

UN ALGORITMO MODULAR PARA EL SEGUIMIENTO DE PARTÍCULAS EN VIDEOS DE MICROSCOPIA

Jorge A. Sánchez^{a,b}, Pedro A. Pury^b y Verónica I. Marconi^{c,b}

^aCONICET

^bFaMAF, Universidad Nacional de Córdoba, Medina Allende s/n, X5000HUA Córdoba, Argentina.

^cIFEG-CONICET

Palabras Clave: Tracking, Seguimiento, Microscopía, Movilidad

Resumen. En el presente trabajo se aborda el problema de seguimiento de una población de partículas (como células, microorganismos o entes autopropulsados en general) en videos de microscopía óptica y la extracción de información cuantitativa confiable de manera automatizada. Para ello se propone un esquema modular de procesamiento compuesto por las siguientes etapas: i) detección de partículas; ii) reconstrucción de trayectorias; iii) análisis de trayectorias. El módulo de detección se basa en la extracción de extremos locales en el Laplaciano de la función intensidad, evitando así el empleo de técnicas de binarización y la consecuente pérdida de precisión en localización. Para la reconstrucción de trayectorias se establece un criterio que aprovecha las restricciones de proximidad espacial y continuidad temporal en el movimiento de las partículas. El método propuesto se evalúa y compara experimentalmente empleando secuencias y métricas conocidas en la literatura, obteniéndose resultados alentadores.

1. INTRODUCCIÓN

Un problema usual en física, biología e ingeniería es la reconstrucción de trayectorias de partículas a partir de videos obtenidos mediante técnicas de microscopía óptica. Si bien existen diversos abordajes al problema, la generalidad de los métodos propuestos en la literatura lo dividen en dos subproblemas bien definidos, a saber: (a) la *detección* de las partículas de interés en cada cuadro del video y (b) el *enlace* (*linking*, por su denominación en inglés) de las posiciones estimadas de las partículas en los distintos cuadros para conformar trayectorias (*tracks*).

Cada una de estas tareas presenta dificultades específicas y requiere de metodologías propias. Sin embargo, el éxito de cualquier método radica en la combinación e integración de ambas etapas. En este trabajo se presenta un esquema de automatización completo que incluye una etapa de preprocesamiento y las mencionadas de detección y enlace, combinando de manera novedosa algunas técnicas conocidas del área de visión por computadora.

Nuestros resultados son promisorios y permitirán la implementación a futuro de esquemas automáticos de procesamiento estadístico de grandes lotes de videos de larga duración para la evaluación robusta de magnitudes físicas y biofísicas relevantes en biología y microfluídica en general.

El desarrollo de este trabajo continua en la Sec. 2 con la descripción del modelo implementado, donde se describe con algún detalle las fases de preprocesamiento, detección y enlace. En la Sec. 3 se presenta la evaluación del esquema de procesamiento propuesto sobre un conjunto de videos simulados que resumen un amplio espectro de situaciones de trabajo estandarizadas y se comparan los resultados obtenidos con una colección de métodos conocidos en la literatura (Chenouard et al., 2014). Finalmente en la Sec. 4 se presentan los comentarios finales del trabajo.

2. MODELO

La Figura 1 ilustra la estructura general de procesamiento en el esquema propuesto. En las secciones subsiguientes se brinda una descripción detallada de cada módulo en cuestión.

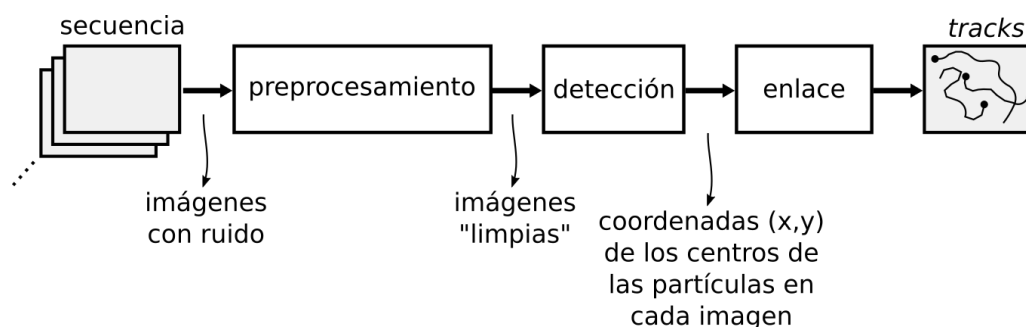


Figura 1: Diagrama esquemático del algoritmo propuesto.

