

## INTRODUCCIÓ AL PROCESSAMENT I ANÀLISI D'IMATGES DIGITALS. APLICACIONS BIOLÒGIQUES

JORDI LÓPEZ i CAMPS

*Servei de Microscòpia Electrònica.  
Universitat de Barcelona.*

*Rebut 9 octubre 1984*

### INTRODUCCIÓ

Bona part de les àrees de recerca biomèdica, en diversos moments del seu desenvolupament, esdevenen ciències visuals. En els estudis microscòpics, per exemple, l'observació i la interpretació dels resultats depenen totalment de la valoració de la imatge. En moltes ocasions les imatges han esdevingut una eina fonamental i imprescindible per a la recerca. Però moltes vegades la simple observació de la imatge és insuficient per treure'n la màxima informació. Una part de la informació enregistrada fotogràficament escapa a la visió de l'ull humà. Per aquesta raó ha estat necessari desenvolupar una tecnologia nova que permeti extreure, condensar en unes variables els diversos nivells d'informació de la imatge i, posteriorment, reconèixer aquesta informació.

Una primera temptativa, emprada en molts estudis, fou analitzar la informació continguda en una fotografia, utilitzant l'anàlisi òptica o una anàlisi computeritzada

prèvia digitalització de la imatge original. L'ús d'aquests sistemes permeté apreciar detalls no observables pels habituals sistemes de reproducció d'imatges. Una de les aplicacions immediates fou quantificar els possibles errors introduïts per la manipulació fotogràfica i, en el cas de la microscòpia electrònica, detectar els errors d'estigmatisme, deriva de la imatge, desenfocament, desgast de la mostra per impacte dels electrons, etc... La base d'aquesta tècnica era l'anàlisi de la imatge no en l'espai real sinó després d'aplicar-hi la transformada Fourier.

L'estudi de les imatges per la transformada de Fourier no va excloure haver de seguir analitzant les imatges de forma visual, ja que la transformada de Fourier és una anàlisi de les diferents freqüències de la imatge original. Aquesta tècnica parteix d'un principi similar a l'aplicat pels cristallografs en l'estudi de cristalls per difracció de raigs X. La imatge original és considerada com la suma d'una sèrie d'ones sinusoidals de freqüències variables, per exemple els detalls fins donen

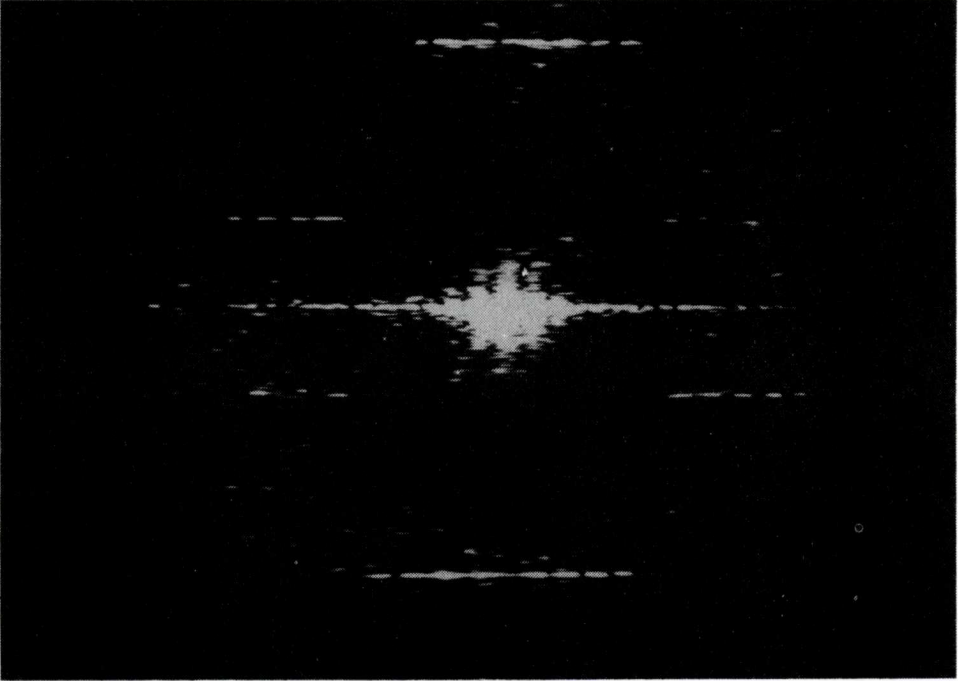


Fig. 1. Diffractograma obtingut per un difractòmetre de llum coherent.

origen a freqüències altes. La representació d'una imatge per la seva descomposició de freqüències aporta una informació diferent a l'apreciada a simple vista. Per aplicació de la transformada de Fourier dels diferents nivells de gris de cada intensitat s'obté una funció complexa amb amplitud i fase. Quan la transformada s'obté per procediments òptics en el suport fotogràfic a on es registren els resultats només hi ha representat el paràmetre intensitat. Però si la transformada s'obté per un càlcul numèric llavors es preserven els valors de les fases.

Per realitzar l'anàlisi òptica el camí més senzill és obtenir la transformada tot utilitzant un banc òptic amb una il·luminació coherent (laser). La informació obtinguda en el negatiu explorat es comporta com una xarxa de difracció i el tipus d'aquesta difracció reflecteix la informació existent en la imatge original (Fig. 1). L'ús del difractòmetre s'ha vist que era útil en els treballs més rutinaris i simples, però esdevenia limitat quan es vo-

lien quantificar les diferents intensitats de difracció i determinar els valors de les fases. Fins que aparegué la possibilitat de quantificar numèricament aquests paràmetres, aquell objectiu restà difícil. Amb el diffractograma òptic el camí més seguit és l'eliminació d'algunes freqüències per aplicació d'una sèrie de màscares i reconstruir, per aplicació de la inversa de la transformada de Fourier, una imatge en espai real perfectament comprensible per a l'observador.

A fi d'ampliar els resultats obtinguts amb l'anàlisi de la transformada òptica de Fourier i de facilitar els càlculs, les imatges foren digitalitzades prèviament i posteriorment transformades a l'espai recíproc per càlcul en un ordinador. En aquests casos les variacions de les densitats de la imatge original en l'espai real s'han convertit en informació digital mitjançant la utilització d'un microdensitòmetre de rastreig (Fig. 2). La transformada numèrica, de per si, no és una alternativa a la transformada òptica, sinó

102	107	118	111	113	108	111	103	116	112
104	117	105	114	102	110	113	108	108	109
107	114	103	112	107	105	114	107	106	111
102	116	97	109	106	101	98	86	84	86
82	82	82	79	83	79	85	86	78	79
80	83	81	80	84	82	81	81	78	78
84	83	80	80	83	81	82	79	82	84
78	85	73	82	82	76	83	81	76	77
80	75	80	66	71	66	62	72	60	75
58	66	63	67	62	71	65	60	69	60

Fig. 2. Representació numèrica dels valors de gris d'una imatge.

que aporta una informació addicional, tal com és la possibilitat de conèixer i treballar amb les fases dels coeficients de Fourier i quantificar la informació de la figura de difracció. Existeixen múltiples mecanismes i aparells dedicats a la microdensitometria que estan perfectament preparats per tal que el seu senyal analògic sigui transformat en un valor numèric. A partir de la digitalització dels valors, el mateix ordinador ja els pot processar amb facilitat, i amb una certa rapidesa, per l'aplicació d'un programa de càlcul anomenat la transformada ràpida de Fourier (FFT). Un cop calculats els coeficients de Fourier, una sèrie d'algoritmes permeten operar sobre ells i reconstruir una nova imatge en l'espai real. Els resultats obtinguts del processament numèric de la imatge en l'espai de Fourier depenen fonamentalment del tipus de simetria present a la imatge original. Quan la imatge és totalment amorfa o aperiòdica l'ús de la transformada numèrica és més limitat, encara que es poden obtenir resultats útils en molts casos per analitzar les imatges.

Malgrat els bons resultats obtinguts, aquestes tècniques d'anàlisi d'imatges eren parcials, en el cas de la difracció òptica, o lentes quan el processament era numèric. L'ús de la informàtica representa un important progrés, però no fou suficient per superar les limitacions originades per la pròpia configuració de les unitats de processament

dels ordinadors emprats ni per la poca capacitat de discriminar nivells de gris o programar les rutines emprades. D'altra part el cost dels equips informàtics era molt superior a l'instrumental utilitzat per treballar amb la imatge analògica. La relació qualitat/preu era encara molt superior en els sistemes fonamentats en els estudis analògics.

Complementàriament a l'anàlisi per difracció d'imatges, es desenvoluparen una sèrie de mètodes que pretenien el millorament estructural de la imatge original sense modificar les seves propietats i característiques. La majoria d'aquestes tècniques únicament volien perfeccionar la imatge original per tal de sotmetre-la a posteriors tractaments d'anàlisi. Els mètodes més coneguts de millorament estructural de la imatge són les tècniques de superposició fotogràfica de la imatge, quan aquesta presenta simetria rotacional o transaccional.

