

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



Corso di laurea magistrale in Bioingegneria

Analisi di immagini da microscopia confocale: riconoscimento dei nervi corneali

Laureanda: Finesso Marta

Relatore: Ruggeri Alfredo
Correlatore: Poletti Enea

Anno accademico 2013/2014,
Padova 14 Ottobre 2014

Indice

<i>Introduzione</i>	1
Scopo ed obiettivi.....	1
Outline della tesi	2
<i>Capitolo 1</i>	5
1. La cornea	7
1.1 Anatomia dell' occhio	7
1.2 Struttura della cornea	10
1.3 Ruolo della cornea.....	14
1.4 Nervi corneali e patologie	15
<i>Capitolo 2</i>	17
2. Elaborazione di immagini.....	19
2.1 Principi generali	19
2.2 Filtri bidimensionali	21
2.3 Filtri Gabor.....	22
2.4 Esempi.....	24
<i>Capitolo 3</i>	29
3. Detection dei nervi corneali.....	31
3.1 Microscopia confocale	31
3.1.1 Principio di funzionamento.....	32
3.1.2 Microscopia confocale corneale	33
3.2 Costruzione del banco di filtri.....	36
3.2.1 Scelta dei parametri: ROC analisi.....	36
3.2.2 Principio base dell' analisi ROC.....	41
3.3 Definizione di ground truth.....	44
3.3.1 Confronto tra immagini e ground truth: scelta dei parametri	46
3.3.2 Validità dei parametri: confronto di ogni immagine con il proprio ground truth	51
<i>Conclusioni</i>	55
<i>Bibliografia</i>	57

Indice delle figure

Capitolo 1

Figura 1.1	Anatomia dell' occhio umano.....	7
Figura 1.2	La cornea.....	11
Figura 1.3	Gli strati della cornea.....	12

Capitolo 2

Figura 2.1	Filtro di Gabor tridimensionale.....	22
Figura 2.2	Scomposizione del filtro di Gabor.....	23
Figura 2.3	Filtro di Gabor a frequenza unitaria e varianze uguali	24
Figura 2.4	Filtro di Gabor a frequenza unitaria; Sigma y molto maggiore di Sigma x.....	25
Figura 2.5	Filtro di Gabor a frequenza unitaria; Sigma x molto maggiore di Sigma y.....	25
Figura 2.6	Filtro di Gabor a frequenza unitaria; Sigma x circa il doppio di Sigma y.....	26
Figura 2.7	Filtro di Gabor a frequenza non unitaria; Sigma x circa il doppio di Sigma y.....	27
Figura 2.8	Effetto sul filtraggio dipendentemente dalle rotazioni: (A) immagine originale; (B) filtro orientato a 180°; (C) filtro orientato a 90°.....	27

Capitolo 3

Figura 3.1	Struttura schematica di un microscopio confocale in riflessione.....	33
Figura 3.2	Microscopia confocale corneale.....	34
Figura 3.3	Immagini da microscopia confocale.....	35
Figura 3.4	Distribuzioni di un test ideale.....	38
Figura 3.5	Distribuzioni di un test reale.....	38
Figura 3.6	Tabella di contingenza.....	39
Figura 3.7	Curva spezzata prima dello "smoothing".....	41
Figura 3.8	Curva ROC prima e dopo interpolazione ("smoothing").....	42
Figura 3.9	Tre esempi di curve: A) un test perfettamente discriminante; B) un test qualsiasi; C) un test completamente inutile.....	43
Figura 3.10	Immagine da microscopia confocale con tracciamento manuale dei nervi.....	45
Figura 3.11	Ground truth.....	46
Figura 3.12	Immagine acquisita con relative problematiche.....	47

Indice delle tabelle

Tabella 3. 1	Selezione del parametro Sigma x.....	47
Tabella 3. 2	Selezione del parametro Sigma y.....	48
Tabella 3. 3	Controllo del parametro Sigma x.....	49
Tabella 3. 4	Selezione del parametro Frequenza	50
Tabella 3. 5	Controllo dei parametri Sigma x e Sigma y.....	51
Tabella 3. 6	Valutazione del filtro sul data set completo.....	54

Introduzione

Scopo ed obiettivi

Questo lavoro di tesi tratta l'analisi automatica di immagini corneali prelevate con microscopi confocali, al fine di estrapolare parametri sulla morfologia e sulla distribuzione dei nervi corneali.

La cornea è lo strato più esterno dell'occhio umano, funge da lente concavo-convessa di elevato potere e ricopre dunque un ruolo fondamentale per quello che è il senso più sfruttato dagli uomini: la vista. Per le sue caratteristiche anatomiche e morfologiche risulta facilmente soggetta a lesioni e patologie le quali possano compromettere la visione e conseguentemente avere ripercussioni sulla qualità della vita quotidiana. Alcune malattie, infatti, portano a una grave disabilità visiva, altre vengono riscontrate quasi per caso in assenza di una sintomatologia invalidante, altre ancora sono implicate in episodi di dolore acuto ma senza provocare la perdita permanente della vista. Cambiamenti nella morfologia della cornea possono anche essere legati all'età, all'uso prolungato di lenti a contatto, a interventi chirurgici (quali ad esempio LASIK o PKR) o a trapianti di cornea. Molte sono le strutture che compongono la cornea (cheratociti, cellule endoteliali, nervi, ...) e che dunque possono essere sede di patologie o danni, in particolare in questa tesi si andrà a esaminare i nervi corneali.

Ad oggi i nervi corneali sono individuati tramite esami diagnostici che utilizzano la microscopia confocale. Tale tecnica permette di ottenere rapidamente e in maniera non invasiva immagini dei vari strati della cornea. Il limite di tale tecnica risiede nel fatto che, dopo l'acquisizione dell'immagine, i nervi vengano tracciati manualmente e i parametri successivamente estratti (ad esempio tortuosità, spessore, densità) abbiano un'elevata

possibilità d'errore dovuta alla soggettività dell'interpretazione, alla sensibilità ed all'esperienza del clinico che effettua tale valutazione.

Scopo del lavoro è sviluppare un algoritmo stabile ed automatico per il tracciamento dei nervi corneali. L'idea di fondo si basa sull'utilizzo dei filtri di Gabor: essi consentono un ampio ventaglio di combinazioni dei proprio parametri per meglio adattarsi alle esigenze di filtraggio e si riescono ad ottenere ottimi risultati con ridotte complessità computazionali.

Per il settaggio dei parametri sono utilizzate 92 immagini ottenute tramite microscopia confocale. Oltre a queste ne sono state impiegate altre 92 dove i nervi sono stati tracciati manualmente. Nel confronto tra le immagini, e dunque nella scelta dei parametri che implicano l'efficacia del filtro, si è applicato un algoritmo che consentisse l'analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Come primo passo si è scelta un'immagine campione e la si è confrontata con la stessa immagine in cui i nervi erano stati tracciati manualmente (ground truth). Su di essa sono stati provati diversi parametri valutando le performance. Successivamente si sono testati questi parametri su tutte le immagini del training set ed i loro relativi ground truth. L'analisi della curva ROC ha consentito di valutarne il comportamento in fase di testing. Le performance ottenute sono molto elevate: la media delle AUC è di 0,942 e quella delle accuratezze è di 0,88.

Outline della tesi

I capitoli saranno così suddivisi:

- Capitolo 1: descrizione dell'anatomia dell'occhio con particolare rilievo a quella della cornea. Approfondimento sui nervi corneali e sulle patologie che colpiscono tale distretto.
- Capitolo 2: breve introduzione ai principi dell'elaborazione delle immagini e presentazione dei filtri di Gabor sia con un approccio matematico che uno

illustrativo per rendere più immediata la comprensione del loro funzionamento.

- Capitolo 3: presentazione dello strumento utilizzato per l' acquisizione delle immagini e delle tecniche usate per il filtraggio, con attenzione all' analisi della curva R.O.C. e conseguente confronto con il tracciamento manuale dei nervi.
- Capitolo 4: discussione dei risultati ottenuti.

Capitolo 1

1. La cornea

1.1 Anatomia dell'occhio

L'occhio, o bulbo oculare, è l'organo di senso principale dell'apparato visivo. Ha il compito di ricavare informazioni sull'ambiente circostante attraverso la luce e di inviarle al cervello, sotto forma di segnali elettrici, dove vengono elaborate ed interpretate.

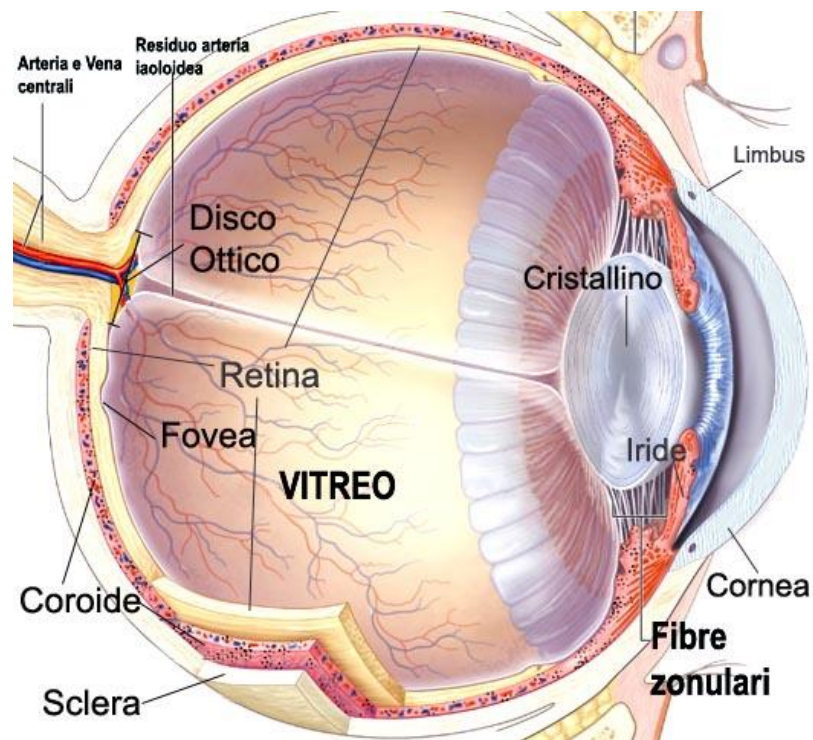


Figura1.1 Anatomia dell'occhio umano

Gli occhi umani sono due organi, posizionati nelle due cavità orbitarie del cranio. La superficie esterna di ciascun occhio è una sfera incompleta e opaca il cui diametro verticale misura 24mm e varia di soli 1-2mm tra diversi individui.

Da un punto di vista ottico, l'occhio è equivalente ad una comune macchina fotografica, in quanto è costituito da un sistema di lenti, da un sistema di apertura variabile (la

pupilla) e la retina, che corrisponde alla pellicola fotosensibile. Il sistema di lenti è costituito da quattro interfacce con potere di rifrazione: 1) l'interfaccia tra l'aria e la superficie anteriore della cornea, 2) l'interfaccia tra la superficie posteriore della cornea e l'umor acqueo, 3) l'interfaccia tra umor acqueo e superficie anteriore del cristallino e 4) l'interfaccia tra la superficie posteriore del cristallino e l'umor vitreo. L'indice di rifrazione è 1 per l'aria, 1,38 per la cornea, 1,33 per l'umor acqueo, 1,40 per il cristallino e 1,34 per l'umor vitreo. Così come una lente può mettere a fuoco un'immagine su un foglio di carta, così il sistema di lenti appena descritto può mettere a fuoco un'immagine sulla retina. Questa immagine è invertita e rovesciata rispetto all'oggetto reale. Tuttavia, il soggetto percepisce gli oggetti nella loro giusta orientazione poiché il cervello è abituato a considerare come normale tale posizione.

La luce, viaggiando attraverso l'occhio, incontra:

1. *LA CORNEA*: è una membrana trasparente convessa anteriormente e rappresenta la lente più potente del nostro apparato visivo. La funzione della cornea è quella di permettere il passaggio della luce verso le strutture interne dell'occhio, facendo convergere i raggi luminosi verso la fovea ma anche di proteggere da parte di abrasioni e patogeni le strutture poste più in profondità.
2. *L'UMOR ACQUEO*: è un liquido trasparente e salino che si trova tra la cornea e l'altra lente naturale del nostro occhio, il cristallino. Contribuisce alla messa a fuoco delle immagini ma principalmente fornisce nutrimento alla cornea ed al cristallino, inoltre mantiene costante la pressione interna dell'occhio.
3. *L'IRIDE*: è una membrana di colore variabile, con forma e funzione di diaframma, pigmentata, situata posteriormente alla cornea e davanti al cristallino. La principale funzione dell'iride è quella di regolare la quantità di luce che colpisce la retina.

