

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 925**

51 Int. Cl.:

**G06K 9/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G06T 7/00** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2012 PCT/US2012/033024**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12142090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2012 E 12718489 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2697737**

54 Título: **Método para la optimización de la videomicroscopía cuantitativa y sistema asociado**

30 Prioridad:

**12.04.2011 US 201161474520 P**

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

**21.02.2020**

73 Titular/es:

**TRIPATH IMAGING, INC. (100.0%)  
780 Plantation Drive  
Burlington, NC 27215, US**

72 Inventor/es:

**MARCELPOIL, RAPHAEL RODOLPHE y  
ORNY, CEDRICK RENE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 743 925 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 para la optimización de la videomicroscopía cuantitativa y sistema asociado

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al análisis de imágenes y, más específicamente, a un método para refinar la videomicroscopía cuantitativa en aplicaciones de biología y patología celular y un sistema asociado y un producto de programa de software informático para el mismo.

10

**Antecedentes de la invención**

El análisis efectivo de imágenes microscópicas es esencial en la biología y patología celular, específicamente para la detección y cuantificación de materiales genéticos como, por ejemplo, genes o ARN mensajero, o la expresión de esta información genética en la forma de proteínas, como por ejemplo, a través de la amplificación génica, la delección génica, la mutación génica, la cuantificación molecular de ARN mensajero o el análisis de expresión de proteínas. La amplificación genética es la presencia de demasiadas copias del mismo gen en una célula, en la que una célula contiene en general dos copias, también conocidas como alelos, del mismo gen. La delección génica indica que pueden encontrarse menos de dos copias de un gen en una célula. La mutación genética indica la presencia de genes incompletos o no funcionales. Los ARN mensajeros (ARNm) son moléculas de información genética, sintetizadas a partir de un proceso de lectura de genes, que sirven como plantillas para la síntesis de proteínas. La expresión de proteínas es la producción de una proteína dada por una célula. Si el gen que codifica la proteína dada, determinado a partir de un proceso de expresión de proteínas, se potencia o hay copias en exceso del gen o están presentes los ARNm, la proteína puede sobreexpresarse. Por el contrario, si la codificación del gen está suprimida o ausente, la proteína puede estar subexpresada o ausente.

15

20

25

Los comportamientos celulares normales están controlados con precisión por los mecanismos moleculares que implican un gran número de proteínas, ARNm y genes. Se sabe que la amplificación de genes, la delección de genes y la mutación de genes tienen un papel destacado en los comportamientos celulares anormales a través de la expresión de proteínas anormal. El intervalo de comportamientos celulares de interés incluye comportamientos tan diversos como, por ejemplo, la regulación de la proliferación o diferenciación. Por lo tanto, la detección y la cuantificación efectivas en la amplificación, delección y mutación genéticas, la cuantificación de ARNm o el análisis de expresión de proteínas son necesarias con el fin de facilitar herramientas útiles de investigación, diagnóstico y pronóstico.

30

35

Existen numerosas técnicas de laboratorio dirigidas a la detección y cuantificación en la amplificación, delección y mutación genéticas, la cuantificación del mRNA, o el análisis de expresión de proteínas. Por ejemplo, tales técnicas incluyen transferencias Western, Northern y Southern, reacciones en cadena de polimerasa ("PCR"), ensayos de inmunoseparación ligados a enzimas ("ELISA") y técnicas de hibridación genómica comparativa ("CGH"). Sin embargo, la microscopía se usa rutinariamente debido a que es una técnica informativa, que permite investigaciones rápidas a nivel celular y subcelular, mientras que puede implementarse rápidamente a un coste relativamente bajo.

40

Cuando la microscopía es la técnica de laboratorio elegida, las muestras biológicas en primer lugar deben someterse a preparaciones específicas de detección y revelación. Una vez que se preparan las muestras, un experto humano analiza en general las muestras con solo un microscopio en un estudio cualitativo, o con un microscopio acoplado a una cámara y un ordenador en un estudio cuantitativo y en general estandarizado. En algunos casos, el microscopio puede configurarse para un análisis totalmente automático, en el que el microscopio está automatizado con una etapa y un foco motorizados, unos cambiadores de objetivos motorizados, unos controles automáticos de intensidad de luz y similares.

45

50

La preparación de las muestras para la detección puede involucrar diferentes tipos de técnicas de preparación que son adecuadas para el análisis de formación de imágenes microscópicas, tales como, por ejemplo, técnicas de preparación basadas en inmunomarcaje y en hibridación. Dichas técnicas de detección pueden combinarse con técnicas de revelación apropiadas, tales como, por ejemplo, técnicas basadas en fluorescencia y en reacciones de color visible.

55

La hibridación in situ ("ISH") y la hibridación in situ fluorescente ("FISH") son técnicas de detección y revelación usadas, por ejemplo, para la detección y cuantificación en la amplificación de información genética y el análisis de mutación. Tanto ISH como FISH pueden aplicarse a muestras histológicas o citológicas. Estas técnicas usan sondas complementarias específicas para reconocer las secuencias precisas correspondientes. En función de la técnica usada, la sonda específica puede incluir un marcador químico (ISH) o un marcador fluorescente (FISH), en la que las muestras se analizan entonces usando 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, cada tipo de marcador tiene unas ventajas correspondientes sobre el otro en casos específicos.

60

65

En el análisis de expresión de proteínas pueden usarse, por ejemplo, las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") e

inmunocitoquímica ("ICC"). IHC es la aplicación de la inmunoquímica a secciones de tejido, mientras que ICC es la aplicación de la inmunoquímica a células cultivadas o improntas de tejido después de que se hayan sometido a preparaciones citológicas específicas tales como, por ejemplo, preparaciones basadas en líquido. La inmunoquímica es una familia de técnicas basadas en el uso de un anticuerpo específico, en la que los anticuerpos se usan para atacar específicamente moléculas dentro o en la superficie de las células. El anticuerpo contiene normalmente un marcador que se someterá a una reacción bioquímica y, por lo tanto, experimentará un cambio de color al encontrar las moléculas objetivo. En algunos casos, la amplificación de señal puede integrarse en el protocolo específico, en el que un anticuerpo secundario, que incluye la tintura marcadora, sigue a la aplicación de un anticuerpo específico primario.

En ambos estudios de hibridación e inmunomarcaje, se usan cromógenos de diferentes colores para distinguir entre los diferentes marcadores. Sin embargo, el número máximo de marcadores que pueden usarse en un estudio está restringido por varios factores. Por ejemplo, la superposición espectral de los colores usados para revelar los marcadores respectivos puede ser un factor limitante debido a que los colorantes pueden absorberse a lo largo de una gran parte del espectro visible. En consecuencia, cuanto mayor sea el número de colorantes involucrados en un estudio, mayor será el riesgo de superposición espectral. Además, la resolución espectral del dispositivo de adquisición puede ser un factor limitante y debe considerarse el mínimo cambio de color que el dispositivo es capaz de detectar.

Además, la inmunoquímica, así como la química en ISH, se consideran en general para mostrar una sensibilidad pobre cuando debe conseguirse la cuantificación de un marcador. Sin embargo, la precisión de cuantificación de estas técnicas puede depender de varios factores. Por ejemplo, el tipo de reacción usada puede desempeñar un papel en la precisión de la técnica, ya que la linealidad de la relación entre la concentración de ligando y el grado de la reacción de tinción inmunocitoquímica puede depender en gran medida del tipo de reacción. Más específicamente, por ejemplo, un método de peroxidasa/anti-peroxidasa puede ser más lineal que un método de biotina-avidina. La localización celular de los marcadores también puede afectar a la precisión cuando, por ejemplo, si la membrana y los marcadores nucleares se superponen espacialmente, el color resultante es una mezcla de los colores respectivos. En consecuencia, ya que la cuantificación correspondiente es subjetiva, la precisión de la determinación puede verse afectada. Además, puede requerirse un estándar de calibración tal como, por ejemplo, células con características conocidas, geles con concentraciones dadas del marcador, o similares, cuando se aplica un modelo de análisis desarrollado a un caso nuevo y diferente. En general, hay disponibles kits de tinción que incorporan estándares de calibración. Sin embargo, el estándar de calibración solo se aplica en general a una muestra específica, tal como una célula específica o una estructura de un tipo específico que se sabe que muestra características constantes con respecto al estándar, y puede ser de utilidad limitada cuando se aplica a una muestra de una naturaleza diferente.

En general, los estudios "colorimétricos" descritos presentan información de análisis de muestra en color y facilitan el procesamiento y la cuantificación de la información para ayudar de este modo a proporcionar un diagnóstico o para formar un pronóstico del caso específico. Por ejemplo, la detección y la cuantificación de la expresión de proteína HER2 y/o la amplificación génica pueden evaluarse mediante diferentes enfoques usados en la microscopía cuantitativa. HER2 es una proteína de membrana que ha demostrado tener una importancia diagnóstica y pronóstica en el cáncer de mama metastásico. Debido a que se demostró que las pacientes con HER2 positivo son más sensibles a los tratamientos que incluyen Herceptin® (un tratamiento objetivo desarrollado por Genentech), se ha demostrado que la definición del estado HER2 de los cánceres de mama metastásicos es de primera importancia en la elección del protocolo de tratamiento apropiado. Esta definición del estado de HER2 se basó en un estudio de muestras tratadas con, o bien técnicas de hibridación (FISH, ISH) o de inmunomarcaje (IHC).

En tales estudios, usando FISH con, por ejemplo, un kit aprobado por la FDA, tal como PathVysion® producido por Vysis, requiere un protocolo de análisis de imágenes para contar el número de copias del gen HER2 presente en cada célula. En un caso normal, se encuentran dos copias del gen en cada célula, mientras que más de tres copias del gen en una célula indican que el gen está amplificado. Como alternativa, el uso de IHC con, por ejemplo, un kit aprobado por la FDA tal como Herceptest® producido por Dako, requiere un protocolo de análisis de imágenes que clasifique los casos en cuatro categorías en función de la intensidad y la localización de la tinción de membrana específica de HER2. Los estudios actuales tienden a mostrar que estas dos técnicas de investigación (hibridación e inmunomarcaje) pueden ser complementarias y pueden ayudar a los patólogos en el diagnóstico de subtipos de tumores cuando se combinan.

Sin embargo, tales estudios de colorimetría requieren un amplio control de preparación y procedimiento de muestras. Por lo tanto, cuando se desechan protocolos de tinción adaptados, es fundamental poder verificar que la tinción de cada muestra coincida con el modelo específico usado en el dispositivo de adquisición y procesamiento de imágenes de tal manera que se obtengan resultados útiles y precisos a partir de la información recopilada. De lo contrario, el análisis puede tener que repetirse, comenzando nuevamente desde la etapa de preparación de la muestra, resultando posiblemente de este modo en un proceso costoso y lento.

En un dispositivo de microscopía típico basado en la adquisición y procesamiento de imágenes, la imagen ampliada de la muestra debe, en primer lugar, capturarse y digitalizarse con una cámara. En general, las cámaras digitales

con dispositivo de carga acoplado (CCD) se usan en microscopía cuantitativa de luz o fluorescencia. Excluyendo los espectrofotómetros, en general se usan dos técnicas diferentes para realizar tales estudios de microscopía colorimétrica. En una técnica, puede usarse una cámara CCD en blanco y negro (BW). En tal caso, se obtiene una imagen de nivel de gris de la muestra, correspondiente a una luz monocromática que tiene una longitud de onda específica para la tinción de la muestra a analizar. La longitud de onda específica de la luz se obtiene o bien filtrando una fuente de luz blanca a través de un filtro de ancho de banda estrecho específico, o controlando directamente la longitud de onda de la fuente de luz, usando o bien controles manuales o electrónicos. Las imágenes de la muestra, que muestran la respuesta espectral de la muestra a diferentes longitudes de onda, se capturan individualmente en orden secuencial para facilitar el análisis. Cuando se analizan múltiples escenas o campos de visión, el protocolo típico es automatizar la secuencia en un modo por lotes para conservar el tiempo de procesamiento.