2.1. Preprocesamiento

Una característica presente en la generalidad de las imágenes de microscopía es la presencia de altos niveles de ruido. El acondicionamiento previo de las imágenes es un paso necesario que tiene por objeto mejorar la performance y robustez de los procesos subsiguientes. En el presente trabajo la etapa de preprocesamiento involucra las siguientes subetapas: (i) filtrado para la reducción de los niveles de ruido y (ii) estimación y sustracción de fondo, las que se detallan a continuación.

(i) *Reducción de ruido.* Un modelo extendido para la caracterización del ruido en imágenes confocales o de fluorescencia es el modelo de Poisson (van Kempen et al., 1997; Sheppard et al., 2006), el cual se caracteriza por la igualdad entre su media y su varianza. Una aproximación al problema de reducción de ruido en esta clase de modelos consiste en transformar la señal original de forma tal que la distribución de ruido se asemeje a una del tipo Gaussiano tras lo cual es posible la aplicación de métodos de reducción de ruido estándar. En el presente trabajo se optó por la transformación $x \mapsto \sqrt{x}$ y la aplicación del algoritmo NLM (Buades et al., 2005) para reducción de ruido¹.

(ii) *Sustracción de fondo.* La sustracción de fondo tiene por objeto la compensación de perfiles no uniformes de iluminación y la reducción de artefactos visuales extraños introducidos durante la adquisición (a modo de ejemplo manchas en la imagen producidas por marcas en el objetivo). En este caso, el proceso consiste en la sustracción de un modelo de fondo obtenido mediante el promedio de las primeras N imágenes de la secuencia. La elección del valor de N no es crítica y suele definirse como un porcentaje del total de imágenes disponibles (por ejemplo el 10 % del total).

2.2. Detección

La etapa de detección consiste en la determinación de la ubicación espacial de cada una de las partículas presentes en la imagen, las que se manifiestan como pequeñas regiones o *blobs* de tamaño regular. En la literatura existen diversas técnicas para la detección de esta clase de estructuras. Entre ellas, se destacan los operadores diferenciales aplicados sobre representaciones espacio-escala (Lindeberg, 2013) como el Laplaciano (LOG) o el determinante del Hessiano (DOH) (Lindeberg, 1994), los que se definen como:

$$\begin{aligned} D_{LOG,\sigma}(I) &= \sigma^2(L_{\sigma,xx} + L_{\sigma,yy}) \\ D_{DOH,\sigma}(I) &= \sigma^4(L_{\sigma,xx}L_{\sigma,yy} - L_{\sigma,xy}^2) \end{aligned} \quad (1)$$

donde $L_{\sigma,\xi\nu}$ denota la derivada espacial de segundo orden en ξ, ν de la función $L_\sigma := g_\sigma * I$, con g_σ un núcleo Gaussiano isotrópico de parámetro σ^2 . Cada uno de los términos en (1) se puede obtener directamente mediante la convolución de la imagen con núcleos derivada del núcleo Gaussiano de parámetro σ^2 . La respuesta de los operadores (1) presentará máximos locales en aquellas regiones de la imagen que se asemejen al perfil espacial del operador elegido. En el caso del operador LOG esto ocurre en el centro de regiones con un radio medio de $\sqrt{2}\sigma$ píxeles (Sanchez, 2007).

Una vez obtenidas las coordenadas en píxeles de las partículas (máximos locales del operador), se efectúa un refinamiento a nivel subpíxel mediante el ajuste de un paraboloides regular en un entorno de 3×3 píxeles alrededor de cada punto detectado. La ubicación del máximo local (analítico) de dicho paraboloides se asume como la ubicación espacial de la partícula en la imagen. Cabe destacar que el refinamiento subpíxel en la localización de las partículas constituye una mejora sustancial respecto de los esquemas usuales de procesamiento a nivel píxel, especialmente en el análisis de imágenes de baja resolución.

