Automatyczna klasyfikacja komórek rozmazu krwi obwodowej na przykładzie zatrucia ołowiem

Adrian Michalski¹, Bogumiła Kupcewicz¹

¹ Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Automatic classification of peripheral blood smear cells by the example of lead poisoning

The first symptoms caused by heavy metals poisoning are usually non-specific, therefore their diagnosis requires specialized knowledge and experience. Incorrect diagnosis can lead to various disorders and irreversible changes in patient's health. Lead poisoning is one of the heavy metals poisoning which is associated with non-specific symptoms and may cause a broad range of biochemical, physiological and behavioral disfunctions. Lead is commonly found in industry and manufacturing and in 2017, lead poisoning caused over a million deaths worldwide. Due to non-specific symptoms, lead poisoning is often diagnosed too late or incorrectly. Early symptoms are headache and stomachache, which potentiate with metal concentration. Lead poisoning increasing risk of anemia due to inhibition the ability to produce hemoglobin by interfering the heme biosynthesis pathway and decreasing red blood cell survival. Because of regularly occurred disorders of hematopoiesis and the presence of atypical cell in smears, diagnosis of lead poisoning that gives relevant information is bone marrow and peripheral blood smear study. The manual smear test made by qualified technician involves the evaluation of the preparation by using an optical microscope. Manual microscopic examination of blood cells is time-consuming and subjective. Automation of this process would enable to reduce the risk of human failure and solve the problem with lack of professional staff. Traditional machine learning is the most popular approach to automating microscopic smear testing. This method consists of the following stages: microscopic image acquisition, preprocessing, cell segmentation, feature extraction, followed by classification into types, artifacts and atypical cells. This work presents the recent methods proposed to automate the analysis of peripheral blood and bone marrow smears using traditional machine learning methods. A review of different machine learning methods was carried out, focusing on the presentation of an algorithm for the construction of automatic blood cell classifiers.

Keywords: image processing, machine learning, peripheral blood smear analysis, leukocyte classification.

Adres do korespondencji

Adrian Michalski, Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, e-mail: ad.michalski2@gmail.com

Źródła finansowania

Praca została wykonana w ramach realizacji zadania badawczego UPB 415 (Wydział Farmaceutyczny CM UMK w Toruniu).

Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2020.07.06

Zaakceptowano: 2020.07.27

Opublikowano on-line: 2020.07.31

DOI

10.32383/farmpol/125764

ORCID

Adrian Michalski (ORCID id: 0000-0003-0800-5394)

Bogumiła Kupcewicz

(ORCID id: 0000-0002-4480-7338)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Problem

Objawy zatrucia metalami ciężkimi zależą od przyjętej dawki. Jeśli jest ona niewielka, objawy są nieswoiste, takie jak: drażliwość, splątanie, bóle brzucha i głowy [1, 2]. Dla leczenia pacjenta istotna jest szybka, prawidłowa diagnoza i zidentyfikowanie źródła zatrucia. Zatrucie metalami ciężkimi – arsenem, kadmem i ołowiem wiąże się m.in. z zaburzeniami hematologicznymi [3]. Z uwagi na powszechność występowania i częstotliwość zatruc, największym zagrożeniem dla zdrowia pacjenta jest ołów. Wraz ze wzrostem stężenia ołowiu we krwi zwiększa się prawdopodobieństwo i nasilenie niedokrwistości. Ołów uważany jest przez WHO za jeden z dziesięciu najgroźniejszych chemikaliów dla zdrowia publicznego. Źródłem narażenia człowieka i zwierząt na zatrucie ołowiem są produkty mające go w składzie oraz zanieczyszczone przez przemysł środowisko. Do najczęściej wymienianych produktów zawierających ołów zaliczyć można farby, ceramikę, zabawki, biżuterię, tradycyjne kosmetyki i leki. Według Instytutu Metryki Zdrowia i Oceny (*Institute of Health Metrics and Evaluation, IHME*) w 2016 r. zatrucie ołowiem było powodem 5,6% globalnego obciążenia chorobą (ang. *Global Burden of Disease, GBD*) niedokrwinną serca, a w 2017 r. ponad miliona zgonów [4]. Jednym z czynników, które wpływają na powyższe statystyki jest nieswoistość objawów zatrucia i błędna diagnoza. Zatrucie ołowiem w krajach rozwiniętych zdarza się rzadko, objawy są niespecyficzne, dlatego często dochodzi do błędnej diagnozy. Jednym z rutynowych badań, zlecanym dla rozpoznania stanu pacjenta, wykonywanym w laboratorium, jest badanie morfologii krwi. U pacjentów z objawami anemii, którzy narażeni byli na wysokie dawki ołowiu wynik potwierdza stan niedokrwistości [1, 2, 5]. Pomocnym badaniem różnicowym jest analiza rozmazu krwi obwodowej [6]. Badanie wykonywane jest na zlecenie lekarza. Diagnosta laboratoryjny może się zdecydować na wykonanie testu, jeśli w wyniku innych zleconych badań występują istotne nieprawidłowości. Ocena rozmazu krwi jest powszechnie wykonywana tradycyjną metodą mikroskopową. W rozmazie krwi obwodowej widoczne są krwinki czerwone (erytrocyty), krwinki białe (leukocyty) oraz płytki krwi (trombocyty) [7]. W obrazie rozmazu krwi obwodowej pacjenta zatrutego ołowiem mogą pojawić się erytrocyty z wtrętami w postaci nakrapiania zasadochłonnego, zwiększona liczba retikulocytów oraz niespecyficzne nieprawidłowe erytrocyty cechujące się anizocytozą i polichromatofilią. Z kolei w rozmazie szpiku kostnego można dostrzec nieprawidłowe komórki

