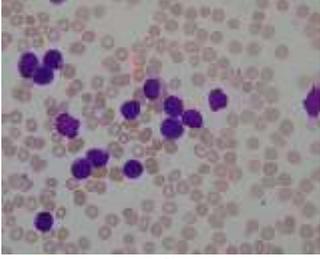
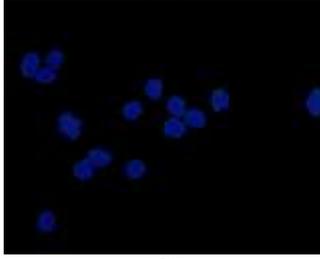
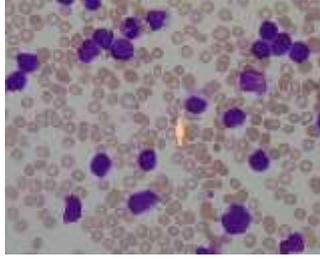
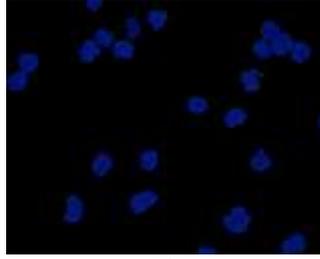
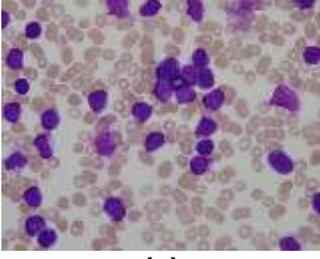
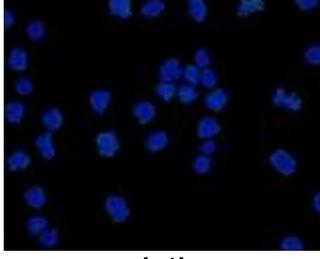
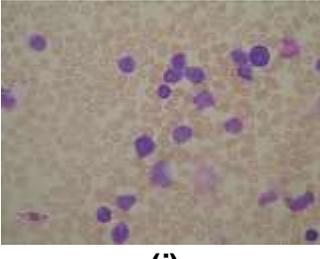
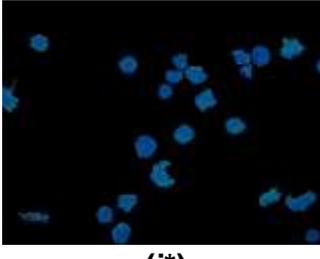
Imagen de entrada	Imagen de salida	Imagen de entrada	Imagen de salida
			
			
			
			
			

Fig. 7 Ejemplos de imágenes obtenidas utilizando nuestro enfoque en diferentes bases de datos de imágenes; las imágenes (a), (b) y (c) se extraen del BMMD; las imágenes (f), (g) y (h) se extraen del WBC-IDB; las imágenes (d), (e), (i) y (j) se extraen del ALL-IDB; las imágenes etiquetadas con asterisco (*) son las imágenes respectivas obtenidas al procesar las imágenes de entrada.

En las imágenes de entrada, muchos de los WBC están superpuestos; en contraste, en las imágenes de salida, los WBC están separados. En algunas de las imágenes, la separación entre los WBC es fácil de apreciar; por ejemplo, las imágenes (a *), (b *), (c *), (e *) y (j *). Mientras que, en otras imágenes, la separación no es clara porque la distancia entre los WBC puede ser de 1 píxel, por ejemplo, las imágenes (d *) e (i *).

Las imágenes segmentadas se binarizan y el etiquetado de componentes conectados se aplica a la imagen binaria para contar los WBC y, más tarde, clasificarlos. La Tabla 1 muestra la precisión de conteo obtenida con nuestro enfoque al procesar todas las imágenes de las tres bases de datos.

Tabla 1 Precisión de recuento obtenida aplicando nuestro enfoque a las bases de datos ALL-IDB, WBC-IDB y BMMD

Base de imágenes	Precisión
ALL-IDB	89.18%
WBC-IDB	93.31%
BMMD	85.50%

La mayor precisión de conteo se obtiene con las imágenes del conjunto de datos WBC-IDB. La precisión más baja se produce con el conjunto BMMD, debido a que el color de los WBC no es uniforme; por lo tanto, varios WBC se extraen rotos o incompletos.

A pesar de que no existe una base de datos de imágenes estándar para probar los algoritmos de conteo de WBC, ALL-IDB se ha empleado en diferentes trabajos para tal fin. En la Tabla 2 comparamos la precisión que obtenemos con respecto a los resultados reportados en trabajos relacionados usando ALL-IDB.

Tabla 2 Precisión de recuento de diferentes trabajos utilizando las imágenes de ALL-IDB

Referencia	Precisión
Mohd et al. [5]	96.92%
Ruberto et al. [6]	100%
Ruberto et al. [7]	97.61%
Alomari et al. [8]	98.40%
Ghosh et al. [16]	95.80%
Esta propuesta	89.18%

La precisión informada en [7] se calculó utilizando solo las primeras 33 imágenes del ALL-IDB. Para las mismas imágenes, nuestro método logra una precisión de conteo del 89.18%.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de conteo de cada una de las imágenes de la ALL-IDB y sus respectivas cantidades de

Tabla 3 Resultados de conteo de células obtenidos por cada imagen de la base de imágenes ALL-IDB

Nombre de la imagen	Número de células en la imagen original	Número de células en la imagen resultante
Im001_1.jpg	25	15
Im002_1.jpg	21	20
Im003_1.jpg	19	15
Im004_1.jpg	12	11
Im005_1.jpg	35	34
Im006_1.jpg	25	22
Im007_1.jpg	12	12
Im008_1.jpg	25	21
Im009_1.jpg	13	11
Im010_1.jpg	22	18
Im011_1.jpg	26	19
Im012_1.jpg	16	15
Im013_1.jpg	15	13

lm014_1.jpg	14	11
lm015_1.jpg	24	20
lm016_1.jpg	23	23
lm017_1.jpg	3	3
lm018_1.jpg	19	18
lm019_1.jpg	25	22
lm020_1.jpg	2	2
lm021_1.jpg	3	3
lm022_1.jpg	5	5
lm023_1.jpg	8	7
lm024_1.jpg	4	4
lm025_1.jpg	3	3
lm026_1.jpg	7	5
lm027_1.jpg	4	4
lm028_1.jpg	2	2
lm029_1.jpg	5	5
lm030_1.jpg	3	3
lm031_1.jpg	2	2
lm032_1.jpg	2	3
lm033_1.jpg	2	1
lm034_0.jpg	2	2
lm035_0.jpg	1	1
lm036_0.jpg	2	2
lm037_0.jpg	1	1
lm038_0.jpg	1	1
lm039_0.jpg	1	1
lm040_0.jpg	1	1
lm041_0.jpg	2	1
lm042_0.jpg	2	1
lm043_0.jpg	2	2
lm044_0.jpg	2	2
lm045_0.jpg	1	1
lm046_0.jpg	1	1
lm047_0.jpg	2	2
lm048_1.jpg	26	25
lm049_1.jpg	24	25
lm050_1.jpg	23	21
lm051_1.jpg	24	22

lm052_1.jpg	32	31
lm053_1.jpg	46	44
lm054_1.jpg	20	21
lm055_1.jpg	30	28
lm056_1.jpg	21	20
lm057_1.jpg	20	23
lm058_1.jpg	28	33
lm059_1.jpg	38	39
lm060_1.jpg	16	16
lm061_1.jpg	30	33
lm062_1.jpg	35	32
lm063_1.jpg	25	25
lm064_0.jpg	1	1
lm065_0.jpg	2	2
lm066_0.jpg	1	1
lm067_0.jpg	2	2
lm068_0.jpg	2	2
lm069_0.jpg	1	1
lm070_0.jpg	1	1
lm071_0.jpg	2	1
lm072_0.jpg	1	1
lm073_0.jpg	1	1
lm074_0.jpg	1	1
lm075_0.jpg	1	1
lm076_0.jpg	2	2
lm077_0.jpg	1	2
lm078_0.jpg	5	2
lm079_0.jpg	12	6
lm080_0.jpg	4	3
lm081_0.jpg	6	2
lm082_0.jpg	3	1
lm083_0.jpg	1	1
lm084_0.jpg	5	2
lm085_0.jpg	3	3
lm086_0.jpg	3	3
lm087_0.jpg	5	4
lm088_0.jpg	8	4
lm089_0.jpg	7	1

Im090_0.jpg	6	3
Im091_0.jpg	3	3
Im092_0.jpg	7	1
Im093_0.jpg	13	4
Im094_0.jpg	1	1
Im095_0.jpg	2	2
Im096_0.jpg	3	3
Im097_0.jpg	3	3
Im098_0.jpg	1	1
Im099_0.jpg	3	3
Im100_0.jpg	1	2
Im101_0.jpg	1	1
Im102_0.jpg	1	1
Im103_0.jpg	2	2
Im104_0.jpg	2	2
Im105_0.jpg	4	4
Im106_0.jpg	2	2
Im107_0.jpg	2	2
Im108_0.jpg	13	4

Evaluación cuantitativa de la segmentación en las imágenes del ALL-IDB

Con el fin de evaluar cuantitativamente la segmentación de las CB, se compara la versión binaria de las imágenes segmentadas obtenidas con esta propuesta con respecto a imágenes de referencia segmentadas a mano por un humano experto en reconocimiento de CB; estas imágenes de referencia se pueden obtener en la referencia [31]⁴.

La evaluación cuantitativa se obtiene al evaluar la clasificación a nivel de pixel entre las imágenes segmentadas y las imágenes de referencia

⁴ <https://drive.google.com/drive/folders/1F7kZ1SRWUD9R6aHLMkj3wsjcHnvlGuwP?usp=sharing>

segmentadas a mano, en donde se calculan los verdaderos positivos (VP), falsos positivos (FP), verdaderos negativos (VN) y falsos negativos (FN).

Los VP son los pixeles que conforman las CB en las imágenes de referencia los cuales son clasificados por la esta propuesta como parte de las CB; los FP son los pixeles que no son parte de las CB en las imágenes de referencia pero que son clasificados como parte de las CB en las imágenes resultantes; los VN son los pixeles que no forman parte de las CB en las imágenes de referencia y que son clasificados como pixeles que no pertenecen a las CB en las imágenes resultantes; los FN son pixeles que forman parte de las CB en las imágenes de referencia pero que son clasificados en las imágenes resultantes como pixeles que no conforman las CB.

En la Fig. 8 se muestran las imágenes de referencia segmentadas a mano de la base ALL-IDB respectivas de las imágenes (d), (e), (i) y (j) de la Fig. 7.

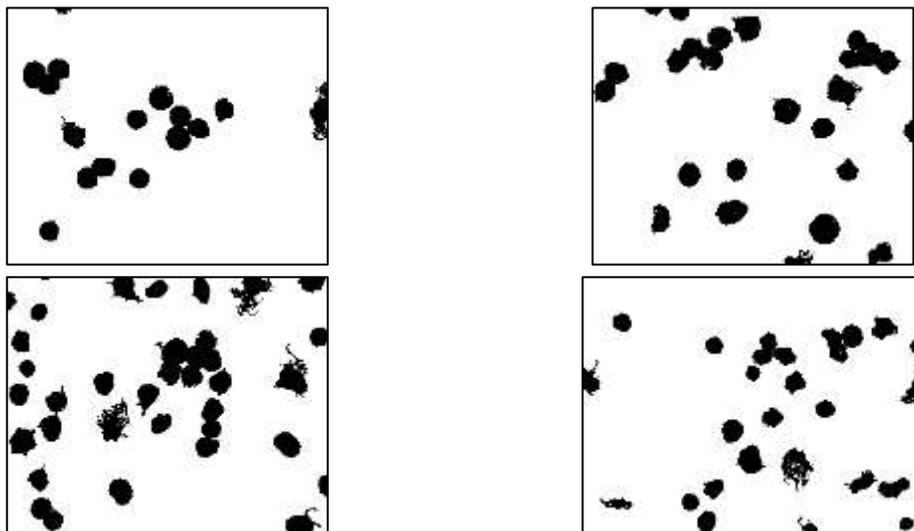


Fig. 8 Imágenes de referencia segmentadas a mano de la base ALL-IDB respectivas de las imágenes (d), (e), (i) y (j) de la Fig. 7

La evaluación cuantitativa es calculada con las métricas de precisión (Pr), especificidad (Es), sensibilidad (Se), f-score (f) e índice kappa (K). Las formulas para calcular estas métricas se muestran a continuación:

$$Pr = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad (13)$$

$$Es = \frac{VN}{VN + FP} \quad (14)$$

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} \quad (15)$$

$$f = \frac{2VP}{2VP + FP + FN} \quad (16)$$

$$K = \frac{Ac - t}{1 - t} \quad (17)$$

En donde

$$t = \frac{(VP + FN) \times (VP + FP) + (VN + FN) \times (VN + FP)}{(VP + VN + FP + FN)^2} \quad (18)$$

