

Sistema de digitalización de imágenes de microscopía mediante teléfono móvil para el telediagnóstico de tuberculosis

M. Postigo Camps¹, D. Cuadrado Sánchez¹, A. Martínez Martínez¹, S. Gil Casanova¹, P. Merino Amador², M.J. Ledesma Carbayo¹, M.A. Luengo Oroz¹

¹ Biomedical Image Technologies, Universidad Politécnica de Madrid & CIBER-BBN, Madrid, España

² Servicio de Microbiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.

Resumen

En 2013, nueve millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta causa. Una de las grandes barreras para la erradicación de la enfermedad es la falta de personal cualificado que pueda analizar por microscopía óptica las muestras de los pacientes. En estas situaciones la telemedicina y, en concreto, la telefonía móvil se presenta como una solución atractiva.

El objetivo de esta investigación es evaluar y validar metodologías de digitalización de muestras de esputo utilizando smartphones. Para ello se analizan diferentes adaptadores móvil-microscopio que permiten alinear ambos elementos y se elabora un protocolo de digitalización. El protocolo se crea en base a una evaluación de los parámetros determinantes en la digitalización, los dispositivos móviles y las especificaciones de la cámara. Esta investigación concluye que es viable la adquisición de imágenes de esputo, válidas para el diagnóstico de la tuberculosis, utilizando smartphones y adaptadores impresos en 3D por menos de un euro.

Este sistema puede integrarse con plataformas como TuberSpot que permiten el análisis online de las muestras utilizando inteligencia colectiva y gamificación.

1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad prevenible y tratable, reconocida por la Organización Mundial de la Salud como la segunda causa mundial de mortalidad causada por un agente infeccioso. En 2013, nueve millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta causa [1]. El diagnóstico de la tuberculosis en muchos de los países en vías de desarrollo está restringido al análisis de muestras de esputo a través del microscopio. Las muestras deben ser previamente teñidas con una de las dos tinciones aprobadas internacionalmente, Ziehl-Neelsen o el procedimiento con fluorocromo auramina-O que se utiliza con microscopía de fluorescencia. El objetivo del análisis microscópico es la identificación y cuantificación de bacilos *Mycobacterium Tuberculosis*, un proceso que puede llevar hasta 20 minutos a un técnico microscopista. Hoy en día no hay suficientes especialistas en aquellas comunidades con mayor prevalencia de la enfermedad. A esto hay que sumar, la variabilidad del técnico debida a la fatiga que genera estar largos periodos de tiempo frente al microscopio.

Por otro lado, la usabilidad de los *smartphones* y sus precios cada vez más económicos han permitido su

expansión geográfica. Actualmente existen seis mil millones de líneas de teléfono, el 70% de ellas en países en vías de desarrollo. Las mejoras en las cámaras de los *smartphones*, la capacidad de registro de datos y la conexión a redes inalámbricas hacen de la telefonía un móvil un potencial interesante para la adquisición y transmisión de imágenes de microscopía.

2. Objetivos

El objetivo de esta investigación es el diseño e implementación de un sistema de adquisición de imágenes de microscopía óptica basado en telefonía móvil. Los parámetros del sistema a analizar y validar son la forma de alinear el móvil al ocular del microscopio, la capacidad de los dispositivos móviles para adquirir imágenes de esputo útiles en el diagnóstico de la tuberculosis y, los parámetros de la cámara móvil y las técnicas básicas de postprocesado de imágenes que representan con mayor fidelidad lo observado a través del microscopio. A pesar de que el diagnóstico con auramina-O permite un cribado más rápido de las muestras, se aplicarán estos estudios a muestras con tinción Ziehl-Neelsen por su mayor especificidad en los resultados.

El sistema debe poder integrarse con TuberSpot [2], un sistema basado en inteligencia colectiva y gamificación para el análisis de imágenes. Mediante juegos online, voluntarios no pertenecientes al campo médico analizan muestras digitalizadas. Utilizando inteligencia artificial se combinan los resultados obtenidos por distintos jugadores sobre una imagen para obtener un resultado de fiabilidad equivalente a la de un técnico microscopista.

