

Lassi Kinnunen & Tuomas Moilanen

WSI-SKANNEREIDEN VERTAILU SEKÄ TOIMIVUUDEN TESTAAMINEN KLIINISILLÄ NÄYTTEILLÄ

WSI-SKANNEREIDEN VERTAILU SEKÄ TOIMIVUUDEN TESTAAMINEN KLIINISILLÄ NÄYTEILLÄ

Lassi Kinnunen & Tuomas Moilanen
Opinnäytetyö
Syksy 2014
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Lassi Kinnunen, Tuomas Moilanen

Opinnäytetyön nimi: WSI-skannereiden vertailu sekä toimivuuden testaaminen kliinisillä näytteillä

Työn ohjaajat: Markku Yli-Pyky, Paula Reponen, Outi Mäkitalo

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Syky 2014

Sivumäärä: 44 + 5 liitesivua

WSI-skanneri skannaa näytelasilla olevat kudospalat näkökenttä kerrallaan ja yhdistää saadut kuvat yhtenäiseksi digitaaliseksi lasiksi, joka on täydellinen kopio alkuperäisestä näytelasista. Syntyntä digitaalista lasia voidaan tarkastella tarkoitukseen soveltuvilla katseluohjelmistoilla, joilla digitaalinen lasi käyttäytyy kuin mikroskoopilla katsottaessa. Katseluohjelmistolla digitaalisen lasin suurennosta voi vaihdella vapaasti ja koko kudosaluetta pystyy tarkastelemaan ilman rajoituksia. WSI-skannerit käyttävät laitevalmistajasta riippuen eri tekniikoita skannauksen toteuttamiseen, mistä johtuen niiden toimivuus ja skannaustulokset poikkeavat toisistaan suuresti.

Opinnäytetyön tavoitteena oli vertailla eri laitevalmistajien WSI-skannereita ja selvittää niiden toimivuutta kliinisillä näytteillä. Opinnäytetyön tilaajana oli Oulun yliopistollisen sairaalan patologian osasto, joka suunnittelee siirtävänsä osan histologisten leikkeiden tarkastelusta digitaaliseen muotoon. Digitaalisessa muodossa histologisten näytteiden lähettäminen on riskitöntä ja nopeampaa kuin alkuperäisten näytelasien lähettäminen. WSI-skannerit luovat pohjan tehokkaalle telepatologialle.

Testijaksojen ajaksi patologian osasto hankki koekäyttöön yhteensä kolmen eri laitevalmistajan WSI-skannereita. Skannereiden ominaisuuksia selvitettiin ja vertailtiin patologian osaston potilasnäytteistä koostetuilla testilaseilla. Skannereilla suoritettavat testit suunniteltiin patologian osaston toiveiden ja vaatimusten mukaisesti vastaamaan skannerin tulevaa käyttöympäristöä. Jokaiselle skannerille pidettiin perehdytysjakso, jonka jälkeen varsinaiset testit suoritettiin kahden viikon aikana.

Opinnäytetyön tuloksena saatiin vertailukelpoisia numeerisia arvoja eri skannereiden suorituskyvystä sekä tietoa skannereiden ominaisuuksista ja soveltuvuudesta eri käyttöympäristöihin. Numeeristen arvojen perusteella skannereita pystyttiin laittamaan paremmuusjärjestykseen tiedostokoon, skannaukseen kuluvaan ajan ja skannausvirheiden perusteella.

Testijaksojen aikana kaikilla testeissä mukana olleilla WSI-skannereilla havaittiin eriaisteisia puutteita kudostunnistuksessa, skannattaessa paljon rasvaista kudosta sisältäviä näytelaseja sekä heikosti värjäytyneitä immunovärjättyjä näytelaseja. Testeissä huomattiin, että skannaukseen kuluvaan aikaan ja kudostunnistuksen onnistumiseen voitiin vaikuttaa suuresti asianmukaisilla skannausprofiileilla. Myös kudospalasten lukumäärällä todettiin olevan vaikutusta skannausaikaan ja skannauslaatuun.

Asiasanat: Digitaalinen patologia, WSI, WSI-skanneri, telepatologia

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Lassi Kinnunen & Tuomas Moilanen

Title of thesis: Comparing WSI-scanners and testing functionality with clinical samples.

Supervisors: Markku Yli-Pyky, Paula Reponen, Outi Mäkitalo

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2014

Number of pages: 44 + 5 appendices

WSI-scanner captures tissue sections on the slide field by field. Captured images are then combined into a digital slide which is a perfect copy of the original sample. Acquired digital slides can be reviewed with a special viewing software. Viewing software simulates microscope and allows magnification changing and navigation on the slide without limitations. Depending on the manufacturer WSI-scanners use different scanning techniques which causes the differences in scanner features and in scanning results.

The aim of this thesis was to compare different WSI-scanners and determine how they perform with clinical samples. The topic to this thesis was given to us by Oulu University Hospital department of pathology which is planning to convert part of their basic tissue analysis into digital analyzing. In digital format sending the histological samples is risk free and faster than sending the original slide. WSI-scanners are one of the key features in efficient telepathology.

For our test period the department of pathology acquired three WSI-scanners from different manufacturers. Features of the WSI-scanners were tested and compared using test slides that were gathered from the patient samples of the department of pathology. The tests were designed to match the requirements and intended use in department of pathology. Before every test period, which lasted for two weeks, scanners were introduced to the department staff.

As a result of this thesis numeric values were attained to compare performance between scanners and suitability to department of pathology. With the help of attained numeric values scanners were put in order based on scanning speed, file size and scanning errors.

During the test period the tests showed that the WSI-scanners were lacking performance in tissue detection when scanning immunostained samples and samples with a lot of fat tissue. Tests showed that the time spend on scanning and the performance of tissue detection can be greatly improved with the use of proper scanning profiles. Also the number of tissue sections on the test slide had an impact on scanning quality and time.

Keywords: Digital pathology, whole slide imaging, WSI-scanners, telepathology

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	DIGITAALINEN PATOLOGIA	7
2.1	Staattinen digitaalinen mikroskopia	7
2.2	Robottimikroskopia	8
2.3	WSI-skanneri.....	8
3	WSI-SKANNEREIDEN OMINAISUUDET	9
3.1	Erotuskyky ja suurennos	9
3.2	Numeerinen apertuuri ja syvyysterävyys	10
3.3	Skannaustekniikat	11
3.4	WSI-skannerin toiminta	12
4	TIEDOSTOJEN PAKKAAMINEN.....	14
4.1	Häviöllinen ja häviötön pakkaaminen	14
4.2	WSI-skannereissa käytetyt tiedostoformaatit.....	15
5	DIGITAALISTEN LASIEN TARKASTELU	18
5.1	Digitaalisten lasien katseluohjelmisto	18
5.2	Telepatologia.....	19
5.3	Digitaaliset lasit opetuskäytössä.....	20
6	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TYÖRYHMÄ	22
7	TYÖN TOTEUTUS	24
7.1	Käytettävät näytteet ja testaukseen valmistautuminen	24
7.2	WSI-skannereilla suoritettut testit	25
8	SKANNEREIDEN TOIMIVUUS JA SUORITUSKYKY	27
8.1	Skanneri A.....	27
8.2	Skanneri B.....	30
8.3	Skanneri C.....	33
8.4	Yhteenvedo skannereiden toimivuudesta	36
9	POHDINTA	40
	LÄHTEET	42
	LIITTEET	45

1 JOHDANTO

Histologisten näytteiden tarkastelu on tapahtunut viimeisen vuosisadan ajan perinteistä valomikroskopiaa käyttäen. Nykypäivänä sairaaloissa ollaan siirtymässä laajemmin digitaalisen kuvantamisen aikaan, esimerkiksi radiologiassa digitaalinen kuvaus on ollut arkipäivää jo useamman vuoden ajan. Viime vuosien tekninen kehitys kameroiden ja mikroskooppien alueella on mahdollistanut histologisten näytteiden digitalisoinnin. (Pantanowitz ym. 2013, 1710). Laittevalmistajat ovat ryhtyneet kehittämään myös kliiniseen käyttöön soveltuvia WSI-skannereita (Whole slide imaging.) WSI-skanneri skannaa näytelasilla olevat histologiset näytteet ja muuntaa ne digitaaliseen muotoon. Digitaalisessa muodossa näytelaseja voidaan tarkastella tietokoneen monitorilta aivan kuin mikroskoopilla katseltaessa.

Oulun yliopistollisen sairaalan (OYS) patologian osasto suunnittelee WSI-skannereiden käyttöönottoa osaksi osaston kliinistä toimintaa. Patologian osasto on hankkinut koekäyttöön eri laitevalmistajien WSI-skannereita. OYS:n patologian osaston lopullisena tavoitteena on ensimmäisenä Suomessa siirtää suurin osa histologisten näytteiden tarkastelusta digitaaliseen muotoon. Opinnäytetyömme tehtävänä on koekäyttää ja selvittää eri WSI-skannereiden ominaisuuksia sekä vertailla laitteiden toimivuutta keskenään. Lisäksi opinnäytetyössä tuodaan esille WSI-skannereiden mahdollinen vaikutus histologisen näytteen valmistus- ja tarkasteluprosessiin. Yhdessä patologian osaston apulaisosastonhoitajan kanssa annamme puolueetonta tietoa skannereiden toiminnasta. Opinnäytetyömme rinnalla kulkee patologian osaston patologioiden suorittama vertailu skannerien tuottamien kuvien laadusta.

Histologisten näytelasien siirtäminen digitaaliseen muotoon mahdollistaa tehokkaan telepatologian. Yksittäisen kuvan sijaan voidaan koko näytelasi lähettää digitaalisena kopiona, jota käyttäjä voi tarkastella monitorilta samalla tavalla kuin mikroskoopilla katseltaessa. Digitaalisten näytelasien lähettäminen on riskitöntä ja pitkillä välimatkoilla huomattavasti nopeampaa sekä kustannustehokkaampaa kuin alkuperäisten lasien lähettäminen. Parhaimmillaan digitaalisten näytelasien tarkastelu etäkohteessa voi tapahtua pelkästään internetyhteyden avulla, jolloin lähettämistä ei tarvita. Prosessi nopeuttaa konsultaatiota ja säästää resursseja. (Webster & Dunstan 2014, 215.)

2 DIGITAALINEN PATOLOGIA

Laajassa käytössä on kolmea erilaista digitaalisen mikroskopian muotoa, joilla jokaisella on erilaiset hyöty- ja haittapuolensa. Staattinen digitaalinen mikroskopia on näistä kolmesta vanhin, helpokäyttöisin ja eniten käytössä oleva digitaalisen mikroskopian muoto. Digitaalinen robottimikroskopia on mekaanisilta ominaisuuksiltaan kaikista monimutkaisin, ja soveltuu kaikista parhaiten telepatologian käyttöön esimerkiksi jääleikkeiden ja sytologisten näytteiden tarkastelussa. Kolmas digitaalisen patologian muoto on WSI-skannaus, jossa koko näytelasi kuvataan ja muutetaan WSI-tiedostoksi. Kaikissa digitaalisen mikroskopian muodoissa on yhteneväisiä ominaisuuksia. WSI-skannerilla voidaan ottaa myös staattisia kuvia, ja useissa laitteissa on yhdistettynä WSI-ominaisuus sekä digitaalinen robottimikroskopia. (Clayton ym. 2012, 1.)

2.1 Staattinen digitaalinen mikroskopia

Staattisella digitaalisella mikroskopiolla tarkoitetaan kykyä luoda liikkumaton digitaalinen kuva, eikä se eroa perinteisestä tavasta ottaa valokuvia kudoksessa esiintyvistä kiinnostavista kohdista. Alueilla, joilla ei ole resursseja WSI-skannereiden tapaisille järjestelmille on staattinen digitaalinen mikroskopia edullinen vaihtoehto. Staattisen digitaalisen mikroskopian avulla voidaan vaikuttaa positiivisesti potilaan hoitoon ilman kalliiden järjestelmien hankkimista. Järjestelmän hankkiminen ja ylläpidon kustannukset ovat myös edullisia verrattuna muihin digitaalisen mikroskopian tyypeihin. Järjestelmän etuna ovat myös sen helppokäyttöisyys ja pienet tiedostokoot. Pieniä tiedostokokoja on helppo ja nopea lähettää eteenpäin. (Park, Pantanowitz & Parwani 2012, 577–578.)

Staattinen digitaalinen kuva vastaa vain yhtä näkökenttää yhdellä suurennoksella ja kuvan laatu riippuu kuvan ottaneesta henkilöstä. Vaikka staattinen digitaalinen mikroskopia on sopiva käytettäväksi yksinkertaisissa tapauksissa, ei sitä suositella käytettäväksi pääasiallisen diagnoosin, konsultaation tai kuva-analyysin saavuttamiseksi, kun koko leikkeen tarkastelu on lopputuloksen kannalta tärkeää. (Pantanowitz 2010, 3.)

2.2 Robottimikroskopia

Robotisoidussa digitaalisessa mikroskopiassa robottimikroskooppiin on liitetty kamera, jota voidaan ohjata toiselta tietokoneelta. Alun perin robottimikroskopia kehitettiin telepatologian työkaluksi. Robottimikroskoopit ovat lähes aina integroitu WSI-skanneriin, tehden niistä hybridijärjestelmiä mahdollistaen näin niiden käytön sekä suorissa yhteyksissä että leikkeiden tarkastelussa monitorilta. (Park ym. 2012, 578–579.)

Laitteiden käyttöönottoon liittyy useita tietoliikennevaatimuksia, jotka tulee ottaa huomioon järjestelmiä suunnitellessa. Korkealaatuisen videon lähettäminen reaaliajassa robottimikroskoopilla vaatii nopeita internetyhteyksiä. Ongelmia tuovat myös palomuurit, jotka voivat estää robottimikroskoopin ohjaamiseen tarkoitettuja signaaleja. Lisäksi useimmat telepatologian mahdollistavat laitteet käyttävät kolmannen osapuolen ohjelmistoja, mikä lisää entisestään viivettä käyttäjien välillä. (Park ym. 2012, 578–579.)

Digitaalisen robottimikroskopian etuihin kuuluu mahdollisuus tarkastella koko leike käyttäjän haluamassa järjestyksessä. Suuri etu on myös jatkuva tarkennuksen hallitseminen, esimerkiksi pak-suissa sytologisissa näytteissä, joissa täytyy tarkentaa eri solukerroksiin. (Thrall ym. 2014, 2.) Mikroskoopin käyttönopeus on hyvä, mutta ei välitön johtuen mahdollisesta viiveestä internet- tai verkko-yhteydessä. Tarkastellut alueet voidaan lisäksi jäljittää. Haittapuoliin lukeutuu kalliit kustannukset, jotka johtuvat laitteista, tarvittavista teleliikenneyhteyksistä ja tarpeesta huoltaa sekä ylläpitää myös vanhempaa teknologiaa. Yhteyksissä olevat osapuolet tarvitsevat yhteensopivat ohjelmistot, sillä eri valmistajien ohjelmistot ja laitteet eivät välttämättä toimi toistensa kanssa. (Park ym. 2012, 578–579.)

