

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABELECIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA A
AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO LINFÓIDE FOLICULAR DA BOLSA DE
FABRICIUS ATRAVÉS ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM E DE REDES
NEURAIS ARTIFICIAIS**

Autor: Lucas Brunelli de Moraes

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias na especialidade de Sanidade Avícola

Orientação: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

PORTO ALEGRE

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABELECIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA A
AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO LINFÓIDE FOLICULAR DA BOLSA DE
FABRICIUS ATRAVÉS ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM E DE REDES
NEURAIS ARTIFICIAIS**

Autor: Lucas Brunelli de Moraes

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias na especialidade de Sanidade Avícola

Orientação: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

PORTO ALEGRE

2008

Lucas Brunelli de Moraes

**ESTABELECIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA A
AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO LINFÓIDE FOLICULAR DA BOLSA DE
FABRICIUS ATRAVÉS ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM E DE REDES
NEURAIS ARTIFICIAIS**

Aprovada em 25 FEV 2008

APROVADA POR:

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Santos Osório
Membro da Comissão

Prof. Dr. Luiz Cesar Bello Fallavena
Membro da Comissão

Dedico este trabalho aos meus pais – Moisés e Luizita – pelo amor sempre demonstrado, pelos ensinamentos, pelo balizamento na vida e pela oportunidade nos estudos.

Dedico também aos meus irmãos – Tiago e Juliana – pelo amor, amizade, lealdade e apoio sempre que necessário.

A vocês ofereço o meu amor incondicional, minha lealdade e minha vida, aqui e sempre.

Amo vocês!

Paz e Luz!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a ELE pela oportunidade que me deu nesta vida, de poder estudar e estar cercado de pessoas de imenso valor.

Agradeço ao meu orientador, Carlos Tadeu Pippi Salle, pela confiança depositada, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Agradeço ao meu fiel amigo Jairo Ramos de Jesus pelo incondicional carinho, apoio sempre que preciso e pelos conhecimentos transmitidos e compartilhados.

Aos queridos Benito Deferrari e Aríete Deferrari – *in memoriam* – pelo carinho, amor e dedicação a mim e minha família.

Agradeço a grande amiga (irmã) Aline Salatino Sant'Anna de Moraes, pela alegria e carinho.

Ao Professor Hamilton Luis de Souza Moraes pelo coleguismo, pelos ensinamentos e apoio nestes anos em que trabalhei no CDPA.

À grande, divertida e inteligente personalidade do querido Silvio Luis da Rocha, pelas conversas e pelo valioso convívio.

Ao Professor Fernando Osório pela simpatia, disposição e auxílio com a análise de imagem.

Aos estagiários e funcionários do CDPA pelo apoio.

Ao Professor Ari Bernardes da Silva, *in memoriam*, por ter me aceito como orientado de Mestrado assim que cheguei ao CDPA no ano de 2001.

A todos aqui citados e aos demais que levo no coração, meu sincero muito obrigado.

Paz e Luz a todos!

“Cultives o amor por menor que seja, pois ele é como um fino veio d’água que insiste em correr, um dia se transformará em rio e oceano”.

Lucas Brunelli de Moraes

RESUMO

A avicultura industrial apresenta altos índices produtivos, caracterizando-se pela alta tecnificação e pela eficiência. Inúmeros fatores podem prejudicar estes resultados, dentre os mais importantes citam-se as doenças imunodepressoras, as quais são agentes primários para o estabelecimento de inúmeros patógenos capazes de agravar o quadro clínico das aves, elevando ainda mais as perdas. Em vista disso, resolveu-se estudar um método mais eficaz para a determinação da depleção linfocitária da bolsa de Fabricius, órgão fundamental para a proliferação e maturação de linfócitos B. Dentre as doenças que mais acometem a bolsa de Fabricius citam-se a doença infecciosa da bolsa de Fabricius, as micotoxicoses e a anemia infecciosa. Foram utilizadas 50 amostras de bolsa de Fabricius coletadas intactas, processadas e o escore óptico de depleção estabelecido (de 1 a 5). As bolsas foram divididas em quadrantes e 12 folículos selecionados por amostra. As imagens foram adquiridas, analisadas com o software MATLAB[®] 6.5 e suas características extraídas. Com os dados foram geradas redes neurais (NEUROSHHELL[®]), comparando-se os escores óticos e a classificação realizada pela rede. A rede foi capaz de classificar corretamente com alta sensibilidade (até 89,81%) e especificidade (até 96,17%) a maioria dos folículos, tendo um melhor desempenho utilizando-se três categorias (sensibilidade de até 79,39% e especificidade de até 91,94%) e duas categorias (sensibilidade e especificidade chegando a 92,54%). Os resultados mostraram que é possível a utilização de análise de imagem e redes neurais para a classificação histopatológica de depleção linfocitária da bolsa de Fabricius. A análise de imagem é uma ferramenta prática, com resultados objetivos, dimensiona o erro classificatório e padroniza a avaliação da depleção linfocitária bolsa.

ABSTRACT

The industrial poultry has high productive indices, characterizing itself for the high technification and efficiency. Many factors can harm these results, the immunodepressive diseases are amongst the most important causes. These diseases are the primary agents for the establishment of many secondary pathogens, aggravating the losses. In sight of this, we decided to study a more efficient method for the determination of the lymphoid depletion of bursa of Fabricius. The infectious bursal disease, the micotoxins and the infectious chicken anemia are the most important diseases of bursa of Fabricius. Fifty BF were examined by conventional optical microscopy and digital images were acquired and processed using MATLAB® 6.5 software. The ANN was generated using NEUROHELL® CLASSIFIER software and the optical and digital data were compared. The ANN was able to make a comparable classification of digital and optical scores. The use of ANN was able to classify correctly the majority of the follicles with sensibility and specificity of 89% and 96%, respectively. When the follicles were scored and grouped in a binary fashion the sensibility and specificity increased significantly to 90 and 92%, respectively. These results demonstrate that the use of digital image analysis and ANN is a useful tool for the pathological classification of the BF lymphoid depletion. In addition

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Imagem ilustrativa da divisão da BF em quadrantes e da numeração dos folículos selecionados.....	32
FIGURA 2 – Imagem de um folículo linfóide selecionado (H&E, 200X).....	33
FIGURA 3 – Imagem em escala de cinza do folículo selecionado (200X).....	34
FIGURA 4 – Seleção da área folicular (200X).....	34
FIGURA 5 – Segmentação da imagem (200X).....	35
FIGURA 6 – Histograma da imagem (pixels/escala de cinza), onde 0 representa o preto absoluto e 250 o branco absoluto.....	35
FIGURA 7 – Representação esquemática dos elementos avaliados nos histogramas de imagem.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Intervalos de depleção linfóide para cada escore de depleção linfocitária, através da avaliação óptica subjetiva.....	31
TABELA 2 - Valores médios das características dos histogramas de acordo com os escores ópticos de lesão.....	39
TABELA 3 - Valores médios das características dos histogramas para a utilização de três escores ópticos de lesão.....	40
TABELA 4 - Valores médios das características dos histogramas para a utilização de dois escores ópticos de lesão.....	40
TABELA 5 - Relação entre a classificação dos folículos utilizando cinco categorias de Escore Digital (ED) e os Escores Óptico (EO).....	41
TABELA 6 - Relação entre a classificação dos folículos utilizando três categorias de Escore Digital (ED) e os Escores Óptico (EO).....	42
TABELA 7 - Relação entre a classificação dos folículos utilizando duas categorias de Escore Digital (ED) e os Escores Óptico (EO).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABEF** - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango
- AD** - Área Direita
- AE** - Área Esquerda
- AI** - Análise de Imagem
- AIG** - Anemia Infecciosa das Galinhas
- AP** - Área Ponto
- BF** - Bolsa de Fabricius
- DIB** - Doença Infecciosa Bursal
- ED** - Escore Digital
- EO** - Escore Óptico
- F** - Forte
- I** - Intermediária
- IM** - Índice Maior
- IP** - Intermediária Plus
- PM** - Ponto Maior
- RNA** - Ácido Ribonucléico
- SPF** - *Specific Pathogens Free*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Doença Infecciosa Bursal (DIB).....	16
2.2 Anemia Infecciosa das Galinhas.....	18
2.3 Aflatoxicose.....	20
2.4 Redes Neurais Artificiais (RNA).....	23
2.5 Análise de Imagem (AI).....	25
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Amostras de BF.....	31
4.2 Preparação dos Cortes Histológicos.....	31
4.3 Avaliação Histopatológica das Lâminas.....	31
4.4 Obtenção das Imagens.....	32
4.5 Análise das Imagens.....	33
4.5.1 Obtenção dos Valores do Número de <i>Pixels</i> /Escala de Cinza das Imagens.....	33
4.5.2 Obtenção dos Valores dos Elementos Observados no Histograma.....	35
4.5.2.1 Obtenção do Índice Maior (IM).....	36
4.5.2.2. Obtenção do Ponto Maior (PM).....	36
4.5.2.3 Cálculo da Área Esquerda (AE).....	36
4.5.2.4 Cálculo da Área Direita (AD).....	36
4.5.2.5 Cálculo da Área Ponto (AP).....	36
4.6 Análise Estatística.....	37
4.6.1 Análise Estatística dos Caracteres do Histograma para os Cinco Escores.....	37
4.6.2 Análise Estatística dos Caracteres do Histograma para os Três Escores.....	37
4.6.3 Análise Estatística dos Caracteres do Histograma para os Dois Escores.....	38

4.7 Redes Neurais Artificiais (RNA).....	38
4.7.1 Redes Neurais Artificiais com Cinco Escores de Classificação.....	38
4.7.2 Redes Neurais Artificiais com Três Escores de Classificação.....	38
4.7.3 Redes Neurais Artificiais com Dois Escores de Classificação.....	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Análise Estatística.....	39
5.1.1 Resultado da Análise Estatística utilizando os Cinco Escores de Lesão.....	39
5.1.2 Resultado da Análise Estatística utilizando Três Escores de Lesão.....	39
5.1.3 Resultado da Análise Estatística utilizando apenas Dois Escores de Lesão.....	40
5.2 Redes Neurais Artificiais.....	40
5.2.1 Resultados das Redes Neurais Artificiais utilizando Cinco Escores Classificatórios.....	40
5.2.2 Resultados das Redes Neurais Artificiais utilizando Três Escores Classificatórios.....	42
5.2.3 Resultados das Redes Neurais Artificiais utilizando Dois Escores Classificatórios.....	42
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	48
8 TRABALHOS FUTUROS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO – Comprovante do recebimento do artigo.....	57
APENDICE A – Artigo encaminhado para a publicação.....	58
APENDICE B – Comandos para o processamento das imagens.....	70
APENDICE C – Janelas de resultados classificatórios e para a predição do escore de depleção linfóide do folículo.....	74

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira, que há cerca de 50 anos possuía pouca relevância no cenário avícola mundial, atualmente é uma das mais eficientes e tecnificadas do mundo. O Brasil alojou no ano de 2007 cerca de 42.481.788 matrizes de corte, produzindo 5.150.210.921 de pintos de corte (12,53% a mais que 2006), totalizando uma produção de 10.246.267 toneladas de carne de frango. Estes números colocam o Brasil como o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, atrás dos Estados Unidos da América e da China (ABEF, 2008).

Devido à alta eficiência da avicultura brasileira, o país é – pelo quarto ano consecutivo – o maior exportador de carne de frango, com o volume de 3.286.775 ton e uma receita de exportação de U\$4.975.563, um aumento de 20,95% no volume exportado e de 54,85% na receita em relação ao ano de 2006 (ABEF, 2008).

Tais dados ilustram a importância do setor avícola no Brasil. Além do aspecto econômico, a avicultura desempenha um papel social de extrema importância, viabilizando a pequena propriedade e fixando a população rural no interior, assim evitando o aumento do número de desempregados e diminuindo os riscos destas famílias assumirem um estado de miséria extrema, devido à falta de oportunidades nas grandes cidades.

A avicultura industrial é uma das mais tecnificadas áreas do agronegócio, produzindo com alta eficiência e exigindo o máximo de desempenho do seu produto, a ave. Com vista nessa alta eficiência é que existe uma constante corrida para a manutenção de um ideal estado sanitário dos lotes, a fim de impedir a quebra deste potencial produtivo, seja de carne ou de ovos. No entanto, patologias imunodepressoras são responsáveis por grandes perdas, ou por suas lesões diretas ou servindo como porta de entrada para outras doenças.

Uma atividade de tamanha magnitude apresenta algumas distorções até certo ponto paradoxais. A mesma avicultura que usa equipamentos de última geração e serviços atualizados, responsáveis pela competitividade internacional do produto brasileiro, na maioria dos casos, é levada a tomar decisões que envolvem todos os

aspectos de produção, apoiada em critérios subjetivos. Como critério subjetivo, entenda-se a análise meramente gráfica dos dados e uma experiência empírica, que se traduz por sensação "epidérmica" de erro e acerto. Uma atividade tão importante econômica e socialmente necessita de critérios objetivos fundamentados cientificamente, com probabilidade de erro e acerto calculados para dar sustentação às decisões que objetivarão a melhoria da produtividade dos plantéis e da qualidade sanitária do produto oferecido aos mercados externo e interno.

Este trabalho tem o objetivo de fornecer uma ferramenta para a melhoria do diagnóstico das doenças imunodepressoras, pois a avaliação da perda linfocitária é subjetiva, dependendo somente da experiência do técnico que a realiza, podendo ser influenciada por inúmeros fatores. Para objetivar estas análises foi necessária a utilização de equipamentos processadores de imagens que pudessem demonstrar e quantificar as lesões. Através desse processamento de imagem, transfere-se uma imagem microscópica à um computador que pode traduzir discretas alterações de coloração dos tecidos em diferenças cromáticas que possam ser quantificadas.

Dessa forma, a utilização de um sistema objetivo contribui para um melhor conhecimento dos prejuízos acarretados pelas patologias imunodepressoras, através da obtenção de dados pela digitalização dos cortes histológicos e da quantificação do grau de lesão.

O Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) já realizou diversos trabalhos neste sentido, que vêm servindo de base para a implantação de redes neurais artificiais, as quais serão disponibilizadas para o controle técnico de doenças de interesse avícola e na melhor compreensão da avicultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença Infecciosa Bursal (DIB)

A Doença de Gumboro (DG), também denominada de Doença Infecciosa Bursal (DIB) ou Infecção da Bolsa de Fabricius (IBF), é uma virose aguda e contagiosa que acomete aves jovens, caracterizando-se por diarreia, inflamação e atrofia da bolsa de Fabricius, causando variados graus de imunodepressão (LUKERT & SAIF, 2003). Além das lesões provocadas pela doença, a produtividade, medida pelo ganho de peso e conversão, estará comprometida se o plantel de reprodutoras, que deu origem aos frangos de corte, não foi vacinado contra a DIB, conforme menciona Wyeth *et al* (1981).

O vírus da DIB tem como alvo o tecido linfóide, principalmente os linfócitos B, sendo a bolsa de Fabricius (BF) o órgão mais severamente afetado (LUCKERT & SAIF, 1997), produzindo graves efeitos imunodepressores (HIRAI *et al*, 1974). A doença ocorre mais frequentemente em frangos jovens, com idade variando entre três e cinco semanas, cursando por cinco a sete dias, levando a uma alta morbidade e uma mortalidade média em torno de 5 e 6% (COSGROVE, 1962).

O agente etiológico da DIB foi objeto de diversos estudos, sendo classificado de diferentes formas a partir de 1962, quando Cosgrove (1962) descreveu a doença. Cho e Edibar (1969) caracterizaram-no como sendo da família *Picornaviridae*. Já Pattison *et al* (1975) classificaram o agente da DIB como integrante da família *Reoviridae*. Dobos *et al* (1979), estudando as propriedades biofísicas e bioquímicas, caracterizaram o vírus da DIB como um membro da família *Birnaviridae*, que inclui também alguns vírus de peixe, moluscos e de drosófila. Conforme Müller *et al* (1979), o vírus tem entre 55 e 65 nm de diâmetro, não envelopado e composto de dois segmentos de RNA de dupla hélice, designados de segmentos A e B. Estes segmentos codificam as proteínas estruturais do vírus que são denominadas de VP1, VPX, VP2, VP3 e VP4, de acordo com Dobos *et al* (1979).

A importância econômica da DIB é manifestada de duas formas: a primeira, relacionada à doença clínica, pela mortalidade em aves a partir de três semanas de idade. A segunda, e mais importante, é a severa e prolongada imunodepressão das aves

infectadas em idade jovem. Assim, perdas consideráveis ocorrem através do efeito imunodepressor do vírus e da interação entre a DIB e outras enfermidades nas duas primeiras semanas de vida. Numerosos trabalhos têm demonstrado um aumento de suscetibilidade das aves a outras infecções após a exposição ao vírus da DIB, as quais incluem dermatite gangrenosa, hepatite por corpúsculos de inclusão, infecção por *Escherichia coli* e falhas vacinais (ALAN *et al.*, 1972, RINALDI *et al.*, 1972; FADLY *et al.*, 1976; GIAMBRONE *et al.*, 1976; ALMASSY & KAKUK, 1976; ROSENBERGER & GELB, 1978; SIVANANDAN & MAHESWARAN, 1980; DOHMS & JAEGER, 1988; ROSENBERGER & CLOUD, 1989; OKOYE *et al.*, 1991).

