



# Roma Tre

Dipartimento di Ingegneria Civile, Informatica

e delle Tecnologie Aeronautiche

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA INFORMATICA

Prova finale di laurea

## Valutazione di tecniche di riduzione del rumore su immagini SNOM e AFM di batteri tramite analisi comparativa

**Relatore**

Prof.ssa Gabriella Cincotti

**Laureando**

Davide Pierotti

562733

Roma, Luglio 2025

Anno Accademico 2024/2025

# Ringraziamenti

Per prima cosa, desidero ringraziare la mia relatrice Gabriella Cincotti, che mi ha guidato, con infinita pazienza, nella stesura dell'elaborato. Grazie per i suoi preziosi consigli e per la sua disponibilità. Grazie per avermi fornito spunti fondamentali nella stesura di questo lavoro e per avermi indirizzato nei momenti di indecisione.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori, Roberto e Donatella, a cui dedico questo lavoro. Senza di voi non sarei mai potuto arrivare a questo importante traguardo.

Per finire, un ringraziamento ai miei amici, la mia ottima scusa per giustificare il fuori corso!

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1 Tecniche di microscopia a super-risoluzione</b>	<b>4</b>
1.1 Microscopi ottici . . . . .	4
1.1.1 Apertura numerica . . . . .	5
1.2 Microscopio elettronico . . . . .	6
1.3 Microscopio a effetto tunnel . . . . .	8
1.4 Atomic Force Microscopy . . . . .	8
1.4.1 Modalità a contatto . . . . .	10
1.4.2 Modalità a contatto infermittenre . . . . .	11
1.4.3 Modalità senza contatto . . . . .	11
1.4.4 Sistema di controllo . . . . .	13
1.5 Scanning Near-field Optical Microscopy . . . . .	14
1.5.1 Aperture SNOM . . . . .	15
1.5.2 Apertureless SNOM . . . . .	17
<b>2 Immagini di batteri ESKAPE</b>	<b>20</b>
2.1 SSNOMBACTER . . . . .	20
2.2 Batteri . . . . .	22
2.2.1 Morfologia . . . . .	23
2.2.2 Parete cellulare . . . . .	24
2.2.3 Fattori di virulenza . . . . .	25
2.2.4 Adesione . . . . .	25
2.2.5 Plasticità morfologica . . . . .	26
2.2.6 Gruppo ESKAPE . . . . .	27

<b>3 Metodi di elaborazione delle immagini</b>	<b>29</b>
3.1 Tecniche di riduzione del rumore . . . . .	29
3.1.1 Filtro guassiano . . . . .	29
3.1.2 Filtro rettangolare . . . . .	32
3.1.3 Filtro mediana . . . . .	33
3.1.4 Filtro di Wiener . . . . .	34
3.1.5 Filtro bilaterale . . . . .	35
3.1.6 Filtro guidato . . . . .	36
3.1.7 Filtro a media non locale . . . . .	37
3.1.8 Filtro BM3D . . . . .	38
<b>4 Risultati</b>	<b>40</b>
4.1 Metodi di valutazione . . . . .	40
4.1.1 Analisi correlativa . . . . .	41
4.2 Discussione . . . . .	44
4.3 Ispezione visiva multicanale . . . . .	52
<b>5 Conclusioni</b>	<b>53</b>
5.1 Analisi correlativa . . . . .	53
5.2 Rumore . . . . .	54
5.3 Sviluppi futuri . . . . .	55
5.4 Ulteriori elaborazioni . . . . .	56
5.4.1 Segmentazione . . . . .	56
<b>Lista di Termini e Acronimi</b>	<b>58</b>

# Elenco delle tabelle

2.1	Tipi di immagini presenti nel dataset . . . . .	21
2.2	Lista dei ceppi batterici esaminati in SSNOMBACTER . . . . .	28
4.1	Valori medi dei metodi di valutazione NR-IQA . . . . .	44
4.2	Valori medi della variazione totale . . . . .	45
4.3	Valori medi della scala FSIM . . . . .	46
4.4	Valori medi dei metodi di valutazione correlativa . . . . .	47

# Elenco delle figure

1.1	Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto . . . . .	5
1.2	Obiettivi con diverse aperture . . . . .	6
1.3	Principio di funzionamento dei microscopi TEM e SEM . . . . .	7
1.4	Principio di funzionamento di un microscopio a effetto tunnel . . . . .	8
1.5	Punta di un microscopio AFM vista al microscopio SEM . . . . .	9
1.6	Principio di funzionamento di un microscopio AFM . . . . .	10
1.7	Modalità di funzionamento di un microscopio AFM . . . . .	10
1.8	Grafico delle forze di van der Waals secondo il modello di Lennard-Jones	12
1.9	Diagramma di un controllore PID ad anello chiuso . . . . .	13
1.10	Principio di funzionamento di un microscopio SNOM . . . . .	15
1.11	Ingrandimento sull'apertura della punta in un microscopio a-SNOM .	16
1.12	Modalità di illuminazione di un microscopio a-SNOM . . . . .	16
1.13	Modelli di dipoli usati per elaborare le radiazioni nel campo vicino .	18
1.14	Sistema di rilevazione a pseudo-eterodina per microscopia s-SNOM .	19
2.1	Tipiche forme di aggregati batterici . . . . .	22
2.2	Rappresentazione schematica del rivestimento cellulare . . . . .	24
2.3	Un esemplare di <i>Escherichia Coli</i> visto al microscopio s-SNOM . .	26
3.1	Immagini in ampiezza SNOM di esemplari di <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
3.2	Effetto del parametro $\sigma$ sul filtraggio . . . . .	31
3.3	Esempio di filtro rettangolare . . . . .	32
3.4	Artefatti di un filtro passa-basso ideale . . . . .	33
3.5	Immagine s-SNOM O2P di esemplari di <i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	33
3.6	Filtro guidato dall'immagine di topografia AFM . . . . .	37
3.7	Effetto del parametro $h$ sul filtraggio . . . . .	38
3.8	Distribuzione dei pesi rispetto al pixel centrale dell'immagine . . .	38

4.1	Confronto della deviazione standard locale tra immagini AFM e SNOM	41
4.2	Immagine O3A con molto rumore impulsivo . . . . .	44
4.3	Immagine della figura 4.2 elaborata con filtro gaussiano e guidato .	45
4.4	Confronto tra filtro rettangolare e mediana . . . . .	46
4.5	Confronto tra filtro NLM e BM3D . . . . .	48
4.6	Confronto delle caratteristiche dell'immagine originale con NLM e BM3D . . . . .	49
4.7	Grafici a barre delle medie di valutazione per immagini O2A . . . . .	50
4.8	Grafici a barre delle medie di valutazione per immagini O3A . . . . .	51
4.9	Ispezione visiva multicanale di un'immagine della 2 <sup>a</sup> armonica . . . . .	52
5.1	Sistema multimodale per l'acquisizione di immagini correlative . . .	54
5.2	Alcuni risultati della segmentazione . . . . .	57

# Introduzione

Sin dal 17° secolo, in cui Antonie van Leeuwenhoek pose le basi della Microbiologia<sup>[1,2,3]</sup>, i microscopi ottici sono stati di vitale importanza nello sviluppo della nostra comprensione degli organismi microscopici. In tempi recenti, il raggiungimento del limite teorico della risoluzione spaziale dei microscopi ottici convenzionali, proporzionale alla lunghezza d'onda della luce, ha favorito lo sviluppo di nuove tecniche di microscopia a super-risoluzione.<sup>[4]</sup>

In questa tesi sono state prese in esame delle immagini generate da un microscopio s-SNOM, che combina le tecniche di microscopia AFM e SNOM. Queste tecniche hanno una risoluzione laterale di pochi nanometri e registrano diverse proprietà del campione esaminato.

Le immagini AFM sono generate facendo scorrere un cantilever con una punta di circa 10 nm sulla superficie del campione. Durante la scansione la punta viene inclinata verso l'alto e il basso dalle forze di interazione con il campione, e queste inclinazioni vengono poi misurate da un raggio laser che viene riflesso dal cantilever su un fotodiodo a quadranti. Il segnale misurato da questo fotodiodo viene convertito in una variazione di altezza della punta. In questo caso è stata impiegata la modalità di funzionamento a contatto intermittente, in cui il cantilever è messo in vibrazione alla sua frequenza di risonanza e l'ampiezza di oscillazione è regolata in modo da toccare appena il campione. Questo è importante quando bisogna lavorare con campioni che possono dislocarsi o danneggiarsi facilmente a causa delle forze impresse dalla punta su essi.

Le immagini SNOM sono generate sfruttando alcune proprietà dei campi evanescenti per misurare le proprietà ottiche del campione con una risoluzione molto maggiore rispetto alle tecniche di microscopia ottica tradizionale. Poiché le onde evanescenze sono confinate a una regione prossima alla superficie del mezzo che le origina, è necessario portare il rilevatore entro l'intervallo della lunghezza d'onda

della radiazione utilizzata. In questo caso è stato impiegato un laser con una lunghezza d'onda di 1550 nm che concentra il fascio luminoso nell'area tra la punta e il campione, generando un campo evanescente.

Le immagini in esame in questa tesi sono prese dal dataset di SSNOMBACTER, un articolo scientifico pubblicato nel 2020 su GigaScience.<sup>[5]</sup> In questo studio sono state generate oltre 4000 immagini AFM e SNOM di 15 specie di batteri diversi, tra cui anche le specie del gruppo ESKAPE<sup>[6]</sup>. Queste specie di batteri sono di particolare interesse perché sono resistenti agli antibiotici o sono state identificate come patogeni opportunisti e rimangono tuttora un grave problema per la salute pubblica, anche nei paesi sviluppati.<sup>[7]</sup> Infatti, la resistenza agli antibiotici è una crescente minaccia per la salute globale, che si prevede sarà la causa di oltre 40 milioni di morti entro il 2050.<sup>[8]</sup>

Studiare questi batteri con tecniche di microscopia a super-risoluzione è di fondamentale importanza per comprendere le interazioni a livello molecolare tra i batteri e le cellule ospite, per studiare i fattori di virulenza e potenzialmente sviluppare dei farmaci più efficaci.

Nel lavoro svolto in questa tesi sono state prese in esame le immagini di topografia AFM e le ampiezze della 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> armonica s-SNOM per valutare l'efficacia di diverse tecniche di riduzione del rumore su questo tipo di immagini. Uno dei fattori che influenza la quantità di rumore in queste immagini è il tempo di integrazione per pixel del microscopio: impostare un periodo di tempo più alto permette di avere immagini con meno rumore a discapito di un tempo di scansione più lungo o il rischio di dislocare il campione. Usare delle tecniche di riduzione del rumore su immagini ottenute con un tempo di integrazione basso, come nel caso delle immagini del dataset SSNOMBACTER, permette di aumentare la qualità delle immagini senza dover aumentare il tempo richiesto per l'acquisizione delle immagini.<sup>[9]</sup>

Le tecniche prese in considerazione in questa tesi sono il filtro gaussiano, il filtro rettangolare, il filtro mediana, il filtro di Wiener, il filtro bilaterale, il filtro guidato, il filtro a media non locale e il filtro BM3D. Per valutare l'efficacia di questi filtri sono stati usati diversi metodi di valutazione. Non essendo disponibili delle immagini di riferimento o valutazioni soggettive di esperti, sono stati usati dei metodi di valutazione senza riferimento (NR-IQA). Oltre a questi, è stata fatta un'analisi comparativa tra le caratteristiche delle immagini di ampiezza SNOM e quelle della corrispondente

immagine di topografia AFM, usando misure come la mutua informazione o la scala FSIM.

Dopo aver testato questi filtri su tutte le 93 scansioni e preso la media delle valutazioni, sono analizzati i risultati ottenuti da cui si evince come, complessivamente, le tecniche migliori siano il filtro mediana o il filtro NLM. Questo dipende da che tipo di rumore sia più tollerato dalle tecniche usate per elaborare le immagini. Il filtro mediana rimuove gran parte del rumore impulsivo e una parte del rumore bianco, ma trasforma le variazioni graduali in gradini. Invece, il filtro NLM riduce gran parte del rumore bianco mantenendo comunque inalterate le caratteristiche del campione, ma lascia inalterato il rumore impulsivo sui campioni.

Questa tesi è strutturata in 5 capitoli. Nel primo capitolo vengono descritte le principali tecniche di microscopia a super-risoluzione, con particolare interesse verso le tecniche di microscopia AFM e SNOM. Nel secondo capitolo viene descritta la modalità di acquisizione delle immagini presenti in SSNOMBACTER<sup>[5]</sup>, si presenta una panoramica sui batteri ESKAPE<sup>[6]</sup> e sulle motivazioni dell'uso di queste tecniche per studiarli. Nel terzo capitolo vengono presentate le tecniche di riduzione del rumore prese in esame in questa tesi. Nel quarto capitolo vengono esposti i metodi di valutazione usati per studiare l'efficacia dei filtri e discussi i risultati ottenuti. Nel quinto capitolo è esposto un riepilogo dei risultati raggiunti e possibili usi per sviluppi futuri.

# Capitolo 1

## Tecniche di microscopia a super-risoluzione

### 1.1 Microscopi ottici

I primi microscopi furono costruiti nel 17° secolo, oltre 400 anni fa e furono utilizzati per vedere per la prima volta i microrganismi che abitano la Terra. In quest'epoca ebbe inizio lo studio della Microbiologia. Lo studioso *Robert Hooke* osservò le pareti cellulari e usò per la prima volta il termine "cellula" [10,11]. Nel 1663 *Antoine van Leeuwenhoek* fabbricò artigianalmente dei microscopi semplici, a singola lente, con ingrandimenti molto superiori rispetto a quelli esistenti a quell'epoca e fu il primo ad osservare microrganismi, come batteri, protozoi e globuli rossi.[1,2,3,12]

Il microscopio ottico composto ingrandisce l'immagine del campione usando due o più lenti. Il campione viene illuminato usanto una sorgente di luce sul lato opposto all'obiettivo (microscopia a luce trasmessa) oppure sullo stesso lato (microscopia a luce riflessa).

Il sistema più semplice è composto da due lenti, una lente obiettivo vicina al campione da esaminare, e una lente oculare vicina all'osservatore. Il campione è prima messo a fuoco dalla lente obiettivo dentro al microscopio in un'immagine reale, che è creata dalla convergenza dei raggi di luce, poi questa immagine viene nuovamente ingrandita dalla lente oculare che crea una immagine virtuale, generata dalle proiezioni di raggi divergenti. L'osservatore quindi vede un'immagine ingrandita, invertita e virtuale del campione esaminato.

Il microscopio ottico composto ha continuato ad evolversi fino ad oggi, dando

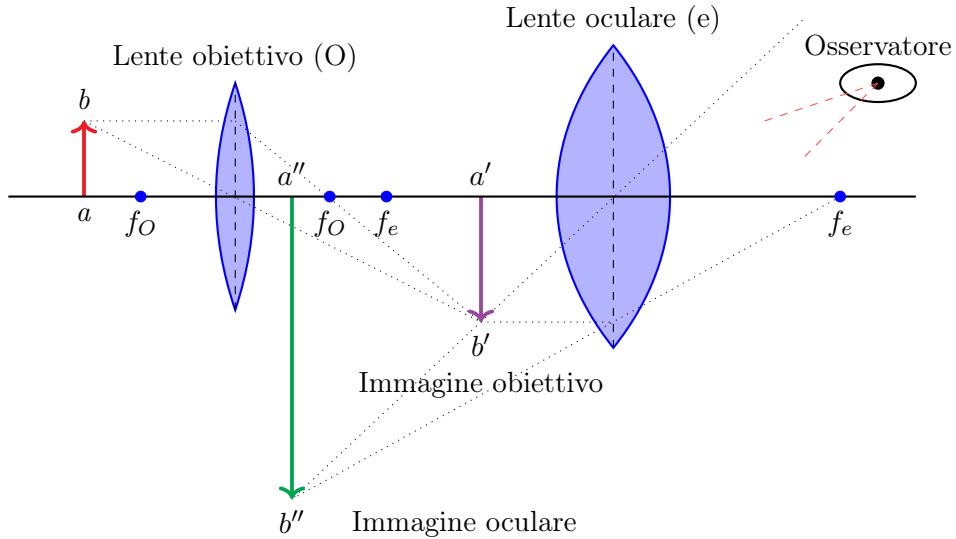


Figura 1.1: Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto

origine a numerose varianti per scopi più specializzati, come il microscopio a contrasto di fase (PCM)<sup>[13]</sup> o il microscopio confocale (CLSM)<sup>[14]</sup>. In generale, oggi la microscopia ottica ha raggiunto prestazioni molto elevate, sia dal punto di vista ottico che meccanico, ma la cui risoluzione spaziale è rimasta limitata dal principio di diffrazione della luce.

### 1.1.1 Apertura numerica

Il primo a definire questo limite fu *Ernst Abbe* nel 1881, quando pubblicò il suo lavoro sulla misura dell'apertura dei microscopi.<sup>[15]</sup> Tale limite, chiamato apertura numerica (NA), misura l'angolo di accettazione massimodei raggi da parte di una lente, ed è usato in microscopia come parametro per valutarne la risoluzione delle ottiche. L'apertura numerica è definito come il prodotto tra l'indice di rifrazione  $n$  e il seno dell'apertura angolare della lente.

$$NA = n \sin \theta \quad (1.1)$$

Da questa formula, Abbe continuò il suo lavoro arrivando a definire anche il potere risolutivo, cioè la distanza minima tra due oggetti diversi affinché possano essere distinti.<sup>[16]</sup>

$$d = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} \quad (1.2)$$

Quando l'aria è usata come mezzo di trasmissione, si ha un indice di rifrazione pari a 1, mentre si può arrivare fino a circa  $n = 1.5$  immergendo il campione e l'obiettivo in olio. L'apertura angolare massima teorica è di  $180^\circ$ , il che si traduce in un valore di  $\theta = 90^\circ$ , tuttavia le lenti presenti ad oggi in commercio presentano un'apertura angolare di  $144^\circ$ , che corrisponde a un valore di  $\sin(\theta = 72^\circ) \approx 0.95$ .<sup>[17]</sup>

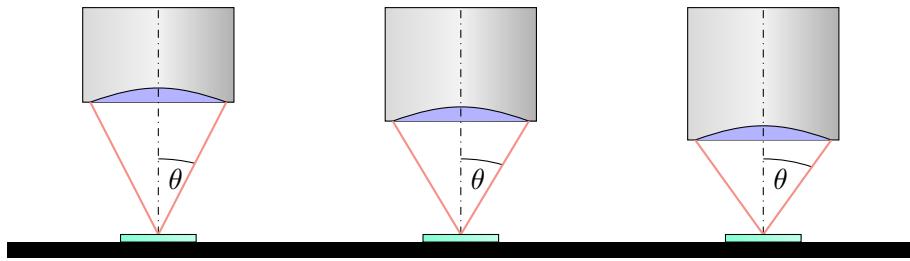


Figura 1.2: Obiettivi con diverse aperture

Per migliorare il potere risolutivo oltre il limite dei 250 nm, per le lunghezze d'onda dello spettro visibile, si possono usare onde elettromagnetiche con lunghezza minore, come i raggi X o i raggi ultravioletti, oppure raggi di altra natura, come i fasci di elettroni. Queste tecniche portano a risoluzioni maggiori ma presentano anche delle criticità, come una scarsa risposta da parte del campione oppure tossicità.<sup>[18]</sup>

## 1.2 Microscopio elettronico

La scoperta che i raggi di elettroni si comportano come onde con lunghezze d'onda molto più corte della luce visibile aprì nuove possibilità per l'osservazione dei dettagli microscopici. I primi prototipi di microscopi elettronici furono realizzati da *Max Knoll* e *Ernst Ruska*<sup>[19]</sup> e già nel 1933 furono in grado di osservare strutture oltre il limite imposto dai microscopi ottici tradizionali.<sup>[20]</sup>

I microscopi elettronici utilizzano un fascio di elettroni al posto della luce e delle lenti magnetiche al posto delle lenti ottiche. Usando raggi di elettroni invece che di luce, questi microscopi non misurano l'interazione tra materia e luce ma tra materia ed elettroni, aprendo le porte a nuovi campi di studio.

Il campione da esaminare è posto tra il cannone elettronico e il rilevatore e l'immagine si forma in base a come gli elettroni vengono trasmessi attraverso il campione, che deve essere molto sottile (meno di 100 nm). Questo tipo di microscopi si chiama

microscopio elettronico *a trasmissione* (Transmission Electron Microscopy — TEM) e i modelli più recenti possono arrivare a risoluzioni spaziali fino a  $0.5 \text{ \AA}$  ( $50 \text{ pm}$ ).<sup>[21]</sup>

Un altro tipo di microscopio elettronico è quello *a scansione* (Scanning Electron Microscopy — SEM), in cui non si rileva il fascio trasmesso attraverso il campione, bensì i raggi secondari che sono generati dall'interazione del fascio con il campione (come elettroni secondari o raggi X). Questa tecnica può generare immagini tridimensionali e non richiede un campione sottile quanto la TEM. Modelli recenti di SEM possono arrivare a risoluzioni spaziali fino a  $0.4 \text{ nm}$ .<sup>[22]</sup>

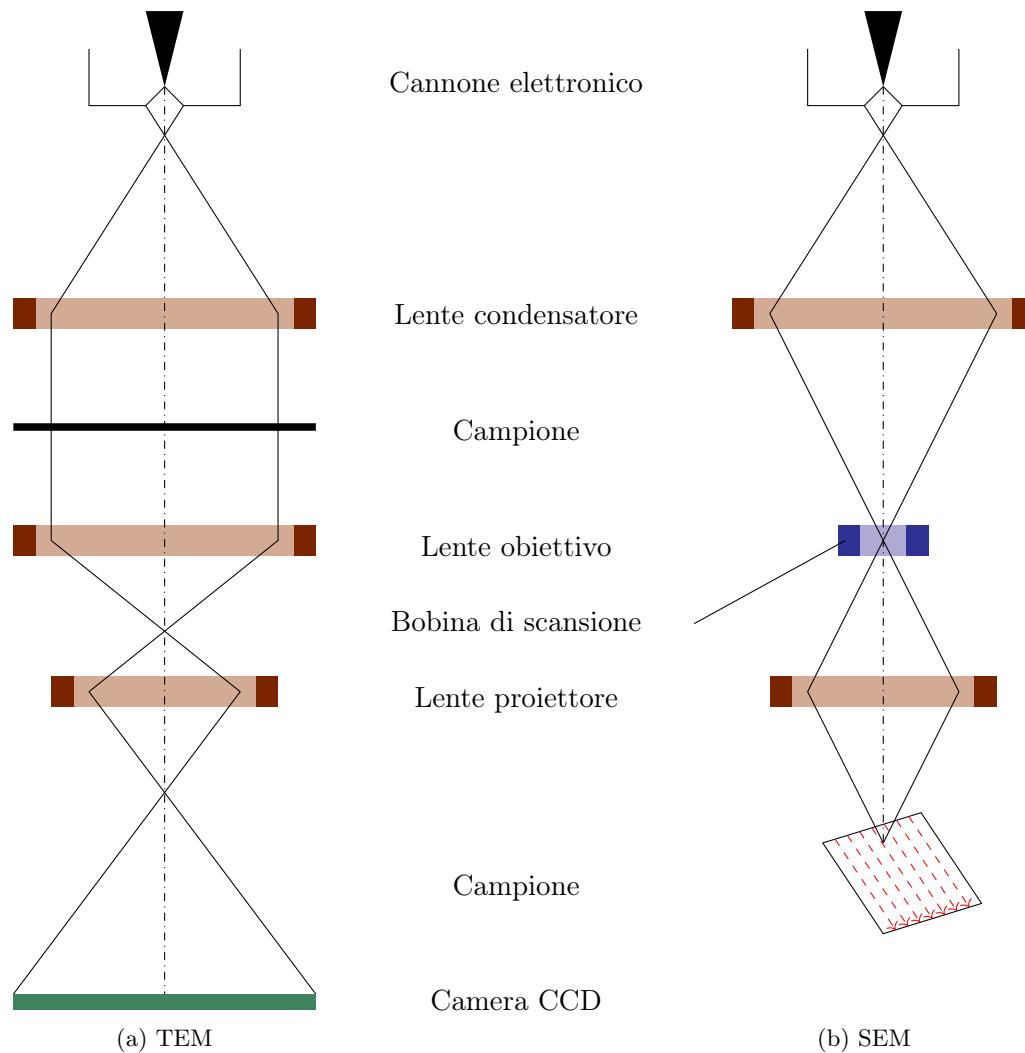


Figura 1.3: Principio di funzionamento dei microscopi TEM e SEM

Una limitazione di questi tipi di microscopi è che il campione deve essere conduttivo, altrimenti gli elettroni si accumulano sulla superficie del campione e lo caricano, distorcendo l'immagine. Per questo motivo, i campioni non conduttori devono essere

rivestiti con uno strato di metallo (come oro o carbonio) per permettere la conduzione degli elettronni.