De acuerdo con una segunda técnica, se usa una cámara digital CCD en color, en la que se capturan y se obtienen simultáneamente tres imágenes de niveles de gris de la muestra. Cada imagen de nivel de gris corresponde al canal Rojo, Verde y Azul (RGB) respectivo de la cámara CCD en color. A continuación, las imágenes se analizan directamente en el espacio de color RGB restringiendo el análisis a los píxeles localizados en una región específica del cubo RGB, incluyendo también la región específica los píxeles de una base de datos de entrenamiento correspondiente. Como alternativa, las imágenes se analizan, después de la transformación matemática del espacio de color RGB, en uno de los muchos espacios de color definidos por la CIE (comisión internacional de iluminación), tal como, por ejemplo, un espacio HLS (matiz, luminancia o saturación). Como alternativa, algunos fabricantes de cámaras producen cámaras CCD específicas, en las que los filtros de ancho de banda estrecho para apuntar a longitudes de onda específicas pueden reemplazar los filtros rojos, verdes y azules habituales. En tal caso, la cámara permite una captura de imagen rápida de los tres componentes espectrales de una escena de manera paralela. Sin embargo, las cámaras modificadas de esta manera pueden estar restringidas a parámetros específicos de análisis espectral debido a que los filtros no pueden cambiarse y, por lo tanto, no pueden adaptarse para abordar una combinación de colorante única usada para la muestra. Por lo tanto, la segunda técnica se basa en general en la detección del contraste entre la especie/especie de interés y el resto de la muestra o el análisis de la muestra a lo largo de un ancho de banda estrecho.

En consecuencia, las técnicas usadas en los análisis colorimétricos de muestras preparadas son de uso limitado en la detección y cuantificación de las especies de interés, debido a varios factores tales como, por ejemplo, la superposición espectral, la mezcla de colores debida a la superposición espacial de la membrana, los marcadores citoplásmicos y nucleares, las aberraciones cromáticas en la trayectoria óptica, la resolución espectral limitada del dispositivo de adquisición, las particularidades de calibración, la subjetividad del proceso de detección y cuantificación y las inconsistencias entre los operadores humanos. La parte de procesamiento de imágenes de las técnicas de análisis colorimétrico se ha dirigido históricamente a la detección subjetiva del contraste dentro de la muestra preparada o a un análisis complejo y voluminoso de la muestra en diversas longitudes de onda específicas de luz usando una combinación de fuentes y filtros de luz. Ejemplos de los mismos se desvelan en el documento WO 02/097716 A1, Robust Stain Detection and Quantification for Histological Specimens based on a Physical Model for Stain Absorption, y en el documento WO 03/025554 A2, Method [for] Quantitative Video-Microscopy and Associated System and Computer Program Product. Por lo tanto, existe la necesidad de un refinamiento de las técnicas de análisis colorimétrico que supere las limitaciones de detección y cuantificación encontradas en las técnicas de análisis de la técnica anterior. Un refinamiento de este tipo también debería ser capaz de proporcionar datos de alta calidad, que comprendan la información de análisis necesaria sobre la muestra, al tiempo que reducen la subjetividad y la inconsistencia en el análisis de la muestra.

## Sumario de la invención

Las necesidades anteriores y otras se satisfacen mediante la presente invención que, en una realización, proporciona un método para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante tal como se describe en las reivindicaciones. El método incluye, en general, adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra. Las imágenes pueden adquirirse por un dispositivo de adquisición de imágenes, tal como una cámara y/o un escáner, en un sistema de videomicroscopía. El método incluye determinar una cantidad de cada especie molecular, como se indica por un colorante respectivo, para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes y refinar la cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una o más localizaciones de píxel en la pluralidad de imágenes como se describe en las reivindicaciones.

La cantidad de cada especie molecular puede determinarse usando una técnica de separación de cromógenos. Una técnica de este tipo incluye determinar una densidad óptica de la muestra en cada píxel en cada localización de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes. Después se forma una matriz de densidad óptica correspondiente para ese píxel y se multiplica por la inversa de una matriz de coeficientes de absorción relativa con el fin de formar una matriz resultante para el píxel. La matriz de coeficientes de absorción relativa comprende un coeficiente de absorción relativa para cada colorante, independientemente de la muestra, en cada una de las longitudes de onda. La matriz resultante comprende, por lo tanto, una cantidad no refinada de cada especie molecular, como se indica por el colorante respectivo para ese píxel.

El método proporciona además, refinar la cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una o más localizaciones de píxel. De acuerdo con un aspecto, refinar puede incluir determinar cada especie molecular que comprende una concentración significativa y refinar la concentración para una pluralidad de especies moleculares que tienen una concentración significativa en una o más localizaciones de píxel. El refinamiento de la cantidad de una pluralidad de especies moleculares puede incluir además determinar un número de subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda y probar cada uno de los subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda de acuerdo con un factor de optimización. Cada subconjunto de combinaciones de filtros de longitud de onda puede incluir una cantidad de filtros de longitud de onda igual al número de concentraciones de colorante que están presentes en la muestra en una concentración significativa.

Probar cada uno de los subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda comprende multiplicar un hipervolumen de una matriz de coeficientes de absorción y un hipervolumen de una transpuesta de la matriz de coeficientes de absorción que es específica para un subconjunto específico de combinaciones de filtros de longitud de onda. La multiplicación de los hipervolumenes comprende multiplicar un determinante de Cayley-Menger de una matriz de coeficientes de absorción y un determinante de Cayley-Menger de una transpuesta de la matriz de coeficientes de absorción que es específica de un subconjunto específico de combinaciones de filtros de longitud de onda. El subconjunto de filtros de longitud de onda que produce el producto máximo comprende la combinación de filtros de longitud de onda óptima. Por consiguiente, el método puede incluir además determinar una matriz de densidad óptica optimizada para cada localización de píxel, determinar una matriz de coeficientes de absorción relativa optimizada y multiplicar la matriz de densidad óptica optimizada por una inversa de la matriz de coeficientes de absorción relativa optimizada con el fin de formar una matriz resultante que comprende las concentraciones de colorante optimizadas para cada localización de píxel, comprendiendo las concentraciones de colorante optimizadas la cantidad de cada especie molecular, como se indica por el colorante respectivo.

La presente invención comprende un sistema de videomicroscopía para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante, a partir de una pluralidad de imágenes de la muestra, como se describe en las reivindicaciones. El sistema comprende un dispositivo de adquisición de imágenes configurado para capturar una pluralidad de imágenes digitales ampliadas de la muestra y un dispositivo procesador en comunicación con el dispositivo de adquisición de imágenes. El dispositivo procesador puede configurarse para determinar una cantidad de cada especie molecular, como se indica por un colorante respectivo, para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes y refinar la cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una o más localizaciones de píxel en la pluralidad de imágenes. De acuerdo con un aspecto, el dispositivo de adquisición de imágenes puede incluir una pluralidad de filtros en el que cada filtro corresponde a una longitud de onda de luz específica.

El dispositivo procesador está configurado para determinar una densidad óptica de la muestra en cada una de una pluralidad de longitudes de onda y para un píxel en la imagen, con el fin de formar una matriz de densidad óptica correspondiente para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente. El dispositivo procesador está configurado para determinar una matriz de coeficientes de absorción relativa para el colorante que indica cada especie molecular, independientemente de la muestra y en cada una de la pluralidad de longitudes de onda, con el fin de formar una matriz de coeficientes de absorción relativa correspondiente. Además, el dispositivo procesador está configurado para multiplicar la matriz de densidad óptica por una inversa de la matriz de coeficientes de absorción relativa con el fin de formar una matriz de concentración de colorante para cada localización de píxel. El dispositivo procesador está configurado además para determinar un número de subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda, probar cada subconjunto de combinaciones de filtros de longitud de onda y determinar una combinación de filtros de longitud de onda óptima.

El dispositivo procesador está configurado para determinar un hipervolumen de un coeficiente de matriz de absorción específica para una combinación específica de filtros de longitud de onda y determinar un hipervolumen de una transpuesta de la matriz de coeficientes de absorción específica para una combinación de filtros de longitud de onda específica. Además, el dispositivo procesador está configurado para determinar los determinantes de Cayley-Menger de la una matriz de coeficientes de absorción y una transpuesta de la matriz de coeficientes de absorción. Además, el dispositivo procesador está configurado para maximizar el producto de los determinantes de Cayley-Menger de la matriz de coeficientes de absorción y la transpuesta de la matriz de coeficientes de absorción.

Otro aspecto ventajoso más de la presente invención comprende un producto de programa de software informático configurado para ejecutarse en un dispositivo informático para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante tal como se describe por las reivindicaciones. El producto de programa informático comprende una parte ejecutable para adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra, una parte ejecutable para determinar una cantidad de cada especie molecular, como se indica por un colorante respectivo, para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes, y una parte ejecutable para refinar la cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una o más localizaciones de píxel en la pluralidad de imágenes.

Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención comprenden una técnica de análisis colorimétrico refinado para muestras preparadas que pueden proporcionar la detección y cuantificación eficaces de las especies de interés

que supera los factores limitativos de las tecnologías de la técnica anterior, tales como errores en las estimaciones de concentración de colorante debido a las fluctuaciones de ruido y/o ruido global. Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar además estimaciones más precisas de las concentraciones de colorante de cada localización de píxel correspondiente de la pluralidad de imágenes de la muestra con el fin de optimizar las cantidades de esas especies moleculares indicadas en las imágenes.

### Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito así la invención en términos generales, se hará referencia ahora a los dibujos adjuntos, que no están necesariamente dibujados a escala, y en los que:

la figura 1 es una representación esquemática general de un sistema de videomicroscopía cuantitativa de acuerdo con una realización de la presente invención;

la figura 2 es un diagrama de flujo para determinar una cantidad refinada de una pluralidad de especies moleculares en una muestra de acuerdo con una realización de la presente invención; y

la figura 3 es un diagrama de flujo para determinar una cantidad refinada de una pluralidad de especies moleculares en una muestra de acuerdo con una realización de la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora más completamente en lo sucesivo en el presente documento haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran las realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, esta invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debería interpretarse como limitada a las realizaciones establecidas en el presente documento; más bien, estas realizaciones se proporcionan de tal manera que esta divulgación sea exhaustiva y completa, y transmitirá completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia. Los números iguales se refieren a elementos similares en todas partes.

Las realizaciones de la presente invención se dirigen, en general, a sistemas y métodos para determinar y refinar la cantidad (por ejemplo, la concentración) de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando la especie molecular indicada por un colorante, como se muestra en la figura 3. La cantidad de la especie molecular se determina analizando imágenes de la muestra que se capturan usando un dispositivo de adquisición de imágenes 10, tal como una cámara o un escáner, en un sistema de videomicroscopía. De acuerdo con una realización de la invención, el sistema puede configurarse con el fin de que sea capaz de detectar uno o más colorantes específicos, correspondiendo cada colorante a una firma espectral específica, con el fin de determinar la cantidad de una especie molecular en cada píxel en cada localización de píxel en las imágenes 11. En una realización, los colorantes que se determinan para estar en cantidades significativas en una o más localizaciones de píxel se refinan con el fin de optimizar la cantidad de aquellas especies moleculares que tienen una concentración significativa en la muestra 12. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar ventajas sobre la técnica anterior, tales como reducir los errores en las estimaciones de las estimaciones de concentración de colorante debido a la fluctuación de ruido.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el análisis de la muestra puede usarse para cuantificar la tinción de melastatina en ambos núcleos de melanocitos normales (melanocitos de la capa basal de las células epiteliales), considerados como núcleos de referencia, y los núcleos de melanocitos anormales (melanocitos de focos tumorales). Los resultados de un análisis cuantitativo de este tipo indican si o bien el gen está regulado negativamente o expresado normalmente en los núcleos anormales. Sin embargo, la eficacia del análisis cuantitativo depende en gran medida de la metodología de análisis de imágenes, que debe considerar y realizar la segmentación de los núcleos de melanocitos, así como el análisis colorimétrico de los colorantes específicos usados en el protocolo.

