

jQC-PET, una macro de ImageJ para el análisis del control de calidad de un PET/CT

jQC-PET, an ImageJ macro to analyse the quality control of a PET/CT

Jesús Cortés-Rodicio, Gaspar Sánchez-Merino, María A. García-Fidalgo

Servicio de Física Médica, Hospital Universitario Araba, Vitoria-Gasteiz.

Fecha de Recepción: 15/07/2014 - Fecha de Aceptación: 24/02/2015

Se ha desarrollado una herramienta en ImageJ para facilitar la realización de los procedimientos de control de calidad de los equipos de tomografía por emisión de positrones descritos en los documentos elaborados por la National Electrical Manufacturers Association (NU2-2007) o la Agencia Internacional de la Energía Atómica (Pub-1393). Se han implementado tres módulos correspondientes a los procedimientos calidad de imagen, uniformidad tomográfica y resolución espacial. En ellos, se automatiza la generación de las regiones de interés y el análisis de las mismas. Los resultados se han comparado con el software de la casa comercial y con los datos de la bibliografía. Utilizando jQC-PET se consigue la estandarización del análisis y la independencia del software de las casas comerciales.

Palabras clave: control de calidad, PET/TAC, NEMA NU2-2007, ImageJ.

An ImageJ macro has been developed to facilitate the analysis of three PET/CT quality control procedures included in the documents from the National Electrical Manufacturers Association (NU2-2007) and the International Atomic Energy Agency (Pub-1393): image quality, uniformity and spatial resolution. In them, the generation of the regions of interest and the analysis are automatized. The results obtained with the software have been compared with those of the commercial software and the literature. The use of jQC-PET allows a standard analysis and the independence of the commercial software.

Key words: quality control, PET/CT, NEMA NU2-2007, ImageJ.

Introducción

Los controles de calidad (CC) en un servicio de Medicina Nuclear son imprescindibles para la práctica clínica habitual, en tanto que permiten asegurar el correcto funcionamiento de los equipos y procedimientos. Para ello, la legislación vigente a través del RD1841/1997¹ describe los parámetros mínimos que caracterizan los equipos. Además, se han establecido los procedimientos detallados en el Protocolo Nacional de Control de Calidad en la Instrumentación en Medicina Nuclear,² consensuado por las sociedades científicas implicadas (SEMN, SEFM y SEPR). Sin embargo, ni en el actual Real Decreto ni en el Protocolo Nacional se incluyen los equipos de tomografía por emisión de positrones PET, por lo que bastaría realizar el paquete de pruebas de CC sugerido por las propias casas comerciales; pruebas que distan mucho de ser comparables entre las diversas casas y que resultan, en algunos casos, insuficientes para conocer en profundidad el estado del equipo. En el caso de querer

realizar pruebas más extensas se hace, por tanto, necesario acudir a organismos y documentos reconocidos a nivel internacional, como son los elaborados por la National Electrical Manufacturers Association (NEMA NU2-2007)³ o la Agencia Internacional de la Energía Atómica (IAEA-Pub1393),⁴ que describen con detalle las pruebas de CC de los equipos PET y PET/CT. Mientras no se modifique el Real Decreto de Control de Calidad en Medicina Nuclear para incluir los equipos PET, las casas comerciales sólo analizan las pruebas bajo demanda y con software propio cerrado que, en general, no es de libre acceso a los usuarios del equipo.

ImageJ es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health⁵ que fue diseñado con una arquitectura abierta. Se puede ampliar su funcionalidad mediante la instalación de *plugins* Java y macros grabables ofreciendo una flexibilidad de gran aceptación entre la comunidad científica. En este trabajo se presenta una macro de ImageJ para el análisis automático de tres de las pruebas de CC de

* Correspondencia
Email: jesus.cortesrodicio@osakidetza.net

los equipos PET: calidad de imagen, uniformidad tomográfica y resolución espacial.

Material y métodos

Equipo PET/CT

En Julio de 2012, el Hospital Universitario Araba instaló en su sede Santiago un equipo PET/CT Philips GeminiTF (Philips Medical Systems) para completar la cartera de servicios de medicina nuclear en la provincia de Álava. Consta de un módulo CT con espesores de corte entre 0.6 mm y 12 mm. Las técnicas disponibles comprenden entre 90 y 140 kV y entre 25 y 500 mAs. El tiempo de rotación mínimo es de 0.5 s. La resolución espacial de la imagen reconstruida es de 1.17 mm. El módulo PET consta de 28336 cristales de LYSO distribuidos en 36 módulos de 23 × 44 cristales de 4 mm × 4 mm × 14 mm cada uno. Se forma así un anillo de detección de 45.7 cm de radio con un campo de visión útil transversal y axial (FOV) de 576 mm de diámetro y 18 cm de longitud respectivamente. Los 36 módulos están acoplados a una matriz hexagonal de 360 fotomultiplicadores (PMT). La electrónica asociada a los PMT utiliza una ventana de coincidencia temporal de 3.8 ns además de una ventana temporal retrasada para la estimación de las cuentas aleatorias.