### 1.3 Microscopio a effetto tunnel

La microscopia a scansione di sonda (SPM) fu sviluppata nel 1981 con l'invenzione del microscopio a effetto tunnel (STM).<sup>[23]</sup> Questo tipo di microscopi rileva la superficie del campione usando una minuscola punta su cui è imposta una differenza di potenziale con il piano di osservazione. Mantenendo l'altezza della punta costante, si può misurare direttamente la variazione di corrente attraverso il campione in movimento, mentre per misurarne l'altezza si può mantenere costante la corrente e applicare un feedback al motore piezoelettrico che regola l'altezza della punta. Avendo una risoluzione di 0.1 nm, questa tecnica permette di osservare singoli atomi, ma può essere usata solo se il campione è conduttivo.<sup>[24]</sup>

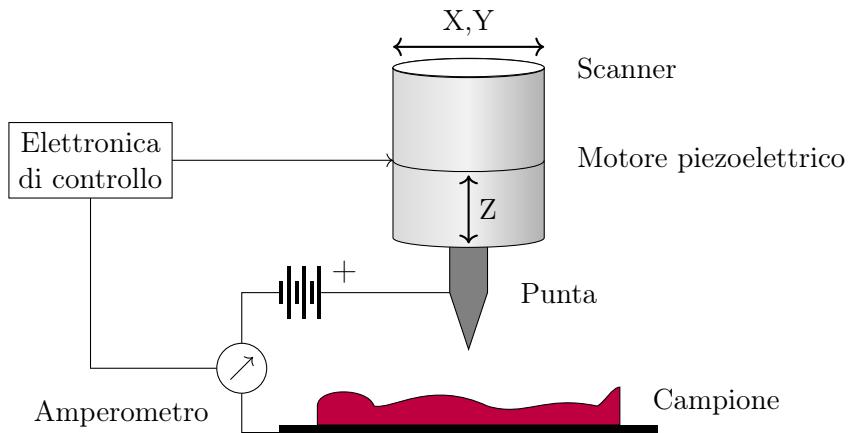


Figura 1.4: Principio di funzionamento di un microscopio a effetto tunnel

### 1.4 Atomic Force Microscopy

Una delle tecniche di microscopia che sono state usate per acquisire le immagini trattate in questa tesi è la microscopia a forza atomica (AFM). Questa tecnica è stata sviluppata nel 1986 da *Gerd Binnig* e *Heinrich Rohrer* ed è un altro tipo di tecnica di microscopia SPM che, permettendo di osservare campioni non conduttori, a differenza della microscopia STM, ha aperto la strada a nuove applicazioni.<sup>[25]</sup>

I microscopi AFM usano una punta di diametro di circa 10 nm fissata a un braccio elastico (*cantilever*), che viene fatta scorrere sulla superficie del campione. La

dimensione della punta è importante perché influisce sulla risoluzione spaziale dell'immagine, che può essere minore di un nanometro. La fabbricazione di punte con un raggio così piccolo è una delle limitazioni principali della microscopia AFM e il loro spessore minuscolo fa sì che possano essere facilmente danneggiate.

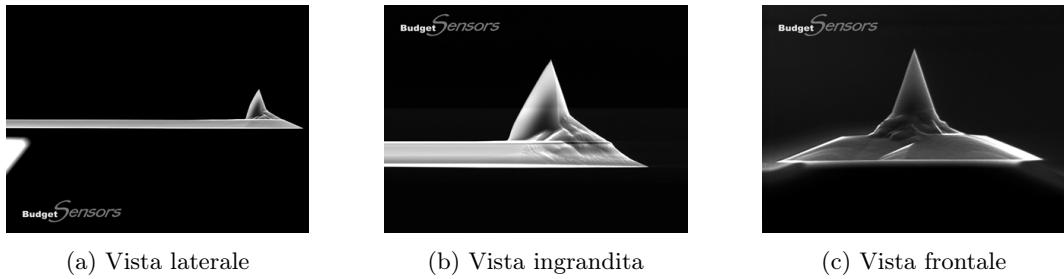


Figura 1.5: Punta di un microscopio AFM vista al microscopio SEM [26]

Durante la scansione, la punta viene inclinata verso l'alto e il basso a causa della forza di interazione con il campione, che può essere di tipo repulsivo o attrattivo in base alla modalità di scansione. Queste inclinazioni vengono misurate da un raggio laser che viene riflesso dal cantilever su un fotodiode a quadranti. L'inclinazione del cantilever deflette il raggio laser, che si sposta fra i quadranti del fotodiodo, e il segnale misurato dal fotodiodo viene poi convertito in una variazione di altezza della punta, che viene usata per generare l'immagine del campione.

Per effettuare la scansione, il supporto su cui poggia il campione viene spostato da un sistema piezoelettrico, che può espandersi e contrarsi con una precisione nanometrica applicando una piccola tensione imposta, dell'ordine dei mV. Gli elementi piezoelettrici sono in grado di muoversi in tre direzioni ( $X, Y, Z$ ) e sono controllati da un sistema elettronico che regola il movimento del campione in modo da mantenere il segnale di riferimento costante. Con questo sistema si possono apprezzare variazioni di altezza fino a 0.01 nm.<sup>[27]</sup>

I microscopi AFM possono essere usati in diverse modalità, a seconda del tipo di interazione che si vuole misurare. Queste modalità possono essere divise in tre categorie principali:

- Modalità a contatto
- Modalità a contatto intermittente
- Modalità senza contatto

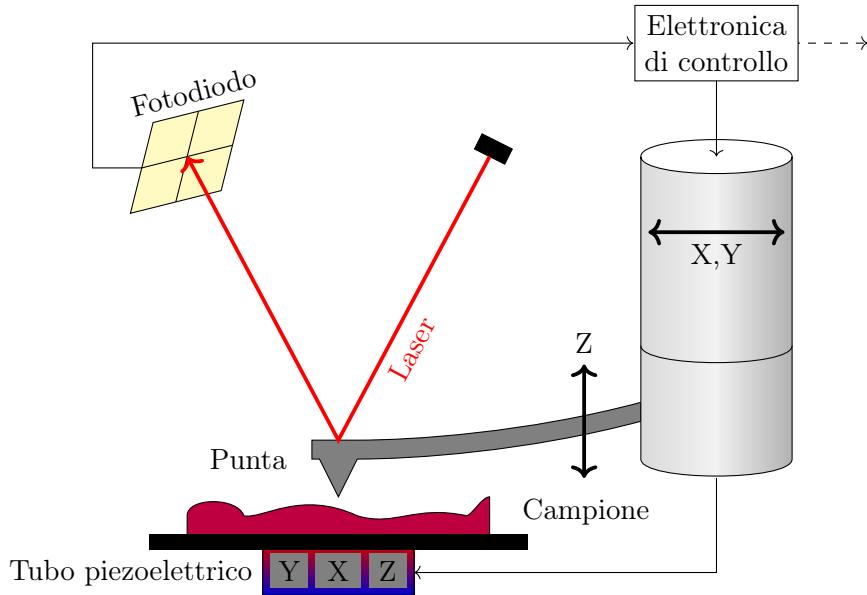


Figura 1.6: Princípio di funzionamento di un microscopio AFM



Figura 1.7: Modalità di funzionamento di un microscopio AFM

#### 1.4.1 Modalità a contatto

Nella modalità a contatto la forza normale, quindi l'inclinazione verticale del cantilever, è mantenuta costante durante la scansione. Quando la punta si sposta sopra una parte protrudente del campione, il cantilever viene spinto verso l'alto e si crea un errore sull'inclinazione verticale. Per correggere questo errore, il controllore alza la punta finché l'errore non si annulla. Quando si incontrano delle depressioni nel campione si opera il procedimento opposto, abbassando la punta.

Questa modalità permette anche di misurare le forze di attrito tra la superficie del campione e la punta ma non è utilizzabile su campioni biologici perché troppo delicati. La forza esercitata dalla punta può provocare stimoli meccanici non sostenibili per delle cellule e deformare le biomolecole.<sup>[28]</sup>

Idealmente, la forza dovrebbe essere minore di 100 pN per essere utilizzabile su biomolecole e nell'ordine dei nN per le cellule. Per questo motivo, vengono usati dei cantilever con una bassa costante elastica per diminuire il rumore, aumentare la sensibilità e diminuire la forza di interazione.<sup>[29]</sup>

Un altro problema dell'uso di modalità a contatto è la possibilità che cellule poco

aderenti o particelle di sporco si attacchino al cantilever.

#### 1.4.2 Modalità a contatto intermittente

Nella modalità a contatto intermittente, il cantilever oscilla verticalmente alla sua frequenza di risonanza, o poco meno. Quando la punta scansiona il campione, la sua altezza diminuisce l'ampiezza delle oscillazioni del cantilever che vengono misurate dal fotodiodo. Il segnale di controllo viene regolato in modo che, nel punto più basso del ciclo di oscillazione, la punta tocchi appena il campione. L'ampiezza di queste oscillazioni è quindi una misura delle interazioni tra la punta e il campione. Muovere la punta in alto e in basso, in modo da mantenere la stessa ampiezza di oscillazione, permette di ottenere una topografia del campione.

Altre informazioni che si possono ottenere sono l'ampiezza e la fase dell'errore tra l'oscillazione del cantilever e il segnale di riferimento. Questo scostamento dal segnale di riferimento è causato dalla dissipazione di energia tra la punta e il campione, che può essere dovuta dalle deformazioni della superficie del campione o da forze di attrazione. Queste informazioni possono essere usate per ottenere proprietà viscoelastiche del campione e distinguere materiali diversi.<sup>[30]</sup>

Al contrario della modalità a contatto, la forza laterale è trascurabile visto che la punta tocca il campione solo per un istante ed è maggiormente indicata per campioni biologici, che altrimenti si muoverebbero liberamente insieme alla punta.<sup>[31]</sup>

Questa modalità di operazione è più lenta rispetto alla modalità a contatto a causa del meccanismo di scansione. Mentre nella modalità a contatto intermittente il segnale è generato dalla modulazione in ampiezza del cantilever, nella modalità a contatto si usa la deflessione del cantilever, che varia molto più velocemente. Questa differenza si riflette anche nel comportamento del controllore: la modalità a contatto è più stabile ad alti guadagni, che invece possono generare forti artefatti o immagini rumorose nella modalità a contatto intermittente. I parametri del controllore devono quindi essere scelti con più attenzione.

#### 1.4.3 Modalità senza contatto

Nella modalità senza contatto, la punta non tocca mai il campione ma mantiene comunque un'alta sensibilità alla sua topologia. Per fare ciò, la punta deve trovarsi

abbastanza vicino al campione da entrare nel suo campo di forze, ma senza passare nella regione attrattiva usata per le modalità a contatto.

Questa scelta comporta l'uso di un cantilever molto rigido che rimane molto vicino alla superficie del campione per osservare come cambiano l'ampiezza e la fase della sua oscillazione, evitando che passi al regime repulsivo. Questi sono effetti della variazione della frequenza di oscillazione in risposta alle forze applicate dalla superficie sulla punta (forze di van der Waals).

Per questa modalità si usa un cantilever ad alta frequenza di risonanza, tipicamente compresa tra 300 e 400 kHz, e bassa ampiezza di oscillazione, di circa 10 nm.<sup>[32]</sup> Come per la modalità a contatto intermittente, la velocità di scansione è più bassa di quella della modalità a contatto, ma queste proprietà del cantilever permettono di avere velocità maggiori della modalità a contatto intermittente.

Non entrando mai nella regione ripulsiva, questa modalità presenta il più basso rischio di danneggiare o contaminare la punta e il campione.<sup>[33]</sup>

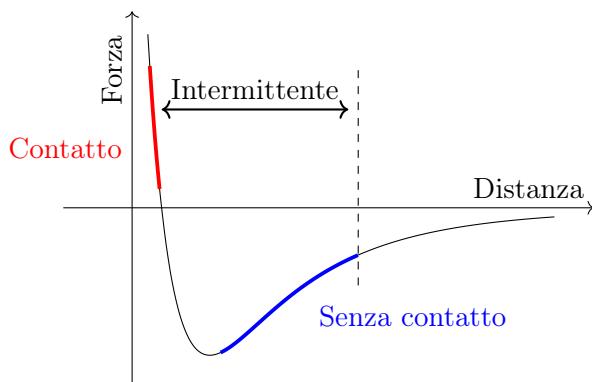


Figura 1.8: Grafico delle forze di van der Waals secondo il modello di Lennard-Jones  
 Semipiano superiore: Forze repulsive  
 Semipiano inferiore: Forze attrattive

Le modalità descritte nei paragrafi precedenti fanno tipicamente uso della modulazione in ampiezza. L'uso della modulazione in frequenza è limitato in quanto richiede attrezzature specifiche e un ambiente a vuoto ultra spinto. Usare una modalità oscillante a modulazione in frequenza ha anche dei vantaggi, come una risoluzione più alta.<sup>[34]</sup>

#### 1.4.4 Sistema di controllo

Il controllo del sistema è affidato a un controllore PID (Proportional-Integrative-Derivative), di gran lunga il tipo di sistema di controllo più usato (nel 95% di tutti i casi).<sup>[35]</sup>

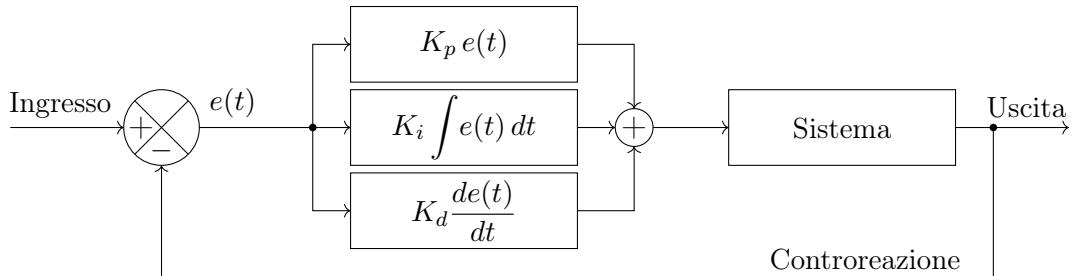


Figura 1.9: Diagramma di un controllore PID ad anello chiuso  
 $e(t)$ : funzione di errore

Quando le forze di interazione tra la punta e il campione cambiano, il cantilever si flette e, di conseguenza, modifica l'uscita del fotodiodo facendola deviare dal valore di ingresso. La differenza tra ingresso e uscita è la funzione di errore  $e(t)$ .

Il controllore PID agisce su questa funzione e il suo comportamento è composto da tre azioni indipendenti, controllate da altrettante variabili di regolazione.<sup>[36]</sup>

- Il termine **P** (*azione proporzionale*) è proporzionale alla funzione di errore
- Il termine **I** (*azione integrativa*) è l'integrale dei valori passati di  $e(t)$
- Il termine **D** (*azione derivativa*) è una stima delle variazioni future di  $e(t)$

Il sistema di feedback comprende tre meccanismi principali: <sup>[37]</sup>

1. Il tubo piezoelettrico per il controllo del movimento e della posizione della punta rispetto alla superficie del campione
2. Il cantilever e il sistema ottico per la misura della distanza tra la sonda e la superficie del campione
3. Il circuito di controllo per mantenere una deflessione costante correggendo la tensione applicata al tubo piezoelettrico

Per sua natura, un microscopio AFM è molto versatile e presenta molti parametri che si possono regolare per ottimizzare la resa delle immagini. Partendo da quelli più generali, si può impostare una modalità operativa, come quelle descritte sopra (vedi 1.4.1, 1.4.2, 1.4.3), e un tipo di cantilever che più si adattano al campione scelto.

Passando ai parametri di scansione, si possono impostare la velocità e l'area di scansione controllando opportunamente il sistema piezoelettrico su cui poggia il campione. L'area di scansione rappresenta il campo di osservazione del campione (es.  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ ) ed influenza la risoluzione delle immagini. La velocità di scansione, espressa in  $\mu\text{m}/\text{s}$  o linee al secondo (Hz), è inversamente proporzionale alla qualità dell'immagine, ma con basse velocità aumenta il rischio di muovere parti del campione.

È possibile anche regolare dei parametri relativi all'interazione tra la punta e il campione, come l'ampiezza e la frequenza di oscillazione (solo in modalità oscillanti) e la forza di carico desiderata. Per regolare questi parametri si può operare sull'ingresso del sistema e sul guadagno dell'anello di feedback.

## 1.5 Scanning Near-field Optical Microscopy

L'altra tecnica di microscopia usata per ottenere le immagini studiate in questa tesi è la microscopia ottica a scansione del campo vicino (Scanning Near-field Optical Microscopy — SNOM). Questa tecnica riesce a superare il limite di risoluzione sfruttando delle proprietà dei campi evanescenti. Ad *Edward Hutchinson Synge* è attribuito il merito di aver proposto per primo questa tecnica nel 1928,<sup>[38]</sup> ma il primo microscopio SNOM fu costruito solo nel 1984 da *Dieter Pohl*.<sup>[39]</sup>

I campi evanescenti possono essere descritti da onde piane della forma  $\mathbf{E}e^{i(\mathbf{k}\mathbf{r}-\omega t)}$ , che sono caratterizzate dal fatto che almeno una componente del vettore d'onda  $\mathbf{k}$ , che descrive la direzione di propagazione, è immaginaria. Nella direzione spaziale definita dalla componente immaginaria, l'onda non si propaga ma decade esponenzialmente. I campi evanescenti sono di grande importanza per lo studio e la comprensione dei campi ottici confinati a dimensioni inferiori alla lunghezza d'onda.<sup>[40]</sup>

Come descritto nel paragrafo 1.1.1, un microscopio ottico tradizionale, per ottenere un'immagine del campione, deve raccogliere tutta la luce diffratta nel campo lontano, che si propaga senza restrizioni. Al contrario, la microscopia SNOM utilizza un laser la cui luce è concentrata in un'apertura di diametro molto inferiore alla sua lunghezza d'onda, creando un campo evanescenze dall'altro lato dell'apertura.<sup>[41]</sup> Quando il campione viene scansionato ad una piccola distanza sotto l'apertura ( $< 10 \text{ nm}$ ), la risoluzione ottica della luce trasmessa o riflessa è limitata solo dal diametro

dell’apertura. I campi evanescenti trasportano informazioni ad alte frequenze spaziali sul campione e permettono di arrivare a una risoluzione laterale di 6 nm<sup>[42]</sup> e una risoluzione verticale di 2 nm.<sup>[43]</sup>

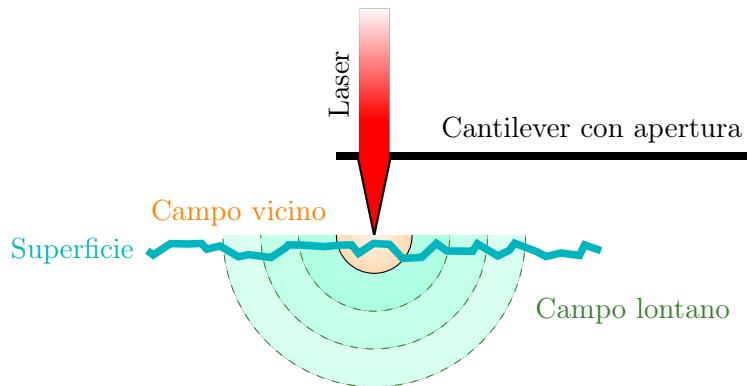


Figura 1.10: Princípio di funzionamento di un microscopio SNOM

Poiché le onde evanescenti sono confinate a una regione prossima alla superficie del mezzo che le origina, è necessario portare il rilevatore entro l’intervallo della lunghezza d’onda della radiazione utilizzata. Su queste onde si applica il *principio di reciprocità di Helmholtz*, secondo cui il campo vicino può essere convertito in onde propaganti dal rilevatore. Grazie a questo principio, i raggi entranti e uscenti possono essere considerati uno come il reciproco dell’altro, permettendo di usare la sonda ottica sia come sorgente che come rilevatore.<sup>[44]</sup>

Per questo motivo, una delle limitazioni principali di questa tecnica è la distanza di lavoro molto breve e una profondità di campo estremamente ridotta. Normalmente questi microscopi sono usati per studi di superficie, ma si possono anche usare per studiare regioni di interesse sotto la superficie, posto che siano entro il limite della profondità di campo.<sup>[45]</sup>

### 1.5.1 Aperture SNOM

Nella microscopia a-SNOM la sonda ottica è installata nella punta, che ha un foro di dimensioni minori della lunghezza d’onda del raggio, da cui la luce può essere emessa o ricevuta. La luce è condotta alla punta da un cavo in fibra ottica monomodale e la punta ha uno strato metallico di rivestimento per riflettere i raggi. La dimensione dell’apertura può arrivare fino a circa 50 nm e influenza la risoluzione spaziale delle immagini.<sup>[46]</sup>

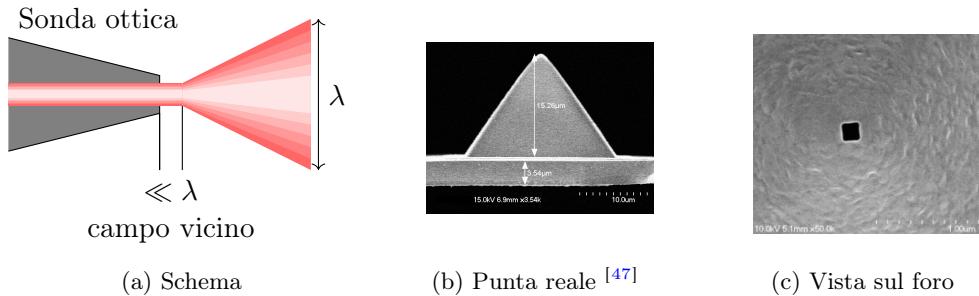


Figura 1.11: Ingrandimento sull'apertura della punta in un microscopio a-SNOM

La maggior parte dei microscopi a-SNOM usa un metodo simile a quello dei microscopi AFM senza contatto (*vedi* 1.4.3) basato sulla forza di taglio per controllare la distanza tra la punta e il campione. La sonda è messa in vibrazione alla sua frequenza di risonanza parallelamente alla superficie con un'ampiezza minore di 5 nm. L'ampiezza e la fase di queste oscillazioni della fibra sono monitorate da un apposito sensore di spostamento.<sup>[48]</sup>

## Modalità di operazione

I microscopi a-SNOM possono operare secondo diverse modalità, che dipendono principalmente dal percorso che compie la luce. Nella modalità più utilizzata la punta è usata sia per illuminare il campione che per raccogliere la luce generata nel campo vicino.<sup>[49]</sup>

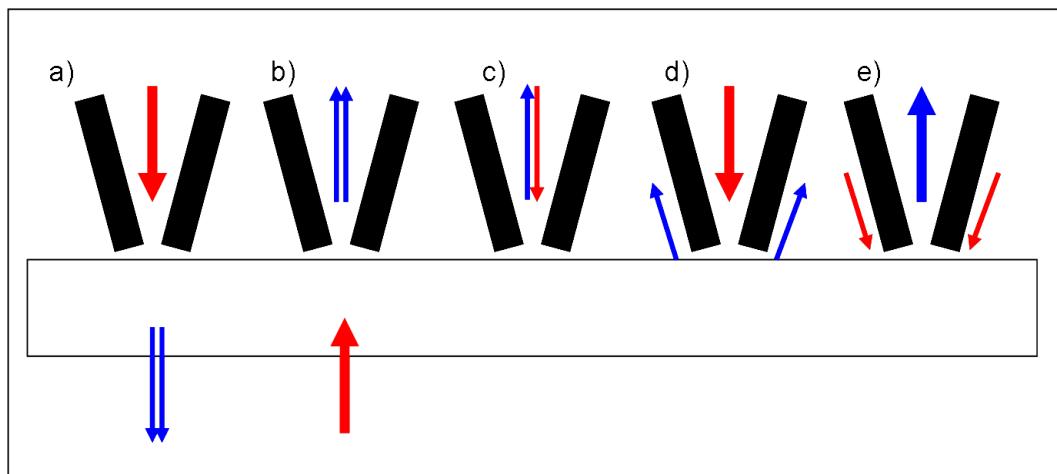


Figura 1.12: Modalità di illuminazione di un microscopio a-SNOM

- a) In questa configurazione, la luce viene emessa da un laser e trasmessa alla

punta dal cavo in fibra ottica. L'apertura estremamente ristretta della punta crea un campo evanescente sulla superficie del campione. Questo campo poi interagisce con il campione e la radiazione convertita viene diffusa e raccolta da un obiettivo ottico convenzionale nel campo lontano.

- b) Al contrario della modalità di illuminazione, il campione è illuminato esternamente con luce dal campo lontano (ad esempio un laser o una lampada), mentre la punta viene usata come un rivelatore. Le onde evanescenti sulla superficie del campione vengono convertite in onde propaganti dentro la punta e trasmesse al rilevatore.
- c) In questo caso, la punta illumina il campione e riceve anche la luce riflessa. Sia l'emissione che la raccolta avvengono attraverso la stessa apertura. In questo caso è necessario installare un dispositivo che separi i due flussi di luce.
- d-e) Queste modalità sono simili alle prime, con la differenza che si basano sulla luce riflessa per effettuare le misure.

### 1.5.2 Apertureless SNOM

La struttura di un microscopio *apertureless SNOM*, anche detto di tipo scattering (s-SNOM), è molto simile a quella di un microscopio AFM, in quanto sono entrambe tecniche di microscopia SPM, e per questo lo stesso macchinario può offrire entrambe le tecniche di acquisizione. Questi sistemi possono anche essere combinati con altre tecniche di imaging, come la spettroscopia Raman<sup>[50]</sup> o la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) <sup>[51]</sup>.

