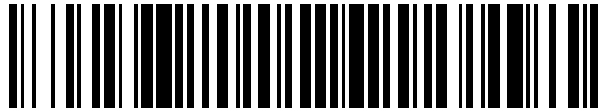


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 486**

51 Int. Cl.:

G02B 21/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2010 E 10707576 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2396690**

54 Título: **Procedimiento de preparación de una placa de análisis virtual tratada**

30 Prioridad:

13.02.2009 FR 0950950

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

23.12.2014

73 Titular/es:

**NOVACYT (100.0%)
13 avenue de Morane Saulnier
78140 Velizy Villacoublay, FR**

72 Inventor/es:

PELTIER, ERIC

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 525 486 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

Procedimiento de preparación de una placa de análisis virtual tratada.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una placa de análisis virtual de una muestra citológica dispuesta sobre una placa de análisis para permitir el análisis celular de dicha muestra, del tipo que comprende las etapas siguientes:

- 10 - realizar un tratamiento de la muestra, siendo dicho tratamiento realizado para permitir diferenciar las células patológicas de las células sanas de la muestra,
- 15 - llevar a cabo una adquisición de imágenes de la muestra dispuesta sobre la placa de análisis con el fin de obtener una pluralidad de imágenes que representan cada una una zona de la plaza de análisis, formando dichas imágenes puestas una al lado de la otra una imagen de la totalidad de la muestra para crear una placa de análisis virtual.

Dicho procedimiento se divulga, por ejemplo, en el documento US-A-2008/0032328.

20 La invención se aplica particularmente a procedimientos de análisis citológico.

El análisis de las muestras se utiliza, por ejemplo, para el diagnóstico de patologías, a partir de células extraídas por frotis (cervicales, vaginales u otros), por punción de órganos (seno, tiroides, ganglios u otros) o también por recogida de muestras (orina, lavado bronco-alveolar u otros), para detectar cualquier tipo de patología y más particularmente unos estados precancerosos o cancerosos.

25 De manera conocida, las muestras son examinadas por unos observadores especializados y preparados para detectar las células susceptibles de ser patológicas en una muestra dispuesta sobre una placa o portaobjetos de análisis. Con el fin de permitir la detección de células potencialmente patológicas, la muestra sufre un tratamiento, tal como una coloración, que permite poner en evidencia, entre otras, las características del núcleo y del citoplasma de las células para ayudar a la localización y al diagnóstico de las células patológicas. Cuando se observa la muestra, las células potencialmente patológicas muestran entonces diferencias de afinidades tintóreas, de tamaño y forma, tanto a nivel del núcleo como del citoplasma, con respecto a las células normales.

35 El análisis puede llevarse a cabo de manera manual, sin asistencia particular. En este caso, el médico o el técnico especializado hace desplazar unas placas de muestra bajo un microscopio y observa cada una de ellas para detectar las anomalías morfológicas que indican unas células patológicas que pueden corresponder a un estado precanceroso o canceroso, por ejemplo. Tal método de análisis es tedioso y consume muchísimo tiempo. Además, no ofrece resultados satisfactorios con, especialmente, un número de "falsos negativos" estimados en aproximadamente el 30%, es decir muestras consideradas como normales, aunque existe una patología en el paciente, en particular precanceroso o canceroso, con los riesgos de evolución ulterior del cáncer en un paciente tranquilizado erróneamente.

45 Para mejorar los resultados de los análisis, se ha propuesto mejorar el muestreo, es decir el número de células, su fijación, su coloración y su esparcimiento sobre la placa de análisis, pero también ayudar en su análisis al médico o al técnico especializado, por ejemplo gracias a medios informáticos de análisis, tales como programas de tratamiento de imágenes y otros.

50 Para ello, una cámara o un aparato de toma de imágenes se utiliza para adquirir unas imágenes de las diferentes zonas de la muestra dispuesta sobre la placa de análisis y comunicar los datos de estas imágenes a un sistema informático que trabaja entonces sobre una placa de análisis "virtual".

Este sistema informático permite un tratamiento de la señal, un pretratamiento de las imágenes y un análisis comparativo de las imágenes con, eventualmente, unas bases de datos nuevamente creadas o existentes para acelerar el proceso de análisis y permitir así el análisis de un número más alto de muestras y para asistir al médico o al técnico especializado. Las imágenes de una muestra son examinadas, por ejemplo, automáticamente y si se localizan algunas zonas que presentan una anomalía, las imágenes correspondientes son comunicadas a un médico o un técnico especializado que pueda entonces determinar si sí o no estas zonas muestran unas células patológicas. El médico o el técnico especializado observa entonces sólo unas zonas anormales sin analizar las zonas consideradas como normales por el sistema informático. Tal procedimiento permite efectivamente acelerar el análisis y garantizar la fiabilidad del diagnóstico.

65 Sin embargo, el médico o el técnico especializado no tienen entonces ya la ocasión de observar unas muestras normales o que presentan unas modificaciones morfológicas menores, lo que es perjudicial para su apreciación de las muestras y sobre todo para su curva de aprendizaje, incluso la conservación de su agudeza de diagnóstico. En efecto, el análisis de muestras se basa en la formación y la práctica del médico o del técnico especializados para examinar unas muestras y comparar unas zonas normales y unas zonas que presentan unas anomalías. El hecho

de suprimir esta práctica por un análisis asistido por ordenador puede llevar a los médicos o a los técnicos especializados a perder sus competencias y así llevar a errores de análisis.

