

Imagen digital macro y microscópica

Luis Alfaro¹, Enrique Poblet²

¹Anatomía Patológica. Fundación Oftalmológica del Mediterráneo;

²Anatomía Patológica. Hospital Reina Sofía. Murcia

El diagnóstico anatomopatológico se basa en la integración de la información clínica del paciente con el estudio macroscópico de las lesiones extirpadas, el análisis microscópico de las mismas y elementos adicionales como técnicas especiales, moleculares, radiología etc. Suele entenderse, sin embargo, de una forma más reducida, como la interpretación de los parámetros morfológicos de las lesiones en el estudio microscópico. Este diagnóstico, que en el fondo parte de un proceso de reconocimiento visual, puede extrapolarse a la valoración de imágenes lesionales. La evolución tecnológica nos ha aportado unos medios para obtener imágenes digitales de tal calidad que superan en resolución y detalle la que nos proporcionan nuestros propios ojos. Cualquier cámara fotográfica de última generación, incluso en sus versiones domésticas y de mayor sencillez, nos permite obtener fotografías macroscópicas de nuestros especímenes mostrando pequeños detalles que pasarían inadvertidos a nuestros ojos. De la misma manera la obtención de imágenes fotográficas microscópicas, bien estáticas, o bien a través de escáneres de preparaciones microscópicas, también puede superar en calidad y resolución a la visión directa en un microscopio.

Todo ello hace que conocer una bases de imagen digital y de sus posibilidades tenga especial interés para su aplicación a nuestro trabajo diario.

IMAGEN MACROSCÓPICA

Tradicionalmente el estudio macroscópico de las biopsias y piezas quirúrgicas era un proceso manual con implicación directa del patólogo y en el que la fotografía se limitaba a un número reducido de casos con especial interés por su rareza o por su valor docente o investigador. La descripción macroscópica intentaba reproducir lo más fielmente posible los hallazgos macroscópicos. En la actualidad poca evolución ha experimentado el proceso de macroscopía y tallado, pero por un lado la progresiva incorporación de los técnicos a las labores de tallado, y por otro la tendencia a reducir la longitud de las descripciones macroscópicas en nuestros informes, nos deja abierta una expectativa de un progresivo incremento de la fotografía de los especímenes macroscópicos, incluso a las piezas más sencillas y rutinarias. Ello paliaría la tradicional carencia que supone no tener un fiel reflejo del aspecto macroscópico de las lesiones para que pueda ser reevaluado en un tiempo posterior al tallado inicial.

Existen mesas y soportes diseñados para fotografía de especímenes macroscópicos equipados con fuentes especiales de iluminación e incluso dispositivos para manejar la cámara fotográfica a través

de pedales que faciliten la toma de fotografías durante el tallado y manejar sistemas de zoom para adaptarse a las muestras con toda su variabilidad en tamaños.

Aunque la obtención de imágenes macroscópicas puede ser tan sencilla como utilizar una cámara compacta prácticamente adaptable a cualquier situación y sin necesidad de configuraciones, el manejo de los equipos diseñados específicamente para este fin proporciona una serie de ventajas. En caso de adquirir uno de estos equipos debe valorarse como prestaciones valiosas, la posibilidad de conexión directa con el Sistema de Información del servicio de Patología (LIS), el poder adaptar lectores de códigos de barras para la inmediata identificación de las imágenes, e incluso poder disponer de algún sistema de bases de datos orientados a imágenes, para suplir las posibles deficiencias del LIS a la hora de manejar clasificar y permitir criterios complejos de búsqueda de imágenes.

FORMATOS DE IMÁGENES

Los formatos de imágenes que manejan las cámaras de última generación han sufrido pocas variaciones. Prácticamente la totalidad de ellas usan como formato de trabajo habitual el JPG (Joint Photographic Experts Group). Este tipo de archivos, ya antiguo, sigue siendo el que domina en las páginas web. Aunque suele criticarse que su efectivo sistema de compresión genera un cierto grado de pérdida de información, fue diseñado de forma que esa pérdida de información sea prácticamente imperceptible para el ojo humano, al menos en las compresiones no excesivamente forzadas.