As galinhas são os únicos animais conhecidos que desenvolvem a doença clínica e lesões características quando expostas ao vírus da DIB. O período de incubação é bastante curto, e os sinais clínicos desenvolvem-se em dois a três dias após a infecção. Em lotes suscetíveis, a doença aparece rapidamente e com alta taxa de morbidade, normalmente próxima dos 100%. A mortalidade pode ser nula ou atingir 30%, geralmente iniciando em torno do terceiro dia pós-infecção e retrocedendo em cinco ou sete dias. Os primeiros surtos em uma granja são geralmente mais agudos; surtos ocorrentes em lotes posteriores são menos severos e freqüentemente passam despercebidos. Muitas infecções são silenciosas, em função da idade das aves (menos de três semanas), ou de infecção por cepas avirulentas de campo ou, ainda, por infecção na presença de anticorpos maternos. Surtos de DIB em lotes suscetíveis são facilmente reconhecidos, sendo que o diagnóstico presuntivo pode ser prontamente realizado. O rápido surgimento, a alta morbidade, a curva de mortalidade em pico, a rápida recuperação dos sinais clínicos, a qual ocorre em cinco a sete dias, são as características principais da doença (LUKERT & SAIF, 2003).

Os vírus de campo, assim como os vacinais, produzem lesões de graus variados. As lesões macroscópicas, em aves mortas devido a essa infecção, são desidratação, hemorragias nos músculos das coxas e peitoral, aumento na quantidade de muco no lume intestinal e hipertrofia renal (COSGROVE, 1962; HITCHNER, 1970). A BF, alvo mais importante do vírus, apresenta lesões que vão desde o aumento de volume e de peso, em consequência de hiperemia e edema no terceiro dia após a infecção, até a atrofia, chegando a aproximadamente 1/3 do seu peso normal em oito dias (CHEVILLE, 1967). HITCHNER (1970) relata que o órgão, após dois ou três dias da infecção,

apresenta conteúdo gelatinoso e amarelado cobrindo a superfície serosa e alterando a coloração desta, que passa de branca para creme. Durante a fase de atrofia, a coloração da serosa bursal torna-se acinzentada. A infecção causa, freqüentemente, necrose multifocal e hemorragias petequiais ou equimóticas na mucosa do órgão. Ocasionalmente, BFs de aves afetadas podem apresentar extensas hemorragias envolvendo a totalidade do órgão e, nesses casos, as fezes podem apresentar aspecto sanguinolento.

Microscopicamente, os efeitos do vírus produzem, principalmente, alteração na arquitetura folicular normal, em consequência da degeneração e necrose dos linfócitos na região medular dos folículos (CHEVILLE, 1967). Quando a ave é infectada por vírus suficientemente virulentos, é possível observar necrose de linfócitos bursais associada a cariorrexia e picnose de 24 – 36 horas pós-infecção. Observa-se também, proliferação de macrófagos, infiltrado heterofílico e células do plasma. A destruição linfocitária é seguida de edema interfolicular e pode ocorrer hemorragia (POPE, 1996). Os linfócitos são substituídos por heterófilos, restos celulares necróticos e células retículo-endoteliais hiperplásicas; após três ou quatro dias da infecção, todos os folículos linfóides da BF estão afetados, e o aumento de peso do órgão deve-se à hiperemia, ao edema e à infiltração heterofílica (CHEVILLE, 1967). À medida que a inflamação regride, começam a se formar cavidades císticas na região medular folicular, sinais de necrose e de fagocitose de células inflamatórias e fibroplasia do tecido conjuntivo interfolicular (POPE, 1996). Observa-se, também, proliferação do epitélio bursal, produzindo uma estrutura glandular de células cilíndricas contendo glóbulos de mucina (CHEVILLE, 1967).

2.2 Anemia Infecciosa das Galinhas

A anemia infecciosa das galinhas (AIG) foi primeiramente reconhecida por Yuasa e colaboradores em 1979. A doença é caracterizada por anemia aplástica e generalizada atrofia linfóide, levando a um quadro de imunodepressão e freqüentes complicações por agentes secundários. Desde o seu primeiro isolamento no Japão, o vírus tem sido encontrado em praticamente todos os países de produção avícola. A AIG é causada por um vírus da família *Circoviridae* e do gênero *Gyrovirus*. É um vírus não

envelopado, de morfologia icosaédrica com um diâmetro aproximado de 25 – 26,5 nm e foi identificado apenas em galinhas e codornas (SCHAT, 2003).

O vírus da AIG tem efeitos deletérios na medula óssea das aves, agindo principalmente em hemocitoblastos, dos quais derivam as séries eritróide e mielóide (ADAIR, 2000).

No tecido linfóide, o vírus da AIG parece ter como alvo as células progenitoras de linfócitos T no timo. No entanto, as células B e seus precursores não são suscetíveis à infecção, não havendo redução substancial no número destas, quando comparado ao efeito deletério observado nas células T (ADAIR, 2000). Schat (2003) afirma que, ao contrário do timo, ocasionalmente encontra-se necrose de BF, baço e outros focos linfóides teciduais antes dos 10 -12 dias pós-inoculação.

No timo, os linfócitos corticais estão entre as primeiras células a serem destruídas, não se observando alterações nos demais leucócitos e nas células do estroma. Isto sugere a infecção seletiva do vírus por células T imaturas, pois são elas os principais timócitos encontrados na zona cortical do órgão (ADAIR, 2000).

A AIG possui um período de incubação de 10 a 21 dias, dependendo da carga viral e da dose infectante. A mortalidade pode variar de dois a 20% e a morbidade pode alcançar 100%. Aves infectadas nos primeiros dias de idade apresentam a doença clínica, entretanto aves infectadas com mais de duas a três semanas não apresentam sinais clínicos ou lesões. A transmissão vertical possui um papel importante para o desenvolvimento da doença clínica, assim como a imunidade materna tem importante ação preventiva para aves de um dia de idade alojadas em ambientes contaminados e que são desafiadas, infectando-se horizontalmente (BRENTANO, 2000).

Dentre as lesões macroscópicas causadas pela ação do vírus da AIG cita-se (1) a atrofia de timo – podendo chegar à ausência do órgão e muitas vezes os lóbulos remanescentes apresentam coloração vermelha escuro; (2) a deposição de tecido adiposo na medula óssea, esta assumindo coloração pálida (variando do amarelado ao rosado); (3) atrofia de baço (SCHAT, 2003) e, em casos mais severos, é possível observar, (4) hemorragias musculares, e (5) hemorragias no pró-ventrículo e tecido

subcutâneo. Estas hemorragias subcutâneas podem estar associadas à infecção por reovírus – *blue wing disease* (BRENTANO, 2000).

Histopatologicamente na medula óssea se observa pancitopenia (BARNES, 1996). As células hematopoiéticas são substituídas por tecido adiposo ou pela proliferação do estroma. Áreas de regeneração podem ser observadas de 16 a 18 dias após a infecção experimental, assim como hiperplasia de medula óssea também pode se fazer presente de 24 a 42 dias pós-infecção – em aves em recuperação (SCHAT, 2003).

No timo observa-se severa depleção dos linfócitos corticais (SCHAT, 2003), que é inicialmente mais intensa na porção mais externa do córtex tímico (POPE, 1996). Pode ocorrer a perda da arquitetura zonal normal do órgão, apresentando-se de coloração menos intensa de difícil distinção entre a região cortical e a medular (RANDALL & REECE, 1996).

As lesões na BF podem estar presentes, consistindo de leve a severa atrofia dos folículos linfóides, com ocasionais pequenos focos necróticos (SCHAT, 2003) por redução do número dos linfócitos foliculares (POPE, 1996). Ocorre a perda linfocitária tanto na zona cortical quanto na medular, sendo que esta perda não é acompanhada de reação inflamatória. Os achados de BF não são específicos (RANDALL & REECE, 1996).

Encontra-se ainda, depleção dos linfócitos esplênicos e dos agregados linfóides do fígado, rins, pró-ventrículo, pulmões, duodeno e tonsilas cecais (SCHAT, 2003).

2.3 Aflatoxicose

A aflatoxicose é uma doença causada pela ingestão de aflatoxinas, as quais constituem um grupo de metabólitos altamente tóxicos e carcinogênicos, produzidos principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O grupo das aflatoxinas compreende as toxinas B₁, B₂, G₁, e G₂, das quais a B₁ é a predominante e também a mais tóxica (HOERR, 1991).

O mecanismo de ação das micotoxinas na célula animal ocorre, na maioria das vezes, através de alterações dos processos metabólicos básicos (como no metabolismo de carboidratos, lipídios e esteróides) e de alterações da função mitocondrial, da síntese protéica e de ácidos nucléicos, constituindo-se estes últimos nos principais sítios de ação das aflatoxinas. Todos esses efeitos primários, somados à ação direta sobre enzimas, proteínas ou coenzimas, determinam efeitos secundários que alteram a regulação da atividade metabólica da célula afetada (KIESSLING, 1986). Clifford e Rees (1966) demonstraram que após uma hora da ingestão da aflatoxina, já há inibição da síntese protéica devido a uma marcante inibição da síntese de RNA-polimerase. Esses autores sugerem a seguinte seqüência de eventos no curso das aflatoxicoses: a toxina entra no núcleo da célula hepática, une-se ao DNA e deste modo inibe a síntese de RNA-polimerase e reduz a síntese de RNA-mensageiro. A inibição do RNA-mensageiro reflete-se, 15 minutos após, na diminuição da síntese protéica.

Cruz (1995) refere-se às alterações provocadas pelas aflatoxinas de acordo com o sistema orgânico afetado. No sistema gastrointestinal, podem ser observadas alterações como diarréia e hemorragia intestinal, atrofia de vilosidades, necrose e fibrose. No sistema cutâneo observa-se icterícia, conseqüente à desordem hepática. No sistema imune é observada redução da atividade imunológica, seja pela diminuição da atividade do complemento e da concentração de imunoglobulinas, e pelo decréscimo da atividade fagocitária e linfocitária, além do efeito imunodepressor sobre o timo, BF e baço. No sistema cardiovascular, a aflatoxicose leva à fragilidade vascular com conseqüente ocorrência de hemorragias nos mais diversos órgãos. No sistema reprodutor, podem ser observadas alterações como embriotoxidez e teratogenia.

Patterson (1983) afirma que a aflatoxina induz a formação de tumores hepáticos em todas as espécies animais, porém naquelas com vida produtiva curta, como é o caso do frango de corte na avicultura industrial, não há tempo suficiente para o desenvolvimento de tais alterações.

A exposição à aflatoxina pode ser aguda ou crônica, dependendo da dose e do período de exposição à toxina (LAZZARI, 1993).

A aflatoxicose aguda é caracterizada por desordem hepática, sendo manifestada pelos sinais clínicos de prostração, anorexia, icterícia e, dependendo da dose ingerida, alta mortalidade (LEESON *et al.*, 1995). Microscopicamente, Hoerr (1996) descreve a aflatoxicose hepática aguda como sendo responsável pela degeneração gordurosa, necrose, aumento do núcleo dos hepatócitos com marginalização da cromatina e nucléolo proeminente; observa-se também rápida proliferação dos ductos biliares.

A aflatoxicose crônica não é facilmente reconhecida, pois prejudica a produtividade do lote (LEESON *et al.*, 1995). Sinais clínicos como depressão, perda de apetite, olhos fechados, penas arrepiadas, paralisia e diarreia são observadas em frangos de corte. A aflatoxicose crônica caracteriza-se microscopicamente pela degeneração dos hepatócitos com a presença de figuras de mitose, a qual pode estar circundada por ductos biliares proliferados e tecido fibroso (HOERR, 1996).

Doerr *et al* (1983) verificaram que as maiores perdas econômicas ocorrem quando frangos são expostos à intoxicação crônica por aflatoxina. Demonstraram, ainda, que é difícil estabelecer um nível “seguro” de contaminação do alimento para que não ocorram efeitos adversos no desempenho das aves, já que a toxicidade da aflatoxina varia com fatores estressantes presentes no meio ambiente.

Aumentando-se gradualmente a dose de aflatoxina (0,625; 1,250; 2,50; 5,00 e 10,00 ppm) incorporada ao alimento das aves, verifica-se um aumento no tamanho do fígado, baço e do pâncreas, ao passo que ocorre uma diminuição no peso da BF (SMITH & HAMILTON, 1970), do timo (THAXTON *et al.*, 1974) e do baço (POPE, 1996).

A aflatoxicose é fortemente associada com o aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas. Em galinhas, a aflatoxicose aumenta a susceptibilidade e/ou a severidade da coccidiose cecal, da doença de Marek, da salmonelose, da hepatite por corpúsculo de inclusão e da DIB. Falhas vacinais também podem estar ligadas à intoxicação por aflatoxinas (HOERR, 2003).

Em acordo com o descrito, cita-se a Doença Infecciosa Bursal, a Aflatoxicose e a Anemia Infecciosa das Galinhas como as principais patologias imunodepressoras que

acometem a bolsa de Fabricius de aves. A avaliação subjetiva tradicional da depleção linfocitária não fornece um dado reprodutível e constante, motivo pelo qual optou-se pela avaliação desta depleção por meio da utilização de análise digital de imagem e de redes neurais artificiais.

2.4 Redes Neurais Artificiais (RNA)

Os modelos neurais procuram aproximar o processamento dos computadores ao do neurônio humano. As redes neurais possuem um grau de interconexão similar à estrutura do neurônio e em um computador convencional moderno a informação é transferida em tempos específicos dentro de um relacionamento com um sinal para sincronização. São capazes de lidar com tarefas complicadas, de forma dinâmica, sem que tenham que desenvolver um modelo matemático e nem um modelo do ambiente em que operam. A rede, diferentemente dos sistemas convencionais aprende, executa operações não lógicas, descobre as relações ou regras dos dados e exemplos e testa todas as possibilidades em paralelo (TATIBANA & KAETSU, 2004).

A rede neural artificial é um sistema de "neurônios" ligados por conexões sinápticas, dividida em "neurônios" de entrada – que recebem estímulos do meio externo, "neurônios" internos ou ocultos e "neurônios" de saída – que se comunicam com o exterior. Os "neurônios" internos são de suma importância na rede neural, pois se provou que sem estes se torna impossível a resolução de problemas linearmente não separáveis. Em outras palavras, pode-se dizer que uma rede é composta por várias unidades de processamento, cujo funcionamento é bastante simples. Essas unidades, geralmente são conectadas por canais de comunicação que estão associados a determinado peso. As unidades fazem operações apenas sobre seus dados locais, que são entradas recebidas pelas suas conexões. O comportamento inteligente de uma Rede Neural Artificial vem das interações entre as unidades de processamento da rede. Estes fenômenos variáveis são conhecidos como causalmente dependentes, mas cuja dependência está além de uma simples relação linear ou não linear (KOVAC'S, 1996).

A rede neural passa por um processo de treinamento a partir dos casos reais conhecidos. Sendo assim, a rede neural é capaz de extrair regras básicas a partir de dados reais. Arquiteturas neurais são tipicamente organizadas em camadas com

unidades que podem estar conectadas às unidades da camada posterior. À medida que o aprendizado ocorre, o erro entre a saída da rede e a saída desejada diminui. Usualmente, as camadas são classificadas em três grupos: Camada de Entrada; onde os padrões são apresentados à rede; Camadas Intermediárias ou Ocultas; onde é feita a maior parte do processamento, através das conexões ponderadas; podem ser consideradas como extratoras de características; Camada de Saída: onde o resultado final é concluído e apresentado (FORSSTRÖRM & DALTON, 1995).

A rede neural baseia-se nos dados disponíveis para extrair um modelo geral. Portanto, a fase de aprendizado deve ser rigorosa e verdadeira, a fim de evitarem-se modelos falsos. Todo o conhecimento de uma rede neural está armazenado nas sinapses, ou seja, nos pesos atribuídos às conexões entre os "neurônios". De 50 a 90% do total de dados deve ser separado para o treinamento da rede neural, dados estes escolhidos aleatoriamente, a fim de que a rede "aprenda" as regras e não "decore" exemplos. O restante dos dados só é apresentado à rede neural na fase de testes, a fim de que ela possa "deduzir" corretamente o inter-relacionamento entre os dados (TATIBANA & KAETSU, 2004).

As RNAs têm sido largamente utilizadas em diversos setores da indústria, agricultura, economia, entre outros. Na indústria avícola não é diferente, pois a sua utilização é necessária para auxiliara na tomada de decisões e estabelecimento de predições confiáveis.

Salle *et al* (2003) utilizaram dados de produção de 22 lotes de matrizes no período de abril de 1998 a dezembro de 1999. Com estes dados alimentou-se o programa de RNA NEUROHELL 2[®] e estabeleceram-se modelos matemáticos, sendo os melhores selecionados (alto coeficiente de determinação e um baixo quadrado médio do erro). Os autores concluíram que é possível explicar as variáveis produtivas de aves de produção através da utilização das RNAs.

