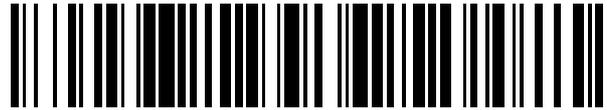


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 724**

51 Int. Cl.:

**G06T 7/00** (2006.01)

**G06K 9/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2005 E 05764118 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **04.04.2007 EP 1769424**

54 Título: **Procesamiento de imágenes y análisis de datos matriciales**

30 Prioridad:

**16.07.2004 US 893007**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.02.2013**

73 Titular/es:

**BIOARRAY SOLUTIONS LTD. (33.3%)  
35 TECHNOLOGY DRIVE SUITE 100  
WARREN NJ 07059, US;  
XIA, XIONGWU (33.3%) y  
YIPING, GUAN (33.3%)**

72 Inventor/es:

**XIONGWU, XIA y  
YIPING, GUAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 394 724 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procesamiento de imágenes y análisis de datos matriciales

**Antecedentes**

5 Los recientes avances rápidos en la biología molecular han creado más demanda de pruebas de alto volumen basadas en la necesidad de cribar bibliotecas cada vez más grandes de compuestos, validar el creciente número de marcadores genéticos y comprobar las poblaciones de pacientes cada vez más diversificadas. Esto ha llevado al desarrollo de nuevos formatos de matriz, en particular para el análisis de la interacción de ácido nucleico y proteína-proteína, que permiten el procesamiento en paralelo mediante la realización de ensayos necesarios en un formato "multiplexado".

10 Convencionalmente, estas determinaciones se realizan mediante la producción de matrices de ácidos nucleicos y anticuerpos por medio de "manchado" o "impresión" de soluciones alícuotas en papel de filtro, papel secante u otros sustratos. Sin embargo, a pesar de su uso actual generalizado en la investigación académica para el análisis de la expresión génica y perfiles de proteínas, las matrices producidas por manchado tienen deficiencias, especialmente en aplicaciones que colocan altas exigencias en la precisión y fiabilidad y llamando para el análisis de un gran volumen de muestras con alto rendimiento. En otra técnica desarrollada más recientemente, matrices de sondas espacialmente codificadas se producen a modo de síntesis de oligonucleótidos fotoquímica in-situ. Sin embargo, esta tecnología se limita en la práctica a la producción de sondas cortas de oligonucleótidos - como resultado, se requieren tecnologías alternativas para la producción de matrices de ADNc y proteína. Además, la síntesis in situ impide la personalización de la matriz de sondas rápida, dado el tiempo y el costo de la remodelación necesarios para el proceso de síntesis fotoquímica.

Además de estas dificultades inherentes relacionadas con el rendimiento del ensayo, las matrices espacialmente codificadas producidas por procedimientos convencionales de manchado o síntesis in-situ generalmente requieren instrumentos especializados de escaneo óptico para extraer datos de calidad utilizable. Los sistemas comerciales disponibles para este fin se basan en el escaneo láser confocal - un proceso lento - incluso a la resolución espacial típicamente modesta de ~ 5 µm - que se debe repetir para cada señal de color.

Con el fin de resolver muchos de los problemas asociados con los usos de diagnóstico y análisis de las "matrices manchadas" de oligonucleótidos y proteínas (como se indica en "Análisis molecular multianálisis utilizando matrices de partículas al azar específicas de la aplicación", solicitud US No. 10/204,799, publicada el 23/8/2002; WO 01/98765), las matrices de oligonucleótidos o matrices de proteínas se pueden formar mediante la visualización de estas fracciones de captura en micropartículas codificadas químicamente ("cuentas") que luego son ensambladas en matrices planas compuestas de tales portadores funcionalizados codificados. Ver la solicitud de patente US No. 10/271,602 "Análisis multiplexado de loci polimórficos de interrogación concurrente y detección mediada por enzimas", presentada el 15/10/2002 y nº de serie 10/204,799 supra.

Las matrices de micropartículas que exhiben oligonucleótidos o proteínas de interés pueden ser montadas por montaje electrocinético controlado por luz (véase, por ejemplo, las patentes US 6.468.811; 6.514.771; 6.251.691) o por un procedimiento de montaje de disposición directa (descrito anteriormente en "Matrices de micropartículas y Procedimientos de preparación de las mismas", presentada el 9/7/02; No. No. 10/192.352).

Para realizar el análisis de ácido nucleico o proteína, tales matrices portadoras codificadas se ponen en contacto con muestras anticipadas que contienen polinucleótidos diana o ligandos de proteínas de interés. La captura de la diana o ligando a agentes de captura particulares mostrados en los portadores del tipo correspondiente según lo identificado mediante un código de color produce una firma óptica, tal como una señal de fluorescencia, ya sea directamente o indirectamente por medio de decoración posterior, de acuerdo con uno de varios procedimientos conocidos. La identidad de agentes de captura, incluyendo sondas o receptores de la proteína (referidos en este documento algunas veces también colectivamente como "receptores") generar una señal de ensayo positivo se puede determinar por los portadores de decodificación dentro de la matriz. Véase la solicitud de patente US "Análisis molecular multianálisis utilizando matrices de partículas al azar específicas de la aplicación" número 10/204.799.

Estas matrices de micropartículas ("cuentas") contienen generalmente un número de tipos de cuentas espectralmente distinguibles dentro de un área lo suficientemente pequeña como para ser vista por un microscopio óptico estándar. La pequeña huella y el alto contraste de la señal permiten la imagen multicolor "instantánea" directa ("snapshot") de toda la matriz bajo un microscopio, eliminando así la necesidad de escaneo láser confocal.

El análisis de las imágenes grabadas a partir de dichas matrices de cuentas codificadas aleatorias implica varias etapas y problemas, tal como se describe en la solicitud de patente US "Análisis, acceso seguro a, y transmisión de imágenes de la matriz" número 10/714.203. Para identificar los receptores individuales de puntuación positiva (y negativa) en un ensayo dado, la imagen del ensayo que comprende un patrón de intensidades de señal grabadas a partir de cuentas individuales dentro de la matriz se compara con una imagen de decodificación, tomada antes (o después) del ensayo. Como se describe en detalle en el documento US N° 10/714.203, este proceso se realiza de forma automatizada mediante la construcción de un mapa que comprende grupos de decodificación ("grupos") de cuentas del mismo tipo (que muestra el mismo tipo de receptor). Un procedimiento rápido para construir el mapa de

decodificación (también referido como el "mapa de grupo") se describe en la presente memoria que invoca una plantilla adaptable.

5 Además, Galinsky et al. *Bioinformátics* 19 (14): 1832-1836 (2003) describe imágenes de tasa de expresión de punto bajo, que son imágenes en las que no todas las cuentas son fluorescentes. En tales situaciones, Galinsky sugiere el uso de una plantilla de cuadrícula, donde la cuadrícula se pre-construye/conoce a priori y encaja simplemente. Además, Galinsky enseña que el algoritmo utilizado para indexar los puntos organizados en cuadrículas hexagonales a partir de la formación de imágenes de los haces de micromatrices de fibra óptica requiere información relacionada con la estructura geométrica de la cuadrícula hexagonal, tal como el número de capas de fibra de núcleo individual en cada minihaz y el número de capas de minihaces en el haz de micromatriz.

10 La determinación de las intensidades de las cuentas individuales en la imagen del ensayo permite la cuantificación de los resultados, por ejemplo, en la expresión del gen o el análisis de biomarcadores de proteína. Para determinar las intensidades de señal de la cuenta, la imagen se divide en segmentos mediante la construcción de una cuadrícula de manera que cada campo en la cuadrícula contiene como máximo una cuenta - a continuación se registran las intensidades de las intensidades de campo de cuadrícula. Debido a que la etapa para hallar la cuadrícula se realiza en una imagen que está alineada dentro del campo de visión, una primera etapa de procesamiento es la de la rotación de la imagen.

15 Aunque la etapa para hallar la cuadrícula se puede realizar en una imagen de campo brillante (como se describe en el documento US N° 10/714.203), es ventajoso eliminar la grabación de una imagen de campo brillante buscando en su lugar la cuadrícula directamente para decodificar y ensayar imágenes, que comprende típicamente imágenes de fluorescencia. Además, la imagen de fluorescencia típicamente tiene un contraste considerablemente mayor, es decir, la relación de la señal con el fondo. Sin embargo, varios problemas se deben superar. En primer lugar, las cuentas que muestran receptores que no producen una señal de ensayo no serán visibles en la imagen de fluorescencia, y esto conducirá generalmente a la corrupción de los bordes de la cuadrícula, lo que afecta la etapa de rotación de la imagen que se basa en la determinación precisa de la orientación de la imagen original mediante la medición de la orientación de los bordes. En segundo lugar, los fuentes de señal tales como cuentas fluorescentes pueden ser desplazados al azar del centro de cada campo de cuadrícula, un hecho que puede afectar a la intensidad registrada a partir de ese campo.

### Sumario

30 Se describen procedimientos para la automatización del proceso de análisis de una manera que aumenta la confianza en los resultados del análisis de datos de ensayos registrados en la forma de imágenes de matrices de señales que representan la fuerza de las interacciones receptor-ligando, y más particularmente, cuando diferentes receptores están asociados con diferentes micropartículas codificadas ("cuentas"), y las señales de cuentas "positivas" representan la cantidad de ligando capturado por los receptores correspondientes que aparecen en dichas cuentas. Los procedimientos de la presente memoria permiten:

- 35 1. alineación de cuadrícula mediante la localización de los bordes de la cuadrícula en una imagen de fluorescencia;
2. segmentación del hallazgo en la cuadrícula de una imagen de fluorescencia que contiene fuentes de señal ("oscuras") invisibles distribuidas al azar;
3. determinación de la intensidad máxima en un campo de cuadrícula, a pesar de los desplazamientos laterales aleatorios de fuentes de señal en el campo; y
- 40 4. agrupación automática de fuentes de señal del mismo tipo, a continuación de la transformación de la imagen de fluorescencia mediante el uso de una plantilla adaptable.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una imagen de decodificación de una matriz de fuentes de señal de cuenta.