linii erytroidalnej, jądrzaste erytrocyty oraz erytrocyty z wtrętami w postaci nakrapiania zasadochłonnego [6]. Poprawne rozpoznanie komórek krwi w rozmazach patologicznych jest zadaniem nietrywialnym, dlatego wymagany jest do tego zadania wykwalifikowany personel. Cała procedura badania jest czasochłonna i opiera się na subiektywnej ocenie diagnosty laboratoryjnego. Badania opisujące powtarzalność wyników klasyfikacji krwinek białych wykazały, że różnica wyników analizy rozmazu krwi, przeprowadzonej przez grupę diagnostów laboratoryjnych, może wynieść 4% [8]. Aby wystandaryzować badanie rozmazu krwi naukowcy od ponad 30 lat starają się zautomatyzować etap detekcji i klasyfikacji komórek [9]. W artykule przedstawiono schemat proponowanych po 2010 r. systemów klasyfikacji komórek wykorzystujących tradycyjne metody uczenia maszynowego.

Klasyfikacja komórek w mikroskopowych obrazach rozmazów krwi z wykorzystaniem tradycyjnego uczenia maszynowego

Uczenie maszynowe jest dziedziną zajmującą się problematyką sztucznej inteligencji. Na podstawie danych wejściowych, algorytmy uczenia maszynowego tworzą i optymalizują model matematyczny, który może być wykorzystany do rozwiązania różnorodnych zagadnień, m.in. regresji i klasyfikacji. Pierwsze próby automatycznej klasyfikacji komórek krwi zostały przeprowadzone ponad 30 lat temu, na niewielkiej liczbie danych, wykorzystując płytke modele uczenia maszynowego [9]. Wraz z rozwojem metod uczenia maszynowego oraz kamer mikroskopowych zwiększała się skuteczność proponowanych klasyfikatorów. Uzyskane w ostatnich 10 latach wyniki były porównywalne do wyników uzyskiwanych przez manualną diagnostykę [10, 11]. Procedurę klasyfikacji można podzielić na cztery części – wstępne przetwarzanie obrazu, wyodrębnienie obrazu komórek z tła, znalezienie charakterystycznych cech dla każdego typu komórki oraz zaprojektowanie klasyfikatora (**rycina 1**). Skuteczność systemu identyfikującego zależy od dokładności każdego z etapów rozpoznawania komórek. Ma to praktyczne znaczenie, ponieważ dopóki jeden etap nie osiągnie oczekiwanej wydajności, cały system będzie nieefektywny [10–12]. Dotychczas stosowane do klasyfikacji krwinek białych i czerwonych standardowe metody uczenia płytkiego obejmują sztuczne sieci neuronowe (ang. *Artificial Neural Network, ANN*) [13, 14], maszynę wektorów nośnych (ang. *Support Vector Machine,*

Rycina 1. Schemat automatycznego systemu klasyfikacji komórek z użyciem tradycyjnych metod uczenia maszynowego.

