

# Obrazová analýza mikroskopických preparátů parazitologických vzorků malárie

## Bakalářská práce

*Studijní program:* B 3944 – Biomedicínská technika  
*Studijní obor:* 3901R032 – Biomedicínská technika

*Autor práce:* **Kristýna Vieweghová**  
*Vedoucí práce:* MUDr. Vladimír Kracík



# Image analysis of microscopic slides of parasitological samples of malaria

## Bachelor thesis

*Study programme:* B3944 –Biomedical Technology  
*Study branch:* 3901R032 – Biomedical Technology

*Author:* **Kristýna Vieweghová**  
*Supervisor:* MUDr. Vladimír Kracík



Technická univerzita v Liberci  
Fakulta zdravotnických studií  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Vieweghová**  
Osobní číslo: **D1500021**  
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**  
Studijní obor: **Biomedicínská technika**  
Název tématu: **Obrazová analýza mikroskopických preparátů  
parazitologických vzorků malárie**  
Zadávací katedra: **Fakulta zdravotnických studií**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### Cíle práce:

Cílem práce bude seznámit se s principem obrazové analýzy a prozkoumat možnost využití u vzorků krevních nátěrů s plasmodii.

V teoretické části se budu věnovat přehledu výskytu a mortality malárie (nejaktuálnější informace), popisu původce, přenosu a diagnostice malárie. Dále se zaměřím na zařízení využívaná při obrazové analýze a analýzu samotnou.

V praktické části se budu zabývat prací s krevními nátěry, snímáním mikroskopických obrazů a jejich následnou obrazovou analýzou pomocí vhodných softwarových prostředků.

#### Teoretická východiska:

Malárie je jedna z nejzávažnějších parazitárních nákaz na světě. Včasná diagnóza je esenciální pro záchranu lidského života. Problémem je ale pomalá analýza vzorků při hledání plasmodií v krevních nátěrech a chybovost způsobená lidským faktorem. Proto je vhodné se této problematice věnovat.

#### Výzkumné předpoklady:

Nafocení vzorků krevních nátěrů obsahující plasmodia. Zpracování pomocí vhodného softwaru. Definování standartních obrazů.

#### Metoda:

Mikroskopická obrazová analýza

Technika práce, vyhodnocení dat:

Vyhodnocení a porovnání mikroskopických obrazů v tzv. tenkých nátěrech popis plasmodií a kvantifikace stanovení parazitémie, SW pro práci s mikroskopickými obrazy

Místo a čas realizace výzkumu:

Technická univerzita v Liberci, 9/2017 - 4/2018.

## Příloha zadání bakalářské práce

### Seznam odborné literatury:

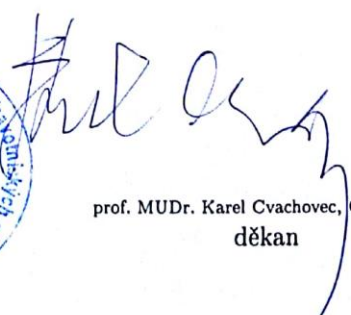
- [1] GÖPFERTO VÁ, Dana a Petr PAZDIORA. 100 infekcí: (epidemiologie pro praxi). Praha: Triton, 2015. ISBN 978-80-7387-846-7.
- [2] ROZSY PAL, Hanuš. Základy infekčního lékařství. Praha: Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2932-2.
- [3] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [4] GOERING, Richard V. a kol. Mímsova lékařská mikrobiologie. Vyd. 5. Praha: Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
- [5] JURÁNKOVÁ, Jana. Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotnický laborant. Brno: Masarykova univerzita, 2011. ISBN 978-80-210-5657-2.
- [6] ŠERÝ, Vladimír a Ondrej BÁLINT. Tropická a cestovní medicína. Praha: Medon, 1998. ISBN 80-902122-4-7.
- [7] ČERVINKOVÁ, Pavla. Diagnostika malárie. Hradec Králové, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd. Dostupné také z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/160218/24438035/?q>
- [8] ČÍŽKOVÁ, Martina. Změny struktury hemoglobinu v souvislosti s onemocněním malárií. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav antropologie. Dostupné také z: [https://is.muni.cz/th/357576/prif\\_b/](https://is.muni.cz/th/357576/prif_b/)
- [9] KINKOROVÁ, Judita. Výzkum malárie v prioritě Zdraví v 7. RP. Echo: informace o evropském výzkumu, vývoji a inovacích. 2008, 2008(6), 12-13. ISSN 1214-7982. Dostupné také z: <http://www.tc.cz/cs/storage/e4064c1fac393b1bc821098bd1d2117ef23f0809?uid=e4064c>
- [10] GETHING, Peter W a kol. A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010. Malaria Journal. 2011, 10(1), 378-. DOI 10.1186/1475-2875-10-378. ISSN 1475-2875. Dostupné také z: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-378>
- [11] Labtest - Malárie. Labtest [online]. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry, c2001-2017 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://www.labtestsonline.cz/condition/malarie.html?idx=3>
- [12] WHO — Malaria. WHO — World Health Organization [online]. WHO, 2017 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- [13] PURWAR, Yashasvi a kol. Automated and unsupervised detection of malarial parasites in microscopic images. Malaria Journal. 2011, 10(1), 364-. DOI 10.1186/1475-2875-10-364. ISSN 1475-2875. Dostupné také z: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-364>
- [14] PRESCOTT, William R a kol. Performance of a malaria microscopy image analysis slide reading device. Malaria Journal. 2012, 11(1), 155-. DOI 10.1186/1475-2875-11-155. ISSN 1475-2875. Dostupné také z: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-155>

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy: 50 - 70  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická  
Seznam odborné literatury: viz příloha

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Vladimír Kracík  
KNL, a.s.

Datum zadání bakalářské práce: 28. dubna 2017  
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2018



  
prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA  
děkan

V Liberci dne 30. listopadu 2017

Vážená paní  
**Kristýna Vieweghová**  
Kovářova 1515  
470 01 Česká Lípa

Vyřizuje/linka: Holá/485 353 738

V Liberci dne 27.4.2018  
č.j.18/8515/018239

**Vyjádření k žádosti o ponechání zadání a prodloužení termínu odevzdání bakalářské práce**

Vážená paní Vieweghová,

na základě Vaší žádosti ze dne 23.4.2018, zaevidované pod č.j.: 18/8515/018239, Vám sděluji, že **souhlasím** s ponecháním zadání bakalářské práce a s prodloužením termínu odevzdání do 30.6.2018.

S pozdravem

  
prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA  
děkan

**Technická univerzita v Liberci**  
Fakulta zdravotnických studií  
Studentská 2, 461 17 Liberec 1



## Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 28.6.2018

Podpis: *Niweglowa'*

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat MUDr. Vladimírovi Kracíkovi za odborné vedení mé bakalářské práce, Mgr. Martinovi Kracíkovi za cenné rady a vstřícnost při konzultacích. Dále bych ráda poděkovala Ing. Ivetě Danilové, Ing. Karlu Palečkovi, Ph.D. a Albertu Myšákovi za ochotu a pomoc během výzkumné části práce.



# **Abstrakt**

**Autor:** Kristýna Vieweghová

**Institute:** FZS – Biomedicínská technika

**Název práce:** Obrazová analýza mikroskopických preparátů parazitologických vzorků malárie

**Vedoucí práce:** MUDr. Vladimír Kracík

**Konzultant:** Mgr. Martin Kracík

**Počet stran:** 54

**Rok obhajoby:** 2018

**Anotace:** Tato bakalářská práce se zabývá obrazovou analýzou mikroskopických preparátů parazitologických vzorků malárie. Cílem této práce je navrhnout vhodný algoritmus pro detekci struktur podezřelých z obsahu plasmodií ve snímcích krevních vzorků. Teoretická část pojednává obecně o daném onemocnění, jak běžně probíhá jeho laboratorní diagnostika a o epidemiologii. Dále jsou zde předloženy informace o původci, jeho vývojovém cyklu a způsobech přenosu následované popisem technického řešení optického mikroskopu, jenž se pro laboratorní diagnostiku malárie běžně používá. V praktické části je popsána analýza a postup detekce malarických plasmodií v krevních vzorcích.

**Klíčová slova:** malárie, obrazová analýza, detekce, plasmodium, algoritmus

## **Abstract**

**Author:** Kristýna Vieweghová

**Institution:** FZS – Biomedical technology

**Title:** Image analysis of microscopic slides of parasitological samples of malaria

**Supervisor:** MUDr. Vladimír Kracík

**Consultant:** Mgr. Martin Kracík

**Pages:** 54

**Year:** 2018

**Annotation:** The Bachelor thesis deals with a topic of image analysis of microscopic slides of parasitological samples of malaria. The main goal of this thesis is to design a suitable algorithm for detection of structures believed to contain plasmodium in images of blood samples. The theoretical part of this thesis describes malaria itself, general process of its laboratory diagnosis and about epidemiology. Furthermore there are information on different types of malaria parasites, their life cycle and specific ways of transmission to human characteristic for each type, followed by description of technical solution of a microscope which is commonly used for laboratory diagnosis of malaria. Practical part includes description of analysis and procedure of detection trophozoites in blood samples.

**Keywords:** malaria, image analysis, detection, plasmodium, algorithm

## Obsah

Seznam zkratk .....	13
1. Úvod .....	14
2. Malárie.....	16
2.1 Epidemiologie .....	16
2.2 Původce .....	18
2.2.1 <i>Plasmodium vivax</i> .....	20
2.2.2 <i>Plasmodium ovale</i> .....	21
2.2.3 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
2.2.4 <i>Plasmodium malariae</i> .....	22
2.2.5 <i>Plasmodium knowlesi</i> .....	22
2.3 Laboratorní diagnostika malárie .....	22
2.3.1 Přímý průkaz .....	23
2.3.2 Nepřímý průkaz .....	24
3. Optický mikroskop .....	25
3.1 Mechanická část mikroskopu.....	25
3.2 Optická část mikroskopu.....	25
3.2.1 Objektivy .....	26
3.2.2 Okuláry .....	27
3.3 Osvětlovací zařízení .....	28
4. Praktická část.....	29
4.1 Cíle a výzkumné předpoklady .....	29
4.2 Metodika výzkumu .....	29
4.3 Analýza dat.....	32
4.3.1 Šedotónový obraz .....	32
4.3.2 Inverzní obraz .....	33
4.3.3 Prahování (thresholding) .....	34
4.3.4 Morfologické operace.....	36
4.3.5 Řídící struktury .....	39
4.3.6 Výpočet senzitivity.....	46
5. Diskuze .....	47

6. Závěr.....	48
Seznam použité literatury .....	49
Seznam obrázků.....	52
Seznam tabulek.....	52
Přílohy.....	53
Příloha 1 .....	53
Příloha 2 – obsah CD .....	54

## Seznam zkratek

Tzv.	takzvaně
P.	Plasmodium
Např.	například
Apod.	a podobně
Obr.	obrázek
Tab.	tabulka
PCR	Polymerázová řetězová reakce
IgG	Imunoglobulin G
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFA	Indirect Imunofluorescence
TP	Skutečná pozitivita
FN	Falešná negativita
FP	Falešná pozitivita

# 1. Úvod

Malárie je závažné parazitární onemocnění, které může bez včasné a přesné diagnostiky, způsobit smrt v řádu několika desítek hodin. Existují různé diagnostické metody k průkazu původce, ale standardně používanou metodou je manuální mikroskopický průkaz. K tomu, aby byla diagnostika za použití této metody dostatečně rychlá a kvalitní, je zapotřebí osoby s patřičnou odbornou způsobilostí. V malarických oblastech je ale nedostatek diagnostických laboratoří a zejména dostatečně proškoleného personálu, čímž může být ovlivněna jak kvalita, tak i rychlost vyšetření. Nabízí se otázka, zda by nebylo možné celý diagnostický proces urychlit použitím postupu ve formě strojového vyhodnocování. Vzhledem k tomu, že problematika malarického onemocnění nedosahuje celosvětového měřítká a státy, které patří mezi oblasti s vysokým rizikem nákazy, jsou povětšinou slabší ekonomické celky, není rozvoj v tomto odvětví nikterak rapidní. Cílem této práce je navrhnout vhodný algoritmus pro detekci struktur podezřelých z obsahu plasmodií ve snímcích krevních vzorků.

