

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 902**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2008** **PCT/US2008/007399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2008** **WO08156669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008** **E 08768439 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2162728**

54 Título: **Sistema y método de microscopio para obtener datos de muestra normalizados**

30 Prioridad:

15.06.2007 US 944402 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2017

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

CHRISTIANSEN, JASON;
PINARD, ROBERT;
ZERKOWSKI, MACIEJ, P. y
TEDESCHI, GREGORY, R.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 599 902 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

Sistema y método de microscopio para obtener datos de muestra normalizados

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 60/944.402, presentada el 15 de junio de 2007.

Campo

La presente invención se refiere, en general, al campo de la microscopía y más específicamente a la normalización de los resultados analíticos cuantitativos obtenidos a partir del mismo o de diferentes sistemas de microscopio para permitir las comparaciones entre los mismos.

10 Antecedentes

A medida que las plataformas de microscopía se convierten en cuantitativas, un método simple y una combinación de hardware permiten la normalización entre estas plataformas que necesitan desarrollarse. Por ejemplo, en las aplicaciones de microscopía de fluorescencia, hay productos disponibles actualmente para medir la intensidad de fluorescencia para un sistema (es decir, microesferas fluorescentes, objetivos fluorescentes), pero que no proporcionan un factor de eficacia global que esté relacionado con las variaciones en la construcción general de una plataforma de microscopio, o con las variaciones en la fuente de luz independiente de las variaciones de la muestra.

El documento US 2002/168665 A1 desvela un sistema de microscopio que comprende un filtro de excitación, un espejo dicróico y un filtro de densidad neutra configurado como una unidad de cubo. Un cubo de detección de partículas extrañas, un cubo para una referencia, y un cubo de una luz fluorescente están configurados de acuerdo con una combinación del filtro de excitación, el espejo dicróico y el filtro de densidad neutra en la trayectoria de luz de observación y en la trayectoria de iluminación. Un controlador del sistema cambia la unidad de cubo al cubo para la referencia y abre el obturador en la etapa. Después de que el procesador de imágenes fotografíe la imagen fluorescente de referencia a través de la cámara CCD, el controlador del sistema cierra el obturador. Después de que el procesador de imágenes fotografíe la imagen fluorescente de referencia a través de la cámara CCD, el controlador del sistema cierra el obturador. El procesador de imagen corrige un fondo de referencia y el procesador de archivos almacena la variable de referencia como el archivo reciente. Por lo tanto, el documento US 2002/168665 A1 desvela el uso de un cubo de filtro de referencia pero cuando este se conmuta en su lugar una muestra de referencia se coloca simultáneamente en la localización de la muestra objetivo sustituyendo de este modo la muestra objetivo durante la medición de referencia.

30 Sumario

Los sistemas y los procesos descritos en el presente documento proporcionan unos factores de normalización para un sistema de microscopía óptica dado que puede usarse para normalizar y escalar los resultados de las mediciones cuantitativas. La normalización permite la comparación de los resultados cuantitativos obtenidos a partir de diferentes instrumentos, habiendo sometido los resultados de cada instrumento a la misma normalización. También, como una extensión de esto, el mismo hardware que contribuye a los factores de normalización de eficacia instrumental puede usarse para medir las variaciones en la intensidad de fuente de luz durante un experimento en el que se toman varias exposiciones en una sola plataforma a lo largo del tiempo.

En un aspecto, se hace referencia a un proceso para normalizar una medida cuantitativa de los datos de muestra objetivo representados por imágenes por un sistema óptico. El sistema óptico tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, una parte de captura de imágenes, y una parte de almacenamiento de datos. Las diversas partes del sistema óptico están dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de la muestra objetivo. Se obtiene un factor de corrección de fuente de luz para la fuente de luz de excitación. El factor de corrección de fuente de luz se aplica a los datos de muestra objetivo, obteniendo de este modo unos datos de muestra de destino normalizados con respecto a la variabilidad de intensidad de luz. Se determina una medida cuantitativa de los datos normalizados de muestra objetivo.

En otro aspecto, se hace referencia a un instrumento de calibración para muestrear la iluminación de una fuente de luz de excitación de un sistema de microscopía. El sistema incluye una superficie de calibración colocada a lo largo de una trayectoria óptica. La superficie de calibración dispersa sustancialmente de manera uniforme la iluminación de la fuente de luz de excitación hacia una parte de detección del sistema de microscopía. El sistema de microscopio incluye un espejo dicromático colocado para reflejar la iluminación de la fuente de luz de excitación a lo largo de una trayectoria óptica a través de un objetivo hacia una muestra objetivo y para transmitir al menos una parte de la iluminación de la muestra objetivo hacia una parte de detección del sistema de microscopía. La superficie

de calibración se coloca para bloquear temporalmente la trayectoria óptica entre el espejo dicromático y el objetivo durante la calibración y dispersar una parte sustancial de la luz de excitación reflejada por el espejo dicromático hacia el detector.

- 5 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para obtener una medición de datos de muestra objetivo normalizada cuantitativa de un sistema óptico. El sistema óptico tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, una parte de detección y una parte de almacenamiento de datos dispuestas cooperativamente para obtener los datos de muestra objetivo. Se obtiene un factor intrínseco de sistema óptico para el sistema óptico. El factor intrínseco de sistema óptico se aplica a los datos de muestra objetivo, obteniendo de este modo una medición de datos de muestra objetivo normalizada con respecto a factores ópticos intrínsecos.
- 10 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un proceso para obtener una medición normalizada a partir de un sistema de microscopio que tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, y una parte de detección dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de una muestra objetivo. El proceso incluye iluminar con la fuente de luz de excitación una muestra de calibración configurada para producir una respuesta normalizada a la iluminación. Una imagen de muestra de calibración de la muestra de calibración iluminada obtenida a través de la parte óptica se captura con la parte de detección. Un instrumento de calibración configurado para dirigir una parte de muestra de la iluminación desde la fuente de luz de excitación hacia el detector se ilumina con una fuente de luz de excitación. Una imagen de muestra de fuente de luz de excitación de la parte de muestra dirigida se captura con la parte de detección, y se determina un factor intrínseco de máquina para corregir las variaciones a lo largo de la trayectoria óptica a partir de la imagen de muestra de calibración y la imagen de muestra de fuente de luz de excitación. El factor intrínseco de máquina puede usarse para compensar una imagen de muestra objetivo para las variaciones intrínsecas del sistema de microscopio.
- 15 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un medio utilizable por ordenador que tiene unas instrucciones legibles por ordenador almacenadas en el mismo para su ejecución por un procesador para realizar uno o más de los procesos descritos en el presente documento.
- 20 En otro aspecto, la divulgación se refiere a la señal electromagnética que lleva las instrucciones legibles por ordenador a obtener una medición normalizada de un sistema de microscopio que tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, y una parte de detección dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de una muestra objetivo, en el que las instrucciones realizan el proceso descrito anteriormente.
- 25 En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación adjunta 1. El sistema puede incluir además un medio para determinar a partir de la imagen de muestra de calibración y la imagen de muestra de fuente de luz de excitación, un factor intrínseco de máquina para corregir las variaciones a lo largo de la trayectoria óptica, el factor intrínseco de máquina puede usarse para compensar una imagen de muestra objetivo para las variaciones intrínsecas del sistema de microscopio.
- 30 La divulgación se refiere a un sistema para compensar las mediciones de intensidad de una muestra objetivo en un sistema de microscopio. El sistema incluye una platina para soportar la muestra objetivo, una fuente de luz de excitación para iluminar la platina de muestra objetivo soportada, una parte de detección para detectar una imagen de la muestra objetivo iluminada, y un instrumento de calibración configurado para la inserción temporal a lo largo de un eje óptico entre la fuente de luz de excitación y la parte de detección para redirigir una parte de muestra de la fuente de luz de excitación a la parte de detección durante la calibración. De manera beneficiosa, el instrumento de calibración permite la redirección de la fuente de luz de excitación sin perturbar la muestra objetivo en la platina. El sistema también incluye un analizador en comunicación con la parte de detección para determinar un factor de corrección de intensidad determinado a partir de la parte de muestra redirigida. El factor de corrección de intensidad puede usarse para ajustar las imágenes detectadas de la muestra objetivo iluminada para compensar las variaciones de fuente de luz de excitación.
- 35 La divulgación se refiere a un proceso para corregir las fluctuaciones de intensidad en un sistema de microscopio de fluorescencia que tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, y una parte de detección dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de una muestra objetivo. El proceso incluye la inserción de un elemento de calibración en una trayectoria óptica entre un objetivo y la parte de detección. El elemento de calibración incluye un espejo dicromático y una superficie de calibración. El espejo está adaptado para reflejar la luz desde la fuente de luz de excitación hacia la superficie de calibración y para transmitir una muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración hacia el detector. Una variación de intensidad de fuente de luz de excitación se determina a partir de la muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración. El elemento de calibración se sustituye con un conjunto de filtro adaptado para reflejar un espectro seleccionado de la fuente de luz de excitación hacia la muestra objetivo. Un espectro seleccionado de la iluminación se transmite desde la muestra objetivo hacia la parte de detector. El espectro de luz de emisión seleccionado se detecta a partir de la muestra objetivo y el espectro de luz de emisión seleccionado de la muestra objetivo se corrige usando la variación de intensidad determinada de la fuente de luz de excitación.
- 40 La divulgación se refiere a un proceso para corregir las fluctuaciones de intensidad en un sistema de microscopio de fluorescencia que tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, y una parte de detección dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de una muestra objetivo. El proceso incluye la inserción de un elemento de calibración en una trayectoria óptica entre un objetivo y la parte de detección. El elemento de calibración incluye un espejo dicromático y una superficie de calibración. El espejo está adaptado para reflejar la luz desde la fuente de luz de excitación hacia la superficie de calibración y para transmitir una muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración hacia el detector. Una variación de intensidad de fuente de luz de excitación se determina a partir de la muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración. El elemento de calibración se sustituye con un conjunto de filtro adaptado para reflejar un espectro seleccionado de la fuente de luz de excitación hacia la muestra objetivo. Un espectro seleccionado de la iluminación se transmite desde la muestra objetivo hacia la parte de detector. El espectro de luz de emisión seleccionado se detecta a partir de la muestra objetivo y el espectro de luz de emisión seleccionado de la muestra objetivo se corrige usando la variación de intensidad determinada de la fuente de luz de excitación.
- 45 La divulgación se refiere a un proceso para corregir las fluctuaciones de intensidad en un sistema de microscopio de fluorescencia que tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, y una parte de detección dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de una muestra objetivo. El proceso incluye la inserción de un elemento de calibración en una trayectoria óptica entre un objetivo y la parte de detección. El elemento de calibración incluye un espejo dicromático y una superficie de calibración. El espejo está adaptado para reflejar la luz desde la fuente de luz de excitación hacia la superficie de calibración y para transmitir una muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración hacia el detector. Una variación de intensidad de fuente de luz de excitación se determina a partir de la muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración. El elemento de calibración se sustituye con un conjunto de filtro adaptado para reflejar un espectro seleccionado de la fuente de luz de excitación hacia la muestra objetivo. Un espectro seleccionado de la iluminación se transmite desde la muestra objetivo hacia la parte de detector. El espectro de luz de emisión seleccionado se detecta a partir de la muestra objetivo y el espectro de luz de emisión seleccionado de la muestra objetivo se corrige usando la variación de intensidad determinada de la fuente de luz de excitación.
- 50 La divulgación se refiere a un proceso para corregir las fluctuaciones de intensidad en un sistema de microscopio de fluorescencia que tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, y una parte de detección dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de una muestra objetivo. El proceso incluye la inserción de un elemento de calibración en una trayectoria óptica entre un objetivo y la parte de detección. El elemento de calibración incluye un espejo dicromático y una superficie de calibración. El espejo está adaptado para reflejar la luz desde la fuente de luz de excitación hacia la superficie de calibración y para transmitir una muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración hacia el detector. Una variación de intensidad de fuente de luz de excitación se determina a partir de la muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración. El elemento de calibración se sustituye con un conjunto de filtro adaptado para reflejar un espectro seleccionado de la fuente de luz de excitación hacia la muestra objetivo. Un espectro seleccionado de la iluminación se transmite desde la muestra objetivo hacia la parte de detector. El espectro de luz de emisión seleccionado se detecta a partir de la muestra objetivo y el espectro de luz de emisión seleccionado de la muestra objetivo se corrige usando la variación de intensidad determinada de la fuente de luz de excitación.
- 55 La divulgación se refiere a un proceso para corregir las fluctuaciones de intensidad en un sistema de microscopio de fluorescencia que tiene una fuente de luz de excitación, una parte óptica, y una parte de detección dispuestas cooperativamente para obtener una imagen de una muestra objetivo. El proceso incluye la inserción de un elemento de calibración en una trayectoria óptica entre un objetivo y la parte de detección. El elemento de calibración incluye un espejo dicromático y una superficie de calibración. El espejo está adaptado para reflejar la luz desde la fuente de luz de excitación hacia la superficie de calibración y para transmitir una muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración hacia el detector. Una variación de intensidad de fuente de luz de excitación se determina a partir de la muestra de la luz de excitación de vuelta de la superficie de calibración. El elemento de calibración se sustituye con un conjunto de filtro adaptado para reflejar un espectro seleccionado de la fuente de luz de excitación hacia la muestra objetivo. Un espectro seleccionado de la iluminación se transmite desde la muestra objetivo hacia la parte de detector. El espectro de luz de emisión seleccionado se detecta a partir de la muestra objetivo y el espectro de luz de emisión seleccionado de la muestra objetivo se corrige usando la variación de intensidad determinada de la fuente de luz de excitación.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más específica de las realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que los caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, colocándose en su lugar el énfasis en ilustrar los principios de la invención.

La figura 1 muestra un diagrama de bloques de un sistema de microscopio a modo de ejemplo.

La figura 2 muestra un diagrama esquemático de un instrumento de calibración construido de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

La figura 3 muestra unas vistas delantera, trasera, lateral izquierda, lateral derecha, superior, e inferior de un instrumento de calibración a modo de ejemplo construido de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

La figura 4 muestra una vista en perspectiva superior en despiece del instrumento de calibración de la figura 3.

La figura 5 muestra una variación temporal de la intensidad de lámpara de excitación obtenida para diferentes instrumentos de calibración de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

La figura 6 muestra una variación temporal de los resultados cualitativos para múltiples canales de una primera platina de calibración.

La figura 7 muestra una variación temporal de los resultados cualitativos para múltiples canales de una segunda platina de muestra.

La figura 8 muestra un diagrama de flujo de un proceso para normalizar los resultados del análisis cualitativo de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

La figura 9 muestra un diagrama de flujo de un proceso para obtener los factores de corrección usados en la normalización de los resultados del análisis cualitativo de la figura 8.

La figura 10 muestra los resultados comparativos obtenidos usando diferentes sistemas de microscopio sin y con una corrección de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

Las figuras 11A y 11B muestran la comparación de los datos de muestra no corregidos y corregidos obtenidos de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

La figura 12A muestra los resultados del análisis cualitativo a modo de ejemplo obtenidos a partir de la misma muestra usando diferentes sistemas de microscopio sin normalización.

La figura 12B muestra la corrección de los resultados cualitativos de la figura 12A de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

Descripción detallada

Los sistemas y procesos se describen en el presente documento para obtener resultados analíticos cuantitativos normalizados a partir de un sistema que incluye unos componentes ópticos y una fuente de iluminación. En particular, los sistemas y los procesos relacionados para normalizar el análisis cuantitativo, microscópico de las muestras objetivo, tales como las muestras biológicas. Las muestras biológicas a modo de ejemplo incluyen una célula, un grupo de células, una sección de tejido, una matriz de secciones de tejido (por ejemplo, una matriz de micro tejidos) y combinaciones de uno o más de cualquiera de los mismos. Las muestras biológicas pueden tratarse con uno o más tintes. En algunos casos, los tintes son tintes inmunohistoquímicos. En algunos casos, los tintes inmunohistoquímicos son tintes fluorescentes.

En general, un sistema de microscopio incluye una fuente de iluminación configurada para iluminar una muestra objetivo, la óptica configurada para producir una imagen ampliada de la muestra objetivo iluminada, y un detector, tal como una cámara digital, configurado para capturar una imagen digital de la imagen ampliada. Los resultados cuantitativos pueden obtenerse a través de la manipulación de las imágenes digitales capturadas. Tal manipulación de imágenes puede incluir las técnicas de procesamiento de imágenes conocidas por los expertos en la materia. En al menos algunas realizaciones, una o más de tales capturas de imágenes y la manipulación de imágenes se realizan con la ayuda de un procesador. El procesador puede incluir un ordenador que implemente las instrucciones

preprogramadas.

