



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 26 043 T2** 2009.05.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 428 016 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 26 043.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/29567**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 798 993.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/025554**
(86) PCT-Anmeldetag: **18.09.2002**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.03.2003**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.06.2004**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.04.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.05.2009**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/78** (2006.01)
G06F 19/00 (2006.01)
G06K 9/00 (2006.01)
G01N 21/27 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
957446 19.09.2001 US
(73) Patentinhaber:
Tripath Imaging, Inc., Burlington, N.C., US
(74) Vertreter:
**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**
(72) Erfinder:
**MARCELPOIL, Raphail, F-38570 Goncelin, FR;
GAHM, Thomas, Burlington, NC 27244, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN FÜR QUANTITATIVE VIDEO-MIKROSKOPIE UND VORRICHTUNG UND PROGRAMM
ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Bildanalyse und insbesondere ein Verfahren für quantitative Videomikroskopie in Zellbiologie- und Pathologieanwendungen und ein zugehöriges System und ein Computer-softwareprogrammprodukt dafür.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Eine effektive Analyse von Mikroskopiebildern ist in Zellbiologie und Pathologie essentiell, insbesondere für ein Auffinden und eine Quantifizierung von genetischen Materialien, wie beispielsweise Genen oder Boten-RNA oder die Expression dieser genetischen Information in der Form von Proteinen, wie beispielsweise durch Genverstärkung, Genlöschung, Genmutation, Boten-RNA-Molekülquantifizierung oder Proteinexpressionsanalyse. Genverstärkung ist das Vorhandensein zu vieler Kopien desselben Gens in einer Zelle, wobei eine Zelle gewöhnlich zwei Kopien, auch als Allele bekannt, desselben Gens enthält. Genlöschung weist darauf hin, dass weniger als zwei Kopien eines Gens in einer Zelle gefunden werden können. Genmutation weist auf das Vorhandensein von unvollständigen oder nicht funktionierenden Genen hin. Boten-RNAs (mRNA) sind Moleküle aus genetischen Informationen, die von einem Genleseprozess synthetisiert werden, die als Vorlage für eine Proteinsynthese dienen. Proteinexpression ist die Herstellung eines bestimmten Proteins durch eine Zelle. Wenn die Genkodierung für das bestimmte Protein, die von einem Proteinexpressionsprozess bestimmt wird, erhöht ist oder überschüssige Kopien des Gens oder der mRNA vorhanden sind, kann das Protein überexprimiert werden. Umgekehrt, wenn die Genkodierung unterdrückt oder nicht vorhanden ist, kann das Protein unterexprimiert werden oder nicht vorhanden sein.

[0003] Normales Zellverhalten wird genau gesteuert durch molekulare Mechanismen, die eine große Anzahl von Proteinen, mRNAs und Genen involvieren. Genverstärkung, Genlöschung und Genmutation sind dafür bekannt, eine bedeutende Rolle in abnormalen Zellverhalten durch abnormale Proteinexpression zu haben. Der Bereich von betroffenem Zellverhalten umfasst Verhalten so unterschiedlich wie beispielsweise Proliferations- oder Differenzierungsregulierung. Darum ist eine effektive Detektion und Quantifizierung von Genverstärkung, -löschung und -mutation, mRNA-Quantifizierung oder Proteinexpressionsanalyse nötig, um nützliche Forschung, diagnostische und prognostische Werkzeuge zu vereinfachen.

[0004] Es gibt viele Labortechniken, die auf ein Detektieren und Quantifizieren von Genverstärkung, -löschung und -mutation, mRNA-Quantifizierung oder Proteinexpressionsanalyse gerichtet sind. Beispielsweise umfassen solche Techniken Western, Northern und Southern Blots, Polymerasekettenreaktionen („PCR“), enzymgekoppelter Immunosorbentassay („ELISA“) und vergleichende genomische Hybridisierungs- („CGH“) Techniken. Allerdings wird Mikroskopie routinemäßig verwendet, weil es eine informative Technik ist, die schnelle Untersuchungen auf dem zellularen und subzellularen Niveau ermöglicht, während sie geeignet ist, schnell mit relativ geringen Kosten implementiert zu werden.

[0005] Wenn Mikroskopie die gewählte Labortechnik ist, müssen die biologischen Proben zuerst bestimmten Detektions- und Auffindungsvorbereitungen durchlaufen. Sobald die Proben vorbereitet sind, analysiert ein menschlicher Experte typischerweise die Proben mit einem Mikroskop in nur einer qualitativen Studie, oder mit einem Mikroskop, das mit einer Kamera und einem Computer verbunden ist, in einer quantitativen und allgemein standardisierten Studie. In einigen Fällen kann das Mikroskop für eine vollautomatische Analyse ausgestaltet sein, wobei das Mikroskop mit einem motorisierten Untersuchungstisch und Fokus, motorisierten Objektivwechseln, automatischer Lichtintensitätssteuerungen und Ähnlichem automatisiert ist.

[0006] Die Präparation der Proben für eine Detektion kann verschiedene Arten von Präparationstechniken involvieren, die für eine mikroskopische Bildanalyse geeignet sind, wie beispielsweise hybridisierungsbasierende und immunmarkierungsbasierende Präparationstechniken. Solche Detektionstechniken können mit geeigneten Auffindungstechniken, wie beispielsweise fluoreszenzbasierten und sichtbare Farbreaktions-basierten Techniken verbunden werden.

[0007] In-Situ-Hybridisierung („ISH“) und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung („FISH“) sind Detektions- und Auffindungstechniken, die beispielsweise für eine Detektion und Quantifizierung von genetischer Informationsverstärkung und Mutationsanalyse verwendet werden. Sowohl ISH als auch FISH können mit histologischen und zytologischen Proben verwendet werden. Diese Techniken verwenden bestimmte komplementäre Sonden zum Erkennen von entsprechenden genauen Sequenzen. Abhängig von der verwendeten Technik kann die

bestimmte Sonde eine chemische (ISH) Markierung oder eine Fluoreszenz-(FISH)Markierung umfassen, wobei die Proben dann unter Verwendung eines Transmissionsmikroskops bzw. eines Fluoreszenzmikroskops analysiert werden. Die Verwendung einer chemischen Markierung oder einer Fluoreszentenmarkierung hängt vom Ziel des Benutzers ab, wobei jede Art von Markierung gegenüber der anderen in bestimmten Umständen entsprechende Vorteile aufweist.

[0008] Bei einer Proteinexpressionsanalyse können beispielsweise Immunohistochemie („IHC“) und Immunocytochemie-(„ICC“)Techniken verwendet werden. IHC ist die Anwendung von Immunchemie auf Gewebeschnitte, wohingegen ICC die Anwendung von Immunchemie auf gezüchtete Zellen oder Gewebeabdrücke ist, nachdem sie bestimmte zytologische Präparationen, wie beispielsweise flüssigkeitsbasierte Präparationen, durchlaufen haben. Immunocytochemie ist eine Familie von Techniken, die auf der Verwendung eines spezifischen Antikörpers basieren, wobei Antikörper verwendet werden, um spezifisch auf Moleküle innerhalb oder auf der Oberfläche von Zellen abzielen. Der Antikörper enthält typischerweise eine Markierung, die eine biochemische Reaktion durchlaufen wird, und dadurch eine Farbänderung bei einem Zusammentreffen mit den Zielmolekülen erfährt. In einigen Fällen kann eine Signalverstärkung in das bestimmte Protokoll integriert sein, wobei ein sekundärer Antikörper, der den Markierungsfarbstoff umfasst, der Anwendung eines primären spezifischen Antikörpers folgt.

[0009] Sowohl in Hybridisierungs- als auch Immunkennzeichnungsstudien werden Chromogene verschiedener Farben verwendet, um zwischen den verschiedenen Markierungen zu unterscheiden. Allerdings wird die maximale Anzahl von Markierungen, die in einer Studie verwendet werden kann, durch verschiedene Faktoren begrenzt. Zum Beispiel kann das spektrale Überschneiden der Farben, die zum Auffinden der entsprechenden Markierungen verwendet werden, einen limitierenden Faktor darstellen, weil Farbstoffe auch über einen großen Bereich des sichtbaren Spektrums absorbieren können. Demgemäß ist das Risiko einer spektralen Überschneidung höher, je höher die Anzahl von involvierten Farbstoffen in einer Studie ist. Des Weiteren kann die spektrale Auflösung der Erfassungsvorrichtung einen limitierenden Faktor darstellen, und die minimale Farbverschiebung, die die Vorrichtung detektieren kann, muss berücksichtigt werden.

[0010] Zusätzlich werden Immunchemie als auch Chemie in ISH im Allgemeinen erachtet, eine geringe Sensitivität aufzuzeigen, wenn eine Quantifizierung einer Markierung erreicht werden muss. Allerdings kann die Quantifizierungsgenauigkeit dieser Techniken von mehreren Faktoren abhängen. Zum Beispiel kann die Art der Reaktion, die verwendet wird, eine Rolle in der Genauigkeit der Technik spielen, da die Linearität der Beziehungen zwischen Ligandenkonzentrationen und dem Grad der immunchemischen Färbungsreaktion stark von der Reaktionsart abhängen. Insbesondere kann beispielsweise ein Peroxidase-/Antiperoxidaseverfahren linearer sein als ein Biotin-Avidin-Verfahren. Die zelluläre Lokalisierung der Markierungen kann auch die Genauigkeit beeinflussen, wobei, wenn beispielsweise Membran- und Kernmarkierungen sich räumlich überschneiden, die resultierende Farbe eine Mischung der entsprechenden Farben ist. Demgemäß, da die entsprechende Quantifizierung subjektiv ist, kann die Genauigkeit der Bestimmung beeinflusst werden. Zusätzlich kann ein Kalibrierungsstandard, wie beispielsweise Zellen mit bekannten Merkmalen, Gele mit bestimmten Konzentrationen der Markierungen oder Ähnliches benötigt werden, wenn ein entwickeltes Analysemodell auf einen neuen und unterschiedlichen Fall angewandt wird. Färbungssätze sind im Allgemeinen verfügbar, die Kalibrierungsstandards beinhalten. Allerdings ist der Kalibrierungsstandard gewöhnlich nur auf eine bestimmte Probe anwendbar, wie beispielsweise eine bestimmte Zelle oder eine Struktur einer bestimmten Art, welche dafür bekannt ist, konstante Merkmale im Bezug auf den Standard zu besitzen, und kann von beschränktem Nutzen sein, wenn auf eine Probe einer verschiedenen Art angewandt.

[0011] Insgesamt bieten die beschriebenen „kolorimetrischen“ Studien Probenanalyseinformationen von Farbe und vereinfachen eine Verarbeitung und Quantifizierung der Informationen, um dadurch zu helfen, eine Diagnose bereitzustellen oder eine Prognose des bestimmten Falls zu bilden. Zur Veranschaulichung, die Detektion und Quantifizierung der HER2-Proteinexpression und/oder Genverstärkung kann durch verschiedene Ansätze, die in quantitativer Mikroskopie verwendet werden, beurteilt werden. HER2 ist ein Membranprotein, für das eine diagnostische und prognostische Bedeutung in metastatischem Brustkrebs gezeigt wurde. Weil gezeigt wurde, dass HER2-positive Patienten sensibler auf Behandlung sind, die Herceptin® (eine Zielbehandlung entwickelt von Genentech) umfassen, wurde bewiesen, dass die Definition des HER2-Zustands von metastatischem Brustkrebs am wichtigsten für die Wahl des geeigneten Behandlungsprotokolls ist. Die Definition des HER2-Zustands basierte auf einer Studie von Proben, die mit entweder Hybridisierung (FISH, ISH) oder Immunkennzeichnung (IHC-Techniken) behandelt wurden.

[0012] In solchen Studien erfordert eine Verwendung von FISH mit beispielsweise einem FDA-genehmigten Satz, wie beispielsweise PathVision® hergestellt von Vysis, ein Bildanalyseprotokoll zum Zählen der Anzahl

von Kopien des HER2-Gens, das in jeder Zelle vorhanden ist. Bei einem normalen Fall werden zwei Kopien des Gens in jeder Zelle gefunden, wohingegen mehr als drei Kopien des Gens in einer Zelle darauf hinweisen, dass das Gen verstärkt ist. Alternativ erfordert eine Verwendung von IHC mit beispielsweise einem FDA-geheimigten Satz, wie beispielsweise Herceptest[®] hergestellt von Dako, ein Bildanalyseprotokoll, das die Fälle in vier Kategorien klassifiziert, abhängig von der Intensität und Lokalisierung der HER2-spezifischen Membraneinfärbung. Derzeitige Studien neigen dazu zu zeigen, dass diese zwei Untersuchungstechniken (Hybridisierung und Immunkennzeichnung) komplementär sein können und Pathologen helfen können, eine Tumorunterartdiagnose durchzuführen, wenn kombiniert.

[0013] Allerdings benötigen solche kolorimetrischen bzw. farbmétrischen Studien eine extensive Probenpräparation und Verfahrenssteuerung. Somit ist es, wenn angepasste Färbungsprotokolle angewandt werden, kritisch, überprüfen zu können, dass das Färben für jede Probe mit dem bestimmten Modell übereinstimmt, das in der Bilderfassungs- und Verarbeitungsvorrichtung verwendet wird, so dass nützliche und genaue Ergebnisse von den gesammelten Informationen erhalten werden. Sonst kann die Analyse wiederholt werden müssen, wobei wieder von der Probenpräparationsstufe gestartet wird, was möglicherweise in einem teuren und zeitaufwändigen Prozess resultiert.

