

Системы видеоцифрового анализа для лабораторной диагностики. Аппаратура и программное обеспечение

Волощук С.Г., Старовойтова Т.А.*, Кутвицкий В.А.***, Туголуков А.Е.,
Зайко В.В., Стереополо Н.А.*, Егоров Е.Е.***, Барский В.Е.***,
Мартынкина Л.П.***, Венгеров Ю.Ю.***

ООО «ОктаМедика»;

*5-й Клинико-диагностический центр;

**Троицкий институт инновационных и термоядерных исследований;

***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

В статье представлены результаты работ по созданию специализированных систем видеоцифрового анализа для регистрации результатов самых распространенных иммунологических и клинических биохимических тестов с описанием идеологии и принципов конструирования приборов, подбора комплектующих, разработки программного обеспечения и приложений разработанной аппаратуры к конкретным анализам.

Методы компьютерного видеоанализа в настоящее время активно развиваются, и их приложения в задачах клинической лабораторной диагностики являются чрезвычайно актуальными. Развитие этих приложений стимулируется стремительным усовершенствованием всех компьютерных технологий и все более расширяющейся доступностью соответствующей аппаратуры за счет снижения ее стоимости.

В настоящее время в лабораторной диагностике, где доминировали классические методы фотометрии, отражательной фотометрии или денситометрии, все чаще используются системы видеоцифровой регистрации (СВР). В этих системах в качестве регистрирующих элементов применяются компьютерные сканирующие устройства или цифровые видеокамеры.

Самыми распространенными примерами применения СВР в клинической лаборатории, являются денситометры для регистрации результатов электрофореза сыворотки с получением изображения с помощью обычных коммерческих сканеров или цифровых видеокамер. Эти системы уже широко

применяются и выпускаются и за рубежом, и в России. В России такие системы разработаны и выпускаются НПЦ «Астра» (г. Уфа), ООО «Октамедика» (г. Москва) [1-8].

В последнее время появились видеоцифровые системы для считывания анализов мочи на полосках сухой химии на базе линейки чувствительных элементов, приборы для считывания результатов определения групп крови и др. Все эти разработки появились в течение последних 3-4 лет, и большинство из них только заменяет имеющиеся традиционные системы регистрации, и речь не идет о получении каких-либо принципиальных преимуществ, достижимых с помощью видеоцифровых подходов. Тем не менее, очевидно, что тенденция состоит в расширении количества таких разработок, в особенности в тех областях, где видеоцифровые системы способны дать решающие преимущества, или там, где другие варианты регистрации в принципе не применимы.

Другой линией внедрения видеоцифровых систем в сферу лабораторной диагностики является применение разработанных для научных лабораторий видеосистем (так называемых «имиджеров») с универсальным программным обеспечением.

И здесь имеется большое количество нерешенных проблем для клинических лабораторных применений, так как эти приборы обладают большим количеством излишних для задач клинической лаборатории возможностей, сложны в эксплуатации, имеют усложненное программное обеспечение, весьма дороги и не приспособлены ни к каким конкретным типам анализов.

Видеоцифровые системы также получили импульс к развитию благодаря внедряющимся в прак-

тику микроаналитическим методам с применением технологии микрочипов [4], где также наиболее распространенным вариантом регистрации являются специализированные видеокamеры.

В настоящей статье описаны применения технологии компьютерного цифрового видеоанализа для задач лабораторной диагностики, рассмотрены аппаратура и принципы разработки программного обеспечения для использования в практике клинических лабораторий.

Материал и методы

В качестве компонентов для основных узлов системы видеоанализатора использовались:

Регистрирующий элемент — CCD-камера ("charge coupled device") для видеоконференций фирмы «Логитек»; изображение сохраняется в BMP, TIFF и JPG формате файлов; количество цветовых оттенков — до 1 миллиона (24 bit). Камера универсальна по подключению к компьютеру, т.к. выпускается в двух модификациях для USB или COM-порта.

Система освещения на базе смонтированных в держателях нескольких светодиодов WU-7-751 SWC фирмы "Wustlich Opto-Elektronik GmbH" (Германия).

