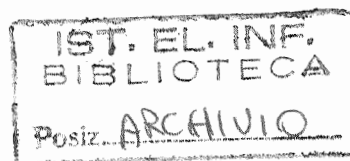


Consiglio Nazionale delle Ricerche



**ISTITUTO DI ELABORAZIONE
DELLA INFORMAZIONE**

PISA

**PROGETTO DI UN DISPOSITIVO PER L'ANALISI
AUTOMATICA DI PREPARATI MICROSCOPICI**

L. Azzarelli, M. Chimenti, E. Fantini, A. Azzarà

Nota Interna B4-07

Marzo 1991

PROGETTO DI UN DISPOSITIVO PER L'ANALISI AUTOMATICA DI PREPARATI MICROSCOPICI

*L.Azzarelli¹, M.Chimenti¹, E.Fantini¹,
A.Azzarà²*

- 1 Istituto di Elaborazione della Informazione - CNR Pisa
- 2 U.O. Ematologia, Clinica Medica I - Università di Pisa

1. INTRODUZIONE

I granulociti neutrofili (GN) sono cellule circolanti nel sangue periferico capaci di esplicare importanti funzioni nell'ambito della immunità cellulo-mediata accessoria. Tra queste assume un ruolo determinante la capacità di locomozione di cui sono dotati, che si esprime secondo due modalità fondamentali:

- motilità spontanea non orientata (random), dipendente esclusivamente dalla chemiocinesi intrinseca;
- motilità orientata in modo direzionale (chemiotassi), dipendente oltre che dalla chemiocinesi, dalla attivazione di strutture capaci di guidare la cellula esclusivamente verso una direzione (ad es. un sito di infezione).

La funzione motoria dei GN può essere studiata mediante varie tecniche. Tra queste è tuttora largamente in uso la metodica della camera di Boyden [1]. In breve, GN vengono fatti migrare attraverso filtri microporosi interposti tra due compartimenti di camere in perspex: nel compartimento superiore è posta la sospensione cellulare; in quello inferiore è posta o la stessa soluzione della sospensione (nessun gradiente: valutazione della motilità spontanea) o una sostanza "chemioattrattante" (gradiente positivo: valutazione della chemiotassi). I filtri, dopo rimozione, fissazione, colorazione, deidratazione e diafanizzazione, sono osservati al microscopio. La misurazione della capacità di locomozione cellulare può essere effettuata in due modi:

- quantificando per ogni campo microscopico il numero di cellule che hanno raggiunto i piani focali corrispondenti a varie distanze dal piano

di partenza arbitrariamente prescelte, e ricavandone un indice numerico [2];

- ricercando mediante la rotazione della vite micrometrica l'ultimo piano focale in cui sono presenti cellule (indipendentemente dal loro numero) esprimendo in micron l'effettiva distanza percorsa dal fronte cellulare [3].

Il primo metodo ha indubbiamente il vantaggio della precisione del conteggio, ma richiedendo lunghe e tediose osservazioni microscopiche, risulta non idoneo per la valutazione di campioni numerosi (ad es. lo studio dell'interferenza di un farmaco con la motilità granulocitaria spontanea e stimolata valutate su almeno 5 campi scelti a caso ad almeno 5 piani focali che preveda una curva dose-risposta per almeno 5 concentrazioni del farmaco su campioni in triplo comporta: $2 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 3 = 750$ conteggi di varie decine di cellule).

Il secondo metodo ha indubbiamente il vantaggio della maggior velocità di esecuzione, e anche se può prestarsi ad errori di interpretazione (singole cellule che sopravanzano in modo atipico il fronte medio di avanzamento), è universalmente utilizzato per grandi campionature.

Allo scopo di migliorare la metodica delle camere chemiotattiche vari autori hanno introdotto alcune variazioni. Una di queste utilizza due filtri sovrapposti, uno con pori di $3 \mu\text{m}$, l'altro con pori di $0,45 \mu\text{m}$ destinato a intrappolare le cellule che hanno attraversato il primo [4]: sono però possibili errori dovuti alle cellule che restano adese al filtro superiore, dopo averlo attraversato, per cui una valutazione corretta implica la lettura di entrambi i filtri. Un'altra variazione utilizza la marcatura delle cellule con Cromo 51 [5], con allungamento dei tempi di incubazione tali da consentire la loro caduta nel compartimento inferiore, con misurazione della radioattività nel liquido del compartimento inferiore. I limiti di tale metodo per la utilizzazione routinaria in laboratorio sono evidenti.

I suddetti sistemi e le varianti introdotte non sono comunque singolarmente in grado di coniugare le informazioni derivanti dallo studio dei due parametri fondamentali (*distanza percorsa* a partire dal piano di

partenza e *numero delle cellule* effettivamente migranti nei vari piani esaminati). D'altra parte l'uso contemporaneo di tutti i metodi allungherebbe i tempi di esecuzione tanto da rendere lo studio praticamente inattuabile. Per lo stesso motivo sono risultati difficilmente verificabili nella pratica i modelli teorici di propagazione cellulare in filtri microporosi che pure, in passato, sono stati proposti: si veda, ad esempio, il modello di diffusione con andamento di tipo gaussiano [6].

Scopo del presente lavoro è l'automatizzazione della fase di lettura di preparati ottenuti seguendo il test della chemiotassi di GN su filtri microporosi al fine di renderla più attendibile, riproducibile, rapida, indipendente dalla soggettività dell'osservatore. Questo processo è realizzato mediante acquisizioni microscopiche con telecamera ed analisi computerizzata d'immagini eseguita da apposito software capace di guidare l'intera operazione.

2. CRITERI DI PROGETTO

Il problema di conteggio di cellule può essere affrontato usando le tecniche per l'individuazione, il riconoscimento e la classificazione di oggetti.

Nel caso particolare i requisiti di elaborazione sono in parte ridotti: infatti le cellule migrate attraverso il filtro sono di un solo tipo e l'elaborazione richiesta consiste nell'individuare in un'immagine l'eventuale presenza di cellule e nel discriminare le immagini di cellule a fuoco da quelle non a fuoco appartenenti a piani diversi da quello in esame.

L'immagine di una cellula a fuoco è caratterizzata da contorni relativamente netti. La forma delle cellule può variare notevolmente a seconda della direzione dei canali del filtro in cui la cellula si è arrestata: si possono avere immagini di forma rotondeggiante o allungata dovute a cellule singole, oppure immagini con forme diverse dovute a sovrapposizioni di cellule sufficientemente a fuoco.

Una procedura di analisi d'immagini per individuare le cellule comporta l'impiego di diversi operatori di tipo locale.

Normalmente infatti l'immagine acquisita viene trasformata in un'immagine di tipo binario in cui viene assegnato un valore ai punti di contorno e l'altro valore ai rimanenti; dall'immagine binaria, ancora di tipo raster, vengono poi ricavati i vettori delle coordinate dei punti di contorno delle singole cellule. Infine analizzando aree, perimetri e fattori di forma delle curve chiuse definite da ciascun vettore ricavato in precedenza, si può determinare con un certo grado di attendibilità il numero di cellule effettivamente presenti nel piano esaminato.

Questo metodo presenta due inconvenienti fondamentali:

- 1) è richiesto un certo grado di interattività per chiudere le curve che possono essere lasciate aperte dall'algoritmo di riconoscimento dei contorni, oppure per discriminare, nel caso di contorni abbastanza irregolari, fra il rilevamento di una cellula e quelle di più cellule sovrapposte;

2) è necessario l'impiego di calcolatori abbastanza veloci per contenere i tempi necessari per l'esecuzione di ripetute operazioni di convoluzione.

Poiché lo scopo primario dell'analisi di immagini è quello di determinare la profondità di migrazione e poiché si vuole impiegare un sistema di calcolo di medie prestazioni, si è ritenuto opportuno ricorrere ad un tipo di elaborazione che opera nel monodimensionale: infatti su ciascuna riga dell'immagine viene eseguita una differenza mobile a passi discreti e viene eseguito un processo di decisione in cui si individua l'attraversamento del contorno dell'immagine di una cellula quando la differenza calcolata nel modo suddetto risulta superiore ad un valore di soglia.

In un precedente lavoro [7] i fotogrammi formato 35mm di piani chemiotattici ottenuti con una fotocamera innestata su un microscopio sono stati digitalizzati mediante un dispositivo MFA/36 [8]; le immagini digitali ricavate dall'acquisizione sono state elaborate mediante programmi di analisi appositamente sviluppati e si sono individuati i valori ottimi di diversi parametri, come il passo di avanzamento e il valore di soglia, utilizzati nella procedura. I risultati ottenuti con questo tipo di elaborazione sono stati correlati con i conteggi delle cellule eseguiti con tecniche microscopiche tradizionali.

3. DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

Il dispositivo per l'analisi in linea di funzioni chemiotattiche fa uso di una telecamera e di una memoria video con convertitore analogico/digitale per la digitalizzazione delle immagini riprese direttamente da un microscopio; il controllo delle operazioni e l'elaborazione dei dati sono eseguite da un calcolatore HP Vectra ES-12.

La fig.1 mostra lo schema di principio del dispositivo di acquisizione.

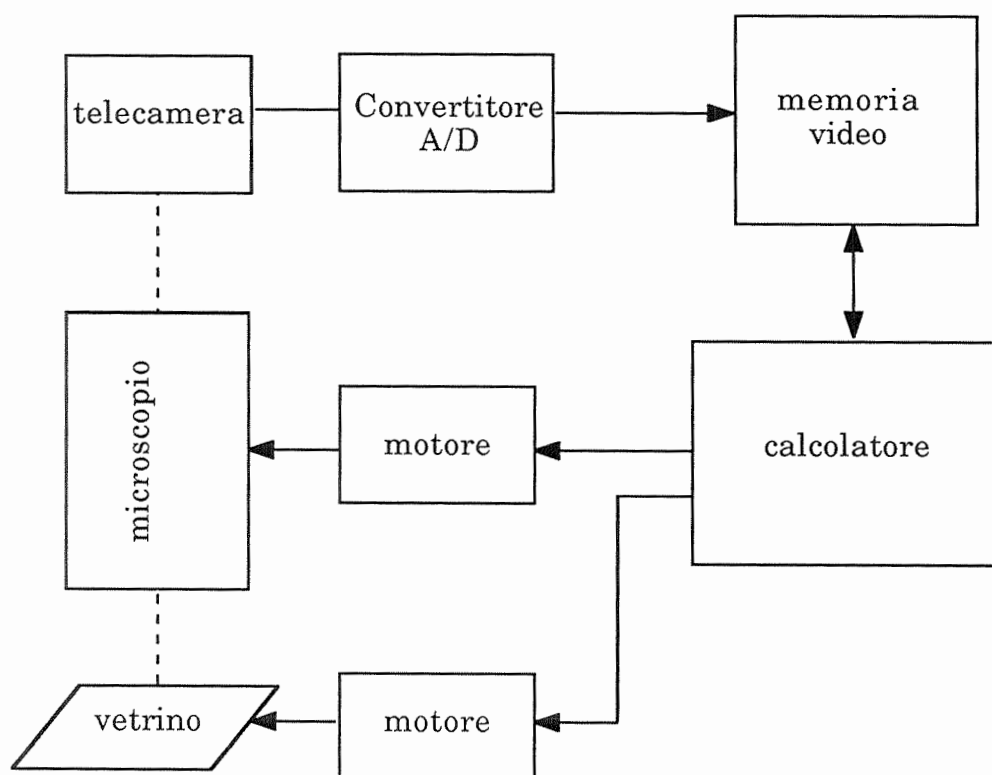


Figura 1 - Schema del dispositivo per l'acquisizione in linea di riprese microscopiche di filtri microporosi.

Il filtro da esaminare è interposto tra un vetrino portaoggetto e un vetrino coprioggetto ed è collocato sul tavolino del microscopio. L'immagine ottica del preparato è focalizzata sul sensore di una telecamera, il cui segnale video è inviato ad un convertitore A/D; i dati

forniti dal convertitore sono immagazzinati in una memoria video. Il programma di elaborazione residente nel calcolatore controlla il movimento di un motore collegato alla vite micrometrica del microscopio per la regolazione del piano di messa a fuoco e l'acquisizione dell'immagine.

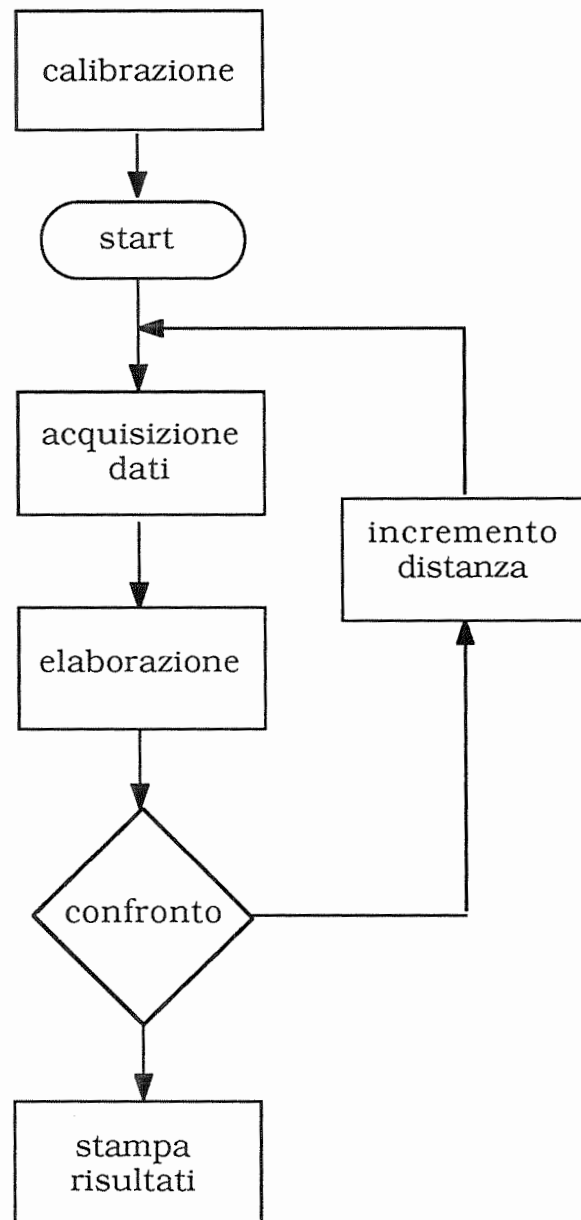


Figura 2 - Diagramma di flusso della procedura di analisi

La procedura di elaborazione è costituita da due parti distinte: una fase interattiva di calibrazione e una fase automatica di analisi (vedi fig.2).

Nella fase iniziale di calibrazione vengono regolate l'intensità della sorgente luminosa del microscopio, viene determinato un valore di soglia per il conteggio e viene trovata la posizione di messa a fuoco iniziale; nella fase di analisi i dati acquisiti mediante la ripresa con telecamera vengono elaborati e viene eseguito il processo di decisione: se il risultato numerico dell'elaborazione è superiore ad un valore di soglia prefissato, il motore viene comandato fino al raggiungimento della quota relativa al piano di analisi successivo, altrimenti il programma arresta la scansione e mostra sul monitor alfanumerico del calcolatore il risultato complessivo dell'esame.

3.1 Componente hardware

I componenti hardware del dispositivo sono costituiti da un microscopio con sistema di illuminamento in trasmissione, una telecamera, un sistema motorizzato per la regolazione della messa a fuoco del vetrino e un calcolatore con scheda di memoria video.

Formazione dell'immagine

La fig.3 mostra lo schema ottico di principio del sistema di ripresa.

La luce emessa dalla lampada viene collimata mediante il condensatore; l'intensità del fascio viene regolata mediante il diaframma e la composizione spettrale viene determinata dal filtro cromatico. La luce che ha attraversato il vetrino viene raccolta dall'obiettivo e focalizzata sulla superficie fotosensibile del trasduttore optoelettronico della telecamera.