Práce je rozdělena do dvou samostatných celků. První z těchto celků představuje teoretická část, která rozpracovává základní témata důležitá pro pochopení celé problematiky. Samotná teoretická část je taktéž členěna do několika kapitol, jejichž obsahem je popis onemocnění, včetně způsobu přenosu na člověka či výkladu o možných původcích tohoto onemocnění. V podkapitole o původcích jsou zahrnuty oblasti výskytu, typ malárie, který způsobují a různé specifické vlastnosti podstatné pro jejich mikroskopickou diagnostiku. Dále jsou stručně rozebrány jednotlivé typy laboratorních diagnostických přístupů včetně výše zmíněného mikroskopického průkazu, následované popisem technického řešení optického mikroskopu, jenž je běžně využíván pro laboratorní diagnostiku malárie. Teoretická část zahrnuje i zmínku o aktuální situaci s malárií na světě a v České republice.

Druhá polovina práce je tvořena praktickou částí, kde je popsán proces samotné obrazové analýzy počínaje nafocněním snímků z vypůjčených vzorků pomocí optického mikroskopu, následován popisem vytvořeného algoritmu pro detekci s názorným příkladem jednotlivých kroků a výsledkem aplikace algoritmu na vybraný snímek.

Závěr praktické části je tvořen výpočtem senzitivity daného programu na zachycení podezřelé struktury ve vzorku padesáti náhodně vybraných snímků.

## 2. Malárie

Malárie je život ohrožující onemocnění způsobené parazity rodu *Plasmodium*. Je charakterizováno horečkou, třesavkou, zimnicí a průjmy nebo rozvíjející se anémií. Komplikováno může být jaterním nebo ledvinovým selháním, encefalopatií, mozkovým edémem až kómatem. Bez léčby může dojít k úmrtí v řádu několika desítek hodin. U nekomplikované malárie mohou být příznaky nespecifické, což může ztěžovat diagnostiku. U typických případů dochází ke střídání bez horečnatých a horečnatých epizod (tzv. malarický záchvat). Pro správnou diagnostiku je podstatná znalost cestovatelské anamnézy [2][17][34].

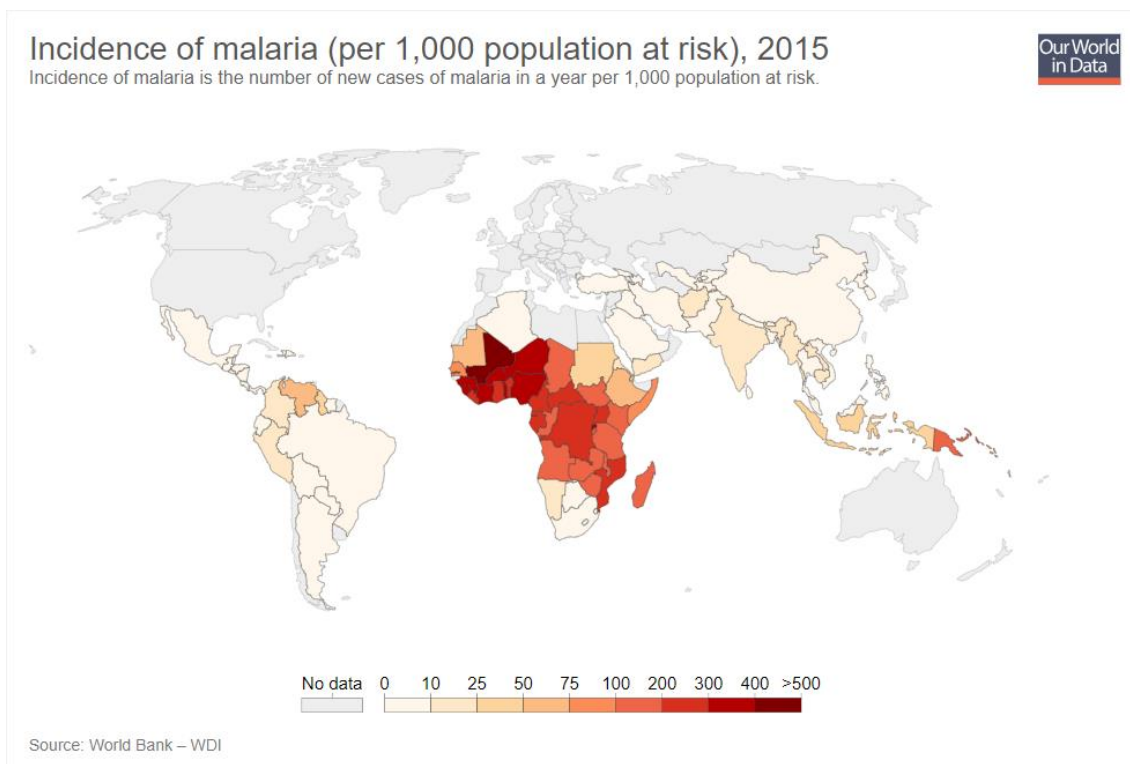
### 2.1 Epidemiologie

Malárie je přenášena přibližně 70 druhy komára rodu *Anopheles*. Aktivita komárů je nejvyšší při soumraku nebo v noci. V nemalarických oblastech může být vektorem onemocnění infikovaná osoba nebo komár zavlečený dopravními prostředky z malarické oblasti. Znamé jsou například letištní malárie (může dojít k nákaze osob bydlících v blízkosti letiště) nebo tranzitní (runway) malárie (přisátí komára během přestupu na letišti v malarické oblasti) [2].

Kromě hmyzího přenašeče je přenos možný pomocí krevní transfuze, injekční jehly, kontaminované krve, transplantátu nebo z matky na dítě [2].

V roce 2016 bylo hlášeno 216 milionů případů z 91 zemí, což představuje nárůst o 5 milionů oproti roku 2015 [6]. Na obr. 1 můžeme vidět mapu, která ukazuje počet případů na 1000 osob vystavených riziku v roce 2015. Výskyt malárie je nejvyšší v centrální části Afriky okolo rovníku, dále se vyskytuje i ve Střední a Jižní Americe či Asii [17][19].





Obr. 1 Počet případů na 1000 ohrožených osob v roce 2015 [19]

Do padesátých let minulého století se malárie vyskytovala i v České republice, konkrétně na jižní Moravě. Těsně po 2. světové válce však byla eradikována stejně jako v ostatních evropských státech vyjma Turecka. Komáři rodu *Anopheles* se v České republice sice objevují, ale malárie jimi není přenášena, protože se zde nevyskytují lidé s neléčenou malárií. Dochází pouze k případům importované malárie u osob cestujících z malarických oblastí. V tab. 1 lze vidět počet hlášených importovaných malárií. Mezi lety 2008 – 2017 se jednalo o 10 – 40 případů za rok [21].

Tab. 1 Případy importované malárie v ČR v letech 2008 – 2017 [21]

Diagnóza	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Malárie	22	11	13	28	27	27	31	29	38	27

## 2.2 Původce

Existuje 5 druhů parazitů rodu *Plasmodium*, kteří jsou příčinou malárie u lidí. Jedná se o *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* a *P. knowlesi*. Největší hrozbu představuje *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium vivax*. První čtyři druhy jsou zobrazeny v tab. 2, kde je obsažen název onemocnění, inkubační doba, časový interval opakování záchvatů a výskyt. *P. knowlesi* je popsáno níže v textu [6].

Tab. 2 Přehled informací o původcích [2]

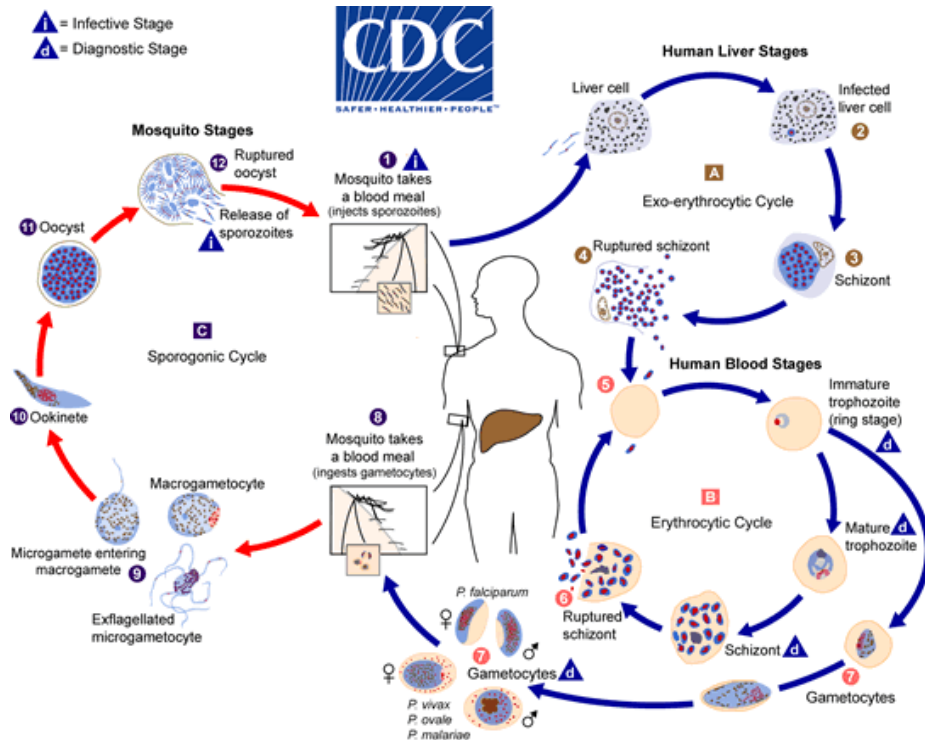
<b>Původce</b>	<b>Název onemocnění</b>	<b>Inkubace</b>	<b>Opakování záchvatů</b>	<b>Výskyt</b>	<b>Procento onemocnění celosvětově</b>
<i>Plasmodium vivax</i>	terciána	8–21 dnů (až 12 měsíců)	48 hodin	Tropy, subtropy a některé oblasti mírného pásma	80 %
<i>Plasmodium ovale</i>	terciána	8–21 dnů (až 12 měsíců)	48 hodin	Západní Afrika, východní Indonésie, Filipíny	5 % (s malariae)
<i>Plasmodium malariae</i>	kvartána	18–42 dnů	72 hodin	Ohraničené oblasti tropů a subtropů (zvláště Afrika)	5 % (s ovale)
<i>Plasmodium falciparum</i>	tropika (maligní terciána)	8–16 dnů	Nepravidelně 24 – 48 hodin	Tropy celého světa (zvláště subsaharská Afrika, jihovýchodní Asie, Amazonie a jihozápadní Tichomoří)	15 %

Důležitým pojmem je vývojový cyklus parazitů. Tento proces je velice komplikovaný, jelikož obsahuje mnoho stádií a mezihostitele. Celý vývojový cyklus plasmodií je názorně zobrazen na obr. 2. Plasmodia mají jako většina parazitů komplikovaný vývojový cyklus. Lze ho rozdělit na sporogenní, jaterní a krevní fázi. Během sporogenní

fáze (pohlavní množení plasmodií) dochází k tvorbě sporozoitů z gametocytů v těle samičky komára. Sporozoity jsou při sání krve samičkou slinami vpraveny do krevního oběhu člověka, pomocí kterého jsou zaneseny až do jaterních buněk (hepatocytů).

Uvnitř hepatocytů začíná jaterní fáze nákazy. Dochází zde k vývoji sporozoitů ve schizont a merozoity. Sporozoit je zakulacen, roste a jádro je opakovaně děleno. Rozdělením cytoplazmy mezi jádra vzniká ve schizontu velké množství jednojaderných merozoitů, které jsou během prasknutí hepatocytu uvolněny zpět do krevního řečiště. Tato fáze probíhá bez klinických příznaků.

V krevním oběhu je ihned zahájena krevní fáze. Merozoity vnikají do erytrocytů. Tam jsou zakulaceny a vytváří prstencovou formu (trofozoit), jádro je pak opakovaně děleno a vznikají mnohojaderní schizonti. Cytoplazma je segmentována mezi jádra, erytrocyt praská a uvolněné merozoity napadají další červené krvinky. U některých merozoitů dochází ke gametocytogenezi (tvorbě nezralých pohlavních stádií – gametocytů). Merozoit během gametocytogeneze není dělen ale transformován. Říká se tomu také terminální stádium vývoje plasmodia v člověku, zpětná transformace v merozoit totiž není možná. Gametocyty jsou vychytávány v kapilárách kůže a jsou infekční pro komáry [2][22].



Obr. 2 Vývojový cyklus plasmodia [23]

### 2.2.1 Plasmodium vivax

Tento druh se vyskytuje především v tropech mimo západní Afriku. Je původcem tzv. třídenní malárie (benigní terciána), což znamená, že vývojový cyklus trvá 48 hodin a každý třetí den se periodicky objevují horečky. Nakažené erythrocyty jsou 1,5 až 2x větší, tvar je normální nebo oválný a bývá přítomno Schüffnerovo tečkování<sup>1</sup>. Napadá pouze mladší erythrocyty. V periferní krvi tvoří všechna stádia a jeden erythrocyt může obsahovat více jak jednoho parazita. Během nález vyvolaných *P. vivax* nebo *P. ovale* mohou vznikat tzv. hypnozoity<sup>2</sup>, ty v jaterních buňkách bez symptomů přežívají a po určité době mohou vyvolat relaps (uvolnění merozoitů a následná infekce erythrocytů). Z tohoto důvodu někdy dochází k onemocnění benigní terciánou až po několika měsících inkubace či dostavení opětovných malarických záchvatů

<sup>1</sup> Vedlejší efekt po obarvení vzorku. Barvivo nateče do prohlubní (kalveol) na povrchu erythrocytu a vytváří růžové až červené tečky. Prohlubně mají pouze mladé erythrocyty, proto se tento artefakt objevuje u *P. vivax* a *P. ovale* [29]

<sup>2</sup> Spící stádium

po delší době. Příčinou relapsu může být těhotenství, změna klimatu, nachlazení, námaha, požití velkého množství alkoholu nebo např. trauma [2][23][24].

### **2.2.2 *Plasmodium ovale***

*P. ovale* může být nalezeno především v západní Africe, ve východní Indonésii nebo na Filipínách. Stejně jako *P. vivax* je původcem třídenní malárie a má řadu podobných vlastností. Mladé infikované červené krvinky jsou obvykle 1,5x větší, část z nich může mít cípovité okraje a také se zde objevuje Schüffnerovo tečkování. V periferní krvi se nachází všechna stádia a erytrocyt neobsahuje více jak jednoho parazita. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.2.1, je schopno vytvářet relabující stádium zvané hypnozoit [2][23][24].

### **2.2.3 *Plasmodium falciparum***

Tento druh je možné najít celosvětově v tropech a subtropích a převažuje na africkém kontinentu. Je nejvíce patogenní a je tedy zodpovědný za většinu úmrtí způsobené onemocněním malárií. Vzniklá nemoc se označuje jako tropická malárie nebo maligní terciána. Záchvaty, které se v průběhu onemocnění objevují, probíhají nepravidelně v rozmezí 24-48 hodin. Infikované krvinky mají normální velikost a jsou „lepivé“ (tvoří výčnělky). Těmito výčnělkami krvinky mohou být přichyceny k endotelu kapilár a hromadit se. Tento jev může zapříčinit poruchy krevního zásobení a tím těžký maligní průběh onemocnění. Pro *P. falciparum* je typické, že napadený erytrocyt často obsahuje více jak jednoho parazita a v periferní krvi tvoří pouze mladé trofozoity (prstýnky) nebo gametocyty. Parazitémie (procento napadených erytrocytů) je vysoká, často přesahuje i 2 %. Vysoké hodnoty jsou způsobené tím, že *P. falciparum* napadá erytrocyty různého stáří na rozdíl od ostatních druhů [2][6][23][24].

#### **2.2.4 *Plasmodium malariae***

Vyskytuje se v tropech a subtropích zvláště v Africe. *P. malariae* je tzv. čtyřdenní malárie neboli kvartána (každý čtvrtý den dochází k opakovanému záchvatu). Je charakterizována pomalejším vývojem jak v komárovi, tak i v člověku. Infikované erythrocyty mají normální tvar a mohou být zmenšené. V periferní krvi tvoří všechna stadia a vybírá si především „starší“ erythrocyty. Mívá velmi nízkou parazitémii, v krvi může přetrvávat více jak 10 let a náhle vyvolat aktivaci klinických příznaků, tomu se říká rekrudescence malárie [2][23][24].

#### **2.2.5 *Plasmodium knowlesi***

Tento parazit se přirozeně vyskytuje u makaků, kteří obývají zalesněné oblasti jihovýchodní Asie. V roce 1967 bylo prokázáno, že může probíhat přenos z makaka na člověka. Předpokládalo se však, že se u lidí objevuje jen velmi zřídka. V roce 2004 se ukázalo, že *Plasmodium knowlesi* je hlavní příčinou malárie v jihovýchodní Asii, převážně v Malajsii. Cyklus záchvatů se opakuje po 24 hodinách, proto se někdy také nazývá každodenní malárie. Diagnostické znaky jsou v raném prstýnkovitém stádiu totožné s *P. falciparum*, v ostatních stádiích s *P. malariae* a proto je extrémně komplikované diagnostikovat malárii pouze s pomocí mikroskopie [5][26].

### **2.3 Laboratorní diagnostika malárie**

Včasná a korektní diagnóza malárie je velmi podstatná a nezbytná pro rychlé zahájení správné a cílené léčby. Podrobná cestovní anamnéza je základem. Je třeba zjistit místo

a délku pobytu, užívání chemoprolaxe<sup>3</sup>, způsob ochrany před napadením komáry a jejich výskyt v oblasti [1].

Při každém horečnatém onemocnění by měl lékař myslet na malárii [2].

### 2.3.1 Přímý průkaz

Mezi přímé průkazy patří mikroskopický průkaz, rychlé imunologické vyšetření a PCR („*Polymerase Chain Reaction*“ neboli polymerázová řetězová reakce).

Nejpoužívanější metodou je přímý **mikroskopický průkaz** plasmodií na barvených nátěrech zhotovených z periferní krve. Metoda je rychlá, levná a poskytuje nám dostatečné množství informací pro stanovení diagnózy. Krev je odebrána z místa s hustou kapilární sítí např. z bříška prstu nebo ušního lalůčku. V krajních případech lze užít i krev žilní, ta však obsahuje mnohem menší procento parazitů[2].

Pro barvení krevních nátěrů a potvrzení prvoků (případ plasmodií), spirochet, mykoplasmat a dalších se používá barvení dle Giemsy (Giemsy-Romanowského)<sup>4</sup>. U malárie a dalších krevních parazitů je kombinována technika tlusté kapky a tenkého nátěru [4].

**Tlustá kapka** se užívá k průkazu parazitů a určení parazitémie. Prohlížíme zhruba dvacet zorných polí s užitím imerzního oleje a objektivu se zvětšením 100x. 2–3 kapky krve jsou nanášeny na podložní sklíčko, rozetřeny do velikosti mince a ponechány k zaschnutí při laboratorní teplotě. Vzorek není nikdy fixován. Oproti tomu **tenký nátěr** je využit tehdy, pokud je podezření na přítomnost malárie či pokud je problém s prohlédnutím tlusté kapky. Je vhodný k určení druhu plasmodia a stádia, ve kterém se nachází a též ke stanovení parazitémie. Kapka krve je nanášena na podložní sklíčko, kde se pomocí roztěrového sklíčka zhruba pod úhlem 45° rozetře tak, aby byl vzorek ucelený a stejnorodý. Před barvením zaslého vzorku je nutno nitrobuněčné struktury šetrně zafixovat. Běžná fixace teplem je příliš drastická, proto se užívá fixace chemická.

---

<sup>3</sup> Předběžné opatření proti nákaze v podobě antimalarik [2].

<sup>4</sup> Barvení sloužící k diferenciaci buněčných struktur [4].

V tomto případě se vzorky většinou fixují metanolem. Mělo by se prohlédnout 200 nebo více zorných polí. Je užíván imerzní olej pod objektivem se zvětšením 100x [3][4].

**Rychlé imunologické vyšetření** je postaveno na detekci malarického antigenu (proteinu) v krvi pacienta pomocí tzv. měřících proužků, u kterých je pozitivní výsledek signalizován změnou barvy na detekční zóně. Tato metoda bývá většinou zaměřena pouze na jeden určitý typ plasmodia. Vyšetření není vhodné pro zjišťování úspěšnosti terapie, protože antigenémie (přítomnost malarického antigenu) přetrvává po vymizení parazitémie až několik týdnů. Tyto testy jsou velmi rychlé, výsledek je možné získat do 15-30 minut. Jsou vhodné pro užití v malarických oblastech především z ekonomického hlediska, dostupnosti zdravotní péče a vybavení laboratoře [2][3].

K průkazu DNA plasmodií se používá metoda **PCR** (Polymerázová řetězová reakce). Podle prokázané DNA lze následně určit druh parazita [3].

### 2.3.2 Nepřímý průkaz

Nepřímý průkaz je průkaz původce infekce podle nálezu stop, které zanechala infekce v organismu. Většina nepřímých průkazů je prováděna podle nálezu protilátek, v určitých případech podle průkazu specifické buněčné imunity [4].

U **průkazu sérových protilátek** jsou protilátky dokazovány obvykle v krevním séru, tzv. serologickými reakcemi, což jsou reakce mezi antigeny a protilátkami *in vitro* (ve zkumavce). Stanoveny jsou protilátky třídy IgG proti *Plasmodium vivax/falciparum* technikou ELISA („*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*“) či pomocí IFA („*Indirect Immunofluorescence*“). Význam této metody je spíše epidemiologický, umožňuje později ozřejmit příčinu onemocnění. Pro diagnostiku akutního onemocnění není vhodný [1].



### **3. Optický mikroskop**

Optický mikroskop je přístroj, pomocí něhož je možno zvětšit zorný úhel pro pozorování předmětů, které jsou pod mezí rozlišitelnosti lidským okem. V mikrobiologii je běžně užíván tzv. složený mikroskop, který se skládá z optické a mechanické části. Optická část slouží k jasnému, reálnému a zvětšenému zobrazení, mechanická část k jeho pohodlnému pozorování [4][7].

#### **3.1 Mechanická část mikroskopu**

Mechanická část mikroskopu je tvořena tubusem, stativem, zaostřovacím mechanismem (makrošroub a mikrošroub<sup>5</sup>) a stolkem<sup>6</sup>. Tubus je pevná trubice, díky které jsou všechny optické členy stále v dané vzdálenosti a v jedné optické ose. Odděluje objektiv od okuláru. Ve spodní části trubky se nachází tzv. revolverový měnič objektivů, jehož manipulací se mění objektivy [4].