Figure 1. Scheme of automatic cell classification system based on traditional machine learning methods.

SVM) [15–22], naiwny klasyfikator bayesowski [7, 23, 24], uczenie wektorów kwantyzacji (ang. *Learning Vector Quantization*, LVQ) [21, 25], liniową analizę dyskryminacyjną (ang. *Linear Discriminant Analysis*, LDA) [16, 26, 30]. W ostatnich pięciu latach naukowcy zmagający się z problemem klasyfikacji komórek krwi, próbowali go rozwiązać wykorzystując konwolucyjne sieci neuronowe, zarówno budowane od zera, jak i ogólnodostępne przetrenowane sieci. Ponadto, stosowano metody hybrydowe wykorzystujące narzędzia tradycyjnego uczenia maszynowego i głębokie uczenie maszynowe. Klasyfikacja krwinek białych oparta o metody uczenia głębokiego składa się z etapów wstępnego przetwarzania obrazu, detekcji komórek i ich klasyfikacji [12, 27].

Pierwszym krokiem w projektowaniu modelu klasyfikującego komórki jest wstępna obróbka zdjęć mikroskopowych i segmentacja komórek (rycina 1). Zarówno w manualnej jak i automatycznej analizie rozmazu krwi kluczowe jest odpowiednie barwienie preparatu, ponieważ prawidłowe wybarwienie struktur jest podstawą poprawnej oceny komórek. Ponadto, umożliwia właściwe wyodrębnienie komórek z tła [10, 26]. Najczęściej stosowana jest metoda barwienia May-Grunwalda-Giemsy. Segmentacja obrazu jest procesem polegającym na jego podziale na określone części według wybranych własności. W typowym rozmazie krwi występują krwinki czerwone, krwinki białe, krwinki płytkowe oraz

tło [7]. Celem segmentacji przy zatruciu ołowiem jest oddzielenie komórek atypowych od reszty obrazu. Podczas pracy nad wyodrębnieniem komórek z tła, naukowcy musieli zmierzyć się z wieloma problemami, które w rutynowej diagnostyce nie stanowią wyzwania. Są to m.in.: zniekształcenie komórek związane z przygotowaniem i przechowaniem preparatu czy też nakładanie się leukocytów i krwinek czerwonych [28, 29]. Narzędzia automatycznej segmentacji, jakich dotychczas używano, można podzielić na dwa podejścia – nienadzorowane i nadzorowane. Do podejścia nienadzorowanego zalicza się klastrowanie [30], progowanie obrazu [31] i metody oparte na obrysie przedmiotów znajdujących się na zdjęciu [31, 32]. Do podejścia nadzorowanego zalicza się sieci neuronowe, K najbliższych sąsiadów, naiwny klasyfikator Bayesowski, SVM oraz algorytm drzew losowych [33, 34]. Naukowcy opracowali wiele algorytmów służących obróbce zdjęć, wyodrębnieniu istotnych fragmentów, wyznaczeniu cech dla klasyfikatora i klasyfikacji. W zależności od rodzaju barwienia i przyjętego sposobu segmentacji podejmowano decyzję o rodzaju palety barw, na jakiej zostanie opracowany obraz. Jądro komórkowe leukocytów jest najintensywniej zabarwioną strukturą w obrazie rozmazu krwi, w związku z tym często wyodrębnienie komórki rozpoczyna się od wyodrębnienia jądra komórkowego [19]. W przestrzeni barw RGB należy wygasić regiony białe i czerwone

