

# **Avances en diagnóstico citogenético automático**

J.M. García Sagredo

Servicio de Genética Médica, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Dept. de Especialidades Médicas, F. de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares.

## **Introducción**

La Medicina no es un coto científico cerrado y por lo tanto no es ajena a los avances de la informática y tecnologías afines. Actualmente la informática se utiliza masivamente en Medicina digitalizando señales que son procesadas en un tiempo cada vez mas rápido, de forma que se pueden obtener interpretaciones rápidas (en tiempo real) de técnicas al uso. Queda, no obstante, un gran futuro abierto a las ayudas diagnósticas y a la interpretación y manipulación del diagnóstico por imagen, proceso muy complejo y en el que puede encuadrarse la citogenética.

Por todo ello, desde hace años, uno de los grandes retos de la bioingeniería médica es el procesamiento digitalizado de imágenes para así poder automatizar todos aquellos diagnósticos que se realizan a través de la imagen:

Radiología, TAC, RMN, etc.

Citogenética

Citología

Microbiología, etc.

Por el momento, el diagnóstico a través de la imagen requiere una serie de procesos tan complejos como para que sea muy difícil su completa automatización (a menos que se progrese rápidamente en nuevas arquitecturas de ordenadores y sistemas de programación como los sistemas expertos o redes neuronales aplicados a este área), por ello es más realista hablar de análisis interactivo.

Ante esto, si se piensa tan sólo en pequeñas tareas que sean sencillas pero suficientemente consumidoras de tiempo por su repetición constante, la rentabilidad de su automatización es muy alta. Así, se pueden automatizar sin demasiados esfuerzos o complejidades tecnológicas determinados pasos rutinarios que faciliten la labor en el proceso del análisis de imagen y que, por consiguiente, aumenten la rapidez del laboratorio.

## **Necesidad de automatización**

### **Automatización en el diagnóstico citogenético:**

La necesidad de automatizar el laboratorio de citogenética es perentoria, ya que aunque la citogenética clínica es una práctica de laboratorio joven (se inicia en 1957-58), el espacio de los 30 años transcurridos desde su inicio ha sido suficiente como para que haya aumentado la demanda de forma considerable, no conociéndose un hospital de rango superior al local sin un Servicio de Genética con un laboratorio de citogenética. Si a ello unimos el hecho de que el laboratorio de citogenética consume mucho tiempo por muestra y emplea gran cantidad de personal procesando cultivos y analizando al microscopio, la rentabilidad de la posible automatización en cualquiera de sus etapas está fuera de toda discusión.

Se puede decir que el final de la década de los 80 ha marcado el inicio de la automatización en los laboratorios de citogenética y es de esperar que la década de los 90 sea la de la implantación y consolidación rutinaria de la citogenética automatizada.

Evidentemente el diagnóstico a través de la imagen requiere una serie de procesos tan sumamente complejos como para que su automatización requiera de sistemas considerados de alta tecnología, lo que influirá en el coste final de los sistemas. Por ello, una alternativa válida de comienzo puede ser introducir la automatización exclusivamente en tareas sencillas. Así, se pueden automatizar sin demasiados esfuerzos tecnológicos determinados pasos rutinarios que

faciliten la labor en el proceso de la imagen y, en definitiva, en el resultado final del análisis citogenético.

De hecho, uno de los inicios en el área citogenética fue la construcción del cariotipo (cuyo aspecto más sencillo serían unas “tijeras electrónicas”) y que hasta hoy sólo es un proceso semiautomatizado dadas las variantes de aberraciones cromosómicas. Pero, por otro lado, la tecnología de análisis de imagen ha ofrecido la posibilidad, a través del reconocimiento de formas, de automatizar la búsqueda de metafases en las extensiones microscópicas.

## **Historia**

Se pueden considerar cuatro fases en el desarrollo de la citogenética automatizada:

### **Prehistoria**

Es la fase de iniciación (final de los 60 e inicio de los 70) en la que se comienza a diseñar y a aplicar programas de procesamiento de imágenes al análisis de los cromosomas. En esta fase se utilizaron algunos prototipos que eran muy lentos y voluminosos; prototipos que hoy quedan como piezas de museo (Ledley, 1964).