45 La figura 2 es una imagen fluorescente de la matriz de fuentes de señal de cuenta, por ejemplo, que se muestran en la figura 1, en la que sólo ciertas cuentas son fluorescentes y por tanto visibles.

La figura 3A representa una matriz de cuentas con filas alineadas horizontalmente.

La figura 3B muestra una matriz de cuentas de columnas alineadas verticalmente.

La figura 3C representa cuentas vecinas conectadas en forma de un hexágono, y la distancia de las perlas, la distancia de fila y líneas de cuadrícula de fila y de columna.

50 La figura 4 muestra las líneas de límite de fila en una cuadrícula.

La figura 5 muestra los centros de cuentas separados en dos grupos, un grupo que contiene cuentas de filas de número impar, y el otro, cuentas de filas de número par.

La figura 6A muestra el hallazgo del borde de la cuadrícula con las cuentas brillantes, y que el pico del perfil de intensidad se encuentra en la posición central de la cuenta.

La figura 6B muestra que para cuentas oscuras, la posición de la intensidad máxima está entre las cuentas.

La figura 6C muestra el hallazgo del borde de la cuadrícula utilizando una cuenta oscura.

5 La figura 7 muestra la posición de cuenta verdadera dentro de una ventana y una zona de límite en torno a ella.

La figura 8 representa un típico mapa de decodificación bidimensional, registrado utilizando dos canales de color.

La figura 9 muestra el resultado de la conversión de la imagen del mapa de cuentas en la figura 8 cuando se utiliza una resolución de 128 cuadrículas en ambas dimensiones.

La figura 10 muestra un mapa de cuentas que puede ser encerrado en un perímetro.

10 La figura 11A muestra el rectángulo delimitador del mapa de perlas de plantilla (mostrando el tipo y posición de grupo).

La figura 11B muestra el rectángulo delimitador del mapa de perlas del proyecto (mostrando sólo las agrupaciones, no sus tipos y sus posiciones).

15 La figura 12 muestra los resultados después de la transformación del rectángulo delimitador para cada grupo en un formato de imagen de un proyecto de mapa de perlas.

La figura 13 representa el ángulo de desalineación frente a la ocupación fraccionaria de una matriz de fuentes de señal de cuenta.

### Descripción detallada

20 **I. Segmentación por hallazgo en la cuadrícula en las imágenes desalineadas de las matrices de fuentes de señales discretas que contienen fuentes "oscuras" colocadas al azar**

Los procedimientos y algoritmos establecidos a continuación abordan el problema de la segmentación de la imagen de una gran variedad de fuentes de señal discretas que generalmente estará desalineada y estará integrada por fuentes "brillantes" y "oscuras" entremezcladas al azar.

25 Desalineación de Imagen - Como se ilustra en la figura 1, una matriz dentro de un ensayo o imagen de decodificación en general, no estará perfectamente alineada con los ejes que definen el cuadro de imagen. En su lugar, la matriz puede estar desalineada por un ligero ángulo que típicamente puede variar desde 0° a aproximadamente 10°, dada la condición de que todos los cuatro bordes deben permanecer dentro del marco del campo. El ángulo entre el borde horizontal inferior de la matriz y el borde horizontal del marco se define como el ángulo de orientación de la matriz. Para hallar la cuadrícula, primero hay que hallar el ángulo de orientación.

30 Fuentes "oscuras" colocadas al azar - En el procesamiento de imágenes de las señales procedentes de las matrices, es una etapa crítica para generar una cuadrícula que tiene un cierto número de campos, en la que un campo contiene una fuente de señal distinta. Imágenes de fluorescencia tales como en los ejemplos mostrados del presente documento se registran utilizando filtros de color y generalmente tienen un alto contraste que excede significativamente de una "imagen de campo brillante," que, como se describe en el documento US N° 10/714.203 (US 2004/101 191 A1), se utiliza para la decodificación.

35 Sin embargo, el problema en dibujar una cuadrícula con los campos alrededor de los fuentes de señales individuales en una matriz de fuentes de señal es que, en general, no todas las fuentes de señal serán "on" cuando la cuadrícula se está dibujando. Por ejemplo, cuando las señales son señales de fluorescencia que indican un resultado de ensayo positivo (es decir, una interacción receptor-ligando), y las fuentes de señal son cuentas distintas en una matriz de dichas cuentas, sólo aquellas cuentas puntuadas como positivas serán visibles, el resto, distribuidos al azar a lo largo de la matriz, serán invisibles (ver la figura 2). Un procedimiento y un algoritmo para resolver este problema se exponen a continuación.

40 **I.1. Segmentación de las imágenes de las matrices de fuente de configuración hexagonal** - Ciertas realizaciones de matrices codificadas aleatorias utilizan un conjunto de trampas mecánicas para confinar las cuentas individuales. En tales realizaciones, un diseño de cuenta hexagonal (figura 3C) proporciona una mayor densidad de embalaje que la que tiene una planta cuadrada y por lo tanto se prefiere. En una cuadrícula con simetría hexagonal, todas las distancias vecinas más cercanas son idénticas (ver la figura 3C).

50 Si una matriz con líneas horizontales está alineada con precisión con respecto al eje horizontal del marco (es decir, con un ángulo de alineamiento de 0°, como en la figura 3C), entonces las líneas que forman el hexágono están orientadas a 0°, 60° y 120°, respectivamente, con respecto a la horizontal. Si la matriz está desalineada en un ángulo finito con respecto a la horizontal, las líneas del hexágono se compensan con 0°, 60°, y 120° desde el ángulo

de desplazamiento de la matriz. Así, se puede hallar la orientación matriz al hallar el ángulo de desplazamiento del hexágono. El perímetro hexagonal se puede hallar mediante la conexión de los centros de las cuentas adecuadas con sus vecinos, como se muestra en la figura 3C. Una función de partición que se desarrolló para todos los ángulos de la línea de partición hexagonales en los tres grupos esperados.

5 **I.2. Algoritmo para la formación de una cuadrícula en una imagen de fluorescencia de las fuentes de señales que contienen fuentes "oscuras" colocadas al azar**

Las etapas principales para hallar una cuadrícula en una imagen de una matriz de fuentes de señal de fluorescencia son como sigue:

1. Procesar la imagen de antes de hallar las líneas hexagonales;
- 10 2. En la imagen procesada, hallar centros de cuenta, construir líneas hexagonales, líneas de partición hexagonales y hallar el ángulo de orientación;
3. Hallar los límites de las filas;
4. Hallar los límites de las columnas;
5. Transformar la matriz completa en una alineación con el marco de la imagen (ángulo de orientación cero);
- 15 6. Hallar líneas de filas de la cuadrícula en la matriz transformada, y
7. Hallar líneas de columna de la cuadrícula en la matriz transformada.

Una descripción de las formas de realizar cada una de estas etapas se establece a continuación.

**Procesamiento de la imagen antes de hallar las líneas hexagonales**

Los objetivos de procesamiento de imágenes son:

- 20 - Reducir el ruido y falsas señales positivas en la imagen;
- Colocar tantas fuentes de señal como sea posible en la imagen.

Las etapas siguientes se utilizan para procesar una imagen de fluorescencia:

Reducir las fuentes de ruido velando la imagen;

Hallar los bordes de la imagen;

- 25 Afinar los bordes mediante erosión;

Resaltar los bordes, y

Convertir la imagen en una imagen binaria (es decir, cada posición de fuente de señal es "on" u "off").

**Hallar la orientación de la matriz**

Los parámetros de entrada para hallar el ángulo de orientación matriz son:

- 30 La imagen binaria en sí misma;

El tamaño de la fuente de señal (cuenta);

Distancia entre dos cuentas vecinas, o Distancia de cuentas;

Distancia entre filas, o Distancia de filas.

- 35 Una matriz puede ser colocada en una cuadrícula utilizando un conjunto de líneas a lo largo de la dirección de la fila y dos conjuntos de líneas a lo largo de la dirección de la columna (con el fin de tener en cuenta las cuentas que están desplazadas de las líneas). Teniendo en cuenta las pequeñas variaciones en la fabricación de chips y de la imagen de la matriz, las distancias reales entre cuentas y las distancias entre las líneas de cuentas en general variará ligeramente, es decir, no se puede simplemente insertar líneas de la cuadrícula utilizando dimensiones de "diseño" y estas líneas deben ser construidas de forma explícita a partir de la propia imagen.

- 40 Utilizando la imagen binaria, se buscan señales positivas, y luego se determina si una "mancha" representa un fuente de señal (tal como una cuenta). Una mancha se designa como fuente si sus dimensiones, tanto en la dirección X e Y están cerca de las dimensiones de cuentas previstas. Cuando una cuenta se encuentra, la posición de su centro se determina y se almacena en una lista. Como se describe aquí más adelante, posiciones del centro

pueden ser refinadas según sea necesario con el fin de mejorar la precisión del valor de intensidad registrada a partir del campo de la cuadrícula que contiene cualquier cuenta dada. A partir de la lista de posiciones centrales de cuentas, se construye una lista de todas las líneas del hexágono de la imagen mediante el examen de la relación entre cada cuenta y las líneas hexagonales existentes.

