

Letture automatizzata dei vetrini in ematologia

Giorgio Da Rin

Convegno Regionale SIBioC
Emilia Romagna 2018



Topics
in medicina di laboratorio

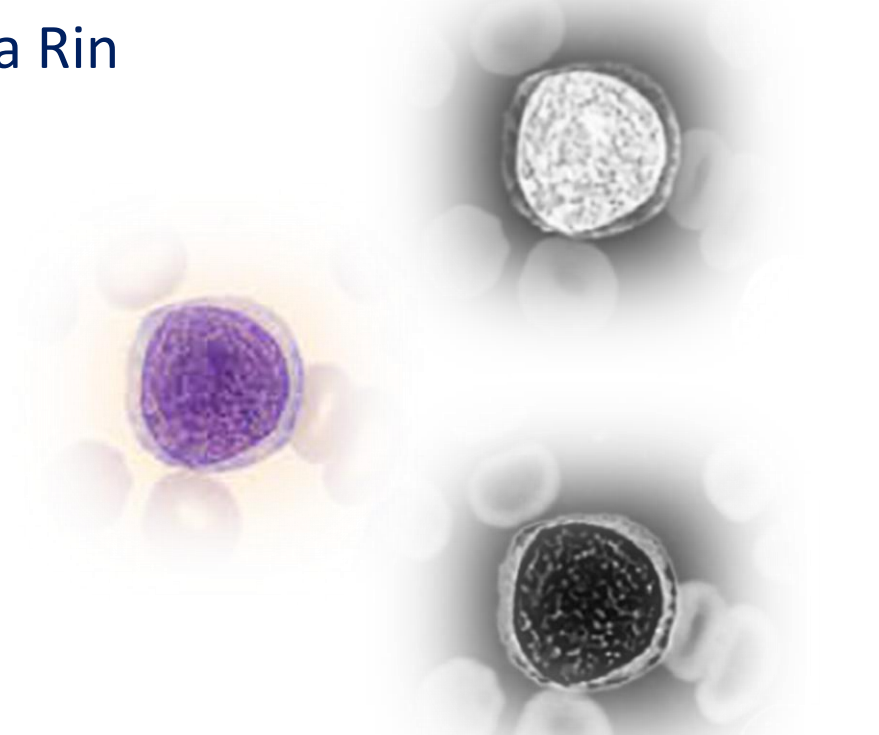
Bologna

30 novembre 2018

Aula Cesari c/o AVIS Ospedale Maggiore

10.00 - 17.00

Via dell'Ospedale, 20





Per quanto concerne i moderatori, relatori, formatori, tutor, docenti è richiesta dall'Accordo Stato-Regioni vigente, apposita dichiarazione esplicita dell'interessato, di trasparenza delle fonti di finanziamento e dei rapporti con soggetti portatori di interessi commerciali relativi agli ultimi due anni, La documentazione deve essere disponibile presso il Provider e conservata per almeno 5 anni.

SLIDE N.2

Il sottoscritto

Nome _____ **Giorgio** _____ Cognome _____ **Da Rin** _____

Dichiara sotto la propria responsabilità che nella Relazione dal titolo

Lettura automatizzata dei vetrini in ematologia

Saranno citati i seguenti nomi di Aziende e/o prodotti commerciali:

Cella Vision DM 96, Di 60, Cobas m 511

IN QUANTO DA CONSIDERARSI UNICI ED INDISPENSABILI SECONDO LE ACQUISIZIONI SCIENTIFICHE PIU' AUTOREVOLI ED ACCREDITATE



Per quanto concerne i moderatori, relatori, formatori, tutor, docenti è richiesta dall'Accordo Stato-Regioni vigente apposita dichiarazione esplicita dell'interessato, di trasparenza delle fonti di finanziamento e dei rapporti con soggetti portatori di interessi commerciali relativi agli ultimi due anni dalla data dell'evento. La documentazione deve essere disponibile presso il Provider e conservata per almeno 5 anni.

Dichiarazione sul Conflitto di Interessi

Il sottoscritto _____ **Giorgio Da Rin** _____ in qualità di:

- responsabile scientifico moderatore docente relatore

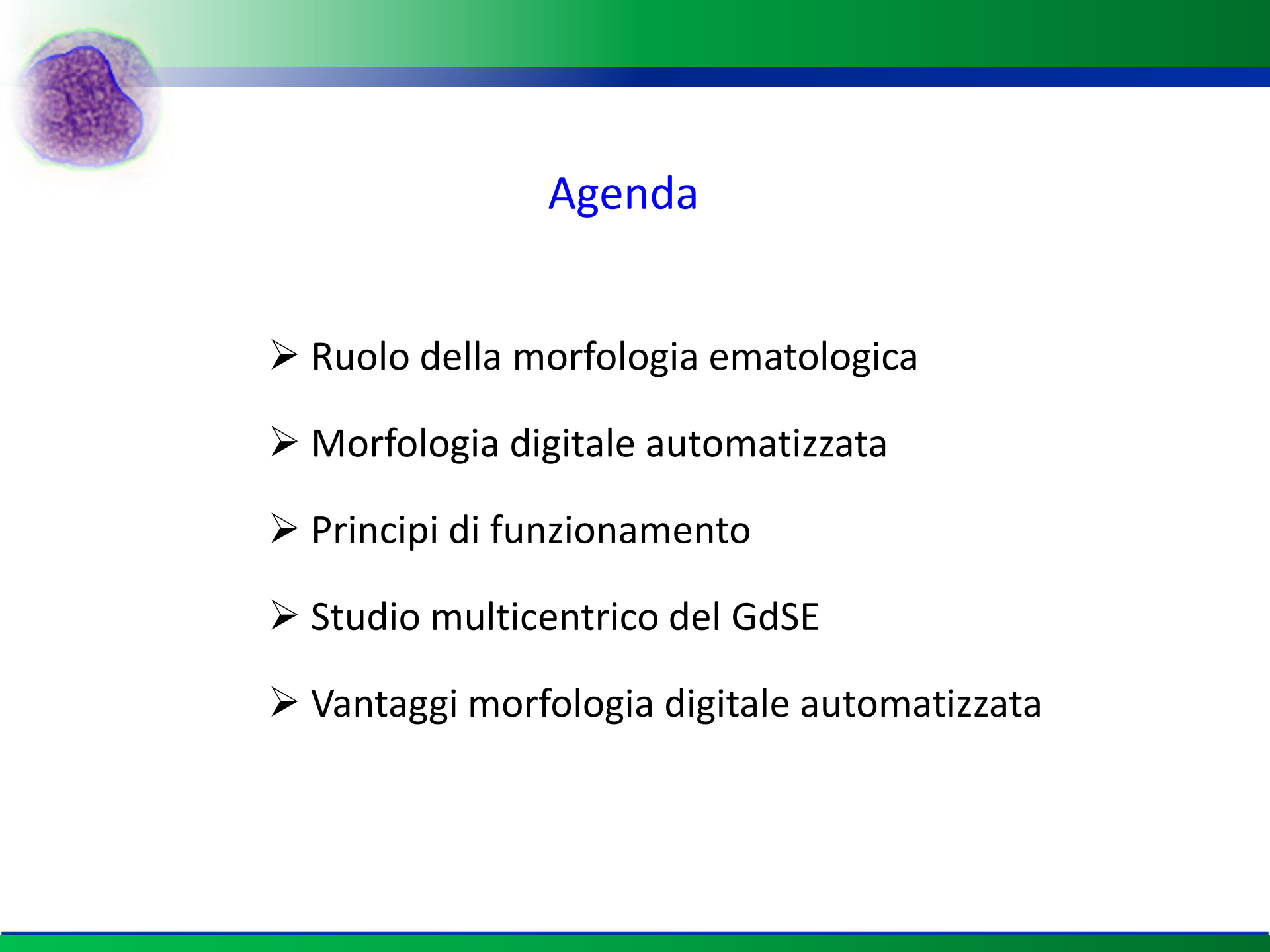
dell'evento **“Topics in medicina di laboratorio ”**

da tenersi per conto di **SIBioC – Medicina di Laboratorio**

ai sensi dell'Accordo Stato-Regione in materia di formazione continua nel settore “Salute” (Formazione ECM) vigente,

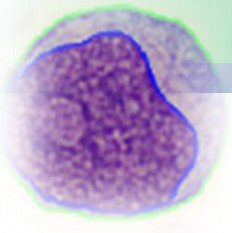
Dichiara

- che negli ultimi due anni NON ha avuto rapporti anche di finanziamento con soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario
- che negli ultimi due anni ha avuto rapporti anche di finanziamento con soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario (indicare quali):



Agenda

- Ruolo della morfologia ematologica
- Morfologia digitale automatizzata
- Principi di funzionamento
- Studio multicentrico del GdSE
- Vantaggi morfologia digitale automatizzata



Ruolo della morfologia

Nel sistema di classificazione WHO 2016 la morfologia delle cellule tumorali, insieme all'immunofenotipo, alla citogenetica e alla genetica molecolare, rimane essenziale nella definizione delle entità della malattia

THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

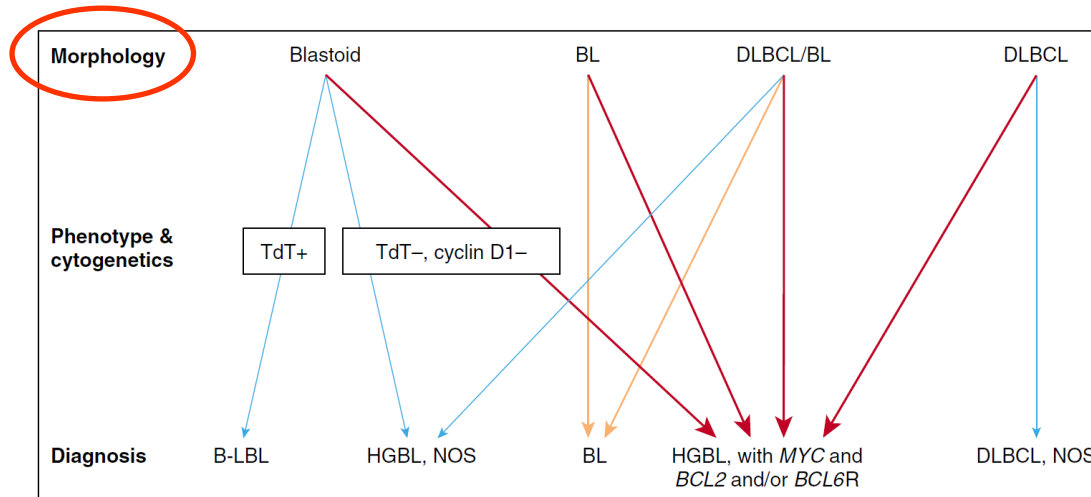
The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia

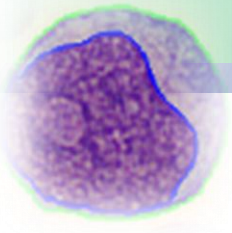
Daniel A. Arber,¹ Attilio Orazi,² Robert Hasserjian,³ Jürgen Thiele,⁴ Michael J. Borowitz,⁵ Michelle M. Le Beau,⁶ Clara D. Bloomfield,⁷ Mario Cazzola,⁸ and James W. Vardiman⁹

THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms

Steven H. Swerdlow,¹ Elias Campo,² Stefano A. Pileri,³ Nancy Lee Harris,⁴ Harald Stein,⁵ Reiner Siebert,⁶ Ranjana Advani,⁷ Michele Ghielmini,⁸ Gilles A. Salles,⁹ Andrew D. Zelenetz,¹⁰ and Elaine S. Jaffe¹¹





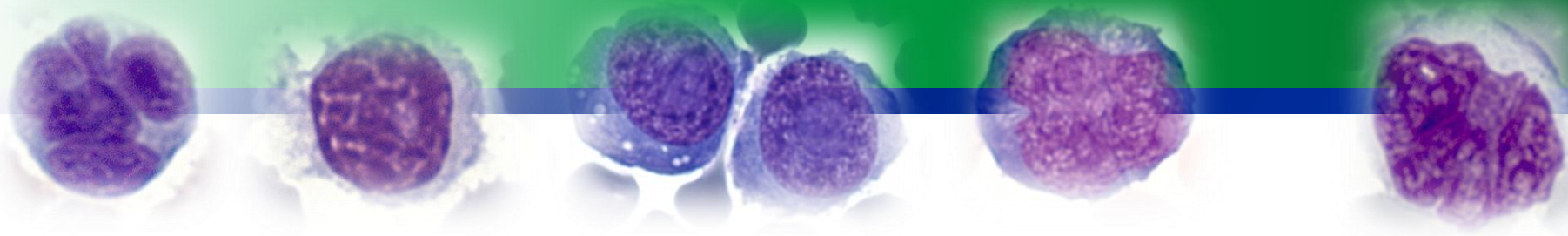
Ruolo della morfologia

Nonostante la morfologia del sangue periferico abbia un ruolo significativo nella diagnostica, non ci sono valori oggettivi per la definizione delle variabili citologiche. Le caratteristiche citologiche distintive delle cellule del sangue sono soggettive e influenzate dall'interpretazione dell'operatore.