Outro trabalho que chega às mesmas conclusões é o feito por Salle *et al* (2004), em que se utilizaram dados de produção de 1516 criadores com lotes alojados em 2001 e 889 criadores com lotes alojados em 2002. Para construção das redes utilizou-se o programa NEUROHELL PREDICTOR[®] e para o seu treinamento foram utilizados

dados de 1000 criadores do banco de dados do alojamento de 2001 e os restantes (516 criadores) ficaram para a validação da rede. Todos os 889 dados dos criadores serviram para validação das redes. Foram gerados 20 modelos, tendo estes um coeficiente de determinação múltipla entre 0,964697 e 0,999951; e um quadrado médio do erro próximo a um. Os resultados da pesquisa provam não haver diferença significativa entre as médias dos valores preditos e a média dos valores reais. Sendo assim, os autores afirmam que (1) as RNAs são capazes de explicar os fenômenos envolvidos na produção industrial de frangos de corte; (2) a técnica oferece critérios objetivos, gerados cientificamente, que embasarão a tomada de decisões dos responsáveis pela produção industrial destes animais e (3) permite a realização de simulações e medir a contribuição de cada variável no fenômeno em estudo.

Roush *et al* (1997) utilizaram as RNAs para a predição de ascite em frangos de corte, através da avaliação de parâmetros minimamente invasivos (nível de oxigênio sangüíneo, peso corporal, eletrocardiograma, hematócrito e índice de dilatação cardíaca). A RNA foi capaz de diagnosticar 97% das aves que desenvolveram ascite.

As RNAs foram também empregadas para explicar a produção de frango de corte (REALI, 2004), os fatores de manejo do incubatório (SALLE, 2005), os pontos críticos nas linhas de abate nos frigoríficos (PINTO, 2006) e no auxílio ao diagnóstico e determinação de patogenicidade de *Escherichia coli* (SOUZA, 2006; ROCHA, 2006).

É importante salientar que a utilização de RNAs não possui limites definidos. Quanto maior é a pesquisa na busca de explicações para os fenômenos não lineares, maior será a utilização das redes para a compreensão destes eventos. Isso faz com que o volume de material publicado seja muito volumoso.

Visto que este trabalho utiliza as RNAs apenas como ferramenta classificatória, a lista de artigos e outros trabalhos aqui citados são apenas uma diminuta amostragem do que é divulgado na área científica sobre as RNAs.

2.5 Análise de Imagem (AI)

Nas áreas biológica e biomédica, muitas avaliações são realizadas de forma subjetiva, baseadas na experiência do técnico que as realiza. Por esta dificuldade de julgamento é que se tem buscado cada vez mais a utilização de técnicas que visem a diminuir o erro, dando um caráter mais objetivo à avaliação, aumentando o valor e a certeza diagnóstica e prognóstica, além de permitir a ideal reprodutibilidade dos testes. A AI é a tecnologia que vem suprindo parte desta necessidade e ganhando cada vez mais credibilidade e aceitação de seu uso, que por vezes é bastante limitado, tornando indispensável a presença do profissional capacitado na área em que a AI será aplicada.

Inúmeros trabalhos são publicados utilizando o processamento digital de imagens para fins de pesquisa e diagnóstico. Pesquisadores cubanos avaliaram a espessura do estrato córneo, da epiderme e a fração de área ocupada por colágeno após a utilização de diferentes concentrações de ácido glicólico, aplicadas sobre a pele de mulheres entre 40 e 60 anos de idade. Foi utilizado um programa cubano de processamento de imagem chamado DIGIPAT[®] (CORO-ANTICH *et al*, 2000).

O processamento de imagem também vem sendo utilizado como auxiliar na avaliação radiológica de pacientes, tendo dois tipos básicos de aplicações. Um é o auxílio à detecção de lesões, a partir da localização de padrões anormais através da varredura da imagem pelo computador (por exemplo, agrupamentos de microcalcificações em imagens mamográficas ou nódulos pulmonares em imagens de tórax). O outro é o auxílio ao diagnóstico, através da quantificação de características da imagem e sua classificação como correspondendo a padrões normais ou anormais. Por exemplo, a associação da quantidade e forma das microcalcificações presentes em um agrupamento com a malignidade ou não do tumor, ou a associação da textura dos pulmões com lesões intersticiais em imagens de tórax (AZEVEDO-MARQUES, 2001).

Rosito (2002) utilizou a análise digital de imagem para a caracterização de núcleos celulares no adenocarcinoma de reto. O pesquisador utilizou amostras de 51 casos de adenocarcinoma e 22 casos controle. Dos casos positivos foram obtidas aproximadamente 70 imagens de núcleos por amostra e dos casos negativos aproximadamente 107 imagens por amostra. As imagens dos núcleos foram segmentadas e suas características foram avaliadas (área, densidade óptica total, dimensão, aspecto, condensação da cromatina, granularidade, circularidade, densidade

máxima e heterogeneidade), foram obtidas as assinaturas digitas das imagens e as mesmas comparadas com o grupo controle. O autor conclui que foi possível a caracterização de núcleos do adenocarcinoma de reto e a obtenção de assinaturas digitais do grupo câncer.

Outro trabalho que teve como objetivo a utilização do processamento de imagem para avaliação histopatológica foi o realizado por Novelli *et al* (1997), onde foram realizadas 28 anastomoses colocólicas em cães através de duas técnicas distintas. Realizou-se biópsia do local da cirurgia 33 dias após a realização da mesma, os cortes foram corados com HE e analisados através do software DIRACOM3[®]. Cada corte histológico obtido das duas formas de anastomose passou por esse *software*, com a digitalização da imagem microscópica das estruturas básicas que compõem os tecidos, identificadas como líquidos intersticiais, cadeias protéicas organizadas em fibras colágenas e musculares, vasos e estruturas nucleares de células. As estruturas celulares foram identificadas através da morfologia nuclear e os linfócitos mononucleares foram agrupados para serem utilizados como indicadores representativos da atividade proliferativa. Estabelecidas as tabelas de padrões dessas estruturas, passou-se a quantificá-las em aumentos de 100 e 400 vezes, para precisar os aspectos quantitativos e qualitativos e suas respectivas relações percentuais. Deve-se enfatizar que todas as estruturas observadas nas imagens puderam ser quantificadas, sendo expressas em valores percentuais. Esses resultados foram comparados com os obtidos pelos métodos clássicos de semiquantificação subjetiva feita por dois patologistas que, independentemente, examinaram os mesmos cortes histológicos e classificaram as estruturas observadas por intermédio de uma gradação de valores correspondentes às alterações ausentes, leves, moderadas e intensas. Os pesquisadores puderam concluir que o método de análise de variáveis histométricas por processamento de imagens computacional mostrou-se eficiente e poderoso na quantificação das principais variáveis teciduais envolvidas em processos inflamatórios e reparativos.

Park *et al* (1998) utilizaram AI associada a RNA para o reconhecimento e classificação de carcaças. Foram utilizadas diferentes categorias de carcaças condenadas (com septicemia, com traumatismos, com tumores, com aerossaculite, ascite e leucose), 91 carcaças foram testadas (70 com lesão e 21 sadias), obtendo-se as características das imagens (intensidade de reflectância), as quais foram significativamente diferentes entre

as categorias de carcaças. As RNA foram treinadas e obtiveram níveis de acertos classificatórios iguais ou maiores a 90%.

Chao *et al* (2002) testaram a inspeção através de visão mecânica na linha de abate. Assim como no trabalho citado anteriormente, os pesquisadores utilizaram a caracterização espectral das carcaças. Cerca de 1.400 carcaças foram utilizadas para a construção do modelo de classificação, 700 amostras sadias e 700 com alterações de aspecto. Para o teste na linha de abate foram utilizadas 12.432 amostras sadias e 759 amostras com alterações de aspecto. Com os dados obtidos RNAs foram treinadas para a classificação das carcaças em um ou em outro grupo. Os pesquisadores chegaram a resultados de 95% de classificação para as carcaças sadias e de 80% para as que possuíam alterações de aspecto.

A espectroscopia foi utilizada por Dey *et al* (2003) para a detecção de septicemia em galinhas, a partir do estudo dos fígados das aves. Foram avaliadas 300 amostras de fígado (150 sadios e 150 condenados por septicemia). As amostras foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, isolamento bacteriano, exame histopatológico e obtiveram-se os valores de media espectral. RNAs foram treinadas e 96% das amostras foram corretamente classificadas nas categorias sadia ou septicêmica.

Yang *et al* (2005) desenvolveram um algoritmo de processamento de imagem para a diferenciação de carcaças sadias e condenadas. Os pesquisadores estudaram 175 carcaças sadias, 170 condenadas por septicemia e 70 com lesões caracterizadas como processo inflamatório (oriundo de onfalite). Foram estabelecidas regiões de interesse (somente na região ventral e entre as pernas) e seus valores espectrais obtidos. Com os dados foram treinadas RNAs, que classificaram corretamente 89,6% das amostras sadias, 92,3% das amostras com processo inflamatório e 94,4% das que apresentavam septicemia.

Em semelhança aos trabalhos supracitados, pode-se listar ainda o trabalho de Qiao *et al* (2007), que estudaram a predição das propriedades mecânicas dos *nuggets* de frango fritos, através da análise de imagem e RNA, o trabalho de Lu *et al* (2000) que utilizaram o processamento de imagem e RNAs para a avaliação da coloração de cortes de carne suína; a pesquisa de Faucitano *et al* (2005) que avaliou as características de

marmoreio de carne suína através de análise de imagem e o trabalho de Li *et al* (1999) que utilizaram as características de textura da imagem como indicador de maciez de carne bovina.

Inúmeros trabalhos são encontrados utilizando a análise e o processamento de imagem em diversas áreas. No entanto, existe uma carência bastante evidente de artigos na área específica desta tese, fato este que limita a citação de outras pesquisas utilizando técnicas próximas à que foi testada neste trabalho e em áreas pouco afins a esta especialidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo diminuir a subjetividade na avaliação de perda linfocitária da bolsa de Fabricius.

3.2 Objetivos Específicos

- Gerar uma nova metodologia para a determinação do grau de depleção linfocitária, a qual seja plenamente reprodutível e robusta, onde o erro classificatório seja informado.
- Utilizar a análise digital para a obtenção das características das imagens dos folículos linfóides;
- Com dados obtidos pela análise digital de imagem, treinar Redes Neurais Artificiais para determinar os escores histopatológicos das Bolsas de Fabricius.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de BF

Foram utilizadas cinquenta amostras de BF oriundas do experimento realizado por Moraes *et al* (2004). Estas amostras foram obtidas intactas – sem a abertura do órgão – e acondicionadas individualmente em frascos contendo solução tamponada de formalina a 10%.

4.2 Preparação dos Cortes Histológicos

Após a fixação, as amostras de BF foram cortadas transversalmente na porção de maior circunferência – porção equatorial – com a finalidade de obter-se a maior área de observação. Os órgãos foram desidratados, clarificados em xileno, impregnados com parafina, cortados com 5µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina, segundo Luna (1968).

4.3 Avaliação Histopatológica das Lâminas

As lâminas foram avaliadas através do método convencional subjetivo – óptico – quanto ao grau de depleção linfóide do órgão, recebendo escores de depleção linfocitária adaptados de Muskett *et al* (1979), conforme mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Intervalos de depleção linfóide para cada escore de depleção linfocitária, através da avaliação óptica subjetiva.

Escores	Percentual de depleção linfóide
Escore 1	Menos de 25% de depleção linfocitária
Escore 2	Entre 25 e 50% de depleção linfocitária
Escore 3	Entre 50 e 75% de depleção linfocitária
Escore 4	Entre 75 e 90% de depleção linfocitária
Escore 5	Mais de 90% de depleção linfocitária

Todas as lâminas foram avaliadas pelo autor em ordem aleatória e repetida a leitura por três vezes – em dias distintos. O escore de depleção linfocitária de cada BF

foi estabelecido como a média dos escores obtidos em cada uma das avaliações de cada amostra.

4.4 Obtenção das Imagens

Foram selecionadas, ao acaso, 10 amostras de BF de cada escore de depleção linfóide – totalizando 50 BF – para a obtenção das imagens. As BF foram divididas em quadrantes e três folículos selecionados por quadrante. Foram selecionados os folículos que possuíam o mesmo escore óptico médio da BF e que possuísem o menor número de artefatos possível. Os quadrantes foram numerados em sentido horário (de 1 a 4) e todos os folículos numerados em ordem crescente (de 1 a 12), conforme a Figura 1.

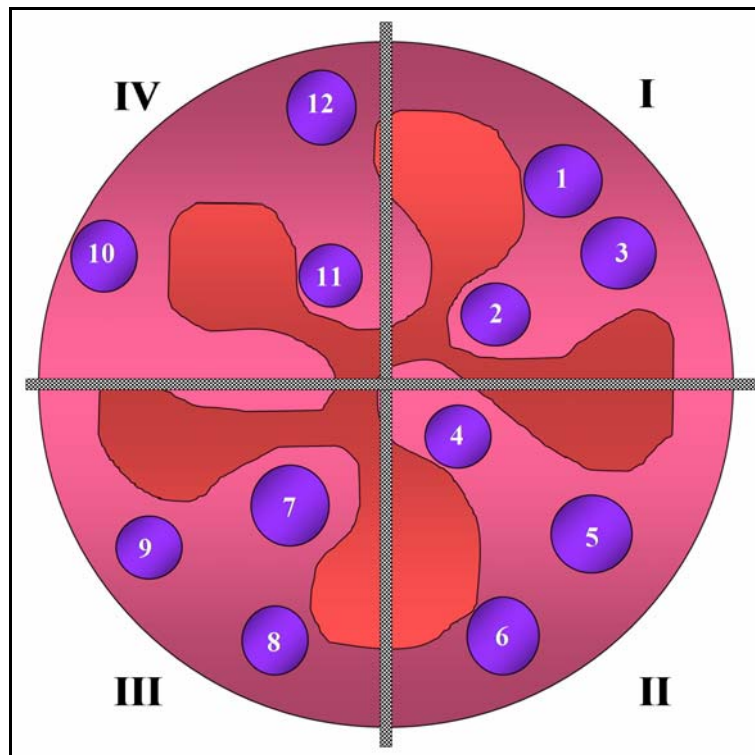


Figura 1 – Imagem ilustrativa da divisão da BF em quadrantes e da numeração dos folículos selecionados.

As imagens foram obtidas através de fotomicrografia digital utilizando uma câmera OLYMPUS® C-7070 acoplada a um microscópio trinocular OLYMPUS® CX40, sendo sacadas com uma magnificação de 200X e com uma definição de 3072x2304 (Figura 2).

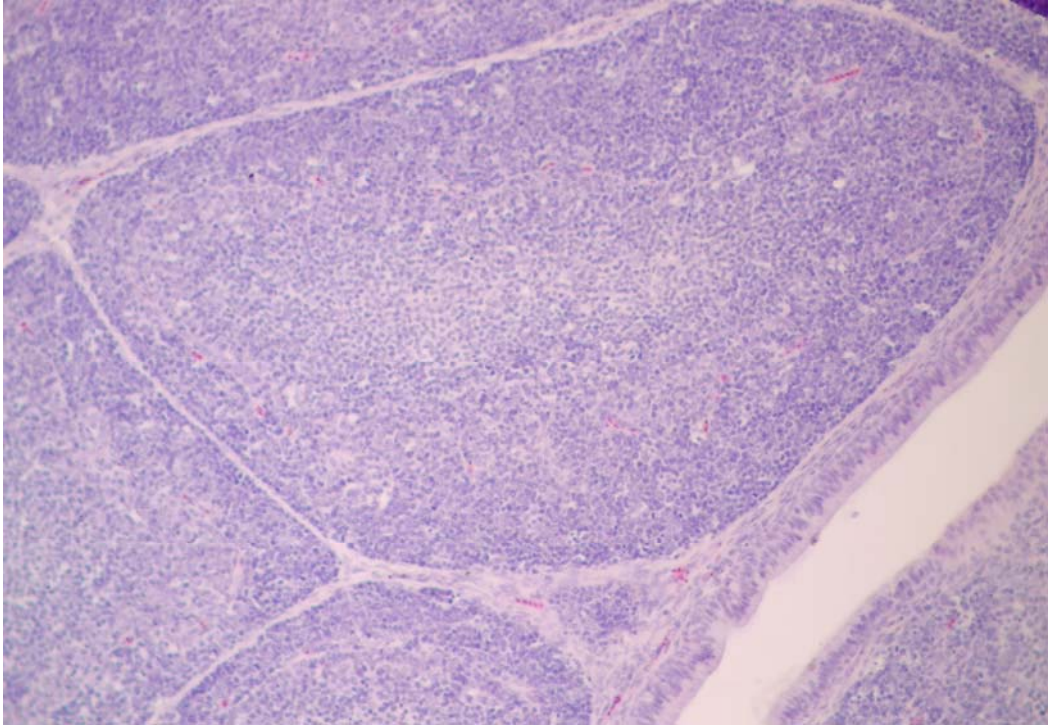


Figura 2 – Imagem de um folículo linfóide selecionado (H&E, 200X)

4.5 Análise das Imagens

O programa utilizado para o processamento e a análise das imagens foi o MATLAB[®] 6.5-MATHWORKS.