5 Hay cuatro tipos de relaciones posibles entre las cuentas y las líneas del hexágono:

1. Una cuenta está fuera de la distancia de las cuentas para cualquier cuenta incluida en cualquier hexágono existente.

Resultado: la posición de la cuenta se almacena para incluir en un hexágono potencial, a determinar. Para facilidad de aplicación, se puede tratar esta cuenta como un hexágono especial, que tiene una cuenta.

10 2. Dos cuentas son vecinas y la distancia entre ellas se ajusta a la distancia de cuentas.

Resultado: Una línea de hexágono se dibuja entre sus centros (como se muestra en la figura 3D).

3. Una cuenta está en una línea hexágono y es vecina a una cuenta en la misma línea, pero en una parte distal de dicha línea.

15 Resultado: La línea de hexágono se extiende y la cuenta se añade al final de la línea (como se muestra en la figura 3E).

4. Una cuenta no está en una línea de hexágono, pero es una vecina a una o dos cuentas que están en una línea de hexágono.

Resultado: Nuevas líneas se añaden, conectando la cuenta, y las nuevas líneas también se añaden a la lista de línea hexágono (como se muestra en la figura 3F).

20 El algoritmo para la construcción de las líneas hexagonales se describe a continuación.

Para cada cuenta central

{

Obtener una línea de la lista existente de líneas de hexágono

{

25 Comprobar la relación de la cuenta actual con esta línea de hexágono.

Si la relación es cualquiera de 2 a 4 mencionados anteriormente

{

Actualizar esta línea de hexágono.

Actualizar la lista de hexágono línea.

30 }

Si la relación es "1" desde arriba, entonces

guardar esta cuenta como una línea de hexágono formado por una cuenta.

}

}

35 Después de la construcción de todas las líneas del hexágono, se dividen en grupos de acuerdo con el ángulo de desalineación, es decir, el ángulo desde la horizontal (y/o desde la vertical) utilizando una variación preestablecida de cada grupo (correspondiente a la variación aceptable en la orientación de la matriz) de +/- 15°. Debe haber por lo menos tres grupos de líneas. Esto es así porque, si todas las líneas hexagonales están incluidas, las líneas dentro de cada grupo pueden ser orientadas, respectivamente, en o cerca de 0°, 60° y 120°. A partir de los ángulos de  
40 orientación media del conjunto de líneas en cada uno de los tres grupos, se pueden determinar las compensaciones de 0°, 60°, y 120°, respectivamente, y de esta a su vez, la alineación de la matriz. Para mejorar la eficiencia y la precisión, el algoritmo establece que cualquiera de las dos líneas hexagonales que se encuentran a lo largo de la misma línea, se conectan y se combinan en una línea de tiempo.

45 La función de partición desarrollada como parte de este algoritmo toma un conjunto de datos (los puntos que forman una línea) y se determina una variación preestablecida para cada grupo, y la desviación en la alineación de cualquier

línea de la media debe estar dentro de la varianza en los límites para esa línea para ser incluidas en el grupo apropiado. A continuación se muestra una descripción pseudocódigo de esta función.

Para todos los datos del conjunto de datos de entrada

{

5           Obtener un grupo a partir del conjunto existente de grupos

          {

                  Obtener la distancia de los datos actuales a partir de la media del grupo actual.

                  Si la distancia es menor que el tamaño de la varianza estándar,

                          añadir los datos actuales del grupo, y

10                    actualizar la media de ese grupo.

                  Si no, intente el siguiente grupo.

          }

          Si los datos actuales no encajan en ningún grupo,

                  crear un nuevo grupo con los datos actuales}

15   Después de clasificar los grupos en función de su tamaño, los tres primeros (más grandes) grupos se designan como grupos de líneas principales. Entre estos tres grupos de líneas principales, se debe hallar un grupo de líneas ya sea cerca de  $90^\circ$  o cerca de  $0^\circ$ . Ese grupo es designado como un grupo de fila. El tipo de grupo de filas determina si la matriz tiene líneas verticales de cuentas o líneas horizontales de cuentas (ver la figura 3A y 3B). Si un grupo de filas está cerca de  $0^\circ$ , entonces la matriz tiene líneas horizontales o filas, si un grupo de filas está cerca de  $90^\circ$ , entonces la matriz tiene líneas verticales, también denominadas como filas verticales. El desplazamiento de un grupo de filas de  $90^\circ$  o de  $0^\circ$  es el ángulo de alineación de la matriz.

### Robustez del algoritmo de la cuadrícula de hallazgo

25   La ocupación de la cuenta en una imagen fluorescente puede variar, y si la ocupación es demasiado baja, puede ser difícil construir la cuadrícula. Se puede simular el efecto de la reducción de ocupación, comenzando con una imagen con una ocupación de cuenta suficiente para llevar a cabo un cálculo de la orientación. La simulación entonces lanza hacia fuera las cuentas secuencialmente de una manera aleatoria y la orientación se vuelve a calcular. El ángulo de orientación se utiliza para determinar la robustez del algoritmo, ya que es una etapa crítica en el algoritmo.

30   Tal como se ilustra en la figura 13, la robustez del algoritmo depende del número de cuentas brillantes en una imagen fluorescente. El eje X de la figura 13 representa la ocupación fraccional y el eje Y representa el ángulo de desalineación. Hay un máximo de 4012 cuentas en una imagen. A partir de alrededor de 3000 cuentas, la desalineación es muy pequeña. Cuando el número de cuentas disminuye aún más, la falta de alineación se mantiene estable, hasta que la ocupación se reduce a aproximadamente 700/4012, en cuyo punto el algoritmo falla. Dado que el algoritmo busca en los vecinos de cuenta más cercanos para formar líneas hexagonales, que depende de las líneas hexagonales para determinar el ángulo de orientación. Una cuenta tiene un máximo de 6 vecinos. En teoría, si todos los 6 vecinos se han perdido y resta un sexto de las cuentas, el algoritmo no será capaz de generar una línea de hexágono. En una imagen, hay un máximo de 4012 cuentas, y sexto de cuentas es aproximadamente 700. El experimento, por lo tanto, está de acuerdo con la predicción teórica.

40   Para la seguridad y precisión, debe haber al menos 1000 cuentas para la segmentación exitosa de una cuadrícula cuando se utiliza una imagen fluorescente. En otras palabras, la ocupación de la imagen debe ser de al menos 25% para hacer que el algoritmo funcione. Exigir un 25% de ocupación demuestra que el procedimiento aquí descrito es, en efecto robusto.

### Hallar los límites de la fila

45   Para mejorar la precisión del proceso de localización de los límites de la matriz, el procedimiento descrito aquí invoca una caja límite que rodea una matriz y luego calcula su ángulo de orientación de nuevo y encuentra el centro de la matriz.

En el hallazgo de la caja, primero se busca la primera y la última fila de la matriz. Las etapas del hallazgo de las mismas son:

1. Proyectar todos los centros de cuentas a lo largo de la dirección de las filas;

Para cada centro de cuenta (x, y), calcular su posición proyectada (x, y), que es la posición en la matriz cuando está en su ángulo de orientación.

```
{
    Proyectado X = x + y * tan (ángulo de orientación);
5    Proyectado Y = y - x * tan (ángulo de orientación);
}
```

Los resultados de partición de todas las posiciones proyectadas (X, Y) en grupos de datos;

Si las filas son verticales, dividir todos los valores de x proyectados en grupos. Si las filas son horizontales, dividir todos los valores de y proyectados en grupos. Cada grupo tiene un tamaño de varianza +/- (Distancia de Fila Proyectada/ 3), donde Distancia de Fila Proyectada = Distancia de Fila/cos (ángulo de orientación).

Ordenar los grupos de datos divididos, y hallar dos grupos de límites;

Las condiciones para un grupo de límite son:

- (i) El grupo está en un extremo y tiene al menos 4 centros de cuenta;
- (ii) Su distancia al siguiente grupo está cerca de la Distancia de Fila Proyectada.

15 Estas dos condiciones impiden seleccionar, por error, grupos de ruido como los grupos de límite.

A continuación, comprueba el resto de los grupos en las filas proyectadas entre los dos grupos de límites y mantiene grupos cuya distancia a sus vecinos está cerca de la distancia entre filas.

20 Para ilustrar las etapas anteriores, se muestra una matriz en la figura 4 como ejemplo. Esta serie cuenta con 17 filas y 11 columnas. Puntos oscuros simbolizan los grupos de divisiones de los centros proyectados. Después de hallar la primera fila y la última fila, se pueden trazar las líneas de límite de dos filas, que se ilustran en el perímetro superior e inferior de la figura 4.

### Hallar los límites de las columnas

25 Después de hallar límites de fila, se separan los centros de cuenta en dos grupos. Un grupo contiene cuentas de filas de número impar contadas en un orden ascendente de las posiciones de fila, sobrepuestas por líneas de trazos en la figura 5, y el otro grupo contiene cuentas de filas de número par, superpuestas por líneas de puntos en la figura 5. Para ambos grupos de centros de cuenta, se realizan las etapas siguientes:

- 1) Proyectar centros a lo largo de la dirección perpendicular de las filas;
- 2) Recoger todos los valores X de los centros proyectados si las filas son horizontales o recoger todos los valores Y de los centros proyectados si las filas son verticales, y

30 3) Dividir los valores recogidos en grupos. Cada grupo tiene un tamaño de varianza +/- (Distancia de cuentas proyectada/3), donde

Distancia de cuentas proyectada = Distancia de cuentas/Cos (Ángulo de orientación).

4) Organizar grupos de divisiones, hallar dos grupos de límite.

Las condiciones para un grupo de límite son:

- 35 (i) El grupo es un grupo terminal y tiene al menos 3 centros de cuenta;
- (ii) su distancia al siguiente grupo está cerca de la Distancia de Cuentas Proyectada.

