

Progetto di ricerca HistoDSSP

Sistema per il supporto alla diagnosi isto-citopatologica DSSP (Decision Support Systems for Pathology) basato sull'analisi di immagini ottenute in tecnologia WSI (Whole Slide Imaging)

SOGGETTO PROPONENTE: SMARTPAT SRL CODICE: RICERCA_2-87

DETERMINAZIONE SARDEGNA RICERCHE N DET DG 511 REA DEL 25-03-2019



Capofila
CUP G44B19000000006



Organismo di ricerca
CUP F24I18000120006

DOCUMENTO STRETTAMENTE RISERVATO SOGGETTO A DIVIETO DI DIVULGAZIONE

E' Vietato il trattamento del contenuto del presente documento (in particolare la sua riproduzione e la sua divulgazione), anche parziale, in qualsiasi forma e modo a meno di preventiva autorizzazione scritta da parte di SmartPath. SmartPath si riserva di tutelarsi nei modi opportuni contro eventuali violazioni di questa volontà. Si ricorda che ogni difforme trattamento o qualsiasi diversa forma di utilizzazione costituirà illecito ai sensi degli art. 11 e 15 del D.lgs. n. 196 del 2003 e comporterà l'obbligo di risarcire ogni conseguente danno.

Nella “Relazione descrittiva del Progetto di Ricerca e Sviluppo” presentata in risposta al bando si dice estrema sintesi che l’obiettivo del progetto HistoDSSP è di sviluppare un Sistema automatico computer-assistito per l’analisi morfologica quantitativa delle immagini di reperti istologici, ottenuta mediante l’elaborazione delle immagini digitalizzate di vetrini istologici

l’innovatività del progetto riguarda la verifica dell’applicabilità degli algoritmi alle immagini WSI di vetrini scannerizzati, al fine di ottenere indici numerici utili per una più precisa e oggettiva categorizzazione dei reperti istologici (per es. dimensione, quantità, densità e distribuzione delle reperti patologici, contorni, presenza di collagene, ecc.), non immediatamente percepibili dall’occhio umano con la microscopia ottica tradizionale

La capofila SmartPath si è occupata delle attività relative l’attivazione del laboratorio di ricerca, lo sviluppo del prototipo, mentre l’organismo di ricerca, DIEE si è occupato dello sviluppo degli algoritmi di elaborazione delle immagini.

Lo studio commissionato alla Azienda Ospedaliera «Brotzu» di Cagliari (AOB) è servito per recuperare i casi istologici e i relativi preparati (vetrini), utilizzati da SmartPath per la generazione delle immagini WSI.

Progetto HistoDSSP sviluppato in 4 FASI (workpackage)	
Attivazione del Laboratorio di ricerca	Scelta della Patologia da considerare per la costruzione del database delle immagini WSI tra quelle per cui è possibile determinare uno score quantitativo associato ad un'analisi morfometrica dell'aggregato cellulare presentate sui vetrini.
	Arruolamento dei casi utilizzando lo studio commissionato a AOB osservazionale retrospettivo, mediante confronto tra due metodiche di valutazione della Patologia scelta: a) score semi-quantitativo (attualmente in uso) e b) score quantitativo computer-assistito.
	Recupero dei preparati istologici (blocchetti paraffinati) relativi ai casi selezionati, allestimento dei vetrini (colorazione), identificazione (bar-code 2D) e scannerizzazione.
	Alimentazione del database mediante la realizzazione di un prototipo software che si occupi di recuperare le immagini WSI dallo WS Scanner e caricarle nel database delle immagini. La realizzazione del prototipo richiede una ricerca tecnologica specifica per la progettazione del database, per il trasferimento di immagini di grandi dimensioni
Sviluppo degli algoritmi di elaborazione delle immagini	Studio e sviluppo di algoritmi per l'analisi delle immagini WSI, con lo scopo di ottenere indici numerici utili ad una più precisa e oggettiva categorizzazione morfologica dei reperti istologici (vetrini).
	Attività di "Riciclo", necessaria nel caso gli algoritmi di analisi dell'immagine WSI non risultino sufficientemente discriminanti a causa della cattiva qualità dell'allestimento del vetrino (colorazione errata, bolle nel copri-oggetto, settori dell'immagine fuori-fuoco).
Sviluppo del prototipo	Implementazione nel prototipo di una funzione di analisi differenziale utilizzabile dal Patologo per la valutazione di casi patologici analoghi, dove l'analogia viene individuata sulla base delle informazioni cliniche riferite al caso e informazioni microscopiche quantitative, ottenute dagli algoritmi di analisi delle immagini WSI del vetrino.
	Implementazione nel prototipo della grafica in grado individuare la "Categoria diagnostica" più probabile cui associare il caso in esame. La Categoria verrà individuata sulla base di osservazioni suggerite dalle linee guida per il trattamento della specifica patologia disponibili in letteratura per la diagnosi del caso.
Validazione dei risultati	Definizione della metodologia di validazione del risultato della Ricerca con particolare attenzione alla giustificazione statistica della scelta del campione.
	Conclude lo studio, un'Analisi comparata tra la Categoria Diagnostica ottenuta come output del software prototipale HistoDSSP e quella ottenuta come revisione in cieco mediante microscopia ottica dei vetrini istologici originali.

Progetto HistoDSSP - Rimodulazione COVID

Le difficoltà dovute all'emergenza COVID 19 nell'autunno 2020 ci hanno costretto a rivedere la modalità di esecuzione dell'attività di Validazione dei risultati che per metà sarebbe dovuta avvenire utilizzando il microscopio ottico presso il laboratorio della AO "Brotzu". Ciò ha significato ridefinire l'obiettivo OO4.2 e costretto a rivedere la programmazione delle attività specifiche e propedeutiche

La validazione dei risultati della ricerca, secondo il piano originale, sarebbe dovuta avvenire sulla base dei risultati di uno studio comparativo cieco eseguito in due sessioni distinte di refertazione dei casi istopatologici selezionati: la prima in microscopia digitale e la seconda, per gli stessi casi, in microscopia ottica presso il laboratorio di Anatomia Patologica della AO "Brotzu". Questa seconda attività non è potuta avvenire a causa emergenza COVID e pertanto si è deciso di operare la validazione dei risultati della ricerca tramite la comparazione dei risultati ottenuti con la microscopia digitale e i risultati ottenuti a suo tempo in microscopia ottica, recuperando le informazioni dall'archivio dei referti originali, dopo averle anonimizzate.