4.5.1 Obtenção dos Valores do Número de *Pixels*/Escala de Cinza das Imagens

Os valores do número de *pixels* / escala de cinza foram obtidos de acordo com a seqüência que segue:

1. As imagens foram convertidas para a escala de 256 tons de cinza (Figura 3);
2. A área folicular foi selecionada, imediatamente adjacente ao tecido conjuntivo interfolicular (Figura 4);
3. As imagens foram segmentadas (Figura 5);
4. Os histogramas (número de *pixels* / escala de cinza) das imagens foram obtidos (Figura 6);
5. Os valores dos histogramas foram exportados para uma tabela de *Micfrosoft –Excel* para o cálculo dos seus elementos.

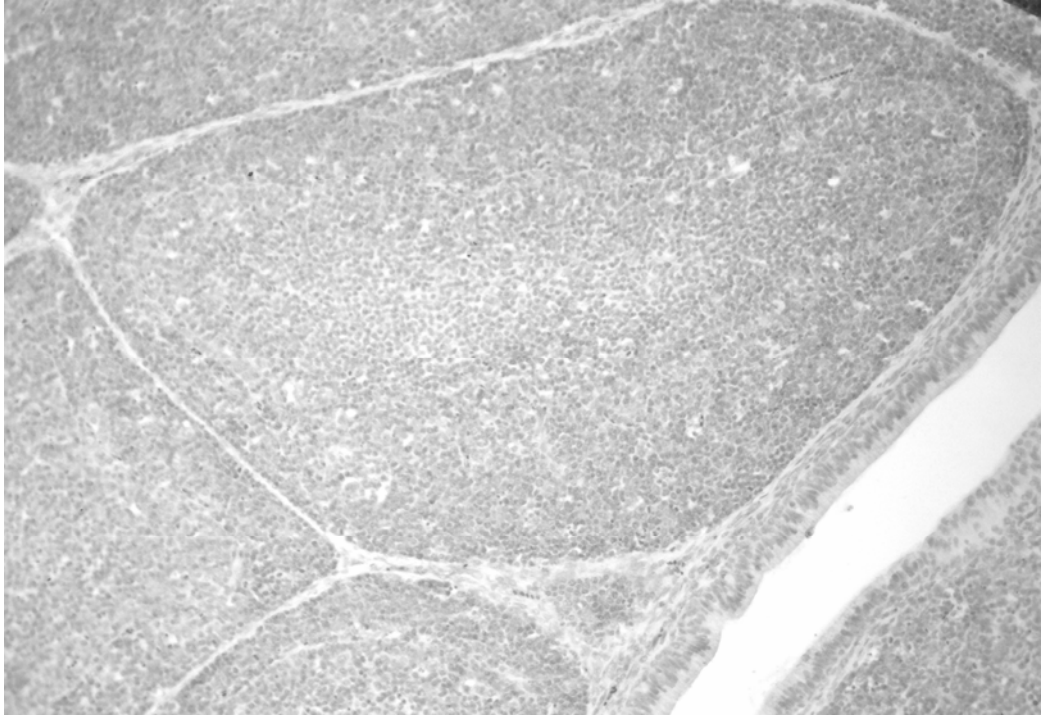


Figura 3 – Imagem em escala de cinza do folículo selecionado (200X)

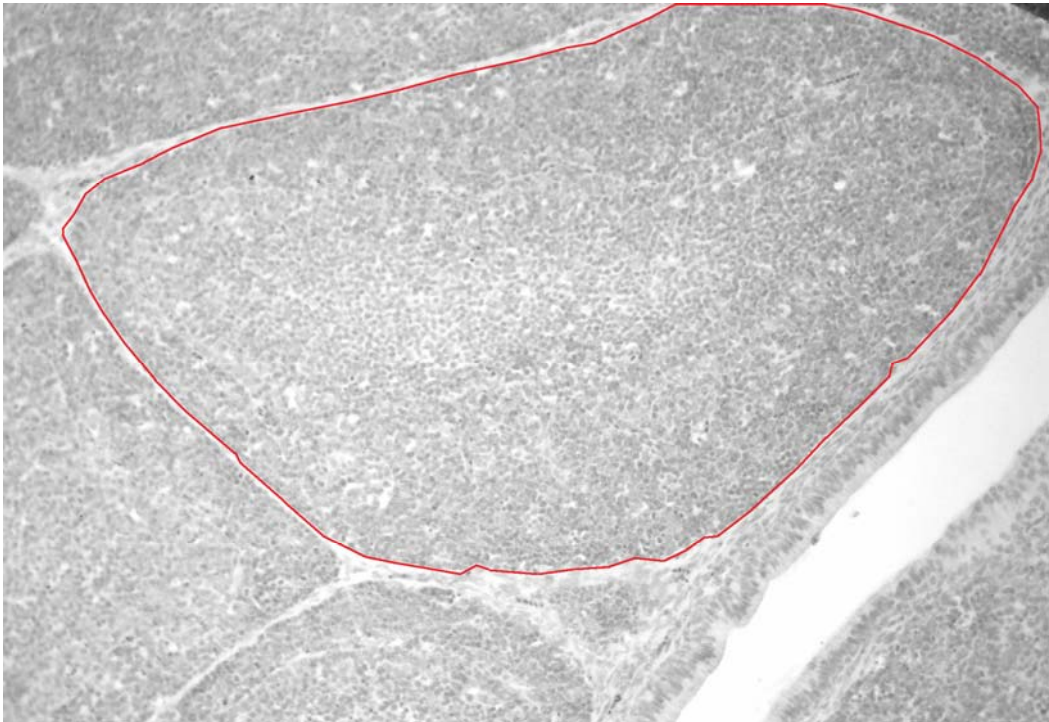


Figura 4 – Seleção da área folicular (200X)



Figura 5 – Segmentação da imagem (200X)

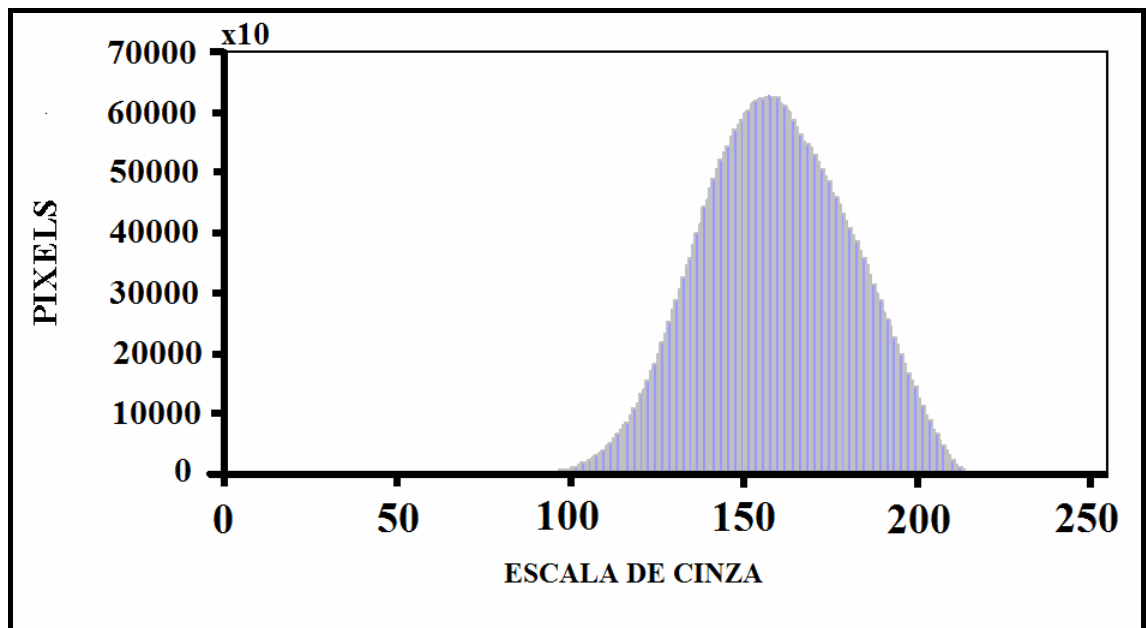


Figura 6 – Histograma da imagem (pixels / escala de cinza), onde 0 representa o preto absoluto e 256 o branco absoluto.

4.5.2 Obtenção dos Valores dos Elementos Observados no Histograma

Os cálculos dos elementos observados nos histogramas estão descritos nos itens abaixo e representados esquematicamente na Figura 7.

4.5.2.1 Obtenção do Índice Maior (IM)

O Índice Maior é o ponto da escala de cinza que abriga o maior número de *pixels*. O Índice Maior é medido no eixo X.

4.5.2.2. Obtenção do Ponto Maior (PM)

O Ponto Maior é o valor máximo de *pixels* presente em um gradiente de cinza. Ou seja, é o ponto medido no eixo Y correspondente ao Índice Maior.

4.5.2.3 Cálculo da Área Esquerda (AE)

A área esquerda é o percentual de área do gráfico à esquerda do IM. A AE é calculada de acordo com a fórmula que segue:

$$\frac{\sum \text{pixels de 0 a IM-1}}{\text{Total de pixels}} \times 100$$

4.5.2.4 Cálculo da Área Direita (AD)

A Área Direita é o percentual de área do gráfico à direita do IM. A AD é calculada de acordo com a fórmula que segue:

$$\frac{\sum \text{pixels de IM+1 a 256}}{\text{Total de pixels}} \times 100$$

4.5.2.5 Cálculo da Área Ponto (AP)

A Área Ponto é o pequeno percentual de área que o IM ocupa dentro do histograma. A AP é calculada de acordo com a fórmula que segue:

$$\frac{\text{PM}}{\text{Total de pixels}} \times 100$$

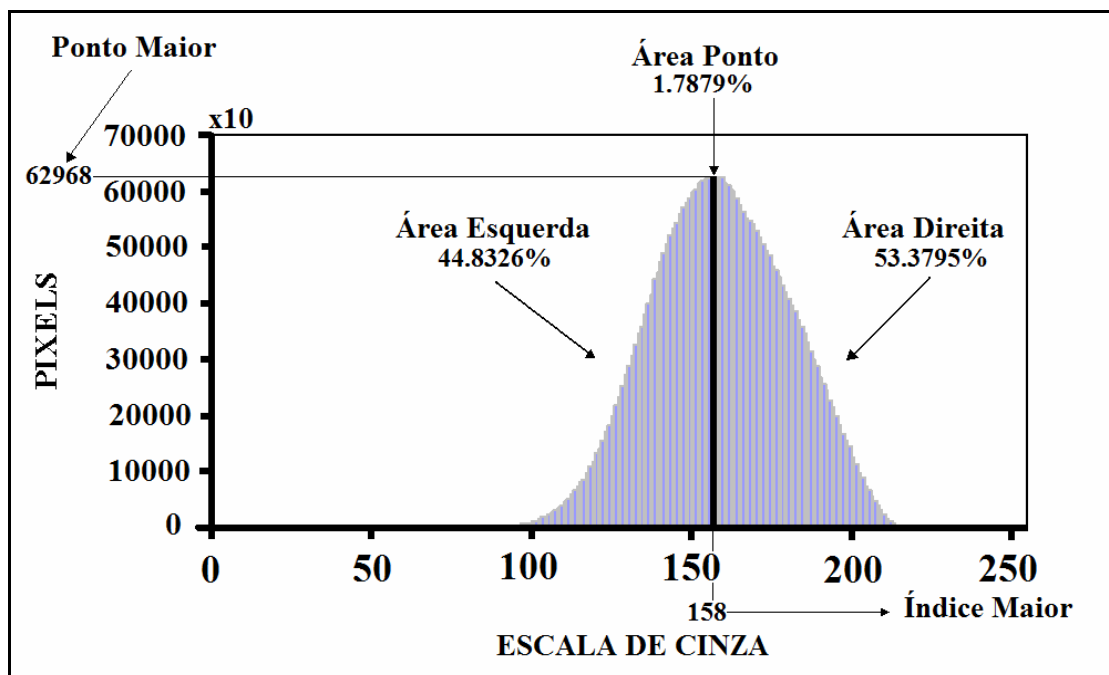


Figura 7 – Representação esquemática dos elementos avaliados nos histogramas de imagem.

4.6 Análise Estatística

As variáveis foram analisadas através do teste da ANOVA, para a classificação em cinco e três escores, e do Teste *T-Student* foi utilizado para a análise da classificação em dois escores apenas.

4.6.1 Análise Estatística dos Caracteres do Histograma para os Cinco Escores

Os valores obtidos dos itens dos histogramas (IM, PM, AE, AD e AP) foram analisados individualmente para os cinco escores de depleção linfocitária, estes obtidos através da análise convencional.

4.6.2 Análise Estatística dos Caracteres do Histograma para os Três Escores

Foram formados três escores de lesão através do agrupamento dos escores 1 e 2, formando o escore 1a, e dos escores 4 e 5 para formar o escore 5a. O escore 3 permaneceu inalterado, contudo foi renomeado para 3a.

4.6.3 Análise Estatística dos Caracteres do Histograma para os Dois Escores

Foram criadas apenas duas categorias, a 1b formada pelo agrupamento dos escores 1 e 2, e a 5b, formada através da fusão dos escores 3, 4 e 5.

4.7 Redes Neurais Artificiais (RNA)

Com os valores obtidos dos itens observados nos histogramas, foram treinadas RNAs para o reconhecimento e classificação dos folículos em diferentes escores digitais de depleção linfocitária (NEUROHELL[®] CLASSIFIER). Os itens do histograma (IM, PM, AE, AD e AP) foram utilizados como variáveis de entrada e os escores ópticos de depleção linfocitária como variáveis de saída.

4.7.1 Redes Neurais Artificiais com Cinco Escores de Classificação

Como variáveis de entrada utilizaram-se os itens dos histogramas e como saída, os cinco escores ópticos de classificação de depleção linfocitária.

4.7.2 Redes Neurais Artificiais com Três Escores de Classificação

Foram agrupados os valores de saída em três escores. Os escores 1 e 2 foram fundidos para formar o escore 1a, as categorias 4 e 5 para formar o escore 5a e o escore 3 permaneceu inalterado, no entanto foi chamado de 3a.

4.7.3 Redes Neurais Artificiais com Dois Escores de Classificação

Foram criadas apenas duas categorias como variáveis de saída. Estas categorias tiveram origem com a união dos escores 1 e 2 para formar o escore 1b, e a fusão dos escores 3, 4 e 5 para formar o escore 5b.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Estatística

5.1.1 Resultado da Análise Estatística utilizando os Cinco Escores de Lesão

As características da imagem foram comparadas entre cinco distintos escores ópticos de depleção, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios das características dos histogramas de acordo com os escores ópticos de lesão.

Escore	AE	AD	AP	IM	PM
1	42,397271 ^a	55,260504 ^a	2,3839248 ^a	163,24074 ^a	43296,278 ^a
2	53,520996 ^b	43,706608 ^b	2,9293102 ^{bc}	170,68333 ^b	51913,883 ^b
3	56,740209 ^b	40,512027 ^c	2,7592750 ^c	178,15000 ^c	29835,242 ^c
4	60,016713 ^{bc}	36,535778 ^d	2,5365956 ^{ac}	190,25000 ^d	18737,917 ^d
5	60,301481 ^c	35,454362 ^d	3,1861043 ^b	183,97500 ^d	34043,733 ^e

p<0,0001

Letras distintas na coluna indicam diferença significativa.

AE – área esquerda; AD – área direita; AP – área ponto; IM – índice maior e PM - ponto maior.

Para área esquerda houve diferença entre os escores 1, 2 e 5, não havendo entre 2, 3 e 4 e entre 4 e 5. A área direita mostrou diferença entre 1, 2 e 3, não havendo entre 4 e 5. Para área ponto não houve diferença entre os escores 1 e 4, e 2 e 5. O escore 3 também não se diferenciou das categorias 2 e 4. Não foram observadas diferenças entre os escores 4 e 5 para o índice maior, no entanto foi encontrada para todos os outros (1, 2 e 3). O ponto maior mostrou diferença significativa para todos os escores.

5.1.2 Resultado da Análise Estatística utilizando Três Escores de Lesão

A Tabela 3 mostra a análise para o agrupamento em três escores, conforme descrito anteriormente.

Tabela 3 – Valores médios das características dos histogramas para a utilização de três escores ópticos de lesão.

Escore	AE	AD	AP	IM	PM
1a	46,370030 ^a	51,134112 ^a	2,5787053 ^a	165,89881 ^a	46373,994 ^a
3a	56,740209 ^b	40,512027 ^b	2,7592750 ^a	178,15000 ^b	32652,295 ^b
5a	60,275593 ^c	36,437468 ^c	3,1270580 ^b	184,54545 ^c	29835,242 ^b

p<0,0001

Letras distintas na coluna indicam diferença significativa.

AE – área esquerda; AD – área direita; AP – área ponto; IM – índice maior e PM - ponto maior.

Para AE, AD e IM, houve diferença significativa para as três categorias de lesão. No entanto, para área ponto não existiu diferença entre os escores 1a e 3a, estes se diferenciando de 5a. Para PM não existiu diferença entre os escores 3a e 5a, ambos se diferenciando do escore 1a.

5.1.3 Resultado da Análise Estatística utilizando apenas Dois Escores de Lesão

O resultado da classificação utilizando apenas dois escores mostrou diferença significativa entre todos os escores para todas as características da imagem, conforme ilustra a Tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios das características dos histogramas para a utilização de dois escores ópticos de lesão.