Preparación y adquisición de estudios

En nuestro caso se utilizan los maniqués y protocolos de adquisición propuestos por los documentos IAEA-Pub1393 y NEMA NU2-2007.

Calidad de imagen

Con esta prueba se pretende evaluar la calidad de imagen en un maniqué antropomórfico en el que se varía el tamaño de las zonas de captación y la relación de actividades entre éstas y el fondo. Este maniqué presenta además un inserto que simula tejido de pulmón sin FDG cuyo objetivo es comprobar las capacidades del equipo de corregir la imagen por atenuación y dispersión. Junto al maniqué de calidad de imagen se sitúa un maniqué con FDG que trata de simular la radiación externa al FOV y que afecta a la calidad de imagen final. Se consigue de esta manera una situación lo más próxima posible a la realidad clínica de un paciente.

Se deben preparar dos maniqués con actividad de FDG. El primero consiste en un compartimento con forma de torso en cuyo interior se sitúan seis esferas de diferentes diámetros (10 mm, 13 mm, 17 mm, 22 mm, 28 mm y 37 mm) y un cilindro centrado de 50 mm de diámetro y relleno de un material de baja densidad que simula tejido de pulmón. El maniqué se rellena con una

concentración de actividad de 5.3 kBq/ml. Las cuatro esferas menores se llenan con una disolución de agua con jabón de glicerina que disminuye la tensión superficial y evita la formación de burbujas. Además se añade la FDG, con una relación de actividad respecto al fondo de 4:1. Las dos esferas mayores se rellenan con agua sin actividad. Consecutivo a este maniqué situamos el maniqué de dispersión de 70 cm de longitud y 20.3 cm de diámetro en cuyo interior y a 4.5 cm del eje y paralelo a éste se sitúa la fuente de FDG con una concentración de actividad inicial de 4.7 kBq/ml (véase la fig. 1a).

La adquisición es similar a los estudios de cuerpo completo con una duración de 334 s y un único campo de 18 cm centrado con el plano central de las esferas. Debido a que la calidad de imagen va a depender del método de reconstrucción, en la rutina mensual realizamos diferentes reconstrucciones, todas ellas con corrección por atenuación: BLOB-OS, 3DRAMLA, con corrección por tiempo de vuelo y sin ella.

Uniformidad tomográfica

Con esta prueba se evalúa la respuesta del equipo frente a una distribución homogénea de actividad distribuida en el FOV. Para realizarla se utiliza un maniqué de inundación cilíndrico de 20 cm de diámetro y 29.6 cm de longitud que proporciona la casa comercial, suspendido al final de la camilla (véase la fig. 1b). Se diluye una concentración de actividad que puede variar entre 7.96 kBq/ml y 9.95 kBq/ml, que equivale a cuatro veces la concentración de actividad de las situaciones clínicas, en nuestro caso ~2.5 MBq/kg. Se realiza una adquisición estándar de cuerpo completo de 300 s de duración y la reconstrucción habitual en la práctica clínica, BLOB-OS de 3 iteraciones y 33 subsets con una matriz de 4 mm por pixel y corrección por tiempo de vuelo.

Resolución espacial

Para realizar el estudio de resolución se ha construido un maniqué que soporta tres fuentes puntuales en tres posiciones radiales (x, y): (0, 1); (0, 10); (10, 0) cm y dos planos axiales: en el centro y a 1/4 del FOV. Las fuentes puntuales consisten en tres esferas microporosas (zeolitos) de 1 mm de diámetro a las que previamente se ha incorporado la actividad de FDG (véase la fig. 1c). La actividad de las esferas debe ser inferior a 1MBq para garantizar que el porcentaje de cuentas perdidas y aleatorias sea inferior al 5% de las cuentas totales. Debido a que los cristales centelleadores de nuestro equipo presentan radiación intrínseca (LYSO) la adquisición debe recoger al menos 120000 cuentas por cada fuente puntual por lo que el tiempo de adquisición vendrá determinado por la sensibilidad del equipo y la actividad presente en los zeolitos. La

