



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103827658 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201280046523. 9

G06K 9/00(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 07. 13

G06T 7/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/510, 614 2011. 07. 22 US

61/510, 710 2011. 07. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/046787 2012. 07. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/016039 EN 2013. 01. 31

(73) 专利权人 罗氏血液诊断股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M. 扎尼瑟 R. 扎尼瑟

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

G01N 15/14(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009269799 A1, 2009. 10. 29,

CN 102027368 A, 2011. 04. 20,

CN 1149337 A, 1997. 05. 07,

US 6197593 B1, 2001. 03. 06,

JP 昭 63-48020 B2, 1988. 09. 27,

审查员 谢百韬

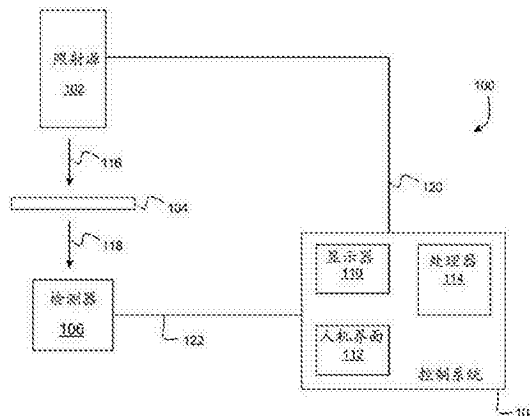
权利要求书3页 说明书21页 附图5页

(54) 发明名称

识别和测量网状细胞

(57) 摘要

识别沉积在衬底上的血液样品中的网状细胞的方法和系统包括：在两个不同波长上用入射光照射样品，获取与第一个波长相对应的样品的二维图像，以及获取与第二个波长相对应的样品的二维图像；分析图像以识别一组代表性红血细胞；确定该组中的每个红血细胞的面积；确定该组中的每个红血细胞的色值；以及对于该组中的每个红血细胞，如果红血细胞的面积超过面积截止值以及红血细胞的色值小于颜色截止值，则将该红血细胞识别成网状细胞。



1. 一种识别沉积在衬底上的血液样品中的网状细胞的方法,该方法包含:
 - 用在两个不同波长上的入射光照射样品,获取与第一个波长相对应的样品的二维图像,以及获取与第二个波长相对应的样品的二维图像;
 - 分析图像以识别一组代表性红血细胞;
 - 确定该组中的每个红血细胞的面积;
 - 确定该组中的每个红血细胞的色值;以及
 - 对于该组中的每个红血细胞,如果红血细胞的面积超过面积截止值以及红血细胞的色值小于颜色截止值,则将该红血细胞识别成网状细胞,
 - 其中每个红血细胞的色值包含红血细胞在两个照射波长上的光密度值之间的差值。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中波长之一在 400nm 与 457nm 之间,以及另一个波长在 575nm 与 600nm 之间。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中确定每个所识别红血细胞的色值包含,对于每个红血细胞:
 - 确定与该细胞相联系的一组像素;
 - 对于该组像素的每一个,确定与第一波长相对应的光密度;
 - 对于该组像素的每一个,确定与第二波长相对应的光密度;
 - 对于该组像素,确定与第一波长相对应的平均光密度;
 - 对于该组像素,确定与第二波长相对应的平均光密度;以及
 - 计算平均光密度之间的差值以确定该细胞的色值。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中确定该组中的每个红血细胞的面积包含,对于每个红血细胞:
 - 确定与该细胞相联系的一组像素;以及
 - 通过计数该组中的像素的数量确定该细胞的面积。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中确定该组中的每个红血细胞的面积包含,对于每个红血细胞:
 - 确定与该细胞相联系的一组像素;
 - 确定围绕该组像素的多边形;以及
 - 通过计算多边形的面积确定该细胞的面积。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中该颜色截止值基于红血细胞的色值分布的百分位。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其中该百分位对应于红血细胞的色值分布内的 70%。
8. 如权利要求 6 所述的方法,其中该颜色截止值对应于百分位与颜色偏移值之和。
9. 如权利要求 8 所述的方法,进一步包含根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和颜色偏移值。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其中该面积截止值基于红血细胞的面积分布的百分位。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中该百分位对应于红血细胞的面积分布的 20%。
12. 如权利要求 10 所述的方法,其中该面积截止值对应于百分位与面积偏移值之和。
13. 如权利要求 12 所述的方法,进一步包含根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和面积偏移值。
14. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包含如果与红血细胞相联系的像素在两个波长

之一上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。

15. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包含如果与红血细胞相联系的像素在不同于该两个波长的波长上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。

16. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包含,对于识别为网状细胞的每个红血细胞,确定网状细胞的体积。

17. 如权利要求 16 所述的方法,进一步包含根据与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度确定网状细胞的体积。

18. 如权利要求 17 所述的方法,进一步包含为样品确定平均网状细胞体积参数。

19. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包含,对于识别为网状细胞的每个红血细胞,确定网状细胞的血红蛋白含量。

20. 如权利要求 19 所述的方法,进一步包含根据网状细胞的面积、与多个照射波长相对应的网状细胞的体积、和与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度的加权组合,确定网状细胞的血红蛋白含量。

21. 如权利要求 19 所述的方法,进一步包含为样品确定平均网状细胞血红蛋白值。

22. 一种识别沉积在衬底上的血液样品中的网状细胞的系统,该系统包含:

光源,配置成用在两个不同波长上的入射光照射样品;

检测器,配置成获取与第一个波长相对应的样品的二维图像和获取与第二个波长相对应的样品的二维图像;以及

电子处理器,配置成:

分析图像以识别一组代表性红血细胞;

确定该组中的每个红血细胞的面积;

确定该组中的每个红血细胞的色值;以及

对于该组中的每个红血细胞,如果红血细胞的面积超过面积截止值以及红血细胞的色值小于颜色截止值,则将该红血细胞识别成网状细胞,

其中该电子处理器被配置成根据红血细胞在两个照射波长上的光密度值之间的差值确定每个红血细胞的色值。

23. 如权利要求 22 所述的系统,其中第一波长在 400nm 与 457nm 之间,第二波长在 575nm 与 600nm 之间。

24. 如权利要求 22 所述的系统,其中对于该组中的每个红血细胞,该电子处理器被配置成通过如下步骤确定该细胞的色值:

确定与该细胞相联系的一组像素;

对于该组像素的每一个,确定与第一波长相对应的光密度;

对于该组像素的每一个,确定与第二波长相对应的光密度;

对于该组像素,确定与第一波长相对应的平均光密度;

对于该组像素,确定与第二波长相对应的平均光密度;以及

计算平均光密度之间的差值以确定该细胞的色值。

25. 如权利要求 22 所述的系统,其中对于该组中的每个红血细胞,该电子处理器被配置成通过如下步骤确定该细胞的面积:

确定与该细胞相联系的一组像素;以及

通过计数该组中的像素的数量确定该细胞的面积。

26. 如权利要求 22 所述的系统,其中对于每个红血细胞,该电子处理器被配置成通过如下步骤确定该细胞的面积:

确定与该细胞相联系的一组像素;

确定围绕该组像素的多边形;以及

通过计算多边形的面积确定该细胞的面积。

27. 如权利要求 22 所述的系统,其中该电子处理器被配置成根据红血细胞的色值分布的百分位确定颜色截止值。

28. 如权利要求 27 所述的系统,其中该百分位对应于红血细胞的色值分布内的 70%。

29. 如权利要求 27 所述的系统,其中该电子处理器被配置成将该颜色截止值确定为百分位与颜色偏移值之和。

30. 如权利要求 29 所述的系统,其中该电子处理器被配置成根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和颜色偏移值。

31. 如权利要求 22 所述的系统,其中该电子处理器被配置成根据红血细胞的面积分布的百分位确定面积截止值。

32. 如权利要求 31 所述的系统,其中该百分位对应于红血细胞的面积分布的 20%。

33. 如权利要求 31 所述的系统,其中该电子处理器被配置成将该面积截止值确定为百分位与面积偏移值之和。

34. 如权利要求 33 所述的系统,其中该电子处理器被配置成根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和面积偏移值。

35. 如权利要求 22 所述的系统,其中该电子处理器被配置成如果与红血细胞相联系的像素在两个波长之一上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。

36. 如权利要求 22 所述的系统,其中该电子处理器被配置成如果与红血细胞相联系的像素在不同于该两个波长的波长上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。

37. 如权利要求 22 所述的系统,其中对于识别为网状细胞的每个红血细胞,该电子处理器被配置成确定网状细胞的体积。

38. 如权利要求 37 所述的系统,其中该电子处理器被配置成根据与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度确定网状细胞的体积。

39. 如权利要求 38 所述的系统,其中该电子处理器被配置成为样品确定平均网状细胞体积参数。

40. 如权利要求 22 所述的系统,其中对于识别为网状细胞的每个红血细胞,该电子处理器被配置成确定网状细胞的血红蛋白含量。

41. 如权利要求 40 所述的系统,其中该电子处理器被配置成根据网状细胞的面积、与多个照射波长相对应的网状细胞的体积、和与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度的加权组合,确定网状细胞的血红蛋白含量。

42. 如权利要求 40 所述的系统,其中该电子处理器被配置成为样品确定平均网状细胞血红蛋白值。

识别和测量网状细胞

[0001] 交叉引用相关申请

[0002] 本申请要求如下美国临时专利申请基于 35U. S. C. § 119(e) 的优先权:2011 年 7 月 22 日提交的第 61/510,614 号;以及 2011 年 7 月 22 日提交的第 61/510,710 号。在此通过引用并入前述申请每一个的全部内容。

技术领域

[0003] 本公开涉及识别、计数和测量包括血液的生物样品以及指定成模拟血液的质量控制复合物中的网状细胞的性质。

背景技术

[0004] 网状细胞是与成熟红血细胞相比通常通过水平升高的 RNA (核糖核酸) 表征的未成熟红血细胞。对血液样品进行的网状细胞计数可以提供有关患者的骨髓正在多快地产生红血细胞的重要信息。因此,患者的血液中网状细胞的数量用作重要诊断指标,通常是全血计数的一个参数。例如,高网状细胞计数可以表示可能内部创伤、失血、或某些类型的贫血。低网状细胞计数可能表示某种营养素缺乏(例如,铁不足)或像癌症那样影响骨髓的疾病。本文所公开的是自动测量细胞样品,包括识别,定量和成分测量包括血液的生物样品以及指定成模拟血液的质量控制复合物中的网状细胞的方法和系统。

发明内容

[0005] 本文公开的方法和系统允许使用光谱成像自动识别和定量血液样品中的网状细胞。这种识别和定量基于一个或多个细胞的图像,该图像在不同光波长上获得。尤其,公开的方法和系统可以用于识别和测量从患者身上抽取的血液样品中的网状细胞的性质。该性质可以包括与网状细胞的形状和外观有关的多种参数,包括面积、周长、圆形度、光密度、和在不同波长的谱性质。可以有选择地向技术人员显示网状细胞(例如,强调成与成熟红血细胞区分开)。也可以向技术人员显示从网状细胞中获取的诊断信息以便作进一步考虑(例如,确定患者可能正遇到的状况,以及选择适当的治疗过程)和/或可以将其传送给其它自动设备,存储在电子病历中,以及发送给其它健康护理专家。

[0006] 总的来说,在第一方面,本公开的特征是识别沉积在衬底上的血液样品中的网状细胞的方法,该方法包括:用在两个不同波长上的入射光照射样品,获取与第一个波长相对应的样品的二维图像,以及获取与第二个波长相对应的样品的二维图像;分析图像以识别一组代表性红血细胞;确定该组中的每个红血细胞的面积;确定该组中的每个红血细胞的色值;以及对于该组中的每个红血细胞,如果红血细胞的面积超过面积截止值以及红血细胞的色值小于颜色截止值,则将该红血细胞识别成网状细胞,其中每个红血细胞的色值包括红血细胞在两个照射波长上的光密度值之间的差值。

[0007] 该方法的实施例可以包括本文公开的特征的任何一个或多个。

[0008] 波长之一可以在 400nm (纳米) 与 457nm 之间,另一个波长可以在 575nm 与 600nm

之间。

[0009] 确定每个所识别红血细胞的色值可以包括,对于每个红血细胞:确定与该细胞相联系的一组像素;对于该组像素的每一个,确定与第一波长相对应的光密度;对于该组像素的每一个,确定与第二波长相对应的光密度;对于该组像素,确定与第一波长相对应的平均光密度;对于该组像素,确定与第二波长相对应的平均光密度;以及计算平均光密度之间的差值以确定该细胞的色值。

[0010] 确定该组中的每个红血细胞的面积可以包括,对于每个红血细胞,确定与该细胞相联系的一组像素,以及通过计数该组中的像素的数量确定该细胞的面积。确定该组中的每个红血细胞的面积可以包括,对于每个红血细胞,确定与该细胞相联系的一组像素,确定围绕该组像素的多边形,以及通过计算多边形的面积确定该细胞的面积。

[0011] 该颜色截止值可以基于红血细胞的色值分布的百分位。该百分位可以对应于红血细胞的色值分布内的 70%。该颜色截止值可以对应于百分位与颜色偏移值之和。该方法可以包括根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和颜色偏移值。该面积截止值可以基于红血细胞的面积分布的百分位。该百分位可以对应于红血细胞的面积分布的 20%。该面积截止值可以对应于百分位与面积偏移值之和。该方法可以包括根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和面积偏移值。

