

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 175**

51 Int. Cl.:

G06K 9/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2008** **PCT/US2008/061499**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2008** **WO08150588**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008** **E 08746847 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020** **EP 2149105**

54 Título: **Método para el conteo y segmentación de partículas virales en una imagen**

30 Prioridad:

30.05.2007 US 940870 P

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

22.06.2021

73 Titular/es:

**INTELLIGENT VIRUS IMAGING INC. (100.0%)
Fasth Law Offices, 26 Pinecrest Plaza, Suite 2
Southern Pines, NC 28387-4301, US**

72 Inventor/es:

HOMMAN, MOHAMMED

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 835 175 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 el conteo y segmentación de partículas virales en una imagen

Campo técnico

5 El método se refiere al conteo, segmentación e identificación de objetos tales como partículas virales representadas en una imagen tales como imágenes de microscopía electrónica.

Antecedentes de la invención

10 Se han realizado muchos esfuerzos en el pasado para clasificar y analizar las estructuras celulares que incluyen virus y otros componentes. Se han desarrollado varios métodos de análisis de imágenes para describir, segmentar y clasificar virus utilizando tecnologías de obtención de imágenes disponibles. Por ejemplo, se ha utilizado la criomicroscopía electrónica, pero las estructuras de las células y las partículas virales no se muestran muy bien. También ha sido difícil describir de forma objetiva, repetida y fiable los componentes celulares para determinar con precisión las fases de madurez de los componentes celulares.

15 Más particularmente, el ensamblaje del virus es un proceso complejo y un objeto de investigación intensiva. Los virus utilizan una célula anfitriona para producir partículas virales de su progenie mediante un complejo proceso de maduración y transporte intracelular. Este proceso se puede verificar con gran aumento utilizando microscopía electrónica (EM), que permite la identificación visual de diferentes tipos de partículas virales en diferentes compartimentos celulares. Los problemas importantes que quedan por resolver incluyen la identidad de las proteínas virales que participan en cada etapa de este proceso de ensamblaje del virus, así como el mecanismo de la translocación intracelular subyacente y la localización de diferentes tipos de partículas virales durante la maduración del virus. Los aspectos estructurales de la maduración del virus son generalmente difíciles de abordar, aunque las técnicas de visualización tales como la tomografía y la crio-EM han contribuido a la información disponible sobre las estructuras del virus. Estas técnicas se pueden utilizar para proporcionar información sobre partículas virales maduras estables. Hay herramientas genéticas disponibles para producir mutantes de componentes proteicos virales clave. La EM se puede utilizar para visualizar los efectos estructurales. Sin embargo, no existen herramientas adecuadas para 25 caracterizar los efectos estructurales, especialmente las formas de partículas intermedias y oscuras, y para cuantificarlas adecuadamente de manera objetiva.

30 Esto explica en parte por qué los métodos de análisis anteriores no han sido muy eficaces y existe la necesidad de métodos más eficaces para analizar las estructuras de partículas virales y celulares. Existe una necesidad de herramientas de análisis de imágenes para caracterizar y cuantificar la maduración de partículas virales y el transporte intracelular para facilitar estudios objetivos de diferentes ensamblajes del virus. También existe la necesidad de un método eficaz para identificar y cuantificar las partículas virales representadas en una imagen.

Compendio de la invención

35 El método de la presente invención proporciona una solución a los problemas descritos anteriormente. El método se puede utilizar para el conteo intracelular y la segmentación de partículas virales en imágenes tales como imágenes de microscopía electrónica. Se proporciona una imagen que tiene una pluralidad de objetos/elementos en su interior. Se identifican todos los objetos redondos y elípticos de la imagen. Los objetos redondos y elípticos se clasifican en grupos. Se determina un perfil de densidad radial de las partículas virales redondas. También se determinan los elementos elípticos que se pueden formar a partir del perfil de densidad radial de partículas virales redondas. Las partículas virales se identifican entre los grupos de objetos redondos y elípticos clasificados analizando los perfiles de densidad radial de los objetos de un grupo seleccionado. Por ejemplo, el método se puede utilizar para el conteo intracelular y la segmentación de partículas citomegalovirales humanas tratadas con ARNip en imágenes TEM. 40

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1A es un ejemplo esquemático de una imagen invariante de rotación (A);

