



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101900668 A

(43) 申请公布日 2010.12.01

(21) 申请号 201010153043.5

代理人 王漪 郑霞

(22) 申请日 2005.10.27

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

60/631,025 2004.11.24 US

G01N 21/01 (2006.01)

60/631,027 2004.11.24 US

G01N 21/84 (2006.01)

60/631,026 2004.11.24 US

(62) 分案原申请数据

200580046364.2 2005.10.27

(71) 申请人 巴特尔纪念研究所

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 约翰·S·拉乌多

艾伯特·E·韦勒三世

史蒂芬·格莱姆斯

托马斯·D·豪伯特

艾瑞克·R·纳文

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

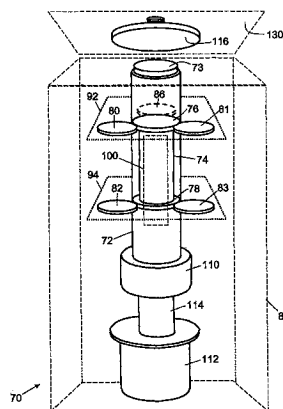
权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图 14 页

(54) 发明名称

样品试管操纵装置

(57) 摘要

公开了一种样品试管操纵装置。其中试管(72、72')界定试管轴线(75)并包含或支持在环状样品区(12)中的关联的样品。至少两个定位轴承(80、81、81'、82、83、110、140、142、181、182、183、184、211、212)试管轴线在环状样品区的相对侧与试管接合。至少一个偏置轴承(86、86'、87、140、142、204)与至少两个定位轴承径向地分隔开,并对着至少两定位轴承压试管,以相对于至少两定位轴承对准环状样品区的一部分。电动机(112)与试管接合以选择性地旋转试管。



1. 一种用于操纵关联的试管的试管操纵装置,所述试管包含或支持在环状样品区中的样品,所述试管操纵装置包括:

至少两个定位轴承,至少一个所述定位轴承布置在所述环状样品区的第一侧,至少一个其他的所述定位轴承布置在所述环状样品区的第二侧,所述环状样品区的所述第二侧沿所述关联的试管的管轴线与所述环状样品区的所述第一侧相对;

机械偏置设备,所述机械偏置设备设置成对着所述至少两个定位轴承偏置所述关联的试管,以相对于所述至少两个定位轴承对准所述环状样品区的一部分;以及

旋转式联接器,所述旋转式联接器设置成响应于所施加的扭矩,来驱动所述试管绕所述管轴线旋转。

2. 如权利要求 1 所述的试管操纵装置,其中所述至少两个定位轴承被从由下述组成的组中选择:滚柱、球轴承,和衬套表面。

3. 如权利要求 1 所述的试管操纵装置,其中所述旋转式联接器还界定布置在所述环状样品区的所述第二侧上的定位轴承,所述环状样品区的所述第二侧沿所述关联的试管的所述管轴线与所述环状样品区的所述第一侧相对。

4. 如权利要求 1 所述的试管操纵装置,其中所述机械偏置设备包括:  
至少一个偏置轴承。

5. 如权利要求 4 所述的试管操纵装置,其中所述至少一个偏置轴承和所述至少两个定位轴承被安排在所述环状样品区的所述第一侧上的第一公共平面中和所述环状样品区的所述第二侧上的第二公共平面中,所述第一公共平面和所述第二公共平面通常横切所述关联的试管的所述管轴线。

6. 如权利要求 5 所述的试管操纵装置,其中所述第一公共平面和所述第二公共平面与布置在所述关联的试管中的关联的浮体的脊对准。

7. 如权利要求 6 所述的试管操纵装置,其中所述第一公共平面和所述第二公共平面关于所述管轴线以相应于所述关联的浮体的所述脊的螺旋间距的间距倾斜。

8. 如权利要求 1 所述的试管操纵装置,其中至少一个偏置轴承和所述至少两个定位轴承包括:

安排在所述环状样品区的所述第一侧上的第一公共平面中的第一组轴承,所述第一组轴承包括至少一个定位轴承和至少一个偏置轴承。

9. 如权利要求 8 所述的试管操纵装置,其中所述至少一个偏置轴承和所述至少两个定位轴承还包括:

安排在所述环状样品区的所述第二侧上的第二公共平面中的第二组轴承,所述第二组轴承包括至少一个定位轴承和至少一个偏置轴承。

10. 如权利要求 8 所述的试管操纵装置,其中所述第一组轴承中的所述轴承分隔开  $120^\circ$  的径向间隔。

11. 如权利要求 8 所述的试管操纵装置,其中所述第一组轴承包括两个定位轴承和一个偏置轴承。

12. 如权利要求 8 所述的试管操纵装置,其中所述第一组轴承包括两个偏置轴承和一个定位轴承。

13. 如权利要求 1 所述的试管操纵装置,其中所述定位轴承和所述偏置轴承是滚柱,所

述滚柱关于所述管轴线倾斜以产生与所述管轴线平行的力分量。

14. 如权利要求 1 所述的试管操纵装置,其中所述旋转式联接器包括:

成形联接器,其具有设置成与所述关联的试管的成形基部相匹配的轮廓。

15. 如权利要求 14 所述的试管操纵装置,其中所述成形联接器和所述关联的试管的所述成形基部被调节,以当所述关联的试管的所述成形基部与所述成形联接器相匹配时限定所述关联的试管的绝对旋转位置。

16. 如权利要求 1 所述的试管操纵装置,其中所述试管被安排为由所述至少两个定位轴承水平地支持,并且所述机械偏置设备包括重力偏置设备。

17. 一种样品操纵装置,包括:

试管,所述试管界定试管轴线并包含或支持在环状样品区中的关联的样品;

至少两个定位轴承,所述至少两个定位轴承沿所述试管轴线在所述环状样品区的相对侧与所述试管接合;

至少一个偏置轴承,所述至少一个偏置轴承与所述至少两个定位轴承径向地分隔开,并对着所述至少两个定位轴承压所述试管,以相对于所述至少两个定位轴承对准所述环状样品区的一部分;以及

电动机,所述电动机与所述试管接合以选择性地旋转所述试管。

18. 如权利要求 17 所述的样品操纵装置,其中所述定位轴承中之一包括布置在所述试管的基部的旋转式联接器,所述旋转式联接器还可操作地将电动机与所述试管连接。

19. 如权利要求 17 所述的样品操纵装置,还包括:

布置在所述试管中的浮体,所述环状样品区被布置在所述浮体和所述试管的内表面之间的环状间隙内。

20. 如权利要求 19 所述的样品操纵装置,其中所述浮体包括接合所述试管的所述内表面以密封所述样品区的密封脊,所述至少两个定位轴承在所述密封脊处接合所述试管。

21. 如权利要求 20 所述的样品操纵装置,其中所述至少一个偏置轴承包括也在所述密封脊处接合所述试管的至少两个偏置轴承。

22. 如权利要求 20 所述的样品操纵装置,其中所述密封脊围绕所述浮体成螺旋状,并且所述定位轴承响应于所述试管经由所述旋转式联接器的旋转而跟踪螺旋的所述密封脊。

23. 如权利要求 17 所述的样品操纵装置,其中所述关联的样品接触所述试管的内表面和所述试管的外表面中之一。

24. 一种用于操纵关联的试管的试管操纵装置,所述关联的试管包含或支持在环状样品区的样品,所述试管操纵装置包括:

固定轴承,其在所述环状样品区的第一侧与所述关联的试管接合;

偏置轴承,其布置成对着所述固定轴承压所述试管;以及

旋转式联接器,其与所述试管接合以传送所施加的扭矩来旋转所述试管。

25. 如权利要求 24 所述的试管操纵装置,其中所述固定轴承包括:

至少两个径向地分隔开的固定轴承。

26. 如权利要求 24 所述的试管操纵装置,其中所述偏置轴承包括:

沿着所述试管的轴线分隔开的至少两个偏置轴承。

27. 如权利要求 24 所述的试管操纵装置,还包括:

偏置弹簧,所述偏置弹簧对着所述试管压所述偏置轴承。

28. 如权利要求 24 所述的试管操纵装置,其中所述旋转式联接器包括:

通过所述施加的扭矩来旋转的所述固定轴承或所述偏置轴承中的一个或多个。

29. 如权利要求 24 所述的试管操纵装置,其中所述旋转式联接器与所述关联的试管的基部耦合,所述旋转式联接器和所述基部包括匹配的轮廓。

30. 如权利要求 29 所述的试管操纵装置,其中所述匹配的轮廓被调节为限定绝对旋转位置。

## 样品试管操纵装置

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 10 月 27 日、申请号为 200580046364.2、发明名称为“用于细胞成像的光学系统”的原申请的分案申请。

[0002] 本申请要求于 2004 年 11 月 24 日提交的在这里通过参考全部加入的美国临时申请 No. 60/631.025 的权益。本申请还要求于 2004 年 11 月 24 日提交的在这里通过参考全部加入的美国临时申请 No. 60/631.026 的权益。本申请还要求于 2004 年 11 月 24 日提交的在这里通过参考全部加入的美国临时申请 No. 60/631.027 的权益。

### 技术领域

[0003] 本发明申请涉及成像技术，特别地涉及一种稀有细胞的成像。

### 背景技术

[0004] 下列内容涉及成像技术。参照示例性实施方式具体描述下列内容，所述实施方式涉及离心血样的血沉棕黄层中的稀有细胞例如上皮细胞的成像。然而，下列内容更一般地涉及用于在大的视场产生实质上均匀的静态照明的照明系统，以及涉及使用同样原理的显微镜。

[0005] 在定量血沉棕黄层分析技术中，使用抗凝血添加剂、离心法等将血液分离成包括血沉棕黄层成分的组分来提取和处理全血样品，血沉棕黄层主要包含白血球。使用合适的荧光染料来标记出现在血沉棕黄层中的感兴趣的稀有细胞，如与一些癌有关的一些上皮细胞，然后使用荧光显微成像来计数荧光染料所标记的感兴趣的细胞。定量血沉棕黄层分析是用于筛检一些癌、用于监控癌治疗等的有希望的非侵害性技术。

[0006] 血沉棕黄层中的荧光染料标记的稀有细胞的浓度是低的。光学扫描荧光显微术通过相对于血沉棕黄层样品扫描显微镜的视场能够实现大面积的血沉棕黄层样品的评估。通过相对于血沉棕黄层样品移动显微镜、通过相对于显微镜移动血沉棕黄层或通过其中的一些组合可实现扫描。用高强度均匀光照明的大视场对于快速和准确地分析血沉棕黄层样品中荧光染料标记的稀有细胞是有利的。所述照明还可方便地使用单色光或窄带宽光以便促进稀有细胞荧光和分散照明之间的光谱差异。

[0007] 然而，在大的视场范围内提供均匀的高强度照明是困难的。

[0008] 在白光源的情况下，一般需要滤波以提供单色或至少在光谱上被限制的照明。光谱滤波阻挡了在所选的光谱范围外的大部分光输出。因此，用白光源照明是光效率低的。高强度白炽白光源例如氙灯也产生大量的热，这可不利地影响定量血沉棕黄层分析。

[0009] 激光光源在产生光谱窄的光方面是更光学有效的。例如，氩激光器在 488nm 和 514nm 输出高强度窄光谱线，以及在其它波长输出较弱的线。这些波长适于在一些标记染料中激发发光，这些染料在约 550nm 处发光。

[0010] 然而，激光器一般输出严格平行光束 (collimated beam)，其在窄光束截面区具有高度不均匀的高斯强度曲线或分布。此外，激光束是相干的，以及由于波前之间的干涉一般呈现出散斑图。所述散斑图可具有与稀有细胞的典型尺寸重叠的空间频率。当扫描所述视

场时,所述散斑图还可移动或改变。激光的这些方面实质上使确定所检测的发光特征是荧光染料标记的稀有细胞还是照明假象变得复杂化。

[0011] 使用光束均匀器可改善空间均匀性。一种光束均匀器通过提供实质上抵消高斯光束分布的逆高斯吸收分布来操作。另一种光束均匀器以将所述光重新分布成平的空间分布的方式使用两个或更多透镜(或复合透镜)来折射高斯光束。然而,在显微荧光成像中使用光束均匀器是存在问题的,因为通过显微镜物镜聚焦均匀的光束可引入另外的光束不均匀性。此外,光束均匀器实质上一般不降低散斑不均匀性。

[0012] 在称作共焦显微术的另一方法中,激光束在大的视场快速扫描或扫掠。所述视场被采样而不是作为整体成像。在此动态方法中,在任何给定时刻及时照明的样品的部分比所述视场小的多。通过在所述视场上快速扫描聚焦的激光束,从所获得的样品点可构造图像。通过快速采样所述视场实际上动态模拟了均匀照明。

[0013] 共焦显微术是已建立的技术。然而,所述光束扫描实质上增加了显微镜系统的复杂性和成本。共焦显微术对透镜或其它光学部件中的小缺陷还可能是高度灵敏的。因此,应使用很高质量的光学器件,这又增加了系统成本。

[0014] 参考引入

[0015] 于2002年10月3日提交的no. 10/263,974以及于2004年4月8日被公布为美国Publ. Appl. No. 2004/0067162A1的美国申请,在这里通过参考被全部加入。

[0016] 于2002年10月3日提交的no. 10/263,975以及于2004年4月8日被公布为美国Publ. Appl. No. 2004/0067536A1的美国申请,在这里通过参考被全部加入。

[0017] 与本发明同时提交,题目为“《用于稀有细胞的检测的方法和设备》(Method and Apparatus for Detection of Rare Cells)”,发明人为Albert E. Weller, III,以及相应于代理人档案号no. BATZ 00009的美国专利申请no. \_\_\_\_\_,在这里通过参考被全部加入。

[0018] 与本发明同时提交,题目为“《取样管处理设备》(Sample Tube Handling Apparatus)”,发明人为Steve Grimes、Thomas D. Hauber和Eric R. Navin,以及相应于代理人档案号no. BATZ 200010的美国专利申请no. \_\_\_\_\_,在这里通过参考被全部加入。