3. Materiales y métodos

3.1. Adaptadores móvil-microscopio

Los adaptadores móvil-microscopio son soportes mecánicos que permiten fijar y alinear un teléfono móvil al ocular de un microscopio. Actualmente se comercializan varios modelos cuyo precio oscila entre 60 y 100€. A lo largo de esta investigación se han utilizado y comparado dos de ellos, Digiscoping [3] y Magnifi [4], y se han impreso otros dos adaptadores en 3D.

Digiscoping (ver Figura 1) puede utilizarse con una gran variedad de teléfonos y microscopios. Su uso obliga a ajustar mecánicamente la posición del móvil con respecto al microscopio para poder visualizar correctamente todo el campo de visión.

Los adaptadores Magnifi (ver Figura 2), sin embargo, poseen las dimensiones específicas para un modelo de iPhone. A pesar de su menor versatilidad, esto les permite enganchar directamente el teléfono al adaptador sin necesidad de ajuste mecánico.



Figura 1. Adaptador Universal Digiscoping



Figura 2. Adaptador Magnifi

Los adaptadores impresos en 3D presentan una diferencia fundamental frente al resto de adaptadores, su bajo coste de producción. Para este proyecto se han impreso dos adaptadores. El primero de ellos es universal en cuanto a que su diseño tan versátil como Digiscoping, y el segundo es un adaptador específico para el móvil Sony Xperia Z2 y para el microscopio Zeiss, modelo AX05COP2. Ambos diseños se han adquirido en Thingiverse [5], un repositorio online de diseños digitales tridimensionales, y se han modificado con Blender, un software libre y gratuito. La impresión 3D se ha realizado con PLA (poliácido láctico) en las impresoras Witbox de BQ y Prusa i3 de RepRap respectivamente, en un tiempo entre 4 y 5 horas cada una de ellas (ver Figura 3 y 4). El coste de impresión, asociado al consumo de material, de cada uno de estos adaptadores es inferior a un euro.



Figura 3. Adaptador universal impreso en 3D



Figura 4. Adaptador impreso en 3D, específico para Sony Xperia Z2 y microscopio Zeiss AX05COP2

3.2. App 'Microscope'

Para el proceso de digitalización se ha diseñado Microscope, una aplicación Android que permite digitalizar imágenes, asociarlas al perfil de un paciente y enviarlas al servidor en red. La aplicación cumple los

requisitos de anonimización y privacidad de datos del paciente. Microscope está pensada para ser usada por personal no cualificado en aspectos médicos, su diseño es sencillo y orientado a la usabilidad.

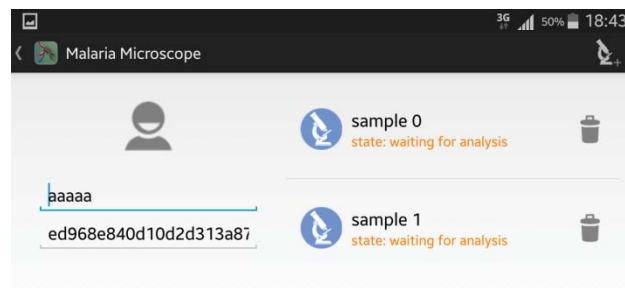


Figura 5. Screenshot de Microscope correspondiente al perfil de un paciente, contiene el identificador público, el identificador codificado y dos muestras digitalizadas que ya han sido enviadas a TuberSpot y están pendientes de ser analizadas.