Además, la operación de digitalización línea por línea y no campo por campo para una imagen en color necesita una sobreescritura o un recalibrado rojo/verde/azul (RVB) que requiere un alto nivel de ajuste para el recalibrado de las imágenes, siendo este alto nivel de ajuste sensible a las más mínimas vibraciones. De este modo, esta digitalización línea por línea para una imagen en color puede llevar mucho tiempo, debido a los tratamientos aplicados sobre el portaobjetos durante la digitalización. Además, la operación de digitalización para una imagen en color necesita tiempos significativos de compresión de imagen.

Por otra parte, la operación de digitalización es delicada para muestras que contienen agrupaciones tridimensionales de células, es decir "apilamientos de células", en particular de células patológicas. En efecto, el enfoque por la cámara se realiza a un grosor de agrupación definido por uno o más puntos de enfoque a nivel de la agrupación, dejando los otros puntos más profundos o más superficiales desenfocados. Con el fin de obtener un "amplio campo" de imagen, es decir de la totalidad de la placa de análisis, adecuado para una lectura de detección o de diagnóstico en la única placa virtual, es necesario tener una superficie "desenfocada" lo más pequeña posible (menos del 5%). Además, las herramientas de segmentación son más difíciles de manejar sobre unas zonas desenfocadas, que afectan tanto las células aisladas como a las agrupaciones tridimensionales. De este modo, el análisis de las células y de los núcleos se vuelve mucho menos pertinente y puede incluso llevar a una mala categorización de las células.

La invención pretende paliar los inconvenientes mencionados anteriormente, proponiendo un procedimiento de análisis que, permitiendo al mismo tiempo ganar tiempo en los procesos de digitalización, los hace más eficaces en términos de superficie analizable y más eficaces en términos de calidad de detección de las anomalías celulares para el análisis asistido por ordenador, en un ámbito de seguimiento de la calidad más pertinente que asocia unos puntos de verificación de diagnóstico y de educación al diagnóstico para el médico o el técnico especializado.

Para ello, la invención se refiere a un procedimiento del tipo antes citado, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- localizar un plano de referencia de la placa de análisis que comprende un portaobjetos y un cubreobjetos dispuesta por encima del portaobjetos, para la adquisición de imágenes, estando dicho plano de referencia definido por la superficie del portaobjetos o cubreobjetos; y
- realizar por lo menos una segunda adquisición de imágenes, estando realizada dicha segunda adquisición a un grosor diferente de la muestra de la primera adquisición, para obtener una pluralidad de imágenes, que corresponde a una sección de la muestra realizada con un grosor diferente.

Tal procedimiento permite realizar de manera particularmente simple por lo menos una imagen de una muestra que permite detectar unas células eventualmente patológicas y adquirir un gran número de informaciones sobre la muestra, tal como se describirá ulteriormente.

Según otras características del procedimiento de preparación:

- la localización del plano de referencia de la placa de análisis se realiza mediante la adquisición de una imagen topográfica del portaobjetos o del cubreobjetos,
- la placa de análisis comprende por lo menos una marca dispuesta para localizar el plano de referencia para la adquisición de imágenes sea cual sea el grosor de la muestra dispuesta sobre la placa de análisis, siendo dicha adquisición de imágenes efectuada a un grosor definido con respecto al plano de referencia del portaobjetos o cubreobjetos definido por la marca,
- la placa de análisis comprende por lo menos cuatro marcas dispuestas alrededor de la muestra,
- la o cada marca está impresa sobre la placa de análisis,
- el grosor de la muestra de la adquisición de imágenes es ajustable,
- el procedimiento comprende además una etapa de superposición de los datos de las imágenes adquiridas durante la adquisición de las imágenes y los de las imágenes adquiridas modificadas durante el tratamiento de las imágenes adquiridas, para realizar un sólo plano de imagen virtual de campo amplio,
- la adquisición de imágenes de la muestra dispuesta sobre la placa de análisis se efectúa según una escala de niveles de gris,
- el procedimiento comprende además la etapa siguiente:

- llevar a cabo sobre la placa de análisis virtual (2) un tratamiento de las imágenes adquiridas para obtener una restitución virtual de los colores y de la intensidad de los colores del citoplasma y/o del núcleo de las células de la muestra, pudiendo dichos colores y dicha intensidad ser modificados según las preferencias de la persona encargada del análisis,
- el tratamiento de la muestra es una etapa de coloración nuclear o una coloración de citología, siendo dicho tratamiento dispuesto para hacer al citoplasma casi transparente y acentuar el contraste entre el núcleo y/o el ARN citoplásmico de las células y el citoplasma,
- el tratamiento de las imágenes adquiridas corresponde a una recoloración virtual policroma de tipo Papanicolaou, Schorr, MAy Grunwald Giemsa o Giemsa o monocroma de estas imágenes adquiridas,
- el nivel de recoloración virtual de las imágenes adquiridas es ajustable,
- el procedimiento comprende una etapa de visualización de la placa de análisis virtual,
- el procedimiento comprende las etapas siguientes:
 - hacer desfilarse automáticamente las imágenes de amplio campo adquiridas de la muestra, sin visualización de datos complementarios; y
 - detener automáticamente el desfile si se detecta por el sistema de análisis automático por lo menos una anomalía que pueda significar la presencia de una célula patológica,
 - la interrupción automática del desfile, si se detecta por lo menos una anomalía que pueda significar la presencia de una célula patológica, comprende una etapa de visualización de la placa de análisis ampliada a nivel de la anomalía y de visualización secundaria de informaciones sobre la zona de muestra visualizada, y/o sobre la totalidad de la muestra, y/o sobre el paciente sobre el cual se ha efectuado la muestra, y/o sobre el resultado de exámenes complementarios realizados sobre la muestra,
 - el procedimiento comprende una etapa de ampliación de la placa de análisis virtual con el fin de permitir la visualización de un detalle de dicha placa.

