

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1933/2005** (51) Int. Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/483** (2006.01),  
(22) Anmeldetag: **30.11.2005** **G01N 21/64** (2006.01),  
(43) Veröffentlicht am: **15.06.2007** **G06K 9/00** (2006.01),  
**H04N 7/18** (2006.01),  
**A61B 1/04** (2006.01),  
**A61B 5/00** (2006.01)

(73) Patentanmelder:

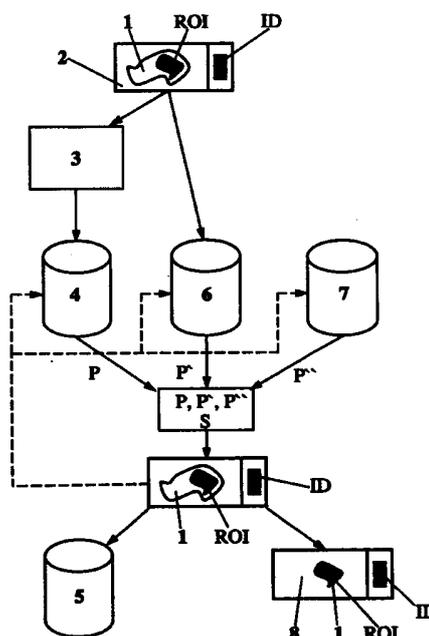
ORIDIS BIOMED FORSCHUNGS- UND  
ENTWICKLUNGS GMBH  
A-8010 GRAZ (AT)

(72) Erfinder:

MEHES GABOR DR.  
GRAZ (AT)  
SCHMIDT WOLFGANG  
GRAZ (AT)  
WRIGHTON CHRISTOPHER DR.  
LASSNITZHÖHE (AT)  
ZATLOUKAL KURT  
GRAZ (AT)  
ZÖBL HARALD  
WUNDSCHUH (AT)  
HECHT PETER DR.  
GRAZ (AT)

(54) **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR AUTOMATISCHEN ANALYSE VON  
BIOLOGISCHEN PROBEN**

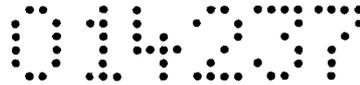
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur automa-  
tischen Analyse von biologischen Proben, ins-  
besondere Gewebeproben, mit einer Einrich-  
tung (11) zur berührungslosen Abtastung der  
Proben (1) zur Bildung von Datensätzen (4) der  
Proben (1). Zur Schaffung eines Verfahrens  
bzw. einer Vorrichtung (10), durch welche mög-  
lichst rasch und möglichst ohne Zerstörung der  
Proben (1) die interessierenden Bereiche (ROI)  
der Probe (1) festgelegt werden können, wird  
aus einem durch Ausnützung der Autofluores-  
zenz gebildeten Datensatz (4) der Probe (1) zu-  
mindest ein Parameter (P) ausgewählt und die-  
ser oder ein davon abgeleiteter Wert oder eine  
Kombination von Parametern (P) oder davon  
abgeleiteten Werten mit zumindest einem  
Schwellwert (S) verglichen, und der Vergleichs-  
wert als Kriterium für die Festlegung interes-  
sierender Bereiche (ROI) der Probe (1) verwen-  
det und zusammen mit einer eindeutigen Ken-  
nung (ID) der Probe (1) gespeichert.



Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur automatischen Analyse von biologischen Proben, insbesondere Gewebeproben, mit einer Einrichtung (11) zur berührungslosen Abtastung der Proben (1) zur Bildung von Datensätzen (4) der Proben (1). Zur Schaffung eines Verfahrens bzw. einer Vorrichtung (10), durch welche möglichst rasch und möglichst ohne Zerstörung der Proben (1) die interessierenden Bereiche (ROI) der Probe (1) festgelegt werden können, wird aus einem durch Ausnützung der Autofluoreszenz gebildeten Datensatz (4) der Probe (1) zumindest ein Parameter (P) ausgewählt und dieser oder ein davon abgeleiteter Wert oder eine Kombination von Parametern (P) oder davon abgeleiteten Werten mit zumindest einem Schwellwert (S) verglichen, und der Vergleichswert als Kriterium für die Festlegung interessierender Bereiche (ROI) der Probe (1) verwendet und zusammen mit einer eindeutigen Kennung (ID) der Probe (1) gespeichert.

(Fig. 1)

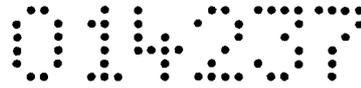


Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur automatischen Analyse von biologischen Proben, insbesondere Gewebeproben, wobei die Probe mit Licht angeregt wird und als Datensatz der Probe ein Bild der resultierenden Fluoreszenzstrahlung der Probe aufgenommen und gespeichert wird.

Weiters betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur automatischen Analyse von biologischen Proben, insbesondere Gewebeproben, mit einer durch zumindest eine Lichtquelle und eine Kamera bzw. einen Detektor gebildeten Einrichtung zur berührungslosen Abtastung der Proben zur Bildung von Datensätzen der Proben.

Für Diagnose- und Forschungszwecke ist es in der Medizin üblich, verschiedene Proben, beispielsweise Gewebeproben, zu sammeln und verschiedenen Untersuchungen zu unterwerfen. Im Falle von Gewebeproben, welche menschlichen oder tierischen Organismen entnommen wurden, ist es üblich, einzelne größere Gewebestücke in Paraffin zu betten, welche für die weiteren Analysen auf Glasträger übertragen in dünne Schnittpräparate aufgearbeitet werden. Weiters können Paraffinblöcke mehrere kleine Gewebestücke beinhalten. Von anderen Paraffinblöcken können von bestimmten ausgewählten Stellen zylindrische Kerne (so genannte cores) von Gewebeproben ausgestochen und in entsprechende große zylindrische Löcher eines Paraffinblockes eingebracht werden. Derartige Gewebeprobenarrays (tissue microarrays, TMAs) werden danach üblicherweise mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten und die Präparate beispielsweise histologisch untersucht.

Oben beschriebene Schnittpräparate oder Gewebeprobenarrays werden aufgrund der großen Anzahl von Schnitten und Einzelproben verstärkt automatischen Analysen zugeführt, um möglichst rasch wichtige Informationen, insbesondere für diagnostische oder therapeutische Zwecke, zu erhalten. Die Untersuchungen können mit einem Mikroskop aber auch auf molekularer Ebene durchgeführt werden, wobei der genaue Inhalt und die Zusammenstellung des Ausgangsmaterials von großer Bedeutung ist. Um den Vergleich zu erleichtern und die Materialauswahl auf das Relevante zu reduzieren, werden die oben genannten Gewebeprobenarrays (TMAs) hergestellt. Beispielsweise beschreibt die US 2003/0215936 A1



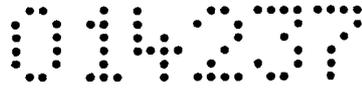
ein Verfahren und eine Vorrichtung für die möglichst rasche und effiziente Untersuchung von derartigen Gewebeprobenarrays.

Obgleich in der nachfolgenden Beschreibung hauptsächlich auf Gewebeproben eingegangen wird, ist die vorliegende Erfindung nicht auf derartige Proben beschränkt. Neben menschlichen, tierischen und pflanzlichen Geweben kommen auch Kombinationen verschiedener Gewebe mit unterschiedlicher Herkunft zur Anwendung der vorliegenden Erfindung in Frage. Ebenso kann Material, welches von Gewebe extrahiert wurde, wie z.B. Proteine und Nukleinsäuren, die tropfenweise auf einen Glasträger aufgebracht werden, mit der vorliegenden Erfindung untersucht werden. Weiters können Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel oder dgl. von lebenden Organismen analysiert werden. Schließlich können auch gezüchtete Zellen oder Teile davon aber auch organische oder anorganische Materialien als Proben vorliegen.

Bei der Vielfalt der Proben ist es von besonderer Bedeutung, eine Aussage über die Relevanz der Einzelproben am Präparat treffen zu können. Dies ist einerseits für die Verlässlichkeit der Aussagen, welche nach Analyse der Probe getroffen werden, insbesondere für Diagnosen im medizinischen Bereich von großer Bedeutung. Andererseits stellen die Präparate einen enormen wirtschaftlichen Wert dar, der erhöht werden kann, wenn eine Aussage über die Relevanz der Einzelproben am Präparat getroffen werden kann.

Neben der Aussage über die Relevanz der Proben ist es auch wichtig, eine Aussage über jene Bereiche der Probe treffen zu können, welche für nachfolgende Untersuchungen interessant sind. Beispielsweise ist bei histologischen Proben nur jener Bereich der Probe wichtig, der beispielsweise ein bestimmtes Organ betrifft, während das umliegende Fettgewebe uninteressant ist. Bisher wurden derartige interessierende Bereiche bzw. Regions of Interest (ROI) in mühsamer manueller Art und Weise von entsprechenden Experten unter dem Mikroskop festgelegt.

Dabei werden die zur Untersuchung herangezogenen Proben üblicherweise histologisch eingefärbt, um die interessierenden Bereiche leichter erkennen zu können. Für nachfolgende



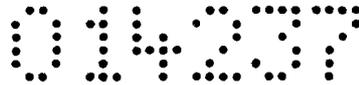
Untersuchungen stehen diese Proben aufgrund der Einfärbung nicht mehr zur Verfügung. Bei Sequenzen von Schnitten, beispielsweise histologischen Gewebes, werden daher nur stichprobenartig Schnitte der Proben eingefärbt. Diese stichprobenartigen Analysen liefern jedoch keine Informationen über die tatsächlichen interessierenden Bereiche der Proben, welche von Schnitt zu Schnitt variieren können. Diese Information würde zwar bei einer Erhöhung der Stichprobenanzahl verbessert, jedoch stehen dann umso weniger Proben für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung. Darüber hinaus sind die üblicherweise manuell durchgeführten Kontrollen sehr zeit- und somit kostenaufwändig.