[0012] 该方法可以包括如果与红血细胞相联系的像素在两个波长之一上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。该方法可以包括如果与红血细胞相联系的像素在不同于该两个波长的波长上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。

[0013] 该方法可以包括,对于识别为网状细胞的每个红血细胞,确定网状细胞的体积。该方法可以包括根据与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度确定网状细胞的体积。该方法可以包括为样品确定平均网状细胞体积参数。

[0014] 该方法可以包括,对于识别为网状细胞的每个红血细胞,确定网状细胞的血红蛋白含量。该方法可以包括根据网状细胞的面积、与多个照射波长相对应的网状细胞的体积、和与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度的加权组合确定网状细胞的血红蛋白含量。该方法可以包括为样品确定平均网状细胞血红蛋白值。

[0015] 该方法的实施例还可以酌情地以任何组合包括本文公开的其它特征或步骤的任何一个。

[0016] 在另一个方面,本公开的特征是识别沉积在衬底上的血液样品中的网状细胞的系统,该系统包括光源,配置成用在两个不同波长上的入射光照射样品;检测器,配置成获取与第一个波长相对应的样品的二维图像和获取与第二个波长相对应的样品的二维图像;以及电子处理器,配置成分析图像以识别一组代表性红血细胞;确定该组中的每个红血细胞的面积;确定该组中的每个红血细胞的色值;以及对于该组中的每个红血细胞,如果红血细胞的面积超过面积截止值以及红血细胞的色值小于颜色截止值,则将该红血细胞识别成网状细胞,其中该电子处理器被配置成根据红血细胞在两个照射波长上的光密度值之间的差值确定每个红血细胞的色值。

[0017] 该系统的实施例可以包括如下特征的任何一个或多个。

[0018] 第一波长可以在 400nm 与 457nm 之间,第二波长可以在 575nm 与 600nm 之间。

[0019] 对于每个红血细胞,该电子处理器可以配置成通过如下步骤确定该细胞的色值:确定与该细胞相联系的一组像素;对于该组像素的每一个,确定与第一波长相对应的光密度;对于该组像素的每一个,确定与第二波长相对应的光密度;对于该组像素,确定与第一波长相对应的平均光密度;对于该组像素,确定与第二波长相对应的平均光密度;以及计算平均光密度之间的差值以确定该细胞的色值。

[0020] 对于该组中的每个红血细胞,该电子处理器可以配置成通过如下步骤确定该细胞的面积:确定与该细胞相联系的一组像素,以及通过计数该组中的像素的数量确定该细胞的面积。对于每个红血细胞,该电子处理器可以配置成通过如下步骤确定该细胞的面积:确定与该细胞相联系的一组像素,确定围绕该组像素的多边形,以及通过计算多边形的面积确定该细胞的面积。

[0021] 该电子处理器可以配置成根据红血细胞的色值分布的百分位确定颜色截止值。该百分位可以对应于红血细胞的色值分布内的 70%。该电子处理器可以配置成将该颜色截止值确定为百分位与颜色偏移值之和。该电子处理器可以配置成根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和颜色偏移值。该电子处理器可以配置成根据红血细胞的面积分布的百分位确定面积截止值。该百分位可以对应于红血细胞的面积分布的 20%。该电子处理器可以配置成将该面积截止值确定为百分位与面积偏移值之和。该电子处理器可以配置成根据已知网状细胞的数量的一组训练数据确定百分位和面积偏移值。

[0022] 该电子处理器可以配置成如果与红血细胞相联系的像素在两个波长之一上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。该电子处理器可以配置成如果与红血细胞相联系的像素在不同于该两个波长的波长上的光密度的标准偏差大于截止值,则从该代表组中排除该红血细胞。

[0023] 对于识别为网状细胞的每个红血细胞,该电子处理器可以配置成确定网状细胞的体积。该电子处理器可以配置成根据与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度确定网状细胞的体积。该电子处理器可以配置成为样品确定平均网状细胞体积参数。

[0024] 对于识别为网状细胞的每个红血细胞,该电子处理器可以配置成确定网状细胞的血红蛋白含量。该电子处理器可以配置成根据网状细胞的面积、与多个照射波长相对应的网状细胞的体积、和与多个照射波长相对应的网状细胞的综合光密度的加权组合确定网状细胞的血红蛋白含量。该电子处理器可以配置成为样品确定平均网状细胞血红蛋白值。

[0025] 该系统的实施例还可以酌情地以任何组合包括本文公开的其它特征或步骤的任何一个。

[0026] 除非另有定义,本文使用的所有科学和技术术语都具有与本公开所属的领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。尽管与本文所述的那些相似或等效的方法和材料可以用在本发明的实践或测试中,但下面将描述适当方法和材料。本文提及的所有公告、专利申请、专利和其它参考文献通过引用全文并入。在发生冲突的情况下,将以本说明书为准,包括定义。另外,材料、方法和例子都只是例示性的而无意成为限制。

[0027] 在附图和下面的描述中展示了一个或多个实施例的细节。其它特征和优点将从该描述、附图和权利要求书中明显看出。

附图说明

- [0028] 图 1 是识别,定量和测量生物样品中的网状细胞的特征的系统的示意图;
- [0029] 图 2 是示出识别样品中的网状细胞的一系列步骤的流程图;
- [0030] 图 3A 是示出用于样品中的红血细胞当中的网状细胞识别的颜色截止值的曲线图;
- [0031] 图 3B 是示出用于样品中的红血细胞当中的网状细胞识别的面积截止值的曲线图;
- [0032] 图 4 是示出从样品的一个或多个图像中选择一组代表性红血细胞的一系列步骤的示意图;
- [0033] 图 5 是示出细胞边界的细胞的示意图;
- [0034] 图 6 是示出两个细胞和针对每个细胞确定的凸包的示意图;
- [0035] 图 7 是示出细胞像素当中光密度的变化的细胞的示意图;
- [0036] 图 8 是自动样品处理系统的示意图;以及
- [0037] 图 9 是测量网状细胞的体积、成分和其它特征的计算系统的示意图。
- [0038] 在各种图形中的相同标号都指相同元件。

具体实施方式

[0039] 网状细胞是与成熟红血细胞相比通常通过水平升高的 RNA 表征的未成熟红血细胞。对血液样品进行的网状细胞计数可以提供有关患者的骨髓正在多快地产生红血细胞的重要信息。因此,患者的血液中网状细胞的数量用作重要诊断指标,通常是全血计数的一个参数。例如,高网状细胞计数可以表示可能内部创伤、失血、或某些类型的贫血。低网状细胞计数可能表示某种营养素缺乏(例如,铁不足)或像癌症那样影响骨髓的疾病。本文所公开的是自动测量细胞样品,包括识别,定量和成分测量样品中的网状细胞的方法和系统。尤其,本文公开的方法和系统可以用于测量样品和以自动方式识别旨在用在自动实验室分析仪上的质量控制复合物中或包括从动物身上提取的样品的多种不同其它样品中的网状细胞。本文公开的方法和系统允许高吞吐量,全自动地分析从患者身上抽取的多种生物样品,而无需专门为网状细胞识别而设计的特殊染色剂或其它造影剂。

[0040] 下面更详细地描述为分析制备样品的自动系统。一旦制备好样品,就将它输送给自动测量系统。该测量系统获取样品中的细胞的一个或多个二维图像,并使用图像来识别红血细胞当中的网状细胞和图像中血液的其它形成元素,以及在一些实施例中,测量像网状细胞体积、面积、周长、光密度、和 / 或所识别网状细胞中的一种或多种成分(例如,血红蛋白)的数量那样,与所识别网状细胞有关的量值。这些量值从源自网状细胞的图像的信息中确定,网状细胞的图像通过将入射光引到网状细胞上,然后检测入射光透过网状细胞或从网状细胞反射的部分获得。每个图像都是二维图像,其中图像内的各个像素强度值对应于出自网状细胞上与像素相对应的空间地点的透射或反射光的数量。

[0041] 一般性考虑

[0042] 网状细胞通常包括以比包括成熟红血细胞的其它类型细胞大的浓度存在于网状细胞中的核糖体 RNA 的网络。当将像天蓝 B 和亚甲基蓝那样的某些染色剂施加于网状细胞时,该染色剂与 RNA 结合。在显微镜下检查时,可容易看见染色 RNA,而网状细胞表现得稍偏蓝一点,并大于成熟红血细胞。染色 RNA 的数量是可以用于将网状细胞与其它细胞类型区

分开的一条准则。

[0043] 自动样品制备系统可以将多种不同染色剂施加于血液样品。虽然识别网状细胞的某些传统技术依靠专用于结合细胞 RNA 的染色剂或专门打算用于网状细胞的其它机制,但本文公开的方法和系统有利地依靠包括罗曼诺夫斯基(Romanowsky)染色剂在内的能够自动检测和测量全血计数的所有其它参数的染色剂。因此,可以将以细胞 RNA 和 DNA 两者为目标的染色剂施加于网状细胞,由于上述的核糖体 RNA 的染色网络,可以将网状细胞与其它细胞类型区分开。更一般地说,包括红血细胞(例如,成熟红细胞、网状细胞)的细胞通常将一种或多种染色剂施加于血液样品来制备(作为血液样品的一部分)。染色剂与细胞质结合,用作细胞图像中的细胞质的标记。当将入射光照射在细胞上时,染色剂吸收入射光的一部分;样品中的特定地点上的吸收量取决于存在于那个地点中的染色剂的数量。

[0044] 除了识别网状细胞之外,本文公开的方法和系统可以用于确定所识别网状细胞的各种性质。例如,通过将细胞厚度的估计值与细胞成分(例如,血红蛋白)和各种施加染色剂的局部变化浓度的吸收效应解耦,可以根据源自二维网状细胞图像的信息确定网状细胞体积。为了实现这样的解耦,按照每个细胞的最大像素强度缩放像素强度。如下面进一步所述,网状细胞体积计算可以基于用于获取网状细胞图像的照射光的每种颜色的光密度值与网状细胞面积的加权组合。可以针对为体积测量选择的一组网状细胞的每个成员重复本文所述的过程,将结果用于计算样品的平均网状细胞体积。如下面进一步所述,像网状细胞的血红蛋白含量那样网状细胞成分的数量也可以从基于用于获取网状细胞图像的照射光的每种颜色的光密度值的计算中确定。

[0045] 为了如下讨论的目的,假设将至少两种染色剂施加于样品:曙红色和天蓝色。但是,本文公开的方法和系统不局限于只施加两种染色剂或只有曙红色和天蓝色。相反,该方法和系统能够对施加了更少种染色剂(例如,一种染色剂)或更多种染色剂(例如,包含曙红色的红色染色剂和包含天蓝色和亚甲基蓝的染色剂,三种或更多种染色剂、四种或更多种染色剂、五种或更多种染色剂)的样品进行测量。

[0046] 图 1 示出了对血液样品中的网状细胞进行自动识别和测量的系统 100 (可以是较大样品处理和分析系统的一部分)的示意图。子系统 100 包括照射源 102、检测器 106、和电子控制系统 108。电子控制系统 108 可以包括显示器 110、人机界面单元 112、和电子处理器 114。电子控制系统 108 分别经由控制线 120 和 122 与照射源 100 和检测器 106 连接。

[0047] 假设已经为分析制备好样品(如下面进一步所讨论),制备好样品 104 (例如,沉积在显微镜载玻片上,随后固定,染色,清洗和干燥的血液样品)被自动放置在源 102 的附近。源 102 把入射光 116 引向样品 104。入射光的一部分通过样品 104 成为透射光 118,被检测器 106 检测。透射光 118 在检测器 106 的有效表面上形成样品 104 的图像;检测器 106 捕获该图像,然后将图像信息发送给电子控制系统 108。一般说来,电子控制系统 108 指示源 102 产生入射光 116,以及指示检测器 106 检测样品 104 的图像。当检测器 106 从透射光 118 中获取样品 104 的图像时,控制系统 108 可以指令源 102 使用不同照射波长。

[0048] 如果需要的话,可以对样品 104 的多个图像重复上面讨论的过程。在获取新图像之前,电子控制系统 108 可以调整源 102 产生的入射光 116 的波长。这样,样品 104 的每个图像可以对应于入射光 116 的不同波长,因此对应于透射光 118 的不同波长。重复该过程直到至少获得足够的信息来进行包括网状细胞候选者的红血细胞的精确识别和/或确定

与所识别红血细胞和 / 或网状细胞相联系的性质。

[0049] 通常,产生精确识别和 / 或定量网状细胞的信息量在校准过程期间确定。例如,校准过程可以用于确定当获得的样品图像的数量大于等于成为分析样品的因素的谱贡献者(例如,吸收者)的数量时,可以实现精确的网状细胞识别和定量。作为一个例子,对于包含包括作为天然存在吸收者的网状细胞、和作为施加染色剂的曙红色和天蓝色的红血细胞的制备好样品(对于总共三种谱贡献者),系统 100 可以继续获取样品图像直到在最少三种不同波长上获得图像。在网状细胞识别和定量中也可以获得和使用与进一步不同波长相对应的另外图像。