En els darrers anys ha aparegut una nova tecnologia que, fonamentada en els principis anteriors, intentava superar llurs limitacions. Gràcies al desenvolupament de la microelectrònica, tant en les seves aplicacions informàtiques pel desenvolupament dels microprocessadors, fonamentalment per l'aparició dels processadors en matriu (array processors), com en el camp de les telecomunicacions pels nous sistemes de televisió d'alta resolució, s'han desenvolupat sistemes que digitalitzen i tracten automàticament la imatge

en temps real. En aquests equips la conversió analògica-digital ja no es fa per sistemes densitomètrics, sinó que tots els punts lluminosos de la imatge analògica, captada per un sistema de televisió, són convertits en valors digitals que expressen la brillantor.

El processament posterior es fonamenta en el valor numèric d'aquesta brillantor. Els sistemes de processament d'imatges digitals normalment treballen amb una matriu numèrica obtinguda per la distribució en l'espai dels punts de la imatge física. Com a resultat del processament s'obté una nova matriu numèrica i els seus valors són els que s'utilitzen per reconstruir una imatge continua que és la visualitzada normalment en un monitor de televisió. Entre la imatge analògica inicial i la resultant, una sèrie d'algoritmes han modificat els valors de brillantor originals pel seu processament en l'anomenat «Image Array Processor» (IAP).

Els nous sistemes d'anàlisi automàtica d'imatges representen una gran economia de temps i permeten el processament de nombrosos punts per segon; presenten alta resolució, definida com nombre de punts capaços d'ésser analitzats per imatge; i la discriminació és elevada en fer-se per nivells de gris i per l'alta flexibilitat de treball que suposa el processament i l'anàlisi de la imatge via software, a diferència dels sistemes primitius on quasi tot s'havia de fer via hardware. Donada la rapidesa del tractament pot reprocessar-se la imatge resultant o adquirir noves imatges si és necessari. La recent incorporació tecnològica de les imatges multiespectrals i del color real han obert noves perspectives d'importantes aplicacions en la recerca. Malgrat la configuració automatitzada d'aquests equips, cal tenir present que, en algun moment del processament de la imatge, és molt important poder disposar de l'acció interactiva.

El nou camí esclatat per la manipulació i transformació de les imatges digitals ha creat una nova especialitat: l'anàlisi d'imatges. Amb l'aparició de la imatge electrònica

nombroses disciplines biomèdiques i clíniques s'han vist fortament potenciades. En els darrers anys s'han fet ja familiars termes com: tomografia de transmissió, tomografia d'emissió, termografia; ressonància nuclear magnètica; ultrasonografia; tots ells sorgits per l'aplicació dels estudis d'imatges digitals a la radiologia, gammagrafia o a noves tècniques com són l'excitació dels àtoms per camps magnètics, l'estudi dels raigs infraroigs emesos per les capes superficials o l'aplicació d'ultrasons. Els estudis biomèdics, clínics i biològics en general, que inicialment havien quedat al marge d'aquestes aplicacions, en els darrers anys han conegut una forta expansió. Si abans algunes d'aquestes disciplines eren més descriptives dels valors qualitius, avui cap d'elles escapa a la necessitat de quantificar i millorar la imatge.

## EQUIPAMENT

Qualsevol sistema especialitzat en el tractament d'imatges digitalitzades consta dels següents elements:

- Un sistema d'entrada gràfica capaç de vertir la informació analògica en digital (ADC.)
- Un ordinador restringit al processament de la informació digitalitzada, «Image Array Processor» (IAP).
- Un sistema de perifèrics per reconvertir els resultats digitals en analògics.
- Un microordinador programable que organitza les operacions a realitzar en la unitat de processament de la imatge, controla els perifèrics, és l'instrument de diàleg i permet manejar les dades extretes de la imatge.

A continuació es descriuen alguns d'aquests elements (Figs. 3 i 4):

### *Entrada gràfica*

Per resoldre aquesta qüestió s'han desenvolupat diverses estratègies que condicionen

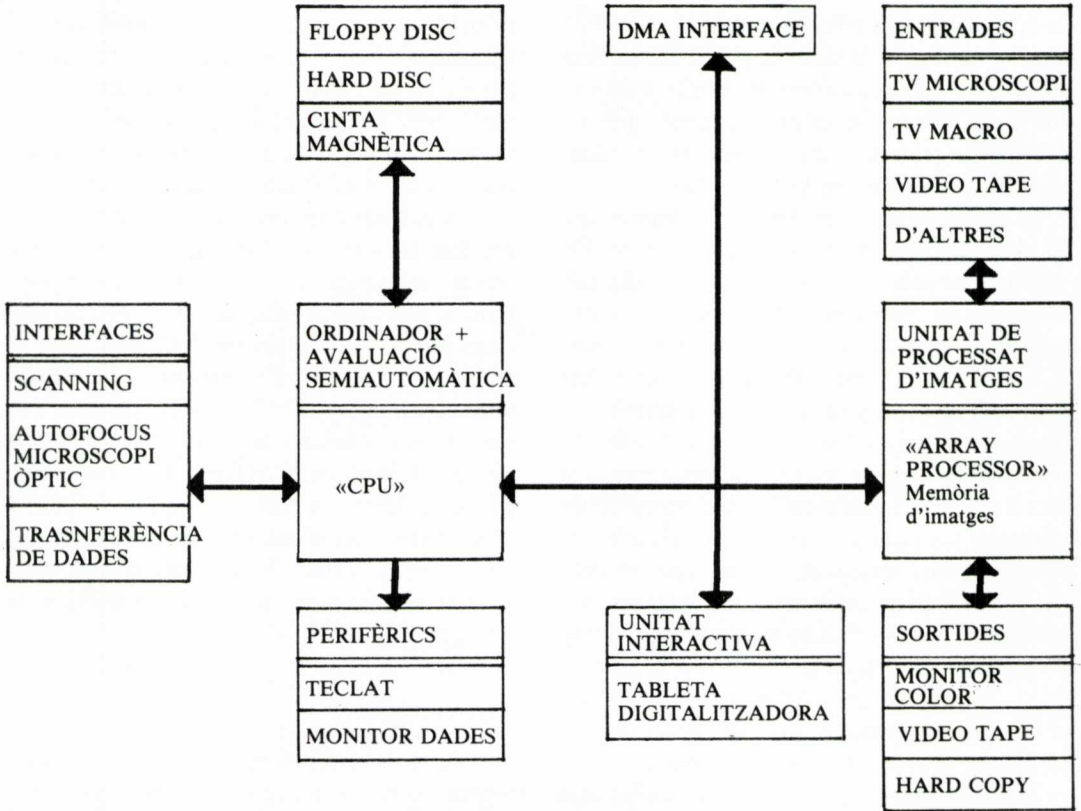


Fig. 3. Organització de les diferents unitats d'un sistema d'anàlisi d'imatges.

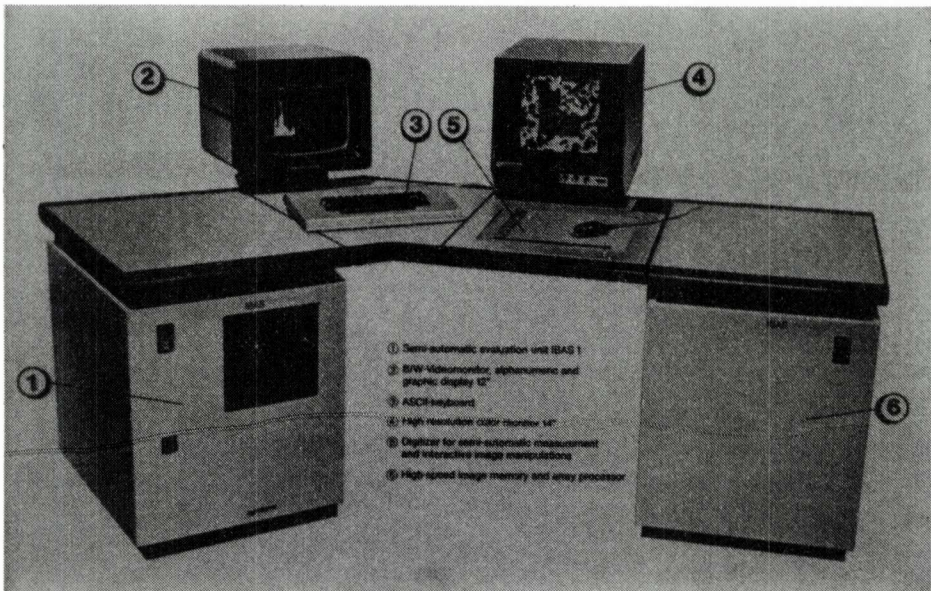


Fig. 4. Configuració de l'equip d'anàlisi d'imatges IBAS (KONTRON).

la qualitat de l'equip i la comoditat de convertir la imatge analògica en digital. Resumim quins són els principals dispositius per realitzar aquesta operació.