[0014] Bei einer typischen Mikroskopvorrichtung basierend auf Bilderfassung und -verarbeitung muss das vergrößerte Bild der Probe zunächst mit einer Kamera aufgenommen und digitalisiert werden. Im Allgemeinen werden Charged-Coupled-Device-(CCD) Digitalkameras in entweder Licht- oder quantitativer Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Spektrophotometer ausgeschlossen werden im Allgemeinen zwei verschiedene Techniken zum Durchführen solcher kolorimetrischen Mikroskopiastudien verwendet. Bei einer Technik kann eine Schwarz-Weiß-(BW)CCD-Kamera verwendet werden. In solch einem Fall wird ein Graustufenbild von der Probe erhalten, das einem monochromatischen Licht entspricht, das eine Wellenlänge aufweist, die spezifisch für die Färbung der Probe, die analysiert werden soll, ist. Die spezifische Wellenlänge von Licht wird entweder durch Filtern einer weißen Lichtquelle mittels eines spezifischen Filters mit schmaler Bandbreite erhalten, oder durch direktes Steuern der Wellenlängen der Lichtquelle unter Verwendung entweder manueller oder elektrischer Steuerungen. Demgemäß erhöht sich die Analysezeit unter Verwendung dieser Technik, da die Anzahl von Farben erhöht wird, weil eine Lichtquelle oder ein Filter für jede verschiedene Probenfärbung oder jede verschiedene Wellenlänge ausgewählt werden muss. Darum müssen viele verschiedene Bilder der Probe, die die spektrale Antwort der Probe bei verschiedenen Wellenlängen zeigen, individuell in einer sequenziellen Reihenfolge aufgenommen werden, um die Analyse zu vereinfachen. Wenn mehrere Szenen oder Gesichtsfelder analysiert werden müssen, ist das typische Protokoll, die Sequenz in einem Batch-Modus zu automatisieren, um Verarbeitungszeit zu sparen.

[0015] Gemäß einer zweiten Technik wird eine Farb-CCD-Digitalkamera verwendet, wobei drei Graustufenbilder der Probe gleichzeitig aufgenommen und erhalten werden. Jedes Graustufenbild entspricht dem jeweiligen roten, grünen und blauen Kanal (RGB) der Farb-CCD-Kamera. Die Bilder werden dann direkt in dem RGB-Farbraum analysiert durch ein Beschränken der Analyse auf Pixel, die sich in einer bestimmten Region des RGB-Würfels befinden, wobei die bestimmte Region auch Pixel von einer entsprechenden Trainingsdatenbank enthält. Alternativ werden die Bilder, nach mathematischer Transformation des RGB-Farbraums, in einem der vielen Farbräume, die von der CIE (Internationale Beleuchtungskommission) definiert sind, wie beispielsweise ein HLS-(Farbwinkel, Helligkeit oder Sättigung)Raum analysiert. Alternativ stellen einige Kamerahersteller spezifische CCD-Kameras her, wobei Filter mit schmaler Bandbreite zum Abzielen auf spezifische Wellenlängen die gewöhnlichen Rot-, Grün- und Blaufilter ersetzen können. In einem solchen Fall ermöglicht die Kamera eine schnelle Bildaufnahme der drei spektralen Komponenten einer Szene auf eine parallele Weise. Auf diese Weise modifizierte Kameras können allerdings auf spezifische spektrale Analyseparameter beschränkt sein, weil die Filter nicht gewechselt werden können, und darum nicht angepasst werden können, um eine einmalige Farbstoffkombination zu adressieren, die für die Probe verwendet wird. Somit ist die zweite Technik im Allgemeinen entweder auf das Detektieren von Kontrast zwischen der interessanten/den interessanten Arten und dem Rest der Probe oder die Analyse der Probe über eine schmale Bandbreite angewiesen.

[0016] Spektrometer, wie beispielsweise das beschrieben in US-Patent Nr. 6,007,996, McNamara et al., können eine besondere Kombination von Farbstoffen und ein Interferometer implementieren, um die nötigen Bilddaten für eine Analyse zu sammeln. Das '996-Patent offenbart eine Abbildungstechnik, die erfordert, dass fluoreszente Farbstoffe gemäß einem besonderen Verfahren gewählt werden, um eine spezifische Kombination von Farbstoffen bereitzustellen. Ein Interferometer, das zum Untersuchen einer schmalen Bandbreite (vordefinierter Wellenlängenbereich oder vorbestimmter Satz von linearen Kombinationen von spektraler Intensität) ausgestaltet ist, wird dann benötigt, um die Probe zu analysieren, wobei die spektrale Datensammlungsvorrichtung und die Auswahl an Farbstoffen derart sein muss, dass die spektrale Komponente, die mit jedem der

Färbungen verknüpft ist, gesammelt werden kann. Demgemäß erfordert das Interferometer, dass mehrere Rahmen der Probe bei aufeinanderfolgenden Messungserhöhungen über einen Wellenlängenbereich, der beobachtet werden soll, erfasst werden, wobei jeder der Rahmen die spektrale Auflösung mit schmaler Bandbreite der Interferometervorrichtung abdeckt. Somit müssen mehrere Rahmen für jede Probe über den Wellenlängenbereich gesammelt werden, wobei die Bilder gemäß jedem Farbstoff durch Integrieren der mehreren Rahmen, die das optische Signal umfassen, über den spektralen (Wellenlängen-)Bereich der CCD-Matrix, unter Verwendung eines RGB-Algorithmus getrennt werden, um ein konvertiertes RGB-Bild bereitzustellen.

[0017] WO 98/55026, Youvan et al., offenbart Bildgebungshardware und -software, Kalibrierungsmittel und Verfahren zur Visualisierung und Quantifizierung der Menge eines Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET), der zwischen Donor- und Akzeptormolekülen in Epifluoreszenzmikroskopie stattfindet, und verwendet Algorithmen, die das Bild falsch färben, um Pixel anzuzeigen, die radiometrisch korrigierte Fluoreszenzemission von dem Donor (blau), Akzeptor (grün), und FREI (rot) aufweisen, wobei eine Orthonormalisierungstransformation (Förster-Gleichung) verwendet wird, um Donor, Akzeptor und FRET-Signale in die einzelnen Rot-, Grün- und Blau-Kanäle zu konvertieren.

[0018] Beim Durchführen solcher kolorimetrischen Analysen müssen die Eigenschaften des Bildgebungssystems adressiert werden, um beispielsweise für chromatische oder andere Aberrationen zu korrigieren. In dieser Hinsicht sind viele Lösungen auf Hardware-Lösungen gerichtet, welche in Bezug auf beispielsweise Kosten unvorteilhaft sein können, oder keine komplette Lösung für das Problem bereitstellen. US-Patent Nr. 5,717,518, Shafer et al., korrigiert beispielsweise chromatische Aberrationen unter Verwendung katadiotropischer Abbildungsoptiken, die eine Kombination von einem oder mehreren Linsenelementen und einem oder mehreren reflektierenden (Spiegel) Elementen in Reihe einsetzen. Ein optisches System, das ein katadiotropisches Abbilden verwendet, umfasst eine Fokussierungslinsengruppe mit mehreren Linsenelementen aus einem einzigen Material, mit brechenden Oberflächen, die Krümmungen und Positionen aufweisen, die ausgewählt werden, um Licht an ein dazwischenliegendes Bild zu fokussieren, mit hohen Korrekturniveaus in dem endgültigen Bild von sowohl Bildaberrationen als auch chromatischen Variationen von Aberrationen. Die Feldlinsengruppe ist in Nähe des dazwischenliegenden Bildes positioniert, um chromatische Aberrationen zu korrigieren. Die katadiotropische Gruppe umfasst einen konkaven sphärischen Reflektor und einen planaren oder nahezu planaren Reflektor (ein reflektivbeschichtetes Linsenelement) in Nähe des endgültigen Bildes, wobei beide reflektive Elemente zentrale optische Aperturen aufweisen. Die katadiotropische Gruppe fokussiert Licht von dem dazwischenliegenden Bild auf ein endgültiges Bild. In der Praxis kann das katadiotropische Abbildungssystem in ein Mikroskopobjektiv integriert sein, welches Licht, das von einer Probe gesammelt wird, in ein vergrößertes Bild bildet, dass durch eine Relais-Linse oder -linsensystem in die Apertur einer Video- oder CCD-Matrix-Kamera zum Bereitstellen einer Bilddatenausgabe transferiert wird.

[0019] US-Patent Nr. 5,734,498, Krasieva et al., offenbart ebenso ein Beleuchtungselement für herkömmliche Lichtmikroskope, das aus chromophoren und/oder lichtstreuenden Körpern in einer stabilen Matrix besteht, die vollständig einen unendlichen Satz von Kondensoren für ein optisches Mikroskop ersetzt und eine Beleuchtung bereitstellt, die vollständig vergleichbar mit einer Koehler-Beleuchtung ist. Farbkontrastfilter können auch verwendet werden, um Kontrast innerhalb von Schwarzweiß-Fotografien zu steuern und der am gewöhnlichsten verwendete Farbkontrastfilter ist grün, weil Objektivaraberrationen nahe der grünen Wellenlänge am effektivsten kompensiert werden und ein Verlust von Bildklarheit aufgrund von chromatischen Aberrationen durch einen grünen Filter verhindert oder zumindest verbessert wird.

[0020] Des Weiteren offenbart US-Patent Nr. 5,016,173, Kenet et al., eine Vorrichtung und ein Verfahren für eine in vivo Überwachung von visuell erreichbaren Oberflächen des Körpers und synthetisiert Verfahren von Systemidentifikation und Computersehen, um Merkmale von Oberflächen oder Unteroberflächen anatomischen, physiologischen, pathologischen Strukturen oder Prozessen zu quantifizieren und/oder zu klassifizieren. Anatomische Oberflächen werden mit Licht stimuliert (sichtbar, Infrarot und/oder violett, strukturiert oder gleichförmig), gefolgt von der quantitativen Analyse von digitalen Bildern (Vielfachauflösung, Vielfachansicht, und/oder multispektral) von reflektiertem oder emittiertem Licht von der interessierenden Oberfläche.

[0021] US 6,007,996 offenbart ein Verfahren einer in situ Analyse einer biologischen Probe, das die Schritte eines (a) Färbens der biologischen Probe mit einer Färbung; und (b) eine Verwendung einer spektralen Datensammlungsvorrichtung zum Sammeln spektraler Daten von der biologischen Probe umfasst, wobei die spektrale Datensammlungsvorrichtung und die Färbungen derart ausgewählt sind, dass eine spektrale Komponente, die mit jeder der Färbungen verknüpft ist, sammelbar ist.

[0022] WO 98/55026 offenbart ein Verfahren zum Kalibrieren eines Fluoreszenzresonanzenergietransfers bei

einer Mikroskopie, das ein Orthonormalisierungsverfahren involviert.

[0023] US 5,717,518 offenbart ein ultraviolett (UV) katadiotropisches Abbildungssystem, mit einer Korrektur über ein breites Spektrum von primären und Rest-, longitudinalen und lateralen Aberrationen für Wellenlängen, die sich in das Tiefe UV erstrecken.

[0024] US 5,734,498 offenbart ein Beleuchtungselement, das aus Chromophoren, insbesondere Fluorophoren, und/oder lichtstreuenden Körpern in einer stabilen, typischerweise einer Polymerkunststoffmatrix besteht.

[0025] US 5,016,173 offenbart eine Vorrichtung und ein Verfahren für eine in vivo Überwachung von visuell erreichbaren Oberflächen des Körpers.

[0026] Demgemäß sind Techniken, die in einer kolorimetrischen Analyse von präparierten Proben verwendet werden, von begrenzten Nutzen in der Detektion und Quantifizierung von interessanten Arten aufgrund von mehreren Faktoren, wie beispielsweise spektrales Überschneiden, Mischen von Farben aufgrund räumlicher Überlappung von Membran, Cytoplasma und Kernmarkierungen, chromatische Aberrationen in dem optischen Pfad, begrenzte spektrale Auflösung der Erfassungsvorrichtung, Kalibrierungsbesonderheiten, Subjektivität der Detektion und des Quantifizierungsprozesses, und Inkonsistenzen zwischen menschlichen Bedienungs-personen. Der Bildverarbeitungsteil von kolorimetrischen Analysetechniken war historisch auf die subjektive Detektion von Kontrast innerhalb der präparierten Probe oder auf eine komplexe und voluminöse Analyse der Probe bei verschiedenen spezifischen Wellenlängen von Licht unter Verwendung einer Kombination von Licht-quellen und Filtern gerichtet. Darum besteht ein Bedarf für eine einfachere und effektivere kolorimetrische Ana-lysetechnik, die die Detektions- und Quantifizierungsbegrenzungen, die in Analysetechniken nach dem Stand der Technik gefunden werden, überwindet. Solch eine Technik sollte auch fähig sein, Daten mit hoher Qualität bereitzustellen, die die nötigen Analyseinformationen über die Probe umfassen, während Subjektivität und In-konsistenz in der Probenanalyse reduziert wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0027] Das obige und andere Bedürfnisse werden von Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung erfüllt.

[0028] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Bestimmen einer Menge von mindestens einer Mo-lekülarart bereit, die eine Probe umfasst, wobei jede Molekülarart mit einem Farbstoff markiert ist, in einem Video-mikroskopsystem, wobei das Verfahren umfasst: Aufnehmen eines Bilds der Probe als Bilddaten mit einer Breitband-Farbbild-Erfassungsvorrichtung; Bestimmen einer optischen Dichte der Probe von den Bilddaten in jedem von einem roten, grünen und blauen Kanal an einem Pixel in dem Bild, um eine entsprechende optische Dichtematrix für das Pixel zu bilden; und Multiplizieren der optischen Dichtematrix mit einer Inversen einer re-lativen Absorptionskoeffizientenmatrix, um eine resultierende Matrix für das Pixel zu bilden, wobei die relative Absorptionskoeffizientenmatrix unabhängig von der Probe einen relativen Absorptionskoeffizienten für jeden Farbstoff in sowohl dem roten, grünen als auch dem blauen Kanal umfasst, wobei die resultierende Matrix die Menge jeder Molekülarart, wie von dem entsprechenden Farbstoff markiert, für das Pixel umfasst.

[0029] Die vorliegende Erfindung stellt ein Videomikroskopsystem zum Bestimmen einer Menge von minde-stens einer Molekülarart bereit, die eine Probe umfasst, wobei jede Molekülarart von einem Farbstoff markiert ist, von einem Bild der Probe, wobei das System umfasst: eine Breitband-Farbbild-Erfassungsvorrichtung, die so ausgestaltet ist, dass sie fähig ist, ein Bild der Probe als Bilddaten aufzunehmen; und eine Computervorrich-tung, funktionsfähig verbunden mit der Bilderfassungsvorrichtung und umfassend: einen ersten Verarbeitungsbereich, der zum Bestimmen einer optischen Dichte der Probe von den Bilddaten in jedem von einem roten, grünen und blauen Kanal (**550, 600, 650**) an einem Pixel in dem Bild ausgestaltet ist, um eine entsprechende optische Dichtematrix für das Pixel zu bilden; und einen zweiten Verarbeitungsbereich, der zum Multiplizieren der optischen Dichtematrix mit einer Inversen einer relativen Absorptionskoeffizientenmatrix ausgestaltet ist, um eine resultierende Matrix für das Pixel des Bilds zu bilden, wobei die relative Absorptionskoeffizientenmatrix einen relativen Absorptionskoeffizienten für jeden Farbstoff umfasst, unabhängig von der Probe, in sowohl dem roten, dem grünen und dem blauen Kanal, wobei die resultierende Matrix die Menge von jeder Molekülarart, wie von dem entsprechenden Farbstoff markiert, für das Pixel umfasst.

[0030] Solche Abbildungstechniken wie hierin beschrieben, sonst auch als multispektrale Abbildungstechni-ken bekannt, ermöglichen, wenn insbesondere für Farbabbildung angepasst, eine im Wesentlichen Echtzeit-oder Videofrequenz, Verarbeitung und ein Anschauen der Probe. Die Verwendung von beispielsweise einer RGB-Farb-CCD-Kamera ermöglicht es, dass eine Erfassungs- und Verarbeitungszeit für Probenbilder bei ei-

ner Videofrequenz, typischerweise 40 Millisekunden pro Rahmen durchgeführt wird, welches einen wesentlichen Vorteil im Vergleich mit Abbildungstechniken nach dem Stand der Technik bereitstellt, welche im Allgemeinen Gesichtsfelderfassungs- und Verarbeitungszeiten von über 1 Sekunde aufweisen. Wo eine RGB-Kamera von dem System verwendet wird, wird eine Bilderfassung durch die verschiedenen Kanäle parallel durchgeführt und Nachschlagetabellen (LUT) können erzeugt werden, um die möglichen RGB-Farbeingabewerte vorbestimmten Konzentrationen und/oder Transmission von jedem von verschiedenen Farbstoffen zuzuordnen. Somit können solche Fähigkeiten beispielsweise eine Verarbeitungsgeschwindigkeit verbessern und eine Echtzeitverarbeitung für Anzeigezwecke vereinfachen.

[0031] Demgemäß kann eine a posteriori Auswertung des Bildes durchgeführt werden um die Effizienz einer a priori bekannten Farbstoffkombination, die zum Lösen der linearen Gleichungen für jeden Pixel verwendet wird, auszuwerten. Das bedeutet, eine Auswertung wie hierin beschrieben stellt auch eine Konfidenzauswertung für jeden Pixel dadurch bereit, dass die Farbe und Intensität, die bei dem bestimmten Pixel gemessen wird, durch eine Kombination der a priori bekannten Farbstoffe gerechtfertigt sein kann. Solch eine Konfidenzauswertung kann ausgedrückt werden als das Inverse der nächsten Übereinstimmung in dem theoretischen Modell. In einer Situation, in welcher weniger Farbstoffe auszuwerten sind als Eingabekanäle (weniger unbekannte Parameter als Gleichungen, z. B. eine Gegenfärbung und eine Markierung (= 2 Farbstoffe) wenn 3 Eingabekanäle (RGB) verfügbar sind), kann die redundante Information verwertet werden, um mögliche Fehler zu minimieren und darum die Genauigkeit des Detektions- und Quantifizierungssystems zu maximieren.

[0032] Somit umfassen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung eine kolorimetrische Analysetechnik für präparierte Proben, die effektive Detektion und Quantifizierung einer Art, die von Interesse ist, bereitstellt, die begrenzende Faktoren von Techniken nach dem Stand der Technik, wie beispielsweise spektrales Überschneiden, Mischen von Farben aufgrund von räumlichen Überschneidungen von Membran- und Kernmarkierungen, begrenzte spektrale Auflösung der Erfassungsvorrichtung, Kalibrierungsbesonderheiten, die Subjektivität des Detektions- und Quantifizierungsprozesses, und Inkonsistenz zwischen menschlichen Bedienpersonen der Analyseeinrichtung überwindet. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen des Weiteren eine Bildverarbeitungstechnik bereit, die nicht auf der subjektiven Detektion von Kontrast innerhalb der präparierten Probe oder einer komplexen und voluminösen Analyse der Probe bei spezifischen Wellenlängen von Licht unter Verwendung einer Kombination von Lichtquellen und Filtern angewiesen ist. Darum stellen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung eine einfachere und effektivere kolorimetrische Analysetechnik bereit, die Detektions- und Quantifizierungsbegrenzungen von Analysetechniken nach dem Stand der Technik überwindet, Subjektivität und Inkonsistenz in der Probeanalyse reduziert und fähig ist, die notwendigen Analyseinformationen über die Probe bereitzustellen, sobald ein Bild der Probe aufgenommen ist, ohne auf eine weitere Untersuchung der Probe angewiesen zu sein, um die Analyse zu vervollständigen. Wie hierin beschrieben werden diese und andere Vorteile gegenüber kolorimetrischen Analysetechniken nach dem Stand der Technik realisiert.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0033] Nachdem somit die Erfindung allgemein beschrieben wurde wird nun Bezug auf die beigefügten Zeichnungen genommen, welche nicht notwendiger Weise maßstabsgetreu gezeichnet sind und worin:

[0034] [Fig. 1](#) eine allgemeine schematische Repräsentation eines quantitativen Video-Mikroskopsystems gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist.

[0035] [Fig. 2](#) ist eine schematische Repräsentation der zweckmäßigen Umsetzung einer erweiterten Ausgestaltung eines quantitativen Videomikroskopsystems gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0036] Die vorliegende Erfindung wird nun hiernach genauer mit Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben, in welchen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung gezeigt sind. Diese Erfindung kann allerdings in vielen verschiedenen Formen ausgeführt werden, und sollte nicht als auf die hierin dargelegten Ausführungsformen begrenzt ausgelegt werden; vielmehr werden diese Ausführungsformen bereitgestellt, so dass diese Offenbarung genau und vollständig ist, und einem Fachmann den Umfang der Erfindung vollständig mitteilt. Gleiche Nummern beziehen sich durchweg auf gleiche Elemente.

[0037] Die Plattform für die Auswertung von biologischen Proben mittels Bildanalyse verschiebt sich vermehrt

von einem Universalbildanalysierer zu einer spezialisierteren und oft hoch spezialisierten zweckbestimmten „Pathologie-Arbeitsstation“. Solche Arbeitsstationen sind typischerweise ausgestaltet, um Routinearbeit zu vereinfachen, wobei oft viele der Werkzeuge die zum Bereitstellen der notwendigen Informationen für einen Pathologen benötigt werden, um die bestmöglichen Ergebnisse zu bestimmen, kombiniert werden. Ein Beispiel einer solchen Arbeitsstation ist in [Fig. 1](#) als ein quantitatives Videomikroskopsystem veranschaulicht, angedeutet durch das Bezugszeichen **100**, gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Das System **100** umfasst im Allgemeinen ein Mikroskop **150**, das eine Lichtquelle **200** und ein Vergrößerungsobjektiv **250** aufweist, eine Kamera **300**, eine Computervorrichtung **350**, und eine Datenübermittlungsverbindung **400** zwischen der Kamera **300** und der Computervorrichtung **350**. Das Mikroskop **150** kann beispielsweise ein Axio-plan (oder Axiovert) Mikroskop, das von ZEISS aus Deutschland hergestellt wird, oder ein ähnliches Mikroskop, das eine Hellfeldlichtquelle aufweist, umfassen. Die Kamera **300** ist funktionsfähig mit dem Mikroskop **150** verbunden und umfasst bei einer Ausführungsform eine 3CCD RGB Kamera wie beispielsweise eine Modellnr. DC-330E Dage-MIT RGB 3CCD Kamera, hergestellt von Dage-MIT, Inc. aus Michigan City, IN oder eine ähnliche RGB Kamera. Typischerweise umfasst eine solche Kamera **300** auch einen zugehörigen Frame-Grabber (nicht gezeigt), um eine Bildaufnahme zu vereinfachen, wobei sowohl die Kamera **300** als auch der zugehörige Frame-Grabber hierin der Einfachheit halber als die „Kamera **300**“ bezeichnet werden. In einigen Fällen kann die Kamera **300** beispielsweise durch einen linearen flachen Scanner ersetzt werden, der einen 3CCD Chip oder ein Äquivalent aufweist. Zum Beispiel kann ein Model Nr. Super CoolScan 4000 ED Scanner von Nikon Corporation, für eine Niedrigauflösungsbildgebung verwendet werden. Man beachte, dass obwohl verschiedene Konfigurationen für das benötigte System **100** von der vorliegenden Erfindung genannt werden, die vorliegende Erfindung hierin im Hinblick auf eine Kamera **300** und zugehöriges Mikroskop **150** beschrieben wird. Demgemäß wird ein Fachmann die Fähigkeiten und Methodologien, die mit diesen verschiedenen Konfigurationen zum Erreichen der vorliegenden Erfindung, wie hierin beschrieben, verknüpft sind, verstehen und erkennen.

[0038] Die Kamera **300** ist im Allgemeinen zum Aufnehmen eines Bildes **450** einer Probe **500** durch das Vergrößerungsobjektiv **250** ausgestaltet, wobei das Bild **450** des Weiteren ein digitales Bild umfassen kann, das entsprechende Bilddaten aufweist (hierin gemeinsam als „das Bild **450**“ bezeichnet). Das Bild **450** wird im Allgemeinen als Ganzes aufgenommen, wobei die entsprechenden Bilddaten ein Rotkanal **550**, ein Grünkanal **600**, und ein Blaukanal **650** – Bild in dem Gesichtsfeld umfassen. Die Datenübertragungsverbindung **400** ist ausgestaltet um fähig zu sein, das Bild **450** zu der Computervorrichtung **350** zu übertragen, wobei die Computervorrichtung **350** des Weiteren ausgestaltet ist um fähig zu sein, das Bild **450** in Bezug auf den roten **550**, den grünen **600** und den blauen **650** Kanal zu analysieren.

[0039] Gemäß einem besonders vorteilhaften Aspekt der vorliegenden Erfindung ist das System **100** ausgestaltet, um die Probe gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz zu analysieren. Das Lambert-Beer-Gesetz beschreibt im Allgemeinen eine Proportionalität, die zwischen der Konzentration von Molekülen in einer Lösung (die Konzentration der „Molekülart“ oder die „Probe“) und der Lichtintensität, die durch die Lösung gemessen wird, beobachtet werden kann. Das Lambert-Beer-Gesetz wird typischerweise ausgedrückt als

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

wobei CD die optische Dichte der Lösung ist, ϵ eine Proportionalitätskonstante, die der molare Auslöschungs- oder Absorptionskoeffizient genannt wird, ist, l die Dicke der Probe ist, und C die Konzentration der Molekülart ist. Der Absorptionskoeffizient ϵ ist spezifisch für die Molekülart und wird typischerweise in Einheiten von $\text{Liter} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ausgedrückt.

[0040] Diese Proportionalitätsbeziehung, die durch das Lambert-Beer-Gesetz definiert wird, wurde unter verschiedenen Bedingungen definiert, die beispielsweise monochromatisches Licht, das die Probe beleuchtet, geringe Molekülkonzentrationen innerhalb der Probe, im Allgemeinen keine Fluoreszenz oder Lichtantwörtheterogenität (vernachlässigbare Fluoreszenz und Diffusion) der Probe und ein Fehlen von chemischer Photosensitivität der Probe umfassen. Des Weiteren umfasst eine andere Voraussetzung für eine Analyse gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz beispielsweise korrekte Köhler-Beleuchtung der Probe unter dem Mikroskop. Die Köhler-Beleuchtung ist mit vielen modernen Mikroskopen verfügbar, wobei eine gleichmäßige Beleuchtung der Probe in der Bildebene bereitgestellt wird und eine effektive Kontraststeuerung ermöglicht wird. Die Köhler-Beleuchtung ist kritisch für bestimmte Prozesse, wie beispielsweise eine densitometrische Analyse. Eine korrekte Köhler-Beleuchtung wird typischerweise durch beispielsweise ein zweistufiges Beleuchtungssystem für das Mikroskop bereitgestellt, in welchem die Quelle in der Apertur des Unter-Objekttisch-Kondensors durch einen zusätzlichen Kondensor abgebildet wird. Der Unter-Objekttisch-Kondensor bildet wiederum ein Bild des zusätzlichen Kondensors auf dem Objekt. Eine Irisblende kann auch an jedem Kondensor platziert werden, wo-

bei der ersten Iris das Gebiet des Objekts, das beleuchtet werden soll, steuert, und die zweite Iris die numerische Apertur des Beleuchtungsstrahls variiert.

[0041] Das Lambert-Beer-Gesetz weist eine additive Eigenschaft auf, so dass, wenn die Probe mehrere lichtabsorbierende Molekülararten umfasst, beispielsweise s_1 und s_2 , die entsprechenden Konzentrationen C_1 und C_2 aufweisen, die OD der Probe einer Dicke l (wobei $l_1 = l_2 = l$ für die Probe, wie in der Lösung hiernach angedeutet) ausgedrückt werden kann als:

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

[0042] Diese Situation kann beispielsweise in einer biologischen Analyse auftreten, in der eine „Szene“, ein Gesichtsfeld oder ein Bereich der Probe mit zwei Farbstoffen, die aus einem Markierungsfarbstoff zum Abzielen auf die Molekülarart, die von Interesse ist, und einer Gegenfärbung zum Färben des Rests der Probe bestehen, gefärbt wurde.

[0043] Um die Konzentration einer bestimmten Art, die unter einem Mikroskop abgebildet wird, genau zu messen, müssen die Messungen der optischen Dichten, die bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt werden, spezifisch dem beobachteten Bereich der Probe entsprechen. Das bedeutet, das Mikroskopsystem muss für chromatische Aberrationen korrigiert sein, wobei eine solche Korrektur und Kompensation durch Hardware, Software oder eine Kombination von Software und Hardware erreicht werden kann. Im Allgemeinen neigt Glas dazu, Licht zu dispergieren, was typischerweise verursachen kann, dass eine einfache Glaslinse beispielsweise blaues Licht bei einer kürzeren Distanz fokussiert als rotes Licht. Das bedeutet, dass eine einfache Glaslinse verschiedene Brennweiten für Licht aufweist, das verschiedene Wellenlängen umfasst. Diese Dispersioneigenschaften von Glas verursachen zwei beobachtete Effekte. Zunächst wird longitudinale chromatische Aberration oder die Positionsunterschiede der Brennpunkte für verschiedene Wellenlängen von Licht entlang der vertikalen Achse beobachtet, wobei bei einem Fokussieren des Bildes für ausgewählte Wellenlängen von Licht, die einer bestimmten Farbe entsprechen, das Bild dazu neigt, leicht defokussiert zu sein, wenn mit Wellenlängen von Licht, die anderen Farben entsprechen, betrachtet wird. Zum Beispiel wird dasselbe Bild in einem RGB-Farbraum, wenn das Bild für eine grüne Wellenlänge von Licht fokussiert ist, dazu neigen, defokussiert zu sein, wenn mit blauen oder roten Lichtwellenlängen betrachtet wird. Zweitens wird eine laterale chromatische Aberration als eine Differenz in einer Vergrößerung für Licht von verschiedenen Wellenlängen aufgrund der verschiedenen Brennpunkte derer beobachtet. Zum Beispiel wird in einem RGB-Farbraum ein Bild, das mit relativ kurzen, blauen Lichtwellenlängen betrachtet wird, größer erscheinen als das gleiche Bild betrachtet mit relativ langen, roten Lichtwellenlängen.

[0044] In Mikroskopiesystemen, die hochqualitative Objektive aufweisen, wie beispielsweise Apochromatobjektive, kann ein großer Bereich der auftretenden chromatischen Aberration korrigiert werden. Allerdings kann restliche laterale chromatische Aberration noch verbleiben, was in Vergrößerungsunterschieden über Lichtwellenlängen resultiert. Diese laterale chromatische Aberration kann visuell schwierig zu beobachten sein, da ein menschlicher Beobachter dazu neigt, sich auf das Zentrum des Gesichtsfelds zu konzentrieren, wo die laterale Aberration typischerweise nicht vorhanden ist. Wenn das Gesichtsfeld allerdings beispielsweise unter Verwendung einer CCD-Kamera abgebildet wird, wird eine sehr kleine laterale chromatische Aberration, die beispielsweise in sogar weniger als 1% Unterschied in der Vergrößerung zwischen Wellenlängen resultiert, wird in geringen Farbverschiebungen um die Kanten von Objekten in dem Gesichtsfeld resultieren, aber entfernt von dem optischen Zentrum des Objektivs lokalisiert. Folglich kann ein Pixel, das an einer bestimmten (x, y) Position in dem Bild lokalisiert ist, nicht exakt den entsprechenden Bereich des untersuchten Objekts darstellen, abhängig von den Wellenlängen von Licht, das zum Beleuchten des Objekts verwendet wird, und der Lokalisierung des Objekts innerhalb des Gesichtsfelds. Allerdings, um die von dem Lambert-Beer-Gesetz abgeleiteten Chromagen-Trennungsgleichungen zu lösen, ist eine grundsätzliche Voraussetzung, dass der exakt gleiche Teil des Objekts in dem Gesichtsfeld untersucht werden muss. Darum müssen Bilder, die für getrennte Wellenlängen von Licht erhalten wurden, angepasst werden, um eine Korrelation in Bezug auf die Regionen des Gesichtsfelds bereitzustellen, in denen Chromagen-Trennungsgleichungen gelöst werden müssen.

[0045] Demgemäß involviert ein vorteilhafter Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zum Korrigieren von lateraler chromatischer Aberration innerhalb eines Mikroskopsystems. Zuerst werden die Koordinaten des Zentrums des Vergrößerungsobjektivs **250** in Bezug auf das Zentrum der elektronischen Vorrichtung oder des Chips, die die bildproduzierende Komponente der Kamera **300** umfasst, bestimmt. Ein beobachteter Vergrößerungsfaktor wird dann für jede Wellenlänge bestimmt und mit dem Vergrößerungsfaktor für eine willkürlich gewählte Wellenlänge verglichen. Beispielsweise würde in einem RGB-Farbraum die zentrale Wellenlänge, nämlich der grüne Kanal **600**, die ausgewählte Wellenlänge umfassen, mit welcher der Vergrößerungsfak-

tor für den roten **550** und den blauen **650** Kanal verglichen werden würde. Das Bild für jede Wellenlänge wird dann angepasst gemäß des bestimmten relativen Vergrößerungsfaktors und den relativen Koordinaten des Zentrums des Vergrößerungsobjektivs **250**.

[0046] Um die ersten zwei Schritte des beschriebenen Verfahrens zu vereinfachen, wird ein spezifischer Kalibrierungsobjektträger verwendet, wobei der Objektträger mit einem Gitter von regelmäßig beabstandeten feinen Löchern durch ein Lichtblockierungsmedium ausgestaltet ist. Ein Bild des Gitters wird bei jeder Wellenlänge von Licht aufgenommen, das verwendet wird, um die Probe zu beleuchten. Beispielsweise kann ein Bild für sowohl den roten **550**, den grünen **600** als auch den blauen **650** Kanal erzeugt werden. Das Zentrum von jedem Loch wird dann beispielsweise in x , y Koordinaten berechnet. Das Bild, das der Wellenlänge von Licht entspricht, die am nächsten zu dem Mittel von Wellenlängen von Licht unter Beobachtung ist (der grüne Kanal **600** beispielsweise) wird dann als Referenzbild ausgewählt. Anschließend wird jedes der Bilder für die andere betrachtete Wellenlänge mit dem Referenzbild verglichen. Für jedes Loch in dem Gitter wird die Differenz in der x -Richtung (δx) und die Differenz in der y -Richtung (δy) dann bestimmt für das entsprechende Loch in dem Referenzbild und dem Bild, das damit verglichen wird. Gleichungen, wie beispielsweise lineare Gleichungen, die den Rekonstruktionsfehler für δx als eine Funktion von x und δy als eine Funktion von y minimieren, werden dann bestimmt. Von diesen zwei Gleichungen wird das Zentrum des Objektivs (x_0 , y_0) bestimmt, wobei x_0 die Lösung der ersten Gleichung in x umfasst, wenn δy 0 ist, und y_0 die Lösung der zweiten Gleichung in y umfasst, wenn δx 0 ist.

[0047] Eine lineare Gleichung, die den Rekonstruktionsfehler von δd , wobei $\delta d = (\delta x^2 + \delta y^2)^{1/2}$ ist, als eine Funktion der Distanz zu dem Zentrum des Objektivs minimiert, wird dann bestimmt, wobei die Steigung dieser Gleichung den Vergrößerungsfaktor für die bestimmte Wellenlänge in Bezug auf die Referenzwellenlänge bereitstellt. Dieses Bild für die bestimmte Wellenlänge wird dann räumlich angepasst, so dass der Ursprung des Bilds dem Zentrum des Objektivs entspricht und die Vergrößerung des Bilds der Vergrößerung des Referenzbilds entspricht.

[0048] Sobald das Mikroskop **150** konfiguriert wurde, um Köhler-Beleuchtung für eine Bilderfassung bereitzustellen und chromatische Aberrationen adressiert wurden, kann die additive Eigenschaft des Lambert-Beer-Gesetzes auf Chromagen-Trennung angewandt werden. Zum Beispiel kann die additive Eigenschaft des Lambert-Beer-Gesetzes auf eine Situation ausgedehnt werden, in welcher eine Szene in einer Farbumgebung analysiert wird, die zum Beispiel von einer RGB-Kamera erzeugt wurde, und in einen roten, einen grünen und einen blauen Kanal getrennt wurde. In einem solchen Fall weist der Markierungsfarbstoff (oder „Farbstoff 1“) Absorptionskoeffizienten ϵ_{1r} , ϵ_{1g} und ϵ_{1b} in dem roten, dem grünen bzw. dem blauen Kanal auf. Man beachte, dass in einigen Fällen die Analyse des Bildes in dem roten, dem grünen und dem blauen Kanal equivalent ist zu einer Analyse einer roten Repräsentation des Bildes über das rote Spektrum, einer grünen Repräsentation des Bildes über das grüne Spektrum und einer blauen Repräsentation des Bildes über das blaue Spektrum. Demgemäß weist die Gegenfärbung (oder „Farbstoff 2“) Absorptionskoeffizienten ϵ_{2r} , ϵ_{2g} und ϵ_{2b} in dem roten, dem grünen bzw. dem blauen Kanal auf. Darum führt eine Analyse der Probe gemäß der additiven Eigenschaft des Lambert-Beer-Gesetzes in der RGB-Umgebung zu drei Gleichungen für die optische Dichte dieser:

$$OD_r = \epsilon_{1r} \cdot I_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2r} \cdot I_2 \cdot C_2 \quad (3)$$

$$OD_g = \epsilon_{1g} \cdot I_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2g} \cdot I_2 \cdot C_2 \quad (4)$$

$$OD_b = \epsilon_{1b} \cdot I_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2b} \cdot I_2 \cdot C_2 \quad (5)$$

wobei OD_r , OD_g und OD_b die optischen Dichten der Probe repräsentieren, die in dem roten, dem grünen bzw. dem blauen Kanal gemessen wurden. Des Weiteren werden in dem Fall einer erhöhten Probenpräparationskomplexität, wie beispielsweise der Behandlung der Probe mit drei verschiedenen Farbstoffen, Gleichungen (3), (4) und (5) zu:

$$OD_r = \epsilon_{1r} \cdot I_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2r} \cdot I_2 \cdot C_2 + \epsilon_{3r} \cdot I_3 \cdot C_3 \quad (6)$$

$$OD_g = \epsilon_{1g} \cdot I_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2g} \cdot I_2 \cdot C_2 + \epsilon_{3g} \cdot I_3 \cdot C_3 \quad (7)$$

$$OD_b = \epsilon_{1b} \cdot I_1 \cdot C_1 + \epsilon_{2b} \cdot I_2 \cdot C_2 + \epsilon_{3b} \cdot I_3 \cdot C_3 \quad (8)$$

[0049] In einer solchen Situation können die drei Farbstoffe beispielsweise einen Markierungsfarbstoff und zwei Gegenfärbungen umfassen, oder zwei Markierungsfarbstoffe und eine Gegenfärbung, oder sogar drei se-

parate Markierungsfarbstoffe. Einem Fachmann wird allerdings klar sein, dass diese gezeigte Eigenschaft des Lambert-Beer-Gesetzes ausgedehnt werden kann, um eine sogar größere Vielzahl von Farbstoffkombinationen gemäß dem Gedanken und Umfang der vorliegenden Erfindung zu umfassen. Man beachte, dass eine besonderes vorteilhafte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Schnellaufnahmefarbbildungsvorrichtung, wie beispielsweise eine 3CCD-RGB-Kamera für eine multispektrale Abbildung der Markierungen über drei verschiedene (rot, grün und blau) Kanäle verwendet. Demgemäß wird die beispielhafte Analyse hierin im Hinblick auf drei Gleichungen präsentiert, obwohl ein Fachmann erkennen wird, dass das gezeigte Konzept auf so viele Kanäle wie verfügbar mit einer bestimmten Abbildungsvorrichtung angewandt werden kann.

[0050] Bei einem Anwenden des Lambert-Beer-Gesetzes auf ein digitales Mikroskopsystem **100** gemäß den Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist es schwierig und komplex, ungenau oder manchmal nicht möglich, die Dicke **1** der Probe **500** zu messen. In solchen Fällen kann die Konzentration C der Molekülarart ausgedehnt werden und als das Produkt von 1 und C ($1 \cdot C$) untersucht werden und die Ergebnisse demgemäß behandelt werden. Zum Beispiel wenn die Konzentration eines Farbstoffs mit der Konzentration eines anderen Farbstoffs in einer bestimmten Probe verglichen wird, wird der Probendickenterm beiden Konzentrationen gemein sein und somit wird es weniger wichtig werden, die Probendicke als einen absoluten und genauen Wert zu bestimmen. Demgemäß wird einem Fachmann klar sein, dass eine genaue Bestimmung der Dicke der Probe typischerweise nicht benötigt wird, aber im Allgemeinen als eine Konstante bei einer Untersuchung der Gleichungen wie hierin beschrieben behandelt werden kann.

[0051] Die Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes auf ein digitales Mikroskopsystem **100** der vorliegenden Erfindung erkennt auch, dass das Lambert-Beer-Gesetz auch ausgedrückt werden kann als:

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

für ein digitales Bild **450** der Probe **500**, das mehrere Pixel umfasst, die beispielsweise gemäß einem kartesischen Koordinatensystem angeordnet sind, wobei (x, y) ein bestimmtes Pixel in dem Bild **450** bezeichnen, $OD_{(x,y)}$ die optische Dichte der Probe **500** bei diesem Pixel ist, $I_{(x,y)}$ die gemessene Lichtintensität oder Transmissivität der Probe **500** bei diesem Pixel ist, und $I_{0(x,y)}$ die Lichtintensität der Lichtquelle **200** wie ohne jegliches dazwischenliegendes lichtabsorbierendes Objekt gemessen ist, wie beispielsweise die Probe. Demgemäß:

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

wobei IOD die integrierte optische Dichte des digitalen Bilds **450** der Probe **500** ist und N die Anzahl von Pixeln in dem Flächenbild **450** der Probe ist. Ein Fachmann wird des Weiteren erkennen, dass die logarithmische Beziehung, die in Gleichungen (9) und (10) beschrieben ist, in verschiedenen anderen Basen innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung ausgedrückt werden kann. Die Beziehungen können beispielsweise in der Basis 2, Basis 10 oder als natürliche Logarithmen ausgedrückt werden, wobei die verschiedenen Basen durch entsprechende Proportionalitätskonstanten in Bezug stehen (zum Beispiel $\ln(x)$ oder $\log_e(x) = 2,3026 \log_{10}(x)$). Somit kann die Proportionalitätskonstante angemessen berücksichtigt werden, wenn relative Vergleiche von Lichtintensitäten gezogen werden. Des Weiteren wird die Proportionalitätsbeziehung zwischen der optischen Dichte OD der Probe und den Farbstoffkonzentrationen in quantitativer Mikroskopie gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz erhalten.