[0050] 照射源 102 可以包括一个源或多个相同或不同源,以便将入射光引到样品上。在一些实施例中,源 102 可以包括像如下那样的多个发光元件:二极管(LED)、激光二极管、荧光灯、白炽灯和 / 或闪光灯。例如,源 102 可以包括分别具有在电磁谱的红色、黄色、绿色和蓝色区域中的输出波长(例如,635、598、525 和 415nm),或更一般地说,大约 620 到 750nm(红色)、大约 575 到 600nm(黄色)、大约 525 到 570nm(绿色)、和大约 400 到 475nm(蓝色)的四个 LED。在某些实施例中,源 102 可以包括一个或多个激光源。取代拥有多个发光源,在其它实施例中,源 102 可以包括可以配置成变更其输出波长(例如,在电子控制系统 108 的控制下)的单个宽带发光源。例如,源 102 可以包括与在系统 108 的控制下产生可变输出谱的可配置滤波系统(例如,多个可机械调整滤波器、和 / 或基于液晶的可电子调整滤波器)耦合的宽带源(例如,白炽灯)。一般说来,源 102 不在单个波长上,而是在围绕中心波长(例如,波段中的最大强度的波长)的一个波段上输出照射光 116。当本文的讨论提及照射光 116 的波长时,这种提及指的是照射波段的中心波长。

[0051] 检测器 106 可以包括多种不同类型的检测器。在一些实施例中,检测器 106 包括电荷耦合器件(CCD)。在某些实施例中,检测器 106 可以包括光电二极管(例如,二维光电二极管阵列)。在一些实施例中,检测器 106 可以包括像基于 CMOS 的传感器和 / 或光电倍增器那样的其它光敏元件。如上面结合源 102 所述,检测器 106 还可以包括一个或多个滤波元件。在一些实施例中,与不同波形相对应的样品图像通过如下步骤获得:将具有相对较宽分布的波长的照射光 116 照射在样品 104 上,然后滤波透射光 118 以便只选择透射光与小波段的波长相对应的部分。滤波可以在激发侧(例如,在源 102 中)和检测侧(例如,在检测器 106 中)之一或两者上进行,以保证使用检测器 106 获得的图像的每一个与具有特定中心波长的光波长的特定分布相对应。

[0052] 一般性网状细胞识别方法

[0053] 本文公开的系统和方法获取样品(例如,沉积在显微镜载玻片上,随后利用固定剂和染色剂为自动显微镜成像制备的血液样品)中的细胞的图像,并从细胞图像当中识别和定量网状细胞。图 2 示出了包括在这样的图像中的识别网状细胞的各种步骤的流程图 200。在第一步骤 202 中,从一个或多个所获样品图像中的所有白血细胞、红血细胞、血小板、和细胞和非细胞假像当中识别一组代表性红血细胞。在下一个步骤 204 中,在该组代表性红血细胞当中识别网状细胞。然后,在可选步骤 206 中,可以根据在步骤 204 中定位的网状细胞确定像网状细胞体积、像血红蛋白那样的网状细胞成分的数量、和网状细胞几何参数那样的网状细胞特征和度量。该过程终止在步骤 208 上。下面更详细地描述流程图 200 中的每个步骤。

[0054] (i) 网状细胞识别

[0055] 如上所讨论,在血液样品中识别网状细胞的第一步是在一个或多个所获样品图像中的所有白血细胞、红血细胞、血小板、和细胞和非细胞假像当中识别一组代表性红血细胞(其中的网状细胞形成一个子集)。这个过程将在副标题“(ii)识别一组代表性红血细胞”下作更详细讨论,并且可以包括从包含红血细胞、白血细胞、和血小板的样品的图像中识别红血细胞的一种或多种特征测量和假像排除技术。在识别出该组代表性红血细胞之后,通过进一步分析该组红血细胞的每个成员在代表性红血细胞当中识别网状细胞。因为网状细胞是非成熟红血细胞,所以将样品中的红血细胞与其它类型的细胞(例如,白血细胞、血小板)区分开的方法可以将网状细胞和成熟红血细胞两者一起识别成该组代表性红血细胞。定位网状细胞牵涉到在该代表组中区分网状细胞和其它更成熟红血细胞。

[0056] 在一些实施例中,可以根据它们的吸收谱,有时借助于着色剂或染色剂(例如,使用公开在如下参考文献中的固定剂、染色剂、和清洗剂的组合:2012年6月18日提交的美国专利申请第13/526,164号,在此通过引用并入其全部内容),在该代表组中定位网状细胞。例如,因为网状细胞包含核糖体RNA的网络,所以与核酸结合的染色剂可以用于识别网状细胞,因为RNA一般以升高的浓度存在于网状细胞之中。

[0057] 在该组代表性红血细胞当中识别网状细胞可以根据该组中的各个细胞的光密度从在电磁谱的一个或多个波长区域中获得的图像中确定。例如,在一些实施例中,可以通过检查在光谱的黄色区域中获得的样品图像中的每个代表性红血细胞的光密度定位网状细胞。网状细胞在黄色区域中通常具有比成熟红血细胞强的吸收,因为施加于红血细胞的核酸染色剂在光谱的黄色区域中具有吸收峰。例如,罗曼诺夫斯基染色剂往往被用于标记样品中的红血细胞(包括网状细胞)的RNA。

[0058] 在某些实施例中,可以通过检查在光谱的蓝色区域中获得的样品图像中的每个代表性红血细胞的光密度定位网状细胞。通常,为了标识网状细胞的目的,光谱的蓝色区域从400nm到470nm。网状细胞在蓝色区域中一般具有比成熟红血细胞弱的吸收,因为网状细胞中的血红蛋白还未完全形成。通过将每个代表性红血细胞在蓝色区域中的综合光密度与已知与网状细胞有关(例如,根据标准化样品的流式细胞仪分析)的光密度值的范围相比较,可以将每个代表性红血细胞分类成网状细胞或成熟红血细胞。

[0059] 在某些实施例中,可以使用多个光谱区域中的红血细胞的光密度来识别网状细胞。例如,可以通过比较分别在光谱的蓝色和黄色区域中获得的图像中的每个代表性红血细胞的光密度(例如,源自利用蓝色和黄色照射波长获得的细胞的图像)识别网状细胞。网状细胞识别可以借助于用于排除成像假像的统计分析。

[0060] 确定特定代表性红血细胞是否是网状细胞的第一步是确定细胞的颜色(C)。例如,可以将细胞的颜色定义成:

$$[0061] \quad C = OD_{\text{mean}}(b) - OD_{\text{mean}}(y) \quad (1)$$

[0062] 其中 $OD_{\text{mean}}(b)$ 是使用光谱的蓝色区域中的照射波长的与红血细胞相对应的整个像素组的平均光密度,以及 $OD_{\text{mean}}(y)$ 是使用光谱的黄色区域中的照射波长的与红血细胞相对应的整个像素组的平均光密度。确定与红血细胞相对应的像素组在在样品图像中分别识别红血细胞时进行,将在后面加以讨论。

[0063] 确定特定代表性红血细胞是否是网状细胞的第二步是根据与红血细胞相对应

的像素组确定细胞的面积(A)。如下面进一步讨论,可以以多种方式确定基于一组像素的细胞面积。在一些实施例中,在识别该组像素时自动确定细胞面积。

[0064] 然后将细胞的颜色C和面积A用于通过根据整个代表性红血细胞群落当中这些参数的数值的统计分布将这些参数的数值与截止值相比较确定该细胞是否是网状细胞。如果下式成立,则可以将特定细胞识别网状细胞:

$$[0065] \quad C < C_{\text{cut}} \text{ 以及 } A > A_{\text{cut}} \quad (2)$$

[0066] 其中 C_{cut} 是颜色截止值,以及 A_{cut} 是面积截止值。颜色和面积截止值两者通常对应于代表性红血细胞当中颜色和面积的分布内的特定百分位标记。因为网状细胞在光谱的蓝色区域中一般没有成熟红血细胞那么强地吸收,所以颜色C小于颜色截止值 C_{cut} 的细胞有可能是网状细胞。此外,因为网状细胞大于成熟红血细胞,所以面积A大于面积截止值 A_{cut} 的细胞有可能是网状细胞。通过只将满足两个条件的细胞识别成网状细胞,可以高精度地在较大代表性红血细胞组内定位网状细胞。

[0067] 在一些实施例中,可以只使用方程(2)中的条件之一来识别网状细胞。例如,可以将色值小于颜色截止值的细胞识别成网状细胞(即, $C < C_{\text{cut}}$),而不考虑细胞的面积。作为另一个例子,可以将面积大于面积截止值的细胞识别成网状细胞(即, $A > A_{\text{cut}}$),而不考虑细胞的色值。

[0068] 如上所讨论,颜色和面积截止值通常对应于代表性红血细胞当中颜色和面积的分布内的特定百分位。通过使用百分位(例如,而不是绝对值),本文公开的方法可以用在染色方案变化的样品中和/或用在细胞大小从预期细胞大小开始自然变化(例如,如在细胞大小通常随患者而变中看到)的样品中。例如,该方法可以用于在平均而言比来自其他患者的红血细胞大的一组代表性当中定位网状细胞。

[0069] 在一些实施例中,使用偏移值调整分布百分位以得出颜色和面积截止值。例如,可以将颜色和面积截止值表达成:

$$[0070] \quad C_{\text{cut}} = C_{\%} + C_{\text{offset}} \quad (3)$$

$$[0071] \quad A_{\text{cut}} = A_{\%} + A_{\text{offset}} \quad (4)$$

[0072] 其中 $C_{\%}$ 和 $A_{\%}$ 分别是颜色和面积百分位,以及 C_{offset} 和 A_{offset} 分别是颜色和面积偏移值。图3A是示出用于在该组代表性红血细胞中定位网状细胞的颜色截止值 C_{cut} 的直方图。在图3A中,示出了所有代表性红血细胞当中颜色参数C的数值的分布390。在该分布内还示出了颜色百分位标记 $C_{\%}$ 。因为网状细胞具有通常小于成熟红血细胞的色值,所以颜色偏移值 C_{offset} 是负值,得出小于颜色百分位标记的颜色截止值 C_{cut} 。该分布的阴影区392对应于根据颜色截止值识别为网状细胞的红血细胞。

[0073] 图3B是示出用于在该组代表性红血细胞中定位网状细胞的面积截止值 A_{cut} 的直方图。在图3B中,示出了所有代表性红血细胞当中面积的分布395。在该分布内还示出了面积百分位标记 $A_{\%}$ 。因为网状细胞具有通常大于成熟红血细胞的面积,所以面积偏移值 A_{offset} 是正值,得出大于面积百分位标记的面积截止值 A_{cut} 。该分布的阴影区397对应于根据面积截止值识别为网状细胞的红血细胞。

[0074] 颜色和面积百分位和偏移的特定值可以通过分析训练数据组来确定,该训练数据组包含成熟红血细胞和网状细胞群落已知的样品。该训练数据组通常包括数百个或数千个样品;可以由实验室技术人员人工地或使用适当校准流式细胞仪系统在这些样品中测量成

成熟红血细胞和网状细胞群落。然后,使用本文公开的方法和系统分析该训练组,将百分位和偏移值选择成使实验分析结果与来自训练数据组的已知测量值最佳地匹配。

[0075] 作为一个例子,在一些实施例中,颜色百分位标记是 70%,颜色偏移值是 -0.09。更一般地说,颜色百分位标记是 80% 或更小(例如,60% 或更小,50% 或更小,40% 或更小)。通常,但并不总是,如果颜色百分位标记小于 70%,则颜色偏移值大于 -0.09。

[0076] 作为另一个例子,在一些实施例中,颜色百分位标记是 20%,颜色偏移值是 12.4。更一般地说,颜色百分位标记是 10% 或更大(例如,30% 或更大,40% 或更大,50% 或更大,60% 或更大)。通常,但并不总是,如果颜色百分位标记大于 20%,则颜色偏移值小于 12.4。

[0077] 在一些实施例中,可选地执行一个或多个假像排除步骤,以便进一步细化从该组代表性红血细胞当中识别网状细胞。这些假像排除步骤可以在上面针对颜色和面积截止值所述的比较之前,在比较之后,或既在之前又在之后执行。作为一个例子,基于与特定代表性细胞相对应的像素在不同波长上的光密度的统计分析的假像排除步骤可以用于排除作为假像的细胞而不是细胞。在多种波长(例如,照射波长)上的光密度可以用于假像排除。作为一个例子,已经发现蓝色、黄色、和绿色波长可用于这个目的。

[0078] 一般说来,可以将具有像素的光密度的标准偏差大的一组相关像素的细胞分类成假像而不是细胞,因为高标准偏差可以指示非寻常细胞形态、重叠细胞、和 / 或不良细胞保存。这样的细胞一般不合作进一步分析。作为一个例子,如果下式成立,则可以作为假像排除一组相关像素的细胞:

$$[0079] \quad \sigma_{00}(y) > \sigma_y \text{ 或 } \sigma_{00}(g) > \sigma_g \text{ 或 } \sigma_{00}(b) > \sigma_b \quad (5)$$

[0080] 其中 $\sigma_{00}(y)$ 、 $\sigma_{00}(g)$ 和 $\sigma_{00}(b)$ 分别是与利用黄色、绿色和蓝色照射波长获取的图像相对应的该组像素的光密度的标准偏差,以及 σ_y 、 σ_g 和 σ_b 是标准偏差截止值。一般说来,可以从如上所述的训练数据的分析和 / 或从历史数据(例如,来自以前分析细胞图像的数据)中确定适当标准偏差截止值。在一些实施例中,例如,适当标准偏差截止值是 $\sigma_y=0.1$, $\sigma_g=0.099$, 以及 $\sigma_b=0.058$ 。可以按照样品的性质、训练方案、和成像条件改变这些数值。作为一个例子,在某些实施例中,适当标准偏差截止值是 $\sigma_y=0.079$, $\sigma_g=0.085$, 以及 $\sigma_b=0.060$ 。

