Experiencia en el uso de microscopia virtual en la implementación de un curso no presencial sobre patología de crustáceos.

Martorelli Sergio R*, Martorelli Sabrina,L**

* Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores CEPAVE (CONICET_UNLP). ** Instituto de Investigación en Informática LIDI (III-LIDI), Facultad de Informática, UNLP.

sergio@cepave.edu.ar, smartorelli@lidi.unlp.edu.ar

Abstract.

Within the framework of La Plata University, Argentina (UNLP) e-learning project, an e-learning platform (WebUNLP) is being used to teach a postgraduate course on crustacean pathology, since three years ago. Within its contents, this course includes several teaching units that need to study cytology and histology aspects in normal and pathological tissue conditions. The capability of providing this type of knowledge has a direct correlation with the possibility of visualization of specific cases under high definition microscopes, to distinguish important cellular structures. This is necessary to provide essential contents and prepare the tasks related practices aimed at achieving an effective learning in the students. To address this challenge we used, in the process of course implementation, a virtual microscopy software *ImageScope* provided for one of the companies that perform digital slide scanning service (Aperio Technologies, Inc). The aim of this paper is to describe the reasons for the choice of the mentioned tool, and to related the steps followed for the use of the virtual microscope in this course. Virtual slides were obtained both: commercially through the scanning service of Aperio and manually using an Olympus BX51 microscope with an Olympus DP71 digital camera of 12.5 megapixels.

Resumen.

En el marco del proyecto de EAD de la Universidad de La Plata (UNLP), Argentina se ha venido utilizando, desde hace tres años, la plataforma WebUNLP para impartir un curso de posgrado en patología de crustáceos. Este curso incluye, dentro de su contenido, varias unidades de enseñanza relacionadas con la citología y la histología en tejidos normales y patológicos. La capacidad de proporcionar este tipo de conocimiento tiene una correlación directa con la posibilidad de visualización de los casos específicos, para distinguir importantes estructuras celulares, en microscopios de alta definición. Esto es necesario para proporcionar contenidos esenciales y preparar las tareas relacionadas con las prácticas destinadas a favorecer el aprendizaje por parte de los estudiantes. Para hacer frente a este desafío en el proceso de migración del curso de la modalidad presencial a la no presencial es que hemos utilizado un software de microscopía virtual. El software elegido es una distribución de software libre (ImageScope), proporcionado por una de las empresas dedicadas a la digitalización de preparaciones virtuales (Aperio Technologies, Inc). El objetivo de este trabajo es describir las razones de la elección de esta herramienta y relatar los pasos seguidos para el uso del microscopio virtual en el curso antes mencionado. Las preparaciones virtuales utilizadas en el curso se obtuvieron de dos maneras diferentes: comercialmente a través del servicio de digitalización de Aperio y en forma manual con la combinación de un microscopio Olympus BX51 y una cámara digital dedicada a microscopia (Olympus DP71) de 12,5 megapíxeles.

Palabras claves: Microscopia Virtual, Preparados virtuales, Patología de crustáceos

Introducción

La microscopia virtual y por ende los microscopios virtuales son herramientas que han revolucionado la enseñanza de la patología microscópica en distintas áreas de la biología. La tecnología que comenzó a posibilitar la obtención de imágenes que pudieran captar el total de un preparado microscópico se desarrollo a partir de los años 80. (Dee, 2006). Su efectividad en emular la visión de un preparado al microscopio comenzó a perfeccionarse en los 90 con el aumento de la velocidad de procesamiento de datos de las computadoras personales. A partir de allí, las posibilidades de aplicar estas metodologías a la enseñanza de la histología, citología, y patología fueron cada vez más amplias. Hoy en día su uso como medio de consulta a través de la conocida tele patología en su forma dinámica o estática (Ferres et al., 2001, García Rojo 2000,2001) es una metodología creciente que facilita las interconsultas patológicas a distintos niveles.

En la actualidad existen numerosos microscopios virtuales implementados por diferentes empresas (Fig. 1) que generalmente son las mismas que ofrecen sofisticados sistemas de microscopios robotizados o escáneres especiales para crear preparados virtuales. A medida que trascurrió el tiempo, los programas ofrecidos fueron perfeccionando sus funciones de tal manera de aumentar su emulación a los microscopios reales. Así con la incorporación del sistema de eje-Z a los característicos ejes X e Y se introdujo la capacidad de emular cada vez con mejor calidad el proceso de enfoque.