El sistema también incluye un dispositivo de calibración configurado para redirigir una muestra normalizada de la fuente de iluminación hacia el detector. En al menos algunas realizaciones se configura un procesador de sistema para determinar un factor de corrección para un microscopio dado. El factor de corrección puede determinarse a partir de una medición de la muestra normalizada de la fuente de iluminación obtenida usando el dispositivo de calibración. El factor de corrección puede usarse (por ejemplo, por el procesador) para corregir cualquier variación en intensidad de una imagen detectada de la muestra objetivo. En algunas realizaciones, un procesador de sistema se configura con instrucciones (por ejemplo, software) para obtener el factor de calibración. Como alternativa, o además, el procesador de sistema se configura con instrucciones para usar el factor de corrección para corregir las imágenes detectadas. Tal calibración es útil para eliminar cualquier resultado cuantitativo, la variabilidad en la intensidad de la fuente de iluminación dentro del mismo sistema de microscopio, como puede ocurrir a lo largo del tiempo y entre los resultados cuantitativos obtenidos usando diferentes sistemas de microscopio y/o diferentes fuentes de iluminación.

El dispositivo de calibración incluye una superficie de dispersión que puede colocarse a lo largo de una trayectoria óptica entre la fuente de iluminación y el detector con el fin de dirigir una parte de dispersión de la luz desde la fuente de iluminación hacia el detector. La variabilidad en la iluminación difundida detectada puede usarse para desarrollar un factor de corrección de este tipo.

En otros ejemplos de un procesador de sistema se configura para determinar o acceder a un factor de corrección para el componente óptico de un microscopio dado. El factor de corrección puede determinarse a partir de una medición de la muestra normalizada usando el componente óptico del microscopio. El factor de corrección puede usarse (por ejemplo, por el procesador) para corregir cualquier variación en las características ópticas de un microscopio dado que afectan a la intensidad de una imagen detectada de la muestra objetivo.

Sistema de microscopio

Los sistemas y los procedimientos descritos en el presente documento pueden aplicarse, en general, a cualquier sistema de microscopía que incorpore una fuente de iluminación. Los ejemplos de al menos algunos sistemas de microscopio en los que pueden usarse los sistemas y procesos incluyen, la microscopía óptica, la microscopía fluorescente, y la microscopía de barrido láser confocal. Un sistema de microscopía a modo de ejemplo es el instrumento PM-2000TM disponible comercialmente en HistoRx, Inc., de New Haven, CT. Los sistemas y los procesos son específicamente útiles para los sistemas dirigidos a proporcionar un resultado semicuantitativo o cuantitativo. Las aplicaciones a modo de ejemplo incluyen el uso de la inmunohistoquímica (IHC) como se usa dentro del campo de la patología (véase, por ejemplo, Immunohistochemistry and Quantitative Analysis of Protein Expression, por M. Cregger et al., Arch. Pathol. Lab. Med., Vol. 130, julio de 2006 en las págs. 1026-1030). Normalmente, estos resultados se basan en la intensidad de la tinción de una muestra examinada usando el sistema de microscopía. Las muestras pueden ser especímenes biológicos. Los tintes pueden ser tintes histológicos generales, tintes especiales, IHC, FISH, cromogénicos, fluorescentes, etc.

De acuerdo con Cregger et al., un patólogo de diagnóstico normalmente interpreta un IHC de acuerdo con un enfoque subjetivo usando un criterio de valoración positiva-negativa binario o una escala de 3 a 4 puntos. Con la ayuda de un ordenador, puede obtenerse un análisis automatizado de las muestras objetivo usando un programa de ordenador para ayudar a eliminar la variabilidad inherente de la puntuación basada en el patólogo. En inmunofluorescencia, un producto fluorescente se deposita en el lugar de un antígeno, lo que permite la localización visual del antígeno en la muestra. Después de la captura fotográfica, el producto de reacción puede cuantificarse por el software de análisis de imágenes. Además, el antígeno puede localizarse en una localización celular específica (por ejemplo, nuclear, organocelular, citoplásmica, membranosa) o extracelular (véase, por ejemplo de Camp et al, Nature Medicine 8 (11) 1323-1327, 2002). Numerosos programas basados en ordenadores se han diseñado para el análisis de IHC, tales como BLISS e IHCscore disponibles en Bacus Laboratories, Inc. de Lombard, IL, ACIS de Clariant, Inc., de San Juan Capistrano, CA, y AQUA® análisis del HistoRx, Inc., de New Haven, CT.

En general, para el IHC fluorescente, se obtienen múltiples imágenes digitales (por ejemplo, TIFF, JPEG, GIF, mapa de bits, PNG) a partir de la misma muestra de tejido objetivo marcada con anticuerpos específicos de biomarcadores de proteínas y reactivos de detección fluorescentes secundarios. Al optimizar, los tintes fluorescentes proporcionan un intervalo dinámico más amplio que el disponible por los tintes cromogénicos basados en la absorbancia. Cada una de las imágenes digitales puede obtenerse usando un filtro óptico diferente configurado para pasar una respectiva de las señales fluorescentes secundarias. De este modo, se obtiene al menos una imagen digital correspondiente para cada una de las señales fluorescentes secundarias. Para el análisis cuantitativo, las imágenes digitales capturadas se manipulan (por ejemplo, usando un software de procesamiento de imágenes) para obtener una puntuación respectiva de la muestra de tejido.

Más específicamente, los sistemas y los procesos se describen en referencia a un sistema a modo de ejemplo ilustrado en la figura 1.

Haciendo referencia a la figura 1, un sistema de microscopio de fluorescencia de luz reflejada a modo de ejemplo 100 incluye una fuente de excitación 102, una lente de objetivo 104, una platina de soporte de muestra 106, un bloque de filtro 108', y un cabezal de observación 110. La platina de soporte de muestra 106 está configurada para soportar una muestra bajo ensayo a lo largo de un eje óptico y dentro de un plano de enfoque de la lente de objetivo 104. El bloque de filtro 108' también se localiza a lo largo del eje óptico entre la lente de objetivo 104 y el cabezal de observación 110. El bloque de filtro 108' es un dispositivo de tres puertos con dos puertos opuestos dispuestos a lo largo del eje óptico y un tercer puerto dispuesto fuera del eje. Como se ilustra, el tercer puerto puede ser ortogonal a una línea que une los dos puertos opuestos.

La iluminación de la fuente de excitación 102 se dirige hacia el puerto ortogonal del bloque de filtro 108'. El bloque de filtro 108' redirige una parte de la iluminación de la fuente de excitación 102 hacia la lente de objetivo 104. La lente de objetivo 104 incluye preferentemente una relativamente alta apertura numérica, permitiéndola de este modo capturar una parte sustancial de la luz de excitación. La lente de objetivo 104 funciona como un condensador que dirige la luz de excitación hacia una muestra bajo ensayo colocada sobre la platina. En algunas realizaciones, múltiples lentes de objetivo 104 (por ejemplo, 4X, 10X, 20X, 40X, 60X) están incluidas dentro de un solo porta objetivos (no mostrado). El porta objetivos puede manipularse para poner selectivamente uno diferente de entre las múltiples lentes de objetivo 104 en alineación con el eje óptico para ajustar la ampliación de la muestra bajo ensayo.

La iluminación (emisión) de la muestra bajo ensayo se desplaza a lo largo de la trayectoria óptica a través de la lente de objetivo 104 y en el primero de los puertos opuestos del bloque de filtro 108'. Al menos una parte de la iluminación de muestra continúa a lo largo de la trayectoria óptica, saliendo del segundo de los puertos opuestos del bloque de filtro 108' hacia el cabezal de observación 110. Como se describe en más detalle a continuación, el bloque de filtro 108' filtra selectivamente la iluminación que pasa a través del mismo. En la microscopía de fluorescencia, la filtración puede usarse para ver selectivamente las emisiones de los diferentes fluoróforos (por ejemplo, rojo, verde, azul). Como se ilustra, el sistema de microscopio 100 puede incluir diversos bloques de filtro 108', 108'', 108''' (en general 108), cada bloque de filtro 108 está sintonizado para pasar una longitud de onda de emisión seleccionada hacia el cabezal de observación 110. Los diferentes bloques de filtro 108 pueden almacenarse dentro de un carrusel o torreta 115, lo que permite la rápida selección de un bloque de filtro diferente 108 sin perturbar la muestra bajo ensayo. En algunas realizaciones, los diferentes bloques de filtro 108 están dispuestos radialmente dentro de la torreta 115 alrededor de un eje de rotación. La torreta 115 está colocada con su eje de rotación paralelo y hacia un lado del eje óptico, de tal manera que uno de los bloques de filtro 108' se alinea con el eje óptico. La rotación de la torreta 115 mueve selectivamente un bloque de filtro 108' fuera de la alineación y trae otro de los bloques de filtro 108'', 108''' en alineación con el eje óptico.

El cabezal de observación 110 dirige al menos una parte de la luz desde el bloque de filtro 108 hacia un dispositivo de recogida de imágenes, tal como una cámara de dispositivo acoplado de carga (CCD) 112. En algunas realizaciones, el cabezal de observación 110 incluye adicionalmente uno o más porta objetivos (no mostrados) que permiten la observación manual de la muestra bajo ensayo. Un porta objetivos de este tipo puede usarse para ajustar la colocación de una muestra de 107 sobre la platina 106 y coordinar la colocación de la platina 106 antes y durante el ensayo. En algunas realizaciones, se proporciona un primer obturador 117 para controlar el tiempo de exposición de la muestra 107 a la fuente de excitación 102. Un segundo obturador 114 se proporciona para controlar el tiempo de exposición de un dispositivo de representación de imágenes, tal como la cámara CCD 112. Como se muestra, el obturador 114 puede ser un componente independiente localizado a lo largo de la trayectoria óptica entre la muestra bajo ensayo y el cabezal de observación 110. Como alternativa o además, de un obturador independiente 114, el obturador puede estar integrado en la cámara CCD 112.

El sistema de microscopio 100 también incluye un controlador 116. El controlador 116 puede usarse para controlar el proceso de adquisición de imágenes general. Preferentemente, el controlador 116 está en comunicación con uno o más subelementos del sistema de microscopio 100 para permitir el control automatizado del sistema 100. En la realización a modo de ejemplo, el controlador 116 está en comunicación con una o más de las fuentes de excitación 102, un traductor axial 119 (ajuste de enfoque) de la lente de objetivo 104, la cámara CCD 112, el obturador 114, la torreta 115, y un controlador de posición de platina 118. El controlador 116 puede incluir al menos un microprocesador o un ordenador 116 que funciona bajo el control de un código de programa.

En funcionamiento, el controlador 116 puede enviar una señal al controlador de posición de platina 118 para colocar la platina 106, de tal manera que una región o punto seleccionado 109 de la muestra bajo ensayo se pone en alineación con el eje óptico. El controlador 116 también puede enviar una señal al traductor axial 119 configurado para colocar y recolocar la lente de objetivo 104 a lo largo del eje óptico con respecto a la platina 106. Para las realizaciones que incluyen un porta objetivos motorizado, el controlador 116 puede enviar una segunda señal al porta objetivos haciendo que rote una seleccionada de las múltiples lentes de objetivo 104 en alineación con el eje óptico antes de enfocar. El controlador 116 también puede enviar una señal a la torreta 115 provocando una rotación controlada de la torreta para seleccionar uno de los múltiples bloques de filtro 118. En respuesta, la torreta 118 rota, poniendo en alineación con el eje óptico el seleccionado de los bloques de filtro 118. El controlador 116 envía a continuación una señal a la fuente de excitación 102 encendiendo la fuente 102, al menos momentáneamente, para iluminar la muestra bajo ensayo. El obturador 114 está normalmente cerrado bloqueando la trayectoria óptica entre

la muestra bajo ensayo y la cámara CCD 112. Para algunos microscopios la fuente de luz 102 se enciende durante la inicialización del instrumento. Con los microscopios fluorescentes, las lámparas de alta intensidad requieren un periodo de calentamiento para permitir que la intensidad de la fuente 102 se estabilice antes de que se midan las muestras de ensayo.

5 Para este tipo de sistemas fluorescentes, la fuente de luz 102 puede permanecer encendida durante el funcionamiento. En tales aplicaciones, se usa un primer obturador 117 proporcionado entre la fuente de luz 102 y la muestra de ensayo para bloquear la iluminación de la muestra hasta que esté listo para ver la muestra y adquirir una imagen de la muestra. Tal exposición limitada de la muestra de ensayo a la iluminación puede evitar la decoloración de la muestra. Opcionalmente, se proporciona un segundo obturador 114 dentro de la cámara CCD 112. Tras recibir una señal de activación desde el controlador 116, el primer obturador 117 se abre durante un periodo de exposición predeterminado antes de cerrarse de nuevo. Una segunda señal de activación del controlador se envía al segundo obturador 114 asociado con la cámara CCD 112. Esta señal controla la exposición lo que permite que una muestra de la emisión de la muestra bajo ensayo alcance la cámara CCD 112. Por lo tanto, el primer obturador 117 se abre durante al menos toda la duración de una exposición controlada por el segundo obturador 114. En algunas realizaciones, el funcionamiento de los dos obturadores 114, 117 puede controlarse por una señal común, o de otro modo configurarse para funcionar en sincronización. Bajo el control del controlador 116, la cámara CCD 112 captura una imagen electrónica de la iluminación de la muestra bajo ensayo. La imagen puede reenviarse al controlador 116 o a un sistema exterior para su análisis.

20 Con un control independiente opcional de los dos obturadores 114, 117, puede variarse el sincronismo de cada obturador para producir diferentes efectos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el primer obturador 117 se abre para exponer la muestra de ensayo durante un período de tiempo predeterminado y a continuación se cierra. Esto puede realizarse para exponer una muestra de ensayo luminiscente a la iluminación de la fuente 102. El segundo obturador 114 podría hacerse funcionar después del cierre del primer obturador 117 para muestrear la luminiscencia de la muestra, sin la interferencia de iluminación de la fuente.

25 En una realización específica, el sistema de microscopio de fluorescencia es parte de un sistema de análisis IHC integrado cuantitativo, tal como el sistema PM-2000TM de análisis de AQUA®, disponible comercialmente en HistoRx, Inc., de New Haven, CT. AQUA es una marca comercial registrada de HistoRx, Inc. El sistema de análisis IHC consiste en los siguientes componentes montados en un recinto hermético a la luz: un microscopio de fluorescencia, tales como el microscopio de epi-fluorescencia Olympus BX51, disponible comercialmente en Olympus America, Inc. de Center Valley, PA; el microscopio está equipado con un porta objetivos motorizado para controlar la selección entre las diferentes lentes de objetivo (por ejemplo, 4X, 10X, 20X, 40X, 60X), y una torreta de filtros motorizada para controlar la selección entre la diferente selección de cubos de filtro (por ejemplo, en DAPI, Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7 o longitudes de onda equivalentes). El sistema también incluye una platina motorizada, tal como la Prior Scientific número de pieza H101A. La tarjeta PCI que impulsa la platina es la platina motorizada de Prior Scientific número de pieza H252 disponible comercialmente en Prior Scientific, Inc. de Rockland, MA. La tarjeta de control ocupa una ranura de expansión PCE dentro de un controlador de ordenador. El control de enfoque se ve facilitado por el software integrado. El sistema también incluye una fuente de luz, tal como el sistema X-CITE 120, disponible comercialmente en EXFO Life Sciences & Industrial Division of Ontario, Canadá, que está equipado con una lámpara de haluro de mercurio/metal; una cámara digital monocromática para la captura de imágenes, tal como la cámara QUANTIFIRE, disponible comercialmente en OPTRONICS de Goleta, California; y un controlador de ordenador. En la realización a modo de ejemplo, el ordenador es un ordenador personal con Windows XP o un entorno de sistema operativo superior.

Normalización del instrumento

45 Con el fin de normalizar los resultados cuantitativos obtenidos usando un sistema específico, puede determinarse un factor intrínseco de sistema para explicar la variabilidad de intensidad de la fuente de excitación y la variabilidad del dispositivo, es decir, a lo largo de la trayectoria óptica. Con el fin de lograr esto, también puede obtenerse una medida de la intensidad de fuente de luz de excitación, por ejemplo usando una herramienta de medición de intensidad de lámpara en línea. También una medición de una muestra normalizada o de calibración, es decir, una platina de microscopio de calibración puede obtenerse usando el sistema específico para definir uno o más factores de trayectoria ópticas. El uso de una platina de calibración de este tipo es específicamente útil para las aplicaciones de IHC basadas en fluorescencia, en las que las regiones fluorescentes de muestra de la platina de calibración emiten una radiación dentro de los respectivos anchos de banda. Las emisiones fluorescentes permiten la caracterización de una trayectoria óptica en cada una de la una o más longitudes de onda respectivas. Esta medición puede obtenerse de manera simultánea o por separado.

Medición de intensidad de fuente de luz

En general, un proceso o un instrumento para proporcionar la medición directa de la intensidad de fuente de luz, se incorpora más convenientemente en el sistema. Un instrumento de muestreo de fuente de luz prevee capturar una muestra de la intensidad de fuente de luz. En algunas realizaciones, una parte muestreada de la intensidad de

fuentes de luz se dirige a un detector (por ejemplo, una cámara). La medición de intensidad de fuentes de luz puede realizarse independientemente de la parte de óptica del sistema.

De manera más general, el proceso o instrumento de muestreo accede a una muestra de la fuente de luz en los niveles de intensidad por debajo de un umbral de saturación de detector de fuente de luz y por encima de un nivel de ruido. Por ejemplo, la intensidad de fuente de luz puede muestrearse por un sensor electrónico dentro de un período de exposición (por ejemplo, 10 milisegundos). Como alternativa, o además, puede atenuarse la fuente de luz para garantizar que la muestra obtenida está dentro del intervalo de sensibilidad de un dispositivo de detección dado.