2.3 WSI-skanneri

WSI-skanneri on käytännössä automaattinen robottimikroskooppi, johon on liitetty kehittynyt ja tarkka kamera. Laitteen tarkoitus on kuvata koko näytelasin sisältämä kudosalue objektiivin läpi näkökenttä kerrallaan ja muuntaa skannattu kudos digitaaliseen muotoon. Syntynyt digitaalinen kopio on täydellinen digitalisointi alkuperäisestä näytelasista. Digitaalista lasia tarkastellaan riittävän tarkalla monitorilla ja erityisellä kuvankatseluohjelmistolla. Kuvankatseluohjelmalla digitaalinen lasi käyttäytyy kuin mikroskoopilla katsoessa, eli suurennosta voi vaihtaa vapaasti ja näytelasilla pystyy liikkumaan ilman rajoituksia. (Thrall ym. 2014, 3.)

3 WSI-SKANNEREIDEN OMINAISUUDET

3.1 Erotuskyky ja suurennos

Erotuskyky (resoluutio) tarkoittaa pienintä välimatkaa, jolla kaksi erillistä kohdetta voidaan erottaa toisistaan. Esimerkiksi mikroskooppijärjestelmä, jonka erotuskyky on yksi mikrometri (μm), pystyy erottamaan toisistaan kohteet, joiden keskinäinen etäisyys on yhden mikrometrin. Saman erotuskyvyn omaavalla mikroskoopilla pystytään havaitsemaan korkeintaan yhden mikrometrin kokoisia rakenteita. Jos kahden kohteen välinen etäisyys on alle yhden mikrometrin, esimerkin mikroskooppijärjestelmän erotuskyky ylittyy ja kohteet sulautuvat yksittäiseksi kohteeksi. Perinteisen valomikroskoopin erotuskyky perustuu käytettävän valon aallonpituuden lisäksi pelkästään objektiivin linsin ominaisuuksiin. (Sellaro ym. 2013, 22.)

WSI-skannereiden erotuskykyyn vaikuttavat valitun objektiivin ominaisuuksien lisäksi WSI-skannerin kameran tarkkuus sekä skannauksessa käytettävä suurennos. (Sellaro ym. 2013, 23) Kameran erotuskyky perustuu sen kuvapisteiden kokoon ja lukumäärään. Digitaalisen järjestelmän erotuskykyä on mahdollista parantaa suurennoksen avulla. Suurentamalla skannattava alue näytelasilta, saadaan kameran sisältämät pikselit eli kuvapistet levittäytymään pienemmälle alueelle skannattavaa näytettä. Tämä parantaa erotuskykyä, sillä vaikka kuvapisteiden määrä ei muutu, ne sijoittuvat kudoksesta katsoen tiuhempaan. (Yagi & Gilbertson 2005, 221.) Esimerkiksi kameralla, jonka yksittäisen kuvapisteen koko on $10 \mu\text{m}$, ei voida erottaa näytteestä yhden mikrometrin kokoisia yksityiskohtia ilman lisäsuurennosta. Käyttämällä 20x lisäsuurennosta kameran kuvapistet sijoittuvat pienemmälle alueelle ja yhden mikrometrin kokoiset yksityiskohdat näkyvät nyt kameralle $20 \mu\text{m}$ kokoisina. Suurennoksen ansiosta $10 \mu\text{m}$ kamera pystyy nyt tallentamaan yksityiskohdat tarkasti erillisinä kohteina. (Sellaro ym. 2013, 23–24.) Objektiivin ja kameran tarkkuuden tulee olla yhtenevät. Huonon erotuskyvyn omaava objektiivi heikentää tarkan kameran kuvanlaatua, sillä kamera ei pysty kompensoimaan objektiivin puutteita erotuskyvyssä. Laadultaan heikompi kamera puolestaan ei pysty hyödyntämään objektiivin tarjoamaa erotuskykyä, mutta tämä ei huononna kuvanlaatua vaan ainoastaan hidastaa skannausta ja kasvattaa syntyvän tiedoston kokoa. (Yagi & Gilbertson 2005, 225.) Onnistuneen skannauksen jälkeen lisäsuurennosta ei skannerissa enää tarvita vaan katselukelpoisen suurennoksen tuottaminen tapahtuu tietokoneen monitorilla. (Sellaro ym. 2013, 23).

Perinteisessä valomikroskoopissa okulaarit antavat näytelasia tarkasteltaessa 10x lisäsuurenoksen. Tämä suurennos tekee näytelasien tarkastelusta mielekkäämpää ja käytännöllisempää. Tietokoneen monitori toimii digitaalisten lasien katselussa okulaarin tavoin: se lisää suurennosta, muttei vaikuta erotuskykyyn. (Sellaro ym. 2013, 23–24.) Monitorin yksittäisten kuvapisteiden koko ja niiden tiheys määrittävät miten suuren suurennoksen monitori antaa digitaaliselle lasille. Kuvapisteiden tiheys on yhteydessä kuvapisteiden kokoon: jos kuvapisteiden määrä pysyy vakiona, mutta monitorin koko kasvaa, täytyy myös yksittäisten kuvapisteiden koon suurentua. Isokokoisemmat kuvapisteteet siis voimistavat suurennosta ja pienet kuvapisteteet heikentävät suurennoksen voimakkuutta. (Park Ym. 2012, 560–561.) Monitorista aiheutuvaan suurennokseen vaikuttaa myös katseletäisyys monitorista. Kauempaa katsottuna kuva monitorilla näyttää pienemmältä ja läheltä katsottuna suurennos vaikuttaa voimakkaammalta. (Sellaro ym. 2013, 23–24.)

3.2 Numeerinen apertuuri ja syvyysterävyys

Numeerinen apertuuri (NA) on objektiivin lukuisiin ominaisuuksiin vaikuttava arvo. Se kuvaa kulmaa, jossa kohteesta lähtevä valo päätyy objektiivin linssiin. Mitä suurempi NA-arvo on, sitä enemmän valoa pääsee objektiiviin. Numeerinen apertuurin arvoon vaikuttaa lisäksi objektilasin ja linssin välissä olevan aineen taitekerroin (n). Kuivaobjektiivien väliaineena toimii ilma ($n=1$). Tästä syystä kuivaobjektiivien NA-arvo on aina alle yhden. Väliaineena voidaan käyttää myös öljyä ($n=1.5$), joka mahdollistaa objektiivin NA-arvon nousemisen noin 1.4 asti. (Niemi 12.5.2004.) Objektiivin kuvankorjaukset vaikuttavat myös osaltaan NA-arvoon. Laadukkaat taso- ja värikorjauksia sisältävät objektiivit tuottavat korkeamman NA-arvon halvempiin objektiiveihin verrattuna. (Molecular expressions 2004a, viitattu 31.3.2014.)

Korkea NA-arvo parantaa objektiiviin erotuskykyä, sillä sen seurauksena objektiiviin pääsevien valosäteiden määrä kasvaa. Haittavaikutuksena korkea NA-arvo heikentää syvyysterävyyttä, erityisesti suuren suurennoksen kanssa. (Turun Yliopisto 2013, viitattu 31.3.2014.) Syvyysterävyys tarkoittaa tarkan näkökentän laajuutta z-akselilla. Esimerkiksi paksua solunäytettä tarkasteltaessa heikon syvyysterävyuden antavalla objektiivilla voidaan kerralla tarkentaa vain yhteen soluun tai solukerrokseen. (Molecular expressions 2004b, viitattu 31.3.2014.) Tämä aiheuttaa ongelmia WSI-skannereilla, sillä syvyysterävyuden heikentyessä tarkennuksen täytyy tapahtua täysin virheettömästi z-askelin suhteen. WSI-skannerit hyötyvät tiettyyn pisteeseen asti korkean NA-arvon tuomasta erotuskyvystä, joten WSI-skannereissa käytettävät objektiivit ovat kompromisseja syvyysterävyuden ja erotuskyvyn välillä. (Massachusetts Institute of Technology 2004, viitattu 31.3.2014.)

3.3 Skannaustekniikat

WSI-skannerit toimivat parhaiten tavanomaisilla kolmen tai neljän mikrometrin paksuisilla kudon näytteillä. Vaikka kudon näytteet on leikattu mikrotomilla tasaisiksi, kudon itsessään ei ole täysin tasainen. WSI-skannerin täytyy pystyä tarkentamaan kameraa z-akselin suhteen, jotta kudoksen epätasaisuus ei aiheuta tarkennusvirheitä skannauksen aikana. Mekaanisesti tarkennus tapahtuu skannerista riippuen siirtelemällä näytealustaa tai objektiivia. Z-akselin onnistunut tarkentaminen on lopputulosta ajatellen tärkeimpiä vaiheita skannausprosessissa. (Montalto, McKay & Filkins 2011, 3.)

Näytelasin skannaamiseen on käytössä kaksi erilaista lähestymistapaa: laatta- ja viivaskannaus. WSI-skannerin käyttämä skannaustekniikka vaikuttaa osaltaan myös automaattisen tarkennuksen toteuttamiseen sekä skannerin suorituskykyyn erilaisilla kudon näytteillä. (John Hopkins Medicine 2013, viitattu 20.2.2014.)

Viiva-skannausta käyttävissä skannereissa kamera on kapean suorakulmion muotoinen. Kameran muodosta johtuen näytelasilla oleva kudon skannataan ohuina pystysuorina viivoina. Skannauksen aikana tapahtuva z-akselin tarkennus tapahtuu ennalta aseteltujen tarkennuspisteiden avulla, jotka skanneri asettaa lasilla olevan kudospalan pinnan muotojen perusteella. Tätä tarkennusmenetelmää kutsutaan tarkennuskartaksi. (John Hopkins Medicine 2013, viitattu 20.2.2014.) Tarkennuskartan avulla laite laskee oletetun korkeuseron vaihtelun kahden tarkennuspisteen välillä, joten vierekkäisten viivojen korkeus z-akselilla voi vaihdella. Automaattisesti aseteltavien tarkennuspisteiden määrä vaihtelee näytteittäin, mutta niitä on myös mahdollista lisätä näytteeseen manuaalisesti. Tarkennuspisteiden määrän lisääntyminen johtaa skannausajan pitenemiseen, mutta toisaalta se voi parantaa digitaalisen lasin laatua, erityisesti, jos automaattisesti asetellut tarkennuspisteet ovat epäedullisissa kohdissa. Tarkennuskartta toimii erityisen hyvin viiva-skannereissa, sillä viivat ovat ohuita eivätkä korkeuserot vierekkäisten viivojen välillä ehdi kasvaa liian suuriksi. (Montalto, McKay & Filkins 2011, 3–4.)

Laatta-skannaukseen perustuvissa skannereissa näytelasilla oleva kudon jaetaan neliönmuotoisiksi "laatoiksi", jotka skannataan yksitellen. Näissä skannereissa kamera on muodoltaan neliö, jonka näkökenttä on yksi "laatta". Näytelasin tarkentaminen z-akselilla tapahtuu yleensä valitsemalla joka n:s laatta (n=2, n=3, n=4...) jolle asetetaan tarkennuspiste tai vaihtoehtoisesti niin, että

jokaiselle yksittäiselle laatalle asetetaan tarkennuspiste. Jokaiselle laatalle asetettavalla tarkennuksella saadaan parempi lopputulos, mutta skannauksen kesto pitenee huomattavasti. (John Hopkins Medicine 2013, viitattu 20.2.2014.) Tästä syystä laattaskannausta käyttävät laitteet tarkentavat yleensä joka neljänteen tai viidenteen laattaan, koska tällä asetuksella saavutetaan järkevä kompromissi laadun ja skannauksen keston välillä. Myös laatta-skannauksessa voidaan käyttää tarkennuskarttaa, mutta laattojen koko on suurempi verrattuna viivoihin, jolloin näytteen epätasaisuus voi muuttua merkittävästi kahden laatan välillä. Tämä voi johtaa epätarkkaan skannaustulokseen tai laattojen rajojen ilmentymiseen digitaalisella lasilla. (Montalto, McKay & Filkins 2011, 3-4.)

3.4 WSI-skannerin toiminta

WSI-skannerilla skannattavat näytelasit valmistetaan samalla tavalla kuin näytelasit jotka tarkastellaan valomikroskoopilla. Ne ovat valmiiksi värjättyjä ja näytelasien päälle on aseteltu peitinlasi. (Park ym. 2012, 570.) Nykyaikaiset skannerit ovat varustettu näytelasikelkoilla, joista ne pystyvät automaattisesti ottamaan ja vaihtamaan näytelaseja. Näytelasikelkkojen kapasiteetti on laitteista riippuen jopa useita satoja laseja. Suuri kapasiteetti mahdollistaa skannerin itsenäisen toiminnan pitkiksi ajanjaksoiksi ilman jatkuvaa valvontaa. (John Hopkins Medicine 2013, viitattu 20.2.2014.) Ennen näytelasin skannaamista on tärkeä valita skannaustarkoitukseen sopiva objektiivi, jolla näytelasi skannataan. Objektiivin koko ja ominaisuudet määräävät suurilta osin skannauksen erotuskyvyn ja suurennoksen. Yleisimpiä käytettyjä objektiiveja ovat mikroskoopeista tutut 20x ja 40x jotka antavat lähes vastaavat suurennokset syntyville digitaalisille laseille. WSI-skannereiden objektiiveissa on kuitenkin huomattavia laadullisia eroja, eivätkä ne ole suoraan vertailtavissa keskenään. Esimerkiksi korkean NA-arvon omaavan 20x-objektiin erotuskyky ja digitaalisen lasin lopullinen suurennus voivat olla saman suuruiset kuin toisen laitevalmistajan 40x-objektilla saavutetut skannaustulokset. Osa laitevalmistajista käyttää myös samaa objektia 20x- ja 40x-skannauksilla, mutta hyödyntää lisäsuurennosta erotuskyvyn ja parantamiseksi. Objektiivia valittaessa on tärkeää huomioida, että valitun objektiivin erotuskyky määrittää suurimman mahdollisen suurennoksen, jolla digitaalista lasia on järkevää tarkastella. Tarkemmalla objektiivilla skannaaminen on myös hitaampaa ja syntyvät tiedostokoot suurempia. (Montalto, McKay & Filkins 2011, 3.)

Skanneri aloittaa toimintansa siirtämällä näytelasin näytekelkasta skannausalustalle. Alustalla skanneri ottaa näytelasista esikatselukuvan ja suorittaa kudostunnistuksen taustan ja kudoksen

kontrastieron perusteella. Esikatselukuvassa näkyy myös näytelasin tunnistetiedot. Kudostunnistuksen jälkeen skanneri lisää havaittuun kudokseen tarkennuspisteitä käyttäjän tai skannausprofiilin määrittelemän tarkennusstrategian mukaan. (John Hopkins Medicine 2013, viitattu 20.2.2014.)

