

## Zytophotometrische und automatisierte Zytodiagnostik

A. Böcking, Abteilung Pathologie der Medizinischen Fakultät der Rhein.-Westf. Techn. Hochschule Aachen. Lehr- und Forschungsgebiet Pathologie und Zytologie

### Abstract:

The different validity of DNA-cytophotometric parameters to morphometric ones for the automated cytological diagnosis of cancer is discussed and demonstrated for prostatic-, cervical- and lymph-node cytology by own measurements. Nuclear-DNA-cytophotometry used for the automation of cytological diagnosis of malignancy has the following advantages compared to image analysis:

- 1) DNA-cytophotometry mostly yields more sensitive parameters for the diagnosis of malignancy than image analysis does and thus results in greater diagnostic accuracy.
- 2) Cytological diagnosis of malignancy may often be possible in earlier stages of the tumor-history with nuclear-DNA-parameters compared to morphological parameters.
- 3) The prognostic validity of nuclear-DNA-distribution is probably greater than of cytomorphological parameters.
- 4) The parameters of nuclear-DNA-distribution for cytodagnosis and grading of malignancy are the same for most of the human tumors in contrast to morphological parameters which are different for histogenetically different tumors.
- 5) Processing time for the automated diagnostic procedure of the slides will be much shorter if the Feulgen-stain for DNA is used instead of the Papanicolaou-stain for image analysis.

One disadvantage of nuclear DNA-measurements as a diagnostic tool is the fact that cytopathologists cannot fully control the diagnostic process and results with their own eyes in Feulgen-stained slides. Meanwhile, however, even in other medical disciplines diagnoses are made by objective measurements of parameters which are not discernible by the human eye. That diag-

---

Prof. Dr. Alfred Böcking, Lehr- und Forschungsgebiet Pathologie und Zytologie, Abteilung Pathologie der Medizinischen Fakultät der RWTH, Goethestraße 27-29, D-5100 Aachen

nostic procedure has to be accepted which yields the most accurate and reproducible diagnoses in the shortest time. It is recommended to combine cytomorphological and DNA-cytophotometric parameters as diagnostic tools for automated cytodiagnosis in Feulgen-stained slides.

Das Thema dieses Vortrages fragt nach einer Abwägung der Leistungsfähigkeit zweier verschiedener, automatisierbarer diagnostischer Verfahren in der zytologischen Krebsdiagnostik:

- 1) der bildanalytischen Messung zytomorphologischer Kriterien nach konventioneller Färbung (z.B. Papanicolaou)
- 2) der zytophotometrischen Messung des Zellkern-DNS-Gehaltes nach histochemischem Nachweis (Feulgen-Färbung)

Was können diese, in der automatisierten Zytodiagnostik konkurrierenden Verfahren leisten, was sind ihre Stärken und Schwächen? Korrelieren die jeweils gemessenen Parameter miteinander, sind sie gleichwertig? Sind diese beiden Verfahren gar kombiniert zur Diagnostik anwendbar?

Wie Sie wissen, wird die herkömmliche zytologische Diagnostik betrieben, indem subjektiv Größen, Formen, Nachbarschaftsbeziehungen und Anfärbbarkeiten von Zellen und deren Bestandteilen beurteilt werden. Von diesen Basisparametern werden eine Vielzahl diagnostischer Kriterien abgeleitet. Aufgrund unterschiedlicher, oft wenig präzise formulierter Kriterien und deren Kombinationen werden verschiedene Diagnosen unterschieden. Die kognitiven Grundmuster des differentialdiagnostischen Entscheidungsprozesses sind meist nicht analysiert (BÖCKING, 1980).

Diese Art Diagnostik wird daher auch häufig weniger intellektuell vermittelt als durch wiederholte Anschauung gelernt. Fast alle die morphologischen Kriterien, mit denen der Zytologe Diagnosen findet, können aber auch von modernen TV-Bildanalysemaschinen automatisch, reproduzierbar und objektiv bestimmt werden (z.B. Kerngröße, Kerngrößenvariabilität, Kernform, Kernformvariabilität, Nukleolengröße, Kernanordnung, Kernanfärbbarkeit, Kernplasmarelation, Zelldissoziation etc.).

