

## **Evaluación de la calidad de las imágenes citogenéticas transmitidas electrónicamente en escenarios con víctimas múltiples: Un enfoque de aplicación para las Redes de Dosimetría Biológica.**

**González J. E.<sup>1</sup>, M. Di Giorgio<sup>2</sup>, A. Radl<sup>2</sup>, M. R. Taja<sup>2</sup>, C. E. Sapienza<sup>2</sup>, M. Stuck Oliveira<sup>3</sup>, P. Valdivia<sup>4</sup>, O. Garcia<sup>1</sup>, A. I. Lamadrid<sup>1</sup>, I. Romero<sup>1</sup>, T. Mandina<sup>1</sup>, C. Guerrero-Carbajal<sup>5</sup>, C. Arceo- Maldonado<sup>5</sup>, G.E. Cortina-Ramirez<sup>5</sup>, M. Espinoza<sup>6</sup>, N. Oliveros<sup>7</sup>, W. Martinez-Lopez<sup>8</sup>, M. V. Di Tomaso<sup>8</sup>, L. Méndez-Acuna<sup>8</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR), Calle 20 No. 4113 e/41 y 47 Miramar, 11300 La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN), Av. Del Libertador 8250, C1429BNP Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup>Instituto de Radioproteccion y Dosimetría (IRD), Av. Salvador Allende s/n, Jacarepaguá, Rio de Janeiro. CEP - 22780-160, Brasil

<sup>4</sup>Comision Chilena de Energía Nuclear (CCHEN), Amunategui 95, Santiago Centro, Santiago, Chile

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Carretera Méjico-Toluca s/n, C.P. 52750, La Marquesa, Ocoyoacac, México

<sup>6</sup>Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), Av. Canadá 1470, San Borja, Perú

<sup>7</sup>Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Facultad de Ciencias Biológicas 11-0058, Lima 11, Perú

<sup>8</sup>Servicio de Biodosimetría, Instituto de Investigaciones Biologicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, Montevideo, Uruguay.

### **RESUMEN**

La dosimetría biológica (DB) clásica se basa en el recuento de aberraciones cromosómicas mediante microscopía. En su procedimiento estándar, no resulta apropiada en escenarios con víctimas múltiples, que requieren un rápido procesamiento y la priorización de las víctimas para su atención médica. El trabajo en redes de DB, enviando a los laboratorios imágenes citogenéticas transmitidas electrónicamente, permite convertir los métodos convencionales en métodos de alto rendimiento, metodología sustentada por los resultados de los ejercicios de intercomparación recientes. Sin embargo, se debe garantizar la armonización de la calidad de las imágenes. Los laboratorios de la red latinoamericana de dosimetría biológica, LBDNet, acordaron cumplir con los requisitos de la Norma ISO/IEC 17043:2010, para la realización de los ejercicios de intercomparación. La provisión de ítems de ensayo homogéneos, mediante mediciones objetivas de la calidad de la imagen, permitirá garantizar la calidad de las imágenes transmitidas electrónicamente en escenarios con víctimas múltiples que conlleven la activación de las redes regionales/internacionales. En este trabajo se presenta un ejercicio en el que cada laboratorio de la LBDNet proveyó veinte imágenes derivadas del ensayo PCC químicamente inducido, obtenidas mediante la observación por microscopía de luz transmitida a través de la captura manual o

automática. Las imágenes fueron analizadas mediante un algoritmo estadístico de control de calidad de las imágenes utilizando la plataforma CellProfiler. El valor medio del algoritmo de la varianza normalizada de la intensidad de píxeles en la imagen (*Focus score*) y su coeficiente de variación fueron utilizados para evaluar la calidad de las imágenes transmitidas. Los parámetros de aceptación considerados, luego del análisis de control de calidad automatizado de las imágenes y su inspección visual, fueron un valor mínimo de *Focus score* de 0,02 y un valor máximo de variación de 20%. Este objetivo permitiría aumentar la precisión y la velocidad de las evaluaciones biodosimétricas de las redes de trabajo con fines de asistencia en emergencias radiológicas o nucleares.

---

<sup>1</sup> E-mail del Autor. [cphrjorge@ceniai.inf.cu](mailto:cphrjorge@ceniai.inf.cu)

## 1. INTRODUCCIÓN

La dosimetría biológica (DB) clásica se basa en el recuento de aberraciones cromosómicas mediante microscopía [1]. En escenarios con víctimas múltiples se requiere un rápido procesamiento y la priorización de las víctimas para su atención médica [2, 3]. Una de las estrategias para acelerar el procesamiento es el trabajo en redes de DB, enviando a los laboratorios imágenes citogenéticas transmitidas electrónicamente, lo cual permite convertir los métodos convencionales en métodos de alto rendimiento, metodología sustentada por los resultados de los ejercicios de intercomparación recientes [2, 3]. En estos ejercicios se debe garantizar la armonización de la calidad de las imágenes digitales transmitidas [3].