Escore	AE	AD	AP	IM	PM
1b	46,3700 ^a	51,1341 ^a	2,57871 ^a	165,899 ^a	46374,0 ^a
5b	58,5921 ^b	38,3777 ^b	2,95192 ^b	181,500 ^b	31310,8 ^b

p<0,0001

Letras distintas na coluna indicam diferença significativa.

AE – área esquerda; AD – área direita; AP – área ponto; IM – índice maior e PM - ponto maior.

5.2 Redes Neurais Artificiais

5.2.1 Resultados das Redes Neurais Artificiais utilizando Cinco Escores Classificatórios

Os resultados da classificação dos folículos utilizando-se cinco escores classificatórios estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Relação entre a classificação dos folículos utilizando cinco categorias de Escore Digital e os Escores Óptico.

	EO1	EO2	EO3	EO4	EO5	Total
ED1	97	26	19	1	3	146
ED2	9	67	5	0	4	85
ED3	1	10	53	20	34	118
ED4	0	0	11	84	17	112
ED5	1	17	32	15	62	127
Total	108*	120	120	120	120	588
Sensibilidade(%)	89,81	55,83	44,17	70,00	51,67	
Especificidade(%)	89,79	96,17	86,11	94,02	88,11	

EO – escore óptico e ED – escore digital.

* Houve a exclusão de 12 amostras devido a presença de artefatos que impediram a obtenção de imagens adequadas.

A priori observa-se uma especificidade alta para todas as categorias de escores – variando de 86, 11 a 96,17%. No entanto, uma alta sensibilidade é observada apenas nos escores 1 e 4, 89,81% e 70,0% respectivamente.

Para o escore 1 a sensibilidade e a especificidade são altas, classificando corretamente 97 folículos. Foram classificados equivocadamente 11 folículos, sendo nove alocados no ED2 e os restantes nos ED3 e ED5.

Na categoria 2 o programa classifica corretamente 67 folículos (55,83%); contudo, 26 amostras são classificadas como ED1 (21,6%), outras 17 como ED5 (14,16%) e as 10 amostras restantes classificadas como ED3 (8,33%).

O MATLAB[®] classifica 53 folículos corretamente como pertencentes ao ED3 (44,17%), distribuindo 19 folículos para o ED1 (15,83%), cinco folículos para ED2 (4,16%), 11 para o ED4 (9,16%) e 32 para o ED5 (26,66%).

A maioria das amostras do escore 4 é classificada de forma adequada (70,0%). Entretanto, o restante dos folículos são distribuídos, quase de forma equivalente entre os ED3 (16,66%) e ED5 (12,5%).

O escore cinco classifica a maioria corretamente (51,66%). Os demais folículos são distribuídos entre os ED1 (2,5%), ED2 (3,33%), ED3 (28,33%) e o ED4 (14,16%).

5.2.2 Resultados das Redes Neurais Artificiais utilizando Três Escores Classificatórios

A Tabela 6 mostra os resultados das RNAs utilizando como saída apenas três escores classificatórios.

Tabela 6 – Relação entre a classificação dos folículos utilizando três categorias de Escore Digital e os Escores Óptico.

	EO1	EO3	EO5	Total
ED1a	181	14	15	210
ED3a	29	75	68	172
ED5a	18	31	157	206
Total	228	120	240	588
Sensibilidade(%)	79,39	62,50	65,42	
Especificidade(%)	91,94	79,27	85,92	

EO – escore óptico e ED – escore digital.

Os resultados de especificidade são altos apenas para o escore 1 (91,94%) e para o escore 5 (85,92%). A RNA classificou corretamente 79,39% das amostras do escore 1, categorizando 29 folículos como ED3a (12,72%) e os 18 restantes como ED5a (7,89%).

Para o escore 3 a RNA classificou satisfatoriamente 75 folículos (62,5%), categorizando 14 folículos como ED1a (11,66%) e 31 como ED5a (25,83%).

No escore 5 a grande maioria dos folículos foi adequadamente classificada (65,42%), os demais foram distribuídos entre o ED1a (6,25%) e ED3a (28,33%).

5.2.3 Resultados das Redes Neurais Artificiais utilizando Dois Escores Classificatórios

As RNAs utilizadas para a classificação dos folículos em apenas dois escores de lesão comportaram-se conforme o descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Relação entre a classificação dos folículos utilizando duas categorias de Escore Digital e os Escores Óptico.

	EO1	EO5	Total
ED1b	211	35	246
ED5b	17	325	342
Total	228	360	588
Sensibilidade(%)	92,54	90,28	
Especificidade(%)	90,28	92,54	

EO – escore óptico e ED – escore digital.

Com classificação em apenas dois escores obtiveram-se sensibilidades e especificidades acima de 90% para as duas categorias. A RNA categorizou adequadamente 211 folículos no escore 1 (92,54%), sendo que as demais amostras – 17 – foram alocadas como pertencentes ao ED5b (7,46%). Comportamento semelhante foi obtido para o escore 5, pois 325 amostras foram corretamente classificadas e apenas 35 foram categorizadas como ED1b (9,72%).

6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que a análise digital das imagens, através do programa Matlab 6.5[®] e da utilização de RNAs são plenamente aplicáveis à rotina diagnóstica laboratorial, sendo de extrema agilidade e de fácil treinamento, não implicando em alteração no processamento histológico de rotina das amostras (H&E). Estes fatores viabilizam o emprego da avaliação digital da depleção linfocitária, tornando os diagnósticos mais confiáveis.

As RNAs foram bastante eficientes para a classificação das amostras nos cinco escores de lesão, no entanto observou-se uma zona cinzenta para classificação dos escores digitais 2, 3, e 5. Este fato é caracterizado pela não correspondência classificatória entre a avaliação subjetiva e a realizada pela RNA, visto que 26 amostras de EO2 (21,6%) foram alojadas como ED1, provavelmente pelo fato das imagens apresentarem características semelhantes, fato semelhante é observado na avaliação subjetiva tradicional. O EO1 (que varia de 0 a 25% de depleção) e o EO2 (variando de 25 a 50% de depleção) apresentam características histológicas muito próximas, dificultando a classificação subjetiva em um ou em outro escore. Uma vez que a imagem reproduz estas similaridades, a RNA tem igual dificuldade em classificá-los, mas com a fundamental diferença de que na classificação digital o erro é informado.

A dificuldade classificatória é também observada para os folículos de EO3, pois 53 amostras são corretamente avaliadas e 43 distribuídas entre os ED4 e ED5. Esta área nebulosa é observada igualmente para os EO5, que 62 amostras são classificadas corretamente e outras 51 divididas entre os ED3 e ED4. De posse destes dados podemos observar que, em semelhança ao acontecido para a classificação nos ED1 e ED2, a RNA também possui um limbo classificatório para os três maiores escores, visto que os escores de menor grau de lesão pouca importância têm na distribuição dos folículos restantes. Mais uma vez a RNA reproduz a dificuldade do histopatologista pois, salvo o extremo do EO5 (mais de 90% de depleção), os demais escores – “3” e “4” – possuem características muito similares quanto ao grau de depleção (de 50 – 75% para EO3 e de 75 – 90% para o EO4), fato que aumenta a possibilidade de alterações da estimativa do percentual de lesão, já que é feita de forma empírica e pode ser influenciada por

inúmeros fatores externos ao histopatologista, não existindo a padronização do erro, pois este é desconhecido.

A análise estatística convencional também mostra uma tendência em agrupar os elementos da imagem em três (para AE e AP) ou quatro escores de depleção linfóide (para AD e IM).

Com a utilização de RNA esta zona nebulosa se mantém, contudo o erro ganha um caráter objetivo, pois ele é informado e os passos da avaliação são reprodutíveis. Existe assim, uma padronização da leitura das depleções observadas, permitindo que os escores sejam obtidos de forma semelhante, independentemente da experiência do histopatologista, da ordem de leitura das lâminas, ou de outros fatores externos. Este ponto de vista concorda com o dos pesquisadores Stewart-Brown e Trampel (1990), que afirmam que a análise de imagem é uma forma mais objetiva e rápida de avaliar-se a depleção linfóide em BF.

As RNAs alcançaram um maior desempenho quando os folículos foram agrupados em três e em dois escores. Desde a classificação em cinco escores, as RNAs sinalizam no sentido de uma classificação em apenas dois escores, 1 e 5. Fato que biologicamente é explicado, por existirem apenas duas possibilidades, ou a ave está sadia ou está doente. É este critério que a RNA nos informa, existindo uma diferenciação no grau de lesão da BF, mas principalmente se a ave é sadia ou enferma. Na avaliação através do método óptico convencional considera-se uma ave enferma quando a BF é classificada com escore superior a 3 (Pereira, 2002 e Moraes *et al*, 2005). A análise digital também nos fornece esta informação, uma vez que classifica a ave em doente ou sadia, graduando a extensão da lesão e ainda nos mostrando o valor do erro classificatório, o dado mais valioso.

Rocha (2006), estudando índices de patogenicidade (IP) de *Escherichia coli* através da utilização de RNAs, obteve um comportamento semelhante nas redes, uma vez que o IP variava de 0 a 10, a autora chegou a resultados onde a sensibilidade se mostrou muito variável e especificidade bastante alta (acima de 95%). Um dos fatores atribuídos a essa variabilidade da sensibilidade foi à proximidade entre as categorias do IP, fazendo com que a rede classificasse as *E. coli* em categorias próximas à correta. Em

vista disso os IP foram agrupados em três categorias, o que fez a RNA comportar-se de forma mais satisfatória. Contudo, as amostras pertencentes à categoria de patogenicidade intermediária e que não foram corretamente classificadas a rede distribuiu entre a Alta (40%) e a Baixa patogenicidade (60%). A RNA para a classificação em IP mostra, assim como nos ED3 e ED4 de depleção linfóide, que os valores intermediários são classificados nas classes adjacentes à correta, o que reproduz a dificuldade classificatória subjetiva para as categorias intermediárias.

A estatística convencional mostrou uma clara diferença entre os escores, quando estes foram agrupados em três e em dois blocos. Houve diferença significativa para praticamente todas as características da imagem e entre os diferentes escores.

No ano de 1990, os pesquisadores Stewart-Brown e Trampel apresentaram na 39ª *Western Poultry Disease Conference* (Califórnia – EUA), um trabalho utilizando a análise de imagem para a quantificação da depleção linfóide em BF e timo. Aves SPF foram vacinadas com cepa intermediária do vírus de Gumboro aos 28 dias de idade, sendo que amostras de BF e timo foram coletadas aos 6, 14 e 21 dias pós-vacinação. Com 21 dias pós-vacinação as aves foram desafiadas e novas amostras coletadas 4 e 9 dias pós-desafio. Foram realizadas as pesagens das amostras de BF e de timo, sendo determinada a relação entre o peso corporal e o peso de cada um dos órgãos. A área de corte foi determinada por AI e três pregas foram selecionadas ao acaso para a determinação do percentual de bolsa ocupada por linfócitos. A área de cada prega selecionada foi examinada para a avaliação da intensidade de cor associada com linfócitos. O objetivo era determinar a área total e a área ocupada por linfócitos, sendo que o estabelecimento desta relação determinaria o escore de depleção do órgão. Os resultados do estudo não parecem muito claros, visto que o programa de AI utilizado não é informado, tampouco a rotina de processamento das imagens. Também não fica claro se existiu diferença significativa entre as avaliações histopatológicas e os valores obtidos pela AI.

Rachid *et al* (2000), testando a ação apoptótica da toxina T-2, utilizaram a avaliação digital através do programa Kontron Elektronik GMBH – KS 300 V2.0, estabelecendo a relação parênquima:estroma. Porções de BF foram coletadas, sendo oito campos estudados e as áreas do estroma, de parênquima e de espaços vazios

estabelecidas. Os pesquisadores não encontraram diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos. Neste trabalho a rotina de processamento também não é muito clara.

O presente trabalho desenvolveu uma nova metodologia para a avaliação da depleção linfocitária da BF, mostrando que é possível a utilização de análise digital de imagem e de RNA na rotina diagnóstica. O diagnóstico é o maior favorecido, pois a objetividade do resultado gera segurança tanto para o veterinário de campo quanto para o profissional do laboratório, uma vez que a leitura histopatológica – para depleção linfóide – padroniza-se onde quer que seja realizada, permitindo a comparação de resultados gerados em distintas condições estruturais e pessoais.

Buscamos descrever de forma clara e didática a seqüência de processamento e análise das imagens, bem como a relação entre os resultados obtidos com o uso da AI e os oriundos da análise histopatológica convencional.

É importante salientar que a figura do histopatologista permanece indispensável para o correto diagnóstico microscópico, pois as diversas outras alterações precisam ser analisadas e corretamente avaliadas.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

1. Gerou-se uma nova metodologia para a determinação da depleção linfocitária folicular da BF através da utilização de análise digital de imagem e redes neurais artificiais
2. A nova metodologia empregada na análise de imagens da BF foi eficaz para avaliação objetiva de alterações histológicas
3. Com os resultados do processamento de imagens foi possível construir redes neurais artificiais úteis para a classificação objetiva das lesões presentes em escores usados no método convencional;
4. As redes neurais artificiais com dois escores de classificação de lesões mostraram-se mais precisas, quando comparadas àquelas com três e cinco escores;
5. As redes neurais artificiais oferecem ao profissional a medida precisa do erro e do acerto da classificação que realiza;

8 TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho é o primeiro passo para o desenvolvimento de um projeto infinitamente maior. O qual tem por objetivo a avaliação da depleção linfocitária em outros órgãos – timo e baço, a avaliação da integridade das vilosidades intestinais, a determinação da lesão hepática, entre outras alterações.

Estes dados, somando outros tantos de produção, manejo e condenação ao abate, criarão redes neurais artificiais capazes de explicar com muita clareza e robustez os fenômenos avícolas. Assim gerando critérios mais objetivos para a tomada de decisões e para a melhor compreensão deste segmento.

9 BIBLIOGRAFIA CITADA

ABEF em www.abef.com.br, 2008.

Adair, B. M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, v.24, p. 247-255, 2000

Almassy, K.; Kakuk, T. Immunosuppressive Effect of a Naturally Acquired Sub clinical Bursal Agent Infection on Vaccination Against Newcastle Disease, *The Veterinary Record*, London, v. 99, p. 435-437, 1976.

Azevedo-Marques, P. M. Diagnóstico auxiliado por computador na radiologia. *Radiol Bras* v.34 n.5 São Paulo set./out, 2001.

Barnes, H.J. Hemic System. In: Ridell, C. *Avian histopathology*, Tallahassee: Florida, Rose Printing, p. 1-16, 1996.

Brentano, L. Anemia infecciosa das galinhas. *Doença das Aves*, ed. A. Berchieri Jr. & M. Macari, OESP Gráfica, Campinas, São Paulo, Brasil, p. 339-350, 2000.

Chao, K.; Chen, Y.R.; Hruschka, W.R.; Gwozdz, F.B. On-line inspection of poultry carcasses by dual-camera system. *Journal of Food Engineering*, v.52, p.185-192, 2002.

Cheville, N.F. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of the chicken. *American Journal of Pathology*, New York, v.51, p. 527-551, 1967.

Cho, Y.; Edibar, S. A.. Characterization of Infectious Bursal Agent. *Poultry Science*, v. 48, p. 2102-2109, 1969.

Cliford, J. I.; Rees, K. R. Aflatoxin in site of action in the rat liver cell. *Nature*, v.209, p.312-313, 1966.

Coro-Antich, R. M.; Martínez, N. S.; Mejías, T. C.; Valera, A. G.; Domínguez-Álvarez, C. Dermoabrasión con ácido glicólico sobre la piel facial. *Histomorfometria. Congresso Virtual Hispano Americano de Anatomia Patológica*, 2000.

Cosgrove, A.S. An Apparently New Disease of Chickens- Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, Iowa, v. 12, n. 6, p.385-389, 1962.

Cruz, L. C. H. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses. Reflexos na Indústria avícola. In: *Simpósio Internacional sobre micotoxinas e micotoxicoses em aves*, 1995, Curitiba. *Anais*. Curitiba, p.1-13,1995..

Dey, B.P.; Chen, Y.R.; Hsieh, C.; Chan, D.E.. Detection of septicemia in chicken livers by spectroscopy. *Poultry Science*, v.82, p.199-206, 2003.

Doerr, J. A. *et al.* Effects of low levels chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, v.62, p.1971-1977, 1983.

Dobos, S. P.. Peptide Map Comparison of the Proteins of Infectious Bursal Disease Virus. *Journal of Virology*, v. 32, n. 3, p.1046-1050, 1979.

Dohms, J.E.; Jaeger, J. S.. The Effect of Infectious Bursal Disease Virus Infection on Local and Systemic Antibody Responses Following Infection of 3 - Week-Old Broiler Chickens, *Avian Diseases*, Iowa, v. 32, n. 3, p.632-64, 1988.

Fadly, A. M.; Winterfield, R.W.; Olander, H.J.. Role of the Bursa of Fabricius in the Patogenicity of Inclusion Body Hepatitis and Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases*, Iowa, v. 20, n. 3, p 467-477, 1976.