## 发明内容

[0019] 根据一个方面,公开了一种用于操纵关联的试管的试管操纵装置,所述试管包含或支持在环状样品区中的样品,所述试管操纵装置包括:至少两个定位轴承,至少一个所述定位轴承布置在所述环状样品区的第一侧,至少一个其他的所述定位轴承布置在所述环状样品区的第二侧,所述环状样品区的所述第二侧沿所述关联的试管的管轴线与所述环状样品区的所述第一侧相对;机械偏置设备,所述机械偏置设备设置成对着所述至少两个定位轴承偏置所述关联的试管,以相对于所述至少两个定位轴承对准所述环状样品区的一部分;以及旋转式联接器,所述旋转式联接器设置成响应于所施加的扭矩,来驱动所述试管绕所述管轴线旋转。

[0020] 优选地,所述至少两个定位轴承被从由下述组成的组中选择:滚柱、球轴承,和衬套表面。

[0021] 优选地,所述旋转式联接器还界定布置在所述环状样品区的所述第二侧上的

定位轴承,所述环状样品区的所述第二侧沿所述关联的试管的所述管轴线与所述环状样品区的所述第一侧相对。

[0022] 优选地,所述机械偏置设备包括:至少一个偏置轴承。

[0023] 优选地,所述至少一个偏置轴承和所述至少两个定位轴承被安排在所述环状样品区的所述第一侧上的第一公共平面中和所述环状样品区的所述第二侧上的第二公共平面中,所述第一公共平面和所述第二公共平面通常横切所述关联的试管的所述管轴线。

[0024] 优选地,所述第一公共平面和所述第二公共平面与布置在所述关联的试管中的关联的浮体的脊对准。

[0025] 优选地,所述第一公共平面和所述第二公共平面关于所述管轴线以相应于所述关联的浮体的所述脊的螺旋间距的间距倾斜。

[0026] 优选地,至少一个偏置轴承和所述至少两个定位轴承包括:安排在所述环状样品区的所述第一侧上的第一公共平面中的第一组轴承,所述第一组轴承包括至少一个定位轴承和至少一个偏置轴承。

[0027] 优选地,所述至少一个偏置轴承和所述至少两个定位轴承还包括:安排在所述环状样品区的所述第二侧上的第二公共平面中的第二组轴承,所述第二组轴承包括至少一个定位轴承和至少一个偏置轴承。

[0028] 优选地,所述第一组轴承中的所述轴承分隔开  $120^\circ$  的径向间隔。

[0029] 优选地,所述第一组轴承包括两个定位轴承和一个偏置轴承。

[0030] 优选地,所述第一组轴承包括两个偏置轴承和一个定位轴承。

[0031] 优选地,所述定位轴承和所述偏置轴承是滚柱,所述滚柱关于所述管轴线倾斜以产生与所述管轴线平行的力分量。

[0032] 优选地,所述旋转式连接器包括:成形连接器,其具有设置成与所述关联的试管的成形基部相匹配的轮廓。

[0033] 优选地,所述成形连接器和所述关联的试管的所述成形基部被调节,以当所述关联的试管的所述成形基部与所述成形连接器相匹配时限定所述关联的试管的绝对旋转位置。

[0034] 优选地,所述试管被安排为由所述至少两个定位轴承水平地支持,并且所述机械偏置设备包括重力偏置设备。

[0035] 根据另一个方面,公开了一种样品操纵装置,包括:试管,所述试管界定试管轴线并包含或支持在环状样品区中的关联的样品;至少两个定位轴承,所述至少两个定位轴承沿所述试管轴线在所述环状样品区的相对侧与所述试管接合;至少一个偏置轴承,所述至少一个偏置轴承与所述至少两个定位轴承径向地分隔开,并对着所述至少两个定位轴承压所述试管,以相对于所述至少两个定位轴承对准所述环状样品区的一部分;以及电动机,所述电动机与所述试管接合以选择性地旋转所述试管。

[0036] 优选地,所述定位轴承中之一包括布置在所述试管的基部的旋转式连接器,所述旋转式连接器还可操作地将电动机与所述试管连接。

[0037] 优选地,样品操纵装置还包括:布置在所述试管中的浮体,所述环状样品区被布置在所述浮体和所述试管的内表面之间的环状间隙内。

[0038] 优选地,所述浮体包括接合所述试管的所述内表面以密封所述样品区的密封脊,

所述至少两个定位轴承在所述密封脊处接合所述试管。

[0039] 优选地,所述至少一个偏置轴承包括也在所述密封脊处接合所述试管的至少两个偏置轴承。

[0040] 优选地,所述密封脊围绕所述浮体成螺旋状,并且所述定位轴承响应于所述试管经由所述旋转式联接器的旋转而跟踪螺旋的所述密封脊。

[0041] 优选地,所述关联的样品接触所述试管的内表面和所述试管的外表面中之一。

[0042] 根据又一个方面,公开了一种用于操纵关联的试管的试管操纵装置,所述关联的试管包含或支持在环状样品区的样品,所述试管操纵装置包括:固定轴承,其在所述环状样品区的第一侧与所述关联的试管接合;偏置轴承,其布置成对着所述固定轴承压所述试管;以及旋转式联接器,其与所述试管接合以传送所施加的扭矩来旋转所述试管。

[0043] 优选地,所述固定轴承包括:至少两个径向地分隔开的固定轴承。

[0044] 优选地,所述偏置轴承包括:沿着所述试管的轴线分隔开的至少两个偏置轴承。

[0045] 优选地,试管操纵装置还包括:偏置弹簧,所述偏置弹簧对着所述试管压所述偏置轴承。

[0046] 优选地,所述旋转式联接器包括:通过所述施加的扭矩来旋转的所述固定轴承或所述偏置轴承中的一个或多个。

[0047] 优选地,所述旋转式联接器与所述关联的试管的基部耦合,所述旋转式联接器和所述基部包括匹配的轮廓。

[0048] 优选地,所述匹配的轮廓被调节为限定绝对旋转位置。

[0049] 本发明的许多优点和益处在本领域的普通技术人员阅读下面优选实施方式的详细说明时将变得显而易见。

## 附图说明

[0050] 本发明可采取多种部件和部件配置以及多种过程操作和过程操作配置的形式。附图仅是为了说明优选实施方式,以及不解释为限制本发明。

[0051] 图 1 简要示出包括光学系统的显微镜系统,光学系统实质上在整个显微镜视场提供大体上均匀的静态照明。

[0052] 图 2 简要示出具有修改的光学系统的图 1 的显微镜系统。

[0053] 图 3 简要示出具有另一修改的光学系统的图 1 的显微镜系统。

[0054] 图 4 简要示出具有又一修改的光学系统的图 1 的显微镜系统。

[0055] 图 5-10 示出试管支架的多个视图:

[0056] 图 5 示出所述支架的透视图,其中框架以虚线显示以展示内部部件。

[0057] 图 6 示出所述支架的侧视图,其中框架以虚线显示。

[0058] 图 7 示出试管以及定位和偏置轴承的透视图。

[0059] 图 8 示出包括偏置力的指示的试管支架的顶视图。

[0060] 图 9 示出包括成形基部的试管的第二端的侧视图。

[0061] 图 10 示出旋转联接器的顶视图,旋转联接器包括设置成与图 9 所示的试管的成形基部匹配的轮廓。

[0062] 图 11A 和 11B 示出另一实施方式的试管支架的顶视图,其中试管具有被加载的偏



心截面。

[0063] 图 12 示出使用倾斜滚柱轴承的试管支架的一部分的侧视图。

[0064] 图 13 示出使用倾斜滚柱轴承的试管支架的一部分的侧视图,滚柱轴承沿试管轴交错,以及具有螺旋形脊的浮体能够实现试管的螺旋扫描。

[0065] 图 14 示出试管支架的透视图,试管支架水平支持试管以及使用试管作为偏置力。

[0066] 图 15 示出试管支架的顶视图,试管支架使用衬套表面作为定位轴承以及使用一组球轴承作为偏置轴承。

[0067] 图 16 简要描述与执行定量血沉棕黄层分析有关的一些测量参数,该分析使用在试管内壁和浮体外表面之间的环状间隙中收集的血沉棕黄层样品。

[0068] 图 17 简要示出合适的定量血沉棕黄层测量 / 分析方法。

[0069] 图 18 简要示出另一合适的定量血沉棕黄层测量 / 分析方法。

[0070] 图 19 简要示出用于标记候选细胞的合适的图像处理方法。

[0071] 图 20 示出用于方形滤波核 (filter kernel) 的像素布局,方形滤波核适于在匹配滤波中使用。

[0072] 图 21 示出图 20 的方形滤波核的像素强度截面 A-A。

[0073] 图 22 简要示出用于使分析员能够确认或拒绝候选细胞的合适的用户验证过程。

[0074] 优选实施方式的详细说明

[0075] 参考图 1,显微镜系统 10 使与血沉棕黄层样品重合的显微镜视场成像,所述棕黄层样品布置在环状间隙 12 的大体上平面的部分,所述环状间隙 12 在透光试管壁 14 和布置在试管内的浮体的浮体壁 16 之间。用于获得和制备这样的血沉棕黄层样品的合适的方法和装置在例如美国 Publ. Appl. No. 2004/0067162 A1 和美国 Publ. Appl. No. 2004/0067536 A1 中公开。

[0076] 尽管所述试管和浮体是弯曲的,所述显微镜视场通常是平面的,因为所述显微镜视场一般比试管壁 14 和浮体壁 16 的曲率半径在尺寸上小的多。虽然所述视场实质上是平的,然而布置在透光试管壁 14 和浮体壁 16 之间的血沉棕黄层样品可具有的厚度实质上大于显微镜系统 10 的景深 (depth of view)。

[0077] 所述试管以有助于扫描跨越所述环状间隙的显微镜视场的方式安装在相应于显微镜系统 10 的固定位置。正如将要讨论的,优先提供合适的机制,以在包含血沉棕黄层样品的环状间隙范围内实现视场的相对旋转和 / 或平移扫描。

[0078] 显微镜系统 10 包括激光器 18,例如气体激光器、固态激光器、半导体激光二极管等,其产生激光束形式的源光 20 (在图 1 中用虚线简要示出),所述激光束具有照明波长和不均匀的空间分布,该分布一般为高斯或大致高斯形状,在所述光束的中心区强度最高,以及随着离光束中心的距离增加,强度降低。光学组件 22 设置成接收空间不均匀源光 20 以及输出校正的空间分布。

[0079] 光束扩散器包括:凹透镜 24,其一般使激光束发散;和以较大的直径校准扩散光束的准直透镜 26,该直径实质上与光束均匀器 30 的高斯空间特性曲线的直径匹配。光束均匀器 30 实质上通过使所述源光的高斯或其它不均匀分布均匀来使扩展的激光束变平,以产生具有改善的空间均匀性的输出光。

[0080] 在一些实施方式中,光束均匀器 30 通过具有相应于逆高斯的空间不均匀吸收分

布来操作。在这样的实施方式中,所述光束均匀器在相应于所述扩展激光来的最高强度中心区域的中心区域内具有最高的吸收,以及在相应于所述扩展激光束的较低强度外部区域的周边具有较低的吸收或无吸收。

[0081] 在其它实施方式中,光束均匀器 30 例如使用合适的透镜对来折射性地重新分布光以使在所述扩展激光束的所述区域的光强度均匀化。折射的光束均匀器将来自所述扩展激光束的高强度中心区的光折射进较低强度的周边区域。

[0082] 聚焦透镜 34 和配合透镜 36 将扩展且平或均匀的激光束减少到期望的光束直径以输入到物镜 40,激光束在显微镜视场被聚焦。二向色镜 44 被选择以实质上在激光束波长或波长范围反射光,以及实质上在荧光染料的荧光波长或波长范围透射光,所述荧光染料用于标记血沉棕黄层样品中的稀有细胞。

[0083] 光学组件 22 包括静止的光学部件 24、26、30、34、36,其设置成将校正的空间分布输出到物镜 40,当校正的空间分布被物镜 40 聚焦在显微镜视场时,实质上在整个显微镜视场提供大体上均匀的静态照明。物镜 40 将校正的照明聚焦到显微镜视场。物镜 40 可包括单个物镜透镜或可包括两个或更多物镜透镜。例如通过调整物镜 40 和透光试管壁 14 之间的距离,可调整显微镜系统 10 的焦深 (focus depth)。另外或可选地,通过在物镜 40 内相对移动两个或更多透镜或透镜元件可调整所述焦深。

[0084] 光束均匀器 30 设计成输出实质上一致的均匀光束,以用作合适直径的高斯输入光束。然而,物镜 40 一般引入一些空间不均匀性。因此,一个或更多静止光学部件,例如发散透镜 24、准直透镜 26、聚焦透镜 34 和 / 或聚焦透镜 36 可选地设置成将空间不均匀性引入到所述空间分布,从而当所述光束被物镜 40 聚焦时,提供显微镜视场的实质上均匀的静态照明。在一些预期的实施方式中,此校正的空间不均匀性由一个或更多专用光学部件 (未显示) 引入,其包括在用于此目的的光学组件 22 中。

[0085] 所述显微镜视场的实质上均匀的静态照明使布置在所述显微镜视场内的任何荧光染料标记的上皮细胞发荧光。另外,所述荧光染料一般会给血沉棕黄层产生较低强度的背景荧光。所述荧光由物镜 40 捕获,以及所捕获的荧光 50 (在图 1 中用虚线简要示出) 通过二向色镜 44,以及通过可选的用于排除任何杂散源光的滤波器 52,以由摄像机系统 56 成像。摄像机系统 56 可例如包括用于获得电子图像的电荷耦合器件 (CCD) 摄像机,所述电子图像可存储在计算机、存储器卡或其它非易失性存储器中以用于随后的图像处理。

