

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 109**

51 Int. Cl.:

**G06T 5/00** (2006.01)

**G06T 5/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2006 E 06124151 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1788523**

54 Título: **Corrección en base a imágenes para señales luminosas indeseadas en una región de interés específica**

30 Prioridad:

**18.11.2005 US 283365**

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

**02.06.2015**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 East Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**KOLTERMAN, JAMES C.;  
SHAIN, ERIC B.;  
GRAY, ROBERT C.;  
HUANG, SHIHAI y  
CLOHERTY, GAVIN A.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 537 109 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

Corrección en base a imágenes para señales luminosas indeseadas en una región de interés específica

### 5 Antecedentes de la invención

#### 1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método para la corrección de señales detectadas por un sistema de detección en un instrumento de diagnóstico.

#### 2. Descripción de la técnica

15 Las imágenes sin procesar generadas por un instrumento de diagnóstico que tiene un sensor de imagen digital como un detector, tal como, por ejemplo, el instrumento de diagnóstico Applied Biosystems Prism 7000, puede exhibir una anomalía conocida como "diafonía." La diafonía se refiere a la situación donde una señal de una ubicación determinada en la imagen (por ejemplo, un pocillo dado en una placa que tiene una pluralidad de pocillos, por ejemplo, una placa PCR de 96 pocillos), causa una variación en la señal en una ubicación diferente en la imagen (por ejemplo, un pocillo diferente en la placa que tiene una pluralidad de pocillos). Una región específica dentro de  
20 una imagen asociada con una señal independiente es, a menudo, referida como una región de interés (denominada alternativamente en la presente memoria como ROI). Cada ROI define los píxeles específicos dentro de la imagen asociada con una reacción específica. Las variaciones en la señal debido a la diafonía, aunque típicamente pequeñas, pueden inducir a variaciones en la cuantificación de reacción de una o más regiones de interés dentro de la imagen. En algunos casos, la sensibilidad de la reacción se reduce al requerir un aumento en el umbral de la  
25 señal con el fin de evitar resultados falsos positivos debido a la diafonía.

Las áreas en la imagen entre las regiones de interés de la imagen contienen información óptica que se puede utilizar para compensar las fuentes de variación en la señal. Estas fuentes de variación de la señal pueden ser el resultado de una reflexión óptica geométrica específica, la luz dispersada a partir de componentes ópticos, fugas de luz, cambios en la intensidad de la fuente de la luz, y similares. Todas estas fuentes de variación pueden contribuir a un error que cambia dinámicamente en la señal óptica en una región de interés dada de la imagen.  
30

Se desea supervisar una región de interés asociada con una reacción y, en última instancia, corregir la variación de señales anómalas durante el transcurso de una pasada de prueba en un instrumento de diagnóstico.  
35

YANG YH *ET AL*: "Análisis de imágenes de micromatrices de ADNc" BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS, HENRY STEWART PUBLICATIONS, Londres, GB, vol. 2, no. 4, Diciembre 2001 (2001-12), páginas 341-349, XP002335348 ISSN: 1467-5463 desvela un análisis de imágenes de micromatrices de ADNc y, en particular, la corrección de intensidad medida de un lugar que incluye contribuciones no debidas para probar la hibridación.  
40

#### Sumario de la invención

La invención proporciona un método para corregir la señal en una imagen que tiene una pluralidad de regiones de interés tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas.  
45

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que define la colocación de las regiones de corrección en forma de diamante alrededor de regiones de interés de reacción circulares.  
50

La Figura 2A ilustra una realización de regiones de interés de reacción y regiones de corrección. Las regiones de interés de reacción son circulares y las regiones de corrección son circulares. La Figura 2B ilustra otra realización de regiones de interés de reacción y regiones de corrección. Las regiones de interés de reacción son circulares y las regiones de interés de corrección son rectangulares. La Figura 2C ilustra otra realización adicional de regiones de interés de reacción y regiones de corrección. Las regiones de interés de reacción son circulares y las regiones de corrección tienen forma de diamantes.  
55

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra la aplicación del algoritmo de corrección en base a imágenes de la presente invención.

La Figura 4 es un mapa de una placa de 96 pocillos que ilustra la ubicación de cada respuesta positiva y cada respuesta negativa.

60 La Figura 5 es un ejemplo de una imagen al final de una pasada.

La Figura 6 es un ejemplo de una imagen que muestra las regiones de interés de reacción y las regiones de corrección.

La Figura 7 muestra las respuestas de fluorescencia en un ensayo de PCR sin corrección en base a imágenes aplicado.

65 La Figura 8 muestra las respuestas de fluorescencia en un ensayo de PCR sin corrección en base a imágenes aplicado. En esta figura, la escala Y está expandida.

La Figura 9 muestra las respuestas de fluorescencia en un ensayo de PCR con corrección en base a imágenes. En esta figura, la escala Y está expandida.

La Figura 10 muestra la respuesta de fluorescencia en un ensayo de PCR para el pocillo F-11 de la Figura 4 con y sin corrección en base al ensayo.