Fig.1: Alguno de los sistemas ofrecidos de Microscopia virtual

Otra incorporación importante en el software utilizado fue la posibilidad de trabajar con capas. Este avance es de gran importancia en el área de las interconsultas y la docencia ya que permite el agregado, a las imágenes virtuales, de marcas, indicadores y notas entre otros. Haciendo uso de estos recursos es fácil pensar en el intercambio de imágenes con indicaciones sobreimpresas, entre alumnos y docentes de cursos no presenciales para ser consultadas o corregidas durante el desarrollo del mismo.

La incorporación del uso de bases de datos permitió también sistematizar las anotaciones, toma de medidas y conteos, entre otras actividades, sobre las imágenes digitalizadas como también el almacenamiento, búsqueda y posterior recuperación de las mismas.

Los especialistas en la temática de la anatomía patológica digital piensan que en pocos años mas la mayor parte de los inconvenientes técnicos actuales para el manejo de imágenes digitales serán solucionados y la mayor parte de los caso de anatomía patológica podrán ser completamente digitalizados (García rojo et al 2005).

La microscopia virtual es un concepto amplio que involucra al menos 4 aspectos centrales: 1-la digitalización de la imagen, 2-el archivo en formato digital, 3-la visualización en la pantalla de una computadora y 4-la trasmisión de esos preparados por internet (Ferres et al, 2001, García Rojo 2000, 2001, García Rojo et al, 2005). Debemos marcar la gran diferencia entre lo que llamamos la fotografía digital microscópica, tan difundida actualmente en ámbitos de la investigación biológica por el advenimiento de cámaras digitales cada vez más precisas, y los preparados virtuales o “virtual slides”. Estos últimos comprenden la digitalización de toda la preparación microscópica posibilitando simular, con el software adecuado, el uso de un microscopio real que incluirá el cambio de aumentos, uso de filtros, y más modernamente enfoque.

A esta altura es seguramente importante remarcar que los preparados virtuales no fueron creados para reemplazar a los preparados microscópicos reales sino contrariamente para protegerlos, ayudando, por ejemplo, a su preservación. Actualmente en todo el mundo son cada vez más los museos biológicos que digitalizan sus preparados de ejemplares únicos y ofrecen su visión a través de software especial evitando así la manipulación de ejemplares que son únicos e irremplazables (holotipos) (Ej. Morphbank Florida State University, Department of Scientific Computing, Tallahassee)

Muchos autores han escrito sobre las ventajas y desventajas o la comparación de preparados reales y virtuales y de la implementación de estos sistemas (Treanor, 2009,2008 Treanor and Quierke 2007, Garcia Rojo et al, 2005, Conde Martin 2006,) pero en general todos coinciden en la importancia de su uso en la educación. Su uso permite preservar el material original y al mismo tiempo multiplicar los elementos disponibles en el aula para la realización de trabajos prácticos en cursos y la implementación de contenidos los cuales , muchas veces, serán reutilizables en futuros cursos .En general los autores coinciden también es que es adecuado el uso de este tipo de tecnologías en la docencia de posgrado y, por supuesto, en las consultas profesionales. En el grado si bien pueden ser utilizadas siempre es preferible que los alumnos tengan una experiencia previa con el uso de microscopios reales (Felten et al 1999, Helin et al 2005, Linder et al 2008).

En el presente trabajo se relatan los procedimientos utilizados para adaptar el uso de preparados virtuales en un curso de posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad

Nacional de la Plata (UNLP). El objetivo de esta comunicación es entonces relatar los motivos de la elección de las herramientas utilizadas y los pasos seguidos para poder implementar los contenidos y la realización de trabajos prácticos en un curso no presencial que necesita de manera irremplazable la utilización de material óptico de alta definición.

Desarrollo

Dentro del marco de la plataforma de educación a distancia de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) denominada WebUNLP se viene dictando hace 3 años un curso sobre patología de crustáceos de importancia comercial y ecológica. El mismo abarca, dentro de sus contenidos, varias unidades didácticas que necesitan del estudio de aspectos citológicos e histológicos en condiciones normales y patológicas. La posibilidad de impartir este tipo de conocimientos tiene una correlación directa con la visualización de casos específicos bajo microscopios de alta definición que permitan distinguir estructuras celulares características. Esto es imprescindible para poder impartir los contenidos esenciales y elaborar las tareas practicas relacionadas, tendientes a lograr un aprendizaje efectivo en los cursantes.