Malgrado la validazione dei risultati non sia avvenuta nei termini rigorosi dichiarati nella Relazione iniziale, riteniamo che gli obiettivi essenziali del progetto citati in premessa siano stati raggiunti e non si esclude che, vista la qualità dei risultati ottenuti, lo studio comparativo a completamento dello studio commissionato alla AOB, potrà essere ripreso al termine dell'emergenza COVID 19 a fronte di iniziative di finanziamento terze rispetto al progetto HistoDSSP

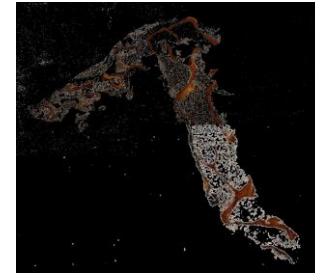
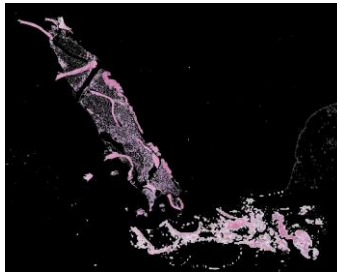
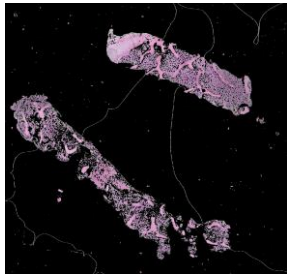
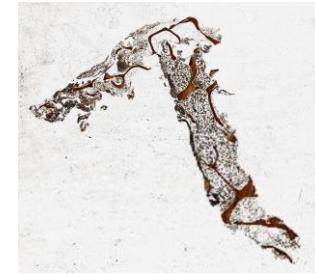
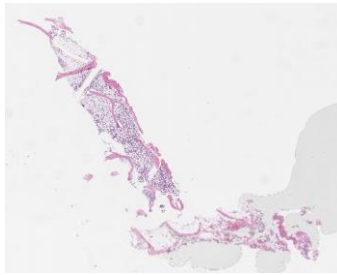
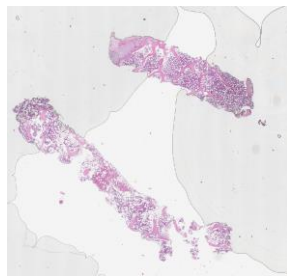
ALGORITMI – SCHEMA A PASSI

- Per quanto riguarda gli algoritmi di elaborazione di immagini sviluppati nel corso dell'attività A2.2 per la caratterizzazione morfologica di immagini WSI, è stato confermato lo schema dei passi
- Come si può osservare dallo schema, entrambe le colorazioni seguono lo stesso flusso, per poi differenziarsi in due task più specifici che sono l'analisi della Fibrosi nelle immagini con colorazione Argentica e l'analisi della Cellularità per l'immagine con colorazione H&E (Ematossilina-Eosina).



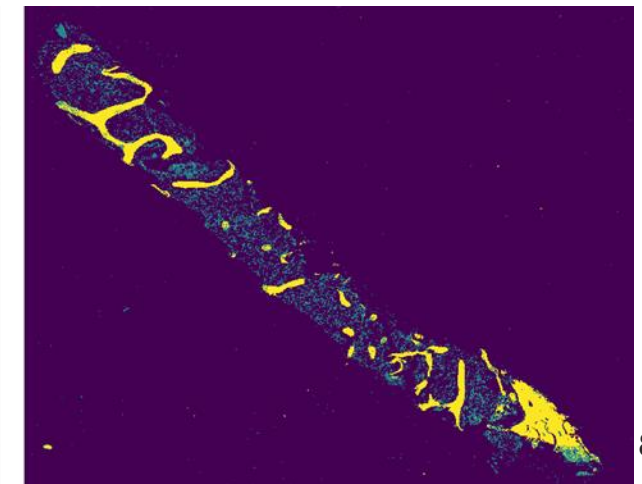
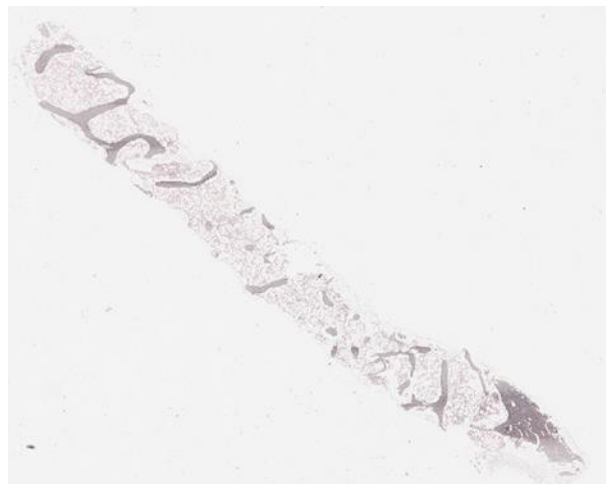
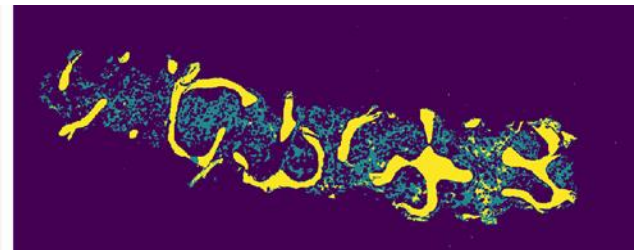
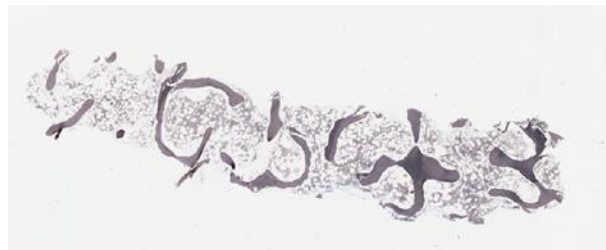
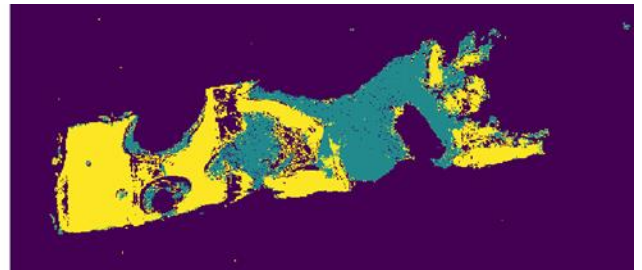
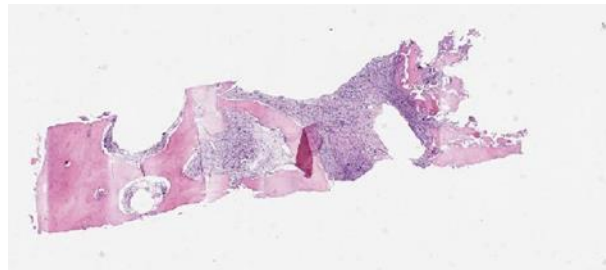
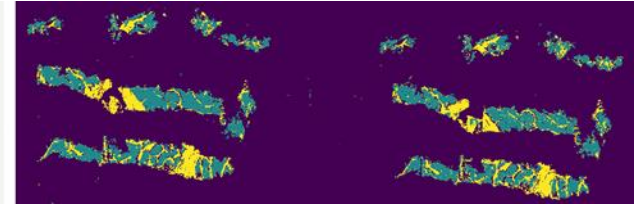
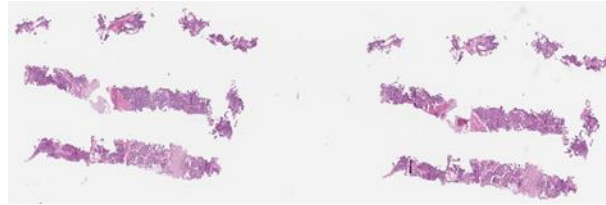
ALGORITMI – COLORAZIONE H&E E ARGENTICA

