

## Development of an online slide library

Duarte R.<sup>1</sup>, Fernandes S.<sup>1,2</sup> e Silva R.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Escola Superior de Tecnologia da Saúde – Instituto Politécnico do Porto (ESTSP-IPP), Vila Nova de Gaia, Portugal

<sup>2</sup> Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, ESTSP-IPP

Received: January 2015/ Published: April 2015

### **Corresponding author:**

Sílvia Fernandes

Escola Superior de Tecnologia da Saúde – Instituto Politécnico do Porto (ESTSP-IPP)

Rua Valente Perfeito, nº 322, 4400-330 Vila Nova de Gaia, Portugal

[smf@eu.ipp.pt](mailto:smf@eu.ipp.pt)

### **ABSTRACT**

Digital Cytology consists in the conversion of a glass slide into a digital image. The application of digital cytology in education, conferences, telecytology, publications and cytology websites has shown increased accessibility to cytology, along with the quality and efficiency improvement of the health services.

In this study we intend to develop an Online Slide Library of gynecological cytology available to students for the gynecological cytology

One hundred samples of gynecological cytology were selected and scanned by the whole slide imaging method. The Online Slide Library was created with HyperText Markup Language 5 and the digital images sharing within the Library was conducted using the institution network server.

In education, the Online Slide Library developed allows the easier access to the study of gynecologic cytology as well as the access to rare and/or old samples. Also several students can observe the same case simultaneously with this method of digital cytology.

The results of the present work allow to conclude that the Online Slide Library is a complementary tool for the gynecological cytology study.

**Key-words:** Digital Cytology, Online slide library, Gynecological Cytology, Education

## Desenvolvimento de uma laminoteca digital

Duarte R.<sup>1</sup> e Fernandes S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escola Superior de Tecnologia da Saúde – Instituto Politécnico do Porto (ESTSP-IPP), Vila Nova de Gaia, Portugal

### RESUMO

A citologia digital consiste na conversão de um esfregaço em lâmina de vidro numa imagem em formato digital. Cada vez mais se recorre à citologia digital para aplicação em vários contextos, nomeadamente na educação, conferências, telecitologia, publicações e em páginas de Internet, o que permite uma maior acessibilidade à citologia e aumenta a qualidade e a eficiência dos serviços de Saúde.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma biblioteca de lâminas (Laminoteca) *online* de amostras de citologia ginecológica, acessível aos estudantes, para o estudo da citologia ginecológica.

Cem casos de citologia ginecológica foram selecionados e digitalizados segundo o método *whole slide imaging* (WSI). A Laminoteca Digital foi desenvolvida em *HyperText Markup Language 5*. A partilha das imagens digitais na Laminoteca Digital foi feita com recurso ao servidor de rede da instituição de ensino.

A Laminoteca desenvolvida aplicada na educação permite aos estudantes uma maior facilidade de acesso ao estudo da citologia ginecológica, bem como o acesso a amostras raras e/ou antigas. Utilizando este método, é ainda possível vários estudantes observarem simultaneamente o mesmo caso.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a Laminoteca Digital demonstra ser uma ferramenta complementar útil no estudo da citologia ginecológica.

**Key-words:** Citologia Digital, Laminoteca Online, Citologia Ginecológica, Educação

## INTRODUÇÃO

A inovação tecnológica tem cada vez mais impacto nos métodos e técnicas de diagnóstico das diversas áreas de intervenção na saúde. Na citopatologia, os microscópios óticos têm vindo a ser continuamente desenvolvidos com vista à melhoria contínua da ergonomia e da qualidade de imagem. Neste sentido, o avanço da tecnologia aliado aos constantes desafios do diagnóstico impulsionaram o desenvolvimento de microscópios com a capacidade de digitalização de preparações citológicas cuja utilidade tem sido crescente entre os profissionais da área<sup>1-6</sup>. Na Anatomia Patológica, a digitalização de amostras têm revolucionado as áreas da histologia, citologia, imunohistoquímica e citogenética, contribuindo para uma automatização diagnóstico<sup>1,6</sup>.