Корпус для электромонтажных работ фирмы "ENSTO" (Финляндия). Материал корпуса химически инертен, хорошо моется и дезинфицируется.

Для достижения полной портативности прибор разработан и может быть использован и специальная бескорпусная конструкция с меньшей по размеру камерой.

В конструкции анализатора имеется также светорассеивающий экран для улучшения равномерности освещения объекта, изготавливаемый из молочно-оргстекла.

Для строгой фиксации объекта в видеоанализаторе конструкция дополнена специальными лотками-держателями для различных объектов, которые также выполняются из оргстекла, металла или пластмассы.

Результаты и обсуждение

1. Принципы конструирования анализатора

Обсуждая направления разработки видеоцифровых методов для лабораторной диагностики, имеет смысл сначала определить преимущества, которые эти подходы могут дать по сравнению с традиционными методами, а также наиболее интересные для практики потенциальные зоны применения этих методов.

Очевидно, что видеорегистрация применима там, где результатом теста является изменение цвета или интенсивности окрашивания зоны планарного объекта. Примерами таких объектов являются окрашенные гели или пленки электрофореграмм, тест-полоски сухой химии для клинических биохимических анализов мочи и крови, тест-полоски для иммунохроматографических определений и некоторые другие. С определенными допущениями к представляющим интерес объектам для видеоаналитических устройств могут быть и любые системы микропланшетов для иммуноферментного анализа и другие объекты для обычных многоканальных систем вертикальной фотометрии.

Таким образом, видеоаналитические подходы могут быть применимы к широкому спектру наиболее распространенных типов тестов, таких как клинические биохимические определения, иммунологические тесты и т.д.

При этом преимуществом видеоаналитических подходов перед традиционной отражательной (или обычной) фотометрией является формирование изображения всего объекта, которое можно затем анализировать с помощью компьютерных методов для получения необходимой информации от любых зон объекта. В обычной фотометрии для регистрации каждого сигнала нужен отдельный канал регистрации, а при видеорегистрации сигнал от каждой зоны объекта может регистрироваться независимо в рамках одного регистрирующего устройства и, таким образом, при определенном построении программного обеспечения видеоцифровую систему можно рассматривать как многоканальную с произвольным количеством каналов. Такая многоканальная регистрация, где количество регистрируемых интересующих полей определяется стратегией использования данного типа анализа на практике, и является решающим преимуществом видеоцифровых систем.

При выборе типа регистрирующего устройства для получения изображения можно рассматривать два варианта. Это сканеры, где как чувствительный элемент применяются ПЗС-линейки и устройства с CCD-камерами. Сканеры производятся в массовом количестве, доступны по ценам, дают изображения высокого разрешения, однако они приспособлены для работы только с плоскими объектами, и могут использоваться только как стационарное оборудование. CCD-камеры позволяют получать изображения хотя и с меньшим, но достаточным разрешением, дают возможность конструировать компактные и более универсальные, чем сканеры, приборы.

Еще одним недостатком сканеров является необходимость непосредственного контакта объекта с поверхностью сканирующего устройства, что неже-

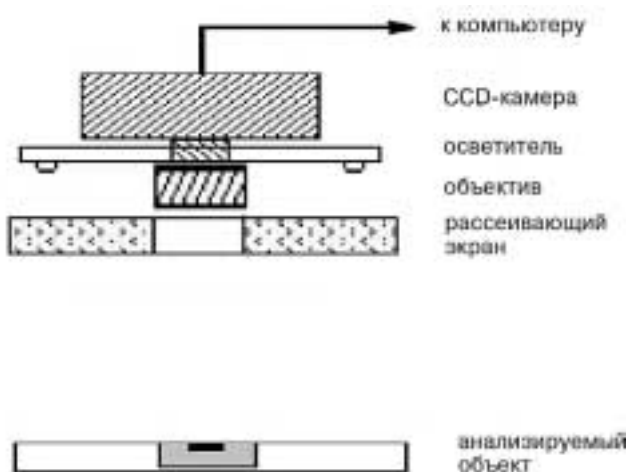


Рис. 1. Принципиальная схема видеоанализатора на основе CCD-камеры

лательно при работе с объектами, на которые нанесли анализируемые, потенциально инфекционно-опасные биологические жидкости.