5

### Descripción detallada

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región de interés" significa la colección de píxeles dentro de una imagen que definen la ubicación de una señal óptica específica. La expresión "región de interés de reacción" significa la región de interés asociada a una reacción específica en un ensayo. Las expresiones "región de corrección" y "región de interés de corrección" significan el área asociada con la porción de fondo de la imagen adyacente a una región de interés de reacción. La expresión "suma de píxeles de reacción" significa la suma de todos los valores de intensidad de píxeles dentro de una región de interés de reacción. La expresión "número de píxeles de reacción" significa el número de píxeles dentro de una región de interés de reacción. La expresión "región de reacción del promedio de píxeles de interés" significa el valor que se obtiene dividiendo la suma de píxeles de reacción entre el número de píxeles de reacción. La expresión "suma de píxeles de corrección" significa la suma de todos los valores de intensidad de píxeles dentro de una región de corrección. La expresión "número de píxeles de corrección" significa el número de píxeles con una región de corrección. La expresión "región del promedio de píxeles de corrección" significa el valor que se obtiene dividiendo la suma de píxeles de corrección entre el número de píxeles de corrección. El término "escala" significa un factor multiplicativo aplicado al cálculo de corrección. La expresión "centro de gravedad" significa el centro geométrico de una región de interés. Tal como se utiliza aquí, los términos "circular", "rectangular", "anular", y otros términos relativos a la forma referida en la presente memoria pretenden incluir formas que son sustancialmente circular, sustancialmente rectangular, sustancialmente anular, y formas que son sustancialmente similares a las otras formas referidas en la presente memoria, respectivamente.

25

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para corregir una imagen que tiene una pluralidad de regiones de interés de reacción y una pluralidad de regiones de corrección, implicando el método las etapas de:

- (a) proporcionar una imagen que tiene una pluralidad de regiones de interés, teniendo estas regiones de interés áreas entre las mismas;
- (b) determinar una región de corrección entre al menos dos regiones de interés;
- (c) calcular una señal de corrección de la región de corrección; y
- (d) utilizar la señal de corrección para corregir una medición de señal de una o más regiones de interés.

Antes de realizar el método de la presente invención, se deben tomar ciertas medidas para calibrar el sistema de formación de imágenes, que es típicamente un sistema de imágenes digitales. La Figura 3 muestra un diagrama de flujo que ilustra las etapas para la definición de las regiones de corrección entre las regiones de interés de reacción adyacentes para la etapa de calibración del método de la presente invención. En este diagrama de flujo, se describen las regiones de corrección genéricas.

40

De acuerdo con el método de calibración de la presente invención, se determina el centroide de cada región de interés de reacción. Las regiones de interés de reacción se determinan normalmente mediante el uso de una calibración donde se miden las señales en un dispositivo que tiene una pluralidad de sitios de reacción. Una señal se mide en cada sitio de reacción. En el caso de placas de reacción de 96 pocillos, las señales en una placa de calibración que contiene tinte fluorescente en cada sitio de reacción se pueden medir por un sensor de imagen. Una placa de calibración es una placa de reacción de 96 pocillos utilizada para calibrar el instrumento utilizado. Las regiones de interés de reacción se pueden determinar mediante la localización de píxeles contiguos en cada sitio de reacción dentro de la imagen. El centroide geométrico de cada conjunto de centroides de cuatro regiones de interés de reacción adyacentes se puede utilizar para determinar un punto central para una región de corrección. Una región de corrección que utiliza ese punto central y una forma geométrica específica se puede definir. Como se muestra en las Figuras 2A, 2B y 2C, las regiones de interés de reacción tienen forma circular. Una región de corrección puede tener forma circular, como se muestra en la Figura 2A, forma rectangular, como se muestra en la Figura 2B, o forma de diamante, como se muestra en la Figura 2C. Otras formas, tales como, por ejemplo, polígonos cerrados, son adecuadas tanto para las regiones de interés de reacción como para las regiones de corrección. Los parámetros de las regiones de corrección son típicamente radios de anillos para las regiones de corrección en forma circular, la longitud y la anchura de las regiones de corrección en forma rectangular, y la longitud de los lados de las regiones de corrección en forma de diamante. Se especifican las dimensiones para la forma geométrica particular seleccionada. Una alternativa a la definición de regiones de corrección por medio de formas geométricas implica el uso de un mapa de bits arbitrario. Un mapa de bits de este tipo podría, por ejemplo, ser una matriz de valores de 9 por 9 que especifica qué píxeles se incluirían en la región de corrección y qué píxeles se excluirían de la región de corrección. Los puntos centrales de las regiones de corrección se pueden reflejar para crear regiones de corrección en la periferia de la placa para las filas y columnas exteriores de las regiones de interés de reacción en la imagen. Por tanto, en el caso de regiones de corrección en forma de diamante en una imagen que tiene 96 regiones de interés de reacción, hay 117 regiones de interés de corrección en forma de diamante en total, es decir, cuatro (4) regiones de corrección en forma de diamante por cada región de interés de reacción. El uso de regiones de corrección en forma de diamante se muestra en la Figura 2C. Las regiones de interés asociadas con los pocillos

65

específicos se pueden determinar y almacenar, tal como, por ejemplo, por medio de un ordenador. En esta realización, cada región de interés de reacción tiene cuatro regiones de corrección adyacentes asociadas las mismas.

