



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820990.7

[43] 公开日 2005 年 2 月 2 日

[11] 公开号 CN 1575475A

[22] 申请日 2002.9.11 [21] 申请号 02820990.7

[30] 优先权

[32] 2001. 9. 12 [33] US [31] 60/322,863

[32] 2002. 1. 31 [33] US [31] 60/353,300

[32] 2002. 1. 31 [33] US [31] 60/353,921

[32] 2002. 2. 5 [33] US [31] 60/355,644

[32] 2002. 2. 8 [33] US [31] 60/355,304

[32] 2002. 2. 19 [33] US [31] 60/358,479

[32] 2002. 3. 12 [33] US [31] 60/363,949

[32] 2002. 8. 21 [33] US [31] 60/404,921

[86] 国际申请 PCT/US2002/028958 2002.9.11

[87] 国际公布 WO2003/023571 英 2003.3.20

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.22

[71] 申请人 长冈实业株式会社

地址 日本兵库县

[72] 发明人 麦克海尔·马特维夫

安德鲁·A·佩尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

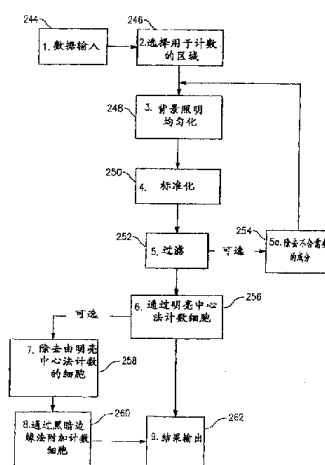
代理人 王永刚

权利要求书 9 页 说明书 65 页 附图 77 页

[54] 发明名称 用于差分细胞计数的方法以及用于
执行该方法的相关装置和软件

[57] 摘要

本发明提供了一种用于成像细胞特别是血细胞的光学方法、系统和软件。在一个实施例中,含有血细胞的实验室样品沉积在光生物盘上,该光生物盘是专门制造的光盘,具有混合室,其含有特效抗原用于锁定血细胞的各种组分。一旦放入光驱动器,光盘便会旋转,且样品和抗原与其它溶液混合。然后将电磁波束导向到光生物盘上,在特殊捕获区与样品相互作用,并通过探测器收集结果波束。然后包含在波束内的信息发送给处理器,由处理器产生数字图象。执行各种图象处理的方法,例如二值化、背景均匀化、标准化和过滤,以强化调查数据中用于精确计数的细胞。设计其它的技术用于修正不规则,例如气泡和模糊细胞。



1. 一种对细胞进行计数的方法，该方法包括如下步骤：
获得含细胞样品的调查数据；
在所述调查数据中选择估计矩形；
在所述估计矩形内强化所述调查数据；和
对所述估计矩形内的细胞进行计数。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述选择步骤进一步包括对所述估计矩形选择自定义尺寸的步骤。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述选择步骤选择多个估计矩形。
4. 权利要求 1 的方法，其中所述强化所述调查数据区域的步骤进一步包括如下步骤：
对所述调查数据执行背景照明均匀化；
对所述调查数据执行标准化；和
过滤所述调查数据。
5. 权利要求 4 的方法，其中所述执行背景照明均匀化的步骤进一步包括如下步骤：
为相邻矩形选择尺寸；
在所述调查数据中选取一个点；
执行水平扫描从而为将中心定于所述点的所述相邻矩形内的所有相邻点计算第一滑动平均值；
执行垂直扫描从而为将中心定于所述点的所述相邻矩形内的所有相邻点计算第二滑动平均值；
组合所述第一滑动平均值与第二滑动平均值产生整体平均值；
将所述点的原始值重新分配给一个结果值，该结果值通过获得所述整体平均值与所述原始值之间的差值并将所述差值加到背景值而计算出来；和
对所述调查数据中的所有点重复所述执行水平扫描、执行垂直扫描、组合两个所述平均值和重新分配原始值的步骤。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述执行背景照明均匀化的步骤进一步包括如下步骤：