Nachdem z.B. für die Zervix-Zytologie die Kriterienkombinationen

bekannt sind, mit denen verdächtige von unverdächtigen Plattenepithelien unterschieden werden und Fernsehbildanalyseautomaten wie das Leitz "TAS plus" selbst an Papanicolaou-gefärbten Präparaten die meisten dieser Kriterien automatisch bestimmen können, vermögen diese Automaten auch malignitätsverdächtige von unverdächtigen Präparaten zu unterscheiden. Dabei erreicht das System LEYTAS derzeit eine Treffsicherheit von 14 % falsch positiven bei 0 % falsch negativen Diagnosen (van DRIEL-KULKER and PLOEM, 1982). Die Bearbeitungszeit pro Papanicolaou-gefärbtem Präparat liegt aber derzeit noch bei ca. 8 Stunden. Es liegt in der Natur des Verfahrens, daß diese Methode kaum höhere Treffsicherheiten erreichen kann, als der subjektiv diagnostizierende Mensch, dessen Treffsicherheit daher auch als Maßstab für die Leistungsfähigkeit der Maschine gilt.

Der Vorteil der automatisierten bildanalytischen Zytodiagnostik liegt daher auch in der Nachvollziehbarkeit und Nachprüfbarkeit der Maschinendiagnose durch den Menschen, weil beide am selben Präparat diagnostizieren. Maschine und Mensch haben sozusagen dieselbe Diagnostik gelernt.

Ebenso wie der Mensch aber für jeden histogenetisch anderen Tumor andere Kriterien lernen muß, um ihn zu diagnostizieren, benötigt auch die Maschine jeweils andere, neu zu entwickelnde Algorithmen und Entscheidungsstrategien zur Diagnostik histogenetisch verschiedener Tumoren. Dies ist nicht nur eine Erschwerung für die Entwicklung der Maschinen-Software, sondern setzt der Anwendung des Verfahrens enge Grenzen, da vor der diagnostischen Bearbeitung des Präparates nicht bekannt ist, welcher Tumor zu erwarten ist. Mit den Algorithmen für die Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms wird man z. B. kaum ein einzelnes Bronchialkarzinom erfassen. Die Tatsache, daß Bildererkennungsmaschinen mit konventionellen Färbungen (z. B. Papanicolaou) arbeiten können, erleichtert zwar die Nachprüfbarkeit der Maschinendiagnose durch den Menschen, geht aber zu Lasten von Schnelligkeit und Treffsicherheit der Maschinendiagnose.

Wie treffsicher ist aber die Krebsdiagnose aufgrund zytomorphologischer Kriterien alleine im Prinzip? Zwischen eindeutig gutartigen und eindeutig bösartigen Zellen kennt die Zytodiagnostik