5) Revisar el resto de grupos entre los dos grupos de límite. Conservar los grupos cuya distancia a sus vecinos está cerca de la Distancia de cuentas;

40 Después del proceso, se tienen 4 grupos de límite, cada uno perpendicular a la dirección de las filas. Dentro de estos 4 grupos de límite, uno conserva los dos grupos que son límites de las columnas para todas las columnas, como se ilustra por las dos líneas verticales en el perímetro de la figura 5.

### Transformación de la orientación de la matriz en alineación con el marco externo

La siguiente etapa es la de transformar la matriz de modo que el ángulo de orientación sea de 0° a la horizontal. Primero se compone un rectángulo alrededor de la imagen con dos límites de fila y dos límites de columna. Teniendo en cuenta el ángulo de orientación (calculado anteriormente) y el centro del rectángulo de límite (que está determinado) se genera una matriz de transformación para rotar la imagen fluorescente mediante la cantidad deseada.

**Hallar líneas de cuadrícula de filas en la matriz transformada**

Para hallar las líneas de cuadrícula que representan los límites de los campos entre cuentas, uno utiliza los centros de cuenta determinados en las etapas anteriores. Pero primero, se transforman todos los centros de cuenta dentro del rectángulo límite mediante la misma transformación utilizada para la rotación de la matriz, para colocarlos donde se desee.

Utilizando centros de cuenta transformados, se realizan etapas similares a las utilizadas en el hallazgo de los límites de la matriz antes de la transformación. Las etapas son las siguientes:

1. Si las filas de la matriz son verticales, se recogen todos los valores en el eje X de centros de cuenta transformados en un conjunto de posiciones de fila designados. Si las filas de la matriz son horizontales, se recogen todos los valores en el eje Y de centros de cuenta transformados en un conjunto de posiciones de fila designadas;
2. Dividir todos los datos en el conjunto de posiciones de fila en grupos. Cada grupo tiene un tamaño de varianza +/- (Distancia de fila/3);
3. Ordenar todos los grupos en orden ascendente de los medios del grupo. Eliminar grupos donde la distancia a los grupos de vecinos no está lo suficientemente cerca a la distancia entre hileras. Tales grupos podrían ser eliminados "falsos positivos" de ruido, o podría ser "flotantes" cuentas (no adherida al sustrato sobre el que se forma la matriz);
4. Comprobar si hay grandes diferencias entre los grupos. Si es así, se llena en un número apropiado de grupos para llenar efectivamente el espacio;
5. Los medios de los grupos divididos son posiciones de todas las filas. Por cada dos filas, se calcula la posición central como una posición de línea de la cuadrícula entre ellas. Así, se obtiene una lista de las líneas de cuadrícula con sus posiciones en un orden clasificado, y
6. Se extiende la lista de línea de la cuadrícula mediante la adición de dos líneas en ambos extremos de cada línea en la lista, a una Distancia de Fila a la primera y a las últimas líneas de la cuadrícula, respectivamente.

**Hallar líneas de la columna de cuadrícula en la matriz transformada**

Después de hallar todas las posiciones de fila y sus líneas de cuadrícula, se encuentran dos conjuntos de líneas de la cuadrícula de columnas. Una primera separa centros de cuenta transformados en dos grupos. Un grupo contiene todas las cuentas de las filas de números impares, contadas en un orden ascendente de las posiciones de fila, mientras que el otro grupo contiene todas las cuentas de las filas de número par.

Para cada grupo, se aplican etapas similares a las del hallazgo de líneas de cuadrícula para las filas, pero con los datos que representan las diferentes dimensiones y las distancias entre las columnas. Al final del proceso, se tiene un conjunto de líneas de la cuadrícula de fila y dos conjuntos de líneas de la cuadrícula de columna (los dos conjuntos de líneas están desplazados entre sí por la mitad de una cuadrícula debido a una colocación escalonada de las columnas, (como se muestra en la figura 3C)).

Una vez que la cuadrícula está establecida para una imagen fluorescente, debe estar alineada con las imágenes fluorescentes de otros canales de color, para evitar tener que establecer una cuadrícula de novo para cada imagen fluorescente.

**II. Alineación de la imagen utilizando bordes; Alineación de otras cuadrículas a continuación**

Las imágenes fluorescentes a menudo residen en varios canales de color. Por ejemplo, una matriz sobre un único sustrato puede incluir imágenes verde, naranja y UV fluorescente. Debido a las variaciones ópticas, hay cambios en las imágenes fluorescentes entre canales de color diferentes. Los desplazamientos en las imágenes están en las direcciones x, y, y son los desplazamientos no aparecen cuando las imágenes se rotan. Las imágenes pueden ser alineadas entre sí para eliminar estos cambios.

El algoritmo siguiente se puede utilizar para hallar la cuadrícula para una imagen fluorescente, y usar la información de cuadrícula para su alineación con las otras imágenes fluorescentes. El algoritmo convencional usado en el hallazgo de la cuadrícula de una imagen fluorescente se basa en hallar el perfil de intensidad para una matriz de imágenes fluorescentes. Como se indicó anteriormente, y como se ilustra en las figuras 6A a 6C, no funciona bien para las imágenes con muchas fuentes de señales oscuras en los bordes, como se muestra en la figura 6C. Como se ilustra en la figura 6A, el pico del perfil de intensidad está en la posición de centro de cuentas, para cuentas fluorescentes como se muestra en la figura 6A. Pero el pico de máxima intensidad de cuentas oscuras se halla entre

las cuentas, para cuentas oscuras como se muestra en las figuras 6B y 6C. Si muchas cuentas de la matriz no están iluminadas, los picos de intensidad no se pueden hallar, y el perfil de pico de intensidad no siempre coincide con las posiciones centrales de las cuentas fluorescentes, causando un fallo de alineación.

5 El perfil del borde de la matriz se determina examinando la diferencia entre píxeles cercanos a los bordes de la matriz (la señal a partir de cada cuenta está formada por varios píxeles). No importa si se vieron cuentas oscuras o cuentas iluminadas, un pico siempre está presente en el borde (ver las figuras 6A a 6C). El uso de este pico para la alineación permite la eliminación del efecto de cuentas oscuras en la alineación.

El pseudocódigo para el algoritmo de alineación es el siguiente:

```

FindColorGrid (colorimage, Grid, RotAngle) /** Encuentra la cuadrícula y rotación de imagen de fluorescencia **/
10 PARA (cada imagen de fluorescencia a procesar)
{
    LoadImage (Imagen);
    RotatImage (Imagen, RotAngle); /** rotar la imagen para obtener horizontal y configuración vertical **/
    GenerateEdge (Imagen, EdgeProfile);
15    AlignImage (EdgeProfile, Grid); /** alinear el perfil de borde con la imagen de la cuadrícula **/
}

```

20 Una vez que la cuadrícula se ha encontrado y las imágenes de fluorescencia han sido alineadas, se pueden extraer los valores de intensidad de los canales de color diferentes para formar un gráfico de dispersión multi-dimensional de las intensidades de señal de fuente procedentes de dos o más canales de color. El diagrama de dispersión se convierte en un mapa de fuente de señal, un ejemplo es un mapa de decodificación, mediante un algoritmo de agrupamiento automático que se describe a continuación.

### III. Corregir desplazamientos en la posición de las cuentas desde el centro de un campo de cuadrícula, mediante el examen de la región donde la intensidad es máxima

25 Un fuente de señal (por ejemplo, una cuenta), cuando es más pequeño que el campo de cuadrícula, puede ser desplazado desde el centro del campo. Tales cambios aleatorios laterales en posición de la cuenta dentro de los campos de cuadrícula se pueden corregir con el fin de mejorar la exactitud del análisis.

30 Se puede ver la distribución de intensidad a través de un único fuente, tal como una cuenta dentro de un campo de cuadrícula dado a través de una ventana ("máscara") que se coloca sobre cada campo de cuadrícula, siendo la máscara generalmente elegida para ser más pequeña que el campo de cuadrícula. Si la cuenta no se encuentra en el centro del campo de cuadrícula, ver la intensidad a través de la ventana reducirá la intensidad media calculada a partir de la serie de lecturas de intensidad discretas para cada píxel de la máscara. Como resultado, la imagen de ensayo o de decodificación de imágenes, y los mapas de fuente correspondientes, mostrará regiones de "falsas" reducciones de la intensidad.

35 El campo de cuadrícula con una ventana se ilustra en la figura 7, donde el cuadrado grande definido en parte por las líneas de puntos indica un campo de cuadrícula, y la ventana está definida dentro del campo de cuadrícula. La ventana es el tamaño de la cuenta, y se mueve alrededor del campo de cuadrícula a varias posiciones. En la figura 7, la ventana se lleva a la posición 0 y a la posición N. La intensidad media de la totalidad de los píxeles dentro de la ventana se calcula en cada posición. Como se muestra en la figura 7, cuando la ventana está sobre la posición de cuenta verdadera, esto proporciona la señal de intensidad máxima.

40 Tenga en cuenta que la región del límite de la cuadrícula de campo en la figura. 7 no está incluido en las posiciones de hallazgo en la ventana, dado que la región límite puede tener un exceso de ruido, causado por las cuentas vecinas. Excluyendo el examen de la región límite, por lo tanto, hace el algoritmo más robusto.

45 Hay otra condición previa en el uso de la ventana. Si la intensidad de la cuenta en un campo de cuadrícula es débil, la intensidad media en el centro del campo de cuadrícula se usa como la intensidad real. La razón de este ajuste es que las cuentas débiles están sujetas a la interferencia a partir del ruido, especialmente cerca de los límites de cuadrícula de campo, y la región del centro de un campo de cuadrícula proporciona resultados más consistentes.