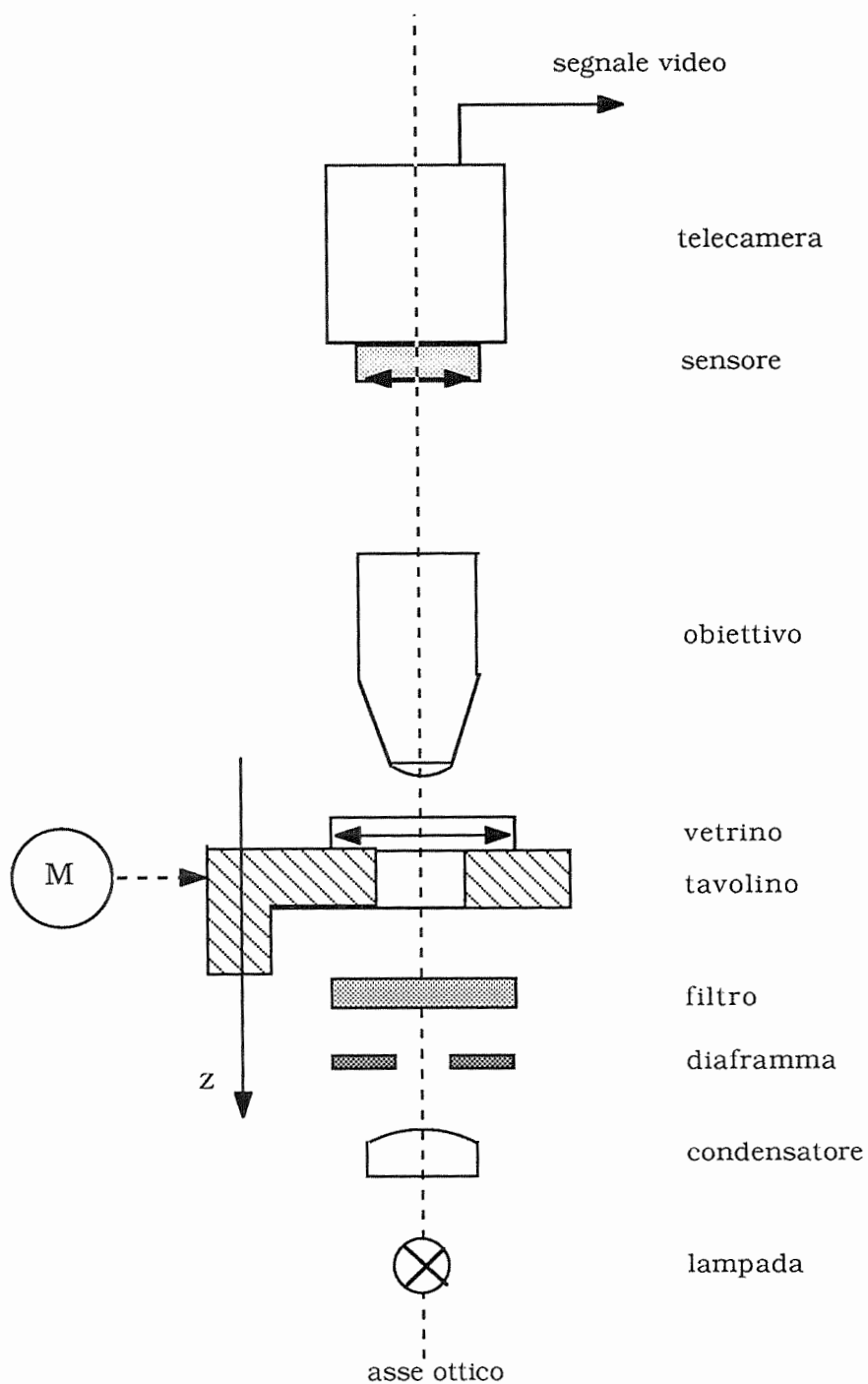


Figura 3 - Schema ottico del dispositivo di ripresa.

Il vetrino è appoggiato su un tavolino che può muoversi nella direzione z individuata dall'asse ottico del sistema; poiché la profondità di campo dell'obiettivo è abbastanza contenuta, sul piano del sensore viene

focalizzata l'immagine di uno strato sottile del filtro microporoso, situato alla distanza costante di messa a fuoco dell'obiettivo; di conseguenza, variando la posizione del tavolino si possono focalizzare le immagini prodotte da differenti strati del preparato.

Il sistema di ripresa è stato realizzato utilizzando un microscopio Leitz Ortholux. Nel percorso ottico tra l'obiettivo e la telecamera può essere inserito un oculare a grande campo: in questo modo, l'ingrandimento dell'immagine proiettata sulla telecamera viene reso eguale all'ingrandimento dell'immagine visibile attraverso l'oculare di osservazione del microscopio, e si possono così confrontare agevolmente l'immagine diretta e quella televisiva.

Le regolazioni dei componenti ottici del microscopio sono fatte in modo da ottimizzare la qualità dell'immagine ripresa dalla telecamera; a questo scopo sono state controllate la distribuzione del flusso luminoso attraverso il vetrino e la composizione spettrale della luce.

Per quanto concerne il primo punto, si agisce inizialmente sulla sorgente luminosa. Quest'ultima è costituita da un edicola con lampada alogena puntiforme, collettore e parabola: si regolano allora la centratura della lampada e la posizione del collettore in modo da ottenere un fascio uniforme. Successivamente vengono regolate le dimensioni dei diaframmi di campo e di apertura nonché la posizione del condensatore in modo da ottimizzare la distribuzione del flusso di illuminamento. La fig.4 mostra l'immagine digitale ottenuta focalizzando il piano superiore ($z=0$) di un preparato in una zona priva di cellule: l'immagine consiste quindi nella mappa del flusso luminoso incidente sul trasduttore optoelettronico della telecamera. Le zone di eguale illuminamento sono evidenziate mediante una quantizzazione dei livelli di rappresentazione dell'immagine digitale; la disuniformità dell'illuminamento dipende dalla disuniformità residua del fascio luminoso, dalla vignettatura dell'obiettivo e dalla risposta fotometrica delle varie zone della superficie sensibile del trasduttore.

Figura 4 - Immagine del piano superiore di un filtro in assenza di cellule. La distribuzione del flusso luminoso è messa in evidenza mediante pseudo-colori con quantizzazione su 8 livelli; la scala sulla parte inferiore della figura mostra la quantizzazione eseguita.

La distribuzione del fascio luminoso è anche funzione della distanza del piano focalizzato rispetto al piano superficiale del vetrino; le figure 5 e 6 mostrano i profili di una stessa riga di immagini ricavate a distanze z diverse.

Figura 5 - Grafico dei livelli di intensità dei pixel appartenenti ad una riga di un'immagine focalizzata sul piano superficiale.

Figura 6 - Grafico dei livelli di intensità dei pixel appartenenti ad una riga di un'immagine focalizzata alla distanza $z=100\mu\text{m}$.

Conversione dell'immagine

L'immagine ripresa col microscopio viene trasformata in segnale elettrico mediante una telecamera a stato solido Javelin JE7362, le cui caratteristiche principali sono riportate nella tabella I.

Il segnale video, prodotto secondo lo standard CCIR, viene campionato mediante un convertitore A/D a 8 bit; i dati prodotti dal convertitore, espressi mediante parole di un byte, vengono inseriti in una memoria video della capacità di $512 \cdot 512$ byte: vengono così memorizzate 512 righe sul totale di 625 righe del quadro acquisito; i 512 punti di campionamento di ciascuna riga sono distribuiti in maniera uniforme sui $51.2 \mu\text{s}$ dell'intervallo attivo di riga, con la frequenza di campionamento di 10 MHz.

Nella direzione della riga di scansione la matrice fotosensibile della telecamera è larga $H=6,0$ mm, mentre nella direzione verticale la dimensione è $V=4,5$ mm. Il campo inquadrato dalla telecamera è dunque un rettangolo di dimensioni $\frac{H \cdot V}{M}$, dove M è l'ingrandimento ottico prodotto dall'obiettivo.

Tabella I - Caratteristiche della telecamera Javelin JE-7362

Il campo di ripresa e la risoluzione di campionamento sono stati misurati inquadrando una mira costituita da una camera contaglobuli modello Thoma, contenente un reticolo piano di passo $50\ \mu\text{m}$; misurando l'immagine digitale ricavata si sono ottenuti i seguenti valori sperimentali:

Dimensioni del campo = $480\ \mu\text{m} \cdot 340\ \mu\text{m}$

Risoluzione orizzontale = $0,94\ \mu\text{m}$

Risoluzione verticale = $0,66\ \mu\text{m}$

Per rendere più affidabile l'elaborazione è necessario ottimizzare la qualità dei dati d'ingresso portando il segnale video il più possibile vicino agli estremi della dinamica del convertitore A/D. Per conseguire questo scopo si regola l'intensità della sorgente luminosa e si incrementa il contrasto dell'immagine. Ciò viene fatto colorando il preparato in maniera adeguata e utilizzando appositi filtri cromatici. In base ad una serie di

prove, l'effetto migliore sui preparati colorati con ematossilina di Harris è stato ottenuto con un filtro interferenziale tipo 371107 Spindler & Hoyer, che presenta un picco di trasmissione a 578 nm (v. fig.7). Le fig. 8 e 9 mostrano l'effetto del filtro: nel primo caso l'immagine riprodotta è stata ottenuta con la luce bianca emessa dalla lampada alogena della sorgente; nel secondo caso l'immagine è stata ottenuta interponendo il filtro nel percorso ottico del dispositivo di ripresa.

Figura 7 - Caratteristica di trasferimento del filtro interferenziale Splinder & Hoyer 371107.