die Grauzone der Dysplasien. Begriffswelt und Morphologie der Dysplasien vermitteln gelegentlich den Eindruck, als gäbe es einen fließenden Übergang zwischen einer normalen und einer Tumorzelle, als gäbe es eine halbe oder dreiviertel maligne Zelle. Dem ist nicht so. Die Dysplasien entsprechen meist einem "diagnostischen Notstand", in dem nicht genügend eindeutige Kriterien für Gutartigkeit oder Bösartigkeit einer Zellpopulation gefunden werden. Dies deshalb, weil gewisse entzündliche oder regressive Zellveränderungen oft dieselben morphologischen Kriterien aufweisen wie low-grade/low-stage Malignome. So fanden wir z.B. bei manueller Bildanalyse in keinem diagnostischen Kriterium signifikante Unterschiede zwischen Zellen einer granulomatösen Prostatitis und einem hochdifferenzierten Prostatakarzinom (BÜCKING 1980, 1983). Zellen einer leichten Dysplasie des Plattenepithels ist nicht anzusehen, ob es sich dabei bereits um Tumorzellen handelt oder nur um eine unspezifische Zellaktivierung. Zellen einer atypisch proliferierenden Mastopathie ist ebenfalls kaum anzusehen, ob es sich bereits um maligne Zellen eines intraductalen Karzinoms handelt. Die Zytomorphologie liefert also oft genug nicht genügend valide diagnostische Kriterien, um eindeutig zwischen einer gutartigen und einer bösartigen Zelle zu unterscheiden. Eine Zelle ist aber nicht erst dann als Krebszelle anzusehen, wenn sich das morphologisch zu erkennen gibt, sondern dann, wenn sie funktionell die Eigenschaften einer Krebszelle angenommen hat. Dieser Änderung der Funktion liegt aber primär eine qualitative und meist auch quantitative Änderung der Zellkern-DNS zugrunde, die sich meist erst sekundär morphologisch manifestiert. Es gibt also durchaus funktionell bereits maligne Zellen, deren Malignität morphologisch aber noch nicht eindeutig zu diagnostizieren ist. Daraus ergibt sich die Frage, was als frühestes und sicherstes, für Malignität beweisendes Kriterium zu gelten hat: pathognomonische Veränderungen der Morphologie oder pathognomonische Veränderungen der DNS? Die Treffsicherheit Zellkern-DNS-zytophotometrischer Diagnosen wird heute meist noch an ihrer Übereinstimmung mit der morphologischen Diagnose gemessen.

Es lassen sich aber auch DNS-zytophotometrisch eindeutige Kriterien der Malignität formulieren, die dann gelegentlich lange

Zeit nachweisbar sind, bevor die Krebsdiagnose morphologisch zu stellen ist (BÜCKING, 1980, 1982). So haben wir mit DNS-Zytophotometrie bei 20 zytomorphologisch unklaren Zervixbefunden (Papanicolaou Gruppe III) 8mal richtig die Diagnose: "negativ" gestellt, was nachfolgende zytologische Kontrollen Jahre später bestätigten. Weitere 12 Fälle wurden als maligne eingestuft, was sich in 10 Fällen histologisch bestätigte und in 2 Fällen handelte es sich um eine mittelschwere Dysplasie (BÜCKING u. HILGARTH, 1983). D.h. die DNS-Zytophotometrie war in der Lage, richtig-positive und richtig-negative Diagnosen zu stellen in Fällen, in denen die morphologischen Kriterien noch "versagt" haben. Bei genügend langem Abwarten wären diese Fälle sicher später auch zytomorphologisch diagnostizierbar geworden.

Ein diagnostisches Kriterium zur Unterscheidung zweier Diagnosen ist umso valider

1) je größer der absolute Unterschied der beiden Diagnosegruppen in diesem Kriterium ist und umso geringer die Varianz des Kriteriums innerhalb einer Gruppe ist (umso höher also die Signifikanz des Unterschiedes zwischen beiden Gruppen in diesem Kriterium ist),

2) je höher der Prozentsatz der Fälle ist, die aufgrund dieses Kriteriums alleine eindeutig diagnostiziert werden können. Die Validität unterschiedlicher Kriterien zur Krebsdiagnostik sei am Beispiel der Prostatazytologie erläutert. An 20 gutartigen Prostataveränderungen und 32 Prostatakarzinomen haben wir mit manueller Bildanalyse und mit Zytophotometrie an denselben Zellen sowohl die bekannten zytomorphologischen diagnostischen Kriterien gemessen, als auch Feulgen-zytophotometrisch den Zellkern-DNS-Gehalt. Wie schon SPRENGER et al. (1974) fanden, unterscheiden sich gutartige von bösartigen Prostatazellen signifikant in ihrem DNS-Gehalt (Abb. 4). Verwendet man statt des mittleren DNS-Gehaltes der Zellkerne das Vorkommen aneuploider Zellkern-DNS-Gehalte über 5c (5c Exceeding-Rate) und die mittlere quadratische Abweichung der Zellkern-DNS-Gehalte vom Diploiden (2c Deviation-Index) als diagnostisches Kriterium der Malignität, so sind damit von 32 Prostatakarzinomen, 31 sicher zu diagnostizieren (= 97 %, Tabelle 1, Abbildung 5, BÜCKING 1980).

