

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 882**

51 Int. Cl.:

G06T 7/00 (2006.01)

G06K 9/00 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2006 E 08010883 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 1978486**

54 Título: **Método de análisis de imagen basado en la separación de cromógenos**

30 Prioridad:

13.05.2005 US 680991 P

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**TRIPATH IMAGING, INC. (100.0%)
780 PLANTATION DRIVE
BURLINGTON, NC 27215, US**

72 Inventor/es:

**ORNY, CEDRIC;
WILLIAMS, RYAN y
MARCELPOIL, RAPHAEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 617 882 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

Método de análisis de imagen basado en la separación de cromógenos

Antecedentes de la invención

Área de la invención

- 5 La presente invención hace referencia al análisis de imágenes y, más concretamente, a métodos para el análisis de imágenes basado en la separación de cromógenos relacionada con técnicas de video-microscopía cuantitativas en aplicaciones de biología y patología celular.

Descripción del arte relacionado

- 10 La evaluación y el análisis de los tejidos es dominio de la patología. Durante el pasado reciente, los desarrollos metodológicos y tecnológicos han convertido el análisis de imagen digital en una de las herramientas más eficaces para ayudar a los patólogos a la hora de interpretar las imágenes con creciente precisión. Aunque dichas técnicas de análisis de imágenes contribuyen sustancialmente a proporcionar a los citólogos un análisis celular preciso, reproducible y objetivo, las técnicas de interpretación histológica tienden aún a depender del análisis subjetivo de las muestras. Tales técnicas de interpretación histológica pueden también estar sujetas a la variabilidad respecto a intra-
15 e interobservador, que además tienden a proporcionar resultados menos precisos, menos reproducibles y menos objetivos. Por tales razones, el análisis de imágenes de tejidos estaba inicialmente limitado a tecnologías desarrolladas para el análisis de muestras citológicas.

- La situación ha cambiado en la actualidad con la evolución y disponibilidad de ordenadores de alto rendimiento, comunicación de área local y de área amplia, soluciones de bases de datos rentable, tecnología de almacenamiento
20 mejorada, y cámaras y/o aparatos de escáner digitales de alta resolución rentables. No pudieron aplicarse a secciones de tejido en un entorno de rutina con anterioridad algoritmos más sofisticados, no efectivos anteriormente debido a la carencia de potencia de las CPU. Sin embargo, tales algoritmos pueden ser utilizados en la actualidad para evaluar y cuantificar las características específicas de los tejidos relacionadas con la cuantificación de marcadores y la localización sub-celular. Al mismo tiempo, se encuentran disponibles soportes más completos para
25 una evaluación visual más estandarizada y reproducible de las secciones de tejido, en base a la etapa inicial en el análisis de imágenes, concretamente la creación y gestión de imágenes digitales. Esto se aplica especialmente a las áreas de control de calidad, garantía de calidad y estandarización. Las imágenes digitales de casos difíciles pueden intercambiarse con patólogos de referencia mediante telepatología para obtener una segunda opinión. Tales imágenes pueden también utilizarse de forma efectiva para pruebas de aptitud. Las imágenes digitales también son
30 la base de potentes bases de datos de imágenes de referencia, a las cuales se puede acceder a través de una red, y que juegan un papel cada vez más importante en la documentación de casos y de resultados de evaluación, en particular en informes electrónicos o impresos completos.

- Una vez que se prepara un portaobjetos con una muestra, un patólogo examina visualmente la muestra de tejido al
35 microscopio. Si hubiera de aplicarse un análisis de imagen con respecto al portaobjetos, el microscopio debe estar equipado al menos con una cámara o con otro dispositivo de captura de imágenes, que esté conectado a un sistema informático a través de una interfaz. La cámara muestrea la imagen óptica microscópica de la muestra del tejido mediante el microscopio. Como resultado, se recoge una imagen digital en la memoria del ordenador y puede mostrarse en el monitor del mismo. Sin embargo, la adquisición de estas imágenes digitales debe realizarse de tal
40 manera que los detalles importantes de las imágenes ópticas se encuentran aún representados correctamente por los datos almacenados.

- Generalmente, la siguiente etapa para una evaluación cuantitativa de las imágenes digitalizadas es la segmentación, que en ocasiones incluye una etapa adicional intermedia de pre-procesamiento. Durante la segmentación, las células se separan unas de otras y del fondo de la imagen. En algunos ejemplos, los avances algorítmicos han
45 hecho imposible segmentar las células hasta el nivel de un componente sub-celular (es decir, núcleo, citoplasma o membranas). Aunque puede parecer una tarea sencilla, la segmentación es a menudo una etapa difícil y propensa a errores en el análisis de imágenes. Para portaobjetos en los que las células se separan bien y se tiñen de forma que tiene lugar un buen contraste en la imagen digitalizada, la segmentación puede realizarse de forma muy fiable en muchos casos. Tan pronto como una de las condiciones anteriores no se cumpla, sin embargo, han de aplicarse algoritmos de segmentación sumamente sofisticados y que consumen mucho tiempo, utilizando conocimiento a
50 *priori* adicional sobre las células y su relación una con otra, o sobre marcadores y localización sub-celular con coloración de contraste. Este es el caso, por ejemplo, en casos de secciones de tejido de tumores infiltrantes, en los que la mayoría de las células ya no se separan bien en el portaobjetos, sino que tienden a tocarse y solaparse entre sí.

Utilizando un algoritmo basado en marcadores, es posible circunscribir la región de interés automáticamente, y dejar que el patólogo decida, utilizando su propia experiencia subjetiva, si la región presentada es adecuada o necesita ser refinada manualmente. Una vez que se determinan las áreas significativas de una imagen, tiene lugar la extracción de características. Para cada célula (y sus componentes sub-celulares), pueden medirse un conjunto de características densitométricas, morfométricas, de textura, y contextuales, con el objetivo de caracterizar las células individuales y sus interacciones de forma tan exhaustiva como sea posible.

La última etapa es la presentación de los datos en bruto y la compilación de los mismos en forma de resultados y/o puntuaciones significativas. Los datos de salida resultantes de un sistema de análisis de imágenes deberían coincidir, de forma deseable, con la forma de los sistemas de clasificación visual y/o semi-cuantitativos que ya están siendo utilizados por el patólogo para fomentar la consistencia, para que sean fácilmente aplicables, o para poder ser interpretados en el uso rutinario.

La plataforma para la evaluación de muestras de tejido mediante el análisis de imágenes se está desplazando, cada vez más, desde un analizador de imágenes de uso general hacia "estaciones de trabajo de patología" especializadas y dedicadas, configuradas para el trabajo de rutina. Tales estaciones de trabajo combinan herramientas con la necesaria información para obtener los mejores resultados posibles. En una posición central con respecto a dicha estación de trabajo se encuentra el microscopio, posiblemente equipado con partes robóticas que incluyen una etapa motorizada, un dispositivo de enfoque automático, un cambiador de objetivos, y un dispositivo de ajuste de intensidad de la luz. Diferentes dispositivos de entrada se encuentran enlazados con la estación de trabajo, tales como cámaras capaces de un enfoque automático rápido y de la adquisición de imágenes de alta resolución. La estación de trabajo puede ser parte de una red de área local (LAN). La estación de trabajo puede además soportar diferentes protocolos de comunicaciones, de manera que puedan utilizarse canales de comunicaciones disponibles para conectar la estación de trabajo con otros lugares en el mundo (red de área amplia o WAN).

Cuando está integrada dentro de una LAN y/o WAN, se puede garantizar el acceso de la estación de trabajo a bases de datos de referencia existentes y a sistemas de información hospitalarios (HIS, por sus siglas en inglés), de tal manera que cualquier caso nuevo a ser examinado pueda ser comparado con las imágenes y la información anexa de los casos de referencia que se han acumulado a lo largo del tiempo. Además, las imágenes adquiridas de los portaobjetos bajo examen pueden complementarse con la historia del paciente y del caso.

La estación de trabajo de patología está adaptada, preferiblemente, para una evaluación exhaustiva del tejido. Comenzando con la información y las imágenes digitales de la muestra de tejido inicial, pueden tomarse las imágenes de los portaobjetos preparados a partir del tejido. La información del paciente y del caso, las propias imágenes, y cualquier información cuantitativa acerca de los componentes celulares de la muestra de tejido pueden todos almacenarse en la misma base de datos.

Toda la información acumulada por la estación de trabajo para un caso, tal como imágenes, resultados de mediciones, datos del paciente, datos de preparación, puede seleccionarse para que forme parte de un informe que puede o bien imprimirse o firmarse electrónicamente a través de la red. El informe proporciona una imagen completa del caso bajo evaluación, y facilita la garantía de calidad y estandarización.

Durante el pre-procesamiento / segmentación de las imágenes capturadas, pueden implementarse muchas técnicas / algoritmos diferentes para el análisis de imágenes, en particular para video-microscopía cuantitativa en el área de aplicaciones de biología celular y patología, utilizando imagen multiespectral adaptada a cámaras en color (es decir, cámaras 3CCD - RGB).

Un análisis efectivo de las imágenes microscópicas es esencial en biología celular y patología, en particular para la detección y cuantificación en el material genético (genes, ARN mensajero) o la expresión de esta información genética en forma de proteínas, por ejemplo, amplificación génica, delección génica, mutación génica, número de moléculas de ARN mensajero o análisis de la expresión de proteínas. La amplificación génica es la presencia de demasiadas copias del mismo gen en una célula, en donde una célula contiene habitualmente dos copias, conocidas de otro modo como alelos, del mismo gen. La delección génica indica que pueden encontrarse menos de dos copias de un gen en una célula. La mutación génica indica la presencia de genes incompletos o no funcionales. Los ARN mensajeros (ARNm) son moléculas de información genética, sintetizadas a partir de la lectura génica, que se utilizan como plantillas para la síntesis de proteínas. La expresión de proteínas es la producción de una proteína determinada por parte de una célula. Si el gen que codifica esta proteína se regula por incremento o se encuentran presentes demasiadas copias del gen o ARNm, la proteína puede ser sobre-expresada. Si el gen se regula por disminución o se elimina, el nivel de expresión de proteínas puede ser bajo o estar ausente.

Los comportamientos celulares normales son controlados de forma precisa por mecanismos moleculares que implican un gran número de proteínas, ARNm y genes. Se sabe que la amplificación génica, la delección génica y la mutación génica tienen un papel destacado en los comportamientos celulares anómalos mediante la expresión de proteínas anómala. El rango de comportamientos celulares de interés incluye comportamientos tan diversos como, por ejemplo, la regulación de la proliferación o la diferenciación. Por lo tanto, es necesaria una detección y

cuantificación efectiva en la amplificación, delección y mutación génica, niveles de ARNm o análisis de la expresión de proteínas, para facilitar unas herramientas de investigación, de diagnóstico y de prognosis de utilidad.

5 Existen numerosas técnicas de laboratorio dedicadas a la detección y cuantificación en la ampliación, delección y mutación génica, niveles de ARNm o análisis de expresión de proteínas. Por ejemplo, tales técnicas incluyen técnicas de inmunotransferencia Western, Northern y Southern blots, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR", por sus siglas en inglés), ensayo de inmunoabsorción enzimática ("ELISA", por sus siglas en inglés), y técnicas de hibridación genómica comparada ("CGH", por sus siglas en inglés). Sin embargo, la microscopía se utiliza de forma rutinaria porque es una técnica informativa, que permite rápidas investigaciones a nivel celular y sub-celular, que puede ser implementada a un coste relativamente bajo.

10 Cuando la técnica de laboratorio elegida es la microscopía, las muestras biológicas, habitualmente, se someten en primer lugar a preparaciones específicas para la detección y el revelado. Una vez que las muestras se preparan, un usuario experto analiza las muestras sólo con un microscopio o con un microscopio acoplado a una cámara y a un ordenador, lo que permite un estudio tanto más estandarizado como más cuantitativo. El microscopio puede estar configurado para un análisis completamente automático, en donde el microscopio es automatizado con platina y enfoque motorizados, cambiadores de objetivos motorizados, controles de intensidad de la luz automáticos y similares.

15 La preparación de las muestras para detección puede implicar diferentes tipos de técnicas de preparación que son adecuadas para el análisis de imágenes microscópicas, tales como, por ejemplo, técnicas de preparación basadas en la hibridación y basadas en el inmunomarcaje. Tales técnicas de detección pueden ir acompañadas de técnicas de revelado apropiadas, tales como, por ejemplo, técnicas basadas en fluorescencia y técnicas basadas en reacción por cambio de color visible.

20 La hibridación in situ ("ISH", por sus siglas en inglés) y la hibridación in situ fluorescente ("FISH", por sus siglas en inglés) son técnicas de detección y revelado que se utilizan, por ejemplo, para la detección y cuantificación de la amplificación de la información genética y del análisis de la mutación. Tanto la ISH como la FIS pueden ser aplicadas a muestras histológicas o citológicas. Estas técnicas utilizan sondas complementarias específicas para reconocer secuencias precisas correspondientes. Dependiendo de la técnica utilizada, la sonda específica puede incluir un marcador (ISH) o un marcador fluorescente (FISH), en donde las muestras se analizan entonces utilizando un microscopio de transmisión o un microscopio de fluorescencia, respectivamente. El uso de un marcador químico o un marcador fluorescente depende del objetivo del usuario, presentando cada tipo de marcador ventajas correspondientes sobre los otros en casos en particular.

25 En caso de análisis de la expresión de proteínas, pueden emplearse, por ejemplo, técnicas adicionales de inmunohistoquímica ("IHC", por sus siglas en inglés) y de inmunocitoquímica ("ICC", por sus siglas en inglés). La IHC es la aplicación de la inmunocitoquímica a secciones del tejido, mientras que la ICC es la aplicación de la inmunocitoquímica a células cultivadas o huellas de tejido después de que se hayan sometido a preparaciones citológicas específicas, por ejemplo, preparaciones a base de líquidos. La inmunocitoquímica es una familia de técnicas basadas en el uso de anticuerpos específicos, en donde se utilizan anticuerpos para establecer como diana específicamente unas moléculas en el interior o en la superficie de las células. El anticuerpo habitualmente, contiene un marcador que se someterá a una reacción bioquímica, y por lo tanto experimentará un cambio de color, al encontrarse con las moléculas diana. En algunos casos, puede integrarse una amplificación de señal en el protocolo en particular, en donde un anticuerpo secundario que incluye el colorante marcador sigue a la aplicación de un anticuerpo monoclonal específico primario.

