

# IMMUNOISTOCHEMICA E ANALISI D'IMMAGINE MULTI SPETTRALE

[Immunohistochemistry and multispectral image analysis]

Giovanni Francesco Spatola

Di.Me.S. Sezione di Istologia ed Embriologia – Facoltà di Medicina - Università degli Studi di Palermo (IT)

**Parole chiave:** Analisi d'immagine, Immagini multispettrali, Immunoistochimica

**Key words:** Image analysis, Multispectral, Immunohistochemistry

**Sommario.** L'uso di metodiche d'analisi d'immagine ha permesso di rendere più affidabili e facilmente riproducibili i risultati ottenuti mediante tecniche di immunoistochimica (IHC). La maggiore diffusione e la semplificazione dei software che permettono uno studio colorimetrico ha fatto sì che tali metodiche siano alla portata di tutti e ha permesso di standardizzare la tecnica mediante dei sistemi di "score" affidabili. Inoltre, l'introduzione negli ultimi anni di metodiche di acquisizione d'immagine mediante sistemi multispettrali ha affinato ulteriormente tali tecniche permettendo di evitare artefatti e svincolare la valutazione dell'operatore dai dati oggettivi.

**Abstract.** The use of methods of image analysis has allowed us to make more reliable and reproducible results obtained by immunohistochemistry (IHC). Wider use and simplification of software allowing a colorimetric study has meant that these methods are available to everyone and made it possible to standardize the technique by reliable systems score. Moreover, the introduction in recent years of multispectral image acquisition systems methods has further refined these techniques allowing to avoid artifacts and release the evaluation of the data by the observer.

## Premessa

La tecnica immunistochimica viene impiegata sia nel campo della ricerca per evidenziare antigeni specifici sia dagli anatomo patologi per evidenziare marker tipici di svariate patologie. Sin dalla sua messa a punto essa ha sofferto di alcune gravi limitazioni intrinseche all'esecuzione della tecnica stessa. Se i passaggi che precedono la valutazione dei risultati possono comunque essere standardizzati [1,2], molto più difficile è ottenere una ripetitività e una corretta valutazione dei dati ottenuti. Infatti la lettura di un preparato IHC dipende strettamente dall'operatore e dalla sua esperienza. Vi sono molteplici fattori che influenzano l'osservazione a partire dal tipo di microscopio, alla temperatura di colore della luce utilizzata, al tipo di colorante usato per la rivelazione, alla capacità visiva dell'operatore stesso ed ultimo, ma non ultimo per importanza, dalla non linearità ottica delle reazioni. Difatti se per basse concentrazioni di antigene si può affermare che ad un aumento della concentrazione aumenta anche l'intensità della colorazione questo dato si perde a maggiori concentrazioni di antigene. Pertanto la nostra percezione ottica non permette una valutazione corretta della effettiva reattività.

Al fine di superare questi limiti sopra esposti negli ultimi anni si è cercato di standardizzare al massimo la tecnica IHC sia nelle fasi di preparazione, che nella vera e propria reazione e nella successiva lettura dei dati [1,2]. A tal fine un importante aiuto è stato fornito dai sistemi di imaging digitale che da circa 15 anni vengono affiancati da software sempre più perfezionati di analisi d'immagine. L'analisi d'immagine è una metodica informatica che ci permette mediante software più o meno dedicati di avere una valutazione sia del numero di cellule positive sia dell'intensità della reazione intesa come parametri colorimetrici derivanti da un'immagine digitale.

### **Analisi d'immagine**

I maggiori problemi legati alla valutazione delle reazioni immunoistochimiche dipendono, come precedentemente sottolineato, da diversi parametri prevalentemente soggettivi. Quello che per un operatore è una positività del test per un altro può essere invece assolutamente negativo e ciò dipende dalla percezione personale dei colori, dalle condizioni di osservazione, dalla propria capacità visiva etc.