Die Ausnützung der Autofluoreszenz, das ist die resultierende Strahlung von Elementen, welche mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden, ist eine geeignete Untersuchungsmethode, bei der die Probe nicht zerstört wird. Die meisten Materialien enthalten chemische Strukturen, welche mit Licht speziell angeregt werden können und mehr oder weniger Fluoreszenzstrahlung aussenden. Die Autofluoreszenz stellt ein Abbild der Zusammensetzung des Materials dar und kann auch zur Darstellung biologischer oder biochemischer Prozesse herangezogen werden. Bei Geweben können sowohl zelluläre als auch extrazelluläre Bestandteile Fluoreszenzstrahlung aussenden. Beispielsweise werden Nikotinamidadenin-dinukleotid (NAD) oder Flavinadenindinukleotid (FAD), welche hauptsächlich in den Mitochondrien angeordnet sind, als hauptsächliche Aussender von Fluoreszenzstrahlen angesehen. Die Quantität und Zusammensetzung verschiedener Substanzen resultieren in spezifischen Autofluoreszenzmustern bei einer bestimmten Anregung, wodurch die Identifikation der Zusammensetzung und funktionellen Unterschiede von Geweben durch die Detektion der Fluoreszenzstrahlung ermöglicht wird. Autofluoreszenz wird sowohl für die in vivo- als auch in vitro-Charakterisierung von biologischem Material verwendet. Beispielsweise befindet sich aufgrund der Blutzirkulation der rote Blutfarbstoff Hämoglobin im Wesentlichen im ganzen menschlichen Körper. Hämoglobin ist stark fluoreszierend, wodurch aufgrund der Variabilität der Menge an Hämoglobin ein unterschiedliches Autofluoreszenzmuster der Gewebe resultiert. Zur Untersuchung der Blutzirkulation kann dies durch spektroskopische Verfahren in vivo gemessen werden (Yoshinori Horie et al., „Role of nitric

oxide in gut ischemia-reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction", American Physiological Society (1997): G1007-G1013). Auch in der Augenheilkunde wird die Autofluoreszenz zur Untersuchung der Retina eingesetzt (Anthony G. Robson et al., „Comparison of Fundus Autofluorescence with Photopic and Scotopic Fine-Matrix Mapping in Patients with Retinitis Pigmentosa and Normal Visual Acuity"; Investigative Ophthalmology & Visual Science 45(11) (2004): 4119-4125). Während zahlreiche Anwendungen der in vivo- oder in vitro-Spektroskopie von Autofluoreszenz existieren, konnte sich die Autofluoreszenz für die Untersuchung mikroskopischer Schnitte noch nicht etablieren. Im Gegenteil wurde die Fluoreszenzstrahlung von Geweben in der Fluoreszenzmikroskopie als nachteilig beschrieben (Werner Batschong et al., „Control of Autofluorescence of Archival Formaldehyde-fixed, Paraffin-embedded Tissue in Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)"; The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 49(12) (2001): 1565-1571). Die Verwendung der Autofluoreszenz-Spektroskopie zur Untersuchung mikroskopischer Strukturen wurde nur sehr selten beschrieben (Luigi Rigacci et al., „Multispectral Imaging Autofluorescence Microscopy for the Analysis of Lymph-Node Tissues", Photochemistry and Photobiology 71(6) (2000): 737-742); Erin M. Gill et al., „Relationship Between Collagen Autofluorescence of the Human Cervix and Menopausal Status", Photochemistry and Photobiology 77(6) (2003): 653-658).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher in der Schaffung eines oben genannten Verfahrens zur automatischen Analyse von biologischen Proben, welches möglichst rasch und möglichst ohne Zerstörung der Proben durchführbar ist und möglichst zuverlässige Ergebnisse über die interessierenden Bereiche der Probe bzw. den informativen Charakter der Proben liefert. Das Verfahren soll mit möglichst geringen Kosten in möglichst kurzer Zeit Informationen über die interessierenden Bereiche der Proben liefern. Die Nachteile des Standes der Technik sollen vermieden oder zumindest reduziert werden.

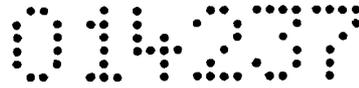
Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Schaffung einer oben genannten Vorrichtung zur automatischen Analyse von biologischen Proben, welche eine möglichst rasche



und zuverlässige Analyse zulässt und darüber hinaus möglichst einfach und robust aufgebaut und möglichst kostengünstig herstellbar ist.

Die erste erfindungsgemäße Aufgabe wird dadurch gelöst, dass aus dem gespeicherten Datensatz der Probe zumindest ein Parameter ausgewählt und dieser oder ein davon abgeleiteter Wert oder eine Kombination von Parametern oder davon abgeleiteten Werten mit zumindest einem Schwellwert verglichen wird, und der Vergleichswert als Kriterium für die Festlegung interessierender Bereiche der Probe verwendet und zusammen mit einer eindeutigen Kennung der Probe gespeichert wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren sieht somit vor, aus einem Datensatz der Probe, welcher unter Ausnützung der Fluoreszenzstrahlung durch berührungslose Abtastung der Probe gebildet und gespeichert wurde, bestimmte Parameter auszuwählen und daraus die interessierenden Bereiche der Probe automatisch festzustellen und zusammen mit einer eindeutigen Kennung der Probe abzuspeichern. Dabei muss die Bestimmung der interessierenden Bereiche nicht in einem einzigen Verfahrensschritt vorgenommen werden, sondern kann diese auch in einem Regelkreis iterativ ermittelt werden. Diese iterative Ermittlung basiert auf einem Lernverfahren aus Informationen, welche durch manuelle Prüfungen von biologischen Proben oder zufällig ausgewählten bereits vor-klassifizierten Proben erhalten wurden. Die Auswahl des zumindest einen Parameters kann in Abhängigkeit der Probe aus Erfahrungswerten erfolgen. Als Resultat des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt ein Datensatz vor, der für jede Probe einen Vorschlag für die interessierenden Bereiche vornimmt. Dieser Datensatz ist für die Auswahl nachfolgender Untersuchungen besonders wichtig und unterstützt beispielsweise den Histologen bei der Auswahl der entsprechenden Proben. Dadurch kann eine Klassifizierung einer Vielzahl von Proben in relativ rascher Zeit auch automatisiert vorgenommen werden und als Vorschlag für die weitere Bearbeitung angeboten werden. Das Verfahren zur Analyse der biologischen Proben kann unmittelbar vor der vorgenommenen Untersuchung der Proben erfolgen oder auch zu einem früheren Zeitpunkt, und die resultierenden Daten gemeinsam mit weiteren Informationen und einer eindeutigen Kennung der Probe beispiels-



weise in einer Datenbank gespeichert werden, so dass sie für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung stehen. Alternativ zur Speicherung der Daten in einer Datenbank können diese auch im so genannten Flatfile-Format abgelegt werden. Grundsätzlich können die gewonnenen Informationen auf einem beliebigen Speichermedium abgelegt werden. Eine Datenbank strukturiert und optimiert jedoch den Prozess, vor allem hinsichtlich der Klassifizierung und Dokumentation. Durch das erfindungsgemäße Verfahren können wichtige Informationen für diagnostische, therapeutische Zwecke aber auch Forschungszwecke gewonnen werden. Mittels der erhaltenen Informationen können die biologischen Proben aufgrund einer Heuristik bestimmten Klassen zugewiesen werden. Das vorliegende Verfahren nützt die Autofluoreszenz für die zerstörungsfreie mikroskopische Charakterisierung von Proben, insbesondere Gewebeproben, aus. Das Muster der resultierenden Fluoreszenzstrahlung der Probe ermöglicht eine automatische Analyse bzw. Entscheidung, welche Teile der Probe für bestimmte Untersuchungen relevant und welche Teile der Probe für bestimmte Untersuchungen irrelevant sind. Somit kann die Autofluoreszenz dazu verwendet werden, die Proben, beispielsweise das Gewebe oder Gewebesteile, vom umgebenden Material, beispielsweise Paraffin, automatisch zu unterscheiden oder bestimmte Gewebesteile mit funktionellen Unterschieden von anderen Gewebesteilen hervorzuheben. Somit ermöglicht die Autofluoreszenz die automatische Bestimmung von Bestandteilen der Probe, insbesondere Gewebesteilen, ohne dass die Probe zerstört wird oder weitere Reaktionen eintreten. Eine Kombination des vorzugsweise zerstörungsfreien erfindungsgemäßen Verfahrens mit anderen Methoden, bei welchen die Proben oder Teile davon beeinträchtigt oder sogar zerstört werden, ist natürlich auch möglich, um dadurch wichtige zusätzliche Informationen zu erhalten.

Vorzugsweise wird die Fluoreszenzstrahlung durch Anregung der Probe mit Laserlicht hervorgerufen. Neben Laserlicht können aber auch Quecksilberlampen oder andere Lichtquellen, welche Autofluoreszenz induzieren können, zur Anwendung kommen.

Gemäß einem weiteren Merkmal der Erfindung kann das Bild der resultierenden Fluoreszenzstrahlung der Probe gefiltert werden. Die aufgenommenen Datensätze bzw. Bilder der Proben können nach

verschiedenen Gesichtspunkten gefiltert werden. Dabei kommen sowohl mechanische Filter, welche vor die Kamera oder. dgl. zur Aufnahme der Bilder gesetzt werden, als auch elektronische Filter, welche von den Bilddaten durchlaufen werden, zur Anwendung. Im Falle eines Fluoreszenzmikroskops werden beispielsweise Ultraviolett-Lampen und drei verschiedene Filter beispielsweise mit folgenden Charakteristika eingesetzt.

Filter	Wellenlänge des Erregerlichts	Durchlassbereich des Filters
Ultraviolett	390 nm	410 bis 420 nm
Blau	410 nm	505 bis 520 nm
Grün	515 nm	560 bis 610 nm

Im Falle von Fluoreszenz-Scannern werden beispielsweise Laser bei zwei verschiedenen Wellenlängen zusammen mit hochspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. CY3 (Indocarbocyanin) oder CY5 (Indodicarbocyanin) verwendet. CY3 kann beispielsweise bei 530 nm angeregt werden und sendet Licht mit einer Wellenlänge von 595 nm aus. CY5 wird mit 630 nm angeregt und sendet eine Fluoreszenz-Strahlung mit 680 nm aus.

Bessere Ergebnisse können auch dadurch erzielt werden, dass die Probe mit kombiniertem Licht verschiedener Wellenlänge angeregt wird. Beim derartigen „Multispectral imaging“ werden verschiedene Lichtquellen eingesetzt und dadurch mehr Informationen erhalten. Als Lichtquellen stehen beispielsweise Laser wie Argon-Ionen oder Helium/Neon-Laser zur Verfügung. Darüber hinaus können anstelle von Lasern auch Lichtquellen mit breitem Wellenlängenbereich herangezogen werden. Beispielsweise können Quecksilberlampen oder fiberoptische Geräte als Lichtquellen eingesetzt werden.

Um die nachfolgende Bearbeitung der Datensätze zu erleichtern, werden diese vorzugsweise in einem standardisierten Format, beispielsweise im TIFF- oder JPG-Format gespeichert. Dies ermöglicht auch die Anwendung vorhandener Bildverarbeitungsprogramme und erfordert keine Umwandlung der Datensätze vor der Un-

tersuchung.

Vorteilhafterweise wird der Datensatz der Probe in zumindest einen binären Datensatz transformiert. Ein binärer Datensatz besteht aus einer Matrix von logischen Nullen und logischen Einsen, welche entsprechend analysiert werden können. Derartige binäre Datensätze werden so erzeugt, dass bestimmte Parameter mit einem Schwellwert oder mehreren Schwellwerten verglichen werden. Wenn mehr als ein Parameter benützt wird, können mehrere Binärdatensätze anfallen, welche zu einem späteren Zeitpunkt im Algorithmus beispielsweise durch Superposition und/oder Gewichtung kombiniert werden können. Prinzipiell kann jedes Bild durch mehrere Binärbilder dargestellt werden. Beispielsweise kann ein Farbbild mit 8 Bit Auflösung, also 256 möglichen Farbabstufungen, durch Superposition von 256 Binärbildern eindeutig dargestellt werden.

Als Parameter, der aus dem Datensatz ausgewählt wird und zur Analyse der interessierenden Bereiche der Proben herangezogen wird, kann ein Fluoreszenzparameter, insbesondere die Fluoreszenzintensität, verwendet werden. Die Daten werden mit einem vorgegebenen Schwellwert verglichen und danach der Vergleichswert als Kriterium für die Festlegung der interessierenden Bereiche der Probe verwendet. Der jeweilige Schwellwert kann aus Erfahrungswerten resultieren oder mittels standardisierter statistischer Methoden, beispielsweise so genannten Box-Plot-Verfahren, auch automatisch bestimmt werden. Dieses Box-Plot-Verfahren benutzt die Information der Häufungen von Stichproben sowie Quantilinformationen und ermöglicht ein einfaches Bestimmen eines Schwellwerts ohne Voraussetzung weiterer Kenntnisse, beispielsweise über die biologische Probe. Bei Verwendung der Fluoreszenzintensität als Parameter werden die Werte vorzugsweise im Verhältnis mit der Intensität der umgebenden Pixel gesetzt und eine Verteilung der Fluoreszenzintensität über die Pixel des Bildes erzeugt. Als abgeleitete Werte eines Parameters können beispielsweise die Variabilität in der Fluoreszenzintensität oder dgl. herangezogen werden. Die Fluoreszenzintensität hängt stark von der Verteilung jener Moleküle, welche die Fluoreszenzstrahlung aussenden ab und kann daher für folgende automatische Analysen herangezogen werden:

1. Mikromolekularer Bereich (Homogenität): Kleine Moleküle in der Zelle (z.B. NAD, FAD, Tryptophan oder dgl.) senden submikroskopische Fluoreszenz aus, deren Gesamtheit in einem unscharfen intrazellularen Erscheinungsbild resultiert. Die Fluoreszenzstrahlung ist homogen, wenn keine Störungen durch andere Fluoreszenz-Quellen auftreten.

2. Makromolekularer Bereich (Granularität): Molekulare Komplexe, (z.B. Porphyrine, Lipopigmente, koagulierte Proteine, usw.) weisen ein starkes körniges Fluoreszenz-Muster auf, das im Mikroskop bzw. digitalen Abbild beobachtet werden kann. Dies kann sowohl bei intrazellularen als auch extrazellularen Molekülen auftreten, welche in einer Variabilität der AutoFluoreszenzintensität resultieren.

3. Gewebsbeschaffenheit (Orientierung): Größere Strukturen mit spezifischer molekularer Zusammensetzung resultieren in charakteristischer Orientierung der Autofluoreszenz, wie es beispielsweise bei kollagenreichen Bindegeweben mit longitudinal ausgerichteten parallelen Strukturen (Fasern) der Fall ist. Dadurch ist es möglich, die Umrisse bestimmter Strukturen innerhalb der Probe automatisch zu ermitteln und somit auf interessierende Bereiche (ROI) rückzuschließen.

Der zumindest eine Schwellwert kann aus zumindest einem Parameter abgeleitet werden. Beispielsweise kann der Schwellwert mittels des Medians festgelegt werden, wenn sich geeignete Parameter feststellen lassen, so dass sich deren Verteilung stabil verhält, beim Beispiel des Medians also eine stabile unimodale Verteilung bei den Parametern feststeht.

Der Schwellwert kann auch in Abhängigkeit der Art der Probe entsprechend gewählt werden. Beispielsweise können zusammen mit der Probe eine Information über die Zusammensetzung der Probe und zugehörige, aus Erfahrungswerten oder anderen Methoden bestimmte Schwellwerte hinterlegt sein. Beispielsweise kann aus einer bestimmten Information in einer Datenbank auch mittels eines Binärbildes, welches z.B. aus einem Gradientenverfahren bestimmt wurde, ein Gewicht gelegt werden.

Die Schwellwerte können auch in Abhängigkeit der Vergleichswerte verändert werden. So kann das erfindungsgemäße Verfahren iterativ bzw. durch einen Lernalgorithmus verbessert werden.

Der Schwellwert kann auch durch externe Parameter, welche beispielsweise durch Experten bestimmt werden, beeinflusst werden.

Gemäß einem weiteren Merkmal der Erfindung ist vorgesehen, dass jene Bereiche der Proben, deren Vergleichswert positiv ist, als interessierende Bereiche gekennzeichnet werden. Dies stellt eine einfache Methode dar, die interessierenden von den nicht-interessierenden Bereichen zu unterscheiden.

Vorteilhafterweise wird die geometrische Form der interessierenden Bereiche der Probe ermittelt und für die weitere Bearbeitung und Analyse gespeichert. Die geometrische Form kann beispielsweise durch Überlagerungen mit vorgegebenen geometrischen Körpern oder durch Speicherung von Charakteristika, wie z.B. Schwerpunkt, maximale und minimale Ausdehnung, Hauptausdehnungsrichtung od. dgl., klassifiziert werden. Somit können sie später dargestellt und für nachfolgende Untersuchungen herangezogen werden.

Im Datensatz der Probe können die außerhalb der interessierenden Bereiche liegenden Bereiche der Probe gelöscht oder selektiv anders dargestellt werden. Dadurch wird verhindert, dass Untersuchungen an nicht-interessierenden Teilen der Probe vorgenommen werden.

Die außerhalb der interessierenden Bereiche liegenden Bereiche der Probe können auch ausgeschnitten werden, wobei zum Ausschneiden insbesondere Laser verwendet werden können.

Um eine Aussage über die Qualität der Probe treffen zu können, kann die Größe der interessierenden Bereiche der Probe bestimmt werden. Darüber hinaus kann aufgrund der resultierenden Größe die Entscheidung nachfolgender Untersuchungen erleichtert werden.

Dabei kann das Verhältnis der Größe der interessierenden Bereiche zur Gesamtfläche der Probe gebildet und zusammen mit der eindeutigen Kennung der Probe gespeichert werden. Dieses Verhältnis gibt Auskunft darüber, wie groß der Anteil der interessierenden Bereiche der Probe ist.

Schließlich kann im automatischen Verfahren vorgesehen sein, dass jene Proben, deren Verhältnis der Größe der interessierenden Bereiche zur Gesamtfläche der Probe einen vorgegebenen Grenzwert unterschreiten, als unverwertbar gekennzeichnet werden. Dadurch kann automatisch eine Ausscheidung von Proben, die einen zu geringen Anteil an interessierenden Bereichen aufweisen, vorgenommen werden.

Zur automatischen Analyse können weitere Datensätze, die von anderen Quellen stammen, herangezogen werden. Aus diesen Datensätzen kann zumindest ein weiterer Parameter zur Festlegung der interessierenden Bereiche ausgewählt werden. Ein derartiger weiterer Datensatz kann beispielsweise ein, allenfalls gefärbtes mikroskopisches Bild der Probe sein, welches weitere interessante Informationen enthält. Durch die Überlagerung des mikroskopischen Datensatzes mit dem Datensatz, welcher beispielsweise aus der Fluoreszenzstrahlung resultiert, kann die automatische Analyse der Probe weiter verbessert werden.

Um die Analyse möglichst rasch durchführen zu können, werden vorzugsweise mehrere Proben automatisch sequenziell oder parallel verarbeitet und die erhaltenen Daten über die interessierenden Bereiche der Proben zusammen mit einer Kennung der Proben gespeichert. Somit können bereits nach der Herstellung der Proben Daten über die interessierenden Bereiche der Proben gesammelt und gespeichert werden. Diese Daten stehen dann für eine Auswahl der Proben für bestimmte nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung.

Gelöst wird die zweite erfindungsgemäße Aufgabe auch durch eine oben genannte Vorrichtung zur automatischen Analyse von biologischen Proben, insbesondere Gewebeproben, und einer Einrichtung zur berührungslosen Abtastung der Proben zur Bildung von Datensätzen der Proben, wobei die Abtasteinrichtung mit einer Rech-

nerereinheit zur Auswahl zumindest eines Parameters aus dem Datensatz, und zum Vergleich dieses Parameters oder eines davon abgeleiteten Wertes oder einer Kombination von Parametern oder davon abgeleiteten Werten mit zumindest einem Schwellwert verbunden ist, und dass eine Einrichtung zur Anzeige eines aus dem Vergleichswert festgelegten interessierenden Bereiches der Probe und ein Speicher zum Speichern dieses Bereiches zusammen mit einer eindeutigen Kennung der Probe. Vorgesehen ist. Die Aufnahmeeinrichtung wird durch zumindest eine Lichtquelle und eine Kamera bzw. einen Detektor gebildet. Im Falle der Autofluoreszenz wird ein Fluoreszenzscanner oder ein Fluoreszenzmikroskop verwendet, welche die Fluoreszenzstrahlung der Probe, welche mit einer entsprechenden Lichtquelle angeregt wurde, als Datensatz aufnimmt. Eine Vorrichtung zur automatischen Analyse von biologischen Proben gemäß der vorliegenden Erfindung besteht daher üblicherweise aus einer Rechneereinheit, welche mit einer aus zumindest einer Lichtquelle und einer Kamera bzw. einem Detektor gebildeten Abtasteinrichtung verbunden ist und die erhaltenen Informationen entsprechend verarbeitet.

Ebenso können mehrere Lichtquellen in verschiedenen Wellenlängenbereichen vorgesehen sein oder auch eine Lichtquelle, welche Licht in einem sehr breiten Wellenlängenbereich aussendet.

Weiters kann eine Einrichtung zur Transformation des Datensatzes der Probe in zumindest einen binären Datensatz vorgesehen sein.

Um die Relevanz der Daten zu erhöhen, kann eine Filtereinrichtung zum Filtern der Datensätze der Proben vorgesehen sein. Wie bereits oben erwähnt, kann es sich dabei um Filter handeln, welche vor die Aufnahmeeinrichtung Hardware-mäßig angeordnet werden, aber auch um Filter, welche Software-mäßig eine Bereinigung der erhaltenen Daten vornehmen.

Zusätzlich kann ein Mikroskop zur Aufnahme der Proben zur Schaffung zusätzlicher Datensätze vorgesehen sein.

Um eine möglichst rasche Analyse zuzulassen, kann eine Einrichtung zur automatischen Zu- und Abführung der Proben vorgesehen sein.

Ebenso kann ein Magazin zur Aufnahme einer Vielzahl von Proben vorgesehen sein, aus welchem die Proben zur Analyse automatisiert entnommen und wieder retourniert werden. Somit kann eine rasche automatisierte Analyse der Proben erzielt werden.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert.

Darin zeigen:

Fig. 1 ein schematisches Blockschaltbild zur Veranschaulichung des erfindungsgemäßen Verfahrens;

Fig. 2 ein Flussdiagramm zur Veranschaulichung des Verfahrens zur automatischen Analyse von biologischen Proben;

Fig. 3 die Ansicht auf eine mehrere Einzelproben umfassende Gewebeprobe;

Fig. 4 beispielhaft verschiedene Gewebeproben mit unterschiedlichem Anteil der interessierenden Bereiche;

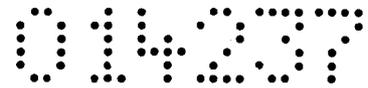
Fig. 5 die Draufsicht auf unterschiedliche Gewebeproben; und

Fig. 6 ein Blockschaltbild einer Ausführungsform der Vorrichtung zur automatischen Analyse von biologischen Proben.

Fig. 1 zeigt ein schematisches Blockschaltbild zur Veranschaulichung des Verfahrens zur automatischen Analyse von biologischen Proben 1. Die biologische Probe 1 kann beispielsweise ein Schnitt eines Organs oder dgl. sein, welcher mit Hilfe eines Mikrotoms hergestellt wurde und histologisch untersucht werden soll. Die Probe 1 ist meist auf einen Glasträger 2 aufgebracht und weist eine eindeutige Kennung ID beispielsweise in Form eines Barcodes auf. Meist beinhaltet nur ein Teil des Gesamtbereichs der Probe 1 interessante Information. Beispielsweise interessiert bei einem Gewebsschnitt meist jener Bereich, der einem bestimmten Organ, beispielsweise der Leber, entnommen wurde und nicht das umliegende Fett- oder Bindegewebe. Üblicher-

weise werden die interessierenden Bereiche, die so genannten „Regions of Interest“ (ROI), manuell von entsprechenden Spezialisten festgelegt. Dabei können Färbemethoden unterstützend angewandt werden, wodurch jedoch die Probe 1 beeinflusst wird und für manche nachfolgende Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung steht. Zu diesem Zweck ist es ein Ziel, die Probe 1 automatisch zu analysieren, um die interessierenden Bereiche ROI automatisch festlegen zu können. Dadurch wird eine besonders wichtige Information für die nachfolgenden Untersuchungen an der Probe 1 zur Verfügung gestellt. Um die Probe 1 nicht zu zerstören bzw. nicht zu beeinflussen, wird diese mit entsprechenden Einrichtungen 3 berührungslos abgetastet und zumindest ein Datensatz 4 der Probe 1 geschaffen. Aus diesem Datensatz 4 wird nun zumindest ein Parameter P ausgewählt und dieser oder ein davon abgeleiteter Wert oder eine Kombination von Parametern P oder davon abgeleiteten Werten mit zumindest einem Schwellwert S verglichen und der Vergleichswert als Kriterium für die Festlegung der interessierenden Bereiche ROI der Probe 1 verwendet. Durch die Festlegung zweier Schwellwerte S bzw. eines bestimmten Betrags für einen Schwellwert S kann durch den Schwellwert S auch ein Intervall festgelegt werden, in dem sich ein Parameter P aufhalten muss, um einer spezifischen Klassifizierung zu genügen. Als Resultat der entsprechenden Berechnung wird also ein Vorschlag für den interessierenden Bereich ROI bzw. die interessierenden Bereiche ROI der Probe 1 wiedergegeben. Danach wird ein Datensatz 5 gebildet, welcher die festgelegten interessierenden Bereiche ROI der Probe 1 zusammen mit der eindeutigen Kennung ID der Probe 1 enthält. Dieser Datensatz 5 bildet zusammen mit der Probe 1 eine wichtige Einheit, durch welche nachfolgende Untersuchungen an der Probe 1 rascher und effizienter durchgeführt werden können. Ebenso dient das erfindungsgemäße Verfahren zur automatischen Analyse von biologischen Proben 1 dazu, rascher jene Proben 1 zu identifizieren, welche keinen oder einen zu kleinen interessierenden Bereich ROI aufweisen. Somit können teure Untersuchungen an ungeeigneten Proben 1 unterbleiben und Zeit für die manuelle Klassifizierung der Proben 1 gespart werden.

Es können aus der Probe 1 auch weitere Datensätze 6 gebildet werden, aus welchen weitere Parameter P' ausgewählt werden



können, die zur Festlegung der interessierenden Bereiche ROI herangezogen werden. Bei derartigen Datensätzen 6 kann es sich beispielsweise um mikroskopische Bilder der Probe 1 aber auch um Daten handeln, welche beispielsweise durch bestimmte Färbemethoden oder dgl. an der Probe 1 entstanden sind. Somit wird wichtige zusätzliche Information geschaffen, welche die automatische Analyse der Probe 1 beschleunigt bzw. verbessert.

Zusätzlich zu derartigen weiteren Datensätzen 6 können auch Datensätze 7 herangezogen werden, welche aus dem Wissen von Experten gegründet wurde. Beispielsweise können bestimmte, durch vorausgegangene Untersuchungen belegte, Hypothesen über verschiedene Arten von Proben 1 in solchen Datensätzen 7 gesammelt werden. Diese Datensätze 7 können weitere Parameter P'' liefern, die zur Berechnung und Festlegung der interessierenden Bereiche ROI der Probe 1 herangezogen werden können.

Wie in der Abbildung durch die strichlierten Linien veranschaulicht, kann die Festlegung der interessierenden Bereiche ROI der Probe 1 auch iterativ erfolgen, indem die Parameter der Datensätze 4, 6, 7 solange verändert werden, bis ein optimales Ergebnis vorliegt.

Schließlich kann, nach Erhalt des Ergebnisses des interessierenden Bereichs ROI der Probe 1, auch jener Bereich der Probe 1 entfernt werden, welcher außerhalb des interessierenden Bereichs ROI liegt. Es resultiert nunmehr ein Präparat 8, dessen Probe 1 ausschließlich aus dem automatisch festgelegten interessierenden Bereich ROI und der eindeutigen Kennung ID der Probe 1 besteht. Dadurch wird verhindert, dass an nicht interessierenden Bereichen der Probe 1 aufwändige und kostenintensive Untersuchungen vorgenommen werden.

Fig. 2 zeigt ein Flussdiagramm zur weiteren Veranschaulichung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur automatischen Analyse von biologischen Proben 1. Ausgehend von der Probe 1 gemäß Block 100 wird diese entsprechend Block 101 berührungslos abgetastet. Die berührungslose Abtastung erfolgt dabei durch optische Verfahren unter Ausnützung der Autofluoreszenz-Strahlung. Nach dem Abtasten der Probe 1 wird ein Datensatz gebildet (Block 102),



der noch gefiltert oder transformiert werden kann (Block 103). Gemäß Block 104 wird aus dem Datensatz zumindest ein Parameter P ausgewählt, und entsprechend Block 105 zumindest ein Schwellwert S festgelegt. Gemäß Block 106 wird der zumindest eine Parameter P oder ein davon abgeleiteter Wert oder eine Kombination von Parametern P oder davon abgeleiteten Werten mit dem zumindest einen Schwellwert S verglichen, um aus dem Vergleichswert den interessierenden Bereich ROI bzw. die interessierenden Bereiche ROI der Probe 1 festzulegen (Block 107). Der ermittelte interessierende Bereich ROI wird zusammen mit der Kennung ID der Probe 1 gespeichert (Block 108) und allenfalls grafisch dargestellt (Block 109). Vor der Festlegung des interessierenden Bereichs ROI entsprechend Block 107 kann eine Abfrage gemäß Block 110 erfolgen, ob das Ergebnis anhand bestimmter Kriterien gut erscheint. Ist dies der Fall, wird der ermittelte interessierende Bereich ROI der Probe 1 entsprechend Block 107 festgelegt. Ist dies jedoch nicht der Fall, kann der zumindest eine Schwellwert S gemäß Block 111 verändert und angepasst werden sowie der zumindest eine Parameter P gemäß Block 112 verändert und angepasst werden und erneut der interessierende Bereich ROI der Probe 1 festgelegt werden. Diese Schleife wird so oft wiederholt, bis das Ergebnis entsprechend der Abfrage 110 zufriedenstellend ist und somit der interessierende Bereich ROI der Probe 1 gemäß Block 107 festgelegt wird.