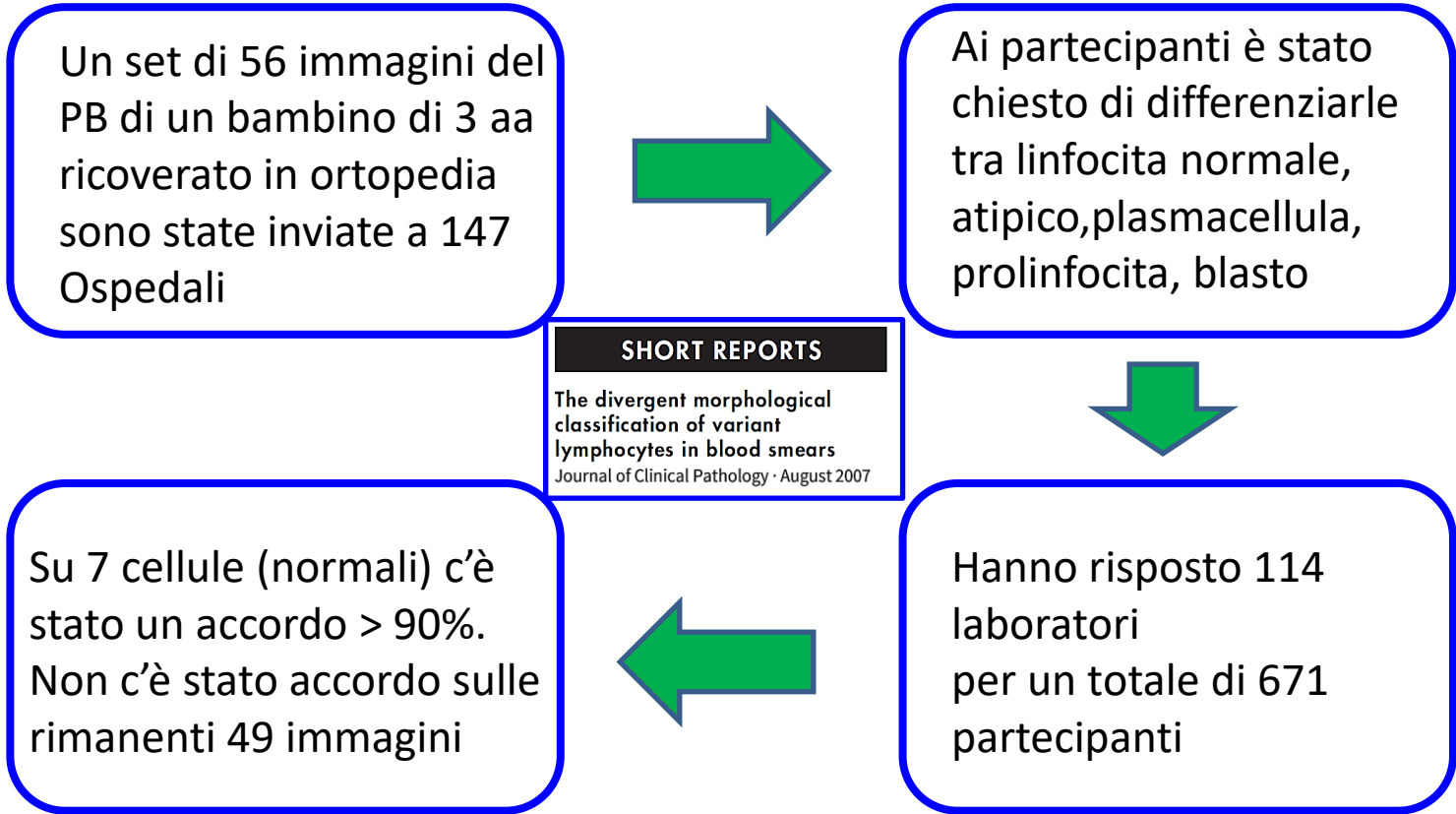
New quantitative features for the morphological differentiation of abnormal lymphoid cell images from peripheral blood

Laura Puigvi,^{1,2} Anna Merino,¹ Santiago Alférez,² Andrea Acevedo,^{1,2} José Rodellar²

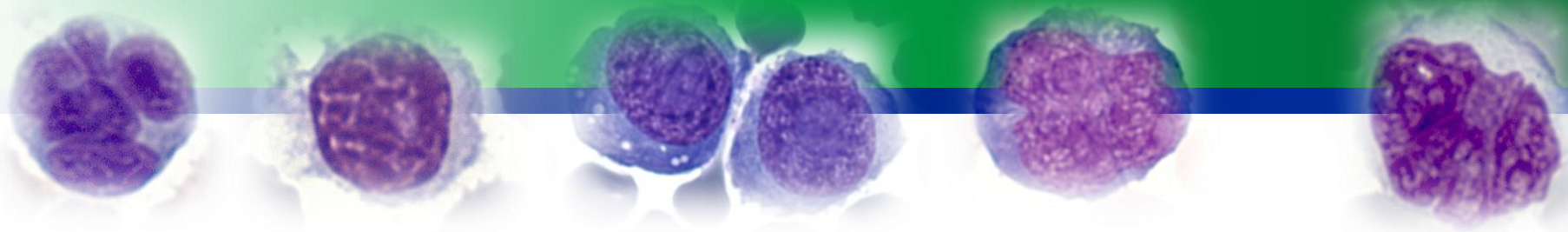
J Clin Pathol 2017;**70**:1038–1048.



Studio relativo all'accuratezza della valutazione morfologica dei linfociti



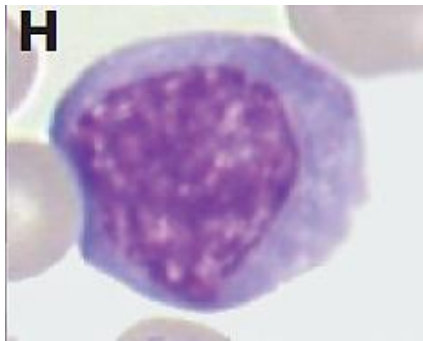
SHORT REPORTS
The divergent morphological classification of variant lymphocytes in blood smears
Journal of Clinical Pathology · August 2007



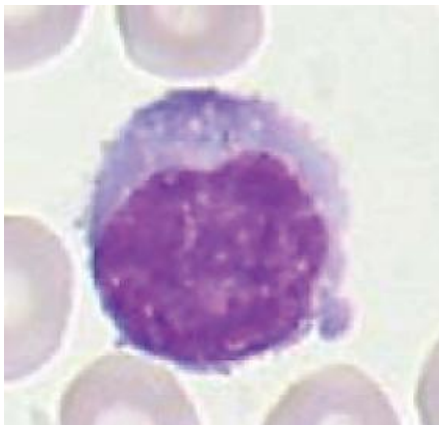
Dobbiamo migliorare la standardizzazione della classificazione morfologica !

SHORT REPORTS

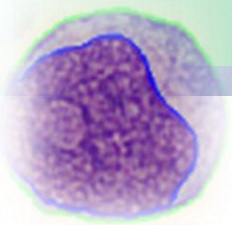
The divergent morphological classification of variant lymphocytes in blood smears
Journal of Clinical Pathology · August 2007



Questa cellula è stata classificata in 5 modi differenti: Linfocita normale, atipico, prolinfocita, plasmacellula, blasto



In 210/671 casi, questa cellula, fatta vedere in duplicato, è stata classificata in modo differente dallo stesso osservatore

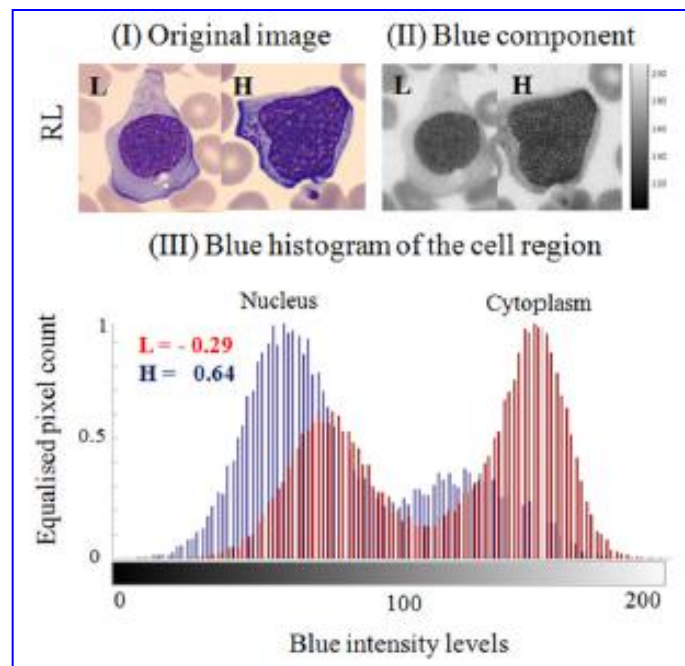


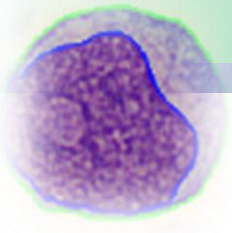
Ruolo ed obiettivi della morfologia digitale

La microscopia digitale e l'analisi computerizzata delle immagini possono fornire una valutazione morfologica più accurata e obiettiva, trasformando i parametri qualitativi citologici in valori quantitativi.

Trasformare i parametri qualitativi citologici in valori quantitativi

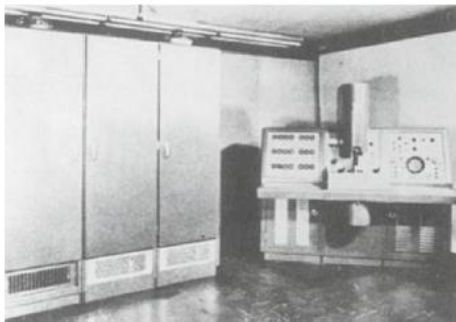
Componente
blu del
citoplasma e
del nucleo





Microscopia digitale

Esistono apparecchiature che sono in grado di preclassificare le cellule in diverse categorie, grazie all'utilizzo di reti neurali e alla rilevazione di un gran numero di misure e parametri, che descrivono le caratteristiche morfologiche di queste cellule.



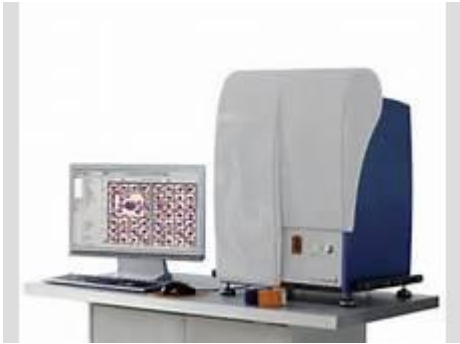
mid-1960s

Cydac Scanning Microscope System

Morfologia digitale automatizzata



powerful image-analysis and deep-learning technology



CellaVision



HeamCell



HemoFAX



VISION HEMA West Medical



Cobas 511

Featuring Bloodhound® technology

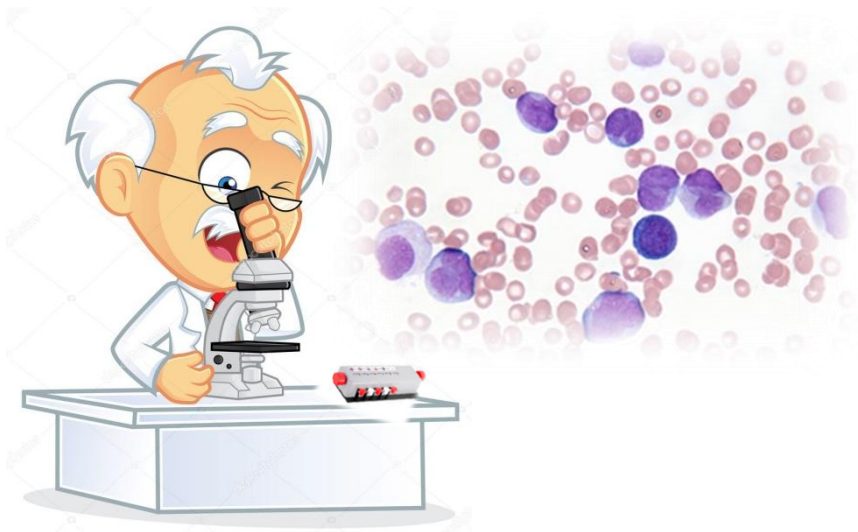


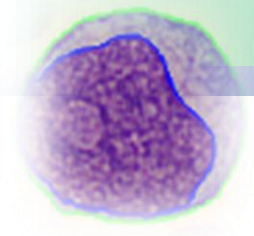
MedicaEasyCellAssistant



Perché utilizzare la morfologia digitale automatizzata?

- Riduzione della disponibilità di personale esperto e competente (meno laureati)
- Necessità di un maggiore livello di standardizzazione
- Aumento della domanda di connettività tra gli operatori sanitari



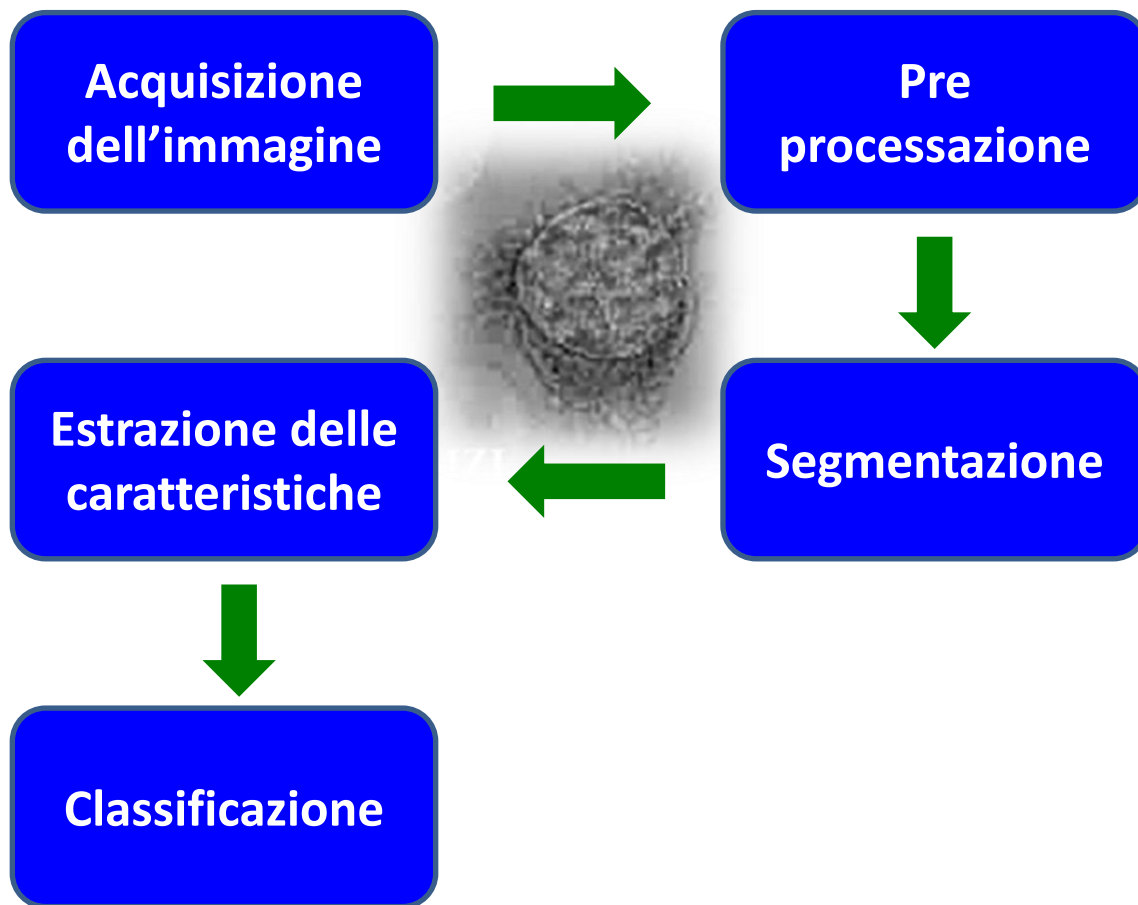


Filmato





Passaggi principali nell'analisi delle immagini sono i seguenti





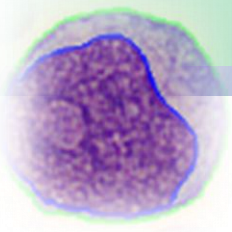
Nell'analisi delle cellule PB la preparazione di uno striscio di sangue adeguato e la sua colorazione sono essenziali per generare immagini di qualità.