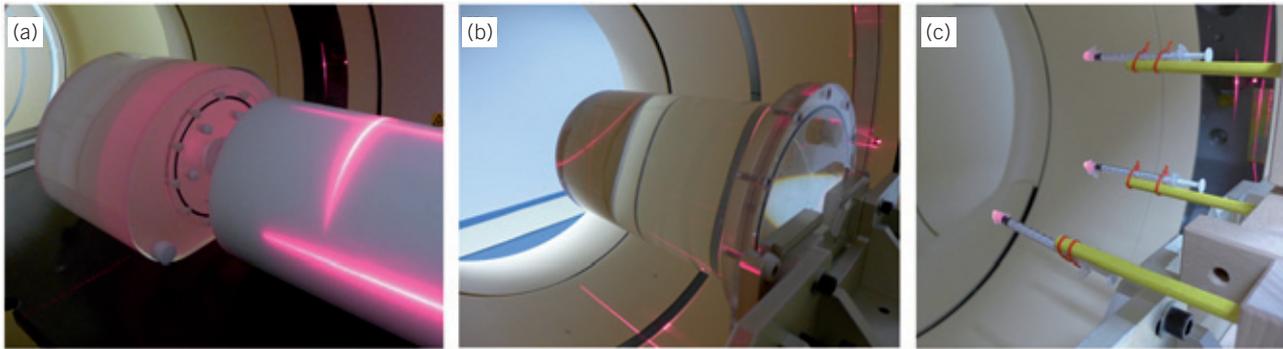


Fig. 1. Maniqués de adquisición de las tres pruebas incluidas en jQC-PET_v2.0: (a) disposición de los maniqués para la prueba de calidad de imagen, (b) maniqué para la prueba de uniformidad tomográfica y (c) maniqué de fuentes puntuales para la prueba de resolución espacial.

reconstrucción debe ser tal que el tamaño de pixel sea menor a 1/3 de la anchura intrínseca a mitad de altura (AIMA) esperada. En nuestro caso se ha usado un protocolo de reconstrucción BLOB-OS de 3 iteraciones y 33 subsets con una matriz de reconstrucción 576 mm × 576 mm × 180 mm a 2 mm de tamaño de pixel.

Análisis mediante jQC-PET

Descarga e instalación de ImageJ y jQC-PET

El programa de análisis ImageJ se puede descargar de <http://imagej.nih.gov/ij/>. Presenta la ventaja de no necesitar instalación, permitiendo su ejecución desde cualquier dispositivo de almacenamiento extraíble. El paquete de macros jQC-PET está a libre disposición en la plataforma de desarrollo colaborativo de software con control de versiones GitHub en la cuenta personal <https://github.com/JCRodicio/jQC-PET>. Además se ha facilitado un enlace en la web de la Sociedad Española de Física Médica, <http://www.sefm.es/fisica-medica/es/aplicaciones/9>.

Para la instalación de las macros es necesario copiar la carpeta .jQC-PET en la carpeta .macros de ImageJ. Posteriormente, se debe ejecutar ImageJ e instalar la macro mediante:

Plugins >> Macro >> Install (Ctrl + Shift + M)

y seleccionar la macro QCPET_v2.0.ijm de la carpeta .macros\jQC-PET de ImageJ. Como ayuda a los usuarios se ha realizado un video-tutorial donde se describen los detalles de la instalación y el manejo de la aplicación.

Antes de utilizar el módulo de QC-PET_Resolución que se presenta aquí es imprescindible instalar previa-

mente el *plugin* FWHM que se incluye en el paquete QC-PET.zip copiando la carpeta .FWHM en el directorio de .plugins de ImageJ. También se puede descargar directamente de <http://www.umanitoba.ca/faculties/science/astronomy/jwest/plugins.html>.

Preparación del software

Tras instalar la macro, se habilita un botón de QC-PT en la barra de herramientas de ImageJ con un menú desplegable que permite elegir entre los diferentes procedimientos (véase la fig. 2).

Los procedimientos contemplados en la versión QC-PET v2.0 incluyen la calidad de imagen, la uniformidad tomográfica y la resolución espacial. En todos los casos hay que tener acceso a la serie del estudio y abrirla con ImageJ mediante:

File >> Import >> Image Sequence...

Como el programa lee el tamaño de pixel de las imágenes a partir de la cabecera DICOM, se debe comprobar que no se está aplicando una calibración global que entre en conflicto con la escala de las imágenes. Para comprobarlo basta acudir a:

Analyze >> Set Scale...

y verificar que no está seleccionada la opción "Global".

Calidad de imagen

El análisis consiste en la realización de una serie de ROI y la evaluación de los valores medios de pixel y sus desviaciones estándar. Dado el corte central de las esferas y la relación de actividades se dibuja para cada tamaño de esfera j una ROI de ese tamaño en la esfera j y 12 ROI de ese tamaño sobre el fondo del maniqué.