w celu uwydatnienia fioletowego jądra komórkowego [35]. Kolejną metodą wyróżnienia jądra komórkowego jest uwydatnienie go w kanale S (saturation), przestrzeni barw HSV [23, 33] lub kanale Y przestrzeni barw CMYK [15]. Po transformacji palety barw na HSV, wystarczającym zabiegiem do segmentacji jest zastosowanie prostego progowania obrazu [23, 33]. Popularną metodą transformacji obrazu w skali szarości na binarną jest metoda Otsu. Opiera się ona na histogramie, dzieli obszary na podstawie wartości wariancji międzyklasowej. Oprócz dwóch powyższych podejść w badaniach pojawia się także propozycja zastosowania binaryzacji obrazów w kanale Y panelu barw CMYK z wykorzystaniem algorytmu Zacka. W wyróżnianiu obszarów komórkowych na obrazie znalazły także zastosowanie przekształcenia w palecie barw CIEL*a*b*. Jądro komórkowe w tym przekształceniu znajduje się w obszarze wysokiego nasycenia, natomiast tło w obszarze niskiego nasycenia i wysokiego świecenia [15]. Najczęściej wybieraną metodą segmentacji w tradycyjnym uczeniu maszynowym jest podejście nienadzorowane, głównie progowanie obrazu oraz metody klastrowe. W pracach dotyczących klasyfikacji komórek w rozmazach szpiku kostnego jako metodę segmentacji często wybierano algorytm centroidów (k-średnich) [36] oraz metodę c-średnich w rozmytej analizie skupień [37]. Wśród metod opartych o obrys należy wspomnieć o algorytmie *watershed* oraz *snake*. Ten pierwszy definiowany na obrazach w skali szarości służy segmentacji na podstawie jasności pikseli. Jest także przydatnym algorytmem pomocniczym służącym rozdzieleniu przylegających do siebie komórek [31, 32]. *Snake* jest to algorytm służący dopasowaniu odkształcalnego modelu punktowego do oczekiwanego kształtu na obrazie [13, 25]. Końcowym etapem segmentacji w każdej metodzie jest zastosowanie operacji morfologicznych, takich jak: dylatacja, erozja, algorytmy Canny, wypełniania dziur [7, 15]. Przeprowadzenie tych operacji jest kluczowe w celu wyodrębnienia istotnego obszaru i wyznaczenia charakterystycznych cech tego obszaru dla późniejszej klasyfikacji.

Kolejnym etapem po segmentacji krwinek jest wyznaczenie ich cech, na podstawie których dokonana zostanie klasyfikacja (**rycina 1**). W sytuacjach, gdy użyto charakterystycznych cech komórek do segmentacji, można użyć tych cech także do klasyfikacji. Podstawą skutecznej klasyfikacji jest wyznaczenie swoistych cech, umożliwiających rozróżnienie krwinek prawidłowych od nieprawidłowych [20–23]. Cechy te można podzielić na trzy rodzaje: kształtowe, teksturowe i wybarwienia [10, 11]. W analizie

Tabela 1. Wyodrębniane cechy komórek i jąder komórkowych.

Table 1. Extracted cells and nuclei features.

kształt	barwa	tekstura
powierzchnia*	średnia	średnia
wydłużenie*	odchylenie standardowe	odchylenie standardowe
okrągłość*	wariancja	wariancja
obwód*	entropia	entropia
średnica*	skośność	skośność
stosunek powierzchni jądra komórkowego do komórki	kurtoza	kurtoza

* dotyczy komórki i jądra komórkowego.

mikroskopowej diagnosta laboratoryjny sprawdza wielkość komórek, wielkość jądra i jego segmentacje oraz obecność i wybarwienie ziarnistości. Monocyty i limfocyty nie posiadają ziarnistości. Neutrofile, bazofile i eozynofile posiadają ziarnistości barwiące się na kolory, odpowiednio: fioletowy, granatowy i ceglastoczerwony. Limfocyty są najmniejsze, granulocyty są w podobnej wielkości, a monocyty największe. Neutrofile charakteryzują się jądrem 3–5 segmentowym, limfocytów są okrągłe, monocytów różnokształtne, z kolei eozynofili przybierają kształt okularów [38]. Erytrocyty wybarwione są na kolor czerwony z centralnym przejaśnieniem, natomiast charakterystyczne dla zatrucia ołowiem erytrocyty z nakrapianiem zasadochłonnym są standardowej wielkości z granatowymi ziarnistościami [1, 2]. Naukowcy opracowujący algorytmy rozpoznające i klasyfikujące krwinki posłużyli się powyższymi cechami oraz innymi, niemożliwymi do oceny przez ludzkie oko (**tabela 1**) [39]. Możliwe jest wyznaczenie wielu cech krwinek, natomiast do klasyfikacji należy użyć tylko tych swoistych dla rodzaju komórki. Selekcje cech można przeprowadzić manualnie bądź przez zastosowanie narzędzi selekcyjnych, takich jak sekwencyjne przeszukiwanie w przód (ang. *Sequential Forward Selection*, SFS) czy sekwencyjne pływające przeszukiwanie w przód (ang. *Sequential Floating Forward Selection*, SFFS) [13, 25].