Acquisizione:

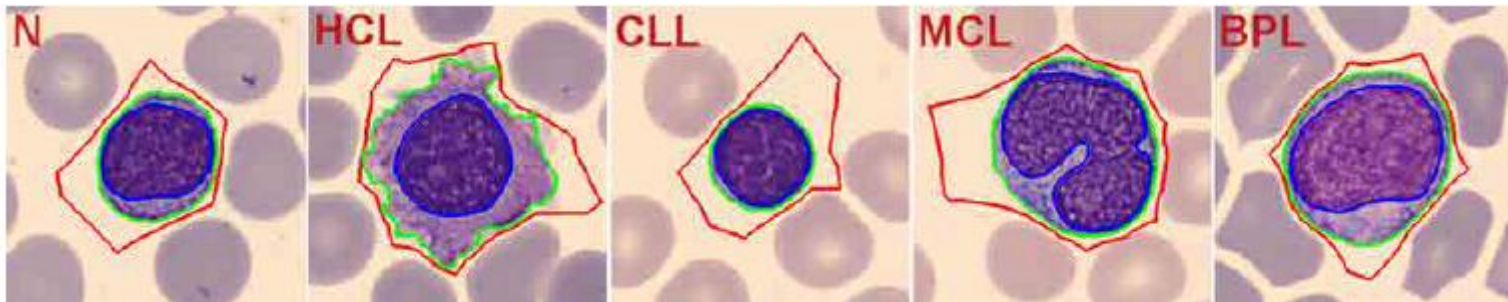
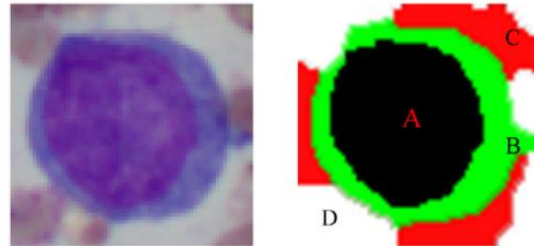
Le immagini digitali delle cellule sono ottenute da un analizzatore di immagini che integra un microscopio motorizzato e una fotocamera digitale

Pre-Processazione:

Questa fase raggruppa tutti i metodi applicati per migliorare le informazioni presenti nell'immagine, come l'utilizzo di filtri o le trasformazioni del colore.



La segmentazione: ha lo scopo di separare le cellule dagli altri oggetti nell'immagine e dividerle in regioni di interesse (ROI): intera cellula, zona periferica intorno alla cellula, il nucleo e il citoplasma.



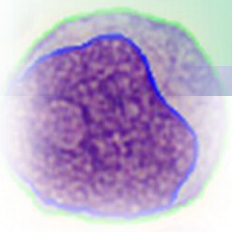
A segmentation method based on HMRF for the aided diagnosis of acute myeloid leukemia

Jie Su^{*,} Shuai Liu^{*,} Jinming Song^{*}

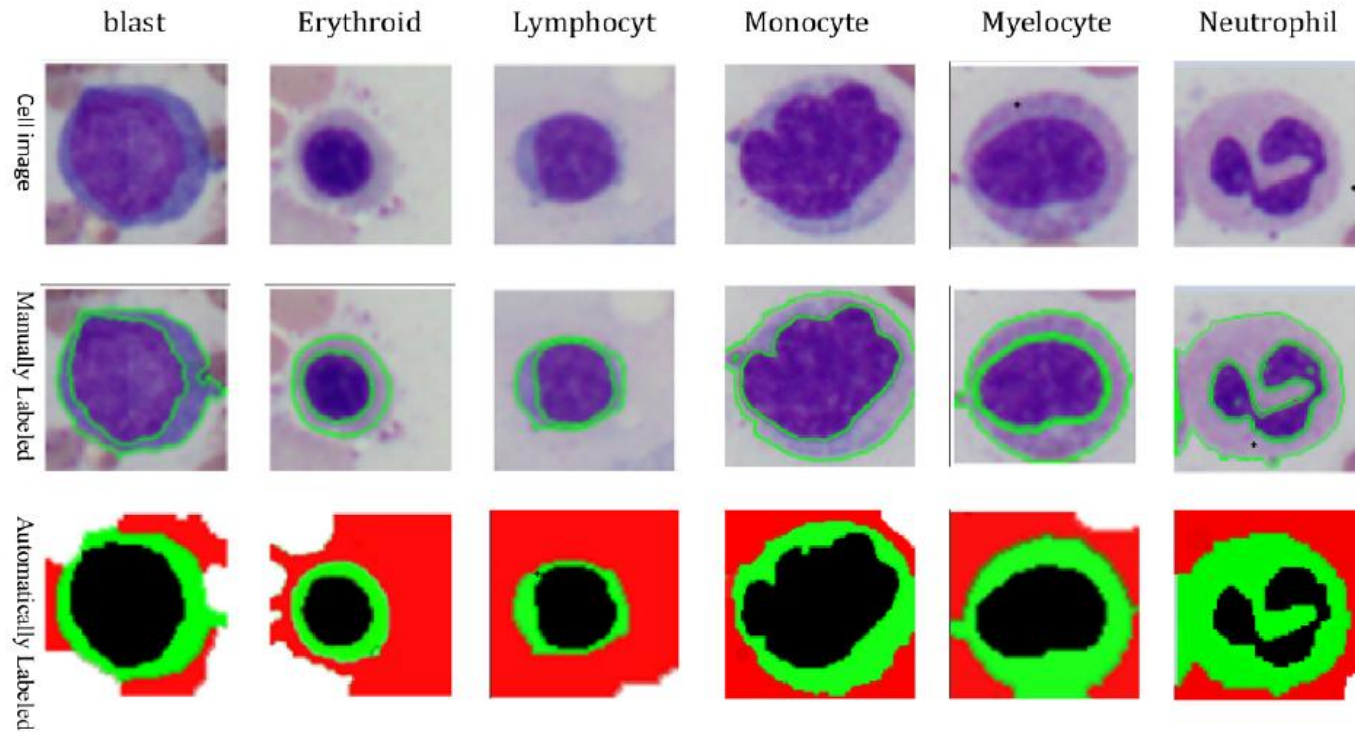
Computer Methods and Programs in Biomedicine 152 (2017) 115–123

Automatic Recognition of Atypical Lymphoid Cells From Peripheral Blood by Digital Image Analysis

Santiago Alferez,¹ Anna Merino, MD, PhD,² Laura Bigorra,¹ Luis Muga, PhD,¹ Maite Bar, PhD,¹ and Jose Rodella, PhD²
Am J Clin Pathol 2015;143:168-176



Segmentazione

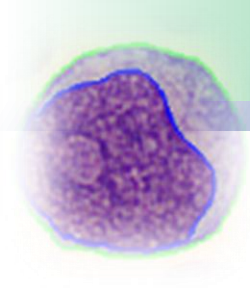


The segmentation results of six types cells. The nucleus and the cytoplasm of these six groups of cells corresponded very well with those labeled manually.

A segmentation method based on HMRF for the aided diagnosis of acute myeloid leukemia

Jie Su^{a,*}, Shuai Liu^a, Jinming Song^b

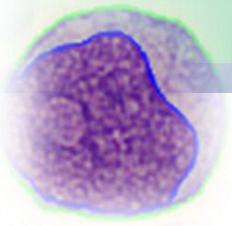
[Computer Methods and Programs in Biomedicine 152 \(2017\) 115–123](#)



Estrazione delle caratteristiche

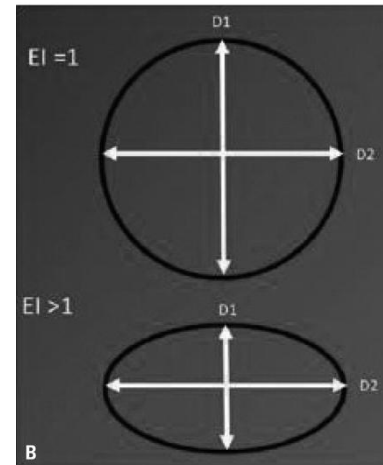
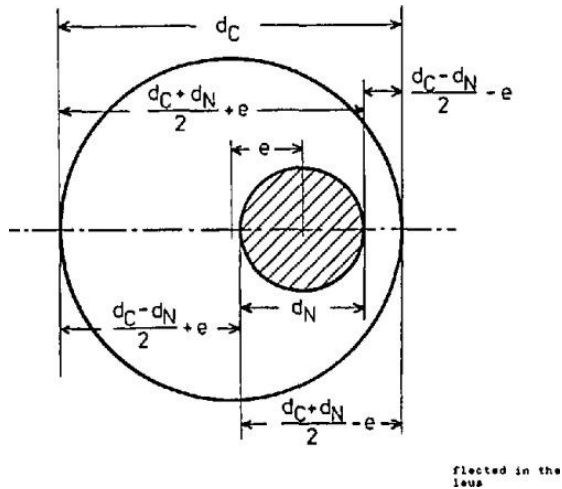
Dopo la segmentazione, il passo successivo consiste nell'identificare una serie di descrittori quantitativi, che in genere sono raggruppati nelle seguenti 3 categorie:

- 1) geometria
- 2) colore
- 3) trama



Caratteristiche geometriche

I descrittori geometrici più comuni includono parametri come area, perimetro, circolarità, diametro, eccentricità, allungamento, rotondità, convessità, dimensione nucleare, dimensione delle celle, rapporto nucleo-citoplasma, eccentricità nucleare ecc.



L'eccentricità del nucleo è calcolata come la distanza tra il centro della cellula e il centro del nucleo

Caratteristiche geometriche

La forma del nucleo è il fattore chiave nel decidere la classe a cui appartiene il WBC

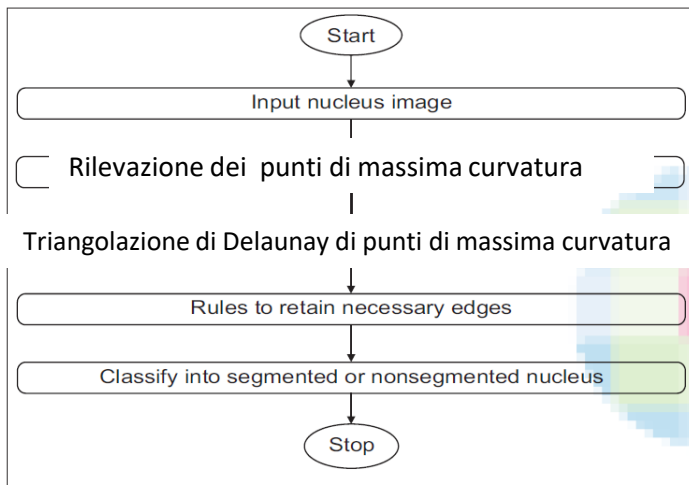


Figure 7: Step I of classification

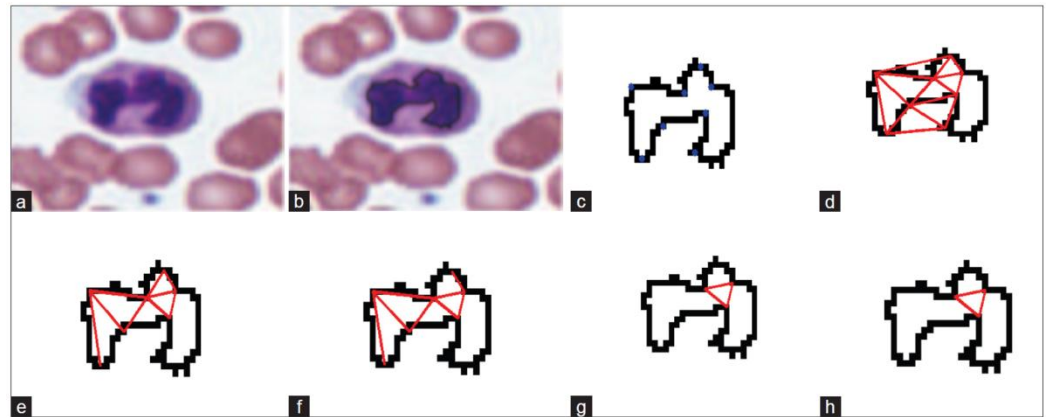
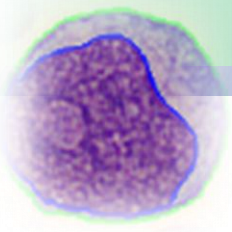


Figure 8: Steps representing segmented vs. nonsegmented nucleus classification, (a) White blood cell image; (b) Nucleus boundary

Isolation and two-step classification of normal white blood cells in peripheral blood smears

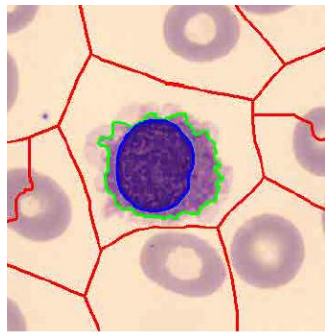
Nisha Ramesh, Bryan Dangott^{1,2}, Mohammed E. Salama^{1,2}, Tolga Tasdizen

J Pathol Inform 2012;3:13.