Tarkennuspisteiden asettamisen jälkeen skanneri aloittaa näytelasin skannauksen. Skannerista riippuen tämä tapahtuu joko laatta- tai viivaskannauksella. Skannauksen aikana tarkennuspisteet varmistavat, että kamera pysyy kohdistettuna kudokseen z-akselin suhteen. Jos kamera ei kohdistu kunnolla z-akselin suhteen, syntyvä digitaalinen lasi on epätarkka. Kuvamateriaali näytelasilla olevasta kudoksesta syntyy ohuiden viivojen tai pienten laattojen muodossa, joten skanneri joutuu yhdistämään syntyvän kuvamateriaalin yhtenäiseksi tiedostoksi. Skannereista riippuen tämä tapahtuu joko jatkuvasti skannauksen aikana tai vasta skannauksen loputtua. Onnistuneessa skannauksessa lopputuloksena on saumattomasti yhteen liitetty täydellinen digitaalinen kopio alkupe- räisestä näytelasista. Skannauksen lopuksi syntynyt tiedosto pakataan automaattisesti ennalta va- litulla pakkausmenetelmällä, joka pienentää tiedostokokoa huomattavasti. (Park Ym. 2012, 570–571.)

4 TIEDOSTOJEN PAKKAAMINEN

Digitaaliset kuvatiedostot ovat kooltaan suuria. Tiedoston pakkaamisen tarkoituksena on vähentää kuvan esittämiseen tarvittavaa tietomäärää tallennus- tai tiedonsiirtokapasiteetin säästämiseksi. (Oulun yliopisto 2013, viitattu 26.3.2014.) Tiedoston pakkaaminen säästää tilaa ja helpottaa tiedoston lähettämistä, mutta samalla hidastaa ja viivästyttää tiedoston avaamista, koska se pitää avata pakatusta muodosta. Pakkausmenetelmät voivat myös vaikuttaa tiedoston laatuun. (JISC Digital Media 2009, viitattu 26.3.2014.)

4.1 Häviöllinen ja häviötön pakkaaminen

Tiedostojen pakkaamiseen on kaksi lähestymistapaa: tarpeettoman tai tiedoston kannalta epäoleellisen tiedon hävittäminen tiedostossa. Tarpeettoman tiedon hävittämistä käytetään usein häviöttömässä pakkauksessa. Virheettömiä tiedostopakkausmenetelmiä käytettäessä kuva voidaan palauttaa alkuperäiseksi. Häviöttömiä menetelmiä tarvitaan esimerkiksi lääketieteen kuvantamisessa tai oikeudellisten asiakirjojen säilyttämisessä, joissa kuvan tulee säilyä täysin muuttumattomana. Tällöin häviöllisiä menetelmiä ei voida käyttää. (Oulun yliopisto 2013, viitattu 26.3.2014.) Häviöttömässä pakkauksessa etsitään "toistoja". Esimerkiksi, jos pakattavassa tiedossa on 25 samaa arvoa peräkkäin, voidaan ensimmäinen arvo tallentaa ja toistaa se 24 kertaa sen sijaan, että jokainen 25 arvoa tallennettaisiin omana arvonaan. (JISC Digital Media 2009, viitattu 26.3.2014.)

Epäoleellisen tiedon hävittämisellä pyritään pääsemään eroon tiedosta, jolla ei ole lopullisen tuloksen kannalta merkitystä. Epäoleellinen tieto hävitetään ennen pakkausta, joten tämä aiheuttaa peruuttamattoman häviöllisen pakkauksen ja tiedoston muuttumisen. Esimerkiksi videon väri-informaatiota voidaan yksinkertaistaa niin, että ihmissilmällä havaittavaa eroa ei synny. Liiallinen kompressointi vaikuttaa laatuun ja tulee helposti havaittavaksi. (JISC Digital Media 2009, viitattu 26.3.2014.)

Häviöttömässä pakkauksessa pyritään vähentämään redundanssia eli toiston ylimäärää. Redundanssi keskittyy tyypillisesti tehokkaiisiin tiedon pakkausmenetelmiin niin, että tietoa ei menetetä lopullisesti kompressoinnin aikana. Redundanssille tyypillisiä piirteitä ovat suuret merkkijonot. (JISC Digital Media 2009, viitattu 26.3.2014.)

Häviöllinen pakkausmenetelmä perustuu epäoleellisen tiedon hävittämisen tekniikoihin, mutta käyttää myös joitain tarpeettoman tiedon hävittämisessä käytettäviä tekniikoita. Häviöllinen kompressointi yksinkertaistaa ja muokkaa tietoa niin, että pakattu tiedosto on verrattain pienempi kuin häviöttömällä tekniikalla pakattu. Tyypillinen häviötön tiedosto voi olla tehokkaasti pakattuna jopa puolet pienempi kuin alkuperäinen tiedosto, kun taas häviöllisellä kompressoinnilla voidaan päästä tiedostoon, jonka koko on alle 10 % alkuperäisestä koosta. Liian tehokas pakkaus vääristää tiedoston sisältöä liikaa. Häviöllisen pakkauksen huonona puolena on sen ominaisuus hävittää tietoa pysyvästi, joten pakkauksella menetettyä tietoa ei voida palauttaa. (JISC Digital Media 2009, viitattu 26.3.2014.)

4.2 WSI-skannereissa käytetyt tiedostoformaattit

Rakenteeltaan digitaalisen lasin eli WSI-tiedoston voidaan ajatella olevan ”kuvapyramidi,” jossa suurimmalla suurennoksella otetut korkearesoluutioiset kuvat ovat pyramidin pohjalla. Pyramidia ylöspäin noustaessa kuvien suurennos ja resoluutio pienenee ja ”huipulla” on matala resoluutioinen esikatselukuva koko näytelasista. Pyramidissa on ennalta lasketut tarkennustasot, joille kuvat asetuvat suurennoksen perusteella. Tämä nopeuttaa suurennoksien vaihtelua, kun digitaalista lasia tarkastellaan katseluohjelmistolla. (Singh, Chubb, Pantanowitz & Parwani 2011, 2.)

WSI-tiedostot ovat todella suuria, erityisesti ilman pakkausta. Epävirallinen standardi WSI-tiedostojen kokoa tai skannereiden nopeutta vertailtaessa on käyttää 15mm x 15mm kokoista kudosaluetta. 0,5 µm erotuskyvyllä skannattava 15mm x 15mm kudosalue luo WSI-tiedoston, jonka koko on pakkaamattomana 2,51 gigatavua (GB). Saman kokoinen kudosalue tuottaa 0,25 µm erotuskyvyllä skannattuna 10,1 gigatavun (GB) kokoisen tiedoston ilman pakkausta. Pakattuna 20:1 suhteella 0,5 µm erotuskyvyllä skannattu WSI-tiedosto on kooltaan vain 128Megatavua (MB) ja 0,25 µm erotuskyvyllä skannatun WSI-tiedoston koko on 502 Megatavua (MB). Nykyaikaiset pakkausalgoritmit mahdollistavat taloudellisen ja nopean pakkauksen ilman kuvanlaadun ja tarkastelun luotettavuuden heikkenemistä. (John Hopkins Medicine 2013, viitattu 20.2.2014.)

TIFF

TIFF (Tagged image file format) on häviöllistä tai häviämätöntä pakkausta käyttävä Adobe Systems:n kehittämä formaatti. TIFF on suunniteltu standardiformaatiksi korkealaatuisille värikuville

usealle alustalle. TIFF:n kyky on tallentaa useita kuvia samaan tiedostoon joko rasteri- tai vektorikuvina. Rasterikuvat on yleisin kuvatyyppe. Rasterikuvassa kuva muodostuu pikseleistä muodostuneesta ruudukosta, jossa jokainen pikseli kuvaa yhtä väriä kuvassa. Vektorikuvat ovat muodostuneet poluista yksittäisten pikselien sijaan. Poluilla voidaan kuvata linjoja ja muotoja kuvassa. Vektorikuvien tallentaessa tietoa poluiksi niitä voidaan suurentaa ilman, että kuvan laatu heikkenee. (Fileinfo 2014b, viitattu 26.3.2014.) TIFF -formaattia käytetään lähes yksinomaan häviöttömänä pakkausmenetelmänä, joka ei käytä kompressointia lainkaan. Häviöttömän pakkauksen seurauksena tiedostot ovat kooltaan hyvin suuria. TIFF-formaatin kanssa käytetään yleisesti muita tehokkaampia pakkausmenetelmiä. Kuvien manipuloinnissa ja editoimisessa TIFF -formaatin käyttö on suositeltavaa, koska se on häviötön ennen lopullista tallennusta. (Wake forest university 2014, viitattu 25.3.2014.)

JPEG

JPEG on Joint Photographic Experts Group:n standardisoima häviöllistä pakkausta käyttävä tallennusformaatti, joka on suunniteltu digitaalisten kuvien tehokkaaseen pakkaamiseen. Tiedoston pakkaaminen JPEG:llä hävittää väri-informaatiota, jota ihmissilmällä on vaikea havaita. Pakkauksen voimakkuus on hallittavissa, mutta liian suurilla pakkaussuhteilla käytettäessä kuvanlaatu heikkenee. (Fileinfo 2014a, viitattu 26.3.2014)

Wavelet-muunnos ja JPEG2000

Wavelet -pakkauksella pystytään sekä häviölliseen, että häviöttömään pakkaamiseen. Häviöllisellä wavelet -pakkauksella voidaan kuvasta säilyttää tärkeitä alueita ja yksinkertaistaa vähemmän kiinnostavia alueita. Pakkausmenetelmä toimii kerralla isommalla alueella kuvassa, usein koko kuvassa, joten pakkauksesta johtuvia artefakteja syntyy vähemmän. Wavelet -pakkauksella kuvasta saadaan yksinkertaistettu versio, jossa on mukana tarvittava tieto alkuperäisen kuvan muodostamiseen. Tässä vaiheessa kuva voidaan pakata häviöttömästi tai vaihtoehtoisesti lopullinen kuva voi perustua yksinkertaistetulle versiolle vain välttämättömien tietojen kanssa. Yksinkertaistettua kuvaa käyttämällä saadaan paljon pienempi tiedostokoko, mutta haittana on tietojen häviäminen, kuten häviöllisessä pakkauksessa. (JISC Digital Media 2009, viitattu 26.3.2014.)

JPEG2000 on uusi standardi kuvan pakkaamiseen ja tallentamiseen sekä mahdollinen JPEG:n korvaaja. JPEG2000 käyttää wavelet-muunnosta kuvien pakkaamiseen, joka mahdollistaa

JPEG2000:n edistyneemmät ominaisuudet. Wavelet -pakkauksen vuoksi tiedostot ovat vanhaa JPEG -pakkausta 20–30 prosenttia pienemmät. JPEG2000 -tiedostoissa on kuvasta tietoa monilla eri tarkkuuksilla. (Kahrama 2001, 47.)

DICOM

DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) on kansainvälinen standardi lääketieteellisille kuville ja kuviin liitettävälle informaatiolle. Se määrittelee erilaiset tiedostoformaatit lääketieteellisille kuville sekä varmistaa formaattien kliiniseen käyttöön vaadittavan laadun. DICOM on maailmanlaajuisesti levinnyt terveydenhuollon viestivälinestandardi. (Digital Imaging and Communications in Medicine 2014, viitattu 25.3.2014.) DICOM:a käytetään laajalti lääketieteellisen kuvien, kuten röntgenkuvien katseluun ja arkistointiin. DICOM tiedostot voivat sisältää potilastietoja, joten niitä voidaan käyttää yhdistämään lääketieteelliset kuvat hoidettavaan asiakkaaseen. (Fileinfo 2014c, viitattu 26.3.2014)

5 DIGITAALISTEN LASIEN TARKASTELU

WSI-tiedostoille ei ole olemassa standardoitua tiedostoformaattia, vaan skannerin tuottama tiedostoformaatti riippuu laitevalmistajasta. Pohjimmiltaan eri laitevalmistajien skannereiden tuottamat WSI-tiedostot ovat samanlaisia, mutta pakkauksen yhteydessä ne koodataan valmistajien omilla formaateilla, jotka estävät niiden avaamisen muiden valmistajien katseluohjelmilla. Suunnitteilla on DICOM tai JPEG2000 formaatin käyttöönotto yhtenäiseksi tiedostomuodoksi, mutta laitevalmistajat eivät halua luopua omista tiedostoformaateistaan. (Tuominen & Isola 2009, 455.)

Digitaalisten lasien tarkastelu tietokoneelta edellyttää, että koneelle on asennettu siihen suunniteltu katseluohjelmisto. Nämä katseluohjelmistot voivat olla selainpohjaisia, mutta vaativat silti erillisen ohjelmiston asennuksen. Eräät yritykset ja instituutit tosin tarjoavat mahdollisuuden tarkastella digitaalisia laseja omilta palvelimiltaan tavallisen internet-selaimen avulla. (Webster & Dunstan 2014, 213.)

5.1 Digitaalisten lasien katseluohjelmisto

Kaikki digitaalisten lasien katseluohjelmat pyrkivät jäljittelemään normaalin mikroskoopin toimintaa. Niillä on mahdollista vaihdella suurennoksia, liikuttaa näkökenttää sekä ottaa kuvia halutusta näkökentästä. Useat katseluohjelmistot sisältävät ominaisuuksia, jotka helpottavat näytelasin tarkastelua. Näistä tärkeimpiä ovat esikatselukuva näytelasista, mittaus- ja rajausvälineet sekä mahdollisuus tarkastella kahta tai useampaa digitaalista lasia rinnakkain samalta monitorilta. (Webster & Dunstan 2014, 213.)

Esikatselukuvaa hyödyntäen saadaan näytelasista kokonaiskuva, joka näyttää katseltavan näkökentän sijainnin näytelasilta. Esikatselukuvan avulla siirtyminen halutulle alueelle näytelasilla onnistuu todella nopeasti ja tarkasti. (Webster & Dunstan 2014, 213.) Mittausvälineillä näytelasista voidaan mitata erilaisten kudusrakenteiden kokoa perinteisen viivaimen avulla tai antaa tietokoneen suorittaa laskutoimitukset. Rajausvälineillä pystytään rajaamaan kiinnostavia alueita ja kohteita näytelasilta, sekä nimeämään ne. Rajattuja alueita on myös mahdollista tarkastella erillisessä ikkunassa isommalla suurennoksella. (Isse, Lesniak, Grama, Roysam, Minervini & Demetris 2012, 6.)

Usean digitaalisen lasin rinnakkainen katselu mahdollistaa reaaliaikaisen vertailun eri värjäysten tai eri syvyyskerroksista otettujen näytteiden kesken. Katseluohjelmistoilla pystytään synkronoimaan rinnakkaiset näytelasit eli ensimmäisen lasin näkökenttää siirrettäessä tai suurennosta vaihdettaessa, tapahtuu sama muutos myös rinnakkain avatuissa digitaalisissa laseissa. (Webster & Dunstan 2014, 213.)

Kehittyneimmät katseluohjelmistot mahdollistavat tietokoneavusteisen digitaalisten lasien analysoinnin. Analysointi tapahtuu katseluohjelmaan liitetyillä makrotoiminnoilla. Makrot ovat sarja esikirjoitettuja toimintoja, jotka katseluohjelmiston käyttäjä aktivoi yhdellä napin painalluksella. Ne suorittavat käyttäjän ennalta valittujen kriteerien pohjalta, esimerkiksi solulaskentaa digitaalisen lasin halutuista alueista. Automaattinen solulaskenta perustuu yksittäisten kuvapisteidien värjäytymiseen, sekä värjäyksen voimakkuuteen. Ohjelmistossa on valmiina oletusasetuksia, joiden avulla määritellään miten solulaskenta tapahtuu. Tietokoneavusteista solulaskentaa voidaan käyttää hyödyksi erityisesti immunovärjäyksissä, joissa positiivisesti ja negatiivisesti värjäytyneiden solujen erottelu silmämääräisesti on työlästä ja tarkan vastauksen saaminen hidasta. Katseluohjelmille on saatavilla myös monimutkaisempia makroja, jotka pystyvät tunnistamaan tumien morfologiaa ja jakamaan solut eri luokkiin sen perusteella. (Isse ym. 2012, 5.)