La intensidad de fuente de luz muestreada puede lograrse usando un radiómetro en línea, lo que resulta en una tensión representativa medible de la intensidad de fuente de luz. Tales tensiones medidas pueden procesarse automáticamente por el sistema. Por ejemplo, las tensiones pueden enviarse a un procesador para un procesamiento adicional. En algunas realizaciones, los niveles de tensión se convierten en una representación digital de las tensiones. Dicha conversión puede lograrse usando la conversión analógica a digital, lo que permite el procesamiento digital de la tensión muestreada. El procesamiento digital puede lograrse mediante uno o más de entre un software que se ejecuta en el procesador y un hardware adaptado para el procesamiento de señales digitales.

La intensidad de fuente de luz muestreada puede obtenerse, directa o indirectamente a partir de la fuente de luz. En algunas realizaciones, la intensidad de fuente de luz muestreada se obtiene independiente de al menos algunas otras partes del sistema, tales como las ópticas (por ejemplo, una lente de objetivo), que pueden afectar de manera independiente en el resultado muestreado. Como alternativa, o además, la intensidad de fuente de luz muestreada se mide en la propia fuente de luz, evitando de este modo cualquier efecto del microscopio.

Cubo de calibración

Un instrumento especial de calibración se usa con el propósito de obtener una muestra de la luz con el fin de medir la intensidad de una fuente de luz. El instrumento de calibración permite una medición de intensidad de luz relativa a obtenerse sustancialmente de manera simultánea con la imagen de muestra objetivo. Esto se logra conmutando un instrumento de calibración especial en la trayectoria óptica para obtener la medición de intensidad de luz relativa, y a continuación fuera de la trayectoria óptica para obtener la imagen de muestra. Por ejemplo, si el sistema de microscopía es un sistema fluorescente que usa múltiples cubos de filtros pre-cargados en una torreta rotatable 115, el instrumento de calibración puede incluirse como uno de los cubos de filtros (es decir, un cubo de calibración) dentro de la torreta 115. Esta permitirá que el cubo de calibración se intercambie con los otros cubos de filtro de manera automática durante el curso de las mediciones.

En general, un cubo de filtro tiene unas aberturas en las caras superior, inferior, y delantera de un bastidor en forma de cubo. La abertura delantera o puerto permite que la luz de la fuente de iluminación entre en el cubo, después de lo cual la luz se refleja en una superficie reflectante interior, en general, colocada a 45 grados con respecto al eje de la luz entrante. La superficie reflectante angulada (por ejemplo, un espejo) redirige una parte reflejada de la luz muestreada hacia la abertura inferior o puerto del cubo. En funcionamiento, la luz redirigida puede usarse para iluminar un objetivo (una muestra de tejido, etc.). La luz redirigida se desplaza a lo largo de una trayectoria óptica que puede incluir las ópticas de objetivos que se proporcionan en los sistemas de microscopio. Al menos alguna parte de la luz de iluminación puede reflejarse desde la muestra. Para al menos algunas aplicaciones, también puede emitirse una luz estimulada desde la muestra, como a través de la fluorescencia. En cualquiera de los casos, al menos una parte de la luz de la muestra (reflejada y/o emitida) se desplaza de vuelta a lo largo de la misma trayectoria óptica, que entra en el cubo desde el puerto inferior. Al menos una parte de la luz que entra en el cubo de calibración se desplaza a través de la superficie reflectante angulada del espejo angulado a lo largo de la trayectoria óptica y sale a través de la abertura o puerto superior del cubo y hacia un dispositivo de representación de imágenes.

En algunas realizaciones, el cubo de calibración es un cubo de filtro modificado en el que se fija una superficie de dispersión de luz para bloquear la abertura inferior. Durante el funcionamiento, la luz que entra en el cubo se refleja en la superficie reflectante angulada interior y se dirige hacia la superficie de dispersión de luz. La luz reflejada ilumina la superficie de dispersión de luz. Al menos una parte de la luz dispersada desde la superficie de dispersión de luz se dirige de vuelta a través de la superficie reflectante interior, saliendo por la abertura superior del cubo hacia el dispositivo de representación de imágenes. El mismo cubo de calibración que tiene la misma superficie de dispersión de luz puede usarse para muestrear la luz de la misma fuente de iluminación en diferentes momentos y/o en diferentes fuentes de iluminación. De esta manera, el cubo de calibración proporciona un medio para muestrear la intensidad de luz dispersada fuera de una superficie normalizada (en lugar de la muestra típica) para captarse por el dispositivo de representación de imágenes, y puede usarse para determinar una medición de intensidad de luz normalizada. De manera beneficiosa, tal muestreo puede lograrse sin tener que recolocar una o más de entre la platina de objetivo y la lente de objetivo.

El cubo de calibración sirve como una herramienta de acceso en línea para medir la intensidad de la lámpara. En

cooperación con un procesador 116 (figura 1), la herramienta de medición de intensidad no solo permite el seguimiento de las desviaciones de intensidad de la lámpara, sino que también permite un medio sencillo de normalizar los resultados cuantitativos. La contabilización de tales desviaciones de intensidad de la lámpara promueve unas medidas de precisión de la expresión de biomarcadores en una muestra de tejido. Por ejemplo, los datos de las imágenes capturadas obtenidas por diversos sistemas de microscopía equipados con cubos de calibración idénticamente contruidos, normalizados, puede corregirse para eliminar con eficacia cualquier contribución que de otro modo se habría atribuido a las variaciones de intensidad de la lámpara. Por lo tanto, los resultados del análisis cuantitativo, tales como las puntuaciones AQUA obtenidas a partir de las imágenes corregidas, pueden compararse con una indicación fiable de las diferencias de muestras objetivo, no con las diferencias del sistema. Los datos de calibración de fuente de luz obtenidos usando el cubo de calibración pueden recogerse, almacenarse y accederse desde diferentes aplicaciones de software del sistema, tales como los programas de inicialización y de configuración del sistema, programas de adquisición de imágenes que permiten una interacción mínima del usuario y un tiempo y coste insignificante.

En una realización, haciendo referencia a la figura 2, un instrumento de calibración, o el cubo 130 incluye una carcasa 132 que incluye un primer puerto 134a y un segundo puerto 134b opuesto al primero y alineado con el mismo a lo largo de un eje óptico común. La carcasa 132 también incluye un puerto lateral 134c que no está alineado con el eje óptico. Como se ilustra, el puerto lateral 134c es ortogonal a la trayectoria óptica. La carcasa 132 también incluye una superficie reflectante interior 136 que forma un ángulo distinto de cero θ , con el eje óptico. La iluminación se recibe de una fuente de excitación 102 a través del puerto lateral 134c. La superficie reflectante 136 está angulada para redirigir una parte de la luz de excitación recibida a lo largo del eje óptico, a través del segundo puerto 134b. El cubo de calibración 130 también incluye una superficie de dispersión de luz 137 colocada en relación con el segundo puerto 134b a dispersar, o devolver la luz de excitación en una dirección opuesta a lo largo del mismo eje óptico. Al menos una parte de la luz de excitación dispersada pasa a través de la superficie reflectante y sale de la carcasa 132 a través del primer puerto 134a. Esta luz dispersada puede detectarse por una cámara CCD 112 alineada con el primer puerto 134a.

En ejemplos alternativos, un instrumento de calibración puede formarse sin una superficie de espejo. Por ejemplo, considerando la misma estructura general del cubo 130 ilustrado en la figura 2, la superficie reflectante interior 136 puede sustituirse por una superficie de dispersión de luz. La superficie de dispersión de luz puede angularse dentro del cubo para promover la redirección de la luz dispersada de la fuente de iluminación 102 a través del puerto lateral 134c.

La superficie de dispersión de luz 137 es en general uniforme, teniendo una superficie que es una superficie mínimamente reflectante (por ejemplo, una superficie mate) y proporciona una reflectancia/fluorescencia uniforme a través del campo de visión, que prevé también medir la uniformidad de la luz muestreada a partir de la fuente de luz. La superficie de dispersión de luz 137 dispersa la luz sustancialmente de manera uniforme. El material que forma la superficie de dispersión de luz 137 debería ser capaz de soportar altas temperaturas y la intensidad de luz sin degradación o variación. El material es preferentemente rígido o al menos semi-rígido y no susceptible a amarillarse, degradarse o foto-blanquearse. Además, el material debería poder reproducirse, y ser relativamente barato. En algunas realizaciones, ciertos materiales metálicos, cerámicos o plásticos que cumplan estas condiciones. Los materiales cerámicos, tales como el oro y los objetivos de cerámica blanca están disponibles comercialmente en Avian Technologies, Inc. de Wilmington, OH. Tales materiales pueden usarse para el filtro de cubo de calibración 148 (figura 3). Como alternativa, o además, estos materiales también pueden usarse para las platinas de calibración normalizadas. En una realización alternativa puede usarse una pieza de papel de filtro plana.

En las aplicaciones de microscopio fluorescente, la luz de emisión detectada por la cámara CCD 112 es sustancialmente más baja en intensidad que la luz de excitación. Con el fin de evitar la saturación de la cámara CCD 112 cuando se detecta la propia fuente de excitación, se incluyen uno o más filtros entre la fuente de excitación y la cámara 112 para atenuar la luz a un nivel suficientemente bajo. En algunas realizaciones, se proporcionan uno o más filtros de densidad neutra o grises a lo largo de una trayectoria óptica entre la fuente de excitación 102 y la cámara CCD 112. Por ejemplo, se proporciona un primer filtro de densidad neutra 138a en el puerto lateral 134c que atenúa la luz de excitación que entra en la carcasa 132. Un segundo filtro de densidad neutra 138 B se proporciona en el primer puerto 134a que atenúa la luz dispersada que vuelve a la cámara CCD 112. Los valores de atenuación de cada filtro 138a, 138b pueden ser los mismos o diferentes, siempre que sus efectos combinados garanticen que la cámara CCD 112 no se saturará por la luz dispersada procedente de la fuente de excitación 102.

EJEMPLO: En una realización a modo de ejemplo del cubo de calibración 130 mostrado en la figura 3, el cubo 130 consiste en una carcasa de filtro OLYMPUS regular o un soporte 140 (cubo de soporte de filtro U-MF2 BX, número de pieza U-M610 de OLYMPUS) equipado con unos filtros de densidad neutra 142a, 142b en las aberturas de emisión y de excitación 144a, 144b y un espejo dicróico 50/50 146. En algunas realizaciones, los filtros 142a, 142b se mantienen en la proximidad de las aberturas 144a, 144b usando unos bastidores de filtro respectivos 145a, 145b (figura 4).

La parte inferior de la carcasa 140 tiene una superficie de dispersión de luz 137 (figura 2); 148 (figuras 3, 4) montada

sobre el puerto 144c (figura 3) colocada para bloquear completamente la abertura de muestra 144c. Una vista en perspectiva superior despiezada del cubo de calibración a modo de ejemplo se muestra en la figura 4.

EJEMPLO: En una realización a modo de ejemplo, el cubo de calibración 130 incluye dos filtros de densidad neutra, 25 mm, tales como el Chroma n.º de cat. 2200a, disponible comercialmente en Chroma Technology Corp. de Rockingham, VT. El cubo 130 también incluye un espejo dicróico, un divisor de haz 50/50, tal como el Chroma n.º de cat. 21000, alojado dentro de un soporte de filtro (cubo) 140, tal como el Chroma n.º de cat. 91018. La superficie de dispersión puede incluir un papel de filtro 148, tal como el VWR cat # 28306-153, comercialmente disponible en VWR de West Chester, PA. No es importante usar una marca específica de papel de filtro, pero preferentemente se usa el mismo filtro entre todos los cubos de calibración 130 de los diferentes sistemas de microscopio para garantizar la uniformidad de los resultados. Como se describirá a continuación, aunque esto no es crítico, ya que las mediciones relativas pueden realizarse para los cubos de calibración 130 usando un papel filtro diferente 148 en comparación con un cubo de calibración común o normalizada. Tal comparación puede usarse para determinar un desplazamiento a tenerse en cuenta en el proceso de corrección.

En otras realizaciones, el cubo de calibración 130 incluye un soporte de filtro de microscopio, tal como un cubo de soporte de filtro U-MF2 BX, número de pieza U-M610 de OLYMPUS, disponible comercialmente en Chroma Technology Corp de Rockingham, VT, cat # 91018. Pueden usarse otros cubos de filtro disponibles comercialmente compatible con el sistema de microscopio. En un ejemplo específico, los filtros de densidad neutra son el filtro de densidad neutra ND 1.0 número de pieza UVND1.0 ND 1.0, 10% de transmitancia, 25 mm, y el filtro de densidad neutra ND 2.0 número de pieza UVND2.0 ND 2.0, 1% de transmitancia, 25 mm, disponibles comercialmente en Chroma Technology Corp. El divisor de haz/dicróico 50/50 es un divisor de haz 50/50 número de pieza 21000 de Chroma, 38X26 mm. Un papel de filtro WHATMAN, grado 1, n.º de cat. 1001-125, VWR de West Chester, PA está fijado a la parte inferior del cubo. De manera beneficiosa, el material de filtro dispersa una cantidad apropiada de luz de nuevo hacia la cámara CCD 112, de tal manera que puede adquirirse una imagen por la cámara 112 en un período de exposición razonable. Por ejemplo, el período de exposición puede elegirse entre aproximadamente 3 y 200 milisegundos. Otros períodos de exposición pueden seleccionarse fuera de este intervalo, siempre que sean apropiados para las capacidades de cámara aplicables.

La luz dispersada recibida en la cámara CCD 112 está, preferentemente, por debajo del nivel de saturación de cámara para el tiempo de exposición seleccionado teniendo en consideración las variaciones en otros conjuntos de cubos que pueden ser más brillantes o más tenues. Menos deseable, pero aceptable, es un material de dispersión que proporcione una señal utilizable (por debajo del límite de saturación de la cámara) para períodos de exposición mayores de aproximadamente 200 milisegundos.

Para el uso en la normalización de los sistemas, puede instalarse un cubo de filtro de calibración diseñado especialmente 130 dentro de la torreta del sistema de microscopio 100 (figura 1). Este cubo de calibración 130 sirve como una herramienta de medición de intensidad de lámpara en línea que proporciona un medio para medir la intensidad de luz de excitación, mediante el muestreo de la luz dispersada que es directamente proporcional a la intensidad de fuente de luz de excitación incidente. Por lo tanto, la luz dispersada muestreada puede usarse para realizar un seguimiento de la variación en la intensidad de luz de la fuente de excitación durante el uso. Tales variaciones en la intensidad pueden producirse a partir de los efectos a largo plazo de la fuente de excitación tal como el envejecimiento, en los que la intensidad de la fuente puede disminuirse lentamente durante el proceso normal de envejecimiento. Las variaciones también pueden ser el resultado de los efectos a corto plazo que pueden resultar de otros efectos, tales como las variaciones de temperatura ambiente, las variaciones de temperatura de dispositivo del dispositivo de calentamiento, y la tensión y la corriente de excitación entre otros.

Durante la adquisición de imágenes en la que se obtiene una muestra de la intensidad de luz de fuente de iluminación, se atenúa la luz que se desplaza a través del filtro de densidad neutra de excitación 142a, que pasa a través del divisor de haz 146 y se refleja fuera del material de calibración 148 (es decir, el objetivo de papel blanco). A continuación, la luz reflejada (o dispersada) se atenúa aún más en el filtro de densidad neutra de emisión 142b y a continuación se captura por la cámara 112 (figura 4). Los filtros de densidad neutra 142a, 142b están dispuestos de tal manera que la luz de excitación se atenúa mucho para reducir la intensidad que incide sobre el material de calibración 148. El filtro de emisión 142a permite que pase más luz y por lo tanto ayuda a reducir la intensidad observada por la cámara digital 112.

Normalización del cubo de calibración (CC)

Los cubos de calibración individuales pueden tener variaciones intrínsecas debido a las diferencias de material que se contabilizan preferentemente con el fin de normalizar los resultados cuantitativos obtenidos a través de los instrumentos. En la fabricación, puede identificarse un cubo normalizado universal. Después de esto, todos los cubos fabricados se comparan con el cubo normalizado universal para muestrear una fuente de luz consistente con cada nuevo cubo y contabilizarse cualquier diferencia inherente, es decir, aplicando una corrección de cubo o un factor de calibración de cubo (CC). El factor de calibración de cubo se determina inicialmente, preferentemente, para cada nuevo cubo de calibración. En algunos casos, el factor de calibración de cubo puede determinarse

posteriormente de manera periódica para el mantenimiento del sistema, y cuando las propiedades de material de un cubo puedan haber cambiado (es decir, debido al envejecimiento).

