

И. С. ГУМЕНЮК^{1,3}, Т. В. ГАЙВОРОНСКАЯ³, С. Е. ГУМЕНЮК⁴, О. А. КАЧАНОВА²,
С. К. ШАФРАНОВА³, Е. А. ГУБАРЕВА¹, А. С. СОТНИЧЕНКО¹, Е. В. КУЕВДА¹

ОЦЕНКА ТЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ ГНОЙНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ С ПОМОЩЬЮ АЛГОРИТМОВ КОМПЬЮТЕРНОГО АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ

¹Лаборатория фундаментальных исследований в области регенеративной медицины;

²кафедра микробиологии;

³кафедра хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии;

⁴кафедра хирургии педиатрического и стоматологического факультетов

ГБОУ ВПО «КубГМУ» Минздрава России;

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. E-mail: meklon@gmail.com

В данном исследовании были изучены алгоритмы автоматического анализа изображения, реализованные на базе ПО Cellprofiler. В качестве образца для проведения анализа были взяты мазки агаровой культуры *Staphylococcus aureus*. Предложенные алгоритмы распознавания микробных тел были верифицированы и показали значительно большую эффективность по сравнению с визуальным методом подсчета специалистом лаборатории.

Ключевые слова: компьютерный анализ изображения, Cellprofiler, гнойные заболевания, цитологический анализ.

**I. S. GUMENYUK^{1,3}, T. V. GAIVORONSKAYA³, S. E. GUMENYUK⁴, O. A. KACHANOVA²,
S. K. SHAFRANOVA³, E. A. GUBAREVA¹, A. S. SOTNICHENKO¹, E. V. KUEVDA¹**

ESTIMATION OF THE CURRENT OF SHARP PURULENT INFLAMMATORY PROCESSES BY MEANS
OF ALGORITHMS OF THE COMPUTER ANALYSIS OF IMAGES

¹Laboratory of basic research in the field of regenerative medicine;

²department of microbiology;

³department of oral and maxillofacial surgery;

⁴department of surgery of stomatological and pediatric faculties

Kuban state medical university of the Ministry of health care of Russia,

Russia, 350063, Krasnodar, Sedina str., 4. E-mail: meklon@gmail.com

The study describes the automatic algorithm for image analysis based on software Cellprofiler. For the main example of the principal implementation of the analysis process agar culture swabs of *Staphylococcus aureus* were taken. The proposed algorithms of recognition of microbial elements were verified and showed a significantly higher efficiency compared to the visual method of counting by the laboratory specialist.

Key words: computer image analysis, Cellprofiler, purulent disease, cytological analysis.

Введение

Цитологический анализ раневого экссудата является источником объективных данных о течении раневого процесса, иммунобиологических параметрах и активности протекания репаративных процессов [1, 3].

Одним из общепринятых способов проведения цитологического анализа является визуальный метод подсчета [6, 10], основанный на анализе мазка-отпечатка врачом лаборатории после стандартной пробоподготовки. При этом достоверные интервалы позволяют оценить общую степень бактериальной обсемененности

препарата с заданной погрешностью. При увеличении объема выборки предельная ошибка снижается, что позволяет уменьшить доверительный интервал для заданной вероятности. Согласно проведенным исследованиям для получения статистически достоверных результатов при визуальном анализе достаточно определения 100–200 клеток в одном мазке [6, 7]. Большее количество объектов, распознанных при одномоментном анализе, может ухудшить качество полученных результатов вследствие увеличения оператор-зависимых ошибок на фоне утомления специалиста лаборатории [4].

При этом задачи по подсчету количества микробных тел являются наиболее сложными для человека-оператора из-за большого количества объектов и вследствие этого выполняются в виде субъективной оценки степени обсемененности. Другой проблемой визуального метода является плохая масштабируемость методики. Значительное увеличение точности подсчета или количества анализов, выполняемых в течение рабочего дня, невозможно без значительного увеличения количества сотрудников лаборатории.

При использовании автоматических алгоритмов цитологические исследования становятся значительно доступнее, так как могут быть использованы для обработки как единичных снимков, так и серий изображений, состоящих из нескольких тысяч образцов. Именно поэтому разработка алгоритмов для компьютерного анализа изображения является очень актуальной. Дополнительные преимущества появляются при использовании ПО с открытым исходным кодом, что дает близкую к нулю стоимость внедрения и разработки.