¹En experimentos preliminares se evaluaron además las transformaciones $x \mapsto 2\sqrt{x + \frac{3}{8}}$ (Anscombe, 1948) y $x \mapsto \sqrt{x} + \sqrt{x+1}$ (Freeman y Tukey, 1950) pero no se observaron diferencias significativas.

2.3. Enlace

Obtenido el conjunto de coordenadas de las partículas en cada imagen de la secuencia, el siguiente paso consiste en vincular aquellas que correspondan a una misma partícula física. El esquema de enlace (o *linking*, por su denominación en inglés) se basa en la observación que debido a que las partículas se desplazan a una velocidad acotada, la distancia entre las posiciones de una partícula entre imágenes contiguas se encuentra también acotada. Bajo esta observación, se puede formalizar el siguiente criterio de enlace: sea $P^{(t)} = \{p_i^{(t)} = (x_i^{(t)}, y_i^{(t)})\}_{i=1}^{N_t}$ el conjunto de coordenadas asociadas a las partículas detectadas en la imagen a tiempo t . El par $(p_i^{(t)}, p_j^{(t)})$ se dice *vinculado* si:

$$(a) \|p_i^{(t)} - p_j^{(t')}\|_2 < \eta$$

$$(b) 0 < t' - t \leq \delta$$

(c) t' es el menor valor que cumple las condiciones (a) y (b).

La condición (a) asegura que la distancia espacial entre puntos es menor a un valor η pre-definido. La condición (b) asegura que las detecciones son temporalmente contiguas, con la posibilidad de que la partícula “desaparezca” (esto es que falle la detección) hasta un máximo de δ cuadros a partir de t . La condición (c) asegura que en caso de que haya más de una posible asociación, la que se considere como válida sea la más próxima en el tiempo.

3. EVALUACIÓN EMPÍRICA

A continuación se brinda una descripción del conjunto de datos y protocolo de evaluación utilizado en los experimentos, tras lo cual se presentan los resultados y se los compara con los de otros métodos propuestos en la literatura.

3.1. Conjunto de datos

Al los fines de evaluar cuantitativamente el método propuesto se utilizó el conjunto de datos y el protocolo de evaluación propuesto en (Chenouard et al., 2014). Dicho conjunto consisten 48 secuencias de imágenes generadas mediante simulación. Las mismas se encuentran agrupadas de acuerdo a la dinámica de movimiento de las partículas, su densidad y el valor de la relación señal–ruido (SNR, por sus siglas en inglés). Estos parámetros son considerados los de mayor influencia en la performance final en esta clase de algoritmos. El conjunto considera cuatro tipos de movimiento: Browniano (VESICLE), movimiento dirigido a velocidad casi constante (MICROTUBULE), conmutación aleatoria (RECEPTOR) y conmutación con restricción en la orientación de la componente de dirección (VIRUS). Para cada uno de estos subconjuntos se consideran tres niveles de densidad (100, 500 y 1000 partículas/imagen) con aparición y desaparición aleatoria de partículas y cuatro niveles de relación señal ruido: 1, 2, 4 y 7. Esta última se calcula como $SNR = (I_0 - I_b)/\sqrt{I_0}$ con I_0 la intensidad máxima de los objetos (partículas) e I_b la intensidad media del fondo.

3.2. Métricas y protocolo de evaluación

A fin de caracterizar de manera cuantitativa la performance de distintos métodos, en (Chenouard et al., 2014) se definen las siguientes figuras de mérito: 1) coeficiente α , el cual da una idea del emparejamiento (*matching*) general entre *tracks* estimados y verdaderos, sin contemplar *tracks* espurios (estimados no emparejados); 2) coeficiente β , similar al α pero contemplando

tracks espurios; 3) coeficiente JSC , la cual es una medida de la performance en la detección de partículas; 4) coeficiente JSC_θ , similar al JSC pero a nivel de *tracks*; y 5) $RMSE$, el cual es una medida en la precisión en la detección para los *tracks* emparejados. Por detalles sobre el cómputo de cada una de estas métricas, se remite al lector a [Chenouard et al. \(2014\)](#).