4. *LA PUPILLA*: è il foro situato al centro dell'iride, di diametro variabile, che permette l'entrata della luce all'interno del bulbo oculare. Le sue dimensioni sono regolate, in base all'intensità luminosa ambientale, da un sistema di muscoli che dipendono dal sistema neurovegetativo
5. *IL CRISTALLINO*: Il cristallino è un organo trasparente. Insieme alla cornea, consente di mettere a fuoco i raggi luminosi sulla retina. Ha il compito specifico di variare la distanza focale del sistema ottico, cambiando la propria forma, per adattarlo alla distanza dell'oggetto da mettere a fuoco.
6. *L' UMOR VITREO*: è una massa gelatinosa, trasparente ed incolore. Funge da sostegno e protezione oltre a permettere il passaggio della luce verso la retina.
7. *LA RETINA*: è la membrana più interna del bulbo oculare. È la componente fondamentale per la visione essendo formata dalle cellule recettoriali, i coni e i bastoncelli, responsabili di trasformare l'energia luminosa in potenziale elettrico. Presenta uno spessore variabile da 0,4 mm in dietro e 0,1 in avanti. Nel complesso forma tutto il rivestimento interno del bulbo oculare, dal punto di entrata del nervo ottico al margine pupillare dell'iride.
8. *LA MACULA*: è la parte della retina preposta alla visione distinta e alla percezione dei dettagli. Si tratta della regione con più elevata densità di fotorecettori (in questo caso principalmente i coni), cellule nervose fotosensibili deputate alla trasformazione dell'energia luminosa in impulsi elettrici.
9. *LA FOVEA*: è un avvallamento e di forma circolare nella retina, di circa 1,5 mm di diametro. Qui c'è la massima concentrazione dei coni mentre sono del tutto assenti i bastoncelli.

10. *LA COROIDE*: è una lamina estremamente vascolarizzata e ha uno spessore di circa 300µm. L'elevata presenza di vasi sanguigni consente di apportare nutrimento al tessuto retinico e permette l'assorbimento della luce evitando la riflessione sulla retina.

11. *LA SCLERA*: è una membrana fibrosa ed opaca, formata da fibre di collagene e fibre elastiche. Le fibre le conferiscono il caratteristico colore bianco che si vede tra le palpebre. Ha una funzione sia strutturale che protettiva, consente l'inserzione dei muscoli cosiddetti estrinseci (che controllano il movimento degli occhi) e prosegue anteriormente con la cornea.

12. *IL NERVO OTTICO*: è il nervo che trasmette le informazioni visive dalla retina al cervello.

1.2 Struttura della cornea

La cornea rappresenta la parte anteriore della tunica fibrosa del bulbo oculare, della quale costituisce solo la sesta parte in quanto la porzione rimanente è formata dalla sclera. Le due strutture contigue sono intimamente connesse tra loro per una vera fusione di tessuti, ma la cornea possiede un raggio di curvatura inferiore per cui appare leggermente protrudente in avanti. Vista anteriormente ha una forma leggermente ellittica con il diametro maggiore orizzontale lungo 11,7 mm contro i 10,6 mm del diametro minore e un diametro variabile dal limbo dov'è più spessa (0,67 mm) alla porzione centrale e più anteriore, la più sottile (0,52 mm).

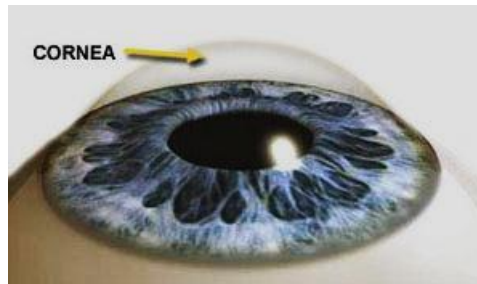


Figura1.2 La cornea

Posteriormente aderisce alla sclera presso la giunzione sclerocorneale formando un lieve solco detto limbo. La cornea è priva di vasi sanguigni; sostanze nutritive le pervengono dai vasi del limbus, rami delle arterie ciliari anteriori e dall'umore acqueo che giunge a contatto con la sua faccia posteriore. Anche i vasi linfatici mancano: sono invece presenti spazi interstiziali, comunicanti tra di loro, delimitati dalle lamelle corneali. Questi spazi comunicano con i corrispondenti spazi interstiziali della sclera e con i vasi linfatici della congiuntiva bulbare. La cornea è riccamente innervata da rami dei nervi ciliari.

La cornea è suddivisa in cinque strati successivi, dal più esterno al più interno sono:

- 1.** Epitelio corneale
- 2.** Lamina di Bowman
- 3.** Stroma o parenchima corneale
- 4.** Membrana di Descemet
- 5.** Endotelio

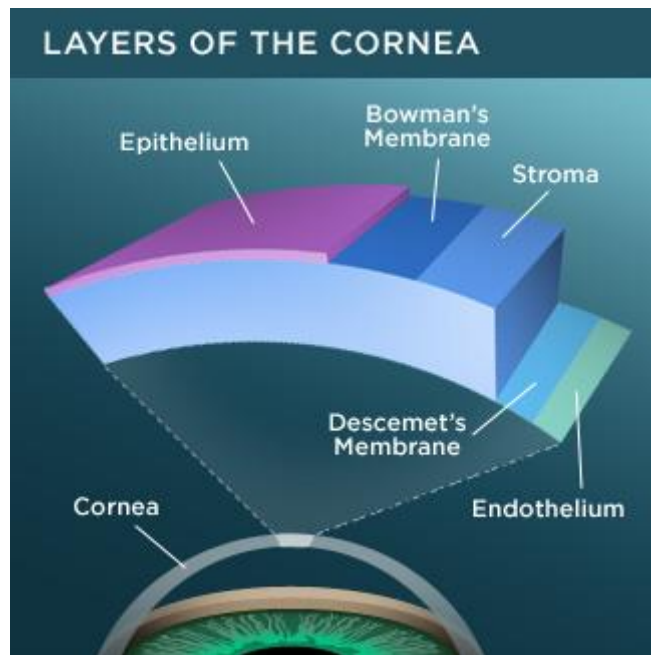


Figura1.3 Gli strati della cornea

Lo strato più superficiale della cornea è l'epitelio corneale, spesso circa 50 μm , cioè circa un decimo dello spessore totale della membrana. È un epitelio pluristratificato (5-6 strati), con cellule piatte nei primi due strati, poliedriche nei successivi due o tre e allungate, quasi cilindriche, negli ultimi due. Al microscopio appare basofilo, i nuclei sono allungati con l'asse maggiore orizzontale nelle cellule pavimentose, tondeggianti o ovalari nelle poliedriche e ovoidali con l'asse maggiore verticale nelle cilindriche. Le cellule, dalla forma otticamente perfetta, sono unite tra loro da giunzioni serrate e quelle più superficiali presentano numerosi microvilli visibili solo al microscopio elettronico.

Sotto l'epitelio corneale si trova lo strato di Bowman o membrana limitante anteriore. Al microscopio ha un aspetto amorfo ed eosinofilo, è priva di cellule, spessa circa 12 μm e formata da fibre collagene immerse in una matrice di proteoglicani.

Il terzo strato è lo stroma corneale, di 500 μm , forma il 75-90% dello spessore totale della cornea. Questo strato è costituito da circa 200 lamelle spesse appena 2 μm e

larghe da poche decine a qualche centinaio di micrometri, formate da fibre collagene di tipo I parallele tra loro. Le fibrille di due lamelle contigue formano tra loro un angolo ottuso. Tra una lamella e l'altra sono presenti dei caratteristici fibroblasti dalla forma dendritica, i cheratociti, che formano una sorta di rete e maglie larghe tra uno strato lamellare e il successivo. Lo spessore delle fibre collagene tende ad aumentare dalla zona centrale dirigendosi verso il limbo e l'età contribuisce all'ispessimento della cornea. Gli strati lamellari permettono il passaggio della luce perché le loro fibrille sono più piccole della lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica che le attraversa, inoltre sono precisamente distanziate tra loro e la dispersione è ridotta al minimo dato che le fibrille collagene determinano interferenza distruttiva in tutte le direzioni, tranne in quella anteriore.

Il quarto strato è la membrana del Descemet o membrana limitante posteriore, con uno spessore variabile di 4-12 μm , tende a ispessirsi proporzionalmente all'età. Ha carattere più basofilo della membrana limitante anteriore, ma appare anch'essa amorfa e priva di cellule; talvolta è considerata la membrana basale dell'endotelio corneale. È dotata di elevata elasticità, anche se non presenta fibre elastiche. Sia la sua superficie anteriore che quella posteriore sono scarsamente aderenti rispettivamente allo stroma e all'endotelio.

L'endotelio corneale è il quinto e più profondo strato della cornea. Si tratta di un singolo strato di cellule piatte e dalla forma esagonale, con nuclei allungati orizzontalmente. Le sue cellule sono strettamente adese tra loro grazie a interdigitazioni che si dipartono dalle porzioni laterali delle loro membrane plasmatiche, coadiuvate da giunzioni serrate e giunzioni comunicanti. Il loro citoplasma è basofilo a causa dello sviluppo del reticolo endoplasmatico rugoso, possiedono inoltre numerosi mitocondri, risultano cellule ad alta attività metabolica. Il suo compito è essenzialmente quello di fungere da filtro posteriore per gli strati superiori della cornea, è inoltre il principale responsabile della sua idratazione. Le sue cellule hanno una modesta capacità mitotica. La cornea è innervata da piccoli rami mielinizzati del nervo oftalmico che in parte formano un plesso profondo sopra l'endotelio, in parte attraversano l'endotelio corneale e si proiettano

perpendicolarmente nello stroma per poi formare un plesso (sottoepiteliale) al di sotto dell'epitelio corneale. Un ultimo plesso sottobasale è costituito da quei piccoli nervi che attraversano la membrana limitante anteriore e si proiettano come terminazioni nervose libere tra le cellule epiteliali; tali assoni presentano caratteristiche espansioni tondeggianti. A partire dall'entrata nello stroma le sottili terminazioni nervose diventano amieliniche. I nervi della cornea sono responsabili dei riflessi dell'ammiccamento e della lacrimazione.

1.3 Ruolo della cornea

La cornea si comporta come una lente convesso-concava di elevato potere. Tale precipua funzione ottica viene espletata grazie alla sua perfetta trasparenza ed alla regolarità della superficie di contatto con l'aria. Infatti il film lacrimale che ricopre l'epitelio, rugoso per la presenza nello strato esterno di un intreccio di micropliche, lo rende liscio, uniforme e di elevate qualità ottiche. La trasparenza è la proprietà fondamentale della cornea. Essa è resa possibile dall'assoluta avascolarità di questa membrana, dalle caratteristiche strutturali dello stroma e da alcuni indispensabili meccanismi fisiologici che assicurano il ricambio idrico e ne impediscono l'imbibizione. Ha inoltre una funzione protettiva da parte di abrasioni e patogeni nei confronti delle strutture poste più in profondità. L'occhio infatti è esposto a traumi ed infezioni e la cornea funge da barriera fisica per proteggerlo da agenti esterni e filtra i raggi ultravioletti della luce solare più dannosi, che altrimenti danneggerebbero il cristallino e la retina. La cornea ha inoltre la funzione di imprimere alle radiazioni luminose che raggiungono l'occhio la convergenza necessaria ad essere deviate sul cristallino e messe a fuoco successivamente sulla retina.

1.4 Nervi corneali e patologie

La cornea è uno dei tessuti più sensibili del nostro corpo poiché è ricca di fibre nervose sensoriali. I nervi corneali derivano dai lunghi nervi ciliari, i quali a loro volta derivano dal ramo oftalmico del trigemino. A livello del limbus sclerocorneale, le fibre nervose provenienti dai nervi ciliari lunghi sono disposte in un plesso circolare dal quale originano altre fibre. Queste fibre scorrono radialmente con diversi anastomosi all'interno dello stroma posteriore, formando il plesso profondo della cornea. Le sottili fibre nervose originate da questo plesso, formano il plesso nervoso subbasale che si estendono superficialmente consentendo l'innervazione allo stroma di cellule basali epiteliali; terminando all'interno dello strato superficiale epiteliale. La maggior parte delle fibre nervose corneali di origine sensoriale, sono derivate dal ramo oftalmico del trigemino. Tuttavia, in alcuni casi la cornea inferiore riceve alcune delle sue innervazioni dal ramo mascellare del trigemino. Tutte le cornee dei mammiferi ricevono anche innervazioni simpatiche dal ganglio cervicale superiore. La maggior parte delle fibre nervose degli esseri umani, si trovano nel terzo anteriore dello stroma, si spostano dalla periferia verso il centro a causa dell'organizzazione delle lamelle di collagene. A livello dello stroma si possono trovare anche lamelle immerse in una sostanza fondamentale e cheratociti. La sostanza fondamentale è formata da mucopolisaccaridi, mentre i cheratociti sono cellule appiattite simili ai fibroblasti. I cheratociti sono spesso localizzati in prossimità delle fibre nervose e a volte avvolgono le fibre nervose adiacenti con estensioni citoplasmatiche. Contatti fisici tra nervi e cheratociti si osservano più frequentemente in cornee di pazienti affetti da cheratocono. Nella cornea umana, i nervi penetrano nello strato di Bowman attraverso la cornea centrale e periferica. Dopo averlo attraversato i grandi fasci nervosi si dividono in fasci più piccoli. Ogni piccolo fascio quindi si estende parallelamente alla superficie corneale, tra lo strato di Bowman e le cellule basali dello strato epiteliale.