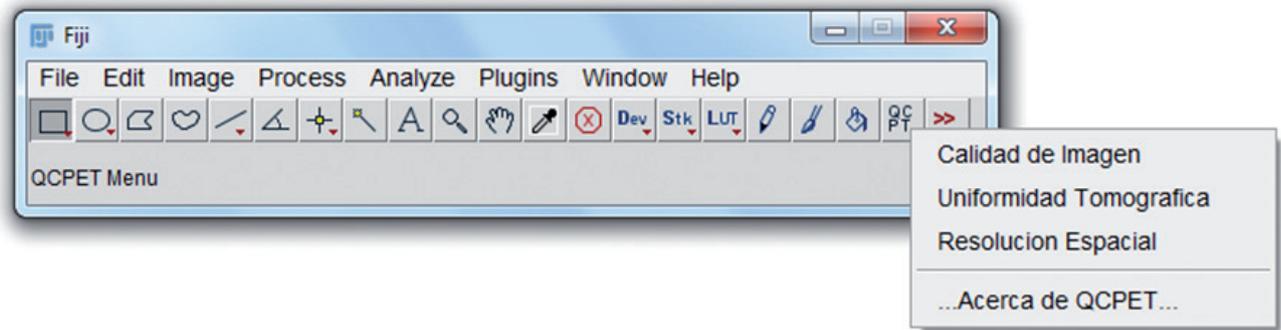


Fig. 2. Interfaz gráfica de ImageJ con la macro jQC-PET_v2.0 instalada.

Además, se dibujarán las mismas ROI de fondo en los cortes -2 cm, -1 cm, $+1$ cm, $+2$ cm respecto al corte central de las esferas resultando un total de 60 ROI de fondo de tamaño j . Finalmente se calculan los contrastes de las esferas con actividad (Q_h) y sin actividad (Q_c) y su variabilidad respecto al fondo (N_j) así como el error residual de las correcciones de atenuación y dispersión por corte ($\Delta C_{lung,i}$) según las expresiones definidas en los protocolos de la IAEA-Pub1393 y NEMA NU 2-2007 (1-4):

$$Q_{h,j} = 100 \left(\frac{\frac{C_{h,j}}{C_{B,j}} - 1}{\frac{a_h}{a_b} - 1} \right) \quad (1)$$

$$Q_{c,j} = 100 \left(\frac{C_{c,j}}{C_{B,j}} - 1 \right) \quad (2)$$

$$N_j = 100 \frac{\sqrt{\sum_{k=1}^K \frac{(C_{B,j,k} - C_{B,j})^2}{K-1}}}{C_{B,j}}, \quad K = 60 \quad (3)$$

$$\Delta C_{lung,i} = 100 \frac{C_{lung,i}}{C_{B,i}} \quad (4)$$

donde:

$C_{h,j}$ es el valor medio de pixel de la ROI sobre la esfera con actividad j

$C_{c,j}$ es el valor medio de pixel de la ROI sobre la esfera sin actividad j

$C_{B,j}$ es el promedio de los valores medio de pixel de las ROI de tamaño j dibujadas en el fondo

a_h/a_b es la relación de actividad entre las esferas calientes y el fondo

$C_{B,j,k}$ es el valor medio de pixel de una ROI de fondo de tamaño j

$C_{lung,i}$ es el valor medio de pixel de la ROI de pulmón del corte i

El software tiene una primera sección para introducir los datos: la relación de actividad entre el fondo y las esferas, el corte central donde se encuentran las esferas y un proceso de umbrales manuales para determinar la posición de las esferas con actividad (calientes o *hot*) y sin actividad (frías o *cold*) (véase la fig. 3). Hay que ser especialmente cuidadoso con el establecimiento de los umbrales para que se localicen correctamente todas las esferas. En caso contrario el software mostrará una ventana de error.

Una vez establecidos los umbrales el programa ya conoce las coordenadas del centro del inserto de pulmón y del centro de cada una de las esferas, por lo que empieza a dibujar y analizar un total de $12 \times 6 \times nSlice$ ROI, siendo $nSlice$ el número de cortes del estudio que se está analizando. Finalmente se presenta la tabla de contraste y variabilidad del fondo para cada una de las esferas (véase la fig. 4). La tabla se habrá de guardar para continuar con el cálculo de la variabilidad del inserto de pulmón, para lo que se dibujan y analizan $(12+1) \times nSlice$ ROI. Al finalizar se muestra un gráfico con la variabilidad del inserto de pulmón por corte que se podrá guardar como imagen o como datos (véase la fig. 4).