[0081] 上述的网状细胞识别实施例也可以用于识别旨在用在像本文公开的系统那样的自动样品测量系统上的质量控制复合物中的网状细胞。质量控制复合物通常包括多种类型的保存哺乳动物血液细胞,被设计成当在自动系统上处理时模拟全血样品。反过来,这些样品的分析结果可以用于评估自动系统的性能,例如,识别网状细胞的系统精度和可再现性。在某些质量控制复合物中,与患者的血液样品中的网状细胞相比,保存过程显著降低了控制样品中的网状细胞的大小;在某些情况下,这样复合物中的网状细胞小于成熟红血细胞成分。因此,不使用面积分析地依靠上述的颜色分析的网状细胞识别实施例可以用于精确检测某些质量控制复合物内的网状细胞。

[0082] (ii) 识别一组代表性红血细胞

[0083] 返回到图 2,流程图 200 中的第一步骤 202 牵涉到从使用本文所述的系统和方法获得的样品的图像中的细胞当中识别一组代表性红血细胞。步骤 204 中的网状细胞识别出现在已经从样品的图像中识别了该组代表性红血细胞之后;因此,该组代表性红血细胞通常包括成熟红细胞和网状细胞。然后,在可选步骤 206 中,像,例如,网状细胞血红蛋白测量值

那样,确定一个或多个特征和度量。就本公开而言,网状细胞特征和度量的确定被显示成单独步骤 206。但是,在一些实施例中,像面积、周长、和形状那样的某些网状细胞特征和度量作为步骤 202 (例如,识别一组代表性红血细胞)的一部分来测量。现在更详细地描述这个识别一组代表性红血细胞的步骤 202。

[0084] 利用经由检测器 106 获得的图像,可以将样品图像中的每个像素的强度值与用在选择一组代表性细胞中,以及随后假像排除、特征测量和网状细胞识别中的光密度值相关联。给定图像像素(x, y)上的透射光强度 $T(x, y)$ 与通过样品与那个像素相对应的部分的入射光的吸收系数 α 和路径长度 $\epsilon(x, y)$ 有关:

$$[0085] \quad T(x, y) = 10^{-\alpha \cdot \epsilon(x, y)} \quad (6)$$

[0086] 对于图像中的每个像素,像素强度与最大可能像素强度的比值(例如,在 8 位分辨率上,像素强度 / 255)代表在像素的空间地点上透射的光的比例。透射光的比例可以通过采用方程(6)的对数,以光密度(OD)为单位表达:

$$[0087] \quad OD(x, y) = -\log(T) = \alpha \cdot \epsilon(x, y) \quad (7)$$

[0088] 可以对样品图像中的每个像素重复这个过程。这样,每个图像中的每个像素上的光密度对应于与该像素相对应的地点上样品中的吸收材料的总量(例如,吸收系数与厚度的乘积)。

[0089] 图 4 示出了包括从血液的制备好样品的图像中选择一组代表性红血细胞的一系列步骤的流程图 420。在获取样品的图像之后,电子控制系统 108,尤其电子处理器 114 处理图像信息,以便将包括在该组代表性红血细胞中的细胞与存在于样品中的其它细胞类型(例如,白血细胞和血小板)、细胞团、和假像区分开。

[0090] 首先,在图 4 中的步骤 422 中,系统 100 定位一个或多个样品图像中的红血细胞(例如,成熟红血细胞和网状细胞)以便作进一步处理。红血细胞通常由于在细胞中存在血红蛋白而吸收蓝光(例如,415nm)。但是,白血细胞不包含血红蛋白,因此不会以与红血细胞相同的方式吸收蓝光。在蓝光下获得的样品的图像可以用于识别红血细胞;在这样的图像中,白血细胞表现得较淡和失真,因为这些细胞最低程度地吸收蓝光,从而降低对图像的贡献,通常使它们变得不可识别。

[0091] 在一些实施例中,可以使用加阈(thresholding)步骤来保证系统 100 只识别红血细胞作进一步分析。例如,系统 100 可以只利用强度(或灰度)值低于 160 的图像像素(对于以 8 位分辨率捕获的图像)。范围从 100 到 180 的其它强度值阈值可以用于从图像中识别红血细胞,而将白血细胞排除在进一步考虑之外。

[0092] 接着,在步骤 424 中,系统 100 为样品图像中的每个红血细胞识别一组像素。多种不同方法可以用于识别与细胞相联系的像素组。例如,在一些实施例中,系统 100 使用相连成分标记过程执行识别步骤。这个过程将来自样品图像的各个像素与图像中的对象相关联。例如,将不被指定为背景的像素分开的任何两个像素指定给相同细胞。

[0093] 另外,系统 100 可以排除位于细胞的边界区域内的像素作,例如,细胞体积或成分分析有关的某些测量。尤其,红血细胞由于这些细胞折射照射光的方式而往往具有又厚又暗的边界。由于这种折射,这些像素的光密度通常是不可靠的。在完成了相连成分标记过程之后,系统 100 可以将像素模糊层腐蚀应用于所识别细胞,以除去像素的最外面 n 个层(例如,与折射最大的边界区相对应的像素)。一般说来,取决于图像的放大倍数,像素模糊

层腐蚀可以被选成除去任何数量 n 的像素层(例如,一个像素层或更多像素层、两个像素层或更多像素层、三个像素层或更多像素层、四个像素层或更多像素层、五个像素层或更多像素层、六个像素层或更多像素层、八个像素层或更多像素层、十个像素层或更多像素层)。例如,已经通过实验确定,对于每个像素对应于细胞等于 $0.148 \mu\text{m} \times 0.148 \mu\text{m}$ 的部分的红血细胞,包含红血细胞周围的最外面 $0.5 \mu\text{m}$ 的像素模糊层腐蚀一般适合显著降低对细胞体积和血红蛋白含量的测量值的错误贡献。利用通过模糊层腐蚀校正的像素组,可以测量各种细胞特征,譬如,对细胞体积和成分分析有贡献的每个细胞的平均和最大光密度。

[0094] 在步骤 426 中,系统 100 继续执行通过确认该组只包含完整和正常形状和大小的红血细胞,从样品图像中识别一组代表性红血细胞的过程。一般说来,步骤 426 起在该组代表性红血细胞中丢弃残缺细胞、重叠细胞、细胞团、血小板、和来自夹杂物的非细胞假像的作用。例如,可以将被图像帧的边缘切割或与图像帧的边缘接触的细胞排除在进一步分析之外,从而防止不精确测量。另外,可以将确定的细胞体积中可以呈现与它们的非标准形状有关的变化畸形的细胞排除在该分析之外。并且,可以将用于计算细胞体积或成分含量时可能不可靠的、从重叠细胞中获得的测量结果排除在该组代表性细胞之外。由于这些原因,在步骤 426 中检验每个所识别细胞的形状,并将畸形和 / 或重叠细胞排除在进一步分析之外。

[0095] 多种不同方法可以用于检验所识别细胞的形状。例如,在一些实施例中,可以通过比较细胞的周长和面积检验每个细胞的形状。图 5 示出了这样比较的示意图。在图 5 中,细胞 500 被识别成样品图像中的一组像素。与细胞 500 的边界相对应的像素为了示范的目的,在图 5 中被加上比内部像素浅的阴影,但在实际图像中它们未必表现为这样。细胞 500 的面积可以计数该组中的像素的数量来确定。

[0096] 像素周长通过使用与细胞 500 相对应的该组像素从边界像素中确定。这可以通过连接通过每个周围像素的中心的线以便在图像中形成多边形,并测量该多边形的周长来完成。确定这个细胞周长值的平方与细胞面积值(即,多边形的面积)的比率来检验细胞的形状。对于理想的、完美的圆形细胞,这个比率的数值是 4π 。该比率的数值随着细胞形状偏离圆形轮廓而增大。使用这条准则,将周长的平方与面积的比率超过 4π 的最小值达到阈值或更大的细胞排除在进一步分析之外。通常,该阈值是 4π 的最小值的百分之几(例如,5% 或更大、10% 或更大、15% 或更大、20% 或更大、25% 或更大)。

[0097] 除了将单独畸形细胞排除在进一步分析之外以外,上面讨论的过程也可以排除重叠细胞。在样品图像中,重叠细胞通常表现为较大、单独畸形细胞(透射光强度的变化由入射光传过的材料的厚度增加引起)。当将分析算法应用于这样的图像时,重叠细胞一般被识别成单个较大细胞。这样,当进行细胞周长和面积的比较时,其比率远远落在相对于理想值的允许偏差的阈值之外,并且排除了重叠细胞。

[0098] 检验所识别细胞的形状的另一方法利用上述的细胞轮廓的多边形表示的凸包,并将凸包围住的面积与从图像像素中确定的细胞面积相比较。凸包面积与细胞面积的高比率可以用于识别不规则形状细胞,并将这样的细胞排除在进一步分析之外。图 6 是包括两个细胞 600A 和 600B 的示意图。细胞 600A 和 600B 的周线在图 6 中被分别标记成 602A 和 602B。围绕细胞 600A 画出凸包 604A,围绕细胞 600B 画出凸包 604B。如图 6 所示,凸包面积与细胞面积之间的差异对于细胞 600A 来说大于细胞 600B。鉴于细胞 600A 的高度不规则

性,可以将细胞 600A 排除在该组代表性红血细胞之外。

[0099] 在一些实施例中,细胞面积测量值可以用在步骤 426 中将假像和重叠细胞排除在该组代表性红血细胞之外。例如,对于包括网状细胞识别的红血细胞测量来说,可以只考虑面积范围从 35 平方微米到 65 平方微米的细胞。面积小于 35 平方微米的成像物体通常不是红血细胞,而是像样品中的一粒灰尘那样的假像。类似地,面积大于 65 平方微米的成像物体通常也不是红血细胞;这样的物体可能对应于一滴染色剂或几个重叠细胞。虽然前面的例子描述了 36 到 65 平方微米的范围,但其它范围也可以用于选择要测量的红血细胞(例如,20 平方微米到 80 平方微米)。并且该范围可以根据样品中的平均细胞大小来缩放,从而计及随患者的变化性。已经通过实验确定,虽然 35 到 65 平方微米范围可以排除一些红血细胞,但这样的范围与 20 到 80 平方微米范围相比,在从样品图像中消除假像方面更加有效。

[0100] 光密度值可以用于选择样品中的该组代表性红血细胞。例如,如果在蓝光下成像的物体的平均光密度值太低,则该物体可能是白血细胞核而不是红血细胞。可以将平均光密度阈值(例如,平均光密度小于等于 0.33)用于使用蓝光获取的图像,将白血细胞排除在该样品的该组代表性红血细胞之外(例如,平均光密度小于等于 0.33 的细胞有可能是白血细胞)。对于在蓝光或黄光照射下获得的图像,物体超过某个阈值的平均光密度值(例如,大于等于 0.66 的平均光密度值)可以用于识别可以排除在进一步分析之外的堆叠、重叠、和/或成团红血细胞(例如,平均光密度值大于等于 0.66 的红血细胞有可能与另一个红血细胞重叠)。

[0101] 在步骤 428 中以最终确定了要作进一步分析的一组代表性细胞而终止显示在图 4 中的过程。如上所述,然后可以使用该代表组内的细胞的测量特征进行网状细胞识别。

[0102] (iii) 确定网状细胞度量和特征

[0103] 回到图 2,在步骤 202 中识别了该组代表性红血细胞,以及在步骤 204 中在红血细胞当中定位(以及可选地计数)了网状细胞之后,可以在步骤 206 中可选地确定一个或多个网状细胞度量和特征。如上所讨论,可以在步骤 202 期间在识别该组代表性红血细胞的同时确定包括网状细胞面积、形状、周长、大小、和光密度的一些网状细胞特征。这些特征也可以在步骤 206 中确定。另外,可以在步骤 206 中确定与网状细胞相联系的其它特征和度量。例如,本文公开的系统和方法可以使用网状细胞图像特征的组合来计算像体积那样的网状细胞度量和像血红蛋白含量那样的成分值。该组合通常包括(但不限于)本发明人已经发现为多种多样样品产生精确、可再现结果的这样网状细胞特征的组合。

[0104] 一旦如上所述在该组代表性红血细胞当中定位了网状细胞,可以根据系统 100 获得的细胞的一个或多个图像为每个网状细胞计算本文公开的一些或所有特征。可以为网状细胞计算的第一组特征是可以按如下确定的特定颜色综合光密度 IOD(c) :

$$[0105] \quad \text{IOD}(c) = A \cdot \text{OD}_{\text{mean}}(c) \quad (8)$$

[0106] 其中 A 是网状细胞的面积,以及 $\text{OD}_{\text{mean}}(c)$ 是用颜色 c 的光照射网状细胞时网状细胞的图像中的平均光密度。如果在不同照射波长上获取网状细胞的图像,则可以在每个照射波长上为网状细胞计算 IOD(c) 的数值。图 7 示出了通过结合流程图 420 所述的过程识别的代表性网状细胞 700 的、利用颜色 c 的光照射获得的示意性图像。网状细胞 700 的图像包括多个像素。网状细胞 700 中的像素的平均光密度 $\text{OD}_{\text{mean}}(c)$ 对应于图 7 中的像素强度