5.2 Telepatologia

Telepatologia on yleistynyt patologian muoto erityisesti valtioissa, joissa välimatkat ovat pitkiä. Sen avulla voidaan keskittää patologian diagnostista osaamista, nopeuttaa diagnoosia ja tasoittaa hoidon laatua pienten keskuksien ja kaupunkien välillä. Telepatologia mahdollistaa erikoisosaamista vaativien näytteiden siirtämisen tietoverkossa patologeille, joilta löytyy vaadittava erikoisosaaminen. (Habeeb, Evans & Ghazarian 2012, 1.) Alun perin telepatologiassa on käytetty mikroskoopin avulla otettuja liikkumattomia kuvia, mutta vastaanottavan patologin on yhden kuvan perusteella mahdotonta saada kokonaiskuvaa näytelasista, joka puolestaan voi johtaa virheelliseen tai puutteelliseen diagnoosiin. (Webster & Dunstan 2014, 215.)

Digitaalisten lasien käyttö poistaa liikkumattoman kuvan ongelmia ja lisää telepatologian käytettävyyttä ja luotettavuutta. Koska digitaalinen lasi on täydellinen kopio alkuperäisestä näytelasista, vastaanottava patologi pystyy tutkimaan koko näytelasin skannatulla suurennoksella. Konsultointi useamman patologin kanssa onnistuu nopeasti ja riskittömästi, koska näytelaseja ei tarvitse lähettää fyysisesti, vaan tieto siirtyy internetin tai verkon välityksellä. Vaikeiden tapausten seminaareissa

jokainen osallistuva patologi voi saada digitaaliset kopiot näytelaseista ennen varsinaista seminaaria ja tehdä omia tulkintojaan jo etukäteen. (Webster & Dunstan 2014, 215.)

Digitaalisten lasien tarkastelu samassa verkossa, johon skanneri ja palvelin ovat yhteydessä, tapahtuu ilman ongelmia verkon sisäisen tiedonsiirtonopeuden ansiosta. Internet-yhteyden avulla tapahtuvassa telepatologiassa, jossa digitaalisia laseja tarkasteleva henkilö on verkon ulkopuolella, muodostuu yhteyden nopeus potentiaalisesti ongelmaksi. Digitaalisten lasien suuren koon takia niitä ei ole ajallisesti kannattavaa lähettää kokonaisina tiedostoina. Kokonaisen tiedoston sijaan palvelimella sijaitsevasta digitaalisesta lasista lähetetään katseluohjelmalle kerralla vain sillä hetkellä tarkasteltava näkökenttä. Katselun sujuvuuden edistämiseksi katseluohjelma arvioi todennäköisiä näkökenttiä, joita lasilta halutaan seuraavaksi tarkastella. Palvelin lähettää näitä katseluohjelman ennakoimia näkökenttiä jatkuvasti. Koska seuraavaksi tarkasteltavat näkökentät ovat jo valmiiksi ladattuja, ei niiden katselu vaadi erillistä odottelua. Katselun sujuvuuteen auttaa myös tehokas pakkaaminen, joka vähentää lähetettävän tiedon määrää muttei hävitä informaatiota. Nykyisten internet-yhteyksien nopeuksilla ja valtion sisäisillä välimatkoilla saavutetaan kuitenkin yleisesti riittävä tiedonsiirtonopeus, jotta katselu pysyy miellyttävänä. (Isse ym. 2012, 3-4.)

5.3 Digitaaliset lasit opetuskäytössä

Perinteisten näytelasien kerääminen ja säilyttäminen katseltavina on haastavaa. Toistuvassa käytössä olevat näytelasit voivat helposti rikkoutua, hävitä tai haalistua katselukelvottomiksi. Monen näytelasin ottaminen samasta kudospalasta aiheuttaa muutosta ensimmäisten ja viimeisten lasien välillä, sillä kudosa saattaa muuttua syvemmissä kerroksissa. Tämä on ongelmallista erityisesti pienissä ja harvinaisissa näytteissä, joissa haluttua kudosta ei välttämättä ole riittävästi monelle lasille. (Webster & Dunstan 2014, 215.)

Digitaalisten lasien käyttö lääketieteen- ja patologian opiskelijoiden koulutuksessa ratkaisee monia ongelmia, joita ilmenee perinteisten näytelasien hankkimisessa ja säilyttämisessä. (Hamilton, Wang, & McCullough 2012, 306). Suurin etu digitaalisissa laseissa on niiden kopioitavuus ja jaettavuus. Yhdestä näytelasista voidaan skannauksen jälkeen luoda haluttu määrä digitaalisia kopioita, jotka tallennetaan verkkolevylle tai palvelimelle. Näistä lähteistä digitaaliset lasit ovat helposti opiskelijoiden saatavissa, myös itsenäistä opiskelua varten. (Brachtel & Yagi 2012, 328.) Opetuksessa pystytään hyödyntämään katseluohjelman ominaisuuksia, kuten kiinnostavien alueiden rajaamista

ja nimeämistä. Pieni esikatselukuva auttaa opiskelijaa näkemään mitä näytelasin aluetta hän parhaillaan tarkastelee. Monitorilta tapahtuvassa tarkastelussa heikko mikroskopointitekniikka ei vaikeuta oppimista ja fyysiset virheet, kuten näytelasin liikuttaminen vahingossa eivät hävitä haluttua näkökenttää. Digitaalisten lasien suuri etu on myös niiden identtisyys. Kaikki opetustilaisuuteen osallistuvat tarkastelevat täsmälleen samaa näytelasia. Monitorilta tapahtuvan näytelasin tarkastelun on todettu edistävän opiskelijoiden keskinäistä vuorovaikutusta ja parantavan oppimistuloksia. (Hamilton, Wang, & Mccullough 2012, 306–307.)

6 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TYÖRYHMÄ

Opinnäytetyössä vertaillaan eri laitevalmistajien WSI-skannereita sekä selvitetään niiden toimivuutta patologian osaston työympäristössä käyttäen osastolla esiintyviä näytetyyppejä. WSI-skannereita vertaillaan skannaustuloksen, syntyvän tiedostokoon ja nopeuden perusteella. Tärkeänä arviointikriteerinä laitteiden vertailussa on myös WSI-skannereiden käyttöliittymä ja käytön sujuvuus. WSI-skannereiden suorituskyvystä saadaan vertailukelpoiset numeeriset arvot sekä niiden toiminnasta arvokasta käyttäjäkokemusta. Opinnäytetyön yhtenä tarkoituksena on selvittää myös miten WSI-skannerit suoriutuvat juuri kliinisestä käytöstä ja siinä esiintyvistä haastavista näytteistä.

Tutkimustehtävät:

Selvittää WSI-skannereiden suorituskyky, kun kriteereinä ovat:

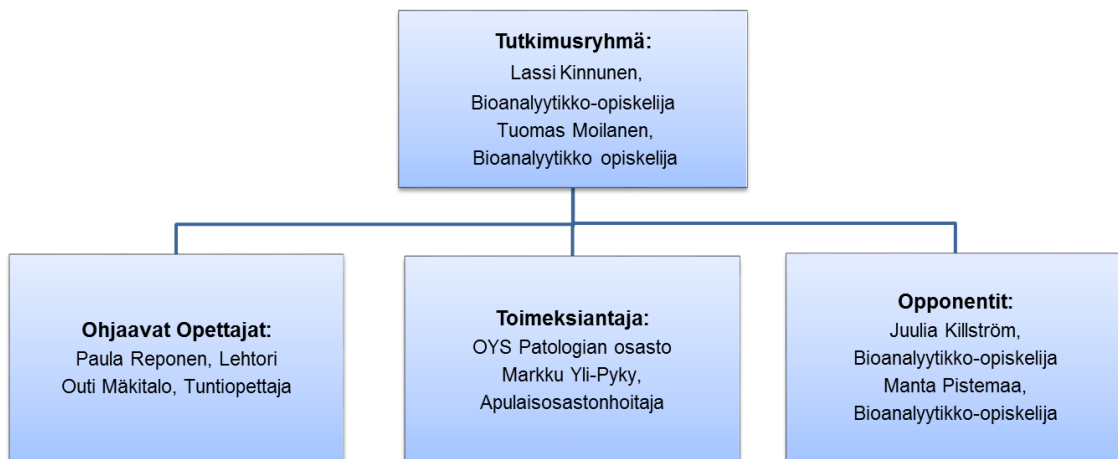
1. skannausnopeus
2. syntyvien virheiden lukumäärä
3. syntyvä tiedostokoko
4. käytön helppous

Selvittää miten WSI-skannerit suoriutuvat patologian osastolla esiintyvistä näytteistä.

Arvioida WSI-skannereiden käyttöliittymiä ja käytön sujuvuutta.

Suomessa WSI-skannereiden käyttö rajoittuu vain paikalliseen tutkimuskäyttöön, joten opinnäytetyö tuo myös paljon tietoa WSI-skannereiden tekniikasta ja niiden tarjoamista mahdollisuuksista. Aiheesta ei juuri ole suomenkielisiä julkaisuja, joten suomenkielinen materiaali antaa tietoperustaa tahoille, jotka suunnittelevat WSI-skannereiden hankkimista osaksi oman osastonsa toimintaansa. OYS:n patologian osasto saa työstä puolueetonta tietoa testikäytössä olleista WSI-skannereista sekä helposti ymmärrettävää teoriatietoa WSI-skannereihin liittyvästä tekniikasta ja käyttömahdollisuuksista.

Opinnäytetyön työryhmä koostui tutkimusryhmästä, työnantajasta, ohjaavista opettajista sekä opponenteista. Toimeksiantaja osallistui myös tutkimusryhmän toimintaan. Ohjaavat opettajat arvioivat opinnäytetyötä sen eri vaiheissa ja antoivat kehitysehdotuksia. Opponentit toimivat vertaisarvioijina ja antoivat myös palautetta työstä opinnäytetyöprosessin aikana. Opinnäytetyöhön osallistuneet henkilöt esitetään kuviossa 1.



KUVIO 1. Opinnäytetyön työryhmä.

7 TYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla eri laitevalmistajien WSI-skannereita. WSI-skannereita vertailtiin ennalta määriteltyjen kriteerien pohjalta. WSI-skannereiden vertailussa käytettäviä kriteerejä olivat kuvanlaatu, nopeus sekä tiedostokoko. Arvoimme myös skannereiden ohjelmistoa ja käytön helppoutta. Patologian osasto pyrkii lisäämään skannerit osaksi työnkulkua ilman uuden työntekijän sitomista skannereiden käyttäjäksi, joten WSI-skannerin käytön tulisi olla helposti perehdytettävissä nykyisille työntekijöille. WSI-skannerin käytön tulisi myös olla mahdollisimman yksinkertaistettua ja sujuvaa, jotta uuden skannauserän aloittamiseen kuluva aika saataisiin minimoitua. Näin työntekijöiltä ei kulu ylimääräisiä resursseja laitteen käyttämiseen.

Skannereiden testien työvaiheet

1. Testijakson suunnittelu / testilasien valinta
2. Laiteperehdytys / skannausprofiilien luominen
3. Rinnakkaisten puolitettyjen näytelasien valmistus
4. Rasvaisten näytteiden uusintaleikkaus eri leikepaksuuksilla (4 µm, 5 µm, 6 µm)
5. Testijakso
 - 100 näytelasin testisarjat
 - rinnakkaisajot
 - leikepaksuuden vaikutuksen testaaminen rasvaisilla näytteillä
6. Skannerikohtaisten raporttien laatiminen

7.1 Käytettävät näytteet ja testaukseen valmistautuminen

Koekäytössämme oli kolmen eri laitevalmistajan WSI-skanneria, joilla ajettiin erilaisia testejä käyttäen OYS:n arkistosta valittuja näytelaseja. Validoinnin tulisi vastata WSI-skannereille suunniteltua kliinistä käyttöä sekä käytettävien näytteiden tulisi vastata potilaskäytössä olevia näytteitä. (Pantanowitz Ym. 2012, 1712). Testeissä käytettävät näytelasit olivat sattumanvaraisesti valittuja potilasnäytteitä, jotka sisälsivät HE-, immuno- ja erikoisvärjäyksiä. Näytteet seurasivat kliinistä näytejakamaa eli ne sisälsivät runsaasti gastrokoppisia näytelaseja, erikokoisia ihonäytelaseja sekä rasvaisia kudosalueita sisältäviä näytelaseja. Lähes kaikki patologian osaston normaalissa toiminnassa esiintyvät näytetyypit olivat edustettuina.

Ennen varsinaisia testejä tutustuimme WSI-skannereiden toimintaan ja ominaisuuksiin. WSI-skannereilla skannauksen onnistuminen riippuu ennalta määriteltävän skannausprofiiliin tai skannausasetusten sopivuudesta näytelasilla olevalle kudospalalle. WSI-skannereiden asetukset muokattiin vastaamaan tavoiteltuja kriteerejä. Saimme opastusta WSI-skannereiden käyttöön laitevalmistajien edustajilta. Heidän avulla loimme testiajoissa käytetyt skannausprofiilit ja optimoimme skannausasetukset.

7.2 WSI-skannereilla suoritettut testit

Ensimmäisessä testissä satunnaisesti valituista näytelaseista koostettiin sadan näytelasin sarja, jolla testattiin WSI-skannereiden nopeutta ja toimivuutta. Sadan näytelasin sarja ajettiin vertailun kaikille skannereille niiden objektiivista riippuen 0,22 μm tai 0,25 μm erotuskyvyllä. Erotuskyvyn pieni ero ei vaikuta olennaisesti skannaustulokseen ja saadut tulokset olivat keskenään vertailukelpoisia. Skannauksen jälkeen tarkistimme syntyneet digitaaliset lasit ja kirjasimme erilaiset virheet. Sadan näytelasin sarjoja suoritettiin useampi, joista laskettiin keskiarvolliset tulokset. Saaduista tuloksista koostettiin lopulta skannerikohtaiset taulukot, joista ilmenee skannausnopeus, virheiden kokonaismäärä sekä erottelu erilaisista virheistä.