Faucitano, L.; Huff, P.; Teucher, F.; Gariepy, C.; Wegner, J.. Application of computer image analysis to measure pork marbling characteristics. *Meat Science*, v.69, p.537-543, 2005.

Forsström, J. J.; Dalton, K. J.; Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. *Annals of Medicine*, n.5, v.27, p.509-517, 1995.

Giambrone, J. J.; Eidson, C. S.; Page, R. K.; Fletcher, O. J.; Barger, B. O.; Kleven, S. H. Effect Infectious Bursal Agent on the Response of Chickens to Newcastle Disease Marek's Disease Vaccination. *Avian Diseases*, Iowa, v. 20, n.3, p.534-544, 1976.

Hirai, K.; Shimakura, S.; Kawamoto, E.; Taguchi, F.; Kim, S. T.; Chang, C. N.; Iritanly, Y.. The Immunosuppressive Effect of Infectious Bursal Disease Virus in Chickens, *Avian Diseases*, Iowa, v. 18, n. 1, p.50 - 57, 1974.

Hitchner, S. B. Infectivity of Infectious Bursal Disease Virus for Embryonating Eggs. *Poultry Science*, v. 49, p. 511-516, 1970.

Hoerr, F. J. Mycotoxins. *Diseases of Poultry 9ª edição*, ed. B.W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa USA, p. 884-915, 1991.

Hoerr, F.J.. Mycotoxicoses. *Diseases of Poultry 11ª edição*, ed. B.W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa USA, p. 1103-1132, 2003.

Kiessling, K. H.; Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure & Appl. Chem.*, v.58, n.2, p.327-338, 1986.

Kovács, Z. L. *Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações: um texto básico*. 2ª edição, São Paulo: Edição acadêmica, 174p., 1996.

Lazzari, F. A. **Umidade**, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Curitiba:editor, 65 p., 1993.

Lesson, S.; Diaz, G. J.; Summers, J. D. *Poultry metabolic disorders and micotoxins*. [S.I.]: Ghelph, 352 p., 1995.

Li, J.; Tan, J.; Martz, F.A.; Heymann, H.. Image texture features as indicators of beef tenderness. *Meat Science*, v.53, p.17-22, 1999.

Lu, J.; Tan, J.; Shatadal, P.; Gerrard, D. E.. Evaluation of pork color by using computer vision. *Meat Science*, v.56, p.57-60, 2000.

Lukert, P. D.; Saif, Y. M.. Infectious Bursal Disease. *Diseases of Poultry 11^a edição*, ed. B.W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa USA, p. 161-180, 2003.

Luna, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 13 ed.. New York: McGraw-Hill, 258p., 1968.

Moraes, H. L. S.; Salle, C. T. P.; Nascimento, V. P.; Salle, F. O.; Rocha, A. C. G. P.; Souza, G. F.; Furian, T. Q.; Artencio, J. O.. Infectious Bursal Disease: Evaluation of maternal immunity and protection by vaccination of oe-day old chicks against challenge with a very virulent virus isolate. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.7, n.1, p.51-57, 2005.

Moraes, H. L. S.; Salle, C. T. P.; Padilha, A. P.; Nascimento, V. P.; Souza, G. F.; Pereira, R. A.; Artencio, J. O.; Salle, F. O.. Infectious Bursal Disease: Evaluation of pathogenicity of commercial vaccines from Brazil in specific pathogens free chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.6, n.4, p.243-247, 2004.

Müller, H.; Scholtissek, C.; Becht, H.. The genome of Infectious Bursal Disease Virus Consists of Two Segments of Double-Stranded RNA. *Journal Virology*, v. 31, p.581-589, 1979.

Muskett, J. C.; Hopkins, I. G.; Edwards, K. R.; Thornton, D. H.. Comparison of two ineetious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential Hazards in susceptible and maternally immune birds. *The Veterinary Record*, v.104, p.332-334, 1979.

Novelli, M. D.; Barreto, E.; Mattos, D.; Saad, S. S; Borra, R. C. Aplicação do processamento de imagens por computador na quantificação das variáveis histopatológicas da reparação tecidual de anastomoses colocólicas em cães. *Rev. Assoc. Med. Bras.* v.43, n.4, out./dez. 1997.

Okoye, J. O. A.; Okeke, C. N.; Ezeobele, F. K. O.. Effect of Infectious Bursal Disease Virus Infection on the Severity of *Aspergillus flavus*, *Aspergillosis* of Chickens, *Avian Pathology*, v.20, p.167-171, 1991.

Park, B.; Chen, Y. R.; Nguyen, M.. Multispectral image analysis using neural network algorithm for inspection of poultry carcasses. *Journal of Engng. Recherche*, v. 69, p.351-363, 1998.

Patterson, D. S. P. Aflatoxin in farm animals. *Vet. Res. Commum*, v.7, p. 135-145, 1983.

Pattison, M.; Alexander, D. J.; Harkness, J. W.. Purification and Preliminary Characterization of a Pathogenic Strain of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Pathology*, v. 4, p.175-187, 1975.

Pereira, R. A.. Relação entre a população linfocitária bursal e diâmetro de bolsa de Fabricius em frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Dissertação (Mestrado em

Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pinto, P. R.. Utilização de redes neurais artificiais no gerenciamento de matadouros-frigoríficos de aves e suínos no sul do Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pope, C. R.. Lymphoid System Avian histopathology, ed. C. Ridell, Tallahassee: Florida, Rose Printing, p. 17-44, 1996.

Qiao, J.; Wang, N.; Ngadi, M. O.; Kazemi, S.. Predicting mechanical properties of fried chicken nuggets using image processing and neural networks techniques. Journal of Food Engineering, v. 79, p.1065-1070, 2007.

Rachid, M. A.; Vasconcelos, A. C.; Nunes, V. A.. Apoptose na depleção linfocitária induzida pela toxina T-2 em frangos de corte. Histomorfometria da bolsa de Fabricius. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.52, n.6, 2000.

Randall, C. J.; Reece, R. L. Color atlas of avian histopathology. Mosby-Wolfe, Turin, Itália, 232 p., 1996.

Reali, E. H.. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento da produção de frango de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rinaldi, A.; Cessi, D.; Servio, G.; Lodetti, E.. Attenuazione del Virus della Malattia di Gumboro e Prove di Vaccinazione in Laboratorio e in Pratica. Nuova Vet., v. 48, p. 216-223, 1972.

Rocha, A. C. G. P.. Utilização de Inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificação de patogenicidade de amostras de Escherichia coli isoladas de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rosenberger, J. K.; Cloud, J.. The Effects of Age, Route of Exposure, and Coinfection with Infectious Bursal Disease Virus on the Pathogenicity and Transmissibility of Chicken Anemia Agent(CAA). Avian Diseases, v. 33, p.753-759, 1989.

Rosenberger, J. K.; Gelb, Jr. Response to Several Avian Respiratory Viruses as Affected by Infectious Bursal Disease Virus. Avian Diseases, Iowa, v. 22, n.1, p.95-105, 1978.

Rosito, M. A. Caracterização de núcleos celulares no adeno carcinoma priário de reto por análise de imagem digital. Porto Alegre: UFRGS, 2002. Tese (Doutorado em Medicina: Cirurgia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Roush, W. B.; Cravener, T. L.; Kirby, Y. K.; Wideman, R. F.. Probabilistic Neural Network prediction of ascites in broilers based on minimal invasive physiological factors. *Poultry Science*, v.76, p.1513-1516, 1997.

Salle, C.T.P.; Cé, M. C.; Wald, V. B.; Santos, C. H. C.; Nascimento, V. P.; Canal, C. W.; Moraes, H. L. S.; Oliveira, S. D.. Estabelecimento de critérios de interpretação para resultados sorológicos de matrizes de corte através de modelos matemáticos. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.1, n.1, p.61-65, 1999.

Salle, C. T. P.; Guahyba, A. S.; Walld, V. B.; Silva, A. B.; Salle, F. O.; Nascimento, V. P.. Use of artificial neural networks to estimate production variables of broilers breeders in production phase. *British Poultry Science*. London, v. 44, n.2, 2003.

Salle, F. O. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Salle, F. O.; Pinto, P. R.; Martins, S. S.; Moraes, H. L. S. Nascimento, V. P.; Salle, C. T. P.. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil. *Conferencia de Ciência Avícola e Tecnologia*, Apinco, Santos, Brasil, p.170, 2006.

Salle, C. T. P.; Reali, E. H.; Guahyba, A.S.; Salle, F. O.; Rocha, A. C. G. P.; Moraes, H. L. S. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento da produção de frangos de corte. *Anais Conferência APINCO – Prêmio Lamas*. p. 158, 2004.

Schat, K. A.. *Chicken Infectious Anemia. Diseases of Poultry* 11^a edição, ed. B.W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa USA, p. 182-202, 2003.

Smith, J. W.; Hamilton, P. B. Aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Science*, v.49, p.207-215, 1970.

Souza, G. F.. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Stewart-Brown, B.; Trampel, D.W.. Quantitating lymphocyte depletion of thymus and bursa using an image processing technique. *Proceedings of the thirty-ninth western poultry disease conference*. Sacramento, Califórnia: Estados Unidos da América, 1990.

Tatibana & Kaetsu, disponível em www.din.uem.br/ia/neurais, 2004.

Thaxton, P.; Tung, H. T.; Hamilton, P. B. Immonosupession in chickens by aflatoxin. *Poultry Science*, v. 53, p.721-725, 1974.

Wyeth, P. J.; O'brien, J. D. P.; Cullen, G. A.; Improved Performance of Progeny of Broiler Parent Chicken Vaccinated with Infectious Bursal Disease Oil- Emulsion Vaccine, *Avian Diseases, Iowa*, v. 25, n.1, p.228-241, 1981.

Yang, C. C.; Chao, K.; Chen, Y. R.. Development of multispectral image processing algorithm for identification of wholesome, septicemic, and inflammatory process chickens. *Journal of Food Engineering*, v. 69, p.225-234, 2005.

ANEXO – Comprovante do recebimento do artigo.

Avian Pathology - Manuscript ID CAVP-2008-0007

Caixa de entrada | X

★ cavanagh@metronet.co.uk para mim, ctps [mostrar detalhes](#) 16 jan [Responder](#) 

The current (2005; published in 2006) impact factor for Avian Pathology is 1.789. Avian Pathology has the highest impact factor of journals devoted to avian species, and is ranked 6/129 in the Veterinary Sciences category.

16-Jan-2008

Dear Mr. Moraes:

Your manuscript entitled "EVALUATION OF FOLLICULAR LYMPHOID DEPLETION IN THE BURSA OF FABRICIUS: AN ALTERNATIVE METHODOLOGY USING DIGITAL IMAGE ANALYSIS AND ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Avian Pathology.

Your manuscript ID is CAVP-2008-0007.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/cavp> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/cavp>.

Thank you for submitting your manuscript to Avian Pathology.

Sincerely,
Avian Pathology Editorial Office

[Responder](#) [Responder a todos](#) [Encaminhar](#)

APÊNDICE A - Artigo encaminhado para publicação

EVALUATION OF FOLLICULAR LYMPHOID DEPLETION IN THE BURSA OF FABRICIUS: AN ALTERNATIVE METHODOLOGY USING DIGITAL IMAGE ANALYSIS AND ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS.

Lucas Brunelli de Moraes*¹, Fernando Santos Osório², Felipe de Oliveira Salle¹,
Guilherme Fonseca de Souza¹, Hamilton Luiz de Souza Moraes^{1,3}, Luiz Cesar Bello
Fallavena³, Vladimir Pinheiro do Nascimento¹, Carlos Tadeu Pippi Salle*¹.

¹ *Diagnostic and Research in Avian Pathology Center, Federal of Rio Grande of Sul University, Porto Alegre, Brasil,* ² *Vale dos Sinos University, São Leopoldo, Brasil,* ³ *Luterana of Brasil University, Canoas, Brasil.*

Postal address: CDPA-UFRGS, Av.Bento Goncalves, 8824, Porto Alegre-Brazil, Postal Code: 91540-000

E-mail: lucasmoraes@gmail.com and/or ctps@ufrgs.br

Abstract

Ninety one day-old Specific Pathogen Free chicks were allocated in nine groups of ten animals, vaccinated with 3 types of commercial Gumboro vaccines and euthanized at 28 days of age. Bursa of Fabricius (BF) were examined by conventional optical microscopy and digital images analysis (IA) were acquired and processed using MATLAB[®]6.5 software. Artificial Neural Networks (ANN) was generated using NEUROHELL[®] CLASSIFIER software and the optical and digital data were compared. The ANN was able to make a comparable classification of digital and optical scores, ranking correctly the majority of the follicles with sensibility and specificity of 89% and 96%, respectively. These results demonstrate that the use of IA and ANN is a useful tool for the pathological

classification of the BF lymphoid depletion. In addition it provides objective results that allow to measure the dimension of the error in the diagnosis and classification therefore making comparison between databases feasible.

Introduction

The poultry industry is one of the most advanced areas of the agribusiness, where efficient standards are required to increase quality. Ideal sanitary state of each flock is needed in order to improve genetic potential of the eggs and/or poultry production. However, common immunosuppressive diseases may cause significant losses to the industry itself or increase susceptibility to other diseases.

The main immunosuppressive diseases faced by the industry are: (a) Infectious Bursal Disease (IBD) (Luckert & Saif, 2003); (b) Aflatoxicosis, (Hoerr, 2003); (c) Marek Disease (Witter & Schat, 2003) and (d) Infectious Chicken Anemia (Schat, 2003). All these conditions cause a marked lymphoid depletion in the BF, spleen, thymus, liver, proventriculus, intestine and kidneys.

Involvement of the BF occurs in all diseases mentioned above and has an important role in the diagnosis as well as in the monitoring of such conditions. Currently, the evaluation of bursal lymphoid depletion depends on a subjective histological evaluation therefore susceptible to errors. In fact, a lesion score has been reported in order to minimize possible subjective errors (Pereira, 2002; Moraes *et al*, 2004; Moraes *et al*, 2005).

Image Analysis (IA) is a recent tool used in many scientific areas, such as food quality (Li *et al*, 1999; Lu *et al*, 2000; Louka *et al*, 2004; Tan, 2004; Faucitano, 2005; Vestergaard *et al*, 2005; Yang *et al*, 2005; Fernández *et al*, 2005), agriculture (Santos *et al*, 1998; Moreira *et al*, 2004; Throop *et al*, 2005) and as an aid in disease diagnosis (Novelli *et al*, 1997; Azevedo-Maeques, 2001; Rosito, 2002; Babinski *et al* 2002; Tang

& Hanka, 2003). The ANN has been widely used in many scientific areas but presently is under-utilized in the poultry industry and has been scarcely reported in the literature. Salle *et al* (2003) proposed its use for breeders management, in the broiler breeders serological results interpretation (Salle *et al*, 1999), in the management of broiler flocks (Salle *et al*, 2004), hatchery management (Salle *et al*, 2006) and as an aid for evaluation of *Escherichia coli* pathogenicity (Rocha, 2006). The ANN was used further to identify the propensity of chickens to develop Pulmonary Hypertension Syndrome (Roush *et al*, 2001), to evaluate the minimal invasive measurements for early diagnosis of ascites in broilers (Roush *et al*, 1997), for the detection of septicemia chicken livers (Dey *et al*, 2003) and to detect wholesome or unwholesome carcasses in on-line inspection (Chao *et al*, 2002).

In this paper we report the use of IA and ANN techniques to minimize errors that may occur in the conventional optical technology.

Material and methods

Chicks, accommodation and diet

Ninety one day-old Specific Pathogen Free (SPF) chicks were allocated in nine groups of ten animals, kept in isolation boxes according their vaccination group. The boxes were kept in positive pressure rooms with filtered air supply. All the animals were given food and water *ad libitum*.

Vaccination Groups

Three types of commercial Gumboro vaccines were used. The first group was constituted of three vaccines containing intermediary virulent strain (I1, I2, I3). The second group was given 2 intermediary-plus virulent strains (IP1, IP2) and, finally, a third group in which three different hot-strain vaccines (F1, F2, F3) were used. Vaccines were administered using an ocular drop of at 21 days of age . The control group

received saline solution ocular at the same age. All animals were euthanized at 28 days old.

Bursa of Fabricius samples

The BF samples were collected intact and kept in individual vials with 10% buffered formalin.

Histological examination

All BF samples were processed for histological examination following the standard technique (Luna, 1968) and cut at the level of their major diameter in order to obtain the largest observation area.

The slides were first evaluated throughout the conventional subjective method (optical), and the degree of lymphoid depletion scored in a scale from 1 to 5: **Score 1-** < 25% depletion; **Score 2-** 25 to 50% depletion; **Score 3-** 50 to 75% depletion; **Score 4-** 75 to 90% depletion and **Score 5-** > 90% depletion (Muskett *et al*, 1979). The samples were scored 3 times by a single examiner with an interval of one day between examinations.

Image capture

Ten slides of each score were randomly selected for image processing. Each slide was divided in 4 parts and three follicles for each quadrant were selected for examination. The quadrants were numbered clock-wise (I to IV) and the follicles in crescent order (1 to 12) (Fig. 1).