Lundsteen (1989) fija el inicio de la automatización en 1964 (Castleman y col, 1968), con el resultado de la primera máquina funcionando en 1976 –proyecto JET– (Castleman y col. 1976) y el primer sistema disponible comercialmente en 1983, descrito y presentado por Lundsteen y col. en 1982.

### **Primeros sistemas**

La segunda fase es la de consolidación en la que, tras constatarse las posibilidades y la eficiencia de la automatización, se construyen sistemas que pueden ser eficaces tanto en la búsqueda de metafases como en el análisis de cariotipo (Philip y col. 1985).

### **Sistemas semiautomáticos**

La tercera fase, en la que estamos actualmente, se caracteriza porque existen varios sistemas comercializados cuya utilidad es indiscutible. Esta es una

etapa no cerrada ya que la introducción de mejoras (en rapidez, definición y eficacia) es constante.

### **Desarrollo de tareas particulares**

Finalmente se están desarrollando, como veremos mas abajo, sistemas de análisis para tareas específicas cuya rentabilidad es mas alta y están mas cerca de una total automatización

## **Arquitecturas actuales de los sistemas automáticos**

### **Sistemas completos**

Actualmente se dispone en el mercado de varios sistemas semiautomáticos con diversas configuraciones (Lundsteen y col. 1989) cuya aplicación, eficacia y eficiencia dependerá de las características del material que se estudia citogenéticamente y la estructura del departamento donde se implante. Como ayuda a esta elección nosotros (García Sagredo, 1989) hemos elaborado unos indicadores de evaluación de las unidades de citogenética con miras al equipamiento necesario para su automatización.

Básicamente, un sistema completo automatizado para análisis de cromosomas consta de las siguientes partes:

- 1) Microscopio óptico automático con capacidad para alojar mas de un portaobjetos (la automatización se refiere a la motorización de los movimientos de la platina, a la motorización del enfoque y al control de la intensidad lumínica, siendo deseables la existencia y motorización de un zoom y la motorización del revólver portaobjetivos)
- 2) Cámara de vídeo
- 3) Unidad de procesamiento de imagen
- 4) Controlador de las funciones automatizadas del microscopio
- 5) Unidad central de proceso con la que, a través de programas, se puede manejar todo el sistema (puede ser un ordenador estandar)
- 6) Monitor/es de vídeo, para la visualización de las imágenes y el control de los programas

- 7) Herramientas de interacción ergonómicas (ratón, tableta digitalizadora, lápiz óptico, etc.)
- 8) Copiadora de imagen con calidad fotográfica para la obtención de las imágenes finales (la mejor calidad se obtiene en papel con emulsión fotográfica).
- 9) Opcionalmente: Unidades de almacenamiento de gran capacidad (cinta de vídeo, disco óptico, etc.).

Un sistema con los componentes descritos debe ser capaz de buscar automáticamente metafases en un portaobjetos para, posteriormente, presentarlas por orden de calidad de forma que puedan ser analizadas interactivamente. Las diferentes configuraciones y tecnologías utilizadas van a influir de manera notoria en la rapidez para “leer” un portaobjetos. Así, existen sistemas capaces de rastrear un portaobjetos completo en 7-10 minutos, mientras que otros tardarán alrededor de 1 hora (García Sagredo 1990). Estos últimos utilizan las platinas con capacidad para 8 o 16 portaobjetos permitiendo que puedan ser rastreados automáticamente durante la noche. Una descripción mas detallada de los tiempos empleados por diferentes sistemas se puede encontrar en Korthof y Carothers (1991).

La búsqueda automática se efectúa leyendo el portaobjetos a bajos aumentos ( $\times 20$ ) utilizando un estativo de microscopio motorizado y controlado por un ordenador. Se emplean técnicas de análisis de imagen para detectar metafases definidas como regiones de un tamaño y textura determinados, cuya posición es grabada para su posterior utilización. Por supuesto, existen diferentes parámetros programables por el usuario, y auto-entrenables en algunos sistemas, para los diferentes tejidos a analizar (sangre, médula ósea, amniocitos, etc.), también los programas serán diferentes según el tipo de tinción de los cromosomas (homogéneo, bandas G, SCE, etc). Además la mayoría de los buscadores de metafases son capaces de ordenar las metafases de acuerdo a su calidad.