La cornea è esposta a traumi e può essere graffiata persino dalle ciglia. Eventuali cicatrici sulla sua superficie provocano un'opacità della stessa, detta leucoma, di gravità proporzionale alla gravità della lesione. Una cicatrice di piccole dimensioni sulla cornea

si definisce nubecola. In base alla sede della cicatrice sulla cornea, si ha una riduzione dell'acuità visiva più o meno grave (più è centrale, più è grave).

Le patologie che riguardano la cornea possono essere:

- Infiammatorie (cheartiti)
- Ectasiche (cheratocono , cheratogloba, degenerazione marginale pellucida)
- Degenerative (legate ad età o uso prolungato di lenti a contatto)
- Anomalie congenite
- Legate a malattie sistemiche
- Conseguenza di interventi chirurgici (ad esempio LASIK o PRK o trapianto)

Alcune di queste patologie vanno ad inficiare la morfologia dei nervi corneali, da qui la necessità di un algoritmo stabile per la determinazione delle loro caratteristiche.

Capitolo 2

2. Elaborazione di immagini

2.1 Principi generali

Un'immagine è generalmente definita come una funzione bidimensionale $f(x,y)$ da \mathbb{R}^2 in \mathbb{R} , ove x e y rappresentano le coordinate spaziali e l'ampiezza di f in ogni coppia di coordinate è l'intensità o livello di grigio dell'immagine in quel determinato punto. Realisticamente si può supporre che l'immagine sia definita solo su un rettangolo di dimensioni finite, ovvero la grandezza dell'immagine:

$$f: [a,b] \times [c,d] \rightarrow [0,1]$$

Quando x , y e f sono quantità discrete l'immagine si dice digitale.

Le immagini biomediche sono originate da una distribuzione spaziale in un piano incidente di energia radiante prodotta da una sorgente luminosa ed indicata con :

$$f(x,y,\lambda,t) \in \mathbb{R}$$

per natura f è finita e ≥ 0 , è limitata rispetto alle variabili x , y , t , cioè è osservabile su un'area finita in un intervallo finito. L'immagine effettivamente percepita da un osservatore o acquisita da un trasduttore è la f modificata dalla risposta dell'osservatore o trasduttore, che tipicamente effettuano una media temporale ed una media rispetto alle lunghezze d'onda. Da cui si evince come l'immagine possa essere rappresentata come funzione bidimensionale. Inoltre si comprende come un'immagine nel diventare digitale venga campionata (discretizzazione delle variabili spaziali) e quantizzata (discretizzazione delle ampiezze), dunque essa rappresenta solo un'approssimazione della realtà.

Un' immagine può dunque essere rappresentata in forma matriciale come segue:

$$f(i, j) = \begin{pmatrix} f(0,0) & f(0,1) & f(0,2) & \dots & f(0,M-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & f(1,2) & \dots & f(1,M-1) \\ f(2,0) & f(2,1) & f(2,2) & \dots & f(2,M-1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ f(N-1,0) & f(N-1,1) & f(N-1,2) & \dots & f(N-1,M-1) \end{pmatrix}$$

**Elemento dell' immagine
PIXEL**

M e N sono rispettivamente il numero di righe e di colonne, entrambi numeri interi positivi.

Grazie a tale rappresentazione si possono applicare tecniche di elaborazione numerica atte a migliorare l' immagine, il cui obiettivo è quello di rendere l' immagine più utile e comprensibile per l' applicazione specifica. In primis è possibile ridurre gli artefatti dovuti all'acquisizione della stessa (rumore di fondo, rumore introdotto dallo strumento d'acquisizione), migliorare luminosità, nitidezza e contrasto per facilitarne la lettura ed infine si possono mettere in evidenza ed estrarre solo alcuni oggetti in presenti, come in questo lavoro.

Nel lavoro svolto si mostrerà un metodo di filtraggio finalizzato al riconoscimento automatico ed alla messa in evidenza dei nervi corneali per rendere la loro identificazione

svincolata dall' interpretazione del clinico. Nel prossimo paragrafo si mostreranno brevemente i principali metodi di filtraggio ed in quello successivo il metodo adottato.

2.2 Filtri bidimensionali

E' possibile approcciare il problema del filtraggio di un' immagine secondo due differenti vie: nel dominio del tempo e nel dominio della frequenza.

Nel primo caso le tecniche si basano sulla manipolazione diretta dei pixel dell' immagine:

$$g(x,y)=T[f(x,y)]$$

ove $f(x,y)$ è l' immagine di partenza, $g(x,y)$ è l'immagine elaborata e T è una trasformazione che opera uno, più o tutti i pixel di $f(x,y)$. Le trasformazioni T possono essere classificate per tipo di operatore ed estensione dell' area coinvolta e si definiscono: operatori puntali, operatori locali, operatori globali. Oppure per numero di immagini su cui operano : operatori unari o duali. Oppure per modalità di interazione: operatori automatici o interattivi. Tali operatori vengono chiamati filtri di convoluzione.

Nel secondo caso, invece, le modifiche all' immagine vengono apportate tramite trasformata di Fourier.

Il filtraggio di un'immagine può essere finalizzato ad un miglioramento globale della stessa (riduzione del rumore, aumento della messa a fuoco, normalizzazione dell' istogramma) oppure, come nel nostro caso, a mettere in risalto solo alcuni dettagli estrapolandoli da tutto ciò che non è di interesse. Quello che si vuole ottenere è un' immagine dove i nervi risultano evidenti e ben delineati rispetto a quello che viene definito sfondo.

I nervi possono essere considerati dei contorni in accordo con la definizione: un contorno può essere definito come un insieme di punti caratterizzati dalla massima variazione di luminosità nella direzione perpendicolare alla tangente in ogni punto dello stesso contorno.

2.3 Filtri Gabor

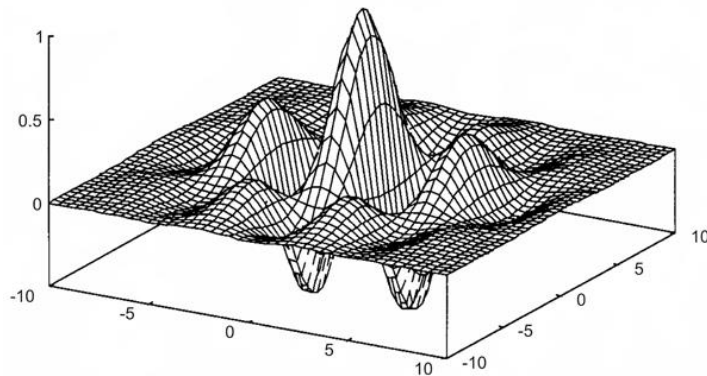


Figura 2.1 Filtro di Gabor tridimensionale

In accordo con quanto detto sopra e per le loro specifiche proprietà, che verranno di seguito descritte, si è scelto di utilizzare i filtri di Gabor. Essi sono dei filtri lineari la cui risposta all'impulso è definita da una funzione armonica moltiplicata per una funzione Gaussiana. In forza del teorema di convoluzione la trasformata di Fourier della risposta all'impulso di un filtro di Gabor risulta essere la convoluzione fra la trasformata di Fourier della funzione armonica e la trasformata di Fourier della funzione Gaussiana.

$$g(x, y; \lambda, \theta, \psi, \sigma, \gamma) = \exp\left(-\frac{x'^2 + \gamma^2 y'^2}{2\sigma^2}\right) \cos\left(2\pi\frac{x'}{\lambda} + \psi\right)$$

Dove:

$$x' = x \cos \theta + y \sin \theta \quad y' = -x \sin \theta + y \cos \theta$$

In questa equazione: λ rappresenta la lunghezza d'onda del fattore coseno, θ l'orientazione del filtro, ψ è la fase del fattore coseno, σ è la varianza della Gaussiana che regola l'involuppo, γ specifica l'ellitticità del supporto della funzione di Gabor. Questi parametri sono determinati empiricamente e da essi dipende la capacità del filtro di determinare le strutture di nostro interesse.

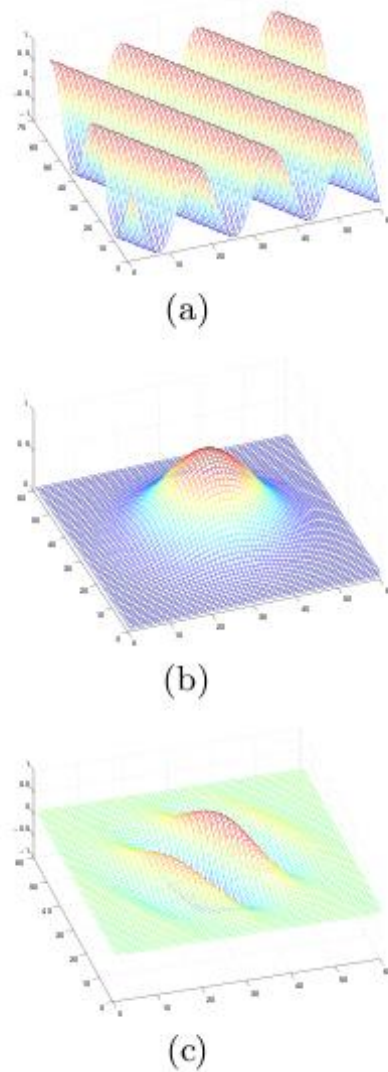


Figura 2.2 Scomposizione del filtro di Gabor: (a) sinusoidale 3D; (b) Gaussiana 3D; (c) convoluzione delle precedenti

La Figura 2.2 vuole essere una rappresentazione della formula matematica del filtro. Si ha infatti, una sinusoidale con orientazione generica rispetto all' asse x, il kernel gaussiano ed infine il risultato della loro convoluzione ovvero il filtro di Gabor.

Il pregio di questi filtri risiede nel fatto che è possibile variare la lunghezza, la larghezza e l'orientazione dell'area di interesse. E' possibile scegliere la varianza sia lungo l'asse delle ascisse che lungo quello delle ordinate, proprietà fondamentali per estrapolare forme dai contorni non perfettamente netti come quelle presenti nelle immagini da studiare. In

relazione all'analisi dei nervi corneali ciò risulta molto importante in quanto tali strutture possono variare la loro lunghezza e la loro orientazione e c'è bisogno di un filtro che asseconi tali variazioni. Per questo la scelta dei parametri risulterà fondamentale e verrà descritta nel dettaglio nel prossimo capitolo.

Nel seguente paragrafo invece verranno mostrate alcune implementazioni del filtro per comprenderne meglio la struttura.

2.4 Esempi

Prendiamo ora in esame alcuni esempi per comprendere il significato del filtro e il razionale che ha condotto alla scelta dei parametri.

Gli elementi su cui si può operare sono: varianza lungo l'asse x, varianza lungo l'asse y (determinano la forma della gaussiana), frequenza della funzione sinusoidale e numero di rotazioni. Partiamo dal caso più semplice in cui si ha un' unica rotazione, la frequenza è unitaria e le due varianze sono uguali. Il risultato è un filtro circolare, altro non è se non un filtro Gaussiano, mostrato di seguito.

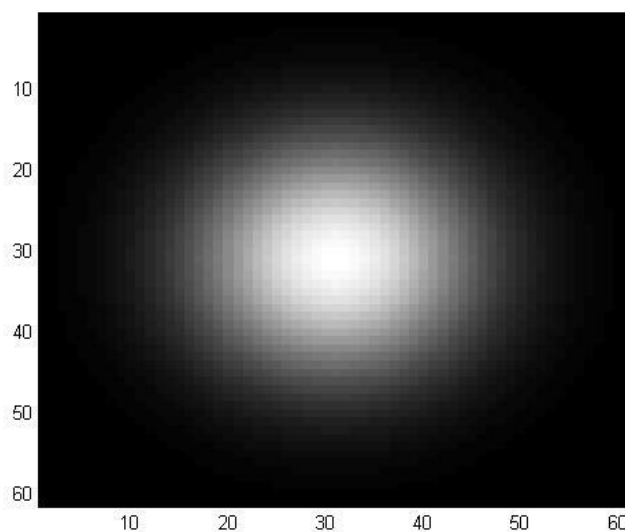


Figura 2.3 Filtro di Gabor a frequenza unitaria e varianze uguali

Come si può evincere dalla Figura 2.3, un filtro siffatto risulta poco utile al nostro scopo in quanto le strutture di nostro interesse sono più simili a delle linee che non a dei cerchi.

Un ulteriore passo è attribuire ad una delle due varianze valore unitario e all' altra uno sensibilmente superiore.