35 Tanto en los estudios de hibridación como en los de inmunomarcaje, se utilizan cromógenos de diferentes colores para distinguir los diferentes marcadores. Como los marcadores pueden ser específicos del compartimento celular, este conocimiento *a priori* puede ser utilizado para segmentar automáticamente las células (es decir, separar las máscaras correspondientes al núcleo de las máscaras citoplasmáticas o las correspondientes a la membrana). En general, los algoritmos "colorimétricos" están dirigidos a proporcionar información sobre las muestras para facilitar el diagnóstico y/o pronóstico del caso en particular. A modo de ilustración, puede proporcionarse la detección y cuantificación de los niveles de expresión de proteína ER, PR y HER2 en la mama utilizando un algoritmo de microscopía cuantitativa aplicada a técnicas de inmunohistoquímica (IHC).

40 En vista de tales técnicas de análisis de imágenes, sin embargo, existe la necesidad de mejoras que faciliten la flexibilidad en dichos análisis, proporcionando, al mismo tiempo, información útil y precisa a un patólogo que permita a dicho patólogo formar un diagnóstico y/o pronóstico apropiado.

La patente US 2003/0191221 divulga un método para la separación de cromógenos.

Resumen de la invención

Acorde con la presente invención, se proporciona un método para la separación de cromógenos para una imagen de una muestra biológica teñida con cuatro colorantes, obtenida con un dispositivo de toma de imágenes de tres canales, donde el método comprende:

5 definir, a partir de un conocimiento *a priori*, tres combinaciones de colorantes de tres de cuatro colorantes que están situados espacialmente en la muestra biológica;

obtener una imagen de una muestra teñida con cuatro colorantes con un dispositivo de toma de imágenes con un canal rojo, verde y azul, donde la imagen por lo tanto incluye una pluralidad de píxeles, cada uno de ellos con un triplete RGB correspondiente;

10 proyectar los coeficientes de extinción de cada colorante, en cada uno de los canales rojo, verde y azul del dispositivo de toma de imágenes, en un plano de coeficiente de extinción incluido en un plano equivalente de Maxwell, donde el plano del coeficiente de extinción está definido por los componentes del coeficiente de extinción E_{CR} , E_{CG} y E_{CB} , donde $E_{CR}+E_{CG}+E_{CB}=1$, de tal manera que las combinaciones de los tres colorantes conocidos *a priori* están representados por un triángulo cuyos vértices corresponden a localizaciones en el plano del coeficiente de extinción de los respectivos tres de cuatro colorantes;

15 proyectar cada triplete RGB en el plano del coeficiente de extinción para determinar una localización correspondiente en el plano del coeficiente de extinción y la correspondiente combinación de tres colorantes de los tres de cuatro colorantes asociados con la misma, determinando qué triángulo asociado con una combinación de colorantes rodea la localización del triplete RGB o qué triángulo asociado con una combinación de colorante está más cerca de la localización del triplete RGB; y

20 separar la imagen de la muestra determinando los píxeles en la imagen correspondientes a cada combinación de tres colorantes previamente definida en el plano del coeficiente de extinción, y realizando la correspondiente separación de cromógenos de tres colorantes para esos píxeles.

Las realizaciones de la presente invención por tanto cumplen con las necesidades identificadas en la presente patente y proporcionan ventajas significativas tal como se detalla adicionalmente en la presente patente.

25 Breve descripción de las diversas vistas del dibujo o dibujos

Habiendo descrito de este modo la invención en términos generales, se hará a continuación referencia a los dibujos anexos que no están necesariamente dibujados a escala, y en donde:

30 La FIG. 1 ilustra esquemáticamente una serie de imágenes de una muestra teñidas electrónicamente, en donde el valor de transmitancia de uno de los colorantes que tiñe la muestra se varía para determinar la intensidad óptima del marcador, tal como se muestra en el núcleo, permitiendo tanto una lectura morfológica por parte del patólogo como una decisión positiva de la célula en base a la expresión del marcador;

Las FIGS. 2A y 2B muestran algunos ejemplos de regiones de interés seleccionadas automáticamente de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

35 Las FIGS. 3A1-3A2 y 3B1-3B2 muestran ejemplos de regiones de interés seleccionadas automáticamente y la posterior segmentación subcelular de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

La FIG. 4 ilustra de forma esquemática un método de puntuación de las células de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

40 Las FIGS. 5A y 5B ilustran un método para el análisis de muestras que incluye altas concentraciones de colorante utilizando un enfoque de integración de tiempo de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

Las FIGS. 6A-6D ilustran datos en referencia a cada uno de los 4 colorantes para el teñido de una muestra para un procedimiento de separación de cromógenos de 4 colorantes de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

45 Las FIGS. 7A, 7B1, y 7B2 ilustran de forma esquemática los 4 colorantes de las FIGS. 6A-6D representados en el plano del coeficiente de extinción equivalente de Maxwell, y las 2 combinaciones aceptadas de 3 colorantes de los mismos, respectivamente, de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

La FIG. 8A ilustra un campo de visión de un PAP modificado, teñido con los 4 colorantes de la FIG. 6;

Las FIGS. 8B-8E ilustran el campo de visión de un PAP modificado de la FIG. 8A para cada uno de los 4 colorantes independientemente de los otros colorantes utilizando separación de cromógenos extendida; y

5 La FIG. 9A ilustra un campo de visión origen (RGB) de una muestra, mientras que la FIG. 9B ilustra una muestra teñida electrónicamente simulada de la misma para dos de los cuatro componentes colorantes, y la FIG. 9C ilustra una imagen simulada teñida electrónicamente de un PAP únicamente, de la muestra reconstruida con todos los componentes colorantes excepto DAB.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención será descrita a continuación de forma más completa de aquí en adelante en referencia a los dibujos anexos, en los que se muestran algunas, pero no todas las realizaciones de la invención. De hecho, esta invención puede ser realizada de muchas formas diferentes y no debe considerarse limitada a las realizaciones expuestas en la presente patente; en su lugar, estas realizaciones se proporcionan de manera que esta divulgación satisfaga los requerimientos legales aplicables. Números similares hacen referencia a elementos completamente similares.

15 La plataforma de toma de imágenes de microscopía

En un dispositivo de microscopía habitual para la adquisición y procesamiento de imágenes, la imagen aumentada de la muestra debe ser capturada y digitalizada, en primer lugar, con una cámara. Generalmente, se utilizan cámaras digitales con dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés) tanto en microscopía óptica o en microscopía de fluorescencia cuantitativa. Excluyendo los espectrofotómetros, se utilizan generalmente dos técnicas diferentes para realizar dichos estudios microscópicos colorimétricos. En una técnica, puede utilizarse una cámara CCD en blanco y negro (BW). En dicho ejemplo, se obtiene una imagen de la muestra en escalas de grises, correspondiente a luz monocromática con una longitud de onda específica al teñido de la muestra a ser analizada. La longitud de onda específica de la luz se obtiene ya sea mediante filtrado de una fuente de luz blanca a través de un filtro de un ancho de banda reducido, o controlando directamente la longitud de onda de la fuente de luz, utilizando controles manuales o electrónicos. Por consiguiente, utilizando esta técnica, el tiempo de análisis aumenta a medida que el número de colores aumenta, ya que debe seleccionarse una fuente de luz o un filtro para cada diferente coloración de la muestra o cada diferente longitud de onda. Por lo tanto, deben capturarse individualmente diversas imágenes diferentes de la muestra, que ofrecen la respuesta espectral de la muestra en diferentes longitudes de onda, en un orden secuencial para facilitar el análisis. Cuando deben analizarse múltiples escenas o campos de visión, el protocolo habitual es automatizar la secuencia en un modo por lotes para conservar el tiempo de procesamiento.

Según una segunda técnica, se utiliza una cámara digital CCD en color, en donde se capturan y se obtienen simultáneamente tres imágenes de la muestra en escala de grises. Cada imagen en escala de grises corresponde a una imagen en escala de grises en cada uno de los canales rojo, verde y azul (canales RGB) de la cámara CCD en color. Cuando se utiliza una cámara digital CCD en color, en donde tres imágenes en escala de grises de la muestra se capturan y se obtienen simultáneamente (cada imagen en escala de grises corresponde a una imagen en escala de grises en cada uno de los respectivos canales rojo, verde y azul (RGB)), pueden aplicarse las técnicas de separación de cromógenos, las cuales permiten que la densidad óptica de cada especie molecular (revelada por su cromógeno o colorante asociado), sea evaluada en cualquier localización de la imagen (pixel). En la muestra biológica, los marcadores y las tinciones de contraste generalmente indican los colorantes a ser detectados y cuantificados.

Según una tercera técnica derivada (por ejemplo, utilizando una cámara multispectral JUMBOSCAN de Lumiere Technology), pueden capturarse y obtenerse simultáneamente hasta 13 imágenes en escala de grises de la muestra. Este tipo de cámara/escáner podría aumentar el potencial de las técnicas de separación de cromógenos en el futuro aumentando el número de colorantes que pueden ser disueltos simultáneamente para una muestra determinada.

A pesar de todo, la concentración de la especie molecular puede determinarse a partir de una imagen en color de la muestra, donde la imagen de color incluye 3 o más canales. En un sistema de video-microscopía equipado con una cámara 3CCD, la imagen debe ser balanceada y normalizada de acuerdo a una imagen de un campo vacío de referencia en blanco y una imagen en negro, y a continuación corregida en cuanto al sombreado. Además, la imagen debe, de forma deseable, corregirse espacialmente para evitar las aberraciones cromáticas, canal por canal. Entonces puede calcularse una densidad óptica de la muestra en cada uno de los canales rojo, verde y azul de la imagen en RGB, en un pixel en particular en la imagen, a partir de la luz transmitida medida. Se forma a partir de entonces un vector de densidad óptica correspondiente para ese pixel. El vector de densidad óptica se multiplica a continuación por la inversa de una matriz del coeficiente de absorción relativa de los colorantes presentes en la

muestra para formar un vector resultante para el pixel, representando las contribuciones de densidad óptica de cada colorante. La matriz del coeficiente de absorción relativa comprende un coeficiente de absorción relativa para cada uno de los colorantes (marcador o marcadores) y coloración o coloraciones de contraste utilizadas en el protocolo de preparación de la muestra, en cada uno de los canales rojo, verde y azul. El vector resultante comprende de ese modo la concentración de la especie molecular, según se indica por el marcador o marcadores, y por la coloración o coloraciones de contraste, para ese pixel.

Dichas técnicas de toma de imágenes, también conocidas como técnicas de toma de imágenes multispectrales, cuando se adaptan a las imágenes en color (cámaras RGB), permiten un procesamiento en tiempo real (velocidad de vídeo) de la muestra (habitualmente 40 milisegundos por fotograma), lo que proporciona una considerable ventaja. En efecto, por razones de velocidad y procesamiento en tiempo real, o con propósitos de visualización en caso de la utilización de una cámara RGB, la adquisición a través de diferentes canales se lleva a en paralelo y pueden generarse tablas de búsqueda (LUT, por sus siglas en inglés) que asignan los valores de entrada de color RGB a concentraciones y/o factor de transmisión pre-calculados de cada uno de los colorantes participantes.

Dichas técnicas se tratan en más detalle, por ejemplo, en los Nos. de publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 2003/0091221A1 (Método para video-microscopía cuantitativa y sistema y producto de programa de software asociados) y US 2003/0138140A1 (Método para video-microscopía cuantitativa y sistema y producto de programa de software asociados), ambas de Marcelpoil et al. y cedidas a Tripath Imaging, Inc, también el cesionario de la presente invención, el contenido de las cuales se incorporan en la presente memoria en su totalidad a modo de referencia.

La ley de Lambert-Beer

La plataforma de toma de imágenes microscópicas está configurada para analizar la muestra de acuerdo con la ley de Lambert-Beer. La ley de Lambert-Beer describe generalmente una proporcionalidad que se puede observar entre la concentración de moléculas en una solución (la concentración de la "especie molecular" o la "muestra") y la intensidad de la luz medida a través de la solución. La ley de Lambert-Beer se expresa habitualmente como:

$$OD = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (1)$$

OD (por sus siglas en inglés) es la densidad óptica de la solución, ϵ es la constante de proporcionalidad denominada extinción molar o coeficiente de absorción, l es el espesor de la muestra, y C es la concentración de la especie molecular. El coeficiente de absorción ϵ es específico a la especie molecular y se expresa habitualmente en unidades de $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Esta relación de proporcionalidad definida por la ley de Lambert-Beer ha sido verificada bajo diversas condiciones que incluyen, por ejemplo, luz monocromática que ilumina la muestra, una baja concentración molecular dentro de la muestra, en general nula fluorescencia o heterogeneidad en la respuesta a la luz (fluorescencia y difusión no significativas) de la muestra, y carencia de fotosensibilidad química de la muestra. La ley de Lambert-Beer puede presentar requerimientos adicionales, sin embargo, tales como, por ejemplo, una correcta iluminación de Koehler de la muestra bajo el microscopio.

La iluminación de Koehler se ofrece en prácticamente todos los microscopios del estado del arte, y proporciona una iluminación uniforme en el plano de la imagen, a la vez que permite un control efectivo del contraste. La iluminación de Koehler es habitualmente de vital importancia para un análisis de la densitometría. Una correcta iluminación de Koehler se consigue, por ejemplo, mediante un sistema de iluminación de dos diafragmas para el microscopio en el que la fuente se proyecta en la abertura del condensador subplatina por parte de un condensador auxiliar. El condensador subplatina, a su vez, forma una imagen del condensador auxiliar sobre el objeto. También puede colocarse un diafragma iris en cada condensador, en donde el primer iris controla el área del objeto a ser iluminado, y el segundo iris varía la apertura numérica del haz de iluminación.

La ley de Lambert-Beer presenta una propiedad aditiva de tal manera que, si la muestra comprende diversas especies moleculares absorbentes de luz, por ejemplo, s_1 , y s_2 , con una respectiva concentración C_1 y C_2 , la OD de una muestra de espesor l (en solución, $l_1 = l_2 = l$) puede expresarse como:

$$OD = \epsilon_1 \cdot l_1 \cdot C_1 + \epsilon_2 \cdot l_2 \cdot C_2 \quad (2)$$

Esta situación puede ocurrir, por ejemplo, en análisis biológicos donde una "escena" o campo de visión de la muestra se ha teñido con dos colorantes que consisten en un colorante marcador para establecer como diana la especie molecular de interés y un colorante de contraste para teñir el resto de la muestra.