Mit der Probe 100 können weitere Analysen entsprechend Block 113 durchgeführt werden und entsprechende Datensätze gebildet (Block 114) und allenfalls vorverarbeitet (Block 115) werden. Die so ermittelten Daten können zur Auswahl der Parameter gemäß Block 104 herangezogen werden. Ebenso können manuelle Einstellungen von Experten entsprechend Block 116 für die Auswahl der Parameter gemäß Block 104 sowie Daten aus Wissensdatenbanken (Block 117) verwendet werden und das Ergebnis der automatischen Analyse der biologischen Proben 1 verbessern.

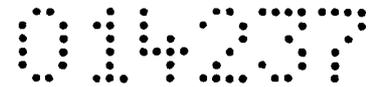
Fig. 3 zeigt die Draufsicht auf ein Bild einer aus 25 Einzelproben 9 bestehenden Probe 1 in Form eines Gewebeprobenarrays (TMAs). Bei der Probe 1 handelt es sich um Gewebsschnitte eines bestimmten Zielgewebes, beispielsweise der Leber. Die Einzelprobe 9' weist beispielsweise kein Zielgewebe oder eine Reaktion

bei einer bestimmten Färbung des Gewebes auf und hat daher keinen interessierenden Bereich ROI. Bei der Einzelprobe 9'' sind etwa 50% der Gesamtfläche mit Zielgewebe bedeckt oder weisen eine Reaktion auf. Die Einzelprobe 9''' weist ebenfalls etwa 50% Zielgewebe auf, welches starke spezifische Reaktion zeigt. Schließlich zeigt die Einzelprobe 9'''' zum Großteil Zielgewebe, welches jedoch nur schwach eine spezifische Reaktion zeigt. Die Abbildung zeigt die Vielfalt an unterschiedlichen Proben, welche normalerweise in zeitaufwändiger manueller Tätigkeit analysiert werden müssen.

Fig. 4 zeigt drei schematische Abbilder von Autofluoreszenzaufnahmen verschiedener Proben 1 mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und somit unterschiedlicher Größe der interessierenden Bereiche ROI. Dabei handelt es sich um schematische Abbilder tatsächlicher Messergebnisse.

Schließlich zeigt Fig. 5 einige Gewebeproben 1, bei welchen die manuell ermittelten interessierenden Bereiche ROI festgelegt und gekennzeichnet wurden. Bei den interessierenden Bereichen ROI handelt es sich beispielsweise um Krebsgewebe, wogegen die irrelevanten Bereiche außerhalb der interessierenden Bereiche ROI Fettgewebe, Bindegewebe oder andere sind.

Schließlich zeigt Fig. 6 ein Blockschaltbild einer möglichen Vorrichtung 10 zur automatischen Analyse von biologischen Proben 1. Die Vorrichtung 10 weist eine Einrichtung 11 zur berührungslosen Abtastung der Proben 1 auf. Die Abtasteinrichtung 11 kann mit einer Datenbank 12 verbunden sein, welche Information über die Proben 1 enthält. Die Abtasteinrichtung 11 ist durch zumindest eine Lichtquelle 13, vorzugsweise einen Laser und eine Einrichtung 14 zur Aufnahme eines Bildes der Probe 1, gebildet. Für weitere Informationen kann ein Mikroskop 15 zur Aufnahme eines Bildes der Proben 1 zur Schaffung weiterer Datensätze angeordnet sein. Die Abtasteinrichtung 11 ist mit einer Rechereinheit 16 verbunden, welche die Daten der abgetasteten Proben 1 entsprechend verarbeitet. In der Rechereinheit 16 wird zumindest ein Parameter P aus den Datensätzen der Proben 1 ausgewählt und dieser Parameter P oder ein davon abgeleiteter Wert oder eine Kombination von Parametern P oder davon abgeleiteten

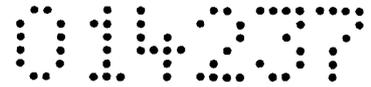


Werten mit zumindest einem Schwellwert  $S$  verglichen und der Vergleichswert als Kriterium für die Festlegung interessierender Bereiche ROI der Probe 1 verwendet. Diese interessierenden Bereiche ROI werden auf einer Anzeigeeinrichtung 17, beispielsweise einem Bildschirm, dargestellt und in einem Speicher 18 zusammen mit der Kennung ID der Probe 1 gespeichert. Zur effizienteren Abwicklung des Verfahrens kann eine Einrichtung 19 zur automatischen Zu- und Abführung der Proben 1 vorgesehen sein, welche vorzugsweise mit einem Magazin 20 zur Aufnahme einer Vielzahl von Proben 1, die aus einem entsprechenden Lager 21 entnommen wurden, verbunden ist.

#### Beispiel für die Anwendung des Verfahrens an den Schnitten eines Gewebeprobenarrays

Das gegenständliche Verfahren zur automatischen Analyse von biologischen Proben eignet sich zur automatischen Analyse von Einzelproben eines Gewebeprobenarrays. Im vorliegenden Beispiel wird ein Gewebeprobenarray (TMA, Tissue Microarray) mit jeweils 450 Einzelproben bzw. „Cores“ untersucht. Das Gewebeprobenarray enthält jeweils 30 Einzelproben eines bestimmten Organs bzw. Gewebes, welche in den Zeilen der folgenden Tabelle aufgelistet sind. Mit Hilfe anderer Verfahren können fehlende oder defekte Einzelproben des Probenarrays und somit die Relevanz der Proben festgestellt werden. Die Anzahl  $n$  der verwertbaren Einzelproben als Ergebnis eines derartigen Verfahrens ist in Spalte 2 und 4 der Tabelle wiedergegeben. Die Spalten 2 und 3 der Tabelle zeigen die Ergebnisse an Schnitt Nr. 4 des Gewebeprobenarrays, die Spalten 4 und 5 zeigen die Ergebnisse für Schnitt Nr. 137 desselben Gewebeprobenarrays. Beim Schnitt Nr. 4 sind entsprechend Spalte 2 insgesamt 14 der 450 Einzelproben defekt bzw. fehlend. Beim Schnitt Nr. 137 des gleichen Gewebeprobenarrays sind gemäß Spalte 4 bereits 223 von 450 Einzelproben nicht vorhanden bzw. zerstört. Dies verdeutlicht das Problem bei Gewebeprobenarrays, bei welchen manche Einzelproben nicht so weit in den Paraffinblock ragen und somit gerade bei tieferen Schnitten des Gewebeprobenarrays fehlen.

Die Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den Spalten 3 und 5 der Tabelle gezeigt. Darin wird die Anzahl  $n_1$  der

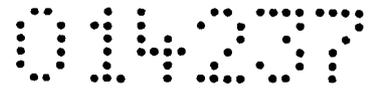


Einzelproben des Gewebeprobenarrays jedes Gewebstyps angegeben, welche der automatischen Analyse zufolge informatives Gewebe enthalten. Demgemäß existieren beim Schnitt 4 gemäß Spalte 3 der Tabelle insgesamt 412 für nachfolgende diagnostische Zwecke verfügbare Einzelproben. 24 Einzelproben enthalten gemäß der automatischen Analyse keine Information und stehen somit für nachfolgende Untersuchungen nicht zur Verfügung. Beim Schnitt 137 gemäß Spalte 5 der Tabelle sind insgesamt 207 Einzelproben gemäß der automatischen Analyse verwertbar und 20 davon enthalten keine verwertbare Information. Beispielsweise wird eine Untersuchung der Gewebeproben der Cervix, Mamma oder des Ovars beim Schnitt 137 gemäß Spalte 5 der Tabelle durchaus sinnvoll, da in diesem Fall eine Mehrzahl der Einzelproben verwertbare Information enthält. Dagegen enthalten nur zwei der insgesamt 30 Einzelproben der Schilddrüse verwertbare Informationen, weshalb bei genauen Untersuchungen der Schilddrüse auf ein anderes Gewebeprobenarray bzw. einen anderen Schnitt des Gewebeprobenarrays zugegriffen werden sollte.

Über jede Einzelprobe des Gewebeprobenarrays liegt üblicherweise auch eine Information über den Patienten vor. Beispielsweise stammen die 30 Einzelproben je Gewebsart im gegenständlichen Beispiel von 10 verschiedenen Quellen, also beispielsweise 10 verschiedenen Patienten. Demnach existieren von der selben Quelle bzw. dem selben Patienten im Idealfall 3 Einzelproben. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann jede Einzelprobe des Gewebeprobenarrays automatisch analysiert werden, so dass beispielsweise eine Aussage darüber getroffen werden kann, von welcher Gewebsart alle 3 der im Idealfall vorhandenen Einzelproben informativen Charakter aufweisen oder von welcher beispielsweise nur 2 oder nur 1 oder gar keine Einzelprobe informativen Charakter besitzen. Für bestimmte Untersuchungen an dem Präparat ist diese Information natürlich von erheblicher Bedeutung. Wie die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltenen Informationen aufbereitet werden, hängt jedoch stark vom jeweiligen Anwendungsfall und den nachfolgenden Untersuchungen an den Präparaten ab.