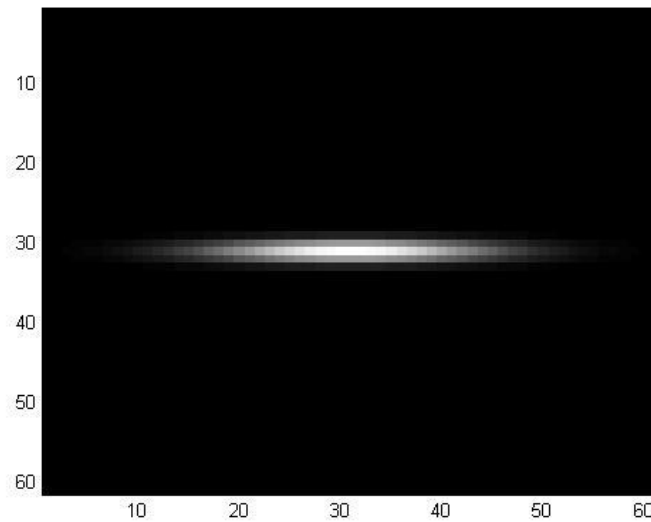


Figura 2.4 Filtro di Gabor a frequenza unitaria; σ_y molto maggiore di σ_x

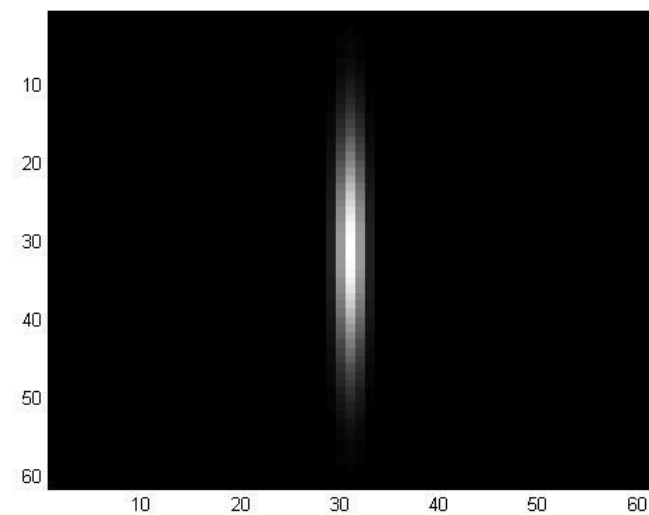


Figura 2.5 Filtro di Gabor a frequenza unitaria; σ_x molto maggiore di σ_y

Nelle due figure riportate nella pagina accanto si può vedere come il filtro così costruito risulti particolarmente selettivo per strutture lineari. Nel caso in esame risulterebbe troppo selettivo infatti, porterebbe buoni risultati nel caso di nervi sottili e lunghi ma al contempo sarebbe poco utile se nell'immagine fossero presenti nervi di maggior spessore e corti. Questi infatti non verrebbero enfatizzati, anzi verrebbero attenuati perché assimilati a sfondo o a rumore.

Di seguito un filtro ove le due varianze sono state settate circa l'una metà dell'altra, da qui la forma ellittica. Si evince come più le varianze tendano ad un valore uguale più il filtro avrà una forma quasi circolare. Per i motivi precedentemente esposti un filtro siffatto risulta poco utile ai nostri fini.

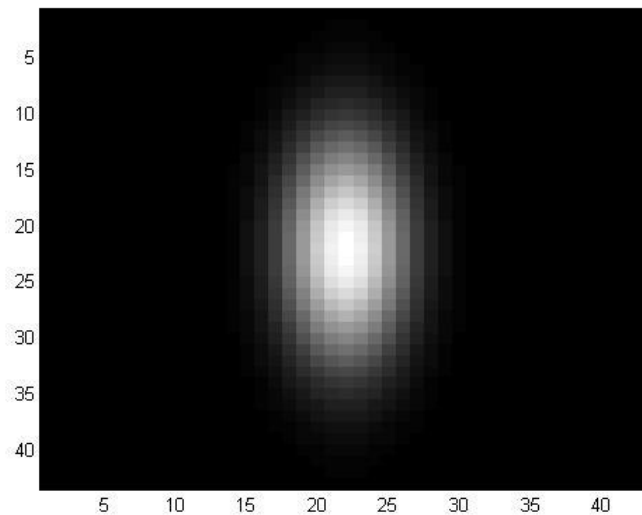


Figura 2.6 Filtro di Gabor a frequenza unitaria; σ_x circa il doppio di σ_y

Sul filtro di cui si è appena discusso andiamo a variare la frequenza, sotto è riportato ciò che ne risulta. Un filtro che sembrava poco utile risulta ora sfruttabile per i nostri scopi, da qui si comprende come tali tre parametri siano strettamente connessi tra loro e la loro scelta si fondamentale.

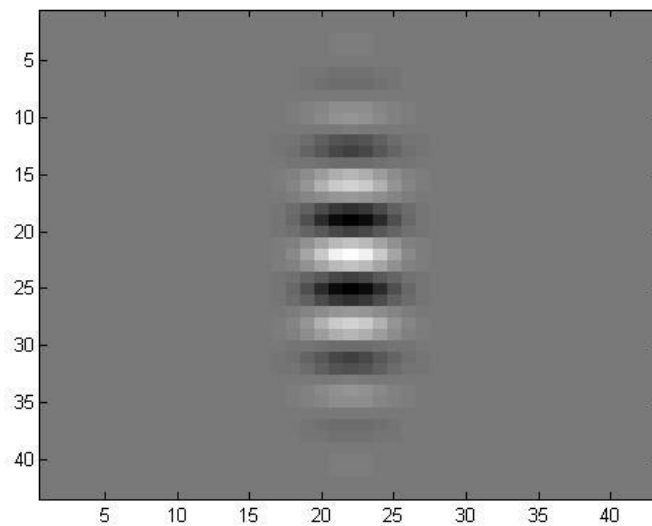


Figura 2.7 Filtro di Gabor a frequenza non unitaria; σ_x circa il doppio di σ_y

Ultimo parametro da prendere in considerazione è il numero di rotazioni. Per capire come esso influenzi il filtraggio si riporta un esempio ove ad un semplice immagine è stato applicato un filtro ruotato di 180° e di 90° . E' immediato vedere come nel primo caso siano evidenziate unicamente le strutture orizzontali mentre nel secondo quelle verticali, tutto il resto risulta sfocato perché non di interesse.

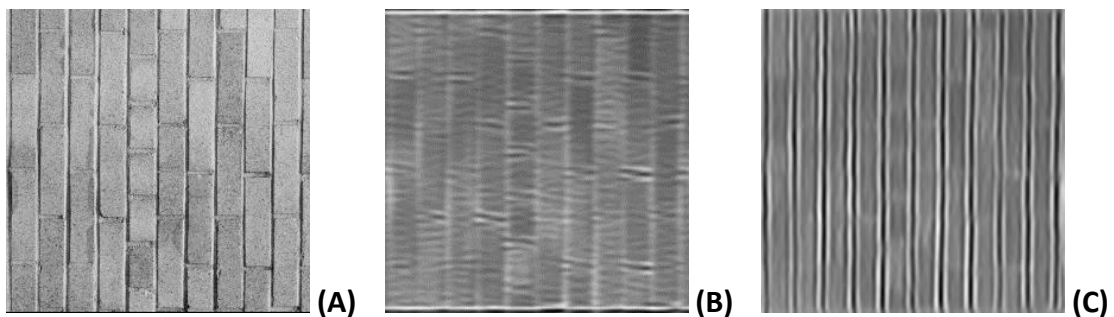


Figura 2.8 Effetto sul filtraggio dipendentemente dalle rotazioni: (A) immagine originale; (B) filtro orientato a 180° ; (C) filtro orientato a 90°

Capitolo 3

3. Detection dei nervi corneali

3.1 Microscopia confocale

La microscopia confocale è un esame diagnostico di ultima generazione che si esegue senza nessun fastidio per il paziente e consente di visualizzare immagini di tutti gli strati corneali ingrandite di 1000 volte. In questo modo è possibile distinguere le singole cellule, i nervi e le altre componenti del tessuto corneale normale e patologico. E' possibile studiare in vivo anche il limbus sclero corneale, sede delle cellule staminali e l'intera superficie oculare. L'esame va richiesto in tutti quei casi in cui si ha bisogno di informazioni approfondite circa lo stato di salute dei singoli strati corneali e della superficie oculare, pertanto è indicato nello studio di tutte le patologie corneali acute e croniche. Le indicazioni più frequenti riguardano *il cheratocono, le distrofie corneali, la cheratite erpetica, la cheratite da adenovirus, l'occhio secco, le ulcere corneali, lo scompenso corneale, il trapianto di cornea e di cellule staminali.*

Il microscopio confocale (i cui principi risalgono al 1957 ad opera di Marvin Minsky) è un microscopio ottico, uno strumento scientifico che si basa su una tecnologia volta ad accrescere sensibilmente la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato. Lo strumento opera nel campo convenzionale degli ingrandimenti della normale microscopia ottica, ed è schematicamente costituito da un normale microscopio a trasmissione a cui viene sovrapposto un apparato che si occupa di illuminare e rilevare l'immagine di un campione illuminato con una scansione punto a punto.

Esistono diverse tecniche per ottenere questo risultato: a disco rotante (*Nipkow disk*), Programmable Array Microscopes (PAM), e laser. Quest'ultimo tipo, il più diffuso e denominato CLSM, acronimo di *Confocal Laser Scanning Microscope*, è un evoluto microscopio a fluorescenza che permette di focalizzare con estrema precisione un laser sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo.

La sua sorgente luminosa è costituita da uno o più laser, generalmente a semiconduttore, per ogni diversa frequenza di eccitazione richiesta. Il meccanismo di direzione del fascio luminoso viene gestito da sistemi computerizzati. Le immagini ottenute, sincronizzando col fascio di eccitazione il dispositivo di rivelazione, sono particolarmente definite e spettacolari, e possono permettere di evidenziare con differenti colori le diverse molecole presenti nel preparato, permettendo di apprezzarne la tridimensionalità.

3.1.1 Principio di funzionamento

Il metodo di formazione dell'immagine in un microscopio confocale differisce da quello di un microscopio convenzionale per il fatto che, mentre nel secondo il fascio di illuminazione investe l'intero campione e forma istantaneamente l'immagine sul rivelatore, nel primo la luce proveniente dalla sorgente illumina l'oggetto in un solo punto per volta ed è necessaria una scansione per formare l'immagine finale. L'uso di questa tecnica permette di raggiungere risoluzioni assiali molto ridotte. Per tale motivo un'immagine così ottenuta viene comunemente chiamata "sezione ottica", in riferimento al fatto che è possibile indagare il campione nelle tre dimensioni spaziali con un metodo non invasivo.

In microscopia confocale lo spot di luce puntiforme è prodotto da un pinhole posto davanti alla sorgente, ossia in sostituzione del diaframma di campo, che risulta così fisso e molto ridotto. La luce viene poi focalizzata dal collettore e dal condensatore (o dall'obiettivo, nel caso di configurazione in luce riflessa) sul campione, per poi essere raccolta dall'obiettivo e dall'eventuale oculare e focalizzata su un secondo pinhole. In corrispondenza di questo è presente anche il rivelatore d'immagine, che produce un segnale proporzionale all'intensità della luce che lo colpisce.

Il pinhole di illuminazione e quello di rivelazione appartengono a piani focali coniugati e si dicono dunque *confocali*, da cui il nome di questa particolare tecnica microscopica.

La quasi totalità dei sistemi confocali moderni utilizza la configurazione in luce riflessa, che, come anticipato da Minsky stesso, aumenta la simmetria e la risoluzione del sistema a spese della luminosità, che si riduce per la presenza dello specchio dicroico o del beam-splitter.

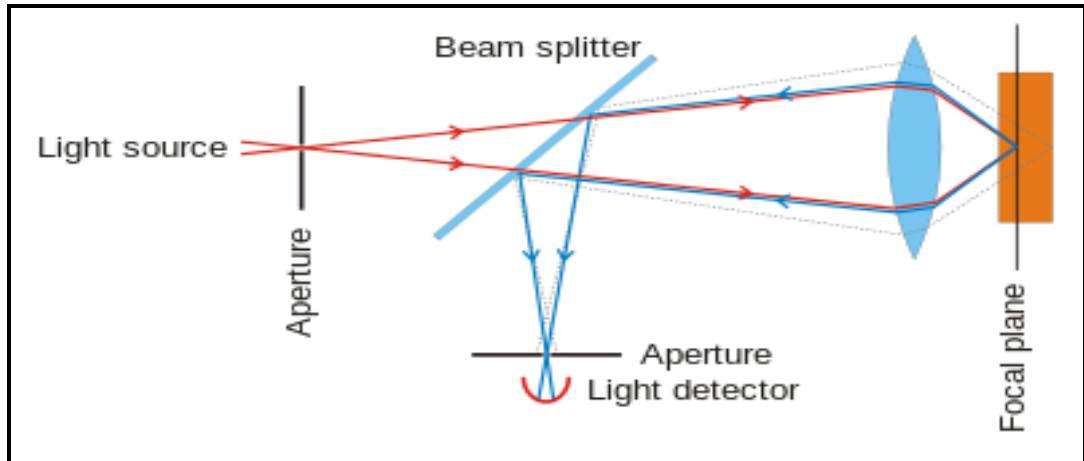


Figura 3.1 Struttura schematica di un microscopio confocale in riflessione

3.1.2 Microscopia confocale corneale

L'esame di microscopia confocale corneale è molto semplice e veloce. Tra la lente dello strumento e la cornea si interpone un gel trasparente. La lente dello strumento viene fatta avanzare dall'operatore tramite un joystick fintanto che viene visualizzato lo strato più esterno della cornea, l'acquisizione dell'immagine ha inizio quando l'obiettivo della lente è posizionato sulla parte apicale della cornea. Il fascio di luce va a colpire la cornea attraversando solo metà lente e la maggior parte della luce è convogliata nel punto focale della stessa. Al fine di minimizzare la dispersione della luce, viene illuminata unicamente una piccola parte della cornea tramite un pinhole (una piccola fessura). La bassa percentuale di luce riflessa, che è comunque presente, attraversa la seconda metà della lente ed un secondo pinhole, con le stesse dimensioni del setup ottico della prima. L'immagine che se ne ottiene viene proiettata in una telecamera ad alta sensibilità e

visualizzata sul monitor. Attraverso questa soluzione ottica tutta la luce che risulta provenire da zone fuori fuoco viene eliminata attraverso la seconda fessura: solo ciò che viene colpito direttamente viene visualizzato. Al fine di poter esaminare una vasta area i pinhole sono in movimento e possono così scannerizzare tutta la cornea. Il microscopio confocale registra una sequenza di immagini della cornea del paziente partendo dalla camera anteriore e muovendosi a ritroso attraversando tutti gli strati della cornea. Tale movimento di avanzamento e retrocessione consente di visionare l'intera cornea. Le immagini che vengono acquisite hanno lo spessore di pochi μm e dimensioni di circa $460 \times 350 \mu\text{m}$.