- Abbiamo addestrato differenti classificatori allo scopo di catalogare le immagini di colorazione H&E e argentica e i migliori risultati sono stati ottenuti con il classificatore SVM e le features estratte dagli istogrammi dello spazio colore RGB e quindi questa versione è quella che è stata integrata nel software di HistoViewer



ALGORITMI – LOCALIZZAZIONE OSSO E NON-OSSO

La localizzazione della regione di osso e non-osso permette di suddividere la porzione del vetrino occupata dal tessuto in due regioni che presentano appunto il tessuto osseo e il tessuto non osseo. Nonostante le regioni di osso e non-osso abbiano delle caratteristiche visive molto differenti tra loro, sia in termini cromatici che in termini di struttura questa netta separazione in molti casi viene meno a causa dell'assenza di una standardizzazione nella colorazione dei vetrini o della presenza di ulteriori regioni come la cartilagine, che ha una colorazione e struttura simile a quella dell'osso.



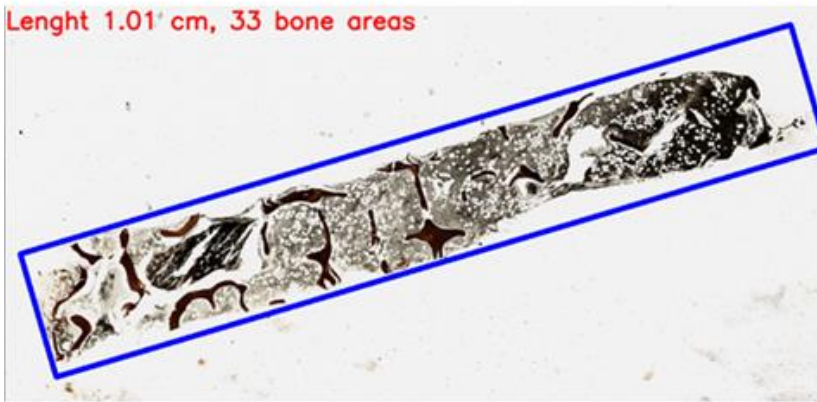
ALGORITMI – VALIDAZIONE DEI VETRINI

Per stabilire se un vetrino può essere utilizzato o meno per la diagnosi si fa riferimento a misure stabilite dalla WHO secondo le quali il tessuto presente nel vetrino deve avere:

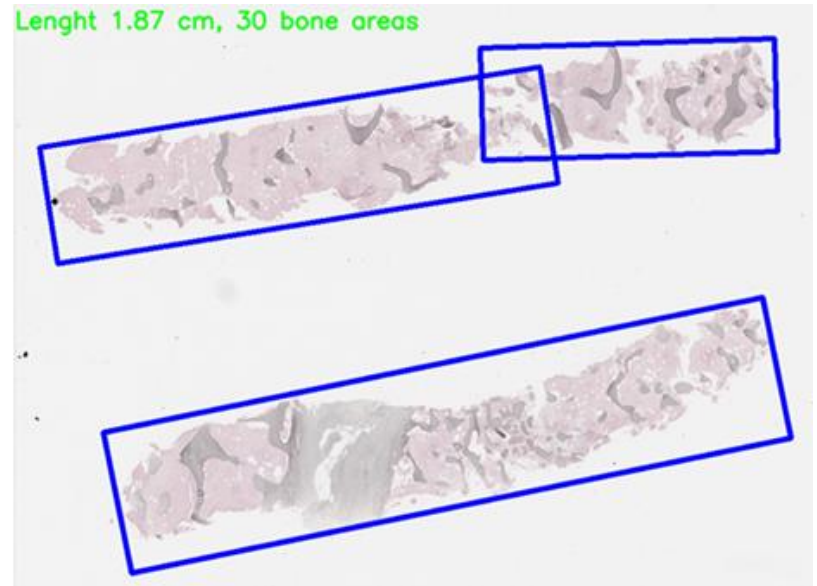
- Una lunghezza di almeno 1.5 cm
- Un numero di aree di tessuto spugnoso maggiore di 10

Per agevolare la visualizzazione e la conferma da parte del patologo il tessuto è stato «racchiuso» all'interno di una forma semplice e facilmente misurabile che è il Minimum Enclosing Rectangle (MER)