Toisessa testissä selvitimme, vaikuttaako näytelasilla olevien kudospalojen lukumäärä ja keskinäinen sijainti näytelasilla skannausnopeuteen, skannauksen laatuun tai tiedostokokoon. Tähän testiin valitsemissamme näytelaseissa oli pienten näytteiden kohdalla neljä tai kahdeksan pientä kudospalaa yhdellä näytelasilla. Suurempia ja keskikokoisia kudospaloja oli laseilla kaksi tai neljä. Haimme arkistosta näytelaseja vastaavat kudusblokot, joista leikkasimme mikrotomilla uudet ”puolitettut” näytelasit. Uusille näytelaseille leikattiin puolet alkuperäisen näytelasin kudokappaleiden lukumäärästä. Rinnakkaisten näytelasien valmistuksessa kudospalojen asettelu näytelasilla huomioitiin, jottei se aiheuttaisi virheitä rinnakkaisissa skannauksissa. Uudet ja alkuperäiset näytelasit skannattiin rinnakkain, jotta tuloksista saatiin vertailukelpoiset. Skannaustuloksissa kiinnitettiin huomiota laadun lisäksi rinnakkaisten skannausten skannausaikoihin sekä syntyneiden digitaalisten lasien tiedostokokoon.

Kolmannessa testissä vertasimme WSI-skannereiden kykyä skannata rasvaisia näytteitä eri paksuudella, mikäli normaalilla (3 μm) leikepaksuudella ilmeni skannausongelmia. Leikkasimme mikrotomilla alkuperäisestä kudusblokista eri paksuisia kudospaloja uusille näytelaseille. Uusien ku-

dospalojen paksuudet olivat 4 μm , 5 μm ja 6 μm ja ne leikattiin kaikki omille näytelaseille skannaustulosten sekaantumisen estämiseksi. Uudet näytelasit skannattiin samoilla skannausasetuksilla kuin alkuperäiset näytelasit, ja skannaustuloksista tehtiin havaintoja leikepaksuuden vaikutuksesta skannaustulokseen.

Eri testeissä saatujen havaintojen, skannaustulosten sekä käyttäjäkokemusten pohjalta laadimme raportin jokaisesta skannerista. Raporteissa tuodaan esille skannereiden tekniikkaa, ominaisuuksia sekä heikkouksia ja vahvuuksia. Myös skannauksessa syntyneiden digitaalisten lasien tiedostoko'ista laadittiin vertailukelpoinen taulukko.

8 SKANNEREIDEN TOIMIVUUS JA SUORITUSKYKY

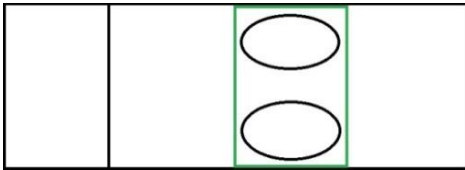
Testaamiemme WSI-skannereiden ominaisuudet poikkeavat toisistaan suuresti, joten niiden vertaileminen ennalta määrättyjen kriteerien pohjalta ei anna todellista kuvaa skannereiden toimivuudesta. Skannereiden ominaisuudet avautuvat tarkemmin, kun kriteerit laaditaan vastaamaan niiden käyttötarkoitusta tulevassa käyttöympäristössä. Työssämme kriteerit laadittiin vastaamaan klinisen laboratorion vaatimuksia eli teknisen suorituskyvyn lisäksi painoarvoa saavat myös laitteen helppo ja nopea käyttöönotto, sekä laitteen työntekijästä riippumaton toiminta. Tutkimuskäytössä painopisteet ovat taas laitteiden teknisissä ominaisuuksissa, kuten kuvanlaadussa ja käyttäjän mahdollisuuksista muokata skannausasetuksia. Tästä johtuen, suorittamissamme testeissä heikosti menestynyt skanneri ei välttämättä ole teknisesti heikompi, vaan se on suunniteltu eri käyttötarkoitusta varten. Tietosuojaan vuoksi vertailun WSI-skannereita ei mainita nimellä, vaan ne ovat nimetty aakkosilla A, B ja C.

8.1 Skanneri A

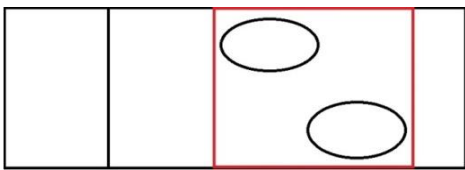
Skanneri A käyttää näytelasien skannaamiseen viivaskannaustekniikkaa eli skanneri jakaa tunnistetun kudosalueen ohuisiin pystysuoriin viivoihin, jotka se skannaa ylhäältä alaspäin. Kudostunnistuksessa skanneri A rajaa tunnistetun kudosalueen reunojen mukaan suorakulmion, jonka sisältä se skannaa kudokset pystysuorina viivoina Y-akselin suuntaisesti. Skannausalue on määriteltävissä myös manuaalisesti aseteltavalla suorakulmiolla. Laitte skannaa Y-akselin suhteen aina koko rajatun skannausalueen, riippumatta siitä, peittääkö varsinainen kudosalue täysin skannattavaa aluetta. Tämä hidastaa skannausta näytelaseilla, joissa useita kudospaloja on sijoitettu näytelasille epätasaisesti. Jos skannattavalla alueella on useita kudospaloja ja niiden välillä on x-akselin suhteen tyhjää tilaa, osaa skanneri tunnistaa nämä tyhjät alueet ja jättää ne skannaamatta. Tyhjiä alueiden ohittaminen nopeuttaa skannausta ja pienentää syntyvän tiedoston kokoa huomattavasti.

Useita kudospaloja sisältäviä näytelaseja skannattaessa on Skanneri A:lla kiinnitettävä erityistä huomiota kudospalojen sijoitteluun näytelasilla. Koska skanneri rajaa skannausalueen reunimmaisten kudospalojen perusteella, jää näytelasille paljon tyhjiä alueita, jotka skanneri joutuu skannaamaan. Kuviossa 2 on esillä kudospalojen hyväksyttävä sijoittelu näytelasilla, joka lisää ylimääräistä skannausaluetta vain vähän. Kuviossa 3 kudospalat on sijoitettu lasille epäedullisesti, sillä skanneri ei osaa pysäyttää skannausta Y-akselilla, vaan joutuu skannaamaan tyhjiä alueita kudospalojen

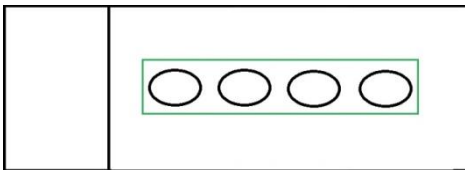
ympäriä. Kuviossa 4 kudospalat on sijoitettu näytelasille niin, että ylimääräistä skannausaluetta syntyy vähiten useamman kudospalan sisältävissä näytelaseissa.



KUVIO 2. Kudospalasten hyväksyttävä sijoittelutapa

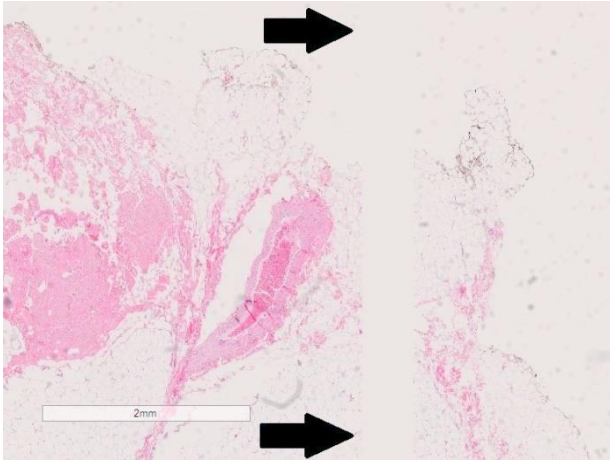


KUVIO 3. Kudospalasten epäedullinen sijoittelutapa



KUVIO 4. Kudospalasten suositeltavin sijoittelutapa

Rasvaisissa ja heikosti värjäytyneissä kudosalueissa skanneri saattaa tunnistaa kudosalueen virheellisesti tyhjäksi ja jättää osan kudoksesta skannaamatta. Virheellinen tunnistus johtuu kudosalueen ja taustan välisestä heikosta kontrastista. Skannaamatta jääneet kudosalueet ovat muodoltaan aina pystysuoria rantuja, mutta niiden leveys voi vaihdella. Kuviossa 5 näkyy Skanneri A:lle tyypillinen rantuvirhe rasvakudoksessa, joka jatkuu Y-akselin suuntaisesti skannausalueen läpi. Rantuvirheet ovat Skanneri A:n pahin ongelma, koska ne eivät yleensä korjaannu tarkennuspisteitä lisäämällä tai siirtelemällä. Rantuvirheet on mahdollista poistaa muuttamalla tarkempia skannausasetuksia, mutta seurauksena on skannausajan huomattava piteneminen.



KUVIO 5. Skanneri A:n rantuvirhe, joka jatkuu koko kudoksen läpi.

Skanneri A asettaa tarkennuspisteet automaattisesti kudospalan pinnanmuotojen mukaan luoden tarkennuskartan, jonka avulla Z-akselin tarkennus tapahtuu. Tämä tarkennusstrategia toimii hyvin, ja aiheuttaa virheitä lähinnä tarkennuspisteiden osuessa kudospalan laskostumiin tai kuoppiin. Skannerilla on mahdollisuus lisätä automaattisesti asetettavien tarkennuspisteiden määrää tai sijoittaa tarkennuspisteitä halutulle kudosalueelle manuaalisesti. Myös automaattisesti sijoitettujen tarkennuspisteiden siirtäminen on mahdollista. Tarkennuspisteiden siirtämisellä pystytään ratkaisemaan osa epäonnistuneista skannauksista, mutta se vaatii käyttäjältä skannerin aktiivista käyttöä.

Skanneri A:n ohjelmisto on erittäin yksinkertainen käyttää ja skannerin käyttöönotto on nopeaa. Toisaalta tarkempien skannausasetusten muuttaminen on skanneri A:n käyttöliittymällä haastavaa. Skannauksen aloittaminen ja skannausjäljen tarkistaminen ei vaadi käyttäjältä syvää perehtymistä skannerin ominaisuuksiin. Skanneri A:ssa näytelasien lataaminen skanneriin tapahtuu automaattisen karusellin ja näytekellojen avulla. Karuselli lataa skannattavat näytelasit automaattisesti skannerille, joten käyttäjän ei tarvitse puuttua skannerin toimintaan. Useiden näytekellojen ja automaattikarusellin kapasiteetin ansiosta skanneri pystyy skannaamaan itsenäisesti useita satoja näytelaseja. Uusintaskannausta vaativat lasit pystytään myös tarkastamaan ja laittamaan uusintaskannukseen ohjelmiston kautta, ilman lasien etsimistä käsin.

Suorituskyvyltään skanneri A on vertailun keskiverto. Skanneri A:lla kaikki näytelasit ajettiin samalla herkällä skannausasetuksella, sillä skannerilla ei ollut yksinkertaista mahdollisuutta muokata ku-

dostunnistuksen asetuksia. Skannerin kudostunnistus toimi kuitenkin hyvin, vaikka herkkä skannausasetus on altis laskemaan skannausalueeseen myös näytelasilla olevat roskat tai peitinlasiin laidat. Taulukossa 1 esitetään sadan näytelasin koesarjaan kulunut aika, sekä virheiden lukumäärä. Skanneri ei erinäisistä syistä skannanut kaikkia laseja, joten nekin laskettiin virheiksi. Lievät rannut tarkoittavat kudospalojen laidoilta sijaitsevia ohuita rantuja, jotka eivät haittaa lasin tarkastelua. Vakavat rannut tarkoittavat suurehkojen kudosalueiden puuttumista. Vakavia rantuja esiintyy erityisesti rasvaisissa kudoksissa. Epätarkkuus tarkoittaa, että skanneri ei ole kyennyt skannaamaan koko näytelasia riittävällä tarkkuudella ja seurauksena on epätarkkoja kudosalueita, joiden tarkastelu ei ole luotettavaa.

Skanneri A:n tuottamien digitaalisten lasien tiedostokoot ovat keskimäärin vertailun suurimpia. (Liite 1). Skannaustekniikasta johtuen kudospalasten sijoittelu näytelasilla voi lisätä skanneri A:n tuottamien tiedostojen kokoa huomattavasti. Pahimmillaan ero vertailun muihin skannereihin on moninkertainen. Myös skannausalueesta riippumattomissa suurissa leikkeissä syntyvät tiedostot ovat kooltaan suuria, mutta kuitenkin hieman pienempiä kuin Skanneri B:n vastaavat tiedostokoot.

TAULUKKO 1. Skanneri A:n sadan näytelasin keskiarvollinen skannaustulos

Objektiivin erotuskyky	0,25µm
Kesto	8h
Kokonaisvirheet	17/100
Ei skannannut	2
Lieviä rantuja	3
Rantuja	6
Epätarkkuus	6
Vaatii uusintaskannauksen	14/100

8.2 Skanneri B

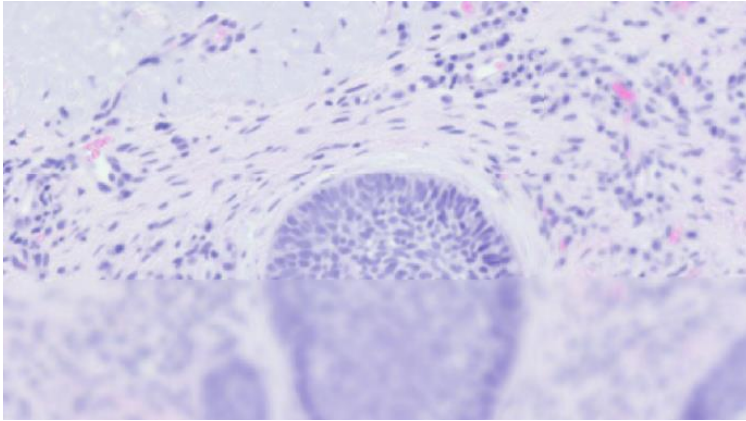
Skanneri B:n skannaustekniikka pohjautuu laattaskannaukseen. Laattaskannauksessa skanneri jakaa tunnistetut kudosalueet neliönmuotoisiksi laatoiksi, jotka se skannaa yksitellen. Automaattisesti tapahtuva skannausalueen määrittely pohjautuu skannerin tunnistamaan kudokseen. Skanneri asettaa skannattavan alueen käytettävissä olevan profiilin asetusten mukaan tunnistettujen

kudosalueiden ympärille eli tyhjä tila kudospalojen välillä jää automaattisesti skannaamatta. Skannausalueen rajaaminen manuaalisesti on myös mahdollista ja skannerilta löytyy siihen monipuoliset työkalut.

Skanneri B:n kudostunnistuksen onnistuminen erilaisilla näytteillä on riippuvainen käytettävän skannausprofiilin asetuksista. Kudostunnistus perustuu kudosalueiden värjäyksen voimakkuuteen sekä taustan ja kudospalan väliseen kontrastiin. Erilaiset kudostyypit värjäytyvät eri tavoin ja erikoisvärjäykset sekä erityisesti immunovärjäykset jäävät usein haaleiksi. Skannerilla onkin mahdollista luoda useita eri profiileja, jotka ovat optimoituja erilaisille värjäyksille ja kudostyypeille. Skannausprofiililla määritellään myös reuna-alue, joka skannataan tunnistetun kudoksen ympäriltä. Skannattavan reuna-alueen optimoimisella on suuri merkitys näytelaseilla, joissa on rasvainen kudospala tai useita irrallisia kudospaloja. Reuna-aluetta kasvattamalla skanneri pystyy paikkaamaan virheellistä kudostunnistusta erityisesti rasvaisissa kudoksissa, joissa kudostunnistus on useasti puutteellinen juuri kudospalan laidoilla. Reuna-alueen liiallinen kasvattaminen ei kuitenkaan ole kannattavaa, sillä irralliset kudospalat saattavat sulautua yhdeksi kudosalueeksi, jolloin tyhjä alue kudospalasten välillä tulee skannatuksi turhaan. Reuna-alueen kasvattaminen lisää myös suoraan skannattavan alueen pinta-alaa.