La Figura 1B es un ejemplo esquemático de una imagen invariante angular (B);

45 La Figura 2 es una ilustración gráfica de medidas de densidad para cinco conjuntos de imágenes;

La Figura 3 es una vista esquemática de los perfiles de densidad radial de todos los conjuntos de imágenes colocados en un LVS;

La Figura 4 es una vista esquemática de perfiles radiales medios con desviación típica en líneas de trazos y puntos alrededor de la media del subconjunto A;

50 La Figura 5 es una vista esquemática de los perfiles radiales medios con desviación típica en líneas de trazos y puntos alrededor de la media para el subconjunto B; y

La Figura 6 es una vista esquemática en primer plano de la Figura 5 en radios entre 30 y 40 nm.

Descripción Detallada

El método de la presente invención se puede utilizar para buscar, segmentar e identificar partículas/objetos en imágenes, tales como objetos representados en imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los objetos identificados en las imágenes se pueden relacionar con partículas virales y otras partículas que tienen formas redondas y elípticas. Las formas elípticas se pueden definir por tener un radio máximo y un radio mínimo, mientras que las formas perfectamente redondas tienen un radio cada una. Preferiblemente, el método determina qué elementos de forma elíptica se pueden formar a partir del intervalo de radio de las partículas virales que se van a analizar. Por ejemplo, si la partícula viral tiene un radio de 100 unidades, en ese caso el radio máximo y el radio mínimo de las formas elípticas pueden ser, por ejemplo, un 20% mayores (o 120 unidades) y un 20% menores (o 80 unidades) que el radio de la partícula viral cuando la partícula viral es redonda. Si el radio máximo o el radio mínimo están fuera del intervalo de radio permitido, el elemento se considera inaceptable y no se identificará como una partícula viral. A continuación, las formas redondas y elípticas se ordenan y agrupan para que los intervalos radiales similares se agrupen. Después, las partículas virales se identifican y cuantifican en las formas agrupadas de los elementos. También es posible identificar las partículas virales que se encuentran entre dos fases de madurez diferentes, es decir, que están en una fase de madurez que está entre dos grupos de madurez diferentes. Las partículas virales pueden tener un perfil de densidad radial predeterminado y se puede utilizar una ecuación matemática, tal como la transformación de Fourier, para determinar qué objetos de forma elíptica, basados en el perfil de densidad radial predeterminado que es típico de las partículas virales, son partículas virales. Preferiblemente, no es necesario utilizar folletos que muestren perfiles de densidad radial de partículas virales en determinadas fases de madurez, ya que pueden no encontrarse partículas virales dañadas o partículas virales que se encuentren entre dos fases de madurez diferentes de los folletos utilizando los folletos.

Puede ser posible determinar la distribución de los intervalos radiales o perfiles de densidad radial en agrupaciones, como se muestra en la Figura 3 y se describe en detalle a continuación. También, como se describe a continuación, las partículas virales pueden exponerse a una sustancia química, tal como un fármaco, y las etapas del método de la presente invención se pueden ejecutar de nuevo basándose en la imagen modificada para determinar cómo cambian la distribución de los tamaños de las partículas o los perfiles de densidad radial como resultado de la exposición a la sustancia química o al tratamiento médico. De esta manera, puede ser posible determinar la eficacia del tratamiento con sustancias químicas sobre las partículas virales.

También puede ser posible utilizar técnicas de ARNip para bloquear ciertos elementos básicos, por ejemplo, eligiendo como diana proteínas pp150 y bloqueando la producción de partículas de cmv, dentro de las partículas virales. Después de tales tratamientos con ARNip, se puede analizar el efecto sobre las partículas virales y los cambios morfológicos/estructurales de las partículas virales. Además, también se puede estudiar el número o la cantidad de partículas virales afectadas.