Uniformidad tomográfica

El análisis consiste en la realización, para cada corte transversal de la imagen reconstruida, un conjunto de ROI de $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ contenidas en una área circular de 175 mm de diámetro centrada en el maniquí, seguido del análisis cuantitativo de la

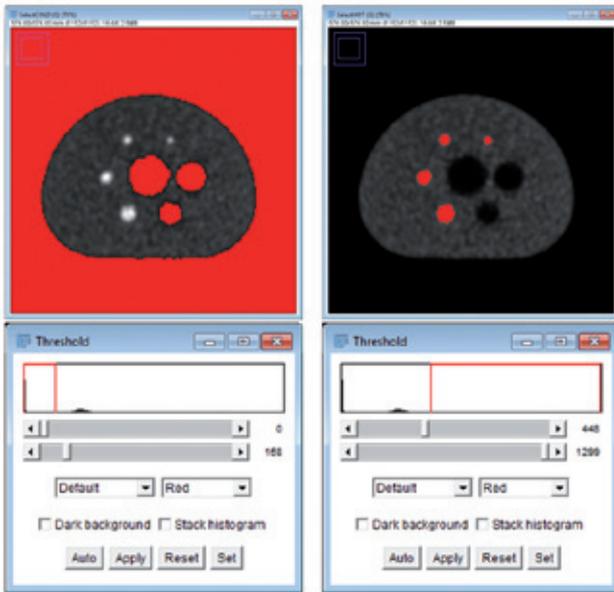


Fig. 3. Establecimiento de umbrales manuales de las esferas frías y las esferas calientes, con relación de actividad respecto al fondo de 4:1.

No-Uniformidad (NU_{\pm}) y el Coeficiente de Variación (CV) (5-7):

$$NU_{\pm} = \left\{ 100 \frac{MAX(C_k) - AVE(C_k)}{AVE(C_k)}, -100 \frac{AVE(C_k) - MIN(C_k)}{AVE(C_k)} \right\} \quad (5)$$

$$STD_i = \sqrt{\frac{1}{N_{ROI} - 1} \sum_{k=1}^K (C_k - AVE(C_k))^2} \quad (6)$$

$$CV_i = 100 \frac{STD(STD_k)}{AVE(C_k)} \quad (7)$$

donde C_k se refiere al valor medio de píxel correspondiente a la ROI k y los subíndices i se refieren a los distintos cortes.

El software encuentra el centro del maniquí, a partir del cual dibuja las ROI necesarias para cubrir el área circular de 175 mm de diámetro, y las analiza. Al finalizar se muestran el gráfico de NU_{\pm} por corte y el gráfico del CV por corte (véase la fig. 5).

Resolución espacial

El software jQC-PET_v2.0 pide en primer lugar el corte donde se encuentran las fuentes puntuales, y las localiza automáticamente. A continuación comienza con la fuente situada en (0, 1) cm y presenta los cortes axial, coronal y sagital. Antes de continuar hay que colocar el cursor en el vértice superior izquierdo

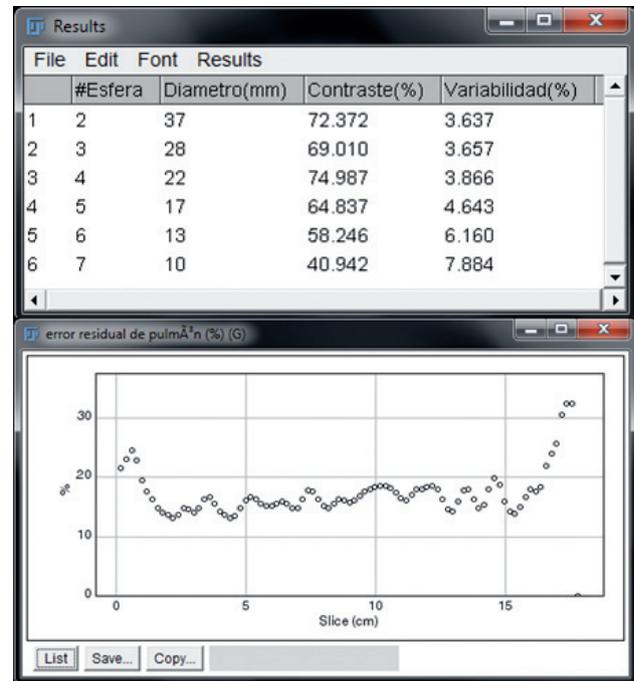


Fig. 4. Datos de salida del módulo de calidad de imagen de jQC-PET: tabla de resultados de contraste y variabilidad del fondo junto a la gráfica de variabilidad del inserto de pulmón.