Skannausprofiileilla määritellään kudostunnistuksen lisäksi z-akselin tarkennusstrategia sekä rajat, joiden väliltä skanneri hakee parasta tarkennusta. Skannerilla on mahdollista valita useista eri tarkennusstrategioista, joiden mukaan tarkennuspisteet asetetaan kudosalueille. Tarkennusstrategioista toiset sopivat paremmin suurille yhtenäisille kudospaloille ja toiset näytelaseille, jotka sisältävät erillisiä pieniä kudosalueita. Skanneri asettaa tarkennuspisteet strategiasta ja kudospalan koosta riippumatta aina erillisille kudospaloille. Tämän seurauksena näytelaseille saattaa tulla profiilista riippuen todella paljon turhia tarkennuspisteitä, jotka lisäävät skannausaikaa selvästi.

Skanneri B:llä kudospalojen sijoittelusta näytelaseille ei ole käytännön merkitystä skannausalueen kasvuun tai skannauksen keston. Skanneri on kuitenkin herkkä erillisten kudospalojen keskinäiselle korkeusvaihtelulle, joka aiheuttaa helposti tarkennusvirheitä. Irrallisten kudospalojen korkeusvaihtelun riski kasvaa kudospalojen lukumäärän lisääntyessä. Korkeusvaihteluista aiheutuvia tarkennusvirheitä pystyy korjaamaan muuttamalla tarkennusrajoja, mutta tämä lisää skannausaikaa. Kuviossa 6 näkyy laattaskannereille ominainen tarkennusvirhe, jossa laatalle asetettu tarkennuspiste on eri tasossa kudoksen pinnan kanssa.



KUVIO 6. Laatan tarkennuspiste ei ole osunut tarkasti kudoksen korkeudelle.

Skanneri B:n ohjelmisto ja säätömahdollisuudet ovat monipuoliset sekä manuaaliset työkalut skannaustuloksen korjaamiseen ovat kattavat. Toisaalta monipuolisuus on ongelma, sillä ohjelmiston käyttöliittymä ja tehokas käyttäminen vaativat perehtymistä. Erityisesti profiilien luominen ja niiden hienosäätö vaativat ymmärrystä laitteen toiminnasta ja säätömahdollisuuksista. Erilaisten valmiiden profiilien asettaminen skannattaville laselle ei sinänsä ole haastavaa, mutta vaatii kuitenkin työntekijän aktiivista osallistumista. Skannerin kapasiteetti on sata näytelasia, jotka latautuvat automaattisesti näytelaseista. Uusintaskannausta vaativien näytelasien löytäminen on helppoa, eikä näytelaseja tarvitse poistaa laitteesta uusinta-ajoa varten.

Kokonaissuorituskyvyltään Skanneri B on vertailun heikoin. Vertailun yhtenä kriteerinä oli käytön helppous, joten skannerille jouduttiin muokkaamaan yleisprofiili, jonka käyttäminen heikensi skannerin suorituskykyä erilaisilla näytteillä. Yleisprofiiliin lisäksi immunovärjätyt ja rasvaista kudosta sisältävät näytelasit ajettiin kuitenkin omalla optimoidulla profiililla. Taulukossa 2 esitetään Skanneri B:n virheiden määrä sekä skannauksen kesto 100 lasin näytesarjalla. Lievä epätarkkuus tarkoittaa tarkennuksen epäonnistumista pienellä kudosalueella. Lievää epätarkkuutta esiintyy erityisesti useita kudospaloja sisältävissä näytelaseissa. Epätarkkuus kuvaa laaja-alaisia epätarkkoja alueita, jotka tekevät kudoksen tarkastelun epäluotettavaksi. Palasien puuttuminen kuvaa laattaskannerille tyypillistä virhettä, jossa kudostunnistus ei ole toiminut oikein, ja skannatussa kudoksessa on reikiä, erityisesti immunovärjäyksissä ja rasvakudoksessa. Skanneri B:n kudostunnistus toimii hyvin näytelaseilla, joiden taustan ja kudospalojen kontrasti on suuri esimerkiksi HE-värjätyillä kudospaloilla. Kudostunnistuksen ongelmat rasvaisissa kudospaloissa ja heikosti värjäytyneissä immunovärjäyksissä olivat vakavia. Rasvaisille kudospaloille ja immunovärjäytyille näytelaseille sopivan profiilin luominen osoittautui erittäin vaikeaksi. Ilman manuaalista skannausalueen määrittämistä oli lähes

mahdotonta varmistua kudostunnistuksen onnistumisesta runsaasti rasvaista kudosta sisältävillä tai heikosti immunovärjättyillä näytelaseilla.

Skanneri B:n tiedostokoot ovat samaa luokkaa Skanneri A:n kanssa. (Liite 1). Suurissa leikkeissä, joissa kudospalasten sijoittelu ei vaikuta skannausalueeseen, ovat skanneri B:n tuottamat tiedostot kuitenkin hieman suurempia. Suuri tiedostoko johtuu osaltaan liian tarkasta kudostunnistuksesta, joka lisäsi ylimääräisen skannattavan alueen määrää tunnistamalla peitinlasin reunat skannattavaksi kudokseksi. Keskimäärin Skanneri B:n tiedostokoot ovat kuitenkin pienempiä kuin skanneri A:n, sillä kudospalasten sijoittelulla ei ole suoraa vaikutusta Skanneri B:n tuottamien tiedostojen koon.

TAULUKKO 2. Skanneri B:n sadan näytelasin keskiarvoinen skannaustulos

Objektiivin erotuskyky	0,22 μ m
Kesto	14h 30min
Kokonaisvirheet	28/100
Ei skannannut	-
lievä epätarkkuus	9
Puuttuu palasia	6
Epätarkkuus	13
Vaatii uusintaskannauksen	19/100

8.3 Skanneri C

Skanneri C:n toiminta perustuu laattaskannaukseen. Erona skanneri B:n skannaustekniikkaan on näytelasin jatkuva liike. Tarkennuspisteiden asettamisen ja niihin kohdistamisen jälkeen, skannerin ei tarvitse pysäyttää näytelasia tarkentaakseen yksittäisiin laattoihin skannauksen aikana. Näytelasin jatkuva liike nopeuttaa skannausta huomattavasti, ilman skannaustuloksen laadun heikkene- mistä. Skanneri C:n skannausalueen raja-
us tapahtuu automaattisella kudostunnistuksella tunnis-
tettujen kudosalueiden ympärille eli skanneri ohittaa automaattisesti kudospalojen välissä olevan
tyhjän tilan. Myös skanneri C:ssä on valittavissa ja muokattavissa erilaisia skannausprofii-
leja, jotka määrittelevät kriteerit kudostunnistukseen ja skannausalueen laajuuteen. Skannerilla on lisäksi mo-
nipuoliset työkalut skannausalueen manuaaliseen määrittelyyn.

Skanneri C:n profiileissa säädetään värjäyksen voimakkuuden raja-arvo ja pienin huomioitava kudosalue sekä reuna-alue, joka skannataan tunnistetun kudospalan ympäriltä. Värjäyksen raja-arvon pienentäminen on pakollista rasvaisia näytteitä skannatessa, mutta samalla skannausalue kasvaa, kun skanneri tunnistaa näytelasin laidat ja mahdolliset tahrat kudosalueiksi. Yhtenäisissä kudospaloissa skannausalueen kasvua voi vähentää kasvattamalla pienimmän huomioitavan kudosalueen kokoa, mutta riskinä on, että myös pienet todelliset kudosalueet jäävät skannaamatta. Raja-arvon kasvattamisella skannausalue kasvaa, mutta se paikkaa tehokkaasti kudostunnistuksen virheitä. Erityisesti näytelaseissa, joissa rasvaiset alueet ovat kudospalojen reunoilla, auttaa raja-arvon kasvattaminen saavuttamaan hyvän skannaustuloksen.

Skanneri C:ssä tarkennuspisteiden asettelu perustuu skannattavien laattojen lukumäärään. Valitun lukuarvon mukaan skanneri asettaa tarkennuspisteen esimerkiksi jokaiseen, joka kolmanteen tai joka kymmenenteen laattaan. Tarkennusstrategiaa ei pysty muuttamaan, vaan ainoastaan tarkennuspisteiden maksimimäärään sekä niiden tiheyteen pystyy vaikuttamaan. Tarkennuspisteiden tiheys tulisi valita aina skannattavien näytelasien mukaan: suurilla kudospaloilla tarkennuspisteet voivat olla harvemmassa kuin pienillä, erillisillä kudospaloilla.

Skanneri C suoriutui lähes ongelmitta useita pieniä kudospaloja sisältävistä näytelaseista, niin skannausajan kuin laadun suhteen. Lievää epätarkkuutta kuitenkin esiintyi näytelaseilla, joilla oli kahdeksan erillistä kudospalaa ja joiden kudospalojen keskinäinen korkeusvaihtelu oli runsasta. Syntyvä epätarkkuus oli lähes aina niin lievää, ettei se häiritse digitaalisen lasin luotettavaa tarkastelua.

Skanneri C:n ohjelmisto on pohjimmiltaan yksinkertainen, mutta siinä ilmenee muutamia puutteita sujuvaa rutiinikäyttöä ajatellen. Profiilien luominen vaatii ymmärrystä säädettävistä asetuksista, mutta informatiivinen käyttöliittymä avustaa käyttäjää. Skannausasetusten säätömahdollisuuksia on rajallisesti, mutta tärkeimmät skannaukseen vaikuttavat tekijät ovat helposti säädettävissä. Eri skannausprofiilien asettaminen näytelaseille on monimutkaista. Käytettävistä profiileista täytyy tällä hetkellä luoda Excel-taulukko, jonka avulla profiilien asettaminen skannattaville näytelaseille nopeutuu. Taulukkoa käytettäessä näytekelkat täytyy ladata skanneriin taulukon mukaisessa järjestyksessä, jotta skannausprofiilit asettuvat oikeille näytelaseille. Skanneri C:n kapasiteetti on useita satoja laseja täydellä latauksella, mutta skanneriin pystyy lastaamaan lisää näytelaseja edellisten

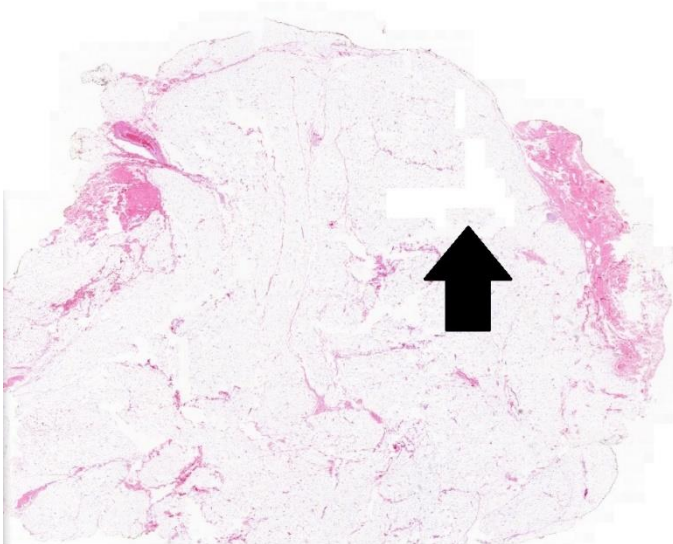
valmistuttua. Skannerista puuttuu kuitenkin automaattinen näytelasien hakutoiminto, eli epäonnistuneissa skannauksissa näytelasit täytyy etsiä manuaalisesti ja ladata käsin uudelleen skannattavaksi.

Skanneri C:n kokonaissuorituskyky on vertailun paras. Myös skanneri C:llä luotiin yleisprofiili, jolla skannattiin suurin osa näytelaseista. Immunovärjättyjä sekä rasvaista kudosta sisältäviä näytelaseja varten luotiin oma profiili, jossa kudostunnistus asetettiin herkemmäksi. Taulukossa 3 esitetään sadan näytelasin sarjan keskimääräinen skannaustulos. Lievä epätarkkuus tarkoittaa, että näytelasilla sijaitsevista kudospelkeistä maksimistaan yhdestä löytyy epätarkka alue. Epätarkkuus tarkoittaa vakavampaa, näytelasin tarkastelua häiritsevää tarkennusvirhettä. Skanneri C:n kohdalla palasten puuttuminen tarkoittaa aina rasvaisen kudosalueen kudostunnistuksen puutteellisuutta. Kuviossa 7 skanneri C:n kudostunnistus on puutteellisesti jättänyt tunnistamatta kudosalueen keskeltä rasvakudosta.

Skanneri C tuottamat digitaaliset näytelasit olivat selvästi vertailun pienimpiä. (Liite 1). Tämä johtuu suurilta osin tarkasta kudostunnistuksesta, joka minimoi ylimääräisen skannausalueen syntymisen. Myös skannausalueesta riippumattomilla laseilla Skanneri C:n tuottamat tiedostot ovat huomattavasti pienempiä kuin vertailun muilla skannereilla.

TAULUKKO 3. Skanneri C:n sadan näytelasin keskiarvoinen skannaustulos

Objektiivin erotuskyky	0,22 μ m
Kesto	3h 38min
Kokonaisvirheet	18/100
Ei skannannut	1
lievä epätarkkuus	6
Puuttuu palasia	8
Epätarkkuus	3
Vaatii uusintaskannauksen	12/100

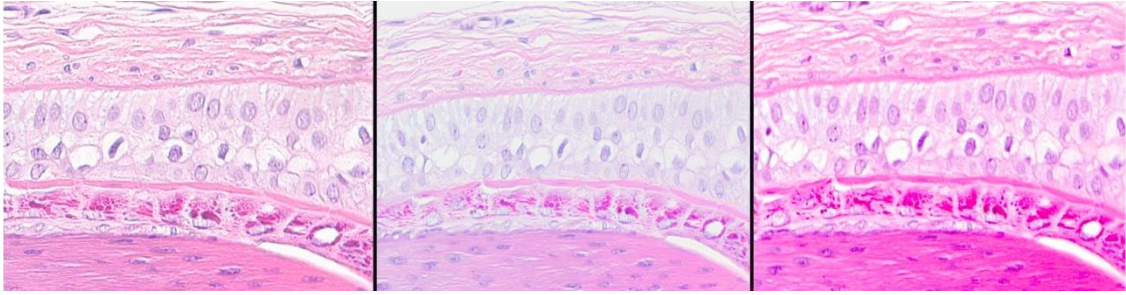


KUVIO 7. Skanneri C:lle tyypillinen virhe rasvakudoksen tunnistuksessa

Skanneri C rikkoi näytelaseja skannauksen aikana. Keskimääräinen hajoamistiheys oli yhdestä kahteen näytelasia sadan näytelasin sarjassa. Lukumäärällisesti laseja hajosi vähän, mutta näytelaseilla olevat kudospalat saattavat olla ainutlaatuisia näytteitä, joten yhdenkin näytelasin hajoaminen skannauksen aikana on paljon.