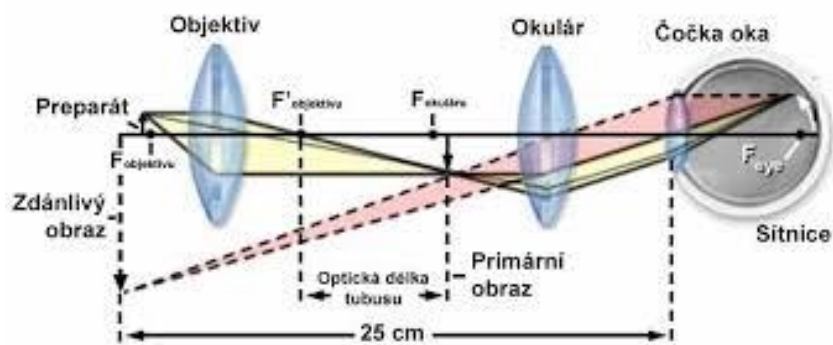
#### **3.2 Optická část mikroskopu**

Na obr. 3 je vidět optické schéma mikroskopu, která se skládá z objektivu a okuláru. Funkce jednotlivých částí je popsána v následujících podkapitolách.

---

<sup>5</sup> Slouží k hrubému a jemnějšímu posouvání nahoru a dolů.

<sup>6</sup> U stolku jsou šrouby umožňující posun a pozorování určitých částí preparátu.

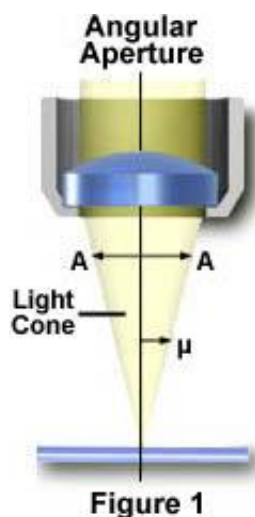


Obr. 3 Optické schéma mikroskopu [30]

### 3.2.1 Objektivy

Z hlediska kvality obrazu je objektiv nejpodstatnější částí mikroskopu. Nachází se blíže k pozorovanému objektu a přímo ho převráceně zobrazuje. Aby vytvářel skutečný obraz předmětu, musí se jednat o spojný systém (spojné čočky) a předmět musí být dál než je ohnisková vzdálenost objektivu  $f_1$  [7][8].

Nejvýznamnější specifikací objektivů je **numerická apertura NA**, ta určuje úhel, pod kterým může světlo vstupovat do objektivu. Čím širší je paprsek vstupující do objektivu, tím větší je rozlišení detailů.



Obr. 4 Numerická apertura<sup>7</sup> [18]

<sup>7</sup> „Light cone“ = světelný sloupec

Velikost numerické apertury významně ovlivňuje **index lomu prostředí n**. Pokud je mezi objektivem a preparátem vzduch, tak NA nepřesahuje hodnotu 1. Pro zvýšení se využívá tekuté prostředí (např. voda, glycerol, imerzní olej), které má vyšší index lomu. Vztah mezi numerickou aperturou a indexem prostředí vyjadřuje rovnice 1. Úhel  $\mu$ , se kterým se v tomto vzorci počítá, můžeme názorně vidět na obr. 4 [18][19].

$$NA = n(\sin \mu) \quad \text{Rovnice 1 [18]}$$

### 3.2.2 Okuláry

Okulár je druhá spojka soustavy a nachází se blíže oku. Je nastavován tak, aby obraz z objektivu vznikl v předmětové ohniskové rovině okuláru. Okulár má následně funkci lupy [7].

Pro úhlové zvětšení mikroskopu platí rovnice 2.

$$\gamma = \frac{\Delta \cdot d}{f_1 \cdot f_2} \quad \text{Rovnice 2 [9]}$$

$\Delta$  – optický interval neboli vzdálenost ohnisek objektivu a okuláru  $|F_1 F_2|$

$f_1$  - ohnisková vzdálenost objektivu

$f_2$  - ohnisková vzdálenost okuláru

$d$  - konvenční zraková vzdálenost ( $d=25$  cm)

Maximální hranice úhlového zvětšení je asi 2000. Pokud by byla překročena, mohlo by dojít k difrakci (ohybu) světla [9].

### **3.3 Osvětlovací zařízení**

U běžného mikroskopu se osvětlovací zařízení skládá ze světelného zdroje, kolektoru a kondenzoru. Jako světelný zdroj je většinou využívána nízkovoltová žárovka nebo halogenová výbojka. Šířka svazku paprsků je upravována kolektorem (clonou) do rovnoběžného, příp. sbíhajícího se svazku. Kondensor je optický systém, díky němuž je světlo soustředěno na pozorovaný objekt [4].

## 4. Praktická část

### 4.1 Cíle a výzkumné předpoklady

Cílem práce je pomocí obrazové analýzy identifikovat plasmodii infikované erythrocyty, navrhnout vhodný výpočetní algoritmus a stanovit jeho úspěšnost záchytu parazitárních trofozoitů.

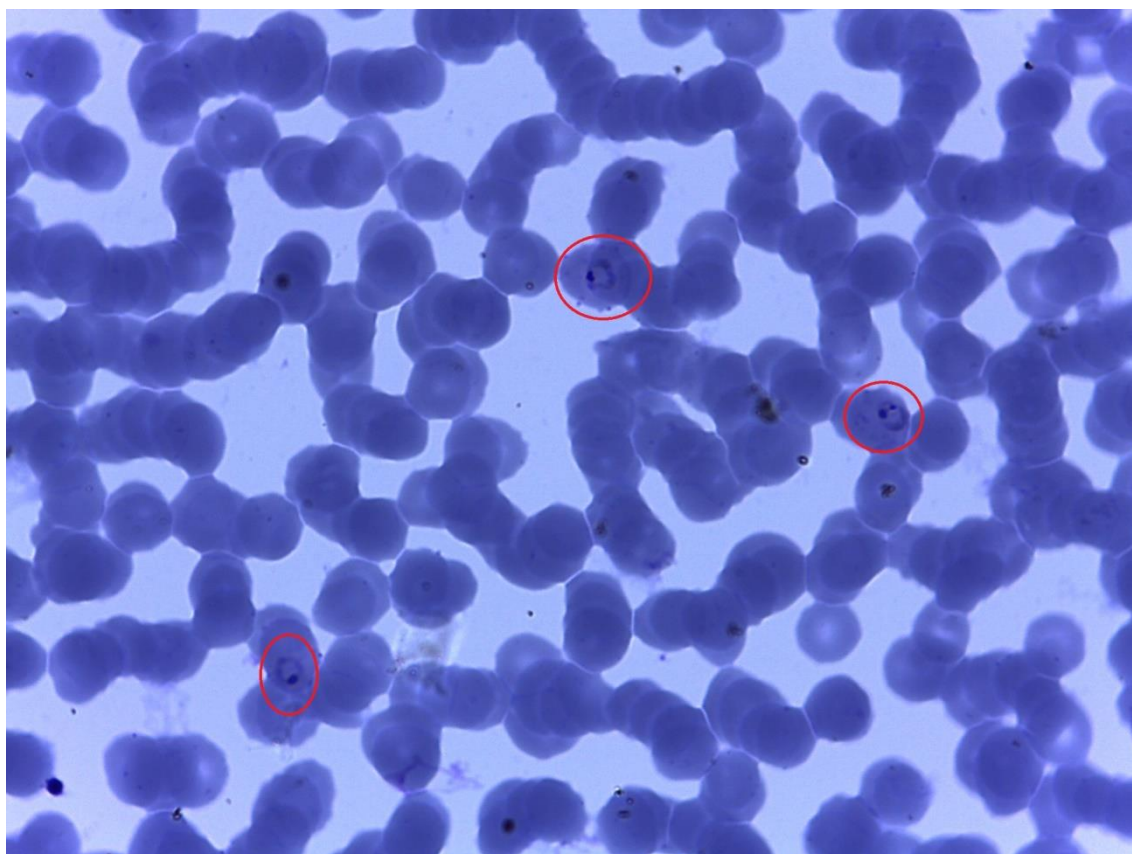
### 4.2 Metodika výzkumu

Charakteristická data tvoří 2 vzorky tenkého roztěru periferní krve nakažené *P. falciparum*, která byla poskytnuta z oddělení klinické mikrobiologie a imunologie Krajské nemocnice Liberec.

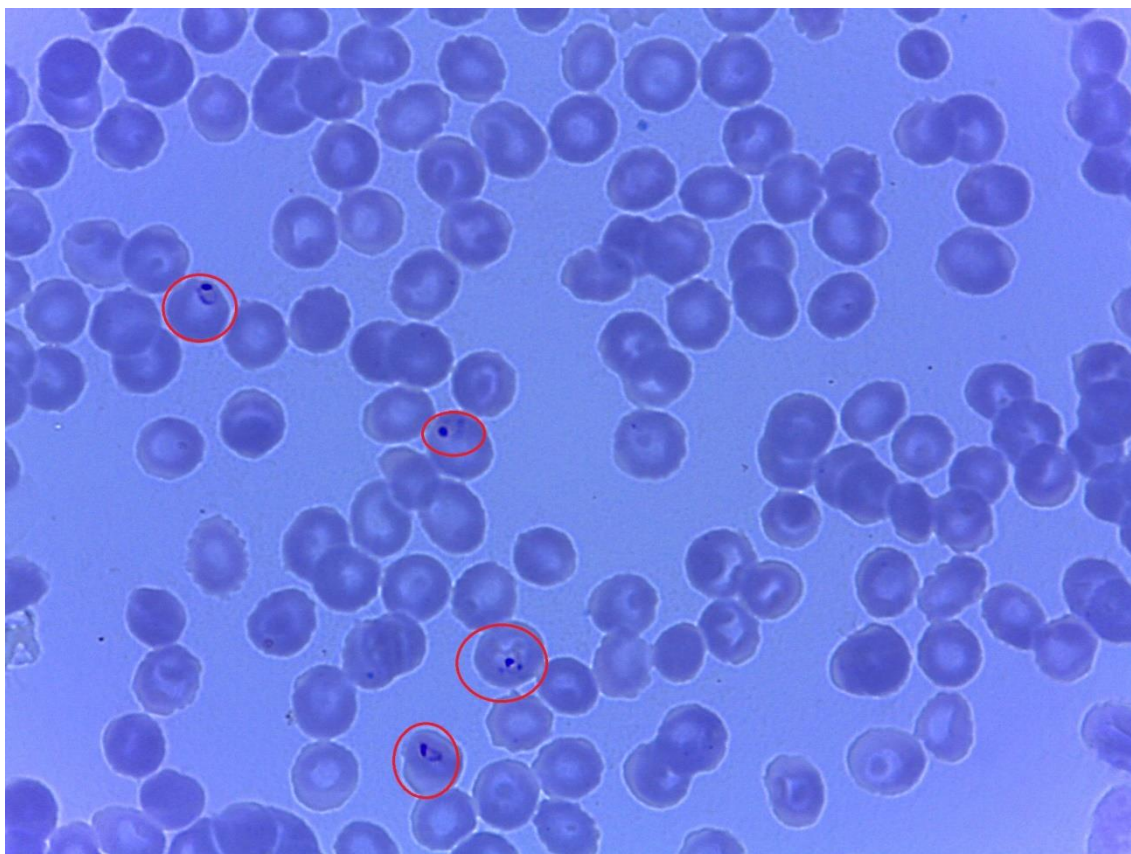
Vzorky byly prohlíženy a nasnímané na mikroskopu Leica DM750 (viz obr. 5) při zvětšení 100x v laboratořích Technické univerzity v Liberci. Obrázky mají velikost 2048 x 1536 px a 1 px na obrázku je úměrný 0,000064 mm reálného vzorku. Celkově bylo pořízeno 152 obrázků vzorku č. 1. Příklad snímku se nachází na obr. 6, kde je možné spatřit 3 erythrocyty nakažené *P. falciparum* znázorněné červenými kroužky.



Obr. 5 Mikroskop Leica DM750



Obr. 6 Vzorek č. 1 (image100)



Obr. 7 Vzorek č. 2(image179)

Obrázků vzorku č. 2 bylo zhotoveno 205 a jeho příklad je možné pozorovat na obr. 7, kde se nachází 4 trofozoity červeně vyznačeny.