Bisogna, inoltre, tenere conto del fatto che le reazioni IHC non hanno una resa totalmente lineare dal punto di vista cromogenico. Esse difatti risultano effettivamente lineari a bassa concentrazione dell'anticorpo nella cellula ma se la sostanza ricercata risulta essere presente in maggiori concentrazioni la risposta cromogenica risulta essere non lineare ossia dopo una certa soglia (per altro molto bassa) non risulta più possibile discriminare in maniera attendibile la quantità di sostanza presente all'interno della cellula. Diverso è il caso della immunofluorescenza in quanto essa tende a dare una risposta quasi del tutto lineare ossia a maggiore concentrazione della sostanza corrisponde un effettivo aumento della fluorescenza. Per tale motivo oggi si tende ad utilizzare sempre più questa ultima tecnica.

A partire dai primi anni novanta l'uso di immagini digitali in microscopia si è sempre più diffuso e ha permesso di ottenere un sempre crescente numero di informazioni dai campioni studiati. Chiaramente in sistemi pionieristici come i primi metodi basati sull'acquisizione di immagini video e non fotografiche la bassa risoluzione dei frames acquisiti non permetteva di potere effettuare valutazioni colorimetriche accurate. Nonostante ciò l'introduzione di alcuni software come il Lucia M della Nikon sono da considerare come una vera rivoluzione nel campo della valutazione IHC in quanto hanno permesso di semplificare sia il conteggio di cellule positive sia la valutazione dei risultati introducendo il concetto di quantificazione colorimetrica. Tale tipo di valutazione permetteva di avere, sia pure in maniera approssimativa, una idea della quantità di sostanza presente all'interno di vari citotipi. A causa della bassa risoluzione si era convenuto che bisognava utilizzare immagini di tipo binario (bianco e nero a 2 bit) oppure immagini in scala di grigio che



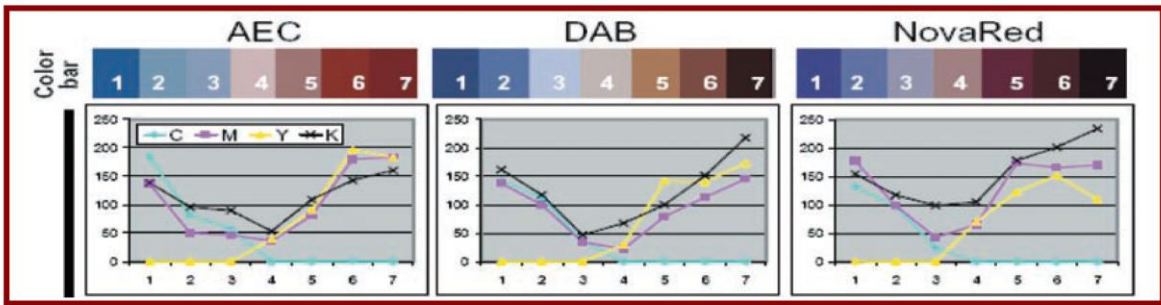


Fig.1 Profili CMYK per i più comuni cromogeni

risultano essere più ricche di informazioni in quanto a 8 bit o 256 toni di grigio. È importante considerare che il nostro occhio riesce a distinguere circa 70 toni di grigio quindi un uso di immagini a 256 toni necessita di un software che effettui una valutazione corretta dell'intensità di reazione. L'uso del b&w evitava le differenze legate ai diversi tipi di cromogeni usati e permetteva una maggiore standardizzazione delle tecniche di analisi d'immagine [3,4].

Per ovviare alla predetta non linearità delle reazioni IHC e alla impossibilità di valutazione oggettiva del singolo operatore (frasi del tipo “diffusamente reattivo”, oppure “molto presente” o ancora “scarsamente immunoreattivo” risultano essere assolutamente inutili e imprecise) e al fine di individuare correttamente la presenza e la distribuzione di una sostanza risulta sempre più di fondamentale importanza l'uso di un sistema di analisi d'immagine che provveda a quantificare mediante uno score la reattività permettendoci di rispondere alle domande base che sono:

- La reazione è positiva in rapporto ai controlli ?
- Se è positiva che intensità presenta e questa è correlata alla quantità di antigene ?
- Dove è localizzata la reattività ?