8.4 Yhteenveto skannereiden toimivuudesta

Karkeasti arvioituna eroja skannereiden kuvanlaadussa ei esiintynyt. Vertailun skannereiden onnistuneet digitaaliset lasit ovat laadultaan keskenään vertailukelpoisia. Digitaalisissa laseissa esiintyvät virheet johtuivat tarkennuksen tai kudostunnistuksen toimimattomuudesta. Kuviossa 8 on nähtävissä onnistunut tarkennus eri skannereilla. Digitaalisista laseista otettuja tarkkoja kuvankaappauksia tulisi katsella asianmukaisilla kuvankatseluohjelmilla kuvien laadun säilyttämiseksi. Kuviossa 8 olevat kuvat eivät ole luonnollisessa koossaan, sekä niiden värit poikkeavat alkuperäisestä tiedostosta.



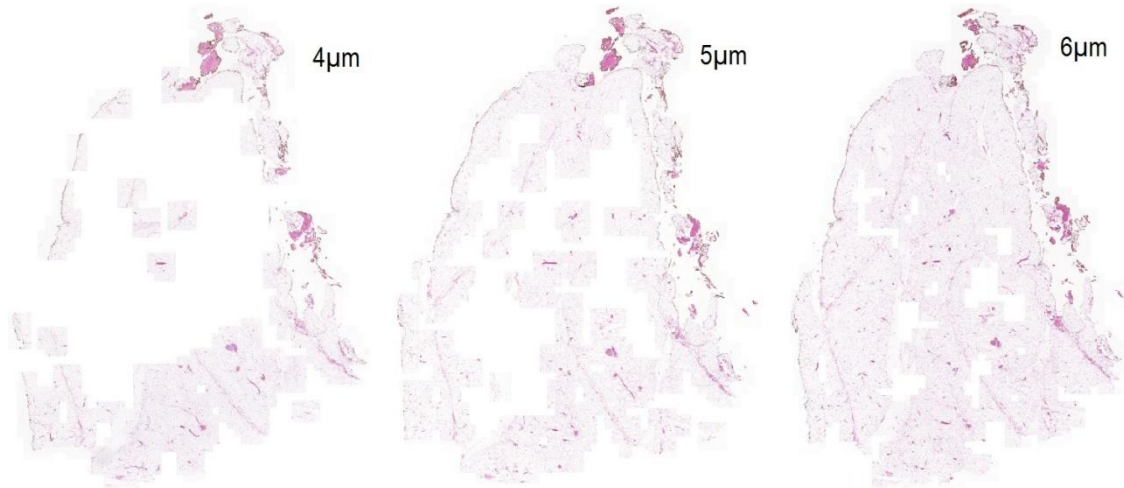
KUVIO 8. Skanneri A:n, -B:n ja -C:n onnistunut tarkennus.

Kudostunnistuksessa esiintyi puutteita kaikilla skannereilla hyvin rasvaisissa kudosalueissa sekä haaleiksi jääneissä immunovärjättyissä näytelaseissa. Skannereiden välillä ilmeni kuitenkin selviä eroja kudostunnistuksen suhteen. Skanneri B oli heikoin tunnistamaan rasvaista kudosta, joka näkyi laajoina skannaamatta jääneinä alueina. Parhaiten rasvaisista kudospaloista suoriutui skanneri C, joka jätti useasti vain pienen rasvaisen alueen skannaamatta. Onnistuminen kudostunnistuksessa johtui hyvin pitkälti siitä, miten hyvin skanneri tunnisti kudoksen ja taustan välisen kontrastieron. Sadan näytelasin testissä vain selvästi rasvaiset näytelasit ajettiin rasvaisella profiililla, joten iso osa kudostunnistuksen virheistä on korjattavissa asianmukaisilla profiilien asetuksilla.

Kudostunnistuksen luotettavuutta lisää skannattavien näytelasien oikeaoppinen valmistus ja säilytys. Skanneri tunnistaa näytelasilla olevat roskat ja liimaiset peitinlasin laidat kudosalueiksi, mikä lisää skannattavaa aluetta ja voi heikentää tarkennuksen onnistumista. Myös liian suuret kudospalat näytelasilla aiheuttavat ongelmia skannauksessa, sillä kudostunnistuksella on tarkasti määritetyt rajat, joiden sisältä kudostunnistus tapahtuu. Tapauksissa, joissa kudospala on liian suuri tai sijoitettu näytelasin laidalle, ei kudostunnistus pysty määrittämään rajojen ulkopuolella olevia kudosalueita. Kudostunnistuksen rajat ovat asetettu, jottei näytelasin nimialuetta tai paljasta näytelasia skannattaisi.

Rasvaisen kudოსleikkeen leikkaaminen paksummaksi parantaa kudostunnistusta, mutta kaikkein rasvaisimmissa näytteissä se jää silti puutteelliseksi. Kuviossa 9 ilmenee kudოსleikkeen paksuuden vaikutus skannerin kudostunnistukseen. Lisäksi näytteen paksuneminen voi heikentää skannauksen laatua. Laadun heikkeneminen johtuu objektiivien syvyysterävyyden rajoista. Paksuissa kudოსleikkeissä kudoksen korkeuserot kasvavat ja skanneri ei onnistuneesta tarkennuksesta huolimatta pysty skannaamaan näytelasia parhaalla tarkkuudella. Lopputuloksena on hieman samea

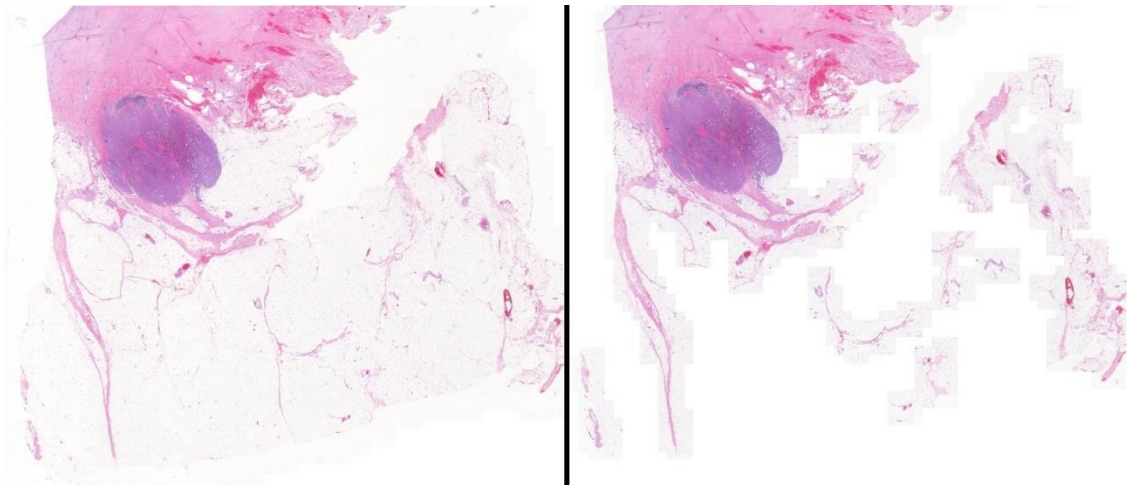
skannaustulos. Kudospalat, joiden paksuus oli 6 μm , olivat jo liian paksuja skannattavaksi normaaleilla asetuksilla. Tulosten perusteella voidaan todeta, että todella rasvaisten kudospalojen kudostunnistus on helpointa suorittaa manuaalisesti.



KUVIO 9. Erittäin rasvaisen leikkeen paksuuden vaikutus kudostunnistukseen

Laadimme rinnakkaisista ajoista skannerikohtaiset taulukot, joista selviää kudospalojen lukumäärän vaikutus skannausnopeuteen sekä tiedostokokoon. Skanneri A:lla (liite 2) kudospalasten sijoittelu aiheutti skannausalueen kasvua, joka hidasti skannausta selvästi ja syntyneiden digitaalisten lasien tiedostokoot kasvoivat merkittävästi. Kudospalojen sijoittelu näytelasilla ei odotetusti vaikuttanut merkittävästi skanneri B:n (liite 3) tai skanneri C:n (liite 4) skannausnopeuteen tai tiedostokokoon. Kudospalasten lukumäärä näytelasilla kuitenkin lisää tarkennusvirheiden mahdollisuutta kaikilla skannereilla, mutta skannerit B ja C ovat erityisen herkkiä näille virheille. Tarkennusvirheet johtuvat kudospalojen keskinäisestä korkeusvaihtelusta, joka vaikeuttaa skannerin suorittamaa tarkennusta. Mikäli yhden tarkennuspisteen ympärillä on runsaasti korkeusvaihtelua, ei skanneri pysty yhdellä tarkennuspisteellä luomaan tarkkaa kuvaa kudosalueesta. Laattaskannereissa tämä on yleisempi ongelma, sillä yhden tarkennuspisteen mukaan määräytyy isomman kudosalueen tarkentaminen. Viivaskannauksessa skanneri mittaa kahden tarkennuspisteen korkeuseron ja laskee sopivan tarkennuksen näitten tarkennuspisteiden välillä. Vertailussa tehtyjen havaintojen pohjalta voidaan todeta, että riski tarkennusvirheisiin kasvaa näytelasilla olevien kudospalojen lukumäärän mukaan. Suurien kudospalasten kohdalla riski on pieni, mutta lukuisia irrallisia kudosalueita sisältävillä näytelaseilla riski kasvaa huomattavasti.

Testejä suoritettaessa huomioitavana kriteerinä oli skannerin nopea ja helppo käyttö. Nopeaa käyttöä edesauttoivat mm. monelle näytetyypille sopiva skannausprofiili ja helppokäyttöinen käyttöliittymä. Skannaustulosten pohjalta on kuitenkin selvää, että laitteiden suorituskyky kärsii, mikäli yritetään luoda kaikille näytteille sopiva skannausprofiili. Kuviossa 10 on esitetty rasvainen kudospala skannattuna rasvaprofiililla sekä yleisprofiililla. Muutaman erilaisen skannausprofiilin asettaminen näytelaseille ei ole aikaa vievää, erityisesti, jos näytteitä pystytään lajittelemaan etukäteen. Esimerkiksi eri värjyksistä tulevat näytelasit voidaan suoraan lajitella omiin näytekelloihin, jolloin profiilin asettaminen näytekellokohtaisesti on käytännöllistä. Liian tarkkojen skannausprofiilien tekeminen ei kuitenkaan ole kannattavaa. Lisääntyneet profiilit aiheuttavat lisää töitä skannerin käyttäjältä näytelasien ylimääräisen jakamisen ja kirjaamisen muodossa. Testeissä eniten ongelmia loivat skannereiden kudostunnistukset. Jokaisella skannerilla kudostunnistus aiheutti suurimman osan virheistä. Mikäli yksittäisiä haastavia näytelaseja ei saada skannattua muodostetuilla skannausprofiileilla, joudutaan näytelaseilta kudostunnistus suorittamaan manuaalisesti riittävän laadukkaan skannaustuloksen varmistamiseksi.



KUVIO 10. Skannausprofiilin vaikutus kudostunnistukseen

Skannereiden vertailussa yhtenä kriteerinä oli syntyvien digitaalisten lasien tiedostokoko. Jatkuvassa käytössä oleva skanneri tarvitsee runsaasti kovalevytilaa, johon syntyneet digitaaliset lasit tallennetaan. Pieneltä vaikuttavat erot tiedostoko'issa korostuvat, kun digitaalisia laseja syntyy päivässä useita satoja. Pienet vaihtelut ja epä johdonmukaisuudet tiedostokokotaulukossa (liite 1) selittyvät kudostunnistuksen herkkyyden asetuksista. Tiedostokoko voi kasvaa, jos kudostunnistus tunnistaa näytelasilta roskia tai peitinlasiin laitoja kudosalueisiksi. Kaikissa testatuissa skannereissa syntyvät digitaaliset näytelasit pakattiin JPEG:iin pohjautuvalla pakkausmetodilla.

9 POHDINTA

Opinnäytetyömme tavoitteena oli vertailla ja selvittää kolmen eri laitevalmistajan WSI-skannerin toimivuutta ja ominaisuuksia kliinisillä näytteillä. Jokaiselle WSI-skannerille saimme muutaman päivän perehdytysjakson, jonka aikana loimme skannerikohtaiset testeissä käytetyt skannausprofiilit. Perehdytysjakson jälkeen siirryimme noin kahden viikon testijaksolle, jonka aikana suoritimme patologian osaston kanssa suunnittelemamme testit. Testien tavoitteena oli selvittää skannaukseen kuluva aika, syntyneet tiedostokoot sekä näytelasilla olevien kudospalasten lukumäärän vaikutus skannaukseen. Lisäksi teimme havaintoja skannereiden ohjelmistoista ja käytön sujuvuudesta. Runsaasti rasvaista kudosta sisältäneille näytelaseille suoritimme lisätestejä niillä esiintyvien skannausongelmien vuoksi. Lisätesteissä selvitettiin leikkeen paksuuden vaikutusta kudostunnistuksen toimintaan.

Opinnäytetyön tuloksena saatiin runsaasti tietoa kolmen eri laitevalmistajan skannerien toiminnasta. Yhteistyössä patologian osaston kanssa luotujen kriteerien pohjalta skanneri C oli vertailun paras. Jokainen skanneri on ominaisuuksiltaan erilainen, joten mahdollista WSI-skanneria hankittaessa tulisi selvittää skannerin käyttötarkoitus omassa työympäristössä. Testeissä havaittiin, että palasten lukumäärä lasilla lisää riskiä tarkennusvirheisiin sekä viivaskannausta käyttävällä skannerilla pidentää skannaukseen kuluva aikaa. Laattaskannereilla kudospalasten lukumäärä ei lisää skannausaikaa merkittävästi. Vaikka tavoitteena oli, että skannerin käyttöön ei sidottaisi omaa työntekijää, selvisi testijaksojen aikana, että käyttö vaatii skannerista riippuen enemmän tai vähemmän työntekijän osallistumista skannausprosessiin.

Opinnäytetyömme testeissä käytetyt näytelasit olivat oikeita potilasnäytteitä, jotka ovat nimettyjä osaston juoksevilla numeroilla. Tuloksissa on nähtävissä käytettyjen näytelasien numerot, mutta niiden jäljittäminen potilaisiin on patologian osaston ulkopuoliselta henkilöltä mahdotonta. Skannereiden vertailussa laitevalmistajien nimiä ei julkaistu. Skannereiden teknisiä tietoja käytettiin myöskin mahdollisimman vähän, jotta testattuja skannereita ei voisi tunnistaa niiden avulla.