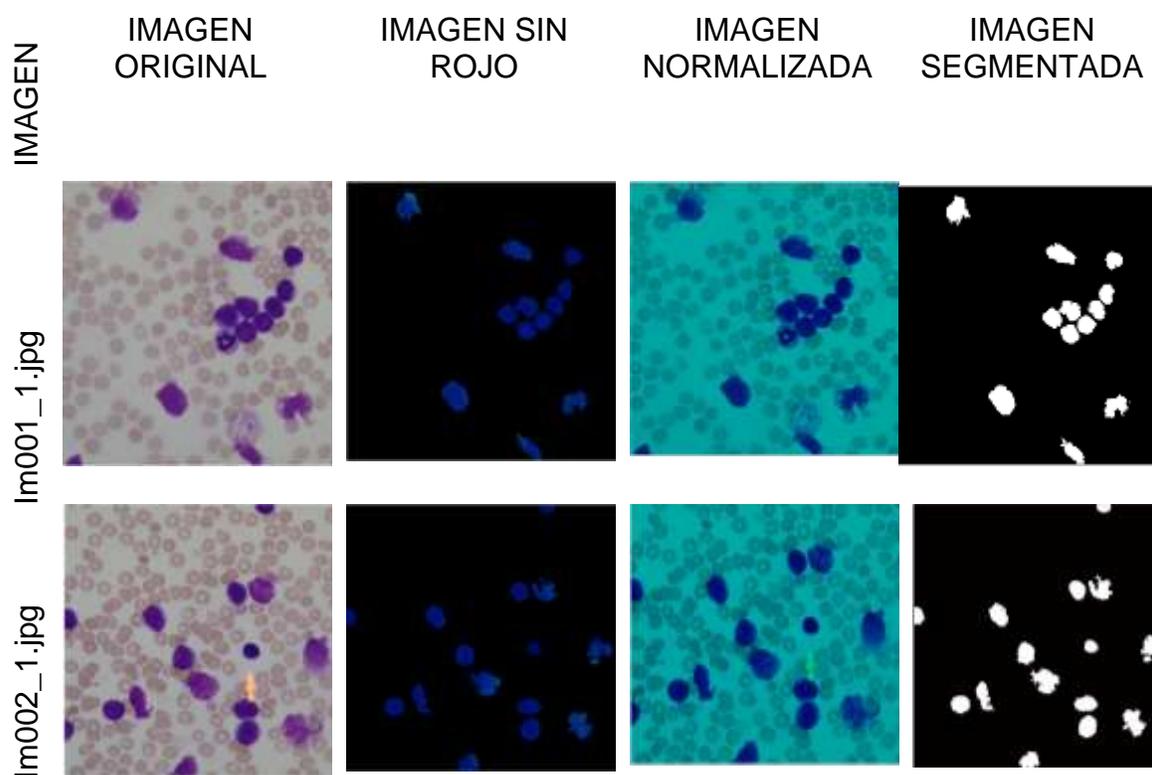
El nivel de precisión en relación a K se clasifica como sigue [32]: pobre ($K \leq 0.2$), razonable ($0.2 < K \leq 0.4$), bueno ($0.4 < K \leq 0.6$), muy bueno ($0.6 < K \leq 0.8$) y excelente ($K > 0.8$). La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos con las ecuaciones (13)-(17).

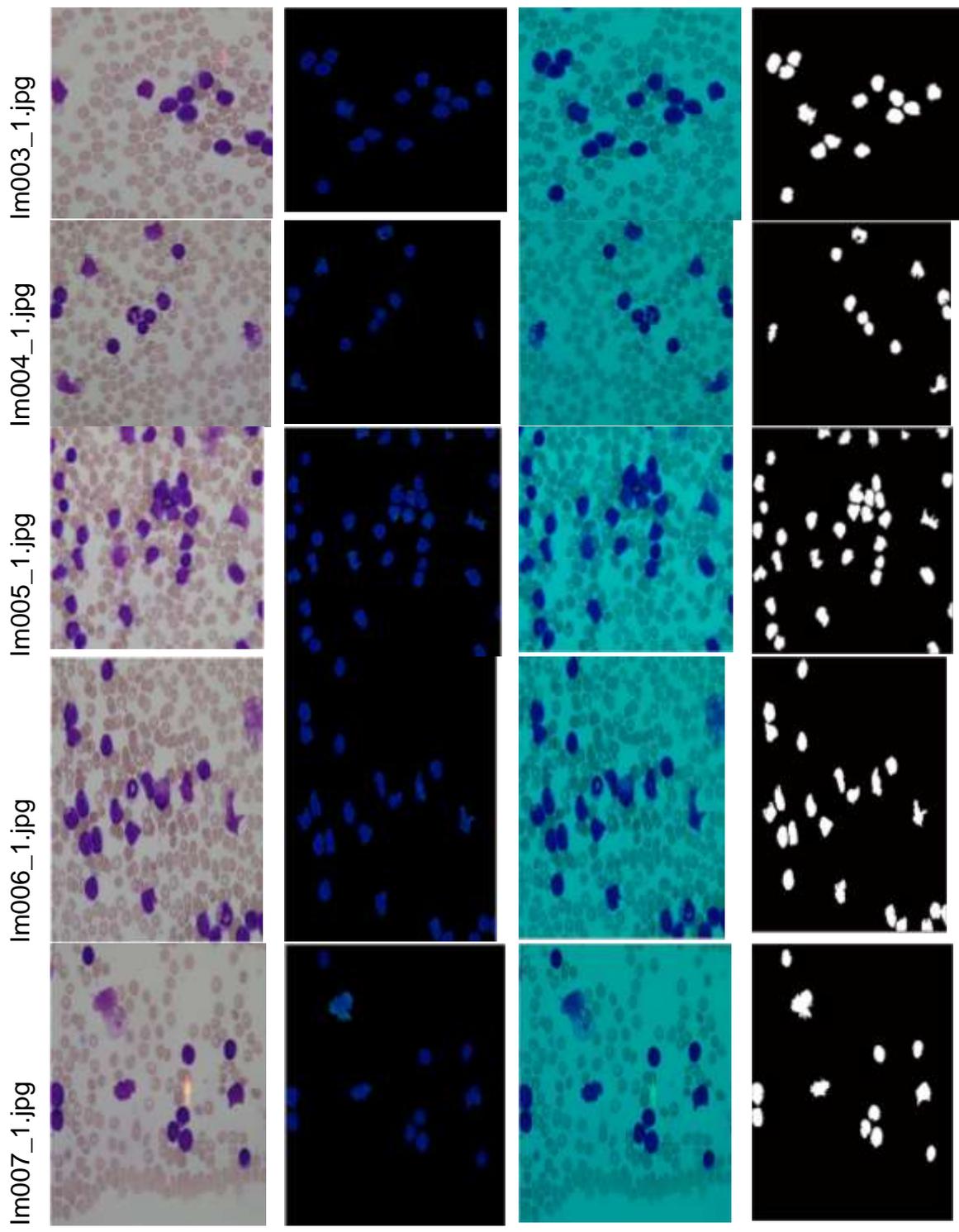
Tabla 4 Resultados obtenidos al procesar la ALL-IDB

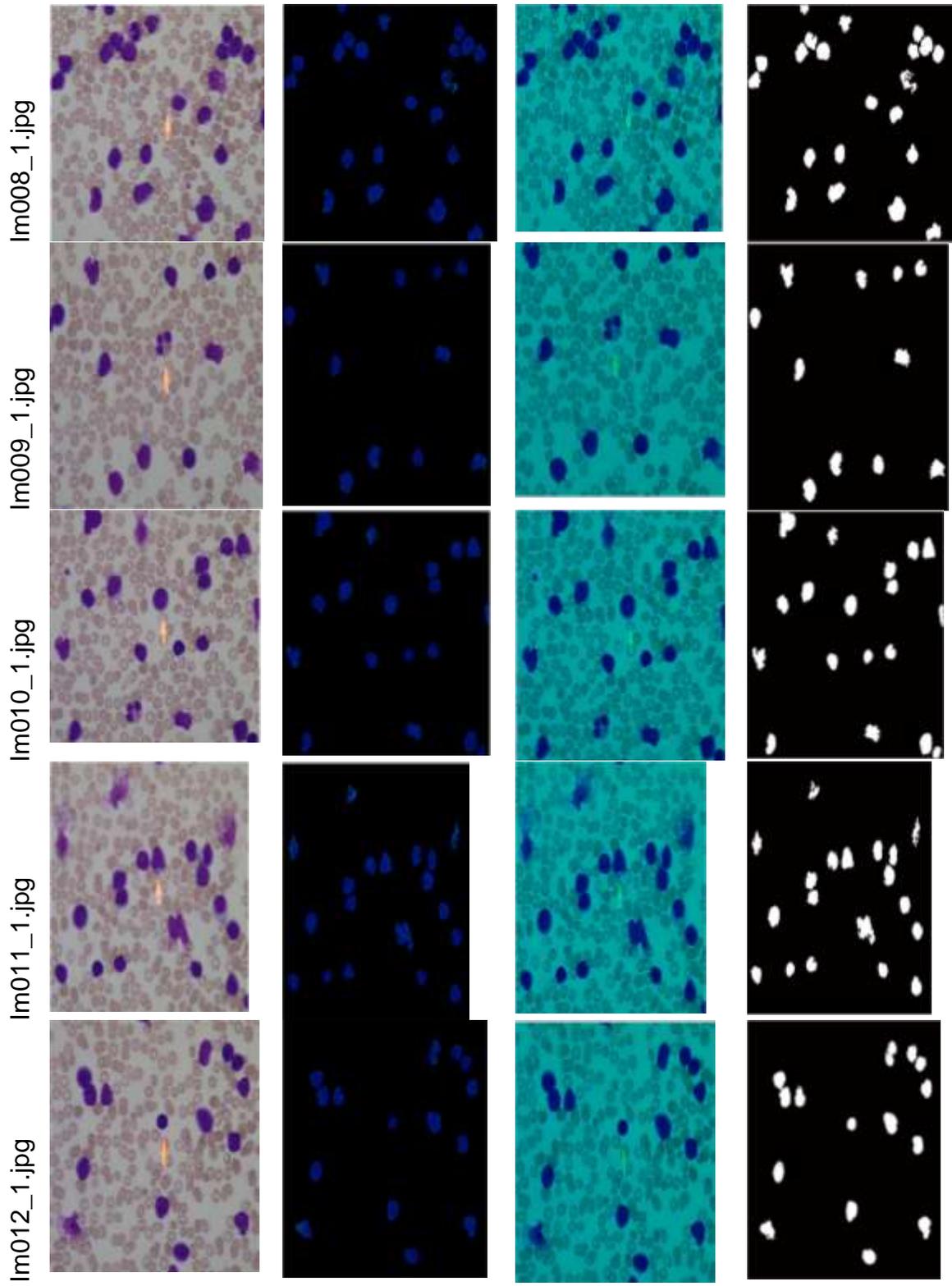
Métricas	Resultado
Precisión	0.9523
Especificidad	0.7035
Sensibilidad	0.9688
f-score	0.8152
K	0.8037

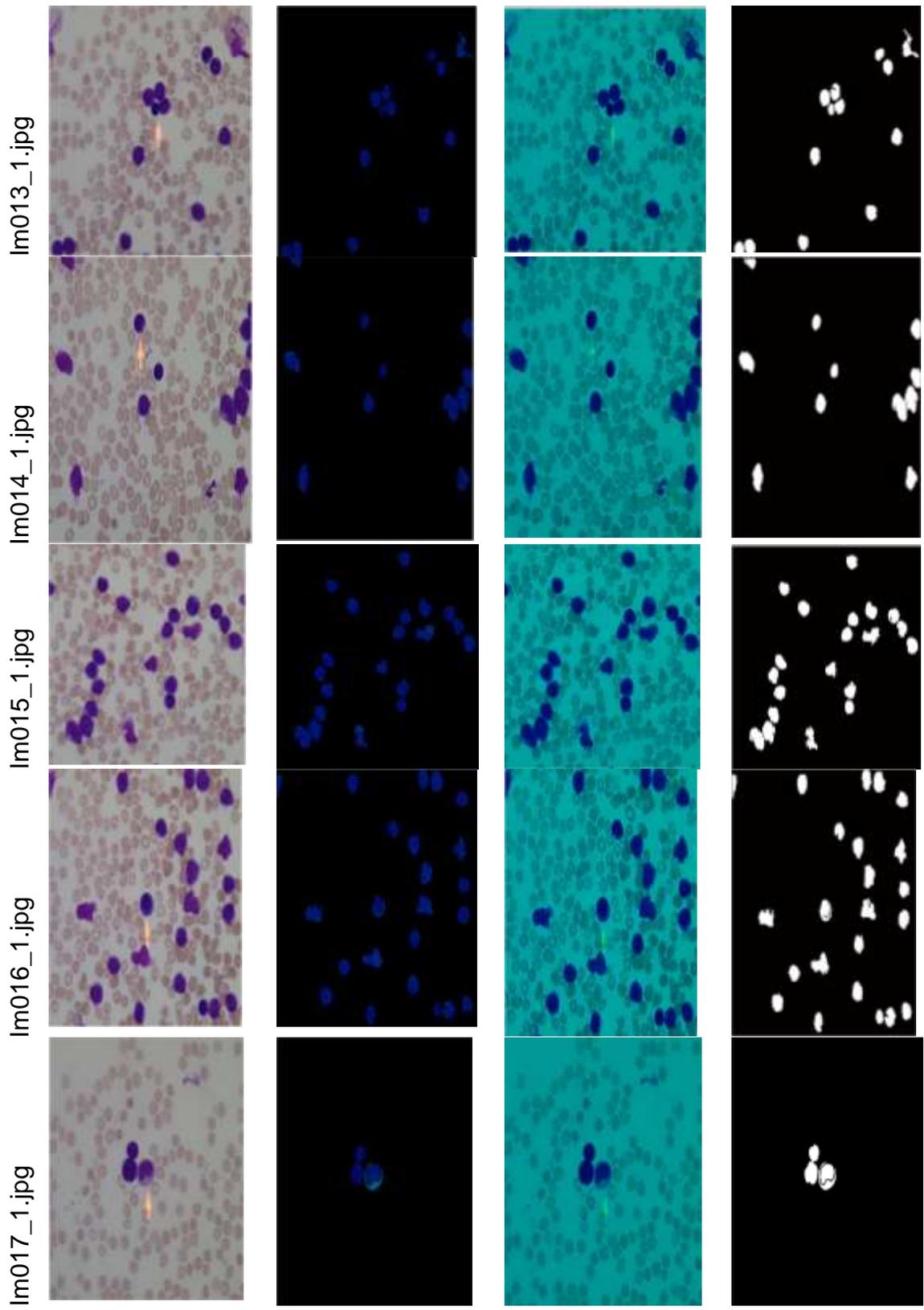
De acuerdo al parámetro K , el nivel de precisión de la propuesta puede clasificarse como excelente, ya que el valor de K obtenido es mayor que 0.8.