Исходя из сопоставления преимуществ и недостатков описанных систем, мы избрали в качестве регистрирующего устройства CCD-камеры, производимые в массовых количествах и применяемые для видеоконференций. На рис. 1 представлена принципиальная схема видеоанализатора на основе CCD-камеры.

Для применения в качестве регистрирующего устройства для перечисленных типов лабораторных тестов видеоанализатор должен обеспечивать: регистрацию оптического сигнала во всем диапазоне длин волн видимой области со всей поверхности считываемого образца не более, чем за 5-10 секунд; хранение изображения в виде файла с возможностью распечатки изображения на бумаге; количественный обсчет результатов с компьютерным выводом данных.

Для минимализации стоимости анализатора в качестве элементов для реализации этой схемы были избраны недорогие компоненты, выпускаемые в массовых количествах. Габариты разрабатываемых анализаторов определяются, прежде всего, геометрическими размерами исследуемых объектов и, соответственно, необходимой площадью поля регистрации видеокамеры. Для регистрации серийных биохимических тестов в микродот-варианте в формате 5x6 точек с периодом 4,5 мм необходимый размер поля регистрации анализатора должен составлять 2,5x3,5 см. Регистрация иммунохроматографических тестов требует меньшего размера поля, и поэтому анализатор, пригодный для микродот биохимических тестов, подходит для обоих типов тестов. Работа с тест-полосками определения глюкозы крови («Бетачек») или мочевыми



Рис. 2. Образец анализатора «Видеолаб»

полосками также возможна при таких размерах поля зрения.

Образец анализатора «Видеолаб», предназначенный для регистрации результатов биохимических дот-тестов и иммунохроматографических анализов, удовлетворяющий всем сформулированным требованиям показан на рис. 2 (в варианте комплекта с портативным компьютером типа «Нотбук»).

Он имеет габариты 85x80x120 мм. Система позиционирования образцов позволяет в рамках фиксированного фокусного расстояния работать с иммунохроматографическими тестами в стандартных кассетах и со специальными тест-полосками для определения глюкозы в крови, в моче и иммунологическими тестами в дот-формате, моно-реагентными полосками сухой химии.

2. Принципы построения программного обеспечения

Программное обеспечение для любого типа тестов с использованием видеоцифрового анализа прежде всего должно обеспечить использование основного преимущества CCD-камеры в качестве регистрирующего устройства. Как уже отмечалось, этим преимуществом является возможность независимой регистрации любого количества зон объекта, представляющих аналитическую ценность.