的总和除以图像中的像素数量。

[0107] 可以为每个网状细胞计算的第二组特征是网状细胞的特定颜色体积 $Vol(c)$ 。图 7 中的网状细胞 700 的体积通过对与网状细胞 700 相对应的每个像素求和光密度值来计算。首先,可以按如下估计每个像素上的网状细胞 700 的“高度”:

$$[0108] \quad height = \frac{OD_{pixel}}{OD_{max}} \quad (9)$$

[0109] 其中 OD_{pixel} 是与给定像素相联系的光密度,以及 OD_{max} 是与网状细胞像素相联系的所有光密度当中的最大光密度。因此,例如,网状细胞 700 的图像中的像素 720 具有小于与像素 710 相联系的最大光密度的光密度。像素 720 对网状细胞 700 的体积的贡献是比值 OD_{720}/OD_{max} , 其中 OD_{720} 是像素 720 的光密度, OD_{max} 是像素 710 的光密度。然后,通过对网状细胞 700 中的所有像素求和像素光密度与最大光密度的比值计算特定颜色网状细胞体积 V :

$$[0110] \quad V = \sum_{pixels} \frac{OD_{pixel}}{OD_{max}} = \frac{\sum_{pixels} OD_{pixel}}{OD_{max}} = \frac{N_{pixels} \cdot OD_{mean}}{OD_{max}} \quad (10)$$

[0111] 其中在方程(10)中用网状细胞 700 中的像素的数量 N_{pixels} 与网状细胞 700 中的像素的平均像素光密度 OD_{mean} 取代与网状细胞 700 中的每个像素相联系的光密度的总和。

[0112] 通常,在网状细胞的边缘附近的像素的光密度值不是特定颜色体积测量值的有效贡献者,因为在细胞的边缘上折射的光产生围绕网状细胞的人为暗边缘。为了避免来自这样边缘像素的这种效应,该系统可以如前所述通过一个或多个像素腐蚀网状细胞边缘上的模糊层,测量网状细胞的模糊区的平均光密度和最大光密度,此后,通过乘以整个未腐蚀模糊层的面积外推到网状细胞的边缘。

[0113] 进一步,当与不同照射波长相对应的多个图像用于获取单个网状细胞的图像,可以在照射光的每种颜色上作出网状细胞体积计算确定。于是,可以按如下确定特定颜色网状细胞体积:

$$[0114] \quad Vol(c) = \frac{A \cdot OD_{mean}(c)}{OD_{max}(c)} \quad (11)$$

[0115] 其中 A 是包括细胞周围的整个网状细胞的面积, $OD_{mean}(c)$ 是网状细胞的模糊区内的像素的特定颜色平均光密度,以及 $OD_{max}(c)$ 是网状细胞的腐蚀模糊区的特定颜色最大光密度(例如,图 7 中的像素 710)。可以缩放所计算特定颜色网状细胞体积 $Vol(c)$ 以便以适当单位(例如,飞升)表达网状细胞体积。

[0116] 在一些实施例中,针对网状细胞图像的一些黑暗可能不是真正由网状细胞的 RNA 或血红蛋白含量引起的事件,将一个或多个校正因子加入方程(11)中加以调整是有用的。另外,可以应用缩放因子将体积测量值转换成像飞升(fL)那样的测量单位。为了计及这些校正和缩放因子,可以将方程(11)重写成:

$$[0117] \quad Vol(c) = \frac{S \cdot [A \cdot OD_{mean}(c)]}{OD_{max}(c) + J} + B \quad (12)$$

[0118] 其中 S 对应于缩放因子或斜率, J 对应于计及确定最大光密度时的偏差的校正因子,以及 B 对应于与全局偏移值相对应的截距值。

[0119] 校正因子、缩放因子、和截距值可以通过将已知体积值的数据组用于在,例如,校准流式细胞仪上处理的多个血液样品在实验上确定。稍有不同的一组校正因子一般将为每个不同样品提供最佳结果,但校正因子可以根据跨越整个数据组的结果来确定。例如,对于包含 1,000 个血液样品的已知网状细胞体积的数据组,可以通过选择使跨越整个数据组的测量和预期体积值之间的平方差之和最小的校正因子确定跨越整个数据组平均而言起最佳作用的校正因子。缩放因子可以通过选择最佳地将原始体积值转换成像飞升那样的所希望测量单位的缩放因子跨越整个数据组地确定。可以为数据组计算截距值 B,以保证当在二维曲线图上展示数据时方程(22)通过原点。校正因子、缩放因子、和截距值可以存储在与电子控制系统 108 相联系的存储单元中,当为了分析新样品确定如方程(12)所示的特定颜色网状细胞体积时从存储器中检索。

[0120] 当使用方程(8)和方程(11)或(12)时,可以为用于获取样品图像的照射光的每种颜色确定两种特征(例如,综合光密度 IOD(c) 和体积 Vol(c))。例如,如果使用四种不同颜色的照射光,则可以为从该代表组中识别的每个网状细胞确定总共八种不同特征。另外,如上所述,可以从网状细胞的图像中确定每个单独网状细胞的面积 A。然后将特定颜色综合光密度和网状细胞体积、和网状细胞面积用于为每个网状细胞计算各种度量。

[0121] 像网状细胞体积和成分数量那样的网状细胞度量可以根据上面公开的为网状细胞计算的一些或所有特征的加权组合来计算。一般说来,度量 M 可以按照下式确定:

$$[0122] \quad M = \sum_n [\omega_{n,i} \cdot IOD(n) + \omega_{n,v} \cdot Vol(n)] + \omega_a \cdot A + K \quad (13)$$

[0123] 其中 n 对应于用于获取网状细胞的图像的照射光的每次颜色, $\omega_{n,i}$ 值是每种特定颜色综合光密度 IOD(n) 的特定颜色权重系数, $\omega_{n,v}$ 值是每种特定颜色体积 Vol(n) 的特定颜色权重系数, ω_a 是网状细胞面积 A 的权重系数,以及 K 是偏移值。例如,当使用四种不同照射波长来获取网状细胞的图像(例如,红色=r,黄色=y,绿色=g,以及蓝色=b)时,那么,可以将网状细胞体积 V 确定成:

$$[0124] \quad V = \omega_{r,i} \cdot IOD(r) + \omega_{y,i} \cdot IOD(y) + \omega_{g,i} \cdot IOD(g) + \omega_{b,i} \cdot IOD(b)$$

$$[0125] \quad + \omega_{r,v} \cdot Vol(r) + \omega_{y,v} \cdot Vol(y) + \omega_{g,v} \cdot Vol(g) + \omega_{b,v} \cdot Vol(b)$$

$$[0126] \quad + \omega_a \cdot A + K \quad (14)$$

[0127] 可以以类似方式确定网状细胞成分的数量。例如,可以按照下式计算网状细胞中的血红蛋白的浓度 H:

$$[0128] \quad H = \omega_{r,i} \cdot IOD(r) + \omega_{y,i} \cdot IOD(y) + \omega_{g,i} \cdot IOD(g) + \omega_{b,i} \cdot IOD(b)$$

$$[0129] \quad + \omega_{r,v} \cdot Vol(r) + \omega_{y,v} \cdot Vol(y) + \omega_{g,v} \cdot Vol(g) + \omega_{b,v} \cdot Vol(b)$$

$$[0130] \quad + \omega_a \cdot A + K \quad (15)$$

[0131] 上面方程(14)和(15)之间的差异在于权重系数和偏移 K 的数值。当使用方程(14)和(15)时,可以为样品中的多个网状细胞确定网状细胞体积和成分数量(例如,血红蛋白的数量)。可以对结果求平均,以确定样品的平均网状细胞体积和成分的平均浓度(例如,平均网状细胞血红蛋白)。

[0132] 与方程(13)中的特定颜色特征相联系的权重系数可以根据可用训练数据,例如,通过确定将实验确定样品特征映射到包含这样样品的已知体积和 / 或成分浓度数值的训练数据的线性回归系数来确定。使用线性回归做法来确定特定颜色权重通过校正像膜厚和

染色剂吸收的随细胞变化性那样影响测量的不可控因素,可以提高样品平均网状细胞体积和平均网状细胞成分浓度测量的精度。在从训练数据中确定了特定颜色权重值之后,可以存储和以后在分析每个样品之前从存储单元(例如,电子存储单元)中检索权重值。

[0133] 一般说来,多种多样不同的样品可以用于确定适当权重系数。为了获得可高度再现结果,使用跨越计算的参量的数值的整个范围的训练数据可能是有利的。并且,如果要分析的样品包括像细胞团块那样的非寻常形态特征,则使用包括这样特征的代表性样品的训练数据可能是有利的。

[0134] 作为一个例子,在为了确定网状细胞体积而从一组训练数据中确定了一组权重系数之后,可以将方程(14)重写如下:

$$[0135] \quad V = (-4.04) \cdot \text{IOD}(r) + 8.49 \cdot \text{IOD}(y) + (-3.69) \cdot \text{IOD}(g) + 4.40 \cdot \text{IOD}(b)$$

$$[0136] \quad + 4.68 \cdot \text{Vol}(r) + (-8.20) \cdot \text{Vol}(y) + 3.57 \cdot \text{Vol}(g) + 0.0159 \cdot \text{Vol}(b)$$

$$[0137] \quad + (-0.125)A + 4.84 \quad (16)$$

[0138] 类似地,在为了确定网状细胞血红蛋白而从一组训练数据中确定了一组适当权重系数之后,可以将方程(15)重写如下:

$$[0139] \quad H = (-1.05) \cdot \text{IOD}(r) + (-2.44) \cdot \text{IOD}(y) + 1.12 \cdot \text{IOD}(g) + 2.15 \cdot \text{IOD}(b)$$

$$[0140] \quad + 1.95 \cdot \text{Vol}(r) + (-0.112) \cdot \text{Vol}(y) + (-1.27) \cdot \text{Vol}(g) + 0.457 \cdot \text{Vol}(b)$$

$$[0141] \quad + (-0.221) \cdot A + (-5.73) \quad (17)$$

[0142] 有关细胞体积和细胞成分含量测量技术的另外细节公开在如下参考文献中:2012年4月13日提交的同时待审美国专利申请第13/446,967和13/447,045号,在此通过引用并入其全部内容。

[0143] 如前所述,本文公开的系统和方法可以用于分析白血细胞样品(例如,从患者身上取得的样品)和质量控制复合物两者。显示在方程(14)-(17)中的权重系数可以用于分析白血细胞样品和质量控制复合物两者。在其它实施例中,可以使用专用于质量控制复合物的权重系数;如前面结合患者血液样品所述,这样的系数可以使用包含质量控制复合物中的网状细胞的已知测量值的训练数据确定。

[0144] 在一些实施例中,可以使用设备来分析控制复合物,以评估该设备得出的结果的精度。例如,可以将设备分析控制复合物(例如,确定网状细胞数量和像网状细胞血红蛋白、网状细胞体积、平均网状细胞血红蛋白、和平均网状细胞体积)所得的结果与控制复合物的这些数量的参考值相比较,以评估设备的精度。如果这些数量的一个或多个的确定值和参考值之间的差值超过阈值,则可以重新校准设备。重新校准可以包括,例如,如本文所述,从参考血液样品中重新确定方程(14)-(17)中的一些或所有权重系数的数值。

[0145] 另外实施例

[0146] 在方程(14)-(17)中,将四种颜色(红色、黄色、绿色和蓝色)的照射光用于照射样品,并从与这些颜色的每一种相对应的图像中计算综合光密度和网状细胞体积。用于计算特定颜色综合光密度值和体积的照射波长可以是,例如,635nm、598nm、525nm和415nm,但在其它实施例中可以使用在电磁谱的红色、黄色、绿色和蓝色区域内的其它数值。更一般地说,可以使用不同数量的照射波长,并且可以获取和使用与每种照射波长相对应的图像来计算综合光密度的特定颜色值和/或网状细胞体积。例如,在一些实施例中,将三种不同波长的光用于照射样品,在某些实施例中,可以使用不止四种波长(例如,五种波长、六种波

长、七种波长、八种波长、十种波长)的照射光,以及可以在一些或所有照射波长上确定特定颜色综合光密度、细胞体积、和权重系数。一般说来,照射光的波长可以被选成使每种不同波长上的每个图像包括有关样品的不同信息。例如,如果样品包括三种谱贡献者,则可以选择三种波长的照射光来使用,以便三种波长的每一种被谱贡献者的不同一种最强地吸收。

[0147] 如上所讨论,方程(13)中的特定颜色权重系数可以通过将大量(例如,1,000个)血液样品的实验确定特征的线性回归系数映射到从,例如,校准流式细胞仪系统中获得、包含这样样品的网状细胞体积和/或各种网状细胞成分的浓度的已知值的训练数据组来确定。随着样品制备参数的变化(例如,影响染色网状细胞的外观的染色剂复合物或像固定和染色之前样品干燥的程度那样,影响网状细胞如何吸收染色剂的其它因素的修改),可以重复确定方程(13)的特定颜色权重和截距值的过程,以保证为一组给定样品制备参数确定精确体积和网状细胞成分测量值。但是,一旦已经为特定样品制备系统优化了样品制备参数,则方程(13)中的实验导出权重系数和其它参数值将导致网状细胞体积和/或网状细胞成分数量的精确和可再现测量。

