



Andy's Algorithm

Guía de usuario

15 Oct 2019

[1. Introducción](#)

[2. Instalación](#)

[3. Descripción general del método](#)

[3.1 DAB IHC](#)

[3.2 H&E](#)

[3.3 Ensayo de colonias 3D](#)

[3.4 PLA](#)

[4. Resolución de problemas](#)

[4.1 General](#)

[4.2 IHC DAB](#)

[4.3 PLA](#)

[5. Resultados](#)

[5.1 Resultado DAB IHC](#)

[5.2 Resultado H&E](#)

[5.3 Resultado del ensayo de colonias 3D](#)

[5.4 Resultado de PLA](#)

[6. Glosario](#)

[6.1 Glosario de DAB IHC](#)

[6.2 Glosario de H&E](#)

[6.3 Glosario del ensayo de colonias 3D](#)

[6.4 Glosario de PLA](#)

1. Introducción

Andy's Algorithm es un programa y tutorial diseñado todo en uno para análisis y optimización automatizado de imágenes de ensayos específicos, como inmunohistoquímica (IHC), tinción H&E, “Proximity Ligation Assays” (PLA) y ensayos de colonias 3D. Para que el estudio por grupos sea simple y adaptable a todos los laboratorios, este documento contiene un tutorial paso a paso de los procesos de optimización y análisis. Inicialmente, se solicita a los usuarios una optimización del programa utilizando imágenes representativas de cada experimento para determinar los parámetros que se aplicarán posteriormente en el análisis. Al finalizar el proceso de optimización, los parámetros calculados se aplican a las imágenes experimentales para su análisis.

Andy's algorithm acepta cualquier formato de imagen que FIJI pueda abrir y permite a los usuarios analizar imágenes específicas al brindar la opción de ingresar un nombre personalizado en el momento de seleccionar el formato de imagen. Es preferible que los nombres de las imágenes contengan el formato del archivo como una extensión del nombre. Si la extensión del archivo no está disponible en el nombre, los usuarios pueden seleccionar sus imágenes ingresando un nombre común. Por diseño, el algoritmo solo analiza imágenes individuales y no Z-stacks.

Los resultados se proporcionan en una hoja de cálculo con el resumen en la misma carpeta que las imágenes analizadas.

2. Instalación

Para descargar, instalar y ejecutar Andy's Algorithm, siga los siguientes pasos:

1. Descargue e instale FIJI o actualice FIJI (versión 1.51ko posterior [\[https://fiji.sc\]](https://fiji.sc))
2. Descargue Andy's Algorithm (por ejemplo, DAB_IHC_v2.40.ijm, PLA_v2.40.ijm, HandE_v2.40.ijm y 3D_colony_v2.40.ijm) de

<https://github.com/andlaw1841/Andy-s-Algorithm> (Proporcionado en el archivo del manuscrito relacionado y se cargará después de la publicación))

3. Vaya a Complementos > Macros > Instalar el Algoritmo de elección en la barra de menú de FIJI
4. Seleccione la preferencia del Algoritmo de Andy (por ejemplo, DAB_IHC_v2.40.ijm) para instalar el algoritmo
5. Vaya a Complementos > Macros. Una opción para seleccionar el algoritmo ahora estará en el menú desplegable.

El algoritmo se instalará temporalmente en la barra de herramientas de FIJI y se cerrará cuando se salga de FIJI. Simplemente reinstale el algoritmo cuando abra FIJI nuevamente.

3. Descripción general del método

Los pasos involucrados en el algoritmo de Andy varían según la canalización utilizada para analizar los ensayos. Todas las canalizaciones, excepto la canalización PLA, siguen una secuencia de pasos comunes de selección de umbral, identificación y medición de regiones totales y positivas dentro de una imagen. Los usuarios tienen las opciones para aplicar un desenfoque gaussiano para suavizar los bordes de la selección antes de aplicar un umbral. El proceso de creación de umbrales se puede realizar manualmente, donde el usuario emplea un valor establecido para el umbral, o automáticamente, donde se aplica un método de umbral y el valor de umbral para cada imagen se calcula mediante el método elegido. Al establecer el umbral para identificar la región de interés (ROI), la imagen se convierte en una imagen de máscara en la que se pueden emplear procesos binarios como cuenca hidrográfica (segmentación), relleno de agujeros y exclusión de bordes para modificar las selecciones. Luego, las selecciones se pueden excluir en función del tamaño y la circularidad utilizando la función de análisis de partículas. La selección final se puede

superponer sobre la imagen sin procesar para permitir que el usuario examine visualmente la precisión de las selecciones.