Corrección de la aberración cromática

5 Para medir de forma precisa la concentración de especies determinadas en imagen bajo un microscopio, las mediciones de las densidades ópticas realizadas a diferentes longitudes de onda deben corresponder a la misma porción de la muestra. Es decir, el sistema puede corregirse físicamente para corregir la aberración cromática o, de otro modo, la corrección puede realizarse mediante otra metodología, tal como mediante un software.

El poder de dispersión natural del cristal causa que una lente simple enfoque la luz azul a menor distancia que la luz roja. Es decir, una lente simple presenta diferentes longitudes focales para luz de diferente longitud de onda (diferentes colores). Dos fenómenos tienen lugar como consecuencia directa de ello:

- 10 1) la diferencia en la posición a lo largo del eje vertical de los puntos focales para luz de diferente longitud de onda se denomina aberración cromática longitudinal. Es decir, cuando se enfoca la imagen para un determinado color (verde, por ejemplo), las imágenes que corresponden a los otros colores tienden a estar ligeramente desenfocadas (el azul y el rojo, en este ejemplo, aparecerán desenfocados).
- 15 2) La diferencia en el aumento (longitud focal) para la luz de diferentes longitudes de onda se denomina aberración cromática lateral. Es decir, la imagen de una longitud de onda azul (pequeña) aparecerá mayor que la imagen de una longitud de onda roja (grande).

En sistemas con objetivos de alta calidad (objetivos apocromáticos), la aberración cromática está corregida. Si la aberración cromática no está bien corregida de otro modo estructuralmente, puede implementarse un método basado en un software para corregir la aberración cromática lateral de la siguiente forma:

- 1) Determinar la coordenada del centro del objetivo en comparación con el centro del chip de la cámara;
- 20 2) Evaluar el factor de aumento observado para cada longitud de onda en comparación con una longitud de onda elegida arbitraria (habitualmente la longitud de onda central, es decir, la verde si se utiliza una cámara RGB); y
- 3) Volver a muestrear cada imagen de acuerdo con su aumento relativo y la coordenada del centro del objetivo.

25 Realizar la separación de cromógenos

Una vez que el microscopio se ha configurado en el modo de iluminación Koehler para la adquisición de imágenes, y de que se haya abordado cualquier aberración cromática o utilizado objetivos apocromáticos, puede utilizarse la propiedad aditiva de la ley de Lambert-Beer para realizar la separación de cromógenos utilizando ecuaciones algebraicas lineales.

30 Más concretamente, la propiedad aditiva de la ley de Lambert-Beer puede también extenderse a una situación en la cual la escena se analiza en un entorno de imagen en color, tal como, por ejemplo, una escena generada por una cámara RGB con canales rojo, verde y azul separados. En dicho ejemplo, el colorante marcador (o "colorante 1") mostraría coeficientes de absorción ϵ_{1r} , ϵ_{1g} , y ϵ_{1b} , respectivamente. Ha de señalarse que el análisis de la imagen de cada uno de los canales, rojo, verde, y azul comprende esencialmente analizar una representación en rojo de la imagen a través del espectro rojo, una representación verde de la imagen a través del espectro verde, y una

35 representación azul de la imagen a través del espectro azul. Por consiguiente, el colorante de contraste (o "colorante 2") mostraría los coeficientes de absorción ϵ_{2r} , ϵ_{2g} , y ϵ_{2b} , en el canal rojo, verde y azul respectivamente. Por lo tanto, de acuerdo con la propiedad aditiva de la ley de Lambert-Beer, el análisis de la muestra en el entorno RGB conduciría al sistema de tres ecuaciones para determinar la densidad óptica de la misma:

$$OD_r = \epsilon_{1r} \cdot l_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2r} \cdot l_2 \cdot C_2 \quad (3)$$

$$OD_g = \epsilon_{1g} \cdot l_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2g} \cdot l_2 \cdot C_2 \quad (4)$$

$$OD_b = \epsilon_{1b} \cdot l_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2b} \cdot l_2 \cdot C_2 \quad (5)$$

40 donde OD_r , OD_g , y OD_b representan las densidades ópticas de la muestra medida en el canal rojo, verde y azul respectivamente. Aún más, en el caso de un aumento en la complejidad de la preparación de la muestra tal como, por ejemplo, el tratamiento de la muestra con tres colorantes diferentes, las ecuaciones (3), (4), y (5) pasan a ser:

$$OD_r = \epsilon_{1r} \cdot l_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2r} \cdot l_2 \cdot C_2 + \epsilon_{3r} \cdot l_3 \cdot C_3 \quad (6)$$

$$OD_g = \epsilon_{1g} \cdot l_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2g} \cdot l_2 \cdot C_2 + \epsilon_{3g} \cdot l_3 \cdot C_3 \quad (7)$$

$$OD_b = \epsilon_{1b} \cdot l_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2b} \cdot l_2 \cdot C_2 + \epsilon_{3b} \cdot l_3 \cdot C_3 \quad (8)$$

En dicha situación, los tres colorantes pueden comprender, por ejemplo, un colorante marcador y dos colorantes de contraste, o dos colorantes marcadores y un colorante de contraste, o incluso tres colorantes marcadores diferentes. Esta propiedad de la ley de Lambert-Beer puede extenderse para incluir una pluralidad incluso mayor de combinaciones de colorantes. Sin embargo, el procedimiento de separación de cromógenos descrito en la presente patente se centra en hacer uso de un dispositivo de captura rápida de imágenes en color con 3 canales, tal como por ejemplo una cámara 3CCD – RGB, para toma de imágenes multiespectrales de marcadores biológicos. Por lo tanto, debido a los 3 canales de información distintos (R, G, B) solamente pueden utilizarse tres ecuaciones en una localización.

A la hora de aplicar la ley de Lambert-Beer a un sistema de microscopía digital, resulta difícil y complejo, impreciso, o algunas veces imposible medir el espesor *l* de la muestra. Consecuentemente, la concentración *C* de la especie molecular puede extenderse y examinarse como el producto de *l* y *C* (*l* · *C*), y los resultados tratarse en consecuencia. Por ejemplo, cuando la concentración de un colorante se compara con la concentración de otro colorante en una muestra en particular, el término del espesor de la muestra será común a ambas concentraciones y por tanto se vuelve menos importante determinar el espesor de la muestra como un valor absoluto y preciso. Por lo tanto, ha de entenderse que habitualmente no se requiere una determinación precisa del espesor, sino que se supone constante y por lo tanto poco significativo en el análisis divulgado en la presente memoria.

La aplicación de la ley de Lambert-Beer a un sistema de microscopía digital también reconoce que la ley de Lambert-Beer puede expresarse como:

$$OD_{(x,y)} = \log I_{0(x,y)} - \log I_{(x,y)} \quad (9)$$

para una imagen digital de la muestra, donde (x, y) representa un pixel en particular de la imagen, $OD_{(x,y)}$ es la densidad óptica de la muestra en ese pixel, $I_{(x,y)}$ es la intensidad de la luz o la transmitancia medida de la muestra en ese pixel, y $I_{0(x,y)}$ es la intensidad de la luz de la fuente de luz según se mide sin la muestra absorbente de luz. Por consiguiente:

$$IOD = \sum_N (\log I_{0(x,y)} - \log I_{(x,y)}) \quad (10)$$

donde IOD es la densidad óptica integrada de la imagen digital de la muestra, y N es el número de píxeles en la superficie de la imagen de la muestra. Puede considerarse de forma apropiada una constante de proporcionalidad cuando se realizan comparaciones relativas en intensidades de luz. Además, en microscopía cuantitativa, según la ley de Lambert-Beer, se conserva la relación de proporcionalidad entre la densidad óptica OD de la muestra y las concentraciones de colorante.

[0046] Por lo tanto, para una muestra preparada examinada mediante el sistema de microscopía digital, la relación apropiada se expresa como:

$$\ln I_0 - \ln I = \ln I_0/I = OD = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (11)$$

Donde, por ejemplo, se utiliza una cámara RGB de 8 bits en el sistema, la intensidad de luz transmitida a través de la muestra será expresada como 2^8 (=256) valores entre 0 y 255. Por ejemplo, la intensidad inicial I_0 de la fuente de luz, que corresponde al 100% de transmitancia, será expresada como valores cercanos a 255 (que representa el valor más brillante posible) en cada canal rojo, verde y azul. De hecho, el operador ajusta el captador de fotogramas de la cámara / la fuente de luz de manera que una luz “blanca” pura en ausencia de la muestra, correspondiente al 100% de transmitancia, presente un valor de intensidad cercano a 255 en cada uno de los canales, rojo, verde y azul, mientras que en ausencia de luz, correspondiente a un 0% de transmitancia, la “imagen

- 5 en negro” tendrá un valor de intensidad cercano a 0 en cada uno de los canales, rojo, verde y azul. En cualquier pixel, el 100% de transmitancia, I_0 , se expresa por lo tanto como la diferencia entre el valor medido por la cámara en presencia de la fuente de luz, menos el valor medido por la cámara en ausencia de la fuente de luz, para cada uno de los canales, rojo, verde y azul. Debido a que la intensidad de la fuente de luz puede variar espacialmente a lo largo del campo de visión medido, y debido a que la óptica puede absorber luz de forma heterogénea, el 100% de transmitancia puede corresponder a diferentes rangos dinámicos a lo largo del campo de visión medido. La OD de la muestra se expresa (11) como el logaritmo de la relación de la transmitancia en ausencia de la muestra (I_0), y la transmitancia en presencia de la muestra (I), y es por lo tanto en gran medida espacialmente independiente de las pequeñas variaciones en el rango dinámico real medido al 100% de transmitancia.
- 10 Debido a que la intensidad de la fuente de luz permanece sustancialmente constante en el tiempo, o puede ser fácilmente re-evaluada, la lectura de la intensidad de la luz en cualquier pixel puede, por lo tanto, traducirse a una medida de la transmitancia relativa en la localización del pixel para cada uno de los canales, rojo, verde y azul. Una vez que se conoce la I_0 y la I , puede calcularse la correspondiente OD.
- 15 Cualquier localización en el campo de visión donde esté presente un único colorante (el único material absorbente) permite que los coeficientes de extinción relativos del colorante sean medidos para los diferentes canales RGB. Debido a que en la ecuación (1), $I \cdot C$ es igual para cada uno de los canales RGB en una localización determinada, si se conocen tanto I como C en esta localización en particular, el coeficiente de extinción exacto puede calcularse como $OD / (I \cdot C)$. El coeficiente de absorción ϵ en cada uno de los canales, rojo, verde y azul puede por tanto extraerse consecuentemente como:

$$\epsilon_r = OD_r / (I \cdot C) = (\ln(I_{0r}/I_r)) / (I \cdot C) \quad (12)$$

$$\epsilon_g = OD_g / (I \cdot C) = (\ln(I_{0g}/I_g)) / (I \cdot C) \quad (13)$$

$$20 \quad \epsilon_b = OD_b / (I \cdot C) = (\ln(I_{0b}/I_b)) / (I \cdot C) \quad (14)$$

- Desafortunadamente, $(I \cdot C)$ no se conoce habitualmente y por lo tanto, los coeficientes de extinción ϵ se calculan de forma arbitraria, como la relación de la OD medida en el pixel determinado en el canal considerado y la OD máxima medida en esta localización para cualquiera de los canales RGB (la determinación del coeficiente de absorción ϵ en cada uno de los canales, rojo, verde y azul en ausencia de un conocimiento a priori con referencia a $(I \cdot C)$ es una cuestión de manipulación de la ecuación lineal para lograr una solución relativa cuando I y C se ajustan de forma arbitraria a 1), en donde:
- 25

$$\epsilon_r = OD_r / 1 = OD_r = \ln(I_{0r}/I_r) \quad (13)$$

$$\epsilon_g = OD_g / 1 = OD_g = \ln(I_{0g}/I_g) \quad (14)$$

$$\epsilon_b = OD_b / 1 = OD_b = \ln(I_{0b}/I_b) \quad (15)$$

- Consecuentemente, si la concentración absoluta del colorante sigue siendo desconocida, es aún posible calcular de forma arbitraria (o relativa) las concentraciones de colorante en cualquier pixel, con un factor de error absoluto conocido igual a $(I \cdot C)$.
- 30

Debido a que el valor I es único en una determinada localización del pixel y puede ser ajustado de forma arbitraria a 1, las ecuaciones 6, 7, y 8 pueden re-escribirse como sigue a continuación, donde C_1 , C_2 y C_3 se relacionan con I .

$$OD_r = \epsilon_{1r} \cdot C_1 + \epsilon_{2r} \cdot C_2 + \epsilon_{3r} \cdot C_3 \quad (16)$$

$$OD_g = \epsilon_{1g} \cdot C_1 + \epsilon_{2g} \cdot C_2 + \epsilon_{3g} \cdot C_3 \quad (17)$$

$$OD_b = \epsilon_{1b} \cdot C_1 + \epsilon_{2b} \cdot C_2 + \epsilon_{3b} \cdot C_3 \quad (18)$$

su aplicación adicional a las muestras tratadas con al menos uno de los respectivos colorantes. Calcular soluciones para todos los valores de píxeles posibles permite un procesamiento sustancialmente en tiempo real. Debido a que en el ejemplo elegido de un dispositivo de adquisición de imágenes en color 3CCD de 8 bits, la intensidad de la luz I medida de una muestra se sitúa en un rango entre los límites de 0 y 255 en cada uno de los canales, rojo, verde y azul, todos los valores posibles de gris (con respecto a la intensidad de luz original I₀) pueden ser pre-calculadas (256³ en caso de un sistema RGB de 8 bits) y almacenados, por ejemplo, en el ordenador. Por tanto, para una muestra teñida con un colorante en particular, la intensidad de luz transmitida I (o la densidad óptica OD) puede ser medida en un pixel en cada uno de los canales, rojo, verde o azul y a continuación comparada con los valores de gris previamente almacenados y la matriz del coeficiente de absorción ε para ese colorante en particular para así determinar la concentración de colorante C (o un estimado de la misma como el producto I·C) en ese pixel. A este respecto, existen [256(rojo) x 256(verde) x 256(azul)] = 256³ soluciones para calcular, dando lugar a una tabla de búsqueda (LUT) de 16 megabytes (datos en bruto) para cada uno de los colorantes. Las resoluciones del valor de gris que exceden los 8 bits por canal conducirán a mayores LUT (por ejemplo, >1 gigabyte si 10 bits por canal).