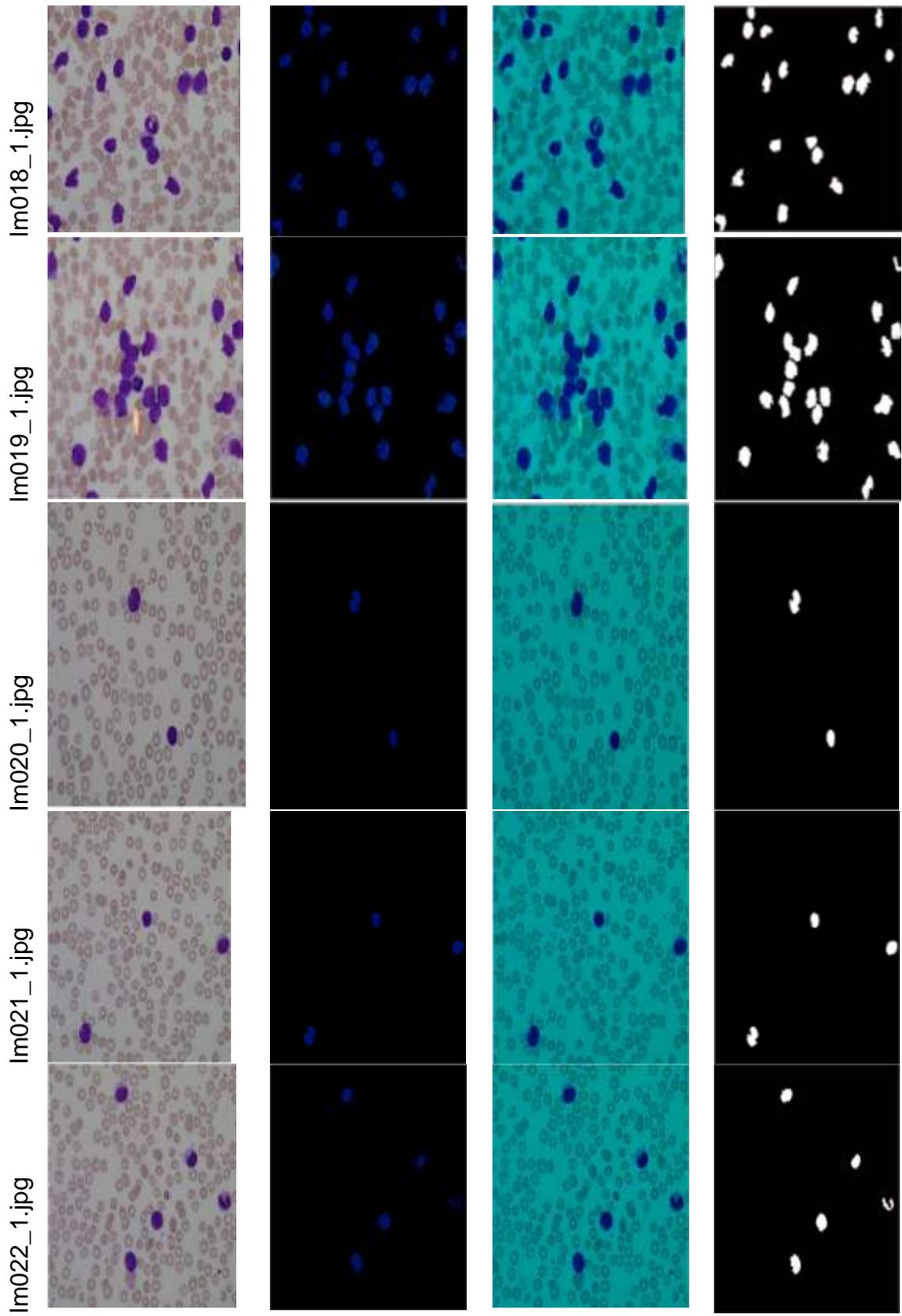
Imágenes resultantes

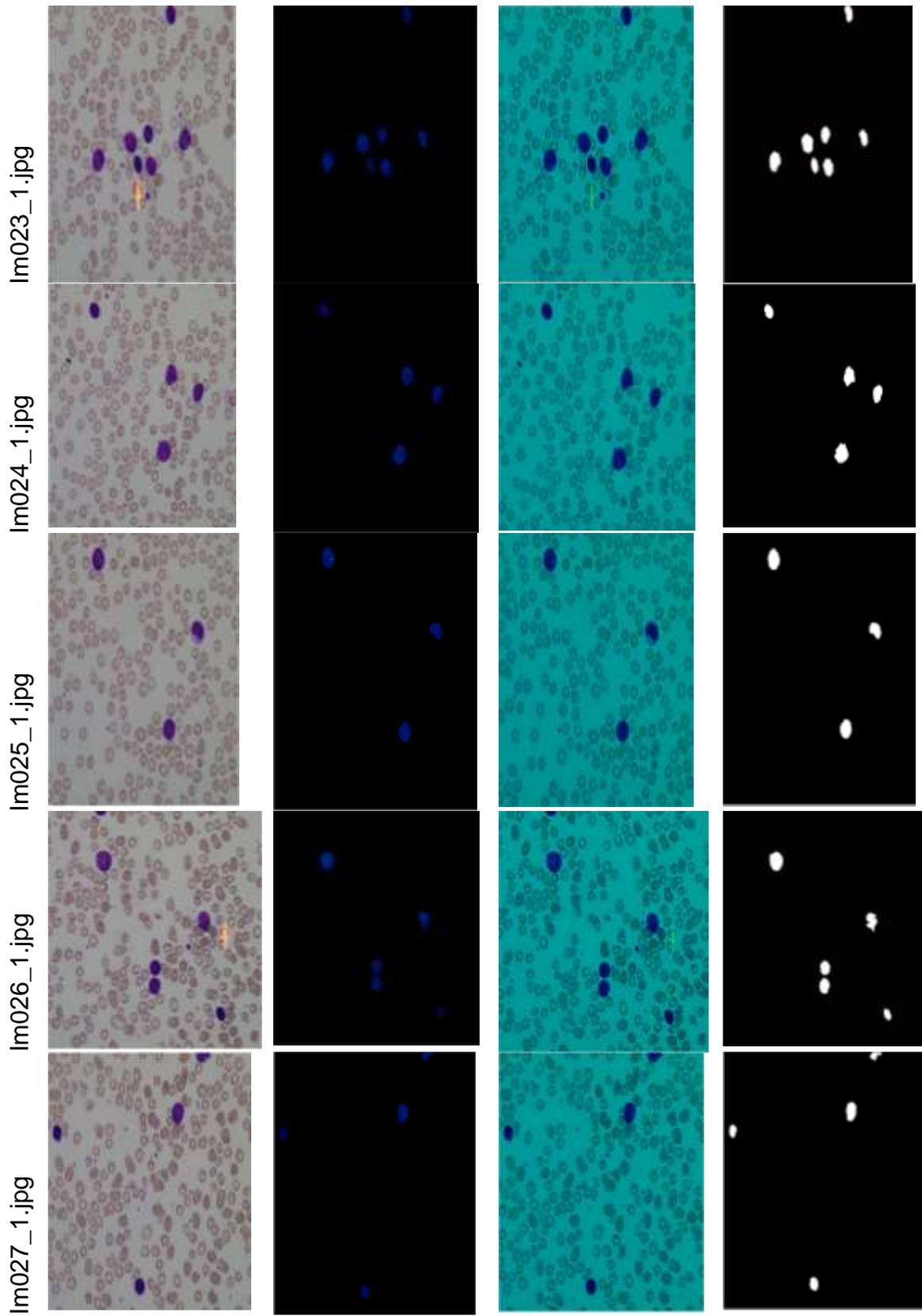


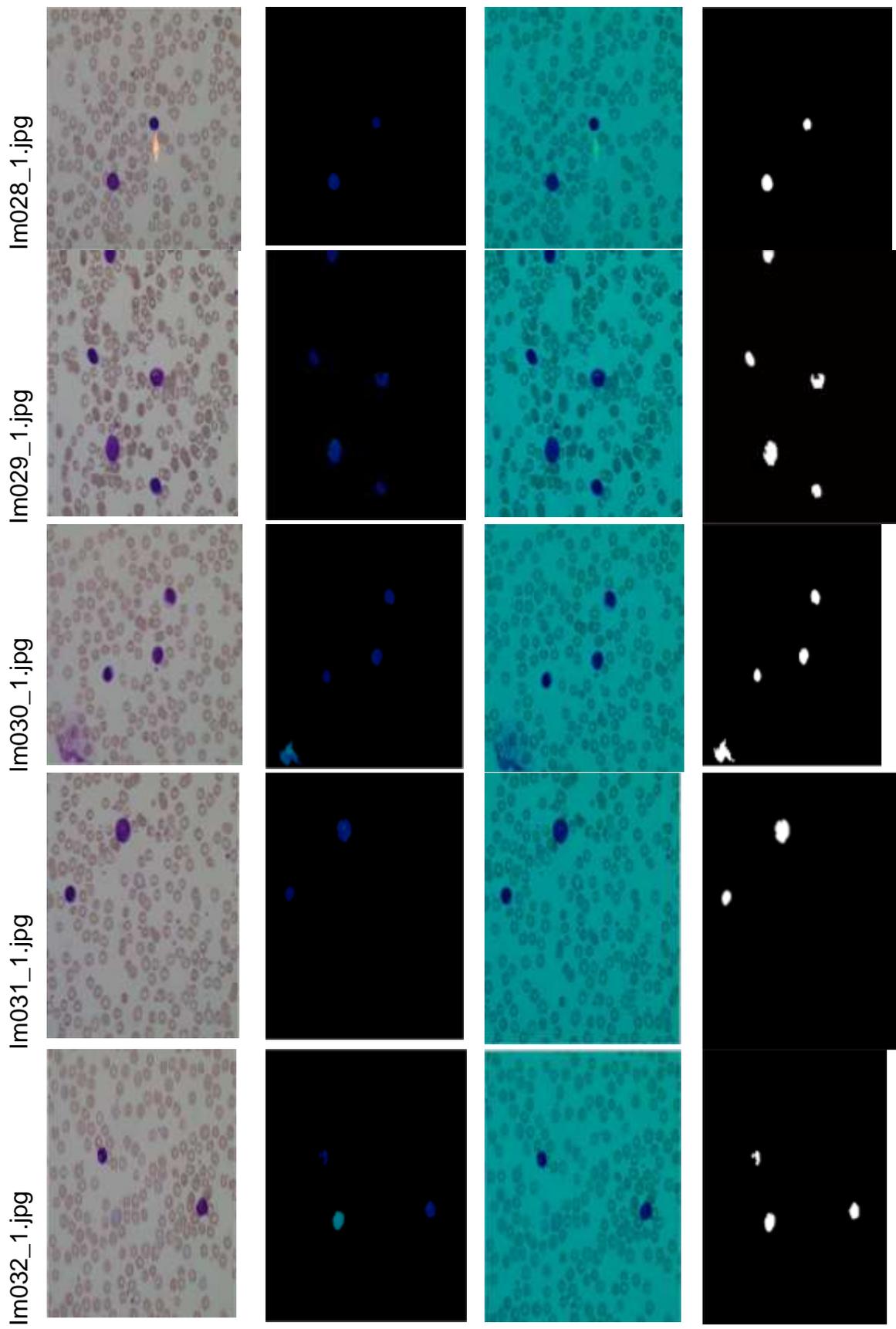


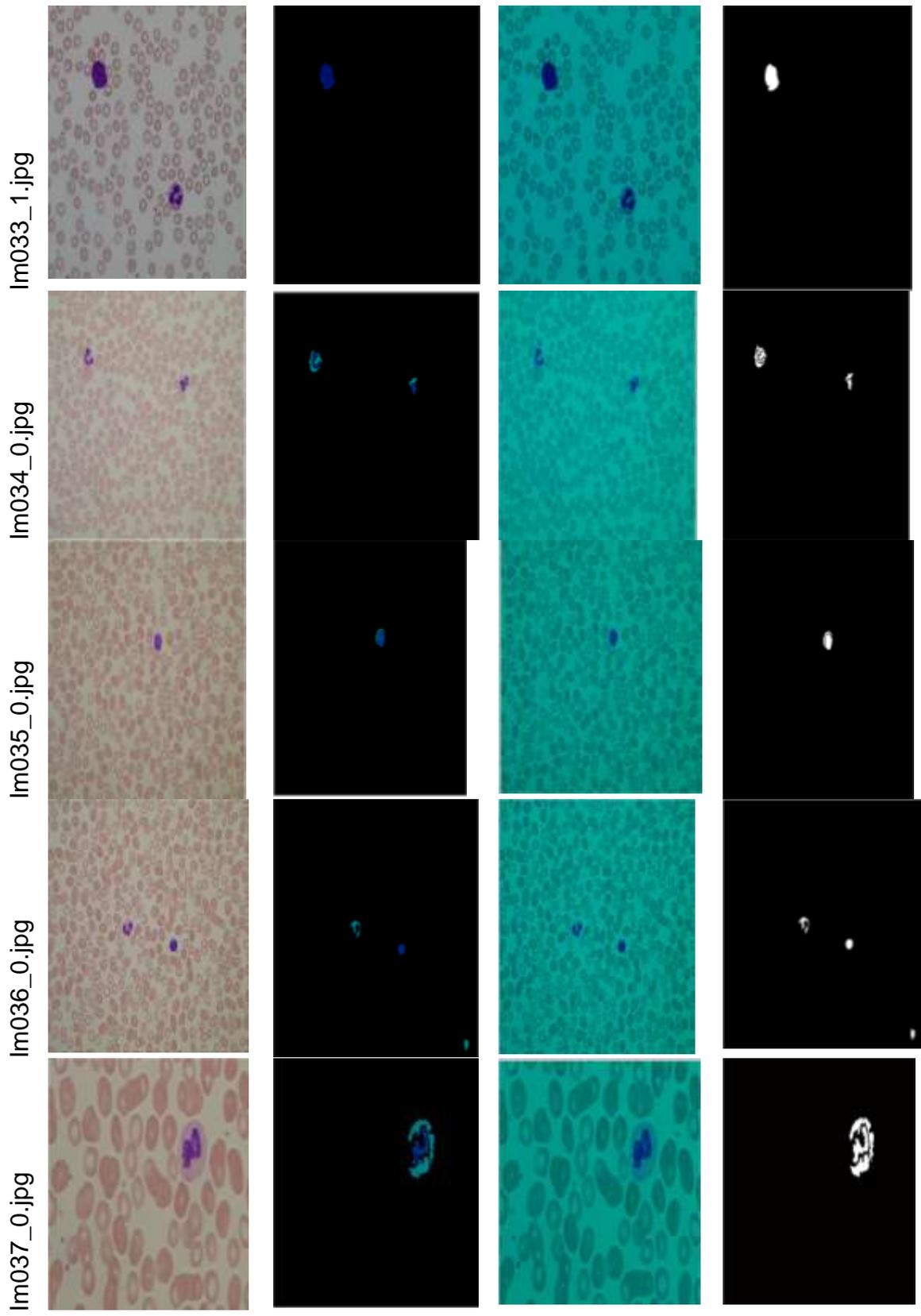


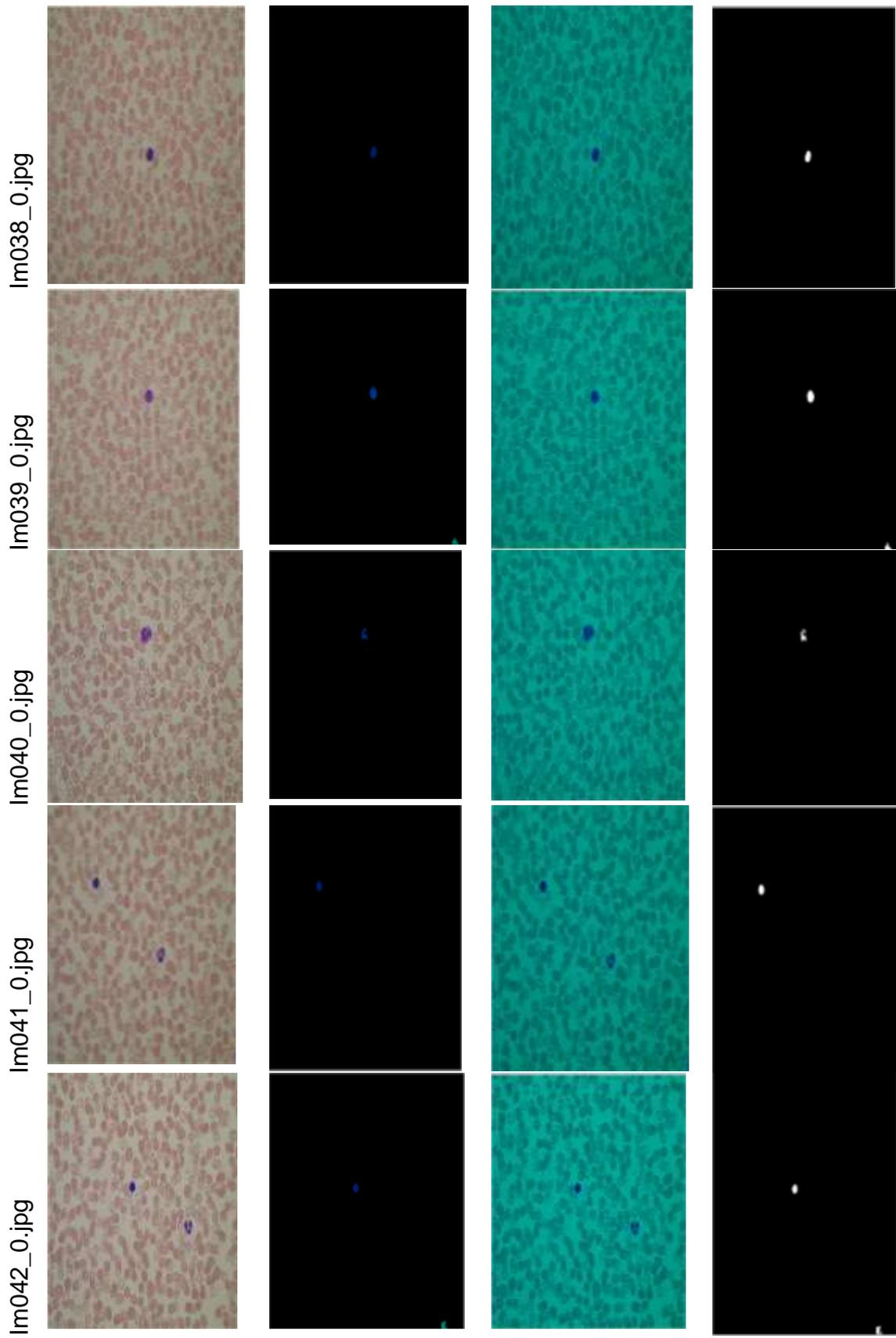


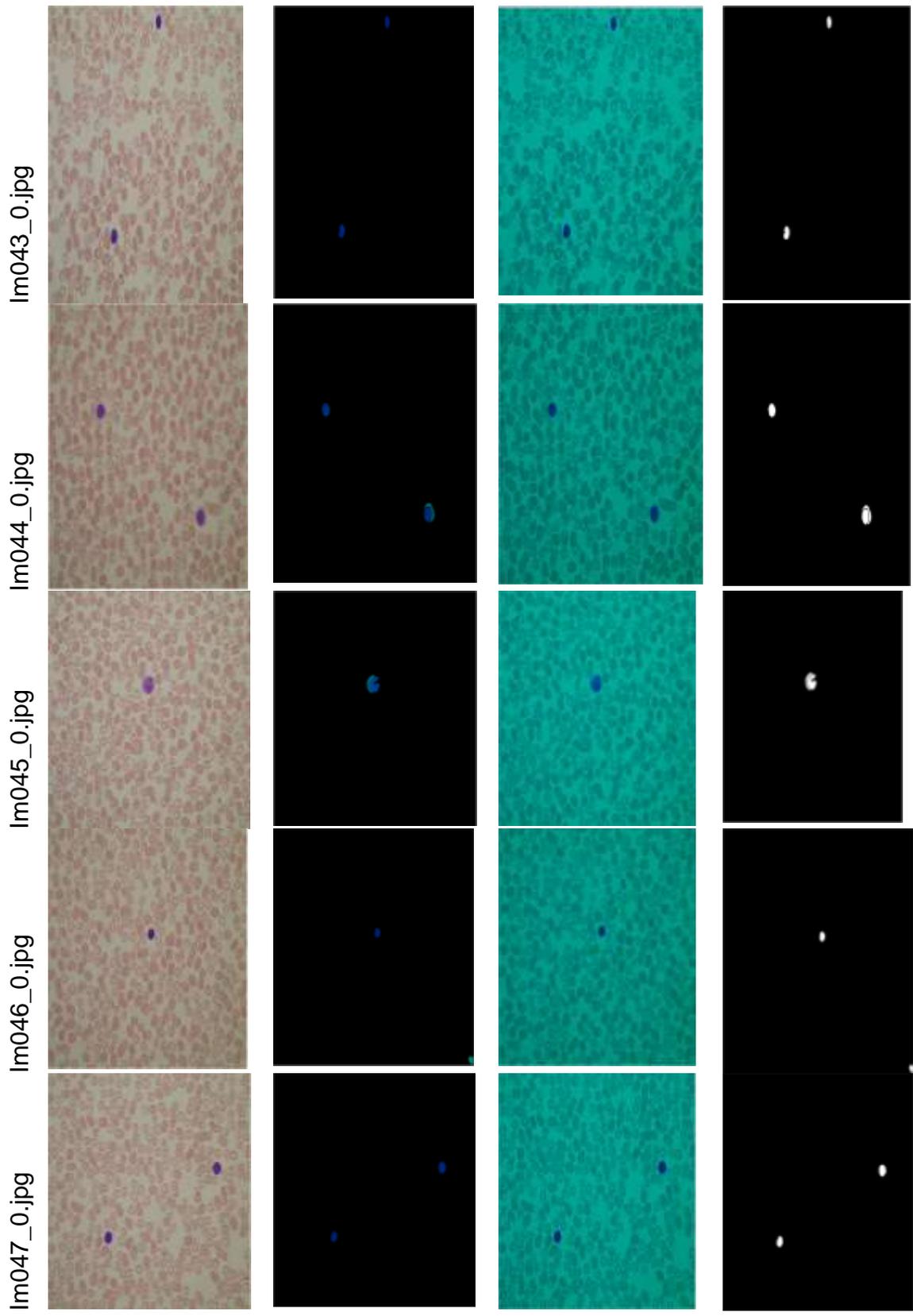


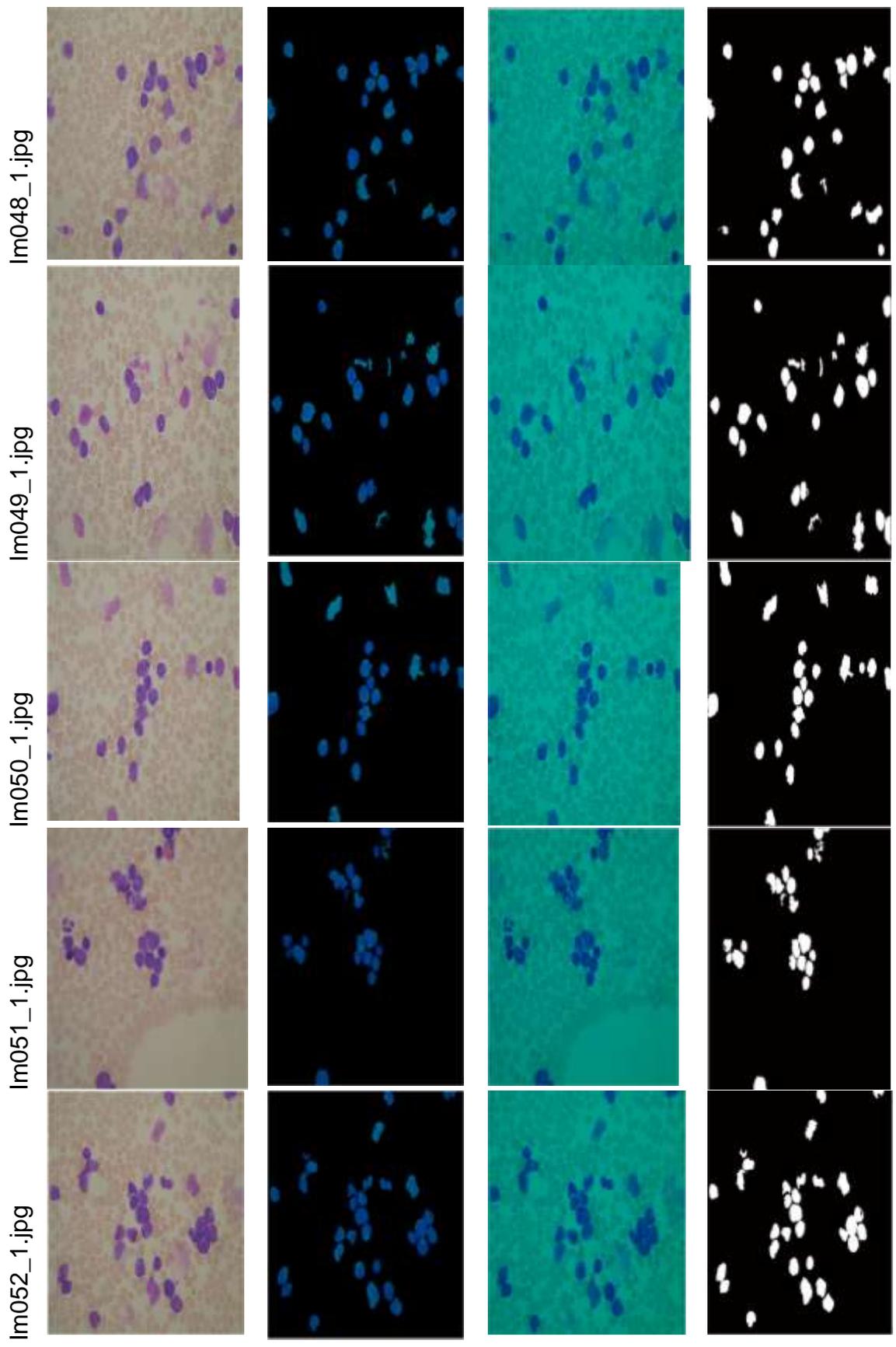


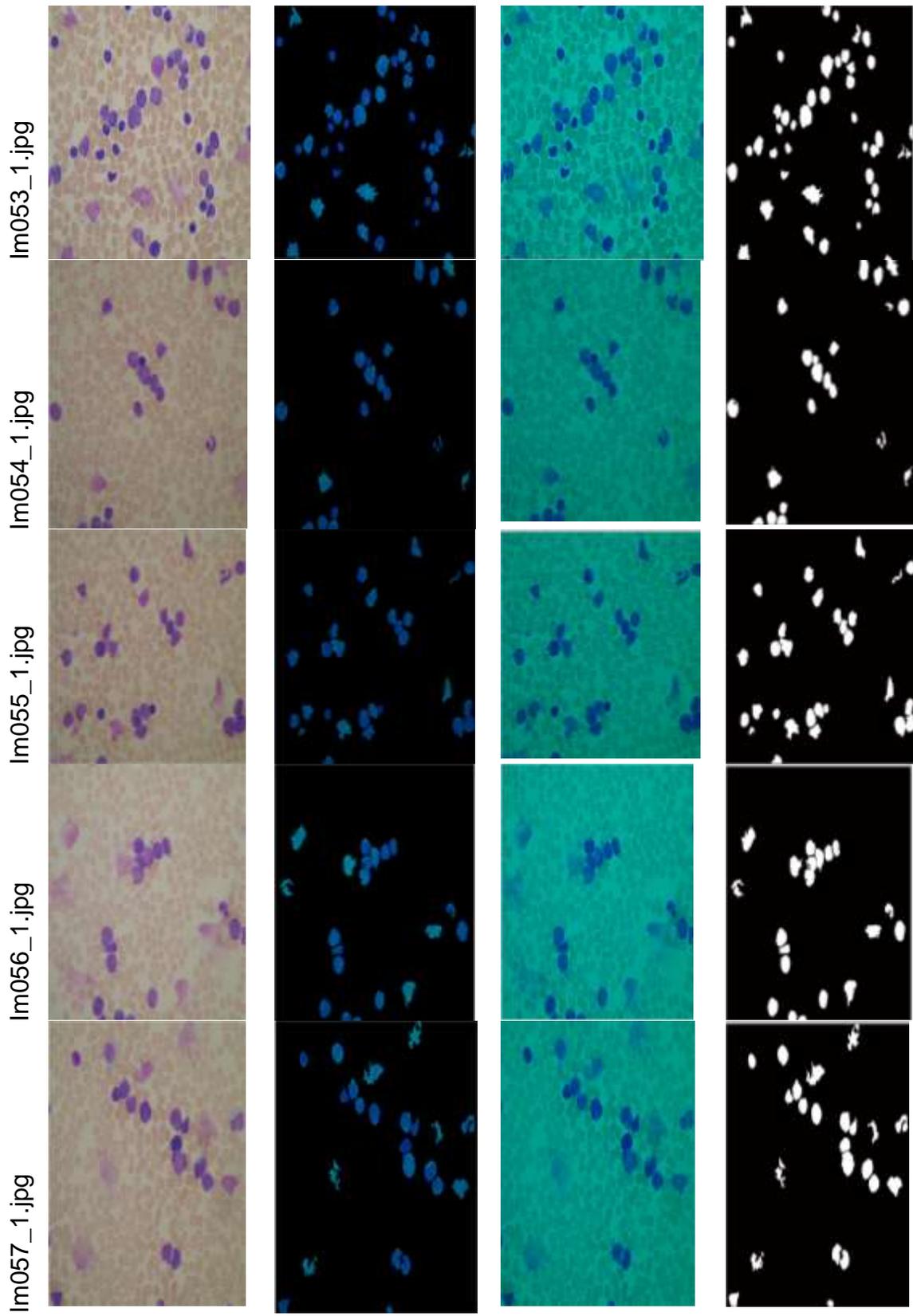




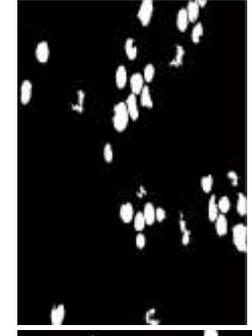
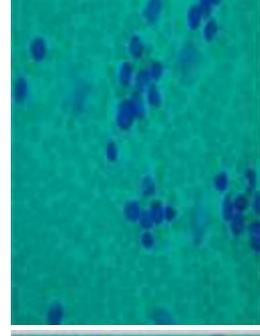