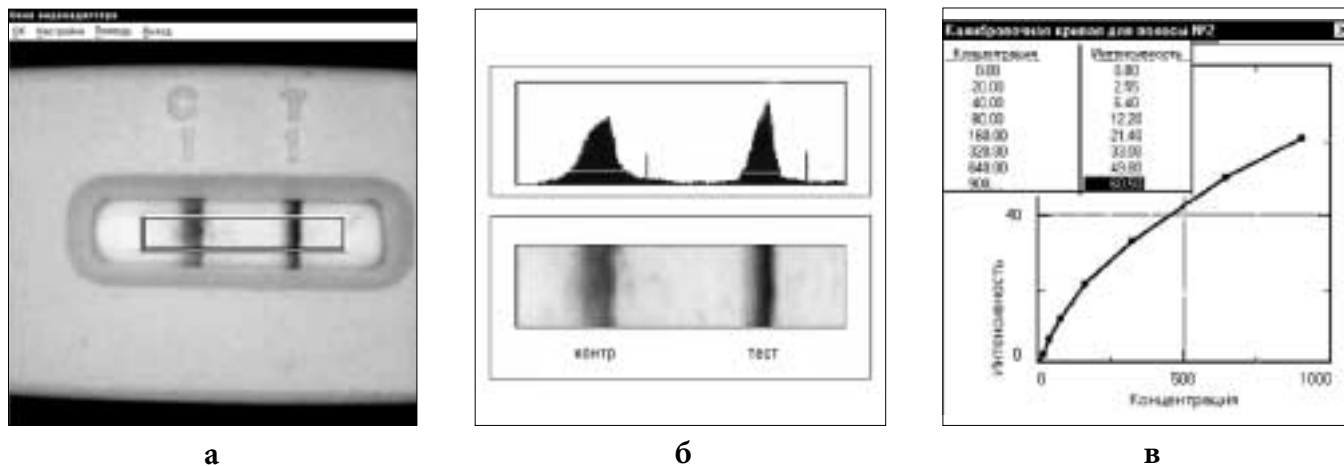


Рис. 3. Обработка результата анализа программой «Видеотест»: а) изображение диагностической зоны тест-полоски в окне настройки программы; б) изображение диагностических линий и их денситограммы; в) окно ввода и построения калибровочной кривой

Мы разработали программное обеспечение для регистрации результатов иммунохроматографических тестов, тест-полосок сухой химии, мульти-дот тестов.

На рис. 3а представлено изображение обычной иммунохроматографической тест-полоски в настройочном окне программы «Видеотест-2». Для иммунохроматографического анализа, когда сигналом о наличии и отсутствии того или иного аналита или пригодности теста является появление или отсутствие полос в соответствующих участках тест-полоски, необходима регистрация наличия двух или более полос и оценка их интенсивности. В настройочном окне каждая аналитическая зона выделяется специальными маркерами, и далее программой проводится расчет интегральной интенсивности окрашивания в рамках этой зоны, который затем используется во всех расчетах (рис. 3б). Численное значение интенсивности в условных единицах представляется в окне результатов. В этом же окне можно установить пороговые значения для автоматического определения положительных или отрицательных результатов теста или достаточной интенсивности контрольной полосы для установления пригодности теста. Численные значения интенсивности также могут быть использованы для полуколичественного и количественного определения детектируемых аналитов. Для этого используется вариант с калибровочной кривой, которая вводится в специальном окне программы (рис. 3в).

Результаты теста распечатываются в виде регистрационной формы, на которой фиксируются как результаты теста в виде изображения аналитической зоны полоски, гистограмм интенсивности соответствующих полос и в числовой форме (рис. 4).

Разработанное программное обеспечение «Видеотест» дает возможность документирования, ко-

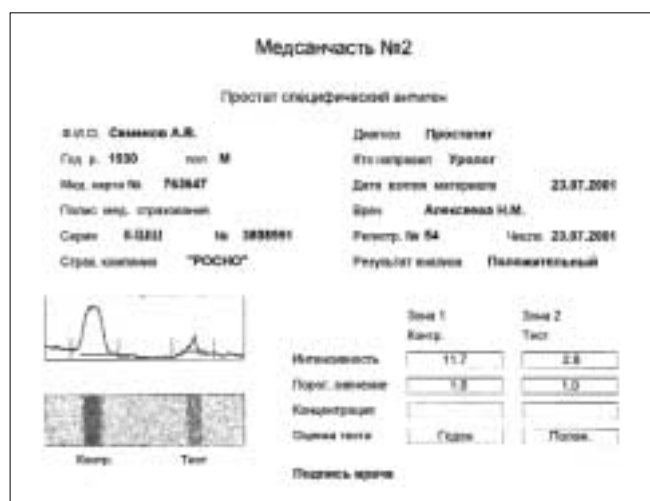


Рис. 4. Результаты теста в виде регистрационной формы

личественной обработки и получения полуколичественных и количественных данных иммунохроматографических определений в различных форматах.

В случае полосок сухой химии зонами регистрации являются фрагменты мембран (обычно прямоугольные), изменяющие цвет при взаимодействии с аналитом, фиксированные на тест-полосках. Интенсивность окрашивания этих зон регистрируется видеонализатором с выделением именно этих зон специальной программой. На рис. 5 продемонстрированы настройочные и пользовательские окна программы.