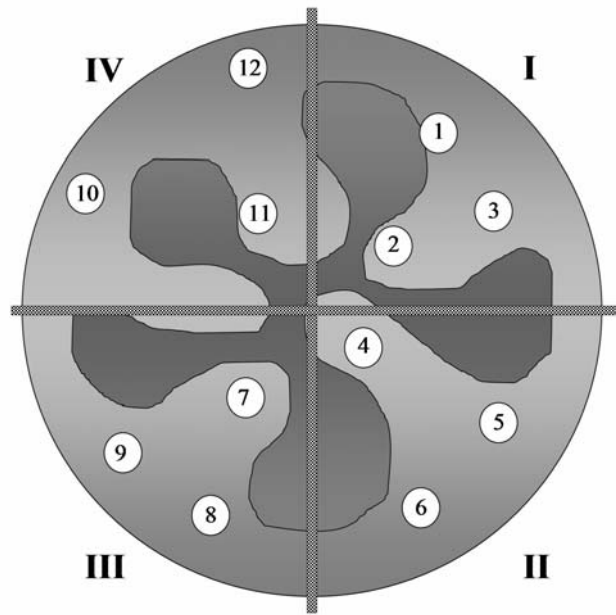


Figure 1- *Image capture in the follicle*

Finally digital photomicrographic images were taken under a 20X magnification with a OLYMPUS® C-7070 camera (Figure 2).

Image analysis

The images were assayed using a MATLAB® 6.5 software according to the following steps: (a) change to gray scale (Fig.2); (b) select the follicular area immediately close to the inter-follicular conjunctive tissue ; (c) all structures around the selected area were rubbed out and the number of pixels for gray scale of each image was estimated (Fig. 3) (d) and the image histograms and table were constructed (Fig. 4).

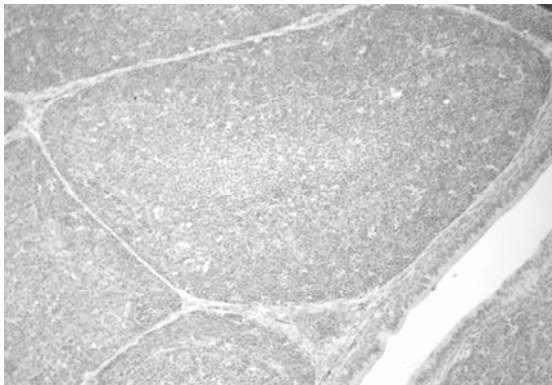


Figure 2 – *Follicle image in gray scale.*

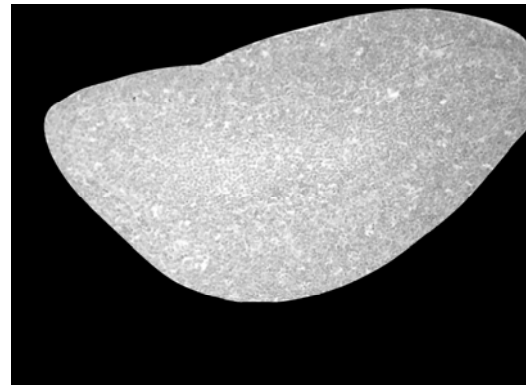


Figure 3– *The follicular area was selected*

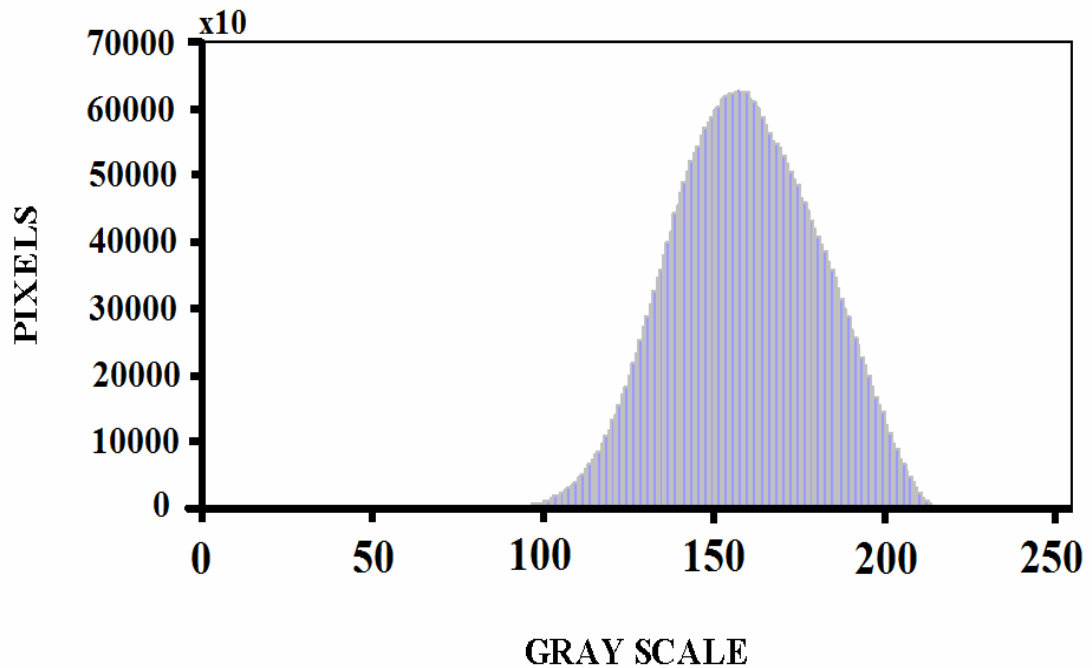


Figure 4 – *Image histogram*

Areas of the histogram were selected and their corresponding data (right and left area, area at the mid-point, midpoint values at X (major index) and Y (higher point) provide the input to construct the ANN (Figure 5). Identification and digital classification of the follicles with different lymphoid depletion scores was performed using the NEUROHELL[®] CLASSIFIER, 2.1, Ward Systems Group, Inc. software. This data was used to train the ANN to obtain a digital score which is compared with the score obtained by optical classification. This procedure is performed for each selected follicle.

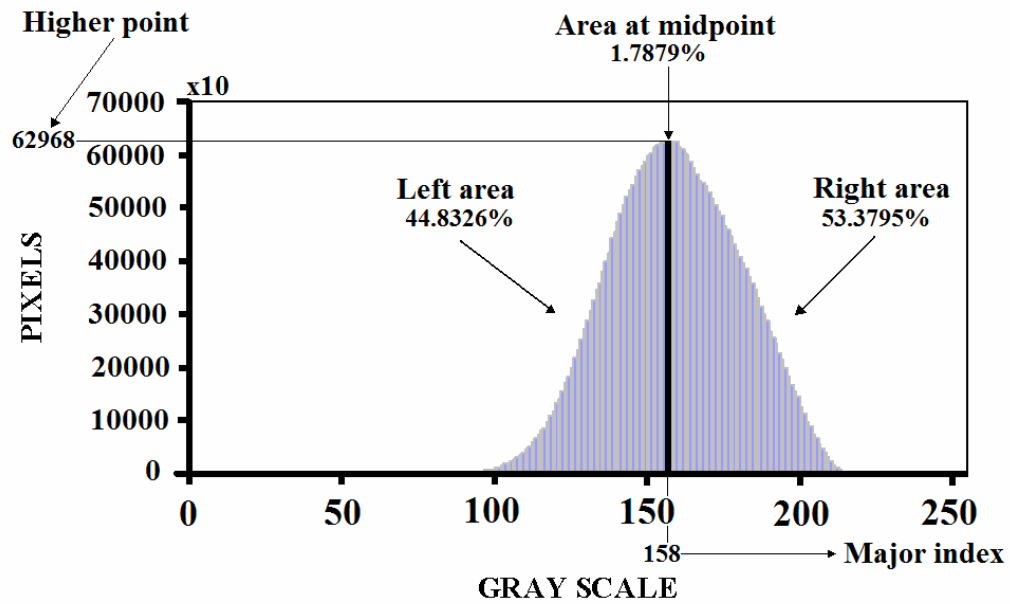


Figure 5 – Example of histogram data selected for ANN input.

Results

The ANN was able to make a comparable classification of digital and optical scores. High sensibility and specificity was found in scores 1 where only nine follicles were misclassified as score 2. It was more difficult to find agreement between ANN and optical classification in more severe cases of depletion and both sensibility and specificity decreased in scores 3, 4 and 5 (Table 1).

Table 1 – Relationship between classification of follicles using Digital Scores (DS) and conventional Optical Scores (OS)

Scores	OS1	OS 2	OS 3	OS 4	OS 5	Total
DS1	97	26	19	1	3	146
DS2	9	67	5	0	4	85
DS3	1	10	53	20	34	118
DS4	0	0	11	84	17	112
DS5	1	17	32	15	62	127
Total	108	120	120	120	120	588
Sensibility (%)	89.81	55.83	44.17	70.00	51.67	
Specificity (%)	89.79	96.17	86.11	94.02	88.11	

In attempt to improve accuracy of the ANN, scores 1 and 2 , 4 and 5, were agglutinated and named 1A and 5A, respectively. Score 3 was maintained intact. In spite of this change the ANN performance remained similar to previous classification, having a “gray” area in score 3 where 31 follicles were misclassified as 5A (Table 2). It is important to point out that the ANN classification changes with regrouping the scores reason why the numbers in Table 2 are different than in table 1, even though the input values are unchanged. The regrouping obliges the ANN to retrain in a new model, reason why the values for 1A and 1B are different despite having unchanged optical and digital findings.

Table 2 – *Follicles classification in three Digital Scores (DS) and the Optical Scores (OS) obtained by the conventional method.*

	OS1A	OS3	OS5A	Total
DS1A	181	14	15	210
DS3	29	75	68	172
DS5A	18	31	157	206
Total	228	120	240	588
Sensibility (%)	79.39	62.5	65.42	
Specificity (%)	91.94	79.27	85.92	

Aiming to improve accuracy of the ANN the follicles were then grouped in a binary fashion, separating the scores of the BF in normal and clearly abnormal. Scores 1 and 2, and scores 3,4 and 5 were agglutinated in score 1B and 5B, respectively. With this alternative the accuracy of the ANN improved significantly with sensibility and specificity higher than 90% (Table 3). Again, as noted above, the values change with regrouping in Table 3 because the ANN retrains in a binary fashion.

Table 3 - *Follicles classification in two scores using Digital Score (DS) and the Optical Scores (OS) obtained by the conventional method*

	OS1B	OS5B	Total
DS1B	211	35	246
DS5B	17	325	342
Total	228	360	588
Sensibility (%)	92.54	90.28	
Specificity (%)	90.28	92.54	

Discussion

The results of this study suggest that the digital image analysis using the MATLAB® 6.5 combined with the ANN is a helpful tool in the diagnosis of follicular lymphoid depletion in BF. One advantage of this methodology is that it does not need special histological techniques, since it can be performed with routine H&E staining. In addition it does not require a sophisticated training to implement the referred protocol. The use of digital imaging reduces the subjectivity of the conventional optical technique and potentially improve the diagnostic accuracy.

The use of ANN showed to be efficient for all digital score lesions with less accuracy in scores 2, 3 and 4. This inconsistency maybe due to the fact that the images for these scores could have similar appearance on routine optical evaluation and is encountered even when experienced pathologists perform their histological assessment.

The optical score 1 and 2 are similar histologically, and often pose difficulties for the pathologist to allocate in one or in the other score. The same difficulty is encountered when ANN methodology is used, but with the advantaged that the “error” (sensibility and specificity) is informed by the software. This difficulty is also seen for the follicles with optical score 3, since only 53 samples (44.17%) were correctly evaluated and 43 (35.83%) were allocated on scores 4 and 5. A similar “cloudy area” is also detected for the optical scores 4 and 5.

The ANN performance improves with grouping of the scores. When the scores are grouped in a binary fashion, simulating a more realistic situation where the animal is either healthy or sick, the ANN accuracy increases significantly. This is reinforced by Pereira (2002) and Moraes *et al* (2004) who suggest that a bird should be considered sick only when BF using optical score is 3 or more. Therefore regrouping the scores in a binary fashion for ANN training does make sense.

The use of ANN to determine the pathogenicity index (PI) for *Escherichia coli*, has been recently reported by Rocha (2006). The author classified the PI in 10 categories and found a variable sensibility but a high specificity (above 95%). Similar to our study, the variability in sensibility was attributed to the number of the PI categories. When the IP was classified in three categories: non virulent, of intermediary pathogenicity and virulent the ANN gave more reliable results.

The results found in this study suggest that the use of digital image analysis and ANN is a helpful tool for routine laboratorial diagnosis of BF histological lesions. The use of ANN allows a more accurate and reliable reading of the histological lymphoid depletion, independent of the operator or laboratory where it is carried out. As the ANN constructs an objective scale the results can be compared from different laboratories and therefore is advantageous when compared to the conventional subjective methodology. For instance, poultry companies with subsidiaries in distinct geographic areas could exchange data related to monitoring programs and elaborate a realistic risk analysis for BF lymphoid depletion.

Finally, it must be emphasized that, although the use of ANN enhances the ability to evaluate BF lymphoid depletion, the presence of a trained pathologist is essential for the differential diagnosis of other conditions.

Conclusions

6. The use of digital images analysis and ANN allows an accurate and reliable and reproducible reading of the histological lymphoid depletion.
7. The use of ANN with scores grouped in a binary fashion improves sensibility and specificity when compared to 3 and 5 score groups

Acknowledgements

The authors would you like to thanks Dr. Luiz Alberto Oliveira Ribeiro (FAVET – Federal of Rio Grande of Sul University) and Dr. João Luiz Pippi Salle (Hospital for Sickkids – Toronto University) for editing the English language and for the suggestion in this manuscript construction.

References

- Azevedo-Marques, P.M. (2001). Diagnóstico auxiliado por computador na radiologia. *Radiologia Brasileira*, 34 (5), 285-293.
- Babinski, M.A., Chagas, M.A., Costa, W.S. & Pereira, J.M. (2002). Morphology and areal fraction of the glandular lumen of transition zone in the human prostate. *Revista Chilena de Anatomia*, 20(3), 255-267.
- Chao, K., Chen, Y.R., Hruschka, W.R. and Gwozdz, F.B. (2002). On-line inspection of poultry carcasses by dual-camera system. *Journal of Food Engineering*, 51, 185-192.
- Dey, B.P., Chen, Y.R., Hsief, C. and Chan, D.E. (2003). Detection of septicemia in chicken livers br spectroscopy. *Poultry Science*, 82, 199-206.
- Faucitano, L., Huff, P., Teucher, F., Garipey, C. & Wegner, J. (2005). Application of computer image analysis to measure pork marbling characteristics. *Meat Science*, 69, 537-543.
- Fernández, L., Castellero, C. & Aguilera, J.M. (2005). An applicaticon of image analysis to dehydration of apple discs. *Journal of Food Engineering*, 67, 185-193.
- Hoerr, F.J. (2003). Mycotoxicoses. In: B.W. Calnek (Ed.) *Diseases of Poultry* 11th edn (pp. 1103-1132). Ames: Iowa State University Press.
- Li, J., Tan, J., Martz, F.A. & Heymann, H. (1999). Image texture features as indicators of beef tenderness. *Meat Science*, 53, 17-22.
- Louka, N., Juhel, F., Fazilleau, V. & Loonis, P. (2004). A novel colorimetry analysis used to compare different drying fish processes. *Food Control*, 15, 327-334.

Lu, J., Tan, J., Shatadal, P. & Gerrard, D.E. (2000). Evaluation of pork color by using computer vision. *Meat Science*, 56, 57-60.

Lukert, P. D. & Saif, Y. M. (2003). Infectious Bursal Disease. In: B.W. Calnek (Ed.) *Diseases of Poultry* 11th edn (pp. 161-179). Ames: Iowa State University Press.

Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P., Nascimento, V.P., Salle, F.O., Rocha, A.C.G.P., Souza, G.F., Furian, T.Q. & Artencio, J.O. (2005). Infectious Bursal Disease: Evaluation of maternal immunity and protection by vaccination of oe-day old chicks against challenge with a very virulent virus isolate. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(1), 51-57.

Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P., Padilha, A.P., Nascimento, V.P., Souza, G.F., Pereira, R.A., Artencio, J.O. & Salle, F.O. (2004). Infectious Bursal Disease: Evaluation of pathogenicity of commercial vaccines from Brazil in specific pathogens free chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6(4), 243-247.

Moreira, M.A., Adami, M. & Rudorff, B.F.T (2004). Análise espectral e temporal da cultura de café em imagens Landsat. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(3), 223-231.

Muskett, J.C., Hopkins, I.G., Edwards, K.R. & Thornton, D.H. (1979). Comparison of two inectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential Hazards in susceptible and maternally immune birds. *The Veterinary Record*, 104, 332-334.

Novelli, M.D., Barreto, E., Matos, D., Saad, S.S & Borra, R.C. (1997). Aplicação de processamento de imagens por computador na quantificação das variáveis histológicas da reparação tecidual de anastomoses colóclicas em cães. *Revista da Associação Médica do Brasil*, 43(4), 277-282.

Pereira, R.A., (2004). Relação entre a população linfocitária bursal e diâmetro de bolsa de Fabrício em frangos de corte. Msc Dissertation, Federal of Rio Grande of Sul University.