L'evoluzione dei sistemi di acquisizione di immagine ha modificato alcuni parametri per cui se fino a qualche anno fa risultava indispensabile utilizzare le immagini binarie o al massimo ad 8 bit, come prima chiarito, oggi la maggiore risoluzione permette anche un uso di immagini a colori.

Le immagini digitali a colori si basano su alcuni parametri fondamentali ed in particolare su degli istogrammi legati alla combinazione dei colori di base siano essi RGB (rosso, giallo, blu) oppure CMYK (ciano, magenta, giallo, e nero). I profili di questi istogrammi variano in maniera sensibile in base al colore che andiamo a prendere in considerazione. In particolare si è visto [5] che il profilo CMYK è quello che maggiormente ci permette una valutazione progressiva ed in particolare il canale del giallo è indipendente dall'osservatore e applicabile a diversi tipi di cromogeno in quanto sensibile a minime variazioni di intensità

IHC con una scala lineare che permette di ottenere un corretto score riproducibile con facilità. Teniamo conto che ogni canale viene suddiviso in 250 toni quindi basta associare secondo una progressione lineare a un determinato valore un punteggio variabile da 1 a 7, dove 1 corrisponde all'assenza di colore o 0 e 7 al massimo valore ottenibile in base al cromogeno, ossia 250 (Fig.1).

Parallelamente all'evoluzione dei sistemi di acquisizione di immagini la semplificazione dei software di analisi ha permesso una diffusione della metodica che risulta oggi alla portata di chiunque abbia un minimo di esperienza nell'uso di comuni programmi di fotoritocco come ad esempio Photoshop [6,7] che nelle sue ultime versioni implementa anche un menù di analisi d'immagine dove con pochi semplici comandi è possibile effettuare una serie di rilevazioni che vanno dal conteggio di cellule positive fino alla quantificazione di valori colorimetrici a cui assegnare uno score [4,8,9].

### **Analisi d'immagine multi spettrale**

Recentemente alla valutazione basata su uno score derivante dal profilo CMYK si è affiancata la metodica di acquisizione di immagini multi spettrali. Tale metodica, utilizzata inizialmente per migliorare la qualità di immagini acquisite dai satelliti e applicata in diversi campi di studio, dalla valutazione geologica del suolo sino a studi di archeologia dove le immagini multispettrali permettono di valutare la presenza di insediamenti nel sottosuolo, si basa sulla possibilità mediante particolari espedienti tecnici di superare i limiti di visione dell'occhio umano che ha una percezione del colore dipendente dalla luce e dalle condizioni di osservazione. In fisica uno stimolo colore è definito univocamente dall'"intensità" che esso assume nello spettro di luce visibile. Pertanto ad ogni colore si deve associare una "curva spettrale" costruita in base all'energia irradiata dalle singole lunghezze d'onda [10]. Per evidenziare tali curve è necessario acquisire delle immagini che tengano conto di quella che in fisica viene definita come "riflettanza" ossia la proporzione di luce incidente che una data superficie è in grado di riflettere. Un sistema di imaging multi spettrale pertanto permette di determinare la riflettanza nello spettro del visibile e di ricostruire fedelmente i colori della stessa immagine. I sistemi multi spettrali utilizzano particolari filtri ottici sensibili alle diverse lunghezze d'onda nello spettro del visibile e successivamente dei sistemi software capaci di ricostruire le curve di riflettanza in ogni punto della scena restituendoci una immagine che può essere studiata nelle sue varie componenti colorimetriche.