Na Saúde, a utilização mais básica da citologia digital aplica-se ao arquivo de lâminas, permitindo aos serviços de saúde uma melhor gestão do espaço físico do laboratório, facilidade de acesso e ainda a qualidade e integridade da imagem citológica ao longo do tempo<sup>7</sup>. No âmbito do diagnóstico, a revisão de casos ou o pedido dirigido de segundas opiniões a outras entidades hospitalares (telecitologia) tem sido cada vez mais praticada, evitando gastos monetários com o envio das preparações citológicas, deslocações de patologistas e potenciais perdas de material<sup>1,2,8,9</sup>. A citologia digital permite igualmente aumentar a qualidade e eficiência do serviço por facilitar o controlo de qualidade interno e externo em tempo útil. O avanço da tecnologia tem progredido de modo a permitir a realização de *screening* automatizado, o qual tem por base a avaliação de imagens obtidas por digitalização da amostra<sup>2</sup>. Além disso, dado o aumento significativo do volume de amostras de citologia ginecológica nos serviços de Anatomia Patológica advindo da adesão aos Programas de Rastreio implementados, a utilização da citologia digital reveste-se de extrema importância na formação dos técnicos e citotécnicos, garantindo a melhoria e inovação do rastreio através de uma correta interpretação de lesões pré-malignas citológicas e de infeções<sup>2,10-12</sup>. Na educação, a imagem digital tem permitido o estudo de amostras raras e/ou amostras

antigas, mas acima de tudo tem possibilitado o estudo à distância, transportando a citologia até aos estudantes a qualquer hora e em qualquer local. Além destas aplicabilidades, as imagens digitais podem ainda ser usadas em conferências, na avaliação contínua para profissionais de saúde, em provas de avaliação/admissão de estudantes e profissionais ou em páginas de internet para consulta<sup>1-9,12,13</sup>. Atualmente, as ilustrações presentes em publicações (livros e revistas científicas) são também efetuadas por este método inovador permitindo a produção de documentos com imagens de alta definição<sup>1</sup>.

A citologia digital consiste na realização do *screening* a partir de uma imagem em duas ou três dimensões representada num monitor<sup>2</sup>. Existem diferentes métodos de captura e criação de imagens digitais, sendo que o *Whole Slide Imaging (WSI)* permite a digitalização completa de toda a lâmina através de *scanners* de alta resolução<sup>1,2,10,14,15</sup>.

O processamento da imagem envolve a sua captura por digitalização, o armazenamento num dispositivo com elevada capacidade de memória, a edição (se necessário) e, por fim, a visualização, exposição ou partilha<sup>2,8</sup>. De modo idêntico ao *screening* num microscópio ótico tradicional, a imagem digital obtida pode ser manipulada, com recurso a um *software* de visualização, por deslocação, ampliação e focagem através do rato ou das teclas de movimento de cursor do teclado, permitindo uma análise completa e detalhada da amostra<sup>1-3</sup>. Contudo, a natureza de uma amostra citológica apresenta características especiais, constituindo a sua digitalização um desafio ainda maior comparativamente a outras amostras<sup>1,2,16</sup>. Enquanto uma amostra histológica se encontra maioritariamente num único plano de focagem por estar representada por um corte histológico plano, a natureza, por vezes tridimensional, de uma amostra citológica implica o uso de um microscópio com alta resolução de imagem e que permita ajustes de pontos de focagem sucessivos para que a amostra original fique corretamente representada<sup>1</sup>. Desta forma, é importante selecionar o equipamento mais apropriado para a obtenção de uma imagem que

permita a observação com nitidez de todas as células constituintes de uma preparação citológica. A funcionalidade *z-stack*, disponível em determinados equipamentos, permite a digitalização de diferentes pontos de focagem da mesma lâmina por focagem manual das imagens em diferentes planos. Deste modo, é possível obter uma única imagem por compactação sequencial das digitalizações realizadas nos diversos planos, permitindo ao observador utilizar a funcionalidade de focagem em suporte digital, para a correta visualização do esfregaço, sobretudo em agrupamentos com sobreposição<sup>1,16,17</sup>.

As vantagens do uso deste método são múltiplas e podem aplicar-se em diversas áreas, como anteriormente referido. Contudo, algumas limitações associadas à digitalização, arquivo e transferência das imagens não têm proporcionado até à data a expansão do método pelos diversos serviços de saúde e instituições de ensino<sup>2</sup>.

O presente trabalho tem como objetivo a digitalização de lâminas de citologia ginecológica para criação de uma Laminoteca Digital que será partilhada *online* com os estudantes da Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica (APCT).