3.1 DAB IHC

El proceso DAB IHC separa las regiones azul (hematoxilina) de las marrones (DAB+) para determinar el porcentaje de DAB+ en relación con la región total identificada. La canalización mide el recuento y el área tanto de la selección total (hematoxilina y DAB+) como de la selección positiva (solo DAB+) y la intensidad de la selección positiva. Las imágenes se analizan con la selección total primero y posteriormente la selección positiva.

Se dispone de un método de selección básico o mejorado tanto para la selección total como para la positiva. En el método básico, la selección total se determina convirtiendo la imagen sin procesar en una imagen en escala de grises de 8 bits antes de identificar las ROI a través del umbral y procesando a través de la secuencia normal de pasos. Para la selección positiva, se aplica una deconvolución de color bajo el vector H&E DAB para aislar las regiones DAB+ antes de convertirla en una imagen de grescale de 8 bits y siguiendo los mismos pasos que la selección total. En el método mejorado, se aplica un filtro daltónico de deuteranope y tritanope antes de que se use un filtro de deconvolución de color con un vector Feulgen Light Green y un vector H&E DAB en la selección total y positiva, respectivamente. La aplicación de estos filtros diluye las diferencias de color entre las regiones de hematoxilina y DAB+ y permite una selección más precisa de los núcleos, el citoplasma o el tejido, al tiempo que reduce el fondo en la selección total. En la selección positiva, el filtro tritanope mejora el contraste de las regiones DAB+ de la hematoxilina, lo que permite un mejor aislamiento de las regiones DAB+ cuando se utiliza la deconvolución de color H&E DAB. El método mejorado se recomienda para imágenes con una tinción deficiente, ya sea debido a una tinción DAB excesivamente diluida o concentrada y/o una contratinción con hematoxilina. Una tinción IHC deficiente puede dar lugar a contornos nucleares definidos de forma inadecuada, lo que puede provocar una segmentación imprecisa de los núcleos.

3.2 H&E

El conducto de H&E separa las áreas azul/púrpura (hematoxilina) de las áreas roja/rosada (eosina). Usando los mismos principios que el DAB IHC, la canalización H&E sigue los mismos pasos para medir el conteo y el área tanto de la selección total (eosina y hematoxilina) como de la selección positiva (hematoxilina). Las imágenes se analizan con la selección total primero seguida de la selección positiva.

Se dispone de un método de selección básico y mejorado tanto para la selección total como para la positiva. El método básico convierte la imagen sin procesar en una imagen en escala de grises de 8 bits para la selección total y se usa una desconvolución de color bajo un vector H&E para el aislamiento de la selección positiva de la hematoxilina. Similar al DAB IHC, el método mejorado se usa para permitir una segmentación y selección más precisas de ROI para imágenes con poca tinción y discrepancia de color entre la hematoxilina y la eosina. Se aplica un filtro daltónico deuteranope y una desconvolución de color con vector FastRed/FastBlue/DAB para la selección total para mitigar la discrepancia de color y un filtro tritanope con una desconvolución de color con vector H&E DAB para selección positiva para mejorar el contraste, respectivamente.

3.3 Ensayo de colonias 3D

El flujo de trabajo de la canalización del Ensayo de colonias 3D consta de los pasos generales involucrados en las canalizaciones IHC DAB y H&E para seleccionar las ROI. Esta canalización mide el recuento, el área promedio y la circularidad promedio de las colonias para determinar su crecimiento, proliferación e invasión dentro de una matriz 3D.