对所述调查数据执行傅立叶变换以产生频域函数；

从所述频域函数中除去低波长函数；

从所述频域函数中除去高波长函数；和

对所述频域函数执行逆变换以获得所述调查数据的修改版本。

7. 权利要求 4 的方法，其中所述执行标准化的步骤进一步包括如下步骤：

计算所述调查数据中所有点数值的平均值和标准偏差；

使用所述平均值和标准偏差使所述调查数据中的所有点的数值标准化；和

如果需要则截去一些点的所述数值。

8. 权利要求 4 的方法，其中所述过滤步骤进一步包括如下步骤：

为相邻矩形选择一个尺寸；

在所述调查数据中选取一个点；

发现位于将中心定于所述点的所述相邻矩形内的所有足够区别的点；

如果所述足够区别的点的数目大于预先确定的过滤标准则重新分配所述点的数值；和

重复所述发现所有足够区别的点并为所述调查数据中的所有点重新分配数值的步骤。

9. 权利要求 4 的方法，进一步包括步骤：

在所述过滤步骤之后从所述调查数据中除去不合需要的成分；和

重复所述执行背景照明的步骤、所述执行标准化的步骤和所述过滤步骤。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述除去不合需要成分的步骤进一步包括如下步骤：

选择阈值；

使用该阈值对所述调查数据执行二值化；

对所述调查数据执行规则化;
提取关联成分;
选择尺寸阈值; 和
除去不满足所述尺寸阈值的成分。

11. 权利要求 10 的方法, 其中所述执行规则化的步骤进一步包括执行多个侵蚀和扩展的步骤。

12. 权利要求 10 的方法, 其中所述提取关联成分的步骤进一步包括如下步骤:

对所述调查数据上的所有黑色点分配初始成分数目;
选取开始点;
设定扫描方向;
扫描所述调查数据的所有点以重新分配每个所述黑色点的成分数目从而与相邻黑色点的成分数目相匹配;
根据一组预先确定的规则改变所述扫描方向; 和
重复所述扫描和改变的步骤从而使关联的黑色点的所述成分数目相同。

13. 权利要求 1 的方法, 其中对所述显示于所述估计矩形内的细胞进行计数的步骤进一步包括如下步骤:

对所述调查数据执行卷积;
寻找所述调查数据的多个局部最大值;
从所述多个局部最大值中除去冗余的局部最大值;
断言剩余的最大值为细胞的明亮中心; 和
通过识别所述细胞的明亮中心对细胞进行计数。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所述执行卷积的步骤使用定义了一个圆形邻域的指示函数, 其中所述圆形邻域限定了细胞预期尺寸的边界。

15. 权利要求 13 的方法, 其中所述执行卷积的步骤使用高斯指示函数。

16. 权利要求 13 的方法, 其中所述除去冗余局部最大值的步骤

进一步包括如下步骤:

选择距离阈值; 和

使用所述距离阈值以确定一个局部最大值是否是冗余的。

17. 权利要求 13 的方法, 进一步包括执行统计分析的步骤, 其包括如下步骤:

根据已计数细胞获得细胞的分布; 和

估计细胞凝集或可见性低的区域内的细胞数量。

18. 权利要求 13 的方法, 进一步包括如下步骤:

以更高的分辨率重新取样所述调查数据; 和

重复所述执行卷积、寻找多个局部最大值、除去冗余局部最大值、断言剩余的最大值为细胞的明亮中心和通过识别所述细胞的明亮中心对细胞进行计数的步骤。

19. 权利要求 13 的方法, 进一步包括如下步骤:

从所述调查数据中除去所述通过明亮中心计数的细胞;

通过识别黑暗边缘对细胞进行计数; 和

将从通过识别明亮中心对细胞进行计数的步骤获得的总数和从通过识别黑暗边缘而计数的步骤获得的总数相加。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述通过识别黑暗边缘对细胞进行计数的步骤进一步包括如下步骤:

对所述调查数据执行反转;

执行多次使用移动环的卷积;

总和来自所述多次卷积的结果;

发现局部最大值;

断言最大值为细胞的中心; 和

对所述细胞的中心进行计数。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述执行多次卷积的步骤无移动环地执行卷积。