Para afrontar este desafío utilizamos en el proceso de migración de la modalidad presencial a la no presencial del curso, un software de microscopia virtual de libre distribución proporcionado por una de las empresas que se dedican a la digitalización de preparados microscópicos, Aperio Inc. El programa utilizado es el ImageScope que es freeware y puede ser descargado de la página web de la empresa via internet. (Figs.2-5)

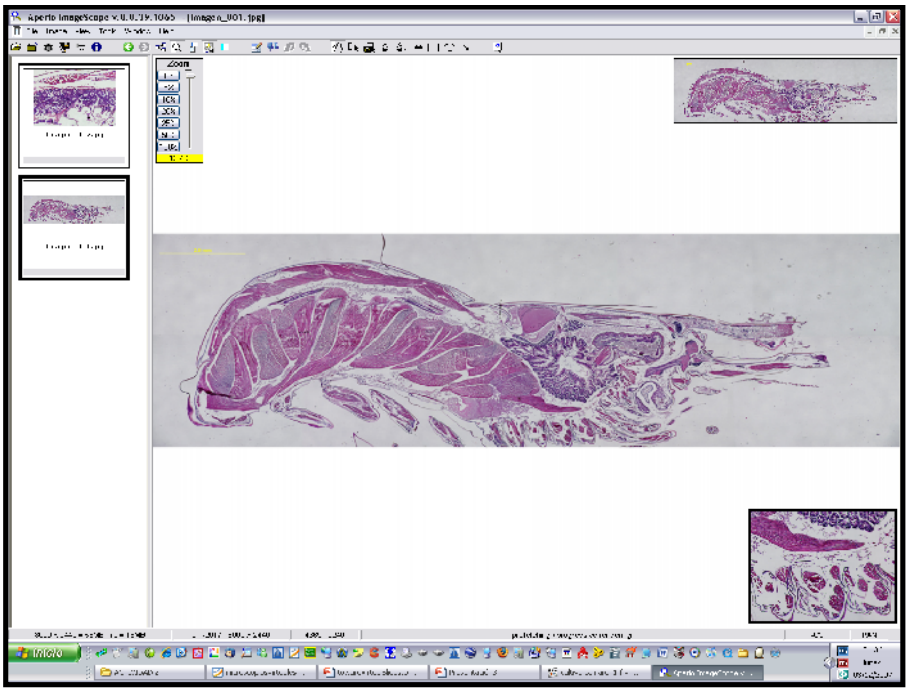

Fig. 2: Vista del software ImageScope con un preparado virtual cargado

El programa ImageScope es de fácil instalación y cuenta con todas las características de los modernos microscopios virtuales. Entre sus características encontramos aumento, zoom, lupa, imagen en miniatura para fácil localización del lugar de navegación por el preparado, trabajo en capas para incluir anotaciones, posibilidad de calibración y realización de mediciones en pantalla, y extracción de imágenes instantáneas de la pantalla entre otras (Figs. 3-5).