3.3. Resultados

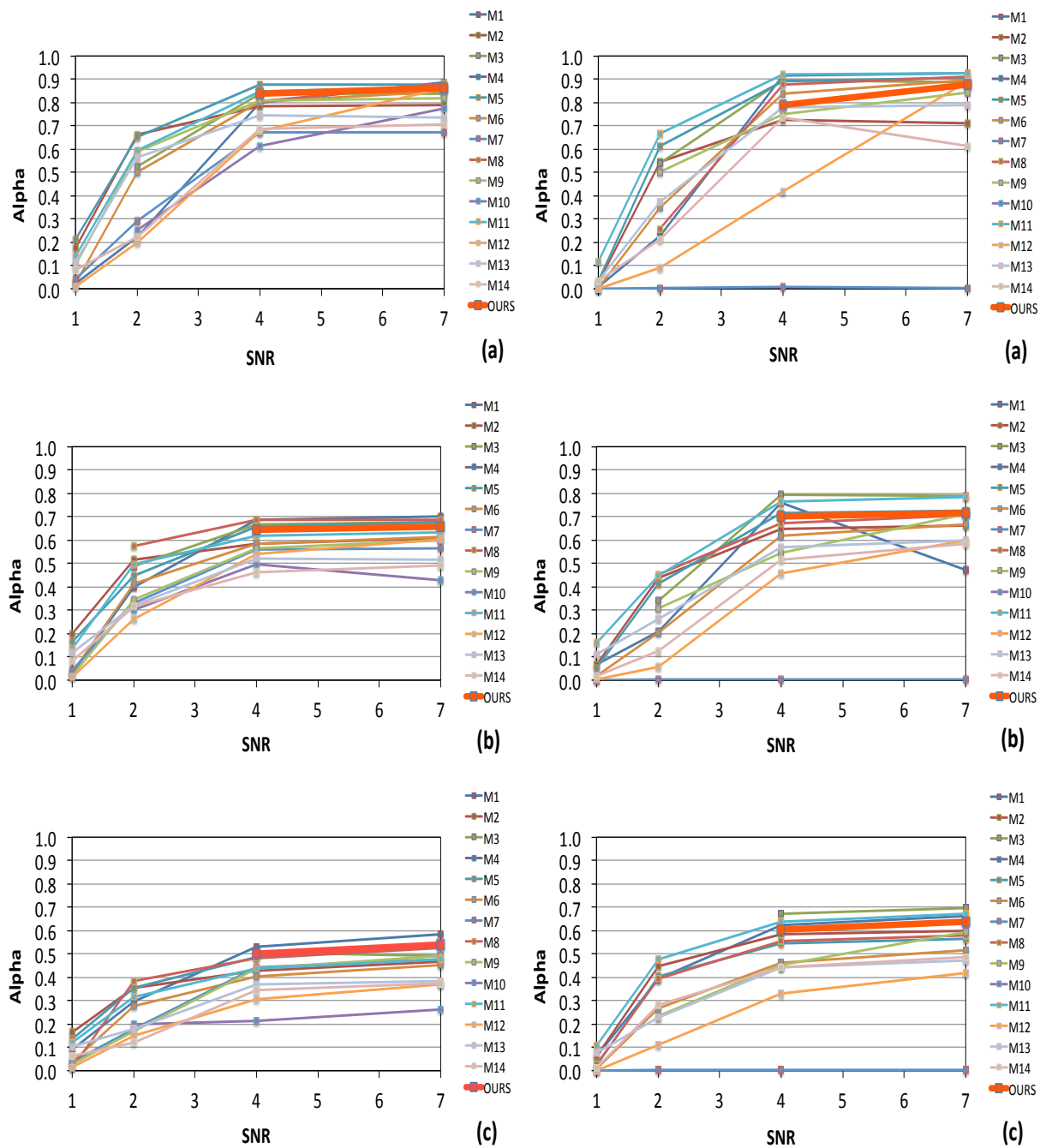


Figura 2: Coeficiente α correspondiente a las secuencias VESICLE (izquierda) y RECEPTOR (derecha) obtenidos con nuestro método (línea roja ancha) en función de la relación señal-ruído (SNR), en comparación con los 14 métodos mencionados en [Chenouard et al. \(2014\)](#). Los paneles corresponden a la performance para densidad baja (a), media (b) y alta (c).