Lenght 1.01 cm, 33 bone areas



Lenght 1.87 cm, 30 bone areas

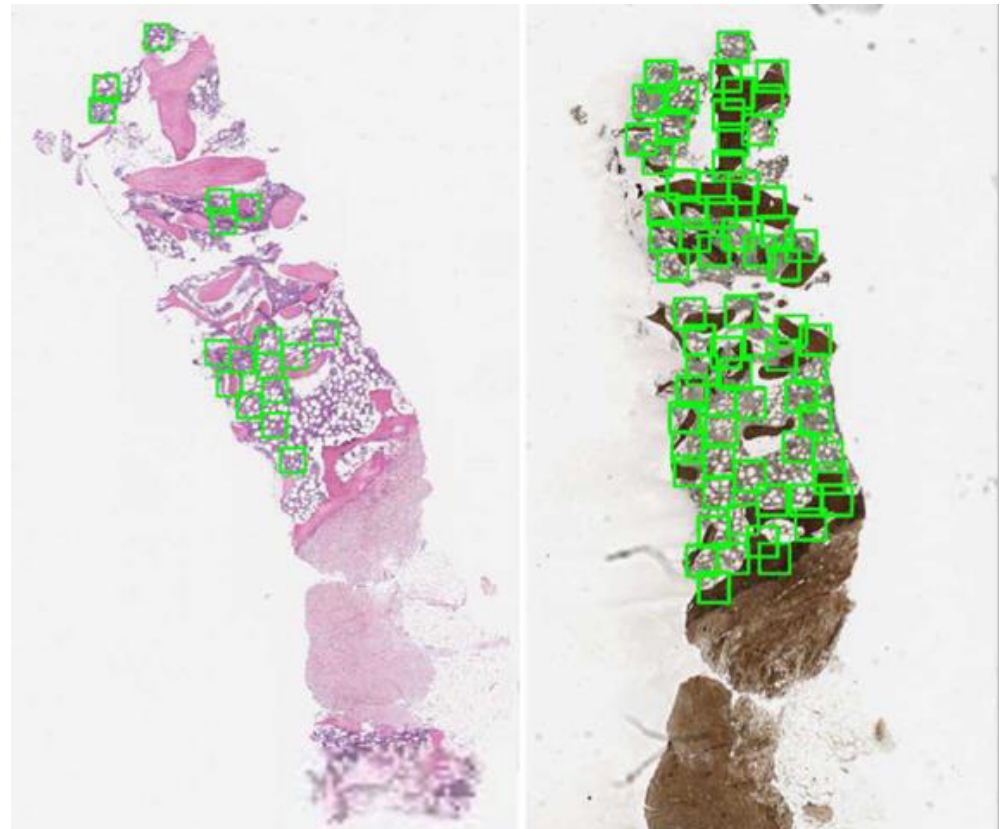


ALGORITMI – ESTRAZIONE DELLE PATCH

Una volta stabilito che il vetrino è valutabile, l'analisi si focalizza nelle zone di tessuto non osseo, perché sono queste che presentano evidenze di una possibile patologia, che si manifesta con variazioni nel numero e distribuzione delle cellule (per le immagini H&E) e una variazione nelle strutture reticolari (immagini argentiche). Dato che l'analisi manuale dell'intera WSI da parte del patologo sarebbe un compito troppo oneroso, specialmente in termini di tempo, in genere viene eseguita solamente su un certo numero regioni di interesse o patch.

Inoltre, non tutte le regioni di tessuto non osseo possono essere utilizzate per l'analisi, ma solamente le regioni con determinate caratteristiche:

- Dimensione della singola patch fissa pari a 512x512 pixels
- Patch estratte da regioni
 - Con una distanza minima da osso e sfondo pari a 150 micron
 - Che non presentano artefatti da taglio
 - Che non presentano vasi sanguigni (parametro non considerato)

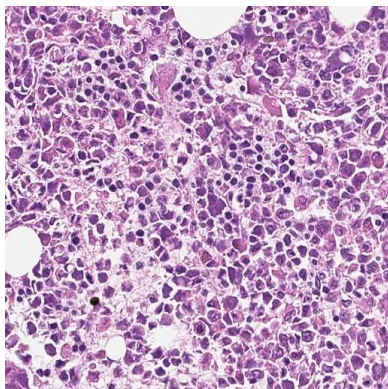


ALGORITMI – ANALISI CELLULARITÀ

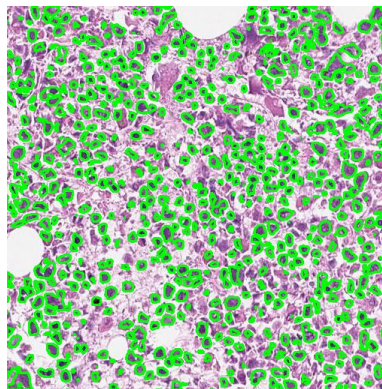
L'analisi delle cellularità è l'ultimo step del processo di analisi di immagini ed è l'unico step in cui viene presa in considerazione solamente la colorazione H&E. Dato che questo step è uno dei più importanti per la riuscita dell'algoritmo di elaborazione di immagini abbiamo testato differenti approcci, per verificare sia qualitativamente che quantitativamente le performance su questo specifico tipo di immagini

I risultati visivi mostrano come gli approcci supervisionati non sono molto accurati né per la localizzazione né per la segmentazione e pertanto il metodo utilizzato per l'analisi delle cellule e integrato con il software HistoViewer è quello basato sulla segmentazione **non supervisionata**

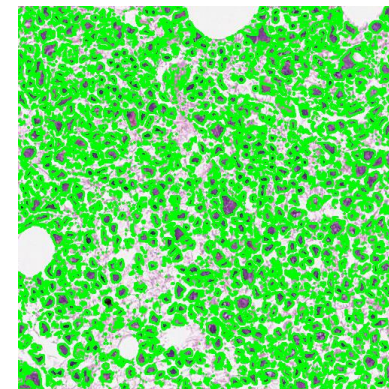
Immagine
originale



Approccio
supervisionato



Approccio non
supervisionato



ALGORITMI – RIMOZIONE DEGLI ADIPOCITI

Gli adipociti sono cellule stromali (o mesenchimali) mature e costituiscono il tessuto adiposo del midollo osseo. Possiamo facilmente individuarli perché sono le grandi aree bianche all'interno delle patch o WSI. Allo stesso modo sono facilmente estraibili con tecniche di elaborazione delle immagini simili a quelle usate precedentemente

Risultato finale del processo di analisi della cellularità su due patch estratte manualmente dalle WSI del progetto: gli adipociti sono evidenziati in azzurro e le cellule di colori differenti in base alla dimensione, blu, verde, giallo e rosso, dalla più piccola alle più grande rispettivamente

