



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: **2010134422/15, 16.01.2009**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

18.01.2008 SE 0800117.4

29.02.2008 US 61/064,380

(43) Дата публикации заявки: **27.02.2012** Бюл. № 6

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **18.08.2010**

(86) Заявка РСТ:

SE 2009/000015 (16.01.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2009/091318 (23.07.2009)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. А.В. Мицу, рег.№ 364**

(71) Заявитель(и):

ХЕМОКУЭ АБ (SE)

(72) Автор(ы):

ЛИНДБЕРГ Стеллан (SE),

ОЛЕСЕН Том (DK),

ВАЛЬВИК Мартин (DK)

(54) СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ АНАЛИЗА ЧАСТИЦ В ЖИДКОМ ОБРАЗЦЕ

(57) Формула изобретения

1. Способ анализа частиц в жидком образце, причем образец удерживается в устройстве удержания образца, способ содержит этапы, на которых:

получают, посредством устройства получения изображения, множество изображений образца в разных фокальных плоскостях в устройстве удержания образца; и

анализируют указанные изображения, посредством анализатора изображений, для идентификации частиц образца, которые отображаются в фокусе в любом одном из анализируемых изображений, и для идентификации, для каждой из идентифицируемых частиц, в каком из анализируемых изображений идентифицирована частица, и анализа тех частиц, которые были идентифицированы как отображаемые в фокусе в любом одном из анализируемых изображений, с использованием соответствующего изображения, в котором соответствующая частица была идентифицирована как отображаемая в фокусе;

в котором множество изображений получают в разных, по существу, параллельных, фокальных плоскостях, каковые плоскости разнесены друг от друга на расстояние, причем указанное расстояние меньше 10 мкм;

причем на этапе идентификации частиц, которые отображаются в фокусе, для

каждой частицы:

находят изображение, в котором частица является различимой;
определяют наибольшее различие в интенсивности света между областью изображения, занятой частицей, и областью изображения, где нет различимых частиц;
определяют соответствующие различия в интенсивности света в других изображениях, где различима та же частица; и
идентифицируют изображение, где различие в интенсивности света максимально;
из чего заключают, что частица находится в фокусе в этом идентифицированном изображении.

2. Способ анализа частиц в жидком образце, причем образец удерживается в устройстве удержания образца, способ содержит этапы, на которых:

получают, посредством устройства получения изображения, множество изображений образца в разных фокальных плоскостях в устройстве удержания образца; и

анализируют указанные изображения, посредством анализатора изображений, для идентификации частиц образца, которые отображаются в фокусе в любом одном из анализируемых изображений, и для идентификации, для каждой из идентифицируемых частиц, в каком из анализируемых изображений идентифицирована частица, и анализа тех частиц, которые были идентифицированы как отображаемые в фокусе в любом из анализируемых изображений, с использованием соответствующего изображения, в котором соответствующая частица идентифицирована как отображаемая в фокусе;
в котором множество изображений получают в разных, по существу, параллельных, фокальных плоскостях, каковые плоскости разнесены друг от друга на расстояние, причем указанное расстояние меньше 10 мкм;

причем на этапе идентификации частиц, которые отображаются в фокусе, для каждой частицы:

находят изображение, в котором частица является различимой;
задают область этого найденного изображения, каковая область содержит частицу и ее ближайшее окружение;
определяют дисперсию пикселя этой заданной области;
определяют дисперсию пикселя соответствующей области других изображений, где различима та же частица; и
идентифицируют изображение, где дисперсия пикселя максимальна;
из чего заключают, что частица находится в фокусе в этом идентифицированном изображении.

3. Способ по п.1 или 2, в котором расстояние меньше 5 мкм, предпочтительно, меньше 2 мкм.

4. Способ по п.1 или 2, в котором способ дополнительно содержит этапы, на которых накладывают друг на друга множество изображений, и, таким образом, получают объединенное изображение, содержащее все частицы, отображаемые в фокусе в разных фокальных плоскостях.

5. Способ по п.1 или 2, в котором получают только по одному изображению для каждой фокальной плоскости.

6. Способ по п.1 или 2, в котором получают, по меньшей мере, 10, предпочтительно, по меньшей мере, 100 и, более предпочтительно, по меньшей мере, 200 изображений.

7. Способ по п.1 или 2, в котором устройство удержания образца предназначено представлять жидкий образец для создания изображений таким образом, чтобы образец имел глубину, перпендикулярно фокальным плоскостям, по меньшей мере, 100 мкм, предпочтительно, по меньшей мере, 200 мкм, более предпочтительно, по меньшей мере, 500 мкм.

8. Способ по п.1 или 2, в котором устройство удержания образца предназначено представлять жидкий образец для создания изображений таким образом, чтобы образец имел глубину, перпендикулярно фокальным плоскостям, 1 мм или менее.