Tabelle 1

Sensitivität diagnostischer Malignitätskriterien der Prostatazytologie

Diagnostisches Kriterium	Sensitivität
Zellkern-DNS-Verteilung (5c ER, 2c DI)	97 %
Nukleolenzahl, -größe	78 %
Kerngröße	69 %
Kernpolymorphie	59 %
Kernanordnung	50 %
Anisonucleose	41 %

Prozentsatz richtig positiver Diagnosen, die mit nur einem, pathognomonisch veränderten Kriterium zu stellen waren, bei 32 Prostatakarzinomen.

Allein mit dem morphologischen Kriterium der Nukleolenzahl oder der Nukleolengröße sind nur 78 % der Prostatakarzinome zu diagnostizieren und aufgrund der Kerngröße alleine nur 69 %. Die unterschiedliche Validität diagnostischer Kriterien zur Unterscheidung von gutartigen und bösartigen Prostatazellen veranschaulichen auch die Abbildungen 1 - 4. Dort sind für die verschiedenen Diagnosegruppen die Mittelwerte und Standardabweichungen für die verschiedenen gemessenen diagnostischen Parameter dargestellt. Der DNS-Gehalt der Zellkerne scheint uns also ein trennschärferes diagnostisches Malignitätskriterium zu sein als morphologische Einzelkriterien. Um morphologisch dennoch eine genügende Treffsicherheit zu erreichen, muß man mehrere Kriterien gleichzeitig bestimmen. Wenn ein Malignom z.B. nicht aufgrund seiner Nukleolengröße diagnostiziert werden kann, so evtl. aufgrund seiner pathognomonisch vergrößerten oder polymorphen Kerne oder aufgrund aller Kriterien zusammen.

Gelegentlich wird behauptet, mit der herkömmlichen Papanicolaou-Färbung sei durch Berücksichtigung der Kernanfärbung (Extinktion) und Kernfläche eine dem DNS-Gehalt äquivalente Information zu erhalten. Unsere Befunde sprechen dagegen. Vergleicht

man z.B. in der Prostatazytologie den Feulgen-zytrophotometrisch bestimmten Zellkern-DNS-Gehalt verschiedener Diagnosen mit dem Produkt aus Kernextinktion (bei 535 nm Papanicolaou-Färbung) und Fläche, so lassen sich folgende zwei Schlüsse daraus ziehen (Abb. 3 und 4).

- 1) Die absoluten Unterschiede zwischen gutartigen und bösartigen Prostatazellen sind DNS-zytrophotometrisch größer als Papanicolaou-zytrophotometrisch und
- 2) die Varianz der Meßergebnisse innerhalb einer diagnostischen Gruppe ist bei der DNS-Bestimmung erheblich geringer, als bei der Papanicolaou-Färbung. Auch daraus ergibt sich eine höhere diagnostische Trennschärfe der DNS-Zytophotometrie gegenüber der Messung an Papanicolaou-gefärbten Präparaten. Eine der Ursachen dürfte sein, daß es sich bei der Feulgen-Zytophotometrie um eine wohl definierte histochemische Reaktion handelt, die weitgehend nach den Gesetzen der Stöchiometrie abläuft. Dies gilt für die herkömmliche Papanicolaou-Färbung nicht.

Es besteht aber eine geringe Korrelation zwischen dem DNS-Gehalt der Zellkerne und ihren morphologischen sowie färberischen Eigenschaften. Diese Korrelation ist jedoch nicht so eng, daß auf den DNS-Gehalt über eine Messung morphologischer Kriterien geschlossen werden darf. Eine exakte Mengenbestimmung der DNS des Zellkerns ist aber eminent wichtig, da bereits kleinen Differenzen große diagnostische Bedeutung zukommt. So muß ein Ploidiewert von 4c noch als normal gewertet werden, während ein Zellkern mit 5c wahrscheinlich einer malignen Zelle entspricht.