## MÉTODOS

### SELEÇÃO DE CASOS

Foram selecionadas cem amostras de citologia ginecológica do arquivo de lâminas da Área Técnico-Científica de APCT da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (ESTSP). Este arquivo é constituído por preparações citológicas realizadas a partir de amostras

excedentes gentilmente cedidas para fins académicos por laboratórios de Anatomia Patológica, tendo sido a respetiva identificação anonimizada antes do envio. As categorias diagnósticas dos casos selecionados encontram-se identificadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Número de casos, por diagnóstico citopatológico, selecionados para a Laminoteca Digital

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO			NÚMERO DE CASOS	
Insatisfatório			2	
Negativo para Lesão Intraepitelial ou Neoplasia Maligna (NILM)	Negativo para Lesão Intraepitelial ou Neoplasia Maligna (NILM)		8	
	Alterações reativas associadas a	Radiação	3	
		Inflamação	3	
		Atrofia	4	
	Microrganismos	<i>Trichomonas vaginalis</i>		9
		Fungos morfológicamente compatíveis com <i>spp Candida</i>		9
		Desvio da flora sugestivo de vaginose bacteriana		2
		Bactérias morfológicamente compatíveis com <i>Actinomyces</i>		8
	Alterações celulares compatíveis com vírus do tipo <i>Herpes simplex</i>		4	
	Células Epiteliais Atípicas/ Anormais	Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL)		10
Lesão Intraepitelial de Alto Grau (HSIL)		9		
Epitélio Escamoso		Células De significado indeterminado (ASC-US)	7	
		Escamosas Não excluindo HSIL (ASC-H)	6	
		Atípicas (ASC)	6	
Carcinoma Pavimentoso		3		
Epitélio Glandular		Endometrial		2
		Adenocarcinoma	Endocervical	2
		Sem outra especificação (SOE)		5
		Células Glandulares Atípicas (AGC)		4
Número Total de Casos			100	

A seleção das amostras foi efetuada com base na qualidade do esfregaço e na quantidade de material citológico. De entre os casos selecionados encontram-se citologias em meio líquido (*Thinprep*®, *Surepath*® e *CellPrep*®) e esfregaços convencionais. A informação clínica de cada caso foi registada para constar da Laminoteca Digital.

### DIGITALIZAÇÃO DE IMAGEM

A digitalização dos esfregaços selecionados foi realizada no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP) através do método WSI com recurso ao equipamento *NanoZoomer 2.0HT* (Hamamatsu, Japão). Os esfregaços foram digitalizados na totalidade pelo técnica *line scanning*, numa ampliação de 40x. A funcionalidade *z-stack* foi utilizada na digitalização de todos os esfregaços convencionais com nove planos de focagem, com 1µm de intervalo, e de determinadas amostras em meio líquido com cinco planos de focagem com 1µm de intervalo. As imagens obtidas foram armazenadas em formato *NanoZoomer Digital Pathology Image (.ndpi)*.

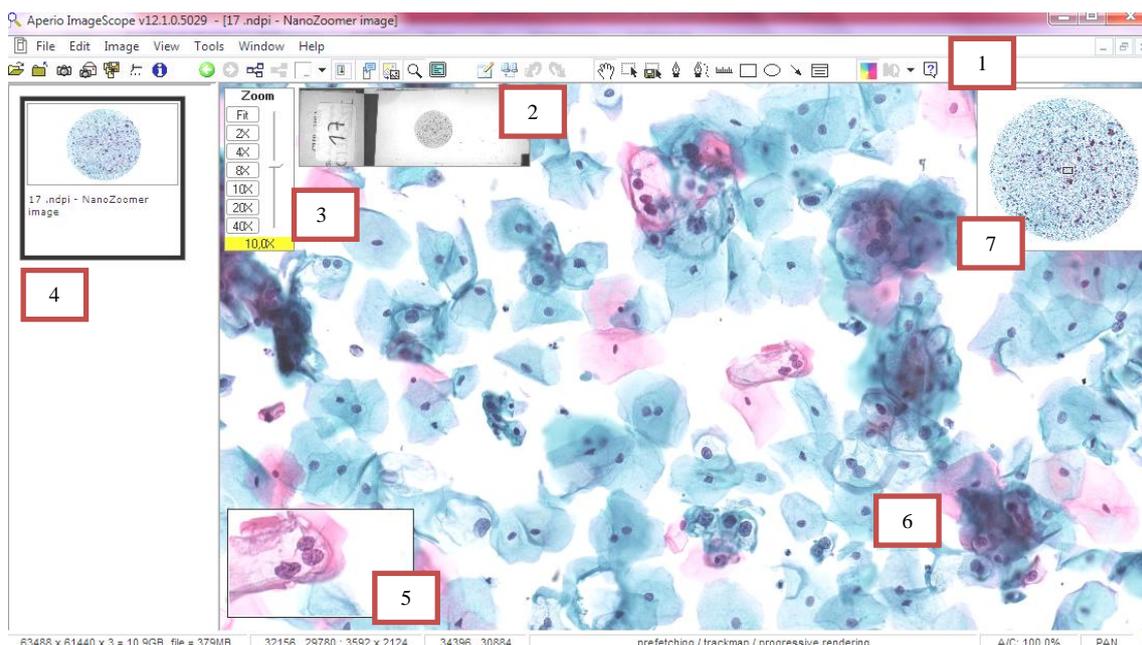
### LAMINOTECA DIGITAL

A Laminoteca Digital foi desenvolvida em *HyperText Markup Language 5 (HTML5)*. As figuras representativas dos casos presentes na Laminoteca Digital foram obtidas através da funcionalidade *Export* do *software* de visualização de imagem *NDP.view* (Hamamatsu, Japão).