В данном случае преимущества видеорегистрации проявляются в возможности регистрации двух цветовых зон для одной полоски, а также одновременной регистрации результатов для нескольких полосок одновременно.

В еще большей степени преимущество многоканальной регистрации проявляется для мульти-

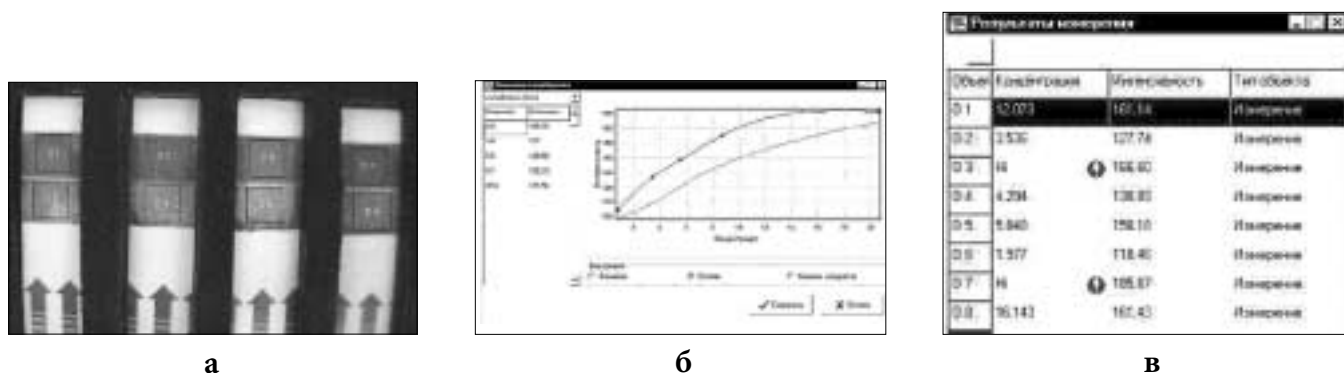


Рис. 5. Обработка результата анализа на полосках сухой химии программой «Видеострип»: а) изображение тест-полосок «Бетачек» для определения глюкозы в крови в настройном окне программы; б) окно ввода и построения калибровочных кривых; в) таблица результатов анализа

дот вариантов анализа. В этом случае речь идет о проведении нескольких однотипных анализов для разных пациентов. Материал для пациентов наносится в виде упорядоченной матрицы микрокапель и в завершающей стадии анализа, когда тем или иным способом проявляется в виде точек окрашивание аналитических зон, получается изображение всего объекта, на котором эти зоны выделяются с помощью методов обработки изображений для дальнейшей количественной оценки.

На рис. 6а в настройном окне программы «Видеодот» показано изображение мембраны при одновременном анализе 30 образцов (матрица 5x6 элементов). На рис. 6б показана сетка разбиения изображения на отдельные зоны, в которых оконтуриваются аналитические точки, а затем в рамках этих контуров проводятся вычислительные процедуры, которые позволяют оценить интенсивность окрашивания каждой точки. Результаты этих измерений представляются в виде таблицы (рис. 6в), где с помощью калибровочных процедур, аналогичных программам «Видеотест» и «Видеострип» для каждой точки могут быть получены результаты измерений в единицах, принятых для данного аналита. Данные на рис. 6 представлены для варианта измерения глюкозы крови с применением мембран для сухой химии.

Мульти-дот анализ с применением видеоанализатора «Видеодот» при использовании специально разработанных приспособлений для высокопроизводительного нанесения образцов от пациентов является весьма перспективным методом проведения серийных биохимических анализов и не уступает по точности и воспроизводимости, традиционным вариантам определений сухой химии и фотометрических определений. Мульти-дот анализ имеет ряд значительных потенциальных преимуществ, таких как серийность, то есть одновременное процессирование многих образцов, возможность включения в