Otros aspectos y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción siguiente, dada a título de ejemplo y realizada en referencia a los dibujos, en los que:

- la figura 1 es una representación esquemática de las diferentes etapas de un procedimiento de preparación de una placa de análisis virtual según la invención,
- la figura 2 es una representación esquemática en sección de una placa de análisis de una muestra y de un dispositivo de digitalización del portaobjetos, y
- la figura 3 es un diagrama que representa las diferentes etapas de análisis de una placa virtual.

En referencia a la figura 1, se describe un procedimiento de preparación de una placa de análisis virtual 2 para su análisis celular asistido por un sistema informático. Por placa virtual 2, se entiende un conjunto de informaciones y de datos numéricos agrupados que se refieren a una muestra 4.

La muestra 4 se obtiene, por ejemplo, por frotis (cervicales, vaginales u otros), por punción de órganos (seno, tiroides, ganglio u otros) o también por recogida de muestras (orina, lavado bronco-alveolar u otros). Durante una primera etapa A, la muestra se pone en suspensión, por ejemplo en un tubo o un frasco de muestras 6.

Durante una etapa B, la muestra 4 se coloca en una placa de análisis 8. De manera conocida, el depósito de las células sobre la placa 8 se lleva a cabo, por ejemplo, por decantación. La muestra se vierte en una cámara de decantación 10 cuyo fondo se abre sobre la placa de análisis 8. Unos medios de absorción 12 permiten la absorción de la solución a medida que las células se depositan sobre la placa de análisis 8. Tal procedimiento de depósito es conocido y no se describirá aquí en detalle.

Durante una etapa C, la muestra sufre un tratamiento que pretende marcar/teñir los núcleos, el ADN y/o el ARN de las células acentuando muy claramente el contraste con respecto a los citoplasmas de estas mismas células. Tal marcado permite segmentar correctamente los núcleos para realizar el estudio morfológico y para realizar una cuantificación del ADN (para un análisis de la ploidía, por ejemplo) y/o del ARN para localizar las células potencialmente patológicas.

Este marcado se realiza por ejemplo de manera automática mediante un autómatas provisto de medios de pipeteado utilizados al mismo tiempo para poner la muestra 4 en solución y para el depósito de la suspensión celular sobre una

placa de análisis 8.

La etapa B de decantación de la suspensión celular puede ser realizada antes o después de la etapa C de marcado/coloración descrita anteriormente.

Este marcado se realiza preferentemente con la hematoxilina.

Se puede utilizar un marcador diferente de los marcadores utilizados para la cuantificación del ADN, tal como la hipericina o un marcador específico de proliferación o de agentes patógenos, tales como por ejemplo unos virus oncogénicos de tipo *Human Papilloma Virus*, en el caso del frotis del cuello uterino.

Se podrían utilizar otras coloraciones utilizadas en el estado de la técnica, pero presentan inconvenientes. Así, se podría considerar una coloración estequiométrica, que ofrece una coloración de los núcleos proporcional a la cantidad de ADN, lo que permite su cuantificación, y por lo tanto localizar y analizar las células patológicas en el ámbito de la ploidía.

Sin embargo, esta coloración particular, cuando se trata de una coloración de Feulgen por ejemplo, es incompatible "técnicamente" con una coloración de Papanicolaou y necesita por lo tanto volver a realizar una difusión celular sobre el portaobjetos para el análisis del médico o del técnico especializado. Ciertos industriales han probado asociar una coloración estequiométrica con la coloración de Papanicolaou y han utilizado por lo tanto una coloración que contiene una tionina y que requiere la fijación con metanol, que es tóxico, y sobretodo que modifica la coloración de Papanicolaou en su interpretación, en particular con unos núcleos cuya cromatina aparece demasiado "negra" para un análisis fino de la composición de dichos núcleos, y por lo tanto conlleva una dificultad de análisis para el diagnóstico de estados pre-cancerosos o cancerosos.

Durante una etapa D, la placa de análisis 8 que comprende la muestra 4, teñida mediante un colorante nuclear conocido o por una coloración citológica conocida pero modificada para hacer al citoplasma casi transparente, se somete a una iluminación con luz blanca 14 para adquirir unas imágenes de la muestra 4 por medio del dispositivo de adquisición de imágenes 16.

La adquisición de imágenes en luz blanca permite obtener unas imágenes de la muestra teñida por la coloración nuclear o la coloración citológica modificada conservando unos citoplasmas casi transparentes para aumentar el contraste con los núcleos.

El aparato de adquisición de imágenes 16 permite obtener unas imágenes en blanco y negro, más precisamente sobre una escala de niveles de gris. Tal selección permite una adquisición de imágenes más rápida y con una mejor resolución que si la adquisición se realiza en color.

La adquisición de imágenes en luz blanca requiere haber localizado previamente un plano de referencia de la placa de análisis, que define un grosor de referencia con respecto a la que se mide el grosor de la muestra, a título de trazado tipográfico de la superficie y de sus desigualdades.

En referencia a la figura 2, la placa de análisis 8 comprende un portaobjetos 20 y un cubreobjetos 22 dispuesto encima del portaobjetos 20. La muestra 4 de la extracción se dispone entre el portaobjetos 20 y el cubreobjetos 22, y se mantiene mediante el adhesivo 24.

El plano de referencia de la placa de análisis 8 se define o bien a nivel de la cara superior del portaobjetos 20, designada por el grosor Z_A , o bien a nivel de la cara superior del portaobjeto 22 designada por el grosor Z_B .