A inserção e o acesso às imagens digitais na Laminoteca Digital foram feitos com recurso ao servidor de rede da ESTSP. Para o acesso às imagens digitais na Laminoteca foi criado um ficheiro de atalho para cada caso em formato *ScanScope Image Set (.sis)* no *software* *Aperio ImageScope* (Leica, Alemanha) para *download* e visualização através da rede *wireless* da ESTSP.

### SOFTWARE DE VISUALIZAÇÃO

Para a visualização das imagens digitais foi utilizado o *software* *Aperio ImageScope* (Leica, Alemanha), encontrando-se este disponível para *download* na Laminoteca Digital. Os principais painéis de controlo bem como as principais ferramentas de navegação utilizadas para a visualização das imagens digitais, encontram-se identificados na **Fig.1**.



**Fig.1** – Principais painéis de controlo e ferramentas de navegação do *software* *Aperio ImageScope* (Leica, Alemanha). (1) Barra de Ferramentas, (2) Janela de Etiqueta, (3) Controlador de zoom, (4) Barra de Imagens Digitais, (5) Janela de Ampliação, (6) Imagem Principal e (7) Janela Miniatura.

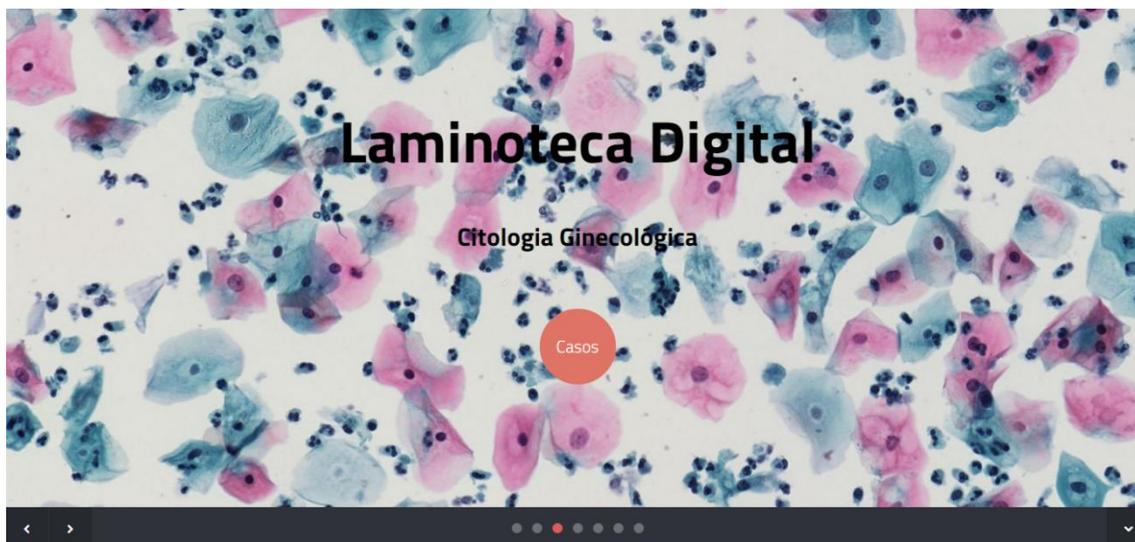
## RESULTADOS

### LAMINOTECA DIGITAL

A Laminoteca Digital criada está disponível *online* no *website* [www.estsp.ipp.pt/sites/laminotecadigital](http://www.estsp.ipp.pt/sites/laminotecadigital). A plataforma é constituída por diversas secções numa única página web: “Início”, “Citologia Digital”, “Aperio Imagescope” e “Casos” (**Fig.2**, **Fig.3**, **Fig.4** e **Fig.5**). No centro da secção “Início”, é encontrada encontra-se uma hiperligação direta para a secção “Casos” (**Fig.2**). Na secção “Citologia Digital” é observado um breve resumo acerca do conceito da Citologia Digital, das principais aplicabilidades do método e as principais vantagens do mesmo, na Educação (**Fig.3**). Na secção “Aperio Imagescope” existe uma hiperligação para o *download* do *software* de visualização das Imagens Digitais bem como algumas imagens ilustrativas do respetivo programa (**Fig.4**). Na secção “Casos” estão dispostos os cem casos de Citologia Ginecológica da Laminoteca Digital. A disposição dos diferentes casos na Laminoteca Digital está organizada de acordo com os diagnósticos assinalados na **Tabela 1**. Cada caso está