Dalším krokem bylo samotné vypracování algoritmu pro detekci. Pro jeho zpracování byl využit programovací jazyk Python a programovací rozhraní Jupyter Notebook. Plný rozsah napsaného programu je přiložen na CD.

Hlavním požadavkem bylo eliminovat množství prohlížených erytrocytů pro pracovníka, tudíž zkrátit dobu strávenou nad laboratorní diagnostikou. Úkolem tedy byla detekce podezřelých struktur, aby se následně pracovník pouze rozhodl, zda je daná zvýrazněná struktura opravdu plasmodium či něco jiného (vada v obraze, vzorku, jiná struktura apod.)

## 4.3 Analýza dat

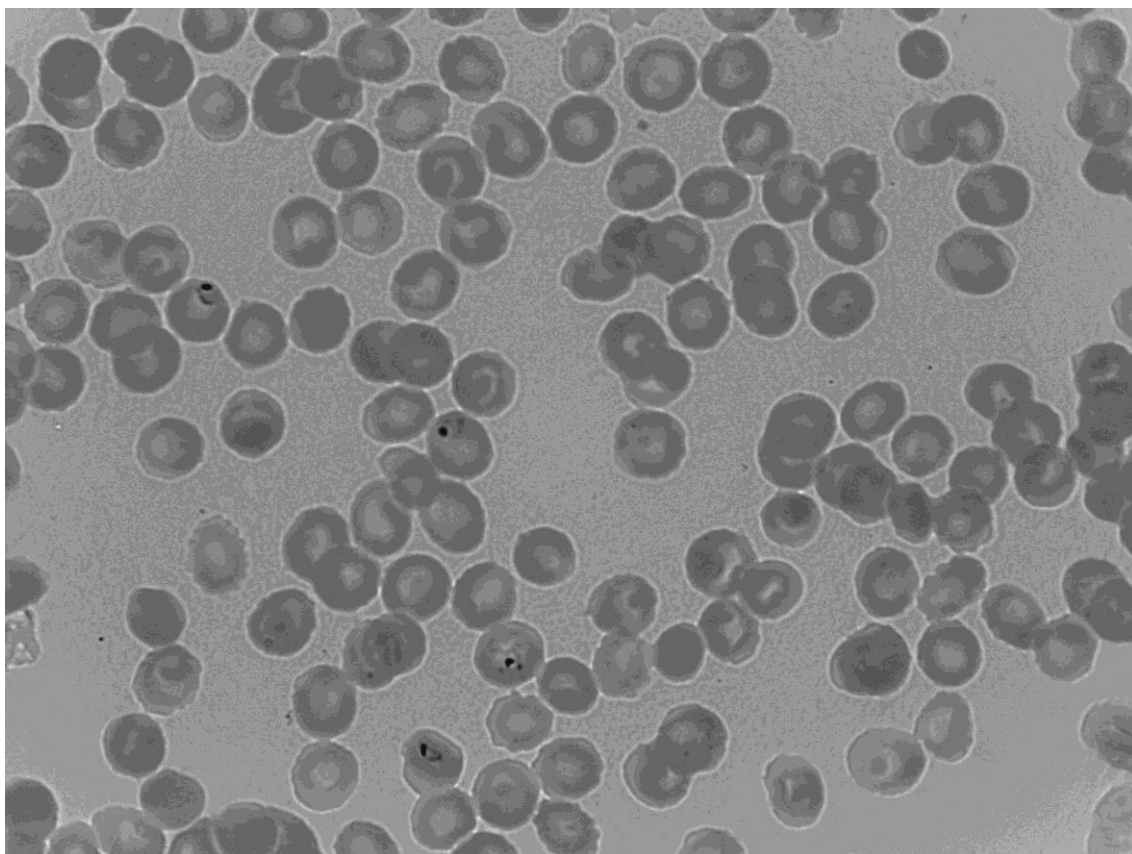
V této kapitole jsou vysvětleny jednotlivé části algoritmu a výsledky jednotlivých kroků v programu na snímku image179 vzorku č. 2, který byl již ukázán na obr. 7.

### 4.3.1 Šedotónový obraz

Pro zjednodušení a práci s obrazem je lepší vypustit barevnou složku a pracovat pouze s dvojrozměrným šedotónovým obrazem, jehož hodnoty obrazových elementů (pixelů) odpovídají stupňům šedi [10]. Tato metoda byla zvolena v úvodu algoritmu. Část programu je zobrazena pod tímto odstavcem. Grafický výsledek aplikace metody šedotónového obrazu je na obr. 8.

```
img_gray = cv2.imread ("Vzorek_2/image179.jpg",  
cv2.IMREAD_GRAYSCALE)
```





Obr. 8 Šedotónový obraz (image179)

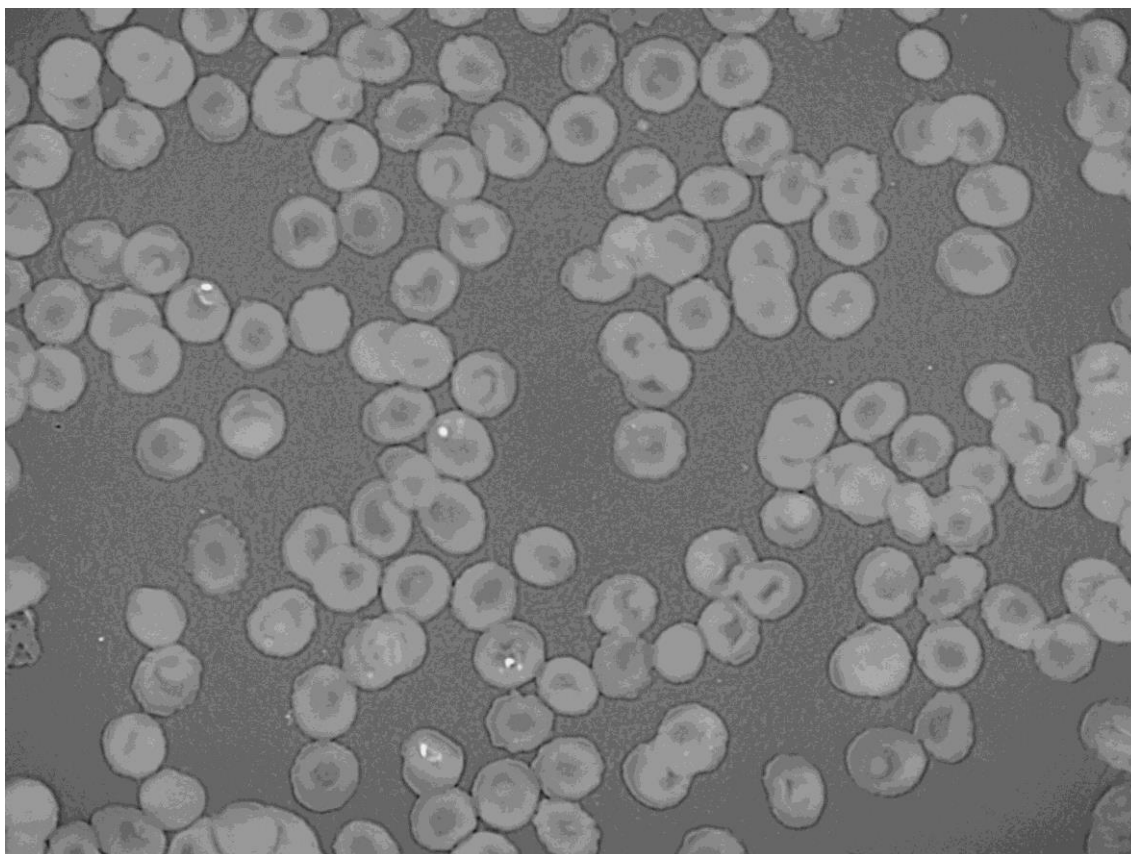
### 4.3.2 Inverzní obraz

Vytváření fotografického negativu může být vhodnější pro hledání specifických struktur v obraze, proto je zde vytvořen inverzní obraz. Pro jeho zhotovení je každému pixelu v obraze přiřazena jeho převrácená hodnota <sup>8</sup> [11]. Tato metoda je další v řadě po přetvoření do šedotónového obrazu, výřez z programu viz níže. Grafické zobrazení použité metody inverzního obrazu se nachází na obr. 9.

```
img = 255 - img_gray
```

---

<sup>8</sup> Pro převrácenou hodnotu počítáme s číslem 255, který vyjadřuje bitovou hloubku obrazu. Bitová hloubka reprezentuje úroveň jasu, pro náš obraz má hodnotu  $2^8$  a může tedy nabývat hodnot 0-255. Číslo 255 je hodnota maximálního jasu [32].



Obr. 9 Inverzní obraz (image179)

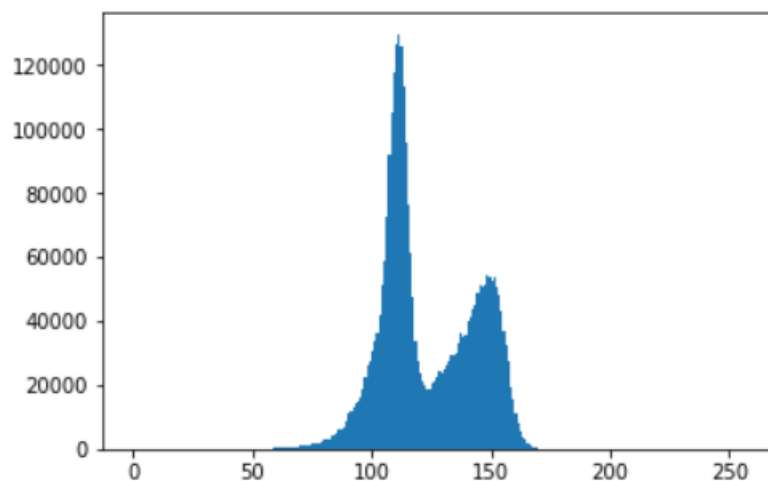
### 4.3.3 Prahování (tresholding)

Prahování je z pohledu principu a implementace jednou z jednodušších segmentačních technik. V tomto případě byla zvolena metoda základního prahování (tzv. prosté), kdy je zvolen pouze jeden práh a to způsobuje vznik binárního obrazu. Probíhá transformace všech hodnot pixelů pod prahem na nulu, nadprahové hodnoty na jedničku [10].

Vhodný práh je zvolen pomocí histogramu, což je graf četnosti výskytu jednotlivých stupňů šedi v obraze. Protože je nutné zaměřit se na detekci jednotlivých plasmodií a podobných struktur, je cílem najít takový práh, aby byly vysegmentovány pouze ty nejsvětlejší struktury v obraze a nikoli celé erythrocyty. Histogram snímku image179 je možné vidět na obr. 10. Svislá osa ukazuje počet pixelů a vodorovná jejich hodnotu

jasu. Práh byl v tomto případě stanoven na hodnotu 200, protože se okolo této hodnoty pohybují nejsvětější body v obraze (i když na obr. 10 je jejich četnost tak malá, že nejsou názorně rozpoznatelné). Příslušný výňatek z algoritmu pro zjištění histogramu je vložen pod tímto odstavcem.