[0052] Darum wird für eine präparierte Probe **500**, die von dem System **100** untersucht wird, die geeignete Beziehung ausgedrückt als:

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

[0053] Wenn zum Beispiel eine 8 Bit-RGB-Kamera **300** in dem System **100** verwendet wird, kann die Lichtintensität, die durch die Probe in jedem Kanal transmittiert wird, als 2^8 ($= 256$) Werte zwischen 0 und 255 ausgedrückt werden. Zum Beispiel wird die anfängliche Intensität I_0 der Lichtquelle **200**, welche 100% Transmission entspricht, vorzugsweise in dem roten **550**, grünen **600** und blauen **650** Kanal als ein Wert ausgedrückt, der sich 255 annähert, was den hellstmöglichen Wert in jedem Kanal repräsentiert. Die Kamera **300** und/oder die Lichtquelle **200** können demgemäß eingestellt werden, so dass bei einem Nichtvorhandensein der Probe ein reines „weißes“ Licht einen Intensitätswert von 255 in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal haben wird, was 100% Transmission entspricht. Umgekehrt wird bei einem Nichtvorhandensein von Licht, was im Allgemeinen einer Transmission entspricht, die sich 0 annähert, ein „schwarzes Bild“ einen Intensitätswert aufweisen, der sich in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal 0 annähert. Bei jedem Pixel wird die anfängliche Intensität I_0 der Lichtquelle **200**, die 100% Transmission entspricht, darum

ausgedrückt als die Differenz zwischen dem Intensitätswert, der in Anwesenheit der Lichtquelle **200** gemessen wurde minus dem Intensitätswert, der bei Nichtvorhandensein der Lichtquelle **200** gemessen wurde, für jeweils den roten **550**, den grünen **600** und den blauen **650** Kanal. Weil die Intensität der Lichtquelle **200** räumlich über das Bild **450**, oder über das gemessene Gesichtsfeld variieren kann, und weil das Vergrößerungsobjektiv **250** oder andere optische Komponenten Licht heterogen absorbieren können, kann 100% Transmission durch verschiedene Differenzintensitäten über das gemessene Gesichtsfeld repräsentiert werden. Da allerdings die optische Dichte OD der Probe als der Logarithmus des Verhältnisses der Lichttransmission bei Nichtvorhandensein der Probe (anfängliche Intensität I_0) zu der Lichttransmission bei Vorhandensein der Probe (I) ausgedrückt wird, ist die optische Dichte OD im Wesentlichen räumlich unempfindlich gegenüber geringen Variationen der Differenzintensitäten über das gemessene Gesichtsfeld.

[0054] Da die Lichtquelle **200** im Wesentlichen über die Zeit konstant bleibt oder einfach wieder ausgewertet werden kann, kann die Messung der Lichtintensität für jeden Pixel bei Vorhandensein der Probe in die Transmission I bei diesem Pixel und in jeweils dem roten **550**, grünen **600** und blauen **650** Kanal übersetzt werden. Sobald Werte für die anfängliche Intensität I_0 und Transmission I bestimmt sind, kann die optische Dichte OD berechnet werden. Somit kann an jedem Ort in dem Gesichtsfeld **450**, an dem ein einzelner Farbstoff vorhanden ist (als das einzige Lichtabsorbierende Objekt zwischen der Lichtquelle **200** und der Kamera **300**) der Absorptionskoeffizient ϵ dieses Farbstoffes in sowohl dem roten **550**, dem grünen **600** als auch dem blauen **650** Kanal bestimmt werden. Insbesondere wird $I \cdot C$ für einen bestimmten Pixel in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal gleich sein. Somit kann, wenn sowohl I als auch C bekannt sind, der Absorptionskoeffizient ϵ gemäß Gleichung (1) berechnet werden oder in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal berechnet werden als:

$$\epsilon_r = OD_r / (I \cdot C) = (\ln(I_0 / I_r)) / (I \cdot C) \quad (12)$$

$$\epsilon_g = OD_g / (I \cdot C) = (\ln(I_0 / I_g)) / (I \cdot C) \quad (13)$$

$$\epsilon_b = OD_b / (I \cdot C) = (\ln(I_0 / I_b)) / (I \cdot C) \quad (14)$$

[0055] Allerdings ist $I \cdot C$ typischerweise nicht bekannt für einen bestimmten Pixel in einem Bild einer bestimmten Probe. Darum werden die Absorptionskoeffizienten für jeden Kanal gemäß dem Verhältnis der optischen Dichte OD in jedem Kanal, gemessen bei einem bestimmten Pixel, zu der maximalen optischen Dichte OD aus allen der Kanäle, gemessen bei demselben Pixel, berechnet. Insbesondere wird ein Fachmann erkennen, dass die Bestimmung des Absorptionskoeffizienten ϵ in jeweils dem roten **550**, grünen **600** und blauen **650** Kanal bei Nichtvorhandensein einer a priori Kenntnis von I und/oder C eine Sache der Manipulation der linearen Gleichungen ist, um eine relative Lösung zu erhalten, worin $I \cdot C$ willkürlich auf einen Wert von 1 gesetzt wird, wobei:

$$\epsilon_r = OD_r / 1 = OD_r = \ln(I_0 / I_r) \quad (15)$$

$$\epsilon_g = OD_g / 1 = OD_g = \ln(I_0 / I_g) \quad (16)$$

$$\epsilon_b = OD_b / 1 = OD_b = \ln(I_0 / I_b) \quad (17)$$

[0056] Folglich kann, wenn die absolute Konzentration des bestimmten Farbstoffes unbekannt bleibt, ein relativer Absorptionskoeffizient ϵ in jeweils dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal für jeden beliebigen Pixel berechnet werden mit einem Fehlerfaktor, der gleich $I \cdot C$ ist.

[0057] Alternativ, weil I einmalig bei einem bestimmten Pixelort ist und willkürlich auf einen Wert von 1 gesetzt werden kann, können Gleichungen (6–8) wie nachfolgend umgeschrieben werden, wobei C_1 , C_2 und C_3 durch einen Faktor von 1 in Beziehung stehen:

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

$$OD_g = \epsilon_{1g} \cdot C_1 + \epsilon_{2g} \cdot C_2 + \epsilon_{3g} \cdot C_3 \quad (19)$$

$$OD_b = \epsilon_{1b} \cdot C_1 + \epsilon_{2b} \cdot C_2 + \epsilon_{3b} \cdot C_3 \quad (20)$$

[0058] Man beachte, dass die Bestimmung einer Absorptionskoeffizienten ϵ – Matrix für verschiedene Farbstoffe unabhängig von der Probenauswertung durchgeführt werden kann und für eine weitere Anwendung auf Proben, die mit mindestens einem der entsprechenden Farbstoffe behandelt wurden, gespeichert werden

kann. Des Weiteren können die verschiedenen Absorptionskoeffizienten ε – Matrizen für bestimmte Farbstoffe, als auch die ursprünglichen Lichtintensitäten I_0 -Daten für die Lichtquelle **200** in beispielsweise der Computervorrichtung **350**, einem Server, der sich an einem Intranet oder dem Internet befindet, oder einer anderen Datenspeichervorrichtung gespeichert werden, was von einem Fachmann erkannt werden wird. Somit können, wenn Absorptionskoeffizienten ε für die verschiedenen Farbstoffe ausgewertet wurden, und optische Dichten OD von Bilddaten bestimmte wurden, die angemessenen Gleichungen als ein Satz von linearen Gleichungen gelöst werden, um die entsprechenden Konzentrationen der Farbstoffe C_1 , C_2 und C_3 zu extrahieren.

[0059] Mittels einer weiteren Erklärung kann ein repräsentativer Satz von linearen algebraischen Gleichungen zum Beispiel ausgedrückt werden als:

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

wobei für N Unbekannte x_j , $j = 1, 2, \dots, N$ durch M Gleichungen in Beziehung stehen. Die Koeffizienten a_{ij} , wobei $i = 1, 2, \dots, M$ und $j = 1, 2, \dots, N$ sind im Allgemeinen bekannt, wie auch die Größen b_i , $i = 1, 2, \dots, M$. Wenn $M < N$ gibt es effektiv weniger Gleichungen als Unbekannte. In einem solchen Fall kann es entweder keine Lösung oder mehr als eine Lösungsmatrix x geben. Des Weiteren, wenn $N = M$, gibt es genauso viele Gleichungen wie Unbekannte, und eine eindeutige Lösungsmatrix x kann wahrscheinlich bestimmt werden. Zusätzlich, wenn $M > N$, dann gibt es mehr Gleichungen als Unbekannte und im Allgemeinen keine bestimmte Lösungsmatrix x für den Satz von Gleichungen. Demgemäß wird der Satz von Gleichungen als überbestimmt bezeichnet und in einem solchen Fall wird im Allgemeinen die Lösung als die am angemessenste Lösung erachtet, die die beste Übereinstimmung für die Gleichungen bereitstellt, wobei die am besten übereinstimmende Lösung typischerweise der Lösung entspricht, die die geringste Summe von Rekonstruktionsfehlern aufweist.

[0060] Gleichung (21) kann alternativ ausgedrückt werden als:

$$A \cdot x = b \quad (22)$$

wobei „ \cdot “ eine Matrixmultiplikation bezeichnet, A die Matrix von Koeffizienten ist, und b der rechte Seitenteil ausgedrückt als ein Spaltenvektor ist. Im Allgemeinen durch Konvention bezeichnet der erste Index eines Elements a_{ij} die Elementenreihe; während der zweite Index die Elementenspalte bezeichnet. Des Weiteren bezeichnet $a_{i\cdot}$ oder $a[i\cdot]$ eine gesamte Reihe $a[i][j]$, $j = 1, \dots, N$. Demgemäß erfordert die Lösung der Matrixgleichung $A \cdot x = b$ für einen unbekannten Vektor x , wobei A die Koeffizientenmatrix ist, und b der rechte Seitenteil, gewöhnlich die Bestimmung von A^{-1} oder der inversen Matrix der Matrix A . Somit:

$$x = A^{-1} \cdot b \quad (23)$$

[0061] Da A^{-1} die inverse Matrix der Matrix A ist, dann gilt $A \cdot A^{-1} = A^{-1} \cdot A = ID$, wobei ID eine Einheitsmatrix ist. Um das Bestimmen einer Lösung zu vereinfachen können Parameter aufgestellt werden, so dass die Anzahl von Gleichungen größer oder gleich der Anzahl von Unbekannten ist, oder $M \geq N$. Wie vorher erörtert gibt es, wenn $M > N$ im Allgemeinen keine bestimmte Lösungsmatrix x für Gleichung (21) und der Satz von Gleichungen ist überbestimmt. In solchen Situationen ist allerdings die beste „Kompromiss-“ oder bestpassende Lösung oft die Lösung, die am nächsten und gleichzeitig alle der Gleichungen erfüllt. Solche eine Nähe kann beispielsweise durch eine kleinste Quadratmethode definiert werden, wobei die Summe der Quadrate der Differenzen zwischen beiden Seiten der Gleichung (21) minimiert wird. Als ein Ergebnis kann der Oberbestimmte Satz von linearen Gleichungen typischerweise auf ein lösbares lineares Problem reduziert werden, das oft als lineares kleinstes Quadrat – Problem bezeichnet wird, das mit einer Singulärwertzerlegung (SVD) – Mathematik gelöst werden kann, wie von einem Fachmann erkannt werden wird. SVD ist auf die parametrische Modellierung von Daten gerichtet, und ist gewöhnlich das ausgewählte Verfahren zum Lösen linearer kleinste Fehler Quadrat – Probleme und wird des Weiteren im Detail in beispielsweise NUMERICAL RECIPES IN C: THE ART OF SCIENTIFIC COMPUTING (ISBN 0-521-43108-5) Copyright© 1988–1992 durch Cambridge University Press. Programm Copyright© 1988–1992 durch Numerical Recipes Software beschrieben.

[0062] In einigen Situationen können Vorberechnungslösungen für alle möglichen Pixelwerte von der beschriebenen Systemkonfiguration effektiv die Echtzeitverarbeitung der Bildanalyse vereinfachen. Insbesondere wenn eine 8 Bit-Farbbild-Erfassungsvorrichtung wie beispielsweise eine 8 Bit 3CCD RGB – Kamera verwendet wird, wird die gemessenen Lichtintensität I einer Probe 256 mögliche Werte aufweisen, die zwischen Gren-

zen von 0 und 255 in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal schwanken. In einem solchen Fall können alle möglichen Grauwerte (256^3 mögliche Grauwerte für ein 8 Bit-System) in Bezug auf die ursprüngliche Lichtintensität I_0 vorberechnet werden und gespeichert werden, beispielsweise als eine Nachschlagetabelle (LUT) innerhalb der Computervorrichtung **350**. Somit kann für eine Probe **500**, die mit einem bestimmten Farbstoff gefärbt ist, die transmittierte Lichtintensität I (oder die optische Dichte OD) bei einem Pixel in jeweils dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal gemessen werden und dann mit den vorher gespeicherten Grauwerten und der Absorptionskoeffizienten ε – Matrix für den bestimmten Farbstoff verglichen werden, um dadurch die Farbstoffkonzentration C zu bestimmen oder eine Abschätzung deren als das Produkt $I \cdot C$ bei diesem Pixel. Demgemäß wird ein 8 Bit – System **256** (roter Kanal) \times 256 (grüner Kanal) \times 256 (blauer Kanal) = 256^3 mögliche Grauwertlösungen bereitstellen, die sich dadurch auf einen 16 MB LUT für jeden Farbstoff belaufen. Ein System, das eine Grauwertaufösung aufweist, die 8 Bit pro Kanal übertrifft, wird zu größeren LUTs führen, wie beispielsweise ein LUT von > 1 GB für eine Systemauflösung von 10 Bit pro Kanal, wobei die Computervorrichtung **350** angemessen konfiguriert sein kann, um die nötigen Berechnungs- und/oder Speicherfähigkeiten bereitzustellen.

[0063] Der Betrieb des Systems **100** wie oben beschrieben kann des Weiteren beispielsweise veranschaulicht werden, indem angenommen wird, dass die Lichtquelle ein „weißes“ Licht ist, das $I_0 = 255$ in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal aufweist, und das drei Farbstoffe verwendet werden, die die folgenden transmittierte Lichtintensität I Eigenschaften in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal aufweisen:

I	Rot	Grün	Blau
Farbstoff 1	168	127	94
Farbstoff 2	94	241	247
Farbstoff 3	120	94	155

[0064] Die entsprechende optische Dichte OD – Matrix (jedes Element wird als $\ln(I_0/I)$ berechnet) wird somit:

OD	Rot	Grün	Blau
Farbstoff 1	0,417	0,697	0,998
Farbstoff 2	0,998	0,056	0,032
Farbstoff 3	0,754	0,998	0,498

[0065] Da $OD = \varepsilon \cdot I \cdot C$ können allerdings die OD-Werte für jeden Farbstoff in Bezug auf den Kanal normalisiert werden, der die höchste OD aufweist, um eine Matrix von relativen Absorptionskoeffizienten ε für die entsprechenden Farbstoffe bereitzustellen, da die $I \cdot C$ – Werte konstant über die Kanäle sein werden. Demgemäß:

ε	Rot	Grün	Blau
Farbstoff 1	0,418	0,698	1,000
Farbstoff 2	1,000	0,057	0,032
Farbstoff 3	0,755	1,000	0,499

[0066] Anschließend wird unter der Annahme, dass eine Probe **500** mit denselben drei Farbstoffen, Farbstoff 1, Farbstoff 2, Farbstoff 3, gefärbt wurde und dass ein Lichtquelle **200** mit ähnlichen spektralen Eigenschaften verwendet wird, um die Probe **500** zu beleuchten, ein Bild **450** der Probe **500** mit der Kamera **300** aufgenommen. Bei einem bestimmten Pixel in dem Bild **450** bestimmt die Computervorrichtung **350** dann dass die transmittierte Lichtintensität in dem roten **550**, dem grünen **600** und dem blauen **650** Kanal ist:

	Rot	Grün	Blau
I	89	168	154

wobei:

	Rot	Grün	Blau
I_0	255	255	255

somit:

	Rot	Grün	Blau
OD	1,053	0,417	0,504

für das bestimmte Pixel. Darum wird, um die Konzentrationen der drei Farbstoffe bei diesem Pixel zu bestimmen, die OD-Matrix mit der inversen der vorher bestimmten relativen Absorptionskoeffizienten ϵ – Matrix multipliziert ($(OD) \cdot \epsilon^{-1} = I \cdot C$). Demgemäß:

	I·C (Mol·cm/L) oder Creativ
Farbstoff 1	0,455
Farbstoff 2	0,829
Farbstoff 3	0,058

[0067] Gemäß der hierin beschriebenen Methodik können die bestimmten Graustufen oder in diesem Beispiel, RGB-Transmissionswerte von einer Kombination der drei betroffenen Farbstoffe verwendet werden, um ein künstliches Bild zu rekonstruieren, da es keine Unbekannten gibt. Demgemäß würden für das bestimmte Pixel und die bestimmten Farbstoffkonzentrationen Bilder für einzelne Farbstoffe den folgenden schwarz und weiß (BW) oder RGB-Pixelintensitäten entsprechen:

$$\ln(I_{BW}) = \ln(I_0) - OD_{BW}, \text{ wobei } OD_{BW} = C \quad (24)$$

$$\ln(I_r) = \ln(I_0) - OD_r, \text{ wobei } OD_r = \epsilon_r \cdot C \quad (25)$$

$$\ln(I_g) = \ln(I_0) - OD_g, \text{ wobei } OD_g = \epsilon_g \cdot C \quad (26)$$

$$\ln(I_b) = \ln(I_0) - OD_b, \text{ wobei } OD_b = \epsilon_b \cdot C \quad (27)$$

[0068] Demgemäß:

	C	Intensität (I)			
Farbstoff	ausgewertet	BW	Rot	Grün	Blau
Farbstoff 1	0,455	161	210	185	161
Farbstoff 2	0,829	111	111	243	248
Farbstoff 3	0,058	240	244	240	247

[0069] Weitere vorteilhafte Aspekte der vorliegenden Erfindung werden als Ergebnis der Farbstofftrennungstechniken unter Verwendung von Farbvideoabbildung wie hierin vorstehend beschrieben realisiert. Beispielsweise kann ein künstliches Bild des Gesichtsfelds in einem RGB-Farbraum oder in Graustufen als in im Wesentlichen Echtzeit oder Live-Bild erzeugt werden, oder als ein unbewegtes Bild, unter Verwendung von Kombinationen der Farbstoffe, die eine Markierung und/oder eine Gegenfärbung umfassen, die zum Präparieren der Probe verwendet werden. Insbesondere kann ein künstliches Bild des Gesichtsfelds hergestellt werden, welches die Probe wie von all den Farbstoffen betroffen, die Probe wie von einem oder mehreren Markierungsfarbstoffen betroffen, oder die Probe wie von der Gegenfärbung betroffen zeigt. Folglich können, da die Farbstoffe, die zum Präparieren der Probe verwendet werden, von dem System charakterisiert werden, die Fähigkeiten des Systems derart ausgedehnt werden, dass beispielsweise eine Probe oder ein Gesichtsfeld automatisch gescannt werden kann, um eine spezifische interessante Region die durch die Eigenschaften eines bestimmten Farbstoffes identifiziert wird, zu detektieren oder eine auszuführende Aufgabe an dieser spezifischen interessanten Region zu beeinflussen oder zu vereinfachen.

[0070] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das System ausgestaltet sein um fähig zu sein, eine oder mehrere bestimmte Farbstoffe zu detektieren, welche vorher durch das System charakterisiert wurden. In einigen Fällen kann ein solcher Farbstoff beispielsweise die Tinte von einem bestimmten Stift oder ähnliche Tintenmarkierungen umfassen, die durch das System dahingehend charakterisiert wurde, dass sie eindeutige Farbmerkmale aufweist, wobei diese eindeutigen Farbmerkmale von dem System als ein entsprechender Satz von Absorptionskoeffizienten beibehalten werden. Es folgt, dass das System ausgestaltet werden kann, um Bereiche des Gesichtsfelds, in welchen dieser Farbstoff identifiziert wird, zu erkennen und

auf diese zu reagieren, und dass, in einigen Fällen, die eine oder mehrere bestimmte Markierungen einen greifbaren Teil eines solchen Systems wie hierin beschrieben umfassen können. Zum Beispiel kann ein solcher Stift verwendet werden, wenn beispielsweise eine Bedienungsperson wie beispielsweise ein Pathologe oder ein Zytotechnologe besondere interessante Gebiete auf einem Proben enthaltenden Glas oder Kunststoffobjektträger identifiziert. Ein besonderes interessantes Gebiet kann beispielsweise ein mögliches diagnostisches Gebiet oder ein Referenzgebiet umfassen. Die Bedienungsperson kann dann unter Verwendung des Stifts das Gebiet mit einer Linie von Tinte von diesem Stift einfassen. Nach einer Verarbeitung einer Anzahl von Objektträgern kann die Bedienungsperson die Objektträger beispielsweise in ein automatisches Scansystem einführen für eine quantitative Auswertung. Das System, das zum Detektieren der Tinte des Stifts konfiguriert wurde, kann dann einschließlich das interessante Gebiet identifizieren, das dem Gebiet mit der Tintenlinie entspricht, das von der Bedienungsperson mit dem Stift eingekreist wurde. Das System kann danach dieses Gebiet des Objektträgers angemessen verarbeiten, wobei beispielsweise eine Farbe von Stifftinte darauf hinweisen kann, dass eine bestimmte diagnostische Auswertung durchgeführt werden muss, während eine andere Farbe von Stifftinte darauf hinweist, dass das Gebiet ein Kalibrierungs- oder Referenzmaterial enthält und würde das System aufrufen, ein entsprechendes Kalibrierungsverfahren ablaufen zu lassen. Man beachte, dass zusätzlich zu Objektträgern die beschriebene Technik einfach angepasst werden kann, um andere Befestigungsformen für mikroskopisches Material, wie beispielsweise Mikrotiterplatten oder Mikroarrays zu untersuchen. Somit wird ein Fachmann erkennen, dass die Fähigkeiten solcher Ausführungsformen des Systems, die zum Erkennen bestimmter Farbstoffe oder Tinten konfiguriert sind, auf viele verschiedene automatische Scanverfahren ausgedehnt werden können, in denen interaktive Markierungen von interessanten Gebieten mit bestimmten Stiften, wobei die Stifte verschiedene Farbtinten aufweisen können, die vorher von dem System ausgewertet wurden, verwendet werden können, um automatisch eine anschließende Auswertung oder andere Verarbeitung dieses interessanten Gebiets durch eine geeignete Komponente des Systems oder eine andere spezifizierte Vorrichtung zu bestimmten oder auszulösen.

[0071] Zusätzlich können die künstlichen Bilder des Gesichtsfeldes auch die Präsentation der Daten in einer Konfiguration vereinfachen, die eine Identifizierung und Auswahl von bedeutsamen Objekten oder interessanten Gebieten ermöglicht, wie beispielsweise unbewegte Bilder in einem Bericht, der für diagnostische oder Berichtszwecke erstellt wurde.

[0072] Andere vorteilhafte Aspekte der vorliegenden Erfindung können auch von dem hierin beschriebenen System und Verfahren realisiert werden. Beispielsweise können die Unterschiede von Eigenschaften zwischen den Markierungsfarbstoffen und der Gegenfärbung, die in verschiedenen farbstoffspezifischen Bildern der Probe realisiert werden, zum Auswerten der Fokuseignung des Gesichtsfeldes verwendet werden. Insbesondere kann beispielsweise die Probe mit zwei getrennten Farbstoffen behandelt werden, wobei ein Farbstoff eine Kernfärbung umfasst und der andere Farbstoff eine Membranfärbung umfasst. In einem solchen Fall kann ein Bild, das auf die Membranfärbung gerichtet ist, für eine Fokuseignung ausgewertet werden, indem der Fokus desselben Bildes, das auf die Kernfärbung gerichtet ist, untersucht wird, wobei das Kernfärbungsbild eine deutlichere Struktur aufweist, anhand welcher ein Fokus ausgewertet wird.

[0073] Des Weiteren kann das künstliche Bild des Gesichtsfelds auch verwendet werden, um die Identifizierung und Extrahierung von ausgewählten Merkmalen der behandelten Probe zu vereinfachen.

[0074] Zum Beispiel können markierte Punktverfahren, kontextabhängige Analyse und/oder Geostatistik verwendet werden, um Merkmale von dem Bild basierend auf beispielsweise einer räumlichen Verteilungsanalyse eines bestimmten Farbstoffs zu identifizieren und zu extrahieren. Solch eine Merkmalsextraktionsfähigkeit würde beispielsweise auch ermöglichen, Gesichtsfelder oder interessante Objekte zu sortieren, zu markieren oder anderweitig zu identifizieren oder zu gruppieren, basierend auf beispielsweise dem Gesamtgehalt eines bestimmten Markierungsfarbstoffs oder eines ausgewählten Verhältnisses einer bestimmten Markierung. Wo beispielsweise ein Schwellwertkriterium aufgestellt werden kann, wäre eine solche Fähigkeit das Auffinden von seltenen, sich verschlechternden oder gravierenden Ereignissen. Weiter fortfahrend können dann Klassifikatoren spezifisch auf der Bildverarbeitung basierend, die von den gegenfärbungs- und/oder markierungsfarbstoffspezifischen Bildern resultiert, aufgestellt werden und verwendet werden, um das Vorhandensein von bestimmten Zellarten auszuwerten oder um eine Diagnose basierend auf dem Gesichtsfeld durchzuführen. Beispielsweise kann HER2 auf diese Art durch Vergleichen mit einer kontinuierlichen Diagnoseskala, die gemäß dem System und den Verfahren, die hierin beschrieben sind, aufgestellt wurde, ausgewertet werden. Solche Klassifikatoren können gewöhnlich auch andere informative Merkmale, wie beispielsweise Details basierend auf der Morphologie oder der Textur der Zellen, umfassen.

[0075] Des Weiteren wird ein weiterer vorteilhafter Aspekt der vorliegenden Erfindung realisiert, wenn das

System fähig ist, die Bilddaten mit einer schnelleren Rate zu verarbeiten als die Bilder erfasst werden. Die verbesserte Geschwindigkeit, bei welcher die Bilddaten verarbeitet werden, kann beispielsweise ermöglichen, Merkmale, die durch einen bestimmten Markierungsfarbstoff markiert sind, zu verarbeiten und zu klassifizieren. Demgemäß können verschiedene Zustände basierend auf vorbestimmten Kriterien identifiziert werden. Als solches können visuelle und/oder akustische Alarmer aufgestellt werden und/oder in Verbindung mit dem Verarbeiten der Bilddaten zugeordnet werden. Somit kann in einigen Fällen die Aufmerksamkeit der Bedienungsperson auf ein spezifisches Gesichtsfeld oder ein interessantes Objekt gerichtet werden, wenn eine Eigenschaft einer Markierung eine vorbestimmte Stufe beispielsweise der Intensität oder des Vorhandenseins in einem bestimmten Gebiet erreicht.

[0076] [Fig. 2](#) ist eine schematische Repräsentation einer zweckmäßigen Verwirklichung einer ausgedehnten Systemkonfiguration gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Bei einer solchen Implementierung ist das System **100** oder die Arbeitsstation um ein Mikroskop **150** zentriert. Das Mikroskop **150** kann eine oder mehrere robotische Komponenten umfassen, die zum Beispiel einen motorisierten Objektisch, einen automatischen Fokussierungsmechanismus, einen motorisierten Objektivwechsler und eine automatische Lichtintensitätseinstellung umfassen. Das System **100** kann auch verschiedene Eingabevorrichtungen, wie beispielsweise Kameras **300a** und **300b**, die eine schnelle automatische Fokussierung aufweisen und zum Erfassen von Niedrigauflösungs- und Hochauflösungsbildern konfiguriert sind, einen linearen Flachbettscanner **310**, der zum Aufnehmen von Niedrigauflösungsbildern verwendet wird, eine Präparationsstation **320**, eine Stimmaufzeichnungsvorrichtung **330**, welche alle mit einer Computervorrichtung **350** durch verschiedene Datenübertragungsverbindungen **400** verbunden sind, umfassen. Die Arbeitsstation **100** kann Teil eines lokalen Netzwerks (LAN) **700** sein, aber kann auch ausgestaltet sein, um verschiedene Kommunikationsprotokolle zu unterstützen, so dass verfügbare Kommunikationskanäle, wie beispielsweise eine Standard-Telefonleitung, ein ISDN-Anschluss oder eine T1-Leitung, die Arbeitsstation **100** einfach mit anderen Komponenten oder Vorrichtungen über große Distanzen mittels eines Weitverkehrsnetzes (WAN) **750** verbunden werden kann, wie ein Fachmann erkennen wird.

[0077] Wenn die Pathologiearbeitsstation **100** ausgestaltet ist, um in einer integrierten Umgebung betrieben zu werden, kann die WAN **700**- oder LAN **750**-Verbindung einen Zugriff auf beispielsweise existierende Referenzdatenbanken **800** und ein Krankenhausinformationssystem (HIS) **850** erlauben. Mit einer solchen Konfiguration können neue Proben und/oder Fälle einfach mit den Bildern und begleitenden Informationen von vorher gesammelten Referenzfällen verglichen werden. Des Weiteren können Bilder, die von den Proben und/oder Objektträgern, die an der Arbeitsstation **100** untersucht werden, aufgenommen wurden, mit der Patienten- und Fallgeschichte ergänzt werden, soweit nötig.