complementado com as informações clínicas mais relevantes para a interpretação diagnóstica bem como o diagnóstico citopatológico atribuído. Estas informações podem ser consultadas na Laminoteca Digital passando o cursor do rato pela imagem ilustrativa do caso. Do lado esquerdo da secção “Casos” é possível encontrar ainda um conjunto de filtros, que permitem ao estudante maior acessibilidade na escolha das categorias diagnósticas a observar (**Fig.5**). A digitalização dos casos resultou em imagens digitais com dimensões compreendidas entre os 297 *megabytes* e os 39 *gigabytes*, dependendo do tipo de citologia e do uso da funcionalidade *z-stack*. No total, foram ocupados 125 *gigabytes* no servidor de rede da ESTSP.

A quantidade de planos de focagem nas imagens digitais em *z-stack* variou entre nove planos para os esfregaços convencionais e cinco planos para as citologias em meio líquido. Como exemplo, na **Fig.6** é ilustrada uma sequência de imagens do mesmo agrupamento de células do caso número 17 nos cinco planos de focagem diferentes.



**Fig.2** - Ilustração do conteúdo da secção “Início” com imagens de apresentação da Laminoteca Digital.



Fig.3 - Ilustração do conteúdo da secção “Citologia Digital”.

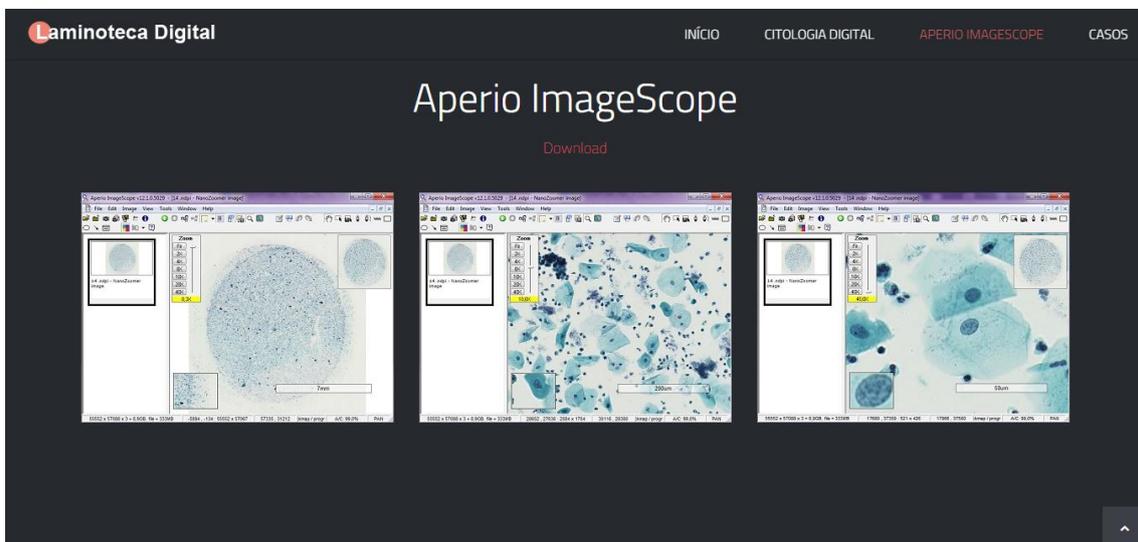


Fig.4 - Ilustração do conteúdo da secção “Aperio Imagescope”.