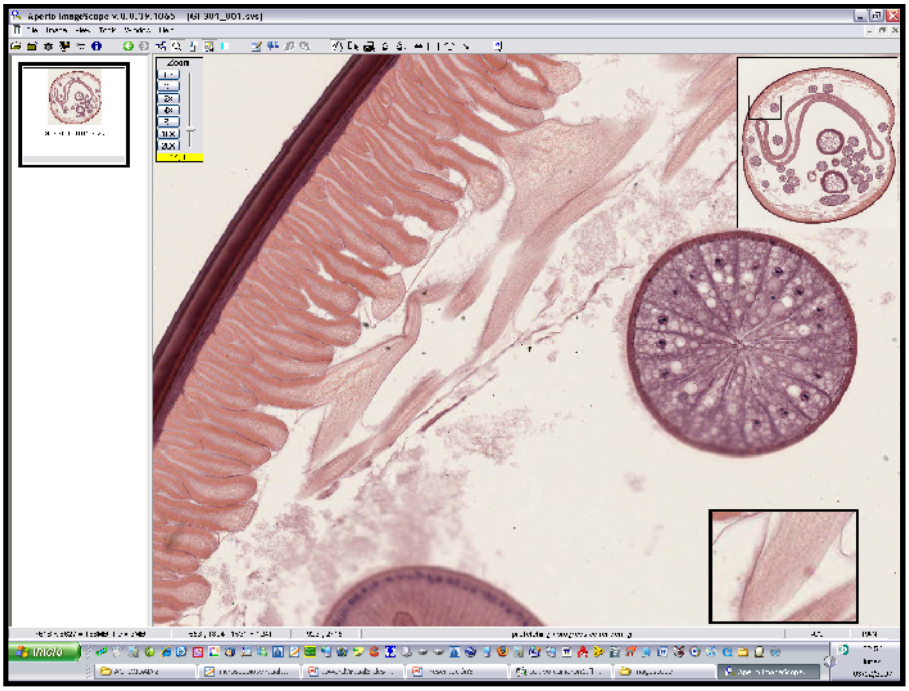

Fig.3: Vista del detalle logrado y el poder de magnificación de los preparados virtuales: Corte transversal de Nematode parasito (imagen descargada del sitio de Aperio Inc).

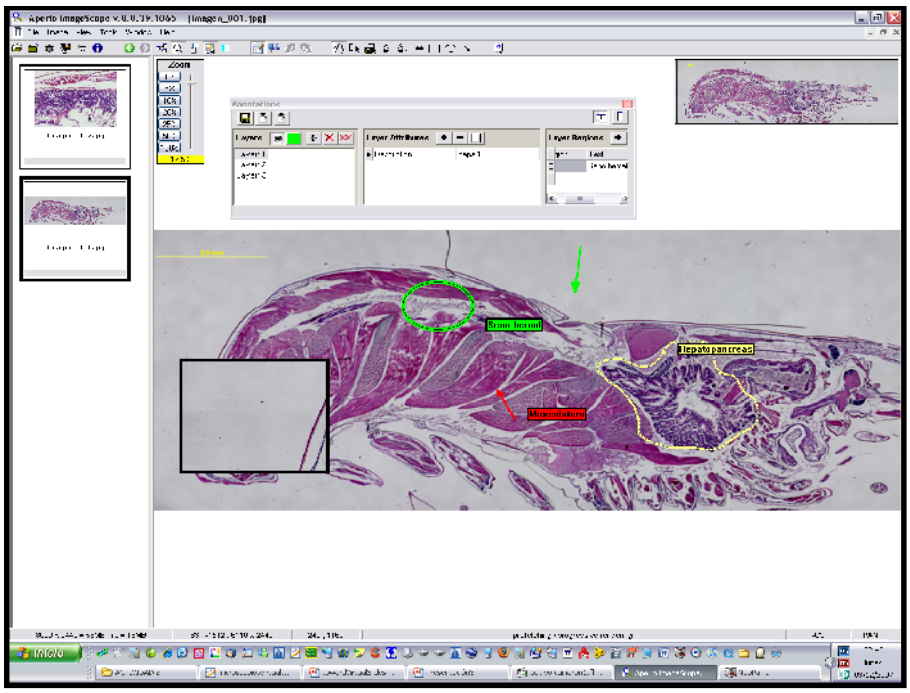

Fig. 4: Trabajando con capas en el ImageScope. La posibilidad de incluir anotaciones en las imágenes posibilito durante el desarrollo del curso virtual implementar trabajos prácticos que eran enviados a los tutores para su corrección.