Ostatnim etapem postępowania klasyfikującego jest użycie na wyodrębnionych komórkach klasyfikatora (**rycina 1**), wykorzystującego uprzednio wyznaczone cechy do przyporządkowania komórki do odpowiedniej klasy. W badaniach związanych z identyfikacją komórek w rozmazach krwi obwodowej i szpiku, wykorzystującym tradycyjne uczenie maszynowe popularniejsze są metody nadzorowane. Z kolei metody uczenia nienadzorowanego, takie jak analiza głównych składowych (ang. *Principal Component Analysis*, PCA) czy analiza skupień, są wykorzystywane do selekcji cech, zwiększając skuteczność

systemu identyfikującego [16, 19]. W badaniach, w których osiągnięto najwyższe wyniki skuteczności używano sieci neuronowych [13, 14] oraz maszyny wektorów nośnych [15–22]. Jedną z najczęściej stosowanych sieci neuronowych był perceptron wielowarstwowy, przygotowywany w różnej konfiguracji wag i liczby epok treningowych [22]. Poza tym stosowano także naiwny klasyfikator Bayesowski [7, 23, 24], liniową analizę dyskryminacyjną [16, 26, 30], uczenie wektorów kwantyzacji [21, 25], losowy las decyzyjny [40]. Naukowcy w proponowanych modelach rozpoznawania i klasyfikowania prawidłowych leukocytów w rozmazach krwi obwodowej osiągnęli wysoką skuteczność – 92–99% [10]. Wyniki badań identyfikacji prawidłowych komórek linii erytroidalnej i mieloidalnej miały podobną skuteczność. Kilka prac poświęconych zostało automatycznej diagnostyce białaczek, wyniki prawidłowego rozpoznania wyniosły ponad 95% [15, 16, 19]. Zagadnienie automatycznej klasyfikacji krwinek czerwonych jest obszarem, w którym skupiano się dotąd na analizie komórek prawidłowych oraz diagnostyce malarii [26]. W wyniku rozwoju dziedziny przetwarzania obrazu wykorzystującej głębokie sieci neuronowe i popularności tych metod, w ostatnich latach pojawiło się wiele prac dotyczących klasyfikacji komórek krwi bazujących na autorskich oraz ogólnodostępnych przetrenowanych sieciach neuronowych [12, 27].

Podsumowanie

Skonstruowanie kompleksowego systemu identyfikującego i klasyfikującego komórki w rozmazach krwi obwodowej i szpiku kostnego jest kluczowym rozwiązaniem w diagnostyce chorób manifestujących się patologią krwinek białych i czerwonych. Stosowanie takiej metody pozwoliłoby na szybszą diagnostykę problemów zdrowotnych takich jak zatrucie ołowiem. Nieprawidłowa diagnoza zatrucia tym metalem może prowadzić do nieodwracalnych problemów zdrowotnych, a nawet śmierci. Ponadto, opracowanie systemu klasyfikującego byłoby krokiem do standaryzacji badania oceny rozmazów i umożliwiłoby prowadzenie specjalistycznej diagnostyki w placówkach, w których brakuje wykwalifikowanego personelu. Rozwój obszaru przetwarzania obrazu, przy użyciu głębokich sieci neuronowych, mógłby zostać wykorzystany w połączeniu z tradycyjnymi metodami uczenia maszynowego do zaprogramowania systemu klasyfikującego komórki rozmazów krwi obwodowej i szpiku kostnego, z jednoczesnym wskazaniem jednostek chorobowych charakteryzujących się obecnością rozpoznanych komórek atypowych.