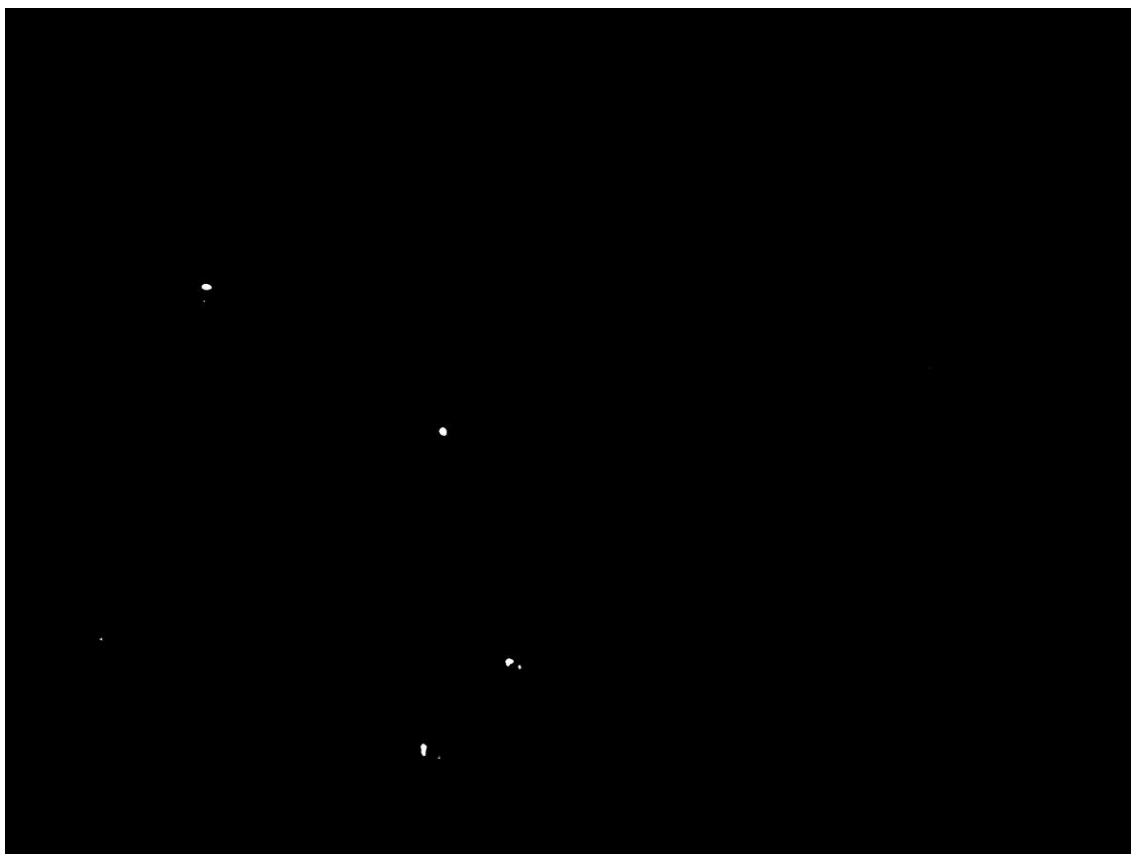
```
hist = cv2.calcHist([img],[0],None,[256],[0,256])  
  
plt.hist(img.ravel(),256,[0,256]); plt.show()
```



Obr. 10 Histogram (image179)

Samotné prahování zobrazuje následující kód. Grafický výstup metody prahování na snímku image179 je na obr. 11, kde jsou jasně patrné nejsvětější struktury.

```
ret,thresh1 = cv2.threshold(img, 200, 255,  
cv2.THRESH_BINARY)
```



Obr. 11 Prahování (image179)

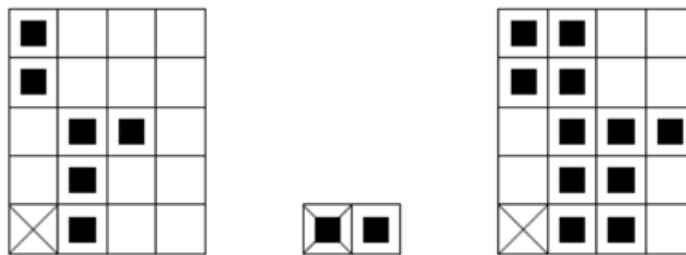
#### 4.3.4 Morfologické operace

Pro morfologické operátory je obraz chápán jako množina a pro binární obrazy se využívají operace jako průnik  $\cap$ , sjednocení  $\cup$ , množinový doplněk  $()^c$ , rozdíl  $\setminus$ , transpozice ( $\sim$ ) a inkluze  $\subset$ . Tyto operátory využívají masku neboli strukturní element, který se pohybuje po obraze a má určitý referenční bod, pod jehož pozici se ukládá výsledek operace do výstupního obrazu. Volba prvku pro referenční bod významně ovlivňuje výsledek a je tedy specifická pro každou operaci. Strukturní element obsahuje pouze nuly a jedničky přičemž jedničky jsou aktivními prvky. Základem pro morfologické operace je eroze a dilatace[10][12].

**Dilatace** s pomocí vektorového součtu skládá body dvou množin. Pokud je pod alespoň jedním aktivním prvkem strukturního elementu na vstupním obraze jednička, tak

se do výstupního obrazu na místo referenčního prvku zapíše hodnota 1. Dilatace  $X \oplus B$  je bodová množina všech možných vektorových součtů pro dvojici pixelů, vždy pro jeden z množiny  $X$  a druhý z množiny  $B$ . Dá se popsat rovnicí 3 a její grafické znázornění je možné vidět na obr. 12. Dilatace je užívána k zaplnění děr či spojení blízkých objektů[10][13][14].

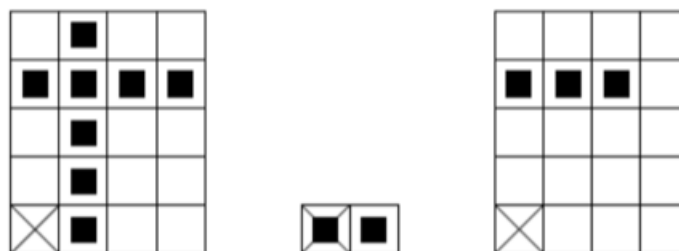
$$X \oplus B = \bigcup_{b \in B} X_b \quad \text{Rovnice 3 [13]}$$



Obr. 12 Dilatace [14]

Eroze není inverzní operací k dilataci, skládá dvě množiny s využitím vektorového rozdílu. Pokud je hodnota 1 pod všemi aktivními prvky strukturního elementu, který je položen na obraze, pak se na pozici referenčního prvku strukturního elementu do výstupního obrazu zapíše hodnota 1. Díky erozi mohou určité drobné objekty s obrazu úplně vymizet a složitější se mohou například rozdělit na více objektů. Předpis pro erozi vidíme na rovnici 4 a její průběh na obr. 13[13][14].

$$X \ominus B = \bigcap_{b \in B} X_{-b} \quad \text{Rovnice 4 [13]}$$



Obr. 13 Eroze [14]

Otevření a uzavření jsou dalšími podstatnými morfologickými operacemi. Tyto operace vznikají vzájemnou kombinací dilatace a eroze. Pro morfologické **otevření** musí erozi

následovat dilatace, viz rovnice 5. Otevření slouží k oddělení objektů spojených úzkou šíjí, zjednoduší strukturu.

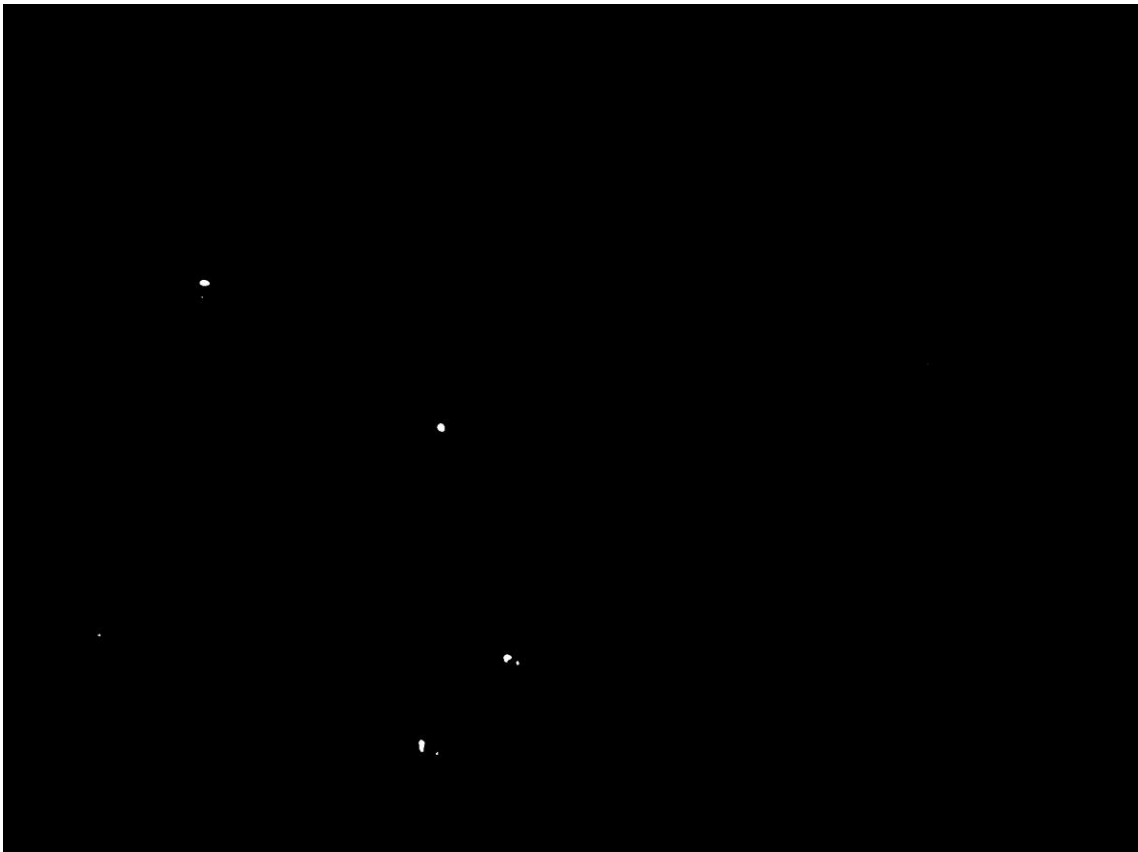
$$X \circ B = (X \ominus B) \oplus B \quad \text{Rovnice 5 [13]}$$

Naopak dilatace následovaná erozí se nazývá morfologické **uzavření** a tato operace je využívána v tomto algoritmu. Díky ní jsou objekty blízko sebe spojeny, díry zaplněny a vyhlazen obrys objektu. Algoritmus pracuje na základě rovnice 6 a kód je uveden níže. Na obr. 14 je možno vidět, jak tato operace pozměnila obraz po prahování.

$$X \bullet B = (X \oplus B) \ominus B \quad \text{Rovnice 6 [13]}$$

```
kernel = np.ones((7,7), np.uint8)

closing = cv2.morphologyEx(thresh1, cv2.MORPH_CLOSE,
kernel)
```



Obr. 14 Morfologické uzavření (image179)

### 4.3.5 Řídící struktury

Řídící struktury jsou základem pro běh samotného programu. Umožňují přeskočení části kódu, opakované vykonání, podmíněné vykonání kódu nebo také například předčasné ukončení programu [15]. Řídící struktury obsažené ve zpracovávaném algoritmu jsou napsány níže.

```
pole=[]  
  
for y in range(0,len(closing[0])):  
    for x in range (0, len(closing)):  
        if closing[x][y] !=0:  
            pole.append([x,y])
```

Díky dvojitému *for* cyklu s podmínkou, jsou projížďeny všechny pixely v obrázku, a pokud má pixel hodnotu, která se nerovná 0, tedy hodnotu 1, je přiřazen do pole<sup>9</sup> *pole*. Toto *pole* tedy bude ve výsledku obsahovat všechny pixely v obraze obsahující hodnotu 1, tedy vyselektované světlé pixely.

```
pixels = {}

areas = {}

area_counter = 1

for i in range(0, len(pole)):

    point = np.array([pole[i][1], pole[i][0]])

    t_point = point - np.array([0, 1])

    l_point = point - np.array([1, 0])
```