*a) Digitalització manual de les coordenades d'un objecte*

No sempre la utilitat de l'anàlisi d'una imatge és la d'estudiar totes les estructures o matisos presents en ella. Moltes vegades l'interès està centrat únicament en els paràmetres morfomètrics d'uns objectes molt concrets i això permet prescindir de la resta de la informació. En aquests casos pot ser suficient digitalitzar únicament allò sobre el que es vol treballar. La forma més simple de fer-ho és resseguir manualment els contorns dels objectes mitjançant un llapis lluminós, sonor o electromagnètic per damunt d'una tauleta de digitalització. Amb aquesta operació el llapis, interactuant amb la tauleta, envia a l'ordinador l'exacte localització de les coordenades de l'objecte resseguit. El resultat final que s'obté és la informació de les coordenades de tots els punts que componen el perfil resseguit.

*b) Digitalització d'imatges de televisió*

Quan vol estudiar-se tota la informació d'una imatge les tècniques manuals de digitalització no podem emprar-se. En aquest cas l'estratègia a seguir ha d'ésser una altra. Un dels sistemes més utilitzats ha estat el de digitalitzar qualsevol tipus d'imatge captada per una cambra de televisió. Aquesta cambra escombra la imatge original 30 o 25 cops per segon, segons els fabricants, i crea una imatge resultant que, tot i ésser analògica, és parcialment discreta perquè és el resultat de 512 línies. Menys freqüent és l'acoplament directe de la cambra de televisió a un microscopi electrònic de transmissió. En algunes ocasions, el senyal de rastreig, en lloc de provenir d'una cambra de televisió, està originat directament per l'escombrat que fa el microscopi electrònic de Scanning quan està connectat "on line" amb l'equip d'anàlisi

d'imatges. Aquesta possibilitat no és només útil per a l'entrada d'imatges provinents d'electrons secundaris, sinó que també permet la combinació d'aquestes amb les corresponents obtingudes pels estudis microanalítics.

Cada línia d'escombrat de la imatge televisiva és un senyal analògic que és la resultant d'una sèrie de diferents voltatges i aquests donen la informació dels corresponents punts de la imatge original. Aquesta línia de televisió es pot fragmentar en petites unitats que donen la informació de la brillantor dels diferents punts de la imatge original. El resultat final és la transformació dels diferents voltatges que formen la línia d'escombrat en una sèrie successiva d'unitats, anomenades «pixels», que representen la quantificació del voltatge en cada punt de la imatge. Al final de tot el procés de digitalització la brillantor de cada pixel és una variable contínua que s'expressa, per a posteriors processaments, en forma de valor numèric discret. Aquesta operació de transformar la imatge analògica en digital la realitza una unitat específicament dissenyada per a aquest tractament: el «convertidor d'analògic en digital» o ADC. L'interval dels valors de la brillantor defineixen l'escala de grisos de la imatge original. Per aquest procediment la primitiva imatge analògica s'ha transformat en una imatge totalment discreta on han quedat perfectament enregistrats els seus valors densitomètrics i geomètrics.

Cada una de les unitats en que s'ha transformat la imatge analògica, els pixels, són agrupades en files i columnes segons el seu ordenament dins la línia i la posició d'aquesta respecte al total. El nombre de files i columnes en que es descomposa la imatge és el que s'anomena el format i la resolució de la digitalització. Els formats més freqüents són:  $240 \times 320$ ,  $480 \times 460$ ,  $512 \times 512$  y  $8.192 \times 8.192$ . Segons les possibilitats dels diferents equips de digitalització la sensibilitat per detectar la brillantor dels grisos pot ser estreta o oscil·lar entre el valor 0 (negre) i

el 255 (blanc). Els equips standards són d'un format  $512 \times 512$  amb 8 bits de resolució que permeten 256 nivells de gris amb 256 K d'informació per imatge. Si l'entrada d'imatge és en color llavors la brillantor és valorada a partir de la resposta a tres longituds d'ona diferents.

### *c) Entrada d'imatges digitalitzades prèviament*

Algunes vegades, les imatges a processar poden haver estat prèviament digitalitzades per altres sistemes i estar emmagatzemades en un suport magnètic, per exemple, les imatges del satèl·lit LANDSAT. En aquest cas l'inconvenient que es presenta és el d'adequar els dos formats; el que té la imatge ja digitalitzada i el que és propi de l'equip a on es va estudiar. Un cop resolt aquest aspecte el tractament de la imatge no representa cap problema.

### *Sortida de la imatge processada*

Un cop la imatge digitalitzada ha estat processada i analitzada cal recuperar-la a fi de tenir un registre seu. Hi ha diverses possibilitats. La forma de visualització és via monitor de televisió treballant a temps real. En aquest cas el procés de reconversió de la imatge digital en analògica és a l'inrevés del procés anteriorment descrit. Optativament pot imprimir-se la imatge, enregistrar-se fotogràficament a través del monitor, o reproduir-se per una «hardcopy». Complementàriament, una altra possibilitat és passar la imatge digital directament a suports magnètics que permetin emmagatzemar-la com a informació digital.

## **PROCESSAMENT D'IMATGES DIGITALS**

Un cop digitalitzada pot operar-se matemàticament sobre la imatge. Això és possible per diferents vies i cap d'aquestes exclou l'altre.

### *Processament punt a punt*

La filosofia d'aquesta forma de processar la imatge és operar pixel a pixel, independentment dels valors dels pixels veïns.

### *Tractament de les imatges digitals en l'espai de Fourier*

Un cop digitalitzada la imatge analògica, el valor dels pixels pot representar-se com una funció bidimensional. Per la posterior aplicació a aquesta imatge digital d'una sèrie d'algoritmes pot passar-se a un espai recíproc digital i obtenir la transformada de Fourier de la imatge. Un cop creada aquesta nova imatge se li poden aplicar uns nous algorismes que realitzen les funcions de filtrat, atenuacions, etc... d'efectes similars als propis de les tècniques de les transformades òptiques. Un cop fet el processament digital en l'espai de Fourier l'aplicació de la inversa de la transformada permet tornar a reconstruir una imatge resultant digital modificada.

### *Tractament dels pixels en l'espai*

Aquesta forma particular de processar els pixels permet operar matemàticament sobre el valor d'un pixel tot ponderant-lo amb els valors dels pixels veïns. Les possibilitats d'aquest tractament dependrà del nombre de pixels veïns que es considerin a l'hora de realitzar el càlcul.

### *Processament geomètric de la imatge*

El tractament geomètric produeix unes imatges resultants amb unes dimensions i orientacions diferents a l'original.

### *Tractament múltiple*

Aquesta forma de tractament emprà diverses imatges a la vegada i permet realitzar, entre aquestes, operacions matemàtiques o aplicar-hi operadors lògics.

L'aplicació d'un filtre a una imatge en l'espai real és una convolució. Per ella els valors d'un pixel queden modificats segons la brillantor dels pixels veïns. L'expressió següent representa l'acció d'una convolució damunt d'un pixel amb una brillantor  $f$  en les coordenades  $(x,y)$ .

$$g(x,y) = \sum_{k=-m}^m \sum_{l=-n}^n (f(x-k, y-l) * h(k,l)) \quad (1)$$

$g(x,y)$  és el valor de la brillantor final després d'aplicar a  $f(x,y)$  la convolució.

$h(k,l)$  representa el filtre que s'aplica com a convolució. Té un tamany de  $(2m+1, 2n+1)$ . Aquest filtre es representa com una matriu amb els següents elements.

$$\begin{matrix} h(-m,-n) & h(-m,-m+1) & \dots & h(-m,n) \\ h(-m+1,-n) & h(-m+1,-n+1) & \dots & \dots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ h(m,-n) & & & h(m,n) \end{matrix} \quad (2)$$

L'expressió (1) és molt senzilla d'introduir en un ordinador i el seu càlcul ens permet simular l'acció de diversos filtres. Amb el següent exemple es veu millor com una convolució modifica els valors dels pixels. La imatge original (3) està representada per una matriu de  $5 \times 5$  i d'ella, per aquest exemple, s'utilitzarà únicament la part compresa dins del recuadre. A aquesta part se l'hi aplicarà una convolució que correspon a un filtre Laplací de  $3 \times 3$  (4).

