

Влияние способов обработки экспериментальных результатов на разрешающую способность акустооптического метода определения группы крови человека

© В.А. Дубровский, С.В. Марков

Саратовский государственный медицинский университет (СГМУ),
410012 Саратов, Россия

e-mail: doubrovski43@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.12.2021 г.

В окончательной редакции 29.12.2021 г.

Принята к публикации 24.01.2022 г.

Исследовано влияние различных способов цифровой обработки фотоизображений на разрешающую способность акустооптического метода (АОМ) инструментального определения групповой принадлежности крови человека по системе АВ0. Эксперименты с образцами крови проводились с использованием моноклональных антител (доликлоны) типа анти-А и анти-В, а также без их использования („чистый“ образец) при одновременном действии на смесь стоячей ультразвуковой волной. Процесс эксперимента регистрировался цифровой фотокамерой. В качестве способов обработки фотоизображений регистрируемых процессов предложены различные варианты статистических расчетов; результаты сравнивались с традиционным фотометрическим подходом. Показано, что статистическая обработка экспериментальных результатов дает более высокую разрешающую способность типирования крови, а следовательно, более высокую достоверность определения групповой принадлежности. Проведено сравнение различных вариантов статистической обработки фотокадров с целью изучения возможности повышения разрешающей способности АОМ определения групповой принадлежности крови.

Ключевые слова: группа крови человека, акустооптический метод, цифровая обработка фотоизображений.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52633.30-22

1. Введение

Определение группы крови по системе АВ0 является одним из наиболее часто используемых тестов лабораторной диагностики. Так, только в США ежегодно проводится от 150 до 200 миллионов клинических анализов по определению группы крови [1]. Сопоставляя численность населения США и России, можно ожидать, что количество тестов, выполняемых ежегодно в России для определения группы крови, приближается к 100 миллионов. Естественно, такая чрезвычайно высокая частота проведения подобных тестов требует создания специальной аппаратуры, автоматов для инструментального определения группы крови [2–9].

Одной из наиболее важных характеристик такого рода приборов является разрешающая способность R . Авторы различных работ определяют этот параметр по-разному. Так, в работах [4,5] разрешающая способность R трактуется как степень отличия тангенсов углов наклона спектральных кривых соответственно для положительной и отрицательной реакций в диапазоне длин волн от 650 до 1000 nm. Поясним, что реакция агглютинации считается положительной, если сыворотка (моноклональные антитела) иммунологически адекватна группе исследуемой крови — эритроцитарные агглютинаты образуются; в противном случае реакция агглютинации считается отрицательной (агглютинаты не образуются).

Совершенствованию этого спектрофотометрического метода определения группы крови посвящены работы [6–8]. Заметим, что в [4,5] пороговое значение „разрешения“ составило $R_{\text{пор}} = 17$, т.е. если в опыте с данной пробой крови и сывороткой (моноклональной субстанцией) $R < R_{\text{пор}}$, то реакция агглютинации считается отрицательная. И, наоборот, при $R > R_{\text{пор}}$ реакция положительная. Как результат, такой анализ позволяет типировать данную пробу крови. Однако достигнутые величины разрешения R не слишком велики — увеличение разрешающей способности прибора остается актуальной задачей, так как это повышает надёжность определения группы крови. Отметим, что ошибка в определении группы крови образца должна быть полностью исключена. При недостаточной разрешающей способности прибора и в силу большой вариабельности образцов крови прибор может не определить группу анализируемой пробы, однако неприемлемо, чтобы он допускал ошибку в типировании образца крови. В [9,10] под разрешающей способностью предложено понимать отношение оптических сигналов, например мощностей зондирующих световых потоков $R = P_+/P_-$, соответствующих положительной и отрицательной реакциям агглютинации.

Среди публикаций по приборам для инструментального определения групповой принадлежности пробы крови стоит отметить работы [2,11], развитию подходов к

конструированию подобных систем на основе проточной цитометрии посвящены работы [12,13].

Одним из способов повышения разрешающей способности является использование АОМ типирования крови человека. Суть АОМ заключается в следующем. При воздействии стоячей ультразвуковой волны на исследуемую смесь „раствор крови + гемагглютинирующая сыворотка или моноклональные антитела (целиклоны)“ при положительной реакции агглютинации эритроцитов в узлах стоячей волны формируются крупные агглютинаты, которые быстро седиментируют при выключении ультразвука (УЗ). В то же время при отрицательной реакции выключение ультразвука приводит к деструкции RBC (red blood cell) агрегатов, а мелкие агрегаты и свободные эритроциты оседают медленно. В [14] экспериментально показано, что при ультразвуковом действии скорость седиментации агглютинатов при положительной реакции превышает скорость оседания агрегатов при отрицательной реакции более, чем на порядок. Это означает, что к некоторому моменту времени при положительной реакции исследуемая среда практически полностью становится прозрачной, в то время как при отрицательной реакции она остается мутной. Соответствующие оптические измерения показывают, произошла реакция агглютинации для данной смеси „раствор исследуемой крови + гемагглютинирующий агент“ или нет. Этот принцип используется для установления групповой принадлежности анализируемой пробы крови.

Данный метод был представлен нами впервые в аналоговом виде в [9] и довольно подробно описан в [15]. В [16] впервые предложено использовать цифровую камеру применительно к АОМ типирования крови, а следовательно, использовать цифровую обработку экспериментальных результатов. Далее были рассмотрены различные варианты АОМ типирования крови, основанные на разных физических принципах с использованием цифровой камеры, например методы проточной цитометрии [17] и цифровой микроскопии [18].

Важно отметить, что АОМ принципиально позволяет получать высокую разрешающую способность, а следовательно, высокую достоверность в определении группы крови. Так, если в первых работах этого направления [9,10] разрешение варьировало от единиц до нескольких десятков, то развитие АОМ типирования крови (применение различных оптических методов регистрации реакции агглютинации) увеличило данный параметр до сотен и тысяч [14]. Это позволило повысить достоверность типирования крови и, кроме того, определять групповую принадлежность в случаях проб со слабой агглютинацией.

В работах [19,20] типирование образцов крови выполнено с применением гемагглютинирующих сывороток на основе следующих способов обработки фотоизображений: фотометрический подход; статистический способ, включающий анализ дисперсии распределения пикселей некоторой зоны наблюдения по их яркости, счет количества пикселей фотоизображения с заданной яркостью,

расчет суммарной яркости пикселей фотоизображения. Проведено сравнение достигнутых значений разрешающей способности АОМ типирования крови для вышеперечисленных способов обработки фотоизображений.

Однако в последнее время в трансфузионной практике вместо традиционных гемагглютинирующих сывороток нашли применение целиклоны (анти-А и анти-В). Естественно, в силу различной природы этих агентов следует ожидать существенных отличий в их агглютинационной активности. Кроме того, как гемагглютинирующие сыворотки, так и целиклоны являются окрашенными, что также усиливает различие в определении степени агглютинации эритроцитов оптическим образом с применением этих агентов [21]. Показано, что окрашенность гемагглютинирующих сывороток не только влияет на разрешающую способность метода, но может приводить к ошибкам в типировании крови - особенно при слабой агглютинационной способности образцов.

В этой связи целями настоящей работы являются:

- 1) экспериментальное сравнение влияния различных способов обработки фотоизображений на разрешающую способность АОМ типирования крови в условиях применения в качестве агентов целиклонов типа анти-А и анти-В;
- 2) поиск путей развития способов обработки фотоизображений с целью повышения разрешения АОМ определения группы крови.