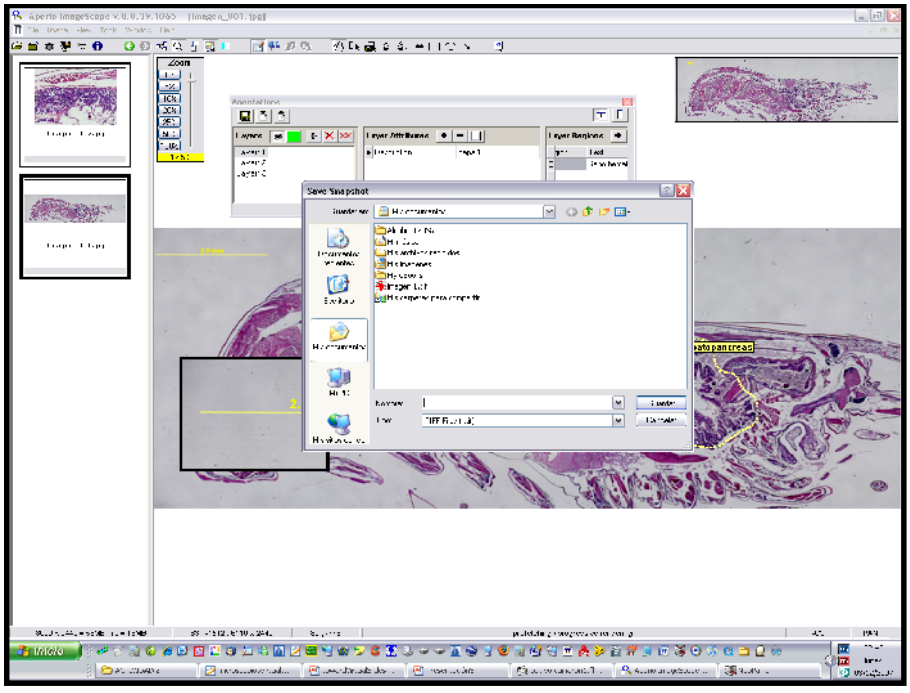

Fig. 5: Archivando una instantánea del la pantalla en el ImageScope con la herramienta Snapshot.

Los trabajos prácticos se realizaron utilizando algunos preparados digitalizados por el servicio especial de la empresa antes mencionada. Este es un servicio pago que realiza en un corto plazo la digitalización de preparados microscópicos completos. Los preparados deben ser enviados a Aperio y a vuelta de correo se reciben las digitalizaciones en DVD y un nombre de usuario y clave para el acceso a una base de datos de un servidor dedicado de la empresa donde los preparados virtuales son almacenados por un tiempo. Pasado este se debe pagar un cargo especial por "hosting" en el caso de querer seguir manteniendo los preparados virtuales en dicho servidor. Estos preparados pueden ser accedidos por los alumnos utilizando el programa instalado en cada una de sus computadoras (ImageScope). Existe también la posibilidad de Acceso directo via web abriendo las imágenes dentro mismo del servidor remoto (WebScope).

El costo de los servicios de digitalización es todavía demasiado elevado y ese fue el motivo que nos llevo, durante la planificación del curso, a realizar preparados virtuales confeccionados en forma manual. Para este procedimiento se utilizó un microscopio Olympus BX51 con una cámara digital Olympus DP71 de 12.5 mega píxel (fig.6). Con este material óptico se procedió a digitalizar el preparado microscópico fotografiando secuencialmente de acuerdo al eje XY. El campo visual depende del objetivo del microscopio, su apertura numérica y el tipo de procesador fotográfico que posea la cámara digital utilizada. De esta manera se calculo la cantidad de fotografías necesarias para cubrir todo el preparado o la parte que deseábamos mostrar. A manera de ejemplo en la Fig 6 se muestra además del sistema óptico utilizado un diagrama del recorrido que se fue realizando sobre cada preparado para tomar las fotografías.