Teñido electrónico

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, pueden generarse los valores de transmitancia de las escalas de grises o RGB de una imagen artificial que se obtienen como resultado de cualquier combinación de los colorantes examinados anteriormente, ya que no hay más variables desconocidas. Como tales, para un pixel en particular y sus concentraciones de colorantes disueltos, las imágenes de un único colorante corresponderían a las siguientes intensidades de píxeles en blanco y negro (BW) o RGB:

$$OD_{BW} = C \quad y \quad I_{BW} = \text{Exp}(\ln(I_0) - OD_{BW}) \quad (22)$$

$$OD_r = \epsilon_r \cdot C \quad y \quad I_r = \text{Exp}(\ln(I_0) - OD_r) \quad (23)$$

$$OD_g = \epsilon_g \cdot C \quad y \quad I_g = \text{Exp}(\ln(I_0) - OD_g) \quad (24)$$

$$OD_b = \epsilon_b \cdot C \quad y \quad I_b = \text{Exp}(\ln(I_0) - OD_b) \quad (25)$$

Cuando este proceso se aplica a cada pixel de una imagen capturada, puede generarse una imagen artificial del mismo campo de visión utilizando únicamente la respectiva contribución de cualquiera de los colorantes constituyentes. Como tal, si los coeficientes de extinción de un colorante se intercambian con los coeficientes de extinción de otro colorante, es posible simular cómo se vería la misma imagen artificial correspondiente a un marcador determinado únicamente, a través de un microscopio si el colorante utilizado para revelar este marcador se cambiara a un colorante secundario.

Además, utilizando la propiedad aditiva de la ley de Lambert-Beer law, también es posible, tal como se muestra en la FIG. 1, generar una imagen artificial donde las contribuciones relativas de cada colorante se cambian, por ejemplo, utilizando coeficientes de peso absoluto o coeficientes de peso relativo (ver la ecuación 26-28 para una imagen teñida electrónicamente (abreviado en inglés "e-stained") con dos colorantes, donde la imagen RGB se reconstruye después de cambiar las proporciones del Colorante 1 y del Colorante 2 por los factores de ponderación w₁ y w₂.

$$OD_r = w_1 \cdot \epsilon_{1r} \cdot C_1 + w_2 \cdot \epsilon_{2r} \cdot C_2 \quad y \quad I_r = \text{Exp}(\ln(I_0) - OD_r) \quad (26)$$

$$OD_g = w_1 \cdot \epsilon_{1g} \cdot C_1 + w_2 \cdot \epsilon_{2g} \cdot C_2 \quad y \quad I_g = \text{Exp}(\ln(I_0) - OD_g) \quad (27)$$

$$OD_b = w_1 \cdot \epsilon_{1b} \cdot C_1 + w_2 \cdot \epsilon_{2b} \cdot C_2 \quad y \quad I_b = \text{Exp}(\ln(I_0) - OD_b) \quad (28)$$

Más en particular, la FIG. 1 ilustra un ejemplo de receptor estrógenos (ER) en el que una serie de imágenes de la misma célula (la imagen original a una determinada transmitancia de aproximadamente un 32%, se muestra rodeada en rojo), en el que la cantidad de un marcador (DAB marrón) se cambia electrónicamente (artificialmente), después de la separación de cromógenos, desde aproximadamente un 22% de transmitancia a aproximadamente un 40% de transmitancia, sin cambiar el contenido de hematoxilina. De esta manera, puede determinarse un contraste óptimo entre componentes sub-celulares a partir de imágenes artificiales, además de la cantidad necesaria de colorante

para proporcionar el valor de transmitancia correspondiente al contraste óptimo entre componentes sub-celulares no diana y diana específicos del marcador.

Estrategia de medición

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, una estrategia de medición puede estar basada en y puede hacer uso de la o las técnicas de separación de cromógenos descritas anteriormente en muchos aspectos, desde permitir que se mida específicamente únicamente el marcador de interés, hasta las habilidades de teñido electrónico que permiten que se generen imágenes contrastadas optimizadas por la segmentación.

10 Obtener resultados de medición de la imagen adquirida incluye diversas etapas: 1) seleccionar la región de interés (región tumoral); 2) segmentación para identificar los objetos de interés en la imagen; y 3) extracción de características para calcular las diversas características de medición para los objetos identificados y efectuar puntuaciones celulares en base a, por ejemplo, la localización de su marcador y la relación señal - ruido.

1) Pre-selección de la región de interés

15 Para reducir la carga de trabajo para el patólogo, se desarrolló una metodología de pre-selección para delinear automáticamente la región de interés potencial dentro del campo de visión que será la región utilizada para el análisis, en donde cualquier parte excluida queda, por tanto, excluida del análisis. Dicha metodología de pre-selección generalmente requiere dos factores *a priori*:

- la región de interés está contrastada positivamente con respecto al área circundante cuando se mira a la imagen de sólo el marcador.
- el cáncer establece como diana las células epiteliales las cuales difieren de las células de estroma en, por ejemplo, un núcleo mayor y una mayor densidad celular.

25 Consecuentemente, puede aplicarse un filtro paso bajo de gran magnitud a la imagen de sólo marcador que se obtiene como resultado de la o las técnicas de separación de cromógenos aplicadas al campo de visión RGB. Se mide el histograma de sólo marcador (evitando las regiones de fondo que se basan en la imagen de luminancia), y a continuación la imagen es binarizada de acuerdo al mejor umbral en el histograma que podría distinguir dos clases (regiones negativas y positivas). Cualquier hueco pequeño se rellena para suavizar la máscara final. La máscara se representa en la parte superior de la imagen del campo de visión RGB original para permitir la aceptación/rechazo del patólogo, tal como se muestra en las FIGS. 2A y 2B. Más particularmente, la FIG. 2A ilustra un ejemplo de PSMB9 y la FIG. 2B ilustra un ejemplo de HER2 de definición automática de la región de interés de acuerdo con una realización de la metodología de pre-selección divulgada en la presente patente. La región de interés se calcula automáticamente o se determina de otro modo, y puede presentarse al patólogo para su refinamiento y/o aprobación final. Si el patólogo rechaza la máscara propuesta, las herramientas de dibujo permiten al patólogo seleccionar manualmente la región de interés apropiada.

2) Estrategia de segmentación

La estrategia de segmentación incluye los siguientes pasos:

- 35 • Determinación del fondo
- Creación de la imagen del componente celular
- Segmentación de la membrana*
- Segmentación del núcleo
- Segmentación del citoplasma
- 40 • Refinamiento de la segmentación
- Filtrado de objetos no deseados

* En el caso de los marcadores de la membrana, tales como Her2, se realiza un paso específico adicional de segmentación de la membrana.

Se muestran diversos ejemplos de dicha segmentación, por ejemplo, en las FIGS. 3A1-3A2 y 3B1-3B2, respectivamente. Más particularmente, la FIG. 3A1 muestra un ejemplo de PSMB9 (marcador citoplasmático) de definición automática de la región de interés, seguido de segmentación sub-celular en la FIG. 3A2. Dentro de la región de interés, se han segmentado células definidas automáticamente, de tal manera que las máscaras del núcleo aparecen en azul y los límites del citoplasma aparecen en rojo, mientras que los píxeles del fondo se muestran en negro. La FIG. 3B1 ilustra un ejemplo de HER2 (marcador de membrana) de definición automática de la región definida automáticamente, de tal manera que las máscaras del núcleo aparecen en azul y la membrana aparece en verde, mientras que los píxeles del fondo se muestran en negro. Un experto en el arte apreciará, sin embargo, que etapas o refinamientos adicionales del procesamiento de imágenes pueden, en algunos casos, ser necesarios para adaptar dichos algoritmos genéricos a las especificidades del tejido o marcador.

2a) Determinación del fondo

La primera etapa de segmentación es dividir el contenido de la imagen en primer plano y fondo. Ya que la plataforma está diseñada para soportar microscopía de campo claro, los objetos aparecerán más oscuros que el fondo claro. Para crear una máscara de fondo para una imagen, la imagen se convierte en una imagen de luminancia y se calcula un nivel umbral del fondo. Se considera que cada pixel con un valor de luminancia por encima del nivel umbral del fondo, pertenece al fondo. De forma inversa, cualquier pixel con una luminancia menor que el umbral pertenece al primer plano, que ha de ser procesado adicionalmente en las siguientes etapas.

Determinar el valor umbral del fondo implica suavizar la imagen de luminancia y calcular el histograma de la imagen igualada. El histograma se escanea a continuación, comenzando en el extremo más elevado, para determinar un mínimo local a ser utilizado para el valor umbral. La búsqueda se limita cuando se alcanza un 90% de transmisión arbitraria, que se traduce, para el caso de imágenes de 8 bits, en el valor de 230.

2b) Creación de imágenes de componentes celulares

En la siguiente etapa de segmentación, las imágenes del componente celular para el núcleo y el citoplasma se crean utilizando técnicas de separación de cromógenos descritas anteriormente. La separación se inicia de acuerdo a la especificación de la contribución de la densidad óptica de cada colorante al componente celular específico. Aquellas imágenes de componentes se utilizan entonces como datos de entrada para las etapas posteriores de segmentación del núcleo y citoplasma. Las imágenes del componente están basadas en las habilidades de teñido electrónico y generan imágenes que mejor contrastan con el compartimento celular diana de las regiones vecinas.

2c) Segmentación de la membrana

La segmentación de membrana se realiza utilizando las siguientes etapas:

- Encontrar el valor medio sobre la imagen total que no es fondo.
- Rellenar cualquier localización en la imagen con este valor medio, si el valor local es más brillante.
- Encontrar la membrana generando la diferencia de imagen entre núcleos de convolución de suavizado grandes y pequeños.
- Binarizar la imagen de contraste resultante en base al contraste local medido.
- Extraer el esqueleto de las máscaras de la membrana candidata.
- Eliminar cualquier pieza del esqueleto menor que una longitud mínima solicitada.
- Expandir el esqueleto de las máscaras de la membrana en un pixel en cualquier dirección y mantener únicamente las máscaras de la membrana que caen bajo el esqueleto.

La segmentación de la membrana se realiza en primer lugar para facilitar una segmentación adicional del núcleo, ya que generalmente se espera que las membranas separen los núcleos entre sí.

2d) Segmentación del núcleo

Al principio del proceso de segmentación del núcleo, tanto los valores de la media como de la mediana de la imagen del componente del núcleo se calculan en consideración con la máscara del fondo. El mayor de esos valores se utiliza para crear una máscara del núcleo inicial formando umbrales de la imagen del componente del núcleo con

este valor. Cualquier pixel con un valor mayor que este umbral se ajusta al valor umbral de manera que únicamente los píxeles con un valor inferior permanezcan con su valor original en esta máscara del núcleo inicial. Si están disponibles las máscaras de la membrana, se borra cualquier pixel potencial de la máscara del núcleo que caiga dentro de una máscara de la membrana.

5 Esta máscara del núcleo preliminar o inicial se somete a un filtro de paso bajo con un núcleo de 1,5 veces el tamaño de núcleo previsto para preparar la máscara del núcleo inicial para un procedimiento de transformación divisoria o de segmentación. Los datos de salida del procedimiento de segmentación divisoria se combinan con la máscara inicial del núcleo de manera que solamente los píxeles de la máscara se ajustan donde la imagen divisoria presenta cuencas y la máscara del núcleo inicial presenta un valor de pixel por debajo del valor umbral. La máscara del núcleo resultante se finaliza a continuación mediante una etapa de depuración que incluye el relleno de huecos con un área menor de aproximadamente un quinto del tamaño del núcleo previsto, y eliminar objetos que son más pequeños de aproximadamente un cuarto del tamaño previsto del núcleo.

2e) Segmentación del citoplasma

15 El proceso de segmentación del citoplasma utiliza un enfoque de dos vías para crear la máscara del citoplasma. Ambas vías utilizan la máscara del núcleo creada en la etapa previa como el punto de partida. Primero, la máscara del núcleo se invierte y se transforma en cuanto a la distancia. La primera máscara del citoplasma potencial se crea mediante binarización de los datos de salida de la transformada de la distancia de tal manera que todos los píxeles dentro del tamaño de célula previsto estén incluidos en la máscara resultante. Para formar la máscara solamente del primer plano, la primera máscara potencial del citoplasma resultante se combina entonces con la máscara del fondo. 20 Para la segunda máscara potencial del citoplasma, la máscara del núcleo se invierte nuevamente y a continuación se somete a transformación divisoria. Tanto la primera como la segunda máscara potencial se combinan entonces para crear la máscara del citoplasma final.

2f) Refinamiento de la segmentación

25 Una vez que las máscaras de segmentación tanto del citoplasma como del núcleo han sido establecidas, esas máscaras se refinan adicionalmente utilizando el conocimiento de las máscaras combinadas. Comenzando con la máscara del citoplasma, cada objeto segmentado en la máscara del citoplasma se identifica y se asocia con una imagen etiquetada, en donde cada objeto es identificado por un único valor de pixel. Debido a la transformación divisoria en la segmentación del citoplasma, los objetos etiquetados se separan entre sí. Como tal, la imagen etiquetada es dilatada una vez para reconectar los objetos etiquetados.

30 La imagen etiquetada se utiliza a continuación para refinar la máscara del núcleo. Es decir, cada objeto es binarizado utilizando un umbral individual. Para cada objeto etiquetado el proceso es como sigue a continuación:

- Calcular el histograma para cada pixel que pertenece al objeto etiquetado y determinar el valor de pixel medio.
- Determinar un límite superior e inferior para la búsqueda del umbral. El límite superior se determina integrando el histograma comenzando desde el límite superior hasta que se acumula un 20% del área del objeto. El límite inferior se determina de forma similar integrando el histograma desde el límite inferior hasta que también se acumula un 20% del tamaño previsto del núcleo.
- Si el límite inferior es menor que el límite superior, el umbral se calcula aplicando el análisis discriminante de Fisher al rango de valores en el histograma entre los límites; de otro modo, el umbral es el valor medio de los límites superior e inferior.
- Redibujar el objeto en la máscara del núcleo binarizando la imagen del componente del núcleo utilizando el valor umbral que se acaba de determinar.

45 A continuación, se rellenan los huecos en la máscara del núcleo con un área menor de aproximadamente un quinto del tamaño previsto del núcleo. Para evitar una infra-segmentación, se aplica a la máscara una transformada de distancia en primer lugar para dividir los núcleos potencialmente unidos.