5 Del mismo modo, en el caso de regiones de corrección en forma rectangular en una imagen que tiene una pluralidad de regiones de interés de reacción (por ejemplo, 96 pocillos en una placa), los rectángulos pueden orientarse con la longitud paralela al eje x o al eje y, como se muestra en la Figura 2B. Para la dirección x (horizontal), se ubica el punto central entre dos regiones de interés adyacentes. Un rectángulo se construye utilizando el punto central entre dos regiones de interés adyacentes como el centro de la región de corrección entre las regiones de interés. Para la  
10 dirección y (vertical), se ubica el punto central entre dos regiones de interés adyacentes. El rectángulo se construye utilizando el punto central entre dos regiones de interés adyacentes como el centro de la región de corrección entre las regiones de interés. Los rectángulos se crean también en la periferia de la imagen para las filas exteriores de las regiones de interés y las columnas exteriores de las regiones de interés. El espejo del centro entre regiones de interés adyacentes se utiliza para establecer el centro del rectángulo de la región de corrección. Las regiones de interés asociadas con los pocillos específicos se pueden determinar y almacenar. En esta realización, cada región de interés de reacción tiene las cuatro regiones de corrección adyacentes asociadas con las mismas. Medidas diferentes del centroide de las regiones de corrección se pueden utilizar también para definir la ubicación de las regiones de corrección. Por ejemplo, la región de corrección se puede colocar equidistante de los límites de las regiones de interés adyacentes.

20 Después se realiza la calibración de la región de corrección, la corrección en base a la región de corrección se puede aplicar utilizando el siguiente método. Una vez que se realiza la calibración de la región de corrección, se tiene que generar un valor compensación de fondo. Este valor se puede generar en al menos dos maneras. De acuerdo con una primera alternativa, se puede realizar una calibración de fondo. En este método, se toma una  
25 imagen de una placa sin ningún tinte fluorescente. Durante la calibración de fondo, el valor de píxeles medio para cada región de corrección se calcula dividiendo la suma de píxeles entre el número de píxeles en la región de corrección para obtener un valor de píxeles medio. Este valor de píxeles medio es indicativo del nivel de luz de fondo y se conoce como el valor de compensación de fondo. Los valores de compensación de fondo se almacenan para su uso en pasadas futuras, por ejemplo, las pasadas de PCR. Como alternativa, el valor de compensación de fondo se puede determinar sobre una base de pasada a pasada mediante el cálculo del valor de píxeles medio para cada  
30 región de corrección para la primera lectura de una pasada, por ejemplo, una pasada de PCR. Debido a que las primeras (o las pocas primeras) lecturas de una pasada de PCR se producen antes de que se produzca una señal de reacción significativa, este método alternativo proporciona una buena representación del fondo.

35 La señal de corrección se realiza de la siguiente manera. El rendimiento de la corrección de señal se representa en las Figuras 1 y 3. Para cada reacción, la suma de los píxeles de reacción y el número de píxeles de reacción se calculan mediante el uso de la región de interés de reacción. Se calcula el valor de píxeles medio para las cuatro regiones de corrección asociadas con una región de interés de reacción dada. Aunque las cuatro regiones de corrección se muestran en la Figura 1 y las regiones de corrección en forma de diamante se muestran en la Figura  
40 1, el método no se limita a cuatro regiones de corrección ni la invención se limita a las regiones de corrección en forma de diamante. El valor de compensación de fondo se resta de la región del promedio de píxeles de corrección. Después, esta diferencia se multiplica por la región de reacción del número de píxeles de interés y, en caso necesario, por un factor de escala, para generar un valor de corrección. El valor de corrección se sustrae, a continuación, de la región de reacción de la suma de píxeles de interés para generar una región de reacción corregida de la suma de píxeles de interés. El factor de escala depende típicamente del sistema de detección. Un ejemplo de un factor de escala es 1,15. En algunos sistemas de instrumentos, se realizan exposiciones múltiples en cada lectura para aumentar el intervalo dinámico de medición. En este caso, un fondo correspondiente compensado y la región de promedio de píxeles de corrección se tienen que generar para cada exposición. La corrección a la suma de píxeles de reacción se hace, a continuación, para la exposición de duración más larga que no presenta saturación significativa del sensor de imagen.

50 La presente invención se puede aplicar también a un sistema de ensayo en base a matriz o a una micromatriz, tal como, por ejemplo, el sistema de micromatriz de ADN genómico Vysis genosensor (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Tales sistemas pueden medir una pluralidad de dianas genómica a través de la hibridación en una matriz de dianas de captura situada sobre una superficie, tales como, por ejemplo, un "chip" de vidrio o un portaobjetos de microscopio. El producto de la hibridación se mide típicamente por medio de colorantes fluorescentes y un sistema de formación de imágenes electrónico.

El siguiente ejemplo no limitativo explica adicionalmente el método de la presente invención.