[0086] 参考图 2 和图 3,描述了其它合适的显微镜系统。

[0087] 图 2 示出显微镜系统 10',其类似于图 1 的显微镜系统 10,除了光学组件 22',其不同之处在于,图 1 的静止光束均匀器 30 由静止的漫射器 30' 替代。漫射器 30' 可例如为全息漫射器,例如可从 Physical Optics Corporation (Torrance, CA) 获得。这样的全息漫射器使用提供随机非周期性光学结构的全息图,所述光学结构漫射光以产生改善的空间均匀性。然而,所述光的漫射还产生伴随的光束发散。一般,光的较强的漫射往往产生较多的空间均匀性,但是也往往产生较大的光束发散。全息漫射器根据发散角的半高全宽 (FWHM) 被适当分类,较大的发散角一般提供较多的漫射以及较大的光均匀性,但是由于增加的光束发散也导致显微镜系统 10' 内增加的光损失。

[0088] 在显微镜系统 10' 的一些实施方式中,漫射器 30' 为小角度漫射器,其具有的 FWHM 小于或约为  $10^\circ$ 。较小角度的漫射器一般优先提供较小的发散,并因而提供较好的照明通

过效率;然而,若发散 FWHM 太低,那么漫射器将不提供足够的光漫射以产生足够的光束均匀性。低漫射降低了漫射器 30' 均匀化高斯分布的能力,以及还降低了漫射器 30' 去除散斑的能力。

[0089] 参考图 3,另一实施方式的显微镜系统 10'' 类似于显微镜系统 10', 以及包括使用漫射器 30'' 的光学组件 22'', 所述漫射器 30'' 类似于显微镜系统 10' 的漫射器 30'。然而,漫射器 30'' 相对于光学组件 22'' 的光路倾斜角度  $\theta$ , 以便实质上降低源光 20 的散斑图。不局限于任何特定的操作理论,认为所述倾斜将散斑图移到较高的空间频率,这实际上使所述散斑的尺寸更小。所述散斑尺寸通过所述倾斜在空间上被移动,从而频移的散斑实质上小于成像的像素尺寸。

[0090] 在一些实施方式中,使用相对于光学组件 22'' 的光路至少约  $30^\circ$  的倾斜角  $\theta$ , 对于具有低到约  $5^\circ$  的 FWHM 的漫射器 30'', 这被认为实质上降低了散斑。另一方面,即使对于具有  $5^\circ$  的 FWHM 的小角度漫射器,大于约  $45^\circ$  的倾斜角  $\theta$  被认为由于散射增加而降低了照明通过效率。

[0091] 参考图 4,应理解,在此公开的显微镜系统适合于除了包含在试管或由其支持的样品成像外的其它显微应用。在图 4 中,显微镜系统 10''' 包括发光二极管(LED)18''' 作为光源,而不是使用在先前显微镜系统 10、10'、10'' 中的激光器 18。由于 LED18''' 输出发散的源光 20''' 而不是准直的激光束,光学组件 22''' 被更改,其中光速扩展的凹透镜 24 被适当地省略,如图 4 所示。可替换地,一透镜可包括在透镜 24 的位置,但被选择来提供合适的发散角调整,以通过准直透镜 26 准直。光学组件 10''' 使用类似于漫射器 30'、30'' 的漫射器 30'''。LED18''' 输出相干光,因此散斑一般不出现。然而,LED18''' 的输出一般具有非高斯分布,例如朗伯分布。由于源光 20''' 的这些特性,漫射器 30''' 并不倾斜,以及在一些情况下,漫射器 30''' 可比不倾斜的漫射器 30' 具有更小的发散角,漫射器 30' 用于在图 2 的显微镜系统 10' 中产生激光束源光 20 的空间均匀性。

[0092] 图 4 的显微镜系统 10''' 进一步不同于显微镜系统 10、10'、10'', 这是因为显微镜系统 10''' 使布置在平面载物片 60 上的样品成像,可选地,载物片 60 由可选的盖玻片 62 盖住。载物片 60 布置在 x-y 平面平移台 64 上,以实现所述样品的扫描。应理解,LED18''' 和光学组件 22''' 还适合于使布置在环状间隙 12 中的血沉棕黄层样品成像,所述环状间隙 12 在透光试管壁 14 和浮体壁 16 之间,如图 1-3 所示。相反地,应理解,激光器 18 和光学组件 22、22'、22'' 还适合于使载物片 60 上的平面样品成像,如图 4 所示。

[0093] 光学组件 22、22'、22''、22''' 具有部件,其在所述部件不旋转、相对振动或相反相对移动的意义上是静止的。然而,作为整体移动光学组件和物镜 40 和 / 或包括光束转向元件等以相应于所述样品能够实现所述视场的相对扫描是预期的。

[0094] 描述了用于使包含在试管或由其支持的环状样品成像的合适的显微镜系统。环状间隙 12 一般具有实质上大于显微镜物镜 40 的景深的厚度。试管壁 12 和浮体壁 16 一般在试管或浮体的整个表面是不一致的。尽管显微镜物镜 40 一般具有可调整的焦深(通过移动内部光学部件和 / 或通过向或远离试管壁 12 移动物镜 40 来调整),然而调整范围是有限的。因此,应夹持所述试管,以便当所述试管旋转和当物镜 40 或所述试管沿着管轴平移时,接近物镜 40 的表面在远离物镜 40 的明确定义的距离处。

[0095] 接下来描述用于获得这样的方面的合适的试管支架。

[0096] 参考图 5-10, 试管支架 70 在其中安装了试管 72, 试管 72 被试管塞子 73 密封。密封的试管 72 包含浮体 74 和血, 其被适当地处理和离心以分离出包括红血球、血浆和血沉棕黄层的组分, 例如在美国 Pub1. 申请 2004/0067162A1 和 2004/0067536A1 中描述的。浮体 74 具有的密度小于充满红血球的组分的密度 (1.090g/ml), 以及大于血浆组分的密度 (1.028g/ml)。因此, 在离心后, 浮体 74 沿试管轴线 75 (在图 6 中画出和标记出) 在充满红血球的层和血浆层之间布置, 即一般与血沉棕黄层重合。在离心后, 血沉棕黄层一般布置在试管壁 14 和浮体壁 16 之间的环状间隙 12 中。(见图 6 中的标志)。在浮体 74 端部的环状密封脊 76、78 当试管 72 静止时与所述试管的内表面接合, 以便密封环状间隙 12。然而, 在离心期间, 试管 72 伸展以提供跨越脊 76、78 的流体传递, 以便使血沉棕黄层能够实质上收集在环状间隙 12 中。

[0097] 在示例性试管支架 70 中的至少一个第一定位轴承, 即径向间隔的两个第一定位轴承 80、81 布置在环状样品区 12 的第一侧。在示例性试管支架 70 中的至少一个第二定位轴承, 即径向间隔的两个第二定位轴承 82、83 布置在环状样品区 12 的第二侧, 环状样品区 12 的第二侧沿试管轴线 75 与环状样品区 12 的第一侧相对。定位轴承 80、81、82、83 为固定的滚柱轴承, 其通过紧固构件 85 (在图 8 中显示) 固定到框架 84。

[0098] 在示例性试管支架 70 中的至少一个偏置轴承, 即两个偏置轴承 86、87 与定位轴承 80、81、82、83 径向间隔开, 以及被弹簧 90 弹性偏置以对着定位轴承 80、81、82、83 压试管 72, 从而相对于定位轴承 80、81、82、83 对准环状样品区 12 接近物镜 40 的一侧。在示例性试管支架 70 中, 两个第一定位轴承 80、81 和第一偏置轴承 86 径向隔开  $120^\circ$  的间隔, 并位于环状样品区 12 第一侧上的第一公共平面 92 内。相似地, 两个第二定位弹簧 82、83 和第二偏置弹簧 87 径向隔开  $120^\circ$  的间隔, 并位于环状样品区 12 第二侧上的第二公共平面 94 内。弹簧 90 固定到框架 84, 以及通过构件 98 与偏置轴承 86、87 连接。

[0099] 更一般地, 轴承 80、81、86 和轴承 82、83、87 可具有除了  $120^\circ$  以外的径向间隔。例如, 偏置轴承 86 可离每个定位轴承 80、81 相等的径向角被隔开。作为特定的例子, 偏置轴承 86 可离每个定位轴承 80、81  $135^\circ$  被隔开, 以及在此特定的例子中, 两个定位轴承 80、81 分离  $90^\circ$  被隔开。

[0100] 可选地, 第一公共平面 92 还包括浮体脊 76, 以使轴承 80、81、86 在脊 76 处压试管 72, 以及相似地, 第二公共平面 94 可选地还包括浮体脊 78, 以使轴承 82、83、87 在脊 78 处压试管 72。此方法降低了使环状样品区 12 扭曲的可能性。偏置轴承 86、87 提供了使试管 72 向着定位轴承 80、81、82、83 偏置的偏置力 96。

[0101] 框架包括沿着试管轴线 75 延伸的观察窗 100。物镜 40 通过观察窗 100 观察环状样品区 12 接近物镜 40 的一侧。在一些实施方式中, 物镜 40 可沿试管轴线 75 线性平移, 如平移范围双箭头指示符 104 所指示的。这可例如通过将物镜 40 和光学组件 22、22'、22'' 或 22''' 安装在共同的板上来实现, 所述板可相对于试管支架 70 平移。在另一方法中, 显微镜系统 10、10'、10''、10''' 是静止的, 以及包括框架 84 的所述管支架 70 作为一个单元来平移, 以穿过所述窗 100 相对平移物镜 40。在又一个实施方式中, 物镜 40 平移, 而光学组件 22、22'、22'' 或 22''' 保持静止, 以及提供合适的光束转向部件 (未显示) 以将光束输入到物镜 40。例如通过在聚焦范围 106 内向或远离试管 72 移动物镜 40, 所述物镜 40 还可聚焦 (平移范围 104 和聚焦范围 106 仅在图 6 中示出)。

[0102] 环状样品区 12 的扫描要求沿试管轴的平移,以及试管 72 绕试管轴线 75 的旋转。为了实现旋转,旋转式连接器 110 设置成响应于由电动机 112 选择性地施加的扭矩而驱动试管 72 绕管轴线 75 旋转,所述电动机 112 通过轴 114 与旋转式连接器 110 连接。示例性试管支架 70 的旋转式连接器 110 在一端或其基部与试管 72 连接。试管 72 的相对端,弹簧加载的盖 116 压试管 72 的塞子 73 以防止所述旋转使试管 72 沿试管轴线 75 的伴随的平动滑移。

[0103] 具体参考图 9 和图 10,在一些实施方式中,旋转式连接器 110 为成形连接器,其具有设置成与试管 72 的成形基部 122 相匹配的轮廓 120。在图 9 和图 10 所示出的实施例中,连接器 110 的轮廓 120 包括四个凹陷,其接纳试管 72 的成形基部 122 的四个凸出部。可使用其它轮廓特征。

[0104] 在一些实施方式中,轮廓 120 和成形基部 122 通过分别在连接器 110 和试管基部 122 中的合适的旋转不对称的形状 124、126(在图 9 和图 10 以虚线示出)来调节,以当试管 72 的成形基部 122 与旋转式连接器 110 的轮廓 120 相匹配时限定试管 72 的绝对旋转位置。以此方式,可保持所述绝对旋转位置(例如测量为以度数的绝对角度值),即使试管 72 从试管支架 70 移去然后重新安装到所述试管支架 70。

[0105] 在提供绝对角位置的另一方法中,所示试管可选地包括基准标记,例如光可读反射基准标记(未显示)以指示所述试管的绝对旋转位置。

[0106] 在一些实施方式中,第二侧定位滚柱轴承 82、83 被省略,以及旋转式连接器 110 限定至少一个第二定位轴承,其沿试管轴线 75 布置在与环状样品区 12 的第一侧相对的环状样品区 12 的第二侧上。在这样的实施方式中,所述旋转式连接器作为机械驱动定位轴承来提供试管 72 的定位和旋转。可选地,在这样的实施方式中,第二侧偏置轴承 87 与相应的滚柱轴承 82、83 一起也被省略。

[0107] 另一方面,在一些其它设想的实施方式中,旋转式连接器 110 被省略,以及滚柱轴承 81、82、83、84、86、87 的一个或更多为机械驱动的以旋转试管 72。在这样的实施方式中,所述驱动的滚柱轴承用作旋转式连接器。所述驱动轴承可以为定位轴承 81、82、83、84 之一或更多,或可以为偏置轴承 86、87 之一或更多。

[0108] 为了将试管 72 安装在试管支架 70 中,框架 84 装配有铰链盖或门 130(在图 5 中显示为开着,以及在图 6 中显示为关着)。当铰链盖或门 130 为开着时,弹簧加载的盖 116 升离试管 72 的塞子 73。可选地,支持偏置轴承 86、87 的支持构件 73 包括手动把手或杠杆(未显示),其用于抵抗弹簧 90 的偏置力来用手拉偏置轴承 86、87 离开试管 72,从而便于从所述支架 70 加载或卸载试管 72。

[0109] 试管支架 70 可方便地对准所示出的具有直边的试管 72。试管支架 70 也可容纳和对准有一点锥形的试管。锥形试管的支持位置在图 6 中由指示锥形试管的锥形边缘的虚线 134 示出。所示出的锥体 134 使所述试管最接近旋转式连接器 110 的端部比所述试管最接近弹簧加载的盖 116 的端部直径小。如图 6 所示,偏置轴承 86、87 的偏置对着定位轴承 81、82、83、84 压所述试管以保持环状样品区 12 接近物镜 40 的一部分的对准,而不管锥体 134。应理解,支架 70 可类似地容纳和对准具有相反锥体的试管,其中接近旋转式连接器 110 的端部比最接近弹簧加载的盖 116 的端部直径大。