In pratica i sistemi di analisi multi spettrali sono composti da un sistema di filtri che ci permettono, guardando attraverso uno di essi settato per una certa lunghezza d'onda nel range visibile, di distinguere il singolo colore (Fig.2). Un "cubo" di dati spettrali è ottenuto per selezione di una lunghezza d'onda dopo l'altra, acquisendo un'immagine per ciascuna



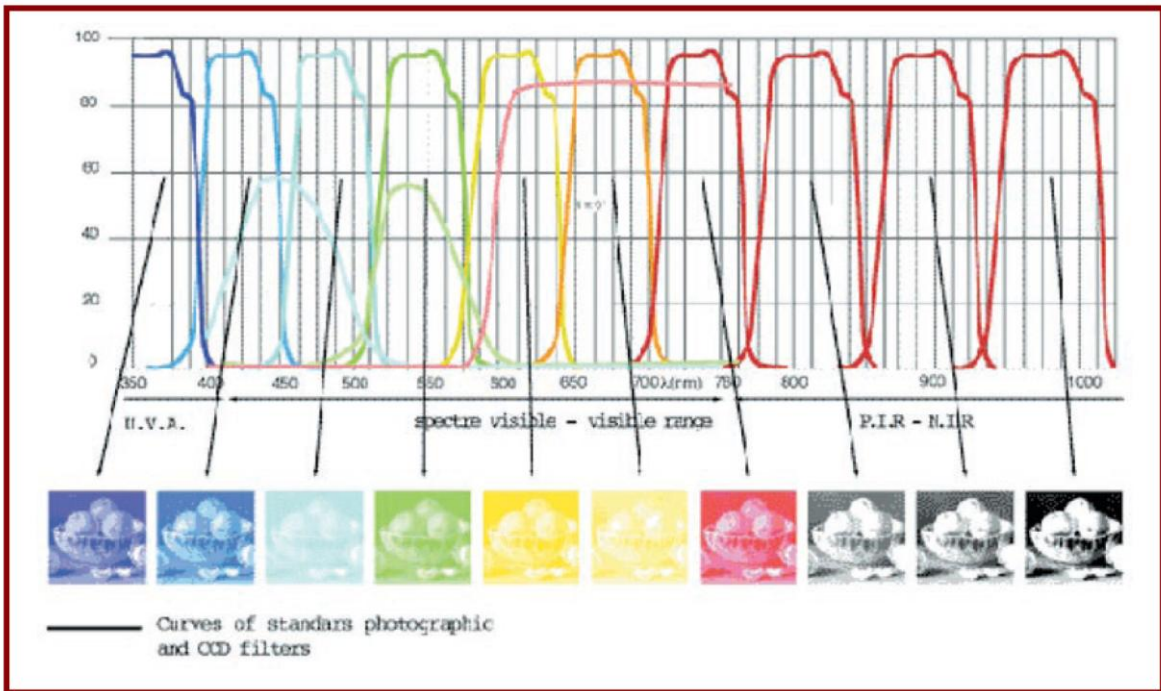


Fig. 2 Curve spettrali e filtri

di essa e ricostruendola mediante appositi software. La possibilità di acquisire immagini a diverse lunghezze d'onda fa sì che si possa anche sottrarre alcune di esse dall'immagine finale e quindi mettere in evidenza soltanto quelle lunghezze d'onda specifiche per un determinato cromogeno o fluorocromo. Le applicazioni risultano essere quindi molteplici. In particolare nel caso di immagini in fluorescenza la possibilità di separare le varie lunghezze d'onda permette di eliminare tutta o in massima parte l'autofluorescenza dei tessuti con indubbio vantaggio per la valutazione di risultati legati ad una determinata reattività specifica. Nell'immunostochimica classica l'uso di tale metodica permette di isolare ed evidenziare, mediante una elaborazione definita pseudo fluorescenza (immagini trasformate in negativo e ben contrastate), la presenza di un determinato cromogeno, la sua localizzazione e successivamente anche la sua intensità (Fig.3-4-5). Inoltre è possibile separare ed isolare diversi cromogeni utilizzati per valutare una colocalizzazione di antigeni diversi all'interno della stessa cellula o dello stesso tessuto [11,12,13]. Successivamente alla fase di acquisizione applicando una separazione selettiva dei vari spettri mediante una eliminazione progressiva di quelli che non corrispondono ai cromogeni in esame è possibile anche qui trasformare l'immagine secondo il profilo CMYK e valutare il canale del giallo ottenendo come già precedentemente esposto una curva colorimetrica lineare a cui applicare uno score per la valutazione dell'intensità della reazione e quindi indirettamente quantificare la presenza del nostro antigene.