Tras la búsqueda de las metafases, la siguiente fase en la utilización de estos sistemas es el análisis del cariotipo. Etapa que es muy parecida en todos los sistemas en cuanto a tiempo y procesos utilizados (Korthof y Carothers, 1991). Este análisis se realiza mediante los siguientes pasos:

- digitalización de la imagen
- normalización de la imagen y conteo de los cromosomas

- extracción e individualización de los cromosomas
- medición de los cromosomas (área, longitud, relación brazos cortos/largos, posición centromérica, lectura de bandas G, etc.)
- clasificación de los cromosomas comparándolos con un banco de datos
- ordenamiento/construcción del cariotipo
- realización de copias fotográficas

Las principales diferencias entre sistemas vendrán dadas por la facilidad de uso de los programas, la flexibilidad en la construcción del cariotipo, y los monitores y sistemas de interacción utilizados

El cariotipo se realiza a grandes aumentos (x100), separándose los cromosomas automáticamente aunque los que estén cruzados o se toquen deberán ser individualizados con la ayuda del operador, bien cortando, bien señalando los ejes cromosómicos. Los cromosomas se clasifican en base a cifras y mediciones extraídas de las imágenes de los cromosomas.

La clasificación automática de los cromosomas con un error de hasta un 10% (Lundsten y col 1986) depende fundamentalmente de la técnica utilizada y sobre todo de la base de datos usada como clasificador.

### **Sistemas de cariotipaje**

Son sistemas que tan solo son capaces de ordenar el cariotipo de una imagen microscópica seleccionada manualmente, para ello el operador una vez decida qué metafase quiere cariotipar, ajustará la imagen en la cámara de vídeo y la digitalizará, comenzando un proceso igual al descrito anteriormente.

### **Sistemas particulares**

A) Sistemas para analizar las aberraciones de cromosomas en genotoxicología y sistemas para la dosimetría biológica:

Tanto el análisis de aberraciones cromosómicas como índice de la capacidad mutagénica de un agente ambiental, como la dosimetría biológica para la determinación de radiación ionizante recibida por un individuo, coinciden casi con la introducción rutinaria de la citogenética (Conen y col. 1961; Buckton y col. 1967). Dado que su utilización de forma estandarizada, sobre todo de la dosimetría biológica, se impone desde los inicios de la década de los 70 (Dolp-

hin, 1973), es obvia la necesidad de algún tipo de automatización ya que tras los cultivos celulares y su procesamiento para obtener las preparaciones microscópicas, es necesario localizar y, después, analizar al microscopio varios cientos, si no miles, de células con el fin de observar el número de aberraciones cromosómicas o cromosomas dicéntricos en el caso de radiaciones ionizantes. Pero no sólo ha de tenerse en cuenta que este tipo de técnica individualmente consume mucho tiempo. Piénsese en la necesidad no sólo de tiempo sino también de técnicos cuando pueda ser necesario realizar la dosimetría biológica para estudiar a un grupo amplio de población en el caso de accidentes. Agravándose aun más el problema si se tiene en cuenta que para que los resultados de la dosimetría sean útiles habrán de realizarse en un espacio corto de tiempo.

La automatización es este campo concreto de la citogenética ha de ir encaminada, por lo tanto, no sólo a acortar los tiempos de análisis, sino a permitir realizar más estudios en relación al número de personal técnico. Por lo que teniendo en cuenta los procesos más arriba descritos, claramente la automatización tiene dos campos diferentes para la ayuda del análisis de aberraciones cromosómicas: uno es la búsqueda automática de metafases, otro sería el reconocimiento automático de la anomalía que queremos cuantificar.

Para la primera tarea cualquier sistema convencional que busque automáticamente las metafases nos ayudará reduciendo considerablemente el tiempo, no sólo de la búsqueda sino el empleado en cambiar cada vez de objetivo con el cansancio e incomodidad que ello supone.

La segunda tarea a automatizar supone un programa específico de análisis de imagen que sea capaz de reconocer un modelo o patrón de imagen determinado, actualmente limitado a los dicéntricos, y que dada la variabilidad biológica, es necesaria la mano de un operador que corrija los errores (falsos positivos y negativos).

De acuerdo con lo dicho más arriba, la aplicación de la citogenética automatizada convencional a la dosimetría biológica y la detección de mutagénesis cromosómica, se realiza automatizando la búsqueda de metafases de forma que el operador pueda analizar gran número de metafases sin realizar tareas complicadas. Dado que son diferentes los sistemas automáticos, los cromosomas se analizan por el operador bien a través del microscopio o bien en una pantalla de vídeo, dependiendo del tipo de tecnología utilizada (García Sagredo 1989, 1990).

Si se utiliza un sistema de barrido rápido, 8-10 minutos por cada portaobjetos, dadas las características y calidad del sistema de captura de imagen, generalmente tipo “scanner”, tras la recolocación automática de las metafases, el análisis se hace a través del microscopio. Las metafases se recolocan automáticamente, y de forma ordenada por calidad, simplemente presionando un botón de un ratón; ello permite que una persona, observando a través del microscopio, ordene con una mano la presentación de metafases sucesivas y pueda contar la presencia de cromosomas dicéntricos o células con aberraciones presionando otro botón del ratón. Si bien este sistema no “libera” personas del microscopio, sí hace que el trabajo sea mucho más rápido y confortable (Finnon y col. 1986; Lloyd, 1989).

Si se utiliza un sistema de barrido lento, 45-60 minutos por portaobjetos, la búsqueda automática de metafases se realizará durante la noche. A la mañana siguiente las metafases se recolocarán automáticamente, también ordenadas de acuerdo a su calidad, pero en este caso dadas las características del sistema de adquisición de imágenes –cámara de vídeo–, las metafases se pueden analizar fácilmente en un monitor, marcando el o los cromosomas anormales con un dispositivo señalizador (ratón o lápiz óptico). En este caso se puede utilizar también la capacidad de contaje automático de cromosomas. Este tipo de sistema suele ser más eficaz para el análisis de todo tipo de aberraciones cromosómicas, ya que lo que se pierde en velocidad se gana en amplitud de anomalías definidas (García Sagredo, 1989).

B) Nuevos sistemas de automatización completa para la dosimetría biológica:

Actualmente, gracias a las mejoras introducidas en los algoritmos que se emplean en el reconocimiento de imágenes y a la disponibilidad de mejor tecnología de automatización microscópica, es posible reconocer automáticamente un cromosoma dicéntrico dentro de una metafase que previamente ha sido digitalizada de forma totalmente automatizada. Dado que se extrae y almacena la imagen del cromosoma dicéntrico, cuando el trabajo está finalizado, al operador se le presentan en la pantalla del monitor todos los posibles dicéntricos para su revisión y eliminación de los falsos positivos. Como a veces es necesaria la revisión de la metafase para poder tomar la decisión de si un cromosoma es o no dicéntrico, existe la posibilidad de recolocar inmediatamente la metafase para su análisis en la pantalla.

Con un sistema de estas características, casi completamente automatizado pero que precisa de una revisión final por parte del operador, se pueden eliminar por éste fácilmente y en un corto espacio de tiempo los falsos positivos, pero no hay que olvidar que todos los falsos negativos son irrecuperables. No obstante según los estudios realizados por uno de los sistemas existentes en la actualidad (Lörch 1989, 1990) los resultados son bastante aceptables.

### C) Sistemas para la detección de X-frágil

Al igual que para los cromosomas dicéntricos, se han desarrollado algoritmos para detectar el cromosoma X-frágil basados en el análisis de metafases que habían sido previamente etiquetadas con una sonda centromérica para el cromosoma X, de esta forma en todas las metafases los cromosomas X son fácilmente identificables para el análisis de su patrón morfológico. Los resultados actuales son prometedores (Piper y col. 1990) aunque no existe un sistema que esté comercialmente disponible.

## **Perspectivas futuras de la automatización en citogenética**

### **Nueva tecnología en sistemas:**

La posibilidad de usar sistemas con capacidad de digitalización automática en alta resolución, posibilitaría la construcción de sistemas de "screening" totalmente automatizados, como el de dicéntricos, X-frágil e intercambio de cromátidas hermanas. Esto implica recolocación automática, enfoque a alta resolución (100x) y captura de imagen de metafases que previamente se han encontrado (Stark, 89).

### **Nueva tecnología en programación:**

Con los conocimientos actuales y la tecnología disponible, parece difícil llegar a la total automatización sin interacciones del usuario. No obstante, aún es posible llegar a un grado más cercano a la completa automatización mejorando los algoritmos en los programas de reconocimiento de modelos, o empleando nuevos métodos más rápidos y eficaces, como las redes neuronales o los sistemas expertos.

Más simplemente, la segmentación automática de cromosomas es otro gran reto y una precondition necesaria para un conteo cromosómico correcto y para

un cariotipaje totalmente automatizado, así como la identificación de aberraciones en mutagénesis. En este momento hay varios métodos que van desde el simple uso de información sobre posición de los cromosomas para crear un algoritmo que los separe, hasta el que está basado en el aspecto de los contornos, infiriendo los principios y finales cromosómicos.

#### A) Cariotipo múltiple

La tecnología puede hacer cambiar los procesos de laboratorio y la forma de analizar, así, siendo más fácil admitir errores en un cariotipo múltiple dado que “la visión” es de conjunto y las aberraciones estructurales no suelen presentarse en mosaico (cariotipo secuencial de 10 o más metafases), la deseable automatización total podría estar cercana (Lundsteen, 1989).

#### B) Automatización del análisis de intercambio de cromátidas hermanas

El análisis de intercambio de cromátidas hermanas es cada vez más frecuente en el estudio de grupos de población sometidos a factores mutagénicos, la necesidad de automatización es igual a la de la detección de aberraciones cromosómicas en mutagénesis ambiental, con el agravante de que, en el mejor de los casos, sólo un tercio de las metafases existentes en una preparación microscópica están en la forma requerida para su estudio (2ª división mitótica). Hasta ahora sólo era posible utilizar la capacidad de búsqueda de metafases de los sistemas automáticos, pero incluso utilizando programas específicos para intercambio de cromátidas hermanas, los tiempos de análisis eran algo mayores a los manuales (García Sagredo 1989).

Actualmente, utilizando la capacidad de digitalización automática de los nuevos sistemas, es posible crear algoritmos que sean capaces de contar los puntos de intercambio en los brazos cromosómicos. Este proyecto experimental en el que estamos participando (García Sagredo y col 1992) promete resultados alentadores.

#### C) Hibridación in situ

Finalmente, están llegando a los laboratorios de citogenética nuevas técnicas que ya empiezan a ser rutinarias y por lo tanto son susceptibles de automatización. Entre ellas está la técnica de hibridación in situ (HIS). Esta técnica de HIS permite observar a través del microscopio los lugares donde hibridan sondas de ADN marcadas previamente con moléculas fluorescentes. Estas sondas

pueden ser más o menos grandes (desde cromosomas enteros hasta pequeños trozos de ADN en el límite inferior de la resolución visual).

Mediante esta técnica ya es posible observar pequeñas deleciones o translocaciones recíprocas que antes se escapaban con las técnicas habituales. Pero la gran ventaja es que, una vez comprobada la eficacia de la sonda en cromosomas en metafase, puede hacerse hibridar también en núcleos de células en interfase, lo que actualmente se llama la citogenética de interfase. De esta forma, en el caso de la existencia de translocaciones recíprocas nos permitiría observar en vez de dos puntos brillantes correspondientes a la pareja cromosómica, uno de tamaño normal y otros dos más pequeños que corresponderían al cromosoma implicado en la translocación. Si esta técnica la combinamos con al menos dos sondas distintas marcadas con dos fluorocromos de diferente color, se puede ampliar el espectro de observación.

Pues bien, no sólo no parece descabellado poder automatizar estas técnicas (Cremer y col., 1989) sino que su rentabilidad es obvia si se aplica en interfase ya que el análisis consistiría en contar puntos brillantes en un gran número de núcleos, núcleos que están en gran cantidad dentro de una preparación. El escollo para la automatización está en las limitaciones técnicas actuales precisando cámaras de vídeo muy sensibles que por el momento es una tecnología cara, pero una vez resuelto y pensando en un “simple” contaje de puntos brillantes, el futuro puede ser claramente halagüeño.