[0110] 在实质上为锥体的情况下,或在试管具有高度偏心或非圆形截面的情况下,对着

定位轴承 81、82、83、84 的偏置不完全补偿锥体或截面的偏心率或椭圆率。这是因为第一定位轴承 81、82 的径向间隔和第二定位轴承 83、84 的径向间隔允许向较窄的管延伸一段较远的距离到第一定位轴承 81、82 间的间隙以及到第二定位轴承 83、84 间的间隙。

[0111] 参考图 11A 和 11B, 更改的具有椭圆截面的试管 72' 通过每支撑浮体脊使用三个轴承组被更精确地对准, 其中所述三个轴承包括仅一个定位轴承 81' 以及两个或更多偏置轴承 86'。定位轴承 81' 与物镜 40 在相同的径向位置 (在图 11A 和 11B 中以虚线示出)。当椭圆试管 72' 旋转时, 对着定位轴承 81' 偏置的成像边保持与径向重合的物镜 40 精确对准, 而不管成像边相应于椭圆试管 72' 的短轴 (图 11A), 还是成像边相应于椭圆试管 72' 的长轴 (图 11B)。

[0112] 参考图 12, 在另一变形中, 轴承 140 相对于试管 72 的管轴线 75 倾斜, 以产生与管轴线 75 平行的力分量而将试管 72 推向旋转式联接器 110。在此装置中, 弹簧加载的盖 116 可选地被省略, 因为在旋转期间, 轴承 140 的倾斜阻止试管 72 的平动滑移。

[0113] 参考图 13, 在另一变形中, 更改的浮体 74' 包括螺旋脊 76', 以及倾斜的轴承 142 依照螺旋间距沿管轴线 75 被隔开以响应于试管 72 的旋转跟踪螺旋密封脊 76'。在此方法中, 倾斜的轴承 142 产生使试管 72 沿管轴线 75 平移的力, 从而物镜 40 可保持在固定位置而当扫描环状间隙 12' 时没有平移。在此方法中, 滚柱轴承 142 适当地被机动化以产生试管 72 的旋转。即, 滚柱轴承 142 还用作旋转联接器。

[0114] 参考图 14, 在另一变形中, 通过机械装置而非偏置轴承可提供机械偏置。在实施例图 14 中, 试管 72 水平布置, 置于定位轴承 181、182、183、184 上, 且物镜 40 安装在试管 72 下。包括浮体 74 的试管 72 的重力 186 (所述重力在图 14 中由向下的箭头 186 简要示出) 形成为对着定位轴承 181、182、183、184 压试管 72 的机械偏置。在其它设想的实施方式中, 使用真空夹盘、正气压、磁引力或其它机械偏置来对着所述定位轴承压所述试管。定位轴承 181、182、183、184 可机械旋转以使定位轴承 181、182、183、184 用作旋转式联接器, 或可提供单独的旋转式联接器。

[0115] 参考图 15, 所述轴承可不同于滚柱轴承。例如, 所述轴承可以为辊子、球轴承或衬套表面。在图 15 所示的不同的试管支架中, 框架 200 提供用于弹簧 202 的簧片, 其对着试管 72 压一组偏置球轴承 204, 以对着定位轴承 211、212 压试管 72, 所述定位轴承 211、212 由框架 200 的衬套表面确定。可使用其它类型的轴承用于偏置和 / 或定位轴承, 当试管旋转时这些轴承支持所述试管。

[0116] 在除图 13 的实施方式以外所示出的实施方式中, 所述试管并不在所述管支架内平移, 而通过平移物镜 40 或通过平移作为一个单元的所述试管和管支架来实现平移扫描部分。在其它设想的实施方式中, 可考虑保持物镜固定或在试管框架内平移试管, 例如通过包括连接电动机 112 和旋转式联接器 110 的轴 114 中的线性平移性能, 使得试管 72 沿试管轴线 75 平移。

[0117] 描述了合适的显微镜系统和试管支架, 其用于使包含在试管中或由其支持的环状样品区成像。应理解, 环状样品区可以不同于包含在试管壁 14 和浮体壁 16 之间的间隙 12 中的所示出的流体样品。例如, 环状样品区可以为附在试管外表面上的膜或涂层, 或环状样品区可以为附在试管内外表面上的膜或涂层。此外, 术语“试管”应广义解释为包括除所示出的常规试管 72 以外的其它管状样品支架。例如, 所述试管可以为圆柱形杆, 其插入所包含

的容积、固体物体或其它感兴趣的对象中,从而用感兴趣的对象样品来覆盖所述圆柱形杆的外侧,或所述试管可以为圆柱形地质核样品等。

[0118] 描述了合适的显微镜系统和试管支架,其用于从包含在试管中或由其支持的环状载物片或环状样品区获取数据,现在描述合适的处理方法,其用于识别或量化在环状生物流体层中的荧光染料标记的细胞。

[0119] 参考图 16,简要示出一些测量参数。物镜 40 在视场 (FOV) 范围内和在位于焦深的景深范围内成像。在图 16 中,所述焦深相对于物镜 40 被指示出,然而,所述焦深可相对于另外的参考被标出。在一些实施方式中,物镜 40 的景深为约 20 微米,而试管壁 14 和浮体壁 16 间的环状间隙 12 为约 50 微米。然而相应于环状间隙 12 的焦深由于试管和 / 或浮体中的不均匀性或其它因素可实质上改变。期望环状间隙 12 位于环绕深度范围内的某处。在一些实施方式中,300 微米的环绕深度范围被认为是合适的。这些尺寸是例子,以及对于特定的实施方式可实质上不同,这取决于特定的物镜 40、透光试管、浮体、离心类型或所使用的其它样品处理等。

[0120] 参考图 17,简要示出一合适的数据获取方法 300。在过程操作 302 中,在跨越所述环绕深度范围的多个焦深处获取分析图像。为了避免沿所述深度方向的间隙,在操作 302 中所获取的分析图像的数量应至少等于物镜 40 的景深除以所述环绕深度范围。

[0121] 在一些实施方式中,在可选的操作 304 处理所述分析图像,以基于图像亮度来识别约在生物流体层(例如棕黄层)深度的一个或更多分析图像。此可选的选择利用荧光染料一般产生背景荧光的观测结果,所述背景荧光作为增强的总图像亮度在所获取的分析图像中被检测出。以多种方式,例如平均像素强度、均方根像素强度等可估计图像亮度。

[0122] 在图像处理操作 306 中,使用合适的技术例如滤波、限定阈值等处理所述分析图像或在可选的选择操作 304 中所选的那些一个或更多分析图像,以将所观察的特征识别为候选细胞。在生物流体层中染料标记的细胞的密度一般低于每视场约一个染料标记的细胞。因此,所识别的候选细胞比率一般是低的。当候选细胞被图像处理 306 识别时,合适的候选细胞标记添加到一组候选细胞标记 310 中。例如,候选细胞标记基于合适的索引系统和所述候选细胞特征的 x 和 y 坐标可识别所述图像。尽管稀有细胞的密度一般是低的,可设想,图像处理 306 有时可仍然在单个分析图像上识别两个或更多候选细胞。另一方面,在一些分析图像中,没有候选细胞可被识别。

[0123] 在判定点 312,确定是否完成样品扫描。若没有,则在操作 314 移动视场。例如,通过合并物镜 40 沿试管轴线 75 平移和试管 72 的旋转可越过环状间隙 12 中的生物流体样品相对扫描视场。可替换地,使用图 13 的管支架,通过螺旋式地移动试管 72 来进行扫描。对于每一新的视场,重复过程操作 302、304、306。

[0124] 当判定点 312 指示完成样品扫描时,可选地使用用户验证过程 320 以使分析员能够确认或拒绝每一细胞的候选资格。若图像处理 306 足够准确,那么可选地省略用户验证过程 320。

[0125] 执行统计分析 322 以计算由分析员确认的细胞的合适的统计数据。例如,若生物流体样品的体积或质量已知,那么可计算每单位体积或每单位重量的稀有细胞的密度(例如细胞 / 毫升或细胞 / 克)。在另一统计分析方法中,合计确认的细胞的数量。当使用标准血沉棕黄样品配置,例如标准试管、标准浮体、标准全血样品量和标准离心处理时,这是合

适的度量。统计分析 322 还可包括阈值警告。例如,若细胞数或密度度量大于第一阈值,那么这可指示癌的可能性增加,这要求进一步的临床研究,而若细胞数量或密度超过第二、更高的阈值,这可指示癌的高度可能性,这要求立即治疗的医学关注。

[0126] 参考图 18,简要示出更改的获取方法 300'。在更改的过程操作 304',使用输入而不是分析图像来首先确定用于最大背景荧光强度的焦深,接下来是约在用于最大背景荧光的焦深处获取一个或几个分析图像的操作 302'。例如,通过在多个深度获取低分辨率的图像可执行搜索过程 304'。为了避免沿深度方向的间隙,在操作 304' 获取的低分辨率图像的数量应至少等于物镜 40 的景深除以所述环绕深度范围。在另一方法中,大面积的亮度传感器(未显示)可耦合到所捕获的荧光 50(例如,使用摄像机 56 中的部分反射镜或是使用置入摄像机 56 的强度仪表),以及物镜 40 的焦点扫过所述环绕深度范围。在扫描期间所述传感器或仪表的峰值信号指示提供最高亮度的焦点。

[0127] 在由过程操作 304' 所确定的生物流体样品的深度的情况下,获取过程 302' 约在所识别的最高亮度的焦深处仅获取一个或几个分析图像。为了确保全部覆盖生物流体层,所获取的分析图像的数量应至少为环状间隙 12 的厚度除以物镜 40 的景深。例如,若环状间隙 12 具有约 50 微米的厚度,以及景深为约 20 微米,那么适当地获取三个分析图像—一个在最高亮度的焦深,一个在大了 15-25 微米的焦深,以及一个在小了 15-25 微米的焦深。

[0128] 更改的获取方法 300' 的优点在于,所获取的高分辨率分析图像的数量被降低,这是因为在获取分析图像之前确定焦深。通过在确定的焦深和在稍微大一点或稍微小一点的焦深获取分析图像来分类所述确定的焦深是有利的。此方法说明在偏离发光背景为最大的深度处可最佳成像稀有细胞的可能性。

[0129] 参考图 19,描述了图像处理 306 的合适的实施方式,其利用预期的稀有细胞尺寸的先验知识来识别分析图像 330 中的任何候选细胞。在匹配滤波过程 332,合适的滤波核卷积所述图像。匹配滤波过程 332 使用滤波核,其具有的尺寸可与分析图像 330 中的稀有细胞的图像的预期尺寸相比较。

[0130] 继续参考图 19 和进一步简要地参考图 20 和 21,在一些实施方式中,使用方形滤波核 334。核 334 包括:像素的中央正区,每一个像素具有 +1 值;以及像素的外负区,每一个像素具有 -1 值。正区的面积与负区的面积应约有相同的尺寸。内或外区的外面的点具有 0 的像素值。可选地,除了 +1 和 -1 的其它像素值分别用于内和外区,从而给予滤波器稍微正或稍微负响应。

[0131] 继续参考图 19,匹配滤波去除或减少由背景照明引起的偏移,还改善稀有细胞的信噪比(SNR)。正匹配区内的点数增加信号,而正和负匹配区内的点的数量增加噪声。SNR 的增益是由于信号直接增加,而噪声按所组合的样品数量的均方根(RMS)值或平方根增加。对具有 N 个正点和 N 个负点的滤波器,获得  $N/\sqrt{(2N)}$  或  $\sqrt{(2N)}$  的增益。

[0132] 方形滤波核 334 在计算上是有利的,因为其边缘与分析图像 330 的 x 和 y 坐标方向对齐。圆形滤波核 334' 或另外形状的核可选地使用来代替方形滤波核 334。然而,圆形滤波核 334' 比方形滤波核 334 在计算上更昂贵。与圆形滤波核 334' 相比,方形滤波核 334 的另一优点在于,方形滤波核 334 的总的滤波器边缘长度从两倍的检测尺寸降低到 1.414 倍的检测尺寸。这降低了边缘效应,允许使用更接近分析图像 330 的边缘的数据。

[0133] 滤波核的尺寸应选择成实质上匹配分析图像 330 中染料标记的细胞的预期图像



尺寸,以提供最佳的 SNR 改善。例如,具有 10 个像素的正 (+1) 区的方形滤波核 334,为也具有约 10 个像素的直径的细胞图像提供最佳 SNR 改善。对于此匹配的情况,信号预期增加了约 78 倍,而噪声预期增加了约 14 倍,这提供约 5.57 : 1 的 SNR 改善。另一方面,使用相同的方形滤波器,更小的 8 个像素直径的细胞的 SNR 改善预期为约 3.59 : 1。使用相同的方形滤波器,更大的 14 个像素直径的细胞的 SNR 改善预期为约 3.29 : 1。

[0134] 可以以多种方式来实现匹配滤波过程 332。在一方法中,输入图像中的每一点被总计到输出图像中在正内区的所有点。然后,输出图像中在外负区但不在内正区的所有点被扣除。当输出图像内每一点被外方框像素区计数接触多次时,输入图像内每一点被接触一次。

[0135] 在另一合适的方法中,对于输出图像内每一点,来自输入图像的在正内方框内的所有点被读取和总计。在正内方框外但在负外方框内的所有点然后被扣除。当每一输出图像像素被接触一次时,每一输入图像像素被外方框像素计数接触。

[0136] 在另一合适的方法中,两个内部值被产生用于输入图像的当前行:在负外方框距离的行内所有点的总数,以及在内正方框距离的行内所有点的总数。在所述当前行所有输出图像列点让输入图像从其扣除了在外方框的所有点的总数。在内正方框内所有输出图像的列点得到在内正方框距离的分两次相加的输入图像行点的总数。通过一加和一减可对所述行中的下一点更新行总数。这使执行成本减少到约为滤波器方框的高度。

[0137] 在匹配滤波过程 332 中,可使用多种边缘条件。例如,在一方法中,对于其滤波器重叠分析图像 330 的边缘的任何点,没有输出产生。此方法避免边缘伪像,但产生减少了可用面积的输出图像。在另一合适的实施例的边缘条件中,缺省值(例如零或所计算的平均水平)用于远离边缘的所有点。