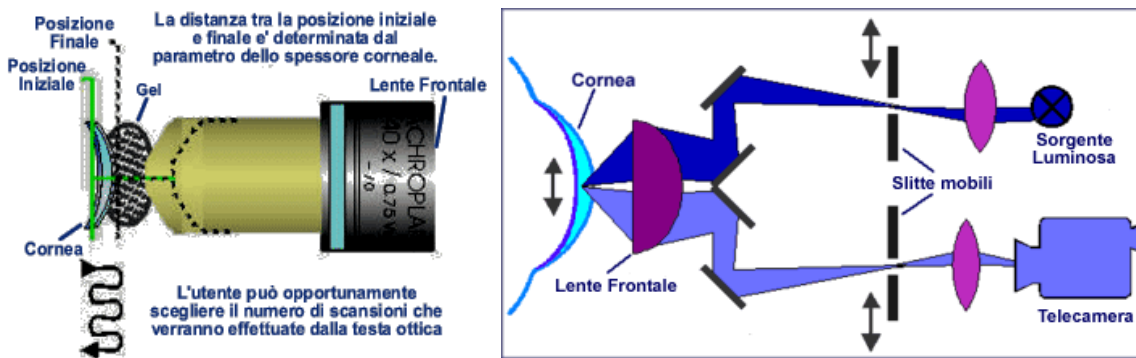


Figura 3.2 Microscopia confocale corneale

Ad ogni immagine è associata una posizione nello spazio (z). La distanza tra le varie acquisizioni varia a seconda dei parametri selezionati per l'esame, tipicamente varia tra i 2 e gli 8 μm . Un aspetto molto importante della microscopia confocale è la sua profondità di campo, mantenendola piccola (pochi μm) si rende lo strumento particolarmente adatto agli studi anatomici della cornea. Una modesta profondità di campo consente una migliore qualità dell'immagine ed un miglior posizionamento di tutte le strutture corneali lungo l'asse z. Per aumentare la stabilità dell'immagine e per avere una collocazione più precisa lungo l'asse z, le immagini possono essere acquisite sfruttando lo "Z-Ring System", un sensore di posizione che è a diretto contatto con l'occhio. Il microscopio confocale può mostrare i diversi strati delle trasparenti strutture organiche ed i tessuti della cornea con

elevato ingrandimento. In media l' esame dura circa 2 minuti ed il tempo di acquisizione delle immagini dai 30 ai 60 secondi.

In Figura 3.3 sono riportate alcune immagine significative degli strati corneali, è evidente come la microscopia confocale riesca a sezionare con buona precisione i sottilissimi strati che compongono la regione anatomica alla base di questo lavoro.

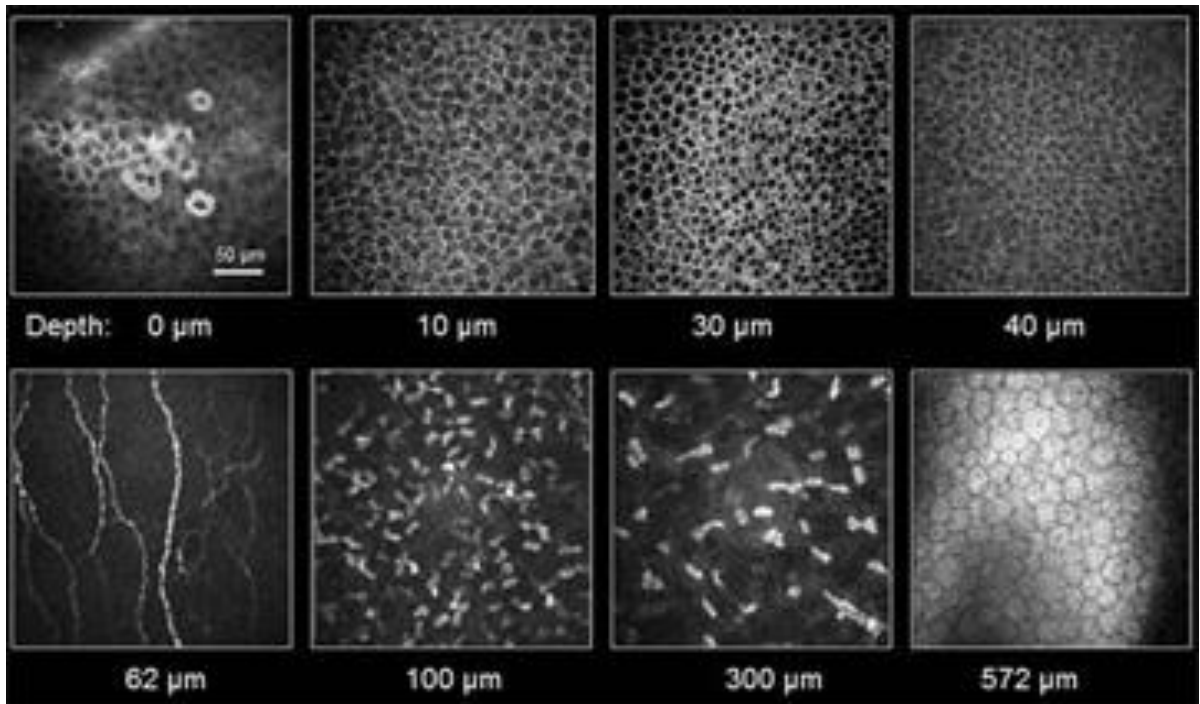


Figura 3.3 Immagini da microscopia confocale

Nella precedente figura, partendo dalla prima immagine in alto a destra, si possono vedere: i dettagli dell' epitelio (prime quattro) il cui spessore è pari a circa 55 μ , il plesso nervoso subepiteliale, lo stroma superficiale (più densamente popolato di cheratociti) e profondo ed infine il mosaico endoteliale.

3.2 Costruzione del banco di filtri

Il lavoro svolto è finalizzato al miglioramento di immagini corneali provenienti da microscopia confocale con l'intento di mettere in evidenza le strutture nervose in essa presenti e conseguentemente trarre informazioni sulla loro morfologia e densità per poter fornire dati di interesse clinico. Per raggiungere questo obiettivo si sono elaborate le suddette immagini con i filtri di Gabor, tali filtri sono stati costruiti ad hoc selezionando accuratamente i parametri. Per quanto concerne la loro descrizione matematica la si è già vista nel capitolo precedente mentre ora ci si focalizzerà sulla scelta dei parametri per cui si è deciso di sfruttare il metodo della ROC analisi, il quale consente, tramite un particolare algoritmo, di valutare l'efficacia di un test e dunque la bontà delle scelte fatte. La ROC analisi verrà trattata con maggior approfondimento nel prossimo paragrafo.

Il materiale a nostra disposizione consta di: un data set di 92 immagini da microscopia confocale in formato jpg, le stesse 92 immagini con tracciato l'andamento dei nervi corneali ad opera di clinici esperti. Per elaborare l'immagine si è utilizzato l'ambiente di lavoro matLab per la possibilità che offre di operare agevolmente su matrici di grandi dimensioni, quali sono le immagini in formato digitale.

Si è partiti implementando in codice matLab il filtro di Gabor, migliorandone le prestazioni e diminuendo il costo computazionale. A tal proposito un primo parametro che è stato impostato riguarda il numero di rotazioni che compie il filtro. Queste sono una delle cause principali dell'aumento del tempo necessario per portare a compimento il filtraggio. Si è determinato che un'ottimo compromesso tra velocità di esecuzione e bontà del filtraggio è ottenibile con 24 rotazioni. Una nota che riguarda l'implementazione, data la simmetria del filtro le rotazioni vengono conteggiate solo tra 0° e 180° consentendo che vengano comunque coperti tutti i 360° .

3.2.1 Scelta dei parametri: ROC analisi

In tutti i campi della scienza vengono sistematicamente messe a punto e utilizzate procedure più o meno complesse e della più svariata natura, ma sempre ben codificate, allo scopo di verificare un'ipotesi. Tali procedure sono comunemente dette "test". In

particolare, in epidemiologia, i test rappresentano lo strumento di base nelle operazioni di screening, eseguite cioè su popolazioni presumibilmente sane (e nelle quali la prevalenza della malattia in studio è ignota) allo scopo di identificare precocemente la presenza di malattie. Anche nell'attività diagnostica di routine i test rappresentano gli elementi fondamentali, e spesso determinanti, nel processo decisionale volto a confermare (o escludere) la presenza di una determinata patologia già sospettata in base a dati clinici.

In base alla tipologia di responso fornito, i test possono essere classificati in due categorie:

- *Qualitativi*: restituiscono un output (risposta) dicotomico (ad es. positivo/negativo, vero/falso, etc)
- *Quantitativi*: producono risultati sotto forma di variabili numeriche discrete o continue

Per i primi, l'ottenimento di risultati affidabili è subordinato alla condizione che il parametro misurato possieda una distribuzione approssimativamente unimodale sia nella classe dei soggetti sani che in quella degli ammalati, ovviamente con medie differenti per ciascuna classe. Tale ipotesi di distribuzione viene detta "bi-normale".

Per i secondi invece, siano essi discreti o continui, occorre individuare sulla scala di lettura un valore soglia (*cut-off*) che discrimini i risultati da dichiarare positivi da quelli negativi. Ciò consente di categorizzare in 2 classi, positivi e negativi, la gamma di tutti i possibili risultati e di equiparare l'interpretazione di un test quantitativo a quella di un test qualitativo.

Il problema di base che genera incertezza nell'interpretazione di un test risiede nel fatto che, nella grande maggioranza dei casi, esiste una zona di sovrapposizione fra le distribuzioni dei risultati del test medesimo applicato in popolazioni di soggetti rispettivamente sani e ammalati. Infatti, se le due popolazioni restituissero valori separati allora sarebbe facile individuare sull'asse delle ascisse il valore di cut-off capace di discriminare con precisione assoluta le due popolazioni.

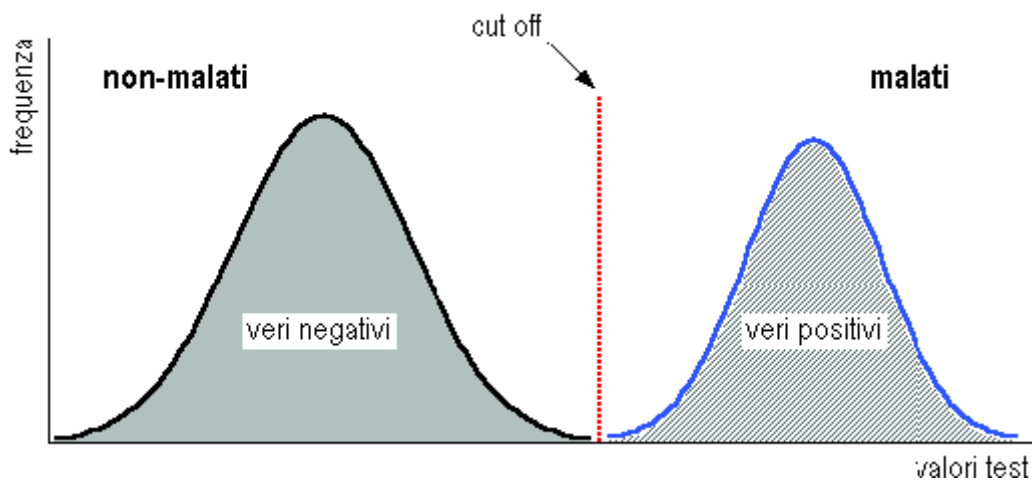


Figura 3.4 Distribuzioni di un test ideale

Purtroppo , invece, nella pratica si verifica sempre una sovrapposizione più o meno ampia delle due distribuzioni ed è perciò impossibile individuare sull' asse delle ascisse un valore di cut off che consenta una classificazione perfetta, ossia tale da azzerare sia i falsi positivi che i falsi negativi.