In questo caso si utilizza una punta metallica o rivestita in metallo per sondare il campo elettrico locale vicino al campione. Con una fonte di luce esterna a una frequenza a scelta, la punta metallica sparge la luce in base alla sua polarizzabilità. La presenza del campione sotto la punta metallica modifica la polarizzabilità della punta in funzione della costante dielettrica del campione. Scansionando la punta metallica sulla superficie del campione con un microscopio AFM in modalità a contatto intermittente (*vedi* 1.4.2) si ottiene il segnale usato per formare l'immagine contenente informazioni sulle proprietà ottiche del campione.<sup>[52]</sup>

I modelli numerici per lo studio delle interazioni nel campo vicino tra la punta e la superficie del campione usano tecniche di elaborazione diverse, come il modello a

dipolo puntiforme e a dipolo finito.<sup>[53]</sup>

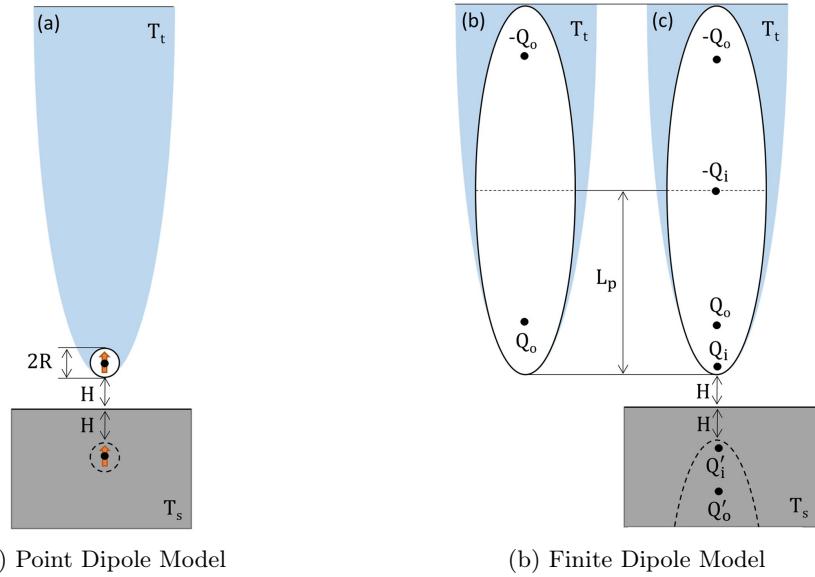


Figura 1.13: Modelli di dipoli usati per elaborare le radiazioni nel campo vicino

Nel modello a dipolo puntiforme la punta della sonda è modellizzata come un punto con un certo momento di dipolo  $\mathbf{p}$  generato dal campo elettrico incidente  $\mathbf{E}$ . Il momento del dipolo è, quindi

$$\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E} \quad (1.3)$$

dove  $\alpha$  è il tensore di polarizzabilità della punta. Il campione genera un dipolo immagine che modifica il campo elettrico locale percepito dalla punta. La misurazione viene effettuata sulla radiazione prodotta da questo dipolo indotto. Questa approssimazione è buona per studi qualitativi ma ignora la geometria reale della punta e non tiene conto della distribuzione delle cariche lungo essa.<sup>[54]</sup>

Nel modello a dipolo finito la punta è rappresentata come un oggetto esteso, come uno sferoide. Il momento di dipolo non è quindi localizzato in un solo punto, ma è distribuito lungo l'asse. Questo modello è più accurato, specialmente per punte lunghe, e tiene conto delle risonanze plasmoniche lungo la punta.<sup>[55]</sup>

La rilevazione del segnale è effettuata da un interferometro di Michelson, con la particolarità che uno degli specchi è mobile. Questa tecnica di misura prende il nome di spettroscopia a trasformata di Fourier (FTS). Il segnale viene registrato mentre lo specchio è in movimento, creando un interferogramma, e poi convertito in uno spettro dalla trasformata.<sup>[56]</sup>

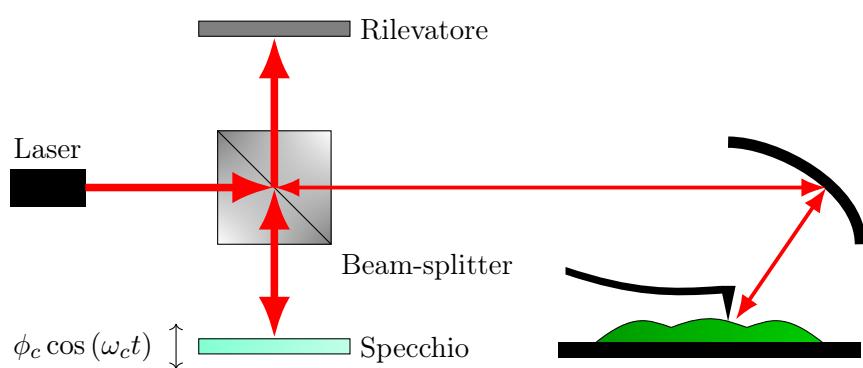


Figura 1.14: Sistema di rilevazione a pseudo-eterodina per microscopia s-SNOM

## Capitolo 2

# Immagini di batteri ESKAPE

### 2.1 SSNOMBACTER

Le immagini elaborate in questa tesi sono prese dal dataset di SSNOMBACTER, pubblicato su GigaScience nel 2020. Questo dataset comprende oltre 4000 immagini di 15 diverse specie batteriche generate da un microscopio s-SNOM con lo scopo di promuovere applicazioni nella Microbiologia e aumentare la popolarità di questa tecnica.<sup>[5]</sup>

Queste immagini sono state generate da un microscopio NeaSNOM in modalità a contatto intermittente usando un laser con una lunghezza d'onda di  $1,550 \text{ } \mu\text{m}$  ( $6,451.61 \text{ cm}^{-1}$ ) e un cantilever placcato in oro con un raggio alla punta minore di  $35 \text{ nm}$ , una frequenza di risonanza di  $65\text{kHz}$  e una costante elastica di  $0.5 \text{ N/m}$ . (HQ:NSC19/Cr-Au)<sup>[57]</sup>

Per ogni specie batterica sono state generate almeno 3 immagini su regioni diverse con un campo visivo di  $10 \text{ } \mu\text{m} \times 10 \text{ } \mu\text{m}$ , e almeno una con un campo visivo ingrandito, tra  $2 \text{ } \mu\text{m} \times 2 \text{ } \mu\text{m}$  e  $4 \text{ } \mu\text{m} \times 4 \text{ } \mu\text{m}$ , in base alle dimensioni della specie selezionata. Sono state generate sia immagini SNOM che AFM della stessa regione esaminata per avere una caratterizzazione più completa e dettagliata delle specie batteriche, potendo infatti ricavare sia proprietà ottiche che topologiche o morfologiche usando degli appositi algoritmi di elaborazione.

Le immagini s-SNOM provvedono l'ampiezza e la fase dello spettro, da cui è possibile ricavare le proprietà dielettriche del campione, mentre le immagini AFM ne provvedono la topografia e le proprietà viscoelastiche. L'oggetto di questa tesi è comparare i due tipi di immagini e verificare quali caratteristiche morfologiche

possono essere estratte da esse.

I dati delle scansioni sono disponibili sia in formato *Gwyddion Simple Fields*<sup>[58]</sup> (.gsf)<sup>1</sup>, in cui sono disponibili i valori reali delle scansioni, sia come immagini .tiff con valori interi compresi tra 0 e 255. Ogni scansione è locata in una cartella a sé e i nomi dei file seguono questo modello:

[ceppo batterico] [numero FOV] [abbreviazione tipo immagine]

Ogni scansione è inoltre provvista di un file .txt con i parametri di acquisizione usati, come il tempo di integrazione, la frequenza di oscillazione della punta, i parametri del controllore PID, la sorgente laser e la frequenza di modulazione.

Abbr.	Descrizione
M0A	AFM — Errore topografia
M1A	AFM — Errore topografia; 1 <sup>a</sup> armonica
M2A	AFM — Errore topografia; 2 <sup>a</sup> armonica
M3A	AFM — Errore topografia; 3 <sup>a</sup> armonica
M4A	AFM — Errore topografia; 4 <sup>a</sup> armonica
M5A	AFM — Errore topografia; 5 <sup>a</sup> armonica
M1P	AFM — Fase topografia; 1 <sup>a</sup> armonica
M2P	AFM — Fase topografia; 2 <sup>a</sup> armonica
M3P	AFM — Fase topografia; 3 <sup>a</sup> armonica
M4P	AFM — Fase topografia; 4 <sup>a</sup> armonica
M5P	AFM — Fase topografia; 5 <sup>a</sup> armonica
O0A	SNOM — Ampiezza
O1A	SNOM — Ampiezza; 1 <sup>a</sup> armonica
O2A	SNOM — Ampiezza; 2 <sup>a</sup> armonica
O3A	SNOM — Ampiezza; 3 <sup>a</sup> armonica
O4A	SNOM — Ampiezza; 4 <sup>a</sup> armonica
O5A	SNOM — Ampiezza; 5 <sup>a</sup> armonica
O1P	SNOM — Fase; 1 <sup>a</sup> armonica
O2P	SNOM — Fase; 2 <sup>a</sup> armonica
O3P	SNOM — Fase; 3 <sup>a</sup> armonica
O4P	SNOM — Fase; 4 <sup>a</sup> armonica
O5P	SNOM — Fase; 5 <sup>a</sup> armonica
Z	AFM — Topografia

Tabella 2.1: Tipi di immagini presenti nel dataset

---

<sup>1</sup>La specifica del file è disponibile online  
URL: <https://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/gsf.html>

## 2.2 Batteri

In Microbiologia, i batteri sono un regno (*Bacteria*) comprendente organismi unicellulari procarioti, le cui dimensioni possono variare tra circa 0.2  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$ .<sup>[59]</sup> I batteri sono stati tra le prime forme di vita ad apparire sulla Terra e sono presenti nella maggior parte dei suoi habitat. Alcuni batteri sono innocui, o perfino utili<sup>[60]</sup>, per gli altri esseri viventi ma altre specie possono vivere a spese loro e arrecargli danni, anche gravi.<sup>[61]</sup>

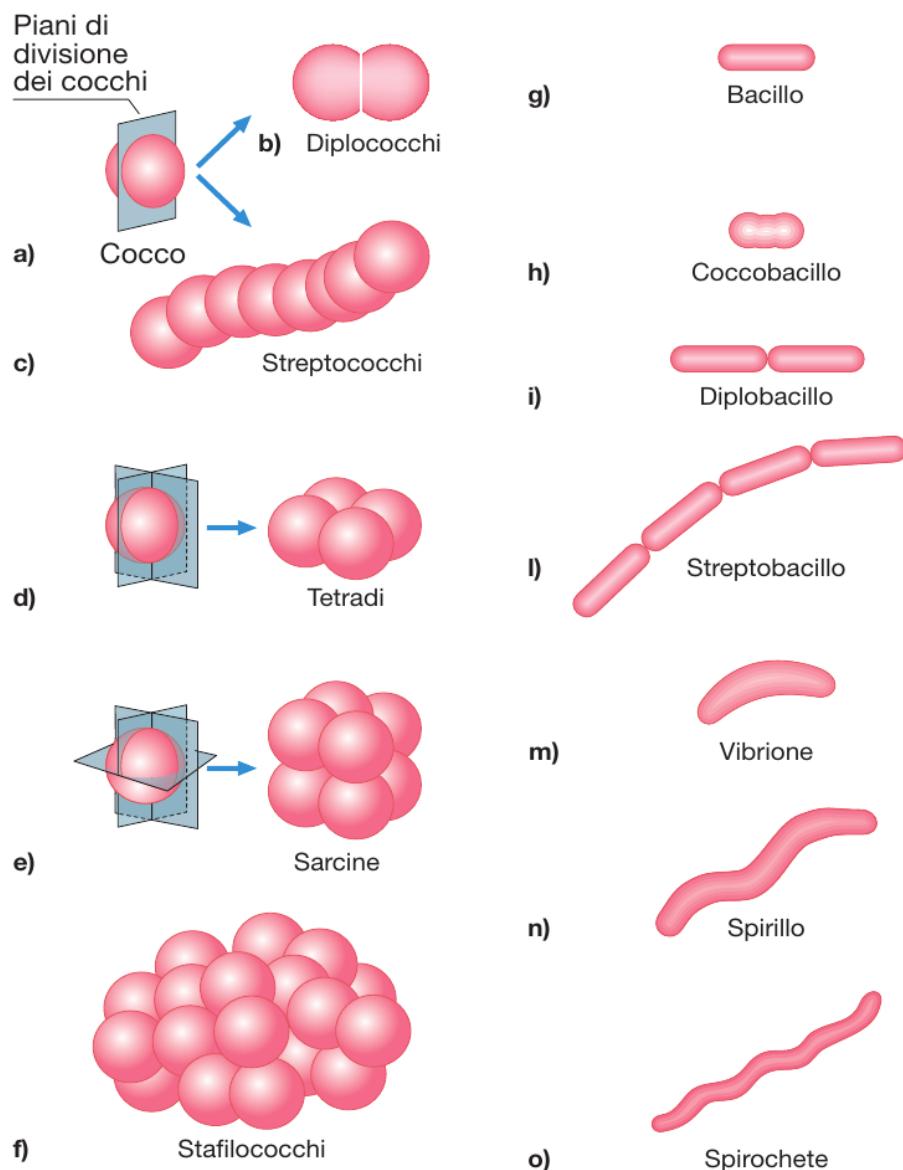


Figura 2.1: Tipiche forme di aggregati batterici [62]

### 2.2.1 Morfologia

Le dimensioni ridotte dei batteri fa sì che il loro rapporto superficie/volume sia in genere molto più elevato di quello delle cellule eucariote (dimensioni lineari tipiche nell'ordine delle decine di  $\mu\text{m}$ ), con ovvie conseguenze sulla velocità con cui avvengono gli scambi molecolari tra cellula e ambiente, il trasporto di nutrienti, la crescita, la divisione cellulare e, di conseguenza, anche l'evoluzione. [62]

Essendo organismi unicellulari, i batteri presentano una limitata varietà di forme, che si possono raggruppare in questi gruppi: **Cocchi**, **Bacilli**, **Coccobacilli**, **Spirali**, **Elicoidali**.

Un **bacillo**, anche chiamato *batterio bacilliforme*, è un microrganismo a forma di bastoncino. Esiste anche un genere tassonomico chiamato *Bacillus* ma i bacilli si possono trovare anche in molti altri gruppi batterici. I bacilli di solito si dividono sullo stesso piano e sono solitari, ma possono anche combinarsi in agglomerati:

- I diplobacilli sono coppie di bacilli legate sul lato corto.
- Gli streptobacilli sono catene di bacilli.
- I coccobacilli hanno una forma più ovale, simile ai cocchi.

Un **cocco**, anche chiamato *batterio coccoide*, è un microrganismo la cui forma è pressoché sferica. I batteri coccoidi si presentano spesso in disposizioni caratteristiche e anche queste forme hanno nomi specifici: [63]

- I diplococchi sono coppie di cocchi.
- Gli streptococchi sono catene di cocchi (come *Streptococcus pyogenes*).
- Gli stafilococchi sono gruppi irregolari di cocchi (com *Staphylococcus aureus*).
- I tetradi sono cluster di quattro cocchi disposti all'interno dello stesso piano (come *Micrococcus sp.*).
- I Sarcina sono cluster di otto cocchi a disposizione cuboidale (come *Sarcina Ventriculi*).

Contrariamente a molti batteri bacilliformi, la maggior parte dei batteri cocchi non ha flagelli e non possono muoversi autonomamente.[64]

### 2.2.2 Parete cellulare

La morfologia batterica è determinata da una parete costituita da una macromolecola gigante di **peptidoglicano**, un polisaccaride complesso, che avvolge tutta la cellula. La parte più interna di questa struttura è la membrana plasmatica ed è presente in tutte le cellule. La parete invece può assumere strutture diverse, che definiscono la Gram-positività di un batterio, o anche avere appendici sulla superficie (come dei flagelli) e ulteriori strati. Queste strutture di superficie conferiscono loro ulteriori proprietà per interagire con ambienti complessi, come ad esempio quelli costituiti da altre cellule, incluse quelle di ospiti animali, vegetali o micobici con cui il microrganismo può instaurare relazioni di simbiosi o di parassitosi.<sup>[65]</sup>

La classificazione dei batteri secondo la colorazione di Gram prende il nome dal suo autore *Hans Christian Gram*, che sviluppò il metodo nel 1884. Questo metodo consente di distinguere tra batteri Gram-positivi e Gram-negativi sulla base della colorazione differenziale tra un complesso cristal violetto-iodio (CV-I) e una controcolorazione di safranina. Le pareti cellulari degli organismi Gram-positivi mantengono questo complesso dopo il trattamento con alcol e sembrano viola, mentre gli organismi Gram-negativi decolorano a seguito di tale trattamento e sembrano rosa. Questo metodo è ancora oggi utile per valutare la contaminazione batterica dei campioni di coltura tissutale o per esaminare lo stato della colorazione di Gram e le caratteristiche morfologiche dei batteri isolati da colture batteriche miste o isolate.<sup>[66]</sup>

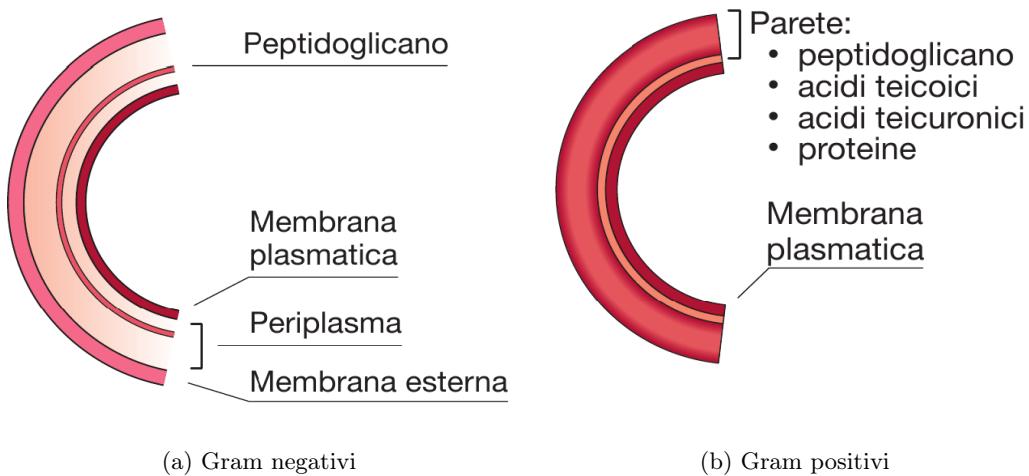


Figura 2.2: Rappresentazione schematica del rivestimento cellulare<sup>[62]</sup>

### 2.2.3 Fattori di virulenza

Comprendere i fattori di virulenza e patogenicità dei batteri è importante perché rappresentano dei potenziali obiettivi per il rilevamento degli agenti patogeni. Nel linguaggio comune questi termini sono spesso confusi o usati intercambiabilmente ma, per definizione, la patogenicità misura l'abilità di un organismo ad indurre una malattia, mentre la virulenza misura la gravità relativa della malattia.<sup>[67]</sup> Misurare la virulenza di un organismo è molto complesso a causa della molitudine di variabili che dipendono sia dal patogeno che dall'ospite e dalla loro interazione.<sup>[68]</sup>

Considerando i problemi sulla definizione della virulenza, anche i fattori di virulenza sono stati difficili da caratterizzare. Pertanto è importante comprendere i fattori di virulenza, poiché questi possono spesso essere utilizzati per rilevare i microrganismi patogeni. I fattori di virulenza tradizionali includono fattori che possono essere di aiuto in diverse fasi dell'infezione:<sup>[69]</sup>

- Adesione alla cellula ospite
- Ingresso nella cellula ospite
- Elusione del rilevamento da parte del sistema immunitario dell'ospite
- Replicazione intracellulare o extracellulare e inibizione della fagocitosi

Questi fattori possono essere sia necessari, ovvero che la presenza o meno del suo gene produttore influenzi la patogenicità della specie, oppure contributivi, cioè che alterano la gravità della malattia. Il consenso generale è che, indipendentemente dalla funzione di un prodotto genico, se la sua espressione porta a un danno alla cellula ospite, allora si tratta di un fattore di virulenza.<sup>[70]</sup>

### 2.2.4 Adesione

L'adesione ad una cellula ospite, o una matrice extracellulare, è un fattore importante per stabilire l'abilità di un microrganismo a provocare danni all'ospite. Questa adesione è mediata da molecole specifiche chiamate adesine, che possono essere proteiche e si suddividono principalmente in due categorie: adesine afimbriali (non filamentose) e fimbrie o pili, strutture filamentose presenti soprattutto nei batteri Gram-negativi (rari nei Gram-positivi).

I pili si osservano al microscopio elettronico come strutture simili a peli e sono fondamentali per l'adesione in batteri patogeni (come *Vibrio cholerae*), che è influenzata

in particolar modo dalle proteine sull'estremità dei pili.<sup>[71]</sup> Altri batteri possiedono più geni per la produzione di fimbrie, e solo la rimozione combinata di tutti questi operoni ha dimostrato di ridurre significativamente la virulenza, suggerendo che i fattori di adesione possono compensarsi a vicenda.

Un'altra forma di adesione piliforme sono i curli, presenti in ceppi di *Escherichia coli* e *Salmonella*.<sup>[72]</sup> Queste strutture sottili e irregolari sono altamente stabili e si legano a proteine dell'ospite come plasminogeno e fibronectina. Anche se i meccanismi di assemblaggio delle fimbrie variano, condividono caratteristiche strutturali comuni.<sup>[73]</sup>

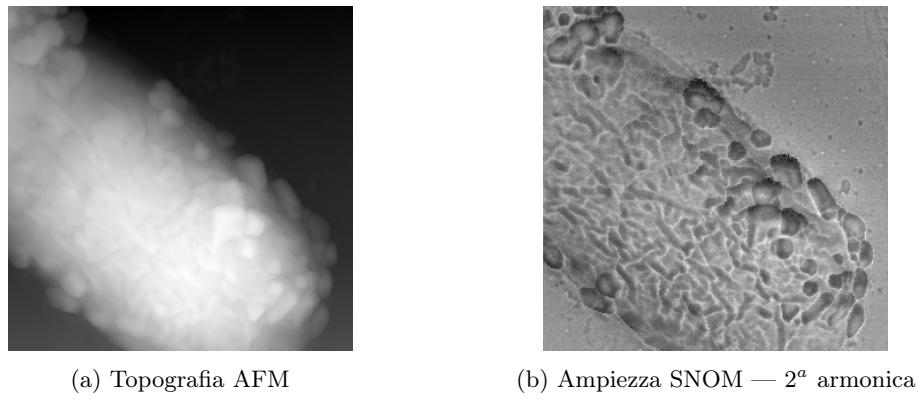


Figura 2.3: Un esemplare di *Escherichia Coli* visto al microscopio s-SNOM <sup>[74]</sup>  
Si possono apprezzare le strutture sulla parete cellulare

Molte adesine, oltre a favorire l'adesione, giocano un ruolo nella fuga dal sistema immunitario dell'ospite. Sia i batteri Gram-negativi che quelli Gram-positivi esprimono una vasta gamma di adesine, che si legano a un ampio numero di bersagli cellulari, come immunoglobuline, glicoproteine, glicolipidi e proteine della matrice extracellulare.<sup>[75]</sup>

In conclusione, l'adesione dei batteri all'ospite è un processo complesso, che coinvolge numerosi tipi di adesine e meccanismi fondamentali non solo per l'inizio dell'infezione, ma anche per la sopravvivenza e la diffusione del patogeno.