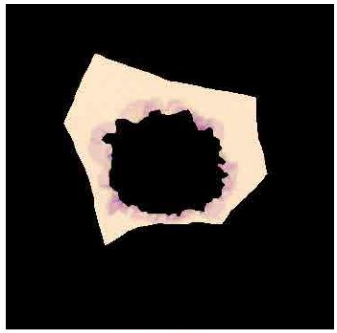


Caratteristiche geometriche

Profilo citoplasmatico o estroflessioni citoplasmatiche nei linfociti villosi



(a) Cell watershed lines



(b) Cell peripheral zone

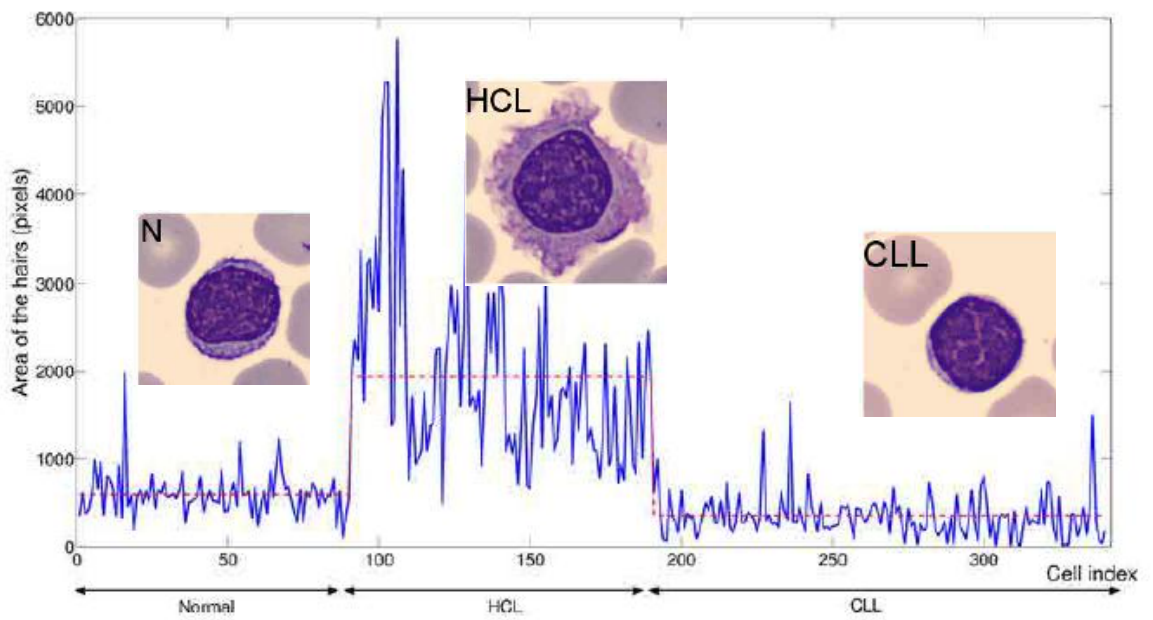
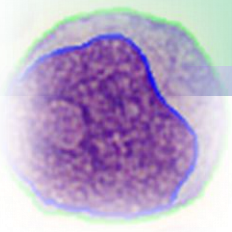
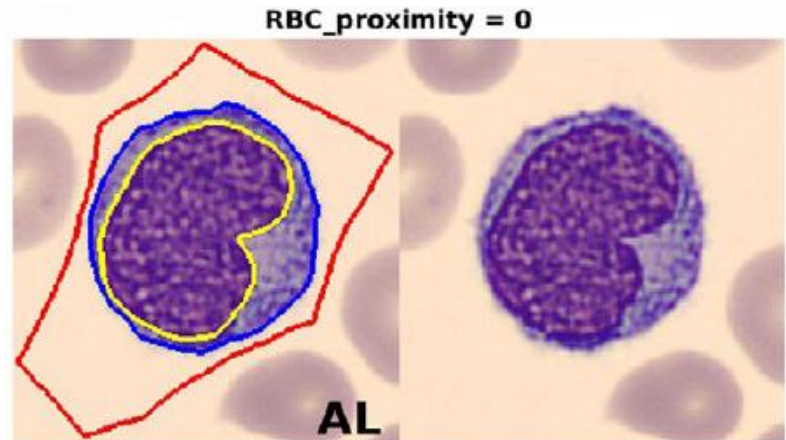
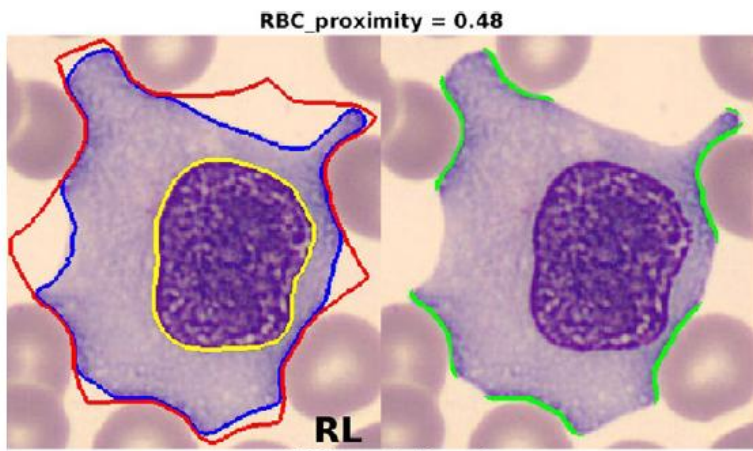


FIGURE 3.4: Cytoplasmic profile feature in N, HCL and CLL lymphoid cells. HCL cells showed very high values of this feature compared with CLL and N lymphoid cells.

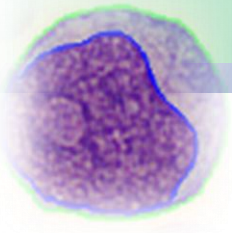


Caratteristiche geometriche

Valori di prossimità dei RBC in pixel, definiti come la proporzione del perimetro del linfocita reattivo che aderisce ai globuli rossi vicini.

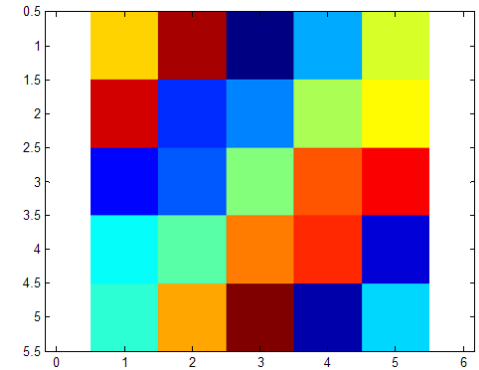


... È ben noto che il citoplasma dei linfociti reattivi (RL) tende ad aderire al vicino (RBC)



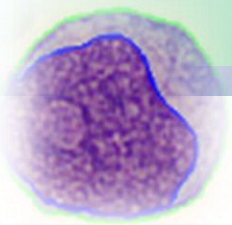
Caratteristiche di colore

L'immagine digitale di una cella è composta da un numero finito di pixel, ognuno con una specifica posizione e un determinato colore o intensità di risposta



Per ottenere caratteristiche quantitative diverse, vengono utilizzati diversi spazi colore.

Uno spazio colore è un modo di descrivere un colore attraverso le sue componenti.



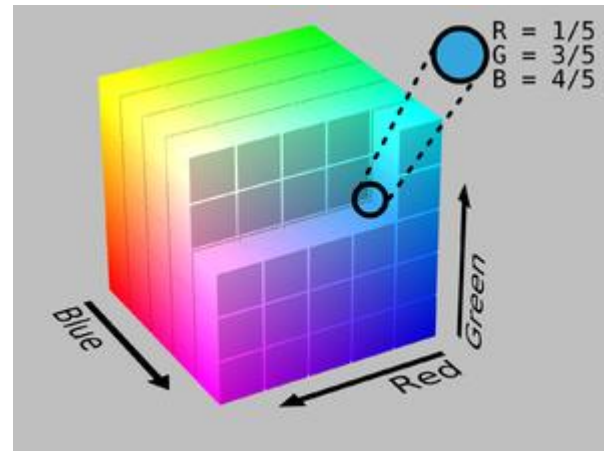
Caratteristiche di colore

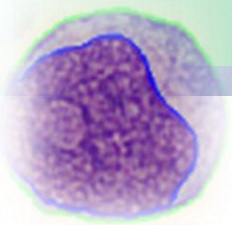
Nello spazio RGB, ogni colore è scomposto in 3 bande corrispondenti ai colori di base: rosso (R), verde (G) e blu (B).

Nello spazio CMYK le bande sono cyan (C), magenta (M), giallo (Y) e nero (K).

Lo spazio HSV è definito da tonalità (H), saturazione (S) e luminosità (V).

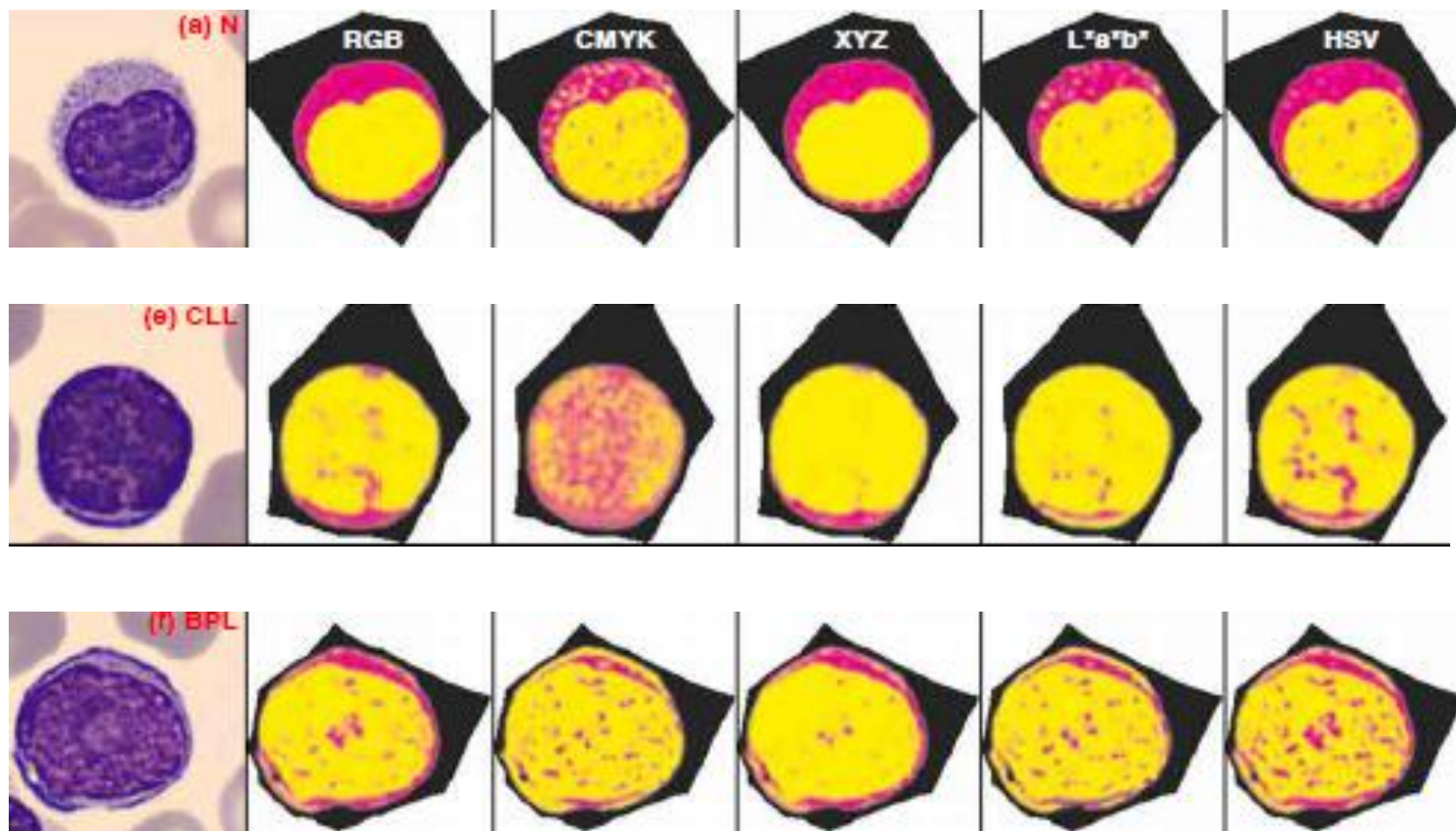
Gli spazi di laboratorio o di Luv usano luminosità (L) e cromaticità (a, b, u, v).

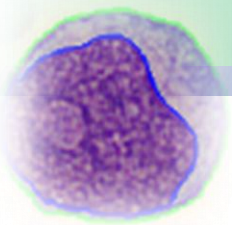




Caratteristiche di colore

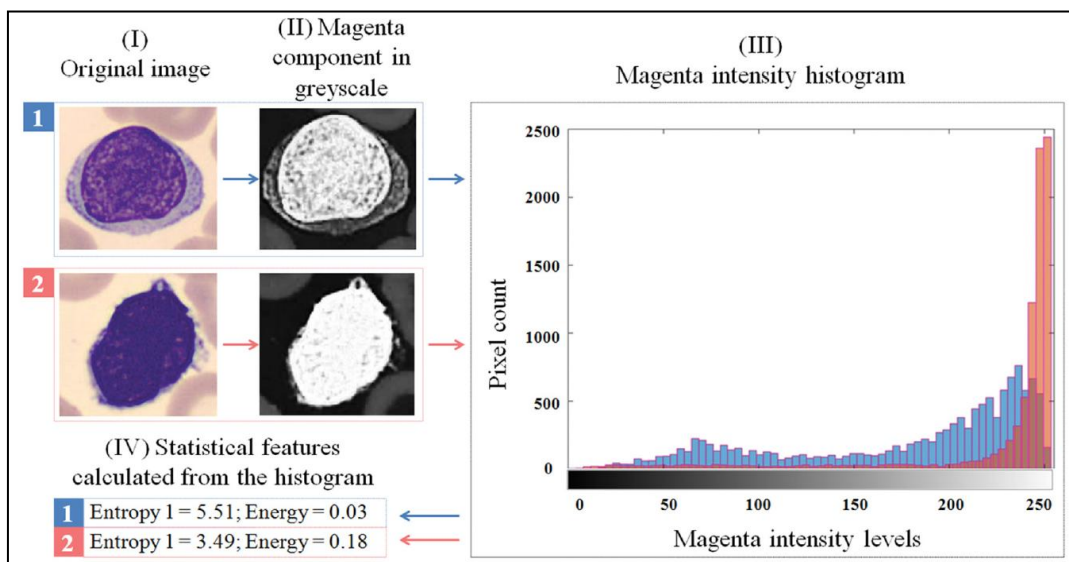
Variazione della percezione delle caratteristiche cellulari a seconda dello spazio colore utilizzato





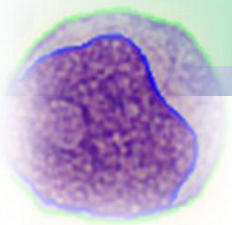
Caratteristiche di colore

Da ciascuna delle componenti di colore appartenenti a uno spazio colore, viene generata un'immagine in scala di grigi, con intensità che varia dal nero (0) al bianco (255). La scala dei grigi riduce semplicemente la complessità: da un valore di pixel 3D (R, G, B) a un valore 1D .