EJEMPLO: Con el fin de caracterizar una serie de cubos de calibración similares, se obtuvieron resultados para cada uno de un lote de cinco cubos (J1-J5) usando la misma fuente de excitación y configuración de la cámara. Uno de los cubos en concreto (es decir, el J5) fue designado como un cubo de referencia para un grupo. Este cubo podría denominarse como un cubo normalizado universal. El cubo de referencia J5, junto con los otros cubos a ensayarse, se instalaron simultáneamente en la torreta 115 del sistema de microscopio 100 (figura 1). Se adquirieron unas imágenes de la iluminación muestreada a partir de la fuente de iluminación obtenida a través del cubo de calibración 130 por la cámara digital 112 para cada cubo J1-J5. Las mediciones de intensidad de luz obtenidas de este modo se compararon entre los diferentes cubos de calibración que se estaban ensayando. Se determinó una relación de intensidad medida para cada cubo de ensayo J1-J4 con la intensidad medida usando el cubo de referencia J5 que representa un factor de calibración de cubo (CC). En un experimento a modo de ejemplo, se recogieron dieciséis mediciones para cada uno de los diferentes cubos J1-J5. Se determinó una relación de la intensidad obtenida para cada cubo J1-J5 con la intensidad del cubo de referencia J5. La Tabla 1 muestra los valores de CC determinados para los cinco cubos en comparación con el cubo de referencia (J5). Ya que la construcción de los cubos J1-J5 fue similar, las relaciones de las intensidades están todas cercanas a 1.

Tabla 1: Factor de calibración de cubo (Valores de CC)

N.º de cubo de calibración	CC
CC2	0,894
J1	0,929
J2	0,989
J3	0,907
J4	0,883
J5 (cubo de referencia)	1,000

Para determinar los efectos temporales, se midieron las mediciones de intensidad de luz para cada cubo usando el mismo instrumento durante un período de dos días. Se tomaron un mínimo de diez mediciones a través de cada cubo cada día (suma de las intensidades de los píxeles en la imagen capturada). Los resultados se muestran gráficamente en la figura 5 como una intensidad total promedio en una escala de 0 a 120.000. Los resultados muestran que se reconocieron las fluctuaciones de intensidad de fuente de luz en las mediciones usando todos los cubos J1-J5. Preferentemente, los valores de coeficiente de correlación R^2 entre todos los cubos son relativamente altos (por ejemplo, $> 0,95$). Los resultados del ensayo sugieren que durante la adquisición de imágenes del espécimen real, puede fluctuar la intensidad de fuente de luz. Estas fluctuaciones pueden ocurrir a lo largo de una duración corta cada vez que la lámpara se enciende y las variaciones lentas ocurren a lo largo del tiempo mientras que una lámpara permanece encendida.

Normalización de la fuente de luz (LS)

En un procedimiento a modo de ejemplo para determinar una normalización de la fuente de luz LS, las intensidades de píxel de una imagen capturada de la superficie de calibración iluminada se combinan en una suma. Pueden identificarse diferentes intervalos en función de los valores de escala de intensidad específicos usados para los píxeles, así como el número de píxeles de la imagen. Los valores LS a modo de ejemplo se obtienen usando el intervalo del sistema AQUA® desde aproximadamente 20.000 a 120.000. A continuación, puede formarse una relación a partir del factor LS y un valor de intensidad elegido. Una relación de este tipo puede usarse para compensar los datos de muestra objetivo para eliminar esencialmente la variación de fuente de luz. En una realización a modo de ejemplo, se forma una relación con un valor elegido de 100.000 y un factor LS que está dentro del intervalo del sistema AQUA®.

Medición de trayectoria óptica (OP) de dispositivo

En general, un procedimiento de corrección de trayectoria óptica usa una muestra de calibración (por ejemplo, una platina de calibración) que proporciona una reflectividad y/o una fluorescencia conocidas que pueden usarse en la medición directa del dispositivo específico o en el rendimiento de la trayectoria óptica del sistema. Una muestra de calibración puede usarse para obtener un factor de corrección para el rendimiento de la trayectoria óptica intrínseca de un sistema de microscopía dado. Cuando los diferentes sistemas de microscopía se corrigen de manera similar, los resultados de muestra objetivo obtenidos a partir de los diferentes sistemas pueden compararse de manera fiable a través de los diferentes sistemas de microscopía.

Más en general, la muestra de calibración tiene las siguientes características:

- Muestra algunas características de las muestras analizadas normalmente en el sistema (es decir, para los sistemas fluorescentes, estas características pueden incluir la longitud de onda de excitación/emisión);
- construido usando un material uniforme, con propiedades ópticas (por ejemplo, la reflectividad) que son reproducibles, están disponibles, y son baratas;
- durante al menos las aplicaciones fluorescentes, el material uniforme puede ser opaco (es decir, una cerámica, etc.);
- para aplicaciones transparentes de campo claro, el material uniforme atenúa la fuente de luz, si es necesario, a un nivel aceptable para el detector; y
- proporciona un blanqueo mínimo (para los sistemas fluorescentes).

Las variaciones a lo largo de una trayectoria óptica de un sistema de microscopía dado no variarán probablemente en un grado significativo a lo largo del tiempo para el mismo sistema. Por lo tanto, no hay necesidad aparente de volver a realizar el procedimiento de corrección de trayectoria óptica durante las operaciones normales. En al menos algunas realizaciones, el factor de corrección de trayectoria óptica se determina en el momento de la fabricación. El factor de corrección de trayectoria óptica puede re-determinarse después del mantenimiento (por ejemplo, una limpieza) del sistema de microscopía.

Platinas de control o de calibración

Una muestra de calibración de instrumento normalizado (platina de control o platina de calibración) se usa para adquirir datos en un sistema específico a calibrarse para aproximarse a la eficacia de producción de luz de un sistema de microscopía específico y a la configuración óptica.

Por ejemplo, la platina de control puede ser un conjunto de platina de referencia fluorescente XF900, que proporciona una platina de referencia fluorescente azul o verde disponible comercialmente en Omega Optical Inc. de Brattleboro, VT. Otros materiales de muestra uniformes pueden usarse siempre que pueda adquirirse una señal suficiente en cada canal (es decir, la longitud de onda) dentro del tiempo de exposición de conjunto (por ejemplo, entre aproximadamente 3 y 1000 milisegundos, o un intervalo real de la cámara CCD 112) y el material preferentemente demuestra un mínimo blanqueo a lo largo de un número normalizado de series. El material de muestra podría reproducirse de tal manera que puede usarse para normalizar cada instrumento y dimensionarse para ajustar en la platina de microscopio. El material emite o refleja preferentemente una señal luminosa con componentes espectrales en la banda(s) de longitud de onda apropiada a adquirirse a través de cada cubo de filtro durante el funcionamiento en el sistema de microscopio, en un ambiente de baja reflexión especular. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, plásticos de color alternativos, materiales reflectantes de papel y cerámica, superficies metálicas o superficies revestidas con diversas tintas y tintes.

EJEMPLO: Una platina de calibración se colocó en la platina de un sistema de microscopio 100 previamente fijada con un cubo de calibración pre-normalizado 130 (figura 2) en la torreta de filtro 115 (figura 1). Dos diferentes platinas de control de instrumentos se testearon: la muestra 1, que tiene un espectro de aproximación FITC/GFP (excitación verde) y la muestra 2 que tiene un espectro de aproximación DAPI/Indo/Fura (excitación azul). La platina de calibración 1 se iluminó, y se obtuvo una imagen de la emisión de fluorescencia de la muestra a través de cada uno de los tres diferentes cubos de filtros 108 (figura 1), una para cada canal y el cubo de calibración. Se realizaron más de 900 iteraciones durante un período de aproximadamente treinta horas. Resultados cuantitativos, para cada canal por iteración se calculó una puntuación de intensidad ("puntuación AQUA® obtenida"): la intensidad media multiplicada por el tiempo de exposición multiplicado por la profundidad de bit (es decir, 0-255). La intensidad de luz a través del canal FITC al usar la muestra 1 fue demasiado brillante lo que indica que este material no es ideal para normalizar las fluctuaciones de luz cuando se adquiere en este canal, véanse los resultados descritos para la muestra 2 a continuación como una alternativa. Los resultados se representaron como la puntuación de análisis AQUA frente a la iteración para la platina 1 (figura 6) para las puntuaciones de intensidad de platina de calibración obtenidas en cada canal Cy3, Cy5 y por separado para el cubo de calibración. Esencialmente se obtuvo un patrón de intensidad de luz idéntico usando la muestra de control de instrumentos 1 en el canal Cy3, Cy5 y de cubo de calibración que indicando que la variabilidad es poco probable debido al blanqueo del material de platina de control de instrumentos. Más bien, la variación es indicativa de la verdadera variabilidad de intensidad de luz inherente al sistema 100. Una disminución sutil a largo plazo en las mediciones cuantitativas puede observarse durante al menos la primera mitad de las muestras. Superpuesto a esto están las variaciones relativas a corto plazo en ambas direcciones. Curiosamente, se observan tendencias similares en las mediciones obtenidas para cada uno de los diferentes canales de manera independiente, lo que sugiere que la variación se debe al menos en parte a las fluctuaciones en la intensidad de la fuente de excitación.

La variabilidad de fuente de luz se siguió adicionalmente adquiriendo las imágenes de la segunda platina de calibración (espectros de aproximación DAPI/Indo/Fura, excitación azul) a través de los canales Cy3, Cy5, y FITC, y el cubo de calibración durante aproximadamente 20 horas para aproximadamente 450 iteraciones. En una realización a modo de ejemplo, los resultados cuantitativos, tales como las "puntuaciones" AQUA derivadas" tratadas anteriormente, se determinaron para cada iteración. Los resultados se representaron como la puntuación de análisis

AQUA frente a la iteración para la platina 2 (figura 7). Esencialmente un patrón de intensidad de luz idéntico resultó del uso de la muestra de control de instrumentos 2 en el canal Cy3, Cy5 y de cubo de calibración que indica que la variabilidad es poco probable debido al blanqueo del material de platina de control de instrumentos. Más bien, la variación es indicativa de la variabilidad de intensidad de luz verdadera inherente al sistema 100. El patrón de fluctuación de luz visto a través del canal FITC al usar la muestra 2 estaba en la escala y podría usarse para la normalización cuando se adquieran las imágenes en este canal. Un blanqueo modesto del material de platina es evidente como una inclinación negativa en el canal FITC durante muchas iteraciones. Tal blanqueo es poco probable que afecte negativamente a las imágenes adquiridas en condiciones normales de funcionamiento. Lo ideal sería sustituir la platina de control de instrumentos después de haberse producido un blanqueo de aproximadamente el 10 %. Por ejemplo, después de 231 series para la muestra 1 y aproximadamente 20 series con la muestra 2.

Normalización de trayectoria óptica (OP) de instrumento

La medición de la señal en la cámara digital 112 resulta de la luz que se ha desplazado desde la fuente de excitación 102 (figura 1) a través del sistema de microscopio 100 y se ha modificado por las propiedades intrínsecas de ese sistema 100 y la muestra 107 que se está midiendo. La trayectoria óptica de un instrumento 100 puede comprender el tubo de luz que se desplaza desde la lámpara de excitación al microscopio, los cubos de filtro 108 y la óptica asociada para cada canal fluorescente y la lente de objetivo 104 que se usa. Un factor intrínseco de máquina (OP) que corrige las variaciones a lo largo de esta trayectoria óptica puede establecerse para cada dispositivo 100 con el fin de normalizar los resultados obtenidos a través de los dispositivos 100.

Para calcular el factor intrínseco de máquina para un sistema específico, se adquirieron múltiples imágenes (por ejemplo, 16 imágenes) de una platina de control de instrumentos normalizada 107. Para cada sistema que se normaliza, la platina de control de instrumentos 107 era del mismo material con la misma configuración, presumiblemente para producir los mismos resultados, pero para efectos del sistema 100. Inmediatamente después de la adquisición de la cámara de un solo campo de visión usando un cubo de filtro de luz especificado 108 (por ejemplo, los cubos de filtros FITC, Cy3 o Cy5), la torreta de filtro 115 se giró con el fin de alinear el cubo de calibración 130 (figura 2). El cubo de calibración 130 se representó por imágenes de manera separada, sin alterar o la lente de objetivo o la muestra (es decir, la platina de control 107) bajo ensayo. Se fijaron los tiempos de exposición para cada canal. Una relación de la intensidad de cubo de calibración para la intensidad de señal observada en cada canal proporcionó un factor intrínseco de máquina para la eficacia de la trayectoria óptica del sistema de microscopio para cada filtro. Este valor es aplicable para ese sistema en esa configuración específica. La configuración está determinada por características tales como la ampliación, el filtro de luz y la óptica.

El factor intrínseco de máquina del sistema también puede hacerse a escala referenciándolo a un valor específico. El factor intrínseco de máquina se determinó usando los datos obtenidos usando una platina de control de instrumentos no blanqueada, con tiempos de exposición elegidos para evitar la saturación de múltiples series (por ejemplo, cinco series) y en experimentos independientes en diferentes días. El valor intrínseco se calculó para cada serie. El CV % entre los valores intrínsecos de serie era extremadamente bajo de tal manera que una serie fue efectiva para calcular los valores intrínsecos.

EJEMPLO: La tabla 2 muestra los factores intrínsecos de máquina resultantes para cinco instrumentos a través de los filtros para tres canales: FITC, Cy3 y Cy5.

Tabla 2: Factores intrínsecos de máquina (Valores OP)

Instrumento	FITC-OP	Cy3-OP	Cy5-OP
1	1,15	1,14	1,09
2	1,61	1,49	1,86
3	1,46	1,38	1,18
4	1,00	1,00	1,00
5	1,38	1,07	1,32

Los factores intrínsecos de máquina se escalaron adicionalmente como el valor empírico/el valor intrínseco, donde el valor empírico era el valor promedio más bajo registrado en el sistema específico. Los valores intrínsecos se determinaron usando dos platinas de control de instrumentos azules diferentes y se encontró que podían reproducirse independientemente de qué platina se usase. Se calcularon los valores promedio y los valores del porcentaje de coeficiente de variación (CV %). Preferentemente, el CV % es menor que aproximadamente el 20 %, más preferentemente el CV % es menor que aproximadamente el 5 %.

Normalización

Los factores de normalización descritos anteriormente (CC, LS, OP) se usaron para transformar los datos cuantitativos recogidos en cada sistema de microscopio individual a los de un sistema idealizado. Cuando se aplica a más de un sistema, los datos obtenidos de los mismos se normalizan, de tal manera que se mitigó cualquier influencia de las respectivas fluctuaciones del microscopio y de la fuente de luz a los resultados.

Haciendo referencia a la figura 8, un diagrama de flujo de un proceso para normalizar los resultados del análisis cualitativos incluye un procedimiento de inicialización preliminar 300 seguido de un procedimiento de muestra de ensayo 200. Como parte del procedimiento de inicialización 300, el instrumento se configura en la etapa 210. La configuración de instrumento incluye configurar el sistema de microscopio 100 (figura 1) con la fuente de excitación adecuada 102, los cubos de filtro 108 (figura 1) y el cubo de calibración 130 (figura 2), garantizado que el controlador 116 (figura 1) incluye el control de programa adecuado, y realizando cualquier rutina de inicialización que pueda necesitarse para el sistema de microscopio 100 y la cámara CCD 112. Una vez que la configuración del instrumento está completa, la cámara CCD 112 es capaz de obtener imágenes de una muestra bajo ensayo usando el sistema de microscopio 100 bajo el control del controlador 116. Una vez configurado, se obtienen un factor de corrección (CC) para el cubo de calibración 130 y un factor intrínseco de máquina (OP) para el sistema de microscopio 100 en la etapa 220. Como se ha descrito anteriormente, el factor intrínseco de máquina (OP) puede determinarse en el momento de la fabricación, y/o en el momento del mantenimiento/repación del sistema de microscopía y almacenarse para su uso posterior. Por lo tanto, obtener el factor intrínseco de máquina OP puede incluirse buscando un valor pre-almacenado. Uno o más de estos factores (CC, OP) pueden almacenarse por el controlador 116, o el analizador de imágenes para su uso posterior en el análisis de imágenes de las muestras de ensayo.

Como parte del procedimiento de ensayo 200, una muestra bajo ensayo se representa mediante imágenes por el sistema 100 en la etapa 230. Un factor de corrección de fuente de luz (LS) se obtiene durante esta etapa. En más detalle, una muestra de ensayo real 107 se coloca sobre la platina del microscopio 106 y se coloca de tal manera que un punto objetivo 109 se alinea con un eje óptico que incluye la lente de objetivo 104 (figura 1). Esta alineación inicial puede realizarse manualmente a través del cabezal de observación 110 (figura 1), automáticamente usando el controlador 116, o a través de una combinación de un curso de ajuste manual seguido por un ajuste de controlador fino 116. Para las muestras de ensayo que incluyen una matriz regular de puntos objetivos 109, la muestra de ensayo 107 se alinea preferentemente una vez (por ejemplo, para un punto objetivo 109) y a continuación se recoloca de nuevo en los puntos objetivos adicionales de ensayo 109 de la muestra 107 usando unos ajustes de desplazamientos preprogramados de la platina 106.