### 2.2.5 Plasticità morfologica

Alcune specie di batteri posseggono, inoltre, la capacità di modificare la loro forma e dimensioni in risposta a condizioni ambientali avverse, chiamata plasticità morfologica. Questa adattabilità consente ai batteri di sopravvivere e proliferare in ambienti ostili, come quelli caratterizzati da stress nutrizionali, esposizione a antibiotici o at-

tacchi del sistema immunitario dell’ospite. Questa strategia è fondamentale nella sopravvivenza dei batteri, permettendo loro di adattarsi e persistere in condizioni avverse per poi ritornare alla forma originale una volta ripristinate le condizioni favorevoli.<sup>[76]</sup>

### 2.2.6 Gruppo ESKAPE

Tra i ceppi batterici esaminati in SSNOMBACTER sono presenti alcuni ceppi patogeni altamente virulenti e resistenti a terapie antibiotiche. Questo gruppo di sei ceppi prende il nome di **ESCAPE**, formato dalle lettere iniziali di:

- *Enterococcus faecium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacter spp*

I ceppi batterici di questo gruppo, sia Gram-positivi che Gram-negativi, possono evadere gli antibiotici comunemente usati grazie alla loro resistenza multifarmaco.<sup>[6]</sup> Di conseguenza, questi batteri rappresentano una seria minaccia per la sanità globale poiché sono la causa principale delle infezioni correlate all’assistenza (ICA) e pongono un grave rischio per pazienti immunocompromessi.<sup>[7]</sup> La resistenza agli antibiotici è una crescente minaccia per la salute globale, che si prevede sarà la causa di oltre 40 milioni di morti entro il 2050.<sup>[8]</sup>

Questi batteri possono essere trovati in ambienti naturali, come terreni o specchi d’acqua, ma possono essere anche trasportati in altri luoghi a causa di una contaminazione, come superfici, tessuti, strumenti o mani. Essendo dei patogeni opportunistici, è possibile che un paziente venga infettato da uno di questi batteri dopo un intervento chirurgico o durante la degenza in ospedale.<sup>[85]</sup>

A causa delle pressioni e dei fattori selettivi naturali e innaturali, la resistenza agli antibiotici nei batteri di solito emerge attraverso una mutazione genetica o acquisisce geni resistenti agli antibiotici (Antibiotic-Resistant Genes — ARGs) attraverso il trasferimento orizzontale di geni, un processo di scambio genetico attraverso il quale

Cepo batterico	Gram	Origine	Regioni acquisite
Achromobacter xylosoxidans ATCC 27061 (DSMZ 2402)T	—	Yabuuchi and Oyama 1971 [77]	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Acinetobacter baumannii ATCC 17978	—	Sahm et al. 1989 [78]	4 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Acinetobacter baumannii ATCC 19606T	—	ATCC (Bouvet and Grimont 1986) [79]	3 × (10 µm × 10 µm) 2 × (2 µm × 2 µm)
Bacillus subtilis subsp. spizizenii DSMZ 3471	+	ATCC	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (4 µm × 4 µm)
Burkholderia cenocepacia ATCC BAA-245 (LMG 16656)T	—	Govan et al. 1993 [80]	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Enterobacter aerogenes ATCC 13048 (DSMZ 30053)T	—	Bascomb et al. 1971 [81]	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Enterobacter cloacae ATCC 13047 (DSMZ 30054)T	—	Hormaeche and Edwards 1960 [82]	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Enterococcus faecali ATCC 29212	+	ATCC	3 × (10 µm × 10 µm) 3 × (2 µm × 2 µm)
Enterococcus faecalis ATCC 700802 (V583)	+	Sahm et al. 1989 [78]	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Enterococcus faecium ATCC 19434 (DSMZ 20477)T	+	Schleifer and Kilpper-Bälz 1984 [83]	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Escherichia coli MG1655 (ATCC 700926)T	—	ATCC	4 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Klebsiella pneumoniae ATCC 27736	—	ATCC	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Pseudomonas aeruginosa PAO1 (ATCC 15692)T	—	ATCC	3 × (10 µm × 10 µm) 2 × (2 µm × 2 µm)
Staphylococcus aureus ATCC 25923	+	ATCC	4 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Staphylococcus aureus ATCC 43300	+	ATCC	3 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Staphylococcus epidermidis SP1	+	Spallanzani Hospital, clinical isolate	4 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)
Stenotrophomonas maltophilia ATCC 13637 (DSMZ 50170)T	—	Palleroni and Bradbury 1993 [84]	4 × (10 µm × 10 µm) 1 × (3 µm × 3 µm)
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	+	ATCC	4 × (10 µm × 10 µm) 1 × (2 µm × 2 µm)

Tabella 2.2: Lista dei ceppi batterici esaminati in SSNOMBACTER [5]

ATCC: American Type Culture Collection

la resistenza agli antibiotici può diffondersi ad altri esemplari senza ricorrere alla riproduzione.[86]

Studiare questi fenomeni attraverso l'uso di tecniche di microscopia a super-risoluzione è di fondamentale importanza per comprendere meglio queste interazioni a livello molecolare e poter potenzialmente sviluppare dei farmaci più efficaci.

## Capitolo 3

# Metodi di elaborazione delle immagini

Nel lavoro svolto in questa tesi sono state prese in esame le immagini di topografia AFM e le ampiezze della 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> armonica s-SNOM per valutare l'efficacia di diverse tecniche di riduzione del rumore su questo tipo di immagini. Il rumore dipende anche dal tempo di integrazione per pixel del microscopio: impostare un periodo di tempo più alto permette di avere immagini con meno rumore a discapito di un tempo di scansione più lungo. Usare delle tecniche di riduzione del rumore su immagini ottenute con un tempo di integrazione basso, come nel caso delle immagini del dataset SSNOMBACTER, permette di aumentare la qualità delle immagini senza dover aumentare il tempo richiesto per l'acquisizione delle immagini.<sup>[9]</sup>

Nelle immagini s-SNOM, oltre a una maggiore rilevanza dei dettagli di superficie, sono presenti diversi tipi di rumore che invece sono assenti o molto ridotti nelle immagini della topografia AFM.

### 3.1 Tecniche di riduzione del rumore

#### 3.1.1 Filtro guassiano

Il **filtro guassiano** è uno dei filtri più usati nell'elaborazione delle immagini come tecnica di sfocatura, di riduzione del rumore e di eliminazione dei dettagli. Il filtro guassiano è un filtro lineare passa-basso efficace in particolare per rimuovere il rumore soggetto a una distribuzione normale

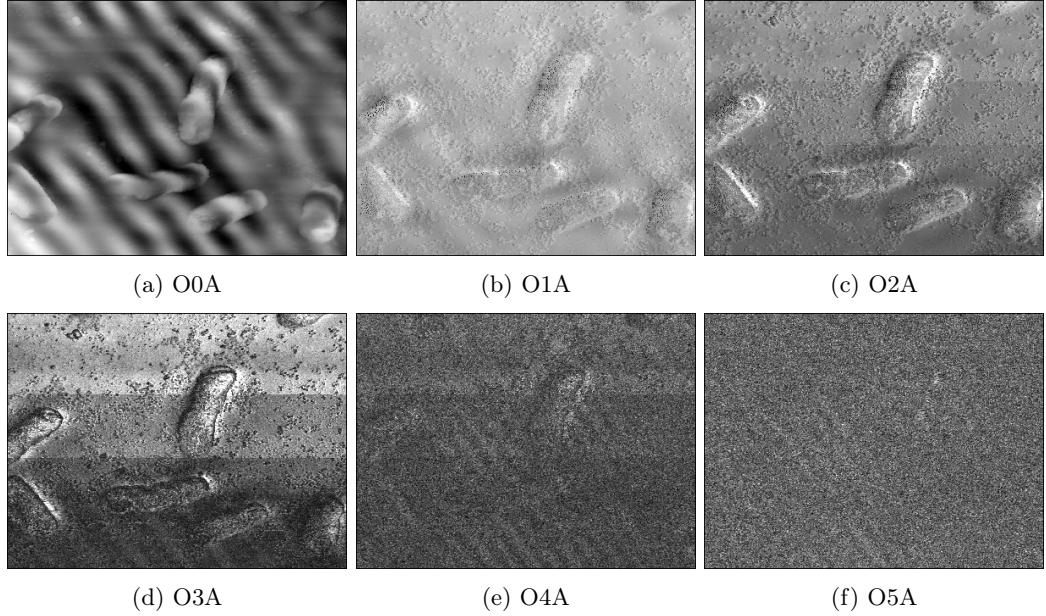


Figura 3.1: Immagini in ampiezza SNOM di esemplari di *Klebsiella pneumoniae* [74]

$$G(x) = e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (3.1)$$

Il parametro  $\sigma$  E' la varianza. Nell'elaborazione numerica delle immagini, si usa una funzione gaussiana discreta con media nulla [87]

$$G[i, j] = e^{-\frac{i^2+j^2}{2\sigma^2}} \quad (3.2)$$

dove  $i$  e  $j$  individuano i pixel dell'immagine.

La funzione gaussiana possiede alcune importanti proprietà: [88,89]

1. La funzione gaussiana bidimensionale ha simmetria rotazionale. In generale, non si conosce la direzione dei bordi nelle immagini e non si può prestabilire se applicare più smussamento in una direzione rispetto all'altra prima di filtrare. Avere una simmetria rotazionale significa che il filtro gaussiano non seleziona nessuna direzione nell'elaborazione delle immagini.
2. La funzione gaussiana è una funzione a valore singolo. Il filtro gaussiano effettua una media ponderata dell'intorno dei pixel per sostituire il valore del pixel centrale. Il peso è monotono decrescente con la distanza dal punto centrale quindi avrà scarso effetto sui pixel che sono lontani dal centro.

3. La larghezza del filtro gaussiano è caratterizzata dal parametro  $\sigma$ . Più grande è la varianza, maggiore sarà la banda di frequenza del filtro gaussiano.

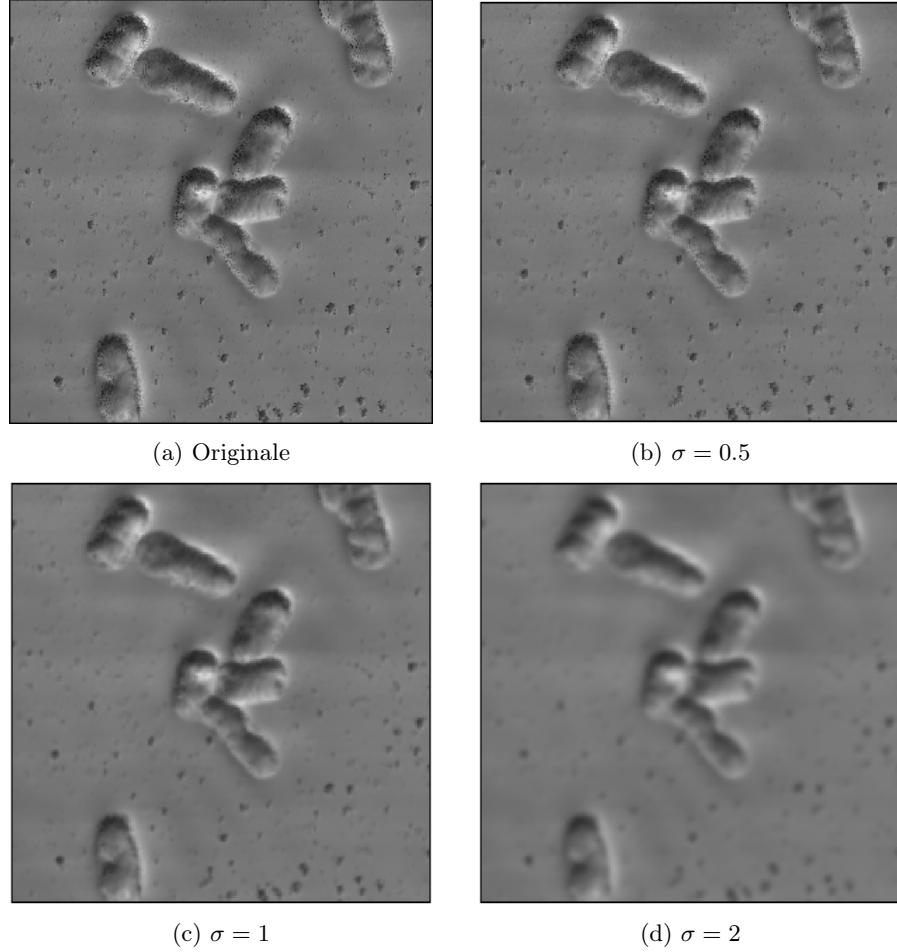


Figura 3.2: Effetto del parametro  $\sigma$  sul filtraggio

4. La funzione gaussiana è separabile in due funzioni monodimensionali. Questa proprietà è importante per la complessità computazionale di questo filtro, in quanto si può applicare una funzione gaussiana 1D in una direzione e poi nell'altra, riducendo la complessità da  $O(N^2)$  a  $O(2N)$ .

$$e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} = e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} e^{-\frac{y^2}{2\sigma^2}} \quad (3.3)$$

5. La trasformata di Fourier della funzione gaussiana è una funzione gaussiana.

$$\hat{G}[u, v] = \hat{G}_1[u] \cdot \hat{G}_1[v] = \sum_{n=0}^{N-1} G[n] e^{-2\pi i \frac{nu}{N}} \cdot \sum_{m=0}^{M-1} G[m] e^{-2\pi i \frac{mv}{M}} \quad (3.4)$$

### 3.1.2 Filtro rettangolare

Il **filtro rettangolare** è un filtro lineare costante nel dominio spaziale in cui ogni pixel dell’immagine viene sostituito con la media aritmetica dei valori dei pixel nel suo intorno di raggio  $r$ . Utilizzando il *Teorema di Lindeberg-Lévy*, è possibile dimostrare che una ripetuta applicazione di questo filtro può essere usata per approssimare un filtro gaussiano<sup>[89]</sup>.

$$\text{box}[i, j] = \frac{1}{(2r+1)^2} \sum_{n=-r}^r \sum_{m=-r}^r I(x+n, y+m) \quad (3.5)$$

Utilizzando dei pesi uguali per tutti gli elementi dell’intorno, questo filtro può essere implementato utilizzando un algoritmo di accumulo molto più semplice, che è più veloce rispetto all’utilizzo di un algoritmo di finestra mobile, passando da una complessità temporale di  $O(m^2n^2)$  ad una di  $O(m^2)$ , dove  $m$  è la grandezza dell’immagine e  $n$  è la grandezza della finestra.<sup>[90]</sup>

Questo filtro, a differenza del filtro gaussiano, non può essere utilizzato efficacemente nel dominio delle frequenze in quanto si trasforma in un seno cardinale ed ha supporto infinito. Dovendo essere limitato in banda per essere utilizzato, può provocare degli artefatti di *ringing* nelle regioni in cui il valore del segnale cambia repentinamente. Questo comportamento prende il nome di *fenomeno di Gibbs* [91].

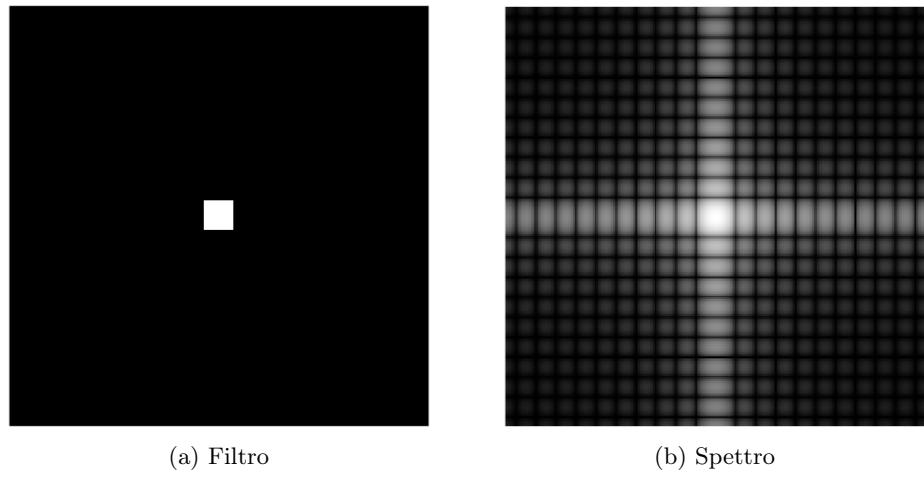


Figura 3.3: Esempio di filtro rettangolare

$$\begin{aligned} \text{box}(u, v) &\xrightarrow{\mathcal{F}} \hat{B}(x, y) = \frac{1}{a^2} \int_{-a/2}^{a/2} e^{2\pi i u x} du \int_{-a/2}^{a/2} e^{2\pi i v y} dv = \\ &\boxed{a = 2r + 1} \qquad = \text{sinc}(ax) \cdot \text{sinc}(ay) \end{aligned} \quad (3.6)$$

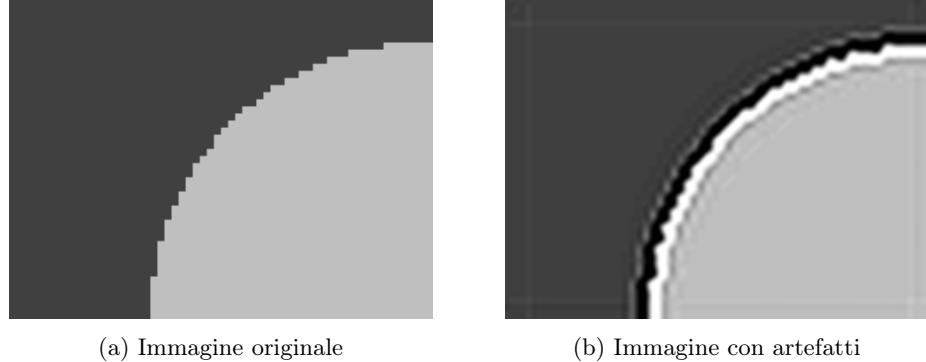
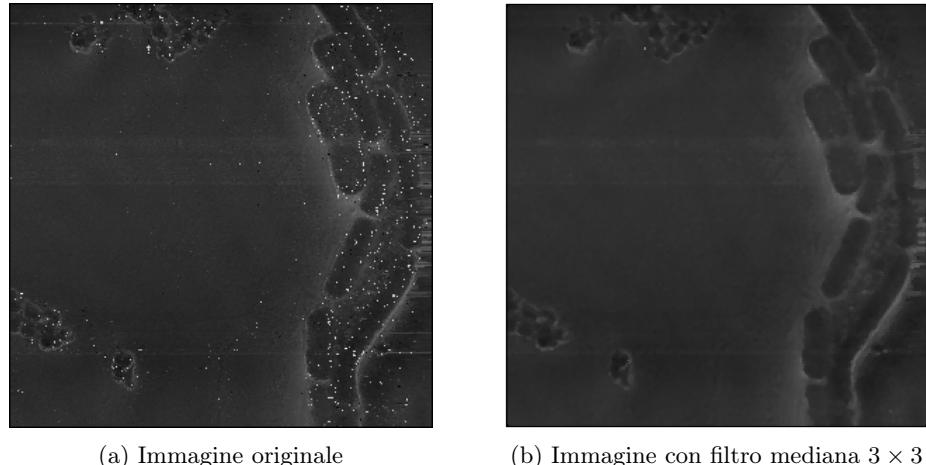


Figura 3.4: Artefatti di un filtro passa-basso [92]

### 3.1.3 Filtro mediana

Il **filtro mediana** è un filtro simile al filtro box, con la differenza che ogni pixel dell’immagine è sostituito dalla mediana dei valori dei pixel nel suo intorno invece che la media, quindi non è un filtro lineare. Questo filtro è molto usato nell’elaborazione delle immagini perché, sotto alcune condizioni, permette di rimuovere il rumore senza modificare i dettagli dell’immagine [93].

Se il rumore gaussiano additivo è basso, il filtro mediano è migliore del filtro gaussiano per rimuovere il rumore preservando i bordi per una determinata dimensione della finestra [94]. Inoltre, questo filtro è particolarmente efficace su rumori di tipo impulsivo, come il rumore *salt & pepper* e il rumore *Schottky* [95].

Figura 3.5: Immagine s-SNOM O2P di esemplari di *Bacillus subtilis*

### 3.1.4 Filtro di Wiener

Il **filtro di Wiener** è stato ideato per calcolare una stima statistica di un segnale sconosciuto usando un segnale correlato come input, di cui si conosce la componente di rumore, e filtrarlo per produrre la stima. Questo filtro, ideato da *Norbert Wiener* nel 1942<sup>[96]</sup>, ha l'obiettivo di minimizzare l'errore quadratico medio (MSE) tra il processo stocastico stimato e il processo desiderato<sup>[97]</sup>.

Per usare questo filtro, l'immagine e il suo rumore vengono considerati come variabili aleatorie. L'obiettivo è trovare una stima dell'immagine non corrotta  $\hat{f}$  tale che l'errore quadratico medio tra di esse sia minimizzato. Questo filtro viene spesso usato per rimuovere una sfocatura di movimento tramite deconvoluzione.

$$\text{MSE} = \mathbb{E} \left[ (f - \hat{f})^2 \right] \quad (3.7)$$

Per fare ciò bisogna rispettare dei presupposti: [98]

- Il rumore e l'immagine non devono essere correlati.
- Il rumore o l'immagine deve essere centrato, cioè a media nulla.
- I livelli di intensità nella stima sono una funzione lineare dei livelli nell'immagine degradata.

$$\hat{F}(u, v) = \left[ \frac{1}{H(u, v)} \cdot \frac{|H(u, v)|^2}{|H(u, v)|^2 + S_\eta(u, v)/S_f(u, v)} \right] G(u, v) \quad (3.8)$$

$H(u, v)$  = Funzione di degradazione

$|H(u, v)|^2$  = Spettro di potenza di  $H$

$S_\eta(u, v)$  = Spettro di potenza del rumore

$S_f(u, v)$  = Spettro di potenza dell'immagine non degradata

Se il rumore è bianco con spettro di potenza costante, usando un'approssimazione di  $S_f(u, v)$  è possibile sostituire il rapporto con un termine costante.

$$\hat{F}(u, v) = \left[ \frac{1}{H(u, v)} \cdot \frac{|H(u, v)|^2}{|H(u, v)|^2 + k} \right] G(u, v) \quad (3.9)$$

### 3.1.5 Filtro bilaterale

Il **filtro bilaterale** smussa le immagini preservando i bordi grazie all'utilizzo di una combinazione non lineare di valori nell'intorno del pixel. Questo filtro combina l'intensità dei pixel sia in base alla loro vicinanza geometrica che alla loro similarità fotometrica e preferisce valori vicini tra loro rispetto a valori distanti sia nel dominio che nel codominio<sup>[99]</sup>.

$$I_f(x) = \frac{1}{k(x)} \iint_{-\infty}^{\infty} I(\xi) c(\xi, x) s(f(\xi), f(x)) d\xi \quad (3.10)$$

La funzione  $s(f(\xi), f(x))$  misura la similarità tra il punto  $x$  al centro dell'intorno e il punto vicino  $\xi$ , mentre la funzione  $c(\xi, x)$  ne misura la vicinanza geometrica. La funzione  $k(x)$  definisce il fattore di normalizzazione.

$$k(x) = \iint_{-\infty}^{\infty} c(\xi, x) s(f(\xi), f(x)) d\xi \quad (3.11)$$

Un caso importante del filtro bilaterale è quello in cui sia la funzione di vicinanza che la funzione di similarità sono funzioni gaussiane della distanza euclidea tra i loro argomenti

$$c(\xi, x) = \exp\left(-\frac{\|\xi - x\|^2}{2\sigma_d^2}\right) \quad (3.12)$$

$$s(\xi, x) = \exp\left(-\frac{\|f(\xi) - f(x)\|^2}{2\sigma_r^2}\right) \quad (3.13)$$

La diffusione geometrica  $\sigma_d$  nel dominio viene scelta in base alla quantità di filtraggio passa-basso desiderata. Allo stesso modo, la diffusione fotometrica  $\sigma_r$  nel codominio dell'immagine viene impostata per ottenere la quantità di combinazione desiderata delle intensità dei pixel.

Questo filtro è anche usato per il filtraggio di immagini a colori in quanto consente di combinare opportunamente le tre bande di colore e di misurare le distanze fotometriche tra i pixel nello spazio combinato. Inoltre, questa distanza combinata può essere fatta corrispondere in modo preciso alla dissimilarità percepita dal sistema visivo umano (Human Visual System — HVS) utilizzando la distanza euclidea nello spazio colore CIE-Lab.<sup>[100]</sup>

### 3.1.6 Filtro guidato

Il **filtro guidato** genera l'immagine di uscita prendendo in considerazione il contenuto spaziale di un'altra immagine, detta di guida, che può essere l'immagine di input stessa o un'altra immagine diversa. Questo filtro ha la proprietà di preservare i bordi come il filtro bilaterale, ma non soffre degli stessi artefatti di inversione del gradiente<sup>[101]</sup>.

$$f[i] = \sum_j I[j] W\{G\}[i, j] \quad (3.14)$$

L'uscita del filtro è una media pesata in cui il kernel di filtraggio  $W\{G\}$  è funzione dell'immagine guida  $G$  ed è indipendente dall'immagine da filtrare  $I$ , mentre  $i$  e  $j$  sono le coordinate di due pixel. Un esempio di questo kernel è il filtro bilaterale congiunto, che si comporta come un filtro bilaterale quando  $G$  e  $I$  sono identiche.<sup>[102]</sup>

$$W^{bf}\{G\}[i, j] = \frac{1}{K} \exp\left(-\frac{|i-j|^2}{\sigma_r^2}\right) \exp\left(-\frac{|G[i] - G[j]|^2}{\sigma_r^2}\right) \quad (3.15)$$

Il presupposto fondamentale del filtro guidato è un modello lineare locale tra la guida  $G$  e l'uscita del filtro  $f$ . Assumendo che  $f$  sia una trasformazione lineare di  $G$  in un intorno  $\omega_k$  centrato sul pixel  $k$ , è sicuro che  $f$  presenta un bordo solo se è presente anche in  $G$ , poiché  $\nabla f = a \nabla G$ <sup>[103]</sup>.

$$f[i] = a_k G[i] + b_k, \quad \forall i \in \omega_k \quad (3.16)$$

Per determinare i coefficienti lineari, bisogna cercare una soluzione che minimizzi la differenza tra l'immagine in ingresso  $I$  e in uscita  $f$ . La soluzione può essere espressa come una regressione lineare.

$$a_k = \frac{\frac{1}{|\omega|} \sum_{i \in \omega_k} G[i] I[i] - \mu_k \bar{I}_k}{\sigma_k^2 + \epsilon} \quad (3.17)$$

$$b_k = \bar{I}_k - a_k \mu_k \quad (3.18)$$

Dopo aver applicato questo modello a tutti gli intorni dell'immagine, può essere calcolato il peso del filtro facendo la media tra tutti gli intorni che includono un certo pixel  $i$ .

$$W\{G\}[i,j] = \frac{1}{|\omega|^2} \sum_{(i,j) \in \omega_k} \left[ 1 + \frac{(G[i] - \mu_k)(G[j] - \mu_k)}{\sigma_k^2 + \epsilon} \right] \quad (3.19)$$

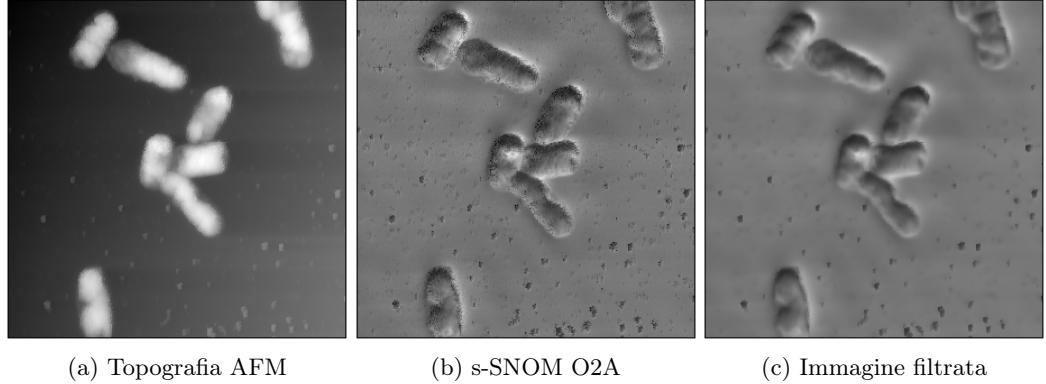


Figura 3.6: Filtro guidato dall’immagine di topografia AFM

### 3.1.7 Filtro a media non locale

Il **filtro a media non locale** (NLM), a differenza dei filtri locali come il filtro gaussiano, non determina il valore di un pixel basandosi sulle caratteristiche del suo intorno ma utilizza una media dell’intera immagine, pesata in ogni punto in base alla similarità con il pixel in esame.<sup>[104]</sup>.