Una pluralidad de cromógenos pueden estar presentes en una muestra histológica o citológica tal como, por ejemplo, uno o más marcadores (por ejemplo, DAB marrón o BCIP-NBT), una o más contratincciones morfológicas (por ejemplo, rojo nuclear rápido-NFR, Hematoxilina, eosina, SF verde claro, G naranja) y uno o más pigmentos naturales (por ejemplo, melanina). Todos los cromógenos se tienen en cuenta normalmente para analizar la muestra, y las realizaciones de la presente invención proporcionan técnicas para analizar la muestra dada de cada uno de los cromógenos, sobre una base por píxel, para cuantificar la cantidad de una o más especies moleculares en la muestra. Por ejemplo, la prueba citológica basada en la tinción de Papanicolaou es un procedimiento de tinción multicromática que contendría 4 colorantes diferentes: hematoxilina, G naranja, eosina Y y SF verde claro.

La plataforma para la evaluación de muestras biológicas a través del análisis de imágenes se está desplazando cada vez más desde un analizador de imagen de fin general a una "estación de trabajo de patología" dedicada más, y a menudo altamente, especializada. Dichas estaciones de trabajo suelen diseñarse para facilitar el trabajo de rutina, a menudo combinando muchas de las herramientas necesarias para proporcionar a un patólogo la información necesaria para determinar los mejores resultados posibles. Un ejemplo de una estación de trabajo de este tipo se ilustra en la figura 1 como un sistema de videomicroscopía cuantitativo, indicado por el número 100, de acuerdo con una realización de la presente invención. El sistema 100 comprende, en general, un microscopio 150

que tiene una fuente de luz 200 y un objetivo de aumento 250, una pluralidad de filtros 600, una cámara 300, un dispositivo informático 350 y un enlace de transmisión de datos 400 entre la cámara 300 y el dispositivo informático 350. El microscopio 150 puede comprender, por ejemplo, un microscopio Axioplan (o Axiovert) producido por ZEISS de Alemania o un microscopio similar que tenga una fuente de luz de campo brillante. La cámara 300 se acopla operativamente al microscopio 150 y, en una realización, comprende una cámara en blanco y negro, tal como, por ejemplo, la prosilica GE1910 de Allied Vision Technologies. Normalmente, una cámara 300 de este tipo también incluye un digitalizador de vídeo asociado (no mostrado) para facilitar la captura de imágenes, tanto la cámara 300 como el digitalizador de vídeo asociado se denominan en el presente documento "cámara 300" por conveniencia. En algunos casos, tanto la cámara 300 como el microscopio 150 pueden reemplazarse por, por ejemplo, un escáner plano lineal en blanco y negro y una fuente de iluminación controlada. Obsérvese que, aunque la presente invención contempla diferentes configuraciones del sistema necesario 100, la presente invención se describirá en el presente documento en términos de una cámara 300 y un microscopio 150 asociados. En consecuencia, un experto en la materia comprenderá y apreciará las capacidades y metodologías asociadas con estas diferentes configuraciones para realizar la presente invención como se detalla en el presente documento. Además, aunque la presente realización se desvela como una cámara, se entiende que la cámara puede ser cualquier dispositivo de adquisición de imágenes, tal como una cámara, un escáner o cualquier dispositivo configurado para capturar una pluralidad de imágenes. El sistema de adquisición de imágenes es capaz de capturar imágenes de baja y/o alta resolución con cualquier aumento deseado, diversas regiones de interés y dentro de diversos campos de visión que pueden corresponder a la totalidad o una parte de la muestra o del portaobjetos.

La cámara 300 está configurada, en general, para capturar una pluralidad de imágenes 450 de una muestra 500 a través del objetivo de aumento 250 (cuando se usa un escáner plano, la imagen 450 se captura a través de lentes internas), en el que las imágenes 450 puede comprender además una imagen digital que tiene datos de imágenes correspondientes (referidos en el presente documento conjuntamente como "la imagen 450"). De acuerdo con una realización, la muestra se coloca en un portaobjetos para su análisis mediante la cámara 300. Los filtros 600 filtran la luz de la fuente de luz 200, y durante la operación del sistema 100, se toman múltiples imágenes de la muestra 500 usando diferentes filtros, proporcionados los diferentes filtros por una rueda de filtro u otro dispositivo de filtrado como conocen los expertos en la materia. De acuerdo con una realización, cada longitud de onda corresponde a un colorante respectivo de interés que puede estar presente en las imágenes. En una realización, los filtros empleados pueden corresponder a las longitudes de onda de 460 nm, 490 nm, 520 nm, 570 nm y 630 nm. Por consiguiente, las imágenes 450 se capturan en general individualmente, correspondiendo cada imagen a una imagen filtrada de longitud de onda individual del campo de visión. El enlace de transmisión de datos 400 está configurado con el fin de ser capaz de transmitir la imagen 450 al dispositivo informático 350, estando el dispositivo informático 350 configurado además para ser capaz de analizar la imagen 450 con respecto a cada una de las longitudes de onda. Un experto en la materia apreciará que el dispositivo informático 350 puede ser cualquier tipo de dispositivo procesador o elemento de procesamiento configurado para comunicarse con el sistema de adquisición de imágenes y está configurado además para analizar una pluralidad de imágenes como se describe en el presente documento.

De acuerdo con un aspecto específicamente ventajoso de la presente invención, el sistema 100 está configurado para analizar la muestra de acuerdo con la ley de Lambert-Beer. La ley de Lambert-Beer describe en general una proporcionalidad que puede observarse entre la concentración de moléculas en una solución (la concentración de la "especie molecular" o la "muestra") y la intensidad de luz medida a través de la solución. La ley de Lambert-Beer se expresa normalmente como:

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

donde **OD** es la densidad óptica de la solución,  $\varepsilon$  es una constante de proporcionalidad llamada coeficiente de extinción o absorción molar, **l** es el espesor de la muestra y **C** es la concentración de la especie molecular. El coeficiente de absorción  $\varepsilon$  es específico de la especie molecular y normalmente se expresa en unidades de  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

Esta relación de proporcionalidad definida por la ley de Lambert-Beer se ha verificado bajo las varias condiciones, incluyendo, por ejemplo, la luz monocromática que ilumina la muestra, la concentración molecular baja dentro de la muestra, en general no fluorescencia o heterogeneidad de respuesta luminosa (fluorescencia y difusión despreciables) de la muestra, y la falta de fotosensibilidad química de la muestra. Además, otro requisito para un análisis de acuerdo con la ley de Lambert-Beer incluye, por ejemplo, la correcta iluminación de Kohler de la muestra bajo el microscopio. La iluminación de Kohler está disponible con muchos microscopios modernos, lo que proporciona una iluminación uniforme de la muestra en el plano de la imagen y permite un control de contraste efectivo. La iluminación de Kohler es crítica para ciertos procesos tales como, por ejemplo, el análisis de densitometría. La iluminación de Kohler correcta se proporciona normalmente, por ejemplo, mediante un sistema de iluminación de dos etapas para el microscopio en el que se genera la imagen en la abertura del condensador de subetapa mediante un condensador auxiliar. El condensador de subetapa, a su vez, forma una imagen del condensador auxiliar en el objeto. También puede colocarse un diafragma de iris en cada condensador, en el que el primer iris controla el área del objeto a iluminar, y el segundo iris varía la apertura numérica del haz de iluminación.

La ley de Lambert-Beer tiene una propiedad aditiva de tal manera que, si la muestra comprende varias especies moleculares que absorben la luz, por ejemplo,  $s_1$  y  $s_2$ , que tienen unas concentraciones respectivas  $C_1$  y  $C_2$ , la OD de una muestra de espesor  $l$  (donde  $l_1 = l_2 = l$  para la muestra, como se indica en la solución en lo sucesivo en el presente documento) puede expresarse como:

$$OD = \varepsilon_1 \cdot l_1 \cdot C_1 + \varepsilon_2 \cdot l_2 \cdot C_2 \quad (2)$$

Esta situación puede producirse, por ejemplo, en un análisis biológico en el que una "escena", un campo de visión o una parte de la muestra se ha teñido con dos colorantes que consisten en un colorante marcador para apuntar a la especie molecular de interés y una contratincción para teñir el resto de la muestra.

Con el fin de medir con precisión la concentración de las especies dadas captadas bajo un microscopio, las medidas de las densidades ópticas realizadas a diferentes longitudes de onda deben corresponder específicamente a la parte observada de la muestra. Es decir, el sistema de microscopía debe corregirse por la aberración cromática, en la que una corrección o compensación de este tipo puede lograrse mediante hardware, software o una combinación de software y hardware. En general, el vidrio tiende a dispersar la luz, lo que en general provoca que, por ejemplo, una lente de vidrio simple enfoque la luz azul a una distancia más corta que la luz roja. Es decir, una lente de vidrio simple mostrará diferentes distancias focales para la luz que comprende diferentes longitudes de onda. Esta dispersión característica del vidrio da lugar a dos efectos observados. En primer lugar, se observa la aberración cromática longitudinal, o la diferencia posicional de los puntos focales para diferentes longitudes de onda de luz a lo largo del eje vertical, donde, al enfocar la imagen para longitudes de onda de luz seleccionadas correspondientes a un color específico, la imagen tenderá a estar ligeramente fuera de foco cuando se ve bajo longitudes de onda de luz correspondientes a otros colores. Por ejemplo, si la imagen está enfocada para una longitud de onda de luz específica, la misma imagen tenderá a estar desenfocada cuando se vea bajo filtros para una longitud de onda de luz más corta o más larga. En segundo lugar, la aberración cromática lateral se observa como una diferencia en el aumento de la luz de diferentes longitudes de onda debido a las diferentes longitudes focales de la misma. Por ejemplo, una imagen vista bajo longitudes de onda de luz azul relativamente cortas aparecerá más grande que la misma imagen vista bajo longitudes de onda de luz roja relativamente más largas.

En los sistemas de microscopía que tienen objetivos de alta calidad, tales como, por ejemplo, objetivos apocromáticos, una gran parte de la aberración cromática aparente puede corregirse. Sin embargo, aún puede quedar algo de aberración cromática lateral residual, lo que resulta en diferencias de aumento a través de las longitudes de onda de la luz. Esta aberración cromática lateral puede ser difícil de observar visualmente ya que un observador humano tiende a concentrarse en el centro del campo de visión donde la aberración lateral en general está ausente. Sin embargo, cuando se forman imágenes del campo de visión usando, por ejemplo, una cámara CCD, una aberración cromática lateral muy pequeña que resulta, por ejemplo, incluso con una diferencia de aumento de menos del 1 % entre las longitudes de onda, dará como resultado ligeros cambios de color alrededor de los bordes de los objetos en el campo de visión, pero localizados lejos del centro óptico del objetivo. En consecuencia, un píxel localizado en una posición  $(x, y)$  dada en la imagen puede no representar exactamente la parte correspondiente del objeto bajo investigación, en función de la longitud de onda de la luz usada para iluminar el objeto y la localización del objeto dentro del campo de visión. Sin embargo, con el fin de resolver las ecuaciones de separación de cromógenos derivadas de la ley de Lambert-Beer, una premisa básica es que debe examinarse exactamente la misma parte del objeto en el campo de visión. Por lo tanto, las imágenes obtenidas para longitudes de onda de luz separadas deben ajustarse para proporcionar correlación con respecto a las regiones del campo de visión donde se deben resolver las ecuaciones de separación de cromógenos. Además, la pluralidad de imágenes adquiridas a partir de cada una de las exploraciones del objeto tomadas con respecto a una longitud de onda específica deberían escalarse y alinearse de tal manera que los píxeles de una imagen capturada en una longitud de onda correspondan a los píxeles de una imagen capturada en una longitud de onda diferente.

Por consiguiente, un aspecto ventajoso de la presente invención implica un método de corrección de la aberración cromática lateral dentro de un sistema de microscopía. En primer lugar, se determinan las coordenadas del centro del objetivo de aumento 250 con respecto al centro del dispositivo o chip electrónico que comprende el componente productor de imágenes de la cámara 300. A continuación, se determina un factor de aumento observado para cada longitud de onda y se compara con el factor de aumento para una longitud de onda elegida arbitrariamente. Por ejemplo, una longitud de onda central comprendería la longitud de onda elegida con la que se compararía el factor de aumento para cada una de las otras longitudes de onda. A continuación, se ajusta la imagen para cada longitud de onda de acuerdo con el factor de aumento relativo determinado y las coordenadas relativas del centro del objetivo de aumento 250.