50 Se determina que una cuenta es débil si su intensidad es inferior a un umbral dinámico. La intensidad de fondo chip se calcula midiendo primero la intensidad media en la región fuera de la serie de cuentas. Si se determina que la intensidad de la cuenta es menor que la intensidad de fondo en un porcentaje especificado, la cuenta será tratada como una cuenta débil, y su intensidad sólo se medirá en el centro de la cuadrícula de campo.

```

GetBackgroundIntensity (Bintensity);
FOR (cada celda de la cuadrícula en la imagen fluorescente)
{
    EvaluateGridCellIntensity (OIntensity);
5    IF (OIntensity> Bintensity * 1,2)
    {
        /** Mover cuadro alrededor de la celda de cuadrícula y hallar intensidad. Nota 2 es la el margen **/
        FOR (i = 2; I <GridWidth-2; I++)
        {
10            FOR (j = 2; J <GridDepth-2; J++)
            {
                GetBoxAreaIntensity (I, J, BoxIntensity (I, J));
            }
        }
15        /** La intensidad máxima es la intensidad de la celda de la cuadrícula **/
        FindMaxBoxAreaIntensity (BoxIntensity (I, J));
    }
    ELSE
    {
20        /** Utilice la intensidad caja central para la cuadrícula débil **/
        GetCentralBoxIntensity ();
    }
}

```

#### IV. Agrupamiento divisorio automatizado a continuación de la transformación para un formato de imagen

25 Una etapa crítica en la decodificación de un mapa de fuente de señal en la forma de una imagen de ensayo es la construcción de un mapa de decodificación mediante la agrupación de cuentas del mismo tipo. Un mapa de decodificación (también mapa de grupo o mapa de cuenta) es una representación multidimensional de grupos de intensidades que representan el nivel de codificación de varios colorantes dentro de cada cuenta; estas intensidades se registran en dos o más canales de color. La figura 8 es un mapa de decodificación típico bidimensional, recogido  
30 utilizando dos canales de color.

Dado un diagrama de dispersión de puntos, cada uno de dichos puntos representa una intensidad de codificación, una operación de agrupación agrupa puntos situados cerca uno del otro en el gráfico de dispersión en grupos al que se asigna una etiqueta con un número. Un mapa de decodificación contiene, por lo tanto, para cada grupo, una posición (por ejemplo, la del centroide) y una etiqueta.

35 Para lograr un alto rendimiento en la etapa de decodificación, el agrupamiento automático es esencial. En la agrupación automática se empieza con un mapa de descodificación convencional y a partir de eso, se genera una plantilla de mapa de decodificación de proyecto, con grupos en las mismas posiciones que el mapa original, pero sin el etiquetado de los grupos.

#### Conversión de un mapa de decodificación en un formato de imagen para el agrupamiento automático

40 En agrupación automática, se comienza con un mapa de decodificación y se lo convierte en un formato de imagen, y se aplica un algoritmo de división a esa imagen con el fin de agrupar las cuentas por intensidades de codificación cada vez más altas dentro de la imagen. Dentro del formato de la imagen, también se puede aplicar procedimientos de procesamiento de imágenes o de filtrado, por ejemplo para eliminar los puntos en la gráfica de dispersión que se

consideran como "atípicos". Las etapas en el proceso de conversión son las siguientes:

1. Dibujar las líneas de cuadrícula a lo largo de ambas dimensiones del mapa de cuentas de dispersión trazado en la resolución deseada (se utilizaron 128 líneas en ambas dimensiones en la figura 8);

5 2. Para cada cuadrícula de campo, calcular el número de puntos (es decir, fuentes de señal, incluyendo cuentas) a partir del mapa de cuentas trazado de dispersión cayendo en ese campo de cuadrícula, y

3. Tratar cada campo de cuadrícula como un píxel y el número de puntos dentro de esa celda como un valor de píxel.

10 La figura 9 muestra el resultado de la conversión de la imagen del mapa de cuentas en la figura 8, cuando se utiliza una resolución de 128 cuadrículas en ambas dimensiones. Las cuadrículas de color más claro indican un menor número de puntos, mientras que las cuadrículas de color más oscuro indican más puntos.

**Algoritmo de división: a los grupos se les asigna un número para que su ubicación sea conocida**

15 El procedimiento de división del hallazgo de intensidad en una imagen es bien conocido en el procesamiento de imágenes y se describe en, por ejemplo, "Procesamiento Digital de Imágenes", K. R. Castleman, Prentice Hall Press. Se utiliza para hallar los niveles de intensidad por tratamiento de los segmentos de diferentes niveles de intensidad de una imagen como cuencas de diferente profundidad. A continuación, simula las precipitaciones en las cuencas hasta que todas las cuencas están llenas. Los resultados del procedimiento de división se ven afectados principalmente por la posición inicial de cada segmento, antes de simular lluvia. En esta aplicación, la posición inicial de un clúster estará en o cerca de la parte central y la más densa posición de dicho grupo, con el fin de evitar resultados erróneos.

20 **1. Hallar un rectángulo delimitador para el mapa de cuentas**

Un mapa de cuentas puede ser encerrado en un perímetro, por ejemplo, una caja rectangular que se muestra en la figura 10.

25 Para encerrar el mapa de cuentas de la figura 10, se encuentra una región que encierra todos los grupos, que, en este ejemplo, son grupos cuyas posiciones son entre 2,50 a lo largo del eje X y 4,25 a lo largo del eje Y. Los grupos por debajo de 2,50 son generalmente de orificios en el sustrato sobre el que se forma la matriz. El número de orificios puede variar mucho, y por lo tanto la región del mapa de cuentas por debajo de 2,5 no es estable y no se incluye en el cálculo. Las etapas para hallar el perímetro de delimitación de un mapa de cuentas son:

1. Convertir la región del grupo del mapa de cuentas (desde 2,50 en la dirección X hasta 4,25 en la dirección Y en el mapa cuenta de la figura 10), en una imagen;

30 2. Aplicar una técnica de filtro de suavizado para suavizar la imagen y eliminar algo de ruido, lo cual es un procedimiento de procesamiento de imágenes, bien conocida y que se describe, por ejemplo, en "Algoritmos prácticos para el análisis de imágenes", M. Seul, L. O'Gorman, M.J. Sammon;

35 3. Aplicar erosión, que es otro procedimiento de procesamiento de imagen, bien conocido y que se describen en, por ejemplo, "Algoritmos prácticos para el análisis de imágenes", M. Seul, L. O'Gorman, M.J. Sammon, para eliminar los bordes débiles alrededor de cada grupo;

4. Hallar el rango de posición tanto en las dimensiones X e Y de todos los pixeles (donde la señal de cada cuenta está dividida en varios píxeles), cuyo valor es superior a un umbral de 5; dicho umbral se selecciona basándose en la experiencia y las pruebas, y

5. Hacer una caja rectangular para cubrir el rango de posición de píxel tanto en las dimensiones X e Y.

40 En la figura 11A y 11B los rectángulos delimitadores se muestran, para respectivamente, la plantilla de mapa de cuentas (mostrando el tipo y la posición del grupo) y el proyecto de mapa de cuentas (que muestra sólo los grupos, no sus tipos, y su posición). Los grupos en el proyecto de mapa de cuentas terminan más abajo.

**2. Transformar un mapa de decodificación en otro: plantillas adaptables**

45 Después de hallar rectángulos delimitadores tanto para la plantilla del mapa de cuentas y el mapa de cuentas de proyecto, se puede establecer una transformación entre los dos rectángulos delimitadores de modo que se puede transformar un punto en la plantilla de mapa de cuentas a una posición relativa en el proyecto de mapa de cuentas. Supongamos que aquí se conoce el rectángulo delimitador para un proyecto de mapa de cuentas de plantilla por su esquina inferior izquierda (TLBx, TLBy), su anchura (TemplateW) y su altura (TemplateH). Y suponemos que también se conoce el rectángulo delimitador en un proyecto de mapa de cuentas por su esquina inferior izquierda (PLBx, PLBy), su anchura (ProjectW) y su altura (ProjectH). Para transformar un punto (x, y) en plantilla a una posición (u, v) en el mapa de cuentas de proyecto, se utiliza la siguiente fórmula:

$$u = PLBx + (x - TLBx) / TemplateW * ProjectW;$$

$$v = PLBy + (y - TLBy) / TemplateH * ProjectH.$$

También se puede transformar un punto (u, v) a partir del mapa de cuentas de proyecto a una posición (x, y) en una plantilla con la siguiente fórmula:

$$5 \quad x = TLBx + (u - PLBx) / ProjectW * TemplateW;$$

$$y = TLBy + (v - PLBy) / ProjectH * TemplateH.$$

### 3. Convertir el proyecto de mapa de decodificación en formato de imagen

Después de obtener el mapa de cuentas de proyecto, se puede convertir a un formato de imagen usando las mismas técnicas descritas anteriormente para convertir un mapa de cuentas y en un formato de imagen.

### 10 4. Transformar el rectángulo de delimitación para cada grupo

Aquí, cada grupo en una plantilla de mapa de cuentas se considera que está encerrado en un perímetro (aquí, una caja rectangular). Para definir un rectángulo delimitador de un grupo, se usa el rango de la posición de los puntos que forman el grupo. Para cada grupo en un mapa de cuentas de proyecto, se transforma el rectángulo delimitador para un formato de imagen de un mapa de cuentas de proyecto.

15 La figura 12 muestra los resultados después de la transformación del rectángulo delimitador de cada grupo en un formato de imagen de un mapa de cuentas de proyecto. Se puede observar que algunos rectángulos delimitadores transformados cubren algunas secciones de grupos vecinos.

### 5. Localización del punto de partida para cada grupo

20 Para cada rectángulo delimitador transformado para cada grupo, se convierte la región interior en una señal binaria utilizando un umbral de valores de píxel promedio en esa región. A continuación, se halla la mayor "mancha" de la imagen en la región binaria. El centro de la mancha más grande es el punto de partida de ese grupo.