2. Материалы и методика проведения эксперимента

В качестве объектов исследования выступали растворы донорской крови. Для каждой исследуемой пробы крови изготавливалось три образца. Первые два: „цельная кровь + физиологический раствор + целиклон“ (анти-А или анти-В). При этом соотношение объемов „цельная кровь+целиклон“ составляло 1 : 10. Третий образец: „цельная кровь + физиологический раствор“ не содержит целиклон („чистый“ образец) Этот образец служил в качестве „опорного“ — здесь принципиально отсутствует реакция агглютинации эритроцитов в силу отсутствия в образце целиклонов. В определенной мере этот образец является аналогом случая отрицательной реакции агглютинации эритроцитов. Введение такого теста продиктовано желанием повысить надежность определения группы крови, что является одним из принципиальных отличий настоящей работы от [14,19] и других. Действительно, для выявления групповой принадлежности исследуемой пробы крови при проведении трех экспериментов с участием УЗ действия на образцы лишь в одном из них априори известно, что реакция агглютинации принципиально отсутствует. Тогда именно с этим образцом следует сопоставлять результаты опытов с участием целиклонов.

Для проведения экспериментов использовались кюветы размером $5 \times 18 \times 32$ mm, объем образца в кювете

составлял $2500 \mu\text{l}$. Процентное содержание крови во всех исследуемых образцах составляло 2% от общего объёма. Соотношение объёмов компонентов следующее.

- Для образцов с цоликлоном „цельная кровь: цоликлон: физиологический раствор“ = $1 : 10 : 36 = 2 : 20 : 78\% = 50 : 500 : 1950 \mu\text{l}$.

- Для „чистого“ образца „цельная кровь: физиологический раствор“ = $1 : 49 = 2 : 98\% = 50 : 2450 \mu\text{l}$.

В дальнейшем будем называть образцы перечисленных трех видов биообъектами исследования.

Эксперименты проходили в два этапа: пробоподготовка, а затем регистрация (запись видеоролика) седиментации эритроцитов и их ассоциатов (агрегатов — в случае отрицательной реакции, агглютинатов — в случае положительной реакции). Во время пробоподготовки в кюветах в соответствующих пропорциях смешивались цельная кровь и физиологический раствор. В случаях образцов с цоликлоном в силу высокой агглютинационной активности этот компонент добавлялся непосредственно перед началом регистрации процесса, когда исследуемый образец уже находился на экспериментальной установке (рис. 1). Запись видеоролика начиналась сразу после перемешивания всего образца.

Через 10 s после начала регистрации на протяжении 50 s образец подвергался УЗ воздействию. Время регистрации седиментации эритроцитов и их ассоциатов, а следовательно, время определения наличия или отсутствия реакции агглютинации (длительность видеороликов) составляла 2 min. Этого времени было достаточно для того, чтобы в случаях с положительной реакции агглютинации процесс седиментации агглютинатов претерпевал „насыщение“.

3. Экспериментальная установка

Экспериментальная установка представлена на рис. 1, *a*. Кювета с исследуемой смесью располагалась на пьезопреобразователе, УЗ волна ориентировалась в вертикальном направлении. Для возбуждения пьезокерамического преобразователя использовался генератор ГЗ-112/1 с усилителем, а его выходное напряжение контролировалось осциллографом С1-79. Генератор настраивался резонансно по отношению к преобразователю $\nu = 2.25 \text{ MHz}$, а его выходное напряжение, подаваемое на пьезокерамику, не превышало 15 V, что обеспечивало ультразвуковое действие на эритроциты без их гемолиза.

Биообъект зондировался коллимированным излучением светодиода типа LXHL-G1S с максимумом мощности потока излучения на длине волны 540 nm (рис. 1, *a*), спектр которого соответствовал спектру поглощения гемоглобина в зеленой области (рис. 1, *b*). Режим питания светодиода: напряжение 3 V, сила тока 0.3 A. Подбор спектра зондирующего светового излучения был продиктован необходимостью повышения контрастности фотоизображения, что способствует повышению точности регистрации седиментации крови.

Таблица 1. Определение групповой принадлежности образца крови по типу реакции агглютинации

Цоликлон		Групповая принадлежность образца
анти-А	анти-В	
Тип реакции агглютинации		
—	—	0(I)
+	—	A(II)
—	+	B(III)
+	+	AB(IV)

Примечание: Индексы „—“ и „+“ соответствуют отрицательной и положительной реакции агглютинации соответственно.

Луч света, прошедший сквозь исследуемый раствор, поступал на полихромную web-камеру Logitext-QuickCam, регистрировавшую процесс седиментации RBC ассоциатов с частотой 15 кадров в секунду. Видеоролики раскладывались на фотокадры с интервалом в 1 s. Полученные цифровые изображения подвергались разложению на RGB (красная, зелёная и синяя) компоненты, причем анализировалась лишь зелёная составляющая. Такой выбор сопряжен со спектром поглощения света гемоглобином в зеленой области и, естественно, со спектром зондирующего излучения светодиода.

4. Экспериментальные результаты

Результатом экспериментов, подлежащим дальнейшей компьютерной обработке, являются цифровые фотоизображения процесса седиментации биообъектов (рис. 2).

Фотоизображения на рис. 2 соответствуют следующим моментам времени: *a, d, g* — непосредственно перед включением УЗ; *b, e, h* — сразу после выключения УЗ; *c, f, i* — спустя 1 min после отключения УЗ. Из рис. 2 легко видеть, что изображения (*e*)–(*h*) и (*f*)–(*i*) попарно подобны. Пара (*e*)–(*h*) демонстрирует формирование эритроцитарных агрегатов, вторая (*f*)–(*i*) — деление RBC агрегатов на отдельные свободные эритроциты или на более мелкие агрегаты. Во втором случае взвесь остается не прозрачной, а изображения (*f*) — (*i*) почти идентичны. Ситуация меняется в случае положительной реакции: при выключении УЗ сформированные крупные агглютинаты (рис. 2, *b*) быстро седиментируют, а среда значительно просветляется (рис. 2, *c*). Таким образом, по значению коэффициента пропускания взвеси в кювете (фотометрия) или по яркости ее фотоизображения можно определить, для каких из моноклональных антител (анти-А или анти-В) имеет место положительная реакция. На этом основании можно определить групповую принадлежность исследуемого образца крови в соответствии с табл. 1.

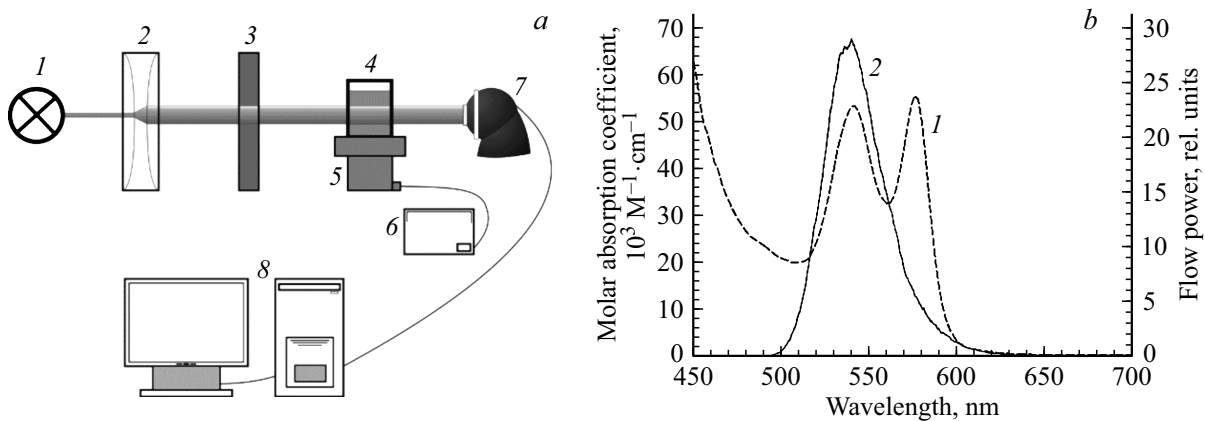


Рис. 1. (а) Схема установки для регистрации реакции агглютинации эритроцитов: 1 — светодиод, 2 — конденсор, 3 — нейтральный светофильтр, 4 — кювета, 5 — ультразвуковой преобразователь, 6 — ультразвуковой генератор, 7 — восьмиразрядная цифровая фотокамера, 8 — компьютер. (б) Спектры: 1 — поглощение гемоглобина (левая ось ординат), 2 — излучение светодиода (правая ось ординат).