120	125	130	135	140
125	130	135	140	145
10	15	20	25	45
15	20	25	30	50
20	25	30	35	55

(3) Imatge original

0	-1	0
-1	4	-1
0	-1	0

(4) Filtre Laplací

A fi de simplificar aquest càlcul solament s'aplicarà al pixel central de la imatge original. Desenvolupant la fórmula (1) obtenim:

$$(130) * (0) + (135) * (-1) + (140) * (0) + (15) * (-1) + (20) * (4) + (25) * (-1) + (20) * (0) + (25) * (-1) + (30) * (0) = -135 - 15 + 80 - 25 - 25 = -120$$

Aplicant el mateix càlcul a tots els pixels compresos dins del recuadre de la imatge (3) obtenim:

120	120	120
-120	-120	-135
0	0	-15

Donat que els valors negatius no es presenten, aquests poden pendre el seu valor absolut o substituir-se per  $\emptyset$ . Suposan que en aquest cas prenguin el valor nul el resultat final és:

120	120	120
0	0	0
0	0	0

Aquests resultats evidencien que el filtre Laplací aplicat destaca la presència d'altres freqüències, expressades en la imatge digital com a salts importants en la brillantor dels pixels.

Fig. 5. Aplicació d'un filtre digital.

## TRACTAMENT I ANÀLISI DE LA IMATGE DIGITAL

A partir de la imatge digitalitzada el processament es pot orientar cap a dues perspectives diferenciades: la restauració i intensificació, o l'anàlisi. Ambdós processaments no són incompatibles i normalment són utilitzats simultàniament.

### Restauració i intensificació

L'aplicació del processament òptic o digital per millorar o treure el màxim de partit a les imatges és una tècnica àmpliament emprada en els darrers anys en els estudis de

les imatges aèries i espacials. Posteriorment s'han anat trobant noves aplicacions industrials i científiques; especialment importants en el camp de les investigacions biomèdiques.

El millorament de la imatge és un terme que implícitament comporta dos tipus de manipulació de la imatge: la restauració i la intensificació.

Restauració es pot definir com la reconstrucció de la imatge a fi de corregir alguna possible degradació i, a partir d'uns algorismes particulars, elaborar una imatge ideal sense cap mena de distorsió. La intensificació comporta una sèrie d'operacions per fer



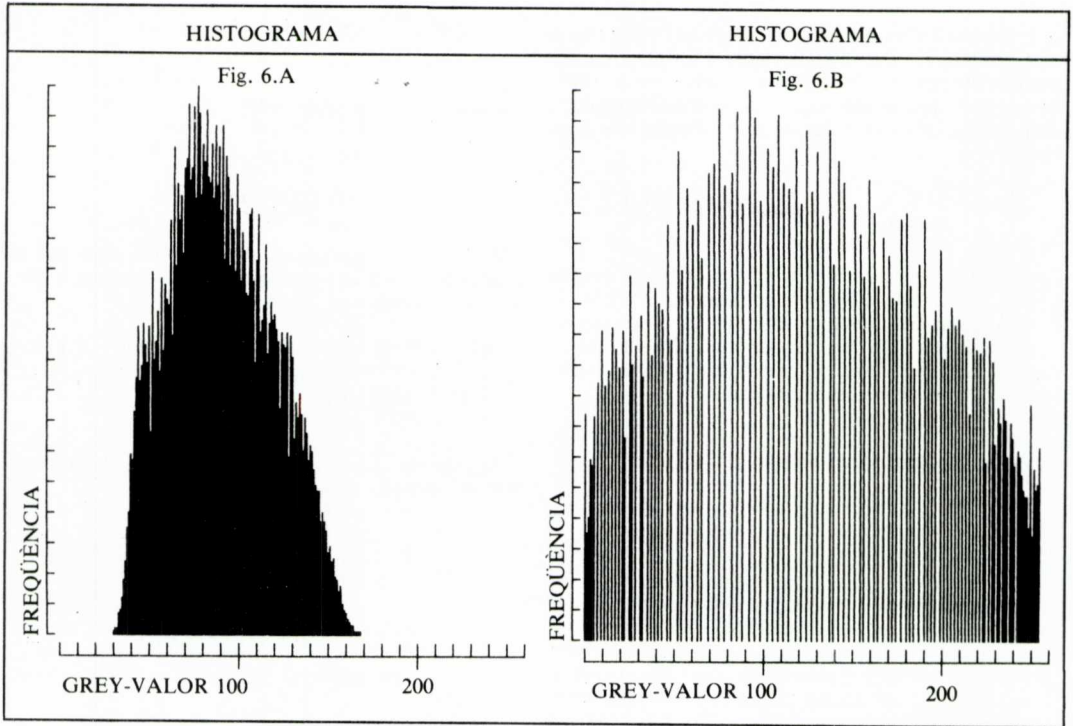


Fig. 6. Modificació de l'histograma. En la Figura A es representa l'histograma de la imatge original. En aquest cas la brillantor dels píxels no cobreix tota l'amplitud de l'escala de grisos (0-255). Per mitjà d'una linealització de l'histograma, Figura B, la imatge original és expandida a tota l'amplitud de l'escala de grisos.

aparèixer a l'ull humà detalls que normalment no són apreciables per la vista. La intensificació també consisteix en una sèrie d'operacions que converteixen la imatge en un format més operable pel sistema de processament.

#### a) Intensificació de la imatge

Les funcions més idònies per realitzar aquesta tasca són: manipulació del contrast, modificació de l'histograma, modificació de la brillantor de la imatge per suma, resta, multiplicació o divisió dels valors dels píxels per una constant; neteja del soroll de fons per filtratge de les freqüències altes; accentuació de contorns per filtres de gradients; millorament per aplicació de filtres de Fourier; filtratge mediant; accentuació del contrast per pseudocolor; intensificació d'imatges multispectrals, etc. (Figs. 5, 6 i 7).

#### b) Restauració de la imatge

La restauració es fonamenta en una sèrie d'algoritmes calculats en funció del tipus de degradació a que ha estat sotmesa la imatge. Aquests algoritmes poden ésser considerats d'utilitat terapèutica. Tots ells permeten obviar els defectes de la imatge original i, habitualment, han d'ésser recalculats segons la naturalesa d'aquells.

#### Anàlisi de la imatge

El terme anàlisi d'imatge, tot i que ha estat un terme àmpliament generalitzat, s'aplica pròpiament a la tasca d'extreure de les imatges el màxim d'informació: paràmetres, dades densitomètriques, etc... utilitzant un sistema automàtic o semiautomàtic.

L'anàlisi d'imatges es diferencia d'altres formes de processament de la imatge, tal

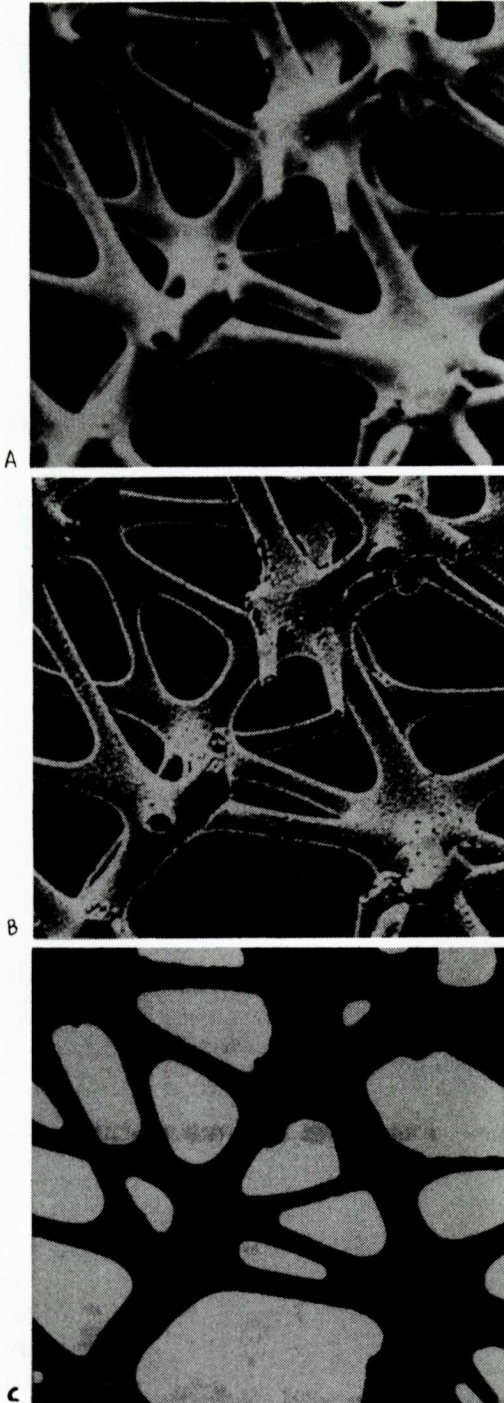


Fig. 7. Exemples d'intensificació i segmentació d'una imatge. A. Imatge original. B. Imatge intensificada. C. Segmentació de la imatge original en forma binària.

com la restauració o la intensificació, en què el darrer producte del processament són dades numèriques i no una nova imatge. D'altra part, l'anàlisi d'imatges també es diferencia del reconeixement de formes perquè aquest classifica un nombre determinat d'objectes en categories, mentre que l'anàlisi d'imatges s'aplica a una imatge complexa amb multiplicitat d'objectes a estudiar. Així mateix, és propi de l'anàlisi d'imatges el presentar un cert grau d'intel·ligència artificial per tal de diferenciar els objectes problema d'altres o del seu fons.