3.3. Protocolo de digitalización

Distintos estudios demuestran la validez del telediagnóstico a través de muestras digitalizadas con cámaras fijas cuando se comparan con el diagnóstico convencional [6]. Sin embargo, no existen estudios acerca de la validez y viabilidad del diagnóstico usando imágenes de microscopía adquiridas con un *smartphone*. Para su evaluación, así como para optimizar el proceso de adquisición de imágenes se ha realizado un estudio consistente en una fase de digitalización y un cuestionario. En la fase de digitalización se adquirieron más de 200 imágenes de múltiples muestras que en conjunto representan todas las posibles gradaciones de bacilos (negativo, *scanty*, +1, +2, +3) [7]. En esta fase se recogieron observaciones de los especialistas que han contribuido a la extracción y ratificación de las conclusiones del cuestionario.

El cuestionario está formado por 12 preguntas, para el cual se ha utilizado una selección de 35 imágenes. Todas las imágenes están realizadas sobre el mismo campo de una muestra +3 (muestra con más de diez bacilos por campo). En cada pregunta se incorporan varias imágenes, cada individuo debe elegir la imagen en la que se considera que sería más sencillo y preciso la detección de bacilos. Las imágenes de cada pregunta están adquiridas modificando un único parámetro de la cámara y manteniendo el resto de parámetros en valores estándar. Los parámetros que se han valorado han sido: teléfono móvil, resolución, aumentos del zoom, tipo de zoom, balance de blancos, brillo, contraste, compensación de exposición, tipo de enfoque, ISO, iluminación de la sala y técnicas de suavizado.

El cuestionario ha sido completado por ocho especialistas del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos y del Programa Apoyo.

Como ejemplo, en la Figura 6 se visualizan las imágenes utilizadas en una pregunta del cuestionario.

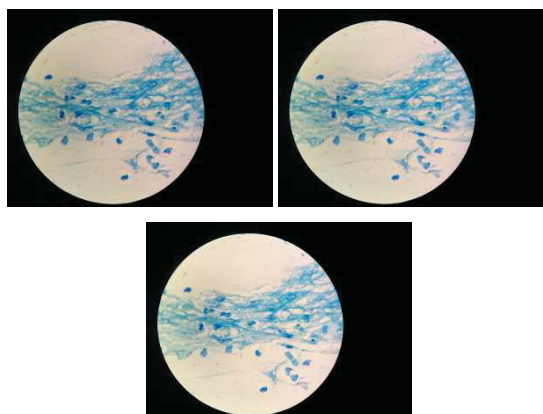


Figura 6. (De arriba hacia abajo y de izquierda a derecha) Imagen con valor de balance de blancos: 0.3, 0.7, 1

4. Resultados

A pesar del reducido número de participantes las respuestas guardan una gran unanimidad que ha permitido llegar a las siguientes afirmaciones:

- existen dispositivos que adquieren con mayor fidelidad que otros. Entre los analizados de las marcas Samsung, Sony y Nexus el que obtiene resultados considerablemente mejores es el Sony Xperia Z2.
- las lentes de los *smartphones* no están optimizadas para la digitalización a 1 cm de distancia del motivo (distancia a la que se sitúa el móvil del ocular del microscopio). En las imágenes obtenidas hay un ligero desenfoque que aumenta en los bordes del campo de visión.
- la resolución de los teléfonos móviles actuales es muy superior a la necesaria para la identificación de microorganismos.
- el zoom digital de la cámara es útil para la identificación de microorganismos y preferible al zoom de los visualizadores de imágenes.
- el formato de fichero *.jpeg* frente al formato *.png* comprime de tal manera la imagen que repercute en la identificación de microorganismos.
- la identificación de bacilos en imágenes de esputo se puede optimizar aumentando el contraste, el brillo y/o el balance de blancos. Estos cambios también se pueden realizar en la adquisición o como postprocesado de la imagen.

Los datos más representativos en los que se apoyan estas conclusiones se representan en las Figuras 6, 7, 8 y 9. El conjunto restante de datos se puede encontrar en la Tabla 1.