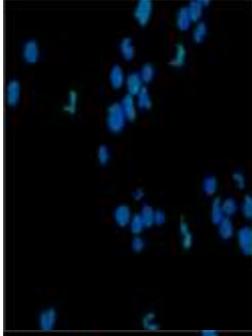
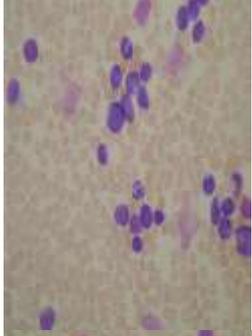




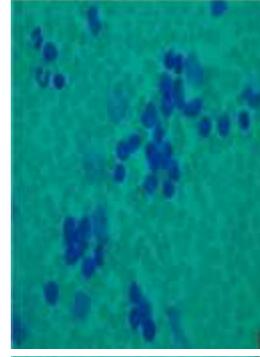
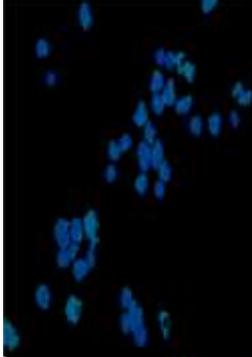
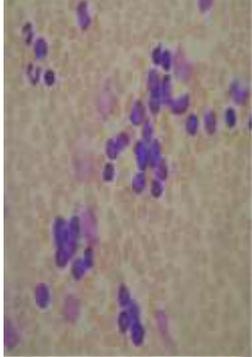




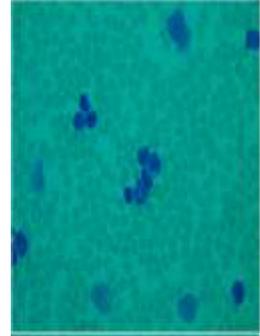
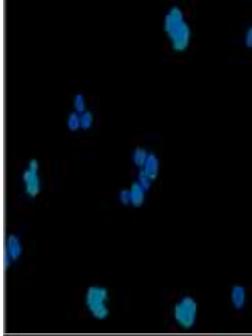
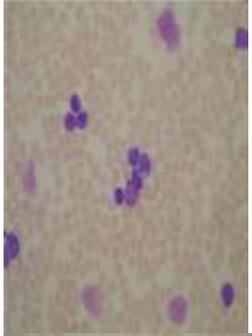
Im058_1.jpg



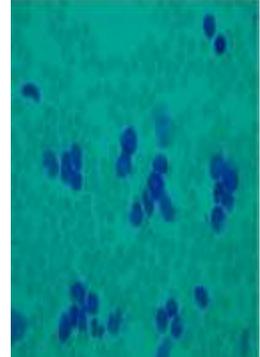
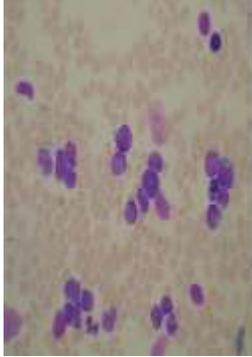
Im059_1.jpg