Los laboratorios de la red latinoamericana de dosimetría biológica, LBDNet, acordaron cumplir con los requisitos de la Norma ISO/IEC 17043:2010 para la realización de los ejercicios de intercomparación. La provisión de ítems de ensayo homogéneos, mediante mediciones objetivas de la calidad de la imagen, permitirá garantizar la calidad de las imágenes transmitidas electrónicamente en escenarios con víctimas múltiples que conlleven la activación de las redes regionales/internacionales.

En este trabajo se presenta un ejercicio en el que cada laboratorio de la LBDNet proveyó veinte imágenes derivadas del ensayo PCC químicamente inducido, obtenidas mediante la observación por microscopía de luz transmitida a través de la captura manual o automática. Estas imágenes digitales fueron sometidas a un análisis de calidad para determinar valores mínimos de aceptación de las mismas para el análisis y la factibilidad de su envío por cada laboratorio de la red.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Distribución de Material de Ensayo.

Los laboratorios pertenecientes a la LBDNet recibieron láminas de microscopio que contenían las muestras procesadas a partir del ensayo PCC químicamente inducido las cuales fueron procesadas por el laboratorio de dosimetría biológica de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) Argentina.

### 2.2 Digitalización de Imágenes.

Cada laboratorio de la LBDNet digitalizó 20 campos de las muestras contenidas en las láminas de microscopio. La digitalización de imágenes se realizó con el lente objetivo de 10x con sus respectivos sistemas de captura de imágenes, de la misma manera que lo realizan rutinariamente. Las imágenes fueron enviadas por correo electrónico por los laboratorios de la red a los laboratorios de dosimetría biológica de Argentina y Cuba.

### 2.3. Análisis de calidad de las imágenes digitalizadas.

El laboratorio de Cuba realizó el análisis de las imágenes digitalizadas utilizando el programa informático CellProfiler ([www.cellprofiler.org](http://www.cellprofiler.org)) [4] para obtener los valores de varianza normalizada de cada imagen enviada por los laboratorios. Se diseñó una secuencia de módulos (*pipeline*) del programa que automáticamente carga, analiza y guarda los resultados del análisis de las imágenes digitales en una carpeta especificada. La secuencia de módulos del programa utilizada fue la siguiente:

1. Load Images.
2. Morph.

3. Measure Image Quality.
4. Measure Image Intensity.
5. Export to Spreadsheet.

La secuencia de módulos puede ser guardada como un fichero el cual es cargado cada vez que se necesite realizar el análisis. Para determinar la calidad de las imágenes se seleccionó la varianza como uno de los algoritmos estadísticos más robustos que detectan el enfoque en una imagen digital obtenida a partir del microscopio, denominado *Focus Score* [5]. Este algoritmo computa las variaciones en los niveles de grises entre los píxeles ( $i$ ) de la imagen. La varianza fue normalizada con la intensidad media ( $\mu$ ) de la imagen para compensar las diferencias de intensidad entre diferentes imágenes.

La varianza normalizada puede ser calculada mediante la siguiente expresión:

$$FS_{normal\ varianza} = \left(\frac{1}{H \cdot W \cdot \mu}\right) \cdot \sum_H \sum_W (i(x, y) - \mu)^2 \quad (1)$$

La sumatoria de los píxeles de alto (H) multiplicados por la sumatoria de los píxeles de ancho (W) es igual al tamaño de la imagen.

El valor medio del algoritmo *Focus Score* (FS) y su coeficiente de variación (CV) fueron utilizados para evaluar la calidad de las imágenes transmitidas. Cuanto mayor sea la diferencia de los píxeles individuales con el valor medio, se asume un mejor enfoque de los objetos en la imagen. Una imagen mal enfocada y digitalizada con insuficiente iluminación resultará en un menor FS que una imagen enfocada y digitalizada con iluminación apropiada.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de calidad de las imágenes transmitidas se muestran en la tabla 1. El FS entre los laboratorios mostró una alta variabilidad, mayor al 20%, lo cual puede deberse a los diferentes sistemas de captura de imágenes de los laboratorios de la red y al formato en que son guardadas las imágenes por los diferentes sistemas.

Los parámetros de aceptación considerados, luego del análisis de control de calidad automatizado de las imágenes y de su inspección visual, fueron: un valor mínimo de FS de 0,02 y un valor máximo de coeficiente de variación entre las imágenes digitales transmitidas del 20%. Se observó coincidencia entre los mayores valores de FS obtenido y la estimación visual de la calidad de las imágenes digitales (Figura 1).