[0078] In der Ausführungsform der ausgedehnten Konfiguration wie in [Fig. 2](#) gezeigt ist die Pathologiearbeitsstation **100** insbesondere für eine umfassende Probenauswertung ausgestaltet. Zum Beispiel mit Informationen und digitalen Bildern von der anfänglichen gesamten biologischen Probe können Bilder von den Objektträgern, die von der Probe präpariert wurden, erstellt und verarbeitet werden, wie hierin beschrieben. Die Patienten- und Fallinformationen, die Bilder und die resultierenden quantitativen Informationen über die Zellkomponenten der Probe und die Probenarchitektur (beispielsweise in dem Fall von Gewebeproben) können gesammelt, wenn nötig integriert und in einer einzelnen Datenbank gespeichert werden. Wenn beispielsweise eine anfängliche oder eine zweite Expertenmeinung benötigt wird oder wenn der Objektträger für ein Training oder einen Kenntnistest verwendet wird, können es die Kommunikationsfähigkeiten der ausgedehnten Konfiguration zusammen mit den Automatisierungsmerkmalen des Mikroskops **150** der Arbeitsstation **100** ermöglichen, als ein Telepathologiesystem verwendet zu werden. Beispielsweise können Hochauflösungsbilder, die auf Merkmale oder interessante Objekte gerichtet sind, die eine fragliche Situation auf einem bestimmten Objektträger kennzeichnen, elektronisch an den Experten und/oder die geprüften Kandidaten weitergeleitet werden. In einigen Fällen kann ein Übersichtsbild des Objektträgers bereitgestellt werden, wobei das automatisierte Mikroskop **150** verwendet wird, um den Objektträger automatisch auf beispielsweise einer Gebiet-auf-Gebiet-Basis zu scannen. Die entsprechenden digitalen Bilder können dann in dem Speicher der Computervorrichtung **350** gespeichert werden. Wenn eine Gebiet-auf-Gebiet-Basis verwendet wird, können die Kanten von benachbarten Gebieten genau unter Verwendung von Korrelationsalgorithmen angepasst werden, um ein einzelnes großes Übersichtsbild des gesamten Objektträgers bereitzustellen. Ein solches Übersichtsbild kann dem Referenzpathologen helfen, eine Beurteilung der Information vorzunehmen. In einigen Fällen kann der Referenzpathologe die Arbeitsstation **100** von einem entfernten Ort fernsteuern, um benötigte und/oder ergänzende Bilder zu erfassen, welche benötigt werden können, um eine richtige und gründliche Bewertung des Objektträgers bereitzustellen.

[0079] Anschließend können die Informationen, die von der Arbeitsstation **100** für einen begutachteten Fall

zusammengetragen wurden, wie beispielsweise reelle oder mathematisch erzeugte Bilder, Messungsergebnisse und graphische Repräsentationen dieser, Patientendaten, Präparationsdaten und Untersuchungskarten selektiv in einen Bericht integriert werden, welcher entweder ausgedruckt werden kann oder auf welchen elektronisch zugegriffen werden kann. Solch ein Bericht würde ein umfassendes Bild des ausgewerteten Falls bereitstellen und würde auch Qualitätssicherung und Standardisierungsprobleme vereinfachen.

[0080] Es wird verstanden werden, dass die hierin beschriebene Methodik und Verfahren in Verbindung mit dem System **100** ein Verfahren zum Quantifizieren einer Menge einer Molekülart von einem Bild einer Probe, das von einer RGB-Kamera in einem Videomikroskopsystem aufgenommen wurde, angeben. Ein Fachmann wird auch erkennen, dass ein solches Verfahren automatisiert werden kann, um ein Computersoftwareprogrammprodukt bereitzustellen, das auf einer Computervorrichtung ausführbar ist, und das ausführbare Teile aufweist, die fähig sind, die Menge einer Molekülart von einem digitalen Bild einer Probe, das von einer Farbbild-Erfassungsvorrichtung, wie beispielsweise einer RGB-Kamera, in einem Videomikroskopsystem aufgenommen wurde, zu quantifizieren.

[0081] Demgemäß beschreiben Ausführungsformen des Systems **100** die Implementierung des Verfahrens und/oder des entsprechenden Computersoftwareprogrammprodukts, welche in einer geeignet konfigurierten Hardware, Software oder einer Kombination von Hardware und Software gemäß dem Gedanken und Umfang der vorliegenden Erfindung erreicht werden kann.

[0082] Somit umfassen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung eine kolorimetrische Analysetechnik für präparierte Proben, die eine effektive Detektion und Quantifizierung einer interessanten Art bereitstellt, die limitierende Faktoren von Techniken nach dem Stand der Technik überwindet, wie beispielsweise spektrales Überschneiden, Mischen von Farben aufgrund von räumlicher Überschneidung von Membran- und Kernmarkierungen, begrenzte spektrale Auflösung der Erfassungsvorrichtung, Kalibrierungsbesonderheiten, die Subjektivität des Detektions- und Quantifizierungsprozesses und Inkonsistenzen zwischen menschlichen Bedienungspersonen der Analysegerätschaften. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen des Weiteren eine Bildverarbeitungstechnik bereit, welche nicht auf die subjektive Detektion von Kontrast innerhalb der präparierten Probe oder auf eine komplexe und voluminöse Analyse der Probe bei spezifischen Wellenlängen von Licht unter Verwendung einer Kombination von Lichtquellen und Filtern angewiesen ist. Darum stellen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung eine einfachere und effektivere kolorimetrische Analysetechnik bereit, die Detektion und Quantifizierungsbeschränkungen von Analysetechniken nach dem Stand der Technik überwindet, die Subjektivität und Inkonsistenz in der Probenanalyse reduziert und die fähig ist, die notwendigen Analyseinformationen über die Probe bereitzustellen, sobald ein Bild der Probe aufgenommen wird, ohne auf eine weitere Untersuchung der Probe für ein Vervollständigen der Analyse angewiesen zu sein.

[0083] Insbesondere und wie gezeigt wird die Analyse (Detektion und Quantifizierung einer interessanten Molekülart) der präparierten Probe durch die Messung von Lichtintensitäten erreicht, die sich in einem digitalen Bild der Probe, das durch eine Farbbild-Erfassungsvorrichtung aufgenommen wurde, äußern. Da die Analyse eher relativ bildabhängig als probenabhängig ist, können redundante Bilder für eine Analyse aufgenommen werden, während viele Proben verarbeitet werden, um die nötigen Bilder innerhalb einer relativ kurzen Zeitdauer aufzunehmen. Sobald die Bilddaten aufgenommen und gespeichert wurden, kann die eigentliche Analyse zu einem späteren Zeit-Punkt oder wie benötigt stattfinden, ohne dass die physikalische Präsenz der eigentlichen Probe benötigt wird. Solch eine Analyse kann des Weiteren auf eine Untersuchung der gesamten Probe oder sogar des gesamten Objektträgers angewandt werden. Somit stellen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ein schnelles quantitatives Videomikroskopsystem bereit, das die Verwendung eines solchen Systems als ein Routine- oder „Produktions“-Werkzeug erlaubt, das fähig ist, einen relativ hohen Analysedurchsatz zu erreichen. Somit werden signifikante Vorteile von Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung im Vergleich mit quantitativen Mikroskopsystemen nach dem Stand der Technik realisiert, welche typischerweise in Probendurchsatz und Analyse limitiert sind, und somit werden solche Systeme im Allgemeinen als Forschungswerkzeuge nützlicher gemacht.

[0084] Viele Veränderungen und andere Ausführungsformen der Erfindung werden einem Fachmann einfallen, den diese Erfindung betrifft, und der die Vorteile der Lehren, die in der vorangehenden Beschreibung und den zugehörigen Zeichnungen präsentiert werden, hat. Darum muss verstanden werden, dass die Erfindung nicht auf die spezifischen Ausführungsformen, die offenbart sind, beschränkt ist, und dass Veränderungen und andere Ausführungsformen im Umfang der angehängten Ansprüche umfasst sein sollen. Obwohl hierin spezifische Ausdrücke benutzt werden, werden diese nur in einem allgemeinen und beschreibenden Sinn verwendet und nicht zum Zweck einer Beschränkung.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen einer Menge von mindestens einer Molekülart, die eine Probe (**500**) umfasst, wobei jede Molekülart mit einem Farbstoff markiert ist, in einem Videomikroskopsystem (**100**), wobei das Verfahren umfasst:

Aufnehmen eines Bilds (**450**) der Probe als Bilddaten mit einer Breitband-Farbbild-Erfassungsvorrichtung;

Bestimmen einer optischen Dichte der Probe von den Bilddaten in jedem von einem roten, grünen und blauen Kanal (**550**, **600**, **650**) an einem Pixel in dem Bild, um eine entsprechende optische Dichtematrix für das Pixel zu bilden; und

Multiplizieren der optischen Dichtematrix mit einer Inversen einer relativen Absorptionskoeffizientenmatrix, um eine resultierende Matrix für das Pixel zu bilden, wobei die relative Absorptionskoeffizientenmatrix unabhängig von der Probe einen relativen Absorptionskoeffizienten für jeden Farbstoff in sowohl dem roten, grünen als auch dem blauen Kanal umfasst, wobei die resultierende Matrix die Menge jeder Molekülart, wie von dem entsprechenden Farbstoff markiert, für das Pixel umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, des Weiteren ein Bestimmen des relativen Absorptionskoeffizienten für jeden Farbstoff, unabhängig von der Probe, umfassend durch:

Bestimmen einer anfänglichen Intensität eines Lichts, das von einer Lichtquelle emittiert wird, in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal;

Beleuchten jedes Farbstoffs mit der Lichtquelle, unabhängig von der Probe;

Bestimmen einer transmittierten Intensität des Lichts, das durch jeden Farbstoff transmittiert wurde in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal;

Bestimmen eines natürlichen Logarithmus des Verhältnisses der anfänglichen Intensität des Lichts zu der transmittierten Intensität des Lichts in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal, um eine optische Dichte für jeden Farbstoff zu bestimmen; und

Normalisieren der optischen Dichte in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal für jeden Farbstoff in Bezug auf den Kanal, der die höchste optische Dichte aufweist, um die relative Absorptionskoeffizientenmatrix zu bilden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei ein Bestimmen einer optischen Dichte der Probe des Weiteren umfasst:

Beleuchten der Probe mit der Lichtquelle und Bestimmen einer transmittierten Intensität des Lichts, das durch die Probe transmittiert wird, in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal; und

Bestimmen eines natürlichen Logarithmus des Verhältnisses der anfänglichen Intensität des Lichts zu der transmittierten Intensität des Lichts durch die Probe in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal, um die optische Dichtematrix zu bilden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Aufnehmen eines Bildes der Probe des Weiteren ein Aufnehmen eines Bildes der Probe als Bilddaten in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal von mindestens einem von einer RGB-Kamera und einem RGB-konfiguriertem Scanner umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 1, des Weiteren ein Beleuchten der Probe unter Köhler-Beleuchtungsbedingungen und ein Korrigieren von chromatischer Aberration in dem Videomikroskopsystem umfassend.

6. Verfahren nach Anspruch 1, des Weiteren umfassend ein Markieren von mindestens einer Molekülart mit einem ersten Farbstoff, der einen Markierfarbstoff umfasst und einer anderen Molekülart mit einem zweiten Farbstoff, der eine Gegenfärbung umfasst.

7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Videomikroskopsystem eine Lichtquelle zum Emittieren von Licht zum Beleuchten der Probe umfasst, wobei das emittierte Licht von einem vergrößernden Objektiv, das funktionsfähig mit einer Bildaufnahmekomponente der Breitband-Farbbild-Aufnahmevorrichtung verbunden ist, detektierbar ist, wobei das Videomikroskopsystem zum Herstellen des Bildes ausgestaltet ist, und wobei ein Korrigieren von chromatischer Aberration in dem Videomikroskopsystem umfasst:

Bestimmen einer zentrischen Koordinate des vergrößernden Objektivs in Bezug auf eine zentrische Koordinate der Bildaufnahmekomponente;

Bestimmen für mehrere Lichtwellenlängen, die aus dem Licht, das von der Lichtquelle emittiert wird, ausgewählt sind, eines Vergrößerungsfaktors für jede der mehreren Wellenlängen in Bezug auf einen Vergrößerungsfaktor für eine mittlere Wellenlänge, die aus den mehreren Wellenlängen ausgewählt wurde; und

Einstellen des Bildes, ohne das vergrößernde Objektiv oder die Bildaufnahmekomponente einzustellen, so dass die zentrische Koordinate des vergrößernden Objektivs der zentrischen Koordinate der Bildaufnahmeein-

heit entspricht und der Vergrößerungsfaktor für jede Wellenlänge dem Vergrößerungsfaktor für die mittlere Wellenlänge entspricht.

8. Verfahren nach Anspruch 7, des Weiteren umfassend:

Anordnen eines Objektträgers, der ein kalibriertes Gitter von Öffnungen aufweist, zwischen der Lichtquelle und dem vergrößernden Objektiv;
 Bilden eines Bilds des Gitters für jede der mehreren Wellenlängen und in Bezug auf ein kartesisches Koordinatensystem, das eine x-Achse und eine y-Achse aufweist;
 Bestimmen einer zentrischen Koordinate in Bezug auf das Koordinatensystem für jede Öffnung des Gitters von dem Bild für jede der mehreren Wellenlängen;
 Auswählen des Bilds für eine mittlere Wellenlänge als ein Referenzbild;
 Bestimmen einer Differenz für jedes Bild in Bezug auf das Referenzbild und für jede Öffnung des Gitters, zwischen der zentrischen Koordinate der Öffnung in dem entsprechenden Bild und der zentrischen Koordinate der entsprechenden Öffnung in dem Referenzbild in Bezug auf das Koordinatensystem, wobei die Differenz als eine Differenzialkomponente entlang der x-Achse und eine Differenzialkomponente entlang der y-Achse ausgedrückt wird;
 Bestimmen einer linearen Gleichung, die einen Rekonstruktionsfehler für sowohl das Differenzial entlang der x-Achse als eine Funktion von x als auch das Differenzial entlang der y-Achse als eine Funktion von y minimiert;
 Bestimmen der zentrischen Koordinate des vergrößernden Objektivs durch Lösen der linearen Gleichung für sowohl das Differenzial entlang der x-Achse als eine Funktion von x als auch das Differenzial entlang der y-Achse als eine Funktion von y, wobei das Differenzial entlang der x-Achse und das Differenzial entlang der y-Achse auf einen Wert von 0 für die entsprechende lineare Gleichung gesetzt werden; und
 Bestimmen einer linearen Gleichung zum Minimieren eines Rekonstruktionsfehlers einer Quadratwurzel einer Summe der Quadrate von dem Differenzial entlang der x-Achse und dem Differenzial entlang der y-Achse, als eine Funktion der Distanz zu dem Zentrum des vergrößernden Objektivs.