Finalmente, la máscara del núcleo se limpia de artefactos eliminando todos los objetos menores de aproximadamente un tercio del tamaño previsto del núcleo. Una vez que la máscara del núcleo refinada se determina, el procedimiento de segmentación del citoplasma se repite y se obtiene como resultado una máscara del citoplasma refinada.

Para la segmentación de Her2neu, se realiza la etapa adicional de la eliminación de la membrana, que elimina cualquier máscara de la membrana situada dentro de aproximadamente 3 píxeles de una máscara del núcleo, para facilitar la discriminación de una membrana celular de una membrana del núcleo.

2g) Filtrado de las células no deseadas

- 5 La última etapa de procesamiento en el procedimiento de segmentación implica el filtrado de células no deseadas. Para este procedimiento, se etiqueta cada objeto en la máscara del citoplasma refinada. Además, la imagen del FOV adquirida se separa por cromógenos en imágenes del colorante para el marcador y el colorante de contraste. Para cada objeto identificado, se determina un rectángulo de limitación y, si el objeto se sitúa más cerca que una determinada distancia a cualquier límite de la imagen, el objeto ya no se toma en cuenta y se descarta para evitar un
- 10 procesamiento de las células que se extienden más allá del límite de la imagen. Si la célula pasa este criterio, se calculan sus características de medición clave, tales como densitometría, textura, forma, información contextual.

Los ejemplos adicionales (incompletos) incluyen:

- Área
- Perímetro

15

- Centro de Gravedad (CoG)
- OD mínima
- OD media
- OD máxima

- 20 Se calcula cada característica para el núcleo, el citoplasma, y/o la célula entera, además de para cada uno de entre la luminancia, colorante o colorantes marcadores y colorante o colorantes de contraste.

Utilizando la transmitancia media determinada a partir de la OD media, se aplica otro criterio de éxito/fracaso a la célula. Es decir, si la transmitancia media de la célula es mayor que un valor umbral especificado en el ajuste de la segmentación, la célula no se considera más y se descarta.

3a) Puntuación de las células

- 25 En base a las características evaluadas para cada célula, se puede atribuir una puntuación a esa célula dependiendo de la intensidad del marcador y de la relación señal – ruido de la misma en el compartimento diana. Una célula se considera positiva cuando el contenido del marcador de dicha célula en la densidad óptica (intensidad) del compartimento diana específico al marcador es significativamente mayor en los compartimentos vecinos. Por
- 30 ejemplo, si el marcador es un marcador del núcleo, se calcula el contraste, o la relación señal – ruido, para la medida de la densidad óptica específica del marcador en el núcleo contra la densidad óptica residual medido en el citoplasma. Debido a que el ruido de fondo no es específico por definición, la densidad óptica media general del fondo se mide por todo el compartimento del citoplasma de las células dentro de la región de interés seleccionada.

Marcador del núcleo:

35
$$\text{SNR Célula} = \text{NúcleoMOD} / \text{CitoplasmaMOD} \quad (28)$$

- Para facilitar una correlación óptima con el “know-how” (experiencia) del patólogo, el contraste requerido para designar una célula como positiva, puede adaptarse de fuerte a débil, ya que algunos patólogos consideran únicamente los núcleos muy intensos como positivos, mientras que otros patólogos consideran cualquier ligera coloración positiva, como un positivo. Una determinación positiva tan subjetiva basada en el nivel de contraste
- 40 puede además verse afectada por la patología en particular que va a ser considerada.

Una célula es positiva para un marcador de núcleo si

$$\text{NúcleoMOD} > \text{CitoplasmaMOD} + \max[\varepsilon, k(1 - \text{CitoplasmaMOD})] \quad (29)$$

- Para los ER (receptores de estrógenos) se observó que $\varepsilon = 0,02$ y $k = 0,11$
- Para los PR (receptores de progesterona) se observó que $\varepsilon = 0,02$ y $k = 0,20$

5 Por consiguiente, tal como se muestra en la FIG. 4, cualquier célula bajo la curva es negativa, y de lo contrario positiva. Es decir, la FIG. 4 ilustra curvas de SNR y OD del núcleo que definen, para los ER y PR, el estatus negativo y positivo de una célula. Para tales marcadores del núcleo, se evalúa la relación señal - ruido (SNR) como una relación de la OD del núcleo con respecto a la OD del marcador citoplasmático. Si una célula cae por encima de la curva (esquina superior derecha), la célula se considera positiva, y de lo contrario negativa. Generalmente, cuanto más fuerte es la intensidad del núcleo, menor debe ser la SNR para denominar la célula positiva (y vice-versa).

10 3b) Puntuación global

Una puntuación global puede ser atribuida a un caso que refleje, para ese caso, la información solicitada por el patólogo para establecer si diagnóstico / pronóstico.

$$\text{Puntuación total} = 100 * \# \text{ células positivas} / \# \text{ células en ROI} \quad (30)$$

15 En el caso de las pruebas de ER y/o PR, la puntuación total solicitada por el patólogo es el porcentaje de células positivas dentro de la región tumoral. Por lo tanto, una vez que el patólogo está seguro de su diagnóstico / pronóstico de la región de interés propuesta (propuesta automáticamente o dibujada manualmente), se informa sobre el porcentaje de células puntuadas positivamente.

Concepto de integración

20 Para investigar adicionalmente la contribución de la OD de los diferentes colorantes cuando las concentraciones son muy altas y se alcanzan limitaciones en cuanto a bits de la cámara, puede implementarse una estrategia basada en la integración del tiempo (velocidad de obturación) de la cámara. Es decir, el mismo campo de visión se visualiza con la misma cámara, pero con diferentes tiempos de integración. Tal como se muestra en las FIGS. 5A y 5B, la OD medida se normaliza con el tiempo de integración y se mantienen los valores no saturados medidos correspondientes al tiempo de integración máximo en cada canal. Más particularmente, la FIG. 5A muestra una célula en particular con una intensidad del marcador elevada que se captura como imagen utilizando diferentes tiempos de integración (4000s^{-1} a 250s^{-1}) para mejorar la resolución de bits en las regiones más oscuras. De acuerdo con una metodología de ese tipo, el pixelado de la imagen con separación de cromógenos en el núcleo (solo hematoxilina), desaparece sustancialmente cuando se utiliza la resolución de bits apropiada. La FIG. 5B muestra intensidades de luz transmitida RGB, además de valores de OD normalizados en el tiempo para un pixel representativo capturado utilizando diferentes tiempos de integración (4000s^{-1} to 250s^{-1}) para mejorar la resolución de bits en las regiones más oscuras de la imagen que se muestra en la FIG. 5A. La mejora de la resolución de bits se obtiene a partir de los valores de intensidad de luz transmitida RGB que se seleccionan en cada uno de los canales RGB para el tiempo de integración, antes de la saturación.

Romper el límite de 3D utilizando una entrada RGB: Separación de cromógenos de 4D

35 Se proporciona un ejemplo de un procedimiento de este tipo para la separación de cromógenos de 4D mediante una combinación de 4 colorantes para un procedimiento de un PAP modificado, según se muestra en las FIGS. 6A-6B, concretamente Hematoxilina (FIG. 6A), Eosina (FIG. 6B), Verde (FIG. 6C), y DAB (FIG. 6D). En este ejemplo, 3 canales (R, G, y B) comprenden los canales de entrada, con 4 incógnitas (colorantes). En dicho ejemplo, puede utilizarse conocimiento *a priori*. Los colorantes se representan en un plano equivalente de Maxwell que incluye el plano del coeficiente de extinción donde $E_{cR} + E_{cG} + E_{cB} = 1$. En este plano, un colorante es representado por una única localización XY. En cada localización XY del plano, pueden presentarse diferentes tripletes RGB que muestran diferentes transmitancias (diferentes intensidades de un colorante determinado), en donde, en el presente ejemplo, se muestra un triplete RGB con la transmitancia más cercana al 50% en la FIG. 7A. Más particularmente, la FIG. 7A muestra diferentes tripletes RGB, tal como el triplete RGB más cercano al 50% de transmitancia. Cada colorante se proyecta en el plano E_c en base a sus coeficientes de extinción en los canales rojo, verde y azul del dispositivo de captura de la imagen (cámara), donde cada colorante está representado por su letra inicial.

Con respecto a la naturaleza de los respectivos colorantes, existen dos configuraciones aceptadas de 3 colorantes entre las 4 posibles configuraciones de los 3 colorantes, tal como se muestra en las FIGS. 7B1 y 7B2, respectivamente, en donde cada una de estas dos configuraciones de 3 colorantes se destacan mediante un

triángulo circundante. A partir de un conocimiento *a priori*, se sabe que es improbable que todos los 4 colorantes estén significativamente presentes en la misma localización geográfica con respecto a la muestra. Por lo tanto, la separación de cromógenos en este ejemplo considera únicamente configuraciones de 3 colorantes en las que los 3 colorantes podrían situarse conjuntamente con respecto a la muestra. Más particularmente, la Eosina y el Verde son colorantes principalmente citoplasmáticos que tiñen células con diferentes atributos citoplasmáticos. Consecuentemente, no es probable que estos colorantes estén presentes en la misma localización con respecto a la muestra incluso aunque, debido a la localización de la hematoxilina entre los colorantes Eosina y Verde en este plano de extinción, una mezcla de Eosina y Verde podría confundirse con Hematoxilina (pero es muy improbable que se confunda con DAB).

Por tanto, para resolver el problema de la configuración de 4D, el procedimiento de separación de cromógenos se aplica buscando cada triplete RGB de este FOV donde estaría localizado, en la localización XY del mismo, el correspondiente colorante, en donde la localización XY es la localización en el plano del coeficiente de extinción donde $E_{cR}+E_{cG}+E_{cB}=1$. En este plano, se determina y se utiliza la configuración de 3D circundante, o la configuración más cercana a 3D por defecto, para resolver las ecuaciones para determinar la densidad óptica de los 3 colorantes correspondientes, mientras que la densidad óptica del colorante restante se ajusta a 0. Un experto en el arte apreciará que la mayoría de las localizaciones XY de los tripletes RGB investigados deberían encontrarse dentro de una de las 2 configuraciones aceptadas de 3 colorantes. La FIG. 8A ilustra un campo de visión con todos los 4 colorantes representados (es decir, un campo de visión de un PAP usual modificado donde todos los 4 colorantes están representados, en donde la célula central oscura es positiva en DAB, tal como se muestra en la FIG. 8C). Las FIGS. 8B-8E ilustran el mismo campo para cada uno de los 4 colorantes.

Adaptación ultra-rápida del escáner para buscar células positivas en (DAB) en un entorno de un PAP modificado

Los aspectos discutidos de la separación de cromógenos de 4D y tñido electrónico pueden, en algunos casos, combinarse para formar otro aspecto de la presente invención. Más particularmente, en continuación con el ejemplo anterior dirigido al uso de DAB y Hematoxilina, puede implementarse un escáner que pueda leer portaobjetos de PAP modificados (una solución poco frecuente positiva en DAB), tal como se muestra en la FIG. 9A (una imagen RGB de un campo de visión original). A continuación, en base a los procedimientos de separación de cromógenos de 4D y tñido electrónico, puede resolverse la situación de 4 colorantes. Una vez resuelta, puede reconstruirse una imagen simulada utilizando un proceso de "tñido electrónico" para incluir únicamente las contribuciones de DAB y Hematoxilina, tal como se muestra en la FIG. 9B. Además, los únicos canales de Hematoxilina y DAB podrían ser utilizados como datos de entrada para el escáner, de tal manera que el escáner estaría configurado para capturar una imagen de "solamente Hematoxilina y DAB", que produciría una imagen sustancialmente igual a la que se muestra en la FIG. 9B. Además, una única imagen de un PAP simulada podría reconstruirse utilizando solamente las contribuciones de Hematoxilina, Eosina y Verde, tal como se muestra en la FIG. 9C.

Consideración de la distorsión RGB

Para adaptar y/o compensar la distorsión RGB debido a las variaciones de la trayectoria, electrónica y/o coloración de la imagen, puede considerarse una modificación de la separación de cromógenos. Es decir, el material biológico visualizado tñido únicamente con un colorante demuestra que el modelo del coeficiente de extinción, que puede calcularse a partir de cada triplete RGB dentro de la fuente del FOV, varía ligeramente alrededor de la medida media aceptada. Consecuentemente, cuando una mezcla de colorantes está presente, podrían aceptarse o resultar aceptables de facto múltiples soluciones de mezclas de colorantes. Diferentes fuentes de ruido podrían ser responsables de dicha distorsión del RGB. Por ejemplo, adquirir la imagen con una cámara CMOS en lugar de una cámara 3CCD podría ser un factor.

Para compensar estas distorsiones, la solución de contribución respectiva del colorante para un triplete RGB determinado y un modelo de múltiples colorantes determinado se calcula de una forma ligeramente diferente. Más particularmente, el triplete RGB bajo investigación se considera el centro de una esfera en el espacio RGB con un radio dado r . Todos los tripletes dentro de esta esfera se investigan para determinar sus soluciones de contribución de colorante, y se calcula la media de las soluciones para cada colorante para todos los tripletes RGB que satisfacen el modelo de combinación de colorantes. Si ningún triplete RGB pertenece al modelo de combinación de colorantes, el triplete RGB dentro de la esfera más cercano al modelo de combinación de colorantes como el mejor candidato de solución potencial.

Procedimientos dinámicos

Tradicionalmente, todos los algoritmos o procedimientos computacionales utilizados en aplicaciones de microscopía cuantitativa son implementados o construidos en el sistema por ingenieros de software. Como tal, cada versión de software incluye generalmente un conjunto limitado de algoritmos, que no pueden cambiarse sin modificación del software ("actualizaciones del software").

5 Por ejemplo, una aplicación puede calcular el porcentaje de células positivas en un portaobjetos calculando la relación del número de células con una densidad óptica media (MOD) de un colorante marcador en el núcleo mayor que un valor umbral con respecto al número de células totales en el portaobjetos. En una aplicación tradicional, el valor umbral puede ser configurable, pero la fórmula utilizada para calcular la relación permanece fija; siempre comparará el número de células sobre un umbral determinado con el número de células totales. Incluso si un procedimiento o algoritmo permite que el valor umbral total varíe en base a otras características extraídas, las fórmulas utilizadas para determinar el umbral siguen siendo fijas.