5. Способы программной обработки фотокадров

Полученные экспериментальные фотоизображения типа рис. 2 обрабатывались несколькими компьютерными способами.

1. Фотометрия.

2. Статистические способы:

- дисперсионный анализ распределения пикселей фотоизображения по яркости для положительной и отрицательной реакций агглютинации;
- расчёт распределения количества пикселей по яркости для положительной и отрицательной реакций агглютинации с использованием граничного значения яркости;
- расчёт суммарной яркости пикселей фотоизображения для положительной и отрицательной реакций агглютинации;
- определение средней плотности распределения пикселей по яркости для положительной и отрицательной реакций агглютинации.

В каждом из рассмотренных способов обработки анализируемое изображение подвергалось следующим операциям:

1. Выделение зоны W на фотоизображении (рис. 2).
2. Преобразование изображения в зоне W в двумерный числовой массив по каждой из RGB составляющих.
3. Выделение и обработка только „зелёной“ составляющей разложения.

В результате для каждой исследуемой пробы крови и каждого способа обработки по завершении эксперимента были получены два параметра, которые демонстрируют, например, степень превышения яркости B (B — brightness) исследуемого образца с цоликлоном по сравнению с „чистым“ образцом. Так, например, если $R_a = B_a/B_0 \sim 1$, то это означает, что яркость образца B_a с цоликлоном типа анти-А по завершении эксперимента

близка в яркости „чистого“ образца B_0 ($B_a \sim B_0$) — соответствующая иммунная реакция отсутствует (реакция отрицательная, $B_a = B_-$). В этом случае величину R_a можно рассматривать лишь как „условное разрешение“ в отношении к цоликлонам типа анти-А. Если, к примеру, $R_b = B_b/B_0 \gg 1$, т.е. $B_b > B_0$ (B_b — яркость образца с цоликлоном анти-В), то реакция агглютинации произошла, реакция положительная ($B_b = B_+$). В этом случае исследуемая кровь соответствует группе В (III группа), R_b — „условное разрешение“ в отношении к цоликлонам типа анти-В. При изменении соотношений для R_a и R_b на обратные, например $R_b = B_b/B_0 \sim 1$, но $R_a = B_a/B_0 \gg 1$, группа крови А (II группа). Анализ соотношений между величинами „условных разрешений“ R_a и R_b позволяет определить групповую принадлежность исследуемых проб крови.

Важно отметить, что в отличие от многих ранее опубликованных работ рассматриваемого направления здесь впервые предложено использовать „чистый“ образец — аналог заведомо отрицательной реакции агглютинации. Его назначение не только в том, чтобы повысить достоверность определения группы крови, но и обеспечить надежность решения этой задачи для проб крови со слабой агглютинацией, а также для проб крови типа 0(I) и АВ(IV). Проблема с последними образцами заключается в том, что эти образцы реагируют с обоими типами цоликлонов подобным образом: образец крови 0(I) в обоих случаях (анти-А и анти-В) реагирует отрицательно, а для АВ(IV) в обоих случаях наблюдается положительная реакция агглютинации (табл. 1). В этих случаях применение „чистого“ образца желательно, так как он априори является аналогом отрицательной реакции агглютинации.

Отметим, что для всех способов обработки изображений алгоритм расчёта разрешения был общим. Так, после отключения ультразвукового действия 30 с отводилось на инкубацию образца (время, предназначенное

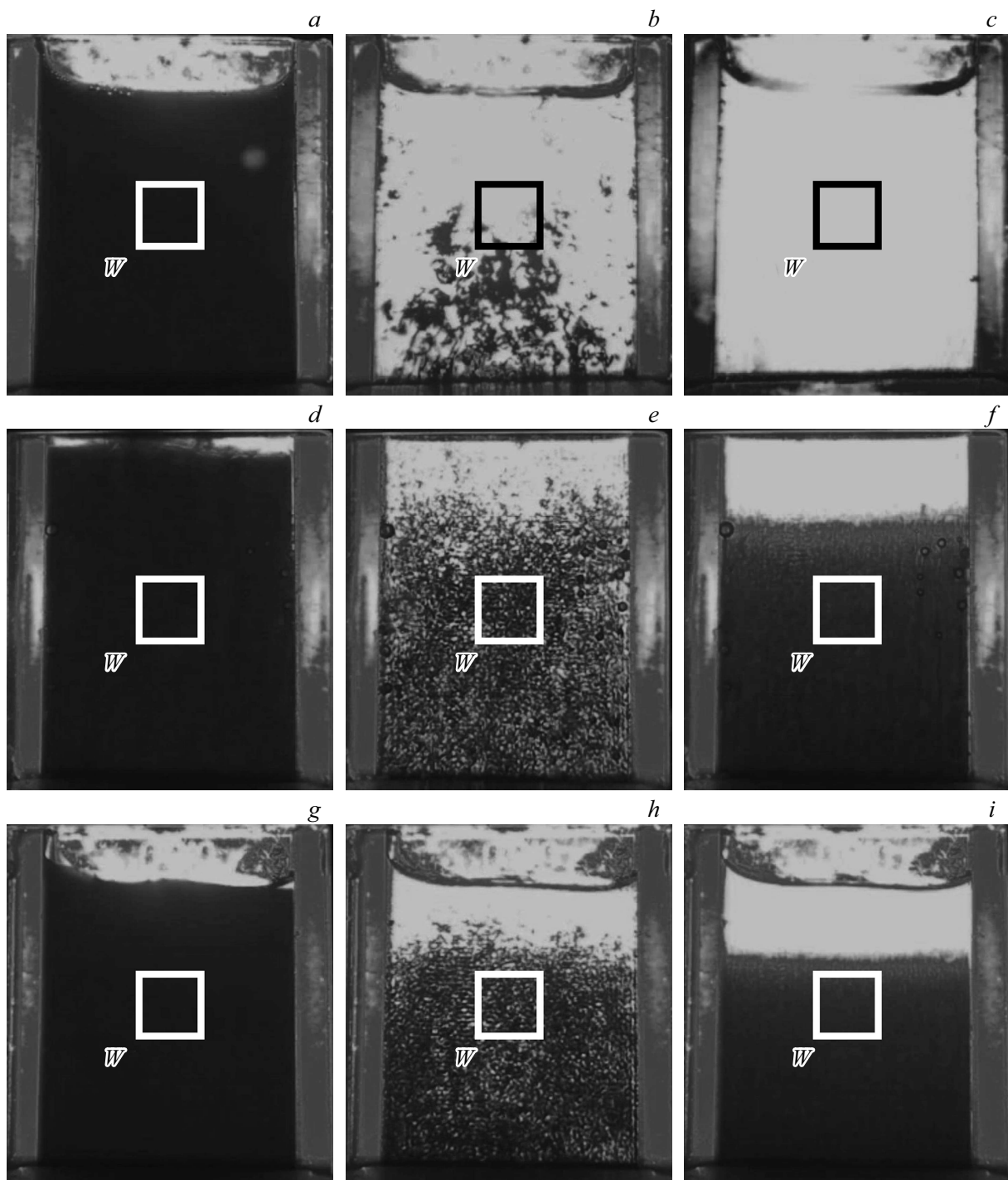


Рис. 2. Примеры исследуемых цифровых фотоизображений: *a, b, c* — положительная реакция агглютинации; *d, e, f* — отрицательная реакция агглютинации; *g, h, i* — „чистый“ образец. *W* — зона компьютерной обработки фотоизображений (100×100 pix).

для седиментации агглютинатов, свободных эритроцитов и их агрегатов), затем реализуется обработка — также в течение 30 с.

Величины, которые приводятся в параграфах разд. 5, являются следствием обработки различными способами экспериментальных результатов, т.е. цифровых фотоизображений, полученных в разд. 4.