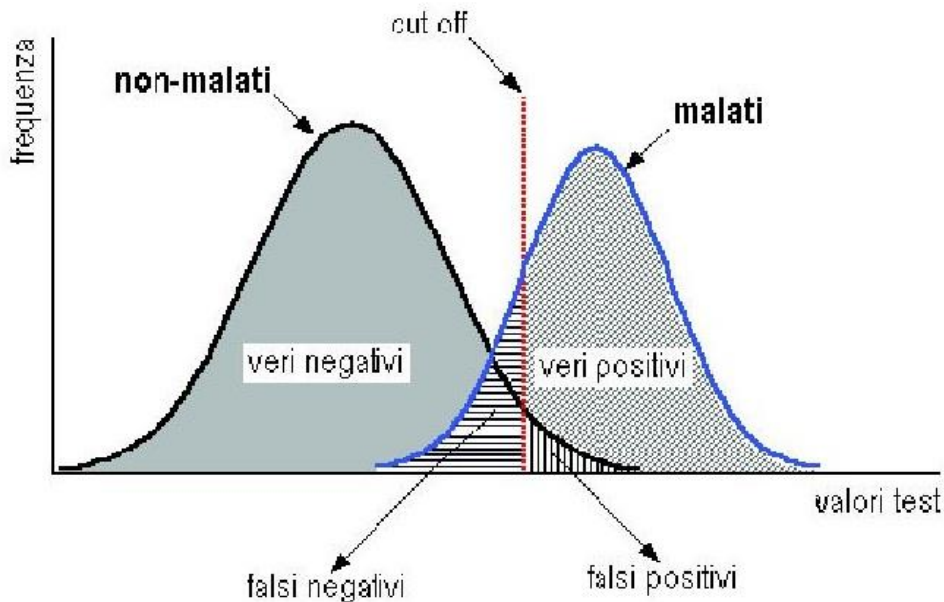


Figura 3.5 Distribuzioni di un test reale

Diamo ora alcune definizioni utili a comprendere l'analisi delle curve ROC.

Si consideri un problema di predizione a 2 classi (classificatore binario). L'insieme dei dati da classificare è suddiviso in due classi possiamo indicare convenzionalmente in positivi "P" e negativi "N". Gli esiti predetti del classificatore binario li indicheremo invece con positivi "p" e negativi "n" rispettivamente.

Sono possibili quattro risultati a seconda della posizione del valore di cut off:

- Se il risultato della predizione è positivo e il valore vero è anch'esso positivo, si parla di *Vero Positivo* (TP);
- Se invece il valore vero è negativo mentre quello predetto è positivo si tratta di un *Falso Positivo* (FP);
- Contrariamente, un *Vero Negativo* (TN) si verifica quando entrambi, il risultato ed il valore vero, sono negativi;
- Un *Falso Negativo* (FN) invece è quando il risultato è negativo e il valore vero è positivo.

E' possibile rappresentare questo tipo di situazione anche utilizzando una tabella di contingenza di dimensione 2x2. Un risultato quantitativo del test potrebbe essere quello di andare a valutare il numero di false positivi e negativi, meno ve ne saranno e tanto il test sarà maggiormente valido.

		valori veri		totale
		P	N	
valori predetti	p	Vero Positivo	Falso Positivo	TP
	n	Falso Negativo	Vero Negativo	FP
totale		FN	TN	

Figura 3.6 Tabella di contingenza

I numeri sulla diagonale della matrice rappresentano le unità statistiche correttamente classificate, gli altri sono gli errori.

Il confronto fra il risultato dell'esame e l'effettivo valore vero permette di stimare due importanti parametri: la *sensibilità* e la *specificità*. La sensibilità, o i Veri Positivi (TP), misura la proporzione di positivi classificati correttamente mentre la specificità, o i Veri Negativi (TN), misura la percentuale di negativi correttamente classificati. In formule possono essere espresse nel modo seguente:

$$\text{Sensibilità} = Se = \frac{TP}{(TP+TN)}$$

$$\text{Specificità} = Sp = \frac{TN}{(TN+TP)}$$

La sensibilità è condizionata negativamente dalla quota di falsi negativi, pertanto un test molto sensibile dovrà associarsi ad una quota molto bassa di falsi negativi. La specificità è invece influenzata dalla quota di falsi positivi, ovvero un test sarà tanto più specifico quanto più bassa risulterà la quota di falsi positivi. Sensibilità e specificità sono fra loro inversamente correlate in rapporto alla scelta del valore di cut-off. Infatti, modificando quest'ultimo si può ottenere uno dei seguenti effetti: aumento della sensibilità e diminuzione della specificità oppure diminuzione della sensibilità ed aumento della specificità.

Un altro importante parametro da considerare è l'*accuratezza* per la valutazione di un test. Con tale termine si intende la capacità di un esame di fornire valori corrispondenti a quelli veri. Innanzitutto occorre disporre di un esame di riferimento a "gold standard" (nel nostro caso è quello che in seguito verrà definito ground truth) che fornisca appunto i valori veri. L'accuratezza del test è definita come:

$$\text{Accuratezza} = Acc = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN}$$

3.2.2 Principio base dell' analisi ROC

L'analisi ROC viene effettuata attraverso lo studio della funzione che, in un test quantitativo, lega la probabilità di ottenere un risultato TP nella classe dei malati veri (ossia la *SENSIBILITA'*) alla probabilità di ottenere un risultato FP nella classe dei non-malati (*1-SPECIFICITA'*). In altre parole, vengono studiati i rapporti fra "allarmi" veri e falsi "allarmi". La relazione tra i suddetti parametri può venire raffigurata attraverso un grafico che si ottiene riportando, in un sistema di assi cartesiani e per ogni possibile valore di cut off, la proporzione di veri positivi in ordinata e la proporzione di falsi positivi in ascissa. Se il risultato del test è riportato su scala continua, si possono calcolare i valori di sensibilità e di 1-specificità per ogni valore registrato (oppure in modo del tutto equivalente, utilizzando la media tra ogni valore e quello precedente). Un altro approccio, applicabile anche a dati ordinati, consiste nel suddividere l'intera gamma di valori restituiti dal test nelle due classi (malati e non-malati) in una serie di k intervalli, per k variabile in rapporto al numero di dati disponibili (ampiezza del set di dati) e della risoluzione della curva che si desidera ottenere. Quest' ultimo approccio consente di ottenere una curva con risoluzione ottimale compatibilmente con lo scarso numero di dati disponibili. L'unione dei punti ottenuti riportando nel piano cartesiano ciascuna coppia (Se) e ($1-Sp$) genera una curva spezzata con andamento a scaletta: ROC plot. Per interpolazione è possibile eliminare la scalettatura (smoothing) ed ottenere una curva (ROC curve) che rappresenta una stima sui parametri dei data set sperimentali.

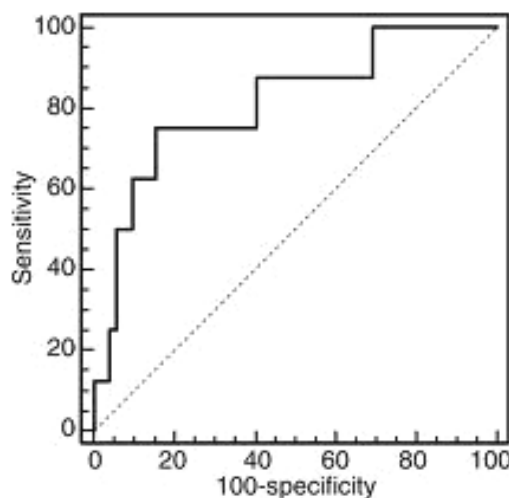


Figura 3.7 Curva spezzata prima dello "smoothing"

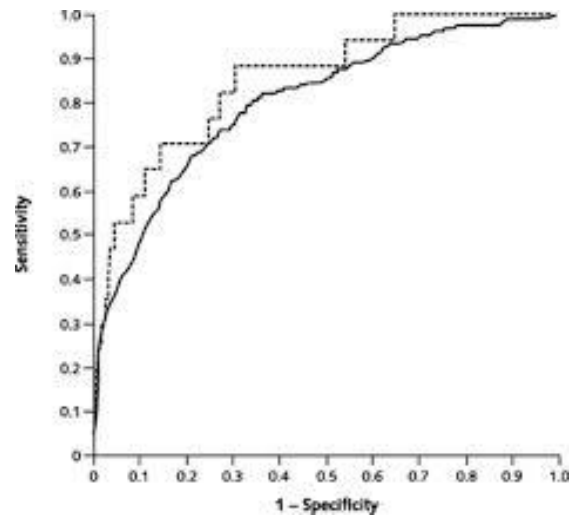


Figura 3.8 Curva ROC prima e dopo interpolazione (“smoothing”)

La capacità discriminante di un test, ossia la sua attitudine a separare propriamente la popolazione in studio in “malati” e “sani” è proporzionale all’ estensione dell’ area sottesa alla curva ROC (Area Under Curve, AUC) ed equivale alla probabilità che il risultato di un test su un individuo estratto a caso dal gruppo dei malati sia superiore a quello di uno estratto a caso del gruppo dei non malati.

Le curve ROC passano solitamente attraverso i punti (0;0) (1;1) consentendo quindi una molteplicità di curve. I due casi limite sono:

- ✓ Test perfetto ossia che non restituisce alcun falso positivo né falso negativo (capacità discriminante 100%), la AUC passa attraverso le coordinate (0;1) ed il suo valore corrisponde all’ area del quadrato delimitato dai punti di coordinate (0;0) (1;0) (0;1) (1;1), che assume valore 1 corrispondendo ad una probabilità del 100% di una corretta classificazione
- ✓ Al contrario, la ROC per un test assolutamente privo di valore informativo è rappresentata dalla diagonale, “chance line”, che passa per l’origine, con AUC=0.5

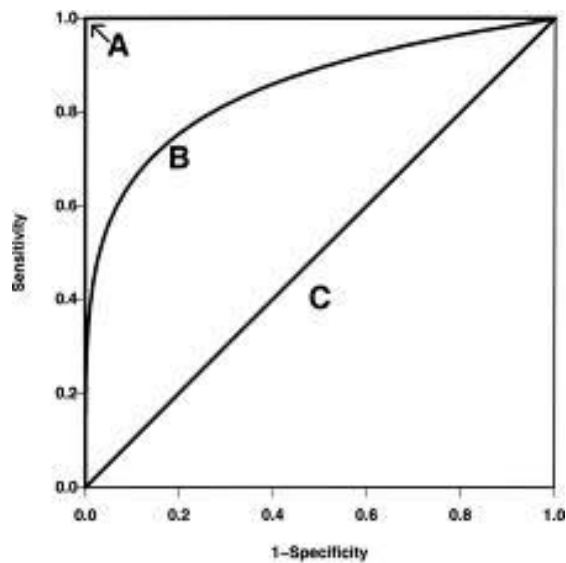


Figura 3.9 Tre esempi di curve: A) un test perfettamente discriminante; B) un test qualsiasi; C) un test completamente inutile

In una curva ROC esistono in genere due segmenti di scarsa o nulla importanza ai fini della valutazione dell'attitudine discriminante del test in esame. Essi sono rappresentati dalle frazioni di curva sovrapposte rispettivamente all'asse delle ascisse ed all'asse delle ordinate. Infatti, i loro valori possono essere scartati in quanto esistono altri valori di cut off che forniscono una migliore Sp senza perdita di Se o, viceversa, una migliore Se senza perdita di Sp. E' da sottolineare che la valutazione di un test attraverso l'AUC viene compiuta attribuendo ugual importanza alla Se e alla Sp, mentre in molti casi è necessario, nella pratica, differenziare il peso da attribuire ai suddetti parametri.

Come regola generale si può affermare che: il punto sulla curva ROC più vicino all'angolo superiore sinistro rappresenta il miglior compromesso fra sensibilità e specificità.

L'area sottesa ad una curva ROC rappresenta un parametro fondamentale per la valutazione della performance di un test, in quanto costituisce una misura di accuratezza non dipendente dalla prevalenza ("pure accuracy"). Poiché l'AUC rappresenta una stima da popolazione campionario finita, risulta quasi sempre necessario testare la significatività della capacità discriminante del test, ovvero se l'area sotto la curva eccede

significativamente il suo valore atteso di 0.5. Tale procedura corrisponde a verificare se la proporzione dei veri positivi è superiore a quella dei falsi positivi.

Il calcolo dell' AUC per una curva empirica (cioè ottenuta da un campione finito) può venire effettuato semplicemente connettendo i diversi punti del ROC plot all'asse delle ascisse con segmenti verticali e sommando le aree dei risultanti poligoni generati nella zona sottostante. Questa tecnica, detta trapezoidale, può fornire risultati sistematicamente distorti per difetto. I metodi di stima dell' area "vera" sono affidati a metodi di calcolo complessi che esulano dalla nostra trattazione.