Immagine
originale

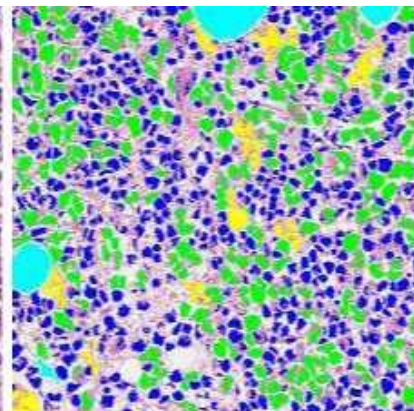
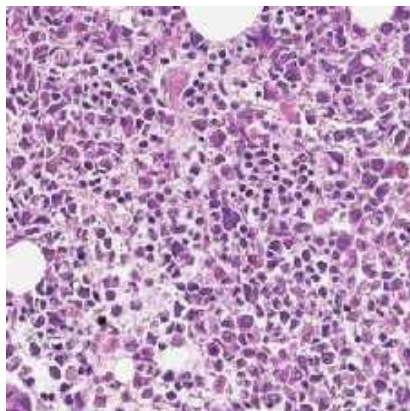
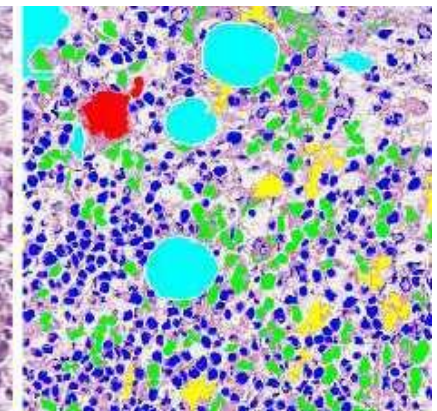
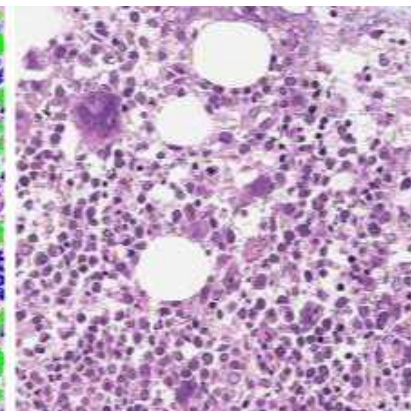


Immagine
originale



ALGORITMI – ANALISI DELLE FIBROSI

Le fibre del midollo osseo, data la loro morfologia sottile e caotica, sono molto difficili da estrarre attraverso un normale approccio di segmentazione e classificazione. L'obiettivo è di estrarle e individuare le regioni dove avviene un cambio di direzione repentino fra le linee. Dopo vari tentativi, l'algoritmo risultato più efficace si basa sull'analisi dello scheletro morfologico della patch ottenuto con una serie di passaggi successivi.

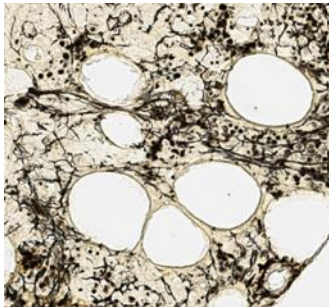
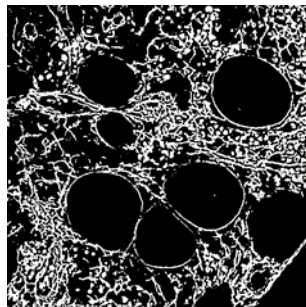
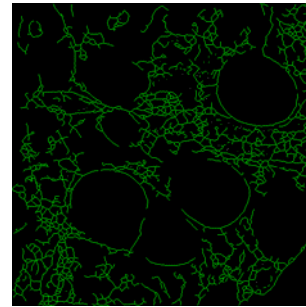