### 60 Ejemplo

Una pasada de PCR en tiempo real para el VIH se realizó en un instrumento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Este instrumento utiliza un formato de placa de 96 pocillos con pocillos dispuestos en una matriz de  
65 12 x 8. La pasada se ha configurado de modo que había 84 pocillos con muestras positivas con una concentración de  $1 \times 10^6$  copias/ml y 12 pocillos que no contenían muestras positivas, es decir, pocillos negativos. Los pocillos

negativos fueron distribuidos en la placa para maximizar el potencial de diafonía de los pocillos que contenían las muestras positivas. La Figura 4 ilustra la disposición de la placa.

5 El instrumento ABI Prism 7500 utiliza una cámara CCD y mide la fluorescencia en cinco bandas de longitud de onda. La Figura 5 muestra una imagen desde el final de la pasada de PCR. La Figura 6 muestra la misma imagen con las regiones de interés de reacción y las regiones de corrección superpuestas. En este ejemplo, se utilizó una matriz diagonal de las regiones de corrección en forma de diamante, cada una de las que contenía 25 píxeles. Se utilizó la primera lectura en la pasada de PCR para establecer los valores de compensación de fondo para cada lectura posterior. El factor de escala utilizado fue 1,15.

10 La Figura 7 muestra las señales de fluorescencia primas para todas las 96 muestras sin ninguna corrección en base a imágenes aplicada. Como se puede observar, las 84 muestras positivas generan señales significativamente por encima de la fluorescencia de fondo por ciclo 15 y se acercaron a su fluorescencia máxima por ciclo 25. La Figura 8 muestra las mismas respuestas con el eje Y a escala para centrarse en las respuestas en los pocillos que no contenían muestras positivas. Todas las respuestas negativas mostraron un pequeño pero significativo aumento de los ciclos 15 a 25, causado por la diafonía de las respuestas de las muestras positivas. La Figura 9 muestra el efecto de la corrección en base a imágenes en las respuestas negativas. Como se puede observar, la señal de diafonía se ha eliminado efectivamente. La Figura 10 muestra la respuesta para el pocillo F-11 con y sin la corrección en base a imágenes aplicada.

20 El método se puede aplicar también a las imágenes que contienen un menor o un mayor número de regiones de interés.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para corregir la señal en una imagen que comprende una señal que cambia dinámicamente y que tiene una pluralidad de regiones de interés, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una imagen que tiene una pluralidad de regiones de interés, teniendo cada una de estas regiones de interés una señal que cambia dinámicamente y áreas entre las mismas;
- (b) determinar una región de corrección entre al menos dos regiones de interés;
- 10 (c) calcular una señal de corrección de la región de corrección; y
- (d) utilizar la señal de corrección para corregir una medición de señal de una o más regiones de interés, **caracterizado por que** la etapa (c) comprende además:
- (e) determinar un número de píxeles de reacción y una suma de píxeles de reacción para cada región de interés de reacción;
- 15 (f) determinar un valor de píxeles medio para al menos una región de corrección para cada región de interés de reacción;
- (g) determinar de un valor de compensación de fondo para cada valor de píxeles medio en una región de corrección;
- 20 (h) determinar un promedio de píxeles y restar el valor de píxeles medio del promedio de píxeles para producir una región de valor de diferencia de corrección para cada región de corrección;
- (I) determinar una señal de corrección multiplicando la región del valor de diferencia de corrección por la región del número de píxeles de interés para cada región de interés de reacción;
- (j) determinar una región de reacción corregida de suma interés, restando el valor de corrección de la región de reacción de la suma de píxeles de interés para cada región de interés de reacción.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, donde la señal de fondo es un valor de compensación de fondo almacenado antes de comenzar la pasada.
3. El método de la reivindicación 1, donde la señal de fondo es un valor de compensación de fondo determinado durante la pasada.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, donde la señal de corrección está a escala.
5. El método de la reivindicación 1, donde las regiones de corrección tienen una pluralidad de lados.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, donde que las regiones de corrección tienen cuatro lados.
7. El método de la reivindicación 1, donde las regiones de corrección son polígonos cerrados.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, donde las regiones de corrección son circulares.
9. El método de la reivindicación 1, donde las regiones de corrección son anulares.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, donde las regiones de corrección se definen por un mapa de bits.
11. El método de la reivindicación 1, donde dicha pluralidad de regiones de interés proceden de una placa de múltiples pocillos.
- 50 12. El método de la reivindicación 1, donde un lector termociclador se emplea.
13. El método de la reivindicación 1, que incluye además la etapa de almacenar las regiones de corrección definidas en la etapa (c).
- 55 14. El método de la reivindicación 1, donde la región de reacción corregida de suma de interés se determina para cada exposición utilizada para generar la imagen.