TABELLE

Gewebe	Schnitt 4		Schnitt 137	
	n	n <sub>I</sub>	n	n <sub>I</sub>
Magen	27	26	14	14
Pankreas	30	22	18	9
Ovar	30	30	22	21
Mamma	30	29	23	23
Zervix	30	30	24	23
Prostata	24	24	7	7
Hoden	30	24	16	12
Niere	30	30	20	20
Sarkom	29	27	14	12
Endometrium	29	28	13	12
Schilddrüse	30	30	3	2
Kolon	30	28	12	12
Melanom	27	27	15	14
Leber	30	27	4	4
Lunge	30	30	22	22
SUMME	436	412	227	207
Fehlend bzw. nicht in- formativ	14	24	223	20



Patentansprüche:

1. Verfahren zur automatischen Analyse von biologischen Proben (1), insbesondere Gewebeproben, wobei die Probe (1) mit Licht angeregt wird und als Datensatz (4) der Probe (1) ein Bild der resultierenden Fluoreszenzstrahlung der Probe (1) aufgenommen und gespeichert wird, dadurch gekennzeichnet, dass aus dem gespeicherten Datensatz (4) der Probe (1) zumindest ein Parameter (P) ausgewählt und dieser oder ein davon abgeleiteter Wert oder eine Kombination von Parametern (P) oder davon abgeleiteten Werten mit zumindest einem Schwellwert (S) verglichen wird, und der Vergleichswert (V) als Kriterium für die Festlegung interessierender Bereiche (ROI) der Probe (1) verwendet und zusammen mit einer eindeutigen Kennung (ID) der Probe (1) gespeichert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe (1) mit Laserlicht angeregt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Bild der resultierenden Fluoreszenzstrahlung der Probe (1) gefiltert wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe (1) mit kombiniertem Licht verschiedener Wellenlängen angeregt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Datensatz (4) der Probe (1) in einem standardisierten Format, beispielsweise im TIFF- oder JPG-Format gespeichert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Datensatz (4) der Probe (1) in zumindest einen binären Datensatz transformiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Parameter (P) ein Fluoreszenzparameter, insbesondere die Fluoreszenzintensität, verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein Schwellwert (S) aus zumindest einem Parameter (P) abgeleitet wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Schwellwert (S) in Abhängigkeit der Art der Probe (1) gewählt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Schwellwert (S) in Abhängigkeit der Vergleichswerte (V) verändert wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Schwellwert (S) durch externe Parameter (P'') beeinflusst wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass jene Bereiche der Proben (1), deren Vergleichswert positiv ist, als interessierende Bereiche (ROI) gekennzeichnet werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die geometrische Form der interessierenden Bereiche (ROI) ermittelt und für die weitere Bearbeitung und Analyse gespeichert wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass im resultierenden Datensatz (5) der Probe (1) die außerhalb der interessierenden Bereiche (ROI) liegenden Bereiche der Probe (1) gelöscht oder selektiv anders dargestellt werden.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die außerhalb der interessierenden Bereiche (ROI) liegenden Bereiche der Probe (1) ausgeschnitten werden.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der interessierenden Bereiche (ROI) einer Probe (1) bestimmt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das



Verhältnis der Größe der interessierenden Bereiche (ROI) zur Gesamtfläche der Probe (1) gebildet und zusammen mit der eindeutigen Kennung (ID) der Probe (1) gespeichert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass jene Proben (1), deren Verhältnis der Größe der interessierenden Bereiche (ROI) zur Gesamtfläche der Probe (1) einen vorgegebenen Grenzwert unterschreiten, als unverwertbar gekennzeichnet werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein Parameter (P'', P''') aufgrund zumindest eines weiteren Datensatzes (6, 7) der Probe (1) ausgewählt wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Proben (1) automatisch sequentiell oder parallel verarbeitet und die erhaltenen Daten über die identifizierten interessierenden Bereiche (ROI) der Proben (1) gespeichert werden.

21. Vorrichtung (10) zur automatischen Analyse von biologischen Proben (1), insbesondere Gewebeproben, mit einer durch zumindest eine Lichtquelle (13) und eine Kamera bzw. einen Detektor gebildeten Einrichtung (11) zur berührungslosen Abtastung der Proben (1) zur Bildung von Datensätzen (4) der Proben (1), dadurch gekennzeichnet, dass die Abtasteinrichtung (11) mit einer Rechereinheit (16) zur Auswahl zumindest eines Parameters (P) aus dem Datensatz (4) und zum Vergleich dieses Parameters (P) oder eines davon abgeleiteten Wertes oder einer Kombination von Parameter (P) oder davon abgeleiteten Werten mit zumindest einem Schwellwert (S) verbunden ist, und dass eine Einrichtung (17) zur Anzeige eines aus dem Vergleichswert festgelegten interessierenden Bereichs (ROI) der Probe (1), und ein Speicher (18) zum Speichern dieses Bereichs (ROI) zusammen mit einer eindeutigen Kennung (ID) der Probe (1) vorgesehen ist.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Lichtquelle (13) durch einen Laser gebildet ist.

23. Vorrichtung nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Lichtquellen (13) in verschiedenen Wellenlängenbereichen vorgesehen sind.
24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass eine Einrichtung zur Transformation des Datensatzes (4) der Probe (1) in zumindest einen binären Datensatz vorgesehen ist.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass eine Filtereinrichtung zum Filtern der Datensätze (4) der Proben (1) vorgesehen ist.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass ein Mikroskop (15) zur Aufnahme der Proben (1) zur Schaffung zusätzlicher Datensätze (6) vorgesehen ist.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass eine Einrichtung (19) zur automatischen Zu- und Abführung der Proben (1) vorgesehen ist.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass ein Magazin (20) zur Aufnahme einer Vielzahl von Proben (1) vorgesehen ist, aus welchem die Proben (1) zur Analyse automatisiert entnommen und wieder retourniert werden.