Con el fin de facilitar las etapas del método descrito, se usa un portaobjetos de calibración específico, en el que el portaobjetos está configurado con una rejilla de agujeros finos separados de manera regular a través de un medio de bloqueo de luz. Se toma una imagen de la rejilla en cada longitud de onda de luz usada para iluminar la muestra. Por ejemplo, puede producirse una imagen para cada una de las longitudes de onda. El centro de cada agujero se calcula, por ejemplo, en coordenadas  $x, y$ . La imagen correspondiente a la longitud de onda de la luz más cercana a la media de las longitudes de onda de la luz bajo consideración se designa entonces como la imagen de referencia.



Posteriormente, cada una de las imágenes para las otras longitudes de onda bajo consideración se compara con la imagen de referencia. Para cada agujero en la rejilla, la diferencia en la dirección  $x$  ( $\delta x$ ) y la diferencia en la dirección  $y$  ( $\delta y$ ) se determinan entonces para el agujero correspondiente en la imagen de referencia y la imagen que se compara con la misma. A continuación, se determinan ecuaciones tales como, por ejemplo, las ecuaciones lineales que minimizan el error de reconstrucción para  $\delta x$  como una función de  $x$  y  $\delta y$  como una función de  $y$ . A partir de estas dos ecuaciones, se determina el centro del objetivo ( $x_0, y_0$ ), donde  $x_0$  comprende la solución de la primera ecuación en  $x$  cuando  $\delta x$  es 0 e  $y_0$  comprende la solución de la segunda ecuación en  $y$  cuando  $\delta y$  es 0. Una ecuación lineal que minimiza el error de reconstrucción de  $\delta d$ , donde  $\delta d = (\delta x^2 + \delta y^2)^{1/2}$ , como una función de la distancia al centro del objetivo, se determina a continuación en la que la pendiente de esa ecuación proporciona el factor de aumento de la longitud de onda específica con respecto a la longitud de onda de referencia. Esta imagen para la longitud de onda específica se ajusta a continuación espacialmente de tal manera que el origen de la imagen corresponda al centro del objetivo y el aumento de la imagen corresponda al aumento de la imagen de referencia.

Otro aspecto ventajoso de la presente invención implica un método para alinear una pluralidad de imágenes dentro de un sistema de microscopía. En una realización, se extraen un número de perfiles a partir de cada una de la pluralidad de imágenes basadas en el fondo y en la densidad óptica del objeto. Con el fin de extraer el número de perfiles, se genera una máscara binaria a partir de cada una de las imágenes correspondientes a las diferentes longitudes de onda. Se crea una máscara binaria para cada imagen obteniendo en primer lugar una imagen con corrección de sombreado. Con el fin de reducir las perturbaciones de ruido de alta frecuencia, puede aplicarse un filtro de paso bajo a cada una de la pluralidad de imágenes con corrección de sombreado. Se crea un histograma que detalla las estadísticas de pico de fondo a partir de las densidades ópticas de la imagen con corrección de sombreado. El histograma proporciona un umbral de fondo usado para crear la máscara binaria, en el que un valor inferior o igual que el umbral recibe un valor de 0 y un valor mayor que el umbral recibe un valor de 1. A partir de la imagen binaria, se extraen los perfiles horizontal y vertical de la imagen, y los perfiles horizontal y vertical de cada una de las imágenes se escalan a continuación de acuerdo con los factores de aumento determinados. Una vez que los perfiles para cada longitud de onda se ajustan de acuerdo con el factor de aumento relativo determinado, los perfiles se evalúan para determinar el cambio real entre los perfiles de una imagen de referencia correspondiente con una longitud de onda de referencia y los perfiles de las imágenes para cada una de las otras longitudes de onda. Para una exposición a modo de ejemplo adicional con respecto a las técnicas para alinear una pluralidad de imágenes de una muestra dentro de un sistema de microscopía, véase la solicitud de patente de los estados unidos N.º 61/474,514, titulada METHOD FOR PREPARING QUANTITATIVE VIDEO-MICROSCOPY AND ASSOCIATED SYSTEM, que se presentó el 12 de abril de 2011 y se incorpora en su totalidad en el presente documento.

Una vez que se ha configurado el microscopio 150 para proporcionar la iluminación de Kohler para la adquisición de imágenes y se han abordado las aberraciones cromáticas, puede aplicarse la propiedad aditiva de la ley de Lambert-Beer a la separación de cromógenos. Por ejemplo, la propiedad aditiva de la ley de Lambert-Beer puede ampliarse a una situación en la que la escena se analiza en un entorno en blanco y negro, generada mediante, por ejemplo, una cámara en blanco y negro y una rueda de filtros que tiene un número de filtros de longitud de onda u otro dispositivo configurado para filtrar la luz correspondiente a las longitudes de onda específicas. Aunque una realización de la presente invención puede comprender una rueda de filtros que tenga cinco filtros de longitud de onda, la presente invención no se limita a 5 longitudes de onda, ya que la rueda de filtros o el dispositivo de filtrado puede tener cualquier número de filtros de longitud de onda correspondientes a un número deseado de colorantes de interés. De acuerdo con una realización, se adquiere una imagen correspondiente a cada longitud de onda, y las imágenes se analizan sobre una base por píxel en cada localización de píxel correspondiente, corrigiéndose las imágenes cuidadosamente por la aberración cromática y la alineación en todas las longitudes de onda. Por lo tanto, un píxel en la localización  $x_1, y_1$  localizado en la imagen 1 se analiza con respecto a un píxel correspondiente en la localización  $x_1, y_1$  en las imágenes 2, 3, 4, 5, etc. Por lo tanto, las cantidades de cada especie molecular en cada localización de píxel correspondiente pueden determinarse para todos los píxeles de las imágenes.

En tal caso, un primer colorante muestra unos coeficientes de absorción o firma espectral,  $\epsilon_{11}, \epsilon_{12}, \epsilon_{13}, \epsilon_{14}$  y  $\epsilon_{15}$ , en los filtros de longitud de onda primero a quinto, respectivamente. Por consiguiente, un segundo colorante muestra unos coeficientes de absorción,  $\epsilon_{21}, \epsilon_{22}, \epsilon_{23}, \epsilon_{24}$  y  $\epsilon_{25}$ , en las longitudes de onda primera a quinta, respectivamente. Por lo tanto, de acuerdo con la propiedad aditiva de la ley de Lambert-Beer, el análisis de la muestra en el entorno blanco y negro conduce a cinco ecuaciones para la densidad óptica de la misma:

$$OD_1 = \varepsilon_{11} \cdot l_1 \cdot C_1 + \varepsilon_{21} \cdot l_2 \cdot C_2 + \varepsilon_{31} \cdot l_3 \cdot C_3 + \varepsilon_{41} \cdot l_4 \cdot C_4 + \varepsilon_{51} \cdot l_5 \cdot C_5 \quad (3)$$

$$OD_2 = \varepsilon_{12} \cdot l_1 \cdot C_1 + \varepsilon_{22} \cdot l_2 \cdot C_2 + \varepsilon_{32} \cdot l_3 \cdot C_3 + \varepsilon_{42} \cdot l_4 \cdot C_4 + \varepsilon_{52} \cdot l_5 \cdot C_5 \quad (4)$$

$$OD_3 = \varepsilon_{13} \cdot l_1 \cdot C_1 + \varepsilon_{23} \cdot l_2 \cdot C_2 + \varepsilon_{33} \cdot l_3 \cdot C_3 + \varepsilon_{43} \cdot l_4 \cdot C_4 + \varepsilon_{53} \cdot l_5 \cdot C_5 \quad (5)$$

$$OD_4 = \varepsilon_{14} \cdot l_1 \cdot C_1 + \varepsilon_{24} \cdot l_2 \cdot C_2 + \varepsilon_{34} \cdot l_3 \cdot C_3 + \varepsilon_{44} \cdot l_4 \cdot C_4 + \varepsilon_{54} \cdot l_5 \cdot C_5 \quad (6)$$

$$OD_5 = \varepsilon_{15} \cdot l_1 \cdot C_1 + \varepsilon_{25} \cdot l_2 \cdot C_2 + \varepsilon_{35} \cdot l_3 \cdot C_3 + \varepsilon_{45} \cdot l_4 \cdot C_4 + \varepsilon_{55} \cdot l_5 \cdot C_5 \quad (7)$$

5 donde **OD1**, **OD2**, **OD3**, **OD4** y **OD5** representan las densidades ópticas de la muestra medida para cada una de las longitudes de onda, respectivamente. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que esta propiedad demostrada de la ley de Lambert-Beer puede ampliarse para incluir una pluralidad aún mayor de combinaciones de colorantes de acuerdo con el espíritu y el alcance de la presente invención. Obsérvese también que, aunque la realización de la presente invención utiliza un dispositivo de formación de imágenes en blanco y negro que tiene una pluralidad de filtros de longitud de onda para formar imágenes multispectrales de los marcadores de colorante a lo largo de cinco longitudes de onda distintas, un experto en la materia apreciará que el concepto demostrado puede aplicarse a un dispositivo de formación de imágenes capaz de capturar una imagen a lo largo de una pluralidad de longitudes de onda, y que el concepto demostrado puede aplicarse a tantos filtros de longitud de onda como estén disponibles con un dispositivo de formación de imágenes específico, rueda de filtros y/u otro dispositivo de filtrado.

15 Al aplicar la ley de Lambert-Beer a un sistema de microscopía digital 100 de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, es difícil y complejo, inexacto o, a veces, no es posible medir el espesor **I** de la muestra 500. En tales casos, la concentración **C** de la especie molecular puede extenderse y examinarse como el producto de **I** y **C** (**I** · **C**) y los resultados pueden tratarse en consecuencia. Por ejemplo, cuando se compara la concentración de un colorante con la concentración de otro colorante en una muestra específica, el término espesor de la muestra será común a ambas concentraciones y, por lo tanto, será menos importante determinar el espesor de la muestra como un valor absoluto y preciso. En consecuencia, un experto en la materia entenderá que normalmente no se requiere una determinación precisa del espesor de la muestra sino que, en general, puede tratarse como una constante al examinar las ecuaciones como se detalla en el presente documento.

25 La aplicación de la ley de Lambert-Beer a un sistema de microscopía digital 100 de la presente invención también reconoce que la ley de Lambert-Beer también puede expresarse como:

$$OD_{(x,y)} = \log I_{0(x,y)} - \log I_{(x,y)} \quad (8)$$

30 para una imagen digital 450 de la muestra 500 que comprende una pluralidad de píxeles dispuestos, por ejemplo, de acuerdo con un sistema de coordenadas cartesianas, donde (x, y) significa un píxel específico en la imagen 450, **OD** (x, y) es la densidad óptica de la muestra 500 en ese píxel, **I** (x, y) es la intensidad de luz medida o transmitancia de la muestra 500 en ese píxel, e **I**<sub>0</sub> (x, y) es la intensidad de luz de la fuente de luz 200 medida sin ningún objeto de absorción de luz intermedio, tal como la muestra. En consecuencia:

$$35 \quad IOD = \sum_N (\log I_{0(x,y)} - \log I_{(x,y)}) \quad (9)$$

40 donde **IOD** es la densidad óptica integrada de la imagen digital 450 de la muestra 500, y **N** es el número de píxeles en la imagen de superficie 450 de la muestra. Un experto en la materia apreciará además que la relación logarítmica descrita en las ecuaciones (8) y (9) puede expresarse en diversas bases dentro del espíritu y el alcance de la presente invención. Por ejemplo, las relaciones pueden expresarse en base 2, base 10 o logaritmos naturales, en las que las diversas bases están relacionadas por las constantes de proporcionalidad respectivas (por ejemplo, ln (x) o log<sub>e</sub> (x) = 2,3026 log<sub>10</sub> (x)). Por lo tanto, la constante de proporcionalidad puede considerarse adecuadamente cuando se introducen comparaciones relativas en intensidades de luz. Además, en la microscopía cuantitativa de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, se conserva la relación de proporcionalidad entre la densidad óptica **OD** de la muestra y las concentraciones de colorante.