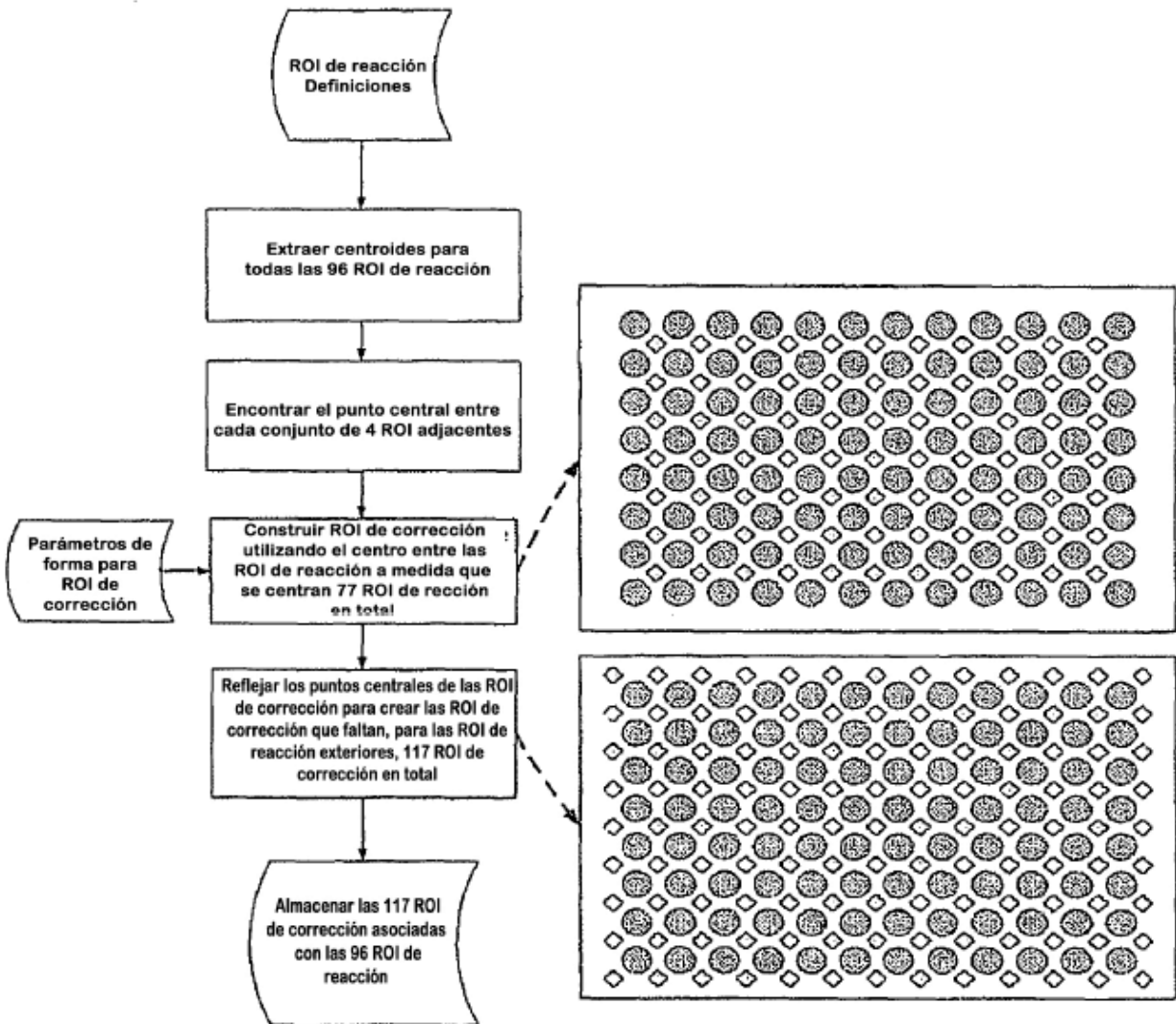
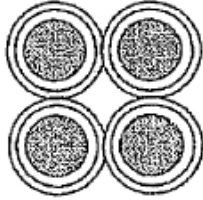
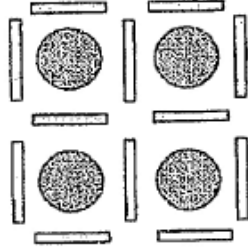


FIG. 1

**Anillos**



**Rectángulos**



**Diamantes**

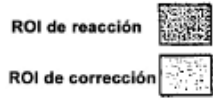
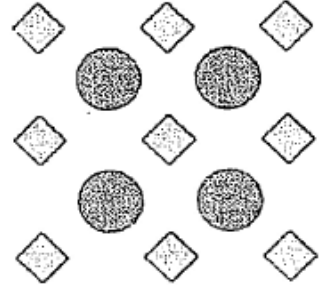