## **Conclusione**

La metodica IHC ancora oggi risulta essere utile a visualizzare la presenza all'interno di cellule di determinati antigeni. Associare le metodiche di analisi d'immagine e di analisi multi spettrale permette inoltre di ottenere risultati riproducibili e separati dalle limitazioni oggettive determinate dai vari osservatori. La possibilità inoltre di quantificare mediante uno score la quantità di antigene presente nel nostro campo microscopico ci permette in associazione a metodiche di biologia molecolare di avere una visione più completa e sicuramente più corrispondente alla realtà rispetto all'utilizzo delle singole metodiche.

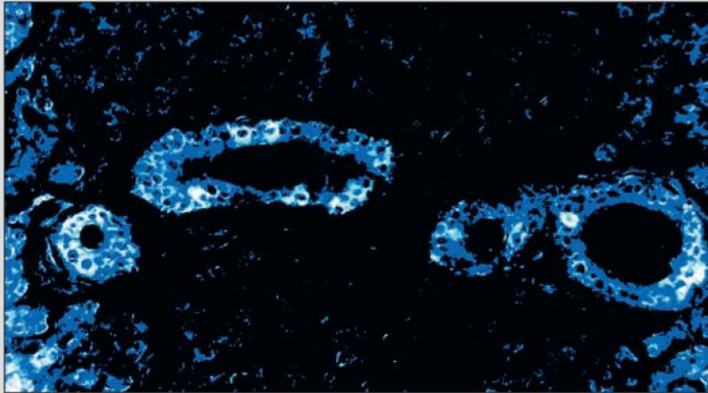


Fig.3 Acquisizione multi spettrale - positività leptinergica (cromogeno AEC) in alcuni epitelociti duttali – immagine multispettrale - Ob. 10x

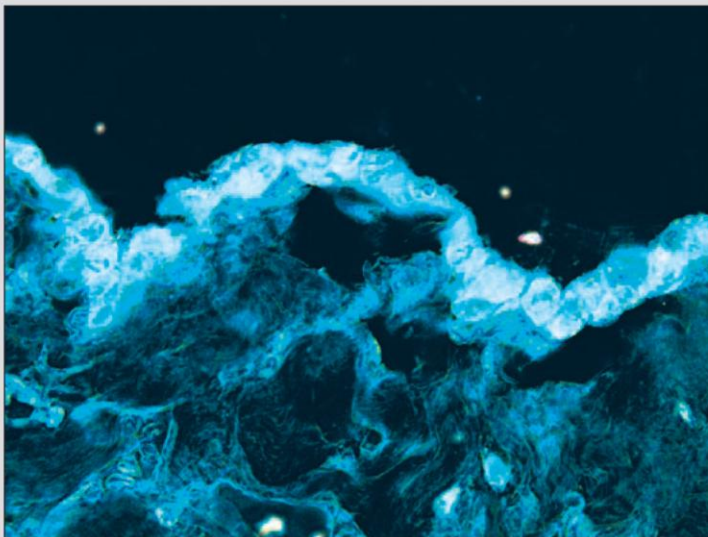


Fig.4 Acquisizione multi spettrale - positività MMP9 (cromogeno AEC) in endotelociti di aneurisma aortico dilatativo umano – immagine multispettrale - Ob. 40x