### 6. Ejecutar el algoritmo de división

25 Aplicar el algoritmo de división con el punto de partida de cada grupo en el formato de la imagen para hallar la intensidad de la agrupación. Al final de este proceso, a cada píxel o bien pertenece a un grupo específico o a ningún grupo.

### 7. Convertir los resultados de un formato de imagen de nuevo al mapa de cuentas de proyecto (asignación de grupo de cada punto en el mapa de cuentas de proyecto)

30 Para cada punto el formato de imagen, hay que hallar el grupo al que pertenece en el mapa de cuentas de proyecto. Para ello, se encuentra que cada píxel pertenece a ese punto en el formato de imagen. A continuación, se copia la asignación de grupo de ese píxel a ese punto en el mapa de cuentas de proyecto.

35 Se debe entender que los términos, expresiones y ejemplos del presente documento son ejemplares y no limitantes, y que la invención sólo está definida en las reivindicaciones que siguen, e incluye todos los equivalentes de la materia objeto de las reivindicaciones. Las etapas del procedimiento en las reivindicaciones no están necesariamente en orden, y salvo que se especifique en la reivindicación, se puede llevar a cabo en cualquier orden, incluyendo el que se especifica en las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de hallazgo de una cuadrícula a partir de una imagen fluorescente de una matriz de fuentes de señal, que comprende:
- hallar los centros de fuente de la señal;
- 5 construir líneas que conectan las fuentes de señal vecinas en hexágonos;
- dividir líneas hexagonales;
- hallar un ángulo de orientación de la matriz;
- hallar los límites de las filas de la matriz;
- hallar los límites de las columnas de la matriz;
- 10 transformar la matriz completa en una alineación con el marco de la imagen, es decir, ángulo de orientación cero;
- hallar líneas de la cuadrícula de filas en la matriz transformada, y
- hallar líneas de la cuadrícula de columnas de la matriz transformada;
- caracterizado porque:
- si las filas de la matriz son verticales, recogiendo todas las coordenadas X de centros de fuente de señal transformados en un conjunto de posiciones de fila;
- 15 si las filas de la matriz son horizontales, recogiendo todas las coordenadas de centros de fuente de señal transformados en el conjunto de las posiciones de fila;
- dividir el conjunto de posiciones de fila en grupos, donde los grupos adyacentes están dentro de una primera distancia umbral;
- 20 calcular y clasificar grupos con el fin de agrupar las medias;
- eliminar grupos donde la distancia a un grupo vecino está dentro de una segunda distancia umbral;
- determinar si las diferencias entre los grupos exceden la primera distancia umbral, y, si es así, insertar un número apropiado de grupos, de manera que los grupos estén dentro de la primera distancia umbral entre sí;
- determinar las respectivas posiciones relativas de las filas basándose en la media de los elementos de perlas en las
- 25 filas respectivas;
- generar un conjunto de líneas de la cuadrícula de tal manera que las líneas de cuadrícula en el conjunto estén a medio camino entre filas adyacentes; y
- añadir una línea superior, paralela a las líneas de la cuadrícula y adyacente a la primera fila de la matriz, y añadir una línea inferior, paralela a las líneas de la cuadrícula y adyacente a la última fila de la matriz, estando dichas
- 30 líneas superior e inferior a una distancia a partir de la línea de cuadrícula respectiva más cercana, que es la misma que la distancia entre líneas de cuadrícula adyacentes.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que también incluye separar fuentes de señal transformados en dos grupos, donde uno de los grupos contiene fuentes de señal de filas numeradas impares, mientras que el otro grupo contiene fuentes de señal de filas numeradas pares.
- 35 3. Procedimiento según la reivindicación 2, que también incluye hallar dos conjuntos de líneas de la cuadrícula de columnas mediante la separación de las fuentes de señales transformadas en dos conjuntos, donde un conjunto contiene fuentes de señal de filas numeradas impares y el otro juego contiene fuentes de señal de las columnas numeradas pares.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las fuentes de señal individuales son perlas fluorescentes.