Figura 8 - Immagine ottenuta con la luce bianca emessa dalla sorgente

Figura 9 - Lo stesso campo di fig. 8 illuminato attraverso il filtro interferenziale.

Spostamento del tavolino portavetrini.

La manopola per la regolazione micrometrica della posizione del tavolino traslatore del microscopio è azionabile mediante un motore comandato dal calcolatore. Il corpo del motore è fissato al corpo del microscopio mediante una staffa di sostegno, mentre l'albero del motore è collegato attraverso un giunto elastico alla manopola.

Poiché si devono eseguire acquisizioni d'immagini relative a piani posti a distanze varianti in maniera discreta è risultato conveniente

l'impiego di un motore passo-passo; è stato usato un motore di bassa potenza a quattro fasi, tipo M061-LS08 Slo-Syn, avente le caratteristiche mostrate in fig.10.

Figura 10 - Caratteristica velocità/coppia del motore Slo-Syn M061.

Il motore ha una risoluzione di 200 passi/giro (1,8 gradi); poiché un giro della manopola micrometrica provoca uno spostamento verticale del tavolino di 100 μm , ad ogni passo del motore corrisponde uno spostamento di 0,5 μm .

Il motore è azionato da un traslatore 230-T Slo-Syn, che riceve dal calcolatore due segnali digitali: una linea con un valore che determina il verso di rotazione del motore e quindi il verso di spostamento del tavolino, e una linea su cui viene trasmesso un impulso per l'esecuzione di un passo.

Interfaccia

Il collegamento tra il calcolatore e il sistema elettromeccanico di avanzamento è fatto utilizzando una scheda 8255 I/O inserita nel bus. La scheda contiene 48 linee raggruppate in 6 porte di 1 byte, con funzione ingresso/uscita programmabile dall'utente, e tre contatori; la figura 11

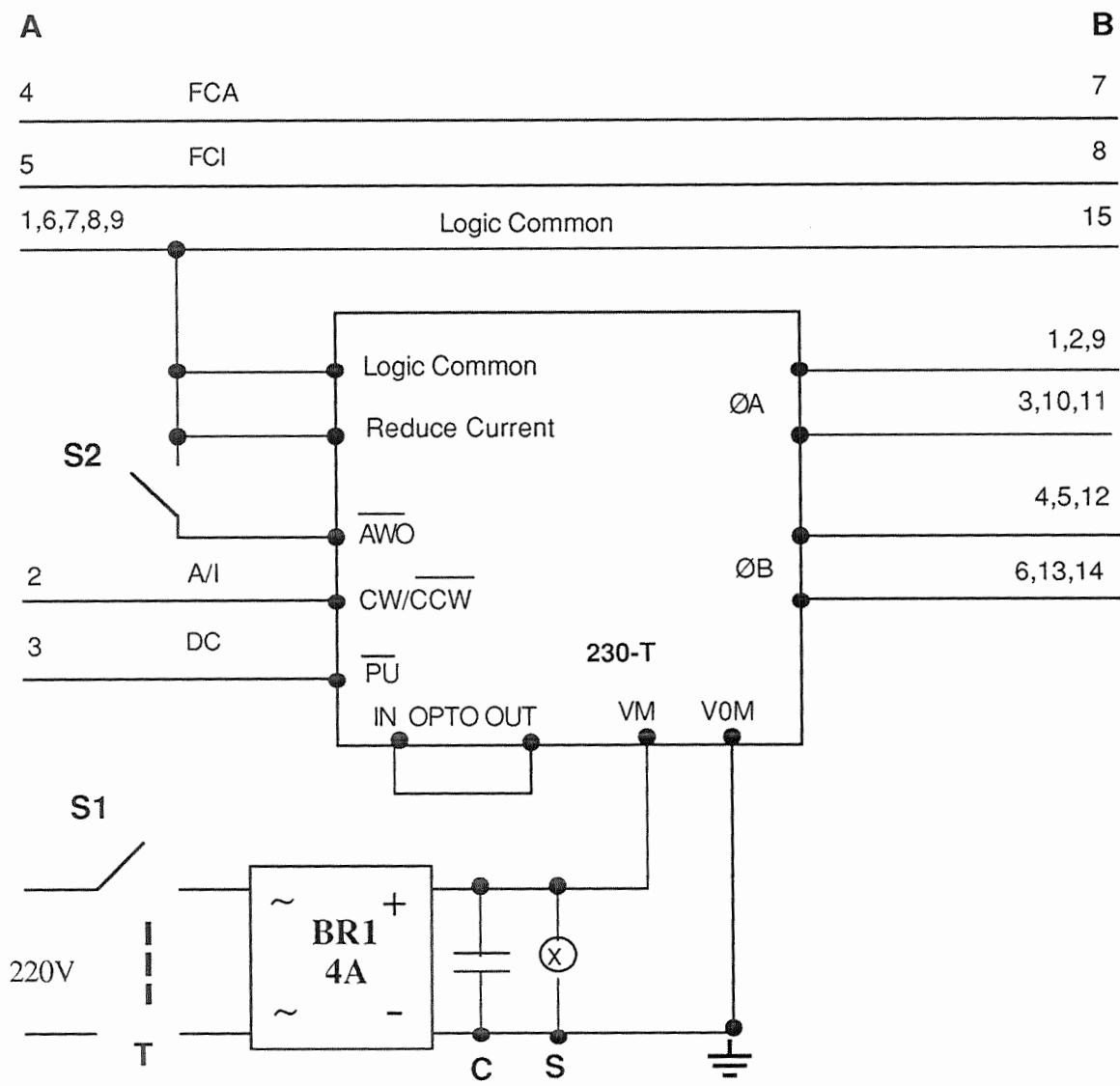
riporta il diagramma a blocchi dell'interfaccia nella configurazione utilizzata.

Figura 11 - Schema a blocchi dell'interfaccia I/O 8255.

La figura 12 mostra lo schema del collegamento elettrico. Il motore per lo spostamento del tavolino lungo l'asse z è controllato mediante le seguenti linee:

- una linea d'uscita dal calcolatore per la definizione del verso di movimento (A/I);
- una linea d'uscita per l'impulso di comando di un passo del motore (Device Command, DC);
- una linea d'ingresso per il segnale di fine corsa avanti (FCA);
- una linea d'ingresso per il segnale di fine corsa indietro (FCI);
- una linea d'ingresso per il segnale di passo compiuto (Device Flag, DF).

Sono state previste altre linee di collegamento per il pilotaggio di una coppia di motori e per il controllo dei rispettivi fine corsa; i motori verranno aggiunti all'apparecchio per traslare il vetrino da analizzare nel piano ortogonale all'asse ottico ed eseguire così i conteggi in zone diverse senza ulteriori interventi manuali.



- A = Connettore 9 pin
- B = Connettore 15 pin
- C = 4,7+2,2 mF,50V
- S = Lampade 24V per S1, S2
- T = Trasformatore 220V/24V

Figura 12 - Conessioni elettriche dell'attuatore

3.2 *Algoritmo di analisi*

Un requisito fondamentale del progetto del dispositivo è costituito dalla velocità di analisi dell'immagine acquisita in corrispondenza di un piano di lettura del filtro; di conseguenza ci si è orientati all'impiego di un modo di elaborazione per righe.

Ciascuna riga della matrice di acquisizione è costituita da 512 elementi L_i con $0 \leq L_i \leq 255$: i valori alti corrispondono a zone del filtro in cui non sono presenti cellule, mentre i valori bassi corrispondono a pixel appartenenti ad una cellula. La figura 13 riporta un esempio di riga di un'immagine: l'attraversamento di una cellula corrisponde ad un picco negativo del segnale.

Figura 13 - Grafico dei valori L_i di una riga di scansione di un'immagine.

Per discriminare i punti in corrispondenza di una cellula dai punti relativi al fondo e per potere quindi rivelare la presenza di cellule o farne il conteggio si può determinare un valore di soglia e trasformare la matrice d'ingresso a 255 valori in una matrice a 2 valori.

La scelta del valore di soglia dipende dai seguenti fattori:

- l'illuminamento del vetrino non è completamente uniforme e quindi i pixel in assenza di cellule non hanno un valore costante;

- al variare della profondità del piano di lettura all'interno del filtro cambiano sia la distribuzione dell'illuminamento che la qualità dell'immagine: in particolare, le cellule appaiono più sfocate all'aumentare della profondità, il che comporta che in una riga i picchi negativi hanno ampiezze via via più ridotte e fronti più lenti.