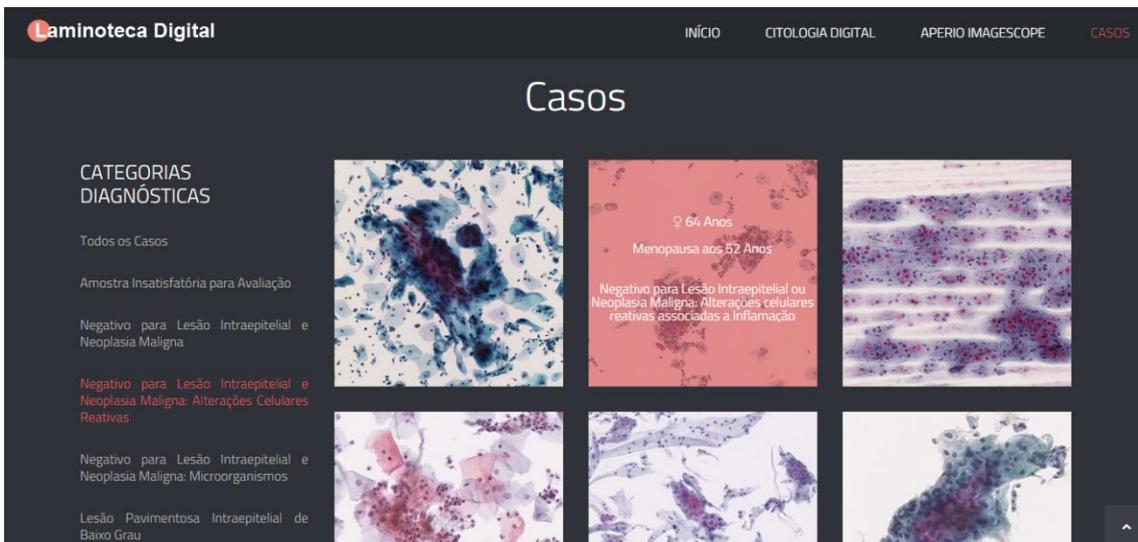
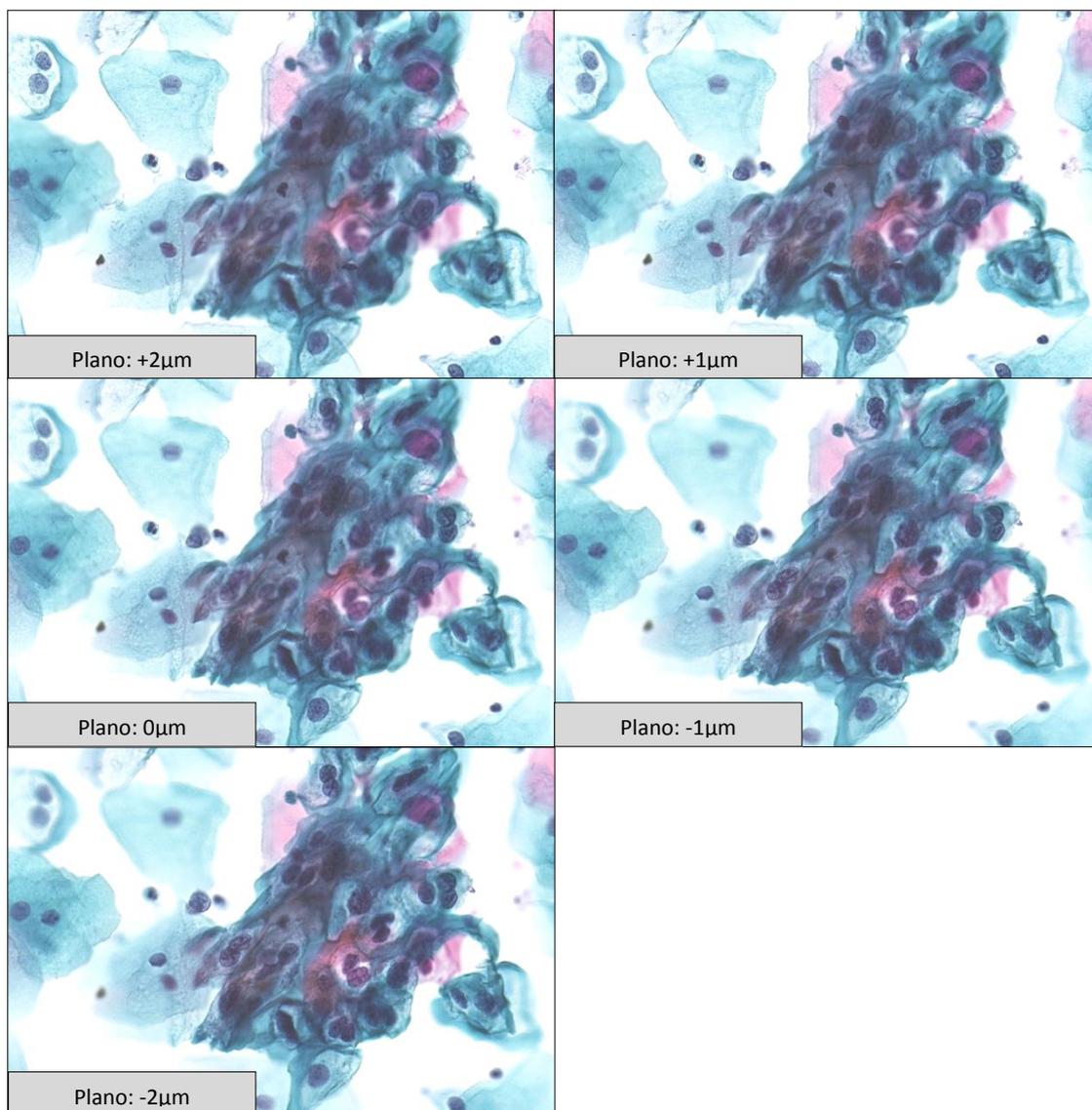