5.1. Фотометрический способ обработки фотоизображений

По аналогии с [19] фотометрический способ обработки фотоизображения трактуется как определение средней яркости пикселей \bar{B} по области *W* (рис. 2) и времени его обработки (рис. 3). Поясним последнее:

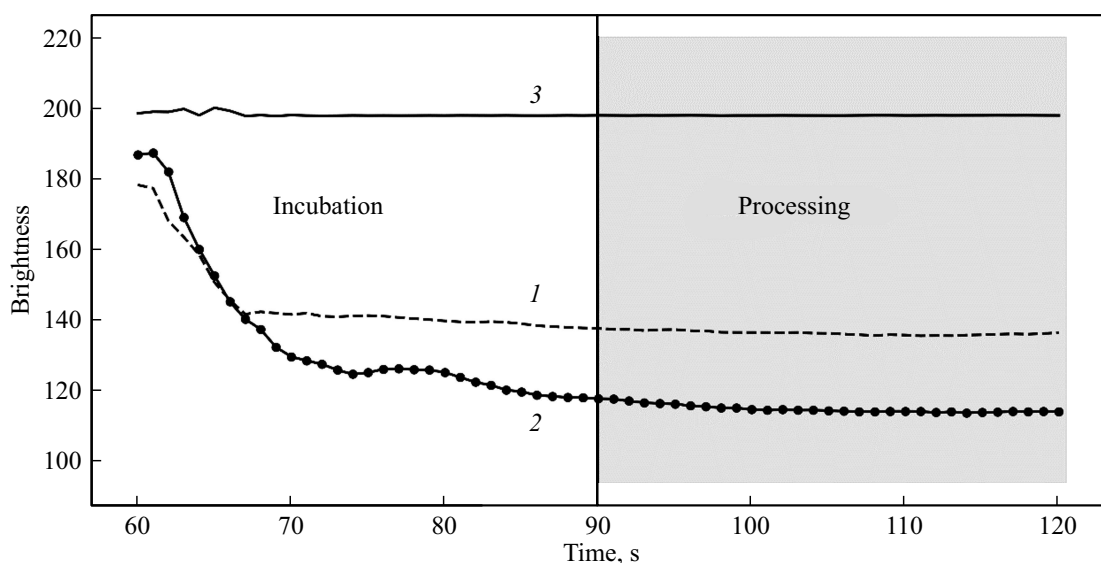


Рис. 3. Зависимости средней яркости пикселей B в зоне W от времени наблюдения для различных образцов крови: 1 — „чистый“ образец без цоликлона; $2, 3$ соответствуют взаимодействию исследуемого образца крови с моноклональными антителами анти- A и анти- B соответственно. Групповая принадлежность данной пробы крови — $B(III)$.

для примера на рис. 3 построены кривые зависимости средней яркости пикселей от времени наблюдения для трех образцов одной конкретной пробы крови. На этом рисунке указаны две зоны: зона инкубации образцов — с 60 до 90 s (incubation) и зона их обработки — с 90 до 120 s (processing).

Из рис. 3 видно, что для фотометрического метода обработки результатов значения „условных разрешений“ составляют $R_b = B_b/B_0 \sim 1.43$ и $R_a = B_a/B_0 \sim 0.86$. Отсюда следует, что $R_b > R_a$ — взвесь в кювете просветлилась с цоликлоном типа анти- B более значительно, нежели с анти- A . Это означает, что данная проба крови, согласно табл. 1, принадлежит к группе $B(III)$. Однако необходимо отметить, что интегрально разрешающая способность составляет всего лишь $R_{ph} = R_+/R_- = R_b/R_a \sim 1.7$ (индекс ph „условного разрешения“ R_{ph} означает photometry, фотометрия). Примерно такие же значения R_{ph} оказались характерными и для других исследованных проб крови: реально максимальное значение R_{ph} по 34 пробам составило не более 3. В целом нельзя считать, что фотометрический способ обработки результатов АОМ исследования обладает достаточным разрешением в определении группы крови, тем более для проб крови с низкой агглютинационной способностью.

5.2. Статистический способ обработки фотоизображений

Способ заключается в статистическом анализе распределения пикселей зоны W (рис. 2) по яркости. На рис. 4 представлены примеры таких экспериментальных распределений.

Распределения пикселей (рис. 4, a) для „чистого“ образца (кривая 1) и отрицательной реакции агглютинации (кривая 2) соответствуют моменту времени спустя 15 s после отключения УЗ воздействия на образец. Эксперименты показали, что распределение для „чистого“ образца располагается, как правило, справа (область большей яркости) по отношению к распределению пикселей для отрицательной реакции. Это обусловлено тем, что цоликлоны обоих типов специальным образом окрашены, что определяет сильное поглощение света зондирующего излучения. В то же время варибельность параметров различных проб крови иногда приводит к обратному взаимному расположению вышеотмеченных распределений. Однако оценки показывают, что это не оказывает значительного влияния на значения „условных разрешений“ R_a и R_b при анализе отрицательных реакций агглютинации.

В случае положительной реакции просветление образца в зоне W наступает практически сразу после выключения УЗ (рис. 2 и 4): все пиксели зоны W (10000) практически имеют одно и то же предельное значение яркости (~ 200). Более того, как было замечено в [14], седиментация агглютинатов (следовательно, и просветление образца) стартует еще до выключения УЗ. Это свидетельствует о том, что УЗ стоячая волна формирует настолько крупные RBC агглютинаты, что под действием силы тяжести они оседают вопреки явлению левитации. Однако при отрицательной реакции и в случае „чистого“ образца в тот же момент времени в зоне W всё ещё находится значительное количество свободных эритроцитов и эритроцитарных агрегатов небольших размеров, поглощающих зондирующий световой поток.

Важно отметить, что для проведения дальнейших количественных оценок „условных“ разрешений

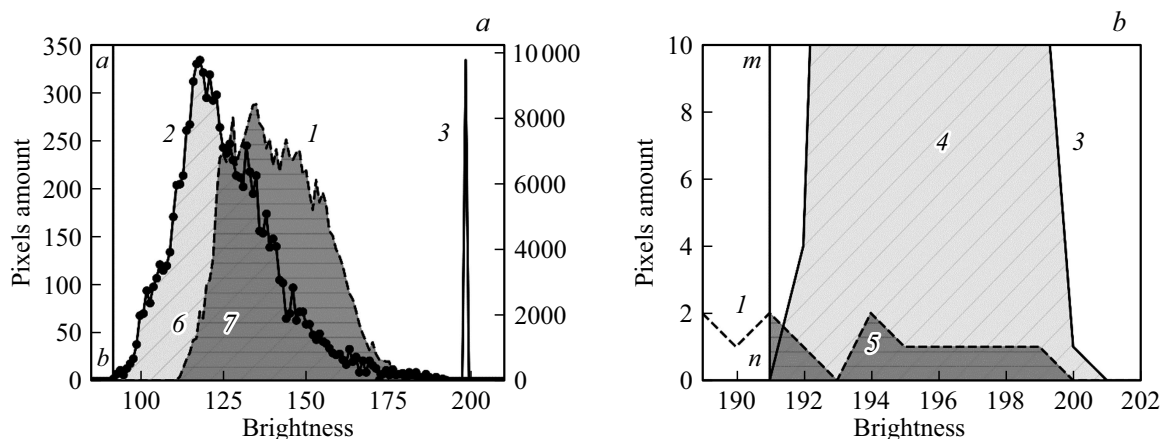


Рис. 4. (а) Распределение пикселей фотоизображений по яркости: 1 — „чистый“ образец, 2 — отрицательная реакция агглютинации, 3 — положительная реакция агглютинации. Кривые 1, 2 — левая ось ординат, 3 — правая ось ординат, ab — линия граничного значения (B_{bound}) для пары „чистый образец–отрицательная реакция“, 6 и 7 — части площадей распределений пикселей для отрицательной реакции RBC агглютинации S_- и „чистого“ образца S_0 соответственно при условии $B \geq B_{\text{bound}}$ для обоих случаев. (б) Увеличенное изображение фрагмента того же распределения (рис. 4, а) для „чистого“ образца (1) и положительной реакции (3), mn — линия граничного значения (B_{bound}) для пары „чистый образец–положительная реакция“, 4 и 5 — части площадей распределений пикселей для положительной реакции RBC агглютинации S_+ и чистого образца S'_0 соответственно при условии $B \geq B_{\text{bound}}$ для обоих случаев.