In base alle considerazioni fatte, appare evidente che il segnale non può essere binarizzato direttamente mediante il confronto con un valore di soglia fisso; si è scelto allora un criterio basato sulla scansione di una riga e sul confronto tra il valore di un elemento e il valore dei suoi vicini, in modo da rivelare la presenza di un picco negativo e quindi l'attraversamento dell'immagine di una cellula.

La figura 14 mostra un diagramma schematico del programma.

Si definiscono inizialmente i seguenti parametri:

D = "distanza derivata"

T_0 = "Soglia iniziale"

P_1 = "Percentuale prima riduzione soglia"

P_2 = "Percentuale riduzione soglia"

T_m = "Soglia minima"

P_a = "Passo di avanzamento"

In una fase di calibrazione viene inoltre ricavato automaticamente il conteggio C_c che dipende dal rumore del segnale acquisito in assenza di cellule.

Il programma contiene un ciclo di acquisizione dati, analisi e confronto. Dall'acquisizione dell' n -esimo piano di lettura si ricava una matrice di 512 righe • 512 colonne. L'algoritmo di analisi è descrivibile nella seguente maniera.

- 1) Per ciascuna riga si calcola:

$$d_i = L_i - L_{i+D} \quad (1)$$

con i = indice di colonna = 0,1,2,...,(511-D)

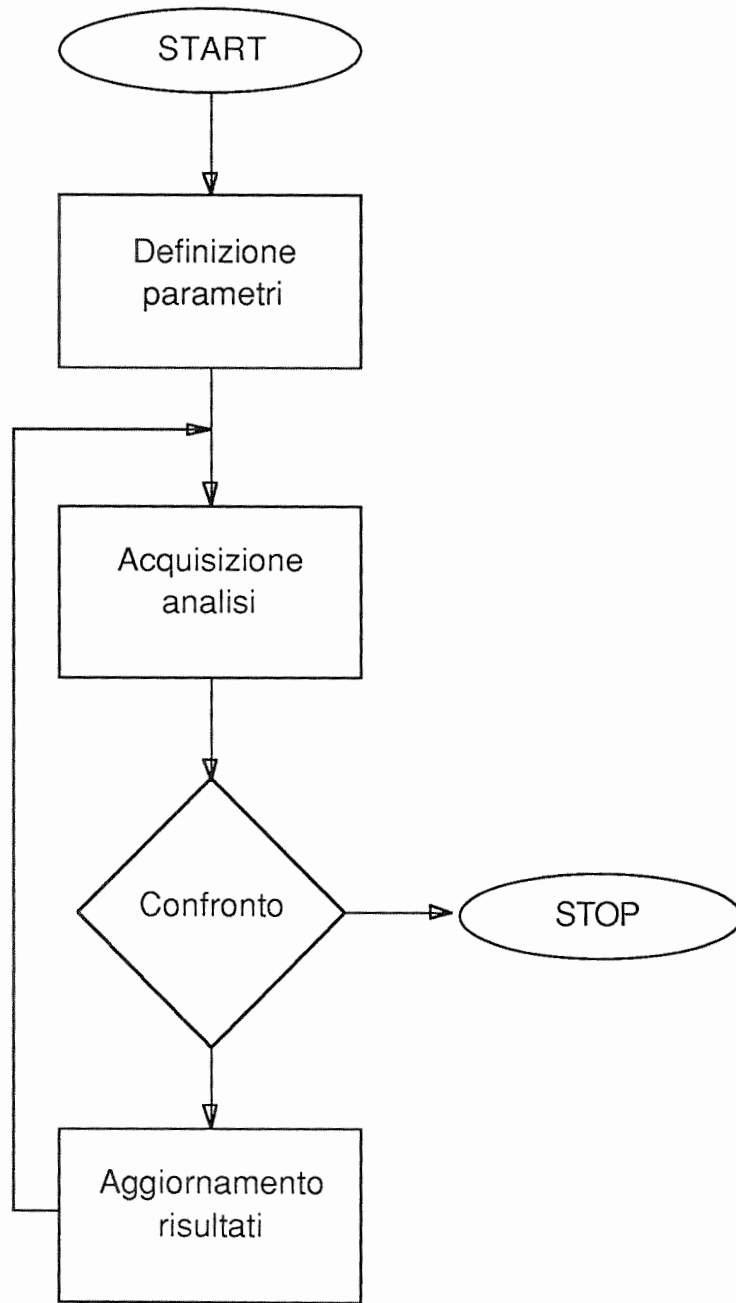


Fig. 14 - Diagramma schematico del programma di analisi

2) Per ciascun valore d_i si esegue il confronto con un valore di soglia T_n dipendente dal piano di lettura. Si ha:

$$\begin{aligned}
 \text{per } k=0 & \quad T_n = T_0 \\
 \text{per } k=1 & \quad T_n = T_0 \cdot \left(1 - \frac{P_1}{100}\right) \\
 \text{per } k \geq 2 & \quad T_n = T_{n-1} \cdot \left(1 - \frac{P_2}{100}\right)
 \end{aligned} \tag{2}$$

Il valore T_n ottenuto dalle precedenti relazioni è convertito in intero mediante arrotondamento; il programma controlla che il valore di T_n non scenda al di sotto del valore T_m .

In base al risultato del confronto si costruisce una riga con elementi B'_i di tipo binario e si incrementa il contenuto di un contatore C_k ; si ha:

$$\begin{aligned}
 |d_i| \geq T_n & \quad B'_i = 255 & \quad C_n = C_n + 1 \\
 |d_i| < T_n & \quad B'_i = 0 & \quad C_n = C_n
 \end{aligned} \tag{3}$$

Al termine della scansione dell'intera matrice si ha un'immagine binaria di 512 righe \cdot (512-D) colonne; nell'immagine si hanno pixel con valori eguali a 255 in corrispondenza dell'attraversamento del bordo di una cellula: il valore del contatore C_n è costituito dal numero di punti di attraversamento.

Se $C_n \geq C_c$, il programma pilota il motore del tavolino in modo da aumentare la distanza di lavoro della quantità P_a ; se $C_n < C_c$ il programma riporta il tavolino nella posizione iniziale.

Al termine della fase di lettura del campo in esame si hanno due vettori: il primo contiene la distanza di ciascun piano esaminato rispetto al piano zero; le distanze sono espresse in micron e sono date da $P_k = n \cdot P_a$; il secondo vettore contiene i valori C_n ricavati dall'analisi di ciascun piano.

Eseguita la trasformazione definita da:

$$\begin{aligned}
 y_n &= \frac{\log_{10} C_n}{\log_{10} C_{n\max}} \\
 x_n &= P_n^2
 \end{aligned} \tag{4}$$

si calcola mediante interpolazione lineare la retta $y(x)$ passante per i punti dati; successivamente vengono determinati:

il coefficiente di correlazione r

il valore x_1 per cui la funzione y_n assume il valore 0,01

il valore $z_{\max} = \sqrt{x_1}$.

Il primo passo dell'algoritmo (vedi eq.1) equivale alla derivata di un vettore L' ricavato dal vettore di acquisizione L mediante una media mobile calcolata su $D-1$ punti. Si ha infatti:

$$L_{i+D}-L_i = \left[L_i + L_{i+1} + L_{i+2} + \dots + L_{i+D-1} \right] - \left[L_{i+1} + L_{i+2} + L_{i+3} + \dots + L_{i+D} \right] \quad (5)$$

e i termini tra parentesi quadra corrispondono, a meno del fattore moltiplicativo $1/(D-1)$, alle medie calcolate sul vettore L_i a partire rispettivamente dall'indice i e dall'indice $i+1$.

L'esecuzione di una media mobile su $D-1$ punti equivale alla convoluzione del vettore con una finestra unitaria di larghezza $D-1$ e quindi al filtraggio mediante un filtro di tipo sinc; variando il valore del parametro D si varia la frequenza di taglio del filtro equivalente.

La differenza $d_i = L_{i+D}-L_i$ non dipende dunque né dalle variazioni a bassa frequenza presenti sul segnale di riga, causate dalla distribuzione del flusso di illuminamento o dalla vignettatura dei mezzi ottici, né dai transienti ad alta frequenza causati dal rumore dei vari componenti elettronici: i picchi contenuti nel segnale derivato dipendono sostanzialmente soltanto dalla presenza di cellule nel campo esaminato.

Nelle immagini acquisite all'aumentare delle profondità all'interno del filtro il contrasto delle cellule rispetto al fondo diminuisce e di conseguenza diminuisce anche il valore del segnale derivato d_i ; eseguendo il confronto di d_i con un valore decrescente al crescere della profondità si compensa la diminuzione di conteggio causata dalla degradazione dell'immagine acquisita.