22. 权利要求 20 的方法, 其中所述执行卷积的步骤使用高斯指示函数。

23. 权利要求 20 的方法，其中所述执行卷积的步骤使用光滑函数。

24. 权利要求 1 的方法，其中所述对显示于所述估计矩形内的细胞进行计数的步骤进一步包括如下步骤：

- 对所述调查数据执行反转；
- 执行多次使用移动环的卷积；
- 总和来自所述多次卷积的结果；
- 发现局部最大值；
- 断言最大值为细胞的中心；和
- 对所述细胞的中心进行计数。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述执行多次卷积的步骤无移动环地执行卷积。

26. 权利要求 1 的方法，其中所述强化步骤进一步包括如下步骤：

- 对所述调查数据执行标准化；
- 对所述调查步骤执行过滤；
- 选择阈值数目；

通过确定所述调查数据是否与一组背景值相差大于所述阈值数目的数值而对所述调查数据执行二值化；

- 对所述调查数据执行规则化；
- 在所述调查数据中提取一个像素宽度的边界；
- 用调查数据填充由所述一个像素宽度的边界限定的区域；和
- 在所述区域填充中应用卷积。

27. 权利要求 1 的方法，进一步包括在计算机监视器上显示表示所述调查数据的图象的步骤。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述显示步骤进一步包括如下步骤：

- 对所述调查数据进行快速傅立叶变换以在频域中产生调查数据；
- 除去频域内的一部分频谱；和
- 对频域内的所述调查数据执行逆变换以强化用于显示的所述调

查数据。

29. 权利要求 1 的方法，其中所述获得含有细胞样品的调查数据的步骤包括如下步骤：

在光盘表面上提供血液样品，所述表面包括一个或多个具有一种或多种捕获剂的捕获区；

将所述光盘装载到光学阅读器内；

旋转所述光盘；

将电磁辐射的入射波束从光源导向到所述捕获区的其中一个；

用探测器探测电磁辐射的结果波束，该结果波束在所述入射波束与光盘在所述捕获区相互作用之后形成；

将探测到的波束转换成模拟输出信号；和

将所述模拟输出信号转换成含有在所述捕获区捕获的细胞的数字数据。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述将所述模拟输出转换成所述数字数据的步骤进一步包括如下步骤：

以固定的间隔取样所述模拟信号的幅度；

将所述取样振幅记录在一维阵列内；

使用所述取样和记录步骤产生多个一维阵列；和

组合所述多个一维阵列产生含有所述样品的数字数据的二维阵列。

31. 根据权利要求 29 的方法，其中所述光盘用反射层构建，从而导向到所述捕获区的光线被反射到所述探测器。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述探测器是底部探测器。

33. 根据权利要求 29 的方法，其中光盘构建成使导向到所述捕获区的光线透射通过所述光盘，所述光盘在所述光源与所述探测器之间。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述探测器是顶部探测器。

35. 权利要求 33 的方法，其中所述探测器是分波探测器。

36. 权利要求 29 的方法，其中所述一个或多个捕获区定位在所

述光盘内的一个或多个室内。

37. 权利要求 29 的方法，其中所述光盘包括多个相应于所述捕获区的窗口。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述选择估计矩形的步骤进一步包括如下步骤：

在所述调查数据中发现所述多个窗口的其中一个；和

在所述窗口内修剪标准尺寸的估计矩形。

39. 权利要求 37 的方法，其中发现所述多个窗口的其中一个的步骤进一步包括如下步骤：

对所述调查数据执行压缩；

对所述调查数据执行阈值估计；

对所述调查数据执行二值化；

对所述调查数据执行规则化；

从所述调查数据中提取关联成分；和

从所述关联成分中发现对应于一个窗口的成分。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述提取关联成分的步骤进一步包括如下步骤：

为所述调查数据上的所有黑色点指定初始成分数目；

选取开始点；

设定扫描方向；

扫描所述调查数据的所有点以重新分配每个所述黑色点的成分数目以便与相邻黑色点的成分数目相匹配；

根据一组预先确定的规则改变所述扫描方向；和

重复所述扫描和改变的步骤从而使关联的黑色点的所述成分数目相同。

41. 权利要求 29 的方法，其中所述光盘的表面含有标记所述捕获区位置的暗点。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述选择估计矩形的步骤进一步包括：

在所述调查数据中发现所述暗点的其中一个；和
产生标准尺寸的估计矩形，中心位于通过从所述暗点移动预先确定的距离发现的点处。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述发现所述暗点的其中一个的步骤进一步包括如下步骤：