45 Por lo tanto, para una muestra preparada 500 examinada por el sistema 100, la relación apropiada se expresa como:

$$\ln I_0 - \ln I = \ln I_0/I = OD = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (10)$$

5 Cuando, por ejemplo, se usa una cámara en blanco y negro de 16 bit 300 en el sistema 100, la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra en cada filtro de longitud de onda puede expresarse como  $2^{16}$  (= 65536) valores entre 0 y 65535. Por ejemplo, la intensidad inicial  $I_0$  de la fuente de luz 200, que corresponde al 100 % de transmitancia, se expresará preferentemente en cada una de la pluralidad de longitudes de onda como un valor cercano a 65535, que representa el valor más brillante posible en cada longitud de onda. La cámara 300 y/o la fuente de luz 200 pueden ajustarse en consecuencia de tal manera que, en ausencia de la muestra, una luz "blanca" pura tendrá un valor de intensidad de 65535 en cada una de las longitudes de onda, correspondiente al 100 % de transmitancia. A la inversa, en ausencia de luz, que en general corresponde a una transmitancia cercana al 0 %, una "imagen negra" tendrá un valor de intensidad cercano a 0 en cada una de las longitudes de onda. En cualquier píxel, la intensidad inicial  $I_0$  de la fuente de luz 200, correspondiente al 100 % de transmitancia, se expresa por lo tanto como la diferencia entre el valor de la intensidad medida en presencia de la fuente de luz 200 menos el valor de la intensidad medida en ausencia de la fuente de luz 200 para cada uno de los filtros de longitud de onda. Debido a que la intensidad de la fuente de luz 200 puede variar espacialmente a través de la imagen 450, o a lo largo del campo de visión medido, y debido a que el objetivo de aumento 250 u otros componentes ópticos pueden absorber heterogéneamente la luz, el 100 % de transmitancia puede estar representado por diversas intensidades diferenciales a lo largo del campo de visión medido. Sin embargo, ya que la densidad óptica **OD** de la muestra se expresa como el logaritmo de la relación de la transmitancia de luz en ausencia de la muestra (intensidad inicial  $I_0$ ) con la transmitancia de luz en presencia de la muestra ( $I$ ), la densidad óptica **OD** es espacialmente en gran medida insensible a pequeñas variaciones en las intensidades diferenciales a lo largo del campo de visión medido.

20 Ya que la fuente de luz 200 permanece sustancialmente constante a lo largo del tiempo, o puede fácilmente reevaluarse, la medición de la intensidad de luz para cualquier píxel, en la presencia de la muestra, puede traducirse en la transmitancia  $I$  en ese píxel y en cada uno de los filtros de longitud de onda. Una vez que se determinan los valores para la intensidad inicial  $I_0$  y la transmitancia  $I$ , puede calcularse la densidad óptica **OD**. Como tal, en cualquier localización en el campo de visión 450 donde esté presente un único colorante, el coeficiente de absorción  $\varepsilon$  de ese colorante puede determinarse con respecto a cada uno de los filtros de longitud de onda. Más específicamente,  $I \cdot C$  para un píxel dado será igual en cada uno de los filtros de longitud de onda. Por lo tanto, si se conocen tanto  $I$  como  $C$ , el coeficiente de absorción  $\varepsilon$  puede calcularse de acuerdo con la ecuación (10) o en cada uno de los filtros de longitud de onda como:

$$\varepsilon_1 = OD_1 / (I \cdot C) = (\ln(I_{01}/I_1)) / (I \cdot C) \quad (11)$$

$$\varepsilon_2 = OD_2 / (I \cdot C) = (\ln(I_{02}/I_2)) / (I \cdot C) \quad (12)$$

$$\varepsilon_3 = OD_3 / (I \cdot C) = (\ln(I_{03}/I_3)) / (I \cdot C) \quad (13)$$

$$\varepsilon_4 = OD_4 / (I \cdot C) = (\ln(I_{04}/I_4)) / (I \cdot C) \quad (14)$$

$$\varepsilon_5 = OD_5 / (I \cdot C) = (\ln(I_{05}/I_5)) / (I \cdot C) \quad (15)$$

35 Sin embargo,  $I \cdot C$  no se conoce normalmente para un píxel específico en una imagen de una muestra específica. Por lo tanto, los coeficientes de absorción  $\varepsilon$  se calculan para cada filtro de longitud de onda de acuerdo con la relación de la densidad óptica **OD** en cada filtro de longitud de onda, medida en un píxel dado, con la densidad óptica máxima **OD** fuera de todos los filtros de longitud de onda medidos en el mismo píxel. Más específicamente, un experto en la materia apreciará que la determinación del coeficiente de absorción  $\varepsilon$  en cada una de las longitudes de onda, en ausencia de un conocimiento a priori de  $I$  y/o  $C$ , es una cuestión de manipulación de las ecuaciones lineales con el fin de lograr una solución relativa donde  $I \cdot C$  se establece arbitrariamente en un valor de 1, en la que:

$$\varepsilon_1 = OD_1 / I = OD_1 = \ln(I_{01}/I_1) \quad (16)$$

$$\varepsilon_2 = OD_2 / I_2 = OD_2 = \ln(I_{o2}/I_2) \quad (17)$$

$$\varepsilon_3 = OD_3 / I_3 = OD_3 = \ln(I_{o3}/I_3) \quad (18)$$

$$\varepsilon_4 = OD_4 / I_4 = OD_4 = \ln(I_{o4}/I_4) \quad (19)$$

$$\varepsilon_5 = OD_5 / I_5 = OD_5 = \ln(I_{o5}/I_5) \quad (20)$$

5 En consecuencia, si la concentración absoluta del colorante específico permanece desconocida, puede calcularse un coeficiente de absorción relativa  $\varepsilon$  para cada una de las longitudes de onda y para cualquier píxel dado con un factor de error igual a  $I \cdot C$ .

10 Como alternativa, debido a que  $I$  es único en una localización de píxel dado y puede establecerse arbitrariamente a un valor de 1, las ecuaciones (3-7) pueden reescribirse de la siguiente manera, donde  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ , y  $C_5$  están relacionadas por un factor de 1:

$$OD_1 = \varepsilon_{11} \cdot C_1 + \varepsilon_{21} \cdot C_2 + \varepsilon_{31} \cdot C_3 + \varepsilon_{41} \cdot C_4 + \varepsilon_{51} \cdot C_5 \quad (21)$$

$$OD_2 = \varepsilon_{12} \cdot C_1 + \varepsilon_{22} \cdot C_2 + \varepsilon_{32} \cdot C_3 + \varepsilon_{42} \cdot C_4 + \varepsilon_{52} \cdot C_5 \quad (22)$$

$$OD_3 = \varepsilon_{13} \cdot C_1 + \varepsilon_{23} \cdot C_2 + \varepsilon_{33} \cdot C_3 + \varepsilon_{43} \cdot C_4 + \varepsilon_{53} \cdot C_5 \quad (23)$$

$$OD_4 = \varepsilon_{14} \cdot C_1 + \varepsilon_{24} \cdot C_2 + \varepsilon_{34} \cdot C_3 + \varepsilon_{44} \cdot C_4 + \varepsilon_{54} \cdot C_5 \quad (24)$$

$$OD_5 = \varepsilon_{15} \cdot C_1 + \varepsilon_{25} \cdot C_2 + \varepsilon_{35} \cdot C_3 + \varepsilon_{45} \cdot C_4 + \varepsilon_{55} \cdot C_5 \quad (25)$$

15 Obsérvese que la determinación de una matriz de coeficientes de absorción  $\varepsilon$ , para diferentes colorantes puede realizarse independientemente de la evaluación de la muestra y almacenarse para una aplicación adicional a muestras tratadas con al menos uno de los colorantes respectivos. Además, las diversas matrices de coeficientes de absorción  $\varepsilon$  para colorantes específicos, así como los datos de intensidad de luz originales  $I_o$  para la fuente de luz 200 pueden almacenarse, por ejemplo, en el dispositivo informático 350, un servidor localizado en una intranet o en Internet, u otro dispositivo de almacenamiento de datos como apreciará un experto en la materia. Como tal, cuando se han evaluado los coeficientes de absorción  $\varepsilon$  para los diferentes colorantes, y las densidades ópticas  $OD$  se han determinado a partir de los datos de imagen, las ecuaciones apropiadas pueden resolverse como un conjunto de ecuaciones lineales para extraer las concentraciones respectivas de los colorantes  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ , y  $C_5$ .

20 A modo de explicación adicional, un conjunto representativo de las ecuaciones algebraicas lineales puede expresarse, por ejemplo, como:

$$\begin{aligned}
 a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + a_{13}x_3 + \dots + a_{1N}x_N &= b_1 \\
 a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + a_{23}x_3 + \dots + a_{2N}x_N &= b_2 \\
 a_{31}x_1 + a_{32}x_2 + a_{33}x_3 + \dots + a_{3N}x_N &= b_3 \\
 \dots & \\
 a_{M1}x_1 + a_{M2}x_2 + a_{M3}x_3 + \dots + a_{MN}x_N &= b_M
 \end{aligned} \quad (26)$$

30 donde, para  $N$  incógnitas,  $x_j, j = 1, 2, \dots, N$  están relacionadas por  $M$  ecuaciones. Los coeficientes  $a_{ij}$ , donde  $i = 1, 2, \dots, M$  y  $j = 1, 2, \dots, N$ , son en general conocidos, al igual que las cantidades  $b_i, i = 1, 2, \dots, M$ . Si  $M < N$ , hay efectivamente menos ecuaciones que incógnitas. En tal caso, no puede haber solución o más de una matriz de solución  $x$ . Además, si  $N = M$ , entonces hay tantas ecuaciones como incógnitas y es probable que se determine una matriz de

solución única  $x$ . Además, si  $M > N$ , entonces hay más ecuaciones que incógnitas  $y$ , en general, no hay una matriz de solución específica  $x$  para el conjunto de ecuaciones. Por consiguiente, se dice que el conjunto de ecuaciones está sobredeterminado  $y$ , en tal caso, la solución más apropiada se considera, en general, la solución que proporciona el mejor ajuste para las ecuaciones, en el que la solución de mejor ajuste corresponde normalmente a la solución que tiene la suma mínima de los errores de reconstrucción.

La ecuación (26) también puede expresarse alternativamente como:

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{x} = \mathbf{b} \tag{27}$$

donde "." indica la multiplicación de la matriz,  $\mathbf{A}$  es la matriz de coeficientes, y  $\mathbf{b}$  es la parte del lado derecho expresada como un vector de columna. En general, por convención, el primer índice de un elemento  $a_{ij}$  indica la fila del elemento; mientras que el segundo índice la columna del elemento. Además,  $a_i$  o  $a[i]$  indica una fila completa  $a_{[i][j]}$ ,  $j = 1, \dots, N$ . En consecuencia, la solución de la ecuación matricial  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{x} = \mathbf{b}$  para un vector desconocido  $\mathbf{x}$ , donde  $\mathbf{A}$  es la matriz de coeficientes, y  $\mathbf{b}$  es la parte del lado derecho requiere, en general, la determinación de  $\mathbf{A}^{-1}$  o la matriz inversa de la matriz  $\mathbf{A}$ . Por lo tanto:

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}^{-1} \cdot \mathbf{b} \tag{28}$$

Como  $\mathbf{A}^{-1}$  es la matriz inversa de la matriz  $\mathbf{A}$ , entonces  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{A}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} \cdot \mathbf{A} = \mathbf{ID}$ , donde  $\mathbf{ID}$  es una matriz de identidad. Para facilitar la determinación de una solución, los parámetros pueden establecerse de tal manera que el número de ecuaciones sea mayor o igual que el número de incógnitas, o  $M \geq N$ . Como se ha tratado anteriormente, cuando se produce  $M > N$ , en general, no hay una solución específica matriz  $x$  para la ecuación (28) y el conjunto de ecuaciones está sobredeterminado. Sin embargo, en tales situaciones, la mejor solución de "compromiso" o mejor ajuste es a menudo la solución que satisface de manera más cercana y simultánea todas las ecuaciones. Tal cercanía puede definirse, por ejemplo, de una manera de mínimos cuadrados, en los que se minimiza la suma de los cuadrados de las diferencias entre ambos lados de la ecuación (28). Como resultado, el conjunto de ecuaciones lineales sobredeterminadas puede reducirse normalmente a un problema lineal solucionable, a menudo denominado problema de mínimos cuadrados lineales, que puede resolverse con matemáticas de descomposición de valores singulares (SVD) como se apreciará por un experto en la materia. La SVD se dirige al modelado paramétrico de datos y suele ser el método elegido para resolver problemas de mínimos cuadrados lineales y se describe con más detalle, por ejemplo, en NUMERICAL RECIPES IN C: THE ART OF SCIENTIFIC COMPUTING (ISBN 0-521-43108 - 5) Copyright (C) 1988-1992 por Cambridge University Press. Programas Copyright (C) 1988-1992 por Numerical Recipes Software.