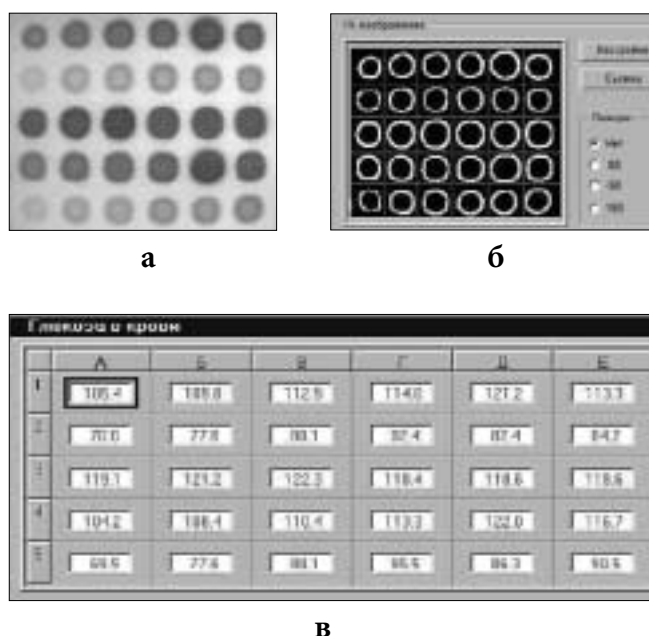


Рис. 6. Обработка результата анализа глюкозы в крови программой «Видеодот»: а) изображение анализируемой мембраны; б) окно настройки с разделяющей сеткой и оконтуренными точками; в) таблица результатов анализа

матрицу контрольных и калибровочных материалов, быстрая регистрация.

Возможность с помощью простого в обращении, недорогого, компактного видеоанализатора регистрировать результаты иммунохроматографического анализа и проводить различные серийные биохимические определения не исчерпывает перспектив видеоцифрового анализа, которые могут применяться и к другим задачам лабораторной диагностики, таким как, например, многопараметрический анализ мочи с применением полосок сухой химии, регистрации результатов иммуноферментного анализа и др.

Литература

1. Венгеров Ю.Ю. Микроминиатюризация лабораторных технологий: перспективы и проблемы // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – N9. – С.5.
2. Венгеров Ю.Ю. Иммунохроматографические «быстрые» тесты с компьютерной видеоцифровой регистрацией — эффективная лабораторная технология для массовых анализов // Клиническая лабораторная диагностика -2000. – N 9. – С.19.
3. Венгеров Ю.Ю., Барский В.Е., Папченко А.А. et al. Способ проведения клинического и биохимического анализа биологических жидкостей и устройство для его осуществления (варианты) // Патент на изобретение № 2157994. – Бюл. №29 от 20.10.2000
4. Мирзабеков А.Д., Прокопенко Д.В., Чечеткин В.Р. et al. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине // В кн. «Информационные медико-биологические технологии под ред. Княжева В.А. и Судакова К.В. – 2002 – Москва – С. 166-198.
5. Папченко А.А., Старовойтова Т.А., Волощук С.Г. et al. Анализаторы и программное обеспечение для видеоцифровой регистрации результатов электрофоретических и иммуноферментных определений // Клиническая лабораторная диагностика – 1999. – N9 – С.50.
6. Старовойтова Т.А., Волощук С.Г., Максимова Е.В. et al. Высоко-производительные скрининг методы на основе микро-дот анализа с видеоцифровой регистрацией // Клиническая лабораторная диагностика – 1999. – N10. – С.16.
7. Старовойтова Т.А., Егоров Е.Е., Максимова Е.В. et al. Иммуно-хроматографические тесты определения онкомаркеров с видеоцифровой регистрацией — перспективы для первичной диагностики злокачественных образований // Клиническая лабораторная диагностика – 2000. – N10. – С. 14-15.
8. Vengerov Y.Y., Voloshuk S.G., Barsky V.E. et al. Multifield image analysis approach: imagers, hardware, software // 1st International Meeting on Imaging Technique in Planar Chromatography (ITPC'99) – 1999. – Jezersko (Slovenia), eds. Vovk I., Prosek M., Medja A. – P.73-76.