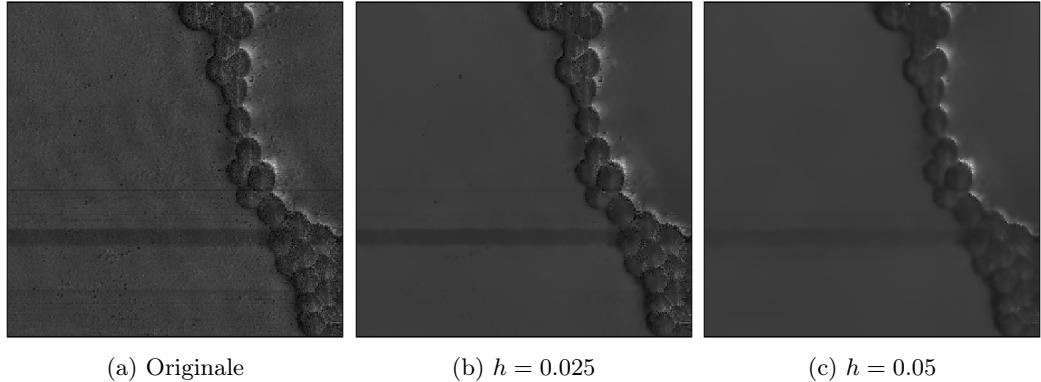
Data un’immagine rumorosa discreta  $v = \{v(i)|i \in I\}$ , il valore stimato dal filtro per il pixel  $i$  è calcolato come una media pesata di tutti i pixel dell’immagine, dove la famiglia dei pesi  $w(i, j)$  dipende dalla similarità tra le intensità degli intorni  $\mathcal{N}_i$  e  $\mathcal{N}_j$ , rispettivamente dei pixel  $i$  e  $j$ .

$$\text{NL}[v](i) = \sum_{j \in I} w(i, j)v(j) \quad (3.20)$$

$$w(i, j) = \frac{1}{Z(i)} \exp \left( -\frac{\|v(\mathcal{N}_i) - v(\mathcal{N}_j)\|_{2,a}^2}{h^2} \right) \quad (3.21)$$

$$Z(i) = \sum_{j \in I} \exp \left( -\frac{\|v(\mathcal{N}_i) - v(\mathcal{N}_j)\|_{2,a}^2}{h^2} \right) \quad (3.22)$$

Questa similarità viene misurata come una funzione decrescente della distanza euclidea pesata, dove  $a$  è la deviazione standard del kernel gaussiano. Il parametro  $h$  agisce modificando il grado di filtraggio: controlla il decadimento della funzione esponenziale e quindi il decadimento dei pesi in funzione delle distanze eucleede.<sup>[105]</sup>

Figura 3.7: Effetto del parametro  $h$  sul filtraggio

Il filtro NLM non confronta solo le intensità dei singoli pixel, ma anche la configurazione geometrica dell'intero intorno. Questo consente un confronto più robusto rispetto ai filtri locali.

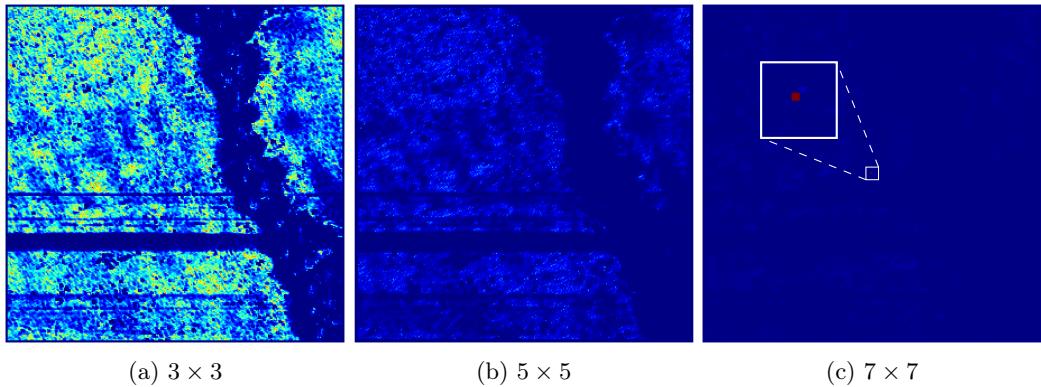


Figura 3.8: Effetto della grandezza dell'intorno sulla distribuzione dei pesi rispetto al pixel centrale dell'immagine

### 3.1.8 Filtro BM3D

Il **filtro BM3D** (Block-Matching and 3D Filtering) è un'estensione del filtro a media non locale che fa uso di una migliore rappresentazione sparsa nel dominio di trasformazione<sup>[106]</sup>.

Il primo passo consiste nel suddividere l'immagine in blocchi (patch) di dimensioni fisse e poi raggruppare insieme i blocchi simili da un algoritmo di block-matching, formando un tensore tridimensionale (gruppo) in cui ogni strato del volume è un blocco simile. Questi blocchi non sono necessariamente disgiunti ma possono anche sovrapporsi parzialmente.

Una volta raccolti i blocchi simili, è possibile applicare delle funzioni di trasformazione (come DCT o wavelet) per rappresentare questi gruppi in modo più compatto. Nello spazio trasformato, il rumore appare come elementi sparsi, mentre i dati reali (cioè i dettagli coerenti tra i blocchi) si concentrano in poche componenti. Si può quindi applicare un filtro sulla trasformata, come un filtro di Wiener, per ridurre il rumore, eliminando i coefficienti minori.<sup>[107]</sup>

Dopo il filtraggio, il tensore viene ricostruito tramite la trasformata inversa e i blocchi ripuliti vengono reinseriti nell'immagine. Dato che un pixel può comparire in più blocchi, l'immagine finale si ottiene come media pesata di tutti i contributi.<sup>[108]</sup>

# Capitolo 4

## Risultati

### 4.1 Metodi di valutazione

Per misurare l'efficacia di questi filtri sono stati presi in considerazione diversi metodi di valutazione. La mancanza di immagini senza rumore di riferimento impedisce l'uso di metodi di valutazione full-reference (FR-IQA) ampiamente utilizzati, come PSNR<sup>[109]</sup> (Peak Signal-to-Noise Ratio), SSIM<sup>[110]</sup> (Structural Similarity Index Measure) e CNR<sup>[111]</sup> (Contrast-to-Noise Ratio). La difficoltà nel valutare la qualità di queste immagini deriva anche dalla mancanza di valutazioni soggettive di esperti nel campo e dalla limitata quantità di letteratura su questo argomento.

In questo lavoro sono stati usati alcuni sistemi di valutazione cieca (NR-IQA) basati su modelli statistici di immagini naturali, come BRISQUE<sup>[112]</sup> (Blind/Referenceless Image Spatial QUality Evaluator), NIQE<sup>[113]</sup> (Naturalness Image Quality Evaluator) e PIQE<sup>[114]</sup> (Perception based Image Quality Evaluator), usando i loro modelli predefiniti. Questi sistemi valutano la qualità dell'immagine con un punteggio da 0 in su, dove 0 corrisponde alla massima qualità. Oltre ai punteggi di questi modelli è stata misurata anche la variazione totale dell'immagine (TV).

È stata inoltre condotta un'analisi correlativa tra le proprietà delle immagini di ampiezza SNOM prese in esame e le corrispettive immagini di topografia AFM, in quanto questa immagine contiene una quantità di rumore molto inferiore rispetto alla prima.

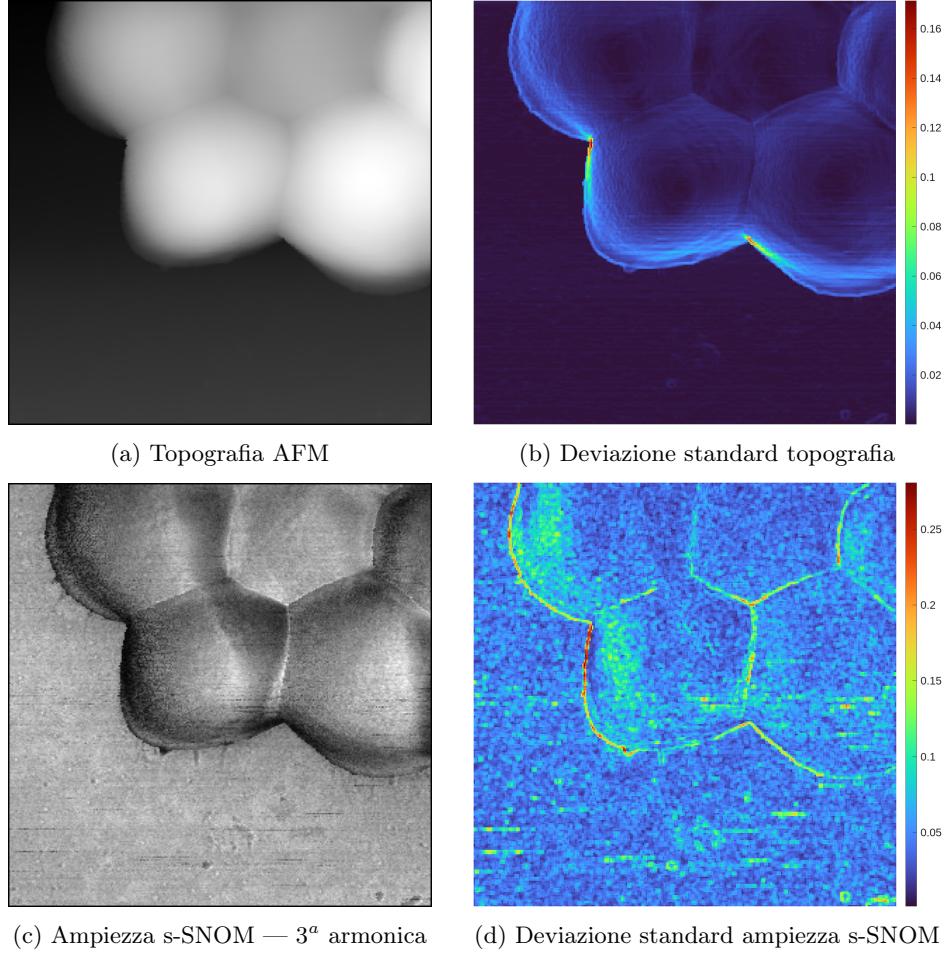


Figura 4.1: Confronto della deviazione standard locale tra immagini AFM e SNOM

#### 4.1.1 Analisi correlativa

Le immagini di topografia AFM e ampiezza SNOM, anche se condividono delle informazioni spaziali correlate, non possono essere esaminate con i metodi di valutazione full-reference tradizionali poiché non rappresentano lo stesso contenuto. Le prime sono una mappa altimetrica del campione, mentre le seconde catturano le interazioni ottiche nel campo vicino, che dipendono dall'indice di rifrazione del campione.

Per svolgere questa analisi sono stati presi in considerazione cinque parametri:

1. Indice di Dice sui bordi
2. Mutua informazione delle immagini
3. Errore quadratico medio dell'entropia
4. Congruenza di fase
5. Modulo dei gradienti

L'**indice di Dice** è usato per misurare la somiglianza tra due campioni studiando la presenza o assenza di elementi in comune, in questo caso la sovrapposizione tra l'immagine dei bordi della topografia e dell'ampiezza SNOM. Un valore vicino a 1 indica un'ottima sovrapposizione dei bordi mentre uno vicino a 0 indica una scarsa sovrapposizione.<sup>[115]</sup>

$$S = 2 \cdot \frac{|E_X \cap E_Y|}{|E_X| + |E_Y|} \quad (4.1)$$

La **mutua informazione** (MI) è una misura statistica che quantifica quante informazioni una variabile contiene su un'altra, in questo caso un'immagine.<sup>[116]</sup> Questa misura è strettamente collegata al concetto di entropia di una variabile ed è ampiamente utilizzata nella correlazione e registrazione di immagini multimodale in cui vengono confrontati due diversi tipi di immagini,<sup>[117]</sup> ad esempio RM e TAC,<sup>[118,119]</sup> usata in questo caso su AFM e s-SNOM. La mutua informazione è nulla se  $X$  e  $Y$  sono variabili indipendenti.

$$\begin{aligned} I(X, Y) &= \sum_{x \in X} \sum_{y \in Y} p(x, y) \log \left( \frac{p(x, y)}{p_1(x)p_2(y)} \right) = \\ &= H(X) + H(Y) - H(X, Y) \end{aligned} \quad (4.2)$$

L'**entropia** è una misura della complessità spaziale dell'immagine, per cui regioni con un'alta entropia presentano strutture fine, texture o bordi marcati mentre regioni con un'entropia bassa presentano superfici lisce o uniformi. Ricavando l'errore quadratico medio dell'entropia rispetto all'immagine di topografia si può stimare la differenza di dettagli o rumore tra le due. Se l'errore è piccolo allora le due immagini avranno complessità spaziale simile negli stessi punti, mentre se è alto le strutture locali saranno differenti.

$$\text{MSE} = \frac{1}{N} \sum_{i \in \Omega} (H_1(i) - H_2(i))^2 \quad (4.3)$$

Un'altra misura per la stima delle strutture locali è la **congruenza di fase** (Phase Congruency — PC), secondo la quale le caratteristiche sono percepite in punti in cui le componenti di Fourier sono massime in fase. La congruenza di fase fornisce un modello semplice ma biologicamente plausibile di come il sistema visivo umano rileva e identifica le caratteristiche di un'immagine.<sup>[120,121]</sup>

Nel caso di segnali unidimensionali, questi si possono scomporre in  $N$  componenti armoniche con ampiezza locale  $A_n(x)$  e fase locale  $\phi_n(x)$ . La congruenza di fase nella posizione  $x$  sarà il massimo allineamento di queste fasi. Quando tutte le fasi sono allineate, i termini del coseno valgono 1 e di conseguenza si avrà  $PC = 1$ , mentre quando sono casuali il numeratore tende a 0.

$$PC(x) = \max_{\bar{\phi}(x)} \frac{\sum_n A_n(x) \cos(\phi_n(x) - \bar{\phi}(x))}{\sum_n A_n(x)} \quad (4.4)$$

$$\bar{\phi}(x) = \tan^{-1} \left( \frac{\sum_n A_n(x) \sin \phi_n(x)}{\sum_n A_n(x) \cos \phi_n(x)} \right) \quad (4.5)$$

Questo metodo non può essere usato per segnali bidimensionali come le immagini perché la trasformata di Hilbert non è definita per spazi multidimensionali e la trasformata di Fourier non è adatta a localizzare spazialmente le informazioni in frequenza. I sistemi moderni utilizzano una banca di filtri log-Gabor in diverse scale spaziali  $s$  e orientamenti  $o$  per misurare la congruenza di fase. Questo è implementato con delle paia di filtri in quadratura, in cui uno è pari  $M_{s,o}^e$  e l'altro è dispari  $M_{s,o}^o$ .<sup>[122]</sup>

$$PC(\mathbf{x}) = \frac{\sum_o \mathcal{E}_o(\mathbf{x}) - T_o}{\sum_o \sum_s A_{s,o}(\mathbf{x}) + \varepsilon} \quad (4.6)$$

$$\mathcal{E}_o(\mathbf{x}) = \sqrt{\left( \sum_s I(\mathbf{x}) * M_{s,o}^e \right)^2 + \left( \sum_s I(\mathbf{x}) * M_{s,o}^o \right)^2} \quad (4.7)$$

$$A_{s,o}(\mathbf{x}) = \sqrt{(I(\mathbf{x}) * M_{s,o}^e)^2 + (I(\mathbf{x}) * M_{s,o}^o)^2} \quad (4.8)$$

la congruenza di fase è combinata con l'**ampiezza dei gradienti** per formare l'indice FSIM, usato per misurare la similarità strutturale di due immagini in modo indipendente dall'intensità delle immagini.<sup>[123]</sup> Per calcolare i gradienti è usato l'operatore di Scharf.<sup>[124]</sup>

$$G_x(\mathbf{x}) = \frac{1}{16} \begin{bmatrix} 3 & 0 & -3 \\ 10 & 0 & -10 \\ 3 & 0 & -3 \end{bmatrix} * I(\mathbf{x}) \quad G_y(\mathbf{x}) = \frac{1}{16} \begin{bmatrix} 3 & 10 & 3 \\ 0 & 0 & 0 \\ -3 & -10 & 3 \end{bmatrix} * I(\mathbf{x}) \quad (4.9)$$

## 4.2 Discussione

Dopo aver applicato le varie tecniche di riduzione del rumore alle immagini e aver registrato i corrispondenti parametri di valutazione, si è calcolata la media di questi ultimi. Nei metodi che richiedono una stima del rumore nell'immagine o un grado di smussamento è stata calcolata una stima

Si può notare come nei metodi di valutazione NR-IQA (BRISQUE, NIQE e PIQE) il filtro mediana sia quello che ricopre la posizione migliore, posizionandosi sempre al primo posto nelle immagini O3A e per due volte su tre anche per le immagini O2A.

	O2A			O3A		
	BRISQUE	NIQE	PIQE	BRISQUE	NIQE	PIQE
Originale	31.028	10.772	35.952	37.379	13.056	48.455
NLM	37.419	7.667	45.094	28.716	6.902	31.237
Mediana	30.333	<b>4.595</b>	<b>25.323</b>	<b>27.523</b>	<b>4.687</b>	<b>19.609</b>
Bilaterale	40.636	6.795	43.191	38.086	7.635	37.005
Wiener	35.567	5.533	32.181	34.382	5.458	22.755
Gaussiana 0.5	<b>25.242</b>	5.354	26.117	28.557	5.777	35.061
Gaussiana 2	<b>55.467</b>	6.926	<b>93.068</b>	<b>56.564</b>	6.814	<b>90.359</b>
Rettangolare	34.036	4.702	30.313	33.615	4.785	21.585
Guidato	<b>56.846</b>	6.612	<b>89.204</b>	<b>57.741</b>	6.553	<b>87.870</b>
BM3D	38.528	6.532	46.523	35.214	5.591	41.416

Tabella 4.1: Valori medi dei metodi di valutazione NR-IQA

Questo comportamento deriva dal fatto che il filtro mediana è un buon filtro da utilizzare per rimuovere i rumori di tipo impulsivo, che sono presenti in queste immagini e sono riconosciuti dai modelli di valutazione.

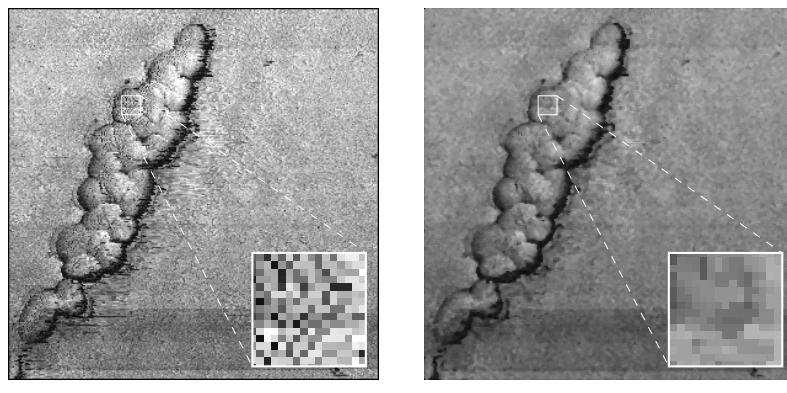


Figura 4.2: Immagine O3A con molto rumore impulsivo

In blu invece sono evidenziati gli outlier nella tabella: il filtro guidato e il filtro gaussiano con  $\sigma = 2$ . Questi filtri presentano dei valori di media in BRISQUE e PIQE molto superiori rispetto a tutti gli altri filtri esaminati. Questo si può notare anche nei valori medi della variazione totale, dove questi due filtri hanno una media molto minore degli altri filtri.

	TV	O2A	O3A
Originale	4876	7594	
NLM	2129	2010	
Mediana	1585	2359	
Bilaterale	2236	3832	
Wiener	2112	2777	
Gaussiana 0.5	2996	4532	
Gaussiana 2	<b>614</b>	<b>753</b>	
Rettangolare	<b>1447</b>	<b>2006</b>	
Guidato	<b>610</b>	<b>742</b>	
BM3D	2072	2019	

Tabella 4.2: Valori medi della variazione totale

Il filtro guassiano ad alta varianza smussa eccessivamente l'immagine, facendo perdere troppi dettagli e rendendo i bordi smussati. Anche il filtro guidato, avendo usato l'immagine della topografia come guida, visto che ha una varianza molto minore dell'immagine di ampiezza SNOM, smussa eccessivamente le immagini. In conclusione, questi filtri sono stati scartati dalla valutazione.

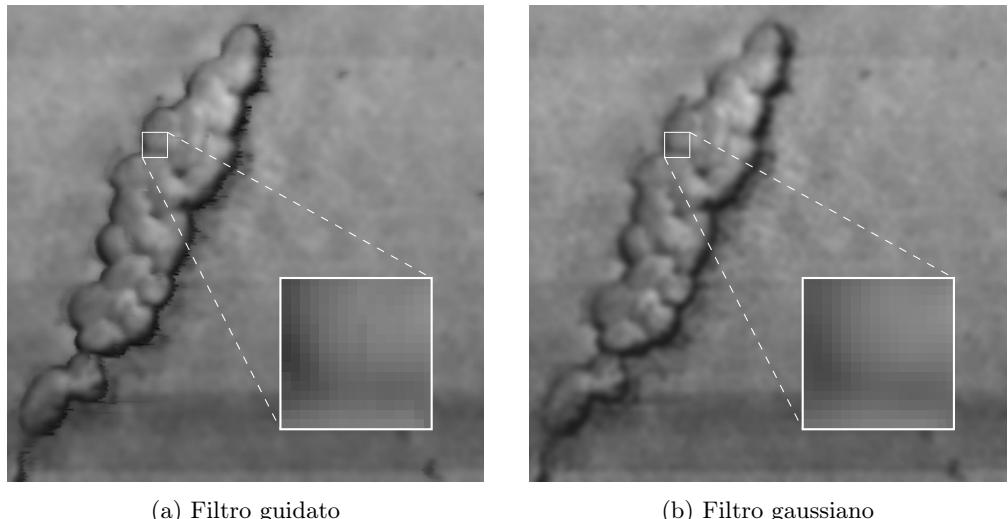


Figura 4.3: Immagine della figura 4.2 elaborata con filtro gaussiano e guidato

Sono visibili anche nella tabella della scala FSIM i valori dei scartatati, a dimostrazione che l'ispezione visiva è uno step importante per la validazione dei risultati, in mancanza di dati di riferimento.

FSIM	O2A		O3A	
	Valore	Diff	Valore	Diff
Orignale	0.899	—	0.889	—
NLM	<b>0.924</b>	<b>0.025</b>	<b>0.926</b>	<b>0.037</b>
Mediana	0.915	0.016	0.912	0.023
Bilaterale	0.915	0.016	0.908	0.019
Wiener	0.915	0.016	0.911	0.022
Gaussiana 0.5	0.906	0.007	0.898	0.009
Gaussiana 2	<b>0.930</b>	<b>0.031</b>	<b>0.932</b>	<b>0.043</b>
Rettangolare	0.917	0.018	0.914	0.025
Guidato	<b>0.929</b>	<b>0.030</b>	<b>0.931</b>	<b>0.042</b>
BM3D	0.918	0.019	0.922	0.033

Tabella 4.3: Valori medi della scala FSIM

Il filtro rettangolare si posiziona al primo posto nelle tabelle della variazione totale, con il filtro mediana che segue in seconda posizione con valori simili. I due filtri producono immagini con una quantità simile di rumore bianco sul piano di osservazione ma presentano dei comportamenti molto diversi in corrispondenza di regioni con variazioni di intensità elevate.