- 对所述调查数据进行压缩；
- 对所述调查数据进行阈值估计；
- 对所述调查数据进行二值化；
- 对所述调查数据进行规则化；
- 从所述调查数据提取关联成分；和
- 从所述关联成分中发现相应于暗点的成分。

44. 权利要求 43 的方法，其中所述提取关联成分的步骤进一步包括如下步骤：

- 为所述调查数据上的所有黑色点指定初始成分数目；
- 选取开始点；
- 设定扫描方向；
- 扫描所述调查数据的所有点以重新分配每个所述黑色点的成分数目以便与相邻黑色点的成分数目相匹配；
- 根据一组预先确定的规则改变所述扫描方向；和
- 重复所述扫描和改变的步骤从而使关联的黑色点的所述成分数目相同。

45. 权利要求 42 的方法，其中所述发现所述暗点其中一个的步骤进一步包括读取位置信息的步骤。

46. 权利要求 29 的方法，其中所述光盘含有用于定位所述捕获区的计算机可读的位置信息。

47. 权利要求 37 的方法，进一步包括在计算机监视器上显示所述窗口的图象的步骤。

48. 权利要求 47 的方法，其中所述显示所述窗口的所述图象的步骤进一步包括：

确定所述图象是否歪斜;
发现歪斜的方向; 和
修正所述图象的歪斜。

49. 权利要求 1 的方法, 其中所述获得所述含有细胞样品的调查数据的步骤包括从存档中检索先前存储的样品的调查数据。

50. 权利要求 49 的方法, 其中所述存档根据患者的特征对所述存储的调查数据进行分类。

51. 权利要求 50 的方法, 其中所述检索先前存储的样品调查数据的步骤进一步包括如下步骤: 选择与多个从所述患者的特征中选则出的标准相匹配的样品从而进行人口健康趋势分析。

52. 权利要求 1 的方法, 进一步包括输出来自所述对细胞进行计数步骤的结果的步骤。

53. 权利要求 52 的方法, 其中所述细胞是白细胞。

54. 权利要求 53 的方法, 其中所述结果包括 CD4+细胞和 CD8+细胞的计数, 和 CD4+与 CD8+细胞的比率。

55. 权利要求 54 的方法, 其中所述结果进一步包括 CD3+细胞和 CD45+细胞的计数。

56. 权利要求 1 的方法, 其中所述对细胞进行计数的步骤进一步包括如下步骤:

对气泡痕迹分析细胞分布;
忽略具有过小的局部细胞浓度的区域; 和
重新计算细胞的计数。

用于差分细胞计数的方法以及 用于执行该方法的相关装置和软件

相关专利申请参考

本发明要求获得如下专利申请的优先权，它们是美国临时专利申请序列 No.60/322,863，其于 2001 年 9 月 12 日提出申请；美国临时专利申请序列 No.60/355,300，其于 2002 年 1 月 31 日提出申请；美国临时专利申请序列 No.60/353,921，其也是于 2002 年 1 月 31 日提出申请；美国临时专利申请序列 No.60/355,644，其于 2002 年 2 月 5 日提出申请；美国临时专利申请序列 No.60/355,304，其于 2002 年 2 月 8 日提出申请；美国临时专利申请序列 No.60/358,479，其于 2002 年 2 月 19 日提出申请；美国临时专利申请序列 No.60/63,949，其于 2002 年 3 月 12 日提出申请；和美国临时专利申请序列 No.60/404,921，其于 2002 年 8 月 21 日提出申请。在此全文引用这些专利申请和公开作为参考。

关于已获得版权的材料声明

本专利文件公开的一部分含有受到版权保护的材料。版权所有人不反对任何人按照其在专利商标局的文档或记录中出现的形式复制本专利文件和专利公开的副本，但保留其它所有的版权。

技术领域

本发明涉及信号探测装置、数据处理方法和相关计算机软件及化验算法（assay algorithms）。本发明更特别地致力于成像生物样品，例如细胞样品，并分析所收集的数据。更特别地，但不仅限于下文根据实践的最佳模式说明的特殊实施例，本发明涉及用于差分细胞计数（differential cell counting）的方法，包括白细胞，以及用于执行该细胞计数的光生物盘的使用。