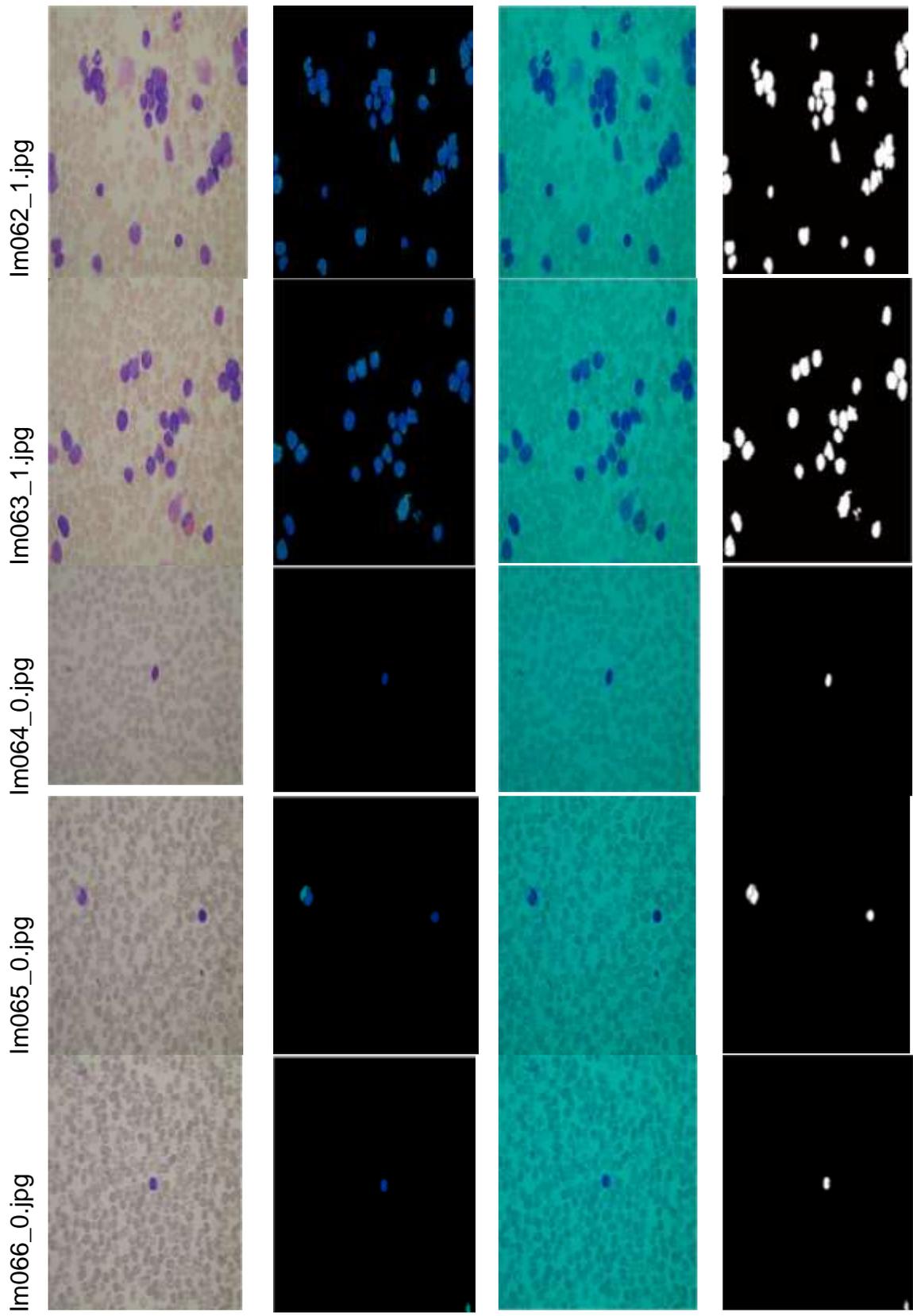


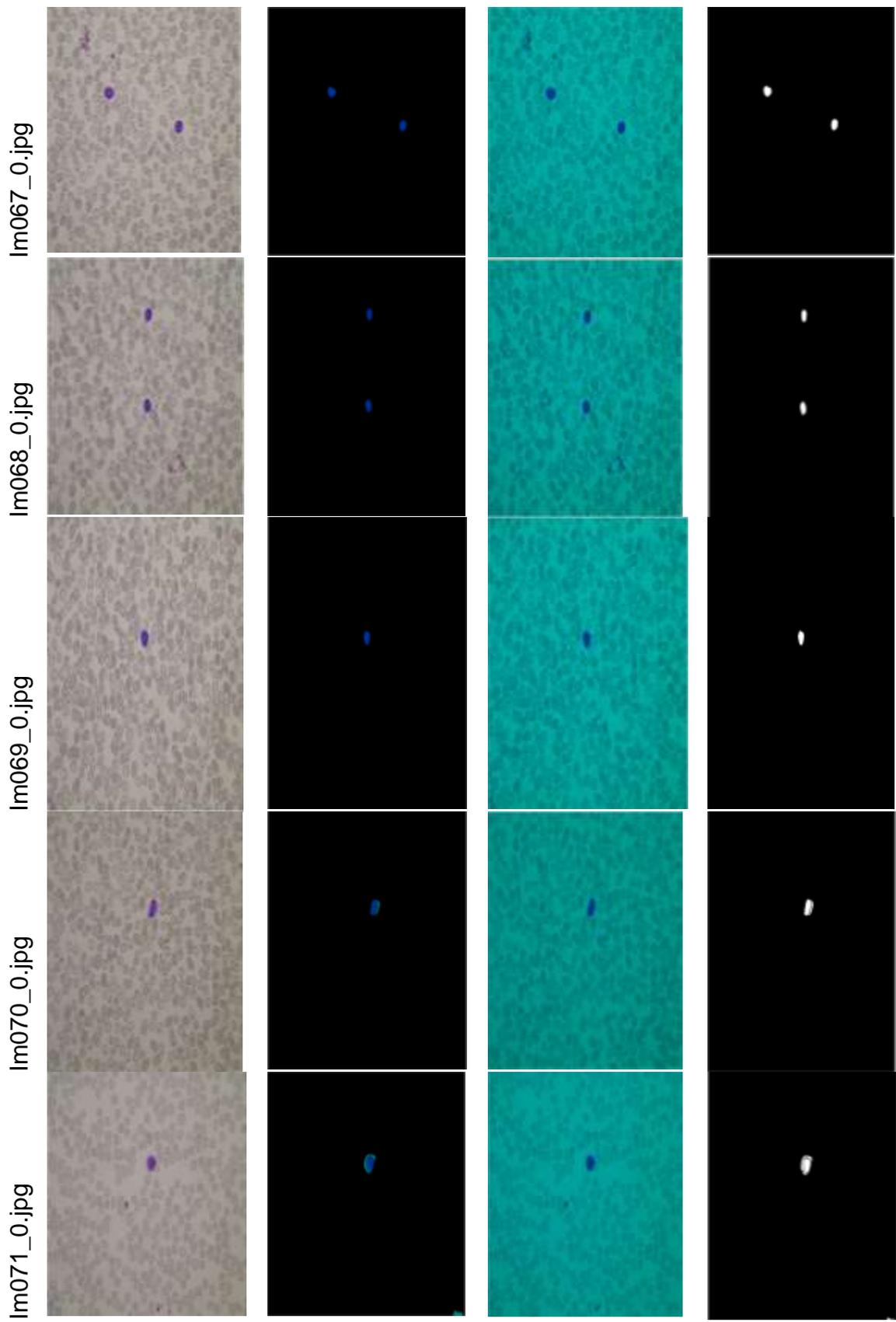
Im060_1.jpg

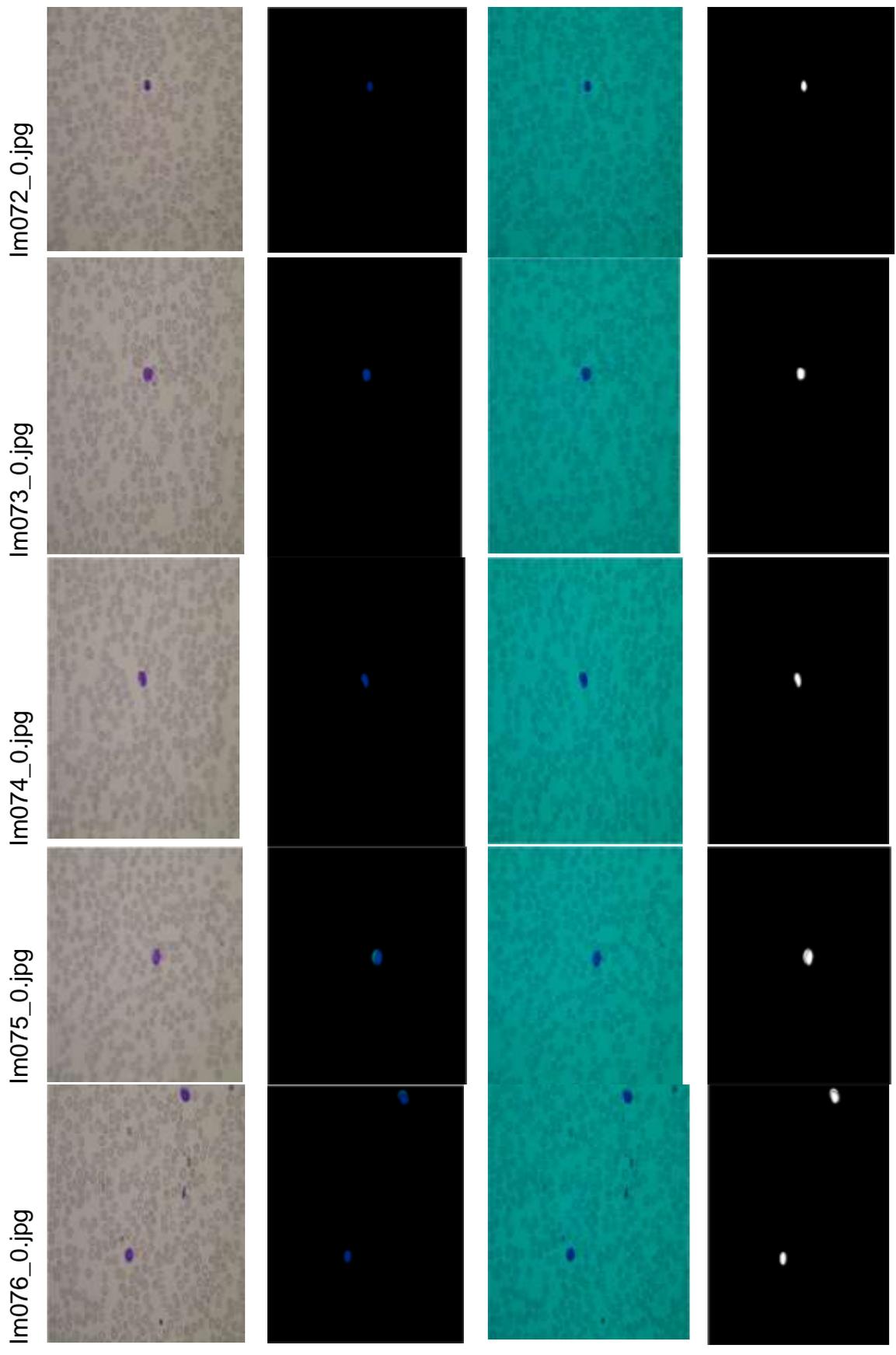


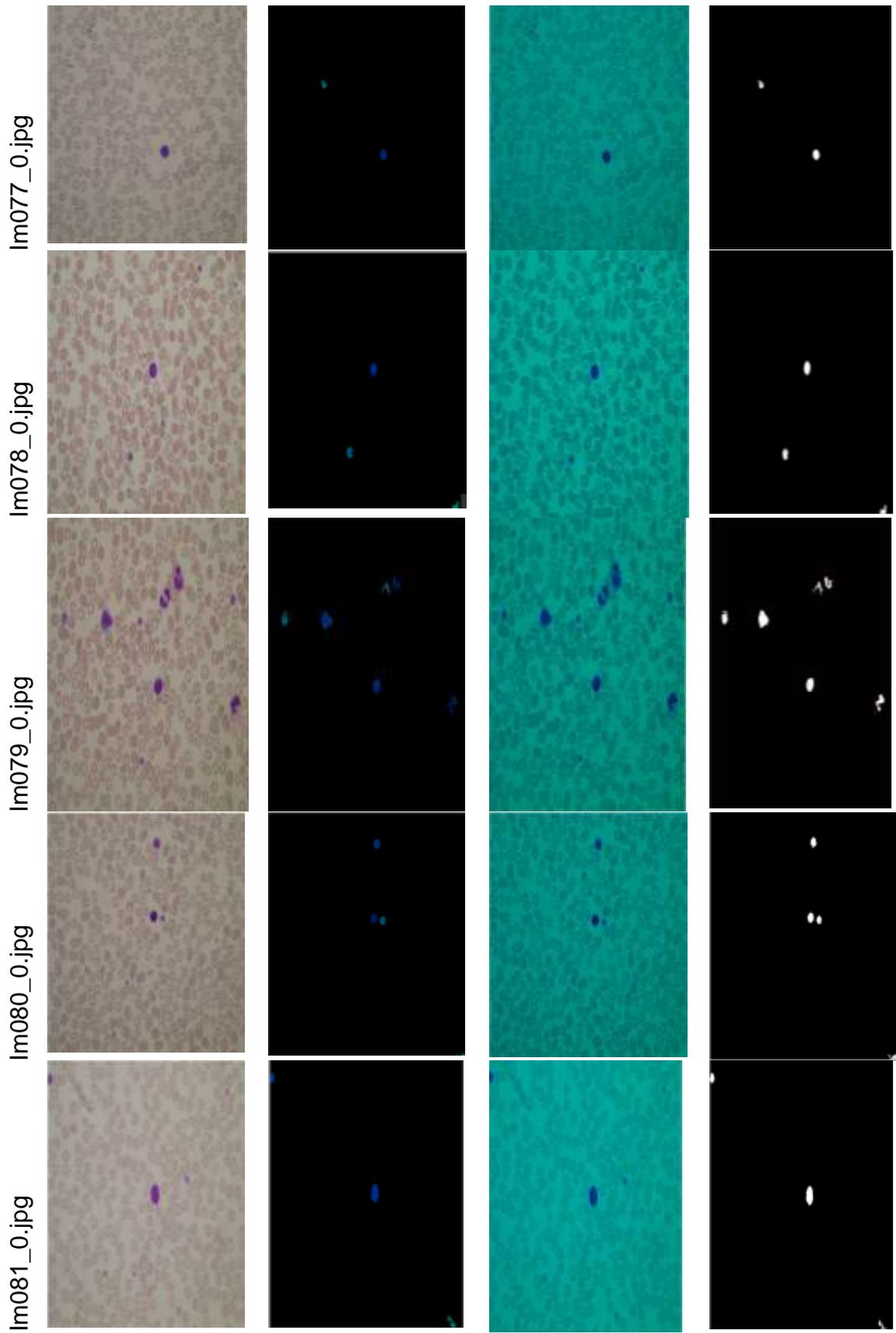
Im061_1.jpg

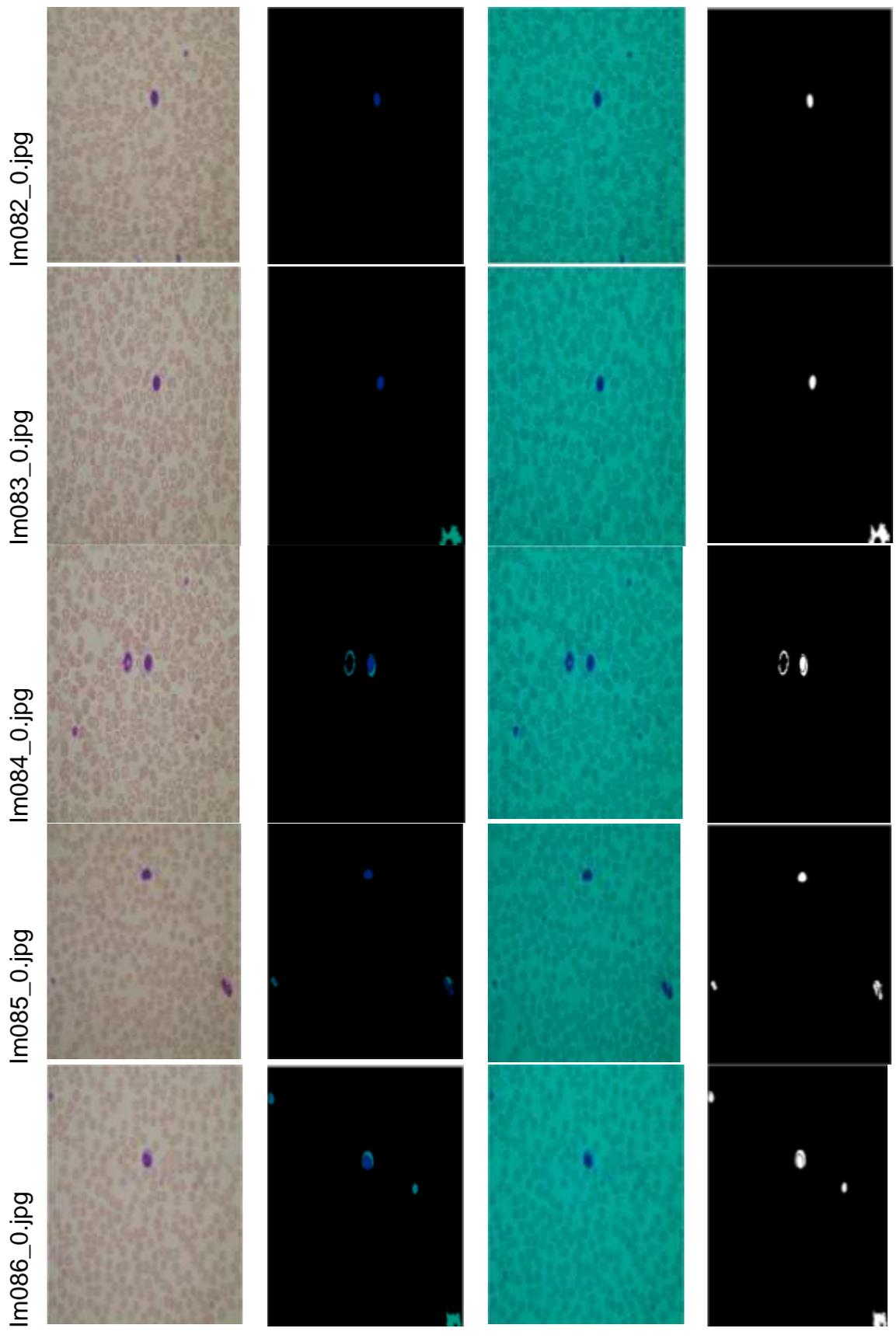


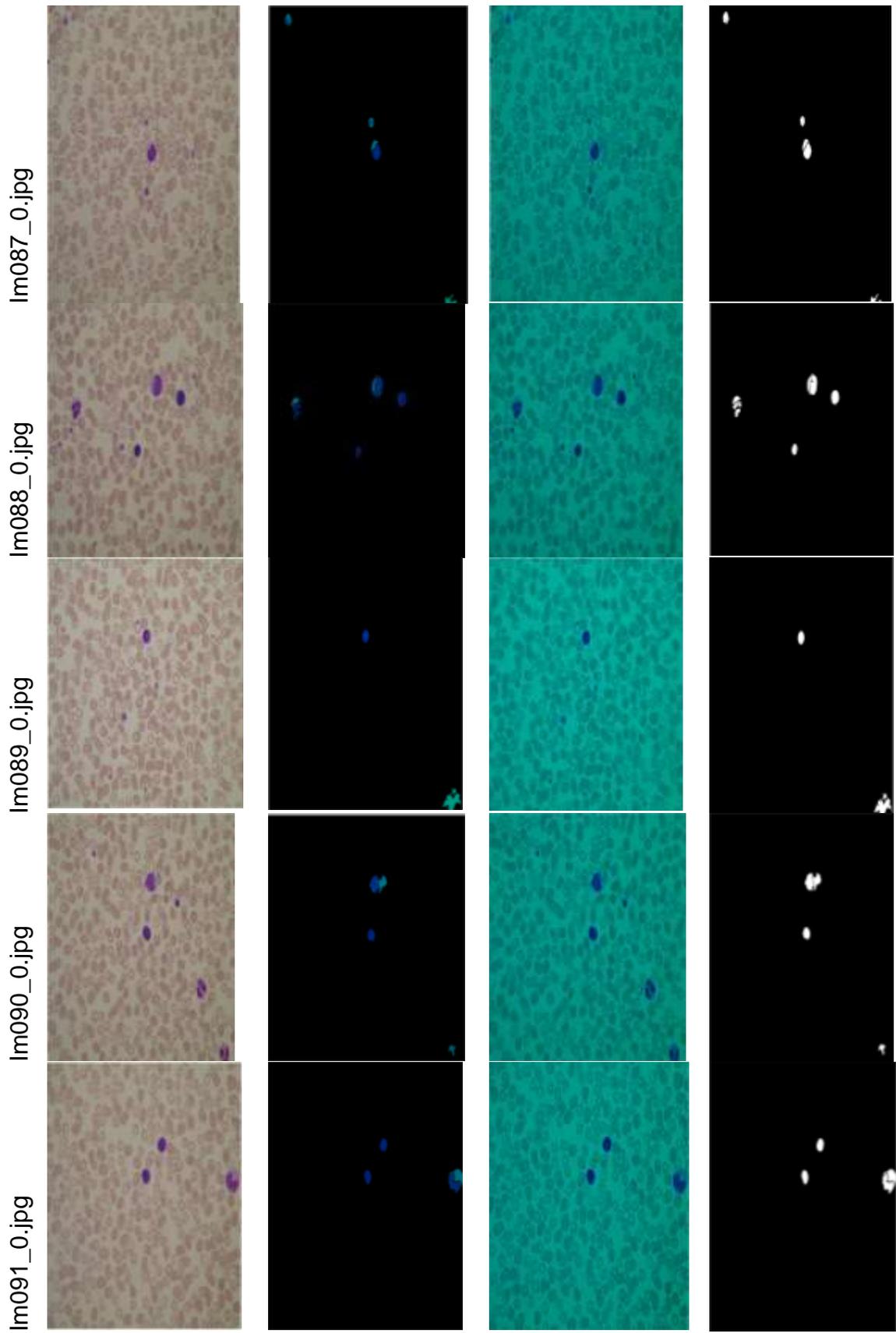


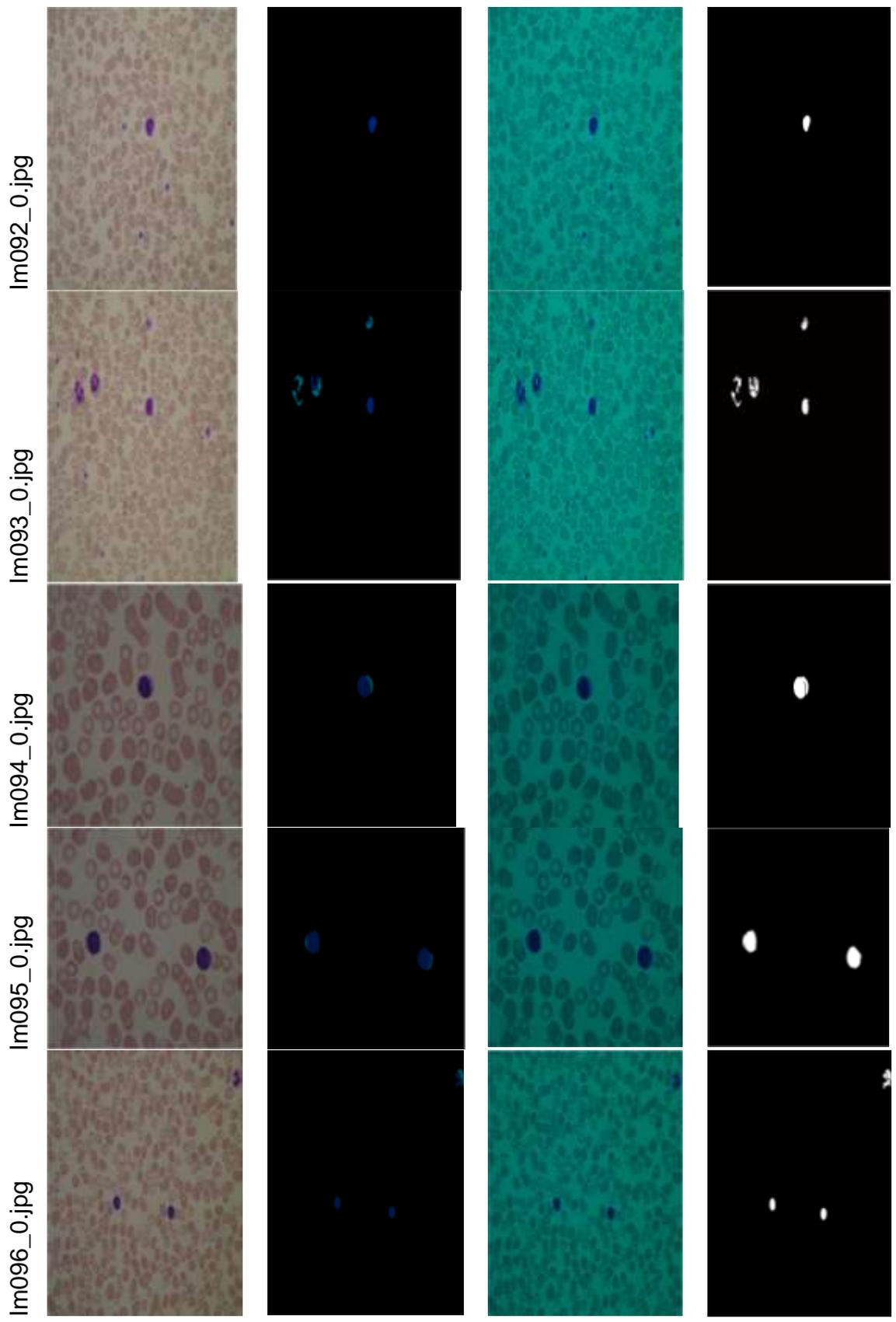


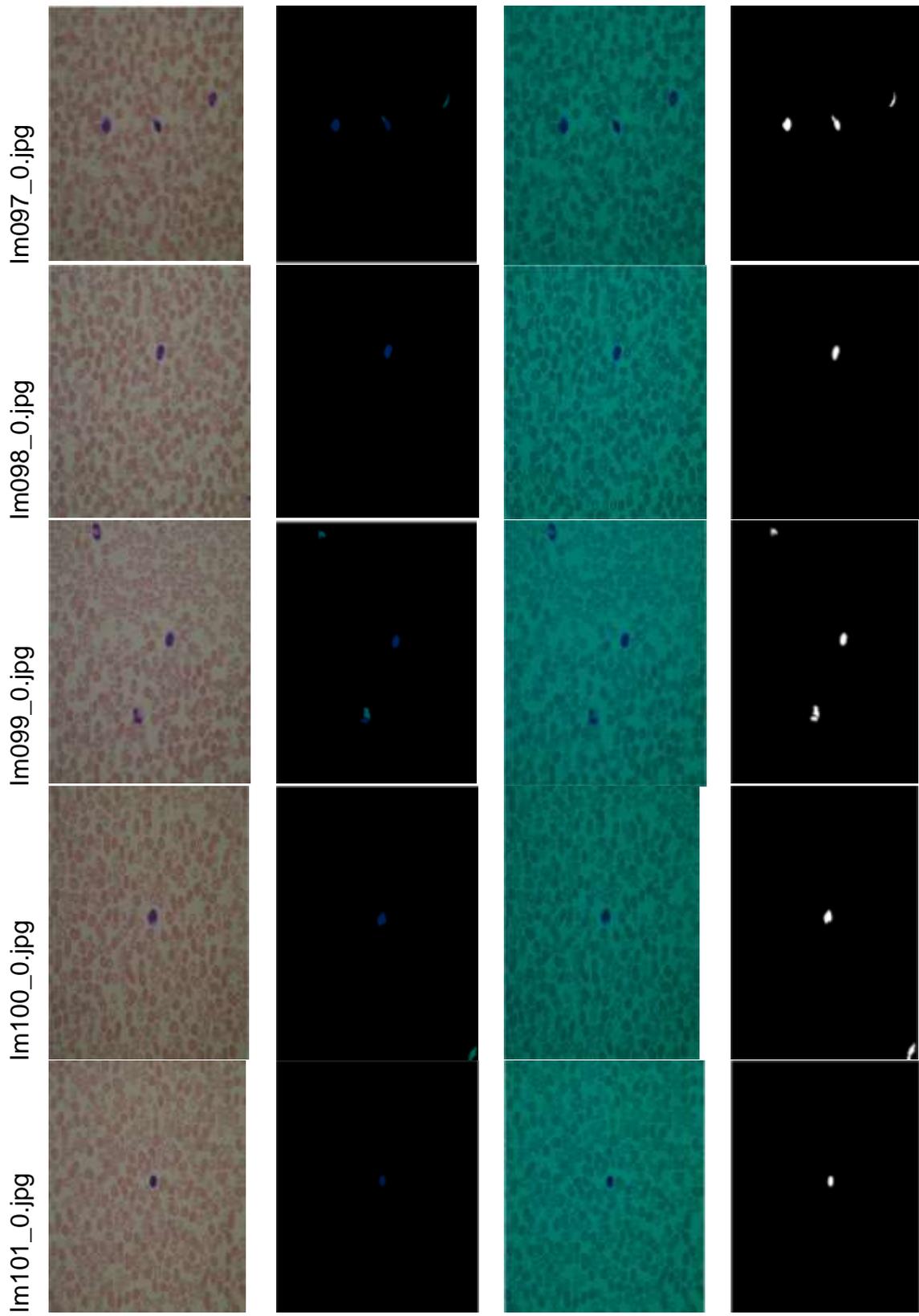




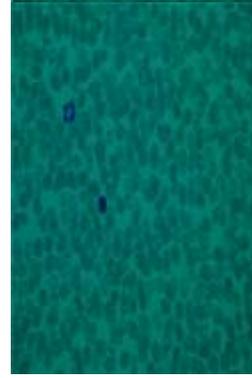
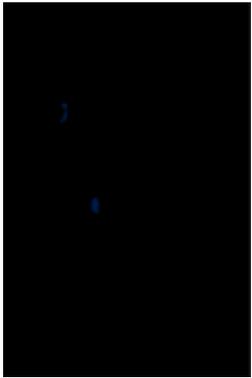
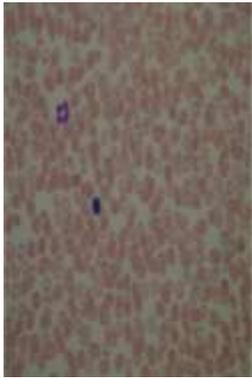