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C



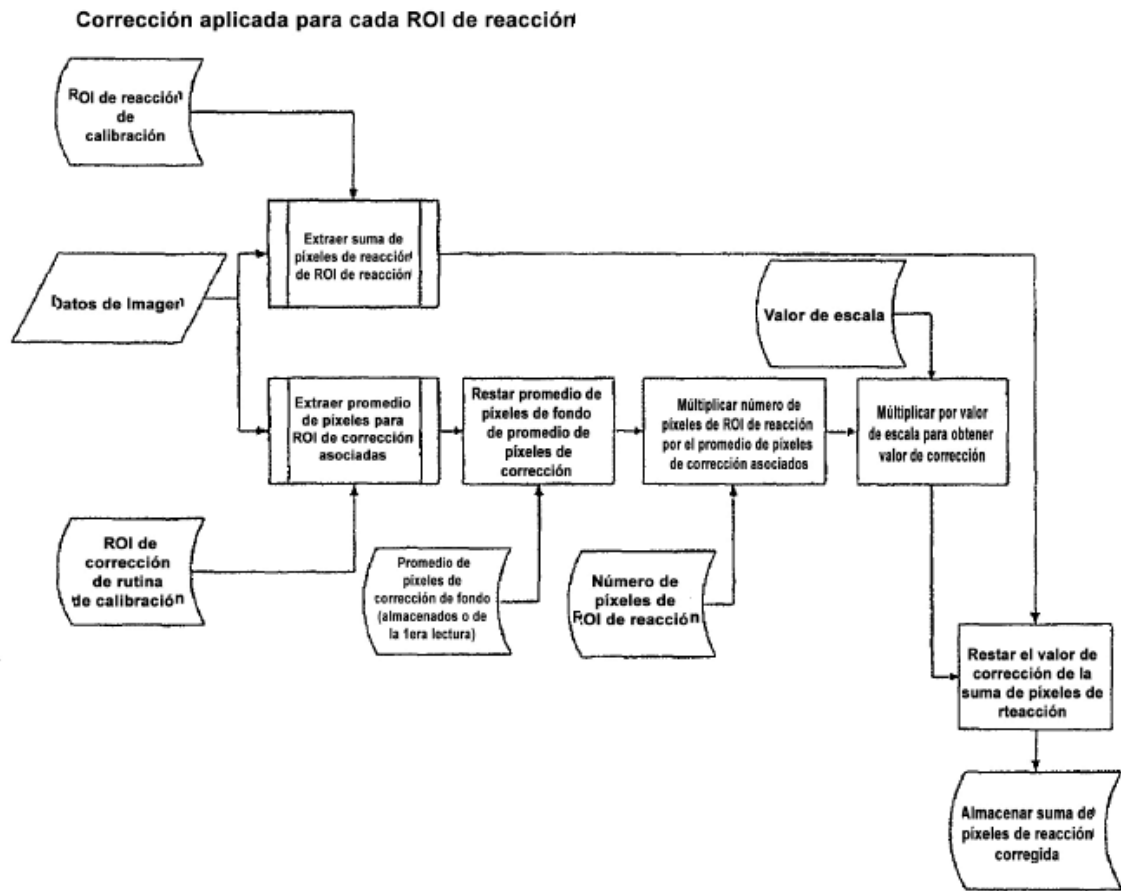


FIG. 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
B	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
C	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
D	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
E	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
F	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
G	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
H	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos

FIG. 4

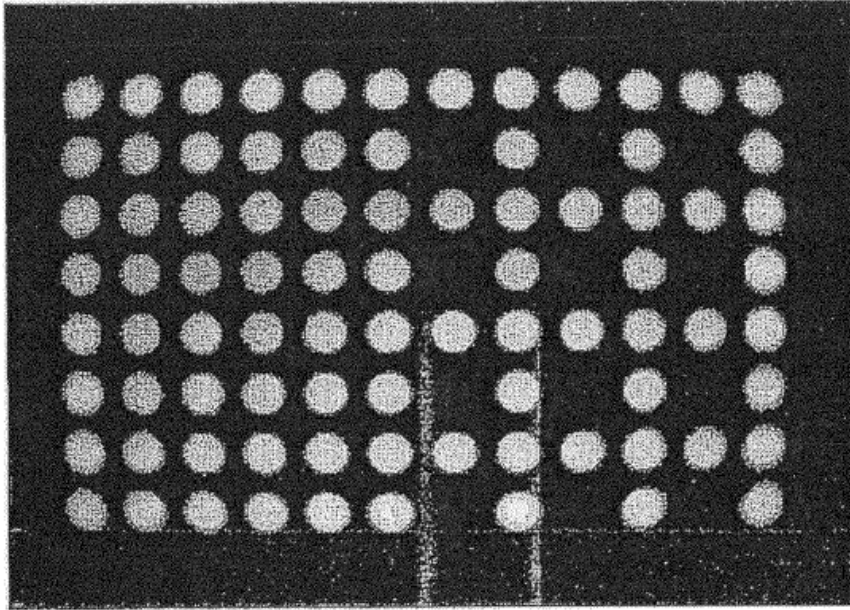


FIG. 5

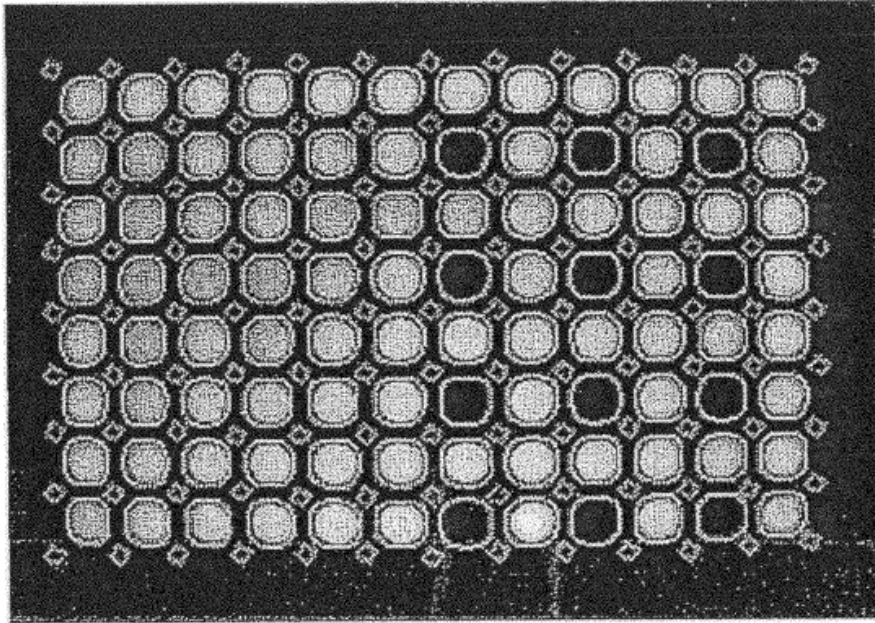


FIG. 6

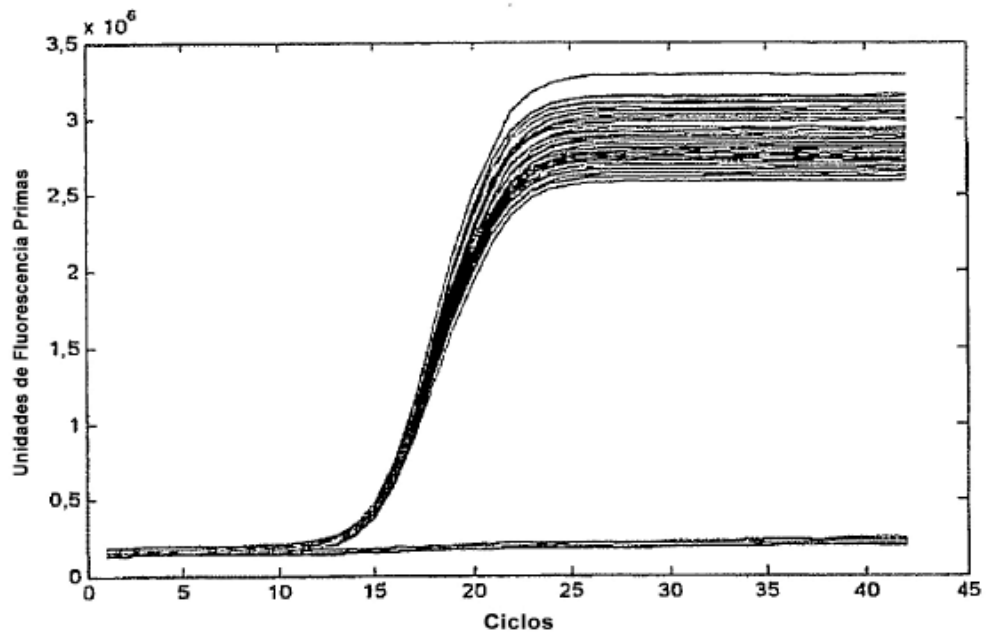