**Tabla 1. Valores medios de *Focus Score* y su coeficiente de variación (CV) obtenidos a partir del análisis de calidad de las imágenes enviadas por los laboratorios de la red LDBNet.**

LAB	Tipo de imagen. Color o Monocromática	Tipo de Captura. Semiautomática ó Automática	Formato Imagen	<i>Focus Score</i> (media $\pm$ DE) N=20	CV (%)
L1	Monocromática	Semiautomática	TIF	0,4100 $\pm$ 0,0323	7,9
L2	Color	Semiautomática	JPG	0,0034 $\pm$ 0,0002	6,1
L3	Monocromática	Semiautomática	TIF	0,4057 $\pm$ 0,0014	3,4
L4	Color	Semiautomática	JPG	0,0026 $\pm$ 0,0013	47,8
L5A	Color	Semiautomática	JPG	0,0040 $\pm$ 0,0015	37,3
L5B	Color	Semiautomática	JPG	0,0130 $\pm$ 0,0035	26,9
L6	Monocromática	Semiautomática	TIF	0,0280 $\pm$ 0,0223	79,7
L7	Monocromática	Automática	TIF	0,0269 $\pm$ 0,0049	18,3



**Figura 1. Valores de *Focus Score*(FS) en tres imágenes digitales enviadas por tres laboratorios diferentes de la red.**

Los resultados obtenidos evidenciaron que existe una variabilidad superior al 20% en la calidad de las imágenes entre los laboratorios de la red. Como primera solución para disminuir la variabilidad se distribuyó un material instructivo con los principios para la digitalización de imágenes de microscopía y se recomendó no emplear formatos de imagen comprimidos que impliquen la pérdida de información de la imagen.

Diferentes ejercicios de transmisión de imágenes digitales a través de Internet han demostrado la factibilidad de esta estrategia para acelerar el análisis en el caso de que las capacidades de análisis de un laboratorio sean superadas [2,3]. El cumplimiento del objetivo de transmisión de imágenes digitales permite aumentar la velocidad de las evaluaciones biodosimétricas de las redes de trabajo con fines de asistencia en emergencias radiológicas o nucleares [3]. Hasta donde conocemos es la primera vez que todos los laboratorios que conforman una red transmiten imágenes digitales para ser analizadas. Otro aspecto relevante es que el algoritmo que permitió evaluar la calidad es de libre uso y distribución [4].

#### 4. CONCLUSIONES

La provisión de ítems de ensayo homogéneos, a través de mediciones objetivas de la calidad de la imagen, constituye el objetivo para garantizar la calidad de las imágenes que se transmitan vía electrónica en escenarios con víctimas múltiples que conlleven la activación de las redes regionales/internacionales de dosimetría biológica con fines de asistencia en emergencias radiológicas o nucleares. El cumplimiento de este objetivo permitiría aumentar la precisión y la velocidad de las evaluaciones biodosimétricas de las redes de trabajo.

El empleo de criterios numéricos objetivos como el FS contribuirá a que el intercambio de la información se realice bajo determinados parámetros de calidad previamente fijados, por lo tanto es necesario continuar trabajando en la armonización de los criterios de calidad de las imágenes transmitidas para aumentar su precisión.

#### 5. REFERENCIAS

1. IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies, EPR-Biodosimetry 2011, International Atomic Energy Agency, Vienna (2011).
2. García O., Di Giorgio M., Vallergera M.B., Radl A., Taja M.R., Seoane A., De Luca J., Stuck Oliveira M., Valdivia P., Lamadrid A.I., Gonzalez J.E., Romero I., Mandina T., Pantelias G., Terzoudi G., Guerrero-Carbajal C., Arceo Maldonado C., Espinoza M., Oliveros N., Martínez-López W., Di Tomaso M.V., Méndez-Acuna L., Puig R., Roy L., Barquinero J.F., Interlaboratory comparison of dicentric chromosome assay using electronically transmitted images, *Radiation Protection Dosimetry*, 154, 18–25 (2012).
3. Romm H., • Ainsbury E., • Bajinskis A., • Barnard S., • Barquinero J. F., • Barrios L.,

- Beinke C., • Puig-Casanovas R., • Deperas-Kaminska M., • Gregoire E., • Oestreicher U., • Lindholm C., • Moquet J., • Rothkamm K., Sommer S., • Thierens H. , • Vral A., • Vandersickel V., • Wojcik A., Web-based scoring of the dicentric assay, a collaborative biodosimetric scoring strategy for population triage in large scale radiation accidents. *Radiation Environmental Biophysics*, **53**, 241–254 (2014).
- 4. Carpenter A.E., Jones T.R., Lamprecht M.R., Clarke C., Kang I.H., Friman O., Guertin D., Chang J.H., Lindquist R.A., Moffat J., Golland P., Sabatini D.M., CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*, **7**, Article R100 (2006).
- 5. Sun Y., Duthaler S., Nelson B., Autofocusing in Computer Microscopy: Selecting the optimal focus algorithm, *Microscopy Research and Technique*, **65**, 139-149 (2004).