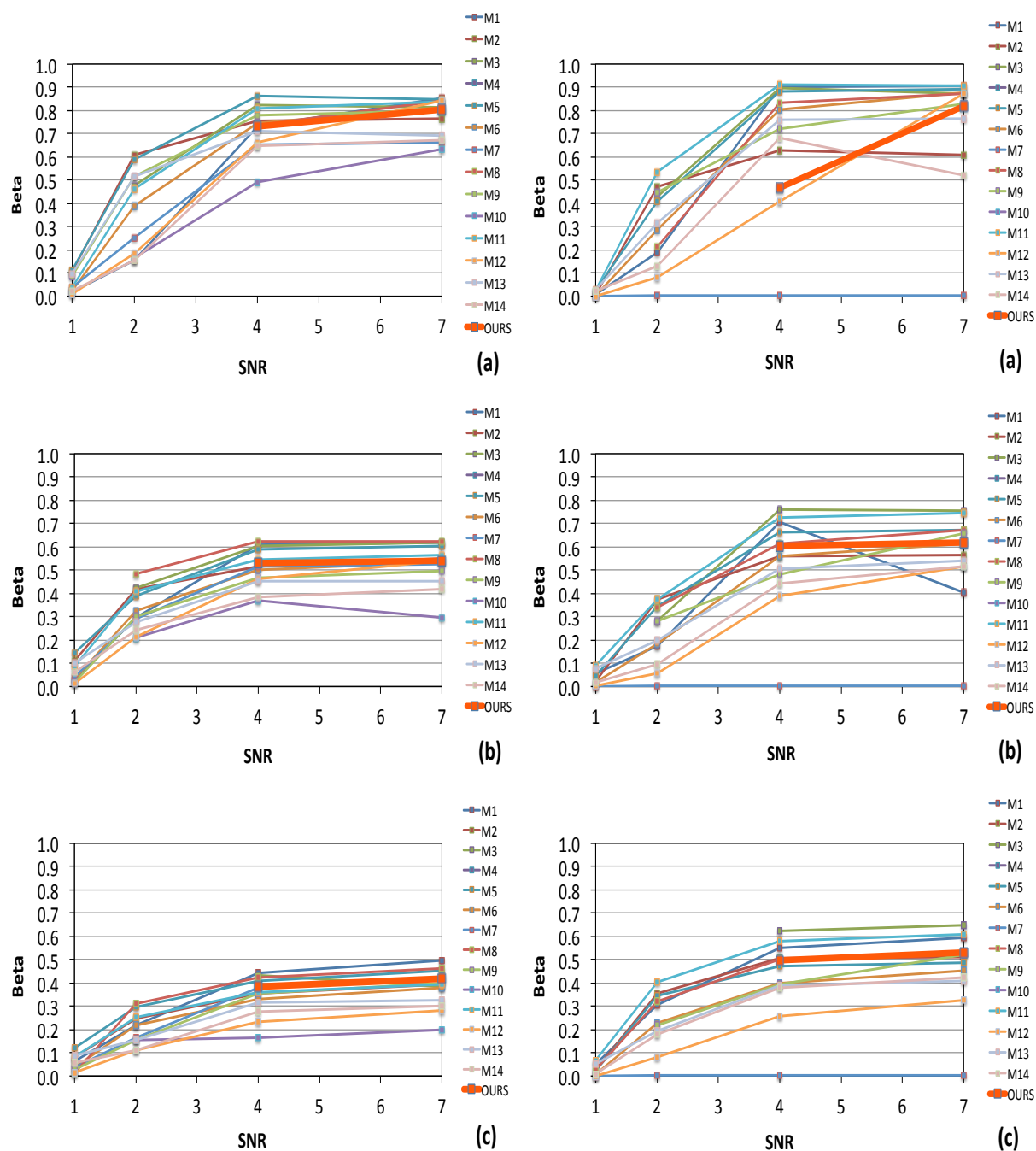


Figura 3: Coeficiente β correspondiente a las secuencias VESICLE (izquierda) y RECEPTOR (derecha) obtenidos con nuestro método (línea roja ancha) en función de la relación señal-ruido (SNR), en comparación con los 14 métodos mencionados en [Chenouard et al. \(2014\)](#). Los paneles corresponden a la performance para densidad baja (a), media (b) y alta (c).