в разд. 5.2.2 и 5.2.3 вертикальные линии ab и mn проведены из точек на оси „Brightness“, в которых 1) линии ab отвечает минимальная граничная яркость $B_{\text{bound}} \sim 98$, при этом число пикселей для отрицательной реакции обращается в нуль, 2) линии mn соответствует $B_{\text{bound}} \sim 191$, где число пикселей для положительной реакции агглютинации также обращается в нуль. Естественно, вышеуказанные числа приведены лишь для распределений на рис. 4, а. Они справедливы только для данного фотокадра, для других кадров они другие и устанавливаются специально.

И наконец, заметим, что распределение пикселей для положительной реакции всегда располагается справа (область больших яркостей) по отношению к „чистому“ образцу и случаю отрицательной реакции агглютинации (рис. 4).

5.2.1. Дисперсионный анализ распределения пикселей фотоизображения по яркости

Из рис. 4, а видно, что ширина распределения пикселей фотоизображения по яркости для отрицательной реакции (впрочем, как и для „чистого“ образца крови) резко отличается от того же параметра для положительной реакции агглютинации. Аппроксимируя это распределение нормальным, можно полагать, что в качестве параметра, который позволяет отличить положительную реакцию агглютинации от отрицательной, допустимо избрать дисперсию d .

В этом случае за „условное разрешение“ можно принять $R_{d,a} = d_0/d_a$ и $R_{d,b} = d_0/d_b$ (индекс d „условного разрешения“ R_d означает dispersion). Такой подход при прочих равных условиях позволяет надеяться на большее значение разрешающей способности по сравнению с

фотометрическим подходом. Действительно, как показано в разд. 5.1, значение R_{ph} ограничено несколькими единицами, в то время как дисперсии для положительной и отрицательной реакций агглютинации могут отличаться более существенно (рис. 4, а). Результаты для данного способа обработки экспериментов приведены в табл. 3.

5.2.2. Расчёт количества пикселей с яркостью, превышающей заданное граничное значение

Для демонстрации смысла данного способа обработки фотоизображений рассмотрим лишь три синхронных фотокадра трех роликов, которые соответствуют положительной, отрицательной реакциям агглютинации эритроцитов и „чистому“ образцу. Смысл заключается в следующем.

Для исследуемой пробы крови поочередно проведем эксперименты с двумя типами антител (анти-А и анти-В), причем изначально неизвестно, какой образец из двух дает положительную реакцию агглютинации, а какой — отрицательную. Как отмечалось выше, положение распределения пикселей для отрицательной реакции близко положению распределения для „чистого“ образца (рис. 4, а), распределение пикселей для положительной реакции значительно смещено вправо относительно распределения для отрицательной реакции, а следовательно, и относительно распределения для „чистого“ образца. При этом „чистый“ образец рассматривается как „опорный“. Эти два обстоятельства позволяют определить, какой из типов антител (какой из двух экспериментов) дает положительную реакцию, а какой — отрицательную. В целом это должно позволить определить группу крови исследуемой пробы.

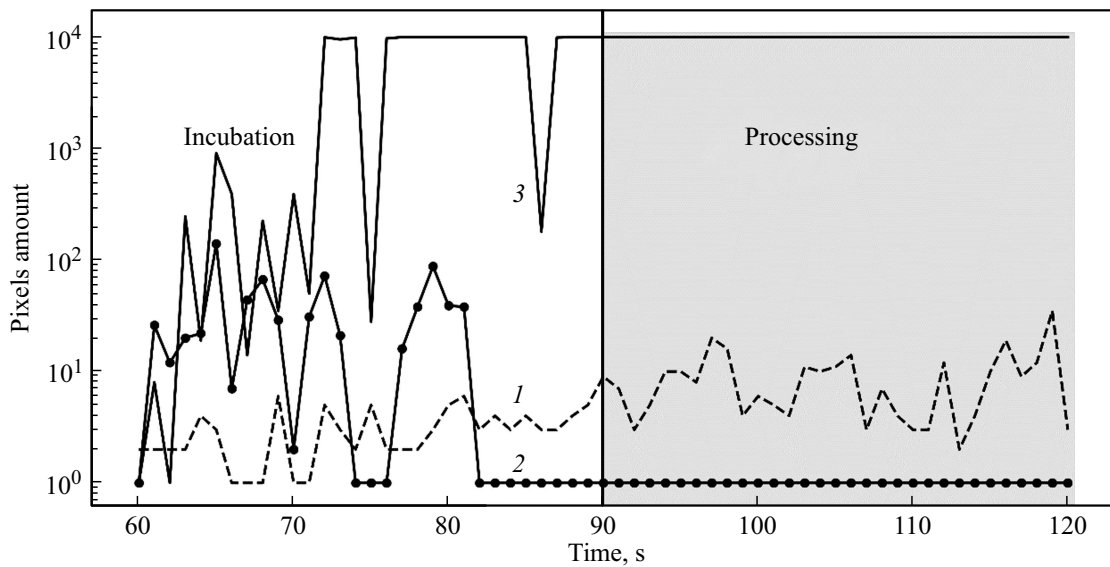


Рис. 5. Зависимости N_a (1), N_b (2) и N_0 (3) от времени наблюдения.

Однако для того, чтобы групповая принадлежность пробы крови устанавливалась автоматически, необходимо предоставить компьютеру некие числовые экспериментальные данные, а именно величины R_a и R_b . С этой целью для полученных экспериментальных распределений выберем положения линий ab и mn (рис. 4) так, как это описано во введении к разд. 5.2.

Рассчитаем отдельно число пикселей для отрицательной реакции N_- и „чистого“ образца N_0 (рис. 4, а) при условии, что яркость пикселей B удовлетворяет $B \geq B_{\text{bound}}$, где B_{bound} лежит в точке b . Очевидно, что площадь 6 (отрицательная реакция) и площадь 7 („чистый“ образец) (рис. 4, а) при данном условии символизируют число пикселей N_- и N_0 соответственно. Видно также, что эти площади близки, а следовательно, $N_- \sim N_0$, т.е. $R_a = N_-/N_0 \sim 1$. Здесь и далее обозначение N — число пикселей (number of pixels). Рассмотрим подобный параметр R_b для положительной реакции (рис. 4, б).

В этом случае на границе распределений для положительной реакции агглютинации и для „чистого“ образца выберем некоторое граничное значение яркости B_{bound} (точка n). Здесь площади 4 и 5 символизируют число пикселей для положительной реакции N_+ и „чистого“ образца N_0 соответственно. Но теперь $N_+ \neq N_0$, более того, $N_+ \gg N_0$. Тогда $R_b = N_+/N_0 \gg 1$. Сравнивая количественно R_a и R_b , можно определить группу исследуемой пробы крови.

Перейдем от обработки трех конкретных фотокадров для трех образцов одной пробы крови к анализу трех роликов, регистрирующих наличие или отсутствие RBC агглютинацию. Кинетика процесса изменения числа пикселей отображена на рис. 5.