Целью нашего исследования стали создание эффективных алгоритмов для подсчета микробных тел в мазках, оценка достоверности полученных результатов, а также разработка требований к исходным изображениям для максимальной эффективности алгоритма.

Материалы и методы

Для первичной разработки алгоритмов и их верификации была проведена серия синтетических тестов на чистой бактериальной культуре. Это позволило исключить влияние побочных факторов. Биоматериал, полученный от пациентов, представляет собой многокомпонентную неоднородную смесь фибрина, слизи, раневого детрита и других загрязняющих факторов. Первичная верификация предложенного алгоритма в данных условиях будет затруднена.

В качестве образцов были выбраны мазки агаровой культуры *Staphylococcus aureus* как одного из наиболее частых возбудителей, присутствующих во флегмонах челюстно-лицевой области [2, 5]. Мазки наносились на стерильные предметные стекла, после чего производилась фиксация термическим методом. После фиксации проводилось окрашивание по Граму по стандартному протоколу. Полученные препараты оцифровывались с помощью встроенной камеры микроскопа «Olympus IX-51» методом иммерсионной микроскопии (объектив x100, окуляр x10). Полученные файлы сохранялись в формате TIFF с 16-битным диапазоном в цветовом пространстве sRGB [8]. Выбранный формат имел ряд преимуществ: TIFF (Tagged Image File

Format) позволяет хранить растровые изображения со сжатием без потери качества с глубиной цвета 8, 16, 32 и 64 бит на канал. В отличие от распространенного 8-битного формата (256 значений на каждый из каналов) 16-битный формат позволяет отобразить 65 536 (2¹⁶) значений для красного, синего и зеленого каналов соответственно. Это значительно расширяет динамический диапазон и позволяет улучшить качество распознавания объектов и их сегментацию от фона.

Для разработки алгоритма было выбрано программное обеспечение с открытым исходным кодом – CellProfiler, которое позволяет создавать индивидуальные алгоритмические последовательности пакетной обработки изображений, оптимизированных под конкретное применение.

ПО работает с применением метода «pipeline», который представляет собой последовательность модулей, применяемых к исходному изображению [7]. Модули выполняются строго в заданной последовательности и могут выполнять как функции модификации самого изображения, так и функции выделения объектов по заданным параметрам, статистическую обработку, а также ряд других функций. Процесс обработки изображений выполнялся в три основных этапа: преобразование цветного изображения в градации серого, идентификация объектов, сохранение результатов в отдельные файлы.

На первом этапе производилось преобразование трех цветовых каналов исходного изображения в один с 16-битной глубиной. Затем производилась инверсия изображения, так как ПО было изначально разработано для иммунофлюоресцентных методов исследования и рассчитано на поиск светлых объектов на темном фоне.

На следующем этапе производилось выделение микробных тел в качестве первичных объектов с помощью классификатора «Identify Primary Objects». В качестве критериев для классификации объекта использовались линейные размеры, округлость и непрерывность формы, пороговая интенсивность окраски. В качестве глобальной стратегии поиска порогового значения интенсивности применялся адаптивный вариант, включающий в себя разбиение общего изображения на отдельные сегменты и вычисление средней интенсивности для каждого из них. Такой метод позволяет отделять объект от фона в случае неравномерности освещенности и окрашивания в рамках одного снимка. В качестве базового алгоритма классификации применялся алгоритм Otsu [9], согласно которому пиксели разделяются на два класса относительно такого порогового значения, при котором внутриклассовая дисперсия была минимальной.

После составления и калибровки алгоритма производилась автоматическая обработка серии изображений, полученных вышеупомянутым методом. Основными требованиями к исходным изображениям были: однородность, отсутствие явных артефактов и посторонних включений, равномерность освещения поля зрения, одинаковый масштаб изображения, максимально возможная однородность по качеству окрашивания. При соблюдении всех требований ложноположительные и ложноотрицательные ошибки алгоритма были минимальны.

На последнем этапе производились сохранение полученных данных в отдельный файл с табличной структурой, сохранение изображений с распознанными объектами.