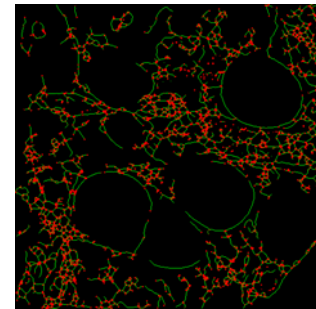
Immagine
originale



fibre
segmentate



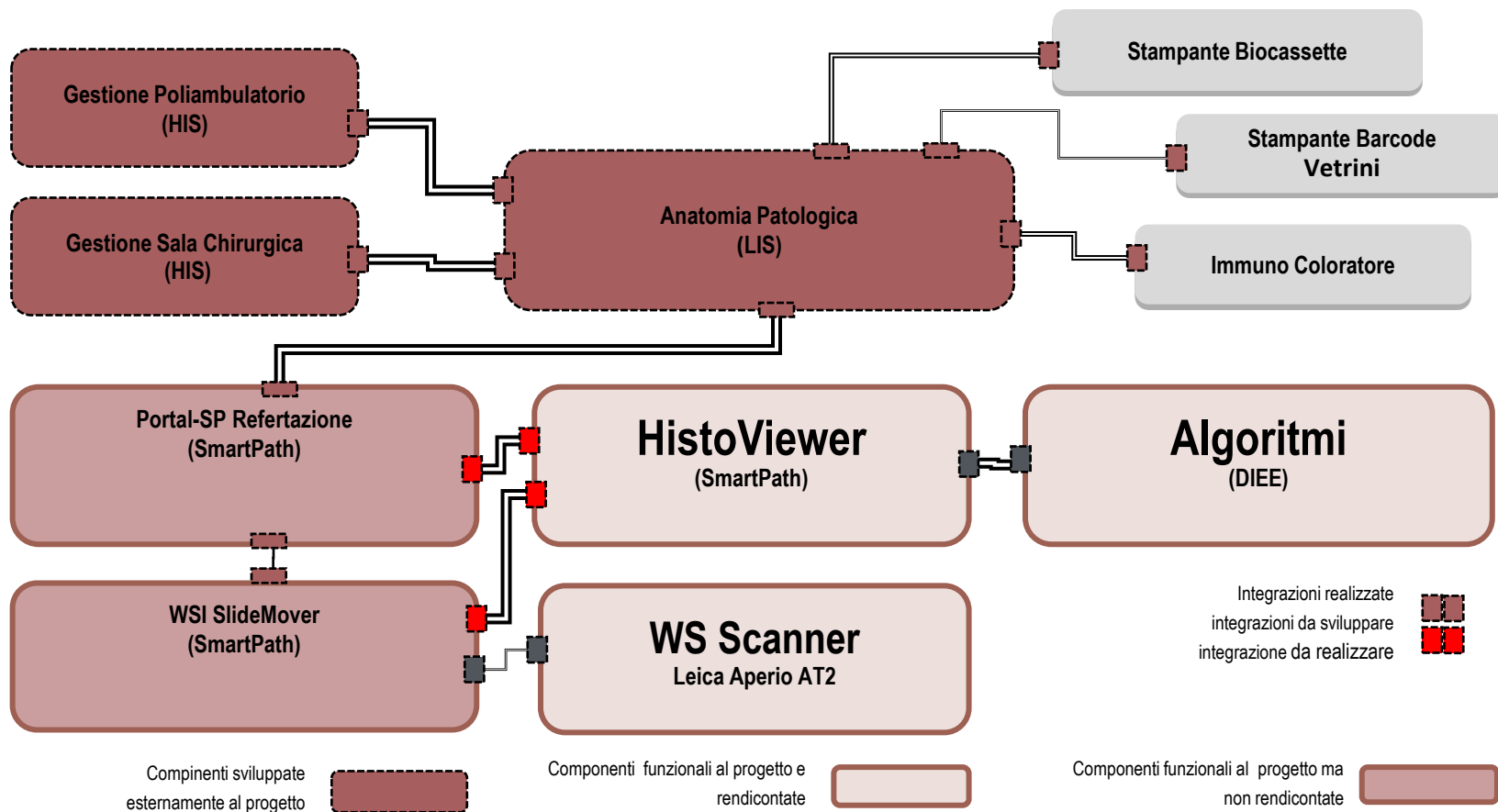
scheletro
morfologico



rilevamento dei
punti di interesse

HISTODSSP - IL PROTOTIPO REALIZZATO

Il prototipo sviluppato come risultato del progetto di ricerca HistoDSSP realizza l'integrazione degli algoritmi sviluppati da DIEE nel software HistoViewer sviluppato da SmartPath a partire dal codice sorgente acquistato come semilavorato dalla società svizzera PrimaLAB SA.



HISTODSSP - IL PROTOTIPO REALIZZATO

I moduli software componenti i blocchi funzionali e le integrazioni, sono stati realizzati nei termini ipotizzati in origine :

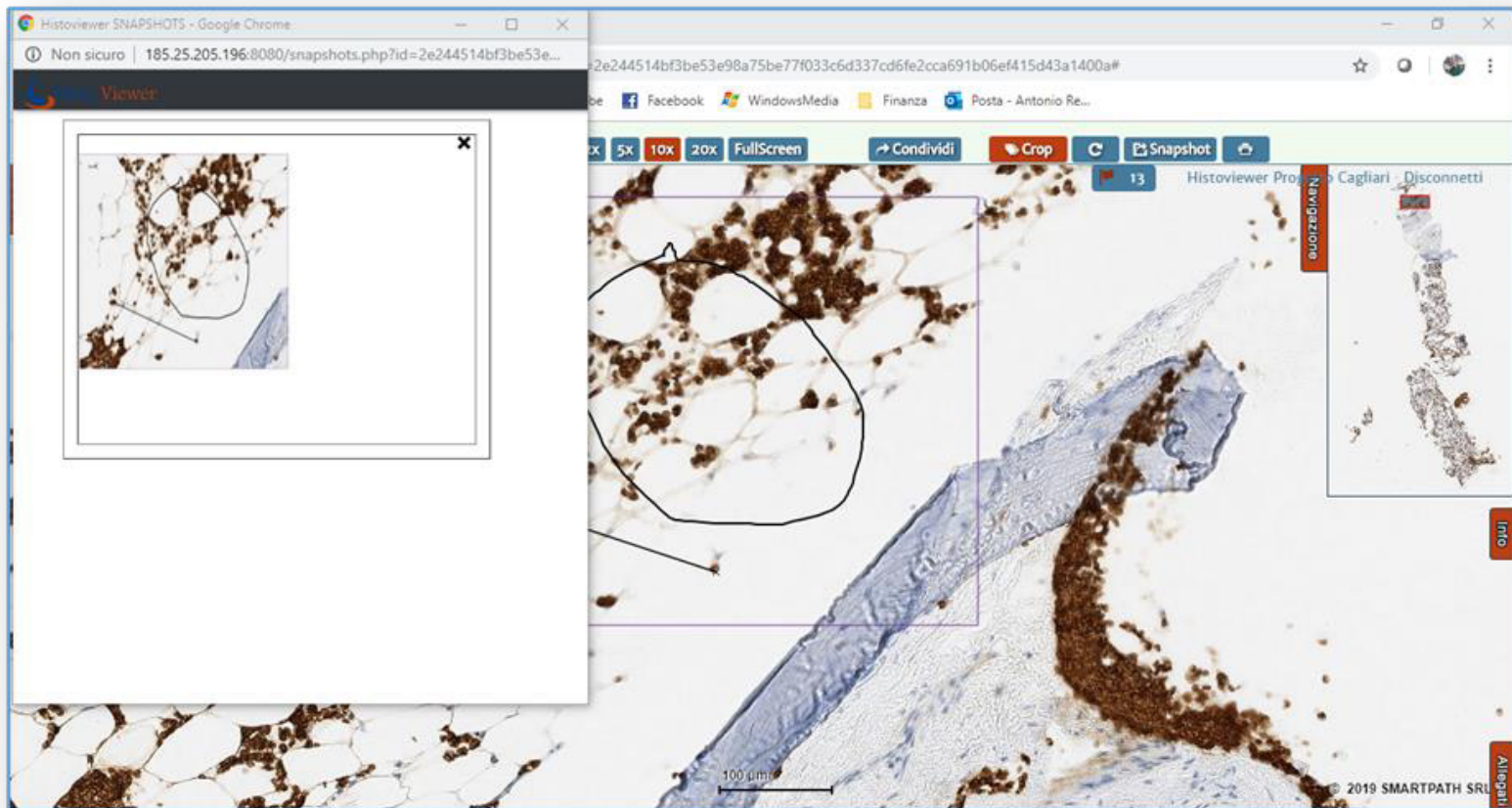
- Interfaccia di integrazione tra il blocco “Algoritmi” e “HistoViewer” per il trasferimento delle informazioni prodotte dal sistema di algoritmi al software HistoViewer che provvede alla loro rappresentazione grafica.
- Interfaccia di Integrazione tra il blocco “Workstation Scanner” e “WSI Slide mover” che consente al patologo di utilizzare la microscopia digitale da remoto, sincronizzando la visualizzazione dei vetrini con lo strumento che utilizza per la refertazione del caso istopatologico in esame (Checklist)

Gli step di applicazione degli algoritmi seguono lo schema recursivo presentato in figura per ciascun caso, considerando l'intero set di vetrini associati. Occorre notare che la «digital pathology» moderna è orientata verso la scansione su larga scala di un sempre maggiore numero di sezioni microscopiche, in modo da garantire che l'intera lesione sia rappresentata sulle immagini digitali.