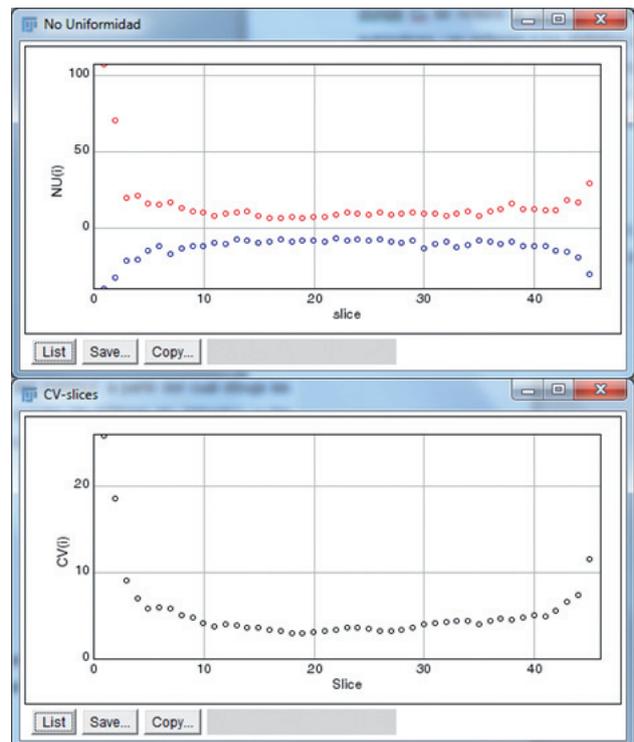


Fig. 5. Datos de salida del módulo de uniformidad tomográfica de jQC-PET: gráficas resultantes del análisis de No Uniformidad, NU_{\pm} , y Coeficiente de Variación, CV.

Tabla 1. Notación de los datos de salida del módulo resolución de jQC-PET.

Coordenadas de la fuente (x, y) cm	Centro FOV			1/4 del FOV		
	(0, 1)	(10, 0)	(0, 10)	(0, 1)	(10, 0)	(0, 10)
AIMA dirección x	01x	100x	010x	01x _{1/4}	100x _{1/4}	010x _{1/4}
AIMA dirección y	01y	100y	010y	01y _{1/4}	100y _{1/4}	010y _{1/4}
AIMA dirección z	01z	100z	010z	01z _{1/4}	100z _{1/4}	010z _{1/4}

del píxel de mayor intensidad en cada una de las tres proyecciones (véase la fig. 6). En caso de no seleccionar correctamente el píxel, el software mostrará un mensaje de error. Se realizarán dos ajustes gaussianos por cada proyección y se mostrarán en la tabla de resultados. En total se tienen 6 ajustes por cada fuente puntual, dos para cada dirección x , y o z . Promediando los pares de resultados de cada dirección x , y , z obtenemos la AIMA de cada fuente (0, 1); (0, 10); (10, 0), en cada dirección (x , y , z), para el plano central y a $\frac{1}{4}$ del FOV que podremos exportar a una tabla como la mostrada en la tabla 1. Con estos resultados se puede obtener la resolución transversal, radial y axial según las expresiones (8)-(12).

$$RES_{trans}^{1\text{ cm}} = \frac{01x + 01y + 01x_{1/4} + 01y_{1/4}}{4} \quad (8)$$

$$RES_{axial}^{1\text{ cm}} = \frac{01z + 01z_{1/4}}{2} \quad (9)$$

$$RES_{radial}^{10\text{ cm}} = \frac{100x + 010y + 100x_{1/4} + 010y_{1/4}}{4} \quad (10)$$

$$RES_{tangencial}^{10\text{ cm}} = \frac{100y + 010x + 100y_{1/4} + 010x_{1/4}}{4} \quad (11)$$

$$RES_{axial}^{10\text{ cm}} = \frac{100z + 010z + 100z_{1/4} + 010z_{1/4}}{4} \quad (12)$$

Resultados y discusión

Para validar el software jQC-PET_v2.0 se ha comparado con el propio de la casa comercial (Philips GEMINI TF) y con las especificaciones del equipo. En la fig. 7 se muestran los resultados de contraste y variabilidad del fondo de la prueba de calidad de imagen con relación de actividad entre esferas y fondo de 4:1 y reconstrucción BLOB-OS de 3 iteraciones y 33 subsets con una matriz de 576 mm x 576 mm x 180 mm y corrección por tiempo de vuelo. Para las esferas de mayor diámetro (sin actividad) se observa una sobreestimación del software de Philips mientras que para esferas menores (con actividad) el contraste