Según un modo de realización, la localización del plano de referencia se obtiene mediante la adquisición de una imagen del portaobjetos o del cubreobjetos, por ejemplo por reflexión de ultrasonidos o de luz sobre el portaobjetos o el cubreobjetos con o sin un tratamiento específico del portaobjetos.

Este tratamiento consiste por ejemplo en hacer el portaobjetos o el cubreobjetos por lo menos parcialmente reflectante.

Antes de la adquisición de imágenes en luz blanca, la localización del plano de referencia de la placa de análisis permite librarse del enfoque sobre las células y de los problemas de polimerización de los adhesivos para los portaobjetos de vidrio, o eventuales burbujas presentes en la muestra. La adquisición de imágenes en luz blanca permite obtener, en diferentes grosores localizados con respecto al plano de referencia, varios planos de imágenes para un enfoque secundariamente tratado, para hacer que sea. Permite también librarse de los problemas de ajuste horizontal del aparato. En efecto, la definición del plano de referencia permite "recalibrar" la imagen con respecto a este plano.

Así, el ajuste del aparato con respecto a la placa no necesita una precisión tan grande como en la técnica anterior.

Según otro modo de realización, la placa de análisis 8 comprende por lo menos una marca 13 dispuesta para localizar el plano de referencia de la placa de análisis antes de la adquisición de imágenes de la muestra.

5 Según una variante, la placa de análisis 8 comprende por lo menos cuatro marcas 13 dispuestas de manera uniformemente repartida alrededor de la muestra, por ejemplo los cuatro puntos cardinales. Según un modo de realización, la o cada marca 13 está impresa sobre la placa de análisis 8. Según otro modo de realización, la o cada marca 13 está fijada sobre la placa de análisis 8, sobre el portaobjetos o el cubreobjetos.

10 Además, con el fin de visualizar correctamente unas agrupaciones de células tridimensionales durante la digitalización, la adquisición de imágenes se realiza a uno o varios grosores diferentes de la muestra.

15 Estos diferentes grosores a los que se realiza la adquisición de imágenes pueden ser seleccionados previamente a la adquisición y están localizados con respecto al plano de referencia sobre el portaobjetos de análisis definido por la marca o por la imagen de la superficie del portaobjetos o del cubreobjetos.

20 El aparato de adquisición de imágenes 16 permite "escanear" la muestra 4 con una resolución muy fina y obtener a partir de una placa 8, unas imágenes en luz blanca. La placa de análisis 8 se escanea línea por línea como se propone por numerosos industriales. Así, cada imagen adquirida representa una banda 18 de anchura predefinida de la placa de análisis 8, por ejemplo se selecciona una anchura de bajo valor con el fin de obtener un gran número de imágenes y por lo tanto una mejor resolución. Las imágenes puestas lado con lado permiten obtener una imagen de la totalidad de la placa de muestra, o imágenes "de amplio campo", y por lo tanto de la totalidad de la muestra con el fin de formar una placa de análisis virtual 2, como se representa en la etapa E de la figura 1. Llegado el caso, la adquisición permite obtener unas imágenes de la totalidad de la placa de muestra en diferentes grosores de la muestra.

25 Así, las imágenes, obtenidas con un solo y mismo aparato y de manera muy simple, son una representación fiel de la muestra 4, que asocia un gran número de informaciones en luz blanca.

30 Los datos numéricos obtenidos con el aparato 16 en luz blanca sufren un tratamiento informático para obtener una placa de análisis virtual 2 modificada formada de la o de las imágenes que han sufrido una recoloración virtual policroma de tipo Papanicolaou, Schorr, May Grunwald Giemsa o Giemsa o monocroma, que pretende teñir las células tal como se describe y se conoce clásicamente para un análisis citológico o morfológico por el experto en la materia.

35 Según un modo de tratamiento informático, la recoloración virtual es una coloración de Papanicolaou, obtenida tal como se conoce desde hace mucho tiempo y cuya semiología, ampliamente descrita en la bibliografía, permite el reconocimiento eventual de anomalías citoplásmicas y nucleares que corresponden por ejemplo a la presencia de células pre-cancerosas o cancerosas. Esta recoloración permite también el reconocimiento de los diferentes tipos de células y de su número, para determinar la calidad representativa de la muestra y, por ejemplo, definir si la muestra es representativa o no. Esta recoloración virtual permite el análisis de la placa virtual mediante un procedimiento de análisis celular descrito a continuación. Siendo virtual la recoloración de Papanicolaou, se puede considerar una coloración de tipo Feulgen sin ningún problema de compatibilidad.

45 El análisis celular se realiza mediante un examen de las imágenes de la muestra por el médico o el técnico especializado encargados de detectar las células patológicas, para proponer un diagnóstico que iniciará eventualmente unos exámenes más profundos, incluso un tratamiento. Por razones de garantía de calidad, la presencia de médico o de técnico especializado es obligatoria para que la detección de células eventualmente patológicas no pueda ser totalmente automatizada.

50 En referencia a la figura 3, se detalla el proceso de visualización y de diagnóstico de las imágenes que han sufrido una recoloración.

55 Durante una etapa F, las imágenes 30 de la placa de análisis virtual 2 modificada formada con la imagen, o de las imágenes en diferentes grosores de la muestra, que hayan sufrido una recoloración virtual, son proyectadas sobre un medio de visualización tal como una pantalla. La restitución virtual de los colores y de su intensidad, tanto para el citoplasma como para el núcleo, puede ser ajustada de manera que corresponda lo más fielmente posible con las costumbres de cada lector, es decir el médico o el técnico especializado, en términos de intensidad y de calidad de la coloración.