La operación del sistema 100 como se ha descrito anteriormente puede ilustrarse además, por ejemplo, suponiendo que la fuente de luz es una luz "blanca" que tiene  $I_0 = 65535$  en cada una de las cinco longitudes de onda y que se usan cinco colorantes que tienen las siguientes características de intensidad de luz  $I$  transmitida en cada una de las cinco longitudes de onda:

I	Longitud de onda 1	Longitud de onda 2	Longitud de onda 3	Longitud de onda 4	Longitud de onda 5
Colorante 1	25264	27462	34245	45617	52728
Colorante 2	21979	35134	20320	53888	59097
Colorante 3	58224	60834	61183	54315	30280
Colorante 4	27570	19651	11411	10051	13679
Colorante 5	16066	11349	18845	44693	46263

La matriz  $\mathbf{OD}$  de densidad óptica correspondiente (cada elemento se calcula como  $\ln(I_0/I)$ ) se convierte de este modo en:

OD	Longitud de onda 1	Longitud de onda 2	Longitud de onda 3	Longitud de onda 4	Longitud de onda 5
Colorante 1	0,413960	0,377739	0,281866	0,157346	0,094424
Colorante 2	0,100639	0,270745	0,508536	0,084976	0,044904
Colorante 3	0,051369	0,032324	0,029842	0,081547	0,335308
Colorante 4	0,376025	0,523080	0,759134	0,814260	0,680395
Colorante 5	0,610557	0,761483	0,541262	0,166232	0,151231

Sin embargo, ya que  $OD = \varepsilon \cdot I \cdot C$ , los valores de **OD** para cada colorante pueden normalizarse con respecto al canal que tiene el **OD** más alto para proporcionar una matriz de coeficientes de absorción relativos  $\varepsilon$  para los respectivos colorantes, ya que los valores de **I·C** serán constantes a través de las longitudes de onda. En consecuencia:

E	Longitud de onda 1	Longitud de onda 2	Longitud de onda 3	Longitud de onda 4	Longitud de onda 5
<b>Colorante 1</b>	1	0,9125	0,6809	0,3801	0,2281
<b>Colorante 2</b>	0,1979	0,5324	1	0,1671	0,0883
<b>Colorante 3</b>	0,1532	0,0964	0,089	0,2432	1
<b>Colorante 4</b>	0,4618	0,6424	0,9323	1	0,8356
<b>Colorante 5</b>	0,8018	1	0,7108	0,2183	0,1986

5 Posteriormente, suponiendo que una muestra 500 se ha teñido con los mismos cinco colorantes, Colorante 1, Colorante 2, Colorante 3, Colorante 4 y Colorante 5, y que se usa una fuente de luz 200 con características espectrales similares para iluminar la muestra 500, se captura una imagen 450 de la muestra 500 por la cámara 300 en cada una de las cinco longitudes de onda. En un píxel específico en la imagen 450, el dispositivo informático 350  
10 determina a continuación que la intensidad de luz transmitida en cada una de las longitudes de onda es:

	Longitud de onda 1	Longitud de onda 2	Longitud de onda 3	Longitud de onda 4	Longitud de onda 5
<b>I</b>	33563	26985	20690	27531	25279

donde:

	Longitud de onda 1	Longitud de onda 2	Longitud de onda 3	Longitud de onda 4	Longitud de onda 5
<b>I<sub>0</sub></b>	65535	65535	65535	65535	65535

15 Por lo tanto:

	Longitud de onda 1	Longitud de onda 2	Longitud de onda 3	Longitud de onda 4	Longitud de onda 5
<b>OD</b>	0,290607585	0,385346	0,500698	0,376643	0,41371

20 para el píxel específico. Por lo tanto, con el fin de determinar las concentraciones de los cinco colorantes en ese píxel, la matriz **OD** se multiplica por la inversa de la matriz de coeficientes de absorción relativa determinado anteriormente  $\varepsilon$  ( $(OD) \cdot \varepsilon^{-1} = I \cdot C$ ). En consecuencia:

	<b>I·C (mol · cm / L) or C<sub>relativo</sub></b>
<b>Colorante 1</b>	0,068527
<b>Colorante 2</b>	0,14145
<b>Colorante 3</b>	0,139956
<b>Colorante 4</b>	0,281291
<b>Colorante 5</b>	0,053319

25 Para más información con respecto a las técnicas a modo de ejemplo para analizar una muestra usando la separación de cromógenos y la ley de Lambert-Beers se detalla en la patente de Estados Unidos N.º 7.065.236 y en la patente de Estados Unidos N.º 7.133.547, cada una de Marcelpoil et al., y asignadas al cesionario actual, y que se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento.

30 Una vez que se evalúa un vector de concentración de colorante **C** inicial, el proceso de refinamiento 50 de acuerdo con una realización de la presente invención comienza, como se muestra en la figura 2. La concentración de colorante inicial de un píxel específico se evalúa 6 y el número de concentraciones de colorante presentes en una concentración significativa,  $N_s$ , se identifica y se cuenta 7. En una realización de la presente invención, la concentración significativa,  $N_s$ , puede ser una concentración mayor que 0,01. En otra realización, la concentración significativa,  $N_s$ , puede ser una concentración mayor que el fondo de densidad óptica media más 6 veces la

desviación estándar de las densidades ópticas medidas en el fondo. En una realización de la presente invención, el proceso de refinamiento 50 comprende cinco filtros de longitud de onda, en la que cada filtro de longitud de onda corresponde a uno de los cinco marcadores de colorante. Si el número de concentraciones de colorante presentes en una concentración significativa,  $N_s$ , para un píxel específico es igual al número de filtros de longitud de onda (es decir,  $N_s = 5$ ), la solución evaluada de las concentraciones de colorante se mantiene, ya que no puede realizarse 62 ninguna mejora o refinamiento. Por el contrario, si el número de concentraciones de colorante presentes en una cantidad significativa,  $N_s$ , para un píxel específico es uno (es decir,  $N_s = 1$ ), la concentración del único colorante se refina a partir de la longitud de onda específica que proporciona el pico de absorción máxima.

10 Por consiguiente, el proceso de refinamiento y optimización se produce cuando el número de concentraciones de colorante,  $N_s$ , está entre uno y cinco (es decir,  $N_s > 1$  y  $N_s < 5$ ), de acuerdo con la realización donde se usan cinco colorantes. Por lo tanto, el proceso de refinamiento puede implementarse para una cantidad de colorantes que sea mayor que uno pero menor que la cantidad máxima de colorantes en la muestra. El número total de combinaciones de filtros de longitud de onda se calcula 8, de acuerdo con la ley binomial. Específicamente, la ecuación (29) 15 determina el número total de posibles subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda  $N_s$  entre  $N$  filtros de longitud de onda totales.

$$\frac{N!}{N_s!(N - N_s)!} \quad (29)$$

20 Un experto en la materia apreciará que el proceso de refinamiento y optimización puede aplicarse para un sistema que usa una pluralidad de concentraciones de colorante cuando el número de concentraciones de colorante,  $N_s$ , presente es mayor que uno y menor que  $N-1$ , donde  $N$  es igual al número total de marcadores de colorante que se usan. Por lo tanto, en la presente realización, cuando  $N_s > 1$  y  $N_s < 5$ , las  $N_s$  concentraciones de colorante se refinan usándose entre todos los subconjuntos potenciales de  $N_s$  longitudes de onda.

25 De acuerdo con una realización de la presente invención, cada posible subconjunto de combinaciones de filtros de longitud de onda se prueba de acuerdo con un factor de optimización y la mejor solución, por ejemplo, la combinación de filtros de longitud de onda a partir del subconjunto de  $N_s$  longitudes de onda que maximiza el factor de optimización, se mantiene para refinar las  $N_s$  concentraciones de colorante. El factor de optimización se calcula, en parte, calculando la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de longitudes de onda  $\mathbf{E}$  de los  $N_s$  colorantes y la transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de longitudes de onda,  $\mathbf{E}^T$  51. Específicamente, el factor de optimización se calcula calculando el determinante de Cayley-Menger de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de longitudes de onda y la transpuesta de la longitud de onda de la matriz de coeficientes de extinción específica de longitud de onda 52. Una vez que se obtienen estos determinantes, el proceso de refinamiento continúa multiplicando los determinantes de Cayley-Menger respectivos 53 para obtener un hipervolumen. Además, los productos de estos determinantes de Cayley-Menger para cada una de las combinaciones de filtros de longitud de onda se comparan 54 entre sí con el fin de encontrar la combinación de filtros de longitud de onda específica que proporcione el producto máximo de los dos determinantes. La siguiente ecuación ilustra el cálculo de la evaluación de factor de optimización  $f(U_i)$ .

$$f(U_i) = \text{CayleyMenger}(E_{ui}) \times \text{CaleyMenger}(E_{ui}^T) \quad (30)$$

A modo de explicación adicional, el determinante de Cayley-Menger proporciona el volumen de unas dimensiones  $n$  simplex. Si  $S$  es un simplex  $j$  en  $R^n$  con vértices  $v_1, \dots, v_{j+1}$  y  $B = (\beta_{ik})$  indica la matriz  $(j+1) \times (j+1)$  dada por,

$$\beta_{ik} = |v_i - v_k|_2^2,$$

entonces el contenido, el hipervolumen,  $v_j$ , viene dado por la siguiente ecuación:

$$v_j^2(S) = \frac{(-1)^{j+1}}{2^j (j!)^2} \det(\hat{B}) \quad (31)$$

50 donde,  $\hat{B}$  es la matriz  $(j+2) \times (j+2)$  obtenida a partir de  $B$  al bordear  $B$  con una fila superior  $(0, 1, \dots, 1)$  y una columna izquierda  $(0, 1, \dots, 1)^T$ . En este caso, las normales vectoriales  $L_2 |v_i - v_k|_2$  (o normal vectorial) son las longitudes de los bordes y el determinante en la ecuación (31) es el determinante de Cayley-Menger (*An Introduction to the Geometry of  $n$  Dimensions*. Sommerville, D.M.Y. 1958; "On the Complexity of Some Basic Problems in Computational Convexity II, Volume and Mixed Volumes". *Polytopes: Abstract, Convex and Computational*

$$|X|_p \equiv \left( \sum_i |x_i|^p \right)^{\frac{1}{p}}.$$

Gritzmann, P. y Klee, V. 1994.) La normal vectorial  $|X|_p$  para  $p = 1, 2, \dots$  se define como

Cuando  $p = 2$ , la normal L2 es simplemente la normal vectorial o  $|X|_2 = |X| = \sqrt{x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2}$ .

$$j = 0, 1, \dots \frac{(-1)^{j+1}}{2^j (j!)^2}$$

Los primeros coeficientes para  $j = 0, 1, \dots$  son -1, 2, 16, 288, -9216, 460800,..... (On the Regular Heptagon, Revista de química matemática, Alan L. Mackay, vol. 21, n.º 2, págs. 197-209 (1997)). Para  $j = 2$ , el hipervolumen se da como

$$-16\Delta^2 = \begin{vmatrix} 0 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & c^2 & b^2 \\ 1 & c^2 & 0 & a^2 \\ 1 & b^2 & a^2 & 0 \end{vmatrix} \quad (32)$$