Les tècniques pròpies de l'anàlisi d'imatges comporten precisar quines són les característiques i els atributs més rellevants i determinants dels objectes. Algunes d'aquestes característiques són naturals i poden ésser fàcilment assignades visualment, mentre que d'altres, les anomenades artificials, són el resultat de manipulacions i transformacions de la imatge. Les característiques naturals fan referència a la brillantor de la imatge segons els valors dels píxels, als límits dels objectes, a l'escala de gris de textura de les regions, etc. Modificar l'amplitud de l'histograma o variar l'espectre de freqüències espacials són mètodes orientats a definir característiques artificials.

Hi ha nombroses funcions que treballen amb aquestes característiques, siguin naturals o artificials, a fi de treure de la imatge original una sèrie d'objectes sobre els quals es vol realitzar un estudi més detallat. Moltes d'aquestes tècniques s'agrupen sota el nom de segmentació. Un procediment alternatiu per detectar objectes en una imatge complexa és recordar la seva localització per segmentació de les coordenades dels seus límits.

## SEGMENTACIÓ

Normalment les imatges a analitzar estan constituïdes per diverses estructures i elements. Freqüentment l'interès estarà centrat només en un o diversos d'aquests elements. Per a l'ull humà la distinció entre diverses

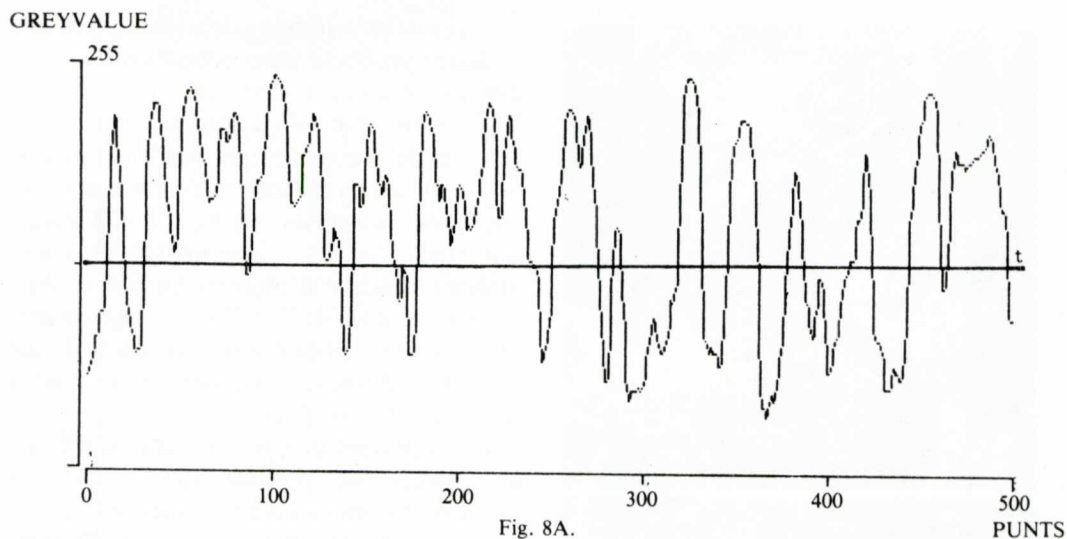


Fig. 8A.

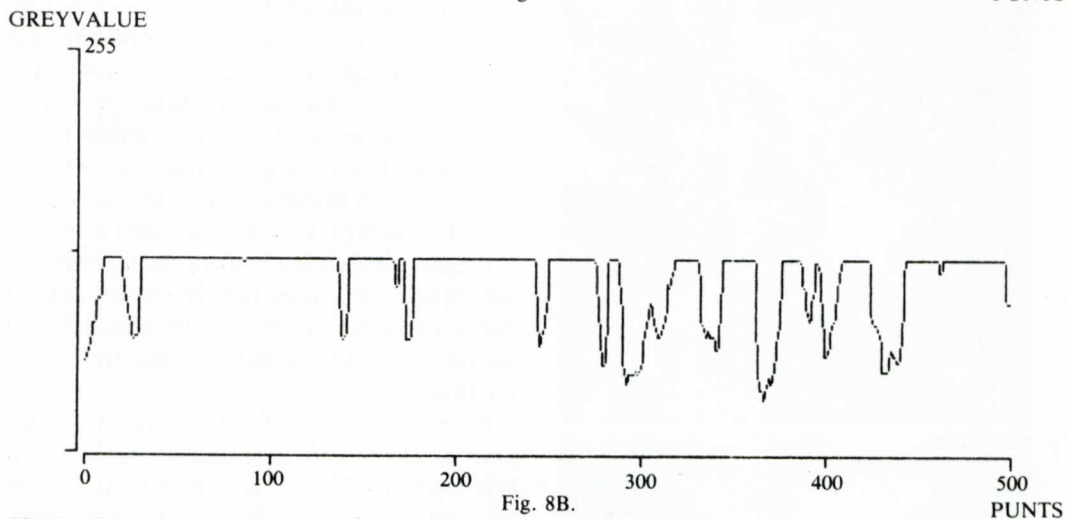


Fig. 8B.

Fig. 8. Exemple d'una segmentació.

Tots els pixels de la gràfica (A) que tenen un valor de brillantor superior a l'umbral  $t$  (en aquest exemple  $t$  s'ha situat a 125) són transformats a un nou valor. En la gràfica (B) es representen els nous valors dels pixels. En aquest cas els pixels superiors a l'umbral han pres el valor de 255 i la resta no s'han modificat. La binarització d'una imatge hauria consistit en assignar als pixels per damunt de l'umbral el valor de 0 (negre) o 255 (blanc) i a la resta els valors de 255 o 0, respectivament.

estructures (fases) no representa cap problema. Però aquesta diferenciació és enormement complexa si ha de fer-se a través dels recursos informàtics. Per realitzar aquesta operació els equips de processament i d'anàlisi d'imatges han desenvolupat les funcions anomenades de segmentació. Aquestes consisteixen en discernir automàticament, dins

d'un mateix camp, diversos objectes del seu fons (separació de fases). En definitiva, la segmentació d'una imatge és dividir o separar la imatge per regions que tinguin uns atributs similars. L'atribut més elemental per fer la segmentació és treballar per nivells de gris, o color en el cas d'imatges multiespectrals (Fig. 8). En altres casos els atributs poden és-

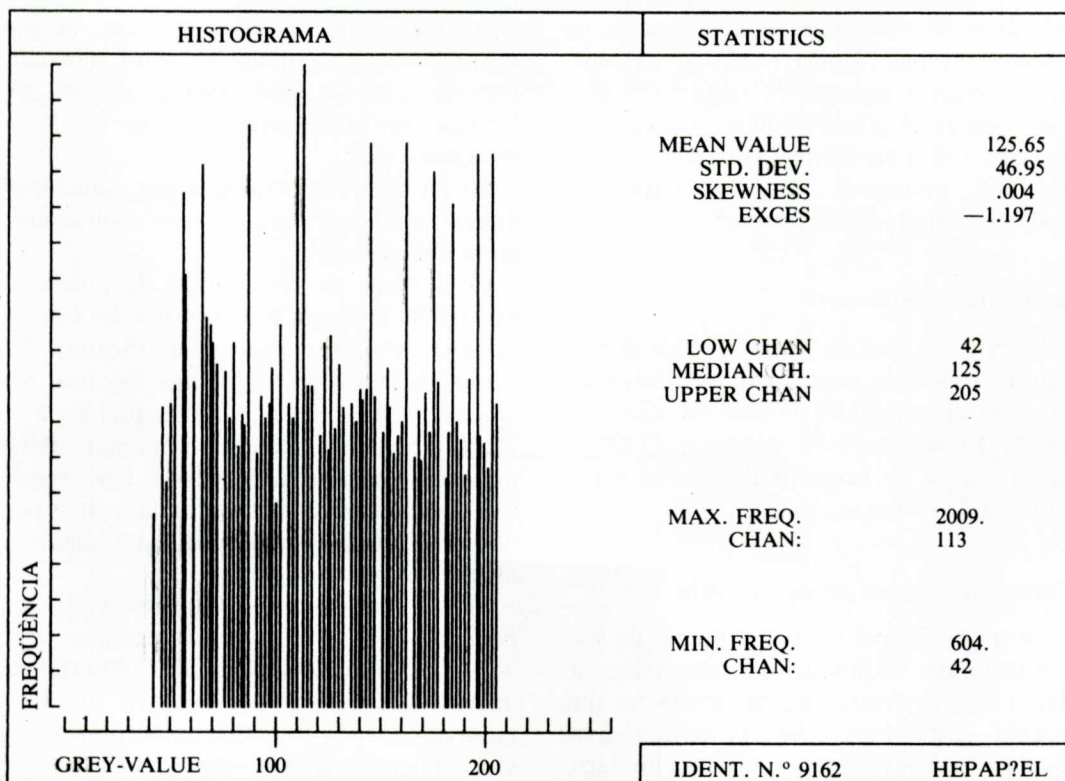


Fig. 9. Representació de l'histograma d'una imatge i l'estadística dels diferents nivells de brillantor dels pixels.

ser referències textuais o de factors de forma. La forma de discriminació per segmentació pot agrupar-se en dos procediments diferenciats.