También puede ser posible utilizar el método de la presente invención para identificar partículas virales analizando los perfiles de densidad radial para decidir qué partículas virales se representan en una imagen. Después de encontrar todos los objetos redondos y elípticos en una imagen y clasificar los objetos en grupos según las características radiales, la siguiente etapa puede consistir en la identificación de la característica radial de una partícula viral en particular. De este modo, se puede utilizar cualquier agrupación de objetos que tenga una característica radial dentro del intervalo radial predeterminado de la partícula viral, tal como dentro de un intervalo radial de 80 ± 3 unidades, para identificar las partículas virales. También se pueden incluir partículas deformadas o elípticas utilizando un intervalo de características radiales. Las partículas con intervalos radiales fuera de este intervalo aceptable se descartan y clasifican como partículas no virales. Si hay muchos tipos de partículas virales dentro del intervalo radial deseado, es posible tratar las partículas virales clínicamente o químicamente y a continuación ejecutar el método nuevamente para determinar cómo reaccionan las partículas virales al tratamiento. Basándose esta reacción, es posible identificar qué es la partícula viral. Por ejemplo, puede ser posible amplificar el ADN, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de PCR, que crea un folleto de referencia que puede utilizarse para identificar la partícula viral. De esta manera, la prueba adicional se puede utilizar para verificar o confirmar la partícula viral identificada.

Por tanto, el método de la presente invención se puede utilizar para buscar, segmentar e identificar partículas virales en imágenes TEM como se describe en detalle a continuación. Las cápsides de las partículas virales son objetos aproximadamente circulares con la misma densidad de proteína en radios fijos desde el centro, los llamados objetos invariantes de rotación, como se muestra mejor en la Figura 1A. Para crear una medida de invarianza rotacional, se necesita una propiedad "opuesta" a la que se pueda medir la invarianza rotacional. Se puede utilizar un objeto invariante angular para este propósito, ya que tiene la misma densidad de proteína en ángulos fijos desde el centro, como se muestra mejor en la Figura 1B.

El espectro de Fourier de una función (f) cuyos valores están determinados por el radio r, con la frecuencia de Fourier correspondiente (w_r), desde el centro y un ángulo (t), con la frecuencia de Fourier correspondiente (w_t), tomados desde cualquier dirección fijada fuera del centro se puede utilizar para ilustrar un objeto invariante de rotación y un objeto invariante angular. Una función invariante de rotación perfecta tiene toda su energía donde $w_t=0$, y un objeto invariante angular perfecto tiene toda su energía donde $w_r=0$ y todos los objetos intermedios tienen energía en ambas bandas

de frecuencia. Por tanto, una medida razonablemente buena es comparar la diferencia de estas energías, dando una medida a priori con el nivel umbral de la medida como la única constante desconocida, que puede ser dada por un control negativo.

- 5 A continuación se describe una medida de densidad de estructuras virales en imágenes TEM. Se introduce una medida de densidad para comparar el número de estructuras virales en diferentes imágenes como un determinado número de objetos (n) por unidad de área A en una imagen.

$$d = \frac{n}{A}$$

- 10 La segmentación de diferentes estructuras virales se describe a continuación. El perfil de densidad radial de cada objeto o elemento/partícula encontrado sirve como una buena aproximación de la estructura viral. La configuración de los perfiles en un espacio vectorial lineal (LVS) con una base establecida en los ejes principales de los perfiles, calculados con una descomposición en valores singulares (SVD), proporciona una comprensión visual del comportamiento de las agrupaciones de las diferentes estructuras virales. Con esta información es posible extraer diferentes agrupaciones y contar individualmente, y discriminar diferencias estructurales al aplicar fármacos clínicos calculando la estructura media de cada conjunto de imágenes.

- 15 Como se muestra en la Tabla 1 a continuación, se adquirieron aproximadamente 500 MB de imágenes de células infectadas con cuatro ARNip aplicados de maneras diferentes con microscopio electrónico a una resolución de 3,3 nm/píxel. Las imágenes se procesaron con la medida de invarianza de rotación. El radio de control de la invarianza de rotación se estableció en 15 píxeles (aproximadamente 50 nm) y los objetos en las imágenes se adquirieron en los máximos radiales locales de 15 píxeles donde la medida de la invarianza radial excedió el nivel de 15. Al adquirir los
20 perfiles de densidad radial, la media de cada perfil se eliminó para compensar los diferentes niveles de brillo en las diferentes imágenes. La media se tomó en un radio de 100 píxeles, aproximadamente 330 nm.

Tabla 1

Grupo	Numero de imágenes	Área total μm^2
Control positivo	83	700,48
MCP	119	1317,30
GB	34	320,17
MCP + gB + pp150	28	241,71
pp150	28	355,84

- 25 La Tabla 2 describe la desviación media y la típica de la media de las densidades calculadas. Al comparar los resultados de las imágenes de pp150 y MCP con el control positivo con una prueba t de Student, se proporcionan valores p de $7,21 \cdot 10^{-13}$ y $2,19 \cdot 10^{-11}$ respectivamente para rechazar la hipótesis de que las densidades proceden de distribuciones con igual media.

Tabla 2

Grupos	Número de objetos encontrados (n)	Densidad esperada $n/\mu\text{m}^2$	Desviación típica de la densidad esperada $n/\mu\text{m}^2$
Pos.	3982	5,65	0,40
GB	2826	4,56	0,70
MCP + gB + pp150	1343	4,24	0,54
MCP	1022	2,40	0,14
pp150	652	1,66	0,28

- 30 La Figura 2 es una ilustración gráfica de medidas de densidad para cinco conjuntos de imágenes (Control positivo, MCP, gB, MCP+gB+pp150 y pp150) con desviación típica 1. MCP y pp150 muestran densidades significativamente menores que el control positivo.

- 35 La segmentación de las estructuras virales se describe a continuación. Los perfiles de densidad radial se trazaron en un LVS, como se muestra mejor en la Figura 3, donde se muestra la información de los dos ejes principales más grandes. La Figura 3 muestra los perfiles de densidad radial de todos los conjuntos de imágenes colocadas en un LVS. La imagen muestra dos agrupaciones bien separadas marcadas como A y B que se describen con más detalle a continuación. Una característica importante es que también se muestran las partículas entre dos agrupaciones. Por

ejemplo, esas partículas pueden estar en fases de madurez que se encuentran entre las fases de madurez representadas por las agrupaciones. A menudo es particularmente importante estudiar las partículas entre agrupaciones o grupos de partículas cuando las partículas virales se han expuesto a un fármaco para poder determinar los efectos del fármaco.

- 5 Los perfiles de densidad radial media para cada conjunto (control positivo, MCP, pp150, gB y MCP+gB+pp150) para la agrupación A se muestran en la Figura 4. Esto revela la clasificación comúnmente conocida A (envolturas virales vacías) de los intermedios de maduración del HCMV. Debido al hecho de que el número de objetos encontrados de este tipo es pequeño, los objetos tienen energías radiales y angulares pequeñas, y la existencia de muchas otras estructuras no virales en el conjunto, no se puede extraer información significativa además de la información de que la pared de la cápside está situada a aproximadamente 40 nm del centro.

10 Los perfiles de densidad radial media para cada conjunto (control positivo, MCP, pp150, gB y MCP+gB+pp150) para la agrupación B se muestran en la Figura 5. Esto revela las clasificaciones de los intermedios de maduración del HCMV comúnmente conocidas como B (cápsides con núcleo translúcido) y C (cápsides maduras con núcleo denso). Los conjuntos de control positivo y gB difieren de los conjuntos MCP, pp150 y MCP+gB+pp150 en radios entre 30 y 40 nm, como se muestra mejor en el primer plano de la Figura 6, y en el centro.

15 Como resultado, se puede desarrollar un modelo de partículas virales en imágenes TEM. El uso de la característica invariante angular como medida para comparar con la característica invariante de rotación puede intercambiarse por una fracción de la energía de la función que se puede describir mediante un objeto invariante de rotación y la energía total. Sin embargo, si la energía total es muy pequeña, la fracción se puede volver numéricamente inestable para calcular.

20 Para resolver esto, se puede utilizar un nivel de umbral. El uso de un nivel de umbral establecido es una fuente de subjetividad. Sin embargo, en este nivel se contaron muy pocas estructuras falsas. No obstante, un grupo de control negativo podría servir para establecer el nivel de umbral y también para observar el impacto de las moléculas de ARNip.

- 25 Cualquier transformación ortonormal de los perfiles de densidad, incluidos los ejes principales, conserva la distancia y el producto interior en el L2-LVS. Por consiguiente, la agrupación de diferentes subestructuras es independiente con respecto a la elección de la base.

Ejemplo

30 A continuación se describe un ejemplo de materiales y métodos que se pueden utilizar. Los fibroblastos de pulmón embrionario humano (HF) se mantuvieron en un medio esencial mínimo sin bicarbonato con sales de Hank (GIBCO BRL) con un suplemento de HEPES 25 mM [ácido 4-(2hidroxiethyl)-1-piperazina etanosulfónico], suero de ternera fetal inactivado por calor al 10%, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EE.UU.). Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos de 175 cm² (Corning, Nueva York, EE.UU.) y se utilizaron hasta el pase 17. Las células se infectaron con HCMV a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. El sobrenadante de virus se recogió 7 o 10 días después de la infección (pi). A continuación, se eliminó el sobrenadante del virus de los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad y se congeló a -70°C hasta su uso. Se infectaron monocapas de células HF cultivadas en placas de 96 pocillos o en portaobjetos de cámara con HCMV AD169, a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.

40 Las células endoteliales de arteria pulmonar humana (HPAEC) se obtuvieron de Clonetics, CA, EE. UU. Las células se mantuvieron en EBM-2 (Clonetics, CA, EE. UU.) con factores de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂. Una hora antes de la infección, el medio se cambió a EBM con suero de ternera fetal al 5% y se cultivó en este medio durante el proceso de infección. Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos de 175 cm² (Falcon) recubiertos con gelatina al 0,2% o portaobjetos de cámara de 8 pocillos (Nalge Nunc International) y se utilizaron hasta el pase 8 en los experimentos.

45 Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en medio EGM (Clonetics, CA, EE. UU.). Una hora antes de la infección, el medio se cambió a EBM con suero de ternera fetal al 5% y se cultivó en este medio durante el proceso de infección. Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos de 175 cm² (Falcon) y portaobjetos de cámara de 8 pocillos (Nalge Nunc internacional) y se utilizaron para experimentos antes del pase 8. Las células se infectaron una cepa adaptada endotelial TB40 a una MOI de 1.

50 Se aislaron células de músculo liso de injertos aórticos obtenidos de pacientes sometidos a cirugía de aneurisma aórtico con inserción de injertos aórticos o bien de injerto aórtico o injerto de vasos ilíacos de donantes de trasplante. Las células se aislaron retirando primero las células endoteliales mediante raspado celular con un instrumento afilado. A continuación, el vaso se dividió en dos capas diferentes, la capa más interna (correspondiente a la íntima del vaso) y la capa más externa (correspondiente al medio del vaso), mediante la separación suave de las dos capas con un par de pinzas. El injerto aórtico se cortó en trozos pequeños de 1 mm y se cultivó en placas de cultivo celular en medio SMGM 2 (Clonetics) con la adición de SmGM-2 Single Quotes (hEGF 0,5 µg/ml, 0,5 ml; Insulina 5 mg/ml, 0,5 ml; hFGF-b 1 µg/ml, 1 ml; FBS 25 ml; GA-1000, 0,5 ml) durante aproximadamente 2 semanas, hasta que hubo una migración de células SMC desde los explantes. Las células se cultivaron en matraces de cultivo celular de 175

cm² (Falcon). Para determinar la pureza de los cultivos de SMC, las células se hicieron crecer en portaobjetos de cámara y se fijaron en formaldehído al 3% durante 45 minutos a 4°C y se permeabilizaron con Triton X al 0,3% durante 5 minutos. Después de la fijación, las células se tiñeron para antiactina conjugada con FITC específica de células de músculo liso (SIGMA) y se evaluaron con microscopía de fluorescencia. Las células se fijaron con metanol:acetona (1:1) a 4°C durante 5 minutos y se tiñeron con anti-factor de von Willebrand (Anti-vWF) conjugado con FITC y factor von Willebrand específico de células endoteliales y se evaluaron con microscopía de fluorescencia. En los experimentos se utilizaron controles de isotipo para los anticuerpos. Los cultivos fueron 100% positivos para anti- α -actina y negativos para el factor de von Willebrand.