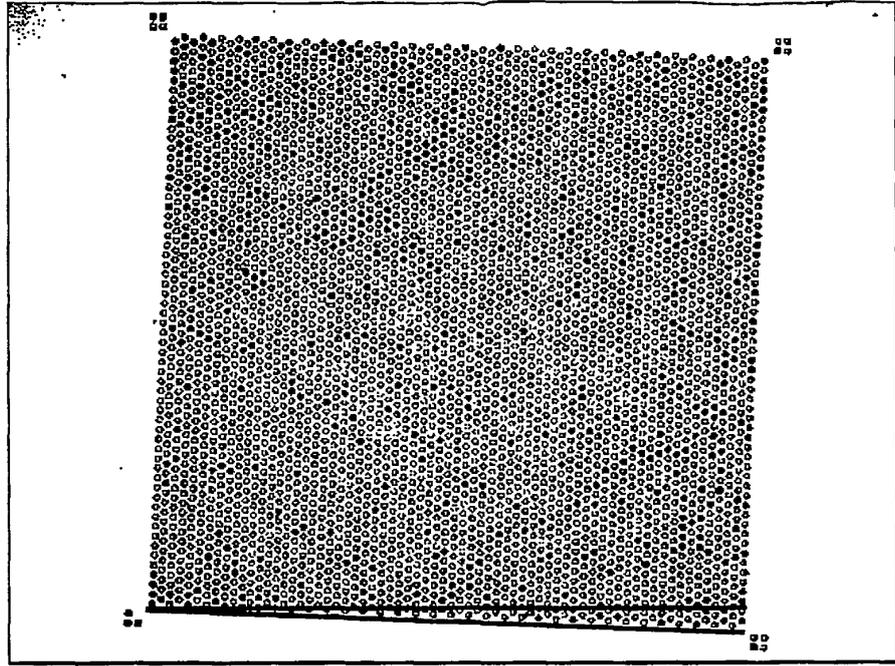


Fig. 1

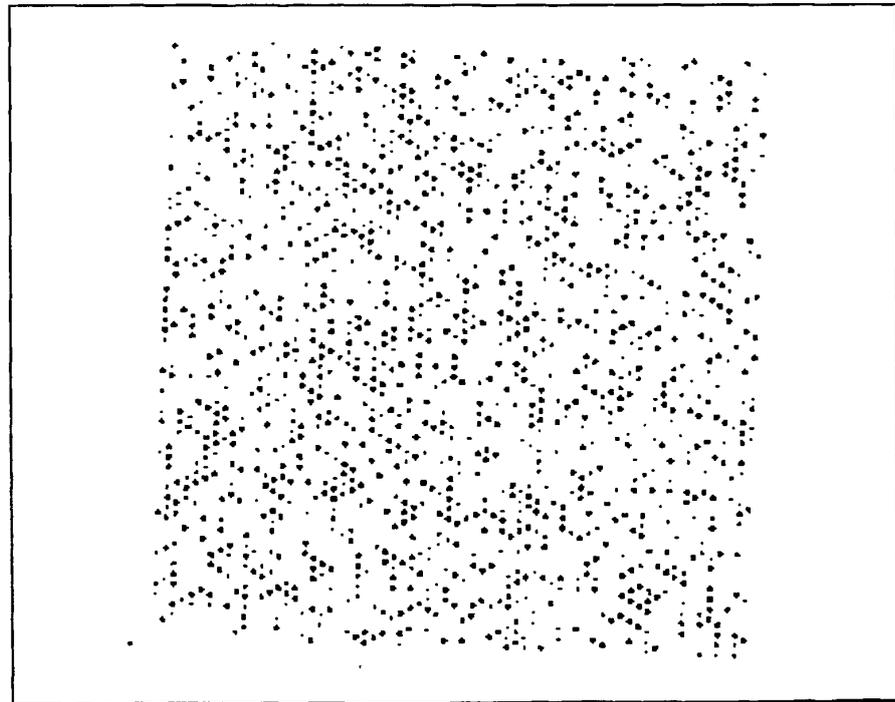


Fig. 2



Fig. 3A Horizontal

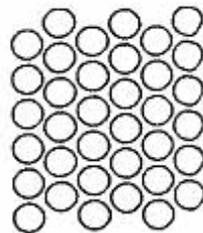


Fig. 3B Vertical

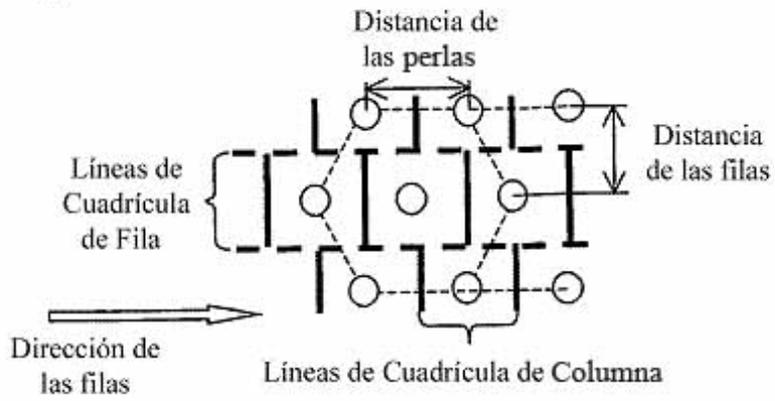


Fig. 3C

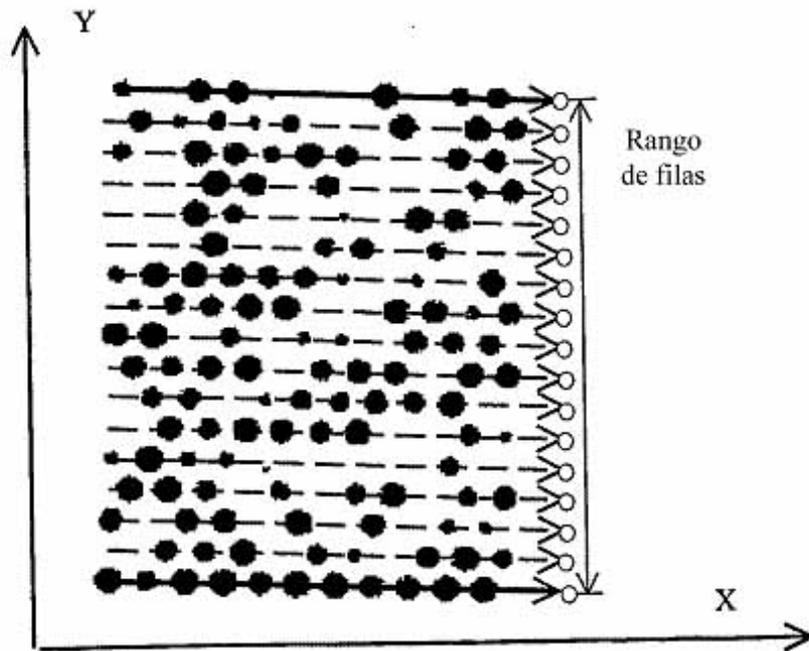


Fig. 4

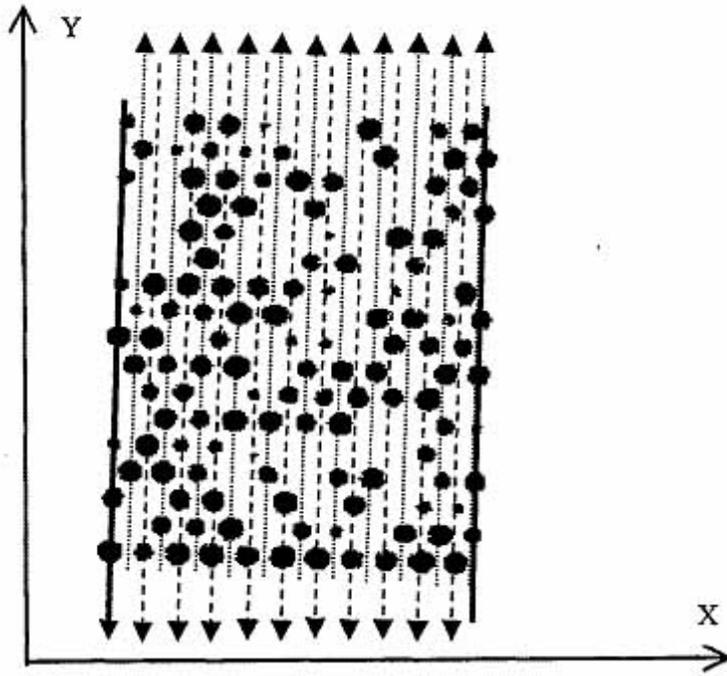


Figura 5

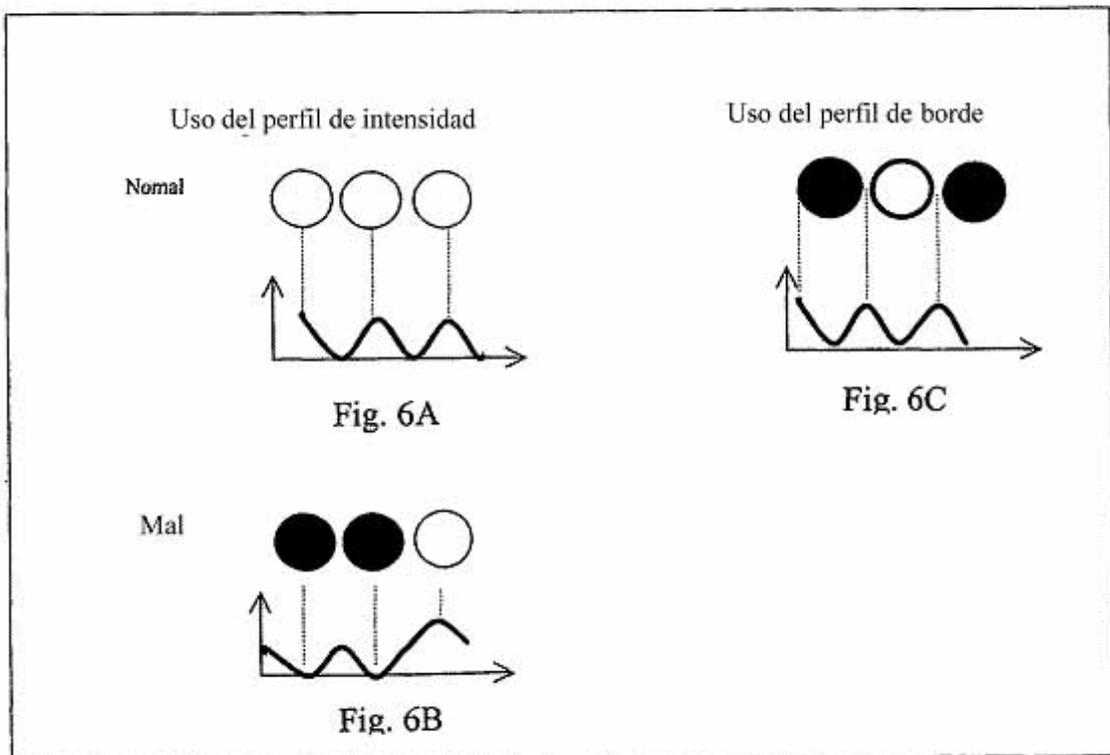
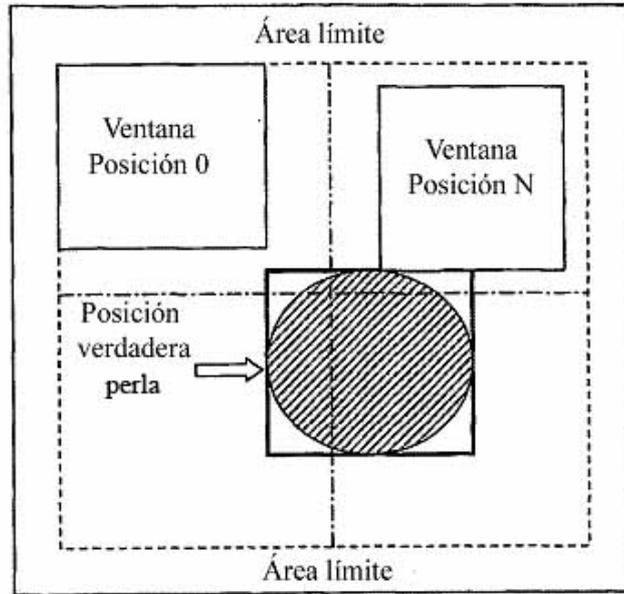


Fig. 7



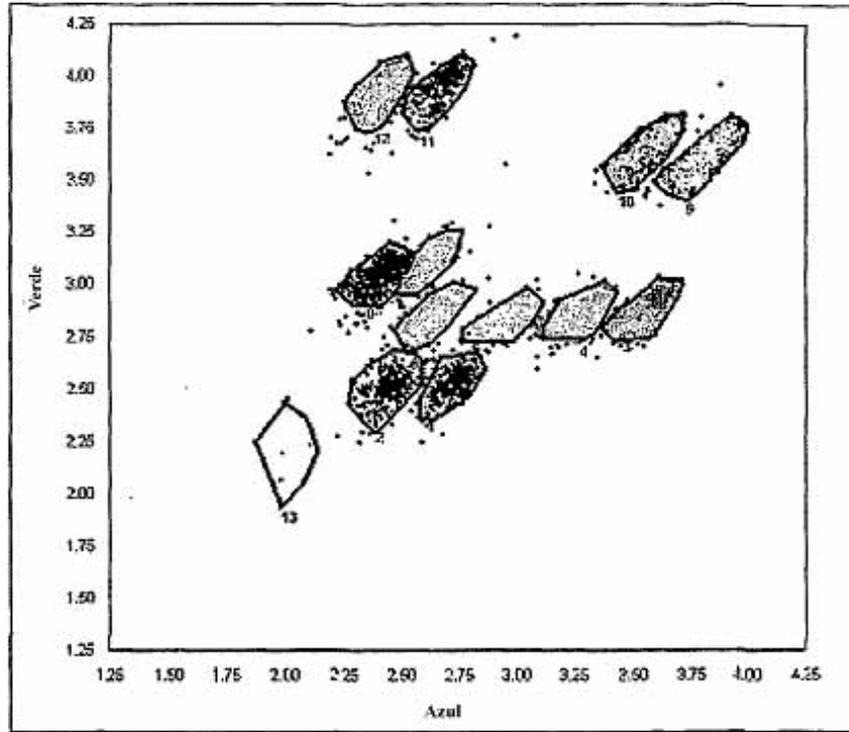
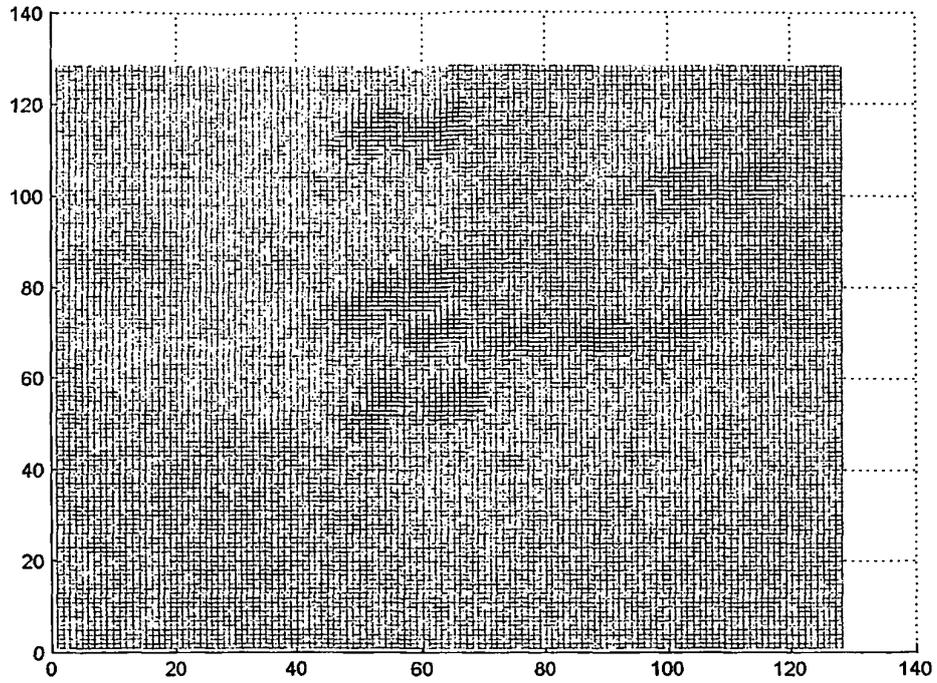