La ecuación anterior proporciona el área para un triángulo plano con longitudes laterales a, b y c, y es una forma de la fórmula de Heron. Para  $j = 3$ , el contenido del simplex 3 viene dado por el determinante

$$288v^2 = \begin{vmatrix} 0 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & d_{12}^2 & d_{13}^2 & d_{14}^2 \\ 1 & d_{21}^2 & 0 & d_{23}^2 & d_{24}^2 \\ 1 & d_{31}^2 & d_{32}^2 & 0 & d_{34}^2 \\ 1 & d_{41}^2 & d_{42}^2 & d_{43}^2 & 0 \end{vmatrix} \quad (33)$$

donde el borde entre los vértices  $i$  y  $j$  tiene una longitud de  $d_{ij}$ .

$$|A| = \sum_{i=1}^k a_{ij} C_{ij}$$

Un determinante general para una matriz  $\mathbf{A}$  tiene un valor sin una suma implícita sobre  $j$  y donde  $C_{ij}$  es el cofactor de  $a_{ij}$  definido por  $C_{ij} = (-1)^{i+j} M_{ij}$ , y  $M_{ij}$  es la matriz menor de  $\mathbf{A}$  formada eliminando la fila  $i$  y la columna  $j$  de  $\mathbf{A}$ . Este proceso también se denomina expansión determinante por menores o expansión laplaciana por menores. Más específicamente, el determinante  $k \times k$  puede expandirse por "menores" para obtener:

$$\begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & \dots & a_{1k} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & \dots & a_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{k1} & a_{k2} & a_{k3} & \dots & a_{kk} \end{vmatrix} = a_{11} \begin{vmatrix} a_{22} & a_{23} & \dots & a_{2k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{k2} & a_{k3} & \dots & a_{kk} \end{vmatrix} - a_{12} \begin{vmatrix} a_{21} & a_{23} & \dots & a_{2k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{k1} & a_{k3} & \dots & a_{kk} \end{vmatrix} + \dots \pm a_{1k} \begin{vmatrix} a_{21} & a_{22} & \dots & a_{2(k-1)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{k1} & a_{k2} & \dots & a_{k(k-1)} \end{vmatrix} \quad (34)$$

Como se ha indicado anteriormente, la combinación de filtros de longitud de onda óptima,  $U_{opt}$ , se define por el producto máximo del determinante de Cayley-Menger de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de longitudes de onda y el determinante de Cayley-Menger de la transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de longitudes de onda. Específicamente, la combinación de filtros de longitud de onda óptima,  $U_{opt}$ , se determina calculando el producto de los dos determinantes de Cayley-Menger para cada combinación de filtros de longitud de onda, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$f(U_{opt}) = \max [f(U_i)]_{i=1}^{\frac{N!}{N_s!(N-N_s)!}} \quad (35)$$

De acuerdo con una realización de la presente invención, una estimación refinada de las concentraciones de colorante,  $C_{Ns}$ , se calcula una vez que se determina la combinación de filtros de longitud de onda óptima,  $U_{opt}$ . La estimación refinada de las concentraciones de colorante,  $C_{Ns}$ , se calcula a partir del vector de entrada de densidades

ópticas multiespectrales,  $OD_{Ns}$  y la inversa de la matriz de coeficientes de extinción de colorante,  $E_{Ns}^{-1}$ , que es una matriz cuadrada que tiene  $N_s$  filas y  $N_s$  columnas, como se muestra en la siguiente ecuación, y como se muestra como el elemento 60 en la figura 2.

$$C_{Ns} = E_{U_{opt}}^{-1} \cdot OD_{Ns} \quad (36)$$



Específicamente, la estimación refinada de las concentraciones de colorante,  $C_{Ns}$ , se calcula a partir del vector de entrada de densidades ópticas multiespectrales,  $OD_{Ns}$ , y la inversa de la matriz de coeficientes de extinción de colorante,  $E_{Ns}^{-1}$ , que se relacionan con la combinación de longitudes de onda específica que proporciona el mejor producto de los dos determinantes de Cayley-Menger a partir de la ecuación (30).

De acuerdo con la metodología descrita en el presente documento, las concentraciones de colorante refinado pueden usarse a continuación para reconstruir una imagen artificial refinada de la muestra. Las imágenes artificiales pueden generarse como una imagen en tiempo real o en vivo sustancialmente, o como una imagen fija, usando combinaciones de los colorantes que comprenden un marcador y/o una contratinción usada para preparar la muestra. Más específicamente, puede producirse una imagen artificial del campo de visión que muestra la muestra como afectada por todos los colorantes, la muestra como afectada por uno o más colorantes marcadores, o la muestra como afectada por la contratinción. En consecuencia, ya que los colorantes usados para preparar la muestra se caracterizan por el sistema, las capacidades del sistema pueden ampliarse de tal manera que, por ejemplo, la muestra o el campo de visión pueden escanearse automáticamente para detectar una región de interés específica de acuerdo con lo identificado por las características de un colorante específico o para afectar o facilitar una tarea a realizar en esa región de interés específica.

Aún más, la imagen artificial del campo de visión también puede usarse para facilitar la identificación y la extracción de las funciones seleccionadas de la muestra tratada. Por ejemplo, los procesos de puntos marcados, el análisis contextual y/o las estadísticas geográficas pueden usarse para identificar y extraer funciones a partir de la imagen basándose, por ejemplo, en un análisis de distribución espacial de un colorante específico. Una capacidad de extracción de funciones de este tipo también permitiría, por ejemplo, que los campos de visión o los objetos de interés se clasifiquen, marquen o identifiquen o agrupen de otra manera de acuerdo con, por ejemplo, el contenido general de un colorante marcador dado o una proporción seleccionada de un marcador específico. Donde, por ejemplo, puede establecerse un criterio de umbral, dicha capacidad sería la detección de eventos raros, empeoramientos u otros eventos graves. Continuando adelante, los clasificadores basados específicamente en el procesamiento de imágenes que resultan a partir de las imágenes específicas de contratinción y/o colorante marcador pueden entonces establecerse y usarse para evaluar la presencia de ciertos tipos de células o para realizar un diagnóstico basado en el campo de visión. Por ejemplo, HER2 puede evaluarse de esta manera en comparación con una escala de diagnóstico continuo establecida de acuerdo con el sistema y los métodos descritos en el presente documento. Tales clasificadores, en general, también pueden abarcar otras funciones informativas tales como, por ejemplo, detalles basados en la morfología o la textura de las células.

Se entenderá que la metodología y los procedimientos detallados en el presente documento junto con el sistema 100, especifican un método de determinación y refinamiento de una cantidad de una especie molecular a partir de una imagen de una muestra capturada por un dispositivo de adquisición de imágenes en un sistema de videomicroscopía. Un experto en la materia también apreciará que dicho método puede automatizarse con el fin de proporcionar un producto de programa de software informático, ejecutable en un dispositivo informático, que tenga partes ejecutables capaces de cuantificar la cantidad de una especie molecular a partir de una imagen digital de una muestra capturada por un dispositivo de adquisición de imágenes, tal como una cámara o un escáner, en un sistema de videomicroscopía. Por consiguiente, las realizaciones de la presente invención describen la implementación de un método y/o un producto de programa de software informático correspondiente que puede lograrse en un hardware, un software o una combinación de hardware y software adecuadamente configurados de acuerdo con el alcance de la presente invención.

Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención comprenden una técnica de análisis colorimétrico refinado para muestras preparadas que puede proporcionar la detección y cuantificación eficaces de especies de interés que supera los factores limitativos de las tecnologías de la técnica anterior, tales como errores en las estimaciones de concentración de colorante debido a las fluctuaciones de ruido y/o al ruido global. Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar además estimaciones más precisas de las concentraciones de colorante de cada localización de píxel correspondiente de la pluralidad de imágenes de la muestra con el fin de optimizar las cantidades de esas especies moleculares indicadas en las imágenes. Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar además una técnica de procesamiento de imágenes que no se basa en la detección subjetiva de una especie molecular. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención proporcionan una técnica de análisis más simple y eficaz que es capaz de proporcionar la información de análisis necesaria a cerca de la muestra, una vez que se captura una imagen de la muestra, sin depender de un examen adicional de la muestra para completar el análisis.

Además, el análisis de la muestra preparada se logra usando imágenes digitales de la muestra. Ya que el análisis depende relativamente de la imagen, en lugar de depender de la muestra, pueden capturarse imágenes redundantes para el análisis, mientras que pueden procesarse muchas muestras con el fin de capturar las imágenes necesarias dentro de un período de tiempo relativamente corto. Una vez que se han capturado y almacenado los datos de la imagen, el análisis real puede producirse en un momento posterior o según se necesite sin requerir la presencia física de la muestra real. Un análisis de este tipo puede aplicarse adicionalmente para examinar la muestra completa o incluso del portaobjetos completo. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar un

sistema de videomicroscopía cuantitativa expedita con un rendimiento de análisis relativamente alto.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante, comprendiendo dicho método:

5 adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra; y  
determinar una cantidad de cada especie molecular, como se indica por un colorante respectivo, para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes:

10 determinando una densidad óptica de cada colorante con el fin de formar una matriz de densidad óptica correspondiente para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente;  
determinando un coeficiente de absorción relativa de cada colorante, determinado independientemente de la muestra, con el fin de formar una matriz de coeficientes de absorción relativa para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente;

15 multiplicando la matriz de densidad óptica por una inversa de una matriz de coeficientes de absorción relativa con el fin de formar una matriz resultante para cada localización de píxel, comprendiendo la matriz resultante la cantidad de cada especie molecular, como se indica por el colorante respectivo, para cada localización de píxel; y

20 determinando una pluralidad de subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda correspondientes a la pluralidad de especies moleculares:

calculando una matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda y una transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda;

25 calculando un determinante de Cayley-Menger para la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda y para la transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda;

multiplicando los determinantes de Cayley-Menger respectivos para obtener un hipervolumen;

30 comparando los productos de los determinantes de Cayley-Menger para cada una de las combinaciones de filtros de longitud de onda entre sí con el fin de encontrar una combinación de filtros de longitud de onda específica que proporcione el producto máximo de los dos determinantes; y

multiplicando el vector de entrada de densidad óptica multiespectral, y la inversa de la matriz de coeficientes de extinción de colorante, que se relacionan con la combinación de longitudes de onda específica que proporciona el producto máximo de los dos determinantes.

35 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra comprende adquirir la pluralidad de imágenes con un sistema de videomicroscopía, comprendiendo el sistema de videomicroscopía un dispositivo de adquisición de imágenes.

40 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de una pluralidad de especies moleculares se determina por la concentración de un colorante presente en una localización de píxel correspondiente.

45 4. Un sistema de videomicroscopía para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante, a partir de una pluralidad de imágenes de la muestra, comprendiendo dicho sistema:

un dispositivo de adquisición de imágenes configurado para capturar una pluralidad de imágenes digitales ampliadas de la muestra; y

50 un dispositivo procesador en comunicación con el dispositivo de adquisición de imágenes y configurado para:

determinar una cantidad de cada especie molecular, como se indica por un colorante respectivo, para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes:

55 determinando una densidad óptica de la muestra, en cada una de una pluralidad de longitudes de onda y para un píxel en la imagen, con el fin de formar una matriz de densidad óptica correspondiente para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente;

determinando un coeficiente de absorción relativa para el colorante que indica cada especie molecular, independientemente de la muestra y en cada una de la pluralidad de longitudes de onda, con el fin de formar una matriz de coeficientes de absorción relativa correspondiente; y

60 multiplicando la matriz de densidad óptica por una inversa de la matriz de coeficientes de absorción relativa con el fin de formar una matriz de concentración de colorante para cada localización de píxel, comprendiendo la matriz de concentración de colorante la cantidad de cada especie molecular, como se indica por el colorante respectivo, para cada localización de píxel; y

65 determinando una pluralidad de subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda correspondientes a la pluralidad de especies moleculares:

calculando una matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda y una transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda;

5 calculando un determinante de Cayley-Menger para la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda y para la transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda;

multiplicando los determinantes de Cayley-Menger respectivos para obtener un hipervolumen; comparando los productos de los determinantes de Cayley-Menger para cada una de las combinaciones de filtros de longitud de onda entre sí con el fin de encontrar una combinación de filtros de longitud de onda específica que proporcione el producto máximo de los dos determinantes; y multiplicando el vector de entrada de densidad óptica multiespectral, y la inversa de la matriz de coeficientes de extinción de colorante, que se relacionan con la combinación de longitudes de onda específica que proporciona el producto máximo de los dos determinantes.