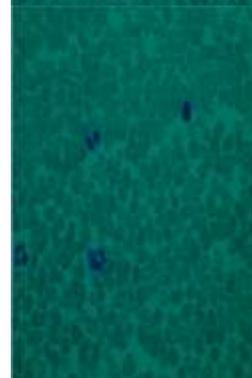
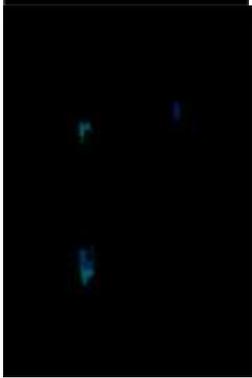
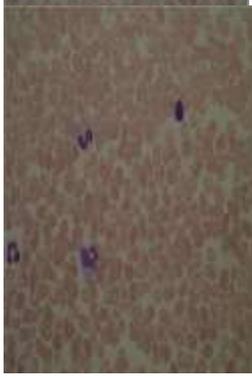




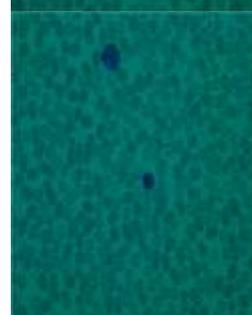
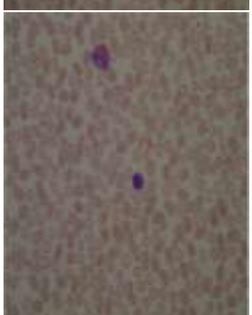
Im106_0.jpg



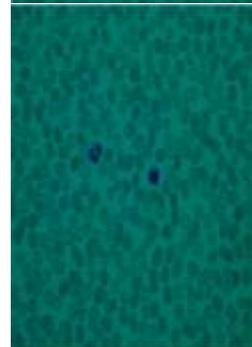
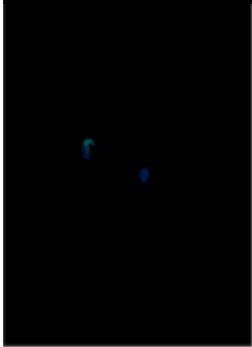
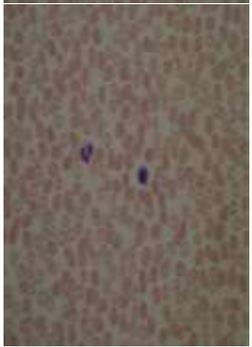
Im105_0.jpg



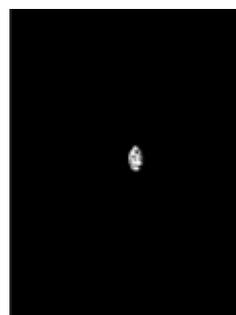
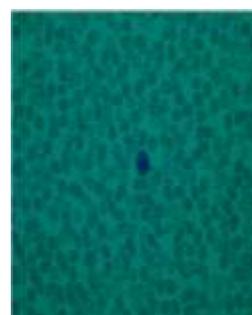
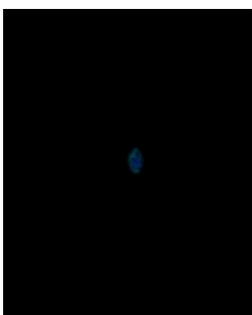
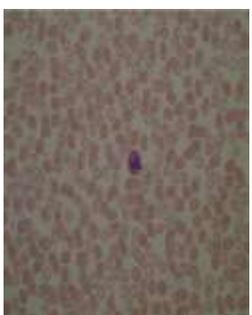