Обработка анализируемых синхронных фотокадров трех роликов (положительная, отрицательная реакции

агглютинации и „чистый“ образец) проводилась в соответствии с вышеизложенными принципами. Важно отметить, что граничные яркости B_{bound} определялись для каждого исследуемого момента времени (фотокадра) и типа ролика индивидуально. Кроме того, разрешающая способность R_N определялась как усредненное по времени наблюдения отношение числа пикселей с яркостью, превышающей граничную для случая с цоликлоном (\bar{N}_a или \bar{N}_b), к числу пикселей для „чистого“ образца (\bar{N}_0): $R_{Na} = \bar{N}_a/\bar{N}_0$; $R_{Nb} = \bar{N}_b/\bar{N}_0$. На рис. 5 представлены зависимости $N_a(t)$, $N_b(t)$ и $N_0(t)$ для образца крови, принадлежащего к группе В(III). Соответственно значение разрешения RN варьирует в пределах от ~ 0 для отрицательной реакции агглютинации до 10000 для положительной реакции агглютинации. Насыщение кривой для положительной реакции агглютинации (рис. 5, кривая 3) объясняется тем, что во временном интервале, в котором наблюдается насыщение, все пиксели зоны W имели яркость выше B_{bound} , т.е. 10000 пикселей. Значения разрешающей способности представлены в табл. 3.

5.2.3. Сравнение суммарной яркости пикселей фотоизображения для положительной и отрицательной реакций агглютинации

Способ расчёта суммарной яркости является усовершенствованием способа подсчёта количества пикселей (разд. 5.2.2.). Действительно, разрешение предыдущего способа может быть увеличено дополнительно, если учесть не только количество пикселей, яркость которых превышает заданное пороговое значение B_{bound} , но и яркость этих пикселей. Очевидно, что площади S_- и S_+ , обозначенные на рис. 4, б как 4 и 5, физически отображают суммарную яркость пикселей соответственно для случаев положительной и отрицательной реакций

Таблица 2. Критерии определения групповой принадлежности проб крови

Параметр обработки фотокадров (раздел)	Максимальное значение „условного“ разрешения для отрицательной реакции, $(R_-)_{\max}$	Критерий, заданный в компьютерной программе, (R_{cr})
1	2	3
D (5.2.1)	13	15
N (5.2.2)	64.9	100
S_N (5.2.3)	77.2	100
PDDB (5.2.4)	5.5	10

агглютинации. Обозначение S — суммарная яркость (summary brightness). Легко видеть (рис. 4, *b*), что при отрицательной реакции агглютинации не только количество пикселей, для которых $B \geq B_{\text{bound}}$ мало, но также мала и их яркость и, как результат, мала суммарная яркость таких пикселей S_0 .

В то же время для положительной реакции агглютинации число пикселей с яркостью $B \geq B_{\text{bound}}$ велико и, кроме того, их яркость значительна. Поэтому для этого случая суммарная яркость всех пикселей S_+ превышает величину S_0 . Тогда разрешение АОМ типирования крови с подобной обработкой фотоизображений $R_S = S_+/S_0$ может оказаться высоким.

Значение разрешения определялось как отношение усреднённых величин S_{N0} , S_{Na} , S_{Nb} по времени следующим образом: $R_{SNa} = S_{Na}/S_{N0}$; $R_{SNb} = S_{Nb}/S_{N0}$. На рис. 6 представлены зависимости S_{N0} , S_{Na} , S_{Nb} от времени наблюдения.

Сравнивая графики рис. 5 и 6, легко видеть явное сходство в характере кривых, но числовые значения на рис. 6 много больше, что свидетельствует о преимуществе способа расчёта разрешения через суммарную яркость пикселей. Предельное значение разрешения в этих двух способах определяется количеством пикселей, т.е. размером зоны обработки экспериментальных результатов W .

5.2.4. Определение средней плотности распределения пикселей по яркости

Данный способ обработки фотоизображений также основан на анализе распределения пикселей избранной зоны W по яркости. Из рис. 2 и 4, *a* видно, что для положительной реакции агглютинации практически все пиксели имеют одно значение яркости, в то время как при отрицательной реакции распределение пикселей по яркости близко к нормальному. То есть разброс пикселей по яркости для положительной реакции значительно уже, чем для отрицательной реакции, а в большинстве случаев и вовсе равен 1. Вот почему авторами был введён параметр, обозначенный как „плотность распределения пикселей по яркости“ PDDB (distribution by brightness, ρ_N), $\rho_N = N_{\max}/\Delta B$, где N_{\max} — максимум в распределении пикселей, а ΔB — ширина распределения на его полувысоте. Естественно, ρ_N для положи-

тельной реакции, $\rho_{+N} = N_{+\max}/\Delta B_+$, и отрицательной, $\rho_{-N} = N_{-\max}/\Delta B_-$, имеют принципиально разные значения.

На рис. 7 приведены примеры зависимости величин PDDB от времени наблюдения для одного из исследуемых образцов. Напомним, что каждому моменту времени соответствует свой фотокадр. Так что для получения лишь одной кинетической кривой на рис. 7 следовало обработать десятки фотокадров. Не стоит также забывать, что здесь представлены три кривые для трех образцов крови.

Из рис. 7 видно, что „чистому“ образцу и образцу с отрицательной реакцией агглютинации отвечают похожие кривые, средние значения \overline{PDDB}_a и \overline{PDDB}_0 составляют около десяти единиц. В то же время для образца с положительной реакцией величина \overline{PDDB}_b достаточно быстро достигает „насыщения“ и оказывается равной нескольким тысячам.

Как и в предыдущих разделах разрешение определялось как отношение усреднённых величин следующим образом: $R_{PDDB_a} = \overline{PDDB}_a/\overline{PDDB}_0$; $R_{PDDB_b} = \overline{PDDB}_b/\overline{PDDB}_0$. Значения разрешения данного способа также представлены в табл. 3.

Из-за того, что случаи с „чистым“ образцом и отрицательной реакцией похожи, можно сделать следующее заключение: если значение разрешающей способности невелико, то в этом случае реакция агглютинации отрицательная (из-за близости значений величин \overline{PDDB}_- и \overline{PDDB}_0). Если значение разрешающей способности на уровне 1000 или выше, то реакция агглютинации положительная (значение \overline{PDDB}_+ многократно превосходит \overline{PDDB}_0).

6. Обсуждение результатов

Число проб крови, групповую принадлежность которых следовало определить с помощью АОМ, составило 34: 0(I) — 12 проб, А(II) — 7, В(III) — 8, АВ(IV) — 7. Заметим, что изначально авторы располагали полной информацией об исследуемых пробах крови, в том числе об их групповой принадлежности. Задача сводилась к типированию с помощью АОМ и сравнению результатов с паспортными данными. Компьютерная обработка фотокадров пятью различными способами (разд. 5) показала,

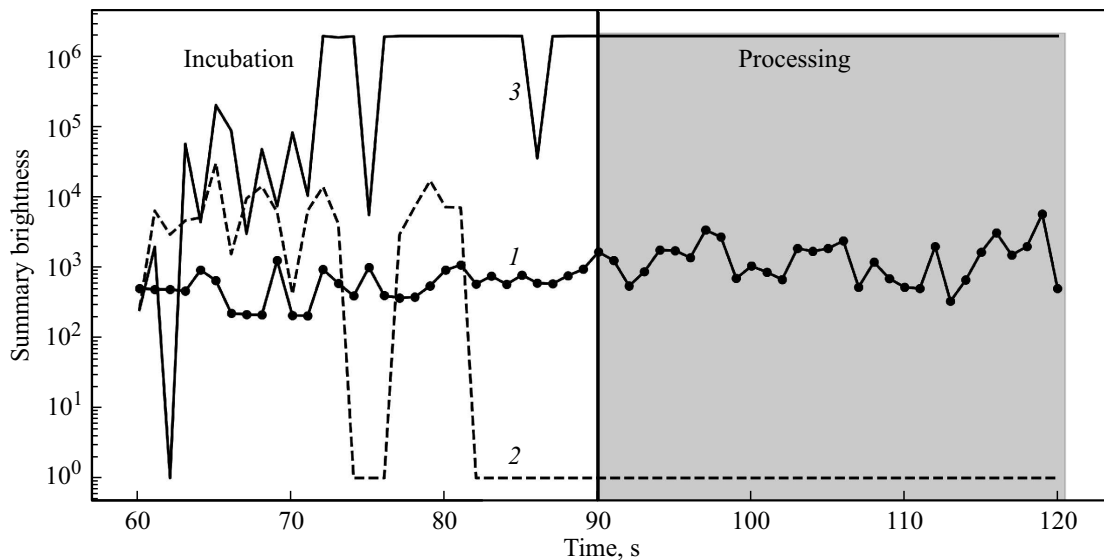


Рис. 6. Зависимости суммарной яркости пикселей от времени наблюдения: 1 — S_{N0} , 2 — S_{Na} , 3 — S_{Nb} .