15 5. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cantidad de una pluralidad de especies moleculares está determinada por la concentración de un colorante presente en una localización de píxel correspondiente.

20 6. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el dispositivo de adquisición de imágenes comprende una cámara en blanco y negro.

7. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el dispositivo de adquisición de imágenes comprende una pluralidad de filtros, correspondiendo cada filtro a una longitud de onda diferente representativa de un colorante respectivo en la muestra.

25 8. Un medio legible por ordenador codificado con un programa informático para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante, pudiendo dicho medio legible por ordenador codificado con un programa informático ejecutarse en un dispositivo informático y comprendiendo:

30 una parte ejecutable para adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra; y una parte ejecutable para determinar una cantidad de cada especie molecular, como se indica por un colorante respectivo, para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes:

35 determinando una densidad óptica de cada colorante con el fin de formar una matriz de densidad óptica correspondiente para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente;

determinando un coeficiente de absorción relativa de cada colorante, determinado independientemente de la muestra, con el fin de formar una matriz de coeficientes de absorción relativa para cada píxel en cada localización de píxel correspondiente; y

40 multiplicando la matriz de densidad óptica por una inversa de una matriz de coeficientes de absorción relativa con el fin de formar una matriz resultante para cada localización de píxel, comprendiendo la matriz resultante la cantidad de cada especie molecular, como se indica por el colorante respectivo, para cada localización de píxel; y

45 determinando una pluralidad de subconjuntos de combinaciones de filtros de longitud de onda correspondientes a la pluralidad de especies moleculares:

calculando una matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda y una transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda;

50 calculando un determinante de Cayley-Menger para la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda y para la transpuesta de la matriz de coeficientes de extinción específica de combinación de filtros de longitud de onda;

multiplicando los determinantes de Cayley-Menger respectivos para obtener un hipervolumen; comparando los productos de los determinantes de Cayley-Menger para cada una de las combinaciones de filtros de longitud de onda entre sí con el fin de encontrar una combinación de filtros de longitud de onda específica que proporcione el producto máximo de los dos determinantes; y

55 multiplicando el vector de entrada de densidad óptica multiespectral, y la inversa de la matriz de coeficientes de extinción de colorante, que se relacionan con la combinación de longitudes de onda específica que proporciona el producto máximo de los dos determinantes.

60

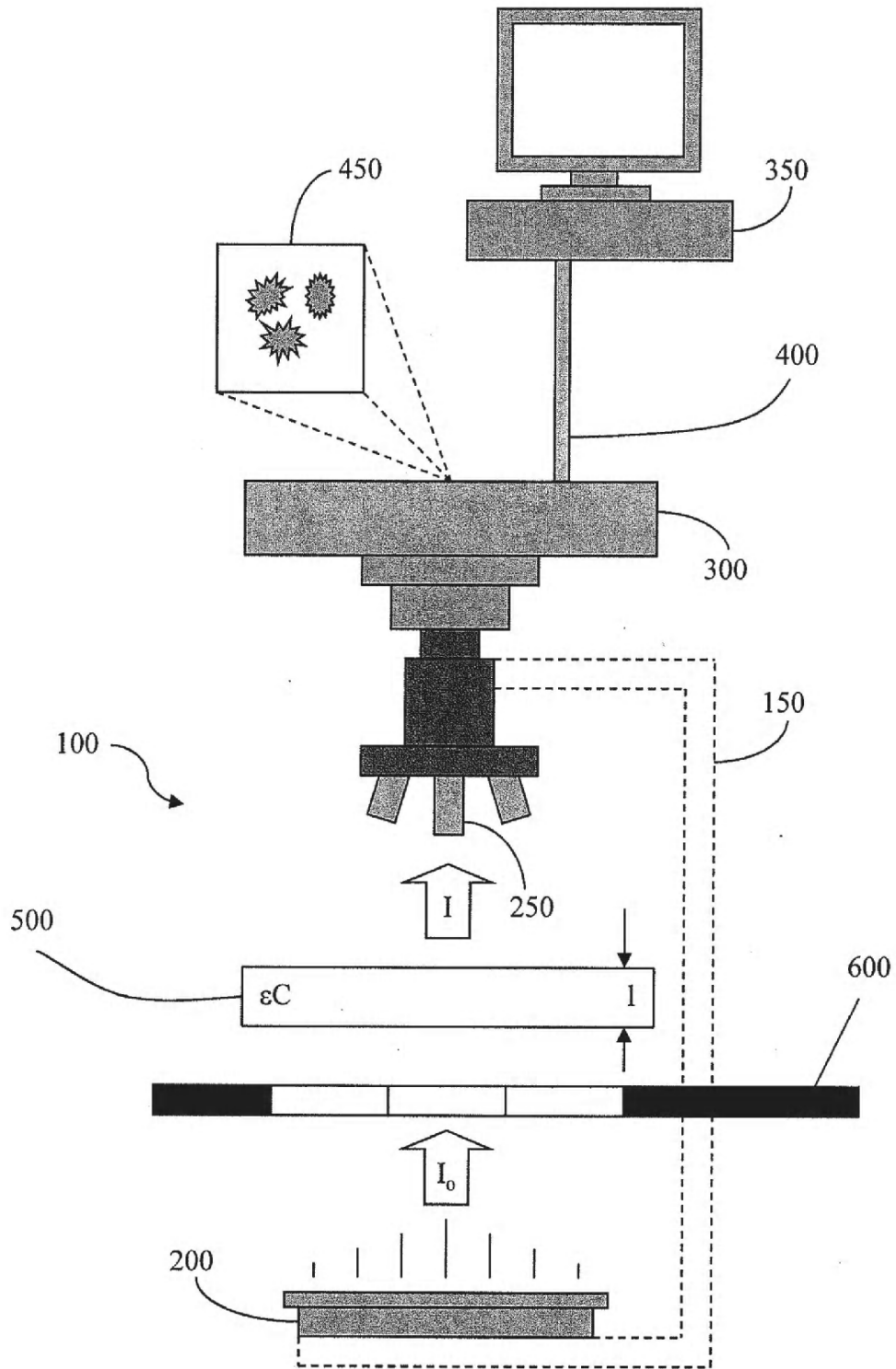


FIG. 1

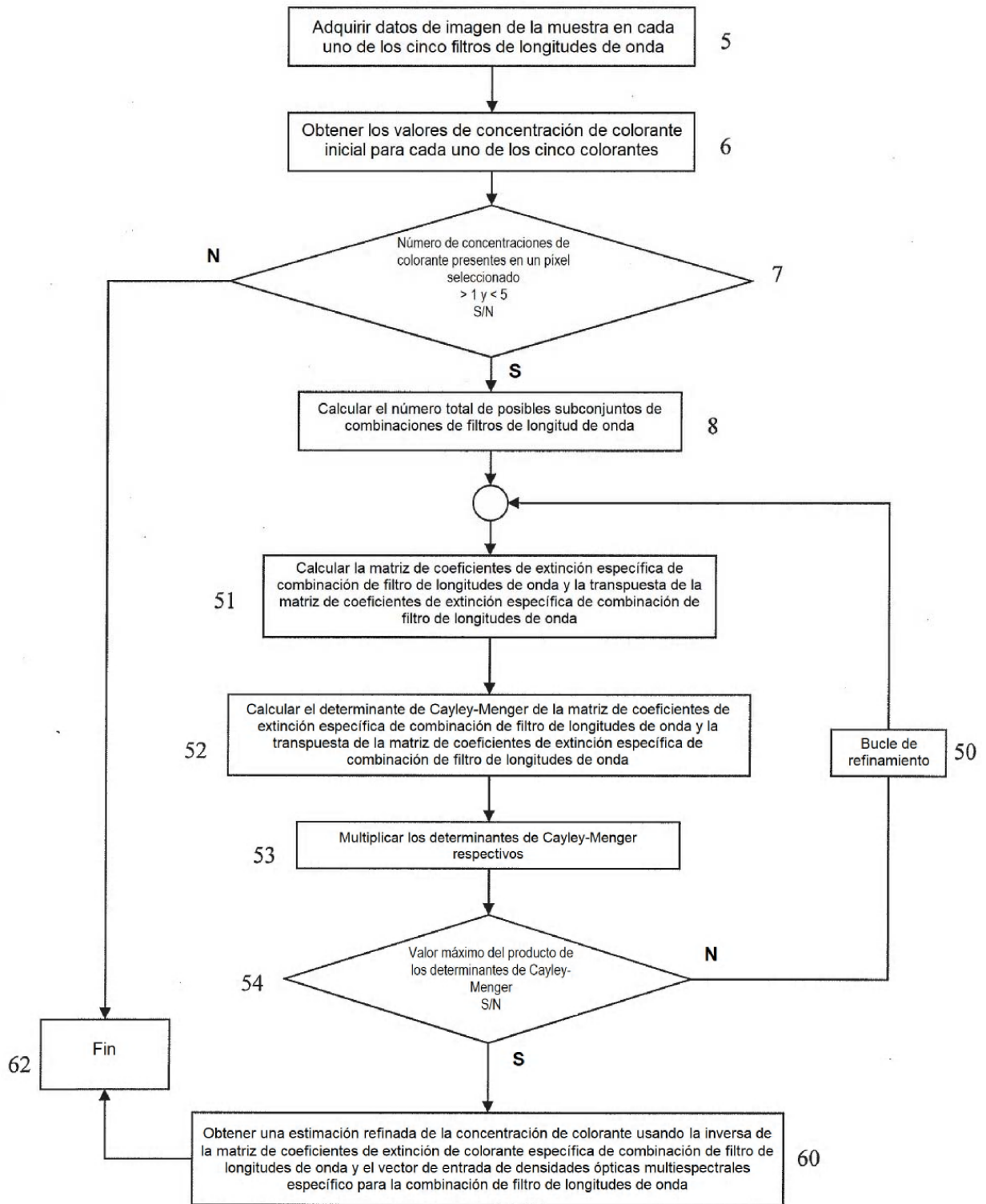


FIG. 2

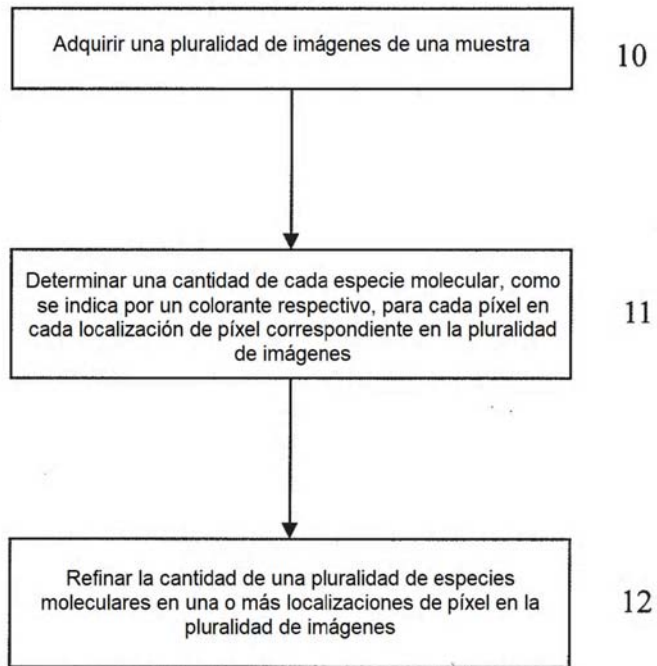


FIG. 3