60 Las informaciones 31 sobre el paciente pueden ser asociadas a la placa de análisis virtual 2 introduciendo estas informaciones en una base de datos y asociándolos a la imagen, o a las imágenes de diferentes grosores, de la muestra 4 que corresponde al paciente sobre el cual se ha efectuado esta muestra 4 después de una autorización del operador, por ejemplo mediante el accionamiento de un botón virtual 32 durante la etapa F.

65 Las imágenes 34 de la muestra se desplazan bajo los ojos del médico o del técnico especializado para su examen durante una etapa G. El desfile de las imágenes 34 se organiza por el sistema informático y se lleva a cabo de

- manera automática. Cada imagen 34 se muestra completamente, sin visualización de datos adicionales sobre el paciente, con el fin de evitar la dispersión de la atención del médico o del técnico especializado durante el análisis (o "screening" en inglés), y esto durante un tiempo predeterminado calculado para permitir al médico o al técnico especializado observar la totalidad de cada imagen proyectada y detectar una eventual anomalía en una imagen. El tiempo de visualización de cada imagen puede ser ajustado por el médico o el técnico especializado en función de sus competencias o en función de otras informaciones. Por ejemplo, si la muestra se efectuó para un paciente "de riesgo" que tenga una mayor probabilidad de presentar unas células patológicas, el tiempo de visualización puede ser ajustado para que sea más largo, con el fin de llevar a cabo un examen más minucioso de la muestra.
- Las imágenes 34 que se desplazan son por lo tanto las de la placa de análisis virtual modificada, formada de la imagen o de las imágenes en diferentes grosores, que han sufrido una recoloración virtual de tipo Papanicolaou, Schorr, May Gruwald Giemsa o Giemsa. Las imágenes 34 bajo esta coloración permiten detectar la presencia eventual de anomalías que corresponden, por ejemplo, a la presencia de células precancerosas o cancerosas y cuya semiología, conocida desde hace mucho tiempo, está ampliamente descrita en la bibliografía, y verificar que la muestra responde realmente a los criterios de Bethesda, en el ámbito del frotis del cuello uterino por ejemplo. El programa puede también adquirir otras informaciones sobre la difusión celular. Estas informaciones están relacionadas con la imagen (o a las imágenes de diferentes grosores) por el sistema informático para completar la placa de análisis virtual 2.
- El médico o el técnico especializado observa cada imagen visualizada, en la pantalla, y determina si una anomalía está presente o no. Esta detección puede también ser efectuada de manera automática por el sistema informático mediante el programa de análisis de imágenes.
- En el caso en el que ni el médico o el técnico especializado, ni el sistema informático de análisis celular detecte una anomalía en la imagen mostrada 38 durante una etapa H, el procedimiento de diagnóstico se continúa mediante la proyección de la imagen siguiente, después de transcurrir un tiempo de visualización previamente ajustado.
- Según un modo de realización del análisis celular, se prevé una etapa durante la cual el sistema informático detiene automáticamente el desfile de las imágenes sobre una imagen sobre la cual no se detecta ninguna anomalía, y espera una validación del médico o del técnico especializado para volver a iniciar el desfile. Al parar sobre tal imagen, se permite analizar en detalle unas imágenes denominadas de referencia, con el fin de confirmar lo que se considera como una muestra normal. La parada sobre imágenes denominadas normales puede realizarse de manera aleatoria o al final de un cierto número de imágenes mostradas. La descripción del análisis detallada de una imagen se realiza a continuación en relación con el análisis de una imagen que presenta una anomalía.
- Si se detecta una anomalía en la imagen 40 por el médico o el técnico especializado y/o el sistema informático, el procedimiento continúa por la interrupción del desfile de las imágenes 36 durante una etapa I.
- La interrupción del desfile se realiza de manera automática por el sistema informático si éste detecta una anomalía, o de manera manual por el médico o el técnico especializado si desea observar una imagen más en detalle o si localiza una anomalía.
- La imagen 42 se visualiza entonces con un porcentaje de ampliación superior, con el fin de visualizar la anomalía en detalle. Por ejemplo, la visualización de las imágenes puede realizarse con un porcentaje de ampliación x10 durante el desplazamiento, y ser duplicado (x20) en el caso en el que se detecte una anomalía, como se representa en la etapa J de la figura 3.
- La visualización de la imagen que contiene una anomalía puede ir acompañada de la visualización de informaciones 44 sobre la zona de la muestra visualizada y/o sobre la totalidad de la muestra y/o sobre el paciente del cual se efectúa la muestra y/o sobre el resultado de exámenes complementarios realizados sobre la muestra, en particular de exámenes de biología molecular.
- La imagen mostrada bajo recoloración virtual, y para la cual se ha interrumpido el desfile, está asociada a la imagen de la misma zona sin recoloración virtual. Esta visualización permite al médico o al técnico especializado afinar su análisis de las células visualizadas y confirmar o no si algunas son eventualmente patológicas. Además, con la visualización de la imagen sin recoloración virtual, pueden ser visualizadas simultáneamente otras informaciones, tales como datos cuantitativos, espectros o informaciones sobre el paciente del cual se ha efectuado la muestra, etc. Este análisis más fino, acoplado a la parada automatizada del desfile, permite disminuir el número de falsos negativos. Además, en el ámbito del frotis del cuello uterino por ejemplo, el control del diagnóstico por el médico o el técnico especializado de las zonas seleccionadas por el sistema permite conservar un alto nivel de especificidad del diagnóstico citológico en este caso. Así, los criterios de sensibilidad y de especificidad del frotis de detección se vuelven más próximos y elevados.
- El reinicio del desfile sólo se puede controlar por el médico o el técnico especializado, por ejemplo mediante la presión de un botón de validación 46. Esto permite asegurarse de que si el desfile se ha interrumpido de manera automática, la imagen mostrada y que presenta eventualmente una anomalía se ha examinado bien por un médico o

un técnico especializado. Es lo mismo para las imágenes normales mostradas.