[0148] 在方程(13)中,像特定颜色综合光密度、特定颜色体积、和网状细胞面积的加权线性组合那样计算度量M。但是,并非所有这些特征都用在所有实施例中确定度量的数值。例如,在一些实施例中,可以像只有特定颜色综合光密度或特定颜色体积的加权组合那样计算度量M。在某些实施例中,可以像网状细胞面积和特定颜色综合光密度或特定颜色体积的加权组合那样计算度量M。在一些实施例中,可以像特定颜色综合光密度和特定颜色体积的加权线性组合那样计算度量M。一般说来,用于计算特定度量M的特征的适当组合可以使用已知度量M的数值的参考样品来确定。

[0149] 当确定网状细胞中的特定成分的数量时,如果在样品中只存在单种谱贡献者(例如,像血红蛋白那样的吸收贡献者),则可以通过求和来自图像中与所选网状细胞相对应的每个像素的强度贡献确定存在于特定网状细胞中的那种贡献者的总量。由于强度贡献者只对应于血红蛋白的吸收,所以只需一个样品图像来确定存在于网状细胞中的血红蛋白的总量。

[0150] 但是,实际上,通常利用一种或多种染色剂来制备样品,以帮助技术人员或自动成像系统识别,计数和分类各种细胞类型。对于样品中的多种谱贡献者,每个照射波长上的吸收是由样品中的每种贡献者引起的吸收的组合;特定网状细胞在任何波长上的总贡献仍然对应于来自代表网状细胞的每个像素在那个波长上的贡献的总和。因此,对于存在于样品中的谱贡献者—血红蛋白(H)、曙红色(E)和天蓝色(A),以及假设样品的三个图像对应于中心波长在电磁谱的黄色(y)、绿色(g)、和蓝色(b)区域中的照射光,可以假设特定网状细胞(或,图像中与一个或多个网状细胞相对应的所有像素)在这在三种波长每一种上的光密度是由每种谱成分在每种波长上引起的吸收的线性组合:

$$[0151] \quad OD(y) = H \cdot \alpha_{y,H} + E \cdot \alpha_{y,E} + A \cdot \alpha_{y,A}$$

$$[0152] \quad OD(g) = H \cdot \alpha_{g,H} + E \cdot \alpha_{g,E} + A \cdot \alpha_{g,A} \quad (18)$$

$$[0153] \quad OD(b) = H \cdot \alpha_{b,H} + E \cdot \alpha_{b,E} + A \cdot \alpha_{b,A}$$

[0154] 其中 $\alpha_{i,j}$ 是特定贡献者 j (例如,血红蛋白 H、曙红色 E 或天蓝色 A) 在波长 i (例如,黄色 y、绿色 g、或蓝色 b) 上的吸收系数。

[0155] 光的每个中心波长可以通过让已知光谱通过样品到达检测器并测量样品的吸收

度来确定。例如,检测器可以利用分别在黄色、绿色、和蓝色区域中具有窄照射谱的照射源获取样品的三个图像。在每种谱贡献者具有包含局部最大值的吸收谱的情况下,可以将照射源选择成使发射谱对应于或最佳地接近谱贡献者的局部最大值。例如,可以将蓝光照射选择成与样品中的血红蛋白的峰吸收度相对应的波长(例如,415nm)。可以将黄光照射与与样品中的天蓝色染色剂的峰吸收度相对应的波长(例如,598nm)相关联。类似地,可以将绿光照射选择成与样品中的曙红色染色剂的峰吸收度相对应的波长(例如,525nm)。另外的照射波长可以被选成与样品中的另外谱贡献者的峰吸收度值相关联。

[0156] 可以从图像信息中确定光密度数量 $OD(y)$, $OD(g)$ 和 $OD(b)$, 以及可以从参考源中获得或通过实验确定吸收系数 $\alpha_{i,j}$ 。因此,方程组(18)包括三个未知数— H , E 和 A , 可以加以求解以得出存在于每个网状细胞中的这三种谱贡献者每一种的数量,或如果为分析所选的像素集体对应于图像中的所有所识别细胞,则对于包括样品中的所有网状细胞的所有细胞集体地得出这三种谱贡献者每一种的数量。

[0157] 不过,本文公开的方法和系统提供了确定网状细胞成分的数量更简单、更有效方法。如上所述,具有适当权重系数的方程(13)可以用于只对那些感兴趣成分确定成分数量,提高可以完成样品分析的速度。并且,在对谱贡献者的数量不十分了解的复杂样品中,可能难以构建像方程(18)中那样的方程组。但是,方程(13)使得即使不十分确定网状细胞中其它谱贡献者的存在,也可以确定特定网状细胞成分的数量。因此,虽然在一些实施例中,可以通过在三种不同照射波长上获取图像来区分方程组(18)中来自血红蛋白、曙红色和天蓝色的谱贡献,但当测量血液样品时,如本文所述使用不止三种特征和 / 或不止三种照射波长来确定像网状细胞血红蛋白、网状细胞体积、平均网状细胞血红蛋白、和平均网状细胞体积那样的网状细胞度量的数值使得可以校正其它系统性和非系统性误差源。

[0158] 除了特定颜色综合光密度和体积、和网状细胞面积之外,可以使用其它图像特征来确定网状细胞体积和 / 或网状细胞成分的数量。例如,在一些实施例中,方程(13)可以包括与网状细胞周长和权重系数的乘积相对应的额外项。如上所述,可以从训练数据中为网状细胞周长确定适当权重系数。更一般地说,在方程(13)中可以包括从训练数据中确定适当权重系数、从网状细胞图像中导出的多种附加项。这样的项可以包括与网状细胞的形态和 / 或在不止三种或四种照射波长上的综合光密度和体积的特定颜色测量有关的图像几何特征。在不希望受理论约束的情况下,附加项可以允许对参考样品信息同时进行以确定所有加权因子的数量的拟合,以校正方程(13)的模型未完全计及、像成像像差、来自其它样品成分的吸收、和系统性测量误差那样的效应。例如,已经发现,将与红光照射波长相对应的综合光密度和网状细胞体积项和与网状细胞面积相对应的项包括进来与未使用在红光照射波长上获得的样品图像或网状细胞面积测量的测量技术相比,提高了确定许多样品中的网状细胞血红蛋白的精确。

[0159] 一般说来,本文公开的方法和系统可以用于确定样品中的天然存在成分(例如,网状细胞中的血红蛋白)的数量和 / 或添加到样品中的成分(例如,施加的和与网状细胞结合的染色剂)的数量。并且,在一些实施例中,本文公开的方法和系统可以用于确定存在于样品中的不止一种成分的数量。例如,通过施加适当染色剂和 / 或选择适合样品图像的中心波长,可以确定两种或更多种成分的数量。考虑包括作为天然存在吸收成分的血红蛋白的样品。该样品可以用两种宽吸收染色剂 $S(1)$ 和 $S(1)$, 以及用具有相对较窄吸收带的第三

染色剂 S(3) 染色。S(3) 有选择地与网状细胞中的特定感兴趣成分结合,以便测量存在的 S(3) 的数量导致成分的测量。

[0160] 如果血红蛋白和 S(3) 的吸收谱在谱上分得足够开,使得血红蛋白只在波长 λ_1 , λ_2 和 λ_3 上而非在 λ_4 上具有显著吸收,以及 S(3) 只在波长 λ_2 , λ_3 和 λ_4 上而非在 λ_1 上具有显著吸收,然后假设 S(1) 和 S(2) 在所有四种波长上都具有显著吸收,则可以按照本文公开的测量网状细胞成分数量的方法,从与照射波长 λ_1 , λ_2 和 λ_3 相对应的样品的图像中确定网状细胞血红蛋白的数量,以及按照相同方法,从与照射波长 λ_2 , λ_3 和 λ_4 相对应的样品的图像中确定 S(3) 的数量。可以将这种做法进一步推广到更多数量的感兴趣成分,以及像 S(1) 和 S(2) 那样的更多或更少数量的宽吸收谱贡献者。

[0161] 网状细胞结果报告

[0162] 在某些实施例中,可以使用,例如,显示器 110 向系统操作人员显示所识别网状细胞、所确定网状细胞体积、成分数量、平均网状细胞体积、和 / 或平均成分浓度。体积和成分结果可以按网状细胞,或作为整个样品的平均结果来显示。此外,可以将计算的数值结果(例如,针对各个网状细胞)叠加在网状细胞的一个或多个图像上面。一般说来,系统操作人员可以使用人机界面单元 112(例如,键盘、鼠标和 / 或其它输入设备)练习对显示结果的方式的控制。系统操作人员也可以通过界面单元 112 和显示器 110 练习对与本文公开的方法相联系的任何其它参数、条件、和选项的控制。

[0163] 也可以从平均网状细胞体积和 / 或平均网状细胞血红蛋白测量值中计算并显示一个或多个度量。例如,在一些实施例中,可以为操作人员计算和显示网状细胞分布宽度。另外,可以将平均网状细胞血红蛋白测量值与样品的血细胞比容值一起用于计算平均网状细胞血红蛋白浓度。有关显示网状细胞图像和相关网状细胞度量的方法和系统的另外细节可以在如下参考文献中找到:2012 年 6 月 18 日提交的美国专利申请第 13/526,223 号,在此通过引用并入其全部内容。

[0164] 网状细胞体积和成分浓度测量值和 / 或从中计算的度量可以与样品图像一起存储在与控制系统 108 相联系的电子存储单元中。例如,可以将这个信息存储在与样品 104 所对应的患者相联系的电子病历中。可替代地,或另外,可以将该信息发送给一个或多个医生或其他治疗人员。可以经由网络(例如,计算机网络)将该信息发送给计算设备。并且,可以将该信息发送给像移动电话那样的手持设备,如果度量在数值的预定范围之外,则该发送信息可以包括警告或警报。

[0165] 用于红血细胞识别和测量的方法和系统公开在,例如,2012 年 4 月 13 日提交的美国专利申请第 13/446,967 号中,在此通过引用并入其全部内容。

[0166] 自动样品制备系统

[0167] 本文公开的系统和方法可以用在多种不同自动样品制备系统上。图 8 示出了自动样品制备系统 800 实施例的示意图。系统 800 包括储存衬底,使样品沉积在衬底上,检查制备在衬底上的样品,以及储存制备好的样品的多个子系统。

[0168] 衬底储存子系统 810 被配置成储存样品沉积在上面之前的衬底。衬底可以包括,例如,显微镜载玻片、盖玻片、和类似平坦、光学透明衬底。衬底可以由包括各种类型的玻璃的多种不同非晶体或晶体材料形成。子系统 810 可以包括从储存容器中选择单独衬底并将所选衬底传送到样品沉积子系统 820 的操纵器。

[0169] 样品沉积子系统 820 将像血液样品那样的所选量值感兴趣样品沉积在衬底上。一般说来,子系统 820 包括配置成沉积样品的多种流体传送组件(例如,液泵、流体管、阀门)。流体传送组件还可以配置成使衬底暴露在各种类型的溶液中,这些溶液包括洗涤溶液、与样品结合的一种或多种染色液、固定溶液、和 / 或缓冲溶液。子系统 820 还可以具有流体移除组件(例如,真空子系统)和干燥装置的特征,以保证样品被固定在衬底上。衬底操纵器可以将支承样品的衬底传送到检查子系统 830。

[0170] 检查子系统 830 包括获取衬底上的样品的图像,并分析图像以确定有关样品的信息的各种组件。例如,检查子系统 830 可以包括将入射光引向样品的一个或多个光源(例如,发光二极管、激光二极管、和 / 或激光器)。成像子系统 830 还可以包括捕获来自样品的透射和 / 或反射光的光学装置(例如,显微镜物镜)。与光学装置耦合的检测器(例如,CCD 检测器)可以配置成捕获样品的图像。可以将分析样品的图像得出的信息存储在多种光和 / 或电存储介质上供以后检索和 / 或进一步分析用。

[0171] 在检查完之后,衬底操纵器可以将衬底传送到储存子系统 840。储存子系统 840 可以将,例如,与施与衬底的样品的源有关的信息、分析时间、和 / 或在分析期间识别的任何不规则性标记在各个衬底上。储存子系统 840 还可以将处理后的衬底储存在当被衬底充满时,可以从系统 800 移走的多衬底架中。

[0172] 如图 8 所示,系统 800 的各种子系统的每一个可以与公用电子处理器 850 链接。处理器 850 可以配置成利用来自系统操作人员的相对少量输入(或无需输入),以自动方式控制系统 800 的每个子系统的操作。可以将来自样品分析的结果显示在系统显示器 860 上供系统管理操作人员使用。界面 870 使操作人员可以向系统 800 发命令和人工复查自动分析结果。

[0173] 自动样品处理系统的另外方面和特征公开在,例如,如下专利文献中:2011 年 11 月 9 日提交的美国专利申请第 13/293,050 号,在此通过引用并入其全部内容。

[0174] 硬件和软件实现

[0175] 本文所述的方法步骤和过程可以用硬件或软件,或两者的组合来实现。尤其,电子处理器 114 可以包括执行上述公开的任何方法的软件和 / 或硬件指令。该方法可以用遵循本文公开的方法步骤和图形的使用标准编程技术的计算机程序实现。将程序代码应用于输入数据以执行本文所述的功能。将输出信息应用于像打印机或显示设备那样的一个或多个输出设备,或访问网站,例如,用于远程监视的计算机监视器上的网页。

[0176] 每个程序优选地用高级过程或面向对象的编程语言来实现以便与处理器通信。但是,如果需要的话,程序也可以用汇编或机器语言实现。在任何情况下,该语言都可以是经过编译和翻译的语言。可以将每个计算机程序存储在处理器可读的存储介质或设备(例如,电子存储器)上,以便配置和操作处理器来执行本文所述的过程。

[0177] 图 9 是按照一个实施例,可以用于控制与本文所述的计算机实现方法的任何一种相联系描述的操作的计算机系统 900 的示意图。系统 900 包括处理器 910、存储器 920、存储设备 930、和输入 / 输出设备 940。组件 910,920,930 和 940 的每一个使用系统总线 950 互连。处理器 910 能够处理在系统 900 内执行的指令。在一些实施例中,处理器 910 是单线程处理器。在另一个实施例中,处理器 910 是多线程处理器。处理器 910 能够处理存储在存储器 920 中或在存储设备 930 上的指令,以便在输入 / 输出设备 940 上为用户界面显

示图形信息。处理器 910 基本上可以与上面参考图 8 所述的处理器 850 类似。

[0178] 存储器 920 存储系统 900 内的信息。在一些实施例中,存储器 920 是计算机可读介质。存储器 920 可以包括易失性存储器和 / 或非易失性存储器。

[0179] 存储设备 930 能够为系统 900 提供大容量存储体。一般说来,存储设备 930 可以包括配置成存储计算机可读指令的任何非短暂有形介质。在一个实施例中,存储设备 930 是计算机可读介质。在各种不同实施例中,存储设备 930 可以是软盘设备、硬盘设备、光盘设备、或磁带设备。

[0180] 输入 / 输出设备 940 为系统 900 提供输入 / 输出操作。在一些实施例中,输入 / 输出设备 940 包括键盘和 / 或定位设备。在一些实施例中,输入 / 输出设备 940 包括显示图形用户界面的显示单元。在一些实施例中,输入 / 输出设备 940 包括上面参考图 8 所述的显示器 860 和界面 870 的一种或多种。

[0181] 所述特征可以在数字电子线路中,或在计算机硬件、固件、或它们的组合中实现。该特征可以在有形地具体化在信息载体中,例如,在机器可读存储设备中,供可编程处理器执行的计算机程序产品中实现;以及该特征可以由执行指令的程序以便通过操作输入数据和生成输出执行所述实施例的功能的可编程处理器实现。所述特征可以在可在可编程系统上执行的一个或多个计算机程序中实现,该可编程系统包括耦合成从数据存储系统、至少一个输入设备、和至少一个输出设备接收数据和指令,以及向它们发送数据和指令的至少一个可编程处理器。计算机程序包括可以直接或间接用在计算机中,以便执行某种活动或引起某种结果的一组指令。计算机程序可以用包括编译或翻译的语言的任何形式编程语言编写,并且可以以任何形式部署,包括作为独立程序或作为模块、组件、子例程、适合用在计算环境中的其它单元来部署。

[0182] 各种软件架构都可以用于实现描述在本申请中的方法和系统。例如,发布 / 订阅消息传送模式可以用在实现本文所述的方法和系统中。在发布 / 订阅消息传送的情况下,该系统包括只经由消息传送模块通信的几个硬件和软件模块。每个模块可以被配置成执行特定功能。例如,该系统可以包括硬件模块、照相机模块、和聚焦模块的一个或多个。硬件模块可以将命令发送给实现快速自动聚焦的成像硬件,该成像硬件又触发照相机获取图像。在一些实施例中,该硬件模块可以包括上面参考图 1 所述的控制系统 108。

[0183] 照相机模块可以接收来自照相机的图像,并确定像快门时间或焦点那样的参数。图像也可以在被照相机模块处理之前缓存在计算机的存储器中。当对载玻片的倾斜进行初始搜索时,照相机模块也可以发送当看到足以确定适当快门时间或焦点的图像时中断硬件模块的消息。在一些实施例中,该照相机模块包括上面参考图 1 所述的检测器 106。

[0184] 该系统还可以包括聚焦模块,该聚焦模块可以实现成软件、硬件或软件和硬件的组合。在一些实施例中,该聚焦模块检查一堆中的所有帧,并估计该堆离理想或理想焦距有多远。该聚焦模块也可以负责对一堆图像中的每个帧指定聚焦得分。

[0185] 适合执行指令的程序的处理器包括,举例来说,通用和专用微处理器两者、和任何类型计算机的单个处理器或多个处理器之一。一般说来,处理器从只读存储器或随机存取存储器或两者接收指令和数据。计算机包括执行指令的处理器和存储指令和数据的一个或多个存储器。一般说来,计算机还包括存储数据文件的一个或多个大容量存储设备,或可操作地耦合成与其通信;这样的设备包括像内部硬盘和移动盘那样的磁盘;磁光盘;和光盘。

适合有形具体化计算机程序指令和数据的存储设备包括所有形式的非易失性存储器, 举例来说, 包括像 EPROM、EEPROM、和闪速存储设备那样的半导体存储设备; 像内部硬盘和移动盘那样的磁盘; 磁光盘; 以及 CD-ROM 和 DVD-ROM 盘。处理器和存储器可以由 ASIC (专用集成电路) 补充或并入 ASIC 中。

[0186] 为了提供与用户的交互, 该特征可以在含有向用户显示信息的像 CRT (阴极射线管) 或 LCD (液晶显示器) 监视器那样的显示设备、和用户可以向计算机提供输入的键盘和像鼠标或跟踪球那样的定位设备的计算机上实现。可替代地, 该计算机可以没有附在上面的键盘、鼠标、或监视器, 可以通过另一台计算机远程控制。

[0187] 该特征可以在包括像数据处理器那样的后端组件, 包括像应用服务器或互联网服务器那样的中间组件, 包括像含有图形用户界面或互联网浏览器的客户计算机那样的前端组件, 或包括它们的任何组合的计算机系统中实现。系统的组件可以通过像通信网络那样的数字数据通信的任何形式或介质互连。通信网络的例子包括, 例如, LAN (局域网)、WAN (广域网)、和形成互联网的计算机和网络。

[0188] 计算机系统可以包括客户机和服务器。客户机和服务器一般相互远离, 通常通过像所述的一种那样的网络交互。客户机和服务器的关系通过运行在各自计算机上和相互具有客户机-服务器关系的计算机程序建立起来。

[0189] 处理器 910 执行与计算机程序有关的指令。处理器 910 可以包括像逻辑门、加法器、乘法器和计数器那样的硬件。处理器 910 可以进一步包括进行算术和逻辑运算的单独算术逻辑单元 (ALU)。

[0190] 其它实施例

[0191] 要明白的是, 前面的描述旨在例示而不是限制由所附权利要求书的范围限定的本公开的范围。其它方面、优点和修改都在权利要求的范围之内。例如, 尽管前面的描述和图 1 中的示意图讨论了测量来自样品的透射光, 但本文公开的方法和系统也可以用在样品的图像对应于从样品反射的光线的时候。某些样品可能是天然反射的, 或可以加上反射标记, 以便反射光提供确定细胞成分和 / 或数量的便利方法。在一些实施例中, 可以将样品 104 放置在带有反射涂层的像显微镜载玻片那样的衬底的上部。反射涂层可以起使一次透射光回头二次通过样品, 以便测量的“反射”光实际上对应于透过样品两次的入射光的作用。

[0192] 一般说来, 本文公开的方法和系统可以用于为多种不同样品类型确定网状细胞计数、每个网状细胞体积、成分含量、和 / 或样品平均网状细胞体积或平均网状细胞成分。例如, 可以为来自包括血液、骨髓、尿、上皮组织、肿瘤、精液, 痰、和其它组织或循环或还循环生物流体的体液和组织的、包括网状细胞的样品确定网状细胞体积和像血红蛋白或其它蛋白质那样的成分。