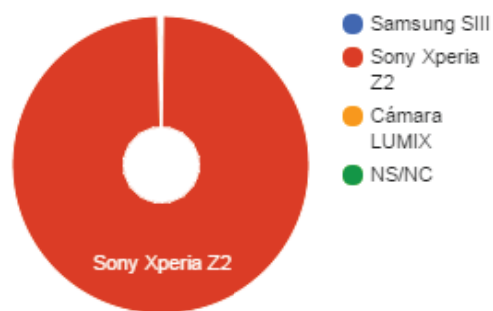


Figura 7. Distribución de las respuestas en cuanto al dispositivo de adquisición

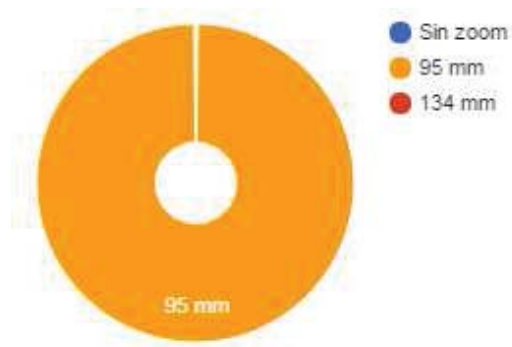


Figura 8. Distribución de las respuestas en cuanto a los aumentos del zoom

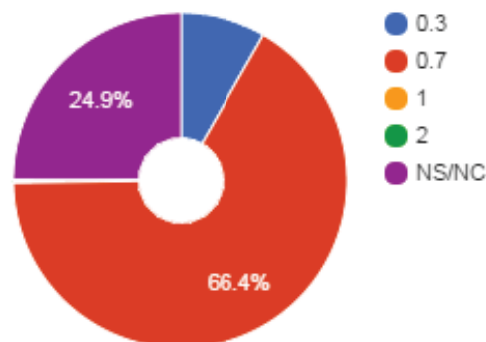


Figura 9. Distribución de las respuestas en cuanto al valor de la compensación de exposición.

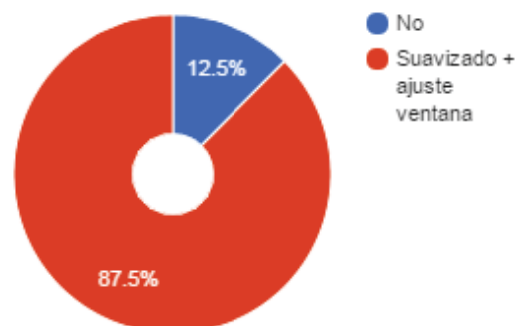


Figura 10. Distribución de las respuestas en cuanto al uso de técnicas de postprocesado de imagen

Resolución	Enfoque	ISO	Zoom (dispositivo)	Balance blancos	Luz sala	Exposición mínima (forma de obtención)	Contraste/ Brillo/ Saturación
NS/NC: 30%	NS/NC: 63%	NS/NC: 75%	95 mm _ Xperia: 100%	Auto: 75%	NS/NC: 63%	Comp. Exp_0.3_app FV5: 100%	NS/NC: 75%
2.1 MPx: 10%	Auto: 25%	800: 12.5%	x4_ SIII: 0%	Bombilla: 12.5%	Encendida: 37%	Comp. Exp_ -1 _ app Cámara: 0%	+4: 25%
3.1 MPx: 20%	Manual: 12%	3200: 12.5%	75%_Galería Windows: 0%	NS/NC: 12.5%	Apagada: 0%	Apert. Obturador_corto_app FV5: 0%	+2: 0%
8 MPx: 20%	Infinito: 0%	Alta sensibilidad: 0%				NS/NC: 0%	
20.7 MPx: 20%							

Tabla 1. Resultados cuestionario

En base a estos resultados se ha formalizado un protocolo de digitalización. Este protocolo ha sido utilizado en la creación del primer repositorio de imágenes de muestras reales de esputo adquiridas con telefonía móvil. El repositorio contiene 100 imágenes correspondientes a 20 muestras que en conjunto representan todas las posibles gradaciones de bacilos. Treinta y cinco imágenes de este conjunto se han introducido en el juego TuberSpot, donde ya han sido analizadas por más de 1000 jugadores diferentes.