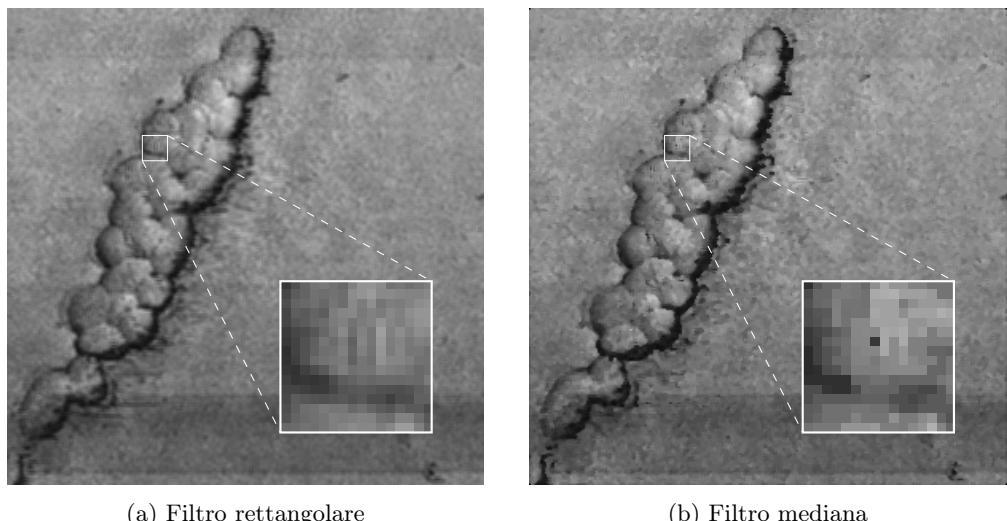


Figura 4.4: Confronto tra filtro rettangolare e mediana

Il filtro mediana elimina le variazioni isolate ma trasforma le curve in gradini definiti, mentre si può notare come il filtro rettangolare generi degli artefatti nelle regioni dove prima era presente una grande variazione di intensità, come si può osservare dalle strisce verticali e orizzontali presenti nella figura 4.4 in corrispondenza del rumore impulsivo.

Passando agli ultimi metodi di valutazione che confrontano le caratteristiche dell'immagine di ampiezza SNOM con quelle della topografia AFM, quindi la mutua informazione, l'indice di Dice sui bordi e l'errore quadratico medio dell'entropia, si può notare come, senza tener conto dei filtri scartati, i filtri che hanno avuto la performance migliori siano il filtro a media non locale e il filtro BM3D.

	O2A			O3A		
	EMSE	EDK	MI	EMSE	EDK	MI
ORIGINAL	0.047	0.108	0.620	0.079	0.102	0.554
NLM	0.039	<b>0.123</b>	<b>0.879</b>	<b>0.042</b>	<b>0.121</b>	<b>0.845</b>
MEDIAN	0.044	0.114	0.738	0.056	0.106	0.706
BILAT	0.042	0.111	0.724	0.056	0.107	0.644
WIENER	<b>0.037</b>	0.111	0.717	0.043	0.107	0.660
GAUSSIAN 0.5	0.038	0.107	0.676	0.053	0.103	0.612
GAUSSIAN 2	<b>0.045</b>	<b>0.090</b>	<b>0.885</b>	<b>0.051</b>	<b>0.093</b>	<b>0.843</b>
AVERAGE	0.040	0.105	0.767	0.044	0.102	0.710
GUIDED	<b>0.044</b>	<b>0.105</b>	<b>0.891</b>	<b>0.049</b>	<b>0.109</b>	<b>0.853</b>
BM3D	0.047	<b>0.121</b>	<b>0.845</b>	0.063	<b>0.119</b>	<b>0.827</b>

Tabella 4.4: Valori medi dei metodi di valutazione correlativa

Questi filtri si basano entrambi sulla metodologia a media non locale e questo si nota soprattutto sulla grande riduzione del rumore presente sul piano di osservazione, mantenendo però inalterate le strutture dei campioni. Questo tipo di filtri però mantiene anche il rumore impulsivo sui campioni quindi, in base alle esigenze, potrebbero servire altri step di elaborazione per ottenere dei risultati migliori. In particolare, il filtro BM3D è controllato da molti parametri e facendo uno studio più approfondito potrebbe portare dei risultati anche migliori del filtro NLM. In questo lavoro è stato usato il profilo VN proposto da Hou et al.<sup>[125]</sup>

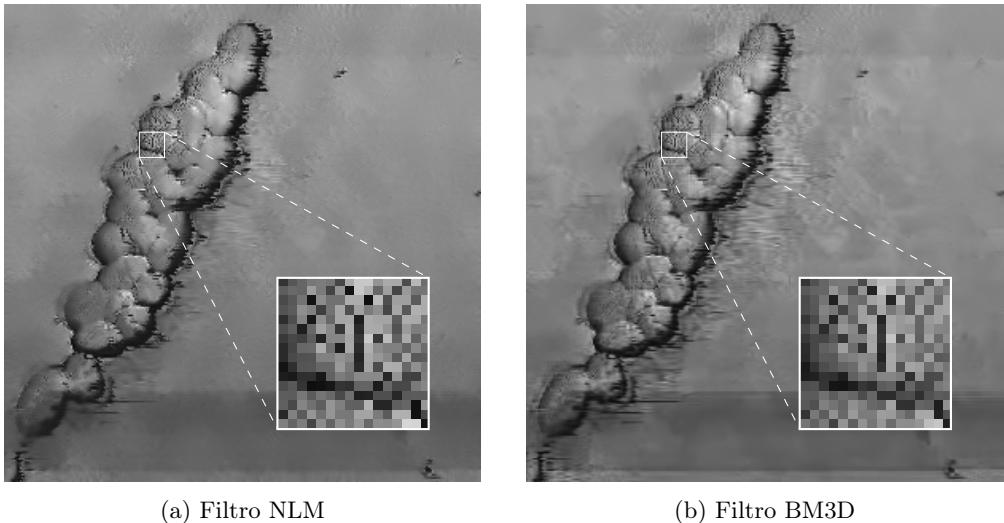


Figura 4.5: Confronto tra filtro NLM e BM3D. Si noti come il rumore impulsivo sia stato mantenuto mentre il rumore bianco sia stato ridotto di molto.

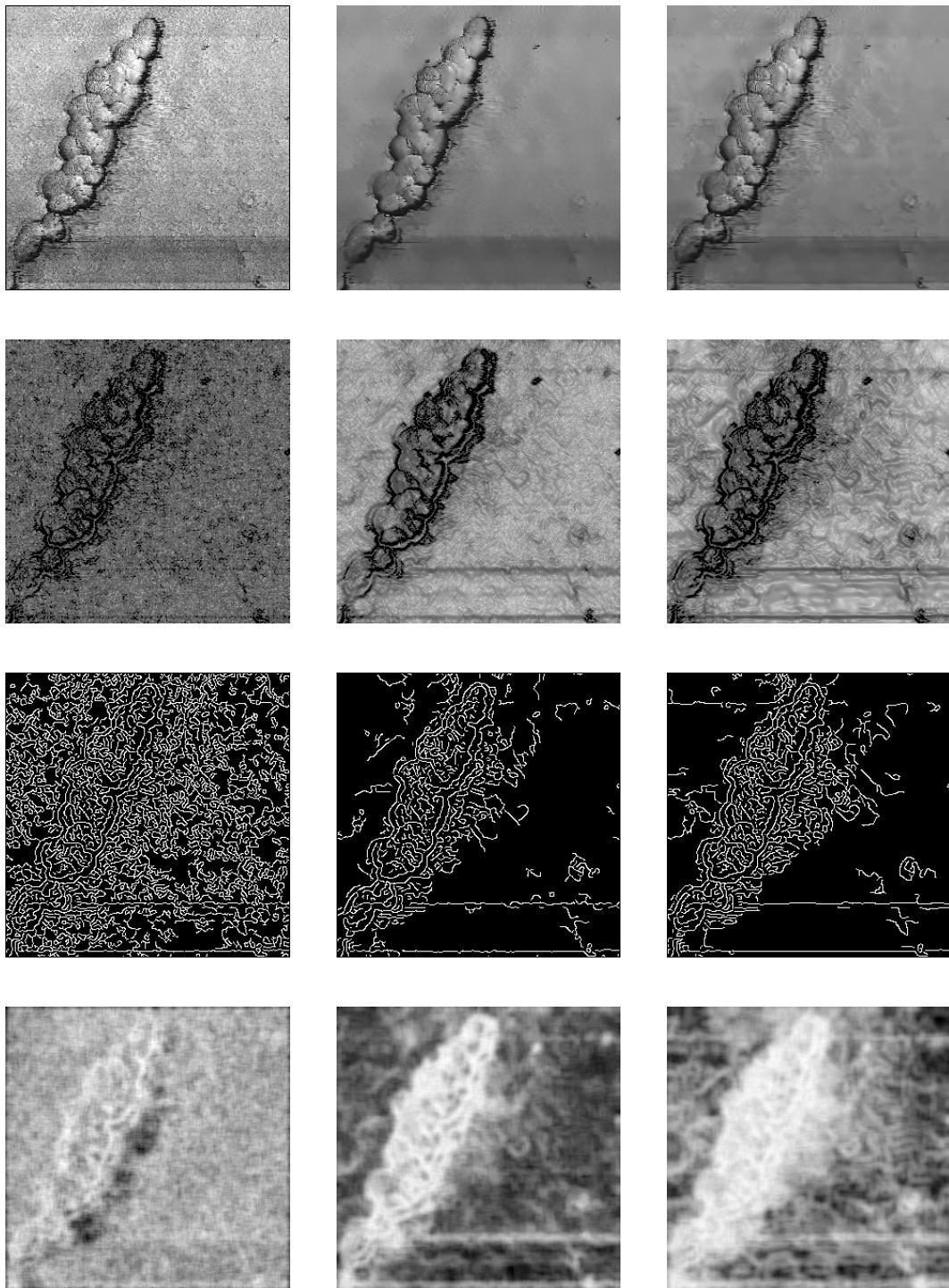


Figura 4.6: Confronto delle caratteristiche dell'immagine originale con NLM e BM3D

Prima riga: Immagini

Seconda riga: Mappa dell'ampiezza dei gradienti

Terza riga: Rilevamento dei bordi con metodo Canny<sup>[126]</sup>

Quarta riga: Entropia locale dell'immagine

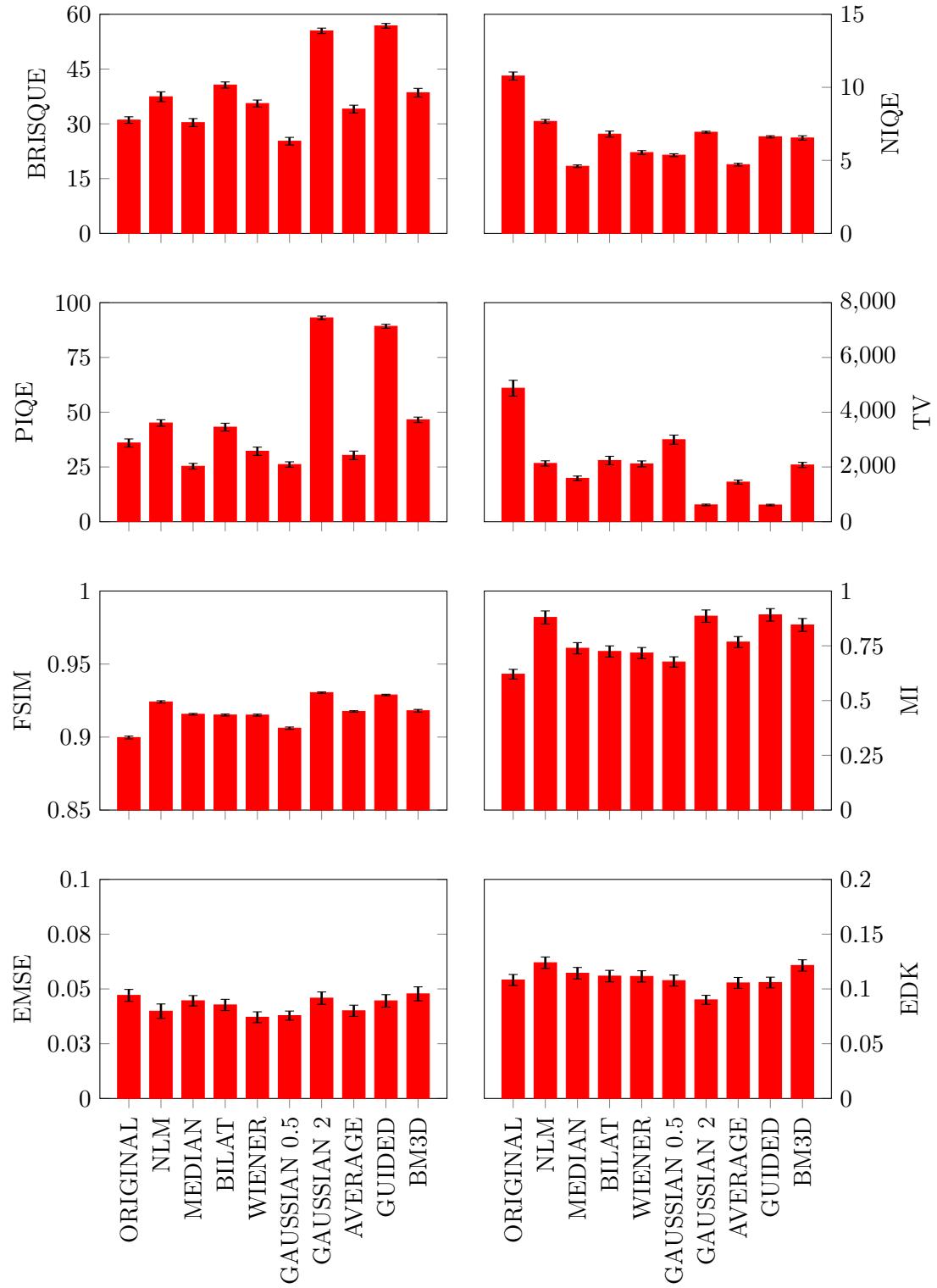


Figura 4.7: Grafici a barre delle medie di valutazione per immagini O2A

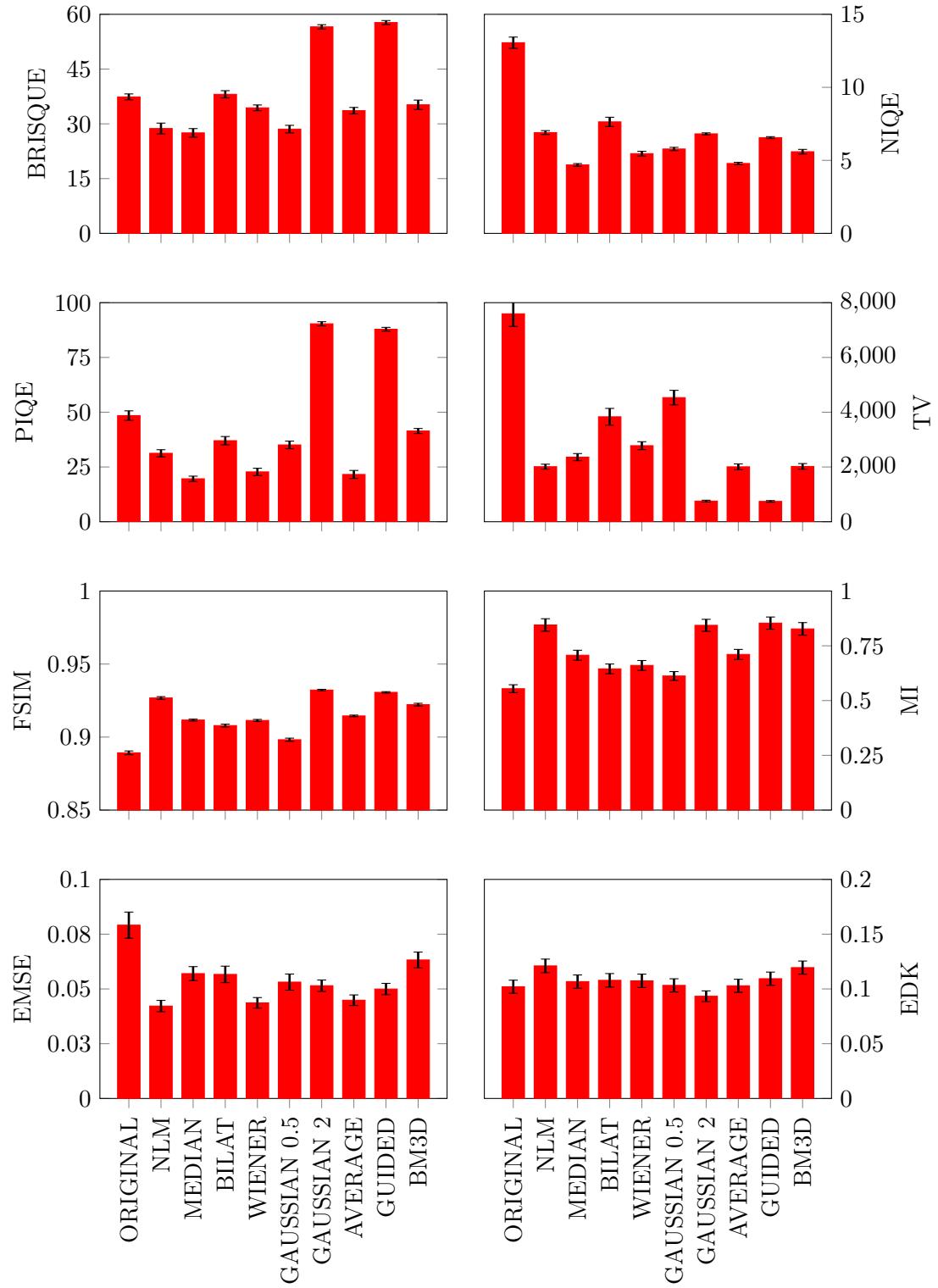


Figura 4.8: Grafici a barre delle medie di valutazione per immagini O3A

### 4.3 Ispezione visiva multicanale

L’ispezione visiva può essere anche eseguita utilizzando l’immagine dell’ampiezza SNOM in combinazione con l’immagine di topografia e fase SNOM per verificare la correlazione delle caratteristiche tra le varie immagini. L’immagine di topografia è posta nel canale rosso, quella dell’ampiezza SNOM nel canale verde e infine quella della fase SNOM nel canale blu.

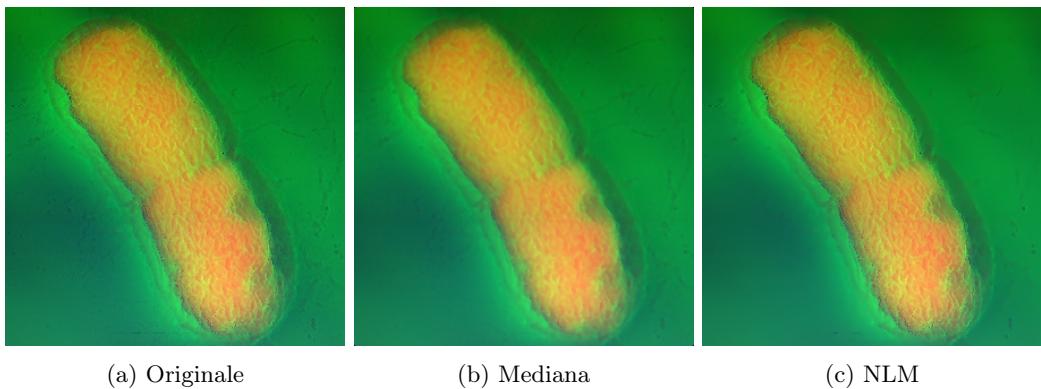


Figura 4.9: Ispezione visiva multicanale di un’immagine della 2<sup>a</sup> armonica

Si può notare come il filtro mediana abbia rimosso il rumore impulsivo presente soprattutto sui bordi del batterio preservando comunque dei bordi definiti, ma sono diminuiti i dettagli delle strutture interne. Al contrario, il filtro NLM ha preservato i bordi e i dettagli del campione ma non è riuscito a rimuovere il rumore impulsivo sui bordi, tuttavia ha svolto un lavoro nettamente migliore nel rimuovere le imperfezioni sul piano di osservazione lasciando però inalterato il batterio. In questo caso il rumore impulsivo dell’immagine originale è basso, molto minore dell’immagine presa in considerazione nelle pagine precedenti, quindi può avere esito migliore applicare un filtro NLM.

# Capitolo 5

## Conclusioni

Lo studio di microrganismi tramite tecniche di microscopia a super-risoluzione è fondamentale per comprendere la loro struttura e i loro comportamenti. I batteri ESKAPE<sup>[6]</sup> pongono oggi un serio rischio per la salute mondiale<sup>[7]</sup> e una minaccia sempre crescente nel futuro.<sup>[8]</sup> Studiare questi batteri con le tecniche descritte in questa tesi può portare a una comprensione migliore dei loro fattori di virulenza e sviluppare nuovi farmaci che superano le loro resistenze per .

Effettuare questi studi con tecniche di microscopia come AFM e SNOM, al posto di tecniche come la microscopia elettronica, ha il beneficio di non richiedere trattamenti speciali per i campioni, che invece potrebbero danneggiare o distruggere il campione. La microscopia AFM fornisce un profilo tridimensionale del campione, da cui si possono anche ottenere le sue proprietà viscoelastiche, mentre la microscopia SNOM fornisce informazioni sulle sue proprietà ottiche, come l'indice di rifrazione.

Queste due tecniche di microscopia funzionano senza aver bisogno di ambienti particolari, come una camera a vuoto o criogenica, rendendole un buono strumento per lo studio di macromolecole e organismi viventi. Inoltre, queste tecniche possono essere combinate nello stesso microscopio per ottenere più informazioni correlate della stessa scansione.

### 5.1 Analisi correlativa

La microscopia s-SNOM ha suscitato interesse negli ultimi anni, ma il suo impiego nella Microbiologia è rimasto limitato, soprattutto per le difficoltà nell'interpretare i dati a causa della scarsa disponibilità dei dati. Come accennato in precedenza, un

microscopio può offrire più tecniche di microscopia per studiare più proprietà dello stesso materiale nello stesso momento, per questo recenti studi hanno accoppiato un sistema di microscopia s-SNOM ad altri sistemi per avere un contesto noto per analizzare i dati provenienti dal campo vicino, come la microscopia Atomic force microscopy (AFM) o CLSM.<sup>[127]</sup>

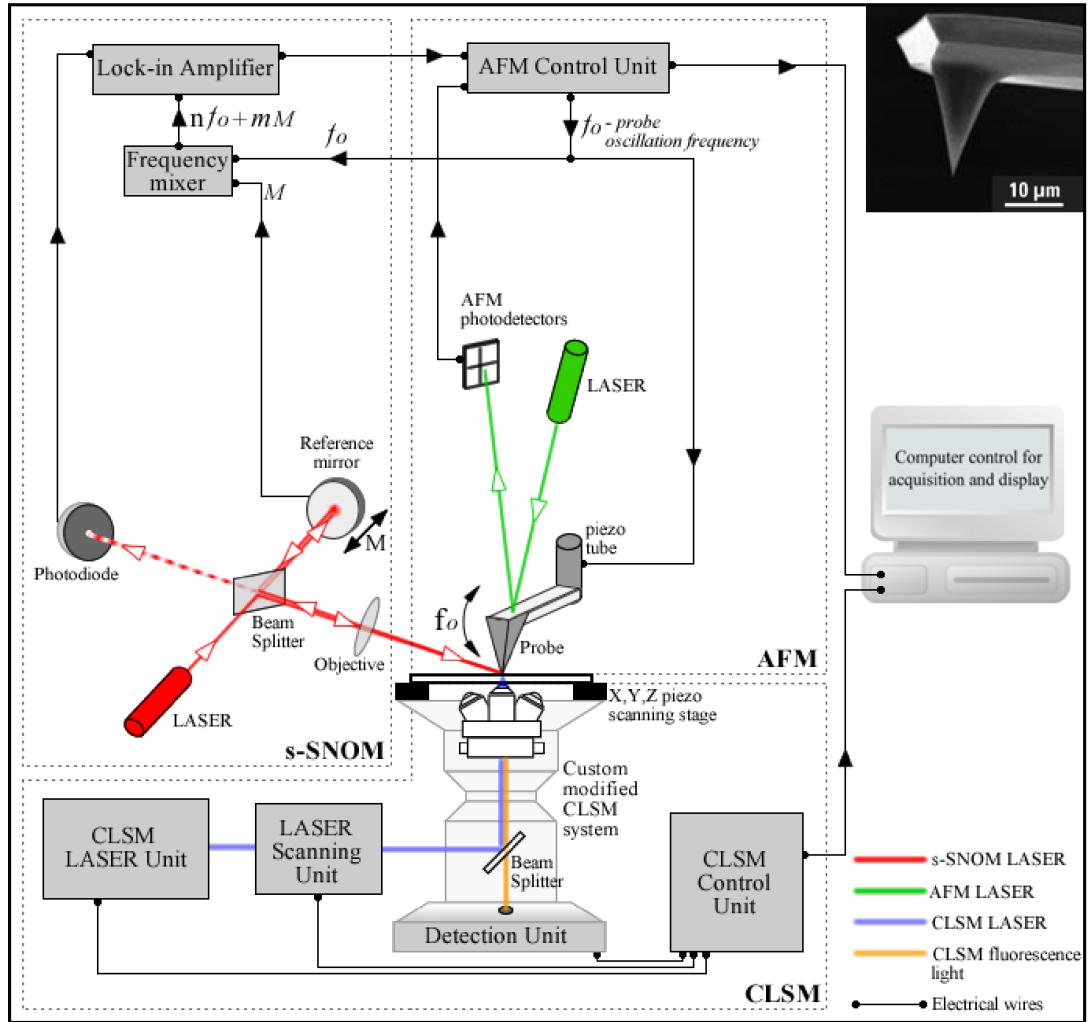


Figura 5.1: Sistema multimodale per l'acquisizione di immagini correlative [127]

## 5.2 Rumore

Uno dei problemi nel comprendere ed automatizzare l'elaborazione di queste immagini è la quantità di rumore al quale sono affette. Uno dei parametri che più influenza la quantità di rumore nelle immagini è il tempo di integrazione per pixel della scan-

sione: più è alto questo parametro, più il rumore sarà attenuato. Il problema nel fare ciò sta nel fatto che un tempo di integrazione alto aumenta il rischio di dislocare il campione e aumenta il tempo di scansione, infatti per le immagini del dataset di SSNOMBACTER è stato usato un tempo di integrazione di 3 ms, che equivale a un tempo di scansione di quasi 5 minuti.