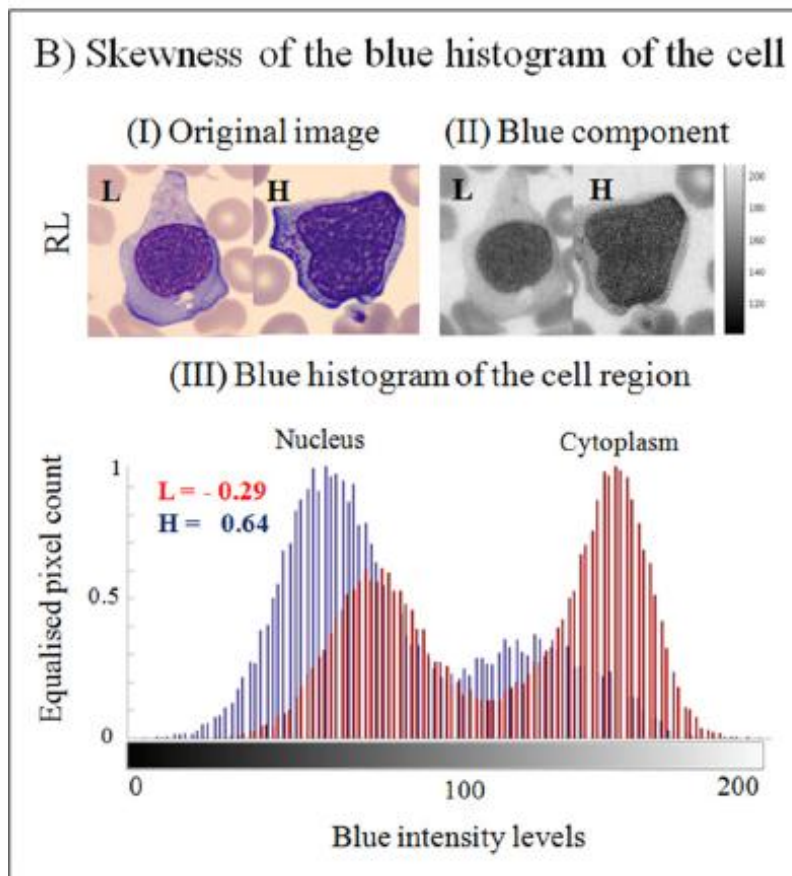
Per ottenere le caratteristiche quantitative di queste immagini in scala di grigi, si usa l'istogramma. L'asse verticale indica il numero di pixel corrispondenti ai diversi intervalli di intensità (0-250)

L'entropia descrive la variabilità e l'energia descrive l'uniformità dei livelli di intensità dei pixel



Caratteristiche di colore

Le caratteristiche del colore sono coinvolte nella quantificazione della basofilia citoplasmatica e delle granulazioni citoplasmatiche



New quantitative features for the morphological differentiation of abnormal lymphoid cell images from peripheral blood

Laura Puigvi,^{1,2} Anna Merino,¹ Santiago Alférez,² Andrea Acevedo,^{1,2} José Rodellar²

J Clin Pathol 2017;**70**:1038–1048.



Struttura della cromatina

Nell'analisi delle immagini digitali, la trama è definita quantitativamente dall'uniformità, dalla densità, dal tono dei pixel e dalle loro relazioni spaziali. Tale analisi non è un compito facile e viene solitamente eseguita seguendo due approcci principali:

- 1) la cosiddetta matrice di co-occorrenza a livello di grigio (GLCM)
- 2) la granulometria

REVIEW ARTICLE

WILEY ISLH International Journal of Laboratory Hematology

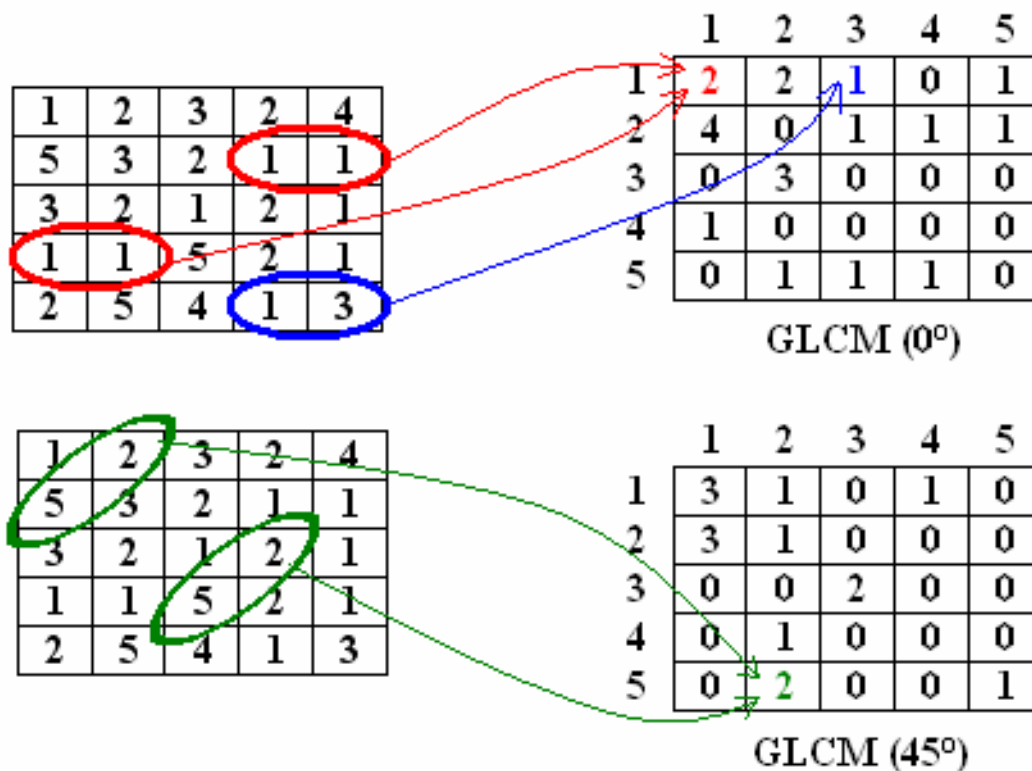
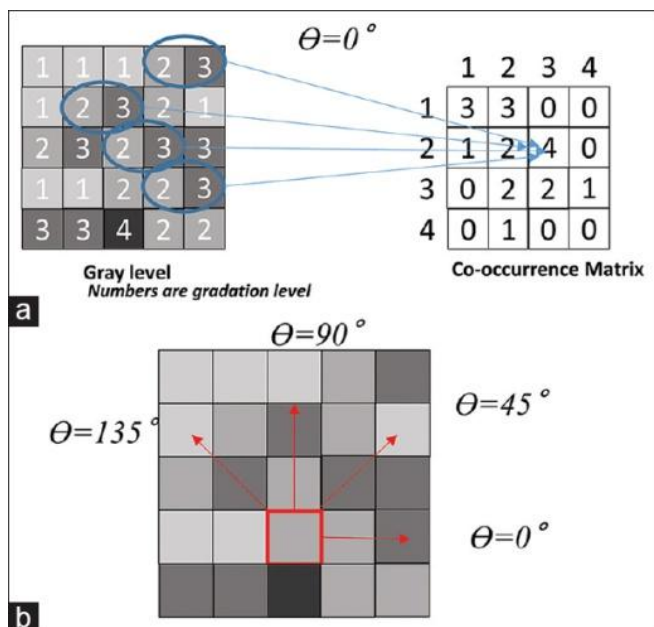
Optimizing morphology through blood cell image analysis

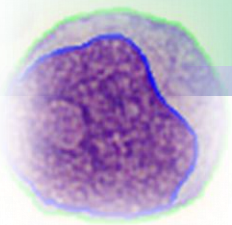
A. Merino¹ | L. Puigv² | L. Boldú¹ | S. Alférez² | J. Rodellar²

Int J Lab Hem. 2018;40(Suppl. 1):54–61.

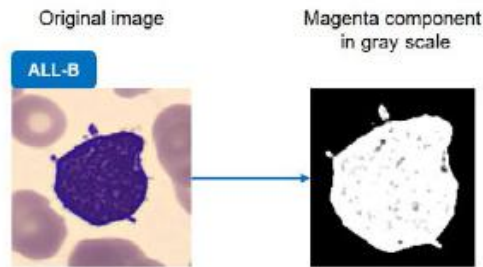
Matrice di co-occorrenza a livello di grigio (GLCM)

E' definita come la probabilità di avere coppie di pixel vicini con intensità simili





Linfoblasto

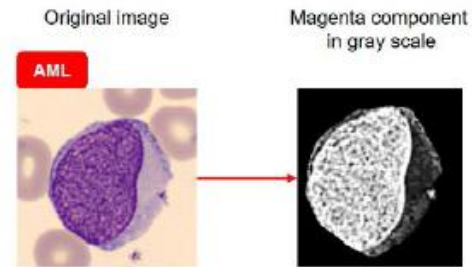


1	0	1	2	1	0	2	0	0
2	1	0	3	0	2	2	1	0
3	2	3	5	1	5	3	5	1
4	3	2	4	3	2	4	4	3
5	0	0	2	2	7	9	18	7
6	1	1	3	6	9	20	60	50
7	1	2	3	7	6	54	157	353
8	1	2	9	10	26	80	366	8178
	1	2	3	4	5	6	7	8

Max Prob =
0,8682

Max Prob =
0,1332

Mieloblasto

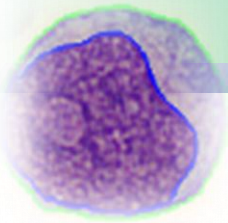


1	89	115	37	21	8	1	0	0
2	133	1460	368	93	47	25	2	0
3	26	379	849	194	92	59	16	0
4	8	56	190	337	272	182	87	8
5	4	28	98	277	538	554	270	44
6	0	15	51	153	597	1419	1089	234
7	1	6	15	70	243	1127	2139	1125
8	0	0	2	7	46	232	1136	2322
	1	2	3	4	5	6	7	8

I livelli di intensità in queste immagini variano da 1 (nero) a 8 (bianco) e, pertanto, il GLCM sono matrici con 8 righe e 8 colonne

Per il linfoblasto, la coppia (8, 8), che è la più brillante, ha 8.178 ripetizioni, il che significa un rapporto di .8682. Questo è in accordo con l'osservazione visiva, dove il linfoblasto in scala di grigi appare praticamente bianco.

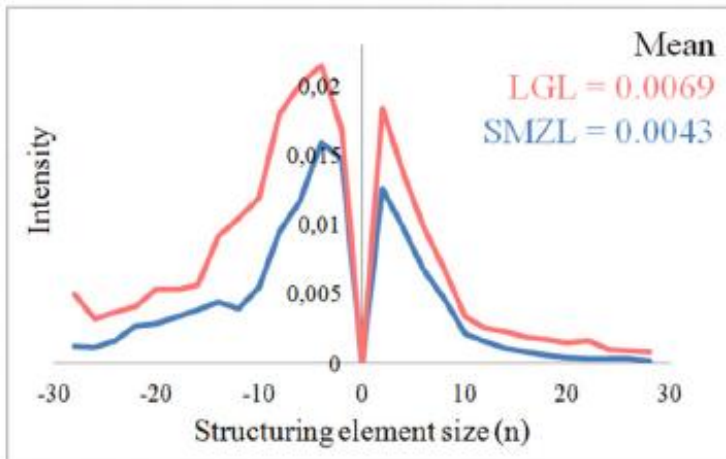
Anche per il mieloblasto, la coppia (8, 8) è la più probabile, ma il valore della funzione è .1332, molto più basso. Questo perché ci sono molte altre coppie di pixel vicine con diverse intensità di grigio, come si può vedere nell'immagine in scala di grigi.



Granulometria

Scopo della granulometria è stimare come sono distribuite le particelle di un'immagine rispetto le loro dimensioni. In un'immagine in scala di grigi vengono generalmente considerati due tipi di particelle, quelle più chiare e quelle più scure rispetto allo sfondo.

(IIIa) Granulometric curve of the cytoplasm

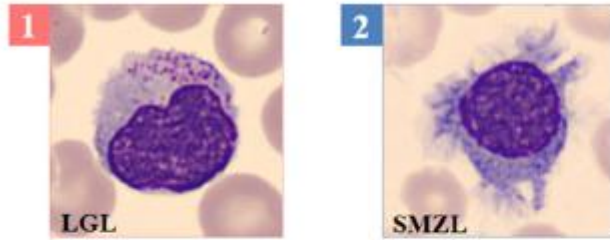


La parte sinistra delle curve (dimensioni negative) rappresenta la densità dei granuli scuri in rapporto alle dimensioni, mentre la parte destra delle curve rappresenta la densità granuli luminosi in rapporto alle dimensioni

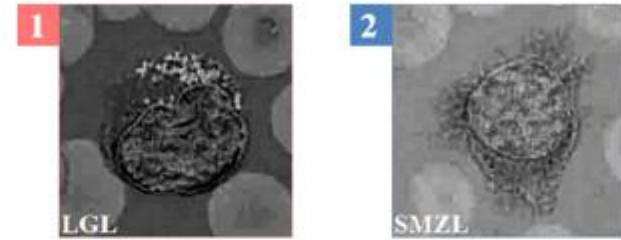
La curva blu (picchi più bassi) rappresenta l'immagine di una cellula con poche granulazioni citoplasmatiche, quella rossa l'immagine di una con più granulazioni.