In generale la distribuzione di particelle che si spostano con un processo casuale, così come avviene per la migrazione di cellule in filtri microporosi, può essere descritta mediante l'equazione di diffusione [6]; detta x la direzione di propagazione, al tempo T si ha in prima approssimazione :

$$P(x) = k \exp \frac{-x^2}{4dT} \quad (6)$$

dove k è una costante e d è il coefficiente di diffusione.

La curva gaussiana data dalla (6) si trasforma in una relazione lineare se si effettua il cambiamento di variabile $x' = x^2$ e si prende il logaritmo di $P(x)$. Si ha infatti:

$$\log P(x) = c - bx' \quad (7)$$

con $c = \log k$, $b = \log (4dT)$

Nel nostro caso al posto del valore della funzione di distribuzione $P(x)$ si ha il conteggio C_n eseguito nel piano n ; il logaritmo di C_n risulta così funzione lineare del quadrato della distanza x' .

La trasformazione fatta permette di calcolare la retta che meglio interpola i dati di misura secondo il criterio dei minimi quadrati. A causa della normalizzazione eseguita in (4) mediante la divisione per $\log_{10} C_{kmax}$ il termine c della (7) è normalmente nullo e la retta è caratterizzata sostanzialmente dalla pendenza b , che dipende a sua volta dal coefficiente di diffusione.

Per determinare la distanza massima raggiunta dalle cellule all'interno del filtro si prende come valore di riferimento un conteggio C_{min} eguale ad una determinata percentuale del conteggio massimo; si è scelto $C_{min} = 0,01 \cdot C_{nmax}$. Il programma calcola così per interpolazione o estrapolazione sui dati la coordinata x'_{max} per cui la funzione normalizzata $y(x')$ assume il valore 0,01; la profondità del piano finale è dunque data da $\sqrt{x'_{max}}$.

4. USO DEL PROGRAMMA MAC

Il dispositivo è gestito mediante il programma MAC (Misurazione Automatica della Chemiotassi). Il programma è scritto in linguaggio C e fa uso del Microsoft C compiler vers. 5.1 e della C Utility Library ESI; la dimensione del file sorgente è di circa 55 kbyte, mentre il programma in forma eseguibile occupa circa 135 kbyte di disco oltre a circa 22 kbyte per il file di configurazione dei parametri di default.

Per la visualizzazione dei dati alfanumerici e dei grafici il programma pilota una scheda VGA nella configurazione 640•480 punti e 16 colori, mentre la stampa dei risultati è ottenibile con una stampante a colori HP-Paintjet.

Il programma è suddiviso in sei fasi alcune delle quali devono necessariamente essere eseguite secondo una sequenza prestabilita mentre altre possono essere richiamate dall'operatore in una sequenza qualsiasi (vedi fig.15). Ad ogni fase corrispondono una o più funzioni svolte dal programma, richiamabili dall'operatore attraverso i tasti funzione presenti sulla tastiera del calcolatore.

All'interno di ogni funzione premendo il tasto <ESC> (escape) si causa l'immediata interruzione della funzione medesima con il risultato di riportare il programma al menù principale; all'interno di questo menù il tasto <ESC> permette di uscire dal programma e di ritornare nell'ambiente del sistema operativo MS-DOS.

Si descrive ora una generica seduta di lavoro analizzando le varie fasi di cui è composto il programma.

La fig.16 mostra il menù principale che si presenta all'operatore una volta che è stato attivato il programma.

Come primo passo deve essere eseguita necessariamente la fase di calibrazione del sistema richiamando tramite il tasto funzione <F1> il modulo "Calibrazione microscopio"; fino a quando l'operatore non effettua questa fase il programma non consente di eseguire il modulo di "Lettura" <F3> e di conseguenza neanche quelli di "Visualizzazione" <F4> e "Stampa del grafico dei risultati" <F5>; invece, i moduli "Inserimento dati anagrafici" <F6> e "Notizie sul programma" <F10> possono essere richiamati senza condizioni.

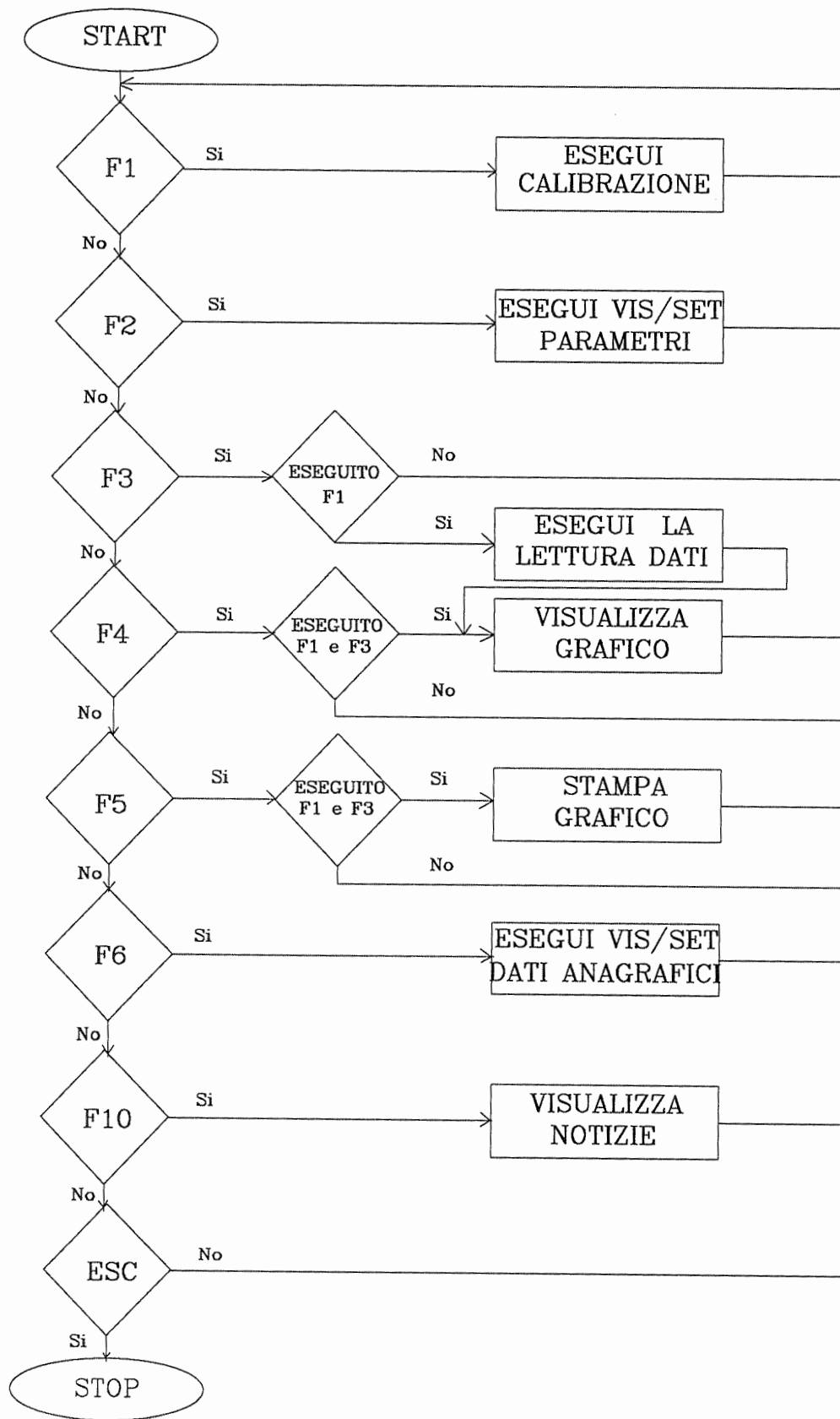


Fig. 15
26

Figura 16

CALIBRAZIONE MICROSCOPIO <F1>

Richiamando la funzione di calibrazione viene presentata all'operatore una maschera (vedi fig.17) in cui sono riportati alcuni messaggi che invitano ad eseguire i seguenti interventi manuali.

- 1) Mettere a fuoco sul piano superficiale del filtro (piano zero) e regolare l'intensità della lampada in modo che il segnale video non vada in saturazione.
- 2) Rotare la manopola di spostamento del tavolino in modo da mettere a fuoco un piano del filtro in cui non sono presenti cellule.

Figura 17

- 3) Modificare eventualmente i dati relativi alla distanza derivata ed alla soglia finale. Per modificare questi parametri si deve:
 - posizionare tramite i tasti cursore la freccia tratteggiata fino all'altezza della riga che riporta il valore del parametro stesso;
 - premere il tasto <return> invio;
 - immettere il nuovo valore e premere il tasto <return> .I valori possibili per questi parametri sono :
 - D = Distanza derivata da 1 a 32
 - T_m = Soglia finale da 0 a 255
- 4) Iniziare la lettura di calibrazione premendo il tasto funzione <F10>; tramite il tasto <ESC> è possibile annullare la fase di calibrazione in qualsiasi momento, in questo caso però il programma ritiene il sistema non calibrato e di conseguenza non permette misurazioni.