Die DNS-zytrophotometrischen Kriterien der Malignität sind wohl für fast alle menschlichen Tumoren dieselben, während die morphologischen Kriterien für jeden histogenetisch anderen Tumor verschieden sind. Bei einer automatischen Diagnostik mittels Bilderkennung muß man also für jeden neuen Tumor neue Algorithmen entwickeln. Wir haben dagegen einen universelleren Algorithmus für eine DNS-zytrophotometrische Diagnose der Malignität vorgestellt, basierend auf der Verrechnung von etwa 100 Zellkern-DNS-Meßwerten morphologisch abnormer oder atypischer Zellen (BÜCKING, 1982; BÜCKING et al., 1983). Die Treffsicherheit dieses Verfahrens haben wir an 178 Malignomen (30 Prosta-

ta-, 18 Mamma-, 40 Gebärmutterhalskarzinomen, 65 malignen Lymphomen und 25 Knochentumoren) geprüft. Dabei wurden 160 Tumoren richtig-positiv als maligne eingestuft, 12 als zweifelhaft und 5 als negativ. Das entspricht einer Rate von 3 % falsch-Negativen und einer Sensitivität für nicht-Negative von 96,6 %. Von 49 nicht malignen Veränderungen wurde keine falsch-positiv eingestuft (0 % falsch-Positive; BÜCKING, 1982).

Aufgrund des Zellkern-DNS-Verteilungsmusters läßt sich nicht nur mit hoher Treffsicherheit die Malignitätsdiagnose stellen, sondern das Verteilungsmuster läßt unabhängig vom Tumortyp auch einen Rückschluß auf die maligne Potenz der Tumoren zu. Wir haben daher einen Algorithmus für ein universelles DNS-Malignitäts-Grading entwickelt, der die Berechnung eines skalaren DNS-Malignitätsgrades von 0 - 3 erlaubt. Die prognostische Validität dieses skalaren Malignitätsgrades haben wir zunächst für maligne Lymphome bewiesen, bei denen damit z.B. noch innerhalb der immunoblastischen Lymphome zwei sich signifikant in der Überlebenszeit unterscheidende Gruppen zu differenzieren sind ( $p < 0,006$ ; BÜCKING et al., 1983).

Zusammenfassend seien folgende Vorteile der Verwendung DNS-zytrophotometrischer gegenüber zytomorphologischer Kriterien für die automatische Zytodiagnostik des Krebses genannt:

- 1) Die DNS-Zytrophotometrie liefert für die Krebsdiagnostik trennschärfere Kriterien als die Zytomorphologie und führt so zu einer größeren diagnostischen Treffsicherheit.
- 2) Die Tumordiagnose ist mit DNS-Parametern häufig in einem früheren Stadium des Krebsleidens möglich, als mit morphologischen.
- 3) Die prognostische Validität des Zellkern-DNS-Verteilungsmusters ist wahrscheinlich größer als die zytomorphologischer Kriterien.
- 4) Die Kriterien der Zellkern-DNS-Verteilung für die Krebsdiagnostik und das Malignitäts-Grading sind, im Unterschied zu den zytomorphologischen, für fast alle Tumoren dieselben.
- 5) Die Bearbeitungszeit der Präparate durch die Bilderkennungs-maschine ist bei der Verwendung der Feulgen-Färbung wesentlich kürzer.

Nicht nur die zytomorphologische Diagnostik ist automatisierbar, sondern auch die DNS-zytometrische Diagnostik. Über die entsprechenden Bemühungen mit Durchflußzytometern und Hybridverfahren wird hier von anderen Autoren berichtet. Moderne Bildanalysemaschinen, wie z.B. das Leitz<sup>®</sup>TAS plus<sup>®</sup>, sind mit einem Densitometerbaustein auszurüsten, der es erlaubt, damit auch DNS-zytometrische Messungen an Zellkernen automatisch durchzuführen. Damit können diese Geräte auch als automatische Zytometer zur Diagnostik eingesetzt werden. Diese Maschine kann selbständig ein Feulgen-gefärbtes Ausstrichpräparat abfahren und an allen isoliert liegenden Zellkernen Extinktions- und Flächenmessungen durchführen. Mit derselben Maschine ist es an denselben Präparaten auch möglich, sowohl zytomorphologische Messungen anzustellen, als auch DNS-zytometrische. Damit sind die Vorteile beider Verfahren miteinander kombinierbar.