Granulometria

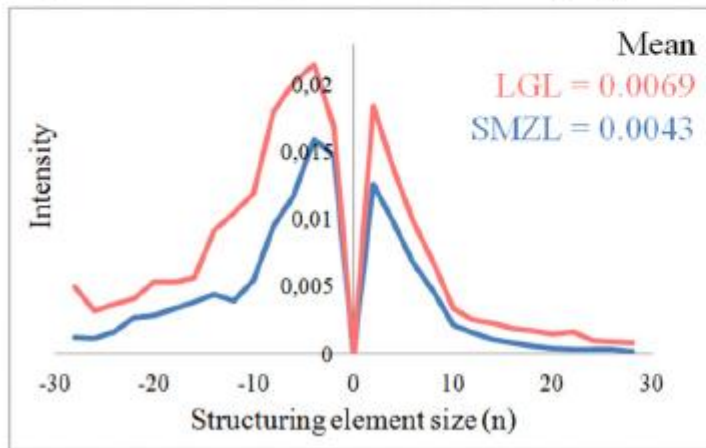
(I) Original image



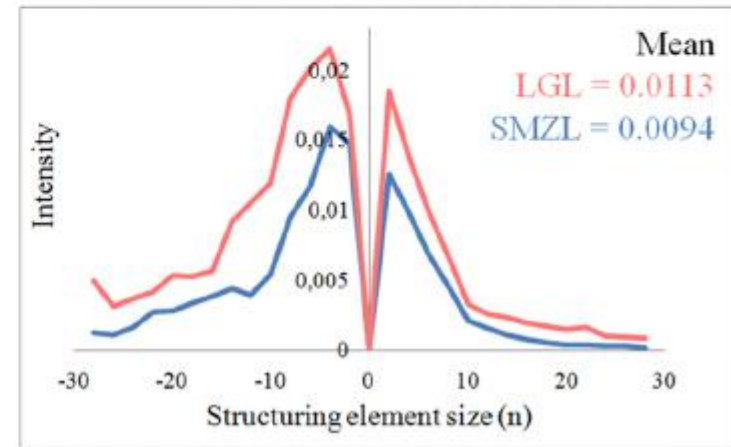
(II) "u" colour component in greyscale



(IIIa) Granulometric curve of the cytoplasm



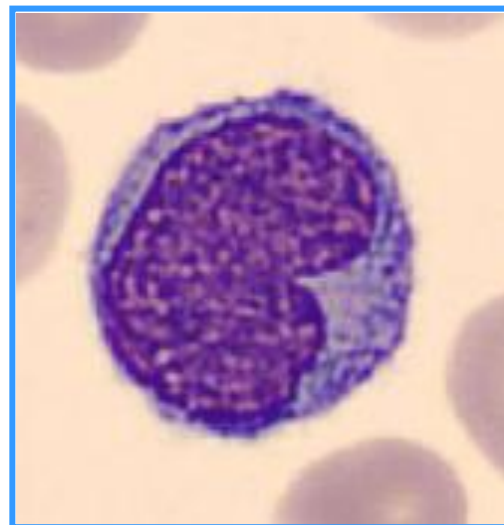
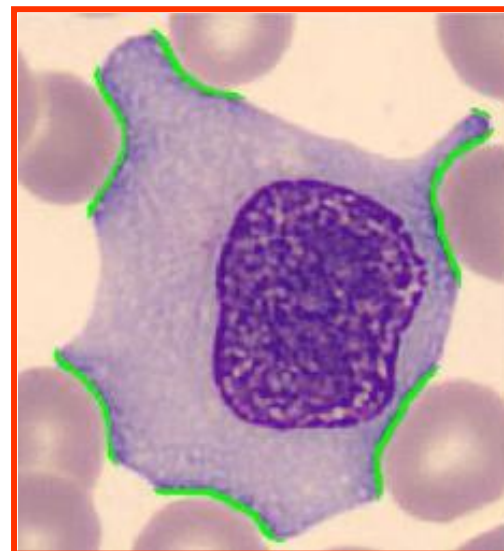
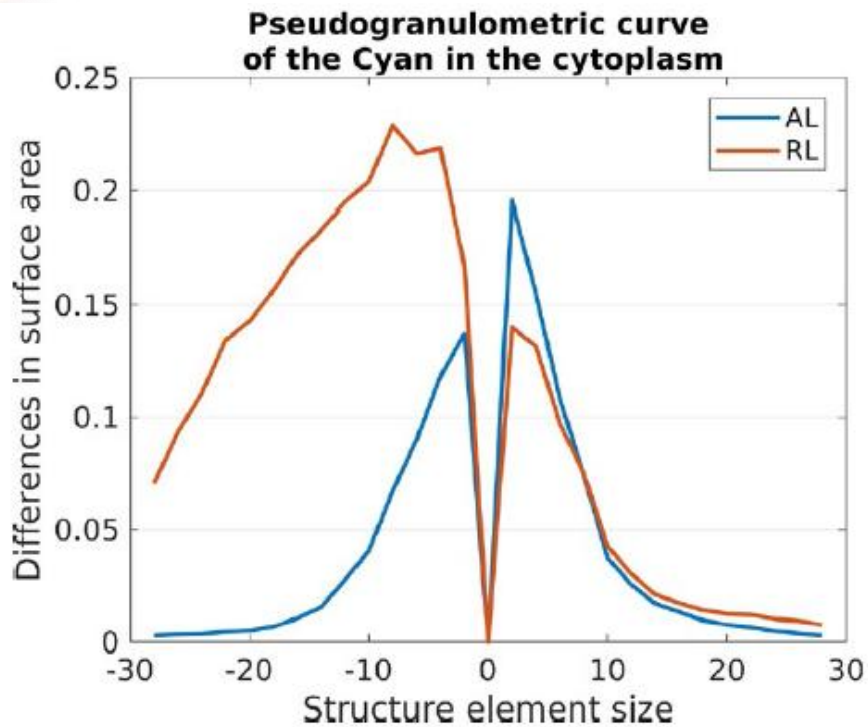
(IIIb) Pseudo-granulometric curve of the cytoplasm



Curva blu: l'immagine di un linfocita di un linfoma splenico marginale, le curve sono basse perché ci sono pochi granuli chiari e scuri.

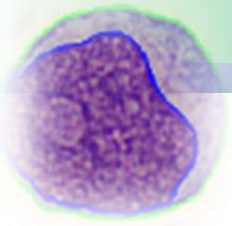
Curva rossa: immagine di un linfocita LGL, presenza di una maggiore quantità di granuli (intensità e dimensioni)

Granulometria



Il significato dei valori per entrambe le curve è che ci sono differenze nella distribuzione dei granuli scuri e luminosi nel citoplasma del RL, rispetto al linfocita del linfoma splenico

SMZL, linfoma splenico della zona marginale



Classificazione delle cellule

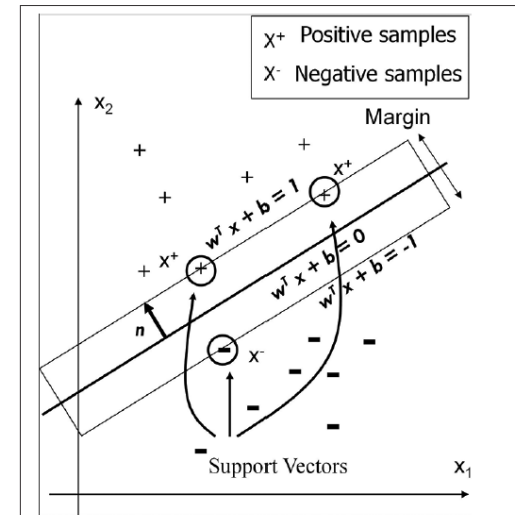
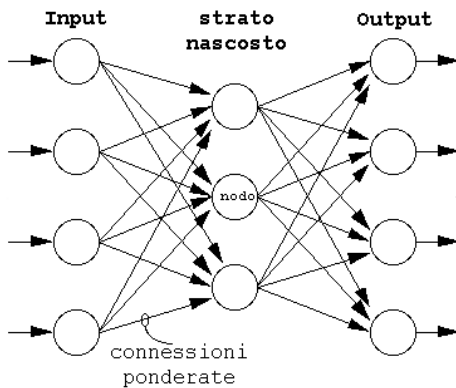
Le caratteristiche quantitative facilitano l'ultima fase che è la classificazione automatica delle cellule

Tra i metodi più utilizzati nella classificazione delle cellule PB, troviamo reti neurali, alberi decisionali e macchine a vettori di supporto (SVM).

Peripheral blood smear image analysis: A comprehensive review

Emad A. Mohammed, Mostafa M. A. Mohamed¹, Behrouz H. Far, Christopher Naugler²
J Pathol Inform 2014;5:9.

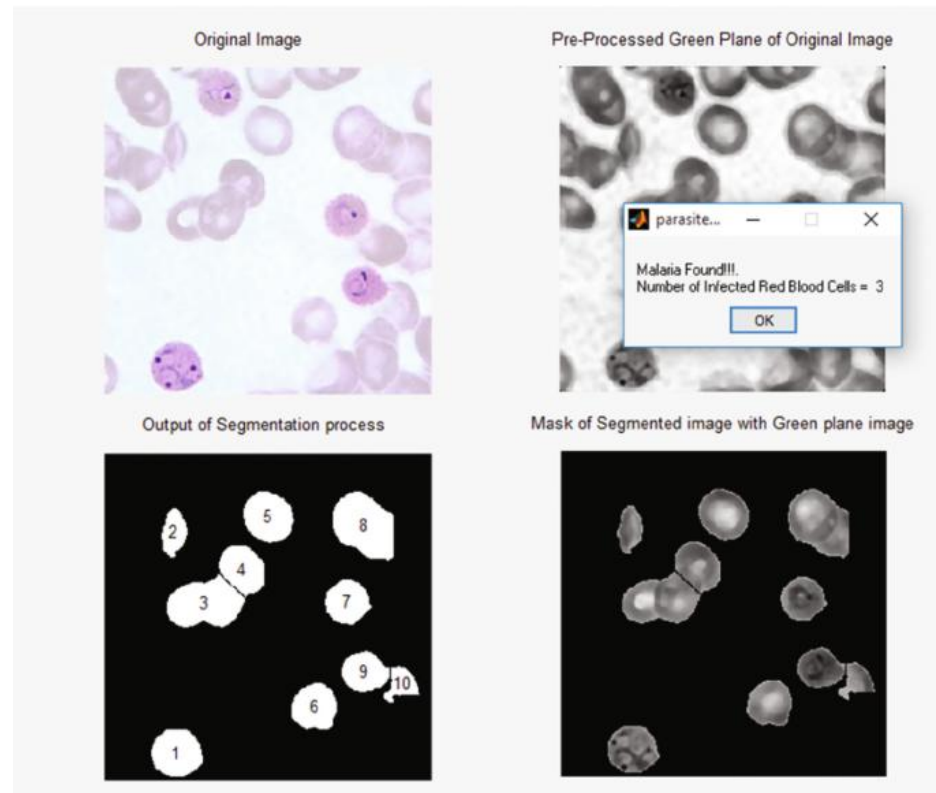
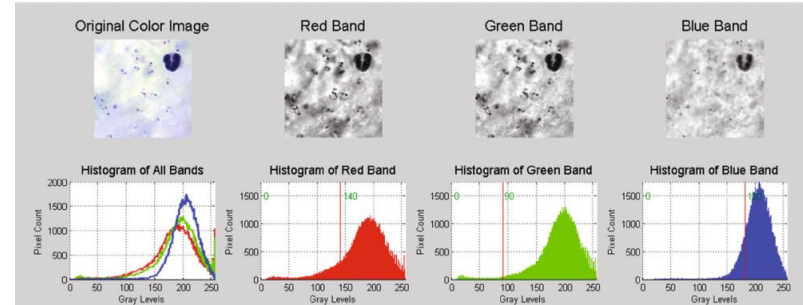
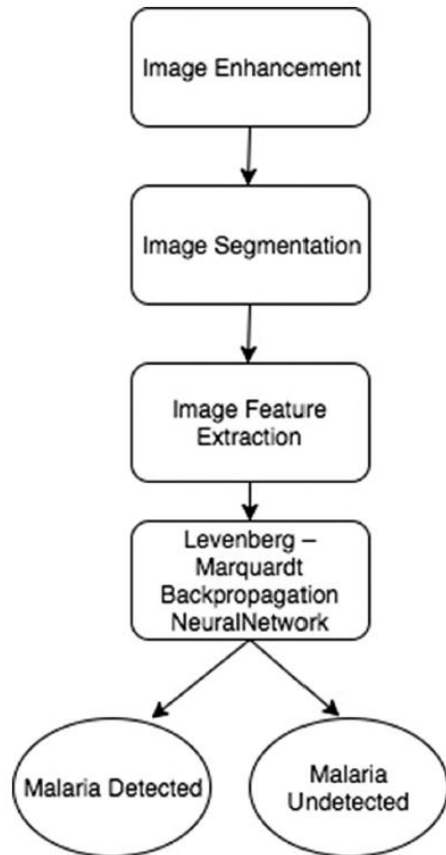
SCHEMA GENERALE DI UNA RETE NEURALE



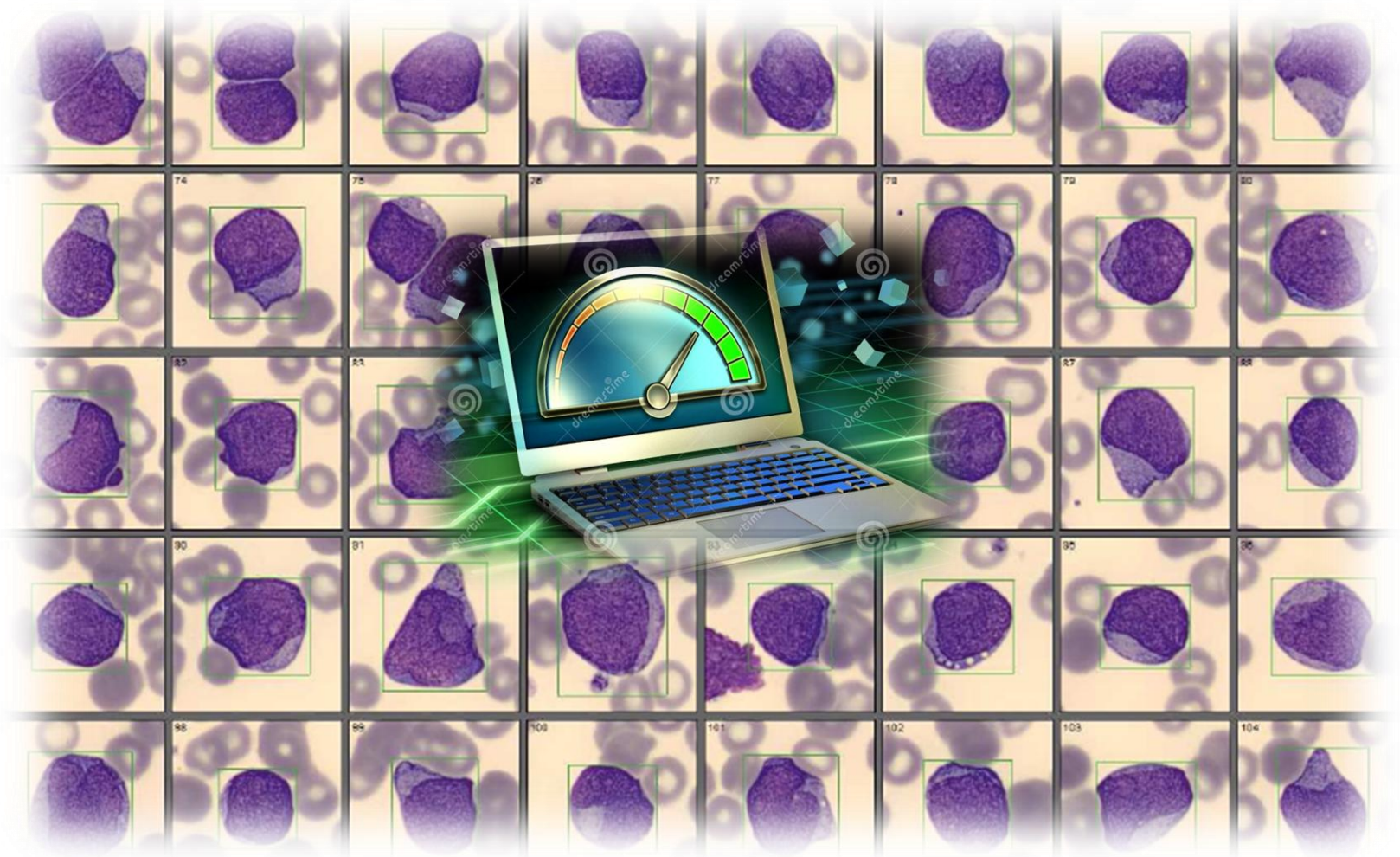
Identificazione della malaria con la morfologia digitale

Automatic Identification of Malaria Using Image Processing and Artificial Neural Network

Mahendra Kanojia^{1(✉)}, Niketa Gandhi², Leisa J. Armstrong³,
and Pranali Pednekar⁴



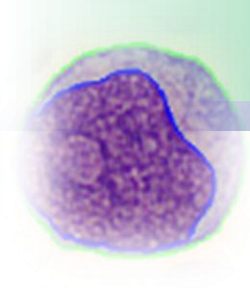
Quali sono le performance della morfologia digitale?