Mediante la lettura di calibrazione viene rilevato il rumore di fondo del sistema C_c , causato da eventuali impurità presenti sulla superficie sensibile della telecamera oppure nel campo inquadrato: con questa misura viene ricavato un valore di soglia usato per determinare la presenza o l'assenza di GN.

Al termine della fase di calibrazione l'operatore deve mettere a fuoco il piano zero.

DEFINIZIONE PARAMETRI <F2>

Una volta effettuata la calibrazione si possono eventualmente variare i parametri usati nella fase di misurazione.

Premendo il tasto funzionale <F2> compare sul video una maschera contenente i seguenti parametri (vedi fig.18) .

Passo di avanzamento. Questo parametro definisce la distanza in mm tra due successivi piani di lettura. I valori possibili di P_a variano da 1 a 999; il valore di default è uguale a 20.

Soglia iniziale. E' il parametro usato per calcolare il valore di soglia per il conteggio fatto nel primo piano di lettura (piano zero); i valori possibili di T_0 vanno da 0 a 255; il valore di default è uguale a 34.

Percentuale 1^a riduzione soglia. E' il parametro usato per calcolare il valore di soglia per il conteggio fatto nel secondo piano di lettura. I valori possibili di P_1 vanno da 0 a 100; il valore di default è uguale a 23.

Percentuale riduzione soglia. E' il parametro usato per calcolare il valore di soglia per il conteggio fatto nei piani successivi al secondo; i valori possibili di P_2 vanno da 0 a 100; il valore di default è uguale a 14.

Figura 18

Numero di campi. Questo parametro definisce il numero dei campi sui quali si intende effettuare una sequenza completa di letture: nel caso di scelta superiore a 1 il valore della lettura è costituito per ciascun piano dalla media ricavata dai risultati ottenuti in ciascun campo. I valori possibili per questo parametro vanno da 1 a 99; il valore di default è uguale a 1.

Display dati immagine. Questo parametro può assumere i valori SI o NO. Se il suo valore è uguale a SI sia in fase di calibrazione <F1> che in quella di lettura <F3> sul video pittorico oltre all'immagine ripresa direttamente dalla telecamera viene mostrata anche l'immagine di sintesi costruita durante l'elaborazione. Viceversa se si imposta il valore del parametro uguale a NO vengono mostrate soltanto le immagini acquisite per ciascun piano di misurazione.

I parametri vengono modificati con la stessa modalità descritta per la funzione <F1>; mediante il tasto <F10> è possibile ripristinare i valori di default.

LETTURA <F3>

È la fase in cui viene fatta la misurazione dei GN, utilizzando i parametri impostati nella fase di calibrazione <F1> e un software che controlla il movimento del tavolino portavetrini del microscopio.

Ciascuna riga viene scandita facendo una differenza mobile tra i valori di una coppia di pixel posti alla distanza definita dal parametro "Distanza derivata" e incrementa un contatore quando tale differenza supera il valore della soglia attuale; inoltre, se il parametro "Display immagine" è stato impostato eguale a SI, sul video pittorico viene costruita un'immagine con pixel colorati in rosso quando tale differenza supera il valore della soglia attuale e con pixel colorati in blu altrimenti.

Terminata la scansione dell'immagine del piano attuale il programma fa avanzare il tavolino del microscopio del valore "Passo di avanzamento" e ripete l'operazione di scansione sopra descritta; questo processo di scansione e di avanzamento viene iterato fino a quando il conteggio ottenuto nel piano in esame non risulta inferiore od uguale al valore Cc trovato in fase di calibrazione.

Durante questo processo l'operatore può seguire sul video VGA l'andamento della misurazione nei vari piani leggendo il valore della misurazione ottenuta su ogni singolo piano del campo in esame; inoltre può interrompere in qualsiasi momento la misurazione e ritornare al menu principale tramite il tasto <ESC>.

Se il parametro "Numero dei campi" (vedi <F2>) è stato impostato ad un valore maggiore di uno, alla fine della fase di lettura il programma richiede l'intervento dell'operatore che deve traslare il tavolino portavetrini in modo da inquadrare il piano zero del nuovo campo.

Al termine della fase di lettura il programma presenta su video alfanumerico i risultati descritti in <F4>.

Figura 19 - Esempio di stampa delle misurazioni eseguite.

VISUALIZZAZIONE GRAFICO RISULTATI <F4>

È la fase che permette di vedere sul video alfanumerico la tabella dei valori di misura, il grafico dei conteggi in funzione del piano di lettura e l'insieme dei dati anagrafici del paziente; vengono inoltre mostrati il valore del piano calcolato mediante l'eq. (4 ed il valore del coefficiente di correlazione r sui dati di misura: r è un indice delle

normalità dei dati di lettura e vale 1 quando le misure in funzione delle distanza hanno un andamento di tipo gaussiano.

La fase di visualizzazione può essere attivata soltanto se è stata eseguita almeno una misurazione; da questa fase si può ritornare al menù principale premendo il tasto <ESC>.

STAMPA GRAFICO RISULTATI <F5>

È la fase che permette di copiare su carta la maschera mostrata sul video alfanumerico con la funzione <F4>: la figura 19 mostra un esempio di stampa.

Mentre avviene la stampa, che può essere interrotta in qualsiasi momento con la pressione del tasto <ESC>, il grafico è visualizzato anche sul video VGA.

INSERIMENTO DATI ANAGRAFICI <F6>

La fig. 20 riporta la maschera che viene presentata sul video alfanumerico per inserire i dati anagrafici del paziente.

La lunghezza dei campi dipende dalla domanda e varia da 1 carattere alfanumerico, relativo al sesso, fino a 25 per il nominativo; il codice rmig viene usato per identificare la funzione di migrazione random, mentre il codice smig identifica la migrazione stimolata.

Mediante il tasto <F10> è possibile annullare tutti i dati inseriti precedentemente.

Misurazione automatica della funzione chemiotattica (Rev. 1.0)

Figura 20

5. RISULTATI

Sono state eseguite numerose prove di lettura di filtri al fine di determinare i valori dei parametri del programma che danno i risultati di misura più attendibili.

In una prima fase i risultati ottenuti al variare di uno dei parametri di acquisizione sono stati confrontati coi risultati delle letture in microscopia diretta (CPC).

In particolare, sono stati eseguiti 99 test variando il valore del parametro "derivata", e del parametro "soglia". Per quanto riguarda la derivata si è determinato che il valore 3 fornisce la migliore correlazione con le letture dirette. Per quanto concerne il valore di soglia si è trovata la variazione in funzione della profondità di lettura che meglio si accorda col tipo di telecamera impiegata e col valore di ingrandimento ottico usato (vedi figure 21 e 22).

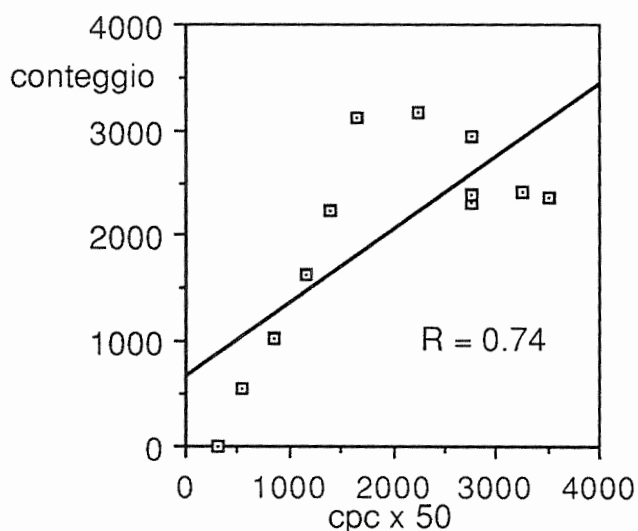


Fig. 21 - Diagramma scatter del conteggio ottenuto col programma MAC rispetto alla lettura ottica cpc. Sono stati usati i seguenti parametri: Soglia iniziale = 36, prima riduzione soglia = 10%, successiva riduzione soglia = 10%. Si ha un coefficiente di correlazione $r = .74$

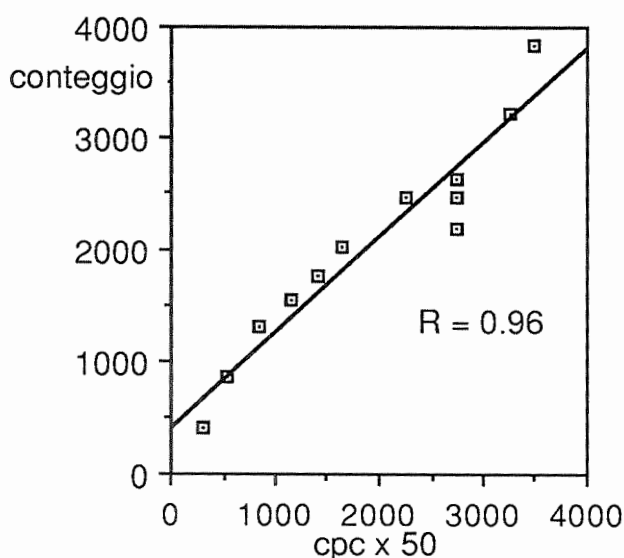


Fig. 22 - Diagramma scatter del conteggio rispetto alla lettura ottica cpc sullo stesso campo della fig. 21. Sono stati usati i seguenti parametri: Soglia iniziale = 36, prima riduzione soglia = 17%, successiva riduzione soglia = 7%. Si ha un coefficiente di correlazione $r = .96$.