Las figuras 2, 3 y 4 presentan los valores de los coeficientes α , β y JSC para las secuencias VESICLE (panel izquierdo) y RECEPTOR (panel derecho) para tres valores de densidad promedio: 100 (arriba), 500 (centro) y 1000 (abajo) partículas/imagen². La performance obtenida mediante el método propuesto (OURS) se compara con los 14 métodos evaluados durante

²En ([Chenouard et al., 2014](#)) estos valores se identifican como niveles *low*, *mid* y *high*, respectivamente

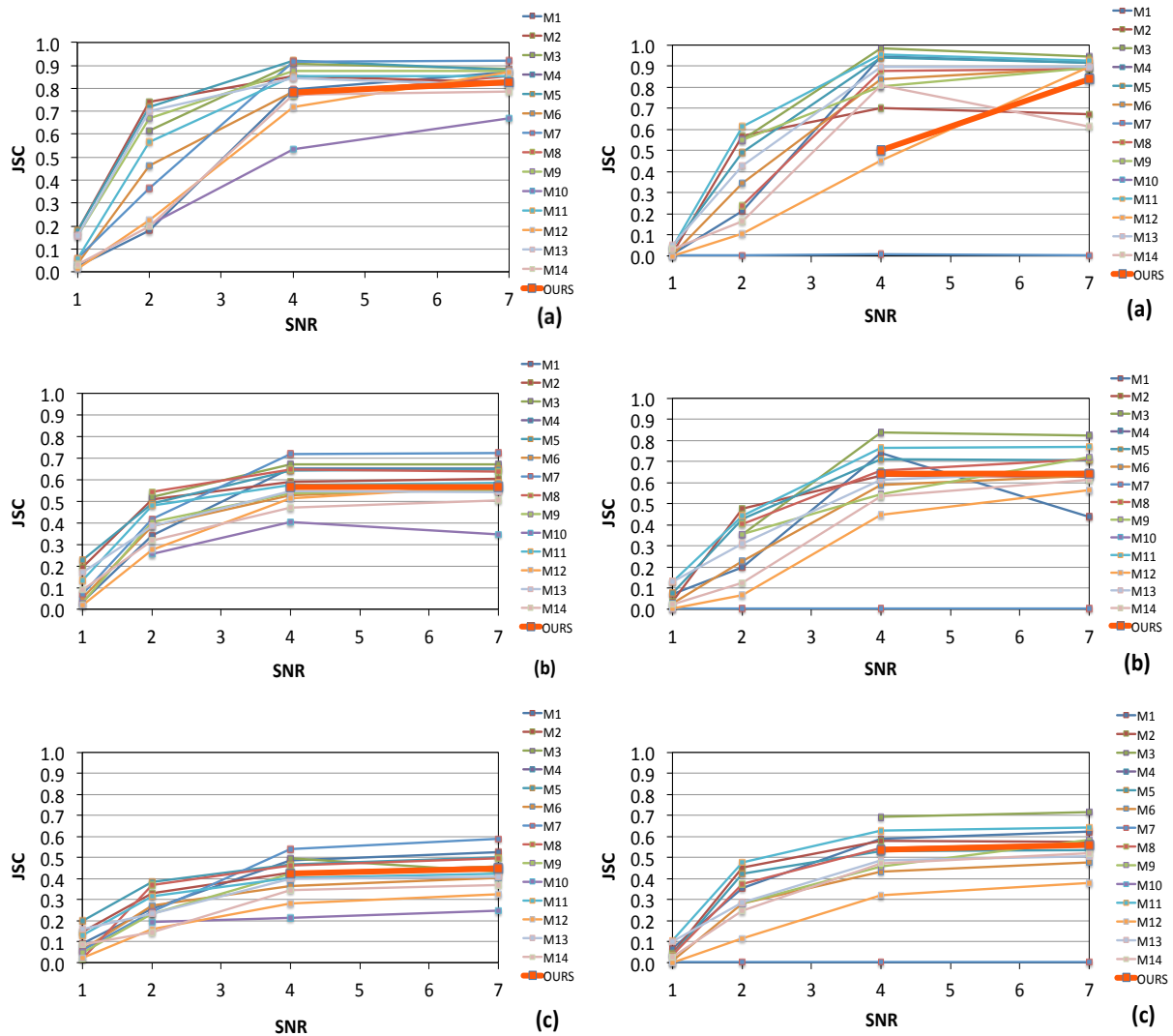


Figura 4: Coeficiente JSC correspondiente a las secuencias VESICLE (izquierda) y RECEPTOR (derecha) obtenidos con nuestro método (línea roja ancha) en función de de la relación señal-ruido (SNR), en comparación con los 14 métodos mencionados en Chenouard et al. (2014). Los paneles corresponden a la performance para densidad baja (a), media (b) y alta (c).

el Particle Tracking Challenge³, en donde M1–M14 se corresponde a los métodos Method1–Method14 en Chenouard et al. (2014).

4. CONCLUSIONES

De la comparación gráfica presentada en la sección anterior podemos observar que el método propuesto se comporta en todos los casos mejor que el promedio de los métodos analizados para todas las métricas consideradas, en los casos en que la relación señal-ruido $SNR \geq 4$. Con valores de SNR más bajos nuestro método no consiguió procesar satisfactoriamente los videos. Es de destacar que para el caso $SNR = 2$ las partículas son muy difíciles de detectar para un observador humano, siendo prácticamente imposible para $SNR = 1$. Así, la principal ventaja del esquema propuesto radica en la estabilidad en performace sobre el conjunto de métricas y escenarios estudiados, siendo su principal debilidad la imposibilidad de manejar situaciones

³<http://bioimageanalysis.org/track/>