Rocha, A.C.G.P (2006). Utilização de Inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. Dr Thesis, Federal of Rio Grande of Sul University.

Roush, W.B., Wideman, R.F., Cahaner, A.Jr., Deeb, N. & Cravener, T.L. (2001). Minimal number of chicken daily growth velocities for Artificial Neural Networks (ANN) detection of Pulmonary Hypertension Syndrome (PHS). *Poultry Science*, 80, 254-259.

Roush, W.B., Cravener, T.L., Kirby, Y.K. & Wideman, R.F. (1997). Probabilistic Neural Network prediction of ascites in broilers based on minimal invasive physiological factors. *Poultry Science*, 76, 1513-1516.

Salle, C.T.P., Cé, M.C., Wald, V.B., Santos, C.H.C., Nascimento, V.P., Canal, C.W., Moraes, H.L.S. & Oliveira, S.D. (1999). Estabelecimento de critérios de interpretação para resultados sorológicos de matrizes de corte através de modelos matemáticos. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 1(1), 61-65.

Salle, C.T.P., Guahyba, A.S., Wald, V.B., Silva, A.B., Salle, F.O. & Nascimento, V.P. (2003). Use of artificial neural networks to estimate production variables of broiler breeders in the production phase. *British Poultry Science*, 44(2), 211-217.

Salle, C.T.P., Reali, E.H., Guahyba, A.S., Salle, F.O., Rocha, A.C.G.P. & Moraes, H.L.S. (2004). Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento da produção de frangos de corte. *Apinco 2004 Conference of Poultry Science and Technology* (p.158). Santos, Brazil.

Salle, F.O., Pinto, P.R., Martins, S.S., Moraes, H.L.S., Nascimento, V.P. & Salle, C.T.P. (2006). Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil. In *Apinco 2006 Conference of Poultry Science and Technology* (p.170). Santos, Brazil.

Santos, J.R., Lacruz, M.S.P., Keil, M., Kux, H.J.H & Xaud, M.R.(1998). Análise de imagem JERS-1 para estimativa de biomassa aérea de florestas tropicais no sudoeste da Amazônia. *Proceedings of the IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto* (p. 11-18). Santos, Brasil.

Schat, K.A. (2003). Chicken Infectious Anemia. In: B.W. Calnek (Ed.) *Diseases of Poultry* 11th edn (pp. 182-202). Ames: Iowa State University Press.

Tan, J. (2004). Meat quality evaluation by computer vision. *Journal of Food Engineering*, 61, 27-35.

Tang, H.L., Hanka, R. & Horase, H.S. (2004). Histological image retrieval based on semantic content analysis. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 7(1), 2003.

Throop, J.A., Aneshansley, D.J., Anger, W. C. & Peterson, D.L.(2005). Quality evaluation of apples based of surface defects: development of an automated inspection system. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 281-290.

Vestergaard, C., Erbou, S.G., Thauland, T., Adler-Nissen, J. & Berg, P. (2005). Salt distribution in dry-cured ham measure by computed tomography an image analysis. *Meat Science*, 69, 9-15.

Yang, C., Chao, K. & Chen, Y. (2005). Development of multispectral image processing algorithms for identification of wholesome, septicemic, and inflammatory process chickens. *Journal of Food Engineering*, 69, 225-234.

Witter, R.L. & Schat, K.A. (2003). Marek's Disease. In: B.W. Calnek (Ed.) *Diseases of Poultry* 11th edn (pp. 407-465). Ames: Iowa State University Press.

APENDICE B – Comandos para o processamento das imagens

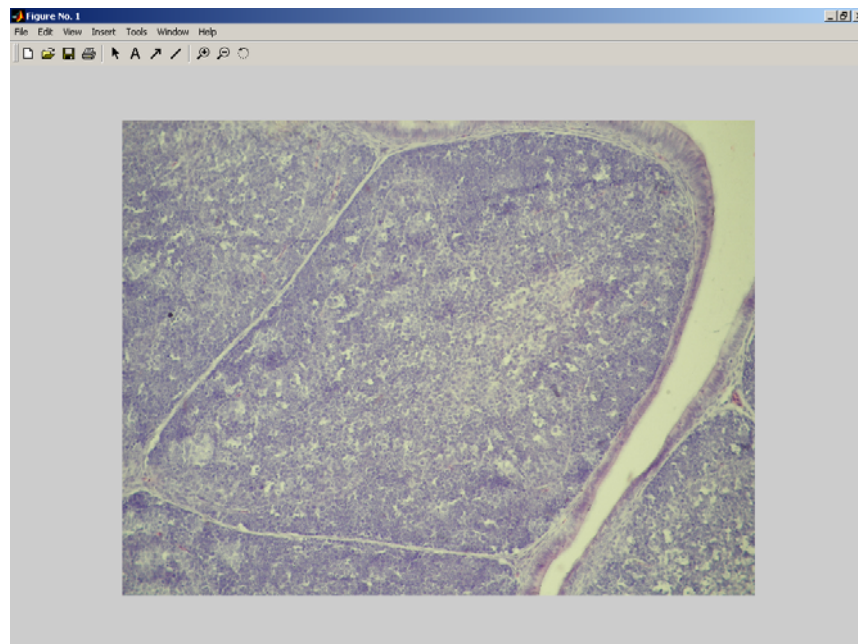
Seqüência de comandos da análise:

Comandos	Função
<code>A=imread('BF.jpg')*</code>	Localiza a imagem
<code>Agray=rgb2gray(A)</code>	Passa a imagem para 256 tons de cinza
<code>imshow(Agray)</code>	Apresenta a imagem cinza
<code>Areg=roipoly(Agray)</code>	Seleciona a ferramenta de corte
<code>imshow(Areg)</code>	Apresenta a máscara
<code>Anew=immultiply(Agray,Areg)</code>	Segmenta a imagem
<code>imshow(Anew)</code>	Apresenta a imagem segmentada
<code>HAnew=imhist(Anew)</code>	Fornece os dados do histograma
<code>Imhist(Anew)</code>	Apresenta o histograma

* - nome da imagem

1. Seleção da imagem:

`A=imread('BF.jpg')`



2. Conversão da imagem para 256 tons de cinza:

Agray=rgb2gray(A)

3. Visualização da imagem Agray:

imshow(Agray)

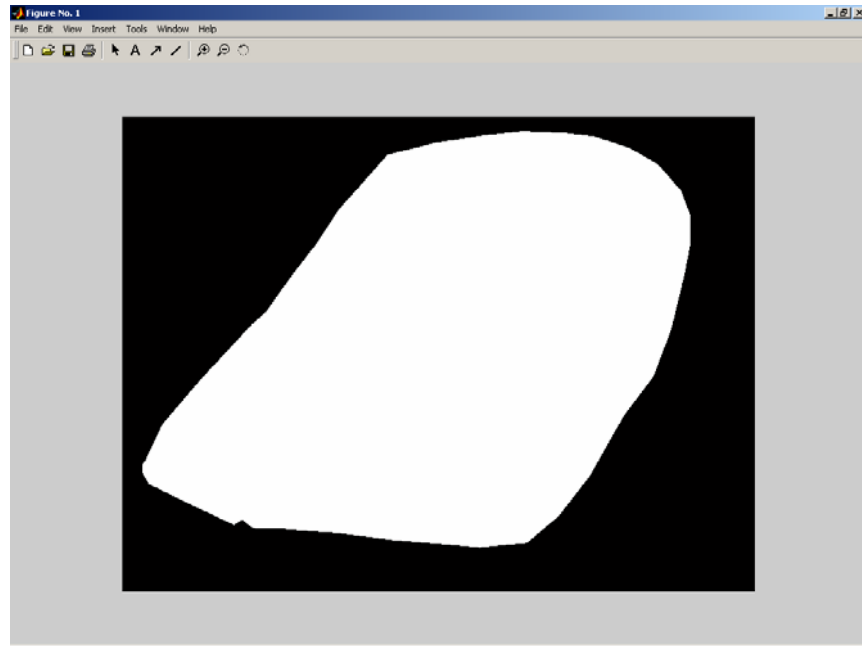


4. Seleciona-se a ferramenta de corte:

Areg=roipoly(Agray)

5. Apresenta a máscara obtida:

imshow(Areg)

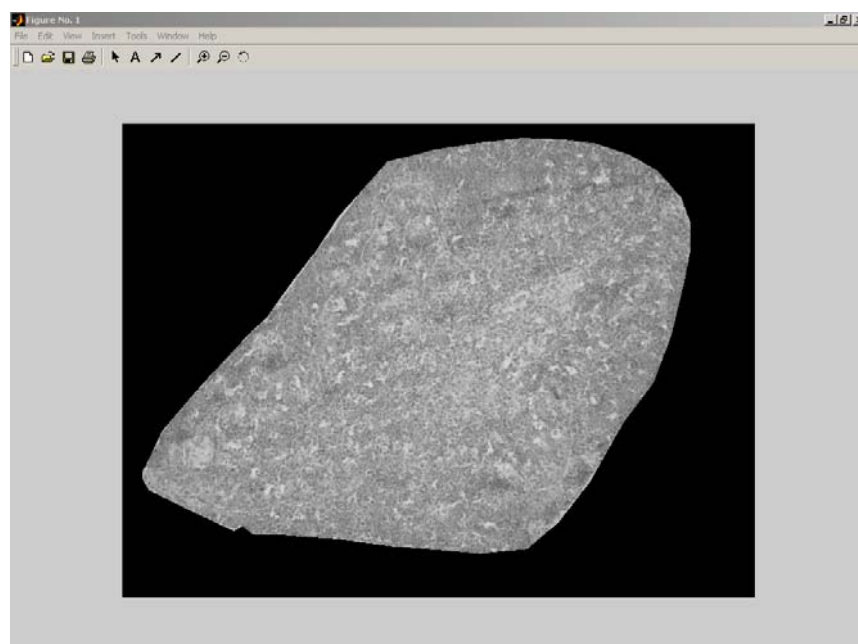


6. Aplica a máscara e segmenta a imagem:

`Anew=immultiply(Agray,Areg)`

7. Apresenta a imagem Anew segmentada:

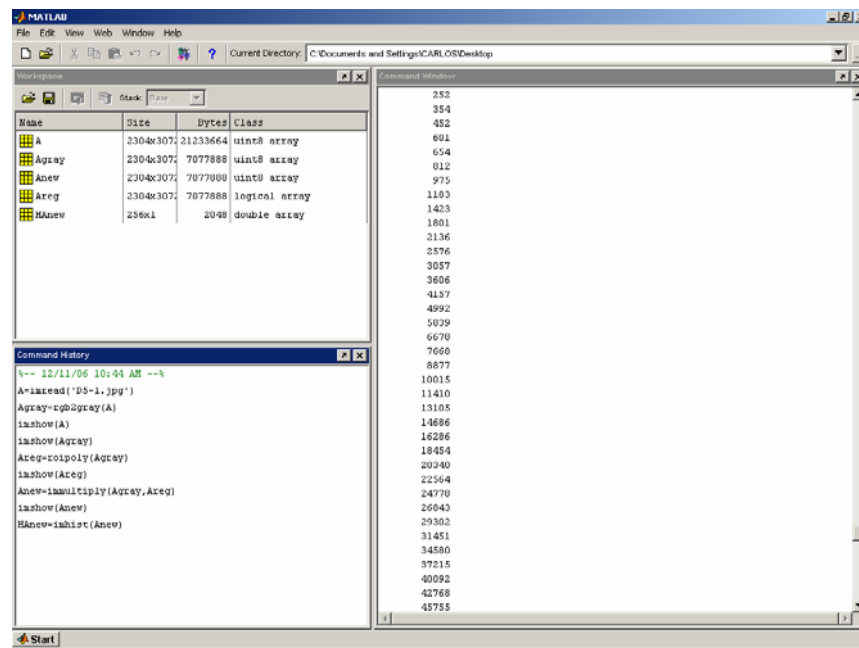
`imshow(Anew)`



8. Fornece os dados do histograma de Anew:

HAnew=imhist(Anew)

9. Apresenta o histograma de Anew:



APENDICE C – Janelas de resultados classificatórios e para a predição do escore de depleção linfóide do folículo.

1. Janela do resultado classificatório para o uso de cinco escores:

C curve						
Agreement Matrix (Contingency Table) Statistics:						
	Actual "1"	Actual "2"	Actual "3"	Actual "4"	Actual "5"	Total
Classified as "1"	95	22	12	0	4	133
Classified as "2"	10	68	6	0	6	90
Classified as "3"	2	7	44	14	21	88
Classified as "4"	1	8	22	91	19	141
Classified as "5"	0	15	36	15	70	136
Total	108	120	120	120	120	588
True-pos. ratio	0,8796	0,5667	0,3667	0,7583	0,5833	
False-pos. ratio	0,0792	0,047	0,094	0,1068	0,141	
True-neg. ratio	0,9208	0,953	0,906	0,8932	0,859	
False-neg. ratio	0,1204	0,4333	0,6333	0,2417	0,4167	
Sensitivity	87,96%	56,67%	36,67%	75,83%	58,33%	
Specificity	92,08%	95,3%	90,6%	89,32%	85,9%	

2. Janela do resultado classificatório para o uso de três escores:

Agreement Matrix (Contingency Table) Statistics:				
	Actual "1"	Actual "3"	Actual "5"	Total
Classified as "1"	214	30	18	262
Classified as "3"	2	5	0	7
Classified as "5"	12	85	222	319
Total	228	120	240	588
True-pos. ratio	0,9386	0,0417	0,925	
False-pos. ratio	0,1333	0,0043	0,2787	
True-neg. ratio	0,8667	0,9957	0,7213	
False-neg. ratio	0,0614	0,9583	0,075	
Sensitivity	93,86%	4,17%	92,5%	
Specificity	86,67%	99,57%	72,13%	

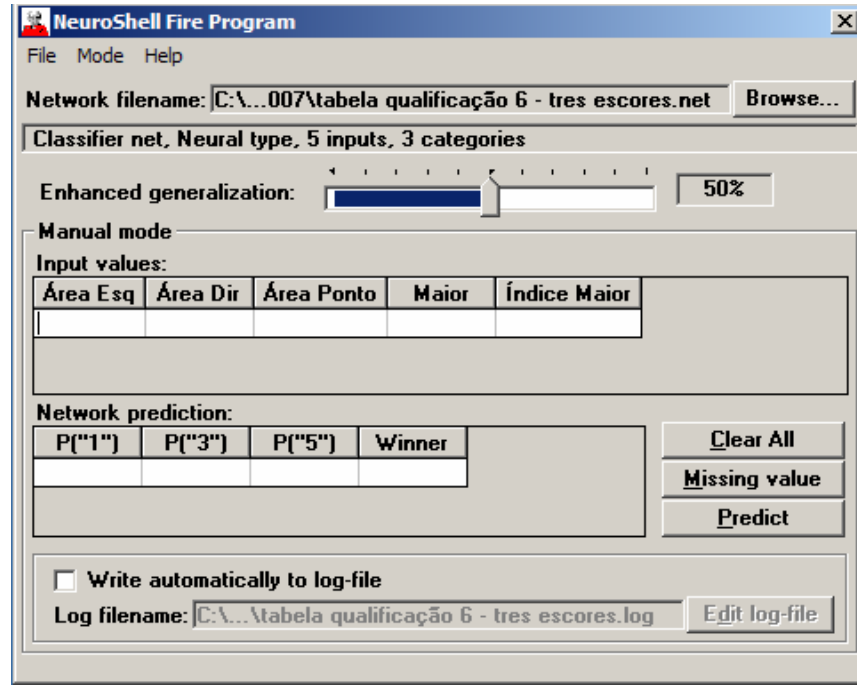
3. Janela do resultado classificatório para o uso de dois escores:

	Actual "1"	Actual "5"	Total
Classified as "1"	188	29	217
Classified as "5"	40	331	371
Total	228	360	588
True-pos. ratio	0,8246	0,9194	
False-pos. ratio	0,0806	0,1754	
True-neg. ratio	0,9194	0,8246	
False-neg. ratio	0,1754	0,0806	
Sensitivity	82,46%	91,94%	
Specificity	91,94%	82,46%	

4. Janela para o resultado de predição do escore de depleção linfóide do folículo com cinco escores:

The screenshot shows the NeuroShell Fire Program interface. The main window title is "NeuroShell Fire Program". The menu bar includes "File", "Mode", and "Help". The "Network filename" field is set to "C:\...07\tabela qualificação 6 cinco escores.net". The classifier is identified as "Classifier net, Neural type, 5 inputs, 5 categories". The "Enhanced generalization" slider is set to 50%. The "Manual mode" section includes an "Input values" table with columns: "Área Esq", "Área Dir", "Área Ponto", "Maior", and "Índice Maior". The "Network prediction" section includes a table with columns: "P('1')", "P('2')", "P('3')", "P('4')", "P('5')", and "Winner". Below the prediction table are buttons for "Clear All", "Missing value", and "Predict". At the bottom, there is a checkbox for "Write automatically to log-file" and a "Log filename" field set to "C:\...tabela qualificação 6 cinco escores.log" with an "Edit log-file" button.

5. Janela para o resultado de predição do escore de depleção linfóide do folículo com três escores:



6. Janela para o resultado de predição do escore de depleção linfóide do folículo com dois escores:

