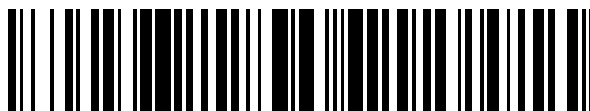


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 626**

51 Int. Cl.:

G06K 9/00 (2006.01)

G06K 9/46 (2006.01)

G06T 7/00 (2007.01)

G06T 7/90 (2007.01)

C12Q 1/6813 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2013 PCT/EP2013/051705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2013 E 13703547 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2810213**

54 Título: **Sistema para detectar genes en muestras de tejido**

30 Prioridad:

01.02.2012 US 201261593776 P

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

18.08.2020

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**BAMFORD, PASCAL;
CHUKKA, SRINIVAS;
MARTIN, JIM F.;
SARKAR, ANINDYA;
SERTEL, OLCAY;
SUZUE, ELLEN y
VARANGAONKAR, HARSHAL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 779 626 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema para detectar genes en muestras de tejido

5 **CAMPO TÉCNICO**

La tecnología divulgada en el presente documento se refiere a analizadores de piezas basados en ordenador y, en particular, sistemas basados en ordenador para detectar un nivel de expresión de genes en muestras de tejido.

10

ANTECEDENTES

Muchas enfermedades se asocian con los cambios que se producen en los núcleos de las células. En particular, algunos tipos de cánceres se asocian con la presencia de material genético adicional en las células. Por ejemplo, un determinado tipo de cáncer de mama se asocia con una sobreabundancia (por ejemplo, sobreexpresión) del factor de crecimiento epidérmico humano 2 ("HER2") frente al número de cromosomas 17 hallados en la célula. Al detectar el número de genes HER2 frente al número de cromosomas 17 en una muestra de tejido, se puede identificar más fácilmente este tipo particular de cáncer de mama y se pueden evaluar las opciones de tratamiento.

15

20

En un sistema de análisis de tejido convencional, un anatomopatólogo usa un microscopio para ver una muestra de tejido que se ha teñido con una mezcla de "cóctel" que incluye marcadores génicos especiales que se unen ellos mismos a genes, cromosomas o partes de los mismos particulares. Los marcadores hacen que los cromosomas o genes unidos aparezcan como regiones coloreadas de manera diferente en el portaobjetos teñido. El anatomopatólogo puede contar o estimar cuántos objetos representan realmente el material genético marcado frente a desecho extraño en el portaobjetos y a continuación determinar si un gen se amplifica en una muestra de tejido particular.

25

30

El documento WO 2005/076216 A2 divulga un procedimiento y un sistema para análisis de imagen de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) automatizado. Los parámetros de luminancia de una imagen digital de una muestra de tejido biológico a la que se ha aplicado un compuesto fluorescente se analizan para determinar regiones plurales de interés. Las señales de color fluorescente en las regiones plurales de interés que incluyen núcleos celulares plurales se identifican, clasifican y agrupan en grupos plurales. Cada uno de los grupos plurales se valida en base a condiciones predefinidas.

35

El documento WO2007/090683 A1 divulga una disposición de detección para detectar la presencia de un analito en una muestra. Los datos de imagen de un ensayo se analizan para generar un resultado de imagen. Los datos de imagen del ensayo se pueden manipular para permitir una discriminación más fácil entre diversas muestras.

40

El documento WO 2008/031228 A1 divulga un procedimiento para análisis automatizado de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) u otro análisis celular usando sondas colorimétricas discretas.

45 **SUMARIO**

Se proporciona un sistema basado en ordenador para detectar una amplificación de genes en una muestra de tejido de acuerdo con la reivindicación 1. Además, se proporcionan un procedimiento para la puntuación automatizada de una pieza de tejido de acuerdo con la reivindicación 6 y un analizador celular de acuerdo con la reivindicación 11.

50

Al menos algunos modos de realización de la tecnología divulgada se refieren a la construcción de un sistema de formación de imágenes para puntuar automáticamente piezas de tejido. El sistema selecciona núcleos candidatos para análisis cuantitativo. El sistema cuenta automáticamente las primeras señales de hibridación *in situ* y las segundas señales de hibridación *in situ*. Se puede determinar una proporción del recuento de las primeras señales con respecto al recuento de las segundas señales.

55

El sistema, en algunos modos de realización, incluye un sistema informático que cuenta automáticamente las primeras y segundas señales de hibridación. En determinados modos de realización, una o ambas de las primeras y segundas señales de hibridación son señales distintas de fluorescencia. Las señales distintas de fluorescencia pueden ser una señal de hibridación *in situ* con plata, una señal de hibridación *in situ* roja o similar. En algunos modos de realización, una señal es una señal de hibridación *in situ* con plata ("SISH") que indica un gen HER2 y otra señal es una señal de hibridación *in situ* roja que indica el cromosoma 17.

60

En algunos modos de realización, un sistema evalúa si se debe contar un rasgo característico de una imagen. El sistema puede usar al menos una métrica característica de imagen y al menos una métrica de morfología para determinar si un rasgo característico corresponde a un gen, proteína, cromosoma u otra estructura

65

anatómica de interés. Las métricas características de imagen pueden incluir, por ejemplo, color, balance de color, intensidad o similares. Las métricas de morfología pueden incluir, por ejemplo, tamaño de rasgo característico, color de rasgo característico, orientación de rasgo característico, forma de rasgo característico, relación o distancia entre rasgos característicos (por ejemplo, de rasgos característicos adyacentes), relación o distancia de un rasgo característico en relación con otra estructura anatómica, o similares. Se pueden usar métricas características de imagen, métricas de morfología y otras métricas para formar a un clasificador.

Un analizador de piezas basado en ordenador, en algunos modos de realización, está configurado para detectar un nivel de expresión para los rasgos característicos de interés en una imagen detectando rasgos característicos de imagen que representan rasgos característicos teñidos de interés. El color de los rasgos característicos teñidos se potencia y se filtra para producir una máscara que define áreas en la imagen que son genes, cromosomas, proteínas, material no genético u otros marcadores marcados. Se pueden usar métricas para evaluar rasgos característicos de imagen (por ejemplo, puntos, píxeles o ambos) correspondientes a los rasgos característicos de interés. Las métricas se envían a un clasificador que separa diferentes estructuras celulares.

Los genes o cromosoma pueden aparecer como puntos en la imagen de la pieza. El procesador, en algunos modos de realización, está programado para identificar genes y cromosomas evaluando al menos uno de una dimensión de punto, una forma de punto, una orientación de punto, una relación espacial entre una pluralidad de puntos y una relación espacial entre al menos un punto y otra estructura de tejido. En determinados modos de realización, el procesador está programado para medir las dimensiones y posiciones relativas de una pluralidad de puntos identificados como genes. El procesador también puede estar programado para medir las dimensiones y posiciones relativas de una pluralidad de puntos identificados como cromosomas.

La memoria puede almacenar instrucciones para evaluar la morfología de los núcleos celulares. Las instrucciones almacenadas pueden ser un algoritmo de morfología. El algoritmo de morfología se puede ejecutar para evaluar, por ejemplo, dimensiones, posiciones, forma y estructura del tejido o parte del mismo. En algunos modos de realización, se usa un algoritmo de morfología génica para evaluar señales correspondientes a genes, y se usa un algoritmo de morfología cromosómica para evaluar señales correspondientes a cromosomas.

Al combinar los valores L, a y b para cada píxel, se puede calcular una imagen en escala de grises. El sistema puede producir una máscara de puntos que representa los rasgos característicos probables de interés filtrando la imagen en color potenciada con varios filtros de diferencia gaussiana. El filtro y parámetros asociados se pueden seleccionar para dar una respuesta fuerte para los píxeles que aparecen como puntos de interés, en tamaño y forma, en la imagen y una respuesta mínima para todos los otros píxeles en la imagen. El sistema basado en ordenador se puede configurar para potenciar los colores de una amplia gama de rasgos característicos de interés, incluyendo genes, productos génicos, cromosomas, marcas, marcadores, proteínas o similares.

En algunos modos de realización, un analizador incluye memoria para almacenar una secuencia de instrucciones de programa y una imagen de una muestra de tejido que se ha teñido de modo que diferentes rasgos característicos de interés aparezcan de manera diferente en la imagen. El analizador está configurado para ejecutar las instrucciones para potenciar la apariencia de los rasgos característicos de interés, filtrar la imagen potenciada para detectar áreas que representan probablemente los diferentes rasgos característicos de interés en la imagen y medir una o más métricas para las áreas que representan los rasgos característicos de interés. En determinados modos de realización, las métricas incluyen métricas características de imagen o métricas de morfología, o ambas. Las métricas se pueden aplicar a un clasificador que determina si las áreas representan los rasgos característicos de interés. El analizador puede contar el número de rasgos característicos identificados diferentes en la imagen o parte de la misma.

En algunos modos de realización, un sistema informático se puede programar para determinar automáticamente cualquier área de interés. Los rasgos característicos candidatos se seleccionan en base a uno o más criterios de selección, incluyendo criterios basados en la morfología de la muestra (por ejemplo, morfología del componente celular, morfología celular, morfología del tejido, morfología de la estructura anatómica, etc.), rasgos característicos del tejido (por ejemplo, densidad, composición o similares), parámetros espaciales (por ejemplo, disposición de estructuras de tejido, posiciones relativas entre estructuras de tejido, etc.), parámetros característicos de imagen o similares. Si los rasgos característicos candidatos son núcleos, los criterios de selección pueden incluir, sin limitación, morfología del núcleo (por ejemplo, forma, dimensiones, composición, etc.), parámetros espaciales (por ejemplo, posición de los núcleos en la estructura celular, posición relativa entre los núcleos, etc.), rasgos característicos de imagen, combinaciones de los mismos o similares. Después de seleccionar los núcleos candidatos, se pueden usar algoritmos automáticamente para realizar un análisis cuantitativo para evaluar las proporciones de genes HER2/cromosomas 17. Un usuario, en algunos modos de realización, puede alterar manualmente las áreas de interés en base a la inspección visual de la imagen, si se desea. Se puede analizar un lote de portaobjetos sin intervención humana, si se desea. Se pueden puntuar áreas de interés. En algunos modos de realización,

el usuario puede eliminar cualquier área de interés por portaobjetos. Por ejemplo, un usuario puede determinar visualmente que un campo de visión seleccionado automáticamente no es adecuado para la puntuación. A continuación, el usuario puede eliminar el campo de visión seleccionado del procesamiento posterior.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El documento de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color se proporcionarán a la Oficina bajo petición y el pago de la tasa necesaria. Los mismos números de referencia se refieren a partes o acciones similares en todas las diversas vistas, a menos que se especifique de otro modo

10

la **FIGURA 1** muestra un sistema basado en ordenador para analizar piezas de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada;

15

la **FIGURA 2** muestra una pantalla de interfaz de usuario ("UI") ilustrativa que permite a un usuario ver los núcleos celulares seleccionados y los resultados de un análisis celular realizado por un sistema informático de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada;

20

la **FIGURA 3** ilustra una ventana de interfaz de usuario en la que se visualiza una célula junto con genes HER2 y cromosomas 17 detectados y las estadísticas calculadas para la célula que se producen de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada;

25

la **FIGURA 4** muestra un diagrama de flujo de trabajo de un procedimiento implementado por ordenador para analizar material nuclear celular de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada;

la **FIGURA 5** ilustra varias células seleccionadas, imágenes de máscara de puntos creadas a partir de las células y material genético detectado de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada;

30

la **FIGURA 6** es un diagrama de flujo de un procedimiento para analizar una pieza de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada; y

35

la **FIGURA 7** muestra un sistema para preparar y analizar piezas de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40

Al menos algunos modos de realización de la tecnología divulgada en el presente documento se refieren a sistemas informáticos y procedimientos para analizar material celular, en particular a sistemas para detectar genes sobreexpresados en células. Aunque los modos de realización ejemplares descritos en el presente documento detectan el nivel de expresión (por ejemplo, sobre o subexpresión) del gen HER2, se apreciará que la tecnología se puede usar para detectar otros genes o partes de los mismos en células, así como otros rasgos característicos de interés.

45

En la FIGURA 1 se muestra un analizador de piezas basado en ordenador para analizar piezas. Un sistema de análisis 10 incluye un aparato de formación de imágenes 12 y un sistema informático 14. Se pueden cargar portaobjetos de microscopio que portan una pieza en el aparato de formación de imágenes 12. El aparato de formación de imágenes 12 produce las imágenes de las piezas. Las imágenes se envían a un sistema informático 14 a través de una conexión directa o bien por medio de una red 20. El sistema informático 14 visualiza las imágenes a un usuario. El usuario (por ejemplo, un anatomopatólogo, un científico celular, un técnico de laboratorio o similar) puede seleccionar una o más áreas de la imagen para su evaluación. El sistema informático 14 puede ayudar al usuario puntuando las áreas con rasgos característicos de interés.

50

55

El aparato de formación de imágenes 12 puede incluir, sin limitación, uno o más dispositivos de captura de imágenes. Los dispositivos de captura de imágenes pueden incluir, sin limitación, una cámara (por ejemplo, una cámara analógica, una cámara digital, etc.), óptica (por ejemplo, una o más lentes, grupos de lentes de enfoque de sensor, objetivos de microscopio, etc.), sensores de imágenes (por ejemplo, un dispositivo de carga acoplada (CCD), un sensor de imagen de semiconductor de óxido metálico (CMOS) complementario o similar), película fotográfica o similar. En modos de realización digitales, el dispositivo de captura de imágenes puede incluir una pluralidad de lentes que cooperan para probar el enfoque sobre la marcha. Un sensor CCD puede capturar una imagen digital de la pieza. Un procedimiento de producción de una imagen digital incluye determinar un área de barrido que comprende una región del portaobjetos de microscopio que incluye al menos una parte de la pieza. El área de barrido se puede dividir en una pluralidad de instantáneas. Se puede producir una imagen combinando las instantáneas. En algunos modos de realización, el aparato de formación de imágenes 12 produce una imagen de alta resolución de la pieza completa.

65

El sistema informático 14 puede incluir un ordenador de escritorio, un ordenador portátil, una tableta o similar y puede incluir circuitos electrónicos digitales, *firmware*, *hardware*, memoria, un medio de almacenamiento informático, un programa informático, un procesador (incluyendo un procesador programado) o similar. El sistema informático ilustrado 14 de la FIGURA 1 es un ordenador de escritorio con una pantalla 16 y una torre 18. La torre 18 puede almacenar imágenes digitales en forma binaria. Las imágenes también se pueden dividir en una matriz de píxeles. Los píxeles pueden incluir un valor digital de uno o más bits, definido por la profundidad de bits. El valor digital puede representar, por ejemplo, energía, brillo, color, intensidad, sonido, elevación o un valor clasificado derivado del procesamiento de imágenes. Los formatos de imagen digital ejemplares no limitantes incluyen, pero no se limitan a, mapas de bits, grupo conjunto de expertos en fotografía (JPEG), formato de archivo de imagen con etiquetas (TIFF) y formato de intercambio de gráficos (GIF), así como otros formatos de datos digitales.

La red 20 o una conexión directa interconecta el aparato de formación de imágenes 12 y el sistema informático 14. La red 20 puede incluir, sin limitación, una o más puertas de enlace, enrutadores, puentes, combinaciones de los mismos o similares. La red 20 puede incluir uno o más servidores y uno o más sitios web que son accesibles para los usuarios y se pueden usar para enviar y recibir información que el sistema informático 14 puede utilizar. Un servidor puede incluir, sin limitación, una o más bases de datos asociadas para almacenar información (por ejemplo, imágenes digitales, algoritmos, protocolos de tinción o similares). La red 20 puede incluir, pero no se limita a, redes que usan el protocolo de control de transmisión (TCP), protocolo de datagramas de usuario (UDP), el protocolo de Internet (IP) y otros protocolos de datos.

La pieza puede ser una muestra de tejido mamario procesada de acuerdo con un protocolo de hibridación *in situ* ("ISH"). El protocolo ISH puede proporcionar visualización de secuencias de ácido nucleico específicas (por ejemplo, ADN, ARNm, etc.) en cortes de tejido congelados, cortes de tejido fijados/incluidos en parafina u otras preparaciones celulares hibridando hebras complementarias de nucleótidos (por ejemplo, sondas) a la secuencia de interés. El protocolo ISH puede incluir, sin limitación, un protocolo doble SISH y Red ISH, un único protocolo Red ISH, un único protocolo SISH o similares. Para determinar una proporción HER2/cromosoma 17, el aparato de formación de imágenes 12 captura imágenes que incluyen señales de hibridación *in situ* con plata, señales de hibridación *in situ* rojas, o similares. El tejido se puntúa en base a las señales correspondientes a genes HER2 y cromosomas 17 para determinar la proporción HER2/cromosomas 17. En base a la proporción, se determina que el gen HER2 de la pieza está amplificado o no amplificado. Para puntuar automáticamente la muestra de tejido mamario, se pueden seleccionar núcleos candidatos para análisis cuantitativo. El sistema informático 14 cuenta automáticamente diferentes rasgos característicos (por ejemplo, genes HER2, cromosomas 17, etc.) y determina la proporción del número de rasgos característicos. Se pueden puntuar núcleos adicionales. Se puede realizar un diagnóstico basado, al menos en parte, en las proporciones. Los resultados se pueden visualizar en la pantalla 16. Para evaluar si la muestra de tejido (por ejemplo, tejido mamario) es un carcinoma, el sistema informático 14 puede ayudar al usuario a obtener información sobre la región seleccionada, por ejemplo, detectando la amplificación de genes evaluando la proporción del número de señales de genes HER2 con respecto al número de señales de cromosoma 17. El término "detectar" como se usa en el presente documento incluye detección cuantitativa o detección cualitativa, o ambas. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido.

El sistema de análisis 10 puede realizar los procedimientos y técnicas analizados en relación con las FIGURAS 2-7. Los componentes y rasgos característicos del sistema de análisis 10 se pueden mezclar y combinar con otros componentes y rasgos característicos de los sistemas de las figuras 2-5 y 7.

La FIGURA 2 ilustra una parte de una pantalla de interfaz de usuario (UI) que permite al usuario interactuar con un analizador de piezas basado en ordenador que analiza células de acuerdo con la tecnología divulgada. Se puede preparar una pieza en forma de muestra de tejido por tinción usando un ensayo de cóctel, montando el tejido teñido en un portaobjetos y sometiendo a formación de imágenes el portaobjetos con un aparato de formación de imágenes de alta resolución que puede estar asociado con un sistema informático 100 o puede ser un componente o sistema separado. Una imagen digital en color de la muestra de tejido se almacena en un medio de almacenamiento legible por ordenador local o remoto (disco duro, memoria de estado sólido o similar) y se visualiza en una pantalla 110.

Una interfaz de usuario ilustrativa 200 creada por el sistema informático 100 se visualiza en la pantalla 110. La UI 200 incluye una ventana 202 que muestra la imagen de la muestra de tejido o una parte de la misma. Un usuario usa una herramienta de selección (ratón, palanca multimando, icono tal como una herramienta de lazo o una o más combinaciones de teclas u otro mecanismo) para seleccionar una parte del tejido visualizado en la imagen como campo de visión ("FOV"). Una vista ampliada del tejido dentro del campo de visión seleccionado se muestra en una ventana 210. El usuario puede seleccionar a continuación células/núcleos individuales con una herramienta de selección para análisis. Los límites seleccionados por el usuario ilustrados (ilustrados en verde) corresponden en general a membranas nucleares. Se pueden analizar partes de la imagen dentro de los límites. De forma alternativa, el sistema informático puede emplear un

algoritmo de detección de células/núcleos para seleccionar varias células. El algoritmo de detección puede determinar límites basados, por ejemplo, en parámetros característicos de la imagen, morfología del tejido, características del tejido, parámetros espaciales, combinaciones de los mismos o similares. Como se apreciará por los expertos en la técnica, el material genético detectado por la tecnología divulgada aparece en el núcleo de las células. Por lo tanto, los términos "célula" y "núcleo" y sus formas plurales se consideran sinónimos para los propósitos de la presente divulgación. Las células seleccionadas se resaltan en la ventana 210 delineando la célula con un color que se puede ver, sombreando el área de la célula u otros medios.

Las imágenes en color de células individuales que se seleccionan para análisis se visualizan en una bandeja de células 214 en la parte inferior de la UI 200. Si el usuario identifica manualmente las células, entonces se puede colocar una imagen de cada célula identificada en la bandeja de células 214. Si el sistema informático 100 identifica automáticamente las células, entonces se puede incluir una imagen de cada célula identificada automáticamente en la bandeja de células 214. De forma alternativa, el usuario puede confirmar manualmente la selección de una o más de las células identificadas automáticamente para incluirse en la bandeja de células 214.

La interfaz de usuario 200 también incluye una o más ventanas 216 que visualizan los resultados de un análisis calculado para los núcleos celulares que se incluyen en la bandeja de células 214. En un modo de realización, el análisis determina la proporción del número de genes HER2 frente al número de cromosomas 17 hallados para cada célula identificada en el FOV. Como se indica anteriormente, la proporción puede ser indicativa de determinados tipos de cáncer. Los resultados de la proporción HER2/cromosoma 17 determinada para cada célula identificada y el portaobjetos en su conjunto se almacenan en un registro para el portaobjetos correspondiente. Un usuario puede ver convenientemente la proporción HER2/cromosoma 17 sin contar visualmente los genes HER2 y cromosomas 17, lo que puede requerir mucho tiempo y ser tedioso y, por lo tanto, propenso a errores. El proceso de puntuación automatizado puede reducir el tiempo que lleva diagnosticar y por tanto incrementar el rendimiento del laboratorio. Adicionalmente, el proceso automatizado puede proporcionar una puntuación consecuente y fiable para potenciar la exactitud de la interpretación.

En un modo de realización, cada portaobjetos se marca con un código de barras, código legible por máquina (por ejemplo, un infoglifo o código de barras o uni o multidimensional, una etiqueta RFID, una rejilla de difracción de Bragg, una banda magnética o un código de barras nanométrico), o algún otro tipo de identificador detectable electrónicamente para, por ejemplo, hacer coincidir los resultados del análisis con un portaobjetos particular. Si el portaobjetos se reinserta en un aparato de formación de imágenes (incluyendo un visor de portaobjetos) del sistema informático, las estadísticas determinadas se pueden recuperar de los medios de almacenamiento legibles por ordenador y visualizar por el usuario. Además o de forma alternativa, el registro del análisis realizado para el tejido en el portaobjetos se puede transmitir a través de un enlace de comunicación por ordenador (por ejemplo, Internet) a un sistema informático remoto para visualización, almacenamiento o análisis. Dichos registros se pueden combinar con el análisis de otras muestras de tejido para una variedad de propósitos, tales como investigación médica, etc. El ordenador también puede producir uno o más informes sobre el análisis de tejidos para su inclusión en los registros de un paciente. Una vez que el análisis se realiza en las células que están incluidas en la bandeja de células 214, el usuario puede salir del análisis o puede seleccionar otro FOV en la imagen de la muestra de tejido.

La FIGURA 3 ilustra una ventana representativa 300 producida por la UI tras seleccionar una célula individual en la bandeja de células 214. La ventana 300 incluye una imagen 302 de la célula seleccionada junto con una pantalla 304 que indica el número de genes HER2 y cromosomas 17 detectado en la célula. Un usuario puede anular el número de genes HER2 o cromosomas 17 detectados automáticamente si lo desea. Varios controles 306 permiten al usuario guardar los resultados para la célula o cancelar. Los controles 308 permiten al usuario desplazarse a través de cada una de las células en la bandeja de células. Los controles 308 incluyen un botón de rebobinado para volver a la primera célula en la bandeja de células, un botón de retroceso para permitir al usuario volver a la célula previa en la bandeja de células, un botón de célula siguiente para permitir al usuario avanzar a la siguiente célula en la bandeja de células y un botón de avance rápido para permitir al usuario avanzar a la última célula en la bandeja de células. Un botón 310 permite al usuario eliminar la célula mostrada de la bandeja de células. Un botón 312 permite al usuario activar y desactivar un contorno del límite celular así como imágenes de puntos negros y rojos que indican la localización de genes HER2 y cromosomas 17 detectados, respectivamente, dentro del límite celular. Un botón 314 permite al usuario incluir las estadísticas que se han calculado para la célula en un informe para el portaobjetos. Finalmente, un botón 316 permite al usuario anular las estadísticas determinadas por ordenador para cualquier célula particular e introducir su propia estimación del número de genes HER2 y cromosomas 17 para la célula.

La FIGURA 4 muestra un diagrama de flujo de trabajo representativo de un procedimiento para analizar células de acuerdo con la tecnología divulgada. Aunque los actos mostrados se describen como realizados en un orden particular para facilitar la explicación, se apreciará que el orden de los actos se puede cambiar, se pueden omitir actos o realizar actos adicionales mientras todavía se obtiene la funcionalidad descrita.

En un modo de realización, los sistemas informáticos 14, 100 incluyen uno o más procesadores que se programan con una serie de instrucciones ejecutables por ordenador que se almacenan en un medio legible por ordenador no transitorio. Cuando se ejecutan, las instrucciones hacen que uno o más procesadores del sistema informático reciban una indicación de uno o más FOV de un usuario. En un modo de realización, a continuación el sistema informático ejecuta instrucciones que hacen que uno o más procesadores segmenten o identifiquen los límites de los núcleos celulares contenidos en el FOV seleccionado. En un modo de realización, el sistema informático 100 ejecuta instrucciones para identificar automáticamente los límites de los núcleos celulares. En otro modo de realización, los sistemas informáticos ejecutan instrucciones para recibir una indicación de los núcleos celulares de un usuario que usa la herramienta de selección. En un modo de realización, una imagen de cada núcleo celular identificado se coloca en la bandeja de células dentro de la interfaz de usuario 200.

Una vez se selecciona el número deseado de células para el análisis en la bandeja de células, el sistema informático ejecuta instrucciones para detectar señales (por ejemplo, puntos) dentro de cada núcleo celular identificado. En un modo de realización, en primer lugar se identifican puntos convirtiendo la imagen en color de una célula en una imagen monocromática. En un modo de realización, se crea la imagen monocromática transformando en primer lugar el espacio de color de la imagen en color de la célula de un espacio de color RGB a un espacio de color L^*a^*b . En el espacio de color L^*a^*b , el canal "L" representa el brillo de un píxel, el canal "a" refleja los componentes rojo y verde de un píxel, y el canal "b" representa los componentes azul y amarillo de un píxel. A continuación se crea una nueva imagen que enfatiza los colores rojo y negro en la imagen que se obtiene combinando linealmente los valores "L", "a" y "b" en cada localización de píxel.

Se detectan puntos en la imagen con rojo y negro potenciados ejecutando la imagen potenciada a través de varios filtros. En un modo de realización, los filtros son filtros de diferencia gaussiana ("DOG") donde cada tamaño de filtro se selecciona en base al tamaño esperado de los puntos/grupos de puntos que se van a detectar. En un modo de realización, el tamaño de los filtros DOG varía de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 5 micrómetros. Los resultados de cada pasada a través de los filtros DOG se combinan para crear una imagen en escala de grises filtrada que se usa como máscara para representar el material nuclear teñido y algo de "desecho" dentro de cada célula.

La imagen en escala de grises combinada se binariza a continuación usando, por ejemplo, una técnica de umbral adaptativo basada en el procedimiento de Otsu para producir una imagen de máscara de puntos donde todo lo que está fuera del punto tiene un valor binario (por ejemplo, un 0 lógico) y todo lo que está dentro de un punto tiene un valor binario opuesto (por ejemplo, un 1 lógico).

Una vez que se ha creado la imagen de máscara de puntos, se usa con un clasificador para eliminar cualquier punto asociado con desecho y dejar los puntos que representan genes HER2 y cromosomas 17. En un modo de realización, se usa un clasificador binario lineal, aunque otros clasificadores son igualmente aplicables. En la primera fase, usando el clasificador, el sistema informático ejecuta instrucciones para retirar puntos con respuestas DOG débiles basadas en un histograma de respuestas determinado para cada una de las células analizadas.

En una segunda etapa, los puntos rojos en negrita se separan de los puntos rojos tenues y los puntos negros se separan de los puntos azul oscuro analizando el color de la imagen RGB del tejido en localizaciones de píxeles que corresponden al área dentro de cada uno de los puntos en la imagen de máscara de puntos. El resultado es un conjunto de solo puntos rojos y negros. El resto de los puntos se consideran desecho y se eliminan. Los puntos y manchas de puntos se extraen a continuación usando un análisis de componentes conectados.

Para determinar si un punto representa un gen HER2 o un cromosoma 17, se miden y analizan múltiples métricas de los puntos (incluyendo manchas de puntos). Estas métricas incluyen tamaño, color, orientación, forma de punto, respuesta de los múltiples filtros de diferencia gaussiana, relación o distancia entre puntos adyacentes, y varios otros factores que se pueden medir por el ordenador. Las métricas se introducen a continuación en el clasificador. El clasificador se ha formado previamente en un conjunto de datos de formación que se han identificado positivamente por representar un gen HER2 o bien un cromosoma 17 por un anatomopatólogo, científico celular u otro individuo o máquina formados, incluyendo modelos informáticos de estas rasgos característicos nucleares.

En un modo de realización, el clasificador se ha formado en un conjunto de portaobjetos de formación que contienen un intervalo de variabilidad de puntos y se ha enseñado el modelo de clasificador binario de margen lineal para cada fase. El modelo resultante, parametrizado por un hiperplano discriminante, divide el espacio de rasgo característico en dos regiones marcadas que definen un gen HER2 o bien un cromosoma 17.

Una vez se ha formado el clasificador, las métricas medidas para los puntos desconocidos en la imagen se aplican al clasificador. El clasificador puede indicar a continuación qué tipo de punto (por ejemplo, gen HER2 o cromosoma 17) se representa.

Una vez se han clasificado los puntos, se cuentan por el sistema informático. Si el sistema informático determina que el tamaño del punto está en la escala de un tamaño de punto único nominal, entonces el punto se cuenta como un punto de HER2 o bien un punto de cromosoma 17, como se marque por el clasificador. Si el punto es más grande que el tamaño de punto único nominal, entonces el sistema informático determina el área del grupo y lo divide entre el área de un punto nominal para determinar cuántos puntos se incluyen probablemente en el grupo de puntos. La proximidad de los puntos clasificados como HER2 y cromosoma 17 se usa en el algoritmo de conteo.

Una vez que se han clasificado y contado los puntos, los resultados se cuentan por célula y por FOV. Se calcula una proporción de los tipos de puntos y se visualiza para cada célula y portaobjetos como conjunto. En base a la proporción, se puede determinar que el nivel de expresión es una sobreexpresión, subexpresión, etc. En un modo de realización, una muestra de tejido se identifica como sobreexpresada si la proporción de genes HER2 con respecto a cromosomas 17 en la muestra de tejido excede, por ejemplo, 2,2. Dichos genes HER2 sobreexpresados pueden indicar carcinoma.

Los sistemas informáticos 14, 100 pueden ejecutar un algoritmo de morfología para evaluar uno o más rasgos característicos en la imagen. Un algoritmo de morfología genética puede evaluar señales en la imagen en color, por ejemplo, midiendo una o más de las dimensiones de punto, evaluando una forma de punto, evaluando una orientación de punto, evaluando la relación espacial entre una pluralidad de puntos y evaluando la relación espacial entre al menos un punto y otra estructura anatómica de la muestra de tejido. La salida se puede enviar a un clasificador que determina si la señal representa un gen. Se pueden usar otros tipos de algoritmos de morfología para identificar otros rasgos característicos del tejido. Las salidas se pueden enviar a un clasificador.

Los modos de realización de la materia objeto y las operaciones descritas en la presente memoria descriptiva se pueden implementar en circuitos electrónicos digitales, o en *software*, *firmware* o *hardware* de ordenador, incluyendo las estructuras divulgadas en la presente memoria descriptiva y sus equivalentes estructurales, o en combinaciones de uno o más de ellos. Los modos de realización de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva se pueden implementar como uno o más programas informáticos, es decir, uno o más módulos de instrucciones de programa informático, codificados en un medio de almacenamiento informático para ejecución o para controlar la operación del aparato de procesamiento de datos.

Un medio de almacenamiento informático puede ser, o se puede incluir en, un dispositivo de almacenamiento legible por ordenador, un sustrato de almacenamiento legible por ordenador, un dispositivo o matriz de memoria de acceso aleatorio o en serie, o una combinación de uno o más de ellos. Además, aunque un medio de almacenamiento informático no es una señal propagada, un medio de almacenamiento informático puede ser una fuente o destino de instrucciones de programa informático codificadas en una señal propagada generada artificialmente. El medio de almacenamiento informático también puede ser, o se puede incluir en, uno o más componentes o medios físicos separados (por ejemplo, múltiples CD, discos u otros dispositivos de almacenamiento). Las operaciones descritas en la presente memoria descriptiva se pueden implementar como operaciones realizadas por un aparato de procesamiento de datos en datos almacenados en uno o más dispositivos de almacenamiento legibles por ordenador o recibidos de otras fuentes.

El término "procesador programado" engloba todas las clases de aparatos, dispositivos y máquinas para procesar datos, incluyendo a modo de ejemplo un microprocesador programable, un ordenador, un sistema en un chip, o múltiples, o combinaciones, de los anteriores. El aparato puede incluir circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de compuerta programable en campo) o un ASIC (circuito integrado específico de la aplicación). El aparato también puede incluir, además del *hardware*, código que crea un entorno de ejecución para el programa informático en cuestión, por ejemplo, código que constituye el *firmware* del procesador, una pila de protocolos, un sistema de gestión de bases de datos, un sistema operativo, un entorno en tiempo de ejecución multiplataforma, una máquina virtual o una combinación de uno o más de ellos. El aparato y el entorno de ejecución pueden realizar diversas infraestructuras de modelos informáticos diferentes, tales como servicios web, infraestructuras de computación distribuidas y computación en malla.

Un programa informático (también conocido como programa, *software*, aplicación de *software*, comando o código) se puede escribir de cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, lenguajes declarativos o de procedimiento, y se puede implementar de cualquier forma, incluyendo como un programa independiente o como un módulo, componente, subrutina, objeto u otra unidad adecuada para su uso en un entorno informático. Un programa informático puede corresponder, aunque no necesariamente, a un archivo en un sistema de archivos.

Un programa se puede almacenar en una parte de un archivo que contiene otros programas o datos (por ejemplo, uno o más comandos almacenados en un documento de lenguaje de marcado), en un único archivo dedicado al programa en cuestión o en múltiples archivos coordinados (por ejemplo, archivos que almacenan

uno o más módulos, subprogramas o partes de código). Un programa informático se puede implementar para ejecutarse en un ordenador o en múltiples ordenadores que se localizan en un sitio o se distribuyen a través de múltiples sitios y se interconectan por una red de comunicación.

5 Los procesos y flujos lógicos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden realizar por uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas informáticos para realizar acciones operando en datos de entrada y generando salida. Los procesos y flujos lógicos también se pueden realizar por, y el aparato también se puede implementar como, circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de compuerta programable en campo) o un ASIC (circuito integrado específico de la aplicación).

10

Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa informático incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores de propósito tanto general como especial, y uno cualquiera o más procesadores de cualquier clase de ordenador digital. En general, un procesador recibirá instrucciones y datos de una memoria de solo lectura o una memoria de acceso aleatorio o ambas. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para realizar acciones de acuerdo con instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. En general, un ordenador también incluirá, o se acoplará operativamente para recibir datos o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar datos, por ejemplo, discos magnéticos, magnetoópticos o discos ópticos. Sin embargo, un ordenador no necesita tener dichos dispositivos. Además, un ordenador se puede integrar en otro dispositivo, por ejemplo, un teléfono móvil, un asistente digital personal (PDA), un reproductor de audio o video móvil, una consola de juegos, un receptor de sistema de posicionamiento global (GPS) o un dispositivo de almacenamiento portátil (por ejemplo, una unidad *flash* de bus serie universal (USB)), por nombrar solo algunos. Los dispositivos adecuados para almacenar instrucciones y datos de programa informático incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo a modo de ejemplo dispositivos de memoria de semiconductores, por ejemplo, EPROM, EEPROM y dispositivos de memoria *flash*; discos magnéticos, por ejemplo, discos duros internos o discos extraíbles; discos magnetoópticos; y discos CD-ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria se pueden complementar por, o incorporar en, un circuito lógico de propósito especial.

15

20

25

30

Para proporcionar interacción con un usuario, los modos de realización de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva se pueden implementar en un ordenador que tenga un dispositivo de visualización (por ejemplo, una pantalla LCD (pantalla de cristal líquido), LED (diodo emisor de luz) u pantalla OLED (dispositivo emisor de luz orgánico) para visualizar información al usuario y un teclado y un dispositivo señalador, por ejemplo, un ratón o una rueda de desplazamiento, por los que el usuario puede proporcionar entrada de información al ordenador. En algunas implementaciones, se puede usar una pantalla táctil para visualizar información y recibir la entrada de información de un usuario. También se pueden usar otras clases de dispositivos para proporcionar interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensorial, por ejemplo, retroalimentación visual, retroalimentación auditiva o retroalimentación táctil; y la entrada del usuario se puede recibir de cualquier forma, incluyendo entrada acústica, de voz o táctil. Además, un ordenador puede interactuar con un usuario enviando documentos a y recibiendo documentos de un dispositivo que se usa por el usuario; por ejemplo, enviando páginas web a un navegador en el dispositivo cliente de un usuario en respuesta a solicitudes recibidas del navegador.

35

40

45

Los modos de realización de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva se pueden implementar en un sistema informático que incluye un componente de soporte, por ejemplo, como un servidor de datos, o que incluye un componente de *middleware*, por ejemplo, un servidor de aplicaciones, o que incluye un componente frontal, por ejemplo, un ordenador de cliente que tenga una interfaz de usuario gráfica o un navegador a través del que un usuario pueda interactuar con una implementación de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva, o cualquier combinación de uno o más de dichos componentes de soporte, *middleware* o frontales. Los componentes del sistema se pueden interconectar por cualquier forma o medio de comunicación de datos digitales, por ejemplo, una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), una red entre redes (por ejemplo, Internet) y redes unidad a unidad (por ejemplo, redes unidad a unidad *ad hoc*). Por ejemplo, la red 20 de la FIGURA 1 puede incluir una o más redes de área local.

50

55

El sistema informático puede incluir cualquier número de clientes y servidores. Un cliente y un servidor en general están alejados entre sí y típicamente interactúan a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de programas informáticos que se ejecutan en los ordenadores respectivos y que tienen una relación cliente-servidor entre sí. En algunos modos de realización, un servidor transmite datos (por ejemplo, una página HTML) a un dispositivo cliente (por ejemplo, para propósitos de visualización de datos a y recepción de entrada de usuario de un usuario que interactúa con el dispositivo cliente). Los datos generados en el dispositivo cliente (por ejemplo, un resultado de la interacción del usuario) se pueden recibir desde el dispositivo cliente en el servidor.

60

65

La FIGURA 6 es un diagrama de flujo 400 de un procedimiento para analizar una pieza. En 402, se

seleccionan rasgos característicos candidatos en una imagen de una pieza de tejido. Los rasgos característicos candidatos se pueden seleccionar por un sistema informático o un usuario.

En 410, se identifican las señales. En el análisis de la proporción HER2/cromosoma 17, una primera señal de hibridación *in situ* (por ejemplo, un punto) indica un gen HER2 y una segunda señal de hibridación *in situ* (por ejemplo, un punto) indica un cromosoma 17. Se pueden contar estas diferentes señales de hibridación.

En 412, se evalúa la relación entre las señales. En determinados modos de realización, se determina la proporción de las señales contadas. Se pueden evaluar otros tipos de relaciones entre las señales.

El procedimiento 400 se puede repetir cualquier número de veces para evaluar cualquier área de interés deseada. El sistema informático puede determinar el área de interés en base a métricas, incluyendo métricas características de imagen, métricas de morfología, combinaciones de las mismas o similares. Para un área o áreas de interés, se puede determinar un puntaje agregado, un puntaje promedio u otro tipo de puntaje. Basándose al menos en parte en el puntaje, un anatomopatólogo puede realizar un diagnóstico.

La FIGURA 7 muestra un sistema de análisis 10 que puede realizar la preparación de tejido por puntuación. Un aparato de procesamiento de piezas 210 puede realizar uno o más procesos de preparación en una pieza. El proceso de preparación puede incluir, sin limitación, desparafinar una pieza, acondicionar una pieza (por ejemplo, acondicionamiento celular), teñir una pieza, realizar la recuperación de antígeno, realizar tinción inmunohistoquímica (incluyendo marcaje) u otras reacciones, y/o realizar hibridación *in situ* (por ejemplo, SISH, FISH, etc.) tinción (incluyendo marcaje) u otras reacciones, así como otros procesos para preparar piezas para microscopía, microanálisis, procedimientos de espectrometría de masas u otros procedimientos analíticos.

Una pieza puede incluir una muestra de tejido. La muestra de tejido puede ser cualquier sustancia líquida, semisólida o sólida en o sobre la que puede estar presente una diana. En particular, una muestra de tejido puede ser una muestra biológica o una muestra de tejido obtenida de un tejido biológico. El tejido puede ser una colección de células interconectadas que realizan una función similar dentro de un organismo. En algunos ejemplos, la muestra biológica se obtiene de un sujeto animal, por ejemplo, un sujeto humano. Una muestra biológica puede ser cualquier muestra sólida o fluida obtenida de, excretada por o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo sin limitación, organismos unicelulares, tales como bacterias, levaduras, protozoos y amebas, entre otros, organismos multicelulares (tales como plantas o animales, incluyendo muestras de un sujeto humano sano o aparentemente sano o de un paciente humano afectado por una afección o enfermedad que se va a diagnosticar o investigar, tal como cáncer). Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un líquido biológico obtenido de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (inflamación), o líquido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una pieza de biopsia o necropsia, tal como una biopsia tumoral) o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o una célula cultivada) o un medio acondicionado por cualquier célula o tejido u órgano. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un extracto nuclear. En determinados ejemplos, una muestra es una muestra de control de calidad, tal como una de las muestras de corte de sedimento celular divulgadas. En otros ejemplos, una muestra es una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba es una célula, un corte de tejido o sedimento celular preparado a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es uno que está en riesgo de sufrir o que ha contraído una afección o enfermedad particular. En algunos modos de realización, la pieza es tejido mamario.

El aparato de procesamiento 210 puede aplicar fijadores a la pieza. Los fijadores pueden incluir agentes de reticulación (tales como aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de reticulación no aldehídicos), agentes oxidantes (por ejemplo, iones metálicos y complejos, tales como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro mercurico, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, Methacarn, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y fijadores diversos (por ejemplo, fijación con volumen excluido y fijación con vapor).

Si la pieza es una muestra incluida en parafina, la muestra se puede desparafinar usando fluido(s) de desparafinado apropiado(s). Después de que el eliminador de desechos elimine el/los fluido(s) de desparafinado, se puede aplicar sucesivamente cualquier número de sustancias a la pieza. Las sustancias pueden ser para pretratamiento (por ejemplo, reticulación de proteínas, exposición de ácidos nucleicos, etc.), desnaturización, hibridación, lavado (por ejemplo, lavado de restricción), detección (por ejemplo, unir una molécula visual o marcadora a una sonda), amplificación (por ejemplo, amplificación de proteínas, genes, etc.), contratinción, cobertura de cubreobjetos o similares.

El aparato de procesamiento de piezas 210 puede aplicar una amplia gama de sustancias a la pieza. Las

sustancias incluyen, sin limitación, colorantes, sondas, reactivos, enjuagues y/o acondicionadores. Las sustancias pueden ser fluidos (por ejemplo, gases, líquidos o mezclas de gas/líquido), o similares. Los fluidos pueden ser disolventes (por ejemplo, disolventes polares, disolventes no polares, etc.), soluciones (por ejemplo, soluciones acuosas u otros tipos de soluciones) o similares. Los reactivos pueden incluir, sin limitación, colorantes, agentes humectantes, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, etc.), fluidos de recuperación de antígenos (por ejemplo, soluciones de recuperación de antígenos de base acuosa o no acuosa, tampones de recuperación de antígenos, etc.), o similares.

Las sondas pueden ser un ácido nucleico aislado o un oligonucleótido sintético aislado, unido a un marcador detectable o molécula indicadora. Los marcadores pueden incluir isótopos radioactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas. Por ejemplo, las sondas pueden incluir, sin limitación, un resto de unión específica marcado con hapteno, una sonda de ADN (por ejemplo, una sonda de ADN marcada con DNP), un compuesto de nitroarilo, dinitrofenol, un compuesto aromático carente de electrones, una solución de hibridación de sonda, u otro tipo de sondas ISH. ISH puede implicar una hebra de ARN o ADN complementaria marcada (es decir, sonda) para localizar una secuencia de ARN o ADN específica o en una parte o corte de tejido (*in situ*), o, si el tejido es lo suficientemente pequeño, en todo el tejido (ISH de preparación microscópica completa).

En algunos modos de realización, un ensayo de cóctel aplicado por el aparato de procesamiento 210 incluye diferentes reactivos. Por ejemplo, un ensayo de cóctel incluye el kit ULTRAVIEW SISH Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-001), la INFORM HER2 DNA Probe (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4332), el anticuerpo Rabbit Anti-DNP Antibody (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4335), el anticuerpo Rabbit Anti-HER2 (4B5) Antibody (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-2996), el kit ULTRAVIEW Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 760-501), tel lavado de plata (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-002), y/o la sonda INFORM Chromosome 17 Probe (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4331). Otro ensayo de cóctel es la sonda INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe vendido por (Ventana Medical Systems, Inc.), que incluye el cóctel INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-4422), HybReady (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4409), el kit ultraView SISH DNP Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-098), el kit ultraView Red ISH DIG Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-505), el kit ultraView Siler Wash II (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-003), y/o los portaobjetos HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 783-4332). Se pueden usar otros ensayos de cóctel. Se pueden usar ensayos de cóctel para detectar cuantitativamente la amplificación del gen HER2 por medio de ISH cromogénico de dos colores en piezas de tejido fijadas con formol e incluidas en parafina de cáncer de mama y cáncer gástrico humano, incluyendo la unión gastroesofágica, y pueden ser una ayuda en la evaluación de pacientes para quienes Herceptin (trastuzumab) puede ser una opción de tratamiento. Aún en otros protocolos, el ensayo de cóctel es el ensayo VENTANA HER2 DNA Probe Assay vendido por Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-4422. La solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/809.024 (correspondiente a la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/299555) titulada MULTICOLOR CHROMOGENIC DETECTION OF BIOMAKERS y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/809.024 (correspondiente a la publicación de patente de EE. UU. n.º 2011/0136130) titulada METHOD FOR CHROMOGENIC DETECTION OF TWO OR MORE TARGET MOLECULES IN A SINGLE SAMPLE divulgan sustancias, protocolos y técnicas de procesamiento de piezas.

El aparato de procesamiento de piezas 210 puede ser un aparato automatizado, tal como el instrumento BENCHMARK XT y el instrumento SYMPHONY vendidos por Ventana Medical Systems, Inc. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de varios patentes de Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de EE. UU. n.ºs 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y las solicitudes de patente publicadas de EE. UU. n.ºs 20030211630 y 20040052685. De forma alternativa, las piezas se pueden procesar manualmente.

Después de que se procesan las piezas, un usuario puede transportar los portaobjetos que portan piezas al aparato de formación de imágenes 12. Se puede abrir una puerta 13 para cargar el aparato 12. Se usa un dispositivo de entrada 17 (ilustrado como un panel de control) para operar el aparato 12. El aparato de formación de imágenes 12 puede ser un generador de imágenes de campo claro u otro tipo de escáner de portaobjetos. Un generador de imágenes de campo claro es el escáner de campo claro iScan Coreo™ vendido por Ventana Medical Systems, Inc. En modos de realización automatizados, el aparato de formación de imágenes 12 es un dispositivo de patología digital como se divulga en la solicitud de patente internacional n.º: PCT/US2010/002772 (publicación de patente n.º: WO/2011/049608) titulada IMAGING SYSTEM AND TECHNIQUES o como se divulga en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 61/533.114, presentada el 9 de septiembre de 2011, titulada IMAGING SYSTEMS, CASSETTES, AND METHODS OF USING THE SAME. Solicitud de patente internacional n.º PCT/US2010/002772 y solicitud de patente de EE. UU. n.º 61/533.114. En otros modos de realización, el aparato de formación de imágenes 12 incluye una cámara digital acoplada a un microscopio.

Un usuario puede usar el sistema informático 14 de la figura 7 para controlar el aparato de procesamiento

210 y seleccionar una imagen de una base de datos de imágenes de portaobjetos digitalizadas. El usuario puede seleccionar una o más áreas de interés para el análisis. El sistema informático 14 cuenta automáticamente las señales en cada área de interés para determinar si está presente un número suficiente de señales SISH y señales Red ISH para una estimación suficientemente exacta de la proporción HER2/cromosoma 17. Los resultados se visualizan al usuario. Si el usuario decide proceder con un análisis de cualquier área específica de interés, el usuario tiene la opción de seleccionar el conjunto de núcleos que se incluirán en la estimación o bien usar un algoritmo para identificar automáticamente los núcleos candidatos. El usuario puede eliminar cualquier núcleo candidato identificado en uso por el algoritmo. En algunos modos de realización, se analiza una imagen completa de la pieza para análisis cualitativo. Se puede determinar un recuento global para la pieza. A continuación, el usuario puede determinar si enfoca el análisis en determinadas áreas de la pieza.

Cada uno de los núcleos seleccionados se examina para detectar señales SISH y Red ISH. La proporción de SISH con respecto a Red ISH se estima para cada núcleo. Las señales SISH y Red ISH halladas en los núcleos seleccionados se combinan para formar una proporción HER2/cromosoma 17 para todo el área de interés. El usuario puede aceptar el resultado como anotación oficial para esa muestra. De forma alternativa, el usuario puede descartar el resultado y reiniciar el proceso en base a, por ejemplo, un conjunto diferente de núcleos, una nueva área de interés o similares. En todo el proceso, los resultados en forma de números o imágenes se visualizan al usuario. En base a los resultados, el usuario puede intervenir o continuar. Además de este enfoque interactivo o asistido por el usuario, el sistema informático 14 puede analizar automáticamente cada área sin ninguna intervención humana. El usuario puede controlar la operación del aparato de procesamiento de piezas 210 en base al análisis para mejorar el procesamiento de piezas posterior.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema basado en ordenador (14) para detectar una amplificación de genes en una muestra de tejido, que comprende:

- una memoria para almacenar una secuencia de instrucciones de programa; y
- un procesador programable que está configurado para ejecutar las instrucciones para:
 - recibir una imagen en color de una muestra de tejido, en la que genes y cromosomas de un núcleo celular están teñidos de manera diferente en la imagen en color;
 - identificar genes y cromosomas de un núcleo celular en una nueva imagen en base a la morfología del núcleo celular; y
 - determinar una proporción de los genes identificados y los cromosomas para determinar la amplificación del gen en la muestra de tejido;

caracterizado por que el procesador está programado además para potenciar el color de los genes y los cromosomas en la imagen en color de la muestra de tejido convirtiendo la imagen en color de un espacio de color RGB en un espacio de color L^*a^*b , creando de este modo una imagen en color potenciada, y para calcular una combinación lineal de L, a, b para cada píxel en la imagen en color potenciada, creando de este modo una nueva imagen que enfatiza los colores rojo y negro en la imagen.

2. El sistema basado en ordenador (14) de la reivindicación 1, en el que la nueva imagen incluye al menos un punto, en el que el procesador está programado para identificar los genes y cromosomas evaluando al menos una de una dimensión de punto, una forma de punto, una orientación de punto, una relación espacial entre una pluralidad de puntos y una relación espacial entre al menos un punto y otra estructura anatómica de la muestra de tejido.

3. El sistema basado en ordenador (14) de la reivindicación 1, en el que el procesador está programado para producir una máscara de puntos que representa genes y cromosomas probables filtrando la nueva imagen con varios filtros de diferencia gaussiana.

4. El sistema basado en ordenador (14) de la reivindicación 3, en el que el procesador está programado para determinar si un punto representa un gen o un cromosoma analizando los píxeles en la nueva imagen de la célula dentro del área de un punto calculando métricas del punto y/o los píxeles y suministrando las métricas a un clasificador que está formado para separar genes de cromosomas en base a una o más de las métricas determinadas.

5. El sistema basado en ordenador (14) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procesador está configurado para determinar varias métricas para regiones teñidas de la muestra de tejido y para suministrar las métricas a un clasificador que identifica si las regiones teñidas representan los genes o cromosomas en una célula.

6. Un procedimiento para la puntuación automatizada de una pieza de tejido, que comprende:

- a) seleccionar núcleos candidatos en la pieza de tejido para análisis cuantitativo de una imagen digital de la pieza de tejido;
- b) contar automáticamente, con la ayuda de un ordenador (14), una primera señal de hibridación *in situ* y una segunda señal de hibridación *in situ* de la imagen digital, refiriéndose la primera y segunda señales de hibridación *in situ* a genes y cromosomas de un núcleo celular, respectivamente; y
- c) estimar una proporción de los recuentos de las primeras y segundas señales de hibridación *in situ*, determinando de este modo una proporción de los genes y los cromosomas identificados para determinar la amplificación del gen en la muestra de tejido e informar de la proporción,

en el que un procesador programable del ordenador (14), para contar automáticamente, está configurado para ejecutar las siguientes instrucciones:

- recibir una imagen en color digital de la pieza de tejido, en la que genes y cromosomas de un núcleo celular están teñidos de manera diferente en la imagen en color; e
- identificar los genes y cromosomas del núcleo celular en una nueva imagen en base a la morfología del núcleo celular;

- 5 caracterizado por que el procesador está programado además para potenciar el color de los genes y los cromosomas en la imagen en color de la muestra de tejido convirtiendo una imagen de una célula de un espacio de color RGB en un espacio de color L^*a^*b , creando de este modo una imagen en color potenciada, y para calcular una combinación lineal de L, a, b para cada píxel en la imagen en color potenciada, creando de este modo una nueva imagen que enfatiza los colores rojo y negro en la imagen.
- 10 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la primera señal de hibridación *in situ* comprende una señal de hibridación *in situ* con plata y en el que la segunda señal de hibridación *in situ* comprende una señal de hibridación *in situ* roja.
- 15 8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que los núcleos candidatos se seleccionan automáticamente.
- 20 9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la pieza de tejido comprende una pieza de cáncer de mama, y en el que el procedimiento comprende además una etapa d) de amplificar un gen HER2 presente en la pieza de tejido.
10. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que las etapas a) a c) se realizan en un primer campo de visión en la imagen digital y en el que el procedimiento comprende además repetir las etapas a) a c) para un segundo campo de visión de la imagen digital.
11. Un analizador celular (10), que comprende:
- 25 - un sistema basado en ordenador (14) para detectar una amplificación de genes en una muestra de tejido, siendo dicho sistema basado en ordenador (14) el sistema basado en ordenador (14) de una de las reivindicaciones 1 a 4; y
- 30 - un aparato de formación de imágenes (12) para producir una imagen de la muestra de tejido.
12. El analizador celular (10) de la reivindicación 11,
- 35 en el que la etapa de identificar genes y cromosomas del núcleo celular comprende ejecutar instrucciones para
- 40 - filtrar la imagen potenciada para detectar áreas que representan probablemente genes y cromosomas en la imagen,
- medir varias métricas para las áreas que representan probablemente genes y cromosomas en la imagen, y
- 45 - aplicar las métricas a un clasificador que determina si las áreas representan genes o cromosomas; y
- en el que la etapa de determinar una proporción de los genes y los cromosomas identificados para determinar la amplificación del gen en la muestra de tejido comprende ejecutar instrucciones para
- contar los genes y cromosomas identificados en la imagen.

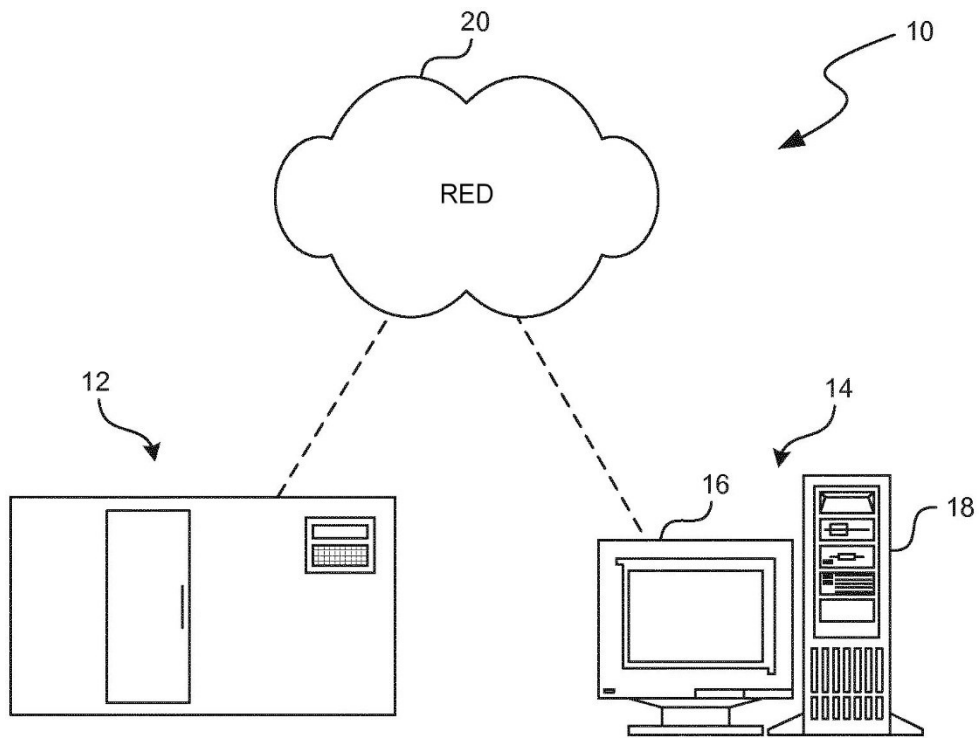


FIG. 1

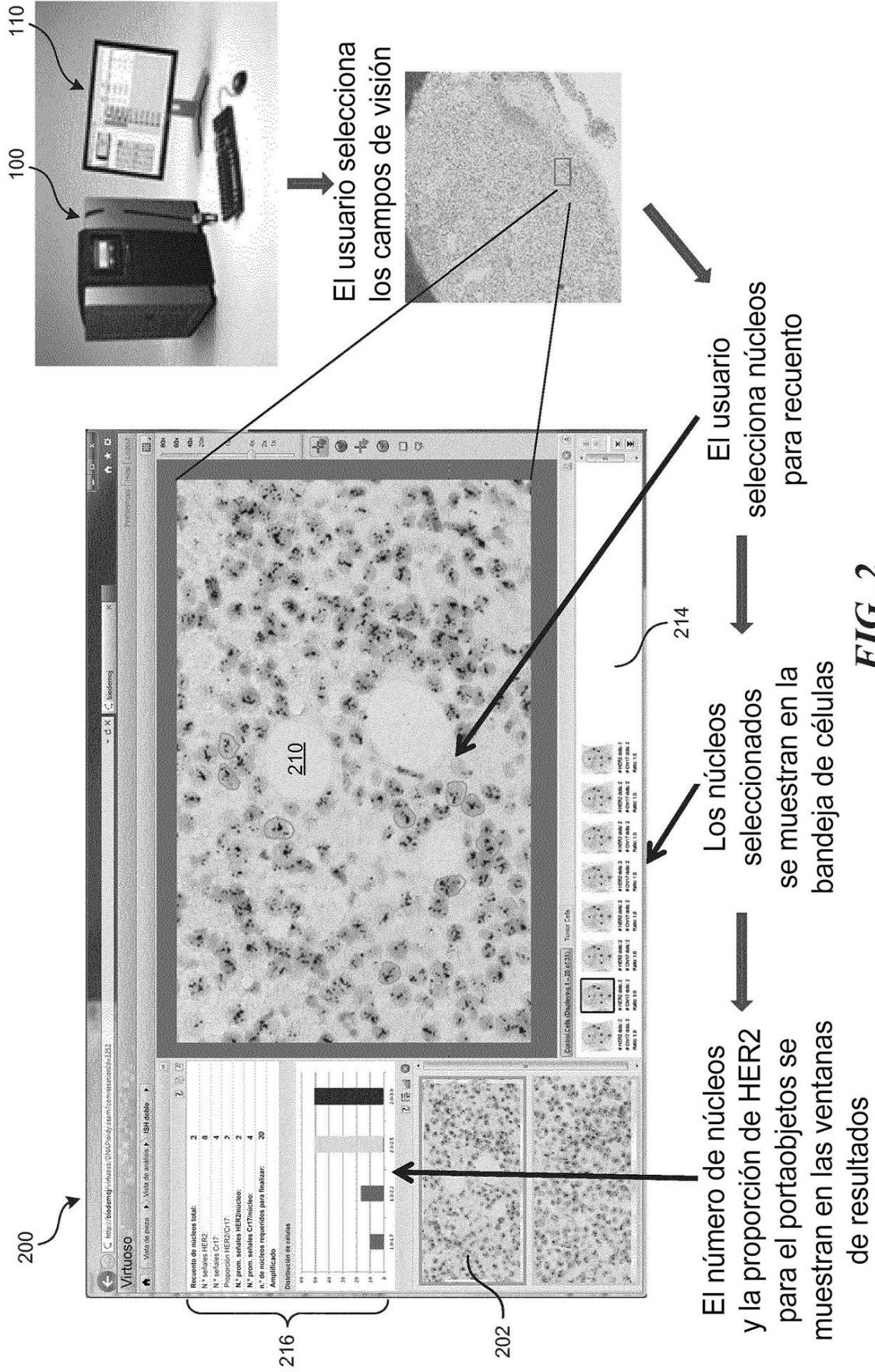
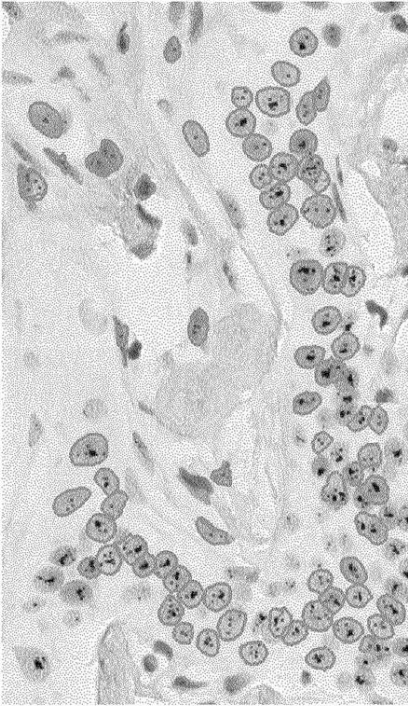
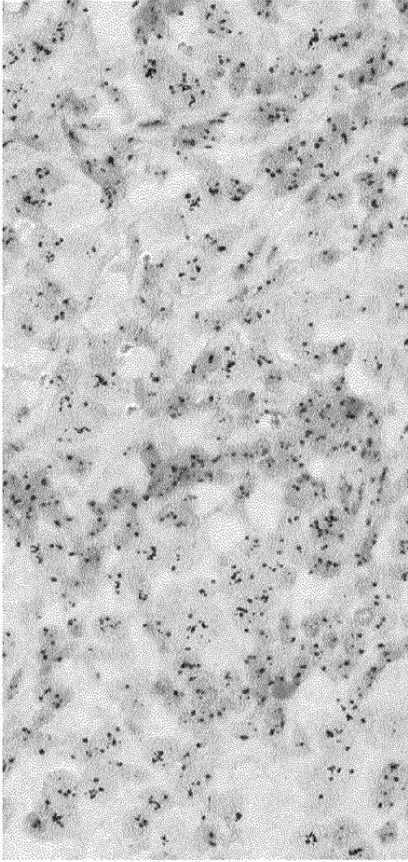