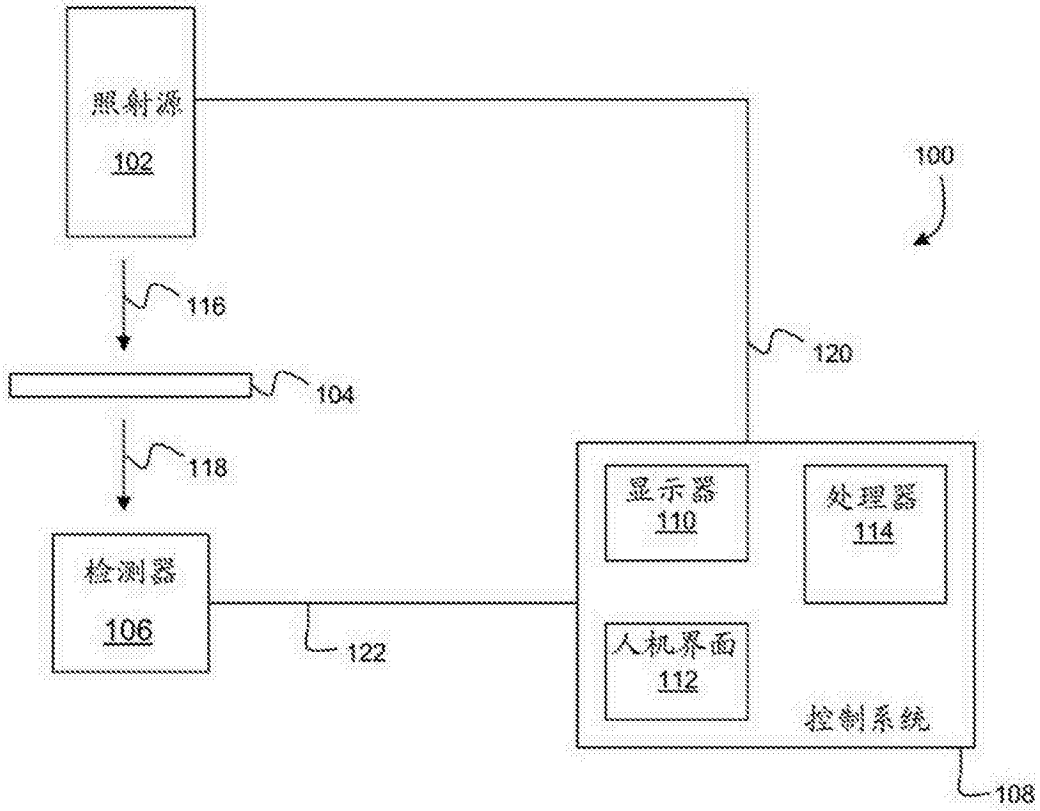


图 1

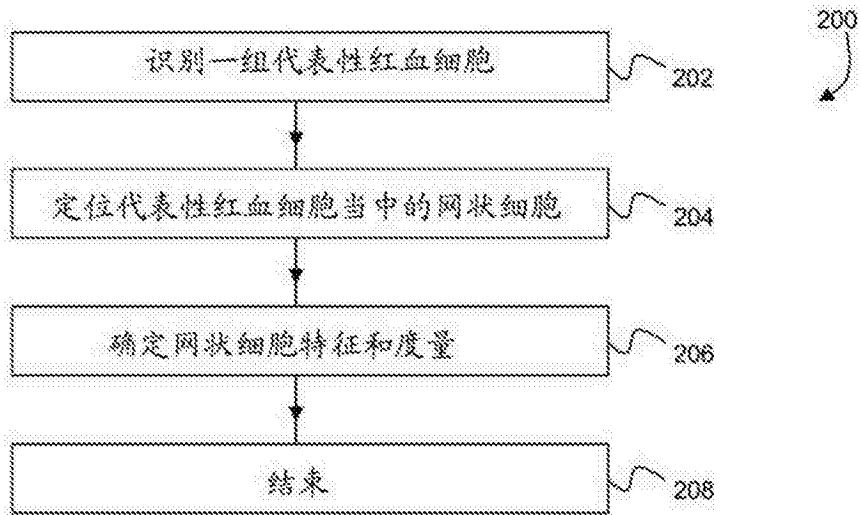


图 2

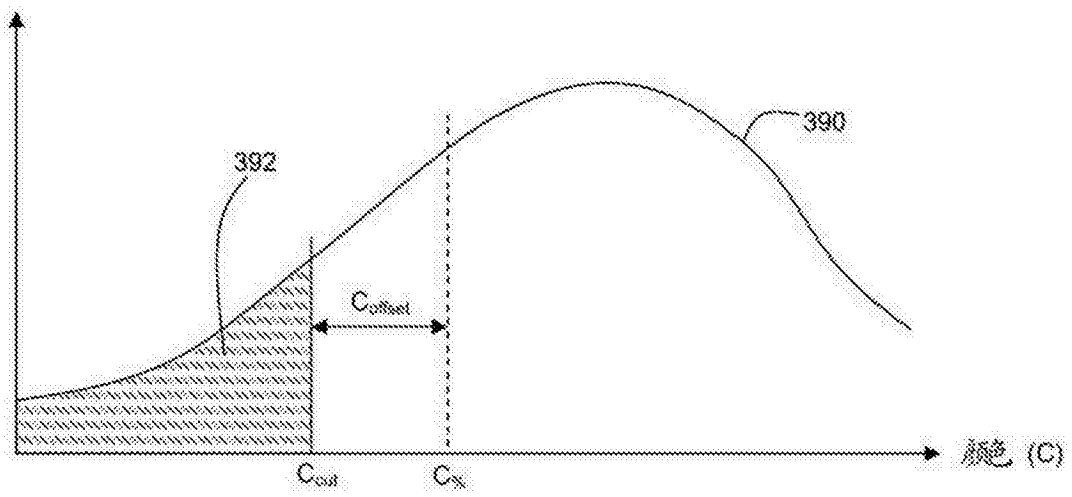


图 3A

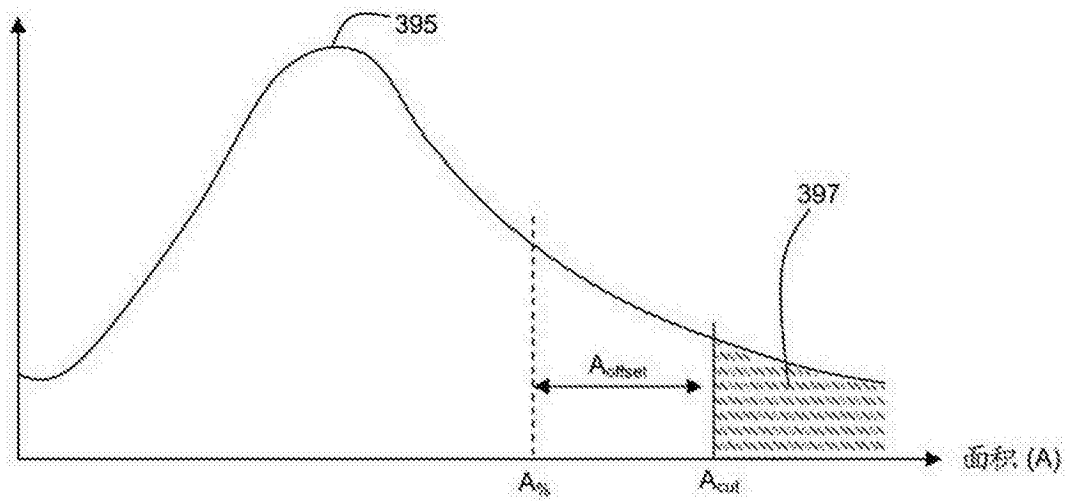


图 3B

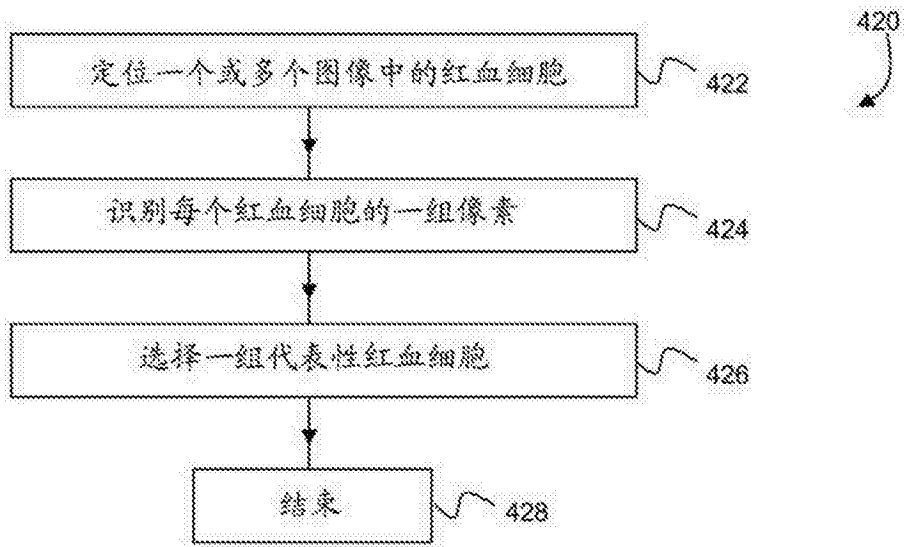


图 4

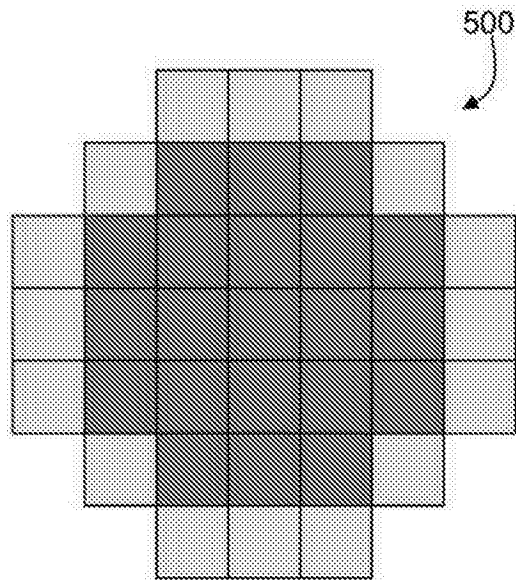


图 5

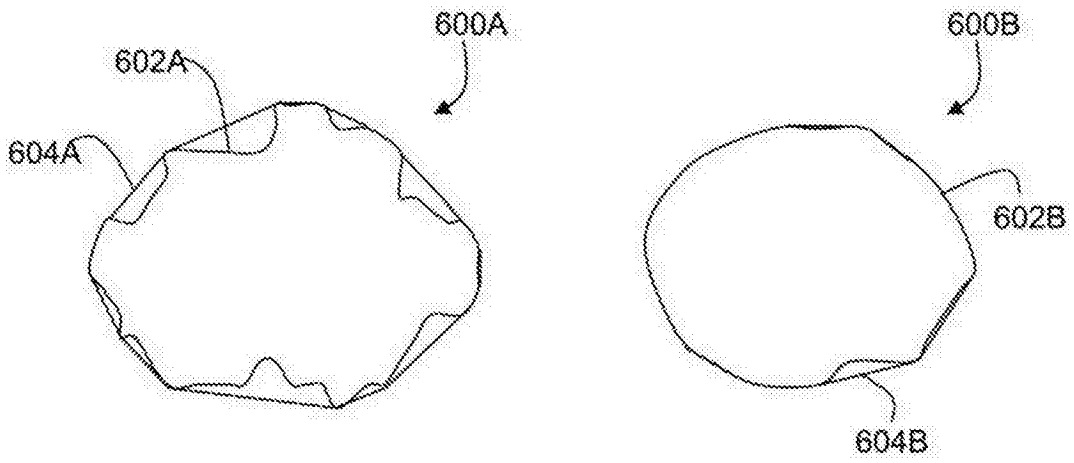


图 6

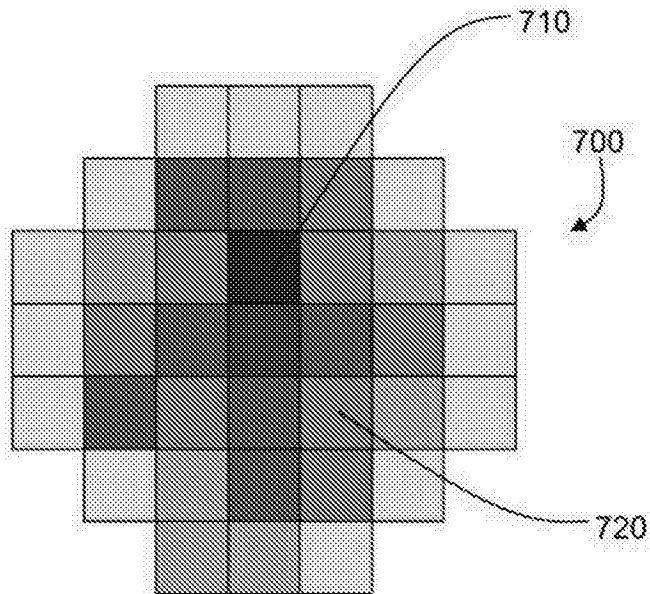


图 7

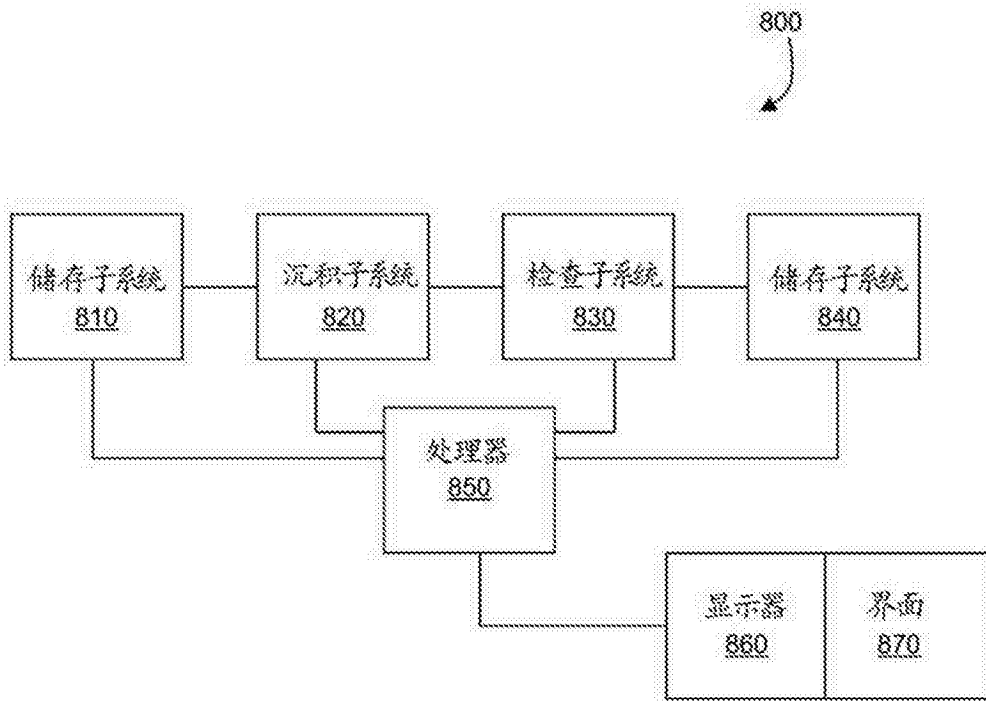


图 8

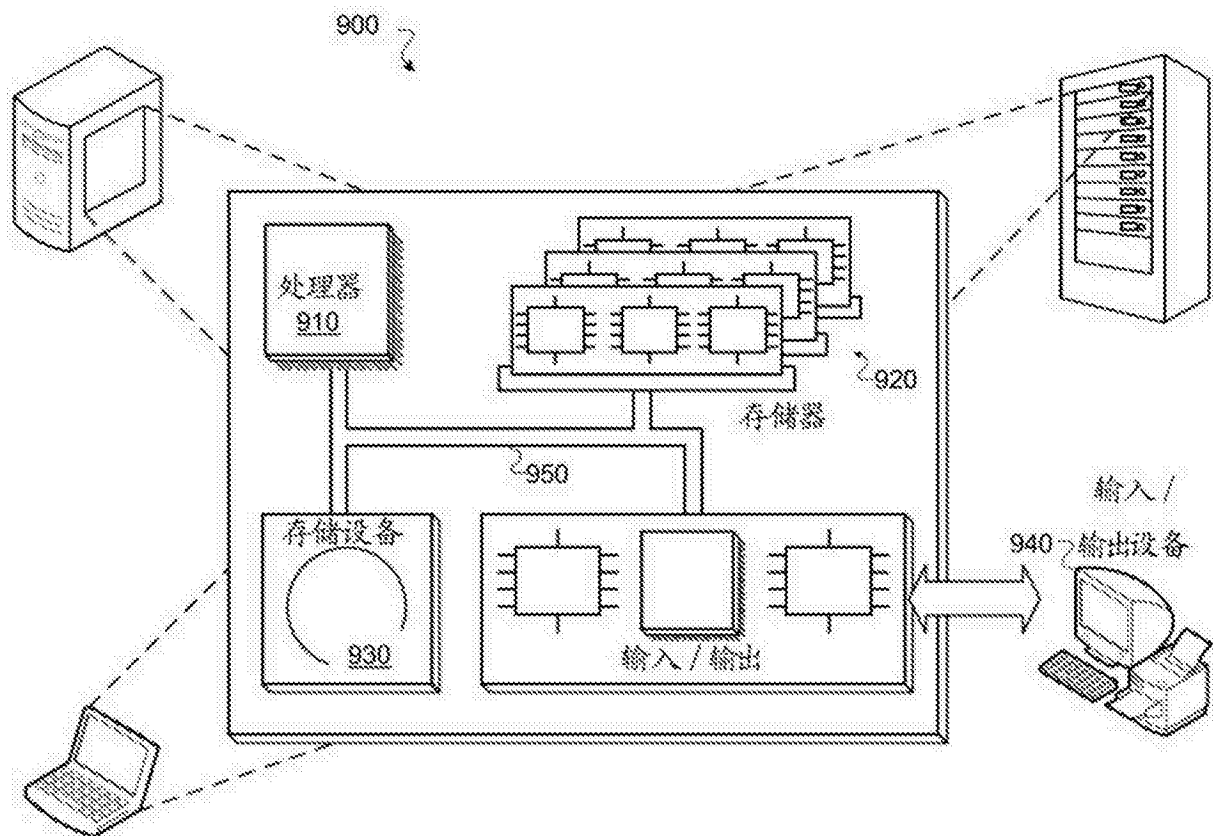


图 9