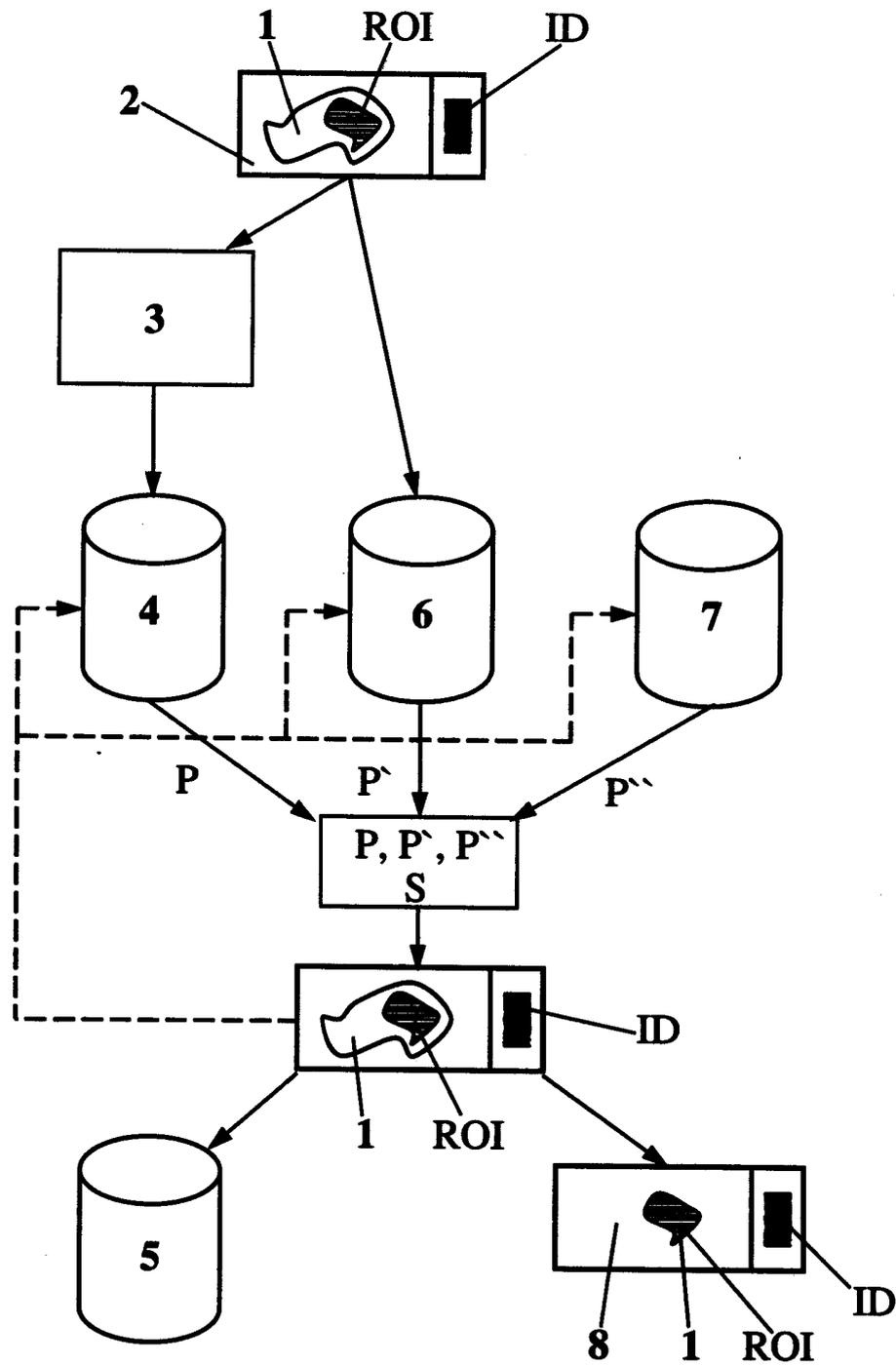


FIG. 1

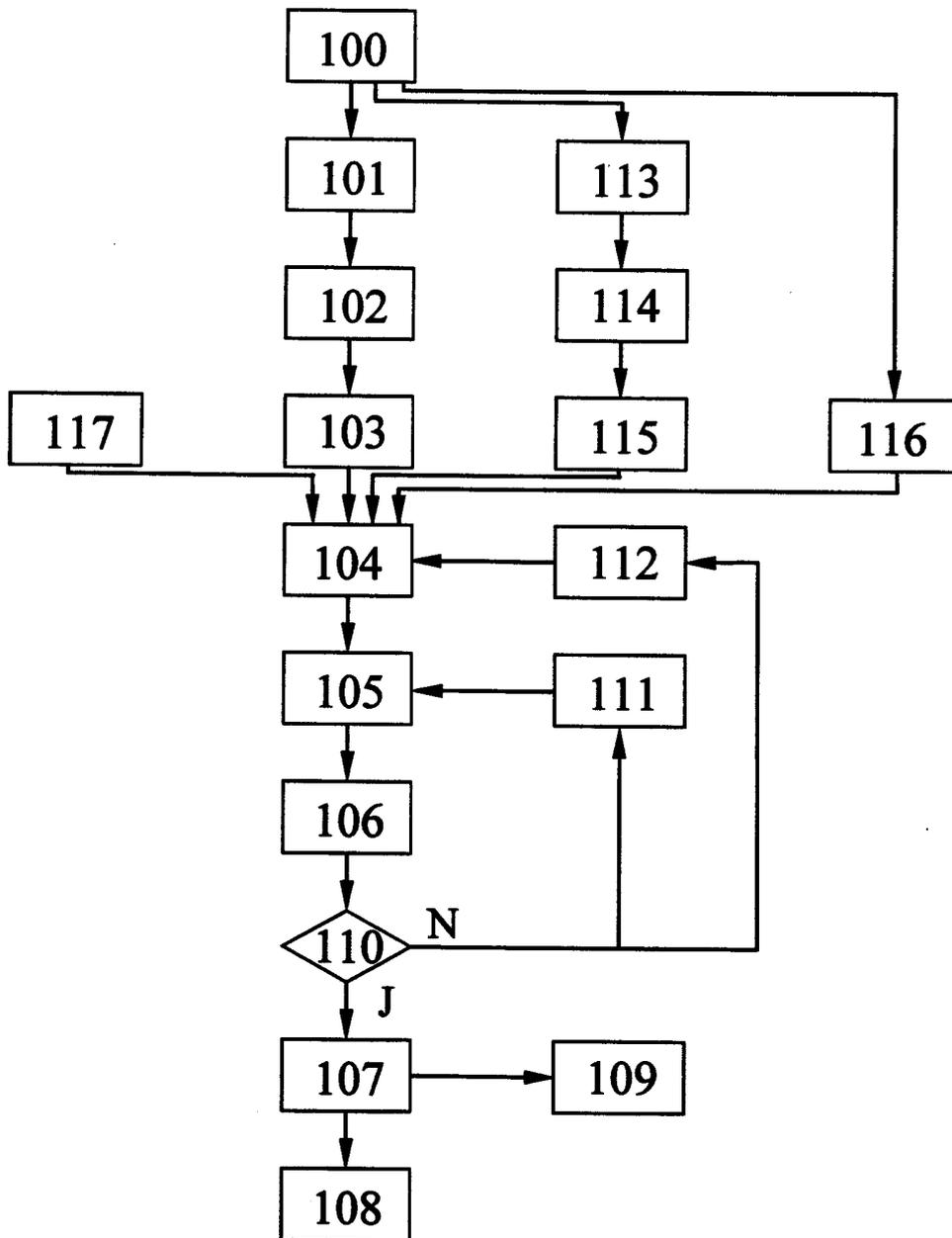


FIG. 2

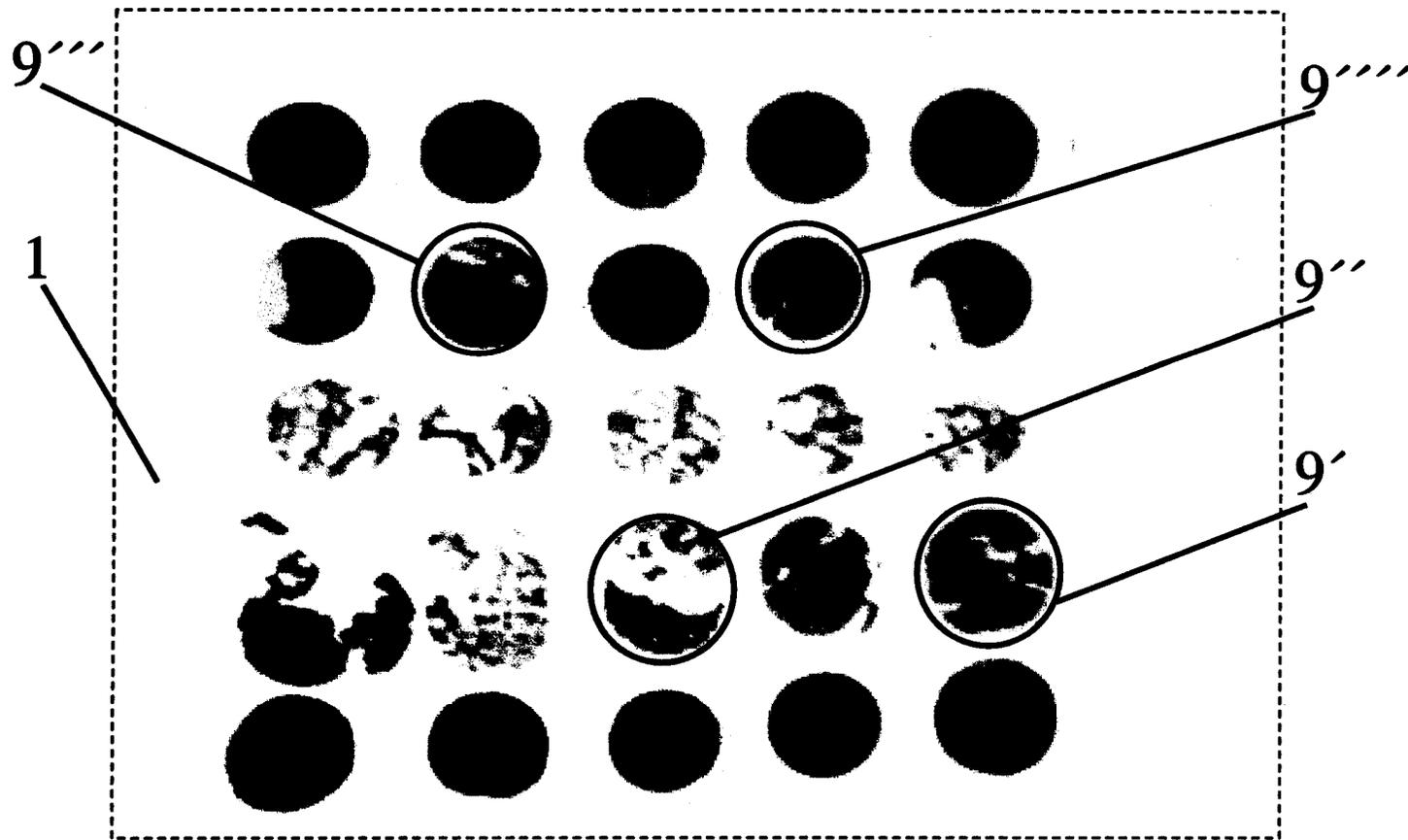


FIG. 3

0  
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

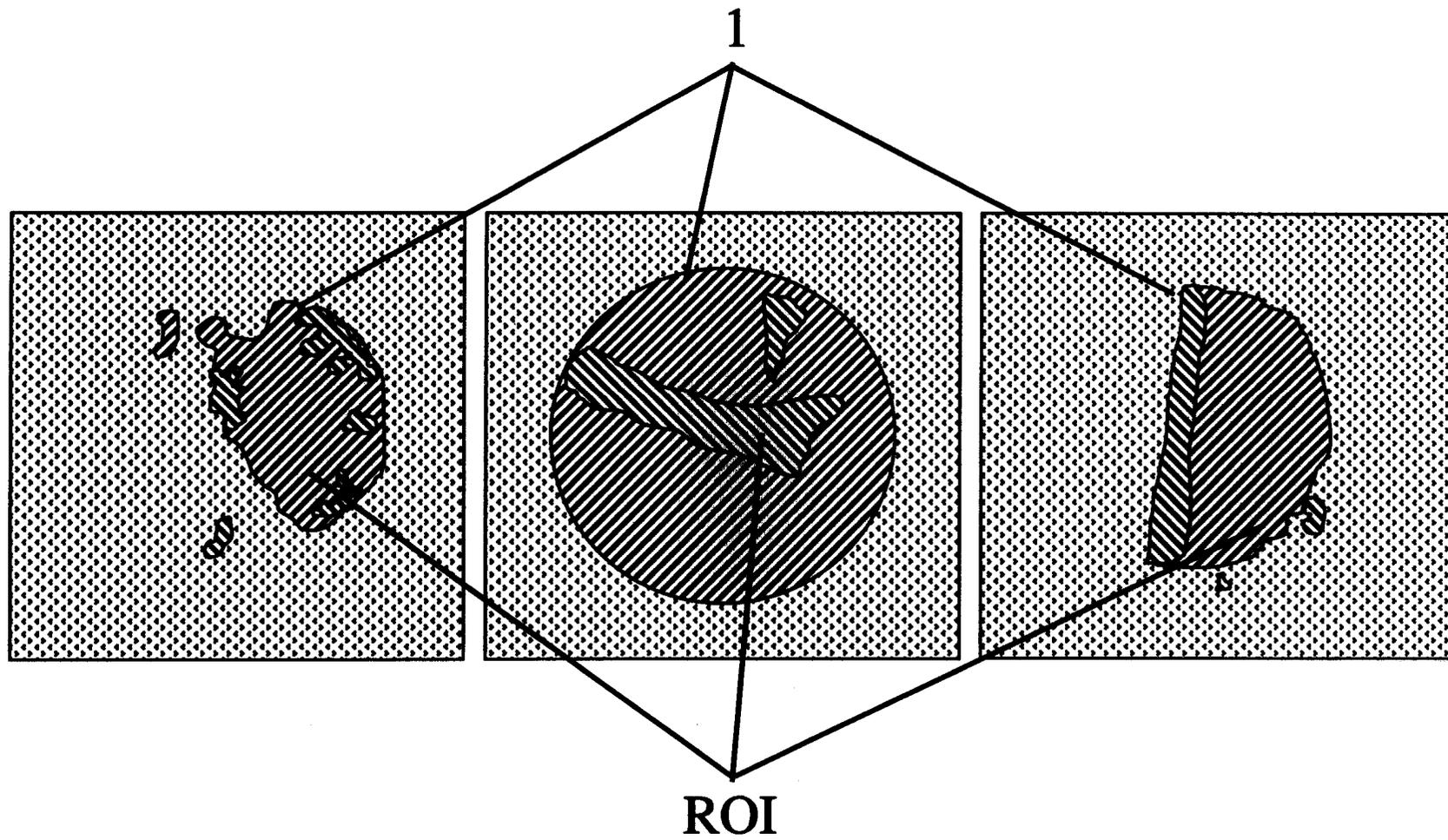


FIG. 4

0  
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

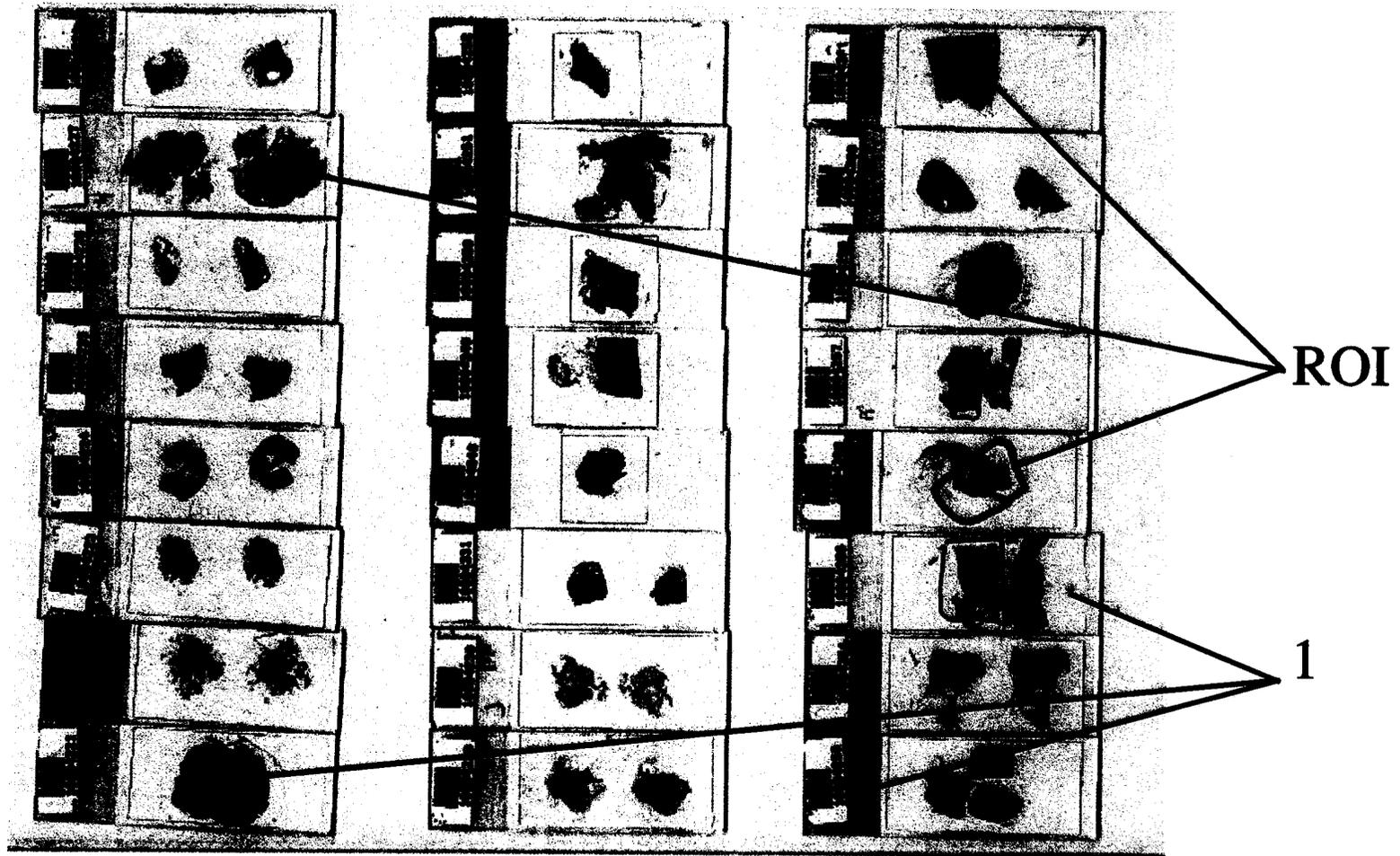
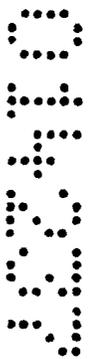


FIG. 5



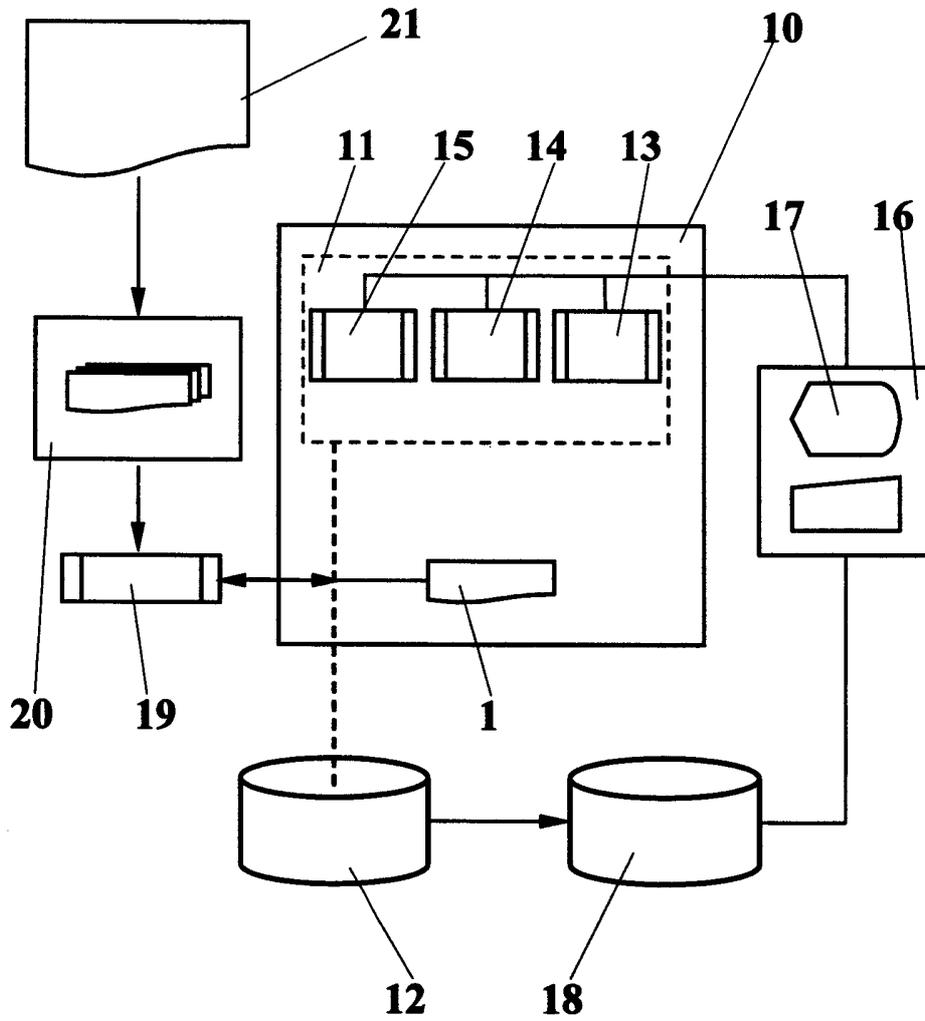


FIG. 6



Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC<sup>8</sup>:  
**G01N 33/483** (2006.01); **G01N 21/64** (2006.01); **G06K 9/00** (2006.01); **H04N 7/18** (2006.01);  
**A61B 1/04** (2006.01); **A61B 5/00** (2006.01)

Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß ECLA:  
G01N 33/483, G01N33/483B, G01N33/483B1, G06K9/00, H04N7/18E, A61B1/04, A61B5/00B,  
G01N21/64A

Recherchiertes Prüfverfahren (Klassifikation):  
G01N, A61B, H04N, G06K

Konsultierte Online-Datenbank:  
EPODOC, WPI, PAJ, TXT, Pubmed, Embase, Internet