Fig.5 - Ilustração do conteúdo da secção “Casos”. Apresentação da informação clínica de um dos casos da Laminoteca Digital.



**Fig.6** – Sequência de imagens do mesmo agrupamento de células em diferentes pontos de focagem obtidas a partir do caso número 17, a uma ampliação de 40x.

## DISCUSSÃO

Desde o desenvolvimento do primeiro equipamento de digitalização de lâminas de alta resolução, elevada velocidade e total automatização, por Art Wetzel e John Gilbertson em 1999, que o interesse na utilização dos scanners pelo método WSI tem sido cada vez maior<sup>18</sup>.

No presente trabalho foi criada uma biblioteca de lâminas de citologia ginecológica em formato digital online (Laminoteca Digital) com o intuito de ser utilizada no estudo da citologia ginecológica pelos estudantes da licenciatura em APCT da ESTSP.

Com vista aos estudantes poderem manusear a

Laminoteca Digital, esta foi desenvolvida sob a forma de uma webpage dinâmica, apelativa, intuitiva, informativa e de fácil acesso. Desta forma, todos os estudantes podem manusear/utilizar a Laminoteca Digital de uma forma simples e interativa.

A inserção das imagens digitais na Laminoteca Digital foi um dos principais problemas técnicos encontrados no desenvolvimento do projeto, devido ao tamanho dos ficheiros. Deste modo, foi necessário criar um ficheiro de atalho ao ficheiro original, em formato diferente e com uma dimensão muito inferior, que

permitisse um upload e download rápido das imagens digitais.

De modo a avaliar a utilidade da Laminoteca Digital como ferramenta complementar à formação em Citologia Ginecológica foi realizado à posteriori um questionário aos estudantes da licenciatura em APCT. Os resultados do questionário permitiram verificar bastante interesse na utilização da Laminoteca Digital, tendo-se obtido uma classificação média de 4,85 em 5 nos parâmetros relacionados com a “Utilidade da Laminoteca”. Estes resultados permitem concluir que a Laminoteca Digital demonstra ser uma ferramenta complementar útil na formação em Citologia Ginecológica.

Apesar das inúmeras aplicabilidades da citologia digital, com a realização deste trabalho pretendeu-se essencialmente a sua utilização na formação. Tradicionalmente, o estudo da citologia é feito com base em livros, lâminas e microscópios óticos. Contudo, com esta metodologia inovadora é possível que o estudo seja feito sem necessidade de deslocação ou disponibilidade do material referido, tornando a citologia facilmente acessível<sup>2,16,19</sup>. Além disso, a utilização do software apropriado permite que um elevado número de estudantes consiga aceder simultaneamente ao mesmo caso, permitindo o estudo da citologia menos individual e mais interativo, assim como contribuindo para uma melhoria da formação pedagógica<sup>1,2,16</sup>. A digitalização de imagens permite ainda o estudo de amostras citológicas raras que na maioria das vezes não estão acessíveis para a observação microscópica tradicional uma vez que podem ser facilmente quebradas ou perdidas. Outra vantagem desta metodologia é o facto de lâminas de casos antigos atempadamente digitalizados, poderem ser visualizadas indefinidamente sem que haja a necessidade de aplicação de uma nova coloração ou montagem na lâmina original<sup>2</sup>.