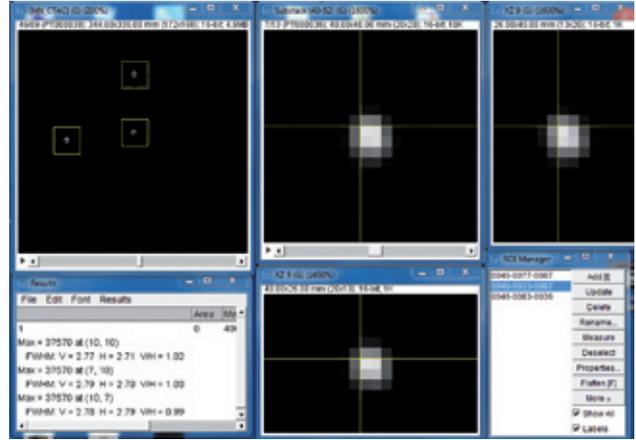


Fig. 6. Proyecciones axial, sagital y coronal de una de las fuentes puntuales, con el cursor en el vértice superior izquierdo del píxel más intenso. Abajo a la izquierda se muestran los datos de salida del módulo de resolución espacial de jQC-PET.

se encuentra por debajo del obtenido con jQC-PET. Respecto a la variabilidad del fondo se observa una menor variación con el diámetro de las ROI con jQC-PET. Como el acceso al software de las casas comerciales está limitado a los propios técnicos del equipo, es complicado encontrar explicación a estas diferencias sin conocer los detalles del código fuente. Sin embargo manejamos varios factores que podrían motivarlas: por un lado la posición de las ROI en el software de Philips se realiza de forma manual, mientras que en jQC-PET se realiza de forma automática a partir de los umbrales de intensidad presente en las esferas. Por otro lado está el tamaño de las ROI de análisis: en jQC-PET se establecen ROI del tamaño nominal de las esferas del maniquí mientras que el software de Philips utiliza ROI ligeramente menores.

Se ha analizado la uniformidad por corte para la reconstrucción más habitual de la práctica clínica (véase la fig. 8). En los planos centrales de nuestro equipo, la NU_{max} se encuentra entre 7.05% y 11.8%, la NU_{min} está entre -6.2% y -11.8% mientras que el coeficiente de variación se encuentra entre el 2.92 y 4.37%. Se observa, además un detrimento de los parámetros de uniformidad hacia los extremos del campo de

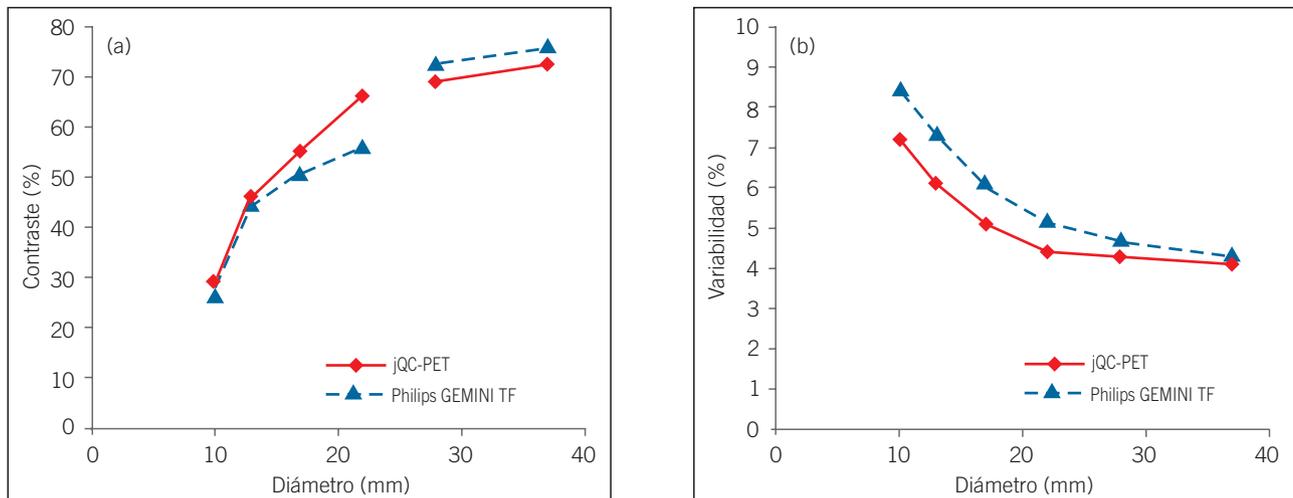


Fig. 7. Comparación de los resultados de la prueba de calidad de imagen: (a) contraste y (b) variabilidad del fondo.

visión debido a la disminución de sensibilidad característica de los equipos PET en régimen de adquisición 3D. Para la prueba de uniformidad no se dispone de especificaciones ni referencias por parte del fabricante, por lo que se evalúa la constancia de los resultados.