Studio multicentrico del GdS Diagnostica Ematologica Integrata Sibioc

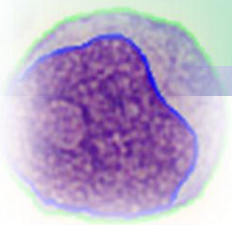
Scopo di questo studio è stato quello di verificare le performance analitiche dei sistemi di analisi morfologica digitalizzata più diffusi DM96 e DI60 rispetto alla microscopia ottica in accordo alle indicazioni dell' International Council for Standardization of Haematology (ICSH)



Studio imprecisione

7 laboratori partecipanti, ad ogni laboratorio sono stati inviati 10 vetrini dello stesso campione, per ognuna delle seguenti condizioni:

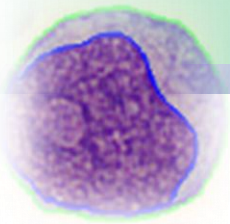
- normale
- con eritroblasti
- campione con neutrofilia
- campione pediatrico con blasti
- campione con linfociti attivati
- campione con granulociti immaturi



Studio imprecisione

CLASSI LEUCOCITARIE (N=70 DETERMINAZIONI)	CONTA CELLULARE MEDIA X10 ⁹ /L	CV MO*	CV MD*	CV MD-PRE*	I _d *
NEUTROFILI	3,268	1,4	2,4	2,4	< 8.5
NEUTROFILI	4,094	1,5	2,4	2,3	< 8.5
NEUTROFILI	32,647	2,4	2,2	2,0	< 8.5
LINOCITI	0,658	3,4	5,5	4,5	< 5.1
LINOCITI	1,901	2,7	4,5	4,5	< 5.1
LINOCITI	3,408	3,1	2,8	3,1	< 5.1
MONOCITI	0,074	26,9	45,3	43,3	< 8.9
MONOCITI	0,301	9,7	10,1	9,1	< 8.9
MONOCITI	1,387	14,0	14,3	12,0	< 8.9
EOSINOFILI	0,171	18,1	17,5	24,6	< 19.8
EOSINOFILI	0,974	15,5	14,6	12,9	< 19.8
BASOFILI	0,105	14,9	11,3	8,2	< 14.0
BASOFILI	1,463	14,9	11,3	8,2	< 14.0

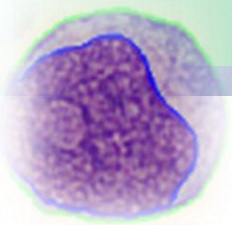
* Microscopia ottica , * Microscopia digitale dopo classificazione, * Preclassificazione digitale * Imprecisione desiderabile



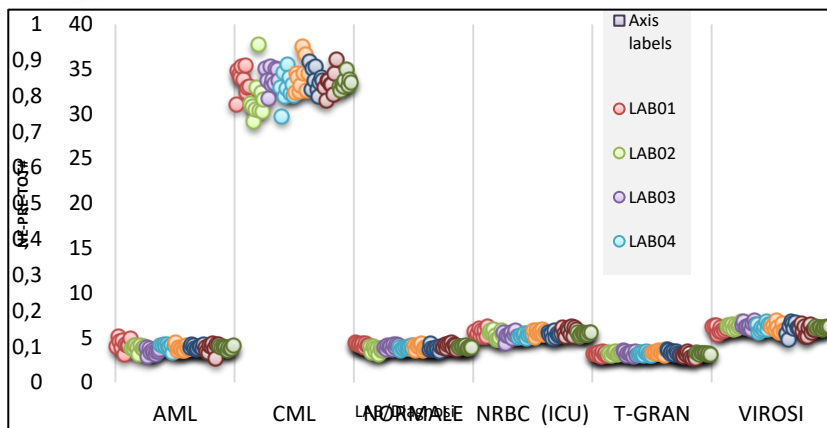
Studio imprecisione

CLASSI LEUCOCITARIE (N=70 DETERMINAZIONI)	CONTA CELLULARE MEDIA x10 ⁹ /L	CV MO*	CV MD*	CV MD-PRE*
METAMIELOCITI	0,343	5,1	15,5	17,53
METAMIELOCITI	3,618	6,5	15,1	13,14
MIELOCITI	0,334	5,8	13,9	19,2
MIELOCITI	3,813	7,6	6,3	14,0
IG	0,688	5,4	7,1	5,8
IG	7,529	5,4	7,1	5,8
BLASTI	0,143	52,2	36,5	44,7
BLASTI	0,844	5,1	10,7	15,4
LINFOCITI REATTIVI	1,218	13,7	20,09	22,3
NRBC	0,163	49,8	42,4	41,1
NRBC	0,608	9,9	6,9	8,4

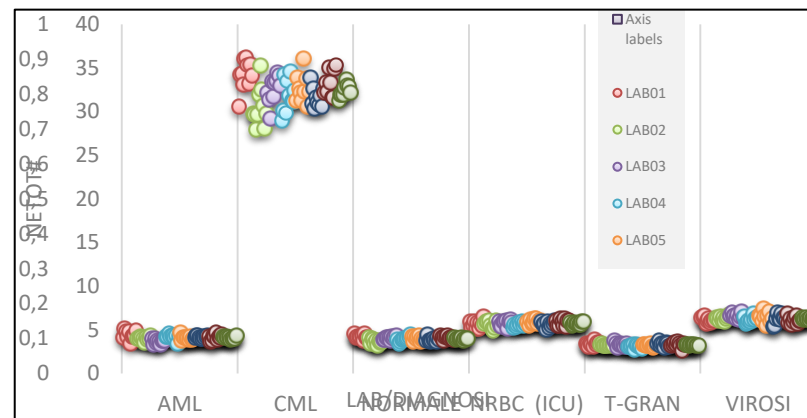
* Microscopia ottica , * Microscopia digitale dopo classificazione, * Preclassificazione digitale * Imprecisione desiderabile



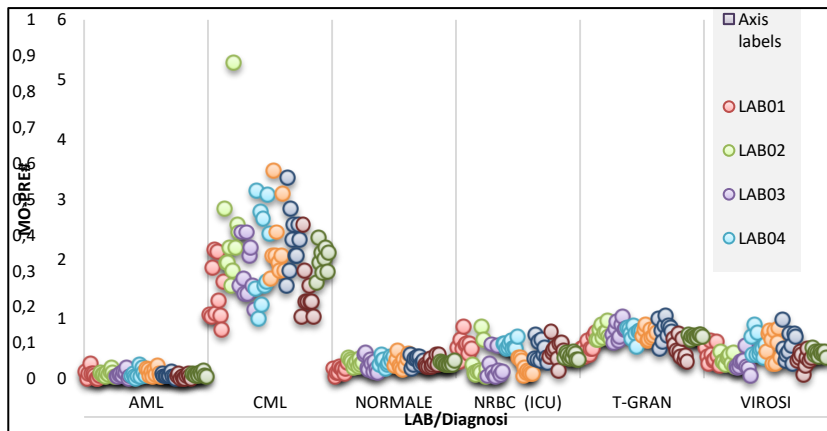
Imprecisione rispetto patologia



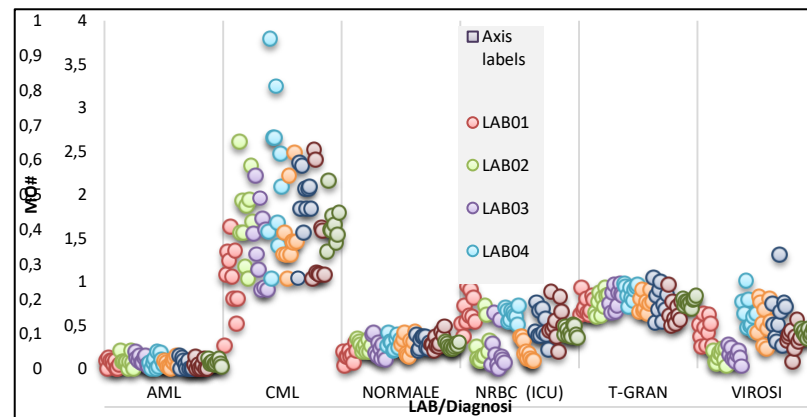
Pre Neutro



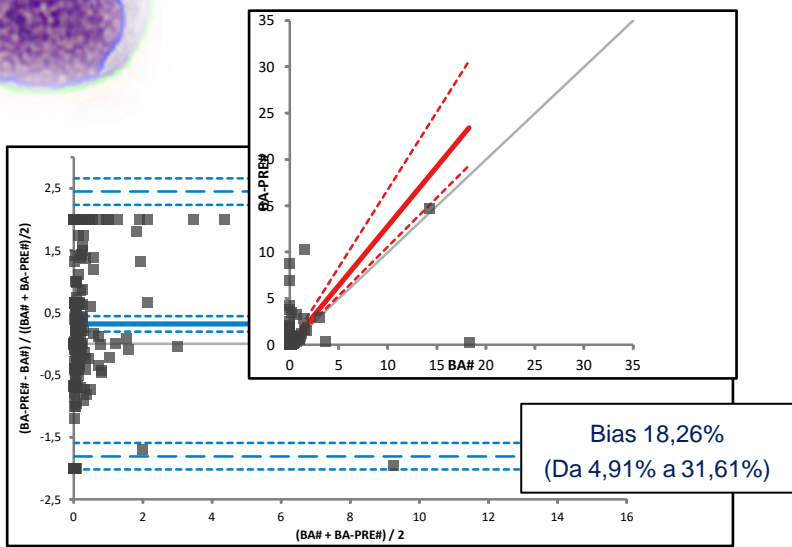
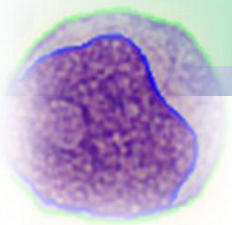
Post Neutro