Apesar das referidas aplicabilidades e respetivas vantagens associadas, algumas desvantagens não têm permitido a expansão do método a todos os serviços de Anatomia Patológica. A necessidade do equipamento de digitalização, de um computador adequado ao ótimo funcionamento do mesmo e de dispositivos de armazenamento de elevada capacidade de memória conduz a grandes custos monetários para as instituições que pretendam aderir a esta tecnologia. Para além disso,

os estudos de validação do método são escassos e muito limitados, ainda não existindo uma standardização para a sua utilização (vários equipamentos e softwares). Adicionalmente, o facto de ser um método relativamente recente requer também a necessidade de uma formação especializada para a utilização correta dos equipamentos por parte dos profissionais de saúde<sup>20</sup>. Por outro lado, as vantagens do uso do tradicional microscópio são bem conhecidas entre os profissionais tais como a familiarização com o equipamento, a facilidade de deslocação das lâminas e ainda o controlo absoluto sobre a focagem e ampliação<sup>21</sup>. Por todos estes motivos, a citologia digital é uma realidade apenas em alguns serviços de Anatomia Patológica.

Com este estudo não se pretende a substituição do método tradicional de screening, mas sim a implementação de uma metodologia futurística, ao encontro das novas tecnologias utilizadas pelos jovens, que permita um estudo mais abrangente e facilitado da Citologia Ginecológica. Com base no website criado e nos resultados obtidos com a aplicação do questionário, pode concluir-se que a Laminoteca Digital demonstra ser uma ferramenta complementar bastante útil na formação em Citologia Ginecológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilbur DC. Digital Cytology: current state of the art and prospects for the future. *Acta Cytol.* 2011;55(3):227-38.
2. Khalbuss WE, Pantanowitz L, Parwani AV. Digital Imaging in Cytopathology. *Patholog Res Int.* 2011 Mar; 1-10.
3. Giansanti D, Grigioni M, D'Avenio G, Morelli S, Maccioni G, Bondi A, et al. Virtual microscopy and digital cytology: state of the art. *Ann Ist Super Sanita.* 2010; 46(2):115-22.
4. Wright AM, Smith D, Dhurandhar B, Fairley T, Scheiber-Pacht M, Chakraborty S, et al. Digital slide imaging in cervicovaginal cytology: A pilot study. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137:618-24.
5. Pantanowitz L, Valenstein PN, Evans AJ, Kaplan KJ, Pfeifer JD, Wilbur DC, et al. Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *J Pathol Inform.* 2011 Aug; 2:36.
6. Krenacs T, Zsakovics I, Micsik T, Fonyad L, Varga SV, Ficsor I, et al. Digital microscopy: the upcoming revolution in histopathology teaching, diagnostics, research and

- quality assurance. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010; 2:965-77.
7. Ministério da Saúde. Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Anatomia Patológica. *Diário da República*. 29 Jun 2007; 124(2): 18549-55.
  8. Pantanowitz T. Digital images and the future of digital pathology. *J Pathol Inform*. 2010 Aug; 1:15.
  9. Thrall M, Pantanowitz L, Khalbuss W. Telecytology: Clinical applications, current challenges, and future benefits. *J Pathol Inform*. 2011 Dec; 2:51.
  10. Ghaznavi F, Evans A, Madabhushi A, Feldman M. Digital Imaging in Pathology: Whole Slide Imaging and Beyond. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2013; 8:331–59.
  11. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening: Second Edition—Summary. *Ann Oncol*. 2010 Mar; 21(3):448-58.
  12. Hamilton PW, Wang Y, McCullough SJ. Virtual microscopy and digital pathology in training and education. *APMIS* 2012 Apr; 120(4):305-15.
  13. Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*. 2012; 61:1–9.
  14. Krurana KK. Telecytology and its Evolving Role in Cytopathology. *Diagn Cytopathol*. 2012; 40:498-502.
  15. Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. Digital Pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*. 2012; 61(1):1-9.
  16. Donnelly AD, Mukherjee MS, Lyden ER, Bridge JA, Lele SM, Wright N, et al. A Optimal z-axis scanning parameters for gynecologic cytology. *J Pathol Inform*. 2013 Dec; 4:38.
  17. Lee RE, McClintock DS, Laver NM, Yagi Y. Evaluation and optimization for liquid-based preparation cytology in whole slide imaging. *J Pathol Inform*. 2011 Oct; 2:46.
  18. Ho J, Parwani AV, Jukic DM, Yagi Y, Anthony L, Gilbertson JR. Use of whole slide imaging in surgical pathology quality assurance: design and pilot validation studies. *Hum Pathol*. 2006 Mar; 37(3):322-31.
  19. Hedvat CV. Digital Microscopy: Past, Present and Future. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Nov; 134(11):1666-70.
  20. Thrall M, Pantanowitz L, Khalbuss W. Telecytology: clinical applications, current challenges, and future benefits. *J Pathol Inform*. 2011; 2:51.
  21. Evered A, Dubbing N. Accuracy and perceptions of virtual microscopy compared with glass slide microscopy in cervical cytology. *Cytopathology*. 2011 Apr; 22(2):82-7.