Piśmiennictwo

1. Njati SY, Maguta MM. Lead-based paints and children's PVC toys are potential sources of domestic lead poisoning – A review. *Environ Pollut.* 2019; 249: 1091–1105.
2. Tang G, Tu X, Feng P. Lead Poisoning Caused by Traditional Chinese Medicine: A Case Report and Literature Review. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2017; 243: 127–131.
3. National Organization for Rare Disorders (NORD). Artykuł: Heavy Metal Poisoning 2006. Dostępny w internecie: <https://rarediseases.org/rare-....> Dostęp 20.06.2020.
4. World Health Organization. Artykuł: Lead poisoning and health 23 august 2019. Dostęp w internecie: <https://www.who.int/news-room/....> Dostęp 20.06.2020.
5. Recasens V, Montañé, A, Bustamante E. Lead poisoning as final diagnosis in a study of normocytic anemia. *Int J Hematol* 2019; 109: 135–136.
6. Lv C, Xu Y, Wang J, Shao X, Ouyang J, Li J. Dysplastic changes in erythroid precursors as a manifestation of lead poisoning: report of a case and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(1): 818–823.
7. Prinyakupt J, Pluempitwiriwaj C. Segmentation of white blood cells and comparison of cell morphology by linear and naïve Bayes classifiers. *Biomed Eng Online.* 2015; 14: 63.
8. Fuentes-Arderiu X, Dot-Bach D. Measurement uncertainty in manual differential leukocyte counting. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(1): 112–115.
9. Sinha N, Ramakrishnan A. G. Automation of differential blood count. *TENCON 2003.* 2003; 1(2): 547–551.
10. Shahin A.I, Guo Y, Amin K, Sharawi A. White Blood Cells Identification System Based on Convolutional Deep Neural Learning Networks. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2017; 168: 69–80.
11. Hegde R, Prasad K, Hebbar H, Singh BM. Comparison of traditional image processing and deep learning approaches for classification of white blood cells in peripheral blood smear images. *Biocybernetics and Biomedical Engineering.* 2019; 39(2):382–392.
12. Wang Q, Bi S, Sun M, Wang Y, Wang D, Yang S. Deep learning approach to peripheral leukocyte recognition. *PLoS One.* 2019; 14(6): e0218808.
13. Rezaatofghi SH, Soltanian-Zadeh H. Automatic recognition of five types of white blood cells in peripheral blood. *Comput Med Imaging Graph.* 2011; 35(4): 333–343.
14. Nazlibilek S, Karacor D, Ercan T, Sazli M, Kalender O, Ege Y. Automatic Segmentation, Counting, Size Determination and Classification of White Blood Cells. *Measurement.* 2014; 55: 58–65.
15. Agaian S, Madhukar M, Chronopoulos AT. Automated Screening System for Acute Myelogenous Leukemia Detection in Blood Microscopic Images. *IEEE Systems Journal.* 2014; 8(3): 995–1004.
16. Alferez S, Merino A, Bigorra L, Mujica L, Ruiz M, Rodellar J. Automatic recognition of atypical lymphoid cells from peripheral blood by digital image analysis. *Am J Clin Pathol.* 2015; 143(2): 168–305.
17. Putzu L, Caoeci G, Di Ruberto C. Leucocyte classification for leukaemia detection using image processing techniques. *Artif Intell Med.* 2014; 62(3): 179–191.
18. Kazemi F, Najafabadi TA, Araabi BN. Automatic Recognition of Acute Myelogenous Leukemia in Blood Microscopic Images Using K-means Clustering and Support Vector Machine. *J Med Signals Sens.* 2016; 6(3): 183–193.
19. MoradiAmin M, Memari A, Samadzadehaghdam N, Kermani S, Talebi A. Computer aided detection and classification of acute lymphoblastic leukemia cell subtypes based on microscopic image analysis. *Microsc Res Tech.* 2016; 79(10): 908–916.
20. Duan Y, Wang J, Hu MH, Zhou M, Li Q, Sun L, Qiu S, Wang Y. Leukocyte classification based on spatial and spectral features of microscopic hyperspectral images. *Optics and Laser Technology.* 2019; 112: 530–538.
21. Wang Q, Wang J, Zhou M, Li Q, Wang Y. Spectral-spatial feature-based neural network method for acute lymphoblastic leukemia cell identification via microscopic hyperspectral imaging technology. *Biomed Opt Express.* 2017; 8(6): 3017–3028.
22. Su MC, Cheng CY, Wang PC. A neural-network-based approach to white blood cell classification. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014: 796371.
23. Mathur A, Tripathi AS, Kuse M. Scalable system for classification of white blood cells from Leishman stained blood stain images. *J Pathol Inform.* 2013; 4(Suppl): S15.
24. Gautam A, Singh P, Raman B, Bhadauria H. Automatic classification of leukocytes using morphological features and Naïve Bayes classifier. *IEEE Region 10 Conference (TENCON).* 2016: 1023–1027.