Käyttäjäkokemuksen ja WSI-skannereihin liittyvän tiedon karttuessa alkuperäisiä testejä jouduttiin muokkaamaan ja yhtenäistämään, jotta testien tuloksista saatiin vertailukelpoisia. Alkuperäisiä testejä jouduttiin myös karsimaan, koska myöhemmin testikäytössä olleiden skannereiden ominaisuu-

det eivät mahdollistaneet ensimmäiselle skannereille suoritettujen testien suorittamista. Opinnäytetyössämme skannerilta vaadittavat kriteerit luotiin työympäristön vaatimusten mukaisesti, joten testeissämme huonosti menestynyt skanneri voi selviytyä paremmin muissa käyttöympäristöissä.

Skannauslaadun varmistamiseksi skannattavat näytelasit on mahdollisuuksien mukaan kannattavaa lajitella kudostyyppin tai värjäyksen mukaan omiin näytekelkkoihin. Lajittelun avulla skannauksen aloittaminen nopeutuu, kun käytettävät profiilit voidaan valita näytekelkkakohtaisesti. Skannauslaatu ja skannausnopeus paranevat myös erilaisille näytelaseille optimoituja profiileja käytettäessä. Testijaksojen aikana huomasimme, että skannereiden koko potentiaalin hyödyntäminen vaatii työntekijän osallistumista skannausprosessiin. Skannerit toimivat itsenäisesti pitkiä aikoja, mutta erityisesti skannausjärjestelmän aloituksessa profiilien huolellisella valinnalla voidaan vähentää uusintaskannauksia.

Skannereiden luomien digitaalisten lasien pakkaaminen vaatii tietokoneelta paljon prosessointitehoa. Laitteiston tulee olla nykyaikainen, jotta sen tehokkuus ei muodostu pullonkaulaksi tiedostojen pakkauksessa ja siirrossa. Tärkeänä huomiona on myös digitaalisten lasien pakkauksen keston piteneminen, mikäli digitaalinen näytelasi tallennetaan suoraan verkkolevylle. Verkkoliitännän nopeus muodostuu pullonkaulaksi, kun syntyneitä tiedostoja siirretään ja pakataan samanaikaisesti. Parhaiten järjestelmä toimii, kun kiintolevylle skannatut lasit kopioidaan automaattisesti verkkolevylle vasta skannauksen jälkeen.

Testijaksojen lyhyen keston, skannerikohtaisten eroavaisuuksien sekä vertailun kriteerien vuoksi osa WSI-skannereiden ominaisuuksista jäi kokonaan kartoittamatta. Tärkeimpiä lisätutkimusta tarvitsevia ominaisuuksia ovat skannaaminen fluoresenssikanavilla, ”Z-stacking” eli useaan näkökenttään tarkentaminen sekä viivakoodinlukijoiden käyttö ja toimivuus. WSI-skannereiden fluoresenssiskannaus avaa uusia mahdollisuuksia fluoresenssivärjättyjen näytelasien tarkasteluun ja arkistointiin. Useaan näkökenttään tarkentaminen ei yleensä ole tarpeellista tavallisilla ohuilla histologisilla näytteillä, mutta se auttaa paksujen sytologisten näytteiden digitaalisessa tarkastelussa. Osassa testaamistamme skannereista oli viivakoodinlukijat, jotka tarjoavat mahdollisuuksia skannausprosessin automatisoimiseksi. Laittevalmistajien mukaan ohjelmistopäivityksillä viivakoodeihin voidaan yhdistää käytettävä skannausprofiili sekä kansio, johon valmis digitaalinen näytelasi tallennetaan. Lisätutkimuksena voisi myös suorittaa WSI-skannereiden mahdollistaman telepatologian vaikutuksia patologin toimenkuvaan.

LÄHTEET

Abramowitz, M. & Davidson, M. 2004. Numerical aperture and resolution. Viitattu 31.3.2014 <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/numaperture.html>.

Abramowitz, M. & Davidson, M. 2004. Depth of field and image depth. Viitattu 31.3.2014 <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/focusdepth.html>.

Al Habeeb, A., Evans, A. & Ghazarian, D. 2012. Virtual microscopy using whole-slide imaging as an enabler for teledermatopathology: A paired consultant validation study. *Journal of Pathology Informatics* 3 (1), 2–7.

Clayton, A., Pantanowitz, L., Wiley, A., Lesniak, A., Ahmed, I., Cable, W., Contis, L. & Parwani, A. 2012, Experience with multimodality telepathology at the University of Pittsburgh Medical Center. *Journal of Pathology Informatics* 3 (45), 1.

Cornish, T. 2013. An introduction to digital whole slide imaging and whole slide image analysis. Viitattu 20.2.2014 <http://www.hopkinsmedicine.org/mcp/PHENOCORE/CoursePDFs/2013/13%2019%20Cornish%20Digital%20Path.pdf>.

Digital Imaging and Communications in Medicine. 2014. Viitattu 25.3.2014 <http://medical.nema.org/Dicom/about-DICOM.html>.

Fileinfo. 2014. File Extensions Registry 2014. Viitattu 26.3.2014 <http://www.fileinfo.com/extension/jpeg>.

Fileinfo. 2014. File Extensions Registry 2014. Viitattu 26.3.2014 <http://www.fileinfo.com/extension/tiff>.

Fileinfo. 2014. File Extensions Registry 2014. Viitattu 26.3.2014 <http://www.fileinfo.com/extension/dicom>.

Hamilton, W., Wang, Y. & McCullough S. 2012. Virtual microscopy and digital pathology in training and education. *Apmis* 120 (4), 305–315.

Isse, K., Lesniak, A., Grama, K., Roysam, B., Minervini, M. & Demetris, A. 2012. Digital transplantation pathology: combining whole slide imaging, multiplex staining, and automated image analysis. *Am J Transplan* 12 (1), 1–17.

JISC Digital Media 2009. File Formats and Compression 2009. Viitattu 26.3.2014 <http://www.jiscdigitalmedia.ac.uk/guide/file-formats-and-compression#compression>.

Kahrama, J. 2001. Kuvanpakkauksen uusi aalto. *MikroPC* 7 (8) 46–48.

Matthews, R. 2014 Digital Image File Types Explained. Viitattu 25.3.2014 <http://users.wfu.edu/matthews/misc/graphics/formats/formats.html>.

Montalto, M., McKay, R. & Filkins, R. 2011. Autofocus methods of whole slide imaging systems and the introduction of a second-generation independent dual sensor scanning method. *Journal of Pathology Informatics* 2 (44), 1–6.

Niemi, J., lehtori, Turun yliopisto, Biokemian laitos. Luentorunko 12.5.2004.

Oulun yliopisto. 2013. Digitaalinen kuvankäsittely. Viitattu 26.3.2014 <http://www.ee.oulu.fi/research/imag/courses/dkk/dkkalvot.pdf>.

Pantanowitz, L., Sinard, J., Henricks, W., Fatheree, L., Carter, A., Contis, L., Beckwith, B., Evans, A., Otis, C., Lal, & Parwani, A. 2013. Validating Whole Slide Imaging for Diagnostic Purposes in Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 137 (12) 1710–1722.

Pantanowitz, L. Digital images and the future of digital pathology. 2010. *Journal of Pathology Informatics* 1 (15), 3.

Park, S., Pantanowitz, L. & Parwani, A. 2012 Digital imaging in pathology. *Clinics in laboratory medicine* 32 (4), 557–584.

Sellaro, T., Filkins, R., Hoffman, C., Ho, J., Parwani, A., Pantanowitz, L. & Montalto, M. 2013. Relationship between magnification and resolution in digital pathology systems. *Journal of Pathology Informatics* 4 (1) 21–25

Singh, R., Chubb, L., Pantanowitz, L. & Parwani, A. 2011. Standardization in digital pathology: Supplement 145 of the DICOM standards. *Journal Of Pathology Informatics* 2 (23) 1–3.

Tuominen, V. & Isola, J. 2010. Linking whole-slide microscope images with DICOM by using JPEG2000 interactive protocol. *Journal of Digital Imaging* 23, (4), 454-462.

Thrall, M., Rivera, A., Takei, H. & Powell, S. 2014. Validation of a novel robotic telepathology platform for neuropathology intraoperative touch preparations. *Journal of Pathology Informatics* 5 (21), 2-3.

Turun Yliopisto. 2013. Optinen mikroskopia. Viitattu 31.3.2014 http://www2.physics.utu.fi/projects/kurssit/UFYS2025/ANMRK_3_2013.pdf.

Webster, J., & Dunstan, R. 2014. Whole-slide imaging and automated image analysis: considerations and opportunities in the practice of pathology. *Veterinary Pathology* 51 (1), 211–223.

Yagi, Y. & Gilbertson, J. 2005. Virtual microscopy and virtual slides in teaching, diagnosis and research. http://web.mit.edu/hst.035/ReadingSupplement/04_26_Yagi/Yagi_2005.pdf

Näytelasi	Tiedostokoko		
	Skanneri A	Skanneri B	Skanneri C
OB10-15531-4	1200MB	850MB	410MB
OB10-15528-2	1100MB	880MB	450MB
OB13-12111-1	1200MB	700MB	290MB
OB13-12085-2R	2050MB	2240MB	900MB
OB13-12724-2F	2890MB	1830MB5	1960MB
OB13-9316-4	1170MB	600MB	540MB
OB13-12042-4B	1130MB	890MB	720MB
OB10-15514-2	2060MB	1850MB	890MB
OB10-15521-3	2900MB	3290MB	1330MB
OB13-9316-3	620MB	710MB	600MB
OB13-3147-10	1340MB	1540MB	690MB
OB13-8350-3	270MB	230MB	130MB
OB13-12018-1	2260MB	2350MB	1170MB
OB13-8350-1	1100MB	680MB	280MB
OB13-9316-2	1500MB	1680MB	690MB
OB10-15538	2000MB	1850MB	760MB
OB13-12659-1	1800MB	1880MB	790MB
OB10-15533	860MB	630MB	270MB
OB10-15540	950MB	810MB	360MB
OB10-15509-4	830MB	550MB	280MB
OB10-15521-4	2890MB	2550MB	1200MB
OB10-15546-2	1970MB	2070MB	1150MB
OB13-8349-4	590MB	540MB	380MB
OB13-12185	880MB	930MB	430MB
OB10-15504-1	540MB	390MB	210MB
OB13-8400-2	570MB	520MB	150MB
OB13-8350-2	600MB	330MB	260MB
OB10-15531	520MB	470MB	250MB
OB13-12014-4B	2140MB	1550MB	600MB
OB13-3147-1	740MB	830MB	460MB
OB13-8400-1	360MB	300MB	140MB
OB10-15514-3	1800MB	2680MB	1340MB
OB13-8350-4	210MB	140MB	80MB
OB10-15539	380MB	240MB	210MB
OB13-9316-5	770MB	1020MB	710MB
OB10-15507-2	2500MB	2750MB	1100MB
OB10-15500	1780MB	1790MB	690MB
OB13-12181-2	2850MB	2600MB	1170MB
OB10-15506-7	2100MB	1950MB	910MB
OB10-15514-4	2200MB	2250MB	1440Mb
OB13-2626-2	1400MB	1250MB	530MB
OB13-12659-2	1510MB	1720MB	1120MB

OB13-12892-3	2830MB	3580MB	1750MB
OB10-15509-3	1010MB	710MB	290MB
OB13-12563-2C	2920MB	3580MB	1470MB
OB13-12724-1R	1310MB	880MB	810MB
OB13-12974	1390MB	1260MB	640MB
OB10-15521-19	2880MB	2870MB	1560MB
OB11-10204-2A	1520MB	920MB	1010MB
OB13-12210-2	1380MB	740MB	320MB
OB13-8349-1	1770MB	630MB	660MB
OB10-15577-1	1230MB	1310MB	650MB
OB13-8540	1180MB	400MB	310MB

NÄYTELASILLA OLEVIEN KUDOSPALASTEN LUKUMÄÄRÄN

LIITE 2

VAIKUTUS SKANNERI A:N SKANNAUSAIKAAN JA TIEDOSTOKOKOON

Leike	Leikemäärä	Skannausaika	Tiedostokoko
OB12-11439-1	8	7min 10s	1420MB
	4	2min 10s	330MB
OB12-11439-2	8	15min 14s	3110MB
	4	3min 33s	690MB
OB12-11120-2	2	4min 21s	800MB
	1	1min 49s	320MB
OB12-11172-3	8	12min 43s	1420MB
	4	5 min 10s	860MB
OB12-11617-3	8	9min 31s	1510MB
	4	2min 26s	430MB
OB12-11133-2F	2	11min 38s	2400MB
	1	4min 29s	950MB
OB12-11439-3	8	7min 45s	1520MB
	4	3min 43s	650MB
OB12-11536-3	2	11min 50s	2420MB
	1	4min 40s	985MB
OB12-11172-4	8	7min 37s	1410MB
	4	3min 27s	600MB
OB12-11239-3	8	6min 43s	550MB
	4	3min 12s	210MB
OB12-11172-2	8	16min 10s	3210MB
	4	4min 37s	970MB

NÄYTELASILLA OLEVIEN KUDOSPALASTEN LUKUMÄÄRÄN

LIITE 3

VAIKUTUS SKANNERI B:N SKANNAUSAIKAAN JA TIEDOSTOKOKOON

Leike	Leikemäärä	Skannausaika	Tiedostokoko
OB12-11439-1	8	6min 12s	260MB
	4	3min 7s	170MB
OB12-11439-2	8	14min 15s	780MB
	4	7min 20s	170MB
OB12-11120-2	2	6min 11s	870MB
	1	2min 50s	520MB
OB12-11172-3	8	16min 39s	900MB
	4	9min 26s	510MB
OB12-11617-3	8	10min 50s	1710MB
	4	5min	790MB
OB12-11133-2F	2	10min 35s	4050MB
	1	4min 40s	2090MB
OB12-11239-3	8	12min 1s	570MB
	4	5min 57s	390MB
OB12-11536-3	2	11min 36s	5410MB
	1	4min 40s	2120MB
OB12-11172-4	8	8min 32s	460MB
	4	3min 55s	320MB
OB12-11439-3	8	8min 55s	670MB
	4	4min 55s	400MB
OB12-11172-2	8	18min 0s	1720MB
	4	8min 33s	970MB

NÄYTELASILLA OLEVIENTEN KUDOSPALASTEN LUKUMÄÄRÄN

LIITE 4

VAIKUTUS SKANNERI C:N SKANNAUSAIKAAN JA TIEDOSTOKOKOON

Leike	Leikemäärä	Aika	Tiedostokoko
OB12-11439-1	8	1min 11s	190MB
	4	0min 36s	120MB
OB12-11439-2	8	2min 3s	560MB
	4	1min 8s	270MB
OB12-11120-2	2	0min 57s	410MB
	1	0min 26s	230MB
OB12-11172-3	8	3min 2s	580MB
	4	1min 25s	310MB
OB12-11617-3	8	2min 4s	620MB
	4	0min 55s	290MB
OB12-11133-2F	2	2min 19s	1620MB
	1	1min 7s	900MB
OB12-11439-3	8	2min 12s	360MB
	4	1min 10s	200MB
OB12-11536-3	2	3min 18s	1960MB
	1	1min 28s	1010MB
OB12-11172-4	8	1min 30s	210MB
	4	0min 40s	110MB
OB12-11239-3	8	2min 35s	440MB
	4	1min 21s	230MB
OB12-11172-2	8	3min 6s	790MB
	4	1min 6s	440MB