con mucho ruido. Sin embargo, cabe señalar que experimentos de laboratorio no simulados, los escenarios con $\text{SNR} < 4$ no son de nuestro particular interés.

Dado el bajo costo computacional y la buena robustez observada en los escenarios estudiados, el método propuesto resulta adecuado para el análisis estadístico de magnitudes físicas a partir de videos de alta resolución y de larga duración, el cual es la principal motivación para el desarrollo del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Anscombe F.J. The transformation of poisson, binomial and negative-binomial data. *Biometrika*, 35(3/4):246–254, 1948.
- Buades A., Coll B., y Morel J.M. A non-local algorithm for image denoising. En *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)*, volumen 2, páginas 60–65. IEEE, 2005.
- Chenouard N., Smal I., De Chaumont F., Maška M., Sbalzarini I.F., Gong Y., Cardinale J., Carthel C., Coraluppi S., Winter M., et al. Objective comparison of particle tracking methods. *Nature methods*, 11(3):281, 2014.
- Freeman M.F. y Tukey J.W. Transformations related to the angular and the square root. *The Annals of Mathematical Statistics*, páginas 607–611, 1950.
- Lindeberg T. Scale selection for differential operators. En *Scale-Space Theory in Computer Vision*, páginas 317–348. Springer, 1994.
- Lindeberg T. *Scale-space theory in computer vision*, volumen 256. Springer Science & Business Media, 2013.
- Sanchez J.A. Evaluación de operadores diferenciales γ -normalizados para selección automática de escalas. *Mecánica Computacional*, 26:2129–2144, 2007.
- Sheppard C.J., Gan X., Gu M., y Roy M. Signal-to-noise ratio in confocal microscopes. En *Handbook of biological confocal microscopy*, páginas 442–452. Springer, 2006.
- van Kempen G.M., Van Vliet L., Verveer P., y Van Der Voort H. A quantitative comparison of image restoration methods for confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 185(3):354–365, 1997.