HISTOVIEWER - SNAPSHOT

Funzione che consente la memorizzazione di porzioni «Snapshot» di immagini WSI «ritagliate» (Cropped), direttamente nel database delle Immagini WSI in modo da poterle condividere con DISE che le utilizza per «addestrare» gli algoritmi porzione per porzione, facendo risparmiare tempo di elaborazione ed evitando di andare ad applicare l'algoritmo su porzioni di immagine che a giudizio del Patologo refertante sono di scarso interesse



HISTOVIEWER – VASSOIO MULTISLIDE

Funzione che consente di «vedere» in un'unica schermata contemporaneamente tutti i vetrini del caso come se fossero disposti su un unico «vassoio» virtuale.

Operando separatamente su ciascun vetrino visualizzato e possibile «centrare» l'origine della navigazione e del livello di zoom e quindi procedere a sincronizzare tutti i vetrini visualizzati nel vassoio in modo che si «muovano» assieme

The screenshot displays the Histo Viewer software interface, which is designed for viewing multiple virtual slides (svs) simultaneously. The interface is organized into four quadrants, each showing a different slide from the same case.

Top-Left Slide: File name: 3900000019.svs. Dimensions: 13,944 x 6,644. Size: 22 MB. Format: tif/jpeg. Pixel size: 0.502 µm. Adjustments: Luminosità, Contrasto, Nitidezza, Rosso, Verde, Blu.

Top-Right Slide: File name: 3900700019.svs. Dimensions: 33,864 x 8,361. Size: 55 MB. Format: tif/jpeg. Pixel size: 0.502 µm. Adjustments: Luminosità, Contrasto, Nitidezza, Rosso, Verde, Blu.

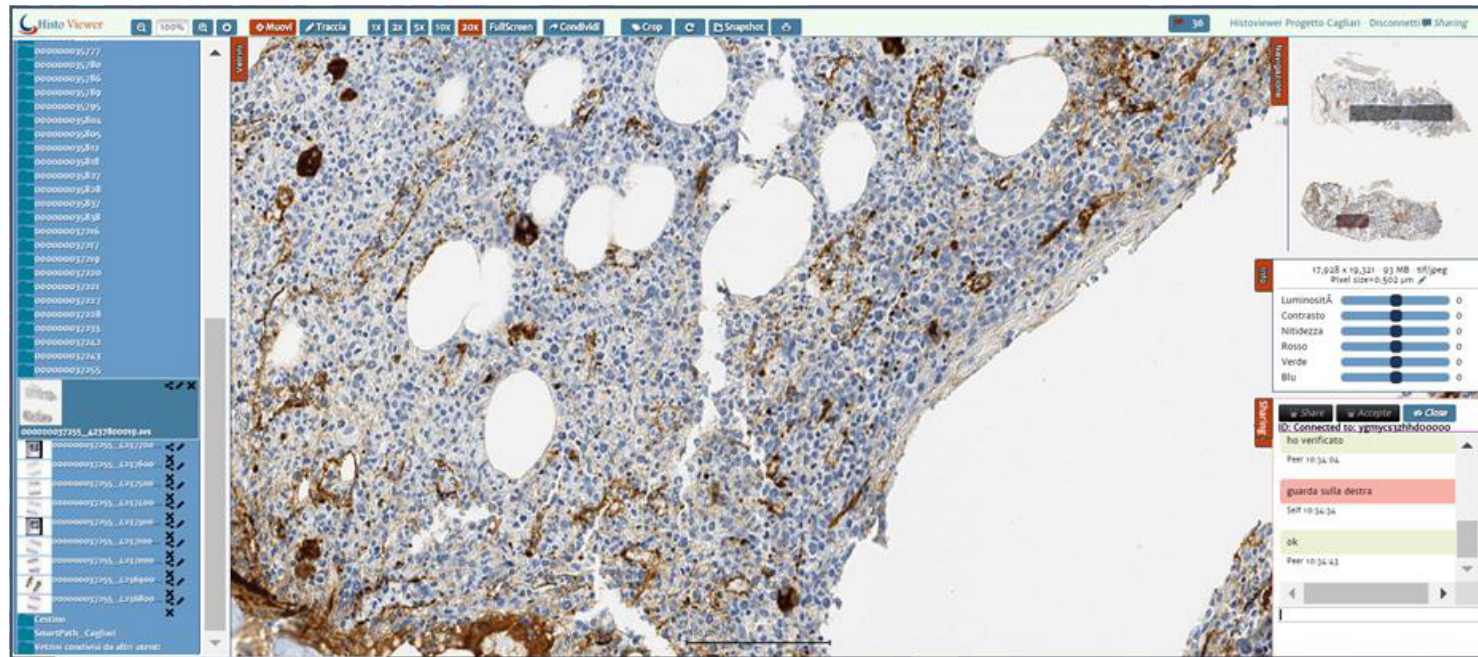
Bottom-Left Slide: File name: 3900500019.svs. Dimensions: 27,888 x 8,955. Size: 72 MB. Format: tif/jpeg. Pixel size: 0.502 µm. Adjustments: Luminosità, Contrasto, Nitidezza, Rosso, Verde, Blu.

Bottom-Right Slide: File name: 3900400019.svs. Dimensions: 61,752 x 13,406. Size: 127 MB. Format: tif/jpeg. Pixel size: 0.502 µm. Adjustments: Luminosità, Contrasto, Nitidezza, Rosso, Verde, Blu.

Each slide panel includes a navigation toolbar with zoom levels (1X, 2X, 5X, 10X, 20X), a search icon, and a 'Snapshot' button. A 1 mm scale bar is present at the bottom of each slide. The software version is © 2019 SMARTPATH SRL.