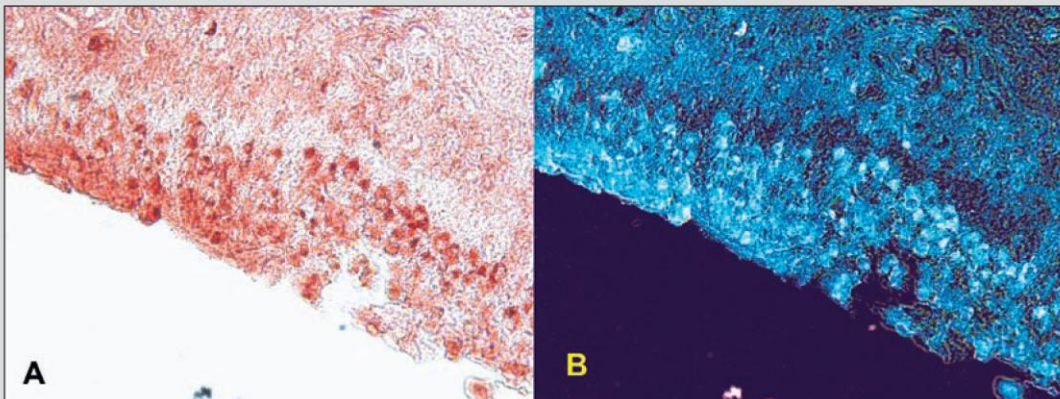


Fig.5 Confronto tra microscopia classica (A) e immagine multi spettrale (B) - positività MMP9 (cromogeno AEC) in cellule di polpa dentale – immagine multispettrale - Ob. 40x



## Bibliografia

- [1] Walker RA. Quantification of immunohistochemistry issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment. I; *Histopathology* 2006; 49: 406-410.
- [2] Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment. II; *Histopathology* 2006; 49: 411-424.
- [3] Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H, Brühlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 1996; May 105(5):333-55.
- [4] Kaczmarek E *et al*, Techniques of image analysis for quantitative immunohistochemistry. *Annales Academiae Medicae Bialostocensis* Vol. 49, 2004; Suppl. 1, Proceedings.
- [5] Nhu-An Pham *et al*, Quantitative image analysis of immunohistochemical stains using a CMYK color model. *Diagnostic Pathology* 2007; 2:8.
- [6] Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 1997; 45(11): 1559-65.
- [7] Kirkeby S, Thomsen CE. Quantitative immunohistochemistry of fluorescence labelled probes using low-cost software. *J Immunol Methods* 2005; Jun;301(1-2):102-13.
- [8] Skaland I, Ovestad I, Janssen EA, Klos J, Kjellevoid KH, Helliesen T, Baak JP. Digital image analysis improves the quality of subjective HER-2 expression scoring in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; Mar;16(2):185-90.
- [9] Skaland I, Øvestad I, Janssen EA, Klos J, Kjellevoid KH, Helliesen T, Baak JP. Comparing subjective and digital image analysis HER2/neu expression scores with conventional and modified FISH scores in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008; Jan;61(1):68-71. Epub 2007 Apr 5.
- [10] G. Novati *et al*, Acquisizione di immagini multispettrali - [www.ivl.disco.unimib.it](http://www.ivl.disco.unimib.it) 2003.
- [11] Gavrilovic M, Wählby C. Quantification of colocalization and cross-talk based on spectral angles. *J Microsc* 2009; Jun; 234(3):311-24.
- [12] Jaskolski F, Mulle C, Manzoni OJ. An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals. *J Neurosci Methods* 2005; Jul 15;146(1):42-9.
- [13] Landmann L, Marbet P. Colocalization analysis yields superior results after image restoration. *Microsc Res Tech* 2004; Jun 1;64(2):103-12.