Per quanto riguarda l' interpretazione del valore di AUC, si può tenere presente la classificazione della capacità discriminante di un test proposta da Swets (1998) la quale si basa sul seguente schema:

- $AUC = 0.5$ test non informativo;
- $0.5 < AUC \leq 0.7$ test poco accurato;
- $0.7 < AUC \leq 0.9$ test moderatamente accurato;
- $0.9 \leq AUC < 1$ test altamente accurato;
- $AUC = 1$ test perfetto

Due test possono essere quindi confrontati tra di loro comparando le accuratèze stimate mediante l' area sottesa alle corrispondenti curve ROC. Questo è stato il metodo seguito nel presente lavoro per valutare le performance dei filtri creati.

3.3 Definizione di ground truth

Dopo aver esposto quali sono i principi statistici alla base delle valutazioni effettuate, si procede ora ad analizzare nel dettaglio il modus operandi seguito per affrontare il problema di detection dei nervi corneali.

Le immagini acquisite con microscopia confocale sono affette da rumore ed artefatti prodotti dal sistema di acquisizione, i contorni dei nervi non sono sempre perfettamente

definiti e possono presentare strutture la cui classificazione non sempre risulta immediata. I filtri che andremo ad utilizzare hanno lo scopo di migliorare tali immagini, ovvero rendere più evidenti e definiti i nervi rispetto a tutto il resto che è presente nell'immagine. Questa operazione, definita di prefiltraggio, ma che sfrutta altri tipi di filtri, sta alla base di altri algoritmi utilizzati per tracciare queste strutture ed estrapolarne le caratteristiche morfologiche e di densità necessarie per un' accurata analisi clinica.

Il primo passo effettuato è stata la creazione dei ground truth, uno per ogni immagine del data set. In generale sono immagini dove sono rappresentati solo gli oggetti di interesse, in questo caso specifico si vedono unicamente le strutture nervose: sulle immagini acquisite dai clinici esperti, manualmente o tramite appositi programmi, hanno tracciato l' andamento delle suddette figure cercando di rispettarne forma, andamento e spessore, successivamente l' immagine è stata binarizzata così da ottenere una classificazione dell' immagine.

Di seguito una stessa immagine elaborata diversamente: nella prima sono stati tracciati i nervi sull' immagine acquisita mentre nella seconda si può vedere il ground truth, dopo un' operazione di sogliatura e binarizzazione è stato eliminato tutto ciò che nervo non è e questi sono stati rappresentati in colore bianco.

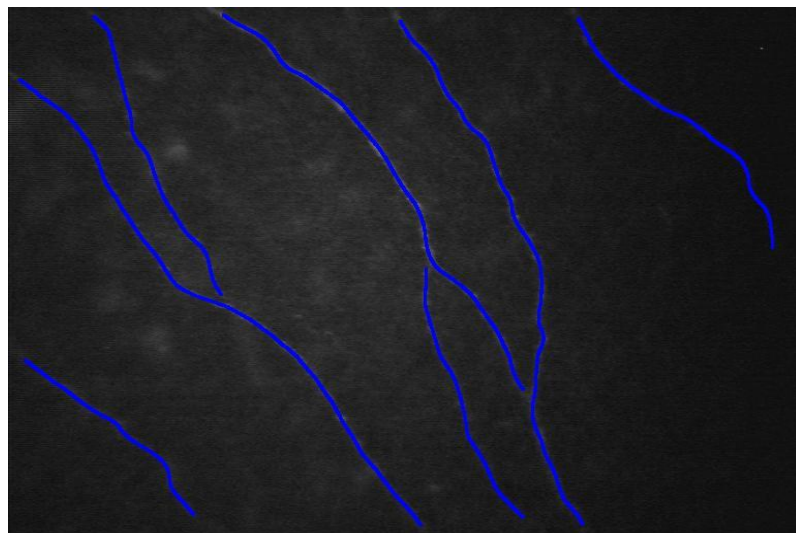


Figura 3.10 Immagine da microscopia confocale con tracciamento manuale dei nervi

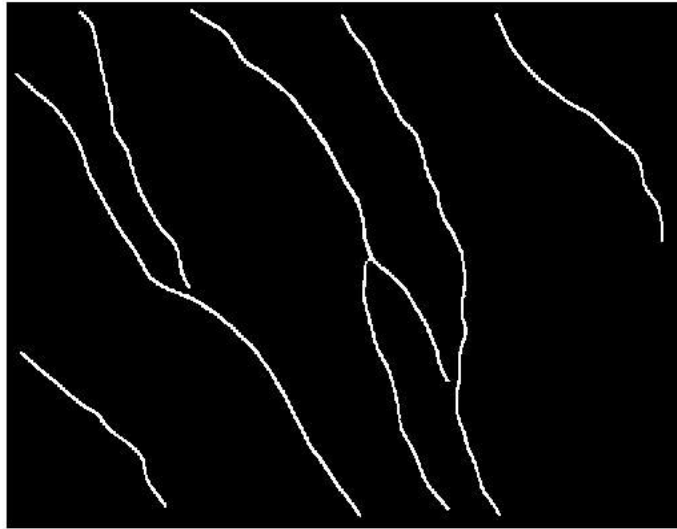


Figura 3.11 Ground truth

3.3.1 Confronto tra immagini e ground truth: scelta dei parametri

Dopo aver ricavato per ogni immagine il relativo ground truth si procede con la selezione dei parametri. Si è partiti da valori empirici selezionati valutando visivamente l'efficienza del filtro per poi affinare la scelta sfruttando la ROC analisi. Si è scelto di utilizzare l'immagine riportata in Figura 3.12 (la numero 21 del data set) come riferimento per valutare le performance, una volta determinati i parametri si è passati a verificarli su tutte le altre del data set.

Risulta evidente dalla figura sotto riportata quali siano le problematiche nell'analisi di una immagine come questa; lungo i bordi verticali è presente del rumore che si palesa sotto forma di linee orizzontali, i nervi non sono sempre ben distinguibili (in alcuni casi sembra quasi si interrompano e si può solo ipotizzare quale sia l'andamento) e non hanno bordi ben definiti .

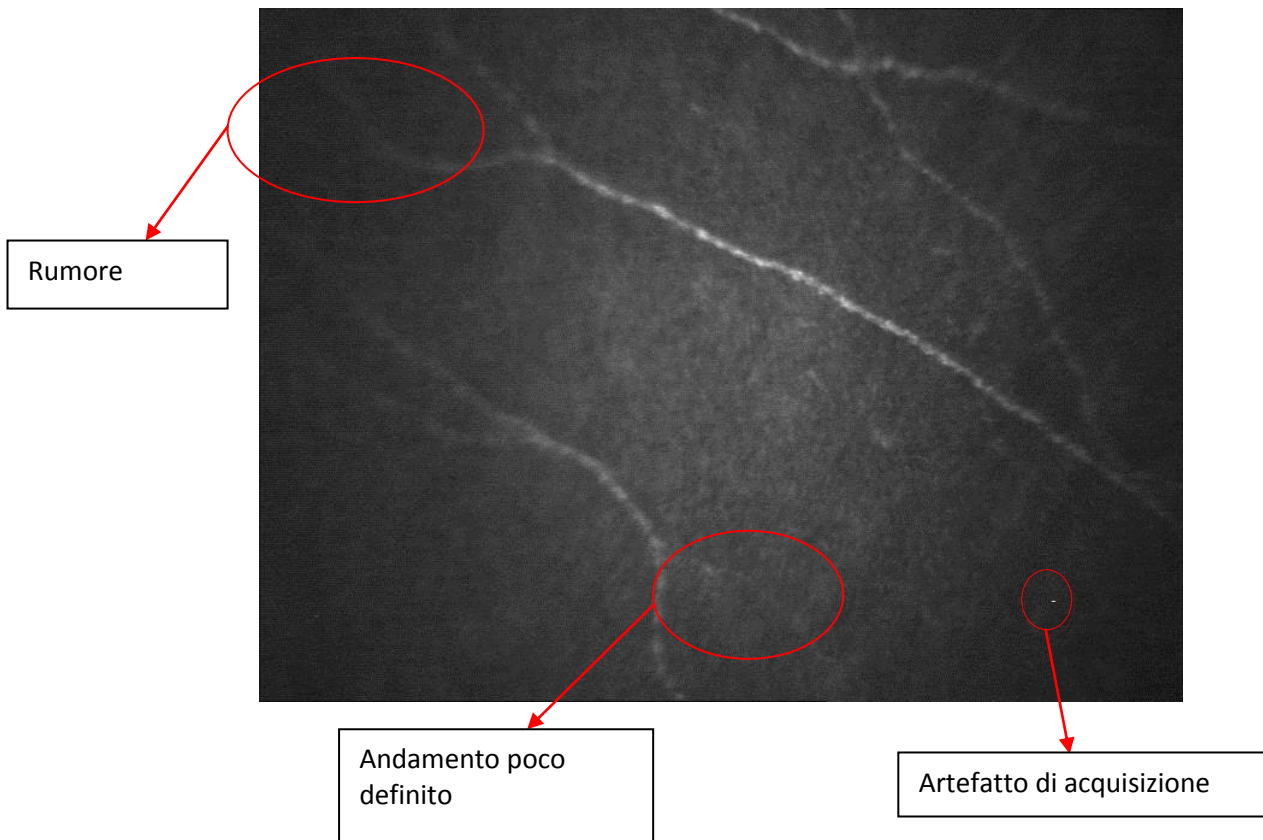


Figura 3.12 Immagine acquisita con relative problematiche

In primis si sono valutati diversi valori di varianza lungo l'asse delle x. In Tabella 3.1 sono riportati le prove svolte con indicati i parametri di AUC ed accuratezza che sono stati utilizzati per le considerazioni.

Figura	Sigma x	Sigma y	Freq	Rotazioni	AUC	ACC
21	3	11	0.085	24	0.798	0.723
21	4	11	0.085	24	0.837	0.805
21	5	11	0.085	24	0.879	0.843
21	6	11	0.085	24	0.890	0.853
21	7	11	0.085	24	0.874	0.801

Tabella 3.1 Selezione del parametro Sigma x

Dalla tabella sopra riportata si evince che ponendo Sigma x pari a 6 si ottengono i risultati migliori. Inoltre, in accordo con quanto discusso precedentemente sulla ROC analisi, si può notare come già per questi valori di AUC il test risulti in un buon range, ovvero tra quelli definiti moderatamente accurati.

Il secondo parametro che si è andati a ricercare è stato il valore di Sigma y, di seguito la tabella con i risultati ottenuti.

Figura	Sigma x	Sigma y	Freq	Rotazioni	AUC	ACC
21	6	3	0.085	24	0.869	0.828
21	6	4	0.085	24	0.877	0.796
21	6	5	0.085	24	0.882	0.787
21	6	6	0.085	24	0.885	0.830
21	6	7	0.085	24	0.888	0.826
21	6	8	0.085	24	0.889	0.815
21	6	9	0.085	24	0.890	0.855
21	6	10	0.085	24	0.890	0.831
21	6	11	0.085	24	0.890	0.853
21	6	12	0.085	24	0.889	0.818
21	6	13	0.085	24	0.887	0.878

Tabella 3. 2 Selezione del parametro Sigma y

Rispetto a prima si può notare come non vi sia un valore di AUC che spicchi rispetto agli altri, si è dunque deciso di scegliere quel valore di Sigma y tale per cui risulti un buon compromesso tra AUC ed accuratezza, ovvero Sigma y pari a 9.

Il terzo step è stato controllare nuovamente la Sigma x rispetto alla nuova Sigma y impostata, come si può notare dalla tabella sotto riportata vi è stata una conferma della coppia di valori appena trovati.

Figura	Sigma x	Sigma y	Freq	Rotazioni	AUC	ACC
21	3	9	0.085	24	0.801	0.735
21	4	9	0.085	24	0.840	0.814
21	5	9	0.085	24	0.881	0.839
21	6	9	0.085	24	0.890	0.855
21	7	9	0.085	24	0.873	0.815
21	8	9	0.085	24	0.850	0.836
21	9	9	0.085	24	0.828	0.835
21	10	9	0.085	24	0.814	0.803
21	11	9	0.085	24	0.803	0.814

Tabella 3. 3 Controllo del parametro Sigma x

Si passa ora a considerare la frequenza, questa più ancora degli altri influenzerà l'andamento della ROC analisi, il motivo è insito nella struttura stessa del filtro, di cui si era parlato nel precedente capitolo. L'uso di una frequenza non adeguata fa incorrere nel rischio di non riuscire a distinguere strutture vicine perché superiore alla loro distanza spaziale o, dualmente, di essere più elevata dello spessore del nervo e dunque identificarlo come sfondo. Ancora, può portare a sfocamento o alla comparsa di ulteriori artefatti. Nella successiva tabella i valori testati.