25. Tabrizi PR, Rezatofighi SH, Yazdanpanah MJ. Using PCA and LVQ neural network for automatic recognition of five types of white blood cells. Annual International Conference of the *IEEE Engineering in Medicine and Biology* 2010; 5593–5596.
26. Molina A, Alfrez S, Bold L, Acevedo A, Rodellar J, Merino A. Sequential classification system for recognition of malaria infection using peripheral blood cell images. *J Clin Pathol*. 2020; jclin-path-2019-206419.
27. Habibzadeh M, Jannesari M, Rezaei Z, Totonchi M, Baharvand H. Automatic white blood cell classification using pre-trained deep learning models: ResNet and Inception. Conference: Tenth International Conference on Machine Vision. 2018; 105.
28. Duggal R, Gupta A, Gupta R, Wadhwa M, Ahuja C. Overlapping cell nuclei segmentation in microscopic images using deep belief networks. Proceedings of the tenth Indian conference on computer vision, graphics and image processing. 2016; 82.
29. Devi SS, Singha J, Sharma M, Laskar RH. Erythrocyte Segmentation for Quantification in Microscopic Images of Thin Blood Smears. *Journal of Intelligent & Fuzzy Systems* 2017; 32(4): 2847–2856.
30. Zhang CC, Xiao XY, Li XM, et al. White blood cell segmentation by color-space-based k-means clustering. *Sensors* 2014; 14(9): 16128–16147.
31. Salem N, Sobhy NM, Dosoky ME. A comparative study of white blood cells segmentation using otsu threshold and watershed transformation. *J Biomed Eng Med Imaging*. 2016; 3(3).
32. Marzukia NIC, Mahmood NH, Abdul Razak MA. Segmentation of white blood cell nucleus using active contour. *J technol*. 2015; 74(6): 115–118.
33. Rehman A, Abbas N, Saba T, Rahman SIU, Mehmood Z, Kolivand H. Classification of acute lymphoblastic leukemia using deep learning. *Microsc Res Tech*. 2018; 81(11): 1310–1317.
34. Fan H, Zhang F, Xi L, Li Z, Liu G, Xu Y. LeukocyteMask: An automated localization and segmentation method for leukocyte in blood smear images using deep neural networks. *J Biophotonics*. 2019; 12(7): e201800488.
35. Ghosh P, Bhattacharjee D, Nasipuri M. Blood Smear Analyzer for White Blood Cell Counting: A Hybrid Microscopic Image Analyzing Technique. *Applied Soft Computing*. 2016; 46: 629–638.
36. Vidhya C, Kumar PS, Keerthika K, Nagalakshmi C, Devi BM. Classification of acute lymphoblastic leukemia in blood microscopic images using SVM. International Conference on Engineering Trends and Science & Humanities (ICETSH). 2015: 185–189.
37. Dorini LB, Minetto R, Leite NJ. Semiautomatic White Blood Cell segmentation based on Multiscale Analysis. *IEEE Jour. Biomed. Health Infor*. 2013; 17(1): 250–256.
38. Dembińska-Kie A, Naskalski JW et al. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wyd. 2. Urban & Partner Wroclaw 2008.
39. Sarrafzadeh O, Dehnavi AM, Banaem HY, Talebi A, Gharibi A. The Best Texture Features for Leukocytes Recognition. *J Med Signals Sens*. 2017; 7(4): 220–227.
40. Mishra S, Majhi B, Sa PK, Sharma L. Gray level co-occurrence matrix and random forest based acute lymphoblastic leukemia detection. *Biomed Signal Process Control*. 2017; 33: 272–280.