10 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención comprende una metodología por la que los algoritmos o procedimientos están configurados para ser dinámicos (es decir, producir resultados basados en fórmulas introducidas por un usuario). Es decir, en lugar de que los algoritmos o procedimientos estén codificados directamente en el software, el software puede evaluar las fórmulas a ser utilizadas en el periodo de ejecución real del análisis. Más particularmente, una aplicación de microscopía cuantitativa que implementa dichos algoritmos dinámicos, calcula en primer lugar o determina de otro modo un conjunto de características generales a diversos niveles, incluyendo a nivel del portaobjetos, a nivel de núcleo de una matriz tisular o TMA (por sus siglas en inglés), a nivel de campo, y a nivel celular. Dichas características generales pueden ser referenciadas, definiendo de ese modo diferentes "variables" que pueden combinarse de diversas formas unas con otras utilizando, por ejemplo, operaciones matemáticas estándar, para formar características de un nivel más elevado, o para definir funciones. Como tal, en el periodo de ejecución del análisis, la aplicación cargaría la lista de características referenciadas y las fórmulas aplicables. Cuando se necesita una fórmula en el análisis, esa fórmula se evalúa dinámicamente y las características referenciadas se utilizan para modificar la fórmula como sea necesario. Si una fórmula es recalculada con frecuencia, o es suficientemente compleja, dicha fórmula o parte de la misma puede ser pre-compilada para acelerar la ejecución.

25 Dicho método permite de ese modo que el conjunto de algoritmos o procedimientos implementados por la aplicación a ser actualizada, añadida o modificada de otro modo, en el campo, sin requerir ninguna modificación externa al software. Como tal, la aplicación proporciona flexibilidad a los usuarios, ya que puede crearse una nueva funcionalidad, según sea necesario y/o se desee, sin requerir ningún desarrollo de software externo complejo. Tales funciones pueden, por ejemplo, generar puntuaciones numéricas para los portaobjetos, núcleos, campos o células. Además, o de forma alternativa, tales funciones pueden proporcionar capacidad de filtrado. Como un ejemplo de aplicación de tales funciones, un usuario puede definir una función que puede calcular un porcentaje positivo, según se describe anteriormente, en donde las fórmulas dinámicas pueden también utilizarse para definir una función que permite una visualización para resaltar células, campos o núcleos "positivos". Dichas fórmulas dinámicas pueden también utilizarse, por ejemplo, para definir rangos para valores normales previstos, o celdas designadas como '0', '1+', '2+', etc.

35 Diversas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones expuestas en la presente memoria vendrán a la mente del experto en el arte al que estas invenciones pertenecen, con el beneficio de los contenidos presentados en las descripciones anteriores y en los dibujos asociados. Por lo tanto, ha de entenderse que se prevé que las invenciones y otras realizaciones estén incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se utilizan términos específicos en la presente memoria, estos se utilizan en sentido genérico y descriptivo únicamente y no con propósitos de limitación.

40

REIVINDICACIONES

1. Método de separación de cromógenos para una imagen de una muestra biológica teñida con cuatro colorantes obtenidos con un dispositivo de toma de imágenes de tres canales, donde el método comprende:

5 definir, a partir de un conocimiento *a priori*, tres combinaciones de colorantes de tres de cuatro colorantes que están situados espacialmente en la muestra biológica;

obtener una imagen de una muestra teñida con cuatro colorantes con un dispositivo de toma de imágenes con un canal rojo, verde y azul, donde la imagen por lo tanto incluye una pluralidad de píxeles, cada uno de ellos con un triplete RGB correspondiente;

10 proyectar los coeficientes de extinción de cada colorante, en cada uno de los canales rojo, verde y azul del dispositivo de toma de imágenes, en un plano de coeficiente de extinción incluido en un plano equivalente de Maxwell, donde el plano del coeficiente de extinción está definido por los componentes del coeficiente de extinción E_{CR} , E_{CG} y E_{CB} , donde $E_{CR}+E_{CG}+E_{CB}=1$, de tal manera que las combinaciones de los tres colorantes conocidos *a priori* están representados por un triángulo cuyos vértices corresponden a localizaciones en el plano del coeficiente de extinción de los respectivos tres de cuatro colorantes;

15 proyectar cada triplete RGB en el plano del coeficiente de extinción para determinar una localización correspondiente en el plano del coeficiente de extinción y la correspondiente combinación de tres colorantes de los tres de cuatro colorantes asociados con la misma, determinando qué triángulo asociado con una combinación de colorantes rodea la localización del triplete RGB o qué triángulo asociado con una combinación de colorante está más cercano a la localización del triplete RGB; y

20 separar la imagen de la muestra determinando los píxeles en la imagen correspondientes a cada combinación de tres colorantes previamente definida en el plano del coeficiente de extinción, y realizando la correspondiente separación de cromógenos de tres colorantes para esos píxeles.