Eine Anwendungsmöglichkeit besteht darin, die Maschine an nach Papanicolaou-gefärbten Präparaten zweifelhafte oder positive Befunde diagnostizieren zu lassen (screening). Alternativ kann dies auch weiterhin der Zytologe tun. Die zweifelhaften oder positiven Präparate werden dann sekundär nach Feulgen umgefärbt und an den lokalisierten abnormen oder atypischen Zellen werden dann für eine Sicherung der Malignitätsdiagnose zytometrisch die DNS-Gehalte bestimmt. Der DNS-Zytometrie ist dabei eine vom Menschen nachvollziehbare und nachprüfbar vorgeschaltet.

Eine zweite Anwendungsmöglichkeit besteht darin, mit Bilderkennungsmaschinen a priori nur an nach Feulgen gefärbten Präparaten zu arbeiten und kombiniert morphologische und DNS-zytometrische Kriterien zu verwenden: morphologische Kriterien zur Elimination von Artefakten und von der Messung auszuschließender Zellkerne (z.B. Granulozyten), zur Trennung von zusammenliegenden Kernen und zur Identifikation abnormer oder atypischer Zellkerne; DNS-zytometrische Kriterien zur Dignitätsbestimmung und zum Malignitäts-Grading dieser Zellen. Dieses Verfahren ist wesentlich schneller (derzeit ca. 30 Minuten für ein Präparat mit dem Leitz<sup>®</sup>TAS plus<sup>®</sup>) und wahrscheinlich treffsicherer. Die Nachprüfbarkeit der Diagnose durch den

UB  
Metr.

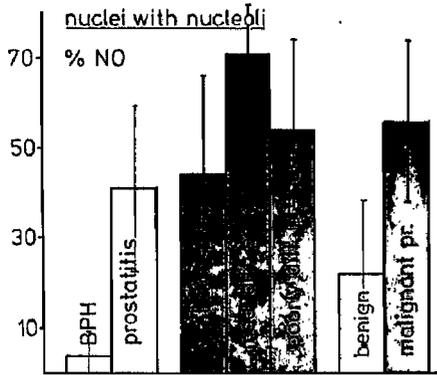


Abb. 1: Prozentsatz der Zellkerne mit Nukleolen

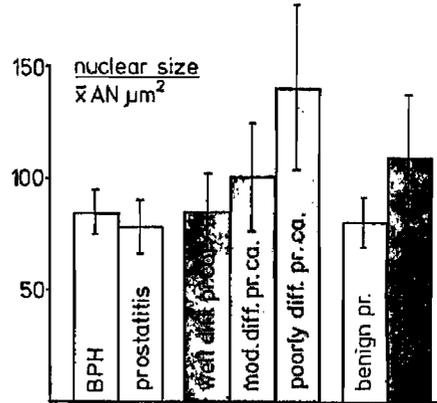


Abb. 2: Mittlere Zellkernfläche

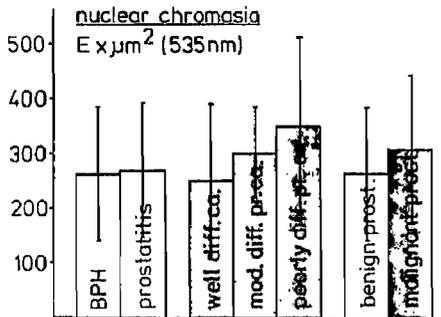


Abb.: 3: Produkt aus mittlerer Kernextinktion und -Fläche bei 535 nm in der Papanicolaou-Färbung

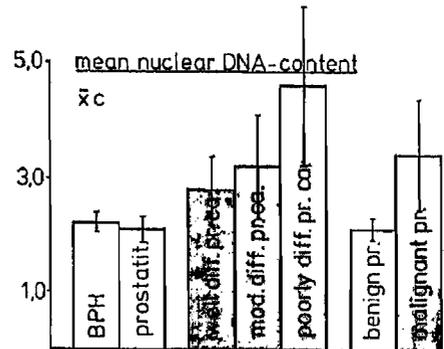


Abb. 4: Mittlerer DNS-Gehalt pro Zellkern nach Feulgen-Färbung mit Pararosanilin bei 570 nm

Abb. 1-4: Ergebnisse bildanalytischer und zytrophotometrischer Messungen an 20 gutartigen und 32 bösartigen Prostataveränderungen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen pro Diagnose-Gruppe, basierend auf je 150 Kernmessungen pro Fall.