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 30. November 2005 eingereichten Ansprüchen 1-28 erstellt.

Kategorie <sup>1</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	US 6462770 (Xillix Technologies Corp.) 8. Oktober 2002 (08.10.2002) <i>*Ansprüche*</i>	1-28
	--	
X	WO97/08538A1 (Purdue Research Foundation) 6. März 1997 (06.03.1997) <i>*Ansprüche 1, 14, 21*</i>	1-28
	--	
X	EP1210907A1 (Fuji Photo Film Co. Ltd) 5. Juni 2002 (05.06.2002) <i>*Ansprüche*</i>	1-28
	--	
X	US2003/0147552A1 (Foran et al.) 7. August 2003 (07.08.2003) <i>*Ansprüche 1, 22*</i>	1-28
Y	<i>*Paragraph [0004]-[0006], [0012]-[0016], [0041]-[0046], Fig. 4*</i>	1-28
	--	
X	WO2004/0085443A1 (Kallioniemi et al.) 6. Mai 2004 (06.05.2004) <i>*Paragraph [0377]-[0389], Ansprüche, besonders 29 und 40*</i>	1-28
	--	
Y	US5796862 A (Eastman Kodak Company) 18. August 1998 (18.08.1998) <i>*Spalte 2, Zeilen 44-68*</i>	1-28
Datum der Beendigung der Recherche: 4. April 2006		<input type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Dr. GÖRNER