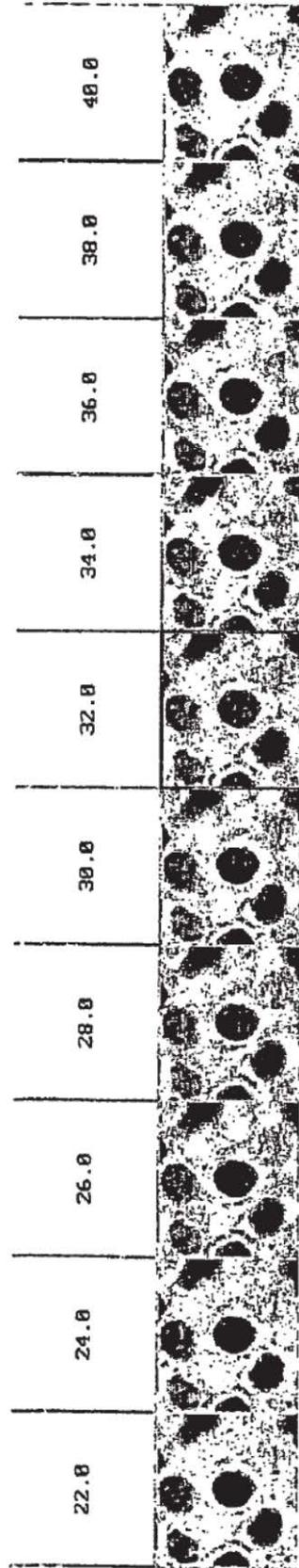


FIG. 1

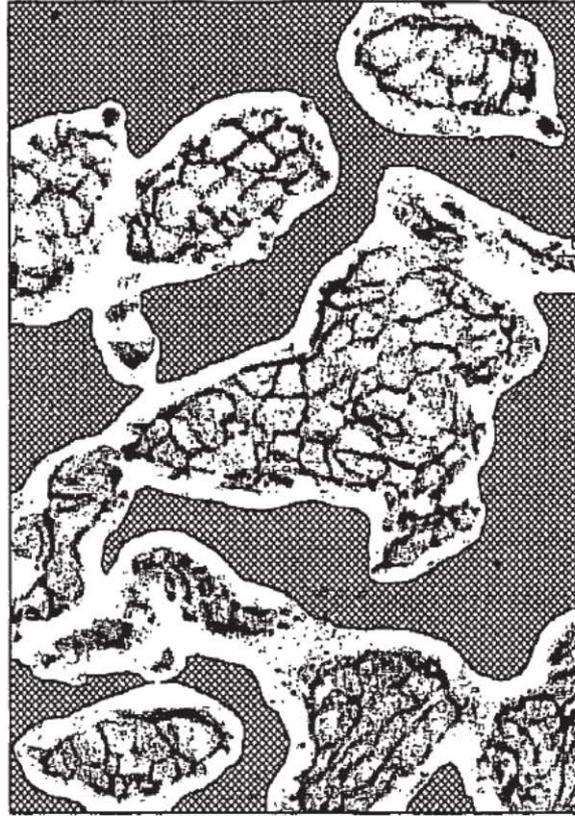


FIG. 2B

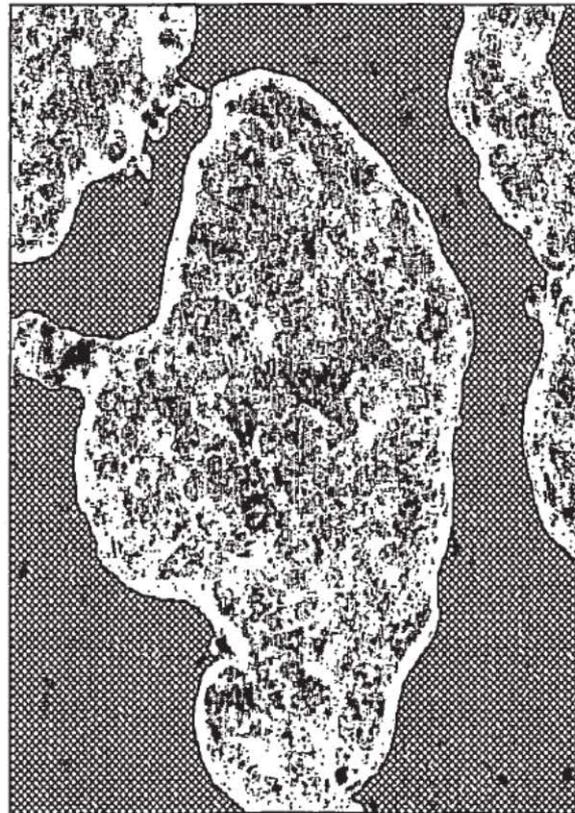


FIG. 2A

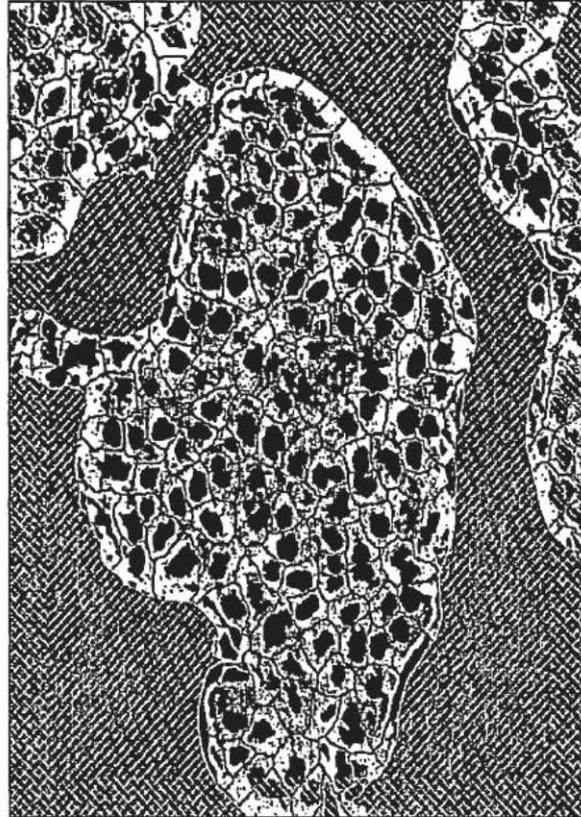


FIG. 3A2

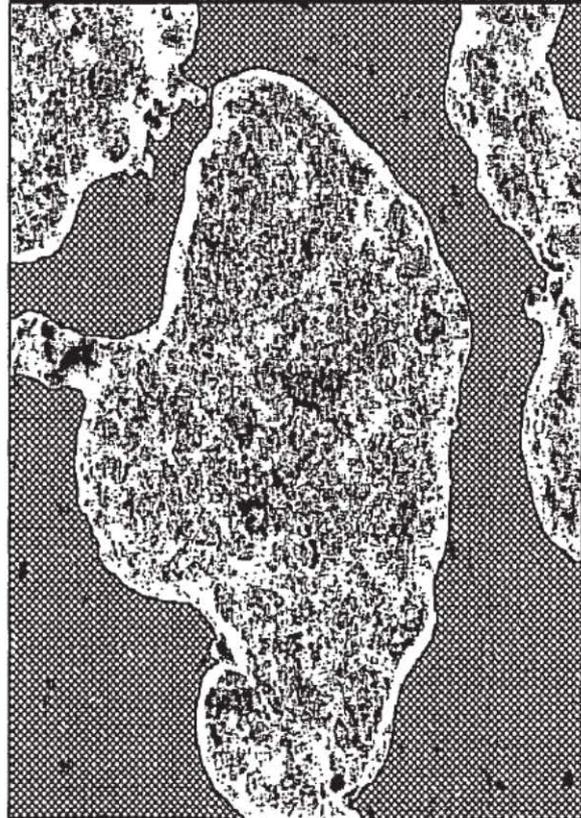


FIG. 3A1

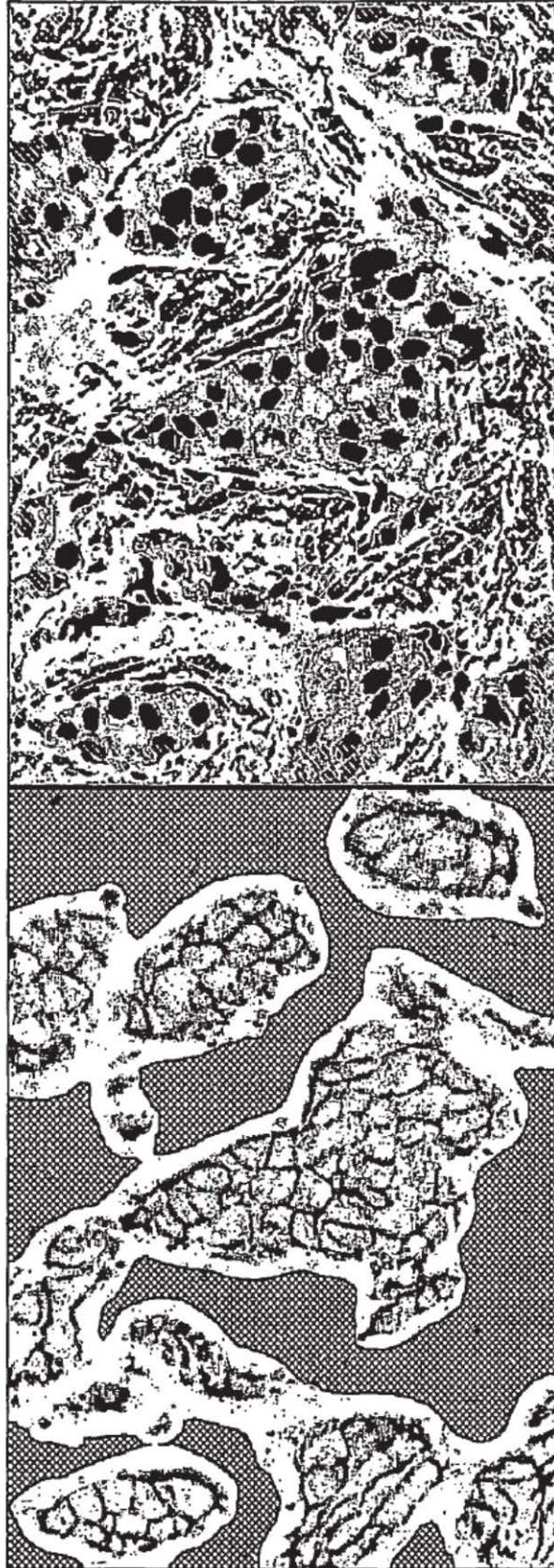


FIG. 3B2

FIG. 3B1

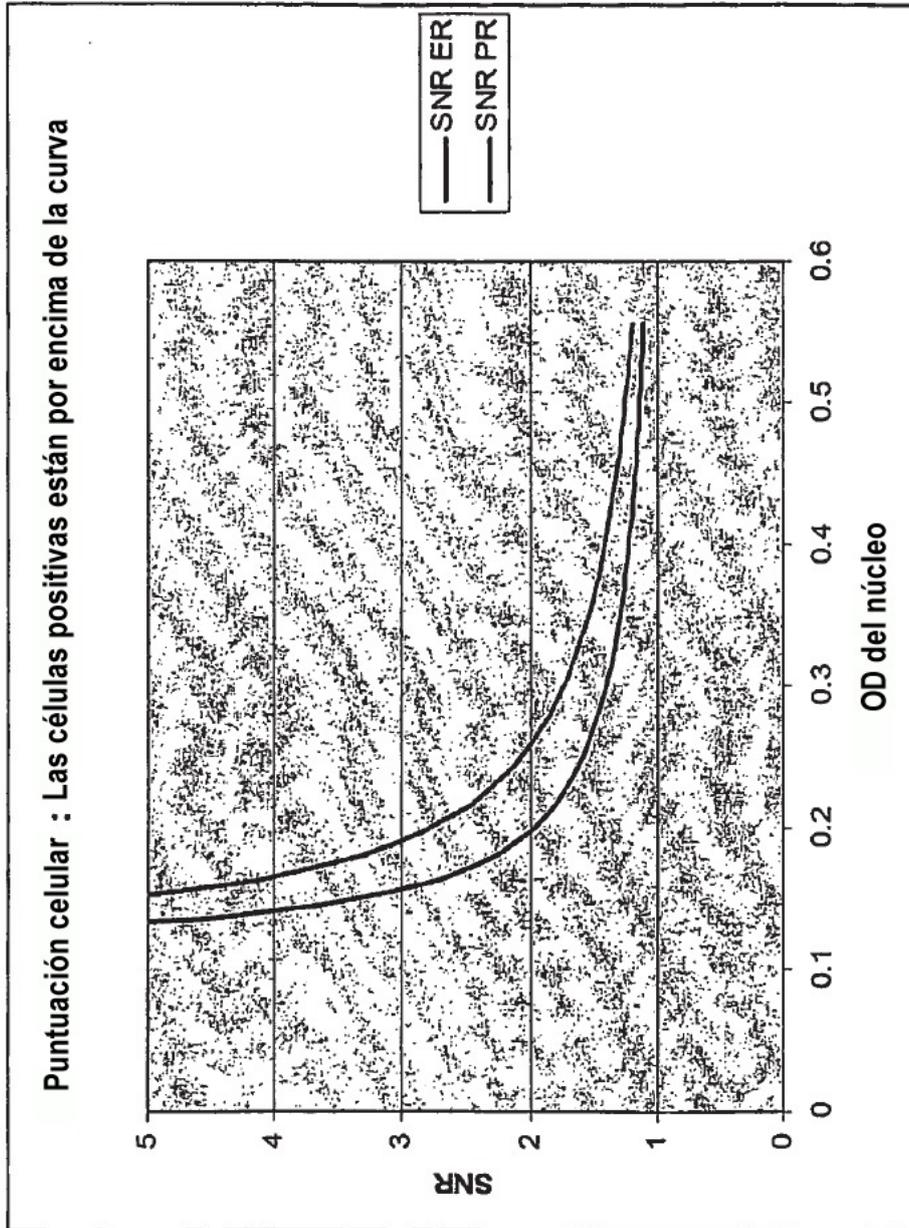


FIG. 4

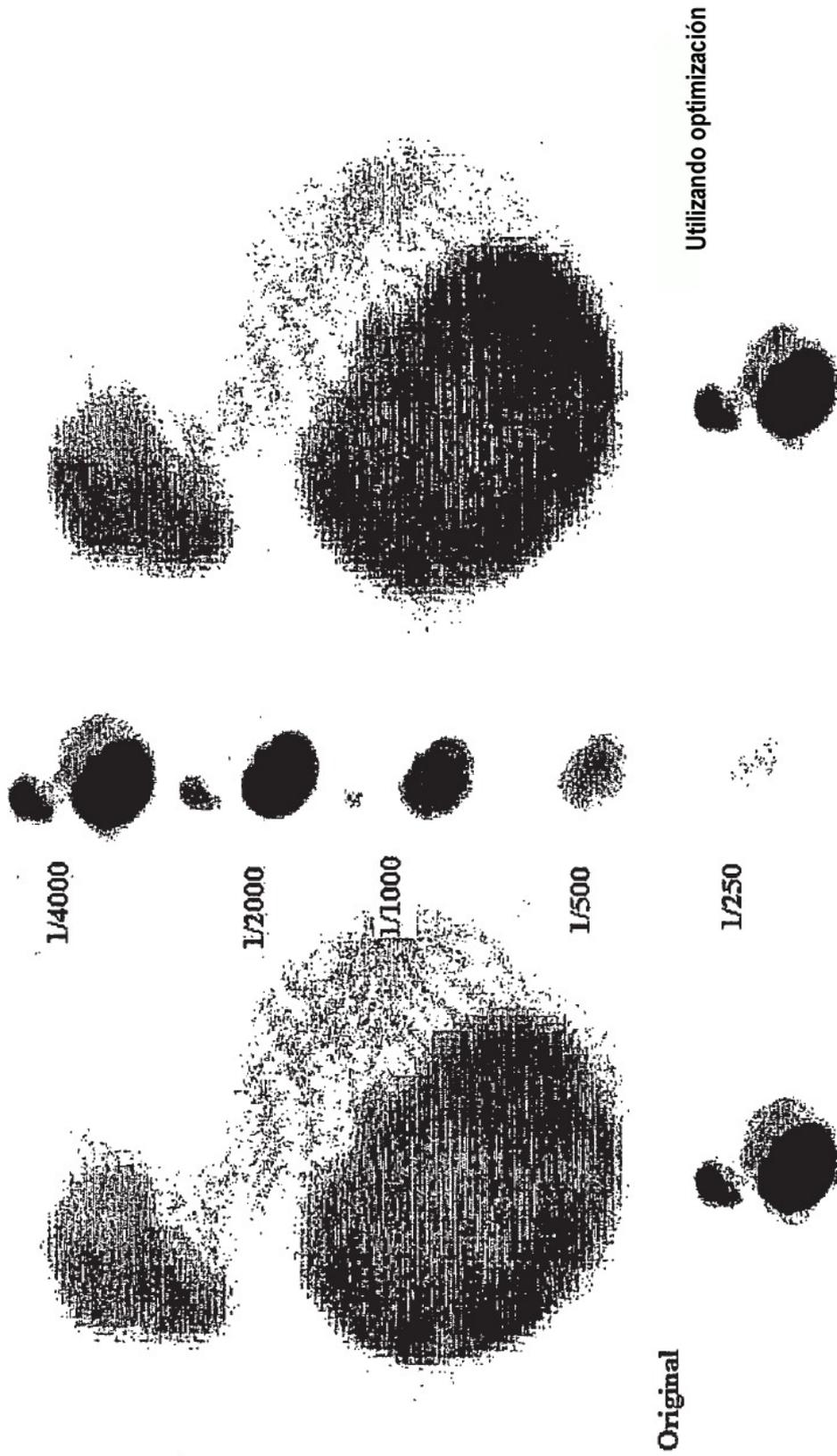


FIG. 5A

1/Tiempo de integración	R	G	B	Tiempo de integración	Odr	Odg	Odb
4000	16	7	11	0.00025	1.20242	1.561442	1.365147
2000	39	16	22	0.0005	1.116506	1.50345	1.365147
1000	80	36	53	0.001	1.10551	1.452298	1.284324
500	163	75	114	0.002	1.097443	1.434569	1.252725
250	255	157	237	0.004	1.097443	1.414761	1.235912
100	255	255	255	0.01	1.097443	1.414761	1.235912