Una vez que el punto objetivo 109 está alineado con el eje óptico, el sistema 100 adquiere una imagen de muestra del punto objetivo 109 usando la cámara CCD 112 (figura 1). Para el sistema IHC de fluorescencia a modo de ejemplo, se obtiene una imagen de muestra para una banda de longitud de onda elegida o canal de interés usando uno respectivo de los bloques de filtro 108 (figura 1) correspondiente al canal. El cubo de calibración 130 (figura 2) se selecciona a través de la rotación de la torreta 115 (figura 1). Una imagen de referencia de la fuente de excitación se obtiene usando el cubo de calibración 130 para una determinación de la intensidad de fuente de excitación. Los cubos de filtro adicionales 108 pueden usarse para obtener imágenes de muestra adicionales a través de diferentes canales, como se requieran. El orden específico en el que se obtienen los canales y las muestras de fuente de excitación puede variarse, a condición de que la una o más imágenes de canal estén relacionadas con la imagen de referencia de fuente de excitación (por ejemplo, tomada en aproximadamente el mismo momento). Una relación de este tipo puede lograrse formando una imagen compuesta de las múltiples imágenes, o etiquetando de otro modo las imágenes para reflejar su relación.

Las imágenes de muestra y de referencia pueden enviarse desde la cámara 112 al controlador 116 o a un analizador de imágenes separado para su análisis y corrección posteriores en la etapa 240. El análisis de imágenes puede incluir calcular las puntuaciones AQUA para cada uno de los diferentes canales. Uno o más de los factores de corrección (CC, OP, LS) se aplican en la etapa 250 para obtener resultados corregidos o normalizados. Los datos de salida normalizados para el punto objetivo específico 109 de la muestra de ensayo 107 se proporcionan en la etapa 260. El procedimiento de muestra de ensayo 200 puede repetirse para puntos objetivo adicionales 109 de la misma muestra de ensayo 107. El procedimiento de muestra de ensayo 200 también puede repetirse para una o más muestras de ensayo 107 usando los mismos factores de corrección obtenidos en la etapa 220.

En más detalle, un diagrama de flujo a modo de ejemplo de un procedimiento de inicialización 300 para obtener los factores de corrección usados en la normalización de los resultados del análisis cualitativo se muestra en la figura 9. La cámara 112 (figura 1) y el microscopio se inicializan respectivamente en las etapas 310 y 320. Estas etapas pueden realizarse secuencialmente o en paralelo. Los proveedores de la cámara 112 y el sistema de microscopio 110 definen normalmente estas etapas de inicialización 310, 320 en forma de un procedimiento de inicialización. Uno o más de los procedimientos de inicialización pueden automatizarse y producirse como parte de un ciclo de encendido.

A continuación, la platina de microscopio 106 (figura 1) se inicializa en la etapa 330 para permitir la alineación

correcta de las muestras de ensayo durante el ensayo. En algunas realizaciones, una platina de calibración que incluye una muestra objetivo se coloca sobre la platina de microscopio 106 en la etapa 350. La platina de calibración se selecciona para proporcionar una respuesta conocida durante la caracterización de la trayectoria óptica, que puede realizarse en el momento de la fabricación, o el mantenimiento del sistema de microscopía. Se obtiene una imagen de la platina de calibración en la etapa 360 y un factor de corrección de trayectoria óptica, o factor intrínseco de máquina (OP) se determina en la etapa 370. El factor intrínseco de máquina puede almacenarse para su uso posterior durante el funcionamiento normal para eliminar la variabilidad de trayectoria óptica entre los diferentes sistemas de microscopía. Esta etapa de determinación del factor intrínseco de máquina incluye obtener una imagen de muestra de la fuente de excitación usando el cubo de calibración 130 (figura 2) para determinar la intensidad de la fuente de calibración. Preferentemente, la muestra de fuente de excitación se obtiene inmediatamente adyacente a la etapa de obtener una imagen de la platina de calibración para minimizar la probabilidad de una variación de la intensidad entre las muestras.

A continuación, se accede al factor de corrección de cubo de calibración (CC) en la etapa 380. Este valor puede almacenarse en el sistema o introducirse manualmente durante el proceso de inicialización preliminar 300. Este valor puede obtenerse comparando los resultados obtenidos a partir del cubo de calibración 130 con los resultados obtenidos usando un cubo de calibración universalmente normalizado y formulando una relación de los resultados. Al igual que en el factor de corrección de trayectoria óptica, no es necesario que se repita la determinación del factor de corrección de cubo de calibración durante el uso normal. Como se ha descrito anteriormente, el cubo de calibración se construye preferentemente para reducir o eliminar cualquier variabilidad en su rendimiento a lo largo del tiempo. Por lo tanto, una determinación inicial del factor de corrección de cubo de calibración puede obtenerse en el momento de su fabricación (la fábrica mantiene un cubo de calibración normalizado de "oro" que se usa en la comparación con los cubos de calibración fabricados para obtener el factor de corrección). El factor de corrección resultante puede marcarse en el propio cubo de calibración y/o proporcionarse al procesador para su uso posterior durante la corrección de las imágenes muestreadas. Una vez obtenidos, el factor intrínseco de máquina (OP) y el factor de corrección de cubo de calibración (CC) se emiten para un software de análisis de imágenes en la etapa 390 (por ejemplo, leer desde las localizaciones de memoria que contienen los valores pre-almacenados). Esto puede incluir el reenvío de los factores (OP, CC) al controlador 116 o a un analizador de imágenes separado para el almacenamiento y posterior uso de las imágenes normalizadas de las muestras de ensayo reales. Las etapas 360 y 380 pueden repetirse para los diferentes canales de la misma platina de calibración y emitirse por separado para el software de análisis de imágenes en la etapa 390. Por lo tanto, el factor intrínseco de máquina (OP) se determina y se retiene sobre una base por canal y se almacena por separado para el análisis posterior de las muestras de ensayo sobre una base por canal usando el factor intrínseco de máquina apropiado. En algunas realizaciones, las etapas 360, 380, y 390 pueden repetirse para el mismo canal para permitir la determinación estadística del factor intrínseco de máquina. Por lo tanto, pueden obtenerse y usarse múltiples resultados para cada canal para formular un resultado promedio que se almacena para su uso posterior.

Una ecuación proporcionada a continuación (Ec. 1) se utilizó para normalizar los resultados obtenidos para cada sistema 100. El factor de corrección de cubo de calibración (CC) y los factores intrínsecos de máquina (OP) se determinaron para cada sistema y se almacenaron para su uso posterior en la manipulación de los resultados de ensayo. A continuación, se obtuvieron unos resultados cuantitativos normalizados (puntuación cuantitativa de espécimen_{en bruto}) para un espécimen específico, o una muestra bajo ensayo. A través de un proceso de corrección, la puntuación cuantitativa en bruto se multiplica por los diferentes factores de corrección, para producir un resultado cuantitativo normalizado adecuado para la comparación entre los diferentes sistemas.

$$\text{Puntuación cuantitativa de espécimen}_{\text{normalizada}} = (\text{puntuación cuantitativa de espécimen}_{\text{en bruto}}) * (\text{CC}) * (\text{OP}) * (100000/\text{LS}) \quad (\text{Ec. 1})$$

La ecuación anterior proporciona un esquema de normalización multiplicativo directo usando dos constantes que eran intrínsecas al cubo de calibración y al sistema de microscopía (CC y OP). Estos dos factores se escalaron como se ha descrito anteriormente, de tal manera que los datos se normalizaron a un sistema ideal. Por lo tanto, un cubo de calibración que se aproxima a la "normalización de oro" resultaría en un CC que se acerca al 1,0. Del mismo modo, una trayectoria óptica que se acerca a una trayectoria óptica de referencia normalizada también se acercaría al 1,0. En el caso del factor de fluctuación de fuente de luz (LS), se usó un valor obtenido empíricamente de 100.000 para definir un valor de intensidad ideal para este factor. A continuación, este valor de 100.000 se dividió por el valor LS específico obtenido durante cada medición. La Tabla 3 muestra el factor de corrección de normalización resultante obtenido para cinco instrumentos diferentes.

Tabla 3: Factor de Normalización para cinco instrumentos

Instrumento	Corrección: (CC)*(OP)*(100.000)
1	97446
2	116702
3	172794
4	88300
5	132000

El uso de los factores de corrección descritos en el presente documento (CC, OP, LS), los datos cuantitativos obtenidos usando los cinco instrumentos diferentes se correlacionaron al instrumento 1. Los resultados de la correlación se ilustran gráficamente en la figura 10. Como puede verse en la figura, antes de la corrección, las correlaciones de cada instrumento al instrumento 1 dan como resultado unas curvas de no superposición que varían sustancialmente del instrumento 1. Sin embargo, después de la aplicación de los factores de corrección, las curvas de correlación corregidos para los cinco instrumentos se superponen sustancialmente al instrumento 1, demostrando un alto grado de correlación para el instrumento 1 y entre sí.

EJEMPLO: En el uso, una muestra de ensayo puede incluir una micromatriz de tejido (TMA) que incluye una matriz de muestras de tejido en una única platina de microscopio. Por ejemplo, se tiñó una micromatriz de tejido de 36 puntos que incluía muestras de tejido de cáncer de mama, BT474, MCF7, T47D muestras de control de línea de célula. El protocolo de tinción implicó una desparafinación en xileno, una rehidratación a través de una serie de cantidades decrecientes de etanol a agua pura, y la recuperación de antígenos en Tris EDTA. Después del bloqueo de peroxidasa endógena y bloquear con el background sniper, HER 2, (CB11) y la citoqueratina se aplicaron anticuerpos primarios (Rabbit, Dako) y se aclararon después de 1 hora. A continuación, se aplicaron Dako Envision anti-ratón e Invitrogen alexa 555 GAR. Después de un extenso lavado, se aplicó cy 5 tiramida. Las platinas se lavaron con TBS/Tween 20. Por último, se aplicó un medio de montaje con DAPI y se secaron las platinas.

La intensidad de fluorescencia de la tinción del HER2 y la puntuación AQUA resultantes se recogieron para cada punto de tejido de la micromatriz de tejido usando los instrumentos 1 y 2 incluidos en la Tabla 3.

Las puntuaciones se normalizaron usando la Ec. 2 y la Ec. 3 a continuación.

$$\text{Puntuación cuantitativa}_{\text{normalizada}} = (\text{puntuación cuantitativa de espécimen}_{\text{en bruto Instrumento 1}} / \text{LS}_{\text{Instrumento 1}}) * 97,446 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{Puntuación cuantitativa}_{\text{normalizada}} = (\text{puntuación cuantitativa de espécimen}_{\text{en bruto Instrumento 2}} / \text{LS}_{\text{Instrumento 2}}) * 116,702 \quad (\text{Ec. 3})$$

Las puntuaciones AQUA para cada muestra en la micromatriz de tejido de 36 puntos se adquirieron usando dos instrumentos diferentes. Las puntuaciones AQUA en bruto mostradas en la figura 11A y las puntuaciones AQUA normalizados mostradas en la figura 11B de la micromatriz de tejido de 36 puntos, adquirida en dos instrumentos se representaron gráficamente en un formato de representación de dispersión. Los resultados muestran una inclinación de la línea de regresión del coeficiente de correlación del 2,6:1 entre los dos instrumentos que usan las puntuaciones en bruto. Usando los métodos de normalización de la invención, se logró una inclinación de la línea de regresión de los coeficientes de correlación del 0,98:1 entre los dos instrumentos, mostrando que la distribución de las puntuaciones no se verá afectada por la normalización.

Se usó un análisis estadístico rho de Spearman no paramétrico para describir la relación de clasificación antes y después de la normalización. El análisis se realizó usando el conjunto de datos de puntuación AQUA obtenido a partir de dos instrumentos. Los órdenes de clasificación se asignan del valor original menor (= clasificación 1) al valor original mayor para cada puntuación AQUA. El coeficiente de correlación y el Valor-P se calcularon para los conjuntos de datos no normalizados (en bruto) y normalizados. El orden de clasificación de los datos no se vio afectado por la normalización (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis Rho de Spearman

	Datos normalizados	Datos en bruto
Rho:	0,72	0,721
Valor-P:	< 0,0001	< 0,0001

EJEMPLO: la misma micromatriz de tejido de 36 puntos descrita en el ejemplo anterior se obtuvo y se puntuó en cinco instrumentos diferentes.

5 Los resultados indicaron que el porcentaje de coeficiente de variación (CV %) de las puntuaciones AQUA en bruto y las puntuaciones AQUA normalizadas para cada punto de tejido de micromatriz de tejido adquirido en los cinco instrumentos diferentes muestra que se logra un CV % significativamente mejor por la normalización de los métodos de la divulgación.

10 Las tablas 5 y 6 son compilaciones de la inclinación de la línea de regresión del coeficiente de correlación generado con una sola serie de platina en los cinco instrumentos. Las correlaciones basándose en las puntuaciones AQUA en bruto se muestran en la Tabla 5 y las basadas en las puntuaciones AQUA normalizadas se muestran en la Tabla 6. Esta comparación se realiza con números generados a partir de las imágenes validadas.

Tabla 5: Datos en bruto

Datos en bruto	Instrumento 1	Instrumento 2	Instrumento 3	Instrumento 4	Instrumento
Instrumento 1	N/A	0,44x	2,55x	1,68x	2,51x
Instrumento 2	0,44x	N/A	0,17x	3,85x	5,76x
Instrumento 3	2,55x	0,17x	N/A	0,66c	0,98x
Instrumento 4	1,68x	3,85x	0,66x	N/A	1,50x
Instrumento 5	2,51x	5,76x	0,98x	1,50x	N/A

Tabla 6. Datos normalizados

Datos normalizados	Instrumento 1	Instrumento 2	Instrumento 3	Instrumento 4	Instrumento
Instrumento 1	N/A	0,88x	0,95x	1,09x	0,89x
Instrumento 2	0,88x	N/A	0,92x	1,24x	1,00x
Instrumento 3	0,95x	0,92x	N/A	1,14x	0,93x
Instrumento 4	1,09x	1,24x	1,14x	N/A	1,23x
Instrumento 5	0,89x	1,00x	0,93x	1,23x	N/A

15 El porcentaje de coeficiente de variación (CV %) de las puntuaciones AQUA® en bruto y las puntuaciones AQUA normalizadas para cada punto de tejido de micromatriz de tejido adquirido en los cinco instrumentos muestra que se logra un CV % significativamente mejor por la normalización de los métodos de la divulgación.

20 Las puntuaciones AQUA medias para la tinción HER2 de 26 de los 36 puntos de micromatriz de tejido validados se muestran en la figura 12A y la figura 12B. Si bien las tendencias o las comparaciones entre las 36 muestras son similares en cada instrumento, la varianza de puntuación para cada muestra individual tiene un CV promedio de aproximadamente un 60 % de un instrumento a otro. En comparación, las puntuaciones medias obtenidas en cada uno de los mismos 5 instrumentos, una vez normalizados figura 12B son más consistentes, con un CV promedio de aproximadamente un 20 %.

25 Un análisis del ensayo de varianza (ANOVA) para las diferencias significativas entre las medias antes y después de la normalización que usa la hipótesis nula de que los instrumentos son idénticos produce un valor de p significativo < 0,05 rechazando de este modo la hipótesis nula que indica que las puntuaciones medias marginales recogidas en múltiples instrumentos son diferentes. Después de la normalización el valor de p > 0,05 indica que las puntuaciones medias marginales recogidas en múltiples instrumentos ahora no son significativamente diferentes.

- 5 A pesar de que las realizaciones a modo de ejemplo se refieren principalmente a la microscopía fluorescente, la invención puede aplicarse ampliamente a los microscopios ópticos en general. Las técnicas de diversas realizaciones se aplican para la corrección de las variaciones en la intensidad de cualquier fuente de luz que usa un instrumento de calibración, para la corrección de las variaciones de instrumentos de calibración que usan los desplazamientos para un instrumento de calibración universalmente normalizado, y/o para normalizar los efectos de la trayectoria óptica a través de un sistema de microscopía óptica específico. Por lo tanto, pueden aplicarse en general diversas realizaciones de la invención a una variedad de microscopios ópticos que usan fuentes de iluminación incoherentes, fuentes de iluminación polarizadas, y fuentes de iluminación coherentes, tales como los sistemas de microscopio de barrido láser confocal.
- 10 Los requisitos de sistema para un sistema de microscopía de fluorescencia a modo de ejemplo se incluyen en la Tabla 7.