[0138] 继续参考图 19,在匹配滤波 332 后,应用二进制阈值处理 338。执行阈值 338 的困难在于合适的阈值的选择。阈值的选择因一些分析图像包括没有细胞、或只有单个细胞或只有两个或几个细胞的可能性而变得复杂。在一方法中,阈值选择为这样的一值:其为在过滤的数据中所见的最高像素强度以下所选的百分率。然而,此阈值使噪声在没有细胞出现时被检测出,因为在这种情况下,像素的峰值在噪声中。另一方法使用固定的阈值。然而,若背景强度在分析图像间实质上改变,或若匹配滤波实质上改变像素强度的动态范围,固定的阈值可能远非最佳。

[0139] 在所示出的方法中,基于未滤波分析图像 330 的 SNR 的处理 340 确定阈值。通过首先确定输入图像的标准偏差,可计算在滤波器输出的预期噪声。所述噪声一般升高了所总计的像素数量的平方根,该总计的像素数量为像素计数中的外方框面积。在一些实施方式中,阈值设置在此噪声水平的约 7 西格码 ( $\sigma$ )。当此滤波器没有准确的零 DC 响应时,合适的平均水平还适当地被总计到阈值。

[0140] 阈值 338 产生二进制图像,其中为细胞图像的一部分的像素一般具有第一二进制值(例如“1”),而不为细胞图像的一部分的像素一般具有第二二进制值(例如“0”)。因此,执行连接性处理 344 以识别与细胞相应的第一二进制值的所连接的像素组。连接性分析 344 将所连接的组的所有第一二进制值的像素集合或联系为候选细胞以作为一个单元考察。此所连接的组或单元的中心可被确定和使用为候选细胞标记中的细胞位置坐标。

[0141] 参考图 22,描述可选的用户验证过程 320 的合适的实施方式。在选择操作 350 中

选择用于验证的标记。在显示操作 352, 显示包含候选细胞标记的分析图像的区域, 可选地连同分析图像的相应区域, 该分析图像在深度上临近包含候选细胞的分析图像。显示在深度上临近的分析图像给检查分析员提供另外的观察, 其幸运地包括比自动处理 306 检测候选细胞的分析图像更多的可识别的细胞图像。在操作 354 分析员确认或拒绝候选资格。循环操作 356 将所有的候选细胞标记看一遍以通过每个候选细胞的分析员提供检查。统计分析 322 对被分析员确认的那些细胞候选标记操作。

[0142] 参照图 16-22, 在定量血沉棕黄层分析的背景下, 描述了示例性的数据获取和分析处理, 该血沉棕黄层分析使用试管壁 14 和浮体壁 16 之间环状间隙 12 中环状样品。然而, 应理解, 所述处理容易应用于其它的样品扫描方法, 例如在图 4 中所描述的平面样品载物片 60 的扫描。

[0143] 所述示例性的实施方式主要涉及定量血沉棕黄层分析。然而, 应理解, 在此公开的装置和方法可应用于其它类型的生物测定。例如, 细胞可被染色而不是被荧光标记, 或细胞可具有能够通过光学显微术实现评估的固有的光学标记 (荧光、对比等)。所评估的特征可以不同于稀有细胞。例如, 所评估的特征可以为细胞碎片、细菌或多细胞结构。所述样品可以为生物样品而不是血沉棕黄层样品。

[0144] 参照优选实施方式描述了本发明。很明显, 在阅读和理解前述说明后, 其它人将想到修改和变更。本发明的意图应解释为包括所有这样的修改和变更, 只要其落在所附权利要求或其中等效物的范围内。