Para examinar las células infectadas con virus por microscopía electrónica, se recolectaron células no infectadas e infectadas con HCMV (MOI de 1) a 3, 5, 7 y 10 dpi, y se fijaron en glutaraldehído al 2% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M que contenía sacarosa 0,1 M y CaCl₂ 3 mM, pH 7,4 a temperatura ambiente durante 30 min. Las células se rasparon con un palo de madera y se transfirieron a un tubo Eppendorf y adicionalmente se fijaron durante la noche en el refrigerador. Después de la fijación, las células se enjuagaron en tampón de cacodilato de sodio 0,15 M que contenía CaCl₂ 3 mM, pH 7,4 y se centrifugaron. Los sedimentos se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 2% en tampón de cacodilato de sodio 0,07 M que contenía CaCl₂ 1,5 mM, pH 7,4 a 4°C durante 2 horas, se deshidrataron en etanol seguido de acetona y se incluyeron en LX-112 (Ladd, Burlington, Vermont, EE. UU.). Las secciones se contrastaron con acetato de uranilo seguido de citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Tecnai 10 (FEI, Países Bajos) a 80 kV. Las imágenes digitales fueron capturadas por una cámara digital Mega View II (Soft Imaging System, GmbH, Münster, Alemania).

El procesamiento de la micrografía electrónica se describe a continuación. Las secciones se contrastaron con acetato de uranilo seguido de citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Tecnai 10 (FEI, Países Bajos) a 80 kV. Las imágenes digitales se capturaron con una cámara digital Mega View II (Soft Imaging System GmbH, Münster, Alemania) o se capturaron, desarrollaron y escanearon micrografías electrónicas para su digitalización. Las micrografías se digitalizaron a imágenes de 8 bits en un escáner de superficie plana HP ScanJet 6200C a tamaños de píxeles que representan 2×2 nm o 3×3 nm, lo que proporciona radios de cápsides de aproximadamente 25 o 17 píxeles respectivamente, en las micrografías digitalizadas. Cada imagen digital tiene un tamaño de aproximadamente 1000×1000 píxeles (1 Mbite). La resolución fue satisfactoria para distinguir entre las tres clases de cápsides investigadas aquí, pero el fondo fuertemente texturizado provoca que la tarea de identificación de la cápside sea muy difícil. Se utilizó una estación de trabajo personal 433 DEC alfa que ejecutaba Hp Tru64 UNIX para el desarrollo y evaluación del método de la presente invención. La implementación y las pruebas se realizaron utilizando Matlab 7.0.1 (MathWorks, Inc., Natick, MA). Las figuras de perfil de niveles de gris generadas se procesaron en Corel Draw 10 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá) y Photoshop CS (Adobe Systems Inc, San José, CAL, EE.UU.).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de partículas virales mediante conteo intracelular y segmentación de partículas virales en una imagen, que comprende:
 - 5 proporcionar imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM), adquiridas con un microscopio electrónico, que tienen una pluralidad de objetos representados en ellos, los objetos relacionados con partículas virales y otras partículas que tienen formas elípticas y las imágenes que muestran células infectadas con partículas virales y tratadas con diferentes tratamientos de ARNip;
las imágenes, examinadas en el microscopio electrónico de transmisión, fueron capturadas por una cámara digital como imágenes digitales;
 - 10 definir un radio máximo y un radio mínimo de objetos elípticos como un intervalo de radio permitido en la imagen;
encontrar objetos elípticos en la imagen y determinar un radio máximo y mínimo de los objetos elípticos;
descartar objetos con intervalos radiales fuera del intervalo radial permitido;
segmentar cada objeto en la imagen aplicando un análisis invariante de rotación e invariante angular calculando un perfil de densidad radial desde el centro de cada objeto y eliminando la intensidad media para compensar los diferentes niveles de brillo en las diferentes imágenes;
 - 15 trazar los perfiles de densidad radial de las partículas virales en un espacio vectorial lineal (LVS) de modo que se muestren una primera agrupación y una segunda agrupación de partículas virales, representando la primera agrupación envolturas virales vacías y representando la segunda agrupación partículas virales maduras;
contar individualmente partículas virales representadas en la etapa anterior;
 - 20 representar los perfiles de densidad radial media para los tipos de partículas virales tratadas con ARNip en la primera agrupación;
representar los perfiles de densidad radial media para los mismos tipos de partículas virales tratadas con ARNip en la segunda agrupación; y
 - 25 analizar los cambios morfológicos/estructurales de las partículas virales en las agrupaciones representadas en el LVS para discriminar las diferencias estructurales entre las partículas virales tratadas con ARNip cuando se exponen a los tratamientos de ARNip.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente analizar un cambio de distribución de tamaños de los objetos en la imagen como resultado de la exposición a una sustancia química o tratamiento médico.
- 30 3. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente exponer las partículas virales a una sustancia química.
4. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente determinar la diferencia en una cantidad de objetos en un grupo antes y después de la exposición a la sustancia química.
5. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente analizar estructuras morfológicas de partículas virales.
- 35

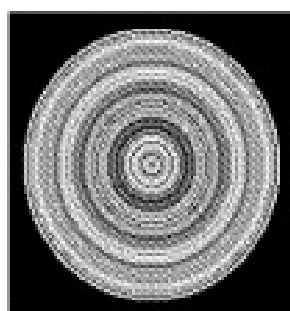


FIG. 1A

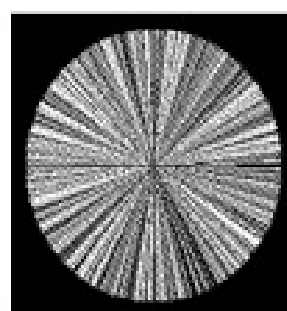


FIG. 1B

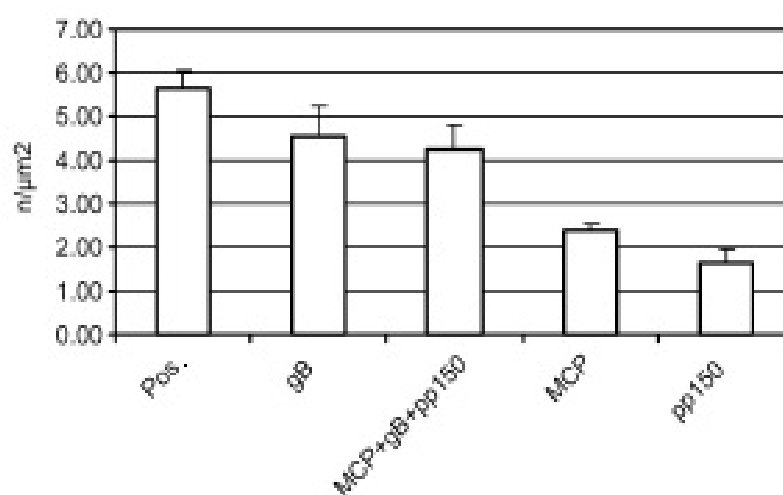


FIG. 2

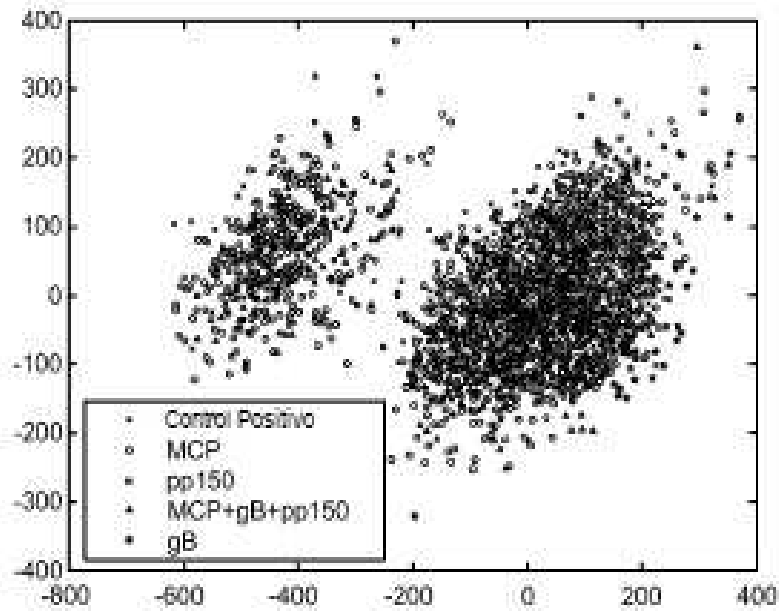


FIG. 3

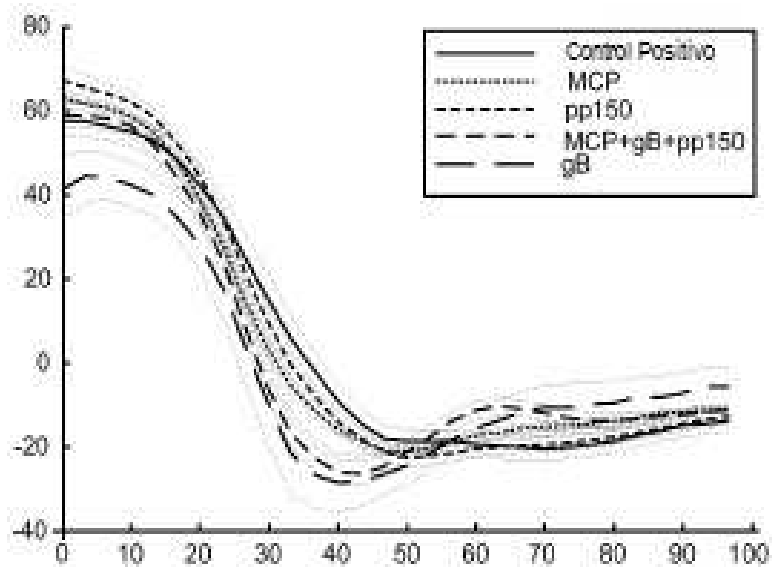


FIG. 4

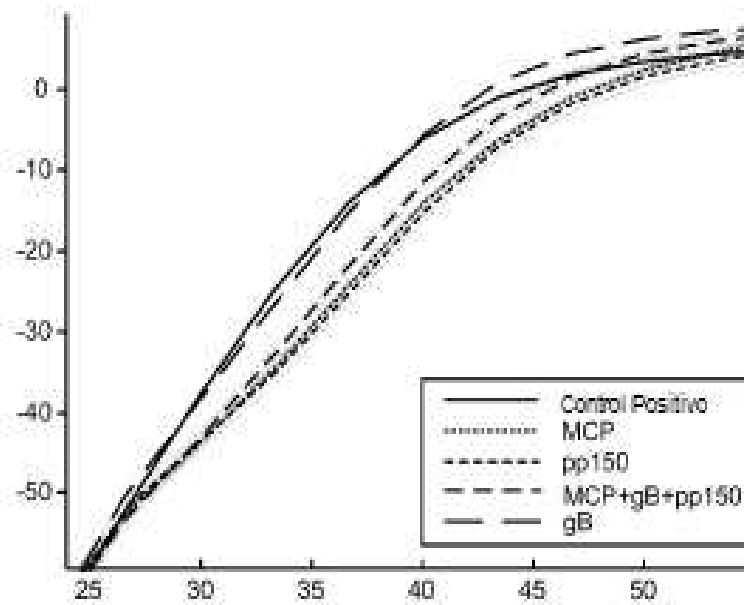


FIG. 5

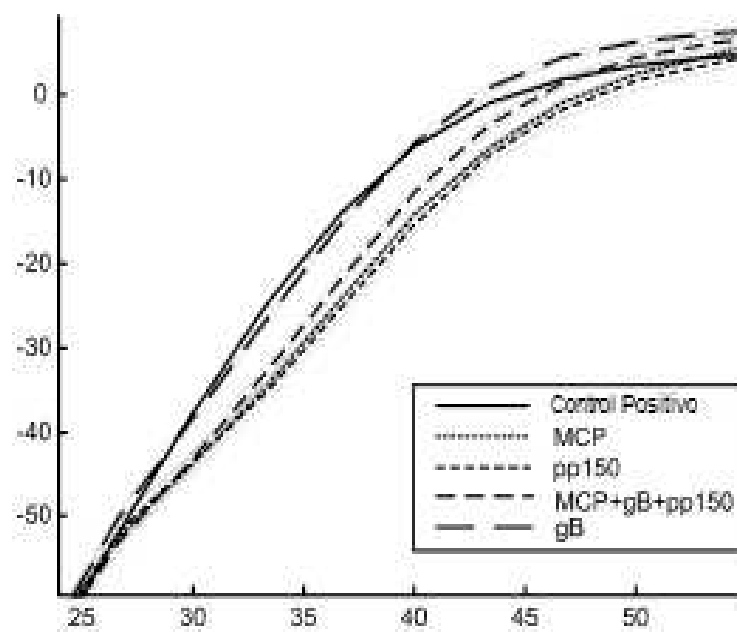


FIG. 6