Existen formatos JPG más modernos con compresión sin pérdida, pero están poco implantados en las cámaras fotográficas tanto domésticas como profesionales y científicas. Su gran compatibilidad y facilidad de manejo por diferentes tipos de software explican su persistencia a lo largo de los años.

Las cámaras de gama media y alta suelen incorporar como sistema de imágenes comprimidas sin pérdida de información, el formato TIF (Tagged Image File Format). Dichas cámaras cumplen su objetivo de mantener toda la información pero con ficheros mucho mayores que los JPG

Por último las más avanzadas incorporan el formato RAW. El fichero RAW es una copia de la información eléctrica que genera el sensor óptico de la cámara (CMOS, CCD, etc). Un fichero .tif o .jpg es el resultado de procesar esa señal eléctrica guardada con una serie de parámetros sobre contraste, balance de blancos, saturación, etc. Esto es lo que hace la cámara cuando genera un fichero .jpg en la tarjeta de memoria.

¿Por qué los fotógrafos profesionales consideran mejor el raw? Porque el jpg que genera la cámara no es más que una de las posibles imágenes que se pueden obtener de un fichero raw, pero no la única: para cada combinación de los parámetros antes citados puede obtenerse una distinta. Se supone que la que obtiene la cámara es una buena aproximación a lo que debe ser una buena foto en términos de luz, contraste, saturación, etc., pero como lo general no siempre sirve en las fotos, puede cogerse el fichero raw, reprocesarlo según otros parámetros y obtener exactamente la imagen deseada. Algunas de las decisiones que la cámara toma en el proceso automatizado de generación de la imagen puede eliminar información del fichero tiff o jpg resultante, información que se conserva toda en el raw (1).

El formato raw no es estándar y cada fabricante de cámaras suele tener el suyo necesitando un software específico para traducirlo a una imagen convencional. Estrictamente las diferencias entre un raw, un tif y un jpg son poco perceptibles para los patólogos y más cuando estamos acostumbrados a variaciones mayores inducidas por los cortes seriados de una muestra, ya que diferencias de décimas de micra en el corte con el micrótopo ya pueden resultar después de la tinción en preparaciones con colores perceptiblemente diferentes.

Las imágenes digitales están conformadas por pequeños cuadraditos denominados píxeles que representan las unidades mínimas de información gráfica. La cantidad de píxeles que tiene una imagen se denomina resolución. El color de cada pixel es asignado por medio de bits (un bit es la unidad mínima de medida de memoria de los archivos informáticos y puede tener dos valores, cero o uno).

La profundidad de color o bits por pixel indica el número máximo de colores disponibles para representar un solo píxel en una imagen. En el modelo de color RGB esto mismo ocurre para los tres canales de color (rojo, verde, azul). Por ejemplo, con 12 bits por canal se lograrían 4.096 matices/combinaciones para cada canal de color [2¹²]. Para los tres canales de color la intensidad de bits representa 36 bits de información de color por píxel, que permite un total de 68.719.476.736 posibles combinaciones de colores [2³⁶].

IMAGEN MICROSCÓPICA

Los microscopios desde sus inicios han estado preparados para adaptar cámaras fotográficas. El cambio de fotografía analógica a fotografía digital no ha variado sustancialmente la toma de imágenes microscópicas.

Hay dos opciones básicas en la toma de imágenes microscópicas: el uso de cámaras específicamente diseñadas para ser conectadas a un microscopio, o el uso de cámaras fotográficas convencionales conectadas mediante un adaptador compatible con el microscopio. Ambas opciones tienen ventajas e inconvenientes.

Las cámaras específicas son significativamente más caras y paradójicamente suelen tener menor resolución. En cambio están adaptadas para un fin concreto y suelen proporcionar más calidad de imagen, y habitualmente más posibilidades de configuración de las imágenes con software avanzado.

Las cámaras convencionales tienen un precio muy inferior, y la aparición casi continua de nuevos modelos incorporando los sensores más modernos les dan mayor resolución. Como inconveniente no todos los modelos de microscopio tienen tubos y roscas y lentes intermedias adaptables para cada cámara. Por otro lado las configuraciones automáticas de estas cámaras están diseñadas para fotografía general y no microscópica. Quizá donde más se percibe esta diferencia es en el balance de blancos. Las cámaras específicas de microscopía tienen ajustes casi perfectos, mientras que en las cámaras convencionales hay que sustituir el balance automático por opciones de luz de tungsteno o luz fluorescente, que simplemente con el cambio de objetivos del microscopio hay que readaptar para cada fotografía.

Probablemente la mejor opción para adaptar cámaras fotográficas convencionales a microscopios sea emplear la salida de video, que prácticamente todas tienen, para conectarlas a un monitor de televisión o un ordenador (a través de una tarjeta o capturadora de video) y efectuar el enfoque y las opciones de imagen directamente sobre la pantalla. Existen empresas que comercializan tubos adaptadores, incluso para cámaras que no tienen rosca en sus objetivos, resultando las opciones más económicas. Al conectar estas cámaras (sin lentes intermedias), un cierto grado de zoom ayudará a eliminar las áreas que suelen aparecer más oscuras en los vértices, producto de trasladar el campo circular del microscopio a la imagen fotográfica rectangular.

Después de la captura el manejo de imágenes macro y microscópicas no tiene grandes diferencias. Disponer de un Sistema de Información con plena integración ayudará a que el almacenaje de las imágenes no se convierta en algo caótico y difícil de recuperar. Es frecuente que los LIS no per-

mitan incorporar imágenes a los informes con todas las posibilidades que da un procesador de textos tradicional, pero es algo que hoy en día debe resultar exigible a unos sistemas generalmente muy costosos. De la misma manera que la asociación de las imágenes a las bases de datos y su recuperación únicamente con parámetros de filiación o categoría diagnóstica es insuficiente.

Suele ser habitual la necesidad de recuperar imágenes exclusivamente por rasgos morfológicos, no estrictamente diagnósticos y por tanto no asociados a la información que almacenan las bases de datos (ej., si buscamos imágenes de células sternbergoides serán fáciles de recuperar aquellas fotografiadas en casos de linfomas de Hodgkin pero casi imposible en casos con un diagnóstico diferente) Idealmente el LIS ante una búsqueda de imágenes no debe responder con listados de casos o pacientes que cumplan los criterios de búsqueda, sino que debiera presentar en formato gráfico *thumbnails* de estas imágenes para su visualización directa de todas juntas.

Si nuestro sistema de información no está adaptado a la organización y búsqueda de imágenes, puede sacarse un cierto provecho de las opciones que, aunque rudimentarias, aporta el sistema operativo Windows. Con una buena organización en carpetas pueden hacerse búsquedas de imagen a partir del nombre con que se almacenaron. En este caso es muy útil añadir al habitual número de identificación en el nombre de la imagen, el criterio de posible búsqueda, como a qué tipo de inmunohistoquímica corresponde o qué elemento peculiar muestra.

IMAGEN DIGITAL EN MICROSCOPIA VIRTUAL

La Microscopia Virtual produce imágenes digitales de preparaciones microscópicas con escáneres específicos que capturan todos los detalles a gran aumento de cada preparación y las habilitan para su estudio en monitores o pantallas de ordenadores. Estas imágenes digitales de gran tamaño se fragmentan y estructuran en sistemas piramidales para no tener que descargar la imagen completa a máxima resolución, sino que emulan el funcionamiento de un microscopio presentando los campos elegidos a la resolución deseada y permitiendo desplazamientos de campo e incremento y disminución de zoom. A diferencia de los microscopios convencionales en los que los saltos de aumento se producen en función de los objetivos disponibles (2x, 4x 40x...), estas imágenes digitales (también llamadas WSI de *Whole slide Image*) permiten una transición continua desde un campo que captura enteramente la preparación hasta la máxima resolución de escaneado (habitualmente 400x).