9. Verfahren nach Anspruch 8, des Weiteren umfassend ein Bestimmen der Steigung der linearen Gleichung als eine Funktion des Abstands zu dem Zentrum des vergrößernden Objektivs, um den Vergrößerungsfaktor des Bilds für jede der mehreren Wellenlängen im Bezug auf den Vergrößerungsfaktor des Referenzbilds bereitzustellen.

10. Computersoftwareprogrammprodukt, das mindestens einen ausführbaren Bereich aufweist, der fähig ist, ein Verfahren wie in einem der Ansprüche 1–9 beansprucht auszuführen.

11. Videomikroskopsystem (**100**) zum Bestimmen einer Menge von mindestens einer Molekülart, die eine Probe (**500**) umfasst, wobei jede Molekülart von einem Farbstoff markiert ist, von einem Bild der Probe, wobei das System umfasst:

eine Breitband-Farbbild-Erfassungsvorrichtung (**300**), die so ausgestaltet ist, dass sie fähig ist, ein Bild (450) der Probe als Bilddaten aufzunehmen; und

eine Computervorrichtung (**350**), funktionsfähig verbunden mit der Bilderfassungsvorrichtung und umfassend: einen ersten Verarbeitungsbereich, der zum Bestimmen einer optischen Dichte der Probe von den Bilddaten in jedem von einem roten, grünen und blauen Kanal (**550**, **600**, **650**) an einem Pixel in dem Bild ausgestaltet ist, um eine entsprechende optische Dichtematrix für das Pixel zu bilden; und

einen zweiten Verarbeitungsbereich, der zum Multiplizieren der optischen Dichtematrix mit einer Inversen einer relativen Absorptionskoeffizientenmatrix ausgestaltet ist, um eine resultierende Matrix für das Pixel des Bilds zu bilden, wobei die relative Absorptionskoeffizientenmatrix einen relativen Absorptionskoeffizienten für jeden Farbstoff umfasst, unabhängig von der Probe, in sowohl dem roten, dem grünen und dem blauen Kanal, wobei die resultierende Matrix die Menge von jeder Molekülart, wie von dem entsprechenden Farbstoff markiert, für das Pixel umfasst.

12. System nach Anspruch 11, wobei die Bilderfassungsvorrichtung mindestens einen von einem Scanner und einer Farbkamera umfasst, der bzw. die funktionsfähig mit einem Mikroskop verbunden ist.

13. System nach Anspruch 12, wobei das Mikroskop zum Bilden eines vergrößerten Bildes der Probe ausgestaltet ist, und wobei die Farbkamera des Weiteren eine RGB-Kamera umfasst, die einen roten Kanal, einen grünen Kanal und einen blauen Kanal aufweist, wobei die RGB-Kamera funktionsfähig mit dem Mikroskop verbunden ist, um fähig zu sein, ein digitales Bild von dem vergrößerten Bild zu bilden.

14. System nach Anspruch 11, des Weiteren eine Lichtquelle umfassend, die in Richtung der Bilderfas-

sungsvorrichtung gerichtet ist, und ausgestaltet ist zum Emittieren von Licht, das eine anfängliche Intensität in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal aufweist.

15. System nach Anspruch 14, wobei die Lichtquelle zum Beleuchten der Probe ausgestaltet ist, und der erste Verarbeitungsbereich zum Bestimmen einer optischen Dichte des Weiteren ausgestaltet ist zum:
Bestimmen einer transmittierten Intensität des Lichts, das durch die Probe in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal transmittiert wird; und
Bestimmen eines natürlichen Logarithmus eines Verhältnisses der anfänglichen Intensität des Lichts zu einer transmittierten Intensität des Lichts, um eine optische Dichte für die Probe in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal zu bestimmen und die optische Matrix zu bilden.

16. System nach Anspruch 14, wobei die Computervorrichtung des Weiteren einen dritten Verarbeitungsbereich umfasst, der ausgestaltet ist zum:
Steuern der Lichtquelle zum Beleuchten von jedem Farbstoff, unabhängig von der Probe;
Steuern einer Bestimmung von einer transmittierten Intensität des Lichts, das durch jeden Farbstoff in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal transmittiert wird;
Bestimmen eines natürlichen Logarithmus eines Verhältnisses der anfänglichen Intensität des Lichts zu der transmittierten Intensität des Lichts in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal, um eine optische Dichte für jeden Farbstoff zu bestimmen; und
Normalisieren der optischen Dichte in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal für jeden Farbstoff, in Bezug auf den Kanal, der die höchste optische Dichte für jeden Farbstoff aufweist, um den relativen Absorptionskoeffizienten in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal zu bestimmen und die relative Absorptionskoeffizientenmatrix zu bilden.

17. System nach Anspruch 11, wobei die Computervorrichtung des Weiteren umfasst:
ein Speichermedium, das zum Speichern des relativen Absorptionskoeffizienten in sowohl dem roten, dem grünen als auch dem blauen Kanal für mehrere Farbstoffe ausgestaltet ist, wobei die Farbstoffe, die die Moleküllarten in der Probe markieren, von den mehreren Farbstoffen ausgewählt sind;
ein vierter Verarbeitungsbereich, der zum Abrufen der entsprechenden relativen Absorptionskoeffizienten für jeden Farbstoff von dem Speichermedium ausgestaltet ist, und zum Bilden der entsprechenden relativen Absorptionskoeffizientenmatrix, in Übereinstimmung mit den Farbstoffen, die die Moleküllarten in der Probe markieren, welche von den mehreren Farbstoffen ausgewählt sind; und
ein fünfter Verarbeitungsbereich, der zum Invertieren der relativen Absorptionskoeffizientenmatrix ausgestaltet ist.

18. System nach Anspruch 14, wobei die Lichtquelle des Weiteren zum Bereitstellen von Köhler-Beleuchtungsbedingungen ausgestaltet ist und mindestens eine der Bilderfassungsvorrichtung und der Computervorrichtung des Weiteren zum Korrigieren chromatischer Aberration ausgestaltet ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

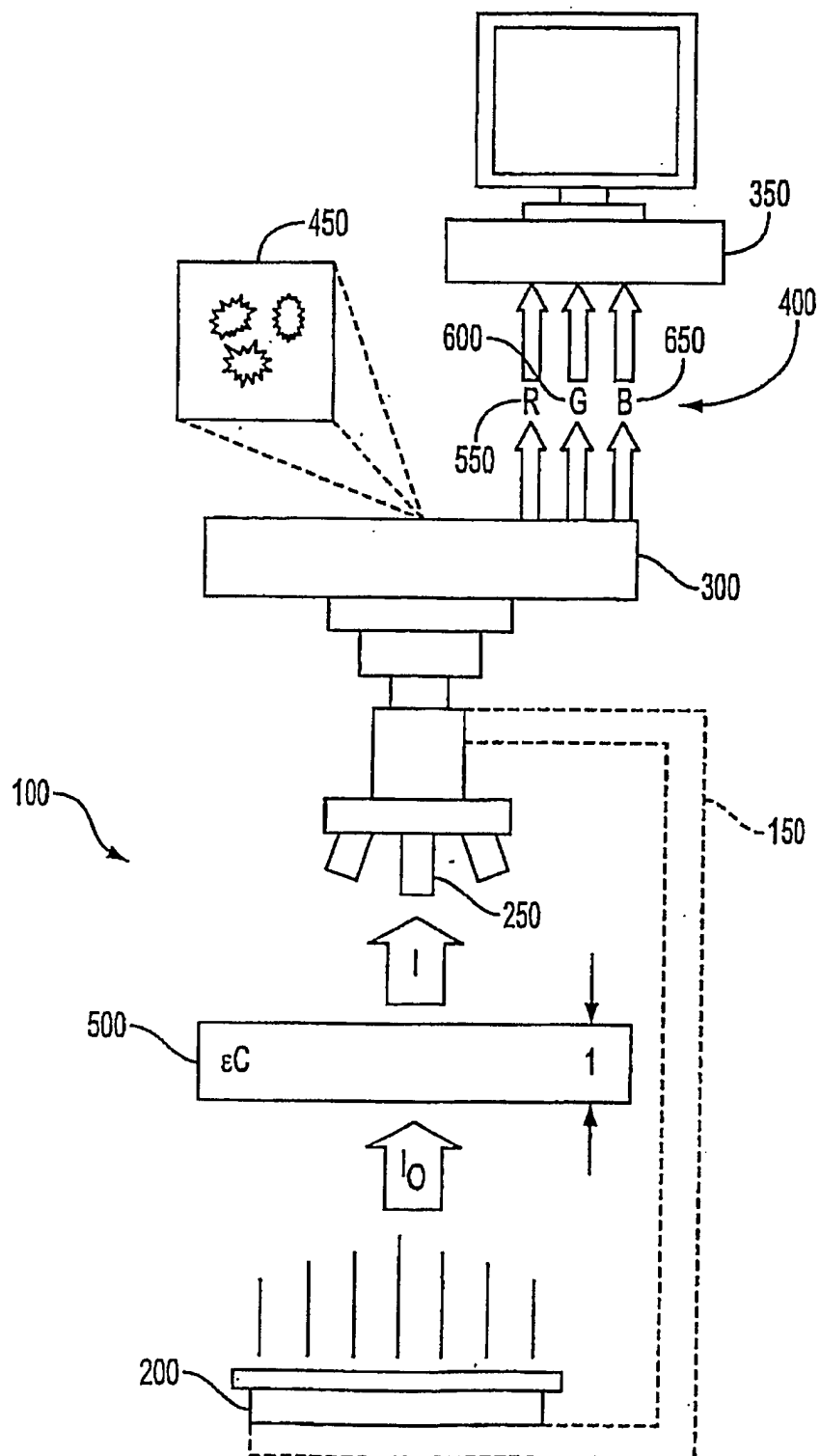


FIG. 1

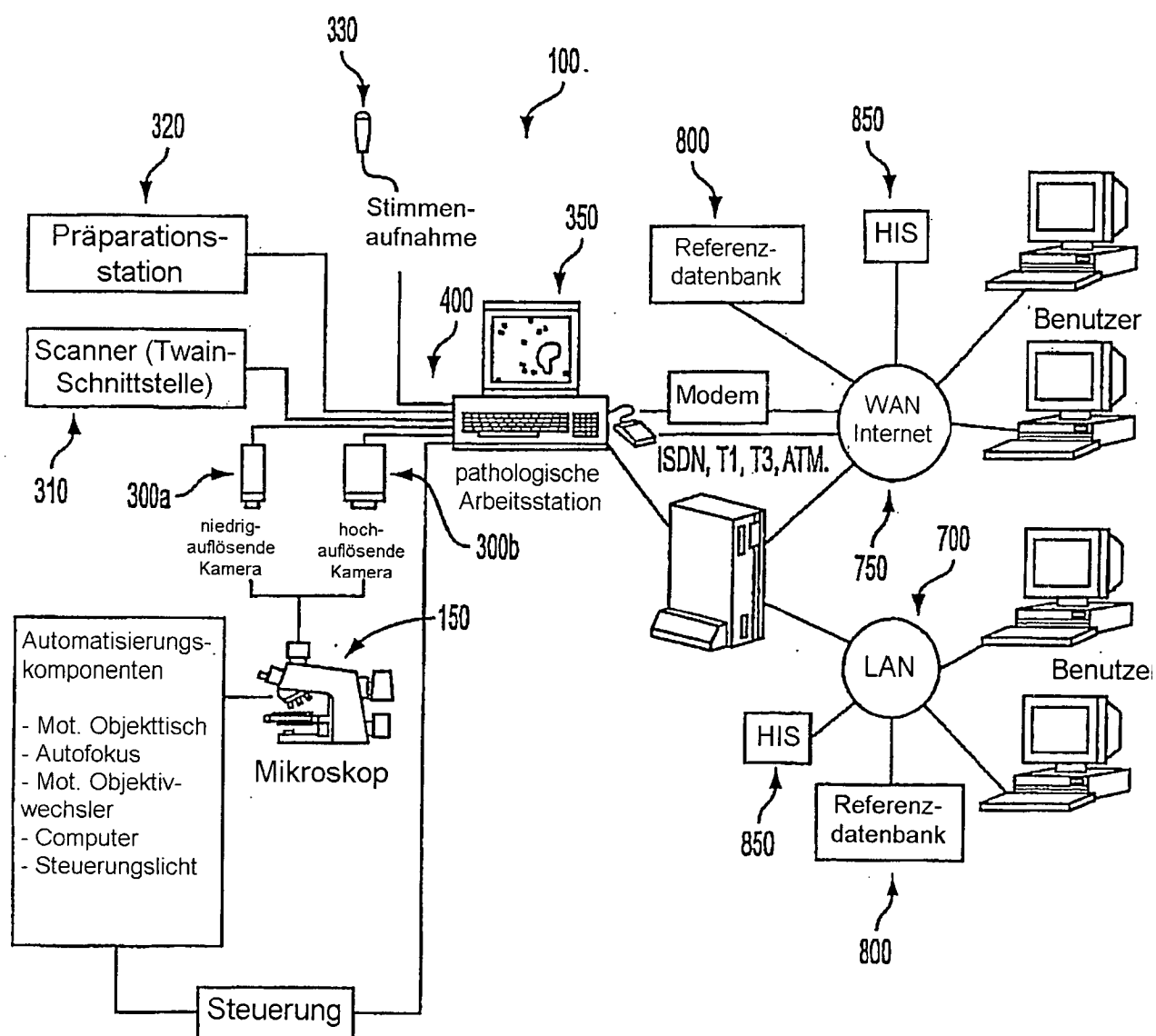


FIG. 2