FIG. 2

Segmentación de células asistida por ordenador



Automatizada



Manual

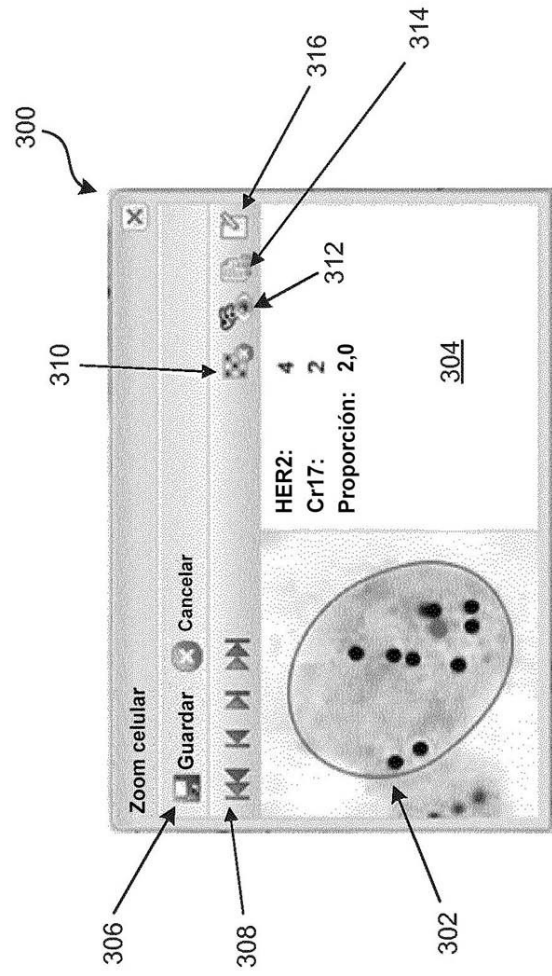


FIG. 3

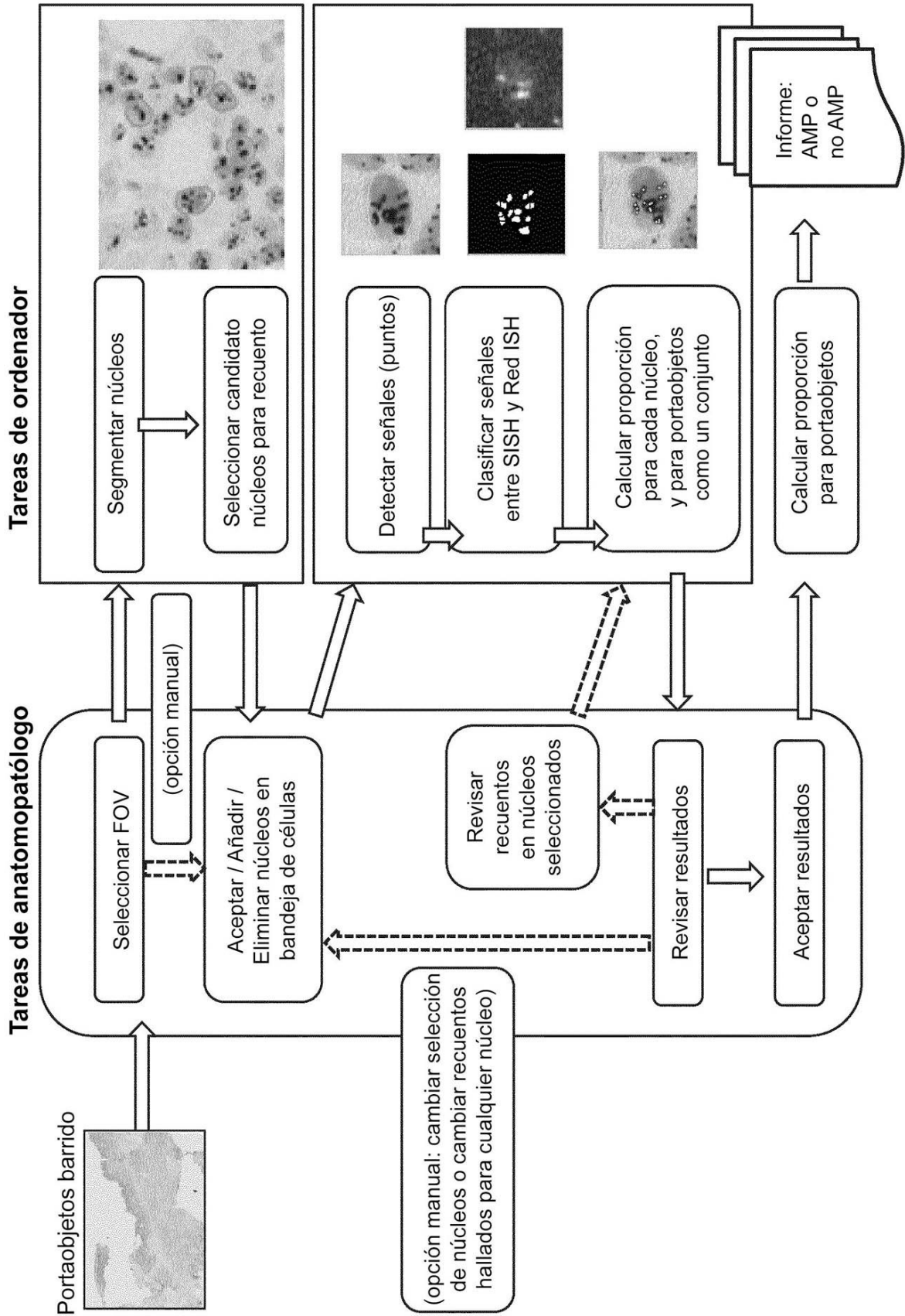


FIG. 4

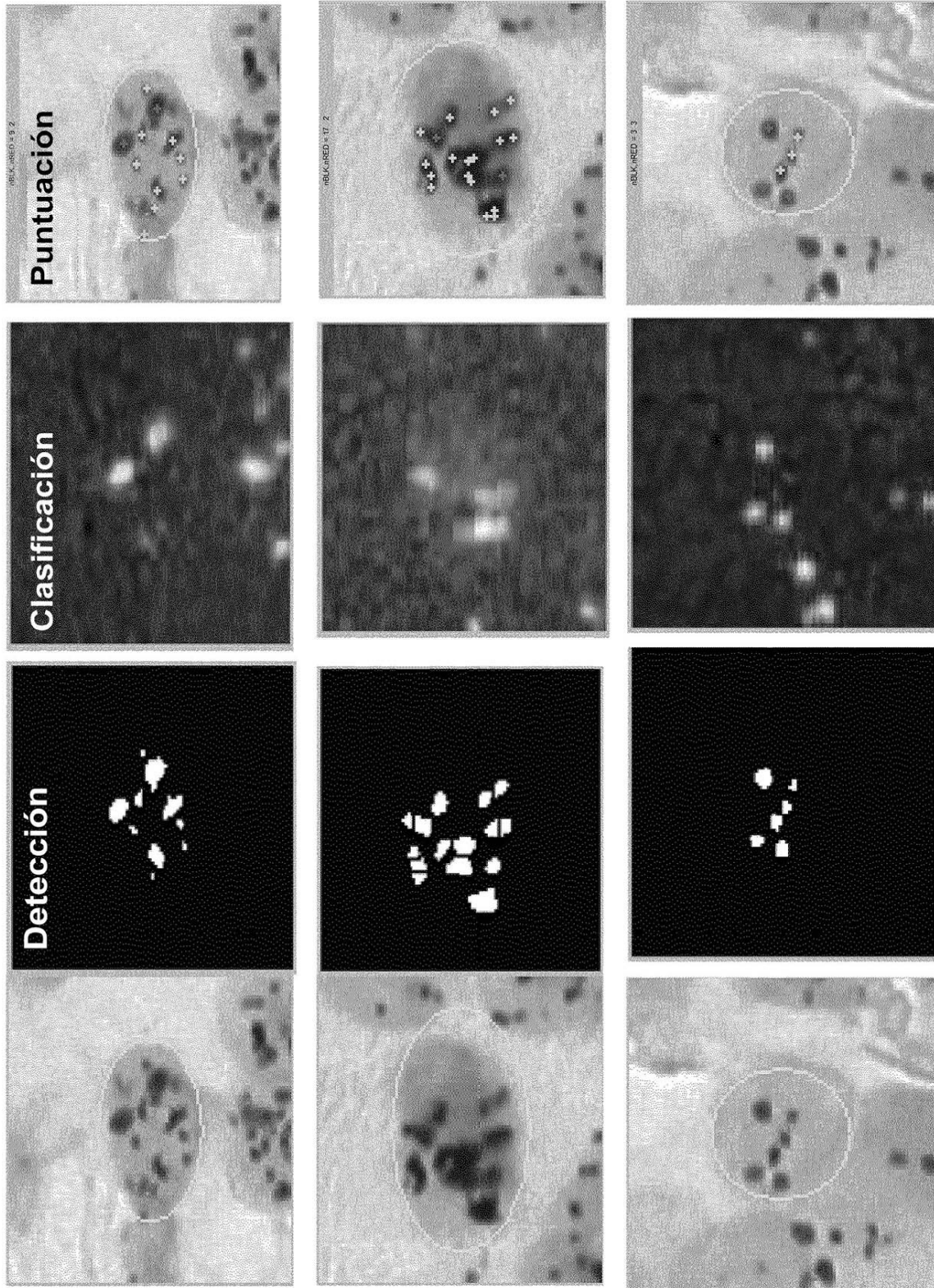


FIG. 5

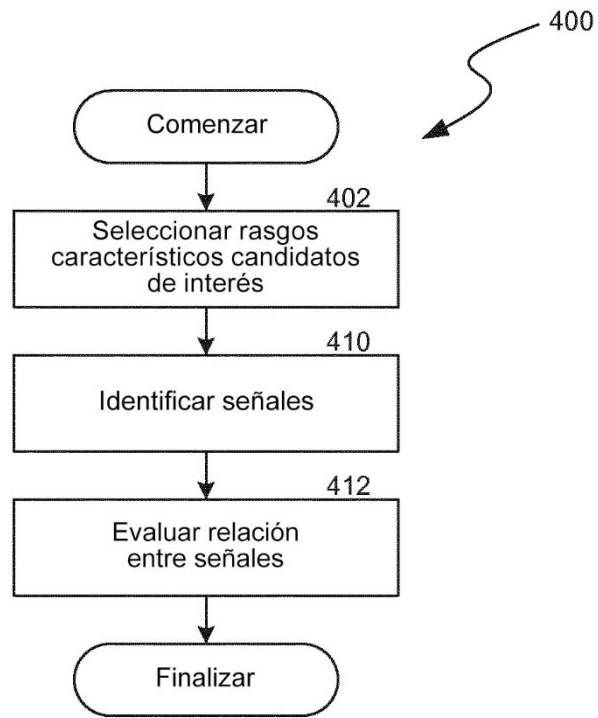


FIG. 6

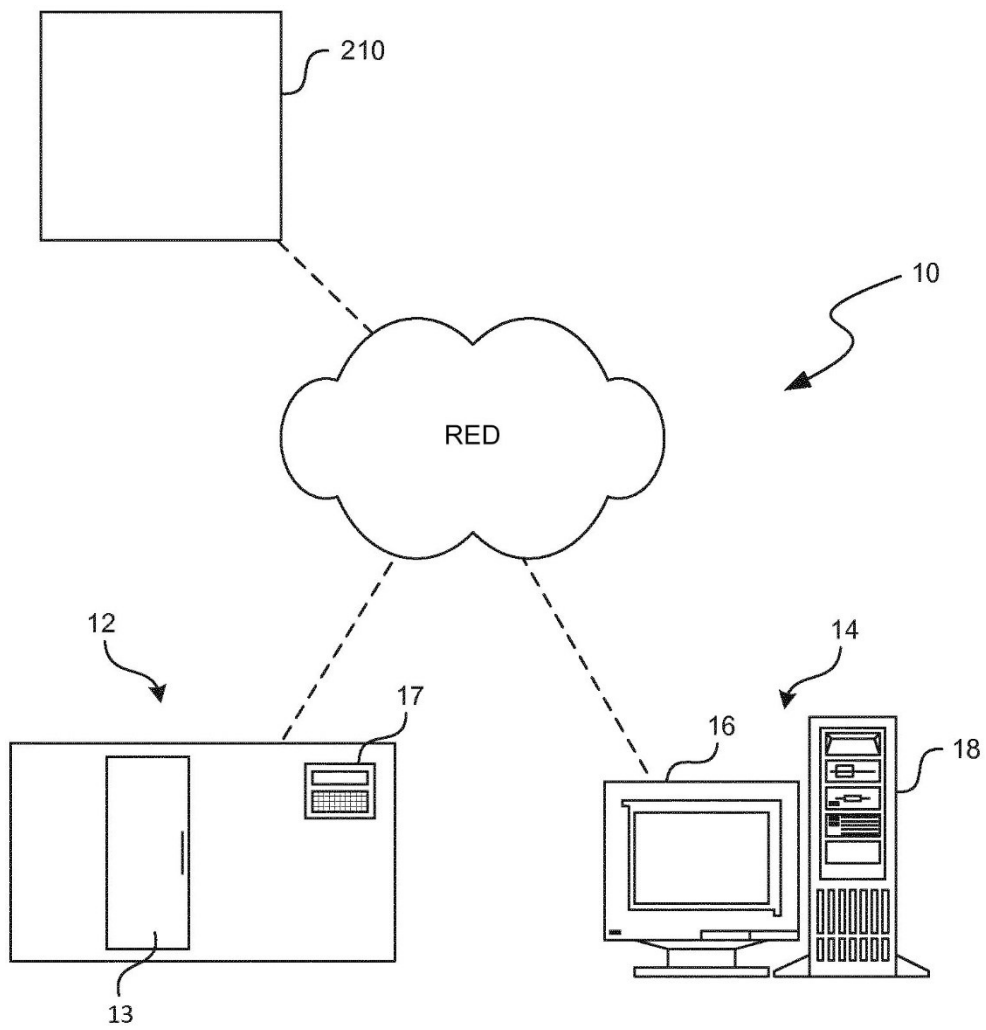


FIG. 7