背景技术

大量的研究和诊断情况都需要从细胞混合物中分离和分析特殊的细胞。这种混合物的来源可以包括血液、脊髓液、骨髓、肿瘤匀浆、淋巴组织和其它含有细胞物质的样品。

完全血细胞计数 (complete blood count) (CBC) 是检测包括血红蛋白、血细胞比容、平均血细胞血红蛋白、平均血细胞血红蛋白浓度、平均血细胞体积、血小板总数和白细胞总数的集合。最常用的临床检测是总 CBC 计数，其常规地用于评估健康状况和临床诊断、治疗及跟踪调查 (follow-up)。

白细胞 (WBC) 通过抵抗感染和攻击外来物质 (foreign material) 保护肌体。差分白细胞计数确定白细胞的数量和人血中每种类型白细胞的百分比。WBC 或白细胞计数提供了疾病存在的线索。这些检测包含在通常的健康检测之中，并有助于调查各种疾病，包括感染、过敏症和白血病。在需要额外的白细胞时，骨髓将增加产量。

有五种类型的白细胞，每一种具有不同的功能：嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜伊红细胞和嗜碱细胞。差分显示出这些细胞是否以正常的分布存在，或者是否有一种细胞类型增加了或减少了。在正常健康人中，典型的 WBC 总数为每微升 (μl) 4,000-10,800 个细胞。如下因素，例如锻炼、应激 (stress) 和疾病等能够影响这些数值。这一信息有助于诊断特殊类型的疾病。高 WBC 可能表明感染、白血病或组织损伤。如果降到每微升低于 1,000 个细胞，则感染的危险增加。减弱免疫系统的疾病 (condition) 和药物，例如 AIDS 或化疗，会导致白细胞减少。从疾病中恢复可以通过白细胞加以监测。总数持续增加或降低到异常的水平表示疾病正在恶化；总数返回到正常表示状况改善。

白细胞差分检测 (differential testing) 是收集超出可以从白细胞计数自身获得的信息之外的信息不可或缺的。白细胞差分计数用于评估新近的疑似感染或感冒 (如果 CBC 正常)、伴随异常的疑似紊乱、

白细胞总数异常、疑似白血病和其它异常，例如嗜酸粒细胞增多、单核细胞增多、嗜碱细胞增多。白细胞或白细胞差分的重复测试可以在出现严重白血球减少症的情况下进行（例如在药物治疗之后）。在治疗期间，例如化疗或放疗，血液计数对于确定治疗是否除了消灭了癌细胞之外也消灭了正常的血细胞是非常重要的。

差分白细胞计数通过计算机细胞计数设备加以确定。机器确定五种主要白细胞类型的总数和百分比。在正常个体中，大多数是嗜中性粒细胞（50-60%），其次是淋巴细胞（20-40%），然后是单核细胞（2-9%），有少量的嗜伊红细胞（1-4%）和嗜碱细胞（0.5-2%）。

在淋巴细胞分类中，有进一步的细胞亚型。例如，淋巴细胞能够广义地分为 T 细胞（胸腺产生的淋巴细胞）和 B 细胞（囊等同物淋巴细胞（bursal-equivalent lymphocyte）），它们分别大量响应细胞介导的免疫和体液免疫。尽管形态学特征已经用于划分白细胞的类群，但是已经证明，形态学自身不足以区分淋巴细胞亚型的许多功能。为了区分具有各种功能的淋巴细胞，已经开发出了许多技术，包括玫瑰花结分析（analysis by rosetting）、免疫荧光显微镜、酶组织化学和最近的抗独特细胞表面标记物的单克隆抗体。

嗜中性粒细胞对于抗击感染很重要。当嗜中性粒细胞数目下降到低于每微升 1,000 个细胞时，该状况称为嗜中性白血球减少症。淋巴瘤治疗能够导致嗜中性白血球减少症。肥胖和吸烟会增加嗜中性粒细胞总数。淋巴细胞分为 B 淋巴细胞（骨髓中化脓）和 T 淋巴细胞（胸腺中化脓）。当成年人的淋巴细胞总数下降到低于每微升 1,500 个细胞，或者在儿童体内低于每微升 3,000 个细胞时，该状况称为淋巴细胞减少症。淋巴瘤能够导致淋巴细胞减少症。