Результаты и обсуждение

Нами был разработан алгоритм обработки изображения, предназначенный для автома-

тельном анализе количестве в 100–200 клеток итоговый результат представляется сомнительным с точки зрения статистической достоверности. После автоматической обработки для каждой микрофотографии были получены следующие изображения и данные: карта распределения распознанных объектов в условных цветах, исходный образец с наложенными контурами распознанных объектов и сводная таблица, содержащая данные по количеству объектов и времени выполнения каждого из этапов автоматического анализа (рис. 1).

Для верификации алгоритма было решено взять образец с максимальным количеством объектов (3983 микробных тела), так как это представлялось достаточным с точки зрения статистической достоверности [6]. Для этих целей было использовано производное исходного изображения с наложением контуров объектов (рис. 2).

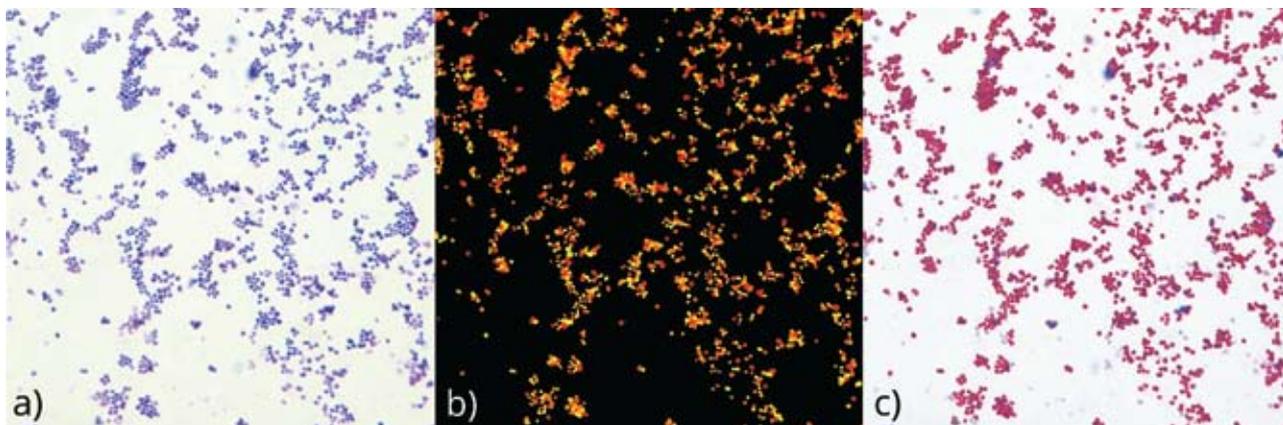


Рис. 1. Результаты автоматического анализа изображения: а) фрагмент микрофотографии мазка культуры *Staphylococcus aureus*; б) распознанные алгоритмом объекты в условных цветах; в) исходное изображение с наложенными контурами объектов

тизированного анализа мазков, содержащих кокковую микрофлору. Было обработано 6 случайно выбранных полей зрения для одного образца. Было установлено, что среднее время обработки одного изображения составило 11,28 секунды ($\sigma=1,04$) при выполнении расчетов на ПК с процессором «Intel Pentium G630, 2.70GHz». При этом количество параллельно обрабатываемых образцов равно количеству потоков (ядер) центрального процессора. В нашем эксперименте подсчет клеток производился на двух изображениях одновременно. Среднее количество микробных тел составило 2177 ($\sigma=1181$). Следует принять во внимание, что дисперсия для данной выборки оказалась значительной даже с учетом того, что подсчет проводился на 6 случайных полях зрения, а общее число распознанных объектов составило 13 063. Для традиционно принятого при визу-

Это позволило ускорить оценку ложноположительных и ложноотрицательных срабатываний алгоритма. Ложноположительных случаев

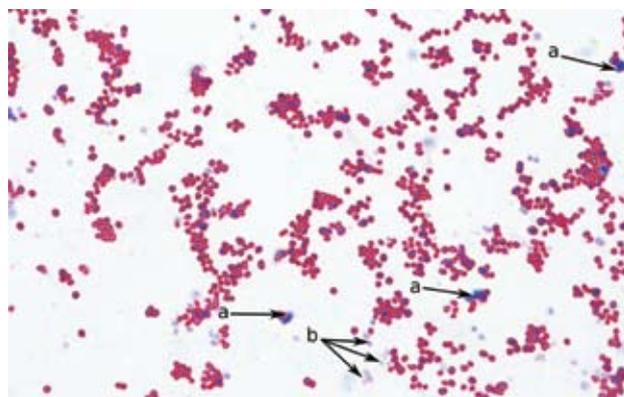


Рис. 2. а – крупные скопления объектов с трудноразличимыми границами; б – объекты вне фокуса