Usare delle tecniche di riduzione del rumore permette di aumentare i dettagli mantenendo un tempo di integrazione basso e riducendo il tempo richiesto per l'acquisizione. Dalle valutazioni esposte in questa tesi si evince come, per immagini in cui il rumore di tipo impulsivo sia elevato è consigliato usare un filtro mediana al costo di una leggera sfocatura dei dettagli, mentre è consigliato usare un filtro a media non locale in immagini con poco rumore impulsivo per rimuovere in modo efficace il rumore gaussiano mantenendo intatti i dettagli del campione.

### 5.3 Sviluppi futuri

La scarsa disponibilità di dati, meno di 100 scansioni, non permette l'uso di tecniche di deep learning per classificare la qualità delle immagini o per ridurre il rumore in modo affidabile senza incorporare dati esterni, come dei rank o punteggi soggettivi come il MOS (Mean Opinion Score), visto che per poter usare queste tecniche più moderne è richiesta una grande quantità di dati per l'apprendimento.<sup>[128,129,130]</sup> Una soluzione sarebbe quella di acquisire più scansioni ma, data la grande quantità di tempo richiesta per effettuarle, si può prendere in considerazione anche l'uso di AI generativa, come un modello di diffusione, per estendere il dataset con immagini sintetiche partendo da quelle presenti.<sup>[131]</sup>

Questo studio può essere esteso ad altri tipi di filtri basati sulla mediana per valutare la loro efficacia nel rimuovere il rumore impulsivo su questo tipo di immagini. Di seguito è presentata una lista di alcuni possibili filtri:

- Median Filter (MF)<sup>[132]</sup> — il filtro usato in questa tesi
- Weighted Median Filter (WMF)<sup>[133]</sup>
- Center Weighted Median Filter (CWMF)<sup>[134]</sup>
- Recursive Weighted Median Filter (RWMF)<sup>[135]</sup>
- Adaptive Median Filter (AMF)<sup>[136]</sup>

- Adaptive Switching Median Filter (ASMF)<sup>[137]</sup>
- Progressive Switching Median Filter (PSMF)<sup>[138]</sup>
- Tri-State Median Filter (TSMF)<sup>[139]</sup>

## 5.4 Ulteriori elaborazioni

Le immagini ottenute dall'applicazione delle tecniche di riduzione del rumore possono essere usate in applicazioni di visione artificiale per compiti come la conta delle cellule nell'immagine, lo studio delle loro caratteristiche morfologiche, come la rugosità della parete, la sua conformazione e come si dispongono gruppi di cellule. Un altro campo di interesse molto importante è la classificazione delle specie partendo dalle immagini o lo studio della mobilità dei batteri con flagelli e il loro riconoscimento.

### 5.4.1 Segmentazione

In questa tesi viene portato come esempio un processo di instance segmentation automatizzato.<sup>[140]</sup> Per prima cosa sono state create manualmente delle regioni di interesse corrispondenti ai batteri sulle immagini, in questo caso tutte della stessa classe. Poi è stato fatto il fine-tuning di un modello YOLO (You-Look-Only-Once) sulla maggior parte delle immagini mentre il restante 20% è stato usato per la validazione dei risultati. Per fare ciò è stato usato il modello `yolo11m-seg` di Ultralytics<sup>[141]</sup>, licenziato secondo la licenza AGPL-3.0. Il modello ha dato buoni risultati, con una precisione dell'80.35%, un recupero dell'82.72%, una mAP50 dell'82.19% e una mAP50-95 del 62.65%.

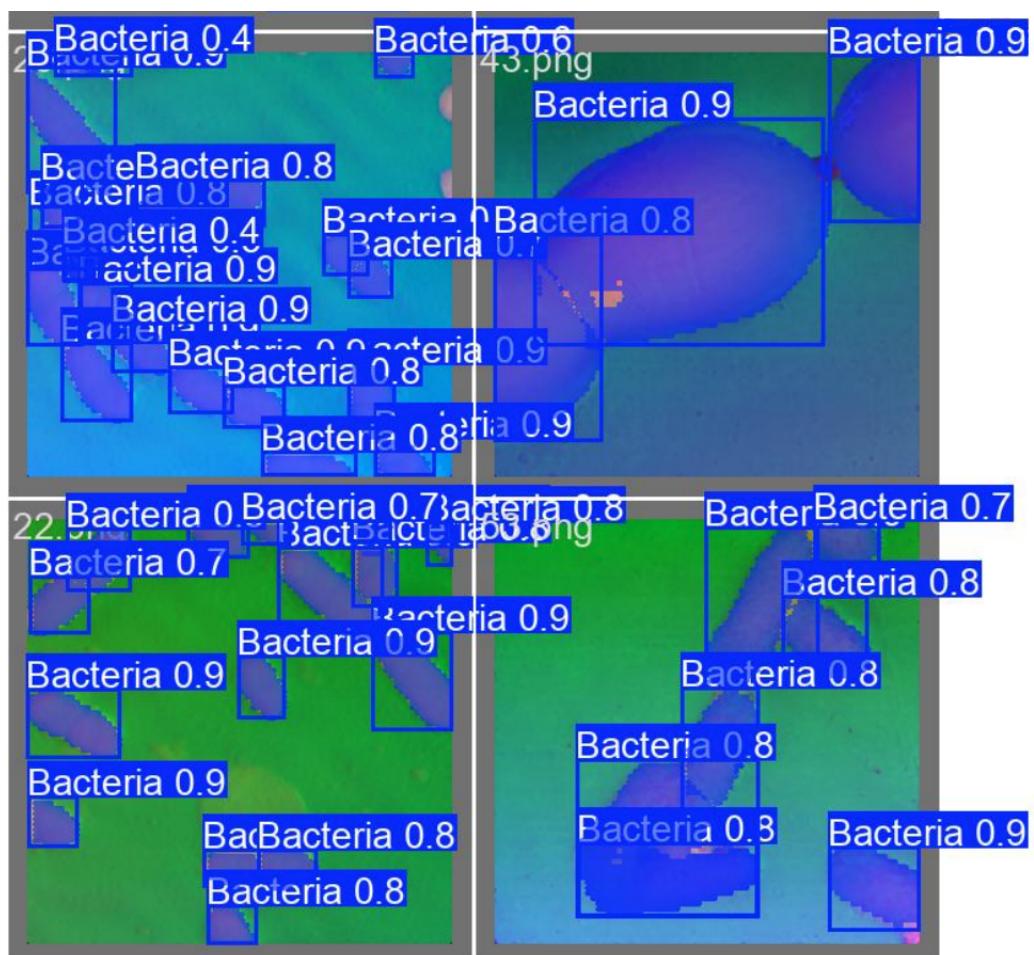


Figura 5.2: Alcuni risultati della segmentazione

# List di Termini e Acronimi

## Glossario

**cm<sup>-1</sup>** Unità di misura di un onda che indica quante oscillazioni sono compiute in un centimetro. 20

**Microbiologia** branca della biologia che studia organismi viventi non visibili a occhio nudo (e.g. batteri, funghi, virus). 4, 20, 22, 53

## Acronimi

**a-SNOM** Aperture Scanning Near-field Optical Microscopy. 15, 16

**AFM** Atomic force microscopy. 1–3, 8–10, 13, 16, 17, 20, 29, 37, 40–42, 47, 53, 54

**AMF** Adaptive Median Filter. 55

**ARGs** Antibiotic-Resistant Genes. 27

**ASMF** Adaptive Switching Median Filter. 55

**BM3D** Block-Matching and 3D Filtering. 2, 38, 47–49

**BRISQUE** Blind/Referenceless Image Spatial QUality Evaluator. 40, 44, 45

**CLSM** Confocal Laser Scanning Microscopy. 5, 54

**CNR** Contrast-to-Noise Ratio. 40

**CWMF** Center Weighted Median Filter. 55

**FR-IQA** Full Reference Image Quality Assessment. 40

**FSIM** Feature Similarity Index Measure. 3, 43, 46

**FTIR** Fourier Transform Infrared Spectroscopy. 17

**FTS** Fourier Transform Spectroscopy. 18

**HVS** Human Visual System. 35

**MF** Median Filter. 55

**MI** Mutual Information. 42

**MOS** Mean Opinion Score. 55

**MSE** Mean Square Error. 34

**NA** Numerical Aperture. 5

**NIQE** Naturalness Image Quality Evaluator. 40, 44

**NLM** Non-Local Means. 3, 38, 47–49, 52

**NR-IQA** No Reference Image Quality Assessment. 2, 40, 44

**PC** Phase Congruency. 42

**PCM** Phase-Contrast Microscopy. 5

**PID** Proportional-Integrative-Derivative. 13, 21

**PIQE** Perception based Image Quality Evaluator. 40, 44, 45

**PSMF** Progressive Switching Median Filter. 55

**PSNR** Peak Signal-to-Noise Ratio. 40

**RWMF** Recursive Weighted Median Filter. 55

**s-SNOM** Scattering-type Scanning Near-field Optical Microscopy. 1, 2, 17, 19, 20, 26, 29, 33, 37, 41, 42, 53, 54

**SEM** Scanning Electron Microscopy. 7, 9

<i>Acronyms</i>	60
<b>SNOM</b> Scanning Near-field Optical Microscopy.	1–3, 14, 15, 20, 30, 40–42, 45, 47,
52, 53	
<b>SPM</b> Scanning Probe Microscopy.	8, 17
<b>SSIM</b> Structural Similarity Index Measure.	40
<b>STM</b> Scanning Tunneling Microscope.	8
<b>TEM</b> Transmission Electron Microscopy.	7
<b>TSMF</b> Tri-State Median Filter.	55
<b>TV</b> Total Variation.	40
<b>WMF</b> Weighted Median Filter.	55

# Bibliografia

- [1] N. Lane, «The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) ‘Concerning little animals’,» *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 370, n. 1666, p. 20140344, 2015. DOI: [10.1098/rstb.2014.0344](https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0344). indirizzo: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstb.2014.0344>.
- [2] C. Dobell, «A Protozoological Bicentenary: Antony van Leeuwenhoek (1632–1723) and Louis Joblot (1645–1723),» *Parasitology*, vol. 15, n. 3, pp. 308–319, 1923. DOI: [10.1017/S0031182000014797](https://doi.org/10.1017/S0031182000014797).
- [3] J. O. Corliss, «Three Centuries of Protozoology: A Brief Tribute to its Founding Father, A. van Leeuwenhoek of Delft,» *The Journal of Protozoology*, vol. 22, n. 1, pp. 3–7, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1975.tb00934.x>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1975.tb00934.x>.
- [4] M. Ohtsu, «History, current developments, and future directions of near-field optical science,» *Opto-Electron Adv*, vol. 3, n. 3, p. 190046, 2020, ISSN: 2096-4579. DOI: [10.29026/oea.2020.190046](https://doi.org/10.29026/oea.2020.190046). indirizzo: <https://www.oejournal.org/article/id/5fa4dc96f4d7917194c90a73>.
- [5] M. Lucidi et al., «SSNOMBACTER: A collection of scattering-type scanning near-field optical microscopy and atomic force microscopy images of bacterial cells,» *GigaScience*, vol. 9, n. 11, giaa129, nov. 2020, ISSN: 2047-217X. DOI: [10.1093/gigascience/giaa129](https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa129). indirizzo: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa129>.
- [6] M. S. Mulani, E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre e K. R. Pardesi, «Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review,» English, *Frontiers in Microbiology*, vol. 10,

- apr. 2019, ISSN: 1664-302X. DOI: [10.3389/fmicb.2019.00539](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539). indirizzo: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00539/full>.
- [7] L. B. Rice, «Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE,» *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 197, n. 8, pp. 1079–1081, apr. 2008, ISSN: 0022-1899. DOI: [10.1086/533452](https://doi.org/10.1086/533452). indirizzo: <https://doi.org/10.1086/533452>.
- [8] L. Pipitò et al., «Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens: A retrospective epidemiological study at the University Hospital of Palermo, Italy,» en, *Antibiotics (Basel)*, vol. 14, n. 2, feb. 2025.
- [9] C. R. Baiz, K. Kanevche, J. Kozuch e J. Heberle, «Data-driven signal-to-noise enhancement in scattering near-field infrared microscopy,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 162, n. 5, p. 054201, feb. 2025, ISSN: 0021-9606. DOI: [10.1063/5.0247251](https://doi.org/10.1063/5.0247251). indirizzo: <https://doi.org/10.1063/5.0247251>.
- [10] P. Fara, «A microscopic reality tale,» *Nature*, vol. 459, n. 7247, pp. 642–644, giu. 2009, ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/459642a](https://doi.org/10.1038/459642a). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/459642a>.
- [11] R. Hooke, *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*. The Royal Society, 1635–1703.
- [12] A. J. C. Jessup e M. T. Coroneo, «Examining the fabric of the eye: Antoni van Leeuwenhoek, the draper and ocular microscopist,» *Survey of Ophthalmology*, 2024, ISSN: 0039-6257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2024.08.006>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039625724000985>.
- [13] F. Zernike, «How I Discovered Phase Contrast,» *Science*, vol. 121, n. 3141, pp. 345–349, 1955. DOI: [10.1126/science.121.3141.345](https://doi.org/10.1126/science.121.3141.345). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.121.3141.345>.
- [14] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3<sup>a</sup> ed. Springer New York, NY, ISBN: 978-0-387-25921-5. DOI: [0.1007/978-0-387-45524-2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2).

- [15] E. Abbe Hon., «VII.—On the Estimation of Aperture in the Microscope.,» *Journal of the Royal Microscopical Society*, vol. 1, n. 3, pp. 388–423, 1881. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1881.tb05909.x>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2818.1881.tb05909.x>.
- [16] A. Hon., «The Relation of Aperture and Power in the Microscope (continued).,» *Journal of the Royal Microscopical Society*, vol. 2, n. 4, pp. 460–473, 1882. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x>.
- [17] M. Wilson, «Collecting Light: The Importance of Numerical Aperture in Microscopy,» *Leica Science Lab*, lug. 2017. indirizzo: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/microscopy-basics/collecting-light-the-importance-of-numerical-aperture-in-microscopy>.
- [18] S. W. Hell, «Far-Field Optical Nanoscopy,» *Science*, vol. 316, n. 5828, pp. 1153–1158, 2007. DOI: [10.1126/science.1137395](https://doi.org/10.1126/science.1137395). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1137395>.
- [19] C. W. Oatley, «The early history of the scanning electron microscope,» *Journal of Applied Physics*, vol. 53, n. 2, R1–R13, 1982.
- [20] «Physics 1981–1990,» in *Nobel Lectures*, T. Frängsmyr e G. Ekspong, cur., Singapore: World Scientific Publishing Co., 1993.
- [21] R. Erni, M. D. Rossell, C. Kisielowski e U. Dahmen, «Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe,» *Phys. Rev. Lett.*, vol. 102, p. 096101, 9 mar. 2009. DOI: [10.1103/PhysRevLett.102.096101](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.102.096101). indirizzo: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.102.096101>.
- [22] T. Sunaoshi, K. Kaji, Y. Orai, C. Schamp e E. Voelkl, «STEM/SEM, Chemical Analysis, Atomic Resolution and Surface Imaging At  $\geq$ 30 kV with No Aberration Correction for Nanomaterials on Graphene Support,» *Microscopy and Microanalysis*, vol. 22, n. S3, pp. 604–605, lug. 2016, ISSN: 1431-9276. DOI: [10.1017/S1431927616003871](https://doi.org/10.1017/S1431927616003871). indirizzo: <https://doi.org/10.1017/S1431927616003871>.

- [23] S. M. Salapalaka e M. V. Salapalaka, «Scanning Probe Microscopy,» *IEEE Control Systems Magazine*, vol. 28, n. 2, pp. 65–83, apr. 2008, ISSN: 1941-000X. DOI: [10.1109/MCS.2007.914688](https://doi.org/10.1109/MCS.2007.914688).
- [24] C. Bai, *Scanning Tunneling Microscopy and Its Application*, 2<sup>a</sup> ed. Springer Berlin, Heidelberg, ago. 2000, pp. XIV, 370, ISBN: 978-3-540-65715-6.
- [25] G. Binnig, C. F. Quate e C. Gerber, «Atomic Force Microscope,» *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, pp. 930–933, 9 mar. 1986. DOI: [10.1103/PhysRevLett.56.930](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930). indirizzo: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- [26] BudgetSensors. «Tap150Al-G AFM Probe. »indirizzo: <https://www.budgetsensors.com/soft-tapping-mode-afm-probe-aluminum-tap150al>.
- [27] W. Sun, «Principles of Atomic Force Microscopy,» in *Atomic Force Microscopy in Molecular and Cell Biology*, J. Cai, cur. Singapore: Springer Singapore, 2018, pp. 1–28, ISBN: 978-981-13-1510-7. DOI: [10.1007/978-981-13-1510-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1510-7_1). indirizzo: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1510-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1510-7_1).
- [28] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller e V. Elings, «Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy,» *Surface Science*, vol. 290, n. 1, pp. L688–L692, 1993, ISSN: 0039-6028. DOI: [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(93\)90582-5](https://doi.org/10.1016/0039-6028(93)90582-5). indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039602893905825>.
- [29] Y. Wang e J. Wang, «Friction Determination by Atomic Force Microscopy in Field of Biochemical Science,» *Micromachines*, vol. 9, n. 7, 2018, ISSN: 2072-666X. DOI: [10.3390/mi9070313](https://doi.org/10.3390/mi9070313). indirizzo: <https://www.mdpi.com/2072-666X/9/7/313>.
- [30] K. Babcock e C. Prater, «Phase Imaging: Beyond Topography,» in ser. Application Note, vol. AN11, Bruker, 2004.
- [31] S. Karrasch, M. Dolder, F. Schabert, J. Ramsden e A. Engel, «Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution,» *Biophysical Journal*, vol. 65, n. 6, pp. 2437–2446, 1993, ISSN: 0006-3495. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81327-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81327-4). indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349593813274>.

- [32] F. J. Giessibl, H. Bielefeldt, S. Hembacher e J. Mannhart, «Calculation of the optimal imaging parameters for frequency modulation atomic force microscopy,» *Applied Surface Science*, vol. 140, n. 3, pp. 352–357, 1999, ISSN: 0169-4332. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(98\)00553-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(98)00553-4). indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433298005534>.
- [33] H. Ho e P. West, «Optimizing AC-mode atomic force microscope imaging,» *Scanning*, vol. 18, n. 5, pp. 339–343, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1002/sca.1996.4950180503>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sca.1996.4950180503>.
- [34] Y. Sugawara, M. Ohta, H. Ueyama e S. Morita, «Defect Motion on an InP(110) Surface Observed with Noncontact Atomic Force Microscopy,» *Science*, vol. 270, n. 5242, pp. 1646–1648, 1995. DOI: [10.1126/science.270.5242.1646](https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1646). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.270.5242.1646>.
- [35] K. Åström e R. Murray, *Feedback Systems: An Introduction for Scientists and Engineers*. Princeton University Press, 2010, ISBN: 9781400828739. indirizzo: <https://books.google.it/books?id=cdG9fNqTDS8C>.
- [36] K. Ogata, «PID Controllers and Modified PID Controllers,» in *Modern Control Engineering*, 5<sup>a</sup> ed. PHI Learning Pvt Ltd, gen. 2010, cap. 8, ISBN: 978-8120340107.
- [37] M. Parisi, «Multiparametric feature extraction in AFM/s-SNOM images of bacterial cells using a machine learning approach,» Master's Thesis, Roma Tre University, dic. 2021.
- [38] E. S. and, «XXXVIII. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region,» *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 6, n. 35, pp. 356–362, 1928. DOI: [10.1080/14786440808564615](https://doi.org/10.1080/14786440808564615). indirizzo: <https://doi.org/10.1080/14786440808564615>.
- [39] D. W. Pohl, W. Denk e M. Lanz, «Optical stethoscopy: Image recording with resolution  $\lambda/20$ ,» *Applied Physics Letters*, vol. 44, n. 7, pp. 651–653, apr.

- 1984, ISSN: 0003-6951. DOI: [10.1063/1.94865](https://doi.org/10.1063/1.94865). indirizzo: <https://doi.org/10.1063/1.94865>.
- [40] L. Novotny e B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*, 2<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press, 2012.
- [41] E. Betzig e J. K. Trautman, «Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit,» *Science*, vol. 257, n. 5067, pp. 189–195, 1992. DOI: [10.1126/science.257.5067.189](https://doi.org/10.1126/science.257.5067.189). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.257.5067.189>.
- [42] X. Ma et al., «6 nm super-resolution optical transmission and scattering spectroscopic imaging of carbon nanotubes using a nanometer-scale white light source,» *Nature Communications*, vol. 12, n. 1, p. 6868, nov. 2021, ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-021-27216-5](https://doi.org/10.1038/s41467-021-27216-5). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27216-5>.
- [43] Y. Oshikane, T. Kataoka, M. Okuda, S. Hara, H. Inoue e M. N. and, «Observation of nanostructure by scanning near-field optical microscope with small sphere probe,» *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 8, n. 3, pp. 181–185, 2007. DOI: [10.1016/j.stam.2007.02.013](https://doi.org/10.1016/j.stam.2007.02.013). indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.stam.2007.02.013>.
- [44] B. Hapke, «Introduction,» in *Theory of Reflectance and Emittance Spectroscopy*, Cambridge: Cambridge University Press, set. 1993, pp. 1–5.
- [45] D. Voborník e S. Voborník, «Scanning Near-field Optical Microscopy,» *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, vol. 8, n. 1, pp. 63–71, feb. 2008.
- [46] T. J. Antosiewicz, P. Wróbel e T. Szoplik, «Bi-metal coated aperture SNOM probes,» in *Metamaterials VI*, V. Kuzmiak, P. Markos e T. Szoplik, cur., International Society for Optics e Photonics, vol. 8070, SPIE, 2011, 80700Z. DOI: [10.1117/12.886834](https://doi.org/10.1117/12.886834). indirizzo: <https://doi.org/10.1117/12.886834>.
- [47] TipsNano. «SNOM-C Contact Probe. »indirizzo: <https://tipsnano.com/catalog/snom/snom-c/>.
- [48] B. Hecht et al., «Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 112, n. 18, pp. 7761–7774, mag. 2000, ISSN: 0021-9606. DOI: [10.1063/1.481382](https://doi.org/10.1063/1.481382). indirizzo: <https://doi.org/10.1063/1.481382>.

- [49] L. Alvarez e M. Xiao, «Theoretical Analyses on the Resolution of Collection Mode Scanning Near-Field Optical Microscopy,» *Optical Review*, vol. 13, n. 4, pp. 254–261, lug. 2006, ISSN: 1349-9432. DOI: [10.1007/s10043-006-0254-8](https://doi.org/10.1007/s10043-006-0254-8). indirizzo: <https://doi.org/10.1007/s10043-006-0254-8>.
- [50] W. Zhang, Z. Fang e X. Zhu, «Near-Field Raman Spectroscopy with Aperture Tips,» *Chemical Reviews*, vol. 117, n. 7, pp. 5095–5109, apr. 2017, ISSN: 0009-2665. DOI: [10.1021/acs.chemrev.6b00337](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00337). indirizzo: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00337>.
- [51] N. Rotenberg e L. Kuipers, «Mapping nanoscale light fields,» *Nature Photonics*, vol. 8, n. 12, pp. 919–926, dic. 2014, ISSN: 1749-4893. DOI: [10.1038/nphoton.2014.285](https://doi.org/10.1038/nphoton.2014.285). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/nphoton.2014.285>.
- [52] L. Wang e X. G. Xu, «Scattering-type scanning near-field optical microscopy with reconstruction of vertical interaction,» *Nature Communications*, vol. 6, n. 1, p. 8973, nov. 2015, ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/ncomms9973](https://doi.org/10.1038/ncomms9973). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/ncomms9973>.
- [53] A. Cvitkovic, N. Ocelic e R. Hillenbrand, «Analytical model for quantitative prediction of material contrasts in scattering-type near-field optical microscopy,» *Opt. Express*, vol. 15, n. 14, pp. 8550–8565, lug. 2007. DOI: [10.1364/OE.15.008550](https://doi.org/10.1364/OE.15.008550). indirizzo: <https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-15-14-8550>.
- [54] C. Wu, M. Ye e H. Ye, «Image dipole approach and polarization effects in scanning near-field optical microscopy,» *Optik*, vol. 116, n. 6, pp. 277–280, 2005, ISSN: 0030-4026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2005.01.024>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030402605000586>.
- [55] A. Jarzembski e K. Park, «Finite dipole model for extreme near-field thermal radiation between a tip and planar SiC substrate,» *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol. 191, pp. 67–74, 2017, ISSN: 0022-4073. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2017.02.001>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022407316304605>.