In base alle esperienze condotte sono stati determinati i seguenti valori dei parametri. Con passo di avanzamento di $10 \mu\text{m}$ il valore iniziale di soglia è di 36; la prima riduzione di soglia è del 17% e le successive del 7%.

Si è inoltre verificato che le letture eseguite con passo di avanzamento di $20 \mu\text{m}$ sono sostanzialmente sovrapponibili a quelle fatte con passo di avanzamento di $10 \mu\text{m}$ (vedi figure 23 e 24).

In questo caso il valore iniziale di soglia è ancora 36 e le riduzioni sono del 23% per il secondo piano di lettura e del 14% per i piani successivi. In entrambi i casi il valore minimo di soglia è 15.

Figura 23 - Grafico del conteggio in funzione della distanza con passo di avanzamento di $10\ \mu\text{m}$

Figura 24 - Grafico del conteggio in funzione della distanza con passo di avanzamento di $20\ \mu\text{m}$ sullo stesso campo della figura 23 Il coefficiente di correlazione calcolato col test di Pearson tra questi dati di lettura e quelli corrispondenti di figura 23 è $r=0,999$.

Per controllare la stabilità del sistema e la ripetibilità delle misure sono state eseguite rilevazioni dello stesso campo in giorni diversi regolando ogni volta l'intensità della sorgente luminosa (vedi figure 25 e 26)

Figura 25 - Grafico del conteggio in funzione della distanza con passo di avanzamento di 20 μm .

Figura 26 - Grafico del conteggio sullo stesso campo di figura 25 eseguito a 48 ore di distanza.

In una seconda fase di prove è stato riscontrato l'accordo tra l'andamento delle misure in funzione della profondità e il comportamento definito dal modello citato; le figure 27 e 28 riportano due esempi. I dati di lettura sono stati normalizzati mediante divisione per il massimo valore di conteggio ed è stato preso il logaritmo decimale dei risultati; i grafici mostrano l'interpolazione lineare tra i valori del logaritmo dei conteggi e i valori dei quadrati delle distanze dei piani di misura; i coefficienti di correlazione delle rette interpolanti rispetto ai dati valgono rispettivamente $r = 0,99$ e $r = 1$.

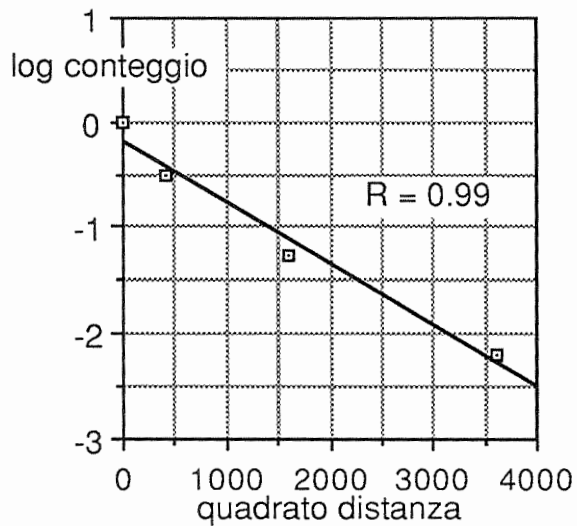


Figura 27 - Grafico del logaritmo decimale dei conteggi in funzione del quadrato della distanza ricavati su un campo con 4 piani di lettura e con passo di 20 μm .

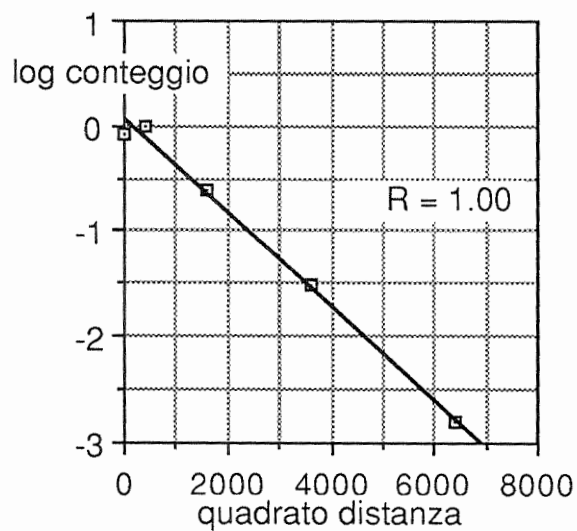


Figura 28 - Grafico del logaritmo decimale dei conteggi in funzione del quadrato della distanza ricavati su un campo con 5 piani di lettura e con passo di 20 μm

6. CONCLUSIONI

In conclusione, la procedura descritta per la misurazione automatica della chemiotassi di GN ha dimostrato caratteristiche di attendibilità e riproducibilità, nonché di rapidità e di completezza rispetto alle procedure tradizionali.

Infatti, il semplice algoritmo per l'analisi delle immagini acquisite, pur non eseguendo né un riconoscimento di oggetti, né un vero e proprio conteggio, fornisce dei risultati che risultano statisticamente validi e sovrapponibili a quelli ricavati mediante il conteggio diretto.

Inoltre, la procedura realizzata è in grado di fornire maggiori informazioni rispetto a quelle ricavate con la tecnica tradizionale: può eseguire conteggi ripetuti e mediati su ciascun piano di lettura in campi di ripresa decisamente maggiori di quelli valutabili con lettura diretta; ricava l'andamento del conteggio in funzione della profondità, il che consente di valutare la cinetica di migrazione; determina un valore di distanza di migrazione valutato non in maniera soggettiva ma mediante un calcolo matematico su dati statisticamente validi; fornisce un indice che esprime la differenza della cinetica misurata da quella attesa in base a un modello teorico; può indicare la presenza di comportamenti anomali attribuibili a artefatti dipendenti dai limiti insiti nella metodica dei filtri microporosi.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Sig.ra Marirosa Ballati che ha curato la redazione del testo.

7. RIFERIMENTI

- 1) Boyden S., The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J.exp.Med.* 115, 453, 1962.
- 2) Maderazo E.G., Woronick C.L. A modified micropore filter assay of human granulocyte leukotaxis. In "Leukocyte chemotaxis" (J.I.Gallin and P.G.Quie eds.), Raven Press, 1978.
- 3) Zigmond S.H., Hirsch J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis: new methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J.Exp.Med.* 137, 387, 1973.
- 4) Keller H., Wissler J.H., Damerau B., Hess M.H., Cottier H. The filter technique for measuring leukocyte locomotion in vitro. Comparison of three modifications. *J.Immunol.Methods*, 36, 41, 1980.
- 5) Gallin J.I., Clark R.A., Kimball H.R. Granulocyte chemotaxis: an improved in vitro assay employing ⁵¹Cr-labelled granulocytes. *J.Immunol.* 110, 233, 1973.
- 6) Zigmond S.H. A model for understanding millipore Filter Assay System. In "Leukocyte chemotaxis" (J.I.Gallin and P.G.Quie eds.), Raven Press, 1978.
- 7) Azzarà A., Ambrogi F., Azzarelli L., Chimenti M., Salvetti O. Studio di fattibilità per una valutazione automatica della funzione chemiotattica di granulociti neutrofili umani. IEI-B422, 1989.
- 8) Azzarelli L., Ballati M., Chimenti M., Giorgi C.A., Pardi L. Microfotometro MFA/36: Manuale tecnico. IEI-B4-15, 1990.