Figura 8 - plantilla de mapa de perlas



**Figura 9 - Trazado de la imagen; cada intensidad de pico tiene su propio valor**

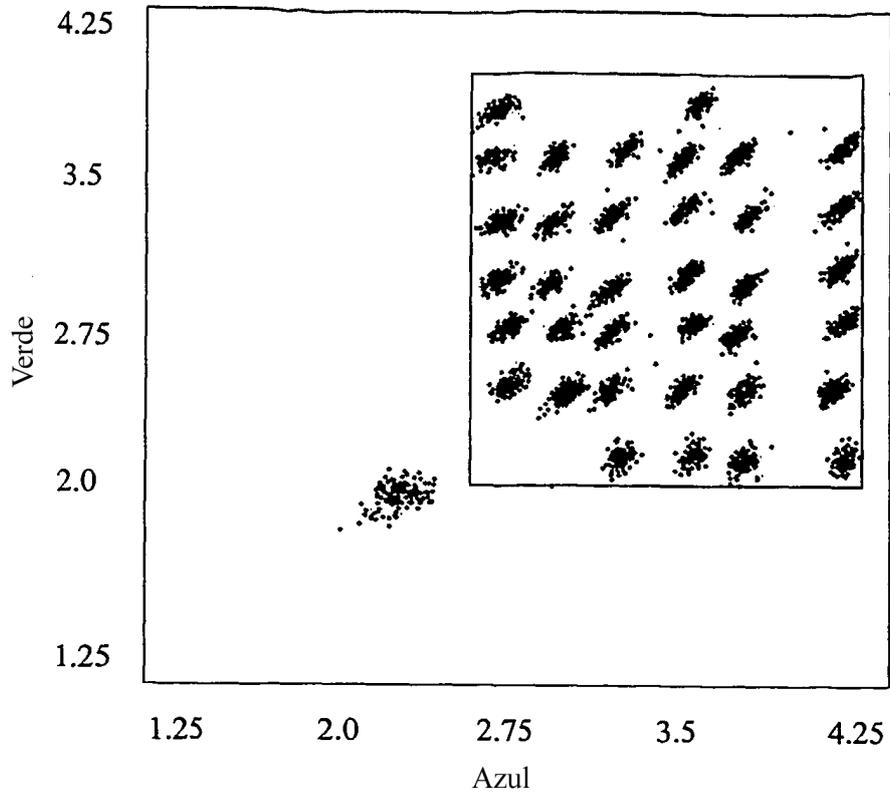
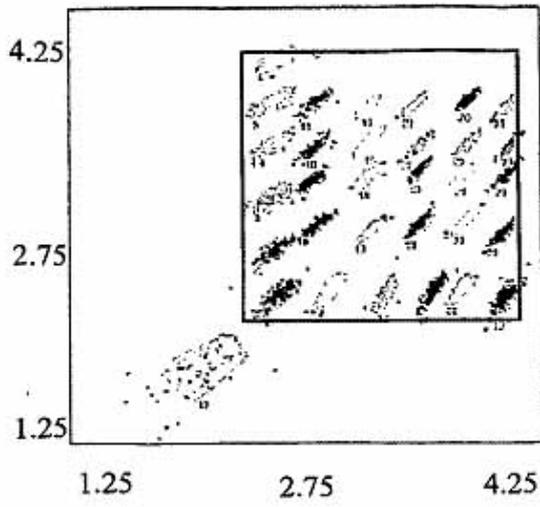
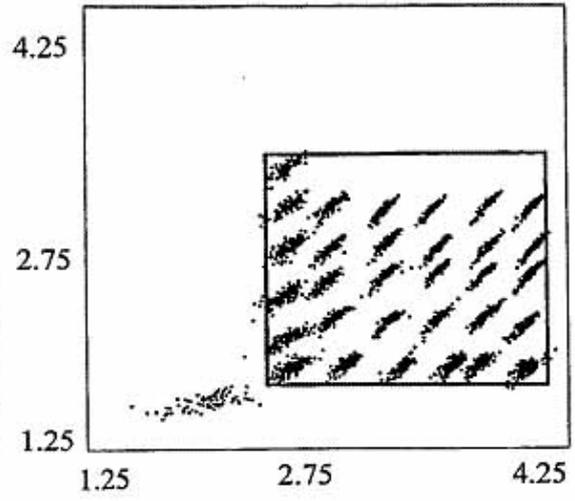


Fig. 10



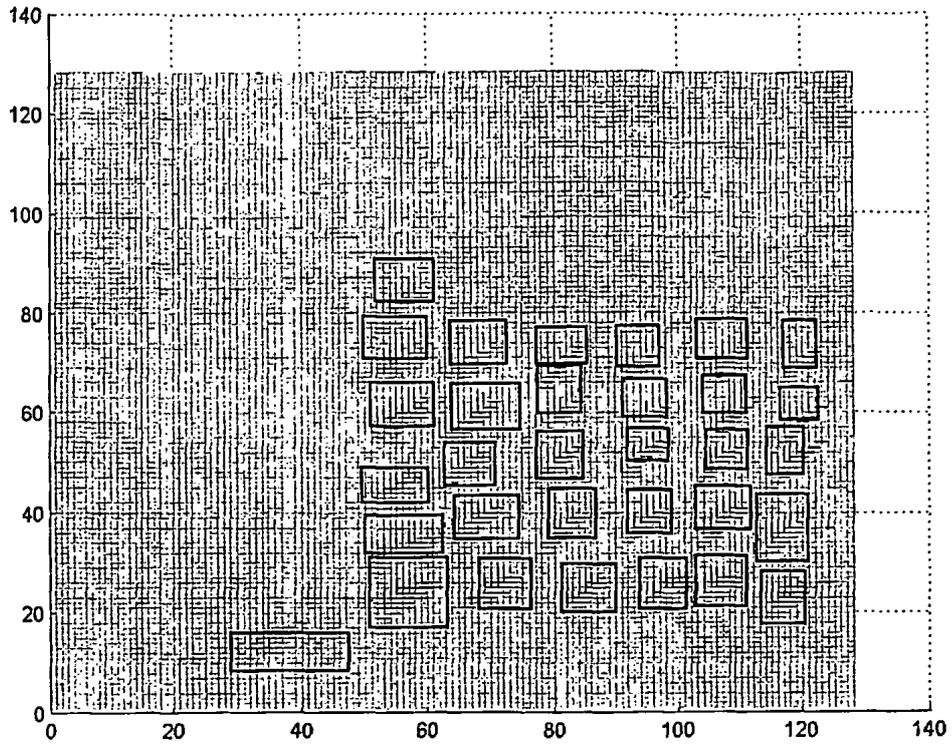
Plantilla de mapa de perlas

**Fig. 11A**



Proyecto de mapa de perlas

**Fig. 11B**



**Figura 12**

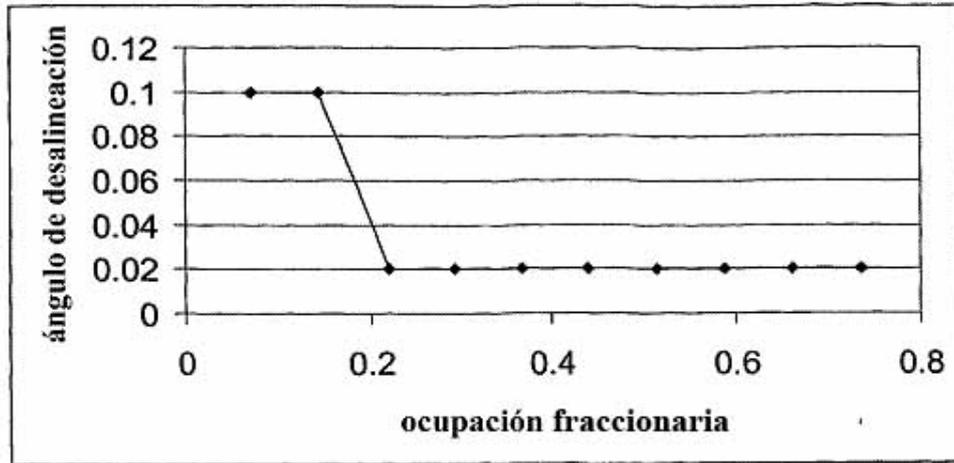


FIG. 13