- [56] C. Moreno, J. Alda, E. Kinzel e G. Boreman, «Phase imaging and detection in pseudo-heterodyne scattering scanning near-field optical microscopy measurements,» *Appl. Opt.*, vol. 56, n. 4, pp. 1037–1045, feb. 2017. DOI: [10.1364/AO.56.001037](https://doi.org/10.1364/AO.56.001037). indirizzo: <https://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?URI=ao-56-4-1037>.
- [57] MikroMasch. «HQ: NSC19/Cr-Au.» Gold Coated Soft Tapping Mode and LFM AFM Probe. indirizzo: <https://www.spmtips.com/afm-tip-hq-nsc19-cr-au>.
- [58] D. Nečas e P. Klapetek, «Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis,» *Central European Journal of Physics*, vol. 10, pp. 181–188, 1 2012, ISSN: 1895-1082. DOI: [10.2478/s11534-011-0096-2](https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2).
- [59] M. Göker e A. Oren, «Valid publication of names of two domains and seven kingdoms of prokaryotes,» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 74, n. 1, 006242, 2024, ISSN: 1466-5034. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006242>. indirizzo: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.006242>.
- [60] J. P. McCutcheon, «The Genomics and Cell Biology of Host-Beneficial Intracellular Infections,» *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 37, n. Volume 37, 2021, pp. 115–142, 2021, ISSN: 1530-8995. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-024122>. indirizzo: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-cellbio-120219-024122>.
- [61] D. I. Johnson, «Bacterial Virulence Factors,» in *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 1–38, ISBN: 978-3-319-67651-7. DOI: [10.1007/978-3-319-67651-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7_1). indirizzo: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7_1).
- [62] G. Dehò e E. Galli, «La struttura della cellula procariotica,» in *Biologia dei microrganismi*, Dehò, Gianni e Galli, Enrica, cur., 3<sup>a</sup> ed. Milano: Pearson, 2018, cap. 2, pp. 46–123, Traduzione e adattamento italiano dell’edizione originale "Brock Biology of Microorganisms".

- [63] A. Zapun, T. Vernet e M. G. Pinho, «The different shapes of cocci,» *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 32, n. 2, pp. 345–360, feb. 2008, ISSN: 0168-6445. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x). indirizzo: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x>.
- [64] W. Levinson, E. A. Joyce, J. Nussbaum, B. S. Schwartz e P. Chin-Hong, *Review of medical microbiology & immunology : a guide to clinical infectious diseases*, English, 15<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. indirizzo: <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=2381>.
- [65] H. Smith, «Microbial surfaces in relation to pathogenicity,» *Bacteriological Reviews*, vol. 41, n. 2, pp. 475–500, 1977. DOI: [10.1128/br.41.2.475-500.1977](https://doi.org/10.1128/br.41.2.475-500.1977). indirizzo: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/br.41.2.475-500.1977>.
- [66] R. Coico, «Gram Staining,» *Current Protocols in Microbiology*, vol. 00, n. 1, A.3C.1–A.3C.2, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>. indirizzo: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780471729259.mca03cs00>.
- [67] D. W. Watson e C. A. Brandly, «VIRULENCE AND PATHOGENICITY,» *Annual Review of Microbiology*, vol. 3, n. Volume 3, 1949, pp. 195–220, 1949, ISSN: 1545-3251. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.001211>. indirizzo: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.mi.03.100149.001211>.
- [68] A. Casadevall e L. Pirofski, «Host-pathogen interactions: the attributes of virulence,» en, *J. Infect. Dis.*, vol. 184, n. 3, pp. 337–344, ago. 2001.
- [69] T. E. Love e B. Jones, «Introduction to Pathogenic Bacteria,» in *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, M. Zourob, S. Elwary e A. Turner, cur. New York, NY: Springer New York, 2008, pp. 3–13, ISBN: 978-0-387-75113-9. DOI: [10.1007/978-0-387-75113-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75113-9_1). indirizzo: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-75113-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75113-9_1).
- [70] A. Casadevall e L. A. Pirofski, «Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity,» en, *Infect. Immun.*, vol. 67, n. 8, pp. 3703–3713, ago. 1999.

- [71] E. Fällman, S. Schedin, J. Jass, B.-E. Uhlin e O. Axner, «The unfolding of the P pili quaternary structure by stretching is reversible, not plastic,» *EMBO reports*, vol. 6, n. 1, pp. 52–56, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400310>. indirizzo: <https://www.embopress.org/doi/abs/10.1038/sj.embor.7400310>.
- [72] B. Kenny, R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey e B. Finlay, «Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells,» *Cell*, vol. 91, n. 4, pp. 511–520, nov. 1997, ISSN: 0092-8674. DOI: [10.1016/S0092-8674\(00\)80437-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80437-7). indirizzo: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80437-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80437-7).
- [73] G. E. Soto e S. J. Hultgren, «Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly,» *Journal of Bacteriology*, vol. 181, n. 4, pp. 1059–1071, 1999. DOI: [10.1128/jb.181.4.1059-1071.1999](https://doi.org/10.1128/jb.181.4.1059-1071.1999). indirizzo: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.181.4.1059-1071.1999>.
- [74] M. Lucidi et al., *SSNOMBACTER*, ott. 2020. DOI: [10.17605/OSF.IO/5U6PG](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/5U6PG). indirizzo: [osf.io/5u6pg](https://osf.io/5u6pg).
- [75] B. B. Finlay e S. Falkow, «Common themes in microbial pathogenicity revisited,» *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, n. 2, pp. 136–169, 1997. DOI: [10.1128/mmbr.61.2.136-169.1997](https://doi.org/10.1128/mmbr.61.2.136-169.1997). indirizzo: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mmbr.61.2.136-169.1997>.
- [76] S. S. Justice, D. A. Hunstad, L. Cegelski e S. J. Hultgren, «Morphological plasticity as a bacterial survival strategy,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, n. 2, pp. 162–168, feb. 2008, ISSN: 1740-1534. DOI: [10.1038/nrmicro1820](https://doi.org/10.1038/nrmicro1820). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1820>.
- [77] E. Yabuuchi e A. Ohya, «Achromobacter xylosoxidans n. sp. from Human Ear Discharge,» *Japanese Journal of Microbiology*, vol. 15, n. 5, pp. 477–481, 1971. DOI: [10.1111/j.1348-0421.1971.tb00607.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1971.tb00607.x).
- [78] D. F. Sahm et al., «In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 33, n. 9, pp. 1588–1591, 1989.

- [79] P. J. Bouvet e P. A. Grimont, «Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*,» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 36, n. 2, pp. 228–240, 1986.
- [80] J. R. Govan et al., «Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis,» *The lancet*, vol. 342, n. 8862, pp. 15–19, 1993.
- [81] S. Bascomb, S. Lapage, W. Willcox e M. Curtis, «Numerical classification of the tribe Klebsielleae,» *Microbiology*, vol. 66, n. 3, pp. 279–295, 1971.
- [82] E. Hormaeche e P. Edwards, *Proposal for the Rejection of the Generic Name Cloaca Castellani and Chalmers, and Proposal of Enterobacter as a Generic Name with Designation of Type Species and of its Type Culture: With Request for an Opinion*, 1960.
- [83] K. H. Schleifer e R. Kilpper-Bälz, «Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.,» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 34, n. 1, pp. 31–34, 1984.
- [84] N. J. Palleroni e J. F. Bradbury, «*Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983,» *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 43, n. 3, pp. 606–609, 1993.
- [85] *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*, eng, Report, Atlanta, GA, 2019. indirizzo: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>.
- [86] M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckley, W. M. Sattley e D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 15<sup>a</sup> ed. London, UK: Pearson, 2015, Global Edition.
- [87] K. Ito e K. Xiong, «Gaussian filters for nonlinear filtering problems,» *IEEE Transactions on Automatic Control*, vol. 45, n. 5, pp. 910–927, 2000. DOI: [10.1109/9.855552](https://doi.org/10.1109/9.855552).

- [88] M. Wang, S. Zheng, X. Li e X. Qin, «A new image denoising method based on Gaussian filter,» in *2014 International Conference on Information Science, Electronics and Electrical Engineering*, vol. 1, 2014, pp. 163–167. DOI: [10.1109/InfoSEEE.2014.6948089](https://doi.org/10.1109/InfoSEEE.2014.6948089).
- [89] P. Getreuer, «A Survey of Gaussian Convolution Algorithms,» *Image Processing On Line*, vol. 3, pp. 286–310, 2013, <https://doi.org/10.5201/ipol.2013.87>.
- [90] W. Jarosz, «Fast Image Convolutions,» Presentato alla conferenza ACM SIGGRAPH 2001, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2001.
- [91] H. S. Carslaw, «A historical note on Gibbs' phenomenon in Fourier's series and integrals,» *Bulletin of the American Mathematical Society*, vol. 31, pp. 420–424, 1925. DOI: [10.1090/S0002-9904-1925-04081-1](https://doi.org/10.1090/S0002-9904-1925-04081-1). indirizzo: <https://www.ams.org/journals/bull/1925-31-08/S0002-9904-1925-04081-1/>.
- [92] N. R. Barth, *Ringing artifact example*, mag. 2010. indirizzo: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Ringing\\_artifact\\_example.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Ringing_artifact_example.png).
- [93] A. Rezaee, «Partition Fuzzy Median Filter for Image Restoration,» *Fuzzy Information and Engineering*, vol. 13, n. 2, pp. 199–210, 2021. DOI: [10.1080/16168658.2021.1921377](https://doi.org/10.1080/16168658.2021.1921377). indirizzo: <https://doi.org/10.1080/16168658.2021.1921377>.
- [94] E. Arias-Castro e D. L. Donoho, «Does median filtering truly preserve edges better than linear filtering?» English, *Ann. Stat.*, vol. 37, n. 3, pp. 1172–1206, 2009, ISSN: 0090-5364. DOI: [10.1214/08-AOS604](https://doi.org/10.1214/08-AOS604).
- [95] G. R. Arce, «Median and Weighted Median Smoothers,» in *Nonlinear Signal Processing*. John Wiley Sons, Ltd, 2004, cap. 5, pp. 80–138, ISBN: 9780471691853. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471691852.ch5>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471691852.ch5>.
- [96] N. Wiener, «The extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series,» Research Project DIC-6037, MIT, Cambridge, Massachusetts, OSRD 370, Report to the Services 19, 1942.
- [97] A. V. Oppenheim e G. C. Verghese, «Wiener Filtering,» in *Introduction to Communication, Control and Signal Processing*. MIT OpenCourseWare, 2010.

- [98] F. Bergamasco, «Filtering in the Frequency Domain,» in *Computer Vision*. Università Ca' Foscari Venezia, 2016, cap. 5. indirizzo: [https://www.dsi.unive.it/~bergamasco/teachingfiles/cvslides/5\\_filtering\\_in\\_frequency\\_domain.pdf](https://www.dsi.unive.it/~bergamasco/teachingfiles/cvslides/5_filtering_in_frequency_domain.pdf).
- [99] C. Tomasi e R. Manduchi, «Bilateral filtering for gray and color images,» in *Sixth International Conference on Computer Vision (IEEE Cat. No.98CH36271)*, 1998, pp. 839–846. DOI: [10.1109/ICCV.1998.710815](https://doi.org/10.1109/ICCV.1998.710815).
- [100] G. Wyszecki e W. S. Stiles, *Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae*, 2<sup>a</sup> ed. New York: Wiley, 2000, ISBN: 978-0-471-39918-6.
- [101] F. Durand e J. Dorsey, «Fast bilateral filtering for the display of high-dynamic-range images,» in *Proceedings of the 29th Annual Conference on Computer Graphics and Interactive Techniques*, ser. SIGGRAPH '02, San Antonio, Texas: Association for Computing Machinery, 2002, pp. 257–266, ISBN: 1581135211. DOI: [10.1145/566570.566574](https://doi.org/10.1145/566570.566574). indirizzo: <https://doi.org/10.1145/566570.566574>.
- [102] G. Petschnigg, R. Szeliski, M. Agrawala, M. Cohen, H. Hoppe e K. Toyama, «Digital photography with flash and no-flash image pairs,» *ACM Trans. Graph.*, vol. 23, n. 3, pp. 664–672, ago. 2004, ISSN: 0730-0301. DOI: [10.1145/1015706.1015777](https://doi.org/10.1145/1015706.1015777). indirizzo: <https://doi.org/10.1145/1015706.1015777>.
- [103] K. He, J. Sun e X. Tang, «Guided Image Filtering,» *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 35, n. 6, pp. 1397–1409, 2013. DOI: [10.1109/TPAMI.2012.213](https://doi.org/10.1109/TPAMI.2012.213).
- [104] A. Buades, B. Coll e J.-M. Morel, «Non-Local Means Denoising,» *Image Processing On Line*, vol. 1, pp. 208–212, 2011. indirizzo: [https://doi.org/10.5201/ipol.2011.bcm\\_nlm](https://doi.org/10.5201/ipol.2011.bcm_nlm).
- [105] A. Buades, B. Coll e J.-M. Morel, «A non-local algorithm for image denoising,» in *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)*, vol. 2, 2005, 60–65 vol. 2. DOI: [10.1109/CVPR.2005.38](https://doi.org/10.1109/CVPR.2005.38).
- [106] J. V. Manjón, J. Carbonell-Caballero, J. J. Lull, G. García-Martí, L. Martí-Bonmatí e M. Robles, «MRI denoising using Non-Local Means,» *Medical Image Analysis*, vol. 12, n. 4, pp. 514–523, 2008, ISSN: 1361-8415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.media.2008.01.003>.

- //doi.org/10.1016/j.media.2008.02.004. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1361841508000248>.
- [107] M. Maggioni, V. Katkovnik, K. Egiazarian e A. Foi, «Nonlocal Transform-Domain Filter for Volumetric Data Denoising and Reconstruction,» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 22, n. 1, pp. 119–133, 2013. DOI: [10.1109/TIP.2012.2210725](https://doi.org/10.1109/TIP.2012.2210725).
- [108] K. Dabov, A. Foi, V. Katkovnik e K. Egiazarian, «Image Denoising by Sparse 3-D Transform-Domain Collaborative Filtering,» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 16, n. 8, pp. 2080–2095, 2007. DOI: [10.1109/TIP.2007.901238](https://doi.org/10.1109/TIP.2007.901238).
- [109] J. Korhonen e J. You, «Peak signal-to-noise ratio revisited: Is simple beautiful?» In *2012 Fourth International Workshop on Quality of Multimedia Experience*, 2012, pp. 37–38. DOI: [10.1109/QoMEX.2012.6263880](https://doi.org/10.1109/QoMEX.2012.6263880).
- [110] Z. Wang, A. Bovik, H. Sheikh e E. Simoncelli, «Image quality assessment: from error visibility to structural similarity,» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 13, n. 4, pp. 600–612, 2004. DOI: [10.1109/TIP.2003.819861](https://doi.org/10.1109/TIP.2003.819861).
- [111] A. Rodriguez-Molares, O. M. Hoel Rindal, J. D'hooge, S.-E. Måsøy, A. Austeng e H. Torp, «The Generalized Contrast-to-Noise Ratio,» in *2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, 2018, pp. 1–4. DOI: [10.1109/ULTSYM.2018.8580101](https://doi.org/10.1109/ULTSYM.2018.8580101).
- [112] A. Mittal, A. K. Moorthy e A. C. Bovik, «Blind/Referenceless Image Spatial Quality Evaluator,» in *2011 Conference Record of the Forty Fifth Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers (ASILOMAR)*, 2011, pp. 723–727. DOI: [10.1109/ACSSC.2011.6190099](https://doi.org/10.1109/ACSSC.2011.6190099).
- [113] A. Mittal, R. Soundararajan e A. C. Bovik, «Making a “Completely Blind” Image Quality Analyzer,» *IEEE Signal Processing Letters*, vol. 20, n. 3, pp. 209–212, 2013. DOI: [10.1109/LSP.2012.2227726](https://doi.org/10.1109/LSP.2012.2227726).
- [114] V. N, P. D, M. C. Bh, S. S. Channappayya e S. S. Medasani, «Blind image quality evaluation using perception based features,» in *2015 Twenty First National Conference on Communications (NCC)*, 2015, pp. 1–6. DOI: [10.1109/NCC.2015.7084843](https://doi.org/10.1109/NCC.2015.7084843).

- [115] A. Carass et al., «Evaluating White Matter Lesion Segmentations with Refined Sørensen-Dice Analysis,» *Scientific Reports*, vol. 10, n. 1, p. 8242, mag. 2020, ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/s41598-020-64803-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-64803-w). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64803-w>.
- [116] C. E. Shannon, «A mathematical theory of communication,» *The Bell System Technical Journal*, vol. 27, n. 3, pp. 379–423, 1948. DOI: [10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x](https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x).
- [117] P. Viola e W. M. Wells III, «Alignment by Maximization of Mutual Information,» *International Journal of Computer Vision*, vol. 24, n. 2, pp. 137–154, set. 1997, ISSN: 1573-1405. DOI: [10.1023/A:1007958904918](https://doi.org/10.1023/A:1007958904918). indirizzo: <https://doi.org/10.1023/A:1007958904918>.
- [118] P. W. McLaughlin et al., «The use of mutual information in registration of CT and MRI datasets post permanent implant,» en, *Brachytherapy*, vol. 3, n. 2, pp. 61–70, 2004.
- [119] T. Veninga, H. Huisman, R. W. M. van der Maazen e H. Huizenga, «Clinical validation of the normalized mutual information method for registration of CT and MR images in radiotherapy of brain tumors,» en, *J. Appl. Clin. Med. Phys.*, vol. 5, n. 3, pp. 66–79, giu. 2004.
- [120] P. Kovesi et al., «Image features from phase congruency,» *Videre: Journal of computer vision research*, vol. 1, n. 3, pp. 1–26, 1999.
- [121] M. Concetta Morrone, D. C. Burr e H. B. Barlow, «Feature detection in human vision: a phase-dependent energy model,» *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, vol. 235, n. 1280, pp. 221–245, 1988. DOI: [10.1098/rspb.1988.0073](https://doi.org/10.1098/rspb.1988.0073). indirizzo: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspb.1988.0073>.
- [122] P. Kovesi, «Phase Congruency Detects Corners and Edges,» vol. 2003, gen. 2003.
- [123] L. Zhang, L. Zhang, X. Mou e D. Zhang, «FSIM: A Feature Similarity Index for Image Quality Assessment,» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 20, n. 8, pp. 2378–2386, 2011. DOI: [10.1109/TIP.2011.2109730](https://doi.org/10.1109/TIP.2011.2109730).

- [124] B. Jahne, P. Geissler e H. Haussecker, *Handbook of Computer Vision and Applications with Cdrom*, 1st. San Francisco, CA, USA: Morgan Kaufmann Publishers Inc., 1999, ISBN: 0123797705.
- [125] Y. Hou, C. Zhao, D. Yang e Y. Cheng, «Comments on "Image Denoising by Sparse 3-D Transform-Domain Collaborative Filtering,"» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 20, n. 1, pp. 268–270, 2011. DOI: [10.1109/TIP.2010.2052281](https://doi.org/10.1109/TIP.2010.2052281).
- [126] J. Canny, «A Computational Approach to Edge Detection,» *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. PAMI-8, n. 6, pp. 679–698, 1986. DOI: [10.1109/TPAMI.1986.4767851](https://doi.org/10.1109/TPAMI.1986.4767851).
- [127] S. G. Stanciu, D. E. Tranca, R. Hristu e G. A. Stanciu, «Correlative imaging of biological tissues with apertureless scanning near-field optical microscopy and confocal laser scanning microscopy,» *Biomed. Opt. Express*, vol. 8, n. 12, pp. 5374–5383, dic. 2017. DOI: [10.1364/BOE.8.005374](https://doi.org/10.1364/BOE.8.005374). indirizzo: <https://opg.optica.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-8-12-5374>.
- [128] Y. LeCun, Y. Bengio e G. Hinton, «Deep learning,» *Nature*, vol. 521, n. 7553, pp. 436–444, mag. 2015, ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/nature14539](https://doi.org/10.1038/nature14539). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/nature14539>.
- [129] G. Litjens et al., «A survey on deep learning in medical image analysis,» *Medical Image Analysis*, vol. 42, pp. 60–88, 2017, ISSN: 1361-8415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.media.2017.07.005>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1361841517301135>.
- [130] S. Bosse, D. Maniry, K.-R. Müller, T. Wiegand e W. Samek, «Deep Neural Networks for No-Reference and Full-Reference Image Quality Assessment,» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 27, n. 1, pp. 206–219, 2018. DOI: [10.1109/TIP.2017.2760518](https://doi.org/10.1109/TIP.2017.2760518).
- [131] J. Ho, A. Jain e P. Abbeel, «Denoising diffusion probabilistic models,» in *Proceedings of the 34th International Conference on Neural Information Processing Systems*, ser. NIPS '20, Vancouver, BC, Canada: Curran Associates Inc., 2020, ISBN: 9781713829546.

- [132] N. Gallagher e G. Wise, «A theoretical analysis of the properties of median filters,» *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, vol. 29, n. 6, pp. 1136–1141, 1981. DOI: [10.1109/TASSP.1981.1163708](https://doi.org/10.1109/TASSP.1981.1163708).
- [133] X. Zhang e Y. Xiong, «Impulse Noise Removal Using Directional Difference Based Noise Detector and Adaptive Weighted Mean Filter,» *IEEE Signal Processing Letters*, vol. 16, n. 4, pp. 295–298, 2009. DOI: [10.1109/LSP.2009.2014293](https://doi.org/10.1109/LSP.2009.2014293).
- [134] S.-J. Ko e Y. Lee, «Center weighted median filters and their applications to image enhancement,» *IEEE Transactions on Circuits and Systems*, vol. 38, n. 9, pp. 984–993, 1991. DOI: [10.1109/31.83870](https://doi.org/10.1109/31.83870).
- [135] V. Kumar, S. Manikandan, P. Vanathi, P. Kanagasabapathy e D. Ebenezer, «Adaptive Window Length Recursive Weighted Median Filter for Removing Impulse Noise in Images with details Preservation,» *ECTI Transactions on Electrical Engineering, Electronics, and Communications*, vol. 6, n. 1, pp. 73–80, mag. 2007. DOI: [10.37936/ecti-eec.200861.171764](https://doi.org/10.37936/ecti-eec.200861.171764). indirizzo: <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/ECTI-EEC/article/view/171764>.
- [136] T. Chen e H. R. Wu, «Adaptive impulse detection using center-weighted median filters,» *IEEE Signal Processing Letters*, vol. 8, n. 1, pp. 1–3, 2001. DOI: [10.1109/97.889633](https://doi.org/10.1109/97.889633).
- [137] V. Khryashchev, A. Priorov, I. Apalkov e P. Zvonarev, «Image denoising using adaptive switching median filter,» in *IEEE International Conference on Image Processing 2005*, vol. 1, 2005, pp. I–117. DOI: [10.1109/ICIP.2005.1529701](https://doi.org/10.1109/ICIP.2005.1529701).
- [138] Z. Wang e D. Zhang, «Progressive switching median filter for the removal of impulse noise from highly corrupted images,» *IEEE Transactions on Circuits and Systems II: Analog and Digital Signal Processing*, vol. 46, n. 1, pp. 78–80, 1999. DOI: [10.1109/82.749102](https://doi.org/10.1109/82.749102).
- [139] T. Chen, K.-K. Ma e L.-H. Chen, «Tri-state median filter for image denoising,» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 8, n. 12, pp. 1834–1838, 1999. DOI: [10.1109/83.806630](https://doi.org/10.1109/83.806630).
- [140] A. M. Hafiz e G. M. Bhat, «A survey on instance segmentation: state of the art,» *International Journal of Multimedia Information Retrieval*, vol. 9, n. 3,

- pp. 171–189, set. 2020, ISSN: 2192-662X. DOI: [10.1007/s13735-020-00195-x](https://doi.org/10.1007/s13735-020-00195-x).  
indirizzo: <https://doi.org/10.1007/s13735-020-00195-x>.
- [141] G. Jocher, J. Qiu e A. Chaurasia, *Ultralytics YOLO*, ver. 8.0.0, gen. 2023.  
indirizzo: <https://github.com/ultralytics/ultralytics>.