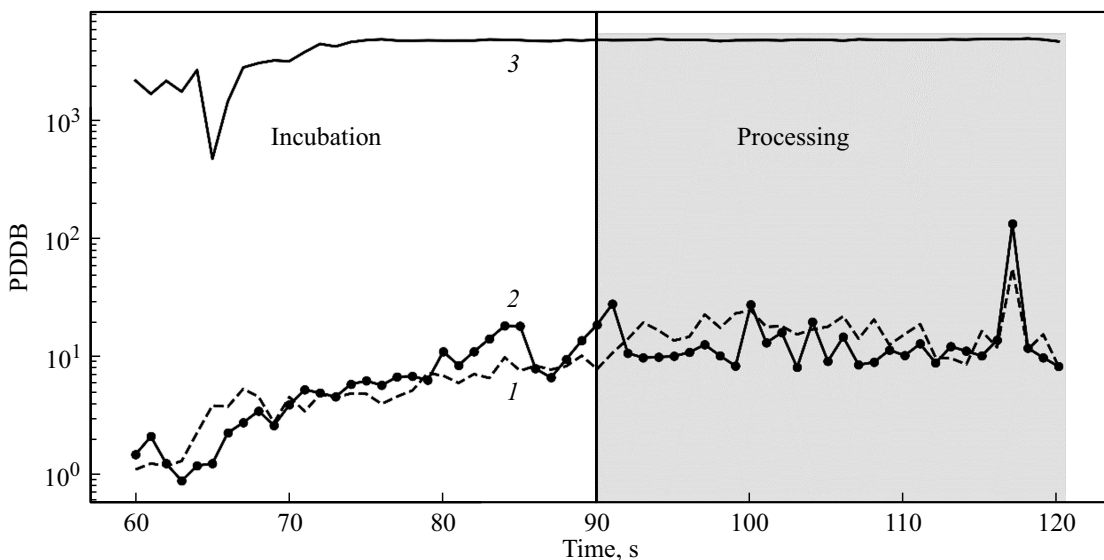


Рис. 7. Зависимость плотности распределения пикселей по яркости PDDB в зоне W от времени наблюдения: 1 — $PDDB_0$, 2 — $PDDB_a$, 3 — $PDDB_b$.

что численные значения „условных“ разрешений, по которым следует делать заключение о групповой принадлежности данной пробы крови, существенно различны при разных способах обработки одних и тех же фотокадров. Результаты такого анализа и соответствующие критерии сведены в табл. 2.

В колонке 1 табл. 2 указаны параметры обработки фотокадров, а также номера разделов, в которых дано название способа обработки и его описание. В колонке 2 приведены реальные максимальные численные значения „условного“ разрешения для отрицательной реакции по совокупности 34 исследованных проб крови для всех четырех статистических способов обработки фотокадров. Для распознавания группы крови данной пробы

на основании данных колонки 2 табл. 2 в компьютерной программе были заданы критерии R_{cr} (индекс cr означает criterion), приведенные в колонке 3 табл. 2. Эти критерии были заданы с некоторым запасом, т.е. $R_{cr} > (R_-)_{max}$. Данные этой колонки следует понимать так: если „условное“ разрешение R_a , рассчитанное, например, как параметр D , превышает $R_{cr} = 15$, то реакцию следует считать положительной. Тогда „условное“ разрешение R_b соответствует реакции отрицательной. Сложнее в отношении образцов крови 0(I) и AB(IV). Поэтому алгоритм применения табл. 2 был следующим.

1) Если $R_a > R_{cr}$, $R_b < R_{cr}$, то образец имеет группу крови A(II). За значение разрешения принимается R_a .

Таблица 3. Пример определения групповой принадлежности проб крови

Группа крови	Способы компьютерной обработки фотоизображений									
	№ 1 Фотометрический способ (разд. 5.1)		№ 2 Дисперсионный анализ распределения пикселей		№ 3 Граничное значение яркости (разд. 5.2.1)		№ 4 Суммарная яркость пикселей (разд. 5.2.2) (разд. 5.2.3)		№ 5 Плотность распределения пикселей по яркости (разд. 5.2.4)	
	R_a	R_b	R_a	R_b	R_a	R_b	R_a	R_b	R_a	R_b
0(I)	0.41	0.43	0.2	0.2	1.0	1.0	0.4	0.4	0.2	0.2
0(I)	0.80	0.92	1.2	1.2	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9	1.0
A(II)	1.77	1.14	412.6	0.9	10000.0	1.2	1980000.0	1.4	33.7	1.2
A(II)	2.74	1.05	320.5	1.1	10000.0	1.0	2539924.2	1.1	46.6	1.1
B(III)	0.84	1.67	3.0	790.8	1.0	10000.0	0.8	1980000.0	1.4	44.6
B(III)	0.87	1.55	1.5	355.0	1.0	8378.4	0.9	33836.8	1.1	28.2
AB(IV)	2.20	2.20	652.0	652.0	10000.0	10000.0	2540000.0	2539971.4	53.7	53.7
AB(IV)	2.54	2.53	390.8	390.8	10000.0	10000.0	2539886.7	2532801.8	47.0	46.9

2) Если $R_b > R_{cr}$, $R_a < R_{cr}$, то образец имеет группу крови B(III). За значение разрешения принимается R_b .

3) Если $R_a > R_{cr}$, $R_b > R_{cr}$, то образец имеет группу крови AB(IV). За значение разрешения принимается минимальное из R_a и R_b .

4) Если $R_a < R_{cr}$, $R_b < R_{cr}$, то образец имеет группу крови 0(I). За значение разрешения принимается минимальное из R_a и R_b .

Фотокадры видеороликов для 34 проб крови были обработаны пятью различными способами (разд. 5) с использованием таблицы критериев (табл. 2). Из-за ограничений на объем статьи приведем лишь некоторую часть полученных результатов для образцов крови разных групп (табл. 3).

Из этой таблицы видно следующее.

1) Фотометрический способ (№ 1) не обладает необходимым разрешением для определения группы крови образца. Это легко видеть, например, из того факта, что для образцов крови A(II) и B(III) величины „условных“ разрешений R_a и R_b должны отличаться между собой значительно, желательнее на порядки, а в действительности они оказались одного порядка. Кроме того, параметры R_a и R_b для образцов 0(I) и AB(IV) должны резко отличаться от друг друга, так как образец 0(I) принципиально не должен взаимодействовать с цоликлонами обоих типов, а образец AB(IV), наоборот, дает реакцию агглютинации как с анти-A, так и с анти-B цоликлонами. Однако в табл. 3 это не наблюдается: величины R_a (0(I)) и R_b (0(I)) близки к значениям R_a (AB(IV)) и R_b (AB(IV)).

2) В то же время четыре статистических способа обработки фотоизображений (№ 2–5) дают положительный результат — величины R_a и R_b адекватны соответственно наличию или отсутствию реакции агглютинации. Например, для образца 0(I) значения R_a и R_b близки к 1 (агглютинация отсутствует), в то время как для образца AB(IV) эти же параметры возрастают до

сотен (способ № 2), тысяч (№ 3) и даже $> 10^6$ (№ 4) — реакция агглютинации состоялась. Естественно, чем сильнее отличаются R_a от R_b , тем выше надежность определения групповой принадлежности пробы крови. И только для способа № 5 „условные“ разрешения составляют десятки.