Tabla 7: Requisitos del sistema de microscopía fluorescente a modo de ejemplo

Componente	Especificaciones objetivo	Ejemplo
Microscopio	Microscopio de Epi-fluorescencia	Olympus BX51
	Automatización de platina para facilitar la adquisición de imágenes (opcional)	Sistema HistoRx PM2000™ (platina previa) con el software AQUAsition™ asociado
	Fuente de luz de fluorescencia de arco de mercurio (Hg). Se recomienda de manera encarecida que las fuentes de luz posean un iris ajustable o un obturador de seguridad si se realizan mediciones de luz	Exfo X-cite con iris ajustable
	Filtro/canales de fluorescencia para adaptar DAPI (UV) / Cy3 / Alexa555, y Cy5 / Alexa 647	Ningún ejemplo dado
	Objetivos basados en la resolución de la cámara descritos a continuación	Objetivos de la serie UPLSAPO de Olympus
Monitorización/ Calibración	Platinas normalizadas para proporcionar una referencia para la normalización de microscopio. [Opcional] Capacidad para medir la intensidad de luz entrante al microscopio (en vatios)	Platinas de referencia de fluorescencia óptica Omega (azul; XF900); [Opcional] radiómetro trazable Exfo NIST (número de pieza P010-00200)
Cámara	Capacidad monocromática CCD, resolución de 8 o 12 bits	Cámara Optronics QuantiFire XI CCD (2048x2048 píxeles, 7,4 µM/pixel) junto con el objetivo UPLSAPO 20X de Olympus
Tamaño del campo visual (combinación cámara / Objetivo)	Combinación tamaño de píxel - aumento del objetivo que proporciona un tamaño del campo de visión de entre 671 µM y 888 µM. Cálculo del tamaño del campo de visión (para cámaras con CCD rectangulares, los valores deben calcularse para ambas dimensiones): (Tamaño de píxel CCD) * (número de píxeles CCD) / (aumento del objetivo)	Cálculo para el hardware de ejemplo: (7,4 µM) * (2048) / (20) = 758 µM campo de visión
Exposición de adquisición	Las imágenes deben adquirirse con los ajustes de exposición óptimos de tal manera que los píxeles de la imagen no se saturen, sin embargo el intervalo dinámico de intensidad se maximiza	---
Ordenador, monitor, teclado, ratón	Windows XP Professional (MSF), equipado con una unidad de DVD-ROM. Monitor de 20" para la visualización de la imagen.	---

Se comprenderá por un experto en la materia, que una o más de las etapas de obtener los diversos factores de corrección: CC, LS, OP pueden obtenerse automáticamente o al menos semi-automáticamente con la ayuda de un procesador, tal como un ordenador. Como alternativa, o además, una o más de las etapas usadas en determinar los datos de imagen objetivo normalizados y/o una medida cuantitativa de los mismos puede automatizarse, por ejemplo, con la ayuda de un procesador. Por ejemplo, un procesador de este tipo puede implementarse mediante unas instrucciones preprogramadas que se ejecutan en un ordenador. Tal automatización facilita la eliminación de la variabilidad inherente de la puntuación basada en el patólogo.

Si bien esta invención se ha mostrado y descrito específicamente con referencias a las realizaciones preferidas de la misma, debería ser evidente que se han descrito las características operativas únicas. Aunque las realizaciones específicas se han desvelado en detalle en el presente documento, esto se ha hecho a modo de ejemplo solamente con fines de ilustración, y no se pretende que sean limitantes con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas que siguen. En particular, se contempla por los inventores que diversas sustituciones, alteraciones y modificaciones puedan hacerse a la invención sin alejarse del alcance de la invención abarcado en las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, la elección de materiales para el filtro, el orden de las etapas de medición y de análisis, y la configuración de los filtros, la platina, y la fuente de excitación empleada se cree que son cuestión de rutina para un experto en la materia con el conocimiento de las realizaciones descritas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de microscopio para obtener una medida cuantitativa normalizada de datos de muestra objetivo, obtenidos a partir de una medición de intensidad, cuando se representa la imagen de una muestra objetivo por un microscopio (100) que tiene una fuente de luz de excitación (102), un medio óptico (104), un medio de captura de imágenes (112), y un medio de almacenamiento de datos (116), dispuestos conjuntamente para obtener una imagen de la muestra objetivo (107),
comprendiendo el sistema de microscopio:

el microscopio (100) que tiene la fuente de luz de excitación (102), el medio óptico (104), el medio de captura de imágenes (112), y el medio de almacenamiento de datos (116), dispuestos conjuntamente para obtener la imagen de la muestra objetivo (107);

un medio para obtener para la fuente de luz de excitación (102), un factor de corrección de fuente de luz, que comprende un instrumento de calibración y un medio para conmutar el instrumento de calibración dentro y fuera de una trayectoria óptica para permitir que se obtenga una medición de intensidad de luz relativa sustancialmente de manera simultánea con la imagen de muestra objetivo;

un medio para iluminar con la fuente de luz de excitación (102) el instrumento de calibración;

en el que el instrumento de calibración comprende una superficie de calibración colocada a lo largo de una trayectoria óptica para la iluminación de dispersión sustancialmente uniforme desde la fuente de luz de excitación hacia el medio de captura de imágenes (112) y comprende además un espejo dicromático colocado para reflejar la iluminación desde la fuente de luz de excitación a lo largo de una trayectoria óptica a través del medio óptico (104) hacia la muestra objetivo y para transmitir al menos una parte de la iluminación desde la muestra objetivo hacia el medio de captura de imágenes (112), en el que la superficie de calibración bloquea temporalmente la trayectoria óptica entre el espejo dicromático y el medio óptico (104) durante la calibración y dispersa una parte sustancial de la luz de excitación reflejada a través del espejo dicromático hacia el detector;

un medio para aplicar el factor de corrección de fuente de luz a los datos de muestra objetivo, obteniendo de este modo datos de muestra objetivo medidos cuantitativos normalizados, que se normalizan con respecto a la variabilidad de intensidad de luz temporal de la fuente de luz de excitación (102).
2. El sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un medio para aplicar un factor intrínseco de microscopio a los datos de muestra objetivo, normalizando de este modo los datos de muestra objetivo con respecto al microscopio.
3. El sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además un medio para obtener el factor intrínseco de microscopio que comprende:

un medio para iluminar, mediante la fuente de luz de excitación (102), una muestra objetivo de calibración configurada para producir una respuesta normalizada;

un medio para obtener, en respuesta a la iluminación del objetivo de calibración, los datos de muestra objetivo medidos; y

un medio para determinar el factor intrínseco de microscopio indicativo del rendimiento relativo del medio óptico (104).
4. El sistema de microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un medio para aplicar un factor de compensación de instrumento de calibración a los datos de muestra objetivo, normalizando de este modo los datos de muestra objetivo con respecto al instrumento de calibración.
5. El sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el factor de compensación de instrumento de calibración se almacena en el medio de almacenamiento de datos (116) del microscopio.
6. El sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra objetivo es una muestra biológica.
7. El sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en: una célula; una pluralidad de células; una sección de tejido; una matriz de secciones de tejido; y combinaciones de las mismas.

8. El sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la muestra biológica se ha tratado con uno o más tintes.

5 9. El sistema de microscopio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microscopio se selecciona del grupo que consiste en: microscopios ópticos que usan fuentes de iluminación incoherentes; microscopios ópticos que usan fuentes de iluminación polarizadas, microscopios ópticos que usan fuentes de iluminación fluorescentes; microscopios que usan fuentes de iluminación coherentes, tales como los sistemas de microscopio de barrido láser confocal; y combinaciones de los mismos.

10. Un método para normalizar una medida cuantitativa de los datos de muestra objetivo obtenidos a partir de una medición de intensidad que usa el sistema de microscopio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10

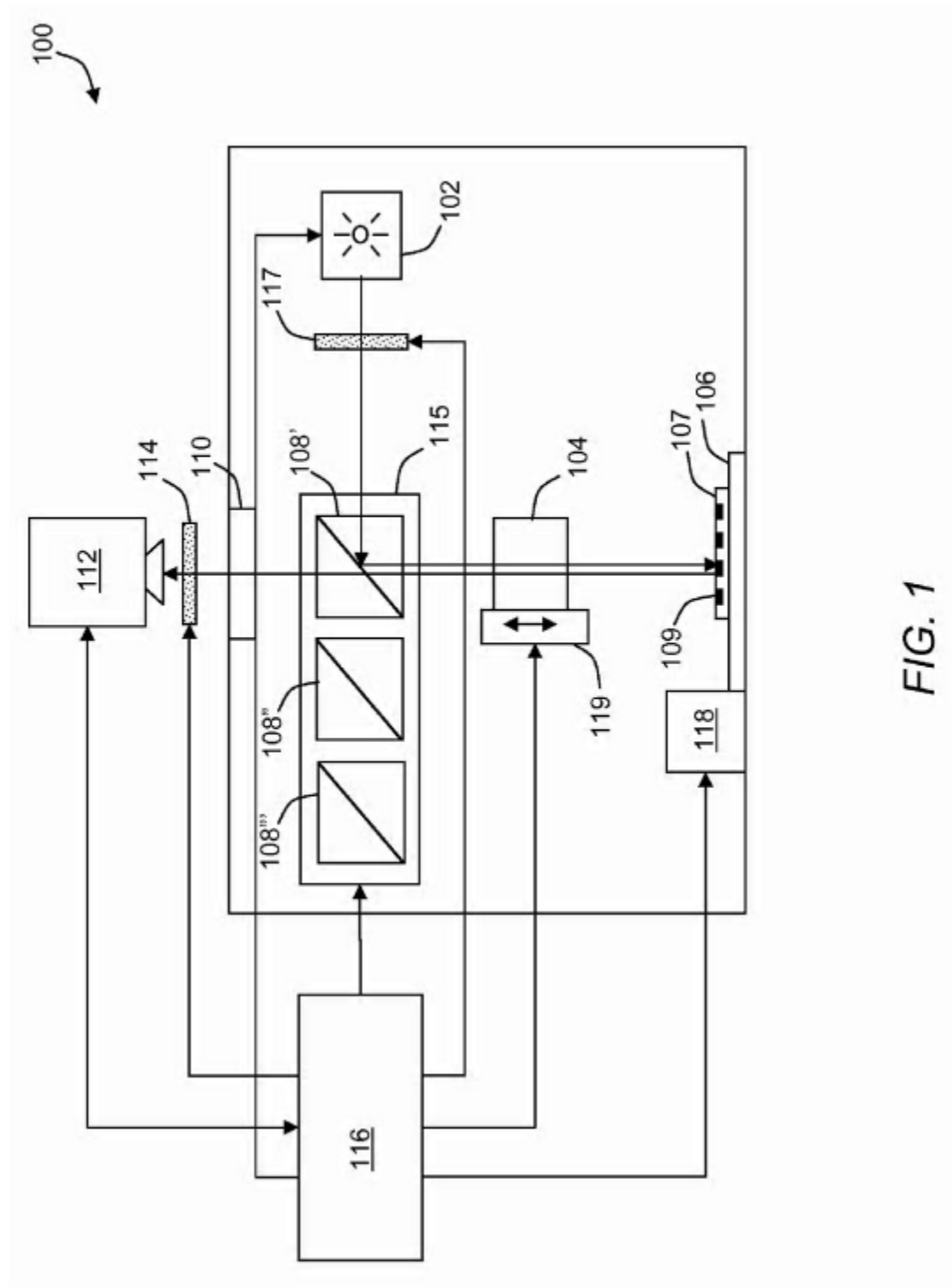
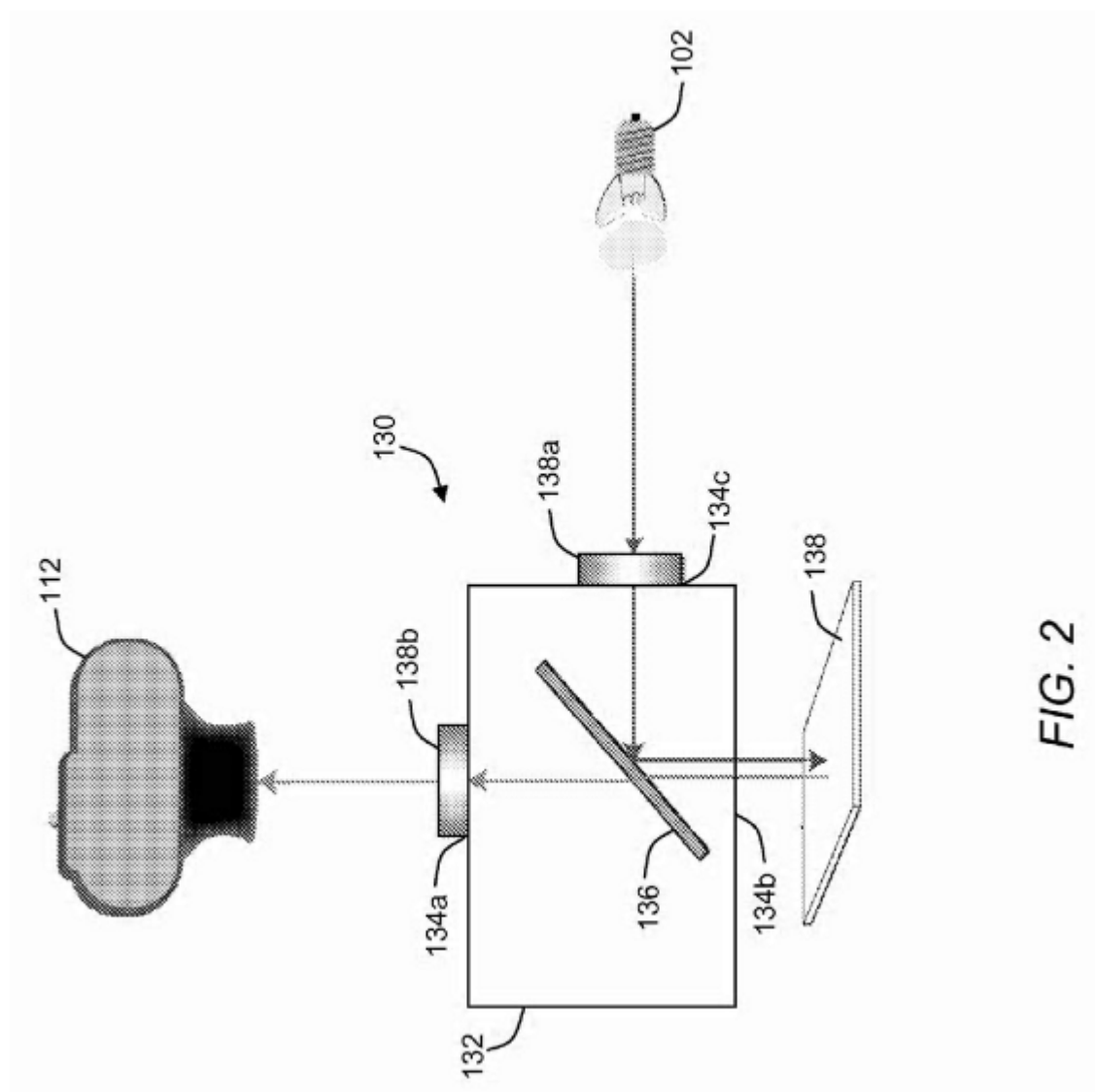