5 Durante las etapas F a J, el médico o el técnico especializado puede efectuar libremente una ampliación de zonas particulares de la imagen visualizada, tanto en la imagen con recoloración virtual como en la imagen sin recoloración virtual. El médico o el técnico especializado puede también cambiar de la imagen con recoloración virtual a la imagen sin recoloración virtual como desee.

10 El procedimiento descrito anteriormente permite un análisis rápido y eficaz de muestras, disminuyendo el riesgo de "falsos negativos".

Además, la experiencia de los médicos o técnicos especializados en términos de calidad diagnóstico y sobretodo de especificidad, está preservada debido al reconocimiento de los colores y de su intensidad en relación con las imágenes virtuales de las preparaciones citológicas y/o histológicas tratadas y visualizadas.

15 El procedimiento permite también adaptar la placa de análisis a las preferencias del médico o del técnico especializado encargado del análisis. En efecto, el médico o el técnico especializado puede seleccionar la intensidad y la coloración de la placa de análisis virtual a su voluntad.

20 El procedimiento permite además adquirir unas imágenes de mejor resolución en niveles de gris que mediante una adquisición en color.

25 Además, el procedimiento permite una adquisición en diferentes grosores en las muestras, conservando al mismo tiempo unas imágenes claras, correctas, gracias al plano de referencia que permite librarse del problema de ajuste horizontal del aparato. Así, incluso si el aparato no permite un desfile suficientemente horizontal del portaobjetos por falta de ajustes, es posible obtener una imagen de calidad interpretable. Al no necesitar el ajuste del aparato una precisión tan alta, el procedimiento ofrece un primer ahorro de tiempo para la digitalización.

30 La adquisición en niveles de gris permite también una adquisición más rápida que en color, en particular durante la adquisición a diferentes grosores en la muestra. En efecto, cuando el médico o el técnico especializado encargado del análisis desea realizar, por ejemplo, unos planos cada 2 μm en el grosor de una célula, es decir 10 μm , la adquisición es cinco veces más larga, lo que es demasiado largo para una sola muestra. En niveles de gris, el tiempo de adquisición se reduce sustancialmente.