Im104_0.jpg



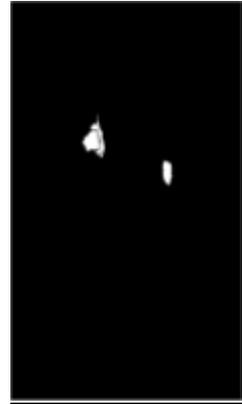
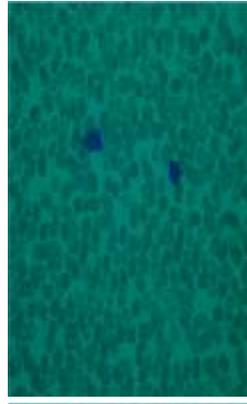
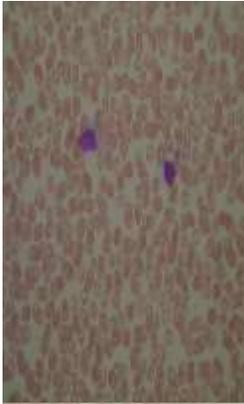
Im103_0.jpg



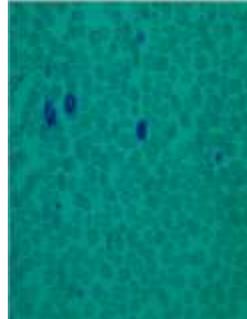
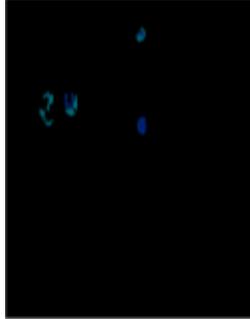
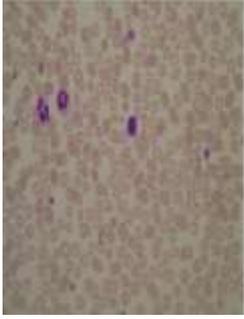
Im102_0.jpg



Im107_0.jpg



Im108_0.jpg



Funcionamiento del programa

El presente programa consta de 5 pasos por los cuales se trata la imagen a color, para la obtención de un mejor resultado del conteo de células blancas.