[0145] 因此描述了优选实施方式, 现在本发明的权利要求为。

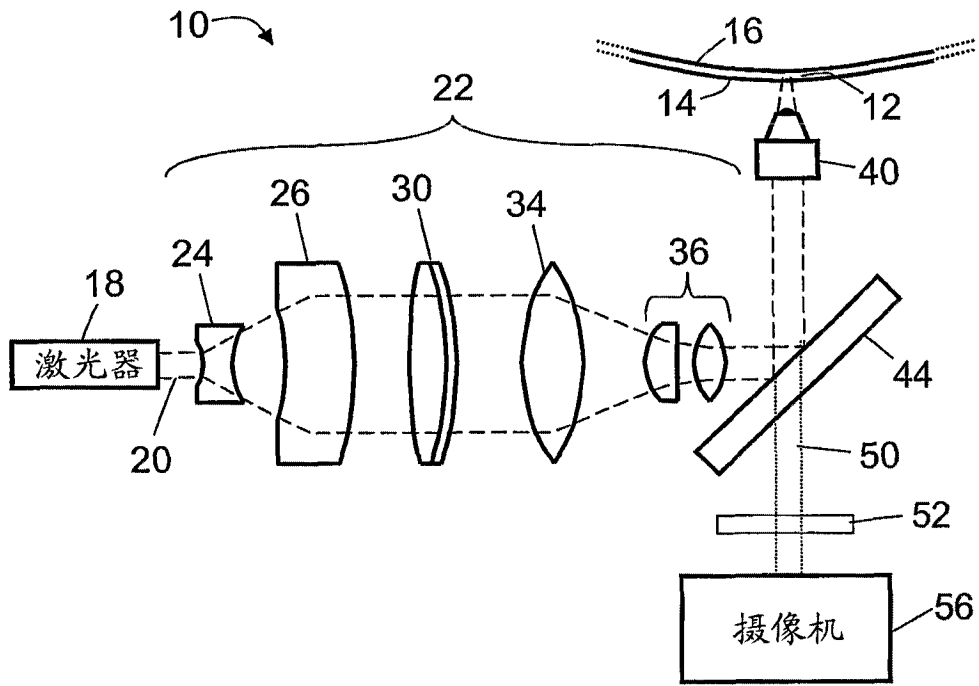


图 1

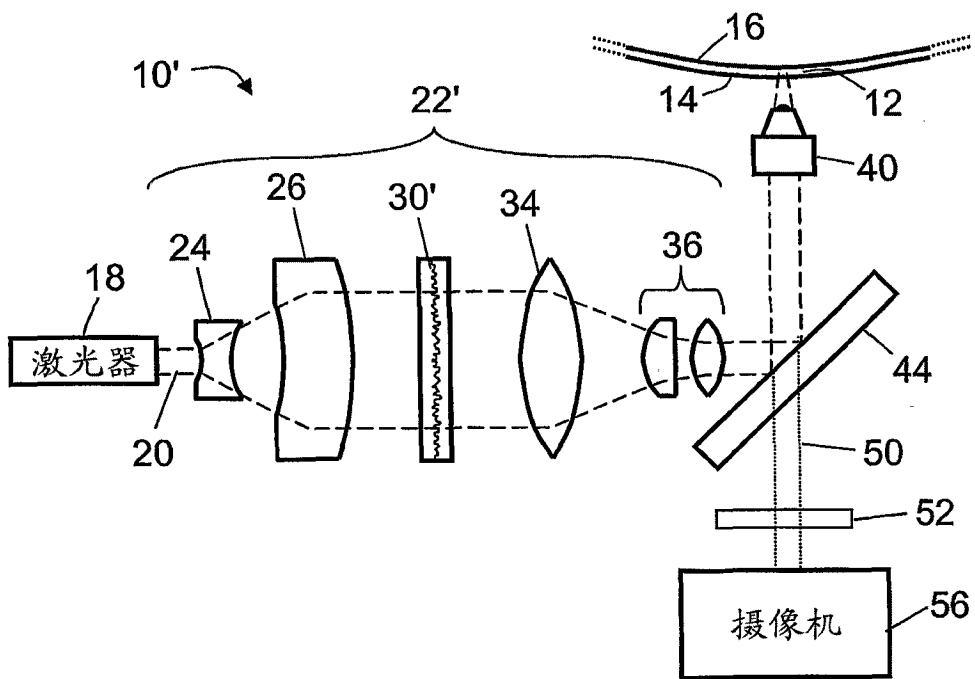


图 2

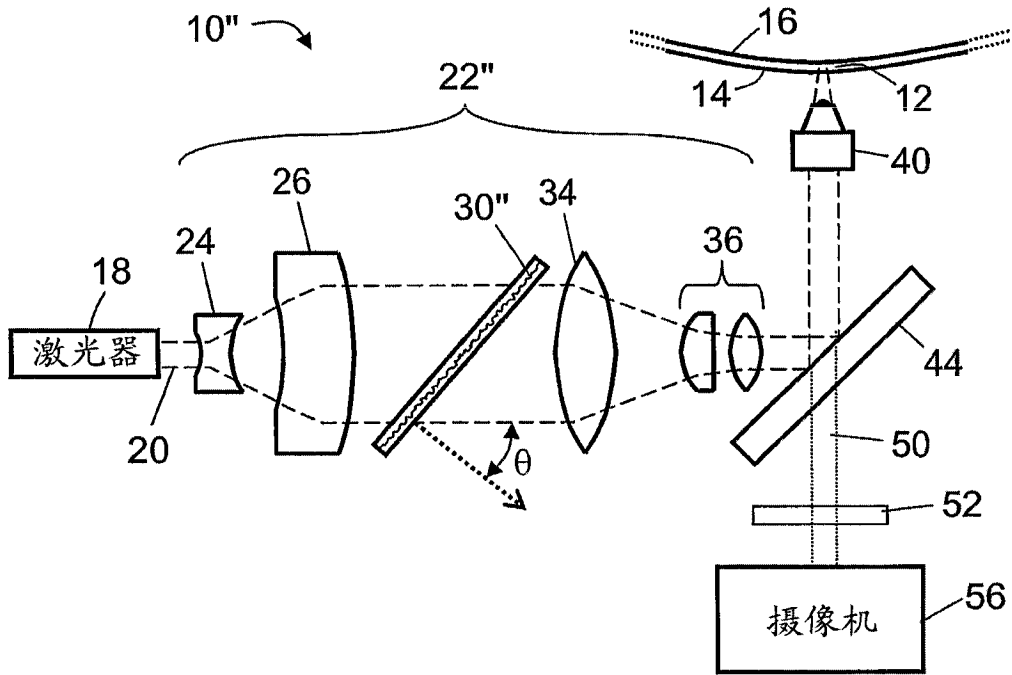


图 3

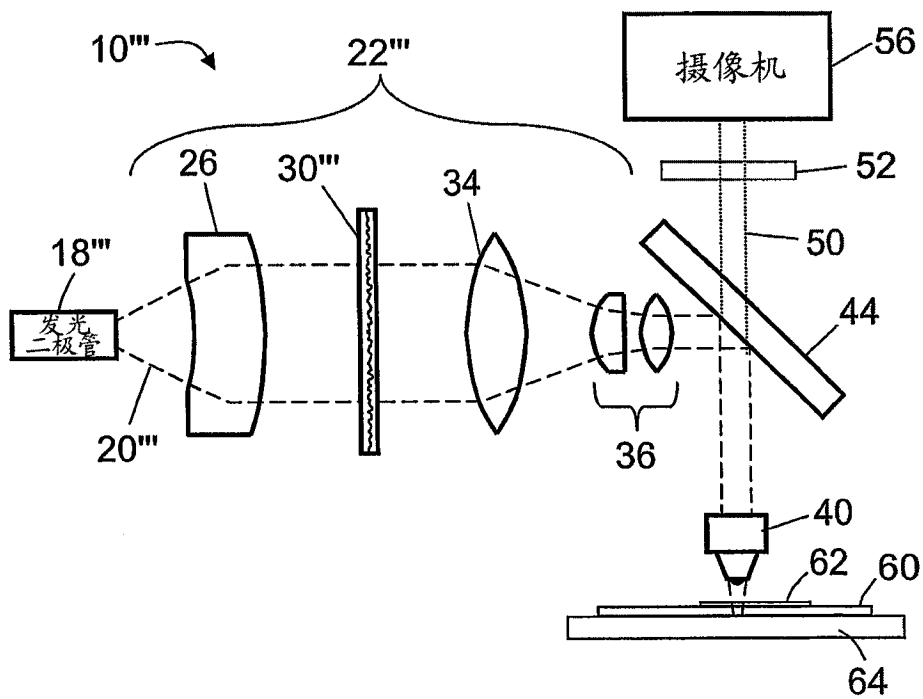


图 4

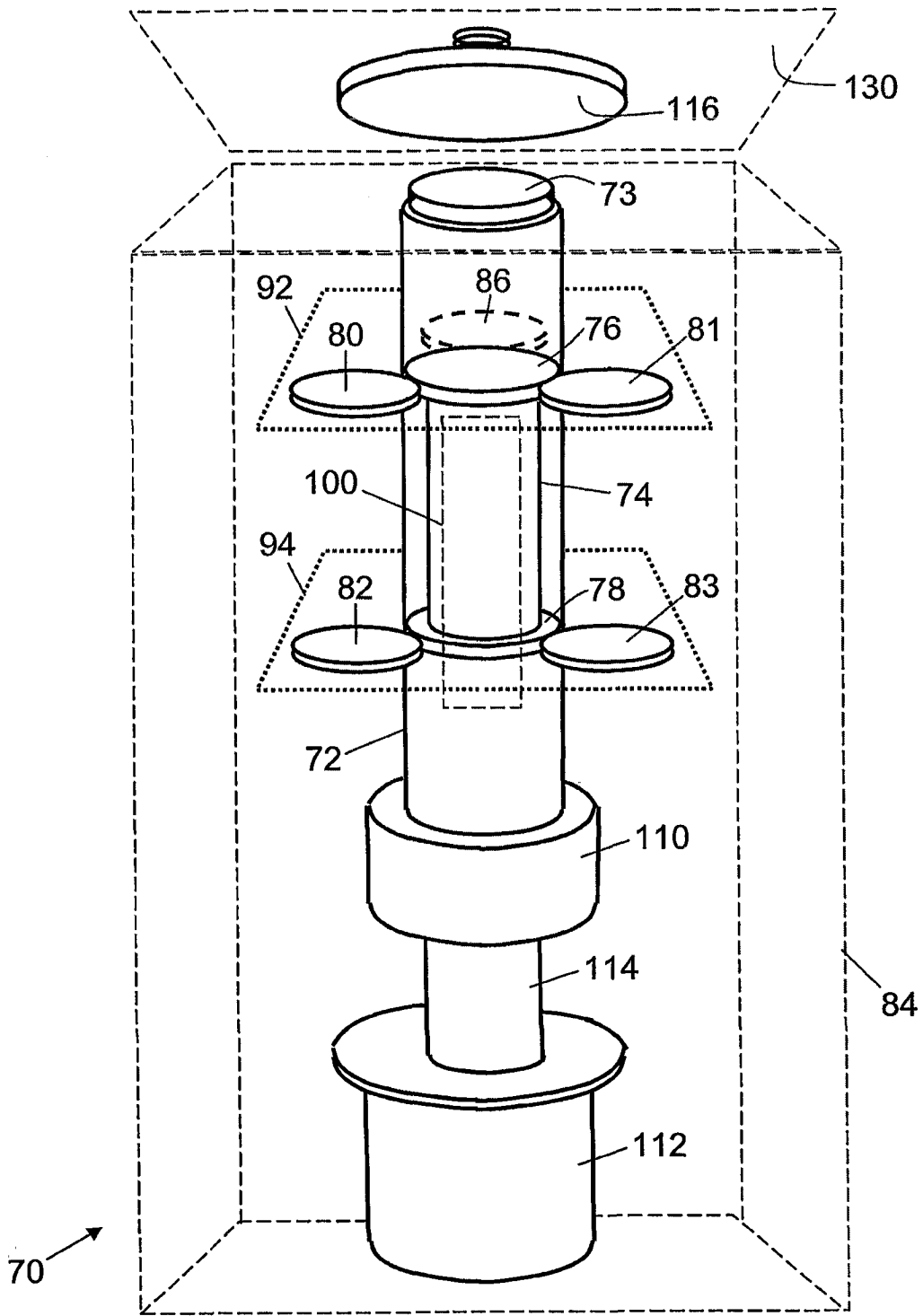


图 5

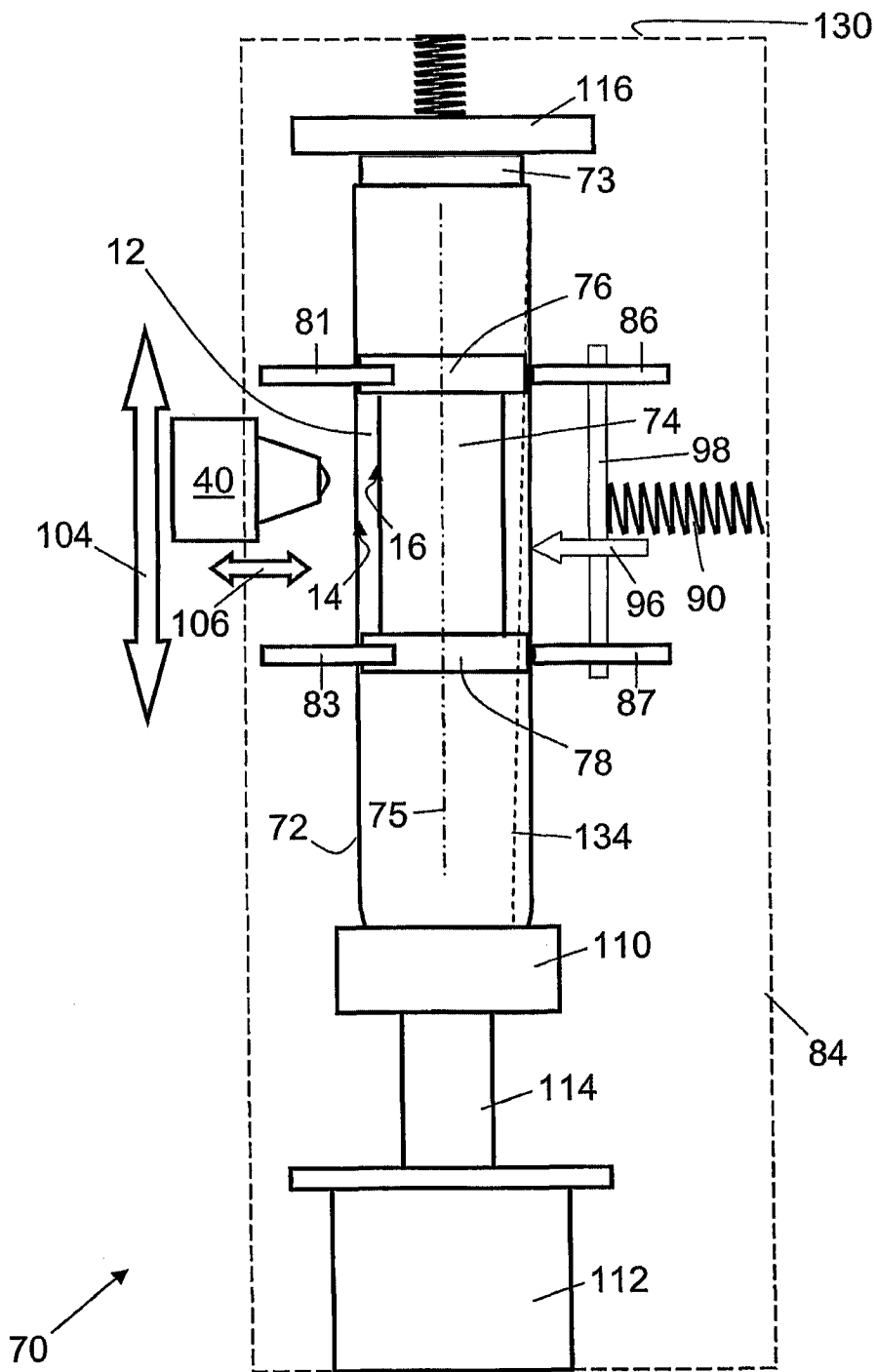


图 6

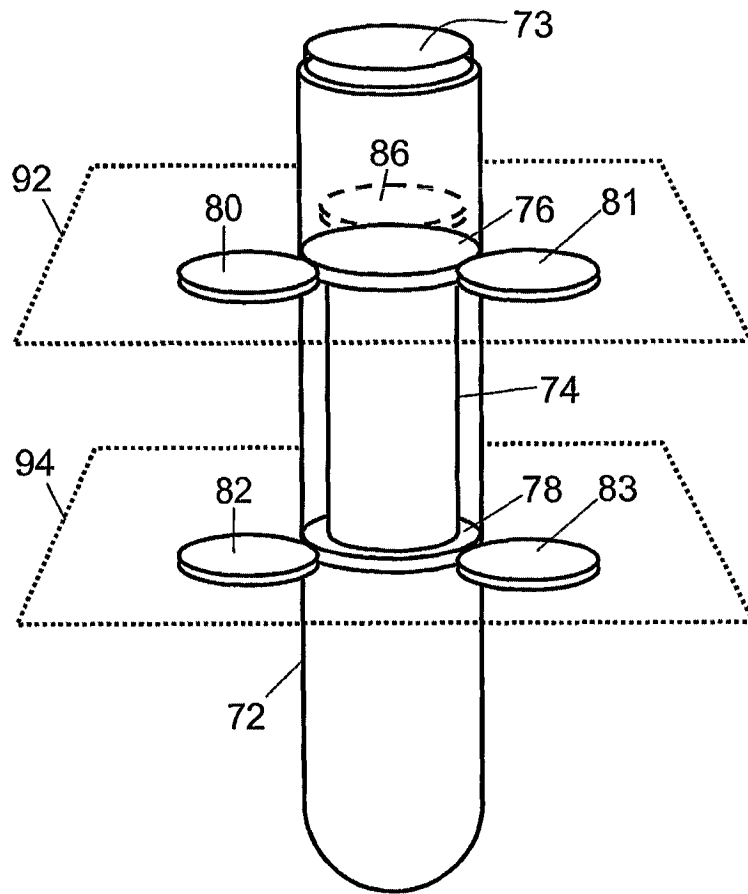


图 7

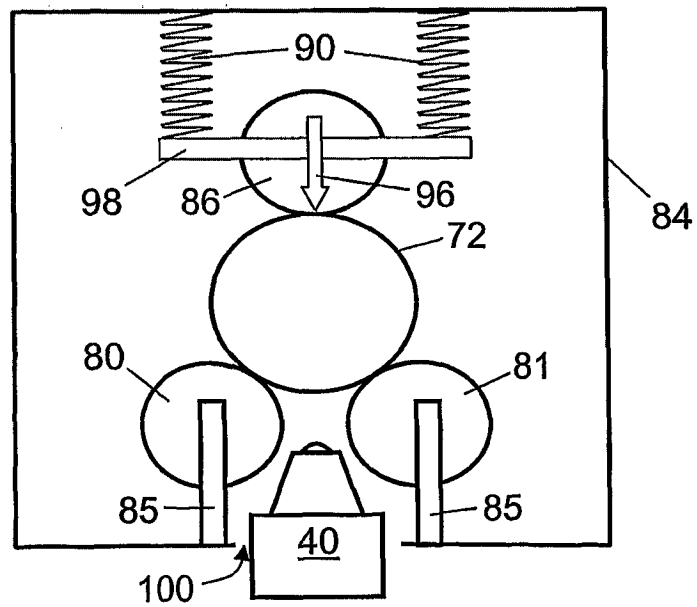


图 8

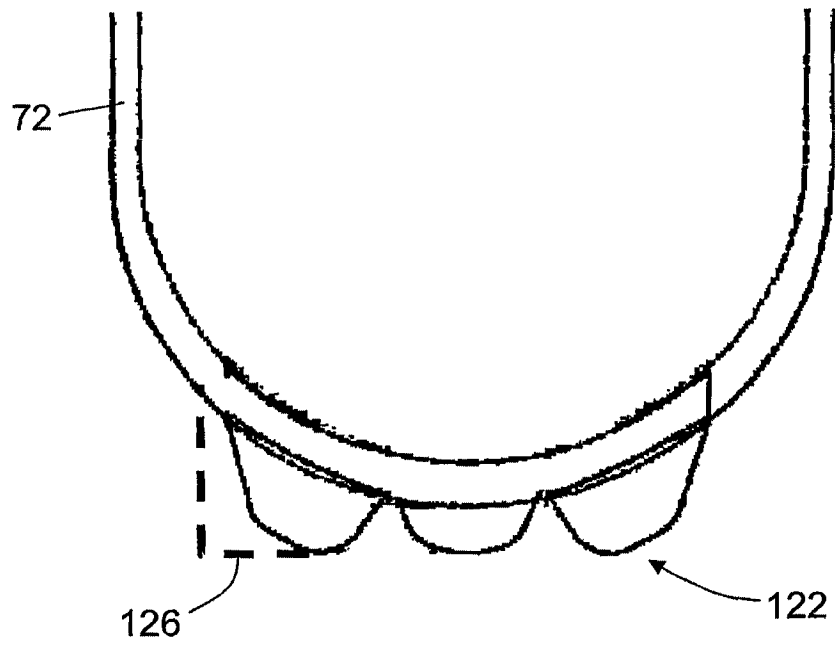


图 9

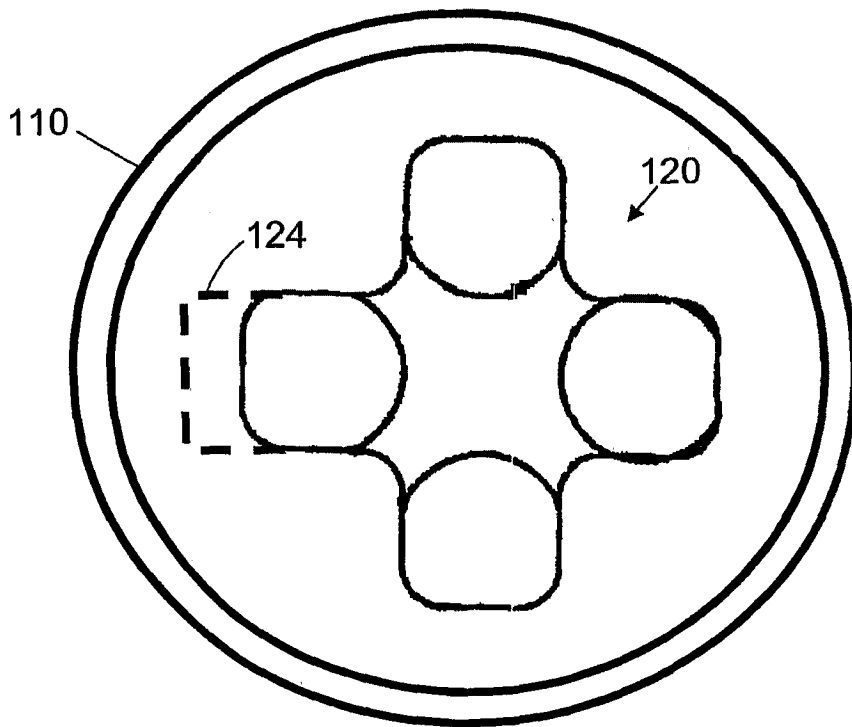


图 10



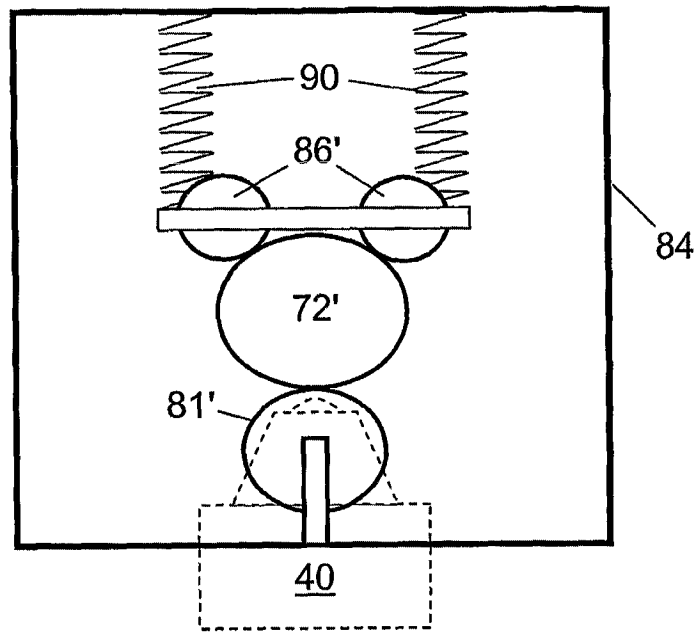


图 11A

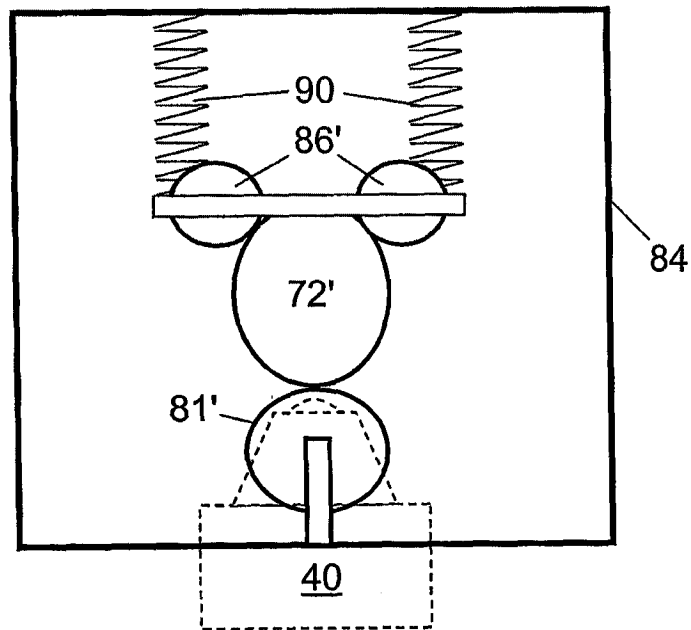


图 11B

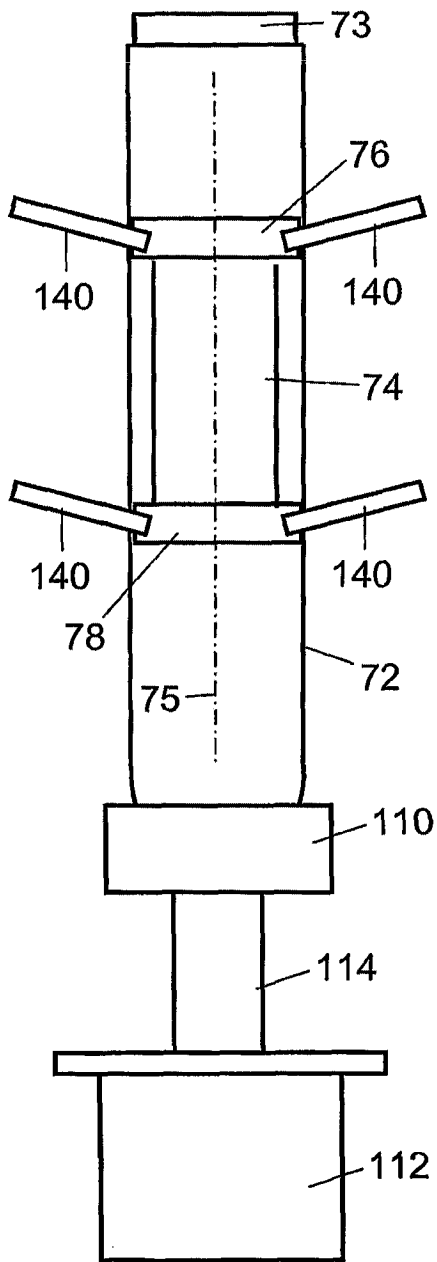


图 12

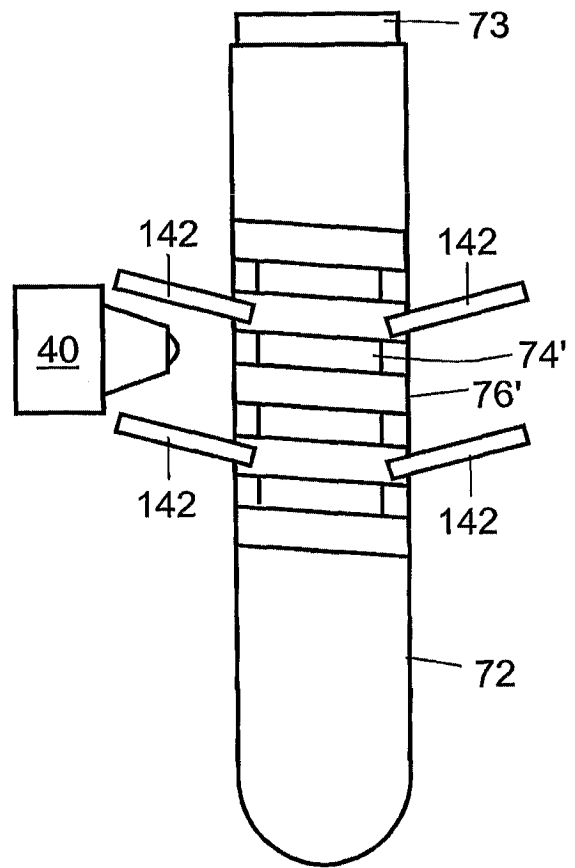


图 13

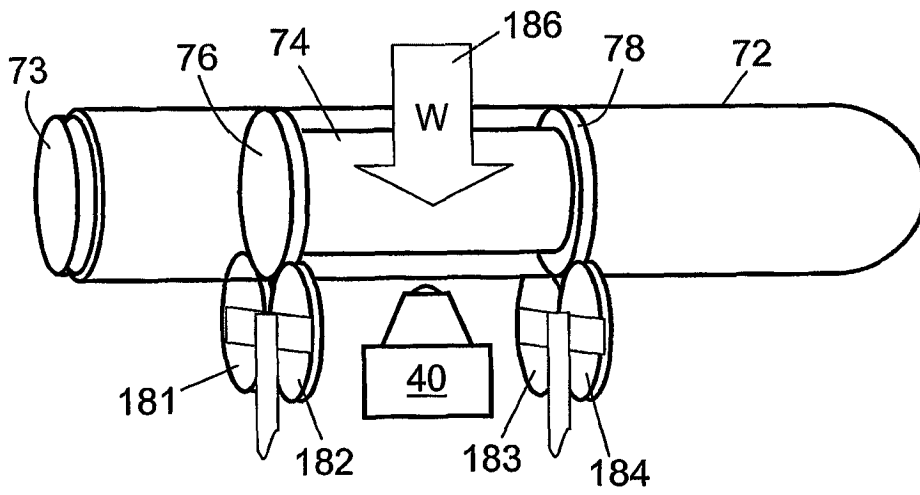


图 14

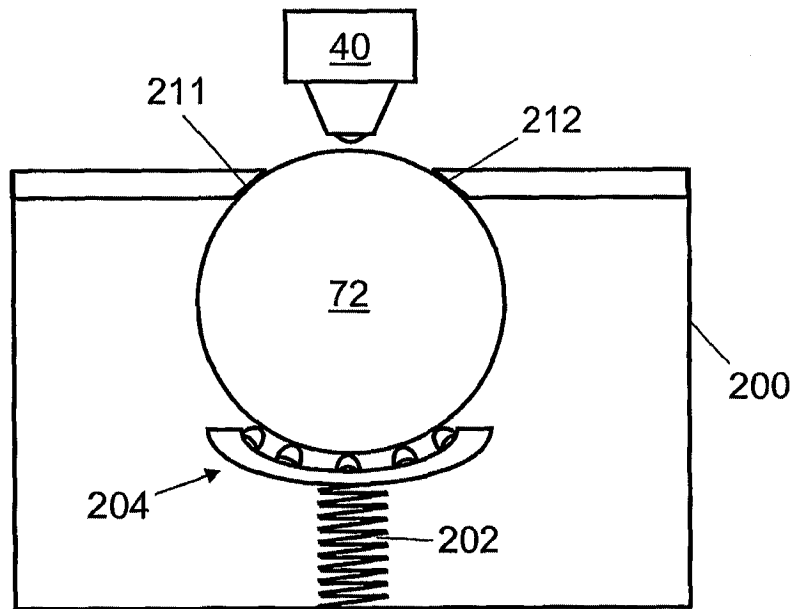


图 15

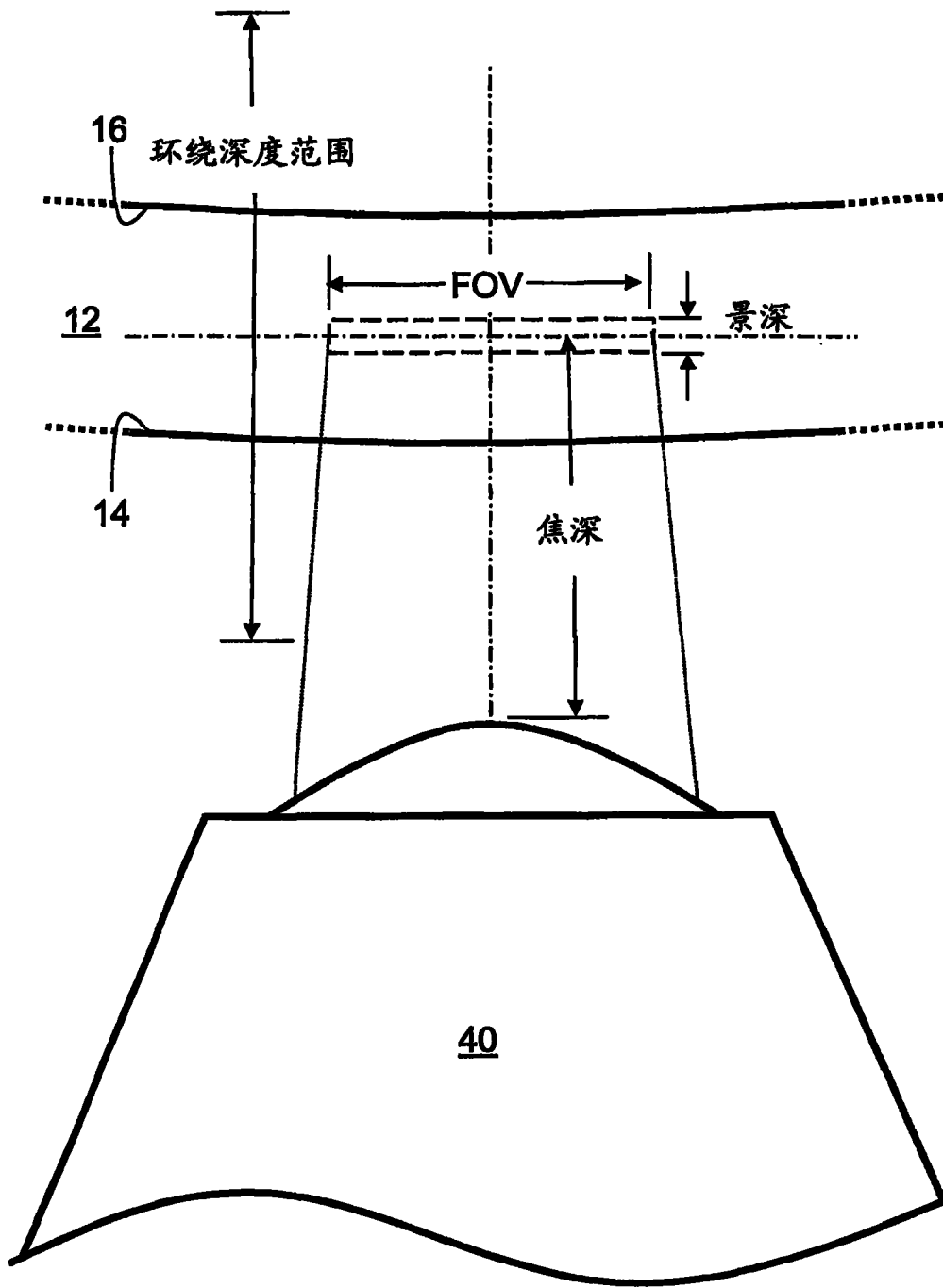


图 16

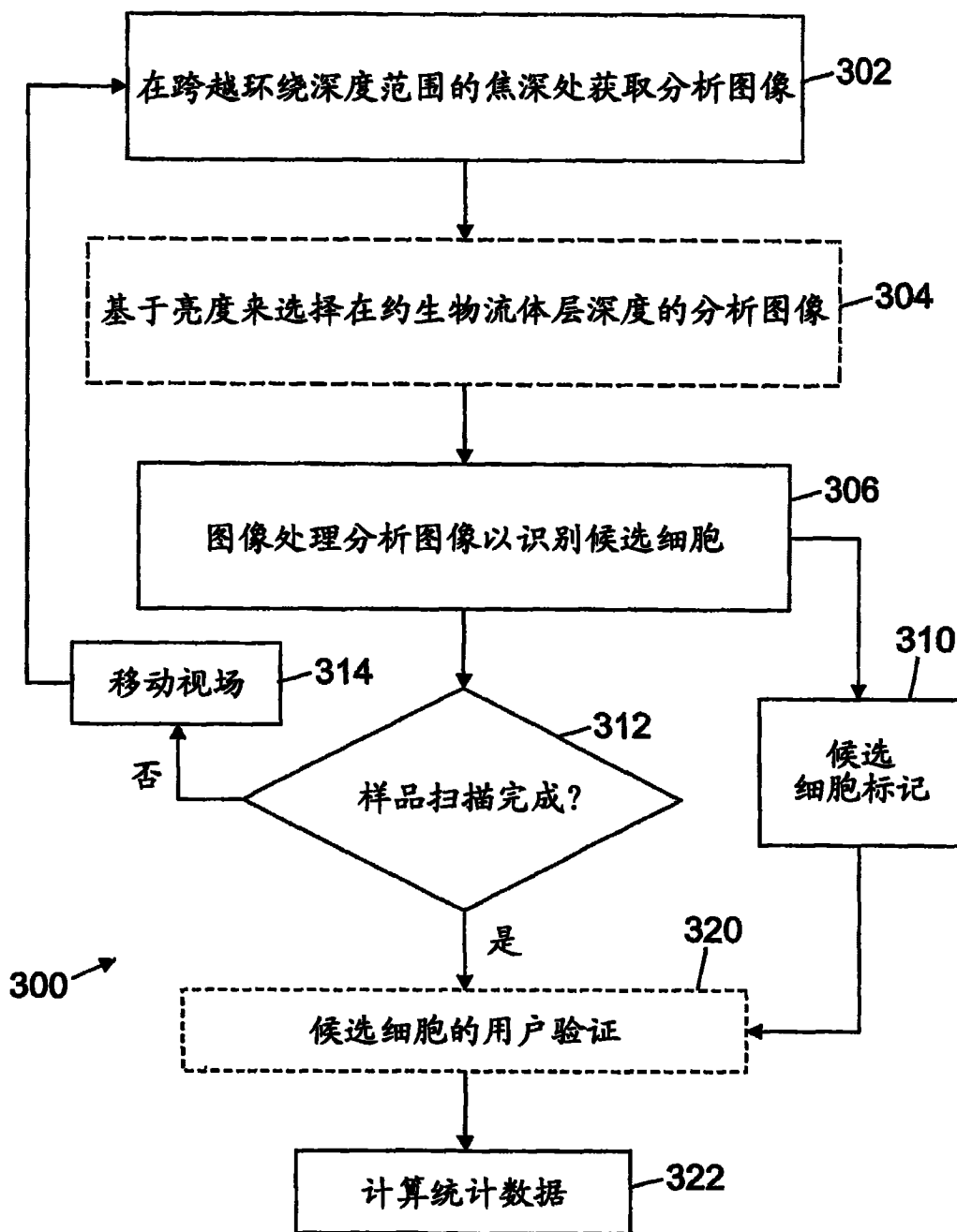


图 17

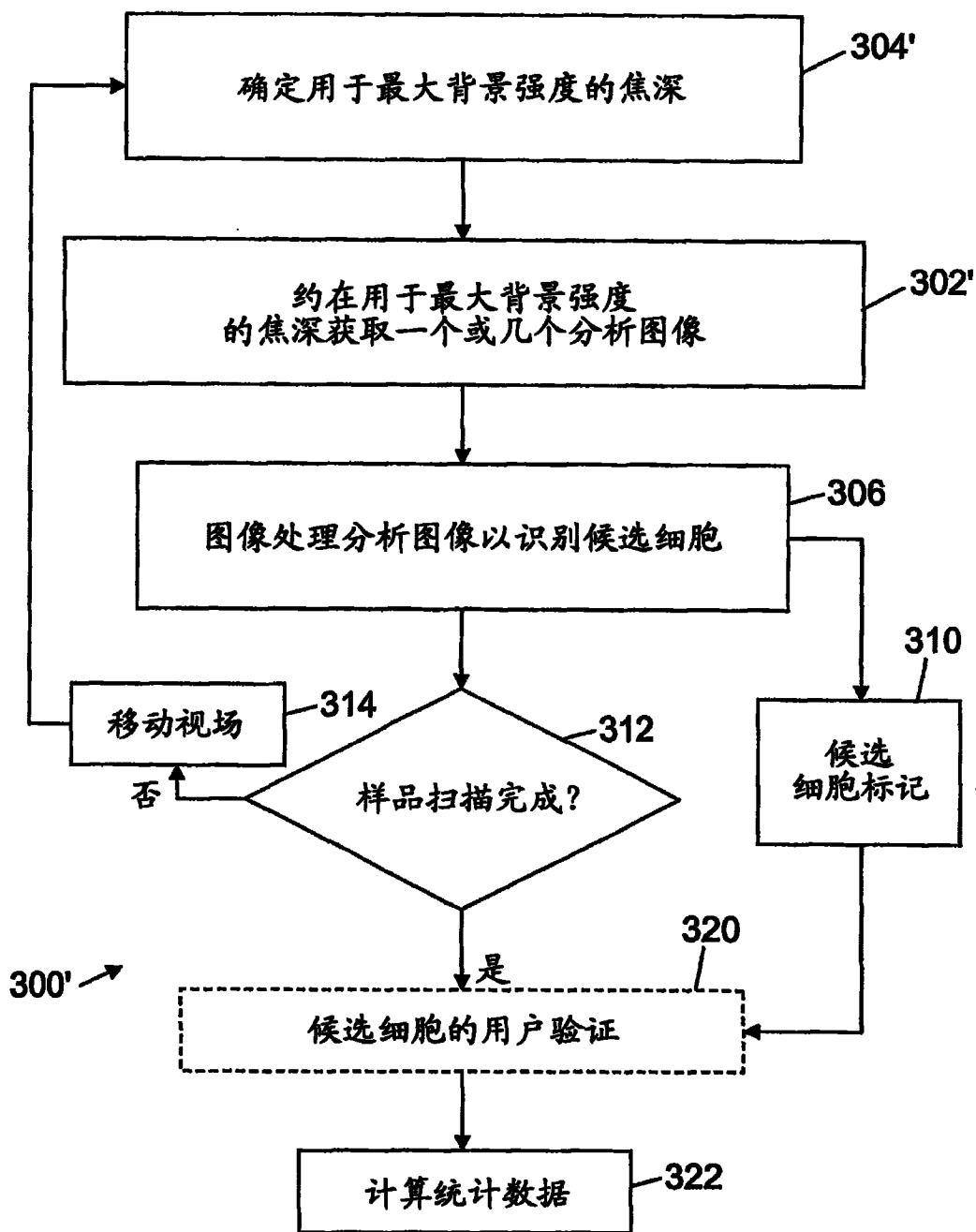


图 18

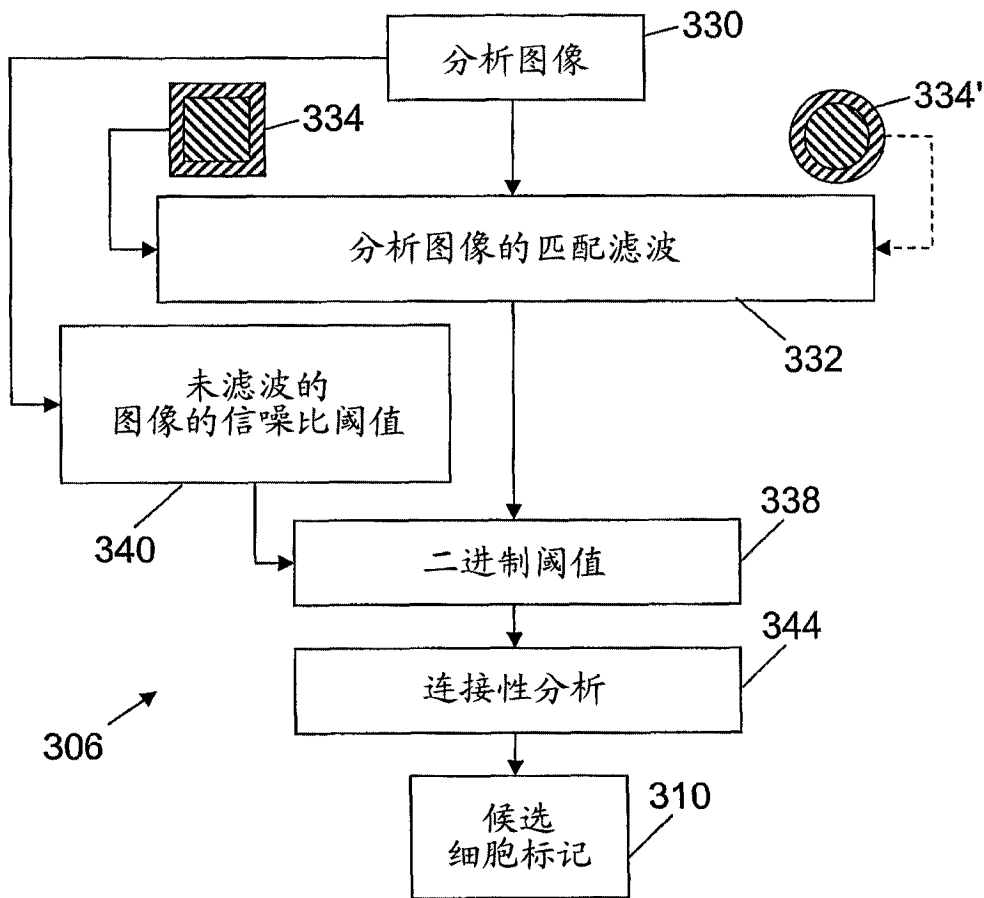


图 19

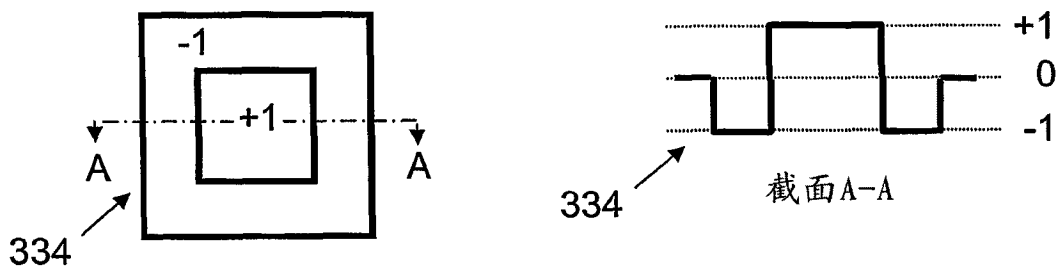


图 20

图 21

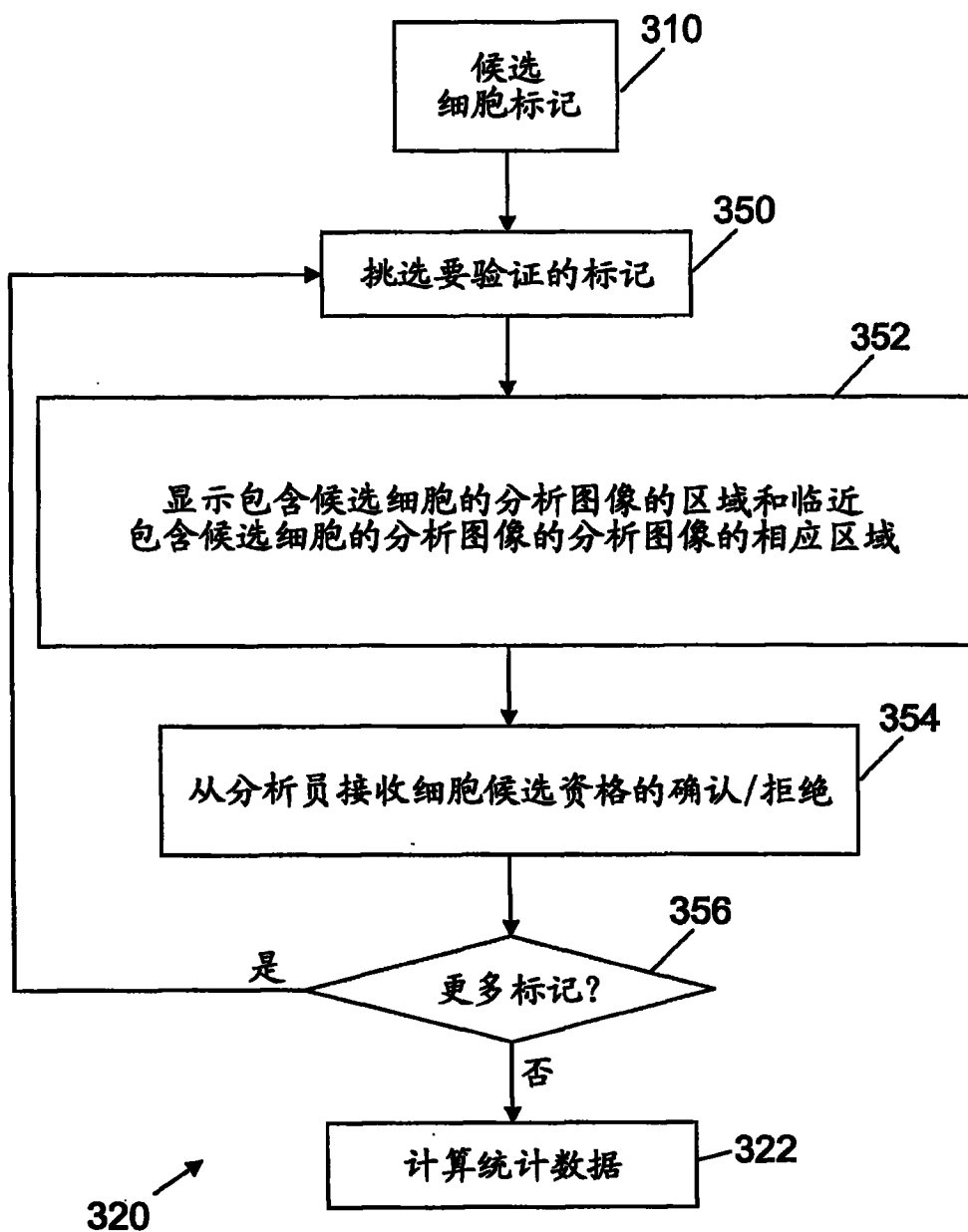


图 22