En la tabla 2 se comparan los resultados de resolución con las especificaciones del fabricante y con otro método de cálculo alternativo basado en Microsoft Excel. Se comprueba que los resultados se encuentran dentro de las especificaciones, teniendo en cuenta que el protocolo de reconstrucción utilizado es diferente al propuesto por NEMA e IAEA, y en buena concordancia con el método alternativo de cálculo. El margen de diferencia ha sido de $\pm 10\%$ respecto a las especificaciones

y de $\pm 2\%$ respecto al método alternativo de cálculo. La resolución transversal y axial en el centro del FOV es de 5.3 mm. A 10 cm del eje, la resolución radial y tangencial aumenta a 5.5 mm y 5.6 mm respectivamente debido a la profundidad de interacción de los fotones de aniquilación en los cristales LYSO.

Conclusiones

En este trabajo se ha presentado la macro de libre distribución jQC-PET basada en ImageJ abierta a modificaciones mediante la plataforma con control de versiones GitHub. Se facilita el análisis de tres pruebas de control de calidad del PET/CT: calidad de imagen,

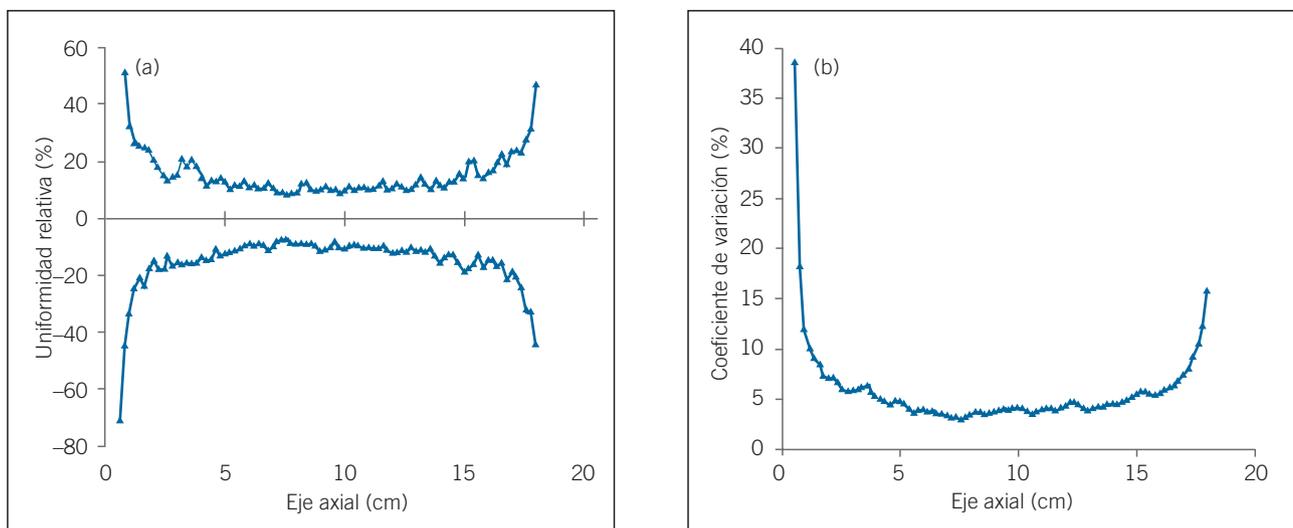


Fig. 8. Resultados del software para la prueba de uniformidad tomográfica: (a) no Uniformidad NU_{\pm} y (b) coeficiente de variación CV.

Tabla 2. Resultados de la resolución espacial respecto a las especificaciones del fabricante.

AIMA	Distancia radial (cm)	Resolución jQC-PET (mm)	Resolución Excel (mm)	Especificaciones (mm)
Transversal	1	5.3	5.4	4.9
Axial	1	5.3	5.4	4.9
Transversal radial	10	5.5	5.6	5.5
Transversal tangencial	10	5.6	5.5	5.5
Axial	10	5.5	5.6	5.5

uniformidad tomográfica y resolución espacial. El software se ha comparado con el software propio de la casa comercial Philips GEMINI TF y con las especificaciones del equipo, obteniendo resultados similares. No obstante, se debería validar el software antes de la utilización por parte de los usuarios que deseen aplicarlo a la rutina mensual de controles de calidad.

Bibliografía

1. Real Decreto 1841/1997, de 5 de diciembre, por el que se establecen los criterios de calidad en medicina nuclear.
2. Sociedad española de Medicina Nuclear, Sociedad española de Física Médica, Sociedad española de Protección Radiológica. Protocolo Nacional de Control de Calidad en la Instrumentación en Medicina Nuclear. SEMN-SEFM-SEPR; 1999.
3. National Electrical Manufacturers Association. Performance Measurements of Positron Emission Tomographs. NEMA Standard NU2-2007. Washington, DC: NEMA; 2007.
4. International Atomic Energy Agency. IAEA Human Health Series No1, Quality Assurance for PET and PET/CT Systems. Vienna: IAEA; 2009.
5. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.