Zytopathologen ist allerdings eingeschränkt, da er nur noch Zellkerne als morphologisches Kriterium zur Diagnose verwenden kann. Dieser Nachteil wird aber durch die größere Schnelligkeit sowie höhere Treffsicherheit und größere prognostische Relevanz des Verfahrens aufgewogen.

Mittlerweile werden auch in anderen medizinischen Disziplinen Diagnosen durch objektive Messungen von solchen diagnostischen Parametern gestellt, die durch die subjektive Wahrnehmung des menschlichen Auges nicht zu differenzieren sind. Letztendlich muß sich das diagnostische Verfahren durchsetzen, das die treffsichersten und reproduzierbarsten Diagnosen in der kürzesten Zeit liefert.

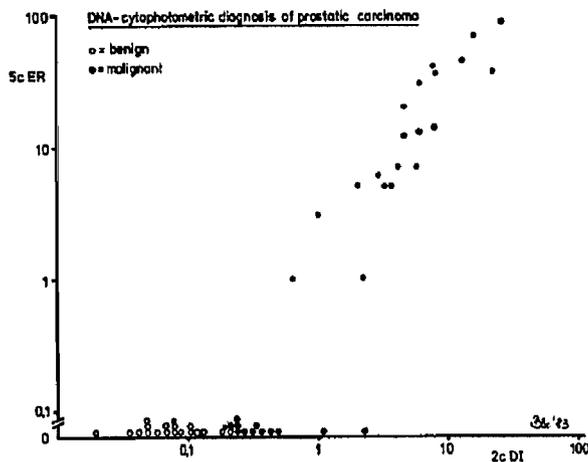


Abb. 5: DNS-Zytophotometrische Diagnose des Prostatakarzinoms mit 5c ER (= 5c Exceeding-Rate, entspricht dem Prozentsatz aneuploider Zellkerne über 5c) und 2c DI (= 2c Deviation-Index, entspricht der mittleren quadratischen Abweichung der Zellkerne vom Diploiden) an 32 Prostatakarzinomen und 20 gutartigen Prostataveränderungen. Bei einer Grenze von 2c DI = 0,22 ist eine Malignitätsdiagnose mit 3 % falsch Negativen und 0 % falsch Positiven möglich.

Literatur

- Böcking, A. (1980): Grading des Prostatakarzinoms.  
Habil.Schrift, Med. Fakultät Univ. Freiburg
- Böcking, A. (1982): Algorithmus für ein DNS-Malignitäts-Grading.  
Verh. Dtsch. Ges. Path. 66, 540.
- Böcking, A. (1983): Zytologische Diagnostik der Prostata.  
Urologe (Ausg. A): 22 (im Druck).
- Böcking, A. und Hilgarth, M. (1983): Beurteilung der prospektiven Malignität zervikaler Dysplasien durch DNS-Zytophotometrie. 13. Dtsch. Kongr. f. Zytologie, Freiburg i. Br. 21.-23.3.1983.
- Böcking, A., Adler, C.P., Common, H., Hilgarth, M. and Granzen, B. (1983): Algorithm for a DNA-Cytophotometric Diagnosis and Grading of Malignancy. Anal. Quant. Cytol., 5, zur Publikation angenommen.
- Sprenger, E., Volk, L. und Michaelis, W.E. (1974): Die Aussagekraft der Zellkern-DNS-Bestimmung bei der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Beitr. Path. 153, 370-378.
- Van Driel-Kulker, A.M.J. and Ploem, J.S. (1982): The Use of LEYTAS in Analytical and Quantitative Cytology. IEEE Trans. Biomed. Eng., 29, 92-100.