V následující části je s pomocí *for* cyklu projížďeno *pole* a následně vytvořena nová pole *pixels* a *areas* s vlastními indexy. To, že má pole vlastní indexy značí složené závorky. Pole *pixels* se skládá z jednotlivých bodů, ke kterým jsou jako indexy přiřazeny čísla oblastí. Vznik oblastí bude vysvětlen v následující části kódu. Pole *areas* obsahuje jednotlivé oblasti, které jako index obsahují jednotlivé body. Díky vlastním indexům se s poli *areas* a *pixels* lépe pracuje. Algoritmus dále prochází *pole* a pro každý jeho pixel (*point*) bude možnost existence pixelu nad (*t\_point*) nebo vlevo (*l\_point*) s hodnotou 1. Existují 4 možné případy:

### 1) Hodnota 1 nahoře i vlevo

V tomto případě algoritmus narazil na pixel, který má v obou výše zmíněných směrech pixel s hodnotou 1 a ten je již označen určitou oblastí. Pokud se číslo horní oblasti nerovná té nalevo, je oblasti nalevo přiřazena horní hodnota a její původní je vymazána. Bod se též zařadí mezi pixely horní oblasti.

```
if tuple(t_point) in pixels and tuple(l_point) in
pixels:
```

---

<sup>9</sup> Pole je datová struktura obsahující daný počet prvků, slouží k ukládání mezivýsledků [33].



```

t_area = pixels[tuple(t_point)]
l_area = pixels[tuple(l_point)]
if t_area != l_area:
    for p in areas[l_area]:
        pixels[tuple(p)] = t_area
    areas[t_area].extend(areas[l_area])
    del(areas[l_area])
pixels[tuple(point)] = t_area
areas[t_area].append(point)

```

## 2) Hodnota 1 nad pixelem

V tomto případě je pouze zjištěna hodnota oblasti horního pixelu a bod je do ní přiřazen.

```

elif tuple(t_point) in pixels:
    t_area = pixels[tuple(t_point)]
    pixels[tuple(point)] = t_area
    areas[t_area].append(point)

```

## 3) Hodnota 1 vlevo od pixelu

Zde se algoritmus chová obdobně jako v případě předchozím. Obeznámí se s hodnotou oblasti vlevo a pixel do ní přiřadí.

```

elif tuple(l_point) in pixels:
    l_area = pixels[tuple(l_point)]
    pixels[tuple(point)] = l_area
    areas[l_area].append(point)

```

#### 4) Nad pixelem ani vlevo od pixelu není žádná hodnota 1

Poslední možná situace nutí vytvořit kompletně novou oblast. *Area\_counter* zajišťuje, že je označena číslem o 1 vyšším, než byla poslední označovaná oblast.

else:

```
pixels[tuple(point)] = area_counter
areas[area_counter] = [point]
area_counter = area_counter + 1
```

Následující *for* cyklus s dvěma podmínkami už parametrizuje vybírané oblasti. Aktuálně pro *image179* bylo nastaveno, že algoritmus vynechává oblasti, které obsahují méně jak 95 a více jak 1000 pixelů. Tyto parametry jsou přizpůsobené průměrným velikostem oblastí. Díky těmto hranicím je podstatně omezena detekce nechtěných struktur.

Je zde tvořeno i pole *centroids* obsahující středy všech oblastí, což je pro následující část algoritmu podstatné. Díky poslednímu řádku této části kódu jsou přehledně vypsané jednotlivé oblasti, počet bodů, které obsahují, a souřadnice středů oblastí.

```
centroids = []

for key in areas:
    if len(areas[key]) < 95:
        continue

    if len(areas[key]) > 1000:
        continue

    area = np.array(areas[key])

    centroids.append([int(round(np.mean(area[:,0]))),
int(round(np.mean(area[:,1])))]])
```

```
print('oblast ' + str(key) + ' má ' +
str(len(areas[key])) + ' bodů a střed ' +
str(centroids[len(centroids)-1]))
```

Pro image179 algoritmus vypisuje následující hodnoty:

```
oblast 7 má 157 bodů a střed [363, 503]
oblast 11 má 179 bodů a střed [755, 1338]
oblast 18 má 162 bodů a střed [790, 764]
oblast 22 má 144 bodů a střed [909, 1180]
```

Každá detekovaná oblast je označena obdélníkem. Každý tento obdélník je následně uložen zvlášť jako obrázek ve formátu jpg.

```
v_c = 100

counter = 0

centroids = vz_centroidy

for p in centroids:

    counter +=1

    cv2.imwrite(str(counter) + ".jpg", original[p[1]-v_c:
p[1] + v_c, p[0]-v_c: p[0]+v_c])

    cv2.rectangle(original, (p[0]-v_c, p[1]-v_c), (p[0] +
v_c, p[1] + v_c), 255, 3)
```

Pokud jsou dva středy příliš blízko sebe, je informace zahrnuta jen do jednoho z nich, tak aby se zamezilo duplikace informace ve čtvercích.

```
vz_centroidy = []

for key in centroids:

    pridat = True

    for j in range(0, len(vz_centroidy)):
```

```
        if (key[0] - vz_centroidy[j][0])** 2 + (key[1] -
vz_centroidy[j][1])** 2 < 10000:

            pridat = False

    if pridat:

        vz_centroidy.append(key)
```

Poslední část kódu ukládá výsledné obrázky z jednotlivých částí celého procesu.

```
cv2.imwrite("grayscale.jpg", img_gray)

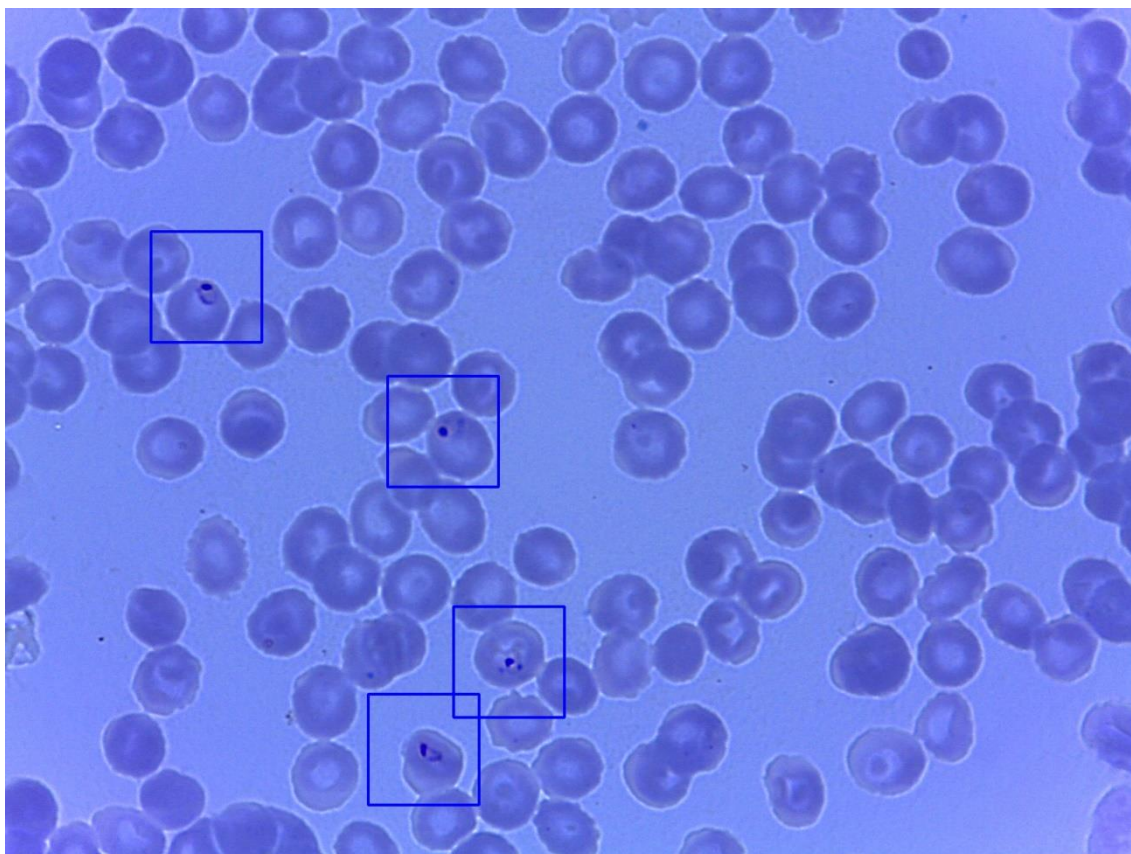
cv2.imwrite("inverze.jpg", img)

cv2.imwrite("thresh.jpg", thresh1)

cv2.imwrite("closing.jpg", closing)

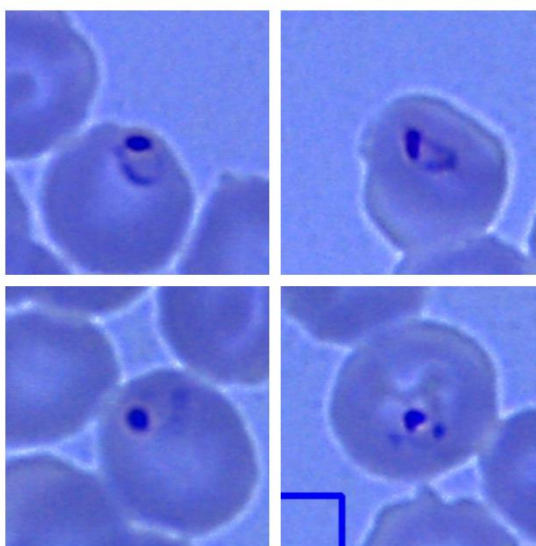
cv2.imwrite("original.jpg", original)
```

Výsledný obraz se zvýrazněnými podezřelými oblastmi je zobrazen na obr. 15.



Obr. 15 Detekce plasmodií (image179)

Zvlášť uložené obdélníkové výřezy z obrazu jsou vidět na obr. 16.



Obr. 16 Obdélníkové výřezy (image179)

### 4.3.6 Výpočet senzitivity

**Senzitivita S** je definována jako pravděpodobnost, s jakou je zachycena přítomnost sledovaného stavu. Tedy čím vyšší je senzitivita, tím je výsledek kvalitnější, neboť z toho vyplývá, že na počet skutečně pozitivních výsledků bylo detekováno malé množství falešně negativních výsledků. Vzorec pro senzitivitu je zobrazen v rovnici 7, kde TP znamená počet skutečně pozitivních výsledků a FN počet falešně negativních [25][31].

$$S = \frac{TP}{TP+FN} \quad \text{Rovnice 7 [25]}$$

Výpočet senzitivity pro hodnocení algoritmu byl zvolen, protože cílem není zjištění počtu falešně pozitivních (FP) výsledků, ale důraz je kladen na skutečně pozitivní a falešně negativní výsledky. Pro výpočet bylo náhodně vybráno padesát snímků, polovina ze vzorku č. 1 a druhá polovina ze vzorku č. 2. Výsledek je zapsán v tab. 3. Z tabulky lze vyčíst, že skutečně pozitivních výsledků bylo 201, falešně negativních 5. Konečná senzitivita algoritmu pro detekci podezřelých struktur se pohybuje okolo 98%. Podrobný rozpis TP, FN a FP výsledků je možné vidět v tab. 4, která se nachází v přílohách.

Tab. 3 Výsledná senzitivita v 50 náhodných snímcích

<b>Skutečně pozitivní (TP)</b>	201
<b>Falešně negativní (FN)</b>	5
<b>Senzitivita (S)</b>	0,98

## 5. Diskuze

Výzkumná část práce věnující se algoritmu je zaměřena především na segmentaci struktur s využitím morfologických operací. Tento přístup se objevuje i v odborné literatuře [26]. Před detekcí určitého vzorku, který se skládá z více snímků, je vhodné specificky upravit parametry pro správnou detekci. To vyplývá z našich výsledků, kdy byly nastaveny jednotné parametry pro 2 vzorky a na jednom z nich se objevuje mnohem vyšší množství falešně pozitivních výsledků, než u druhého. Tento fakt byl však způsoben i tím, že použitý vzorek č. 1 byl nekvalitně zhotoven a erythrocyty se na snímcích překrývají. Na druhou stranu, vysoké množství falešně pozitivních výsledků pro nás není tolik podstatné, našim cílem bylo detekovat podezřelé struktury, aby je mohl odborník následně vyhodnotit.