FIG. 7

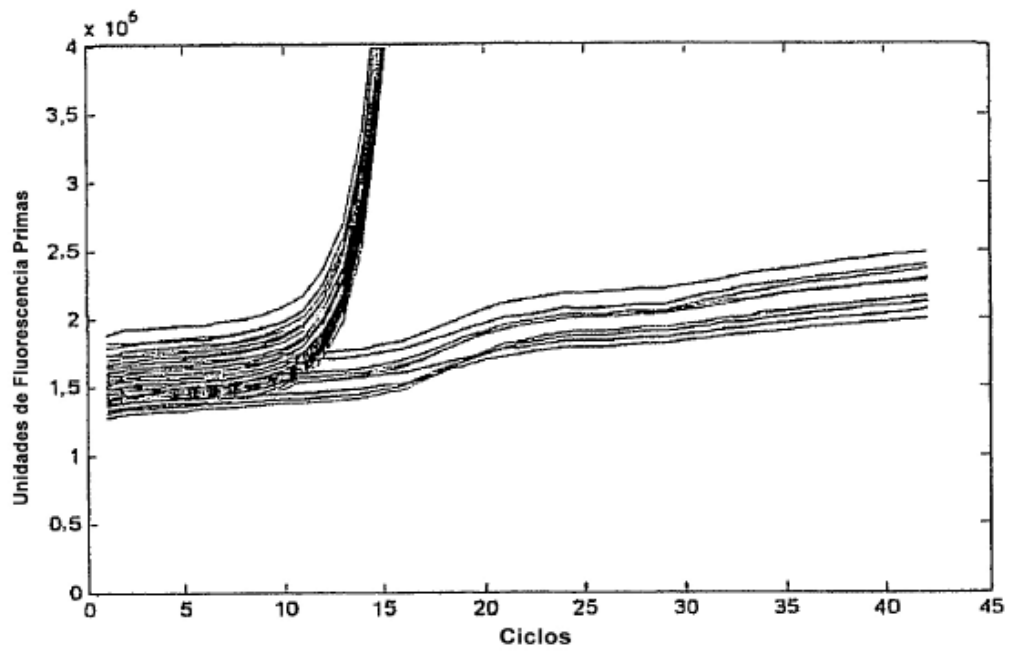


FIG. 8

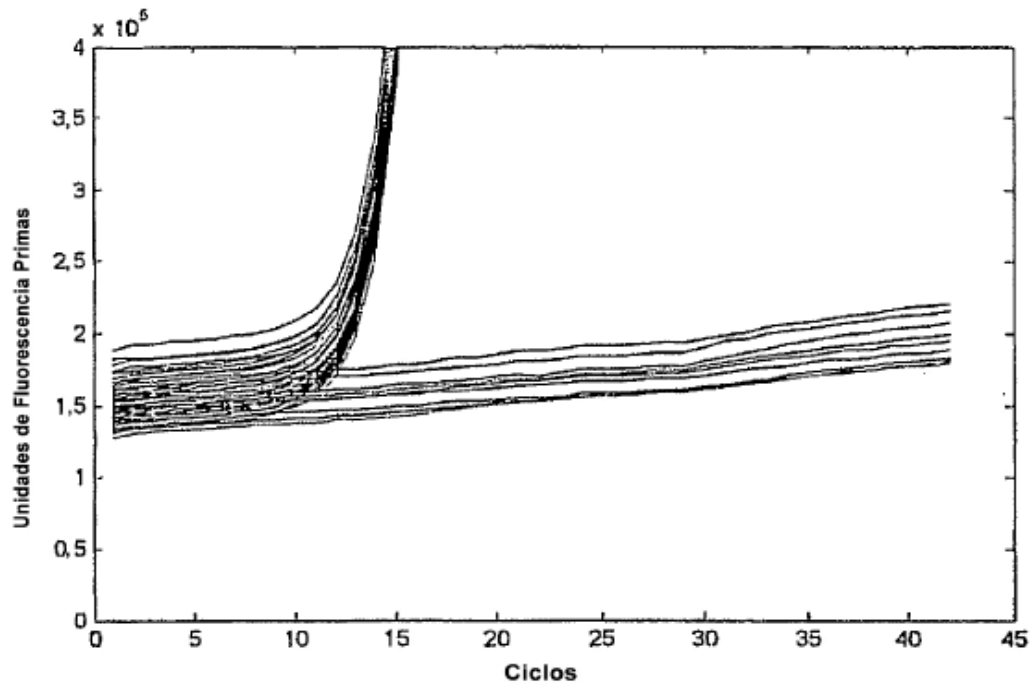


FIG. 9

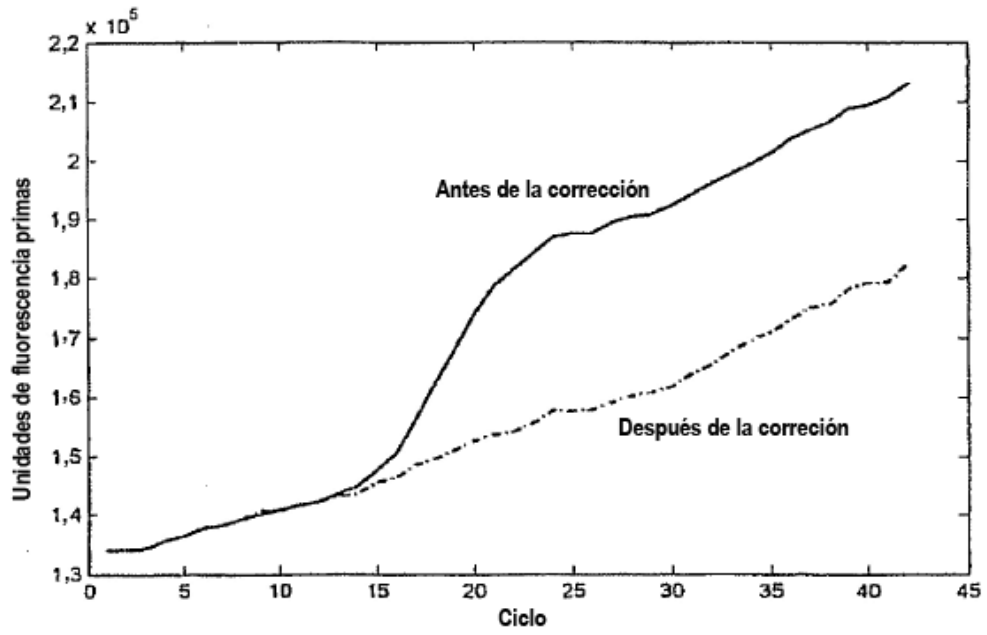


FIG. 10