Para permitir una selección precisa de colonias, las imágenes sin procesar primero se procesan con una sustracción de fondo con el algoritmo de bola rodante o se normaliza el contraste local para eliminar cualquier iluminación desigual dentro de la imagen. Luego, los ROI se suavizan con un desenfoque gaussiano, se convierten en

una imagen en escala de grises de 8 bits y se procesan con los pasos de análisis generales.

3.4 PLA

El oleoducto PLA se compone de un método de análisis diferente en comparación con los otros tres oleoductos. El análisis de imágenes se realiza en conjuntos de imágenes compuestas por núcleos, focos y citoplasma (opcional), adquiridas bajo un canal diferente. Para que el algoritmo identifique la imagen correcta para el análisis, primero se requiere que el usuario ingrese un nombre único para cada canal. La imagen del núcleo y el citoplasma se procesa de la misma manera en la que se utiliza un paso de realce-contraste para realzar artificialmente cualquier fluorescencia tenue antes de aplicar un desenfoque gaussiano para suavizar las ROI, reducir el ruido, establecer un umbral para las ROI y, finalmente, emplear un análisis de partículas con un Exclusión de tamaño y circularidad. La imagen de los focos se procesa inicialmente con un desenfoque gaussiano para eliminar cualquier falso positivo múltiple que pueda ocurrir debido a la dispersión desigual de píxeles brillantes dentro de los focos individuales. Luego, los focos se seleccionan utilizando la función Find Maxima en función de un valor de tolerancia de ruido definido por el usuario. Las selecciones se convierten en una imagen de máscara que luego se cuenta mediante el análisis de partículas. Los focos dentro de un dominio nuclear o citoplasmático se identifican utilizando la imagen de máscara de focos y estableciendo un ROI nuclear y/o citoplasmático para determinar la densidad integrada sin procesar dentro de la región.

4. Resolución de problemas

4.1 General

Diferencia entre el umbral automático y el umbral manual El umbral

Automático selecciona un algoritmo para aplicar a una imagen que utiliza un valor de umbral diferente en función de cada imagen. Un umbral manual es un valor

de umbral establecido que está determinado por el usuario que aplicará ese único valor de umbral en todas las imágenes. Para obtener más detalles sobre el umbral automático, consulte https://imagej.net/Auto_Threshold

Aplicación de la exclusión de tamaño y circularidad en el análisis de partículas

Para determinar los valores apropiados para la exclusión de tamaño y circularidad, se recomienda a los usuarios utilizar sus propias imágenes representativas para ajustar el parámetros que mejor se adapten a sus imágenes. Si la exclusión es demasiado estricta o indulgente, vuelva a intentar la exclusión de tamaño seleccionando 'no' cuando se le solicite con el cuadro de diálogo "¿Está satisfecho con la selección?" para probar diferentes valores. Se encuentra disponible una guía de exclusión de tamaño inferior y superior ajustada para tejidos epiteliales.

Magnificación	Tamaño mínimo de exclusión (tamaño de píxel)	Tamaño máximo de exclusión (tamaño de píxel)
10x	40	infinito
20x	100	infinito
40x	150	infinito

Las imágenes no se abren

Al seleccionar el formato de archivo, asegúrese de que el nombre de archivo de la imagen contenga la extensión del archivo al final, por ejemplo, si selecciona "tif" para el formato de archivo, entonces el nombre de la imagen requiere que la extensión coincida, como Image01.tif. Alternativamente, las imágenes también se pueden identificar ingresando palabras/letras/números (con distinción entre mayúsculas y minúsculas) que es común en el nombre de archivo de todas las imágenes dentro de una carpeta determinada al elegir "personalizado" al seleccionar el formato de imagen. En Windows, la extensión del archivo se puede mostrar en los nombres de archivo siguiendo los

<https://support.microsoft.com/en-au/help/865219/how-to-show-u-hide-file-name-extensions-pasosin-windows-explorer>

No hay valores en el cuadro de diálogo

Cuando se solicita al usuario que ingrese un valor en el cuadro de diálogo y se elimina un valor dentro del cuadro de diálogo y no se ingresa ningún valor, se mostrará un error con el siguiente mensaje.

Valor numérico esperado en la función ejecutar ()

Título del cuadro de diálogo: "[Título del diálogo donde se eliminó el valor]"

Clave: "[Sección donde se eliminó el valor]"

Valor o nombre de variable: "[Un nombre de variable]"

Esto El error solo ocurrirá si el usuario elimina un valor y lo deja en blanco antes de continuar con el siguiente paso. Si ocurre el error, el usuario tendrá que cerrar todo lo que está abierto dentro de FIJI y reiniciar el algoritmo. Para evitar este error, asegúrese de que ningún parámetro esté vacío o se deje en blanco a lo largo del algoritmo.

4.2 IHC DAB

Segmentación deficiente para hematoxilina o núcleos DAB+

Recomendamos que los usuarios empleen los algoritmos de Andy en experimentos en los que la fijación, la tinción, la configuración de adquisición de imágenes, la exposición, el contraste y el brillo sean consistentes en una cohorte de muestras para permitir un análisis por lotes preciso y reproducible. La inmunohistoquímica se debe realizar en una cohorte de muestras usando el mismo lote de anticuerpos, tiempos y protocolo en cualquier experimento dado. Si existen grandes variaciones en la fijación, la tinción, la configuración de adquisición de imágenes, la exposición, el contraste y el brillo, los parámetros promedio no funcionarán de manera ideal en las imágenes atípicas.

Las imágenes con tinción DAB excesivamente diluida o concentrada y/o contratinción con hematoxilina pueden dar lugar a contornos nucleares poco definidos, lo que dificulta la segmentación de los núcleos. La condición de tinción debe optimizarse para permitir núcleos bien definidos que puedan segmentarse y aislarse fácilmente. Sin embargo, si aún persisten las dificultades en la segmentación de núcleos, se recomienda utilizar el método mejorado para la selección total y positiva, no aplicar un desenfoque gaussiano y realizar un umbral manual para afinar la segmentación nuclear. Es importante que los usuarios reduzcan el valor de umbral para que minimice la selección de fondo, lo que da como resultado una mayor segmentación nuclear. Si la segmentación de núcleos sigue siendo inexacta, utilice "Área" al interpretar los resultados.

4.3 PLA

Asignación de cada nombre a un canal

Al asignar un nombre único a un canal específico, asegúrese de que el nombre solo aparezca en el nombre de archivo de esa serie de imágenes (se distingue entre mayúsculas y minúsculas).

Por ejemplo:

- Foci_01_ch00.tif
- Nucleus_01_ch01.tif
- Foci_02_ch00.tif
- Nucleus_02_ch01.tif

El nombre exclusivo que se puede asignar a las imágenes de focos puede ser "ch00" o "Foci", mientras que las imágenes de núcleos pueden ser "ch01" o "Nucleus".

Las imágenes no se abren

Asegúrese de que el nombre único coincida con el canal específico (se distingue entre mayúsculas y minúsculas) y que sean imágenes individuales y no pilas Z. Los conjuntos de imágenes deben agruparse en orden secuencial, ya que el

algoritmo lee conjuntos de dos o tres imágenes a la vez, dependiendo de si hay una imagen citoplasmática o no.

Por ejemplo:

- Cytoplasm_01_ch02.tif
- Foci_01_ch00.tif
- Nucleus_01_ch01.tif
- Cytoplasm_02_ch02.tif
- Foci_02_ch00.tif
- Nucleus_02_ch01.tif

El algoritmo analizará las primeras tres imágenes como un conjunto antes de analizar las siguientes tres. Si los conjuntos contienen imágenes adicionales o faltantes, aparecerá un error antes de que comience el análisis para notificar al usuario que elimine o reemplace el conjunto de imágenes defectuoso.