### *Segmentació per discriminació*

En aquest cas els objectes són diferenciats entre si i respecte al fons pel valor de gris dels pixels que conté (discriminació o detecció) (Fig. 9). Per l'aplicació successiva d'una sèrie de llindars es poden anar discriminant selectivament aquells valors de gris únicament continguts dins de l'objecte a segmentar. En la imatge resultant els objectes discriminats poden seguir conservant els seus corresponents valors de gris o transformar-los a uns altres valors. Quan tots els pixels dels objectes són transformats al valor 1 i el fons al valor 0, o viceversa, s'obté una imatge binaritzada

que és fàcil i ràpidament avaluable. La binarització dels objectes no té sentit quan l'anàlisi ha d'ésser de valors densitomètrics.

La segmentació per llindars té importants limitacions pràctiques. Una de elles és la dificultat de discriminar objectes que presentin uns nivells de gris similars al fons o a d'altres objectes. Aquest problema és normal en imatges ultraestructurals o espectrals. Un processament previ de la imatge pot ajudar a superar, en part, aquestes limitacions. Si la imatge original ha estat digitalitzada i s'han preservat les propietats espectrals una anàlisi multivariant dels valors dels pixels optimitza la funció de segmentació.

### *Segmentació per detecció límit*

Una altra possibilitat de discriminar objectes consisteix en diferenciar-los per aplicació

de filtres de gradients (transformada de Laplace, Sobel, Robert, etc...). Aquests filtres detecten els salts de freqüències dins d'uns valors de grisos similars. Aquest camí pot ésser útil si prèviament la imatge original ha estat obtinguda preveient l'aplicació d'aquest mètode de segmentació.

### *Segmentació interactiva*

L'acció interactiva permet, amb menys automatismes que en els casos anteriors però superant determinades limitacions, discriminar de la imatge aquells objectes que interessin gràcies a les funcions de borrat, resseguiment de contorns, etc...

### *Correcció d'errors de segmentació*

És probable que durant el procés de segmentació, per les limitacions abans esmentades, s'hagin introduït alguns artefactes que puguin distorsionar les posteriors avaluacions d'aquesta imatge. Aquesta limitació és freqüent en tots els sistemes que treballen per nivells de gris. Per això sempre és recomanable efectuar, després d'un procés de segmentació, una correcció d'aquests possibles errors. A continuació es resumeixen algunes de les dificultats que en el treball quotidià poden sorgir en segmentar la imatge i, al mateix temps, s'orienten algunes possibles solucions pràctiques.

### *Problemes derivats de la discriminació*

La majoria d'equips d'anàlisi automàtica de la imatge segmenten els objectes o estructures per la seva pertinença dins d'un marge de grisos prèviament determinats. Si la imatge a estudiar és rica en tons de gris, com és freqüent en les imatges microscòpiques, el procés de discriminació de nivells de grisos es fa problemàtic. Segons com es faci aquesta operació es poden perdre part de les estructures o incorporar-ne d'altres. Els resultats avaluats poden ésser totalment erronis. Aquesta dificultat resta possibilitats a uni-

versalitzar el mètode de segmentar, ja que normalment les condicions d'il·luminació, exposició, revelat, impressió no són sempre les mateixes ni les característiques de tinció es repeteixen.

Hi ha diverses estratègies per solucionar aquest problema, però cal ésser molt acurat en la seva aplicació.

a) Utilitzar les possibilitats de processament de la imatge a fi de destacar les estructures o objectes a avaluar. Segons les característiques de la imatge és possible emprar profusament els filtres digitals a fi d'obtenir aquests efectes discriminants. Però no sempre aquest camí porta a bons resultats. Un progressiu filtratge de la imatge pot introduir artefactes que modifiquin notablement els resultats.

b) Preparar el material que es vol estudiar per anàlisi d'imatges específicament per aquesta tècnica. Moltes de les tincions que en microscòpia donen bons resultats discriminants, no tenen els mateixos efectes per a la visió humana quan són emprades en l'anàlisi d'imatges. La discriminació per nivells de gris limita la possibilitat de diferenciar per l'equivalent en gris dels colors. Tonalitats ben separades per la seva longitud d'ona poden donar nivells de gris molt propers i confondre's en segmentar. Tenint present aquesta limitació és convenient utilitzar tincions en què els seus resultats no siguin difícils de discriminar. Una solució alternativa és entrar les imatges filtrades òpticament procurant eliminar aquells colors que puguin emmascarar els objectes a estudiar.

c) La microscòpia electrònica està molt més limitada quan a possibilitats d'emprar tincions selectives i discriminants. En aquests casos és bo combinar, quan sigui possible, les tincions citoquímiques per microscòpia electrònica amb tècniques fotogràfiques d'increment de contrast.

d) Si cap de les tècniques anteriors és suficient per discriminar perfectament la majoria d'equips d'anàlisi permeten fer-ho utilitzant les funcions interactives. Un cop la

imatge està digitalitzada l'operador, mitjançant el llapis d'interacció, pot manipular la imatge i quedar-se amb aquelles estructures que s'han d'avaluar. La principal desavantatge d'aquesta operació és que perd totes les seves possibilitats d'automatització i cada cop és necessari repetir tota la rutina interactiva amb la imatge.

#### *Problemes provocats per la complexitat de la imatge*

Una altra dificultat, estretament relacionada amb la problemàtica anterior, és que dos objectes discrets poden aparèixer, degut a la complexitat de la imatge, com una sola estructura sense possibilitats de que puguin identificar-se separatament.

Són possibles diverses solucions per superar aquest problema.

a) El processament previ de la imatge pot ajudar a superar parcialment aquest problema. No obstant no sempre l'ús dels filtres digitals fa que els resultats obtinguts siguin els òptims i, per contra, el risc de modificar la morfologia és bastant elevat.

b) Una altra possibilitat consisteix en calcular prèviament, de forma interactiva, la mida d'alguns objectes i posteriorment, per discriminació de formes, eliminar automàticament aquells objectes que no es situin dins dels valors esperats. No obstant, aquesta operació té el risc de perdre algun objecte segons quin sigui el grau de variabilitat dels paràmetres escollits. Complementàriament a aquesta estratègia poden elaborar-se uns índexs, o factors de forma específics, amb prou capacitat discriminatòria pels objectes problema i utilitzar-los com a filtre de càlcul numèric abans d'avaluar. Un altre camí, perfectament compatible amb els anteriors i molt utilitzat, consisteix en emprar les funcions d'erosió i dilatació de la imatge. Aquestes funcions, operadores de la imatge binaritzada, poden arribar a aconseguir que objectes ajuntats per l'efecte de segmentació puguin separar-se sense perdre les seves característiques morfològiques. Bona part

dels actuals equips han dissenyat unes funcions especials per realitzar automàticament i ràpidament la desaglomeració d'estructures.

c) Finalment queda la possibilitat de l'acció interactiva d'eliminació dels punts de contacte i superposició dels objectes. En aquests casos concrets la interacció pot ésser font de subjectivisme i d'errors importants.

### **ESTUDIS PARAMÈTRICS**

L'aparició dels sistemes d'anàlisi automàtica ha representat un gran ajut pels estudis morfomètrics. Fins ara la morfometria depenia de l'ull i del cervell de l'observador, així com de la seva paciència per estudiar els registres fotogràfics. És evident que aquests estris són suficients en molts casos, però esdevenen limitats quan són molts els objectes o paràmetres a quantificar i, especialment limitats, quan aquesta discriminació pretén ésser diferenciadora dins d'una mateixa mostra. El sistema d'anàlisi automàtica aplicat als estudis morfomètrics permet superar, en gran mesura, aquestes limitacions. La seva parcialitat rau en les dificultats existents en calcular algorismes corresponents que supleixin l'acurat sistema de discriminació dels nostres sentits. Mentre amb un cop d'ull sabem si un objecte és rodó o esfèric i a la vegada si és gran o petit, llis o rugós, un sistema automàtic necessita múltiples càlculs, i no del tot precisos, per realitzar la mateixa tasca.

La principal utilitat morfomètrica de l'anàlisi automàtica és la possibilitat que tenen aquests equips d'extreure d'un objecte un ampli ventall de valors paramètrics (Fig. 10). I trobar, a partir d'aquests valors, uns de nous que caracteritzin morfològicament l'objecte estudiat a fi d'obtenir una bona descripció de la seva forma.