A continuación, se describe el proceso de cada paso:

1. El tamaño de la imagen: en este paso, se procesa la imagen en tamaño real para obtener el tamaño total de esta por medio del valor de cada pixel, por medio del espacio RGB, para saber que pixeles son de color rojo, verde y azul.

Una vez que se sabe cuál es el valor de cada pixel se guarda en una matriz, esta matriz se va creando de acuerdo a la imagen que se procesa.

```
I=imresize(imread('Im001_1.jpg'),0.5);  
[n,m,p]=size(I);  
I(:,:,1)=zeros(n,m);  
clear P S J  
P=zeros(3,n*m);
```

2. Quitar la componente de color rojo: es decir en este paso se quitarán todos los pixeles, que contengan valores que pertenezcan al color rojo en el sistema RGB.
3. Normalización de los vectores: aquí se procede a normalizar el valor de los pixeles resultantes a un mismo valor por medio de una matriz.

```
for k=1:3  
    P(k,:)=reshape(double(I(:,:,k)),[1,n*m]);  
end  
for k=1:n*m  
    if norm(P(:,k))>0  
        P(:,k)=P(:,k)/norm(P(:,k));  
    end  
end
```

4. Cálculo de la covarianza: se procede con los cálculos de la media de la imagen a tratar, se realiza una matriz de covarianza y valores propios de la matriz de covarianza

Al resolver los valores propios de la covarianza surgen dos casos:

Caso 1: donde si los pixeles de la imagen, están dentro del rango seleccionado del color en el sistema RGB, quiere decir que en esa imagen si cuenta con CB.

Caso 2: donde en la imagen tratada no está dentro del rango seleccionado en el sistema RGB que quiere decir que en esa imagen no cuenta con CB.

```
mu=mean(P')';
Om=cov(P');
[V,D]=eig(Om*Om);
clear V Om
mx=sqrt(sqrt(max(D(:)))));
clear D
I2=I;
B=ones(n,m);
k=0;
for j=1:m
    for i=1:n
        k=k+1;
        if norm(P(:,k)-mu)<mx
            B(i,j)=0;
            I2(i,j,:)=zeros(1,1,3);
        end
    end
end
end
```

5. Detección de bordes: se procede a la detección de bordes de la imagen por medio, de las máscaras de sobel, se trata a la imagen por medio de la intensidad de cada pixel y así es como se detecta si hay CB en la imagen y se va segmentando cada una de ellas.

Conclusiones

En este trabajo presentamos una propuesta para la segmentación de glóbulos blancos, para el conteo automático y el reconocimiento en imágenes de frotis de sangre. El enfoque de segmentación se basa en imitar la percepción humana del color. La variación cromática de los glóbulos blancos es alta con respecto al tono de los otros elementos del frotis de sangre; por lo tanto, se seleccionan píxeles de alta varianza cromática, porque dan forma a los glóbulos blancos.

También presentamos una propuesta para separar los glóbulos blancos superpuestos, donde los bordes se detectan calculando las variaciones de color entre los glóbulos blancos superpuestos. Se crea un canal de intensidad calculando las magnitudes de los vectores de color de los píxeles; El operador laplaciano se aplica al canal de intensidad con una máscara propuesta por los autores. Las diferencias cromáticas se obtienen calculando los cambios de orientación entre los vectores de color de los píxeles; Si la magnitud laplaciana y los cambios de orientación son mayores que los umbrales específicos, entonces se detecta un borde, por lo tanto, esos píxeles se ponen a cero.

Mostramos que nuestra propuesta de segmentación es lo suficientemente precisa como para contar glóbulos blancos; pero también, para extraer características para la clasificación. Realizamos experimentos con tres bases de datos de imágenes diferentes, donde los resultados obtenidos para el recuento y la clasificación están cerca de los resultados informados en trabajos relacionados. Por lo tanto, afirmamos que nuestra propuesta de segmentación para los glóbulos blancos es competitiva.

El trabajo futuro es desarrollar una técnica para calcular los valores óptimos de δ_ϕ , δ_I y δ_s dependiendo de las condiciones de intensidad y aumento. Nuestra propuesta está contemplada para implementarse en un dispositivo para automatizar los procesos de conteo y clasificación; por lo tanto, las imágenes se capturan en las mismas condiciones. Por lo tanto, los valores de umbral óptimos se calculan solo una vez y luego se fijan para procesar cualquier imagen adquirida.

Referencias bibliográficas

1. Tsai M.H., Yu S.S., Chan Y.K., Jen C.C.: Blood smear image based malaria parasite and infected-erythrocyte detection and segmentation. *J Med Syst*, 39:118, 2015
2. Jan Z., Khan A., Sajjad M., Muhammad K., Rho S., Mehmood I.: A review on automated diagnosis of malaria parasite in microscopic blood smears images. *Multimed Tools Appl*, 77:9801-9826, 2018
3. Liu H., Cao H., Song E.: Bone marrow cells detection: a technique for microscopic image analysis. *J Med Syst*, 43:82, 2019
4. Abdulhay E., Mohammed M.A., Ibrahim D.A., Arunkumar N., Venkatraman V.: Computer aided solution for automatic segmenting and measurements of blood leucocytes using static microscope images. *J Med Syst*, 42:58, 2018
5. Mohd Safuan S.N., Md Tomari M.R., Wan Zakaria W.N.: White blood cell (WBC) counting analysis in blood smear images using various color segmentation methods. *Measurement*, 116:543-555, 2018
6. Ruberto C.D., Loddo A., Putzu L.: A leucocytes count system from blood smear images. *Mach Vis Appl*, 27:1151-1160, 2016
7. Ruberto C.D., Loddo A., Putzu L.: Learning by sampling for white blood cells segmentation. *Int Conf Image Anal Process*, LNCS 9279, pp. 557-567, 2015
8. Alomari Y.M., Sheick Abdullah S.N.H., Zaharatul Azma R., Omar K.: Automatic detection and quantification of WBCs and RBCs using iterative structured circle detection algorithm. *Comput Math Method Med*, 2014:1-17, 2014

9. Shahin A.I., Guo Y., Amin K.M., Sharawi A.A.: White blood cells identification system based on convolutional deep neural learning networks. *Comput Method Program Biomed*, 168:69-89, 2019
10. Lopez-Puigdollers D., Traver V.J., Pla F.: Recognizing white blood cells with local image descriptors. *Expert Syst Appl*, 115:695-708, 2019
11. Wang Q., Chang L., Zhou M., Li Q., Liu H., Guo F.: A spectral and morphologic method for white blood cell classification. *Opt Laser Technol*, 84:144-148, 2016
12. Hegde R.B., Prasad K., Hebbar H., Singh B.M.: Comparison of traditional image processing and deep learning approaches for classification of white blood cells in peripheral blood smear images. *Biocybern Biomed Eng*, 39(2):382-392, 2019
13. Gupta D., Arora J., Agrawal U., Khanna A., Albuquerque V.H.: Optimized Binary Bat algorithm for classification of white blood cells. *Measurement*, 143:180-190, 2019
14. Hedge R.B., Prasad K., Hebbar H., Singh B.M.K.: Development of a robust algorithm for detection of nuclei and classification of white blood cells in peripheral blood smear images. *J Med Syst*, 42:110, 2018
15. Nazlibilek S., Karacor D., Ercan T., Sazli M.H., Kalender O., Ege Y.: Automatic segmentation, counting, size determination and classification of white blood cells. *Measurement*, 55:58-65, 2014
16. Ghosh P., Chattacharjee D., Nasipuri M.: Blood smear analyzer for white blood cell counting: a hybrid microscope image analyzing technique. *Appl Soft Comput*, 46:629-638, 2016
17. Andrade A.R., Vogado L.H.S., Veras R., Silva R., Araujo F., Medeiros F.: Recent computational methods for white blood cell nuclei segmentation: a comparative study. *Comput Method Program Biomed*, 173:1-14, 2019

18. Cuevas E., Diaz M., Manzanarez M., Zaldivar D., Perez-Cisneros M.: An improved computer vision method for white blood cells detection. *Comput Math Method Med*, ID 137392, 2013
19. Liu Y., Cao F., Zhao J., Chu J.: Segmentation of white blood cells image using adaptive location and iteration. *IEEE J Biomed Health Inform*, 21(6):1644-1655, 2017
20. Li Q., Wang Y., Liu H., Wang J., Guo F.: A combined spatial-spectral method for automated white blood cells segmentation. *Opt Laser Technol*, 54:225-231, 2013
21. Cao F., Cai M., Chu J., Zhao J., Zhou Z.: A novel segmentation algorithm for nucleus in white blood cells based on low-rank representation. *Neural Comput Appl*, 28(Suppl 1):S503-S511, 2017
22. Cao F., Liu Y., Huang Z., Chu J., Zhao J.: Effective segmentations in white blood cell images using ϵ -SVR-based detection method. *Neural Comput Appl*, 31:6767-6780, 2019
23. Zheng X., Wang Y., Wang G., Liu J.: Fast and robust segmentation of white blood cell images by self-supervised learning. *Micron*, 107:55-71, 2018
24. Sayed G.I., Solyman M., Hassanien A.E.: A novel chaotic optimal foraging algorithm for unconstrained and constrained problems and its application in white blood cell segmentation. *Neural Comput Appl*, 31:7633-7664, 2019
25. Cao H., Liu H., Song E.: A novel algorithm for segmentation of leukocytes in peripheral blood. *Biomed Signal Process Control*, 45:10-21, 2018
26. Gonzalez R.C., Woods R.W.: *Digital image processing*, 4th edn. Pearson, 2018

27. Garcia-Lamont F., Cervantes J., Lopez-Chau A., Ruiz-Castilla S.: Color image segmentation using saturated RGB colors and decoupling the intensity from the hue. *Multimed Tools Appl*, 79:1555-1584, 2020
28. Bronshtein I., Semendyayev K., Musiol G., Muehlig H.: *Handbook of mathematics*, Springer, 2007
29. Ojala T., Pietikäinen M., Mäenpää T.: Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 24(7):971-987, 2002
30. Labati R.D., Piuri V., Scotti F.: All-idb: The acute lymphoblastic leukemia image database for image processing. *IEEE ICIP Int Conf Image Process*, pp. 2045-2048, 2011
31. Shahzad M., Umal AI, Khan M.A., Shirazi S.H., Khan Z., Yousaf W.: Robust method for semantic segmentation of whole-slide blood cell microscopic images. *Comput Math Methods Med*, 2020:4015323, 2020
32. Landis J.R., Koch G.G.: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1):159-174, 1977

Apéndice: Código desarrollado en Matlab

```
I=imread('Im001_1.jpg');
[n,m,p]=size(I);
I(:,:,1)=zeros(n,m);
clear P S J
P=zeros(3,n*m);
for k=1:3
    P(k,:)=reshape(double(I(:,:,k)),[1,n*m]);
end
for k=1:n*m
    if norm(P(:,k))>0
        P(:,k)=P(:,k)/norm(P(:,k));
    end
end
clear p
mu=mean(P')';
Om=cov(P');
[V,D]=eig(Om*Om);
clear V Om
mx=sqrt(sqrt(max(D(:))));
clear D
I2=I;
B=ones(n,m);
k=0;
for j=1:m
    for i=1:n
        k=k+1;
        if norm(P(:,k)-mu)<mx
            B(i,j)=0;
            I2(i,j,:)=zeros(1,1,3);
        end
    end
end
```

```

        end
    end
    Ix=zeros(n,m,3);Iy=zeros(n,m,3);
    v=zeros(3,1);
    for i=1:n
        for j=1:m
            v=double(reshape(I2(i,j,:),[3,1]));
            if norm(v)>0
                v=v/norm(v);
            end
            Ix(i,j,:)=reshape(v,[1,1,3]);
            Iy(i,j,:)=reshape(v,[1,1,3]);
        end
    end
    for k=1:3
        Ix(:,:,k)=imfilter(Ix(:,:,k),fspecial('sobel'));
        Iy(:,:,k)=imfilter(Iy(:,:,k),fspecial('sobel'));
    end
    D=sqrt(Ix.^2+Iy.^2);
    clear Ix Iy
    v=zeros(3,1);
    for i=1:n
        for j=1:m
            v=reshape(D(i,j,:),[3,1]);
            if norm(v)>0.35
                I2(i,j,:)=reshape(zeros(3,1),[1,1,3]);
                B(i,j)=0;
            end
        end
    end
    clear h i j k P v D mx mu
    B=imfill(B,'holes');

```

```

H=[0,1,0;1,1,1;0,1,0];
B=imdilate(imerode(B,H),H);
clear H
[L,N]=bwlabel(B);
I2=I;
c=0;
for k=1:N
    S=L==k;
    if sum(S(:))<=650
        for i=1:n
            for j=1:m
                if L(i,j)==k
                    B(i,j)=0;
                end
            end
        end
    else
        c=c+1;
    end
end
clear S
for i=1:n
    for j=1:m
        if B(i,j)==0
            I2(i,j,:)=zeros(1,1,3);
        end
    end
end
clear i j k L n m N
imshow(I2),figure,imshow(I),figure,imshow(B);

```