распознавания микробных тел выявлено не было. Ложноотрицательные были условно разделены на два класса: ошибки в идентификации размытых объектов, находящихся вне фокуса, и ошибки в идентификации объектов, образовавших крупные скопления без визуально различимых границ между ними. Было проанализировано поведение человека-оператора в случае обнаружения аналогичных объектов при анализе мазков. В случае расфокусированных фрагментов изображения человек отбрасывает их при подсчете, так как нет уверенности в точной идентификации таких образований. В случае обнаружения крупных скоплений интерпретация их количественного и качественного состава является субъективным заключением человека и может ухудшать итоговую точность из-за повышенного риска оператор-зависимых ошибок. Таким образом, немногочисленные ложноотрицательные ошибки анализа, выявленные при верификации алгоритма, не оказывают значимого влияния на достоверность итогового результата.

Таким образом, применение разработанных нами алгоритмов автоматизированной обработки изображения в значительной степени позволит снизить трудоемкость рутинных операций сотрудников лаборатории, а также выполнить большие объемы исследований в краткие сроки. Внедрение данной технологии в клиническую практику в перспективе позволит в значительной степени улучшить качество лабораторных исследований и высвободить человеческие ресурсы для осуществления других задач медицинской лаборатории, которые не могут быть выполнены компьютером. Применение автоматизированных алгоритмов для изучения зависимости между течением раневого процесса и степенью бактериальной обсеменности, а также количеством фагоцитированных микробных тел и концентрацией иммунокомпетентных клеток в гнойной ране является перспективным направлением для проведения дальнейшего исследования.

Из других положительных моментов автоматизации можно отметить отсутствие влияния субъективного человеческого фактора, а также нивелирование фактора утомляемости персонала, что позволяет использовать аналитический ком-

плекс в круглосуточном режиме. Из выявленных недостатков следует отметить большую требовательность ПО к качеству и однородности исходных изображений по сравнению с визуальным методом исследования. В то же время необходимо учитывать, что значительное ухудшение снимков также будет негативно отражаться на результатах работы человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бачманов А. Е. Цитологическое исследование ран у больных гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей / А. Е. Бачманов, К. В. Клейн // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2009. – № 11. – С. 118–120.
2. Гарайшин Р. М. Микробиологическая характеристика одонтогенных флегмон челюстно-лицевой области // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – Т. 4. № 2. – С. 46–48.
3. Гуменюк С. Е., Бабичев С. А., Евглевский А. А., Бондаренко С. И., Гуменюк С. И Компьютерный анализ изображения в клинической медицине // Кубанский научный медицинский вестник. – 1999. – № 4–5. – С. 27–28.
4. Саблина А. А. Стрессовые гранулы в клетках с интактными или разрушенными микротрубочками: анализ с помощью нового алгоритма обработки видеоизображений / А. А. Саблина, Е. М. Чудинова, Е. С. Надеждина, П. А. Иванов // Цитология. – 2012. – Т. 54. № 7. – С. 5.
5. Черченко Н. Н. Одонтогенные остеофлегмоны дна полости рта и топографо-анатомические векторы их распространения / Н. Н. Черченко, Л. И. Тесевич // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2015. – № 2 (14).
6. Hyun B. H. Differential leukocyte count: manual or automated, what should it be? / B. H. Hyun, G. L. Gulati, J. K. Ashton // Yonsei med. j. – 1991. – V. 32. № 4. – P. 283.
7. Lamprecht M. R. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis / M. R. Lamprecht, D. M. Sabatini, A. E. Carpenter // Biotechniques. – 2007. – V. 42. № 1. – P. 71–75.
8. Vakil N. A prospective, controlled trial of eight-bit, 16-bit, and 24-bit digital color images in electronic endoscopy / N. Vakil, K. Bourgeois // Endoscopy. – 1995. – V. 27. № 8. – P. 589–592.
9. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms // Automatica. – 1975. – Т. 11. № 285–296. – P. 23–27.
10. Pierre R. V Peripheral blood film review: the demise of the eyecount leukocyte differential // Clin. lab. med. – 2002. – Т. 22. № 1. – P. 279–297.

Поступила 21.10.2015