FIG. 1



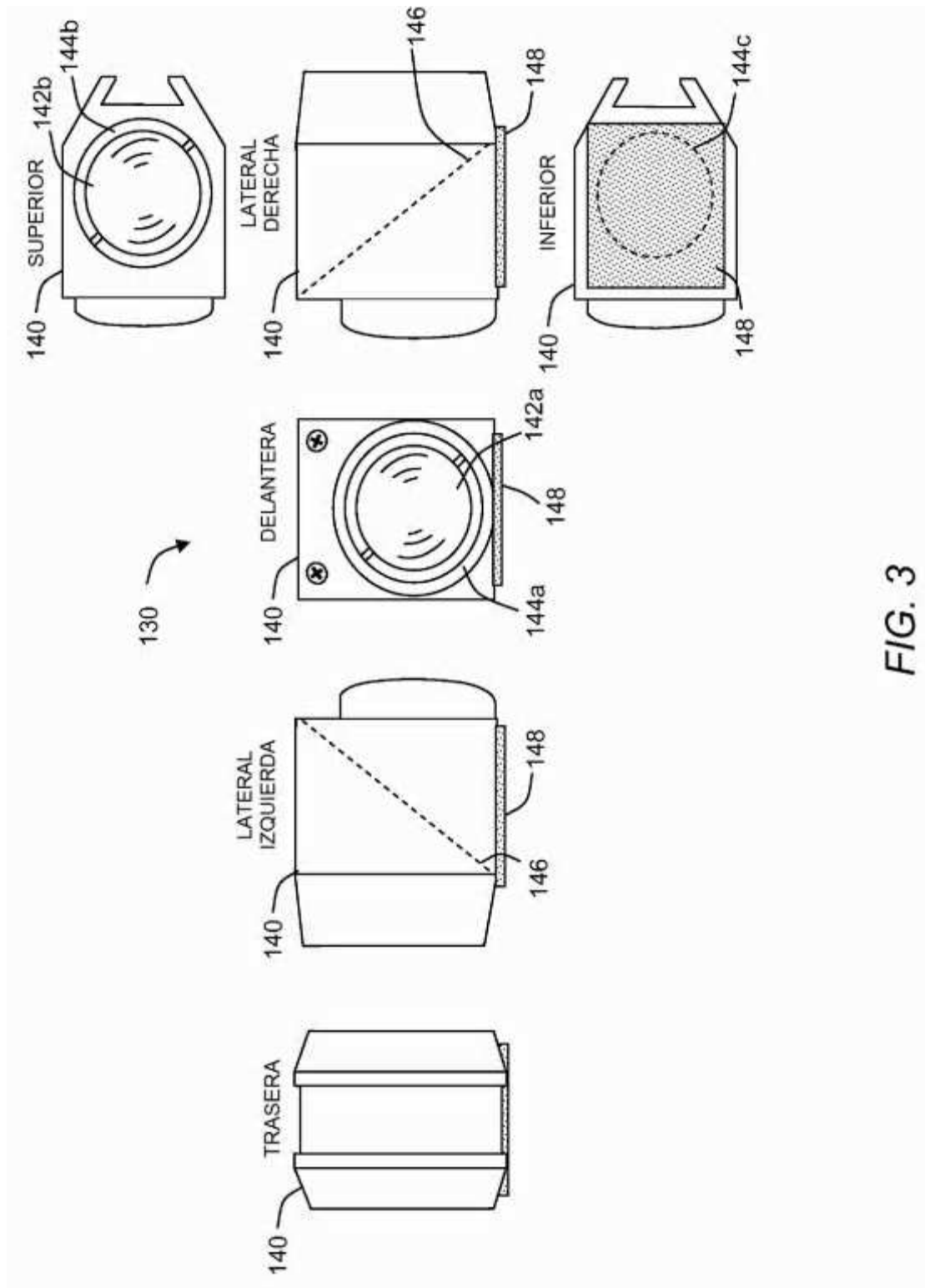


FIG. 3

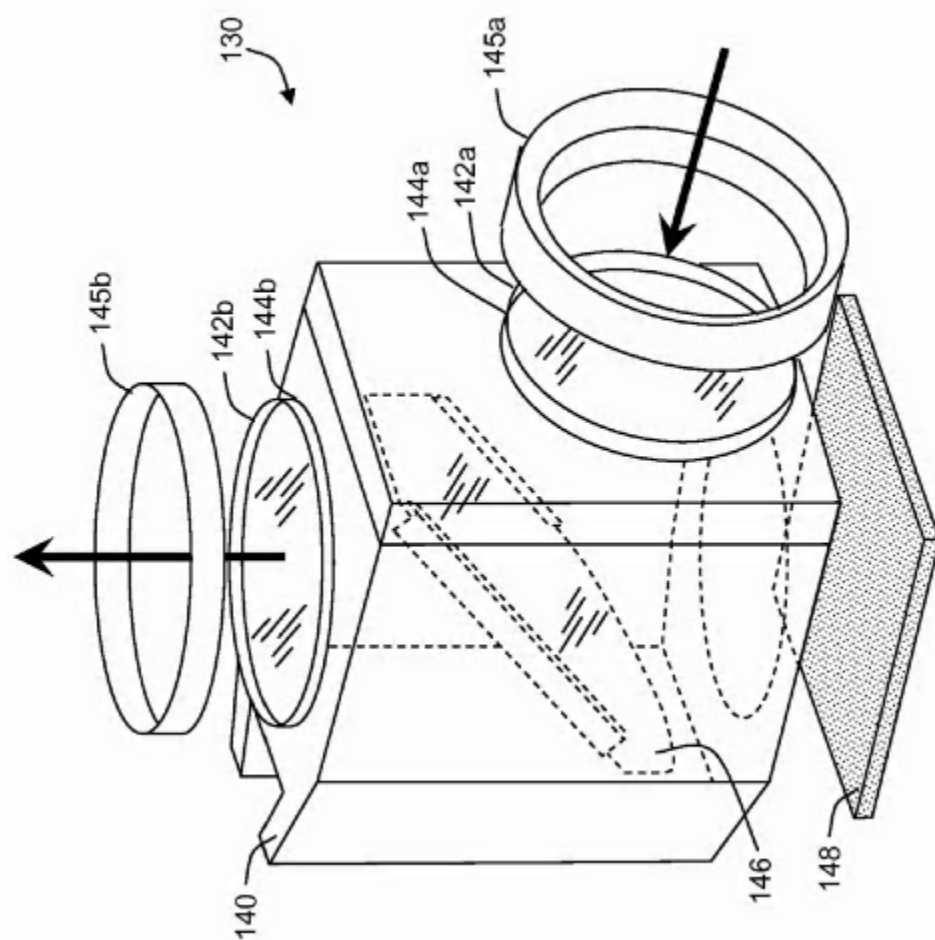


FIG. 4

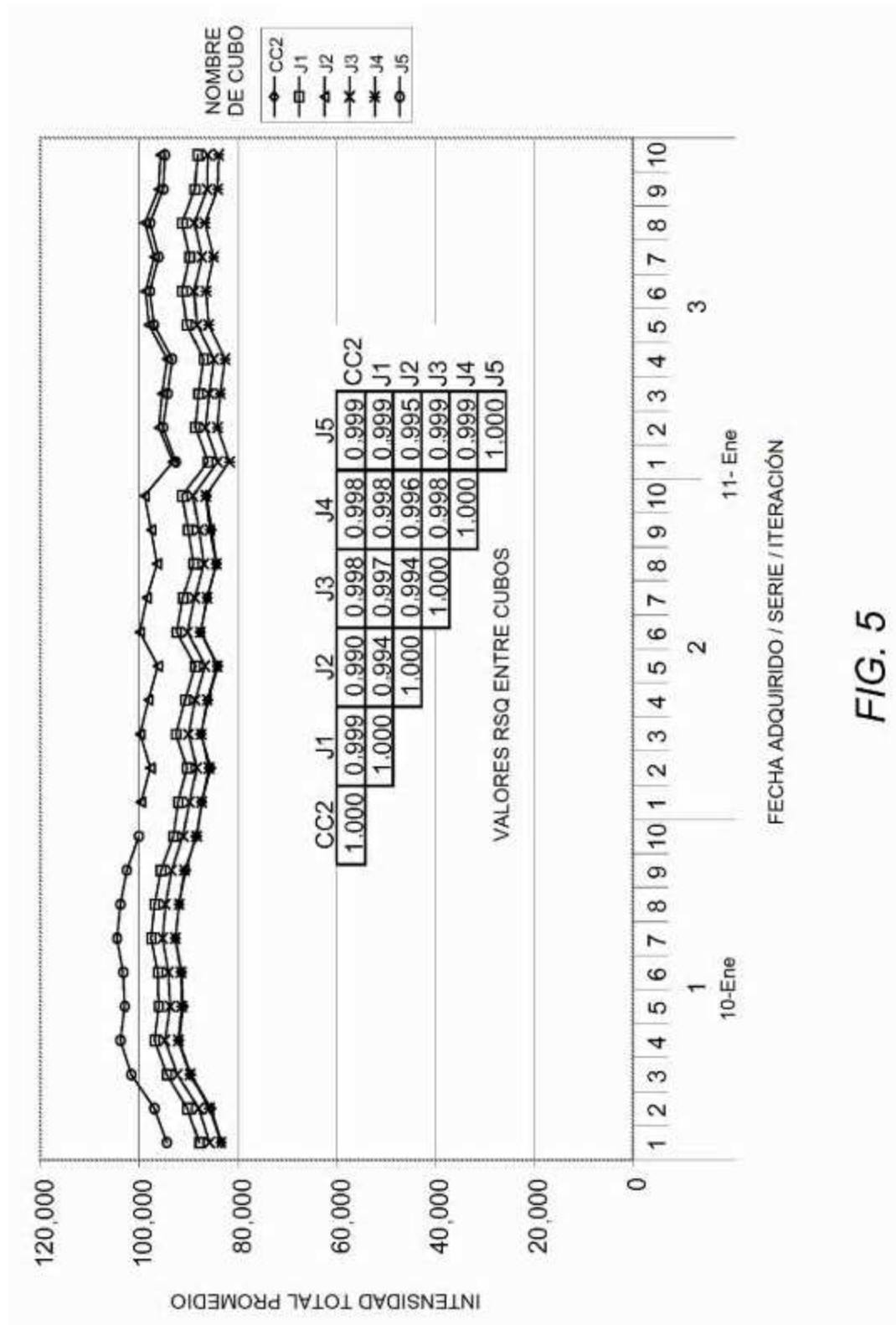


FIG. 5

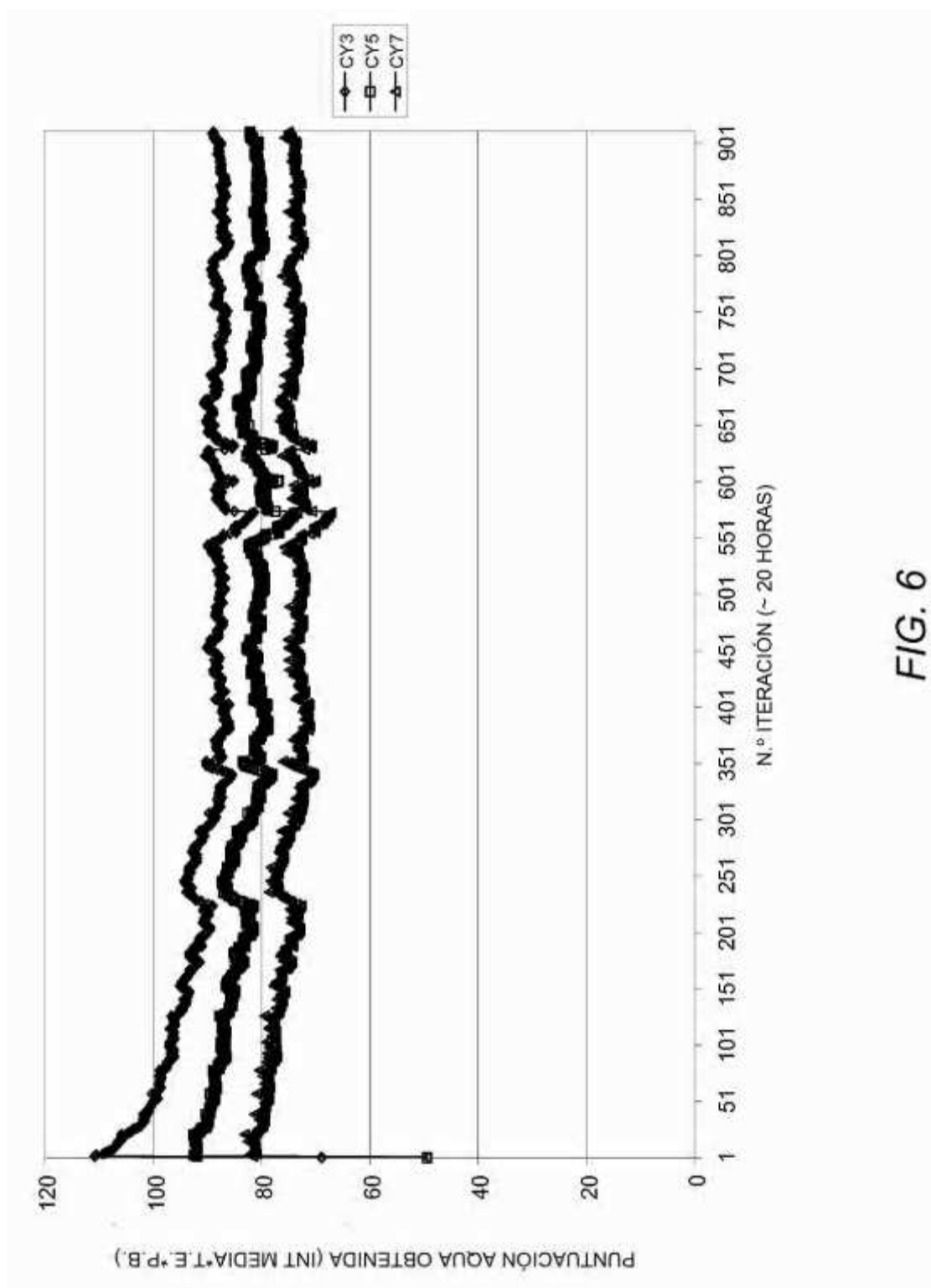


FIG. 6

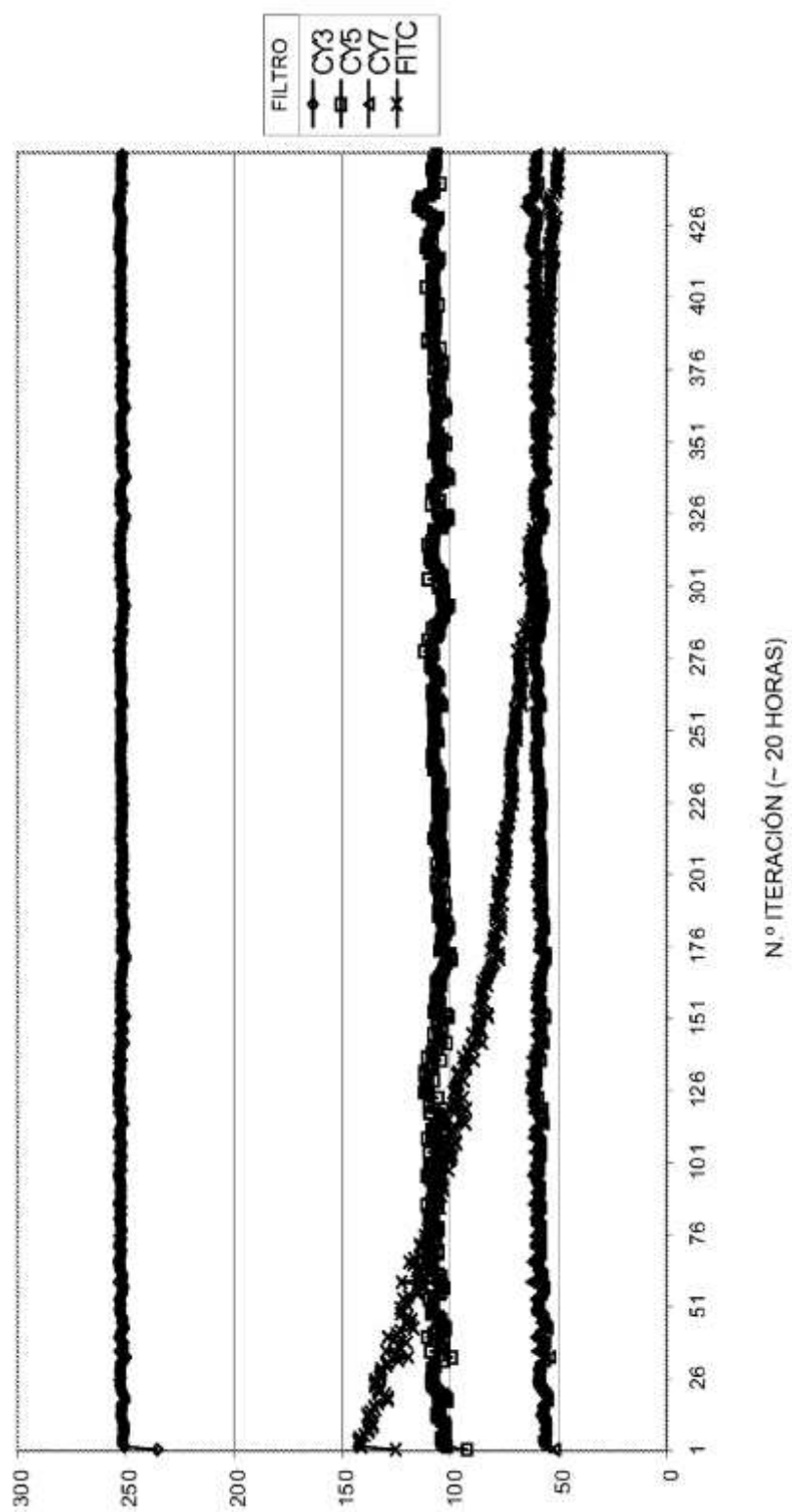