Les possibilitats d'efectuar càlculs en la imatge s'orienten en tres nivells segons l'interès o les característiques de la informació que

<p><b>I. Paràmetres d'objecte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Àrea.</li> <li>* Perímetre i longitud.</li> <li>* Perímetre convex.</li> <li>* Diàmetre màxim.</li> <li>* Diàmetre mínim.</li> <li>* Angle d'orientació entre diàmetre màxim i EIX X.</li> <li>* Factor de forma circularitat.</li> <li>* Diàmetre del cercle equivalent a l'àrea.</li> <li>* Ferets X i Y.</li> <li>* Coordenades del centre de gravetat.</li> <li>* Dos radis de gir a partir del moment d'inèrcia.</li> <li>* Angle entre el radi major de gir i l'eix X.</li> <li>* Factor elíptic o d'elongació.</li> </ul> <p><b>II. Paràmetres de camp</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>= Nombre d'objectes per camp.</li> <li>= Percentatge d'àrea.</li> <li>= Àrea absoluta de la mesura.</li> <li>= Perímetre absolut mesurat.</li> <li>= Àrea absoluta de referència.</li> <li>= Cordes de referència.</li> <li>= Suma total de les cordes.</li> <li>= Contatge de les interpretacions de tall.</li> <li>= Distribució de les cordes.</li> </ul> <p><b>III. Paràmetres densitomètrics</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Valor mig del nivell de gris i desviació standard.</li> <li>+ Idem de la transmissió.</li> <li>+ Idem de la densitat òptica.</li> <li>+ Densitat òptica integrada.</li> </ul>
--

Fig. 10. Paràmetres directament avaluable pel sistema IBAS (KONTRON).

es vulgui obtenir. Aquestes categories o formes d'avaluació són:

- a) Individuals. Avaluar objecte per objecte sense referenciar-ho a un conjunt.
- b) De camp. Avaluació dels objectes i del camp a on aquests estan.
- c) Estereològiques. Quan l'interès és reconstruir a partir de mesures dels objectes en diversos camps, els valors en l'espai.

Les categories paramètriques segons les quals els objectes poden ésser estudiats les podem resumir com a:

1. Morfomètriques (àrea, formes, orientacions, situació...).
2. Percentuals (valors de referència).
3. Densitomètriques (densitat òptica, llum transmesa...).
4. Volumètriques (aplicacions d'estereologia).

5. Avaluatives (estadística, classificacions).

6. Lliure programació.

## RECONeixEMENT I CLASSIFICACIÓ AUTOMÀTICA D'OBJECTES

Una de les utilitats de l'anàlisi d'imatges és l'aplicació, als estudis morfomètrics, de la tècnica del reconeixement i classificació automàtica dels objectes segons les seves característiques. En els estudis citològics, fonamentalment quan aquests esdeven rutinaris —hematologia, citogenètica, citologia quantitativa per diagnosi— és de gran profit l'establir uns criteris automatitzats que possibilitin l'avaluació cel·lular d'una forma objectiva, reproducible i ràpida. A fi de realitzar aquesta tasca és imprescindible, en primer lloc, disposar d'un bon sistema d'anàlisi de la imatge capaç d'extreure'n la màxima informació (forma, textura, densimetria i color). En segon lloc, decidir quina és la mínima informació necessària per realitzar una bona discriminació i que aquella sigui potent per classificar els objectes per tipologies significatives segons llurs característiques. En cada aplicació concreta del procés de reconeixement i classificació de formes caldrà decidir quins són els millors criteris a emprar. Empíricament caldrà decidir quins són els paràmetres morfològics o factors de forma més idonis per realitzar la discriminació.

Complementàriament als criteris morfomètrics, l'anàlisi de textures pot contribuir a millorar el sistema avaluatiu. El concepte textura, aplicat a l'anàlisi d'imatges, significa objectivar els atributs que l'observador utilitza per caracteritzar visualment una superfície. En el camp de l'anàlisi d'imatges l'estudi de textures s'ha d'interpretar com la identificació de discontinuïtats segons els diferents nivells de gris presents en la imatge i avaluar-ne la seva ordenació i disposició. Per exemple, en els estudis citològics la informació de la textura del nucli no és la mateixa

que la proporcionada pel citoplasma. En aquest, la textura ve condicionada pels òrgans presents i el nombre de vacuoles, mentre que la textura nuclear depèn fonamentalment de l'estat de la cromatina. Ambdós informacions caracteritzen les estructures cel·lulars i llurs variacions evidencien canvis en l'estadi funcional. L'anàlisi de textures implica decidir quina d'aquestes informacions és millor per identificar les característiques de tota la cèl·lula.

En els estudis citològics la cromatina proporciona una informació de textura prou vàlida per identificar tipològicament les cèl·lules. ¿Quins són els millors atributs de la cromatina que defineixen la seva textura? Després d'una anàlisi empírica del problema es veuen que són: condensació, organització i distribució. Posteriorment cal establir quins són els paràmetres d'anàlisi d'imatges (histogrames, densitats òptiques, densitats òptiques integrades, gradients, etc...) que millor determinen aquests atributs. Un cop realitzada aquesta tria l'aplicació dels paràmetres serà suficient per definir i quantificar els atributs i construir una rutina automàtica de reconeixement i classificació de cèl·lules (Fig. 11).

## PROCESSAMENT DE LES DADES CALCULADES

Sinó es té present quan s'utilitza el sistema d'anàlisi automàtica el que es vol obtenir en fer els càlculs paramètrics pot acumular-se una muntanya de dades que ràpidament sobrepassen les possibilitats d'interpretació acurada. És convenient, abans d'omplir pàgines senceres de llistats i gràfiques, haver-se plantejat quines són les dades fonamentals que s'han d'obtenir per utilitzar en els estudis morfomètrics.

Els mètodes d'anàlisi multivariant són un bon complement, per evitar carregar-se de dades supèrflues, pels estudis morfomètrics. Tant perquè aquests mètodes poden orientar sobre quins són els paràmetres a avaluar,

com perquè ens poden fixar quina és la mida de mostra estadística a emprar i evitar-nos l'avaluació excessiva de mostres.

## APLICACIONS BIOLÒGIQUES

Tots els camps de la biologia i la medicina són usuaris potencials del sistema de processament i anàlisi. Qualsevol disciplina que tingui necessitat de quantificar o millorar la informació continguda en unes imatges, siguin micro o macroscòpiques, pot utilitzar els sistemes de tractament digital de les imatges. A partir de la nostra experiència particular, i recollint les línies d'aplicació exposades en treballs realitzats per altres autors, hom pot dibuixar les principals aplicacions dels equips de tractament d'imatges. Sense voler esgotar les seves aplicacions, voldríem destacar-ne les següents.

### a) Citologia.

La majoria d'estudis citològics són un bon camp d'aplicació per a les tècniques de tractament d'imatges. En aquests cas són interessants totes les possibilitats que ofereixen les tècniques de millorament i intensificació de les imatges. Molt particularment, aquestes tècniques tenen una aplicació genuïna en els camps de la histo i citoquímica.

Les aplicacions del reconeixement de formes són també molt àmplies en el camp citològic. Han esdevingut especialment útils en totes aquelles disciplines biològiques o biomèdiques que precisin classificar les cèl·lules. En algunes ocasions aquestes classificacions només tindran un valor complementari en el treball de recerca, però en d'altres seran una eina imprescindible en els treballs rutinaris de diagnòstic: classificació cel·lular segons patrons de normalitat o anormalitat patològica (aplicacions en hematologia, andrologia, patologia òsea, dermatologia, oncologia, patologia de les vies respiratòries, ginecologia...). En definitiva, la possibilitat d'automatitzar les tècniques