## REFERENCIAS

- Buckton K. E. Langlands A .O. Smith P.G. McLelland J. (1967) Chromosome aberrations following partial- and whole-body X-irradiation in man. Doseresponse relationships. En "Human Radiation Cytogenetics", Ed. por Evans H.J., Court Brown W.M. y McLean A.S., North Holland Publ., Amsterdam, pp 122.
- Castleman K. R. Welch A.J. (1968) Match recognition in chromosome band structure. Biomed. Sci. Instrumen. 4:256.
- Castleman K. R. Melnyk J. Frieden H. J. Persinger G. W. Wall R. J. (1976) Computer-assisted karyotyping. J. Repr. Med. 17:53-57.
- Cremer C. Haussmann M. Diaz E. Hetzel J. Aten J. A. Cremer T. (1989) Chromosome aberration detection with hybridized DNA probes: digital image analysis and slit scan flow cytometry. En "Automation of Cytogenetics", ed. por C. Lundsteen y J. Piper, Springer-Verlag, Berlin, pp. 123-132.
- Conen P. E., Lansky G. S. (1961). Chromosome damage during nitrogen mustard therapy. Br. Med. J.:1055-1057.
- Dolphin G. W. Lloyd D.C. Purrot R. J. (1973) Chromosome aberration analysis as a dosimetry technique in radiation protection. Health Physics 25:7-15.
- Finnon P. Lloyd D.C. (1986) Edwards A. A. An assesment of the metphase finding capability of the Cytoscan 110. Mutat. Res. 164:101-108.
- García Sagredo J. M. (1989) Proposal for evaluation of cytogenetic laboratories in order to plan the installation and determine the cost effectiveness of automated chromosome analysis systems. En "Automation of Cytogenetics", ed. por C. Lundsteen y J. Piper, Springer-Verlag, Berlin, pp. 81-91.
- García Sagredo J. M. (1989) Performance of a semiautomatic system for chromosome analysis in mutagenic studies: Application to analyze the effect of low-level 50 Hz electromagnetic fields on human chromosomes in vitro. Analyt.Cel.Pathol. 1:304.
- García Sagredo J. M. (1990) Performance of a semiautomatic system for chromosome analysis in scoring aberrations: Application to analyze the effect of low-level 50 Hz electromagnetic fields on human chromosomes in vitro. En "Advances in Analytical Cellular Pathology", ed. por G. Burger, M. Oberholzer y G.P. Voijis. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 65-66.

- García Sagredo J. M, Piper J, Ji L., Vaquero J. J. , Vázquez Y (1992). Fully automatic scoring of sister chromatid exchanges. Comunicación presentada en el 22 Meeting of European Environmental Mutagen Society, Berlin (Alemania), 1992.
- Korthof G. Carothers AD. (1991) Test of performance of four semi-automatic metaphase-finding and karyotyping systems. *Clin. Genet.* 40:441-451.
- Ledley R. S. (1964) High-speed automatic analysis of biomedical pictures. *Science* 146:216-223.
- Lloyd D. C. (1989) Automated aberration scoring: the requirements of an end-user. En "Automation of Cytogenetics", ed. por C. Lundsteen y J. Piper, Springer-Verlag, Berlin, pp. 9-17.
- Lörch T. Wittler C. Stephan G. Bille J. (1989) An automated chromosome aberration scoring system. En "Automation of Cytogenetics", ed. por C. Lundsteen y J. Piper, Springer-Verlag, Berlin, pp. 20-30.
- Lörch T. (1990) Automatic dicentric scoring: A PC-based implementation. Abstracts del XII European Workshop on Automated Cytogenetics, Segovia, pp.41.
- Lundsteen C. Gerdes T. Philip J. (1982) Semiautomated chromosome analysis. Comunicación presentada en el Symposium de la European Society of Human Genetics, Madrid.
- Lundsteen C. Gerdes T. Maahr J. (1986) *Cytometry* 7:1-7
- Lundsteen C. Martin A.O. (1989) On the selection of systems for automated cytogenetic analysis. *Am.J.Med.Genet.* 32:72-80.
- Lundsteen C. Gerdes T. Maahr J. (1989) Cytogenetic analysis by automatic múltiple cell karyotyping. En "Automation of Cytogenetics", ed. por C. Lundsteen y J. Piper, Springer-Verlag, Berlin, pp. 263-274.
- Philip J. Lundsteen C. (1985) Semiautomated chromosome analysis: a clinical test. *Clin.Genet.* 27:140-146.
- Piper J. Fantes J. Gosden J. Ji L. (1990) Automatic detection of fragile X chromosomes. En "Advances in Analytical Cellular Pathology", ed. por G. Burger, M. Oberholzer y G.P. Voijis. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 79-80.
- Stark M., Farrow S., McKie M., Rutovitz D. (1989). Automatic high bresolution digitisation of metaphase cells for aberration scoring and karyotyping. En "Automation of Cytogenetics", ed. por C. Lundsteen y J. Piper, Springer-Verlag, Berlin, pp. 31-43.