FIG. 7

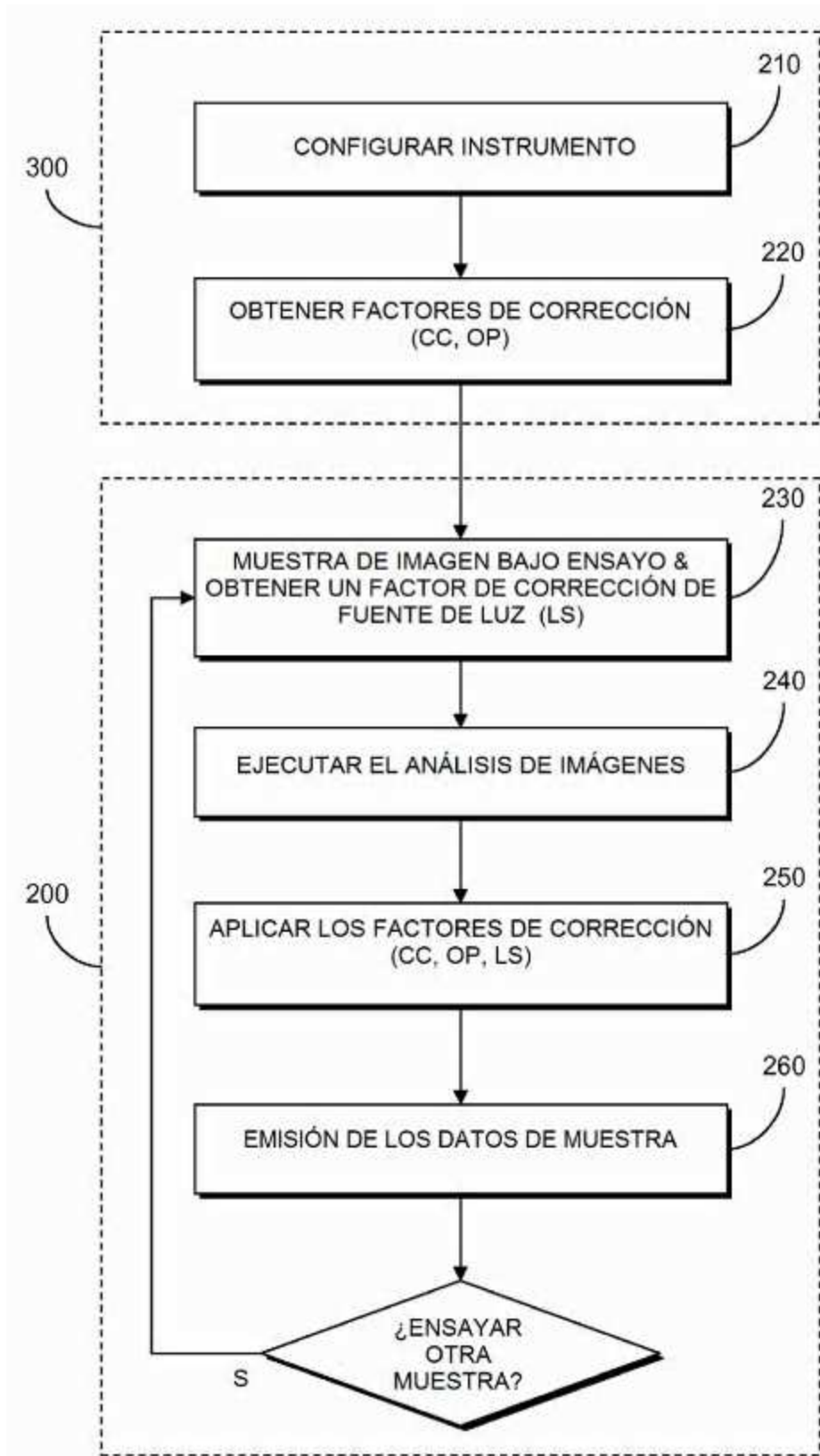
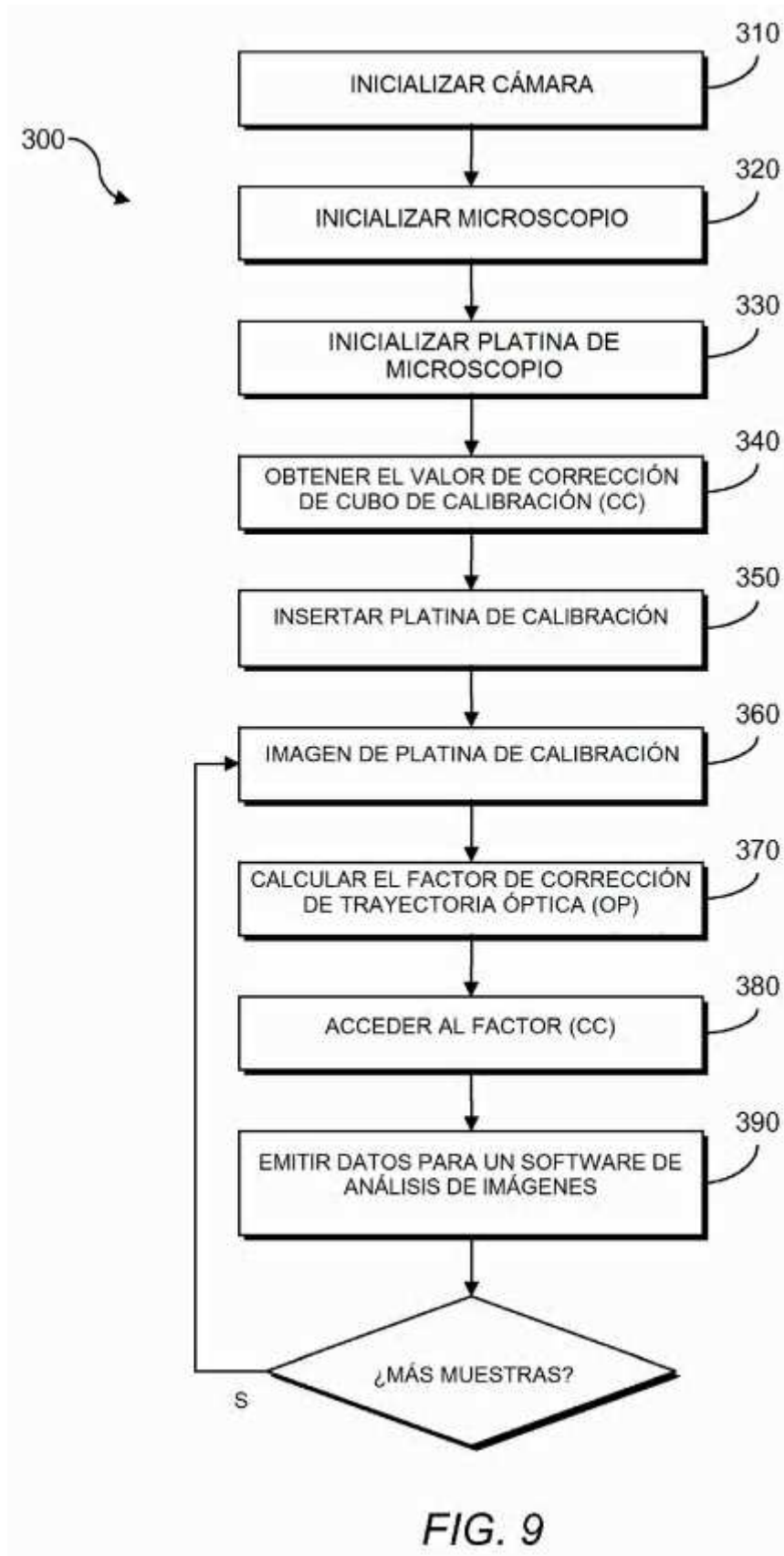
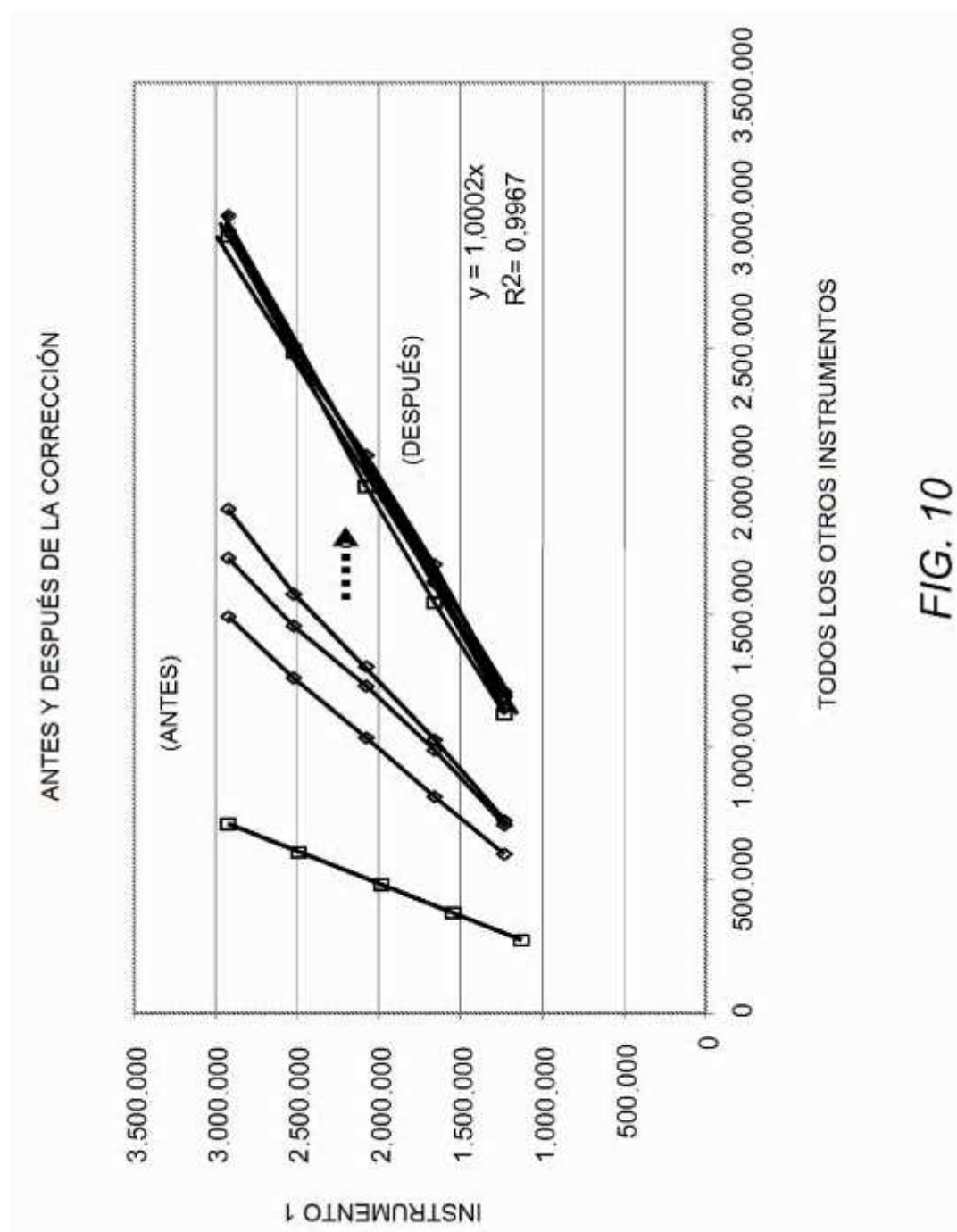
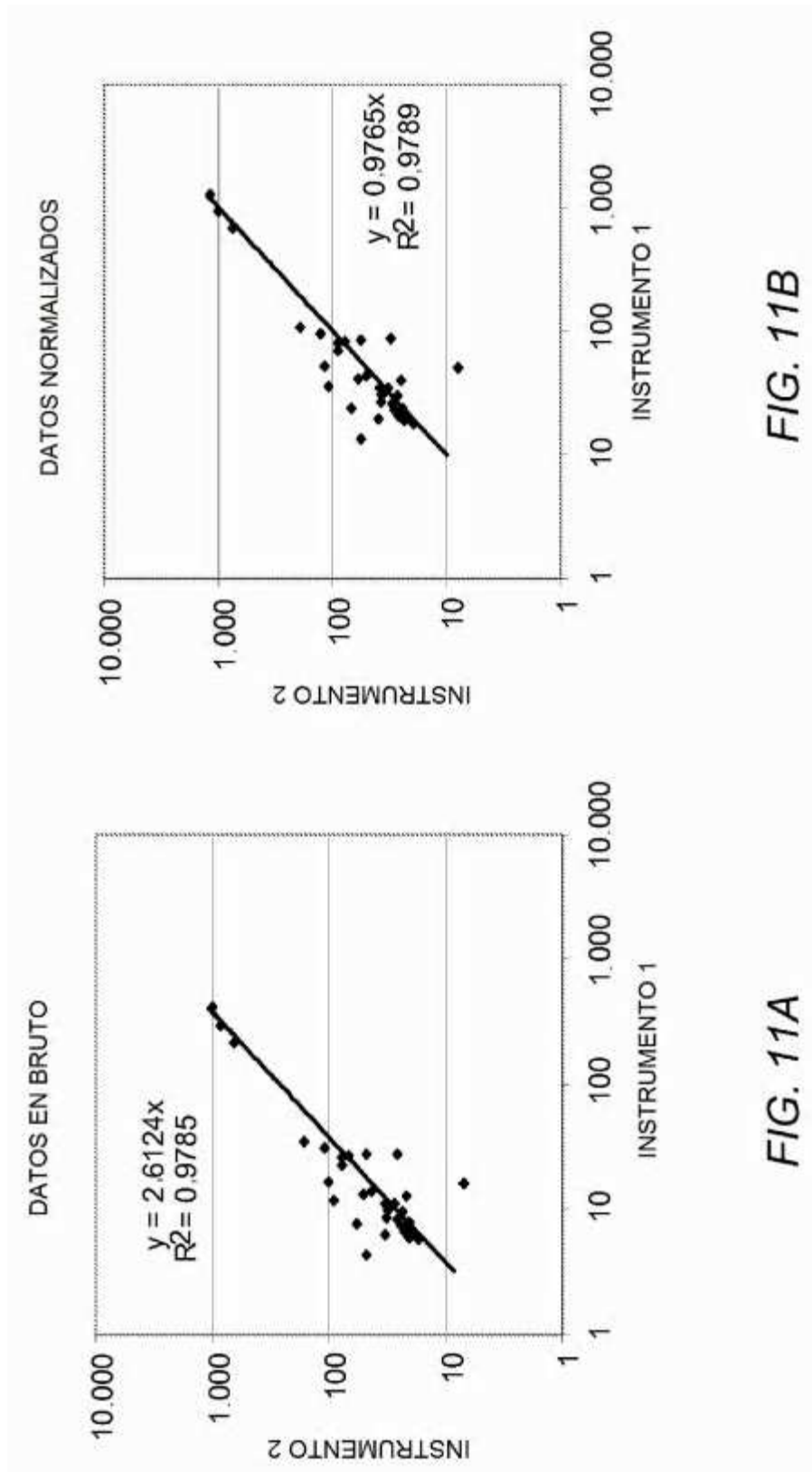


FIG. 8







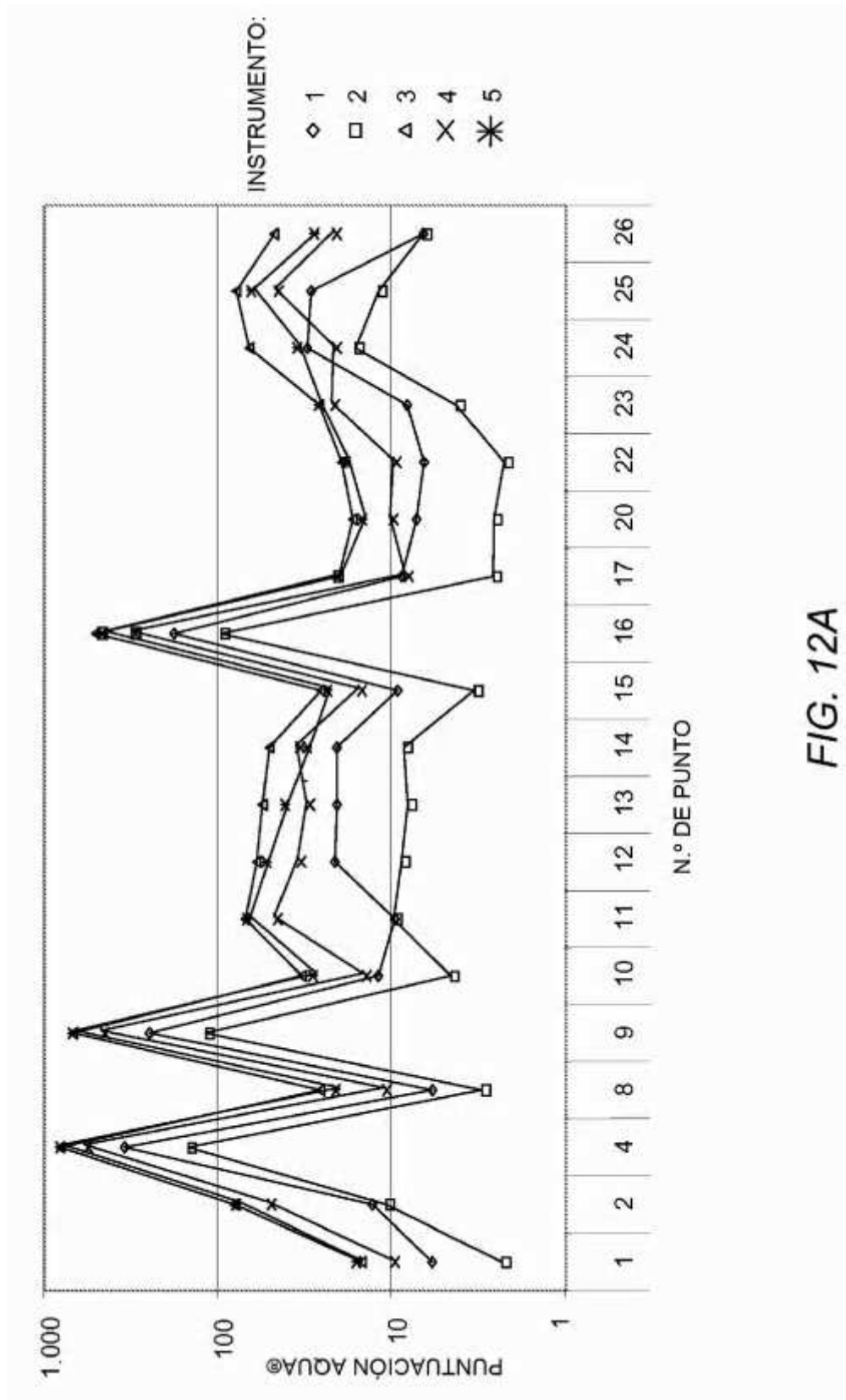


FIG. 12A