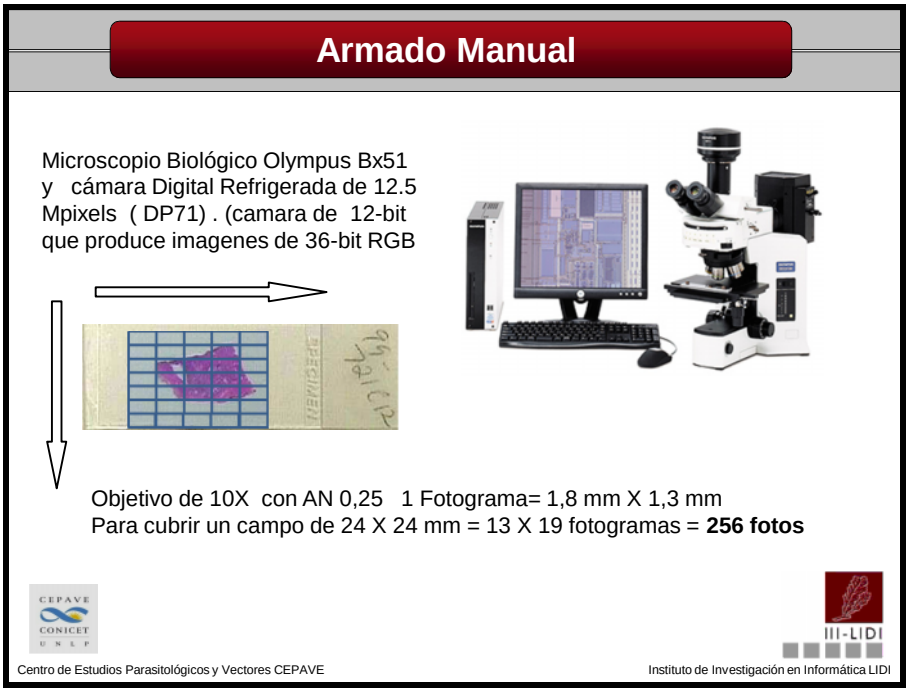

Fig. 6: sistema óptico utilizado para el armado de los preparados virtuales

A modo de ejemplo, para el objetivo Nikon 10X con AN 0,25 cada fotograma ocupó un rectángulo de 1,8 mm X 1,3 mm. De esta manera se calculó que para cubrir la superficie de cubreobjetos de 24 X 24 mm se deberían realizar, teniendo en cuenta una pequeña zona de superposición, un total de 13 exposiciones horizontales y 19 verticales lo que da un total de 256 fotos (Fig. 6). De la misma manera para el objetivo de 20X con una AN de 0,5 cada fotograma ocupó un espacio de 877µm X 660 µm en este caso para el mismo cubreobjetos (24 X 24 mm) se deberían realizar 36 exposiciones verticales y 27 horizontales lo que da un total de 993 fotos.

Las imágenes obtenidas fueron ensambladas mediante la utilización del software Autostitch ™ (Automatic Panorama Stitching Software). Este programa es un ensamblador automático 2D desarrollado por investigadores de la University of British Columbia. Permite "pegar" imágenes sin ninguna intervención del usuario. El software utiliza distintos algoritmos que permiten reconocer las zonas de coincidencia aun en imágenes invertidas o de distinto tamaño. (Fig.7)

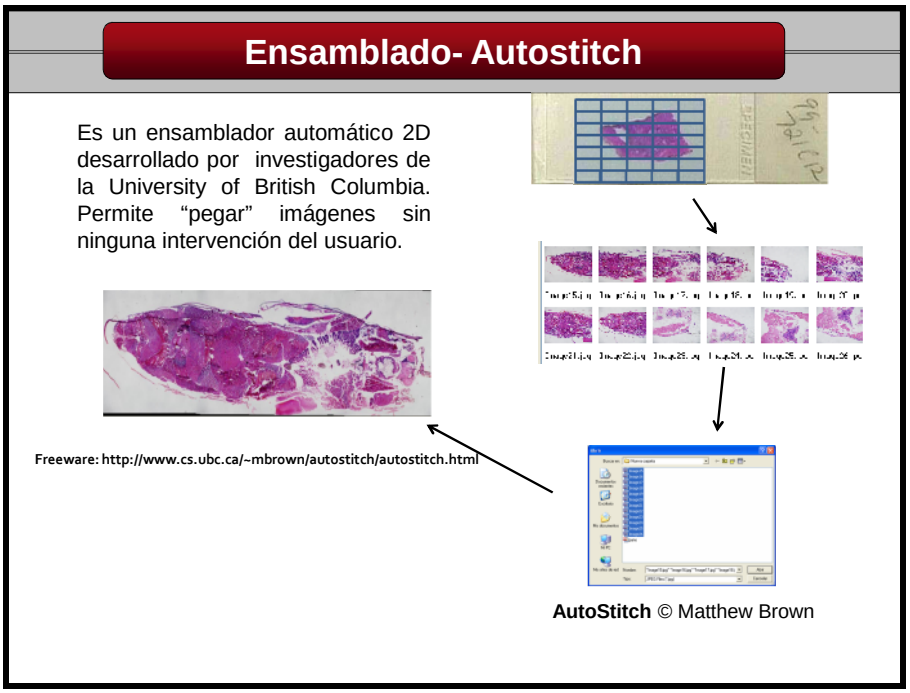

Fig.7 Ensamblado de las fotos secuenciales mediante la utilización del software Autostitch ™

Uno de los factores a tener en cuenta en el trabajo con imágenes en la microscopia virtual para su uso en docencia es el tamaño de las mismas que a veces hace imposible su subida a las plataformas de e-learning o su envió. A modo de ejemplo se reproduce en la Fig.8 una tabla general del espacio ocupado por las imágenes en relación al tipo de objetivo microscópico utilizado.