3) Справедливости ради следует отметить, что полное распознавание групп крови рассмотренных проб с помощью АОМ оказалось возможным благодаря тому, что для каждого способа обработки фотоизображений были определены критерии для значений „условных“ разрешений (табл. 2). Численные значения критериев в табл. 2 определены по 34 пробам крови, увеличение этого числа может привести к корректировке табл. 2. В противном случае в силу вариабельности проб крови возможны ошибки в типировании.

4) В то же время такая корректировка является естественной. Дело в том, что при разработке и производстве диагностических приборов, в частности для типирования крови, изготовители практикуют „отслеживание“ надежности в определении группы крови в клиниках и центрах крови. Это необходимо для дальнейшего совершенствования прибора. Так, например, результаты испытаний разработанного авторами [22] прибора для определения группы крови по системе АВ0 и системе Rh сопоставлялись с результатами параллельного типирования крови прибором Technicon Auto Analyzer, а также в некоторых случаях для контроля „ручным“ (не инструментальным) методом. Сравнение показало, что в 97.3% из 10042 образцов крови оба прибора однозначно определили группы крови образцов, лишь в 266 случаях ответом приборов был „группа не определена“. В этих случаях группа крови уточнялась вручную, причем обратным методом перекрестного тестирования. Другой пример: в работе [23] испытанию, подобному [22], был подвергнут прибор Inverness Blood Grouping System (IBGSystem), где результаты, полученные этим прибором

ром, сопоставлялись с „ручным“ методом. Лишь в трех случаях из 2051 результат определения группы крови системами IBGSystem отличался от результатов ручного типирования крови.

5) И наконец, подчеркнем, что рассмотренный здесь АОМ определения групповой принадлежности пробы крови технически сводится к получению трех фотоизображений образцов (двух с цоликлонами типа анти-А и анти-В, а также „чистого“ образца). В то же время метод допускает несколько способов (предпочтительно статистических) обработки этих фотографий. Если все результаты приводят к единому заключению о групповой принадлежности пробы крови, то с большой долей вероятности можно утверждать, что типирование состоялось. Однако если хотя бы при одном из способов получен отличный результат, то следует провести дополнительные исследования, например с использованием кроссметода, но в рамках АОМ.

7. Заключение

Экспериментально апробирован АОМ инструментального определения групповой принадлежности образцов крови по системе АВ0 с использованием цоликлонов типа анти-А и анти-В. С целью повышения достоверности в определении группы крови впервые предложено в качестве дополнительного теста ввести „опорный“ образец — раствор исследуемой пробы крови без цоликлона („чистый“ образец). Такой образец априори имитирует отрицательную реакцию агглютинации эритроцитов, что способствует точному распознаванию реальной отрицательной реакции агглютинации эритроцитов по отношению к положительной.

Показано, что достоверность типирования крови зависит не только от технологии проведения соответствующих исследований, но и от способов обработки фотоизображений агглютинации эритроцитов. Впервые для АОМ типирования крови в качестве разрешающей способности метода предложено использовать параметр „средняя плотность распределения пикселей по яркости фотоизображения“. Проведено сравнение достоверности типирования крови для четырех вариантов статистических способов обработки экспериментальных результатов. Определены критерии для „условных“ разрешений типов реакций агглютинации, а также алгоритм их применения. Использование разработанных критериев и алгоритма позволило определить группу крови 100% исследованных проб. В целом настоящую работу можно рассматривать как этап дальнейшего развития АОМ инструментального типирования крови человека.

Список литературы

- [1] A. Vyas, *Simultaneous human ABO and RH(D) blood typing or antibody screening by flow cytometry*, US Patent 5776711, July 7, 1998.
- [2] P. Sturgeon. *Immunohematology*, **17** (4), 100 (2001).
- [3] T.R. Kline, M.K. Runyon, M. Pothiwala, R.F. Ismagilov. *Anal. Chem.*, **80** (16), 6190 (2008).
- [4] S. Narayanan, S. Orton, G.F. Leparc, L.H. Garcia-Rubio, R.L. Potter. *Transfusion*, **39**, 1051 (1999).
- [5] L.H. Garcia-Rubio, S. Narayanan, G. Leparc, R. Potter, S. Orton. *Spectrophotometric method and apparatus for blood typing*, US Patent, 6330058, December 11, 2001.
- [6] S. Narayanan, L. Galloway, A. Nonoyama, G. Leparc, L.H. Garcia-Rubio, R.L. Potter. *Transfusion*, **42**, 619 (2002).
- [7] R.A. Steven. *A Simplified Visible/Near-Infrared Spectrophotometric Approach to Blood Typing for Automated Transfusion Safety*. Thesis presented to North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA, 2005.
- [8] Lambert J.B. *A miniaturized device for blood typing using a simplified spectrophotometric approach*. Thesis submitted to North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA, 2006.
- [9] А.Н. Алипов., В.З. Ванинский, Л.Б. Денисов, С.И. Донсков, В.А. Дубровский, Э.Н. Завьялов, Н.Н. Князьков. *Способ определения реакции агглютинации*. Авторское свидетельство изобретения, СССР № 1683760, приоритет от 04.06.1987, опубликовано Бюл. № 38 от 30.10.1991.
- [10] Н.Н. Князьков, С.И. Донсков и др. *Проблемы гематологии и переливания крови*, **2**, 5 (1997). [N.N. Knyazkov, C.I. Donskov et al. *Problems of hematology and blood transfusion*, **2**, 5 (1997)].
- [11] P. Moncharmont, A. Plantier, V. Chirat, D. Rigal *Immunohematology*, **19** (2), 54 (2003).
- [12] C.F. Battrell, D. Wierzbicki, J. Clemmens, J. Capodanno, J.R. Williford, B.I. Sprague. *Microfluidic apparatus and methods for performing blood typing and crossmatching* US Patent. Patent application number: 20100112723. Publication date: 05.06.2010.
- [13] Dong-Sung Kim, Tai-Hun Kwon, *Microfluidic biochip for blood typing based on agglutination reaction*, US Patent 7718420 B2, May 18, 2010.
- [14] V.A. Doubrovski, S.V. Markov, S.O. Torbin, E.P. Karpocheva. *J. Biomed. Photonics & Engineering*, **7** (4), 2021.
- [15] V.A. Doubrovski, K.N. Dvoretzki. *Ultrasound in Medicine & Biology*, **26** (4), 665(2000).
- [16] В.А. Дубровский, А.А. Долмашкин. *Опт. и спектр.*, **109** (2), 1346 (2010). [V.A. Doubrovski, A.A. Dolmashkin. *Opt. Spectrosc.*, **109** (2), 1346 (2010)].
- [17] Yu.A. Ganiлова, V.A. Doubrovski, I.V. Zabenkov. *Proc. SPIE.*, **7999**, 799903 (2011).
- [18] В.А. Дубровский, И.В. Забенков, С.О. Торбин. *Медицинская техника*, **3**, 14 (2013). [Doubrovski V.A., Zabenkov I.V., Torbin S.O. *Med. Tech.*, **3**, 14 (2013)].
- [19] В.А. Дубровский, М.Ф. Медведева. *Медицинская техника*, **1**, 7 (2016). [Doubrovski V.A., Medvedeva M.F. *Med. Tech.*, **1**, 7 (2016)].
- [20] В.А. Дубровский, М.Ф. Медведева. *Медицинская техника*, **2**, 3 (2016). [Doubrovski V.A., Medvedeva M.F. *Med. Tech.*, **2**, 3 (2016)].
- [21] В.А. Дубровский, М.Ф. Медведева, С.О. Торбин. *Опт. и спектр.*, **120** (1), 68 (2016). [V.A. Doubrovski, M.F. Medvedeva, S.O. Torbin. *Opt. Spectrosc.*, **120** (1), 68 (2016)].
- [22] A. Chung, P. Birch, K. Ilagan. *Transfusion*, **34** (1), 88 (1994).
- [23] P.D. Mintz, G. Anderson, C. Barasso, E. Sorenson. *Immunohematology*, **10** (2), 60 (1994).