Las imágenes no se abren (PC)

Cuando se ejecuta el algoritmo PLA en Windows, los archivos ocultos (como desktop.ini) en la carpeta de imágenes pueden hacer que se muestre un mensaje de error con "No hay imágenes abiertas" o "Índice (X) fuera de rango en la línea 4278". Para corregir esto, en la carpeta de imágenes, haga clic en la pestaña Ver y seleccione Configuración avanzada. Marque "Mostrar archivos, carpetas o unidades ocultos" y desmarque las casillas "Ocultar archivos protegidos del sistema operativo" y haga clic en Aceptar. Esto revelará los archivos ocultos que se encuentran dentro de la carpeta de imágenes y puede mover temporalmente esos archivos ocultos a otra carpeta antes de continuar con el análisis de imágenes PLA. Una vez que se complete el análisis, puede volver a mover los archivos ocultos a la carpeta y volver a la configuración avanzada en la pestaña Ver y desmarque "Mostrar archivos, carpetas o unidades ocultos" y marque las casillas "Ocultar archivos protegidos del sistema operativo".

5. Resultados

5.1 Resultado DAB IHC

Nombre de la imagen	Recuento total	Recuento positivo	Recuento porcentual	Área total	Área positiva	Área porcentual	Intensidad media
---------------------	----------------	-------------------	---------------------	------------	---------------	-----------------	------------------

5.2 Resultado H&E

Nombre de la imagen	Recuento total	Recuento positivo	Recuento porcentual	Área total	Área positiva	Área porcentual
---------------------	----------------	-------------------	---------------------	------------	---------------	-----------------

5.3 Resultado del ensayo de colonias 3D

Nombre de la imagen	Recuentos de colonias	Área total de todas las colonias	Área Promedio por colonia	Circularidad promedio por colonia	Proporción media por colonia
---------------------	-----------------------	----------------------------------	---------------------------	-----------------------------------	------------------------------

5.4 Resultado de PLA

Nombre de la imagen	Recuento	Área total de núcleos	Promedio de núcleos	Señal total	Señal nuclear	Señal no nuclear	Porcentaje de señal nuclear	promedio por núcleo
Área citoplasmática	Área promedio citoplasmática	Señal citoplasmática	señal no citoplasmática	Porcentaje De la señal Citoplasmática	Señal promedio por citoplasma	Señal intracelular	Señal extracelular	

6. Glosario

6.1 Glosario de DAB IHC

Term	Definition
Intensidad	Promedio El valor promedio de gris de todos los ROI positivos, que varía de 0 a 255, donde 0 es el más oscuro (negro) y 255 es el más brillante (blanco).

Porcentaje de área	Porcentaje del área positiva de DAB en relación con el área total medida (Área de selección positiva dividida por el área de selección total multiplicada por 100)
Porcentaje de conteo	Porcentaje del conteo de DAB positivo en relación con el conteo total medido (Área de selección positiva dividida por el área de selección total multiplicada por 100)
Área positiva	El área de la selección positiva DAB (ROI positivo), que se puede visualizar en la imagen de "máscara de selección positiva".
Recuento positivo	El recuento de la selección positiva DAB (ROI positivo), que se puede identificar en el archivo zip "ROI positivo"
Máscara positiva Imagen	Binaria en blanco y negro donde el recuento positivo y el área se miden a partir de
Superposición positiva Imagen	en pseudocolor con el ROI positivo superpuesto sobre la imagen sin
ROI	Región de interés de
Área total	El área de la selección total (total ROI), que se puede visualizar en la imagen de "máscara de selección total"
Total Count	El recuento de la selección total (total ROI), que se puede identificar en el archivo zip "total ROI"
Máscara total Imagen	binaria en blanco y negro donde el recuento total y el área se miden a partir
superpuesta total Imagen	en pseudocolor con el ROI total superpuesto sobre la imagen sin

6.2 Glosario de H&E

Term	Definition
Porcentaje de área	Porcentaje de hematoxilina positiva área relativa al área total medida (Área de selección positiva dividida por el área de selección total multiplicada por 100)
Porcentaje de recuento	Porcentaje de recuento positivo de hematoxilina en relación al recuento total medido (Área de selección positiva dividida por el área de selección total multiplicada por 100)
Positivo Área	El área de la selección positiva de hematoxilina (ROI positivo), que se puede visualizar en la imagen de "máscara de selección positiva"