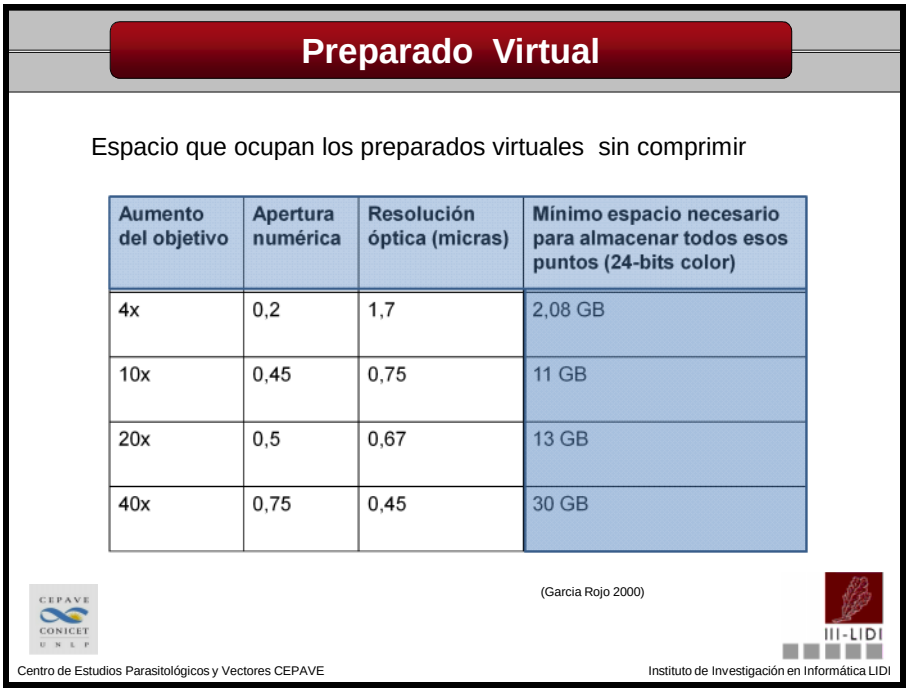

Fig.8 Espacio ocupado por las imágenes en relación al tipo de objetivo microscópico utilizado. (Tomado de Garcia Rojo 2000).

Las imágenes con las que se trabajó presentaban dos formatos originales, las escaneadas por Aperio Inc fueron recibidas en SVS y comprimidas con JPEG2000. Las tomadas con el microscopio Olympus BX 51 fueron archivadas en formato TIFF. Para poder manejar los dos tipos de formatos ambos fueron trasformados utilizando una herramienta incluida en el programa ImagScope al formato CWS (Composite WebSlide). En este formato el archivo de salida es un directorio que contiene un conjunto de archivos de imágenes más pequeñas en mosaico, que juntas forman la imagen completa, y un archivo con coordenadas que permite su ubicación. Las imágenes en formato CWS fueron almacenadas en un repositorio especial montado en un servidor dedicado desde donde podían ser descargadas con mas rapidez, por los respectivos programas (ScanScope) de cada uno de los cursantes . Cada alumno recibió a través de la plataforma WebUNLP una serie de pequeños programas en HTML que hacían referencia a las fotos que se cargarían en sus respectivos microscopios virtuales (Fig. 9)