Existen múltiples fabricantes de escáneres de preparaciones microscópicas y cada uno aparta su propia solución de software e incluso su propio formato de imagen digital. Ello genera problemas de compatibilidad entre imágenes obtenidas con dispositivos de diferentes fabricantes. Casi todos proporcionan visores gratuitos para su propio formato, pero no es habitual que los patólogos dispongan instalado en su ordenador de trabajo toda la amplia gama de visores existentes para ser capaz de cubrir todos los formatos de imagen disponibles.

Por otro lado la instalación de un visor gratuito no habilita para el acceso remoto a las imágenes (si disponibles en la Intranet hospitalaria). Este acceso a distancia, idealmente a través de web, solo es posible con un software servidor específico que supone un coste adicional en la instalación del equipo de Microscopia Virtual. Ello explica la aparente paradoja de la última encuesta de la SEAP 2013 en la que el número de escáneres de preparaciones duplica al de instalaciones de Telepatología.

En relación al problema de compatibilidad de formatos de imágenes digitales entre los diferentes fabricantes de escáneres existe un grupo de trabajo dedicado analizar y resolver a las necesidades de los patólogos dentro del estándar mundialmente reconocido de intercambio de imágenes médicas (DICOM: *Digital Imaging and Communication in Medicine*). El objetivo es la definición de un sistema de ficheros y un protocolo de comunicación en red que resulte compatible. Por un lado el uso de

estos estándares permitirá almacenar imágenes de patología digital en los PACS (*Picture Archiving and communication system*) ya implantados y actualmente empleados principalmente por los radiólogos entre otras especialidades médicas. Por otro lado se trata de ofrecer a los fabricantes unas guías para el diseño y la venta de escáneres compatibles con el sistema DICOM (2).

La realidad es que de momento la implantación de DICOM en los entornos de Microscopia Virtual es baja incluso puede retrasar el esperado descenso de precios de los escáneres si los fabricantes se ven obligados a invertir en equipos de ingenieros e informáticos para cumplir las especificaciones de este estándar.

Otros esfuerzos se han realizado con software de código abierto para contribuir a la compatibilidad de los formatos de imágenes de microscopía virtual. Probablemente el más conocido es OpenSlide (3), un software gratuito que permite en la última versión leer ficheros de Aperio (.svs), Hamamatsu (.vms .vmu), Leica (.scn). Mirax (.mrxs), Trestle (.tif), y ficheros TIFF genéricos (.tif). Lamentablemente cualquier patólogo sin una cierta experiencia y conocimientos informáticos encontrará dificultades en manejar este software simplemente para elegir la versión adecuada, desentrañar los ficheros comprimidos y encontrar entre los directorios el fichero ejecutable que funciona como visor (openslide.jar).

Una alternativa gratuita más sencilla consiste en exportar la preparación virtual del fabricante de nuestro escáner a algún formato más genérico y que pueda ser leído con menos problemas de compatibilidad. Los dos mejores candidatos en la actualidad son sin duda Jpeg2000 (.jp2) y Tiff, quizá con el nuevo formato bigTiff (que supera la limitación de tamaño de los ficheros .tif convencionales de 4Gb). Uno de los visores gratuitos más antiguos que permite estas funciones es el de Aperio (4). Puede leer ficheros .tif, .jp2, .mrxs, además de los propios .svs e incluso ficheros .jpg planos convencionales y elegir el tipo de compresión y redimensión de imágenes. Aunque no es la solución perfecta es probablemente la más sencilla si tenemos la intención de manejar ficheros de microscopía virtual con la misma facilidad y versatilidad con la que usamos los ficheros .jpg de las cámaras fotográficas.

Para concluir, en el mundo digital que nos espera es posible que los departamentos de patología deban implantar la figura del patólogo informático como existe ya en departamentos norteamericanos (5), que sea capaz de entender las complejidades descritas y establecer un puente de colaboración más fluido con ingenieros e informáticos.

REFERENCIAS

1. (<http://www.ojodigital.com/foro/software/9401-tiff-vs-raw.html>)
2. (<http://darkdaily.com/new-digital-pathology-dicom-standards-will-expand-pathologists-use-of-whole-slide-images-927#axzz2MBng1TwY>)
3. (<http://openslide.org/>)
4. (<http://www.aperio.org>)
5. (<http://www.massgeneral.org/pathology/informatics/>)