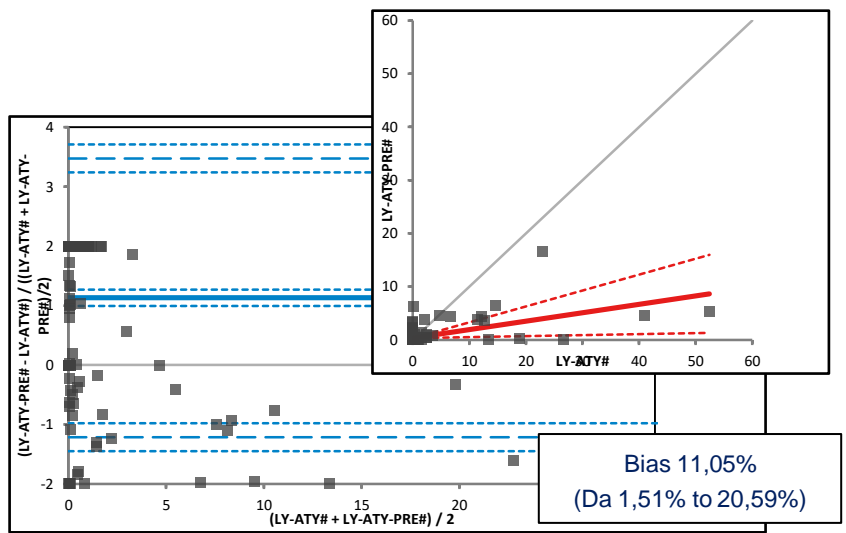
Pre Mono



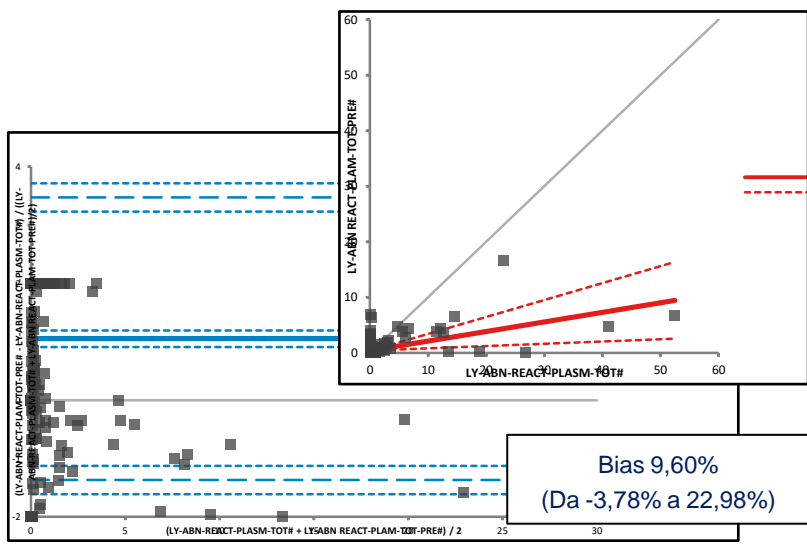
Post Mono



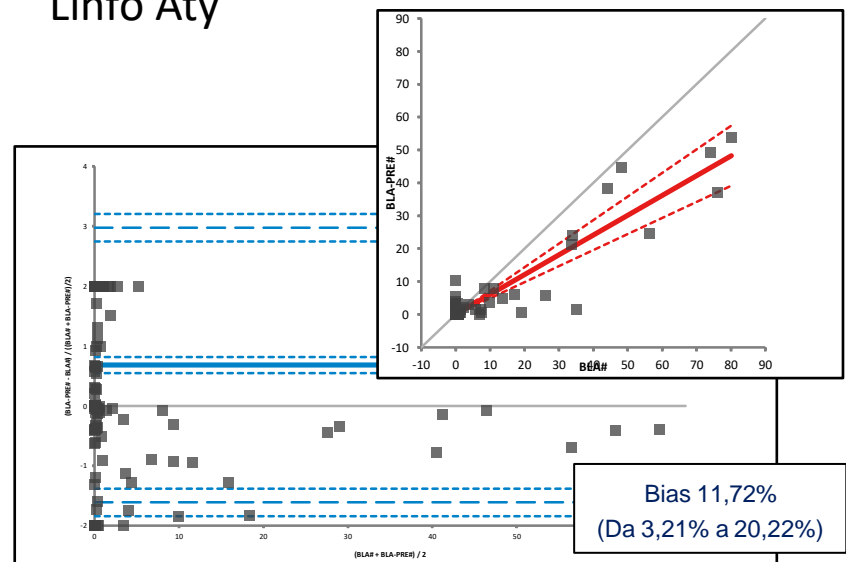
Baso



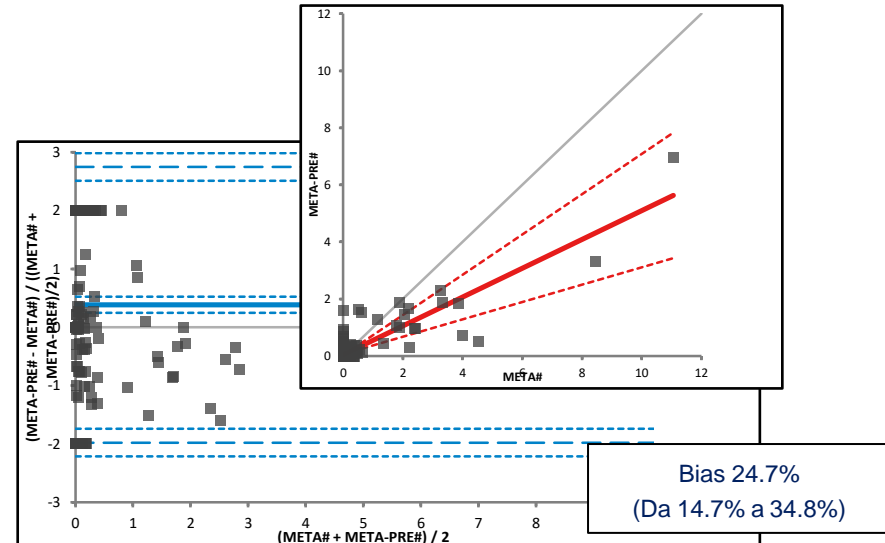
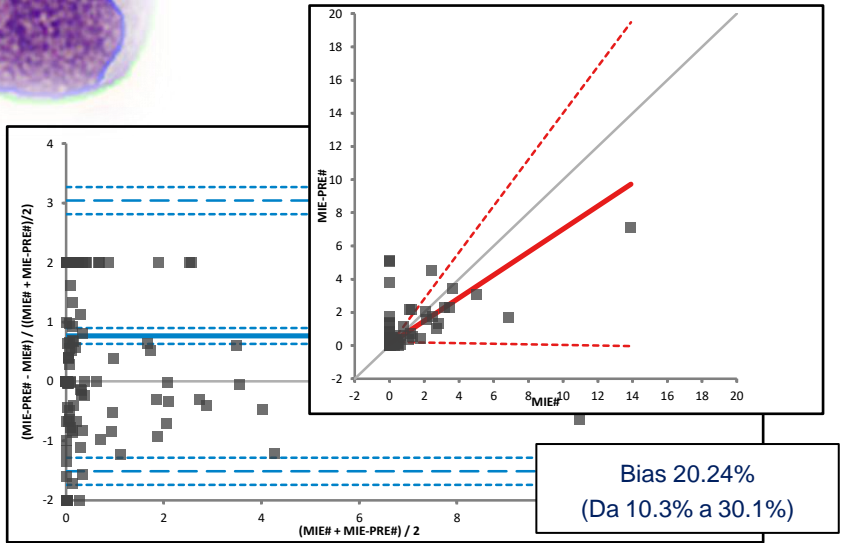
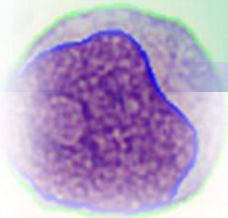
Linfo Aty



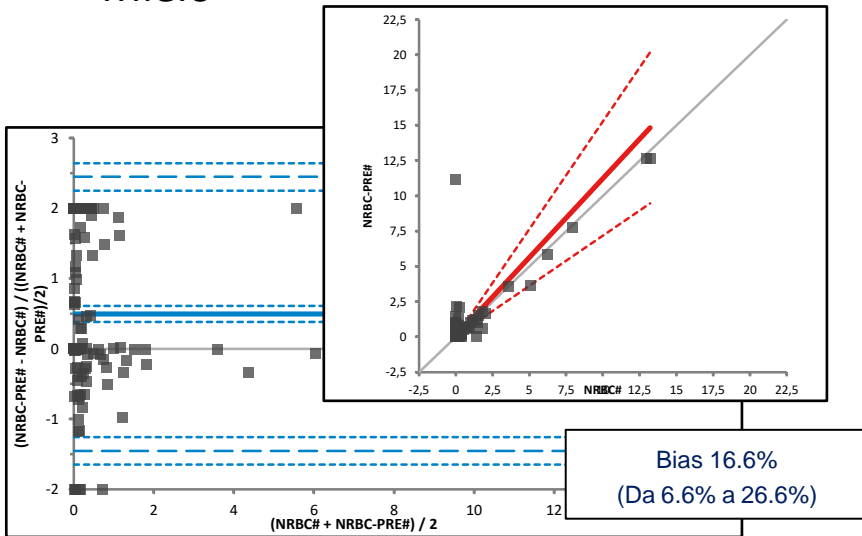
Linfo Reat



Blasti

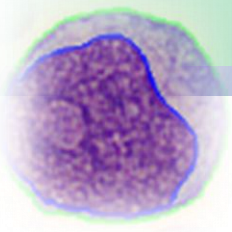


Mielo

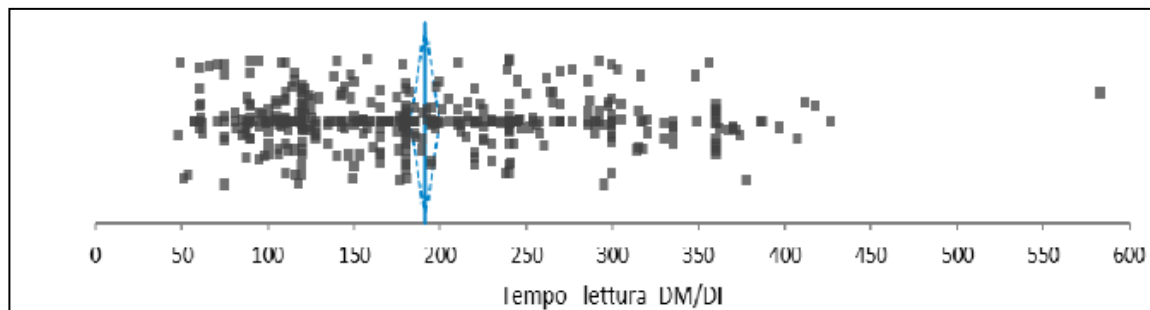


NRBC

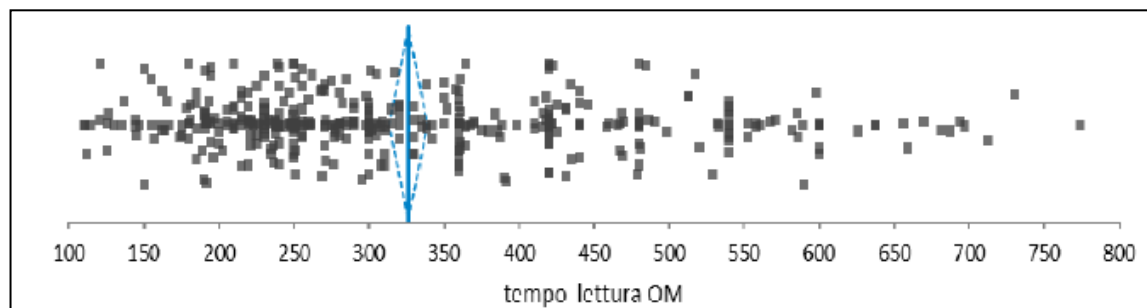
Meta



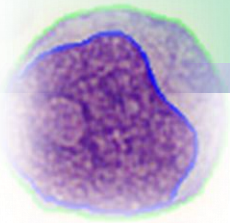
Tempi di lettura medi



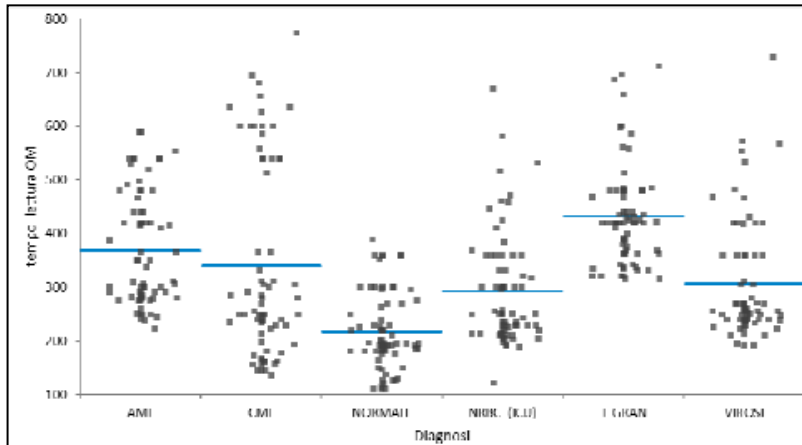
Morfologia digitale:
3' 18''



Microscopio ottico:
5' 43''

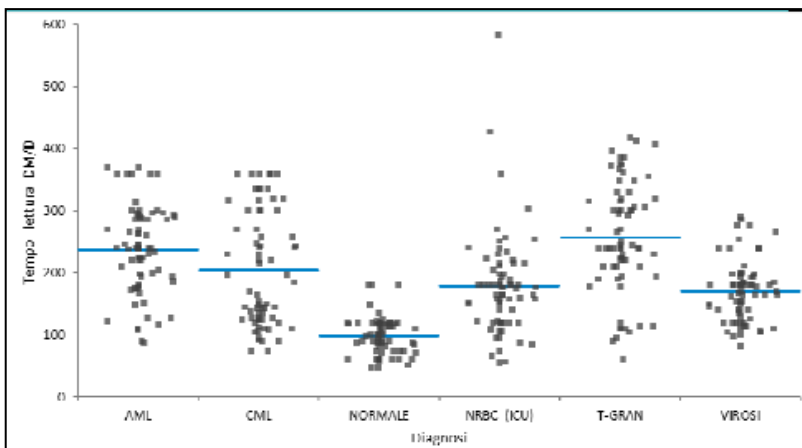


Tempi di lettura per diagnosi



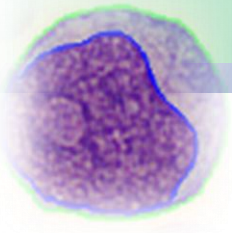
N totali= 419

Tempo lettura MO per diagnosi	N	Minuti medi
AML	70	6
CML	69	5
NORMALE	70	3
NRBC (ICU)	70	4
T-GRAN	70	7
VIROSI	70	5



N totali= 419

Tempo lettura DM per diagnosi	N	Minuti medi
AML	70	3
CML	69	3
NORMALE	70	1
NRBC (ICU)	70	2
T-GRAN	70	4
VIROSI	70	2



Vantaggi della microscopia digitale

- Approccio standardizzato alla classificazione cellulare
- Tracciabilità del processo, archiviazione immagini
- Comparabilità rispetto storico
- Ottimizzazione del tempo (Selezione, preparazione, colorazione e acquisizione completamente automatizzata delle immagini delle cellule)
- Minor affaticamento degli occhi e stanchezza
- Ergonomia migliorata
- Trasmissione di immagini digitali a ematologi esperti in varie località
- Strumento di formazione per studenti e professionisti di laboratorio

**A Survey Study of Benefits and Limitations of using
CellaVisionDM96 for Peripheral Blood Differentials**

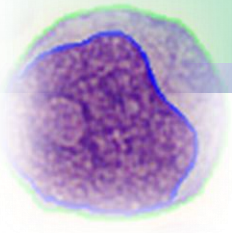
SANDRA J VANVRANKEN, EMILY S. PATTERSON, SALLY V. RUDMANN, KATHY V. WALLER

Utilization of Digital Images in Clinical Hematology

Evaluating the Perceived Benefits and Limitations With the Use of Digital Image Software for Peripheral

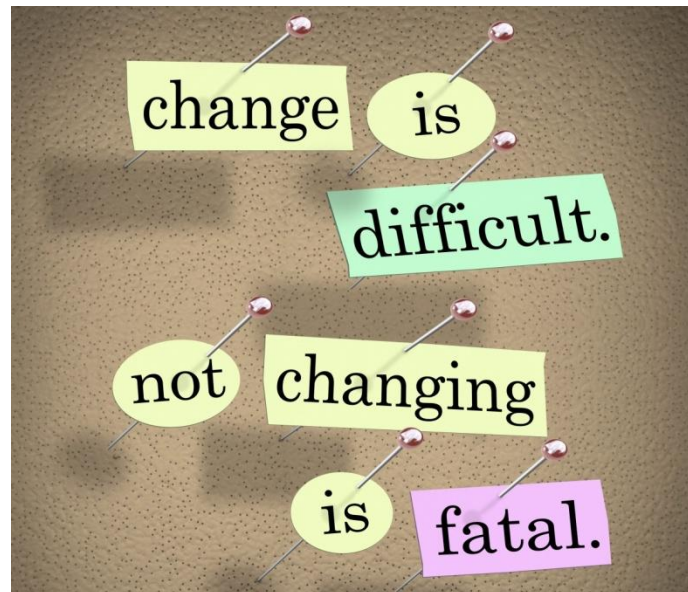
Blood Differentials

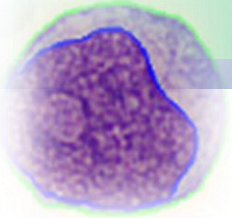
2012 - etd.ohiolink.edu



Microscopia digitale

Non sono stati trovati studi noti che descrivano le percezioni dei professionisti dei laboratori medici sull'utilizzo della morfologia digitale, viene evidenziata una difficoltà di transizione dal microscopia ottica alla morfologia digitale





“Non è la specie più forte che sopravvive né la più intelligente ma quella più ricettiva ai cambiamenti”

Charles Darwin (1809- 1882)