Adicionalmente, en junio de 2015 se ha validado el sistema de adquisición en una prueba sobre el terreno en un centro de salud de Mozambique. En esta prueba sobre el terreno se adquirieron 53 imágenes con el adaptador Digiscoping y con el teléfono móvil Sony Xperia Z2.

5. Conclusiones

A pesar de existir ligeras diferencias entre una muestra digitalizada con el teléfono móvil y la misma muestra observada a través del microscopio, es posible adquirir imágenes de microscopía de muestras de esputo con un adaptador móvil-microscopio y un *smartphone*, sin necesidad de conocimientos técnicos. El sistema propuesto tiene un coste mínimo en comparación con otras cámaras usadas específicamente en este contexto y posee una calidad de imagen suficiente para identificar y cuantificar *M. tuberculosis* en las imágenes.

Es importante resaltar que las muestras cuya extensión no es lo suficiente fina pueden poseer zonas desenfocadas ya que no es posible enfocar al mismo tiempo todas las profundidades. En esta línea, sería interesante automatizar un desplazamiento vertical de la platina, digitalizar a diferentes niveles de Z y fusionar las diferentes imágenes [8]. Otro trabajo a plantear es pasar de la digitalización de campos individuales de la muestra a la digitalización automática de toda la muestra, crear el llamado ‘*whole slide image*’ (WSI). Hoy en día, existen tecnologías que lo implementan el WSI, sin embargo, su coste aún es elevado. Por último, otro paso interesante sería intercambiar el microscopio por tecnologías más baratas, compactas, ligeras y sencillas de usar que también

adquieran imágenes lo suficientemente precisas para generar resultados útiles en el campo de la salud. Algunas de las tecnologías emergentes en este campo son Foldscope [9], las lentes PDMS[10] o Keeploop. Hoy por hoy, estas tecnologías no se pueden incorporar al diagnóstico de la TB ya que no poseen los aumentos necesarios o porque la proporción del campo de visión que se encuentra enfocada es muy reducida.

Referencias

- [1] WHO. *Global Tuberculosis Report 2014*. World Health Organization, 2014.
- [2] Página web de TuberSpot. <http://tuberspot.org/es/>. (Consultada: Septiembre 2015).
- [3] Página web de Digiscoping | Adapters. <http://www.digiscoping.co.uk/?Cat=Adapters>. (Consultada: Septiembre 2015).
- [4] Página web de Magnifi. <http://www.arcturuslabs.com>. (Consultada: Septiembre 2015).
- [5] Página web de Thingiverse | Universal Camera Phone/Microscope Adapter by Ggoss. <http://www.thingiverse.com/thing:78071>. (Consultada: Septiembre 2015).
- [6] Campbell WS, Lele SM, West WW, Lazenby AJ, Smith LM, Hinrichs SH. (2012). *Concordance between whole-slide imaging and light microscopy for routine surgical pathology*. *Human pathology*, vol 43, no 10, 2012, pp 1739-1744.
- [7] Weyer K. *Laboratory services in tuberculosis control. Part II: microscopy*. *World Health Organization Technical Bulletin*, vol 98, 1998, pp 258.
- [8] Li S, Kwok JT, Wang Y. *Multifocus image fusion using artificial neural networks*. *Pattern Recognition Letters*, vol 23, no 8, 2002, pp 985-997.
- [9] Cybulski JS, Clements J, Prakash M. *Foldscope: origami-based paper microscope*. *Plos ONE*, vol 20, 2014, no 6.
- [10] Sung YL, Jeang J, Lee CH, Shih WC. *Fabricating optical lenses by inkjet printing and heat-assisted in situ curing of polydimethylsiloxane for smartphone microscopy*. *Journal of biomedical optics*, vol 20, 2015, no 4, pp 047005-047005.