FIG. 5B

FIG. 6C

Edición colorante

Coeficiente Ext. rojo: 1

Coeficiente Ext. verde: 0.31

Coeficiente Ext. azul: 0.31

Nombre: Verde

Ok Cancelar

FIG. 6A

Edición colorante

Coeficiente Ext. rojo: 1

Coeficiente Ext. verde: 0.788

Coeficiente Ext. azul: 0.385

Nombre: Hematoxilina

Ok Cancelar

FIG. 6D

Edición colorante

Coeficiente Ext. rojo: 0.3864

Coeficiente Ext. verde: 0.684

Coeficiente Ext. azul: 1

Nombre: DAB

Ok Cancelar

FIG. 6B

Edición colorante

Coeficiente Ext. rojo: 0.13

Coeficiente Ext. verde: 1

Coeficiente Ext. azul: 0.35

Nombre: Eosina

Ok Cancelar

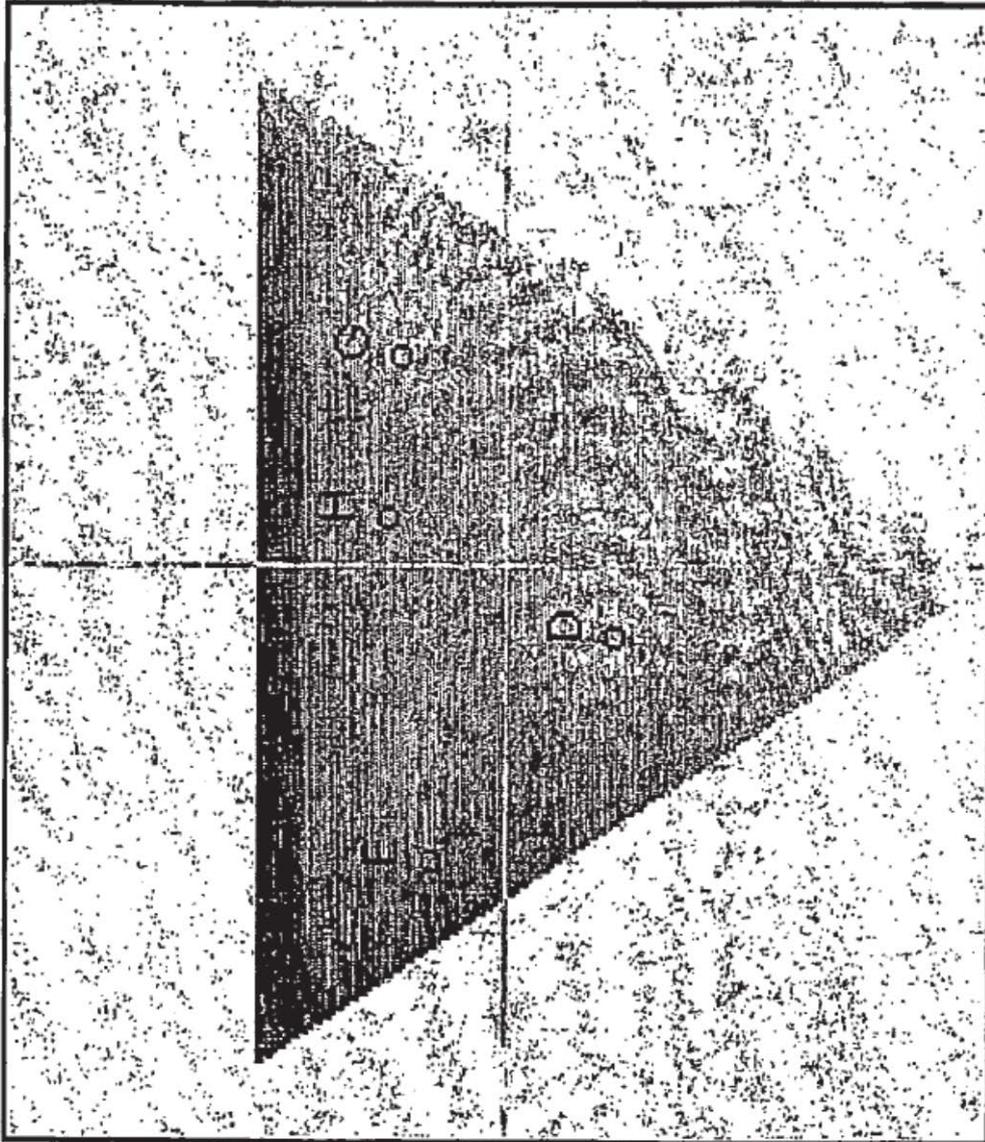


FIG. 7A

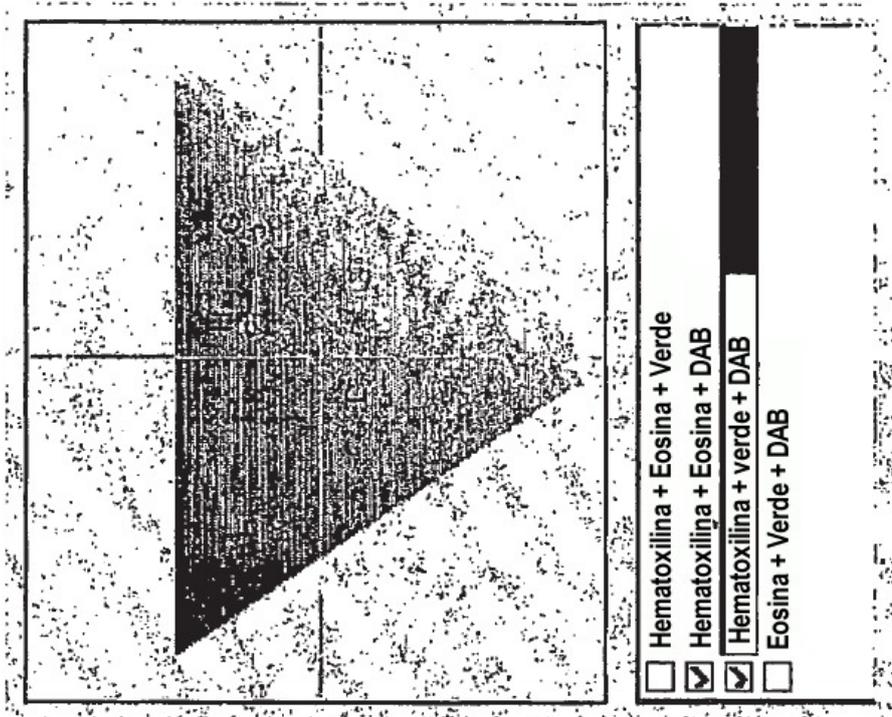


FIG. 7B2

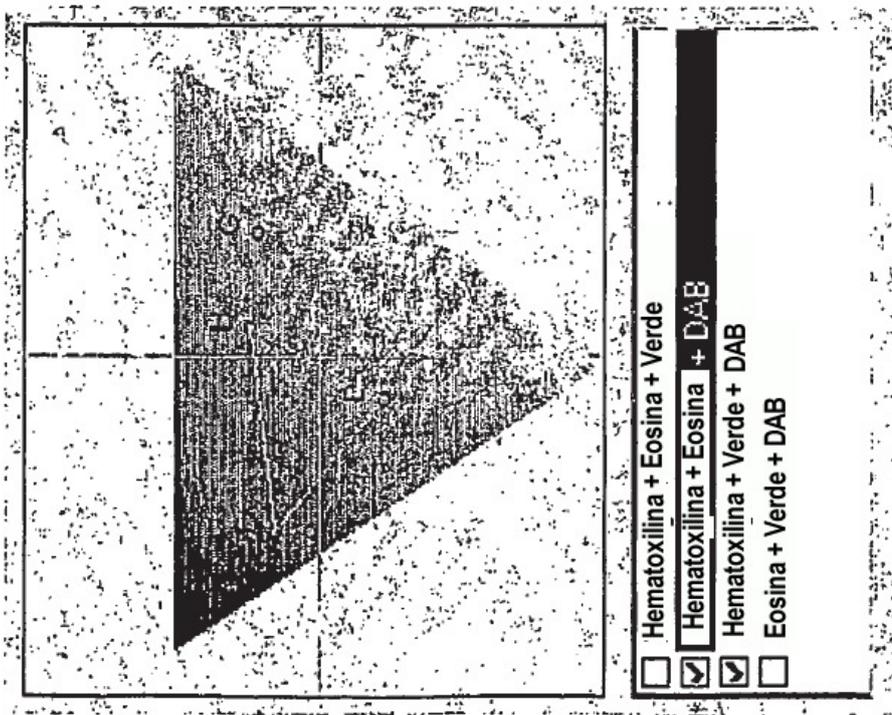


FIG. 7B1

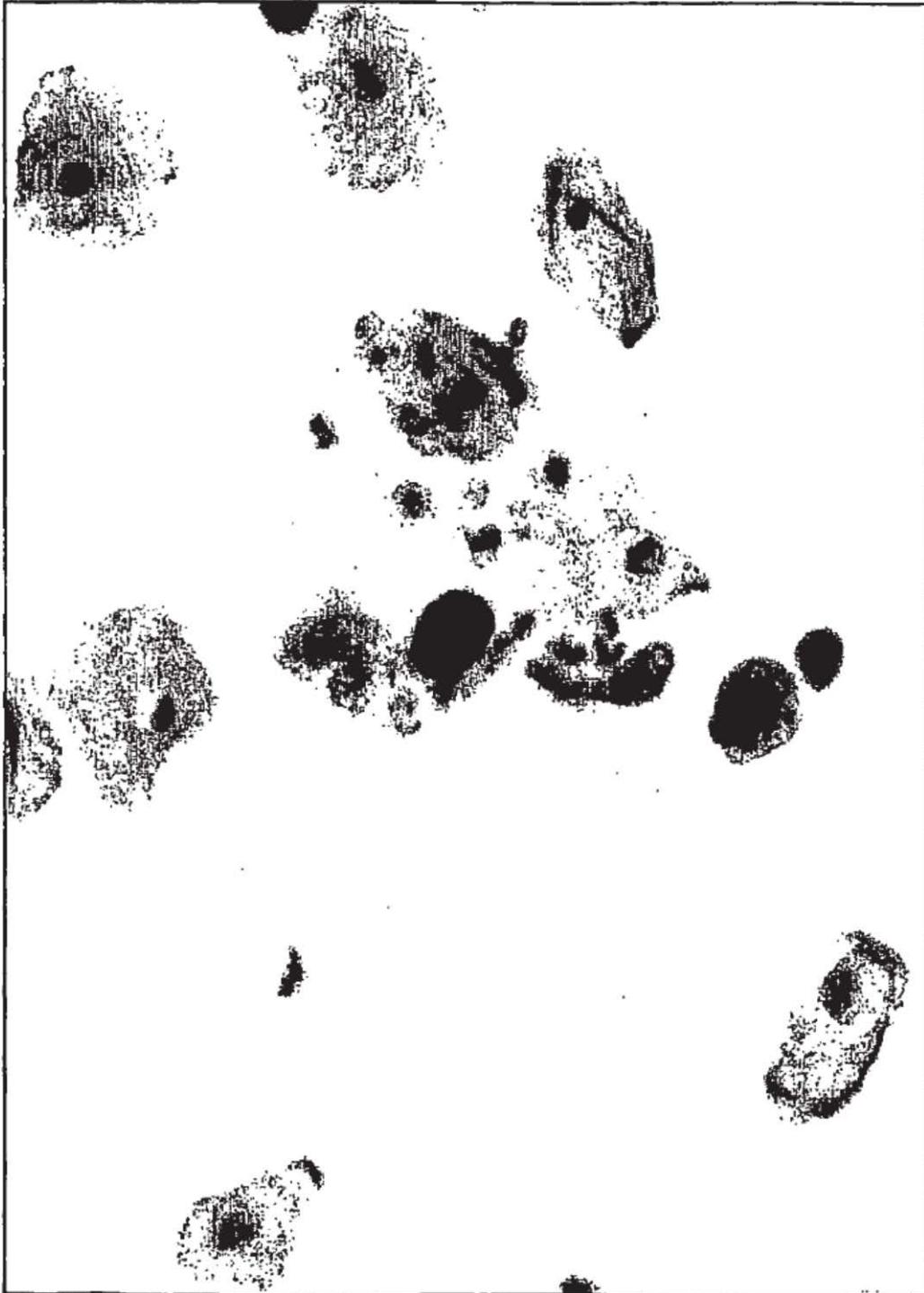


FIG. 8A

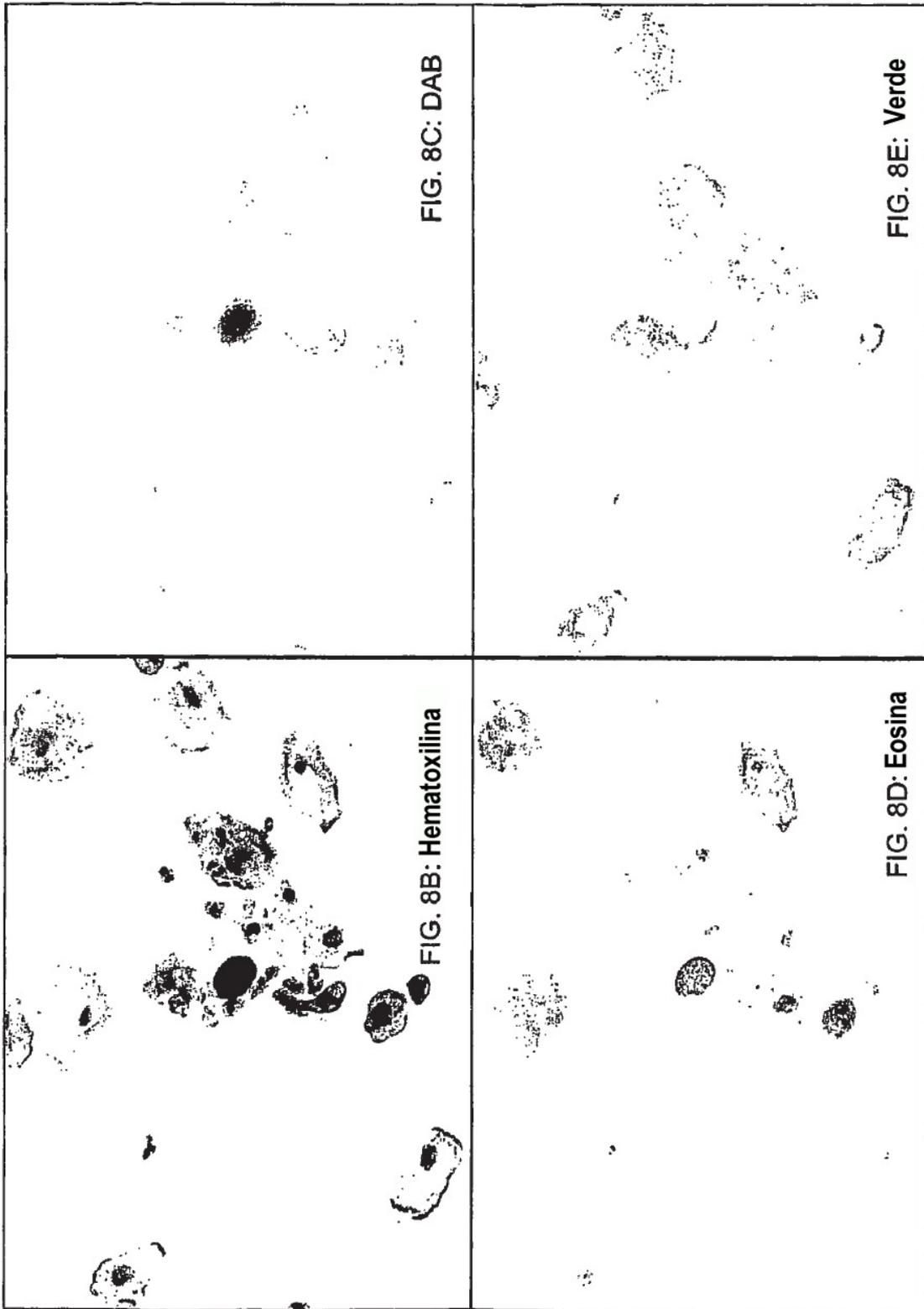




FIG. 9B



FIG. 9A

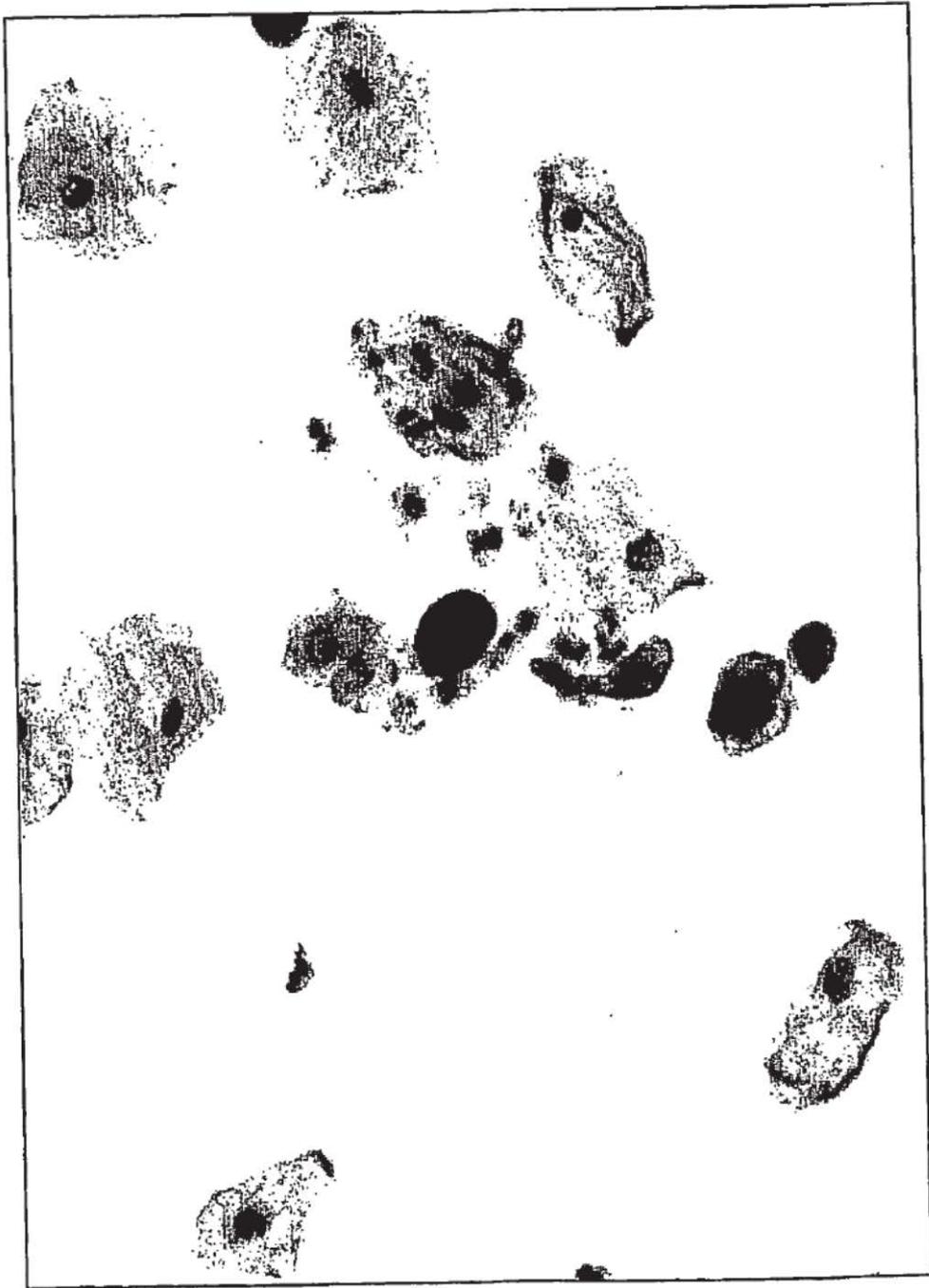


FIG. 9C