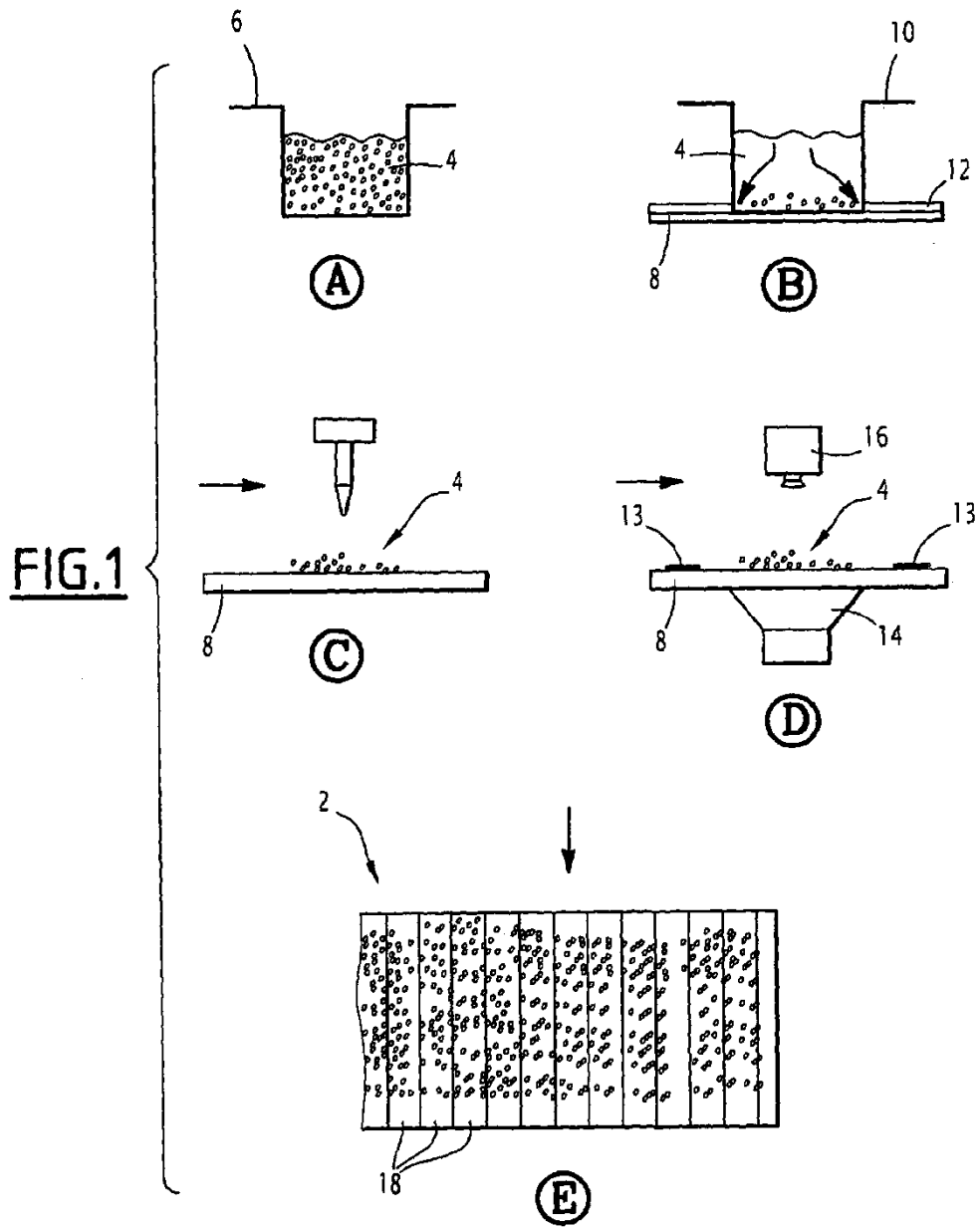
35 Finalmente, este procedimiento, que permite la recoloración de una placa de análisis virtual, permite realizar un ahorro de colorante garantizando al mismo tiempo un análisis rápido y eficaz de las muestras.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de una placa de análisis virtual (2) de una muestra (4) citológica dispuesta sobre una placa de análisis (8) para permitir el análisis celular de dicha muestra, que comprende las etapas siguientes:
- 5
- realizar un tratamiento de la muestra, siendo dicho tratamiento realizado para permitir diferenciar las células patológicas de las células sanas de la muestra (4),
 - llevar a cabo por lo menos una primera adquisición de imágenes de la muestra (4) dispuesta sobre la placa de análisis (8) para obtener una pluralidad de imágenes que representan cada una una zona (18) de la plaza de análisis, formando dichas imágenes puestas una al lado de la otra una imagen de la totalidad de la muestra con el fin de crear una placa de análisis virtual (2).
- 10
- caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- 15
- localizar un plano de referencia de la placa de análisis que comprende un portaobjetos y un cubreobjetos dispuesto encima del portaobjetos, para la adquisición de imágenes, estando dicho plano de referencia definido por la superficie del portaobjetos o del cubreobjetos; y
 - realizar por lo menos una segunda adquisición de imágenes, siendo dicha segunda adquisición realizada a un grosor diferente que la muestra de la primera adquisición, para obtener una pluralidad de imágenes, que corresponden a una sección de la muestra realizada a un grosor diferente.
- 20
2. Procedimiento de preparación según la reivindicación 1, caracterizado por que la localización del plano de referencia de la placa de análisis se realiza mediante la adquisición de una imagen topográfica del portaobjetos o del cubreobjetos.
- 25
3. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la placa de análisis (8) comprende por lo menos una marca (13) dispuesta para localizar el plano de referencia para la adquisición de imágenes sea cual sea el grosor de la muestra colocada sobre la placa de análisis, siendo dicha adquisición de imágenes efectuada a un grosor definido con respecto al plano de referencia del portaobjetos o del cubreobjetos definido por la marca.
- 30
4. Procedimiento de preparación según la reivindicación 3, caracterizado por que la placa de análisis (8) comprende por lo menos cuatro marcas (13) dispuestas alrededor de la muestra (4).
- 35
5. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por que la o cada marca (13) está impresa sobre la placa de análisis (8).
- 40
6. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el grosor de la muestra de la adquisición de imágenes es ajustable.
- 45
7. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende además una etapa de superposición de los datos de las imágenes adquiridas durante la adquisición de las imágenes y los de las imágenes adquiridas modificadas durante el tratamiento de las imágenes adquiridas, para realizar un solo plano de imagen virtual de amplio campo.
- 50
8. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la adquisición de imágenes de la muestra (4) colocada sobre la placa de análisis (8) se efectúa según una escala de niveles de gris.
- 55
9. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que comprende además la etapa siguiente:
- llevar a cabo sobre la placa de análisis virtual (2) un tratamiento de las imágenes adquiridas para obtener una restitución virtual de los colores y de la intensidad de los colores del citoplasma y/o del núcleo de las células de la muestra, pudiendo dichos colores y dicha intensidad ser modificados según las preferencias de la persona encargada del análisis.
- 60
10. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el tratamiento de la muestra es una etapa de coloración nuclear o una coloración de citología, estando dicho tratamiento dispuesto para hacer que el citoplasma sea casi transparente y para acentuar el contraste entre el núcleo y/o el ARN citoplásmico de las células y el citoplasma.
- 65
11. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, caracterizado por que el tratamiento de las imágenes adquiridas corresponde a una recoloración virtual policroma de tipo Papanicolaou,

Schorr, May Grunwald Giesma o Giesma o monocroma de estas imágenes adquiridas.

- 5 12. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que el nivel de recoloración virtual de las imágenes adquiridas es ajustable.
- 10 13. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que comprende una etapa de visualización de la placa de análisis virtual.
- 10 14. Procedimiento de preparación según la reivindicación 13, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- hacer desfilar automáticamente las imágenes de amplio campo adquiridas de la muestra, sin visualización de datos complementarios; y
- 15 - detener automáticamente el desfile si se detecta por el sistema de análisis automático por lo menos una anomalía que puede significar la presencia de una célula patológica.
- 20 15. Procedimiento de preparación según la reivindicación 14, caracterizado por que la interrupción automática del desfile, si se detecta por lo menos una anomalía que puede significar la presencia de una célula patológica, comprende una etapa de visualización de la placa de análisis ampliada a nivel de la anomalía y de visualización secundaria de informaciones sobre la zona de la muestra visualizada, y/o sobre la totalidad de la muestra, y/o sobre el paciente sobre el cual se ha efectuado la extracción, y/o sobre el resultado de exámenes complementarios realizados sobre la muestra.
- 25 16. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado por que comprende una etapa de ampliación de la placa de análisis virtual con el fin de permitir el visionado de un detalle de dicha placa.