Recuento positivo	El recuento de la selección positiva de hematoxilina (ROI positivo), que se puede identificar en el zip "ROI positivo" archivo
máscara positiva Imagen	binaria en blanco y negro donde el conteo positivo y el área se miden a partir de
superposición positiva Imagen	de pseudo-color con el RO positivo Superpuesto en la parte superior de la imagen sin procesar
ROI	Región de interés
Área total	El área de la selección total (ROI total), que se puede visualizar en la imagen de "máscara de selección total"
Recuento total	El recuento de la selección total (ROI total), que se puede identificar en el archivo zip "total ROI"
máscara total Imagen	binaria en blanco y negro donde el recuento total y el área se miden a partir de
superposición total Imagen	de pseudocolor con el ROI total superpuesto sobre la imagen sin procesar

6.3 Glosario del ensayo de colonias 3D

Term	Definition
Área promedio por colonia	El área promedio de cada colonia (área total de todas las colonias dividida por los recuentos de colonias)
Relación de aspecto promedio por colonia	La relación de aspecto promedio de cada colonia basada en el eje mayor dividido por el eje menor
Circularidad promedio por colonia	El promedio circularidad de cada colonia que va de 0 a 1, donde 1 es un círculo perfecto y 0 es un polígono alargado
Máscara de celda	Imagen binaria en blanco y negro donde el recuento total de colonias y el área se miden a partir de
superposición de celdas	Imagen de pseudocolor w Con el ROI total superpuesto en la parte superior de la imagen sin procesar
Recuentos de colonias	El recuento del número total de colonias, que se puede identificar en el archivo zip de "ROI de celdas"
ROI	Región de interés

Área total de todas las colonias	El área de la selección total, medida basado en la imagen de "máscaras celulares"
----------------------------------	---

6.4 Glosario de PLA

Term	Definition
Área citoplasmática	promedio El área promedio de cada citoplasma según el número de núcleos identificados (área de citoplasma dividida por el recuento de núcleos)
núcleos Área	promedio de cada núcleo (área total de núcleos dividida por el recuento de núcleos))
Promedio de señal por citoplasma	Promedio de focos en cada región citoplasmática (señal citoplasmática dividida por el recuento de núcleos)
Promedio de señal por núcleo	Promedio de focos en cada núcleo (señal nuclear dividida por el recuento de núcleos)
Área de citoplasma	El área total de toda la región citoplasmática medida desde el "citoplasmamáscara"
Máscara de citoplasma	Imagen binaria en blanco y negro donde el área citoplasmática total se mide a partir de
Superposición de citoplasma	Imagen en pseudocolor con la superposición de ROI citoplasmática d encima de la imagen de citoplasma sin procesar
Señal citoplasmática	Número total de focos identificados dentro de las regiones citoplasmáticas
Señal extracelular	Número total de focos identificados fuera de la región nuclear y citoplasmática (señal total menos señal intracelular)
Superposición	de focos Imagen de pseudocolor con la ROI de focos superpuesta encima de la imagen de focos sin procesar
Señal intracelular	Número total de focos identificados dentro de las regiones nuclear o citoplasmática (señal nuclear más señal citoplasmática)
Señal no citoplasmática	Número total de focos identificados fuera de las regiones citoplasmáticas
Señal no nuclear	Número total de focos identificados fuera de todos los núcleos
Señal nuclear	Número total de focos identificados dentro de todos los núcleos

Máscara	Imagen binaria en blanco y negro donde el área total de los núcleos y el conteo se miden a partir de
Superposición de núcleos	Imagen en pseudocolor con el ROI nuclear superpuesto sobre la imagen del núcleo sin procesar
Recuento	Número total de núcleos identificados en la imagen basados en el archivo zip "núcleos ROI"
Porcentaje t Señal citoplasmática	Porcentaje del total de focos que son citoplasmáticos (señal citoplasmática dividida por la señal total multiplicada por 100)
Porcentaje de señal nuclear	Porcentaje del total de focos que son nucleares (señal nuclear dividida por la señal total multiplicada por 100)
ROI	Región de interés
Total de área de núcleos	Total área de todos los núcleos medida a partir de la imagen "máscara de núcleos"
Señal	total Número total de focos identificados, que se pueden identificar en el archivo zip "todos los focos ROI"