Figura	Sigma x	Sigma y	Freq	Rotazioni	AUC	ACC
21	6	9	0.02	24	0.744	0.610
21	6	9	0.03	24	0.768	0.612
21	6	9	0.04	24	0.801	0.706
21	6	9	0.045	24	0.820	0.772
21	6	9	0.05	24	0.840	0.815
21	6	9	0.055	24	0.860	0.812
21	6	9	0.06	24	0.877	0.857
21	6	9	0.065	24	0.891	0.884
21	6	9	0.07	24	0.899	0.818

21	6	9	0.075	24	0.902	0.835
21	6	9	0.08	24	0.898	0.864
21	6	9	0.085	24	0.890	0.855
21	6	9	0.09	24	0.876	0.819
21	6	9	0.1	24	0.838	0.834
21	6	9	0.3	24	0.658	0.672
21	6	9	2	24	0.726	0.593
21	6	9	3	24	0.726	0.593

Tabella 3. 4 Selezione del parametro Frequenza

Dai valori sopra riportati è lampante come oltre un determinata soglia di frequenze non vi siano più variazioni della curva ROC. Risulta inoltre evidente come la scelta migliore sia operare con una frequenza di 0.075, questa consente di arrivare ad una AUC pari a 0.902 facendo rientrare il test nel range dei molto accurati.

Fatto ciò si controllano nuovamente Sigma x e Sigma y in relazione al nuovo parametro di frequenza trovato.

Figura	Sigma x	Sigma y	Freq	Rotazioni	AUC	ACC
21	4	9	0.075	24	0.826	0.775
21	5	9	0.075	24	0.871	0.829
21	6	9	0.075	24	0.902	0.835
21	7	9	0.075	24	0.906	0.860
21	8	9	0.075	24	0.894	0.825
21	9	9	0.075	24	0.880	0.817
21	7	4	0.075	24	0.894	0.818
21	7	5	0.075	24	0.899	0.832
21	7	6	0.075	24	0.901	0.813
21	7	7	0.075	24	0.902	0.828
21	7	8	0.075	24	0.905	0.845

21	7	9	0.075	24	0.906	0.860
21	7	10	0.075	24	0.906	0.829
21	7	11	0.075	24	0.906	0.843
21	7	12	0.075	24	0.906	0.864
21	7	13	0.075	24	0.906	0.845

Tabella 3. 5 Controllo dei parametri Sigma x e Sigma y

La scelta fatta ricade sulla terna di parametri 7 ; 10 ; 0.075 che sono rispettivamente Sigma x , Sigma y e frequenza. Per questa decisione si è considerata, vista la vicinanza tra i valori di AUC e ACC, anche la posizione del punto più rappresentativo della curva ROC (dov'è migliore il connubio tra sensibilità e specificità) , che per quanto discusso prima è quello che più è prossimo all' angolo superiore sinistro.

3.3.2 Validità dei parametri: confronto di ogni immagine con il proprio ground truth

Dopo aver determinato i parametri si procede andando a testarli su tutto il data set a disposizione per poter valutare la robustezza e l'efficienza del filtro creato.

Figura	Sigma x	Sigma y	Freq	Rotazioni	AUC	ACC
1	7	10	0.075	24	0.934	0.831
2	7	10	0.075	24	0.905	0.799
3	7	10	0.075	24	0.958	0.899
4	7	10	0.075	24	0.965	0.909
5	7	10	0.075	24	0.960	0.899
6	7	10	0.075	24	0.900	0.760
7	7	10	0.075	24	0.955	0.890
8	7	10	0.075	24	0.926	0.828
9	7	10	0.075	24	0.943	0.885
10	7	10	0.075	24	0.974	0.925
11	7	10	0.075	24	0.944	0.916

Capitolo 3 - Detection dei nervi corneali

12	7	10	0.075	24	0.889	0.772
13	7	10	0.075	24	0.900	0.862
14	7	10	0.075	24	0.938	0.857
15	7	10	0.075	24	0.954	0.909
16	7	10	0.075	24	0.923	0.826
17	7	10	0.075	24	0.928	0.834
18	7	10	0.075	24	0.939	0.855
19	7	10	0.075	24	0.871	0.825
20	7	10	0.075	24	0.532	0.651
21	7	10	0.075	24	0.906	0.828
22	7	10	0.075	24	0.987	0.944
23	7	10	0.075	24	0.892	0.858
24	7	10	0.075	24	0.972	0.913
25	7	10	0.075	24	0.951	0.862
26	7	10	0.075	24	0.906	0.815
27	7	10	0.075	24	0.994	0.952
28	7	10	0.075	24	0.913	0.854
29	7	10	0.075	24	0.934	0.872
30	7	10	0.075	24	0.932	0.896
31	7	10	0.075	24	0.908	0.835
32	7	10	0.075	24	0.884	0.85
33	7	10	0.075	24	0.982	0.930
34	7	10	0.075	24	0.904	0.818
35	7	10	0.075	24	0.901	0.864
36	7	10	0.075	24	0.899	0.834
37	7	10	0.075	24	0.916	0.872
38	7	10	0.075	24	0.997	0.981
39	7	10	0.075	24	0.931	0.866
40	7	10	0.075	24	0.941	0.870
41	7	10	0.075	24	0.913	0.832
42	7	10	0.075	24	0.971	0.898
43	7	10	0.075	24	0.976	0.91
44	7	10	0.075	24	0.931	0.829
45	7	10	0.075	24	0.929	0.87
46	7	10	0.075	24	0.957	0.907

47	7	10	0.075	24	0.968	0.923
48	7	10	0.075	24	0.954	0.88
49	7	10	0.075	24	0.932	0.797
50	7	10	0.075	24	0.979	0.947
51	7	10	0.075	24	0.975	0.936
52	7	10	0.075	24	0.929	0.865
53	7	10	0.075	24	0.964	0.898
54	7	10	0.075	24	0.957	0.927
55	7	10	0.075	24	0.943	0.899
56	7	10	0.075	24	0.96	0.911
57	7	10	0.075	24	0.965	0.886
58	7	10	0.075	24	0.946	0.858
59	7	10	0.075	24	0.963	0.902
60	7	10	0.075	24	0.974	0.92
61	7	10	0.075	24	0.976	0.928
62	7	10	0.075	24	0.969	0.869
63	7	10	0.075	24	0.957	0.897
64	7	10	0.075	24	0.99	0.95
65	7	10	0.075	24	0.953	0.875
66	7	10	0.075	24	0.973	0.934
67	7	10	0.075	24	0.952	0.884
68	7	10	0.075	24	0.976	0.924
69	7	10	0.075	24	0.992	0.951
70	7	10	0.075	24	0.971	0.921
71	7	10	0.075	24	0.959	0.905
72	7	10	0.075	24	0.972	0.918
73	7	10	0.075	24	0.969	0.916
74	7	10	0.075	24	0.916	0.828
75	7	10	0.075	24	0.945	0.875
76	7	10	0.075	24	0.951	0.884
77	7	10	0.075	24	0.936	0.887
78	7	10	0.075	24	0.956	0.871
79	7	10	0.075	24	0.965	0.933
80	7	10	0.075	24	0.957	0.871
81	7	10	0.075	24	0.952	0.867

82	7	10	0.075	24	0.937	0.835
83	7	10	0.075	24	0.951	0.917
84	7	10	0.075	24	0.963	0.9
85	7	10	0.075	24	0.973	0.94
86	7	10	0.075	24	0.97	0.944
87	7	10	0.075	24	0.96	0.903
88	7	10	0.075	24	0.948	0.885
89	7	10	0.075	24	0.955	0.899
90	7	10	0.075	24	0.959	0.904
91	7	10	0.075	24	0.958	0.891
92	7	10	0.075	24	0.961	0.887

Tabella 3. 6 Valutazione del filtro sul data set completo

Solo l'immagine 20 fornisce dei risultati tali per cui il test risulta privo di significato, la ROC curve è prossima alla diagonale (come descritto nel paragrafo riguardante i principi di tale tecnica).

Per valutare complessivamente l'andamento del test si sono calcolate le medie di entrambi i parametri:

- $AUC_{media} = 0,942$
- $ACC_{media} = 0,88$

Grazie a questi si vede come i parametri scelti forniscano risultati molto attendibili e con un discreto grado di accuratezza a conferma che il metodo proposto in questo lavoro può essere un utile strumento per migliorare il riconoscimento dei nervi corneali.

Conclusioni

Lo scopo del lavoro descritto in questa tesi era quello di sviluppare un algoritmo per il riconoscimento automatico dei nervi corneali su immagini da microscopia confocale e di valutarne le performance.

L'analisi di tali immagini è fondamentale in campo medico per riconoscere patologie che possono compromettere la vista e conseguentemente la qualità della vita dei pazienti. L'idea di base fa riferimento al lavoro svolto da Fabio Scarpa nell'ambito della sua tesi di dottorato. In esso erano stati sviluppati degli algoritmi per il tracciamento automatico dei nervi corneali e la successiva valutazione di alcuni loro parametri quali spessore, tortuosità e densità, fondamentali per una valutazione medica adeguata. Nodo cruciale era proprio la necessità di automatizzare il tracciamento dei nervi ad oggi affidato a clinici che lo effettuano manualmente o con metodiche semi-automatiche.

Nel lavoro sopra citato si riscontrava la necessità di un prefiltraggio che migliorasse le prestazioni dei successivi algoritmi. Per perseguire tale obiettivo si è scelto di optare per un filtro che consentisse di adattarsi facilmente alla forma ed alla orientazione dei nervi: i filtri di Gabor. Questi sono filtri bidimensionali ottenibili dalla convoluzione di una gaussiana con una senoide. Questo implica che si hanno quattro parametri da selezionare: le due varianze lungo gli assi (σ_x e σ_y) della gaussiana, la frequenza della senoide e il numero di rotazioni. L'ottimizzazione di tali parametri è stato il focus di questo studio. A disposizione si avevano 92 immagini da microscopia confocale e le stesse 92 con tracciati, manualmente da medici, i nervi corneali. L'implementazione dei filtri e l'elaborazione delle immagini è stata svolta in MatLab mentre per valutare l'efficienza dei filtri, al variare dei parametri selezionati, si è fatto ricorso all'analisi delle ROC, sfruttata in molteplici ambiti per valutare le performance di un classificatore binario. Tramite la ROC analysis si valutano le variazioni relative dei valori di specificità, sensibilità, accuratezza ed AUC (Area Under Curve) rispetto alle variazioni dei parametri da ottimizzare.

Dalle 92 immagini ove erano tracciati i nervi, tramite operazioni di sogliatura e binarizzazione supervisionati manualmente è stato estrapolato il ground truth, utilizzato

come gold standard per la ROC analisi. Presa un'immagine campione, da una selezione di parametri empirici si è proceduto ad affinare la scelta dell'ottimo globale con una procedura greedy, massimizzando il valore dell'AUC di ogni singolo parametro tramite ottimizzazione locale.

Dopo aver ottimizzato i parametri lavorando su un'unica immagine si sono valutate le performance su tutto il data set. Dai dati ottenuti si può evincere che i filtri di Gabor consentono di ottenere immagini in cui l'andamento dei nervi corneali è messo in evidenza con prestazioni molto elevate, la media delle AUC è di 0,942. I filtri di Gabor possono essere considerati come un utile strumento di prefiltraggio nell'analisi automatica dei nervi corneali e dunque migliorare le prestazioni dei successivi algoritmi consentendo delle diagnosi più accurate per tutte le patologie della cornea.

Bibliografia

1. Scarpa F. "Automatic analysis of confocal images of the cornea", PhD Thesis, 2008;
2. Niederer R.L., McGhee C.N.J., "Clinical in-vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease", *Progress in Retinal and Eye Research*, Vol. 29, no. 1, pp.30-58, January 2010;
3. Guyton A.C., "Elementi di fisiologia umana", Edizione italiana a cura di M. Midrio, Piccin Editore, pp. 269-275, 1980;
4. Bairati A., "Compendio di Anatomia umana", Minerva Medica, pp. 767-789, 1972;
5. Scuderi G., "La cornea", Masson, pp. 138-143, 1998;
6. Tavakoli M., Hossain P., A Malik R., "Clinical application of corneal confocal microscopy", *Clinical Ophthalmology*, Vol. 2, no. 2, pp. 435-445, June 2008
7. Auguste G.-Y.C., Kaufman S.C., Kaufman H.E., Beuerman R.W., "Clinical Corneal Confocal Microscopy", *Survey of Ophthalmology*, Vol. 52, no. 5, pp. 482-500, September 2006;
8. Laing R.A., Sandstrom M.M., "Clinical Specular Microscopy", *Archives of Ophthalmology*, 1979;
9. Price N.C., Cheng H., "Contact and noncontact specular microscopy", *Br J Ophthalmol.*, Vol. 65, no. 8, pp. 568-574, August 1981;
10. Craig T., "Use specular microscopy to diagnose corneal disease", *Review of Optometry*, June 2009;
11. Jalbert I., Stapleton F., Papas E. Sweeney D.F., Coroneo M. "In vivo confocal microscopy of the human cornea", *Br J Ophthalmol.*, Vol. 87, no. 2, pp. 225-236, 2003;
12. Zweig H.H., Campbell G. "Receiver Operating Characteristic (ROC) plots: a fundamental evolution tool in medicine" (1993);
13. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. "Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests" (2000);

14. Hanley J., McNeil B.J. "The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve" (1982);
15. Schafer H. "Constructing a cut-off point for a quantitative diagnostic test" (1989);
16. Swets J.A. "Measuring the accuracy of diagnostic systems" (1998);
17. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL "Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a non parametric approach";
18. James Egan "Detection Theory and ROC Analysis";
19. H.G. Feichtinger, T. Strohmer. "A brief introduction to Gabor analysis".