9. Способ по п.1 или 2, в котором жидкий образец является биологическим образцом.

10. Способ по п.1 или 2, в котором жидкий образец является образцом крови.

11. Способ по п.1 или 2, в котором частицы являются эйкариотическими клетками, предпочтительно, клетками млекопитающих, более предпочтительно, клетками человека.

12. Способ по п.1 или 2, в котором частицы являются бактериями, вирусами или тромбоцитами.

13. Способ по п.1 или 2, в котором частицы имеют максимальный диаметр меньше 20, предпочтительно, меньше 10, более предпочтительно, меньше 2 мкм.

14. Способ по п.1 или 2, в котором на этапе анализа частиц, которые были идентифицированы как отображаемые в фокусе, определяют типы и количества частиц, причем типы различаются по физическим характеристикам частиц, что позволяет определять соотношения между разными типами частиц в образце.

15. Способ по п.1 или 2, в котором частицы, подлежащие анализу, окрашивают посредством окрашивающего агента, до получения изображений.

16. Способ по п.15, в котором жидкий образец контактирует с окрашивающим агентом, причем окрашивающий агент пребывает в сухом виде, в устройстве удержания образца, благодаря чему окрашивающий агент растворяется в образце.

17. Способ по п.15, в котором окрашивающий агент является флуоресцентным окрашивающим агентом.

18. Способ по п.1 или 2, в котором устройство получения изображения является цифровой камерой.

19. Способ по п.1 или 2, в котором изображения, полученные посредством устройства получения изображения, получают с увеличением жидкого образца, причем увеличение достигается посредством светопреломляющего элемента, такого как линза.

20. Способ по п.1 или 2, в котором изображаемый объем образца задается изображаемой площадью образца, умноженной на глубину образца, охваченного множеством изображений.

21. Измерительное устройство для анализа частиц в жидком образце, причем устройство содержит устройство получения изображения, анализатор изображений, держатель, предназначенный для поддержки устройства удержания образца, удерживающего жидкий образец, и светопреломляющий элемент, расположенный между устройством получения изображения и держателем;

в котором фокальная плоскость может скачкообразно перемещаться в устройстве удержания образца, когда оно поддерживается держателем, что позволяет устройству получения изображения получать множество изображений образца в разных фокальных плоскостях в устройстве удержания образца, причем разные фокальные плоскости по существу, параллельны друг другу и разнесены друг от друга на расстояние, причем указанное расстояние меньше 10 мкм;

в котором анализатор изображений предназначен для анализа, по меньшей мере, одного полученного изображения для идентификации, какие из частиц отображаются в фокусе, и анализа тех частиц, которые идентифицированы как отображаемые в фокусе;

причем идентификация частиц, которые отображаются в фокусе, осуществляется для каждой частицы путем:

нахождения изображения, в котором частица является различимой;
определения наибольшего различия в интенсивности света между областью изображения, занятой частицей, и областью изображения, где нет различимых частиц;
определения соответствующих различий в интенсивности света в других изображениях, где различима та же частица; и
идентификации изображения, где различие в интенсивности света максимально;
что позволяет сделать вывод, что частица находится в фокусе в этом идентифицированном изображении.

22. Измерительное устройство для анализа частиц в жидком образце, причем устройство содержит устройство получения изображения, анализатор изображений, держатель, предназначенный для поддержки устройства удержания образца, удерживающего жидкий образец, и светопреломляющий элемент, расположенный между устройством получения изображения и держателем;

в котором фокальная плоскость может скачкообразно перемещаться в устройстве удержания образца, когда оно поддерживается держателем, что позволяет устройству получения изображения получать множество изображений образца в разных фокальных плоскостях в устройстве удержания образца, причем разные фокальные плоскости по существу, параллельны друг другу и разнесены друг от друга на расстояние, причем указанное расстояние меньше 10 мкм;

в котором анализатор изображений предназначен для анализа, по меньшей мере, одного полученного изображения для идентификации, какие из частиц отображаются в фокусе, и анализа тех частиц, которые идентифицированы как отображаемые в фокусе;

причем идентификация частиц, которые отображаются в фокусе, осуществляется для каждой частицы путем:

нахождения изображения, в котором частица является различимой;

задания области этого найденного изображения, каковая область содержит частицу и ее ближайшее окружение;

определения дисперсии пикселя этой заданной области;

определения дисперсии пикселя соответствующей области других изображений, где различима та же частица; и

идентификации изображения, где дисперсия пикселя максимальна;

что позволяет сделать вывод, что частица находится в фокусе в этом идентифицированном изображении.

23. Устройство по п.21 или 22, в котором расстояние меньше 5 мкм, предпочтительно, меньше 2 мкм.