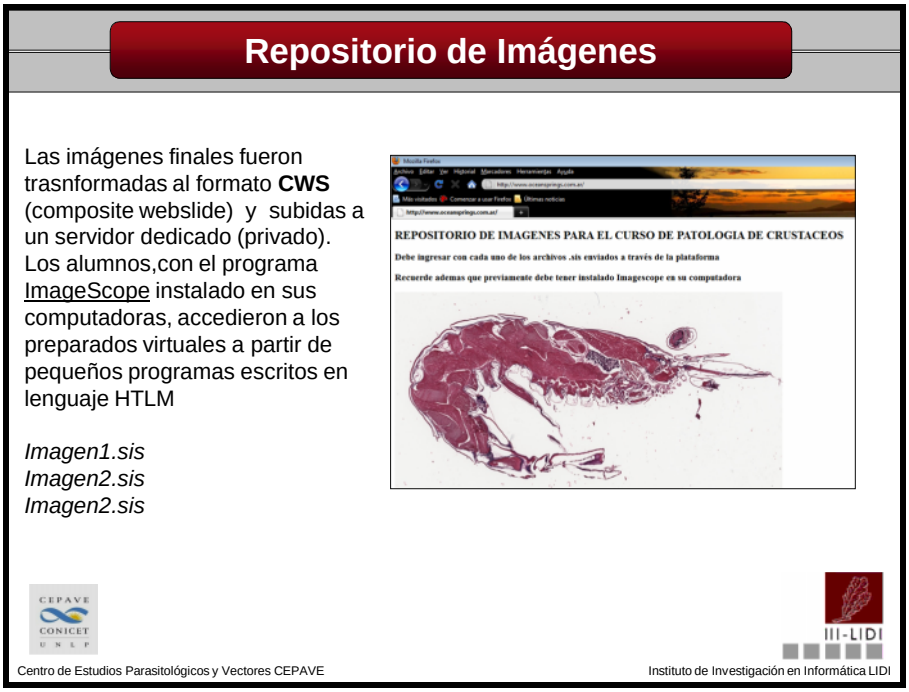

Fig. 9: Pantalla Inicial del repositorio de imágenes utilizado (www.oceansprings.com.ar)

Conclusiones

El uso del software de microscopia virtual posibilitó que los alumnos accedan a preparados microscópicos originales de distintos patógenos de crustáceos.

El armado manual de preparados virtuales permitió bajar notablemente los costos de digitalización y aumentar de manera sustancial la colección de preparaciones para el dictado del curso.

Las herramientas incluidas en el programa ImageScope favorecieron la implementación de trabajos prácticos, las correcciones de los mismos y la realización de devoluciones con indicaciones graficas sobre las imagenes de los preparados virtuales enviadas.

El uso de archivos CWS (WebSlide) montados en un servidor dedicado facilito y agilizó el tiempo de acceso a los preparados virtuales por parte de los alumnos y posibilito además no sobrecargar la plataforma WebUNLP.

Agradecimientos

Los autores agradecen al AC Diego Martorelli por su ayuda en el armado del repositorio de imágenes y la instalación de los programas de acceso a las mismas. Al Lic. Luis A. Giambelluca por su ayuda en la toma de fotografías digitales utilizadas en el curso.

Bibliografía Consultada

Conde Martin AF.2006 Microscopia virtual: ¿Un cambio en la forma de hacer telepatología? http://conganat.cs.urjc.es/index.php/conganat/article/viewFile/121/247

Dee FR: 2006. Virtual Microscopy for Comparative Pathology Toxicologic Pathology, 34:966–967.

Felten CL, Strauss JS, Okada DH, Marchevsky AM.1999 Virtual microscopy: high resolution digital photomicrography as a tool for light microscopy simulation. Hum Pathol 1999 Apr;30(4):477-83.

Ferres L.A, M Garcia Rojo y AM Puras Gil. 2001, Manual de Telepatología. Ed. Sociedad Española de Anatomia Patologica. http://www.seap.es/telepatologia/manual.htm

Garcia Rojo 2000 . Telepatologia Multidisciplinar en Hospitales . http://www.aperio.com/pathology-events/pdfs/Garcia-rojo%20Webinar%20Telepathology%20in%20Multi-discipline%20Hospitals%20Worldwide.pdf.

García Rojo M. 2001. Microscopios Virtuales. Aspectos actuales y futuros de la digitalización de preparaciones histológicas y citológicas. Conferencia invitada. IV congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 1 Mayo - 30 Junio 2001. http://conganat.uninet.edu

Garcia Rojo M, G. Bueno García1, J. González García, M. Carbajo Vicente. 2005. Preparaciones digitales en los servicios de Anatomía Patológica (I).Aspectos básicos de imagen digital. Revista Española de Patología 38(2): 69-77

Helin H, M Lundin, J Lundin, P Martikainen, T Tammela, Hi Helin, T van der Kwast , and J Isola 2005. Web-based virtual microscopy in teaching and standardizing Gleason grading . Human Pathology 36, 381– 386

Linder H., M Lundin, C Thors, M Lebbad, J Winiecka-Krusnell,H Helin, B Leiva, J Isola and J Lundin 2008. Web-Based Virtual Microscopy for Parasitology: A Novel Tool for Education and Quality Assurance. Neglected Tropical Diseasess.2(10):1-8

Treanor D, Quirke P.2007 The virtual slide and conventional microscope a direct comparison of their diagnostic efficiency. in: Annual Meeting of the Pathological Society of Great Britain and ireland, Glasgow,

Treanor D.2008. Creating A Virtual Slide Library http://www.wrgrid.org.uk/Resources/Presentations/20081113_Vslidelib.pdf

Treanor D. 2009 Virtual slides: an introduction. Diagnostic Histopathology 15:2 99-103