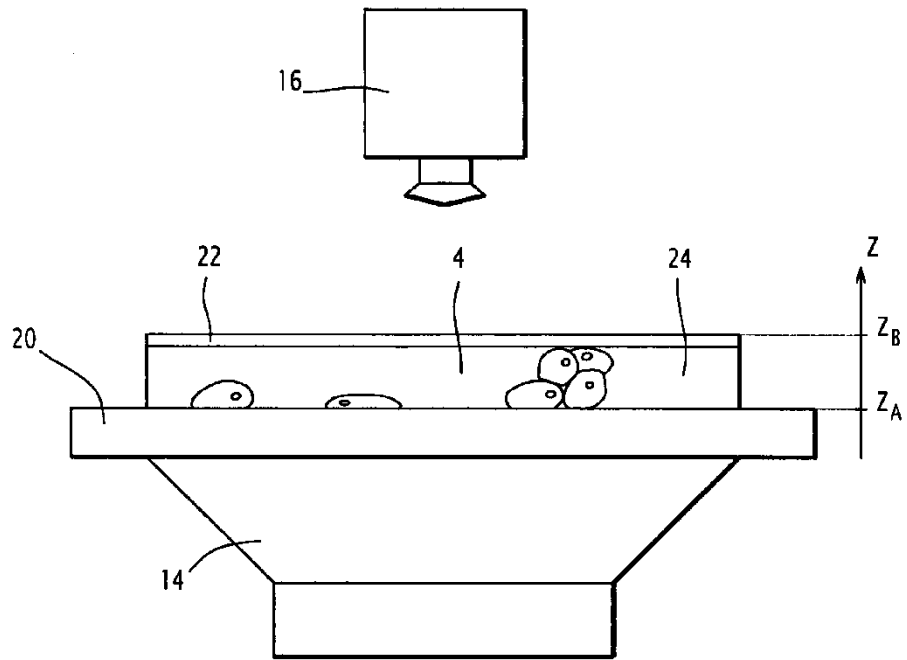


FIG.2

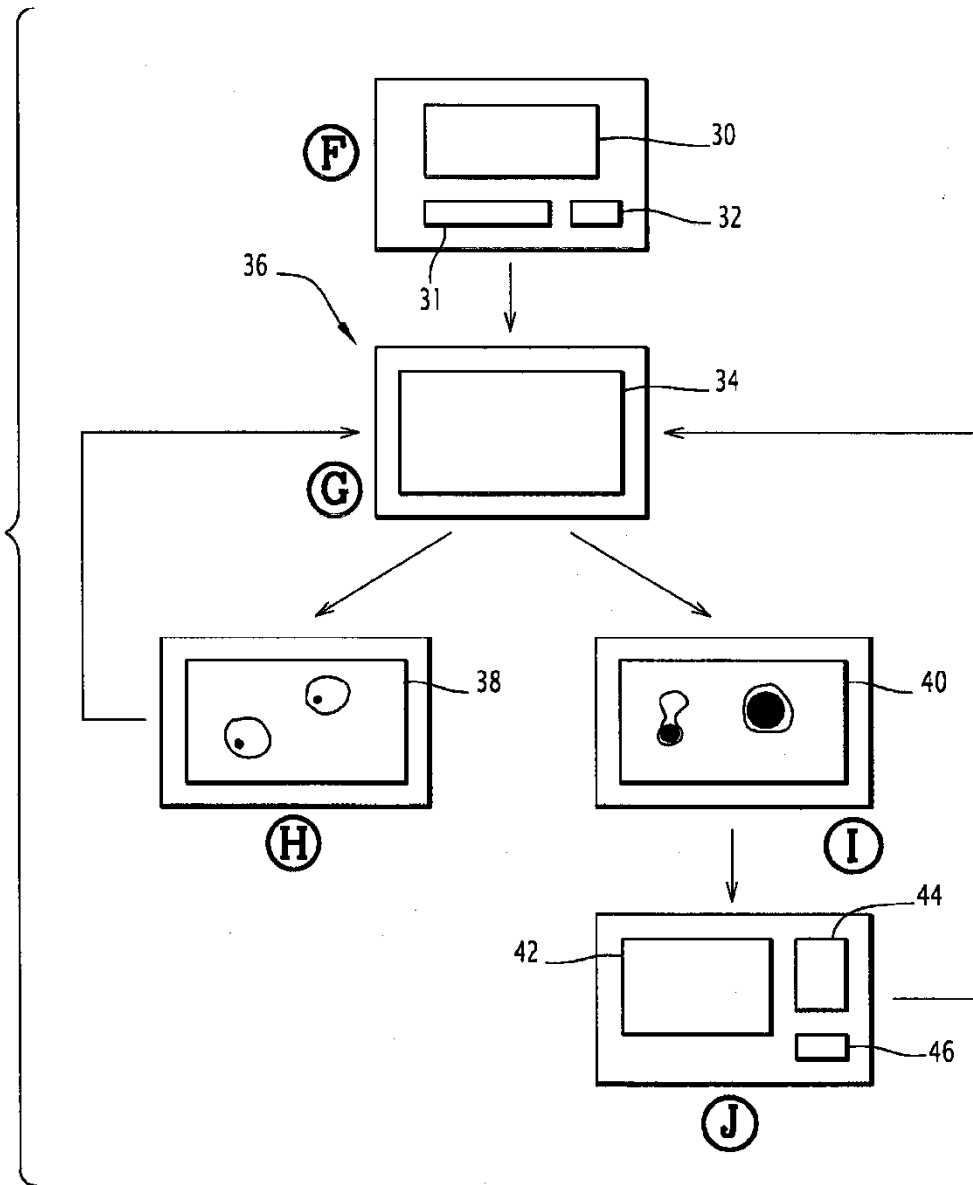


FIG.3