Algoritmus je schopný, při zadání správných parametrů, detekce na vysoké úrovni, ale nezajišťuje příliš velké urychlení práce. Každý snímek je nutno manuálně zadat před spuštěním procesu a může se objevit příliš velké množství falešně pozitivních výsledků.

Řešení nedostatků by mohlo být cílem navazující diplomové práce. Algoritmus by bylo vhodné urychlit automatickým procházením snímku a také zahrnutím parametru falešně pozitivních výsledků. Je žádoucí, aby byla její hodnota nižší. Dle odborné literatury se vhodné řešení může nabízet v detekci trofozoitů s pomocí neuronových sítí [27]. Vzhledem k tomu, že neuronová síť je schopna naučit se, jak trofozoit vypadá, mohlo by se jejím využitím značně snížit množství falešně pozitivních výsledků.

## 6. Závěr

V této bakalářské práci byl proveden teoretický rozbor problematiky parazitárního onemocnění malárie. V rozboru byla stručně popsána epidemiologie, původce nemoci a laboratorní diagnostika daného onemocnění. Následně byl zpracován přehled součástí optického mikroskopu s popisem jejich funkcí.

V rámci praktické části byly nafoceny snímky s pomocí optického mikroskopu Leica DM750. Dále byl po jednotlivých krocích popsán algoritmus pro detekci struktur podezřelých z obsahu plasmodií. Popis jednotlivých kroků programu obsahuje jak výňatek kódu, tak jejich grafické znázornění na vybraném snímku. V samotném závěru praktické části byla na padesáti náhodně vybraných snímcích vypočtena hodnota senzitivity algoritmu. Senzitivita algoritmu na daném vzorku snímků je poměrně vysoká, byla stanovena na 98 %.

Nicméně se nepodařilo příliš zrychlit celý proces diagnostiky vzhledem k tomu, že program není schopen sám projít všechny snímky bez asistence. Dalším negativem je příliš vysoká hodnota falešně pozitivních výsledků, která nebyla pro algoritmus podstatná, ale zpomaluje proces vyhodnocení výsledku odborníkem. Do budoucna se nabízí pro detekci možnost aplikace neuronových sítí, které by mohly tato negativa značně redukovat.



## Seznam použité literatury

- [1] ČERVINKOVÁ, Pavla. *Diagnostika malárie*. Hradec Králové, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd. Dostupné také z:  
<https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/74878>
- [2] BERAN, Jiří a Jiří VANIŠTA. *Základy cestovního lékařství*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-435-0.
- [3] Malárie. *Lab Tests Online* [online]. ©2001 - 2017 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z:  
<http://www.labtestsonline.cz/malarie.html#laboratorni-testy>
- [4] VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [5] SINGH, Balbir a Cyrus DANESHVAR. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013, **26**(2), 165-184. ISSN 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.0079-12. Dostupné také z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623376/>
- [6] Malaria. *WHO / World Health Organization* [online]. ©2018 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- [7] SVOBODA, Emanuel. *Přehled středoškolské fyziky*. Vyd. 5. Praha: Prometheus, 2014. ISBN 978-80-7196-438-4.
- [8] Princip činnosti mikroskopu. *Fyzika :: MEF* [online]. ©2006 - 2018 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/501-princip-cinnosti-mikroskopu>
- [9] TARÁBEK, Pavol a Petra ČERVINKOVÁ. *Odmaturuj! z fyziky*. Vyd. 2. Brno: Didaktis, c2006. Odmaturuj!. ISBN 80-7358-058-6.
- [10] WALEK, P., M. LAMOŠ a J. JAN. *Analýza biomedicínských obrazů: Počítačová cvičení*. Brno, 2013. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. ISBN 978-80-214-4792-9. Dostupné z:  
<http://www.dbme.feec.vutbr.cz/sites/default/files/news/fabo.pdf>
- [11] Image Arithmetic - Invert/Logical NOT. *Informatics homepages web service / Documentation* [online]. ©2003 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z:  
<http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/invert.htm>
- [12] BRADSKI, Gary R. *Learning OpenCV*. Sebastopol: O'Reilly, c2008. ISBN 978-0-596-51613-0.
- [13] Computer Vision. *Multimedia Interactive Didactic System*[online]. ©2010 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z:  
[http://midas.uamt.feec.vutbr.cz/ZVS/Exercise10/content\\_cz.php](http://midas.uamt.feec.vutbr.cz/ZVS/Exercise10/content_cz.php)
- [14] JAKSCH, Ivan. *Morfologické operace, strukturní elementy, binární matematické morfologie* [přednáška]. Liberec: Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií, 2017.

- [15] KOPETSCHKE, Igor. Řídící struktury – cykly, podmínky aj.[přednáška]. Liberec: Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií, 2015.
- [16] *OpenCV-Python Tutorials*[online]. ©2013 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <http://opencv-python-tutorials.readthedocs.io/en/latest/>
- [17] GÖPFERTO VÁ, Dana a Petr PAZDIORA. *100 infekcí: (epidemiologie pro praxi)*. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2015. ISBN 978-80-7387-846-7.
- [18] Anatomy of a Microscope - Numerical Aperture and Resolution. *Olympus - Life Science Solutions* [online]. [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/numaperture/>
- [19] *Skripta ke cvičení z Obecné mikrobiologie, Cytologie a morfologie bakterií | Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity* [online]. ©2017 [cit. 2018-06-25]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/prace\\_mikroskop.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/prace_mikroskop.html)
- [20] Malaria. *Our World in Data* [online]. [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <https://ourworldindata.org/malaria#malaria-prevalence-historically>
- [21] SZÚ [online]. [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/>
- [22] NOHÝNKOVÁ, Eva a František STEJSKAL. Malárie. *Interní Med.* 2005, **7**(5), 256-261. ISSN 1803-5256. Dostupné také z: <http://web.natur.cuni.cz/parasitology/vyuka/Zaklady%20TEXTY/Malarie.pdf>
- [23] CDC - Parasites - Malaria. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 2018 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/parasites/malaria/index.html>
- [24] ČERMÁK, Pavel a kol. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: Maxdorf, 2008. Jessenius. ISBN 978-80-7345-142-4.
- [25] PURWAR, Yashasvi a kol. Automated and unsupervised detection of malarial parasites in microscopic images. *Malaria Journal*[online]. 2011, **10**(1), 364- [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1186/1475-2875-10-364. ISSN 1475-2875. Dostupné z: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-364>
- [26] LODDO, A., C. DI RUBERTO a M. KOCHER. Recent Advances of Malaria Parasites Detection Systems Based on Mathematical Morphology. *Sensors* [online]. 2018, **18**(2), 513- [cit. 2018-06-26]. DOI: 10.3390/s18020513. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/18/2/513>
- [27] GOPAKUMAR, Gopalakrishna Pillai a kol. Convolutional neural network-based malaria diagnosis from focus stack of blood smear images acquired using custom-built slide scanner. *Journal of Biophotonics* [online]. 2018, **11**(3), e201700003- [cit. 2018-06-26]. DOI: 10.1002/jbio.201700003. ISSN 1864-063X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201700003>
- [28] VAN HELLEMOND, Jaap J. a kol. Human Plasmodium knowlesi Infection Detected by Rapid Diagnostic Tests for Malaria. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2009, **15**(9), 1478-1480 [cit. 2018-06-25]. DOI:

- 10.3201/eid1509.090358. Dostupné z:  
<https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/9/pdfs/09-0358.pdf>
- [29] Plasmodium malariae (zimnička čtvrtodenní). *BioLib* [online]. ©1999-2018 [cit. 2018-06-24]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id133049/>
- [30] Microscope Conjugate Field Planes. *Olympus - Life Science Solutions* [online]. [cit. 2018-06-24]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/numaperture/>
- [31] Specificita, senzitivita. *Medicína prakticky* [online]. 11.5.2009 [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: <https://medicinaprakticky.blogspot.com/2009/05/specificitasenzitivita.html>
- [32] Bitová hloubka polopate. *Vše o fotografování pro fotografy* [online]. 15.9.2014 [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: <https://www.fotoradce.cz/bitova-hloubka-polopate>
- [33] Lekce 8 - Pole v C#. *Itnetwork.cz* [online]. ©2018 [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: <https://www.itnetwork.cz/csharp/zaklady/c-sharp-tutorial-pole>
- [34] *Basic malaria microscopy*. Vyd. 2. Geneva: World Health Organization, 2010. ISBN 978-92-4-154782-6.

## Seznam obrázků

Obr. 1 Počet případů na 1000 ohrožených osob v roce 2015 [20].....	17
Obr. 2 Vývojový cyklus plasmodia [23].....	20
Obr. 3 Optické schéma mikroskopu [30].....	26
Obr. 4 Numerická apertura [18].....	26
Obr. 5 Mikroskop Leica DM750 .....	30
Obr. 6 Vzorek č. 1 (image100) .....	30
Obr. 7 Vzorek č. 2(image179) .....	31
Obr. 8 Šedotónový obraz (image179).....	33
Obr. 9 Inverzní obraz (image179).....	34
Obr. 10 Histogram (image179).....	35
Obr. 11 Prahování (image179).....	36
Obr. 12 Dilatace [14] .....	37
Obr. 13 Eroze [14] .....	37
Obr. 14 Morfologické uzavření (image179) .....	39
Obr. 15 Detekce plasmodií (image179).....	45
Obr. 16 Obdélníkové výřezy (image179) .....	45

## Seznam tabulek

Tab. 1 Případy importované malárie v ČR v letech 2008 – 2017 [21].....	17
Tab. 2 Přehled informací o původcích [2] .....	18
Tab. 3 Výsledná senzitivita v 50 náhodných snímcích.....	46
Tab. 4 Podrobné výsledky detekce v 50 náhodných snímcích .....	53

# Přílohy

## Příloha 1

Tab. 4 Podrobné výsledky detekce v 50 náhodných snímcích

snímek	TP	FN	FP
v2_003	6	1	0
v2_010	2	0	2
v2_018	7	0	0
v2_025	10	0	2
v2_035	5	0	0
v2_037	5	0	0
v2_050	8	0	1
v2_056	1	1	0
v2_061	7	2	0
v2_090	3	0	2
v2_092	4	0	0
v2_097	2	0	0
v2_100	4	0	0
v2_106	3	0	0
v2_111	3	0	0
v2_118	5	0	1
v2_124	6	1	5
v2_139	8	0	0
v2_143	4	0	0
v2_152	3	0	2
v2_162	11	0	1
v2_167	4	0	2
v2_179	4	0	0
v2_188	2	0	1
v1_010	1	0	6
v1_015	1	0	11
v1_035	4	0	5
v1_037	6	0	5
v1_040	3	0	10
v1_049	2	0	16
v1_055	2	0	7
v1_058	3	0	7
v1_060	3	0	6
v1_066	5	0	9
v1_070	3	0	4
v1_073	4	0	3
v1_077	5	0	6
v1_079	3	0	11
v1_082	4	0	14
v1_085	2	0	11
v1_088	4	0	3
v1_096	6	0	9
v1_100	3	0	9
v1_104	5	0	3
v1_108	2	0	7
v1_115	4	0	10
v1_127	3	0	9
v1_131	4	0	5
v1_134	2	0	8
součet	201	5	213

## **Příloha 2 – obsah CD**

- Text bakalářské práce
- Algoritmus
- Snímky
- Výběr padesáti detekovaných snímků
- Hodnocení padesáti detekovaných snímků