HISTOVIEWER – CALL CONFERENCE

- Funzione che consente la visualizzazione delle medesime immagini WSI tra più patologi che discutono il caso da postazioni remote, conservando la sincronia di zoom e di movimento, ovvero tutti gli utenti «vedono» la stessa porzione di immagine con lo stesso livello di zoom
- Call Conference si applica non solo al singolo vetrino ma all'intero vassoio.
- Call Conference comprende una funzione «Chat non gerarchica» che consente a tutti i partecipanti contemporaneamente la possibilità scambiarsi opinioni



HISTOVIEWER & ALGORITMI

Funzione che consente l'attivazione in HistoViewer dell'algoritmo che effettua l'analisi del tessuto per la localizzazione delle regione Osso-nonOsso e alla visualizzazione grafica in una finestra pop-up.

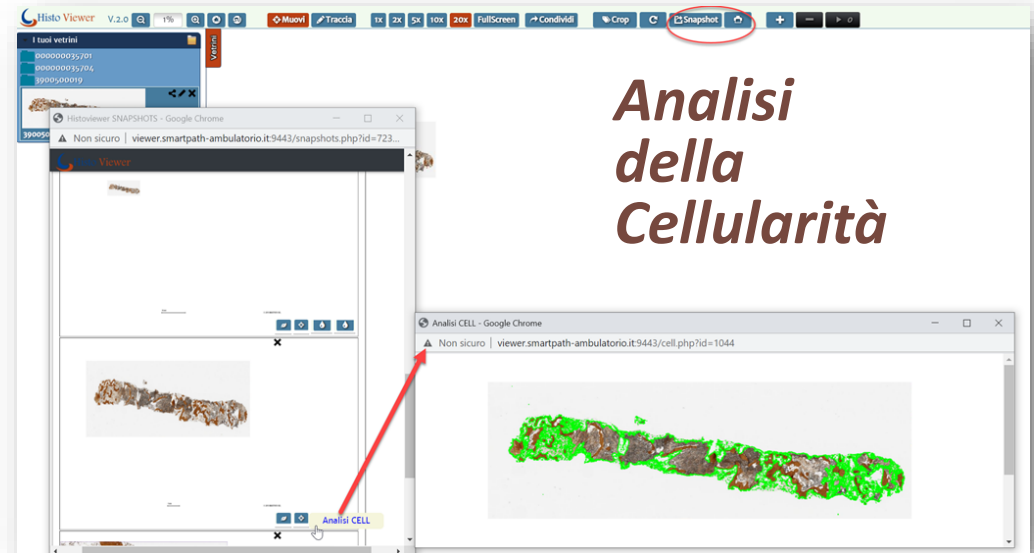


The image displays a screenshot of the HistoViewer software interface. The main window shows a histological section of tissue with the text "Analisi dei tessuti" overlaid. A red arrow points from a button in the top toolbar to a pop-up window titled "Analisi Tissue - Google Chrome". This pop-up window shows the same tissue section with a color-coded segmentation, where the bone regions are highlighted in magenta against a black background. To the left of the pop-up window, the text "Osso vs. non osso" is displayed vertically.

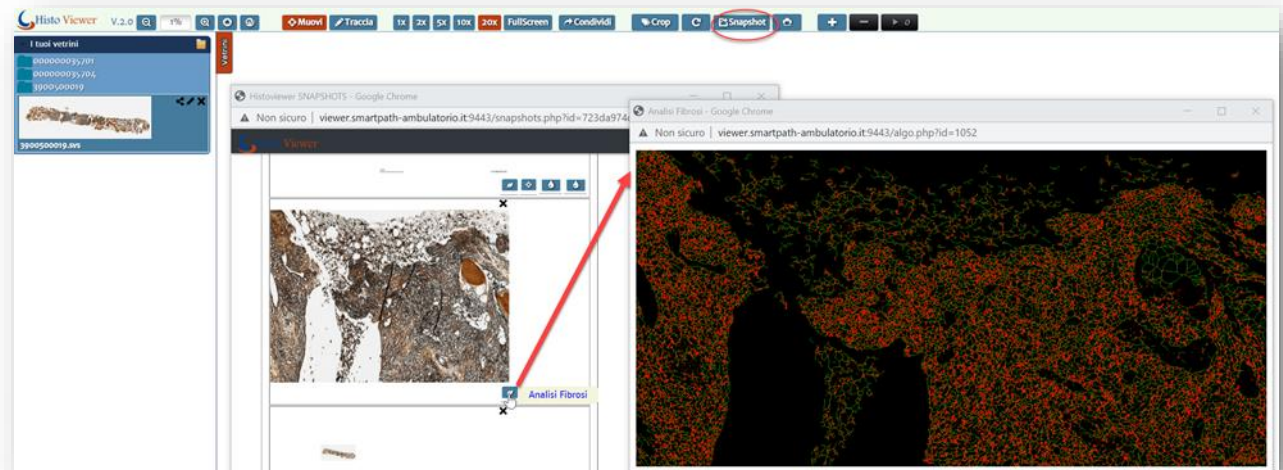
Osso vs. non osso

HISTOVIEWER & ALGORITMI

Funzione attivabile per una specifica «Snapshot» selezionato da HistoViewer dell'algoritmo che effettua l'analisi cellularità e della fibrosi e alla loro visualizzazione grafica in una finestra popup



Analisi della Fibrosi



HISTOVIEWER & ALGORITMI

Non sicuro | viewer.smartpath-ambulatorio.it:9443/index.php?page=home&id=723da974c23c0ba6884045d31830fda9db711f628969c79c65c3a3d08de514dd#

Histo Viewer V.2.0

I tuoi vetrini

- 00000035701
- 00000035704
- 00000035704_406030019.svs
- 00000035704_405990019.svs
- 00000035704_406000019.svs
- 00000035704_406010019.svs
- 00000035704_405970019.svs
- 390050019
- 390050019.svs

Non sicuro | viewer.smartpath-ambulatorio.it:9443/snapshots.php?id=723...

Histo Viewer

Analisi Patch - Google Chrome

Non sicuro | viewer.smartpath-ambulatorio.it:9443/patch.php?id=1044

```
{ "rank":  
  [1118,378,790,486,637,857,1101,778,426,27,440,1177,512,1061,1075,582,283,760,838,1044,856,190,765,948,222,987,307,114,647,774,1093,726,  
  [2,0,1,0,2,0,2,0,2,0,2,0,2,0,2,0,1,0,1,0]]
```

coordinate che identificano posizione e dimensione di ogni singola Patch al interno del immagine WSI.

Analisi Patch