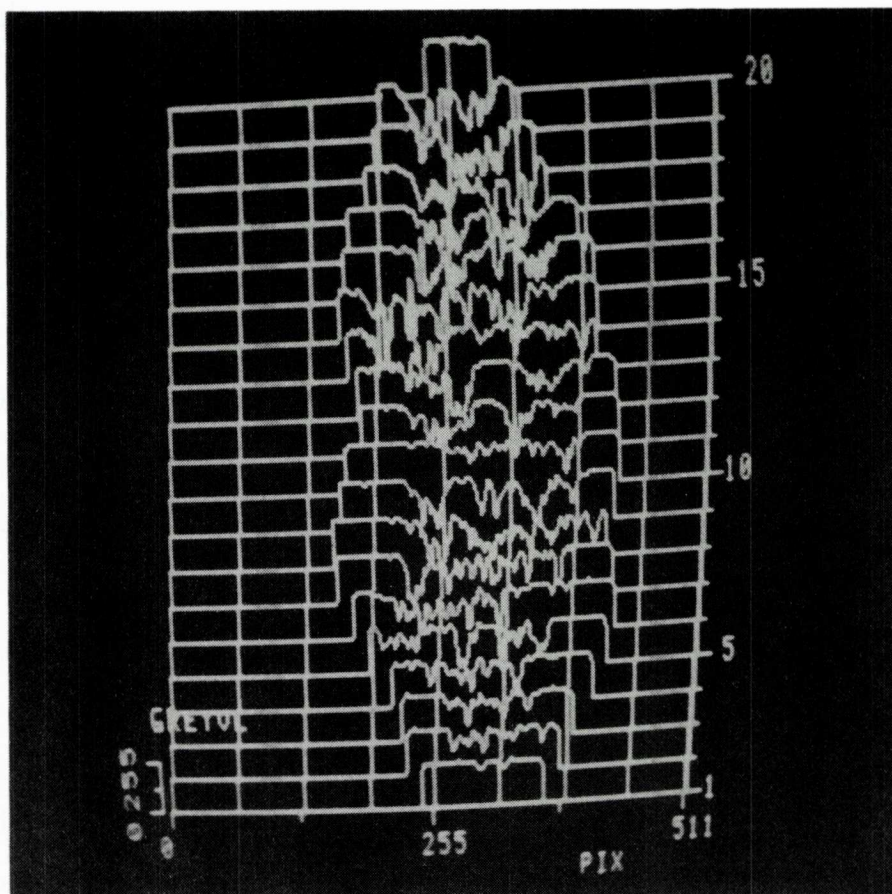


Fig. 11. Aproximació a l'anàlisi de textures. Rellu dels nivells de gris presents en una cèl·lula.

d'anàlisi d'imatges està donant una gran projecció a la patologia morfològica, estigui aquesta fonamentada en criteris geomètrics o densitomètrics.

### b) Microscòpia electrònica.

El processament digital de les imatges de microscòpia electrònica contribueix a millorar i intensificar els detalls ultraestructurals. La connexió «on line» dels sistemes de tractament d'imatges al microscopi electrònic de transmissió representa un gran ajut als treballs d'alta resolució. En aquests casos la possibilitat de corregir ràpidament els errors de focus o d'aberracions de les lents opti-

mitza al màxim l'aplicació de la microscòpia electrònica de transmissió als estudis d'alta resolució. Similarment la connexió «on line» aplicada al microscopi electrònic de Scanning és extraordinàriament profitosa. A part de la seva utilitat com a control de les condicions de treball, permet trobar aplicacions insòlites al tractament dels senyals provinents de la microscòpia electrònica de Scanning. El tractament digital combinat de les senyals i la informació subministrada pel microscopi de Scanning (electrons secundaris, retrodispersats, catodoluminiscència, difracció d'electrons i altres senyals) i la informació microanalítica proporcionada pel sistema de dispersió d'energia de raigs X dó-

na un ampli ventall de possibilitats a tots dos sistemes d'anàlisi.

### c) Citogenètica.

La creació d'un software específic d'aplicacions citogenètiques ha possibilitat, en els darrers anys, la lectura automàtica de metafases, l'ordenació automàtica de cromosomes, el seu aparellament i l'obtenció automatitzada del cariograma. Gràcies a les possibilitats interactives, els cariogrames poden ésser posteriorment manipulats i reconstruïts segons les necessitats.

Per aplicacions de les tècniques densitomètriques poden realitzar-se estudis específics del contingut d'ADN; anàlisi de bandes; distribució de les fases nuclears, obtenció de les seves distribucions; etc...

### d) Ecologia.

En els estudis ecològics la visió macro o microscòpica aporta una valuosa informació de com es desenvolupen els diversos sistemes. En cada cas, en un moment o altre, serà necessari avaluar quantitativament la informació continguda en aquestes imatges. Així mateix les tècniques de processament i intensificació de les imatges poden esdevenir imprescindibles en els estudis sobre el desenvolupament dinàmic de fenòmens tals com: alteracions del medi ambient; modificacions de les condicions generals dels sistemes; estudis dels recursos hidràulics o forestals, etc...

En aquest camp, així com en els estudis edafològics, és molt útil l'anàlisi de les imatges multispectrals proporcionades pel satèl·lit LANDSAT. El processament de les diferents imatges espectrals d'un mateix territori aporta una informació valuosa per entendre els fenòmens que s'hi succeeixen.

### e) Aplicacions densitomètriques.

Els nuclis cel·lulars tenyits específicament poden ésser quantificats perfectament en

avaluar el seu contingut d'ADN i llur distribució. Ràpidament pot calcular-se la densitat òptica integrada de molts nuclis i determinar si hi ha diferències entre tipus cel·lulars. En altres casos els paràmetres densitomètrics són interessants per estudiar la distribució, en l'espai, de la cromatina i caracteritzar l'estadi funcional de les cel·lules. Una bona intensificació i millorament de la distribució de la cromatina pot ésser suficient per tipificar la cel·lula sense necessitat de posteriors quantificacions paramètriques.

### f) Altres possibilitats.

1. *Neurologia* (estudis sobre densitat neuronal en la superfície cerebral; distribució de les sinapsis, reconstrucció tridimensional de les neurones).

2. *Microbiologia* (estudis dinàmics sobre l'acció dels antibiòtics; comptatge automàtic de colònies, classificació de virus).

3. *Biologia molecular* (densitometria de les bandes electroforètiques; quantificació de les tècniques de fraccionament cel·lular).

4. *Anatomia i embriologia* (reconstrucció tridimensional d'òrgans; creació de models macroestructurals).

5. *Radiologia* (millorament del contrast de les radiografies o gammagrafies per aplicacions del pseudocolor).

6. *Malalties de les vies respiratòries* (avaluació de la reducció d'àrea dels alvèols en casos d'enfisemes).

7. *Fibres musculars* (estudi dels components fibrilars, actina i miosina. Interpretació de la seva estructura i disposició a l'interior de la fibra. Determinació d'alteracions en les disposicions de les fibres dins la musculatura).

### BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTÀRIA SOBRE PROCESSAMENT I ANÀLISI D'IMATGES

1. ATTLE, J.R. ONEY, D., SWENSON, R.A. (1980). Applications of image analysis. Intern. Lab. Octubre, 35-48.
2. BRADBURY, S. (1979) «Microscopical image analy-

- sis: problems and approaches.» *J. Microsc. Oxford.* 115: 137-150.
3. BRUGAL, G., (1984) «Image analysis of microscopic preparations» in «Methods and achievements in experimental biology». JASMIN, G., i PROSCHEK, L. eds. 11: 1-33.
  4. CANNON, T.M., HUNT, B.R. (1981). «Procesamiento de imágenes por ordenador.» *Investigación y Ciencia.* Diciembre. 96-108.
  5. FRANK, J. (1973) «Computer processing of electron micrographs», in «Advanced techniques in biological electron microscopy». KOEHLER, J ed. Springer Verlag, New York. 215-274.
  6. FRANK, J. (1979) «Image analysis in electron microscopy». *J. Microsc., Oxford.* 499: 25-38.
  7. GONZÁLEZ, R., WINTZ, P. (1977) «Digital image processing». Addison-Wesley.
  8. GREGORY, P. (1983) «Advances in automatic image analysis». *Intern. Lab.* Abril. 56-65.
  9. HAWKES, P.W. «Computer processing of electron microscopic images», in «Topics in Current Physics». 13, pp. 296.
  10. ISARD, H.J. (1984) «Other imaging techniques». *Cancer* 53: 658-662.
  11. JENKINSON, G.W. (1984) «The solution of problems in science and technology by Image Analysis». *Intern. Lab. Gener/Febrer.* 34-45.
  12. *Journal of Microscopy. Oxford.* (1982) «Computer techniques in Electron Microscopy and Analysis». 127.
  13. KeveX Corporation (1983) «Digital imaging with electron microscopy». p. 8.
  14. MISELL, D.L. (1978) «Image analysis, enhancement and interpretation» in «Practical methods in Electron Microscopy». Glauert, A.M. ed. Elsevier/Nort-Holland. Biomedical Press. Amsterdam 1978. p. 305.
  15. PRATT, W.K (1978) «Digital image processing». Wiley-Interscience Publications. John Wiley and Sons. New York. p. 750.
  16. RINK, M. (1976) «A computerized quantitative image analysis procedure for investigation features and a adapted image process». *J. Microsc. Oxford.* 107: 267-286.
  17. ROHLF, F.J., FERSON, S. (1983) «Numerical taxonomy» in NATO ASI Series vol. G1''. Felsenstein, J., ed. Springer Verlag. Berlin. 583-599.
  18. SERRA, J. (1982) «Image analysis and mathematical morphology». Academic Press. London.
  19. WALTER, R.J., BERNS, M.W. (1981) «Computer-enhanced video microscopy: digitally processed microscope images can be produced in real time». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6927-6931.
  20. ZAJICEK, G., SHOHAT, M., MELNIK, Y., YEGER, A. (1983) «Image Analysis of nucleated red blood cells». *Comput. Biomed. Res.* 16: 347-356.