血小板（凝血细胞）是类似细胞的颗粒，其通过聚集在发生出血的部位而停止出血。然后，它们激活并凝集在一起，以停止出血和促进凝血。如果患者患有骨髓增殖紊乱（myeloproliferative disorder），包括感染、炎症、恶性肿瘤，以及如果切除了脾，则在剧烈激活期间，血小板数量增加。血小板数量过多称为血小板增多症。

标准血液样品内血小板的数量典型地为每微升 (μl) 133,000-333,000 个血小板。血小板数量过高称作血小板增多症 (thrombocythemia)。高于正常的血小板总数可能是由于反应性响应 (reactive response) 或骨髓衰竭 (bone marrow failure)。反应性响应典型地由出血、感染、肿瘤形成和骨髓增生紊乱 (myeloproliferative disorder) 导致。骨髓衰竭通常涉及血细胞损失, 称作全血细胞减少症。另一方面, 血小板总数的减少是因为免疫血小板减少症。如果血小板总数下降到低于 30,000 则发生血小板减少症, 其会导致异常出血。总数低于 5,000 则认为有生命危险。

CBC 可以通过商业上可获得的手动或电子仪器执行, 它们测量血红蛋白水平、血细胞比容、总白细胞和红细胞总数。变化可以包括血小板计数、白细胞差分计数和细胞指数 (cell indices)。血液分析仪完全自动化, 且细胞计数、体液中的细胞类型和胃排空 (gastric aspiration) 的结果精确, 其中体液包括例如 CSF、胸腔液、禁欲液 (ascetic fluid)、心包液。

与先前的方法和系统相比, 我们开发出了一种用于对成像和分析细胞及其成分的简单、微型、极其灵敏、低廉的系统。该系统使用光学光生物盘、相关探测组件以及信息和信号的处理方法和软件。

发明内容

本发明涉及用于成像和计数实验室样品中细胞物质的方法、装置和软件。本发明的实施例生成样品中细胞的数字图象, 并对图象进行计算机分析。本发明成像细胞, 特别是血细胞, 包括在血液和其它生物液中滋生的寄生虫和病原体。在其它化验中, 对珠子 (bead) (基于珠子的化验)、凝集物质、沉淀 (酶反应) 或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记 (biological reporters) 进行成像。该系统使用光学光生物盘、相关探测组件, 以及信息和信号处理的方法和软件。

本发明还致力于光生物盘、生物驱动和相关方法。本发明或其不

同的方面可以容易地在如下的光盘、化验和系统中实现，或者能够容易地适用于或与它们结合使用，这些光盘、化验和系统在如下共同转让的并且同在审理中（commonly assigned and co-pending）的专利申请中公开，这些专利申请包括：美国专利申请序列 No.09/378,878，题目为“用于分析从光盘获得的可操作和非可操作数据的方法和装置”

（Methods and Apparatus for Analyzing Operational and Non-operational Data Acquired from Optical Discs），其于1999年8月23日提出申请；美国临时专利申请序列 No.60/150,288，题目为“用于使用物理同步化标记物获取光盘数据的方法和装置”（Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers），其于1999年8月23日提出申请；美国专利申请序列 No.09/421,870，题目为“具有并发可读分析物材料的可跟踪光盘”（Trackable Optical Discs with Concurrently Readable Analyte Material），其于1999年10月26日提出申请；美国专利申请序列 No.09/643,106，题目为“用于使用物理同步化标记物获取光盘数据的方法和装置”（Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers），其于2000年8月21日提出申请；美国专利申请序列 No.09/999,274，题目为“具有反射层的光生物盘”（Optical Biodiscs with Reflective Layers），其于2001年11月15日提出申请；美国专利申请序列 No.09/988,728，题目为“使用光生物盘探测和定量淋巴细胞的方法和装置”（Methods and Apparatus for Detecting and Quantifying Lymphocytes with Optical Biodiscs），其于2001年11月20日提出申请；美国专利申请序列 No.09/988,850，题目为“使用光生物盘进行血液分类的方法和装置”

（Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-discs），其于2001年11月19日提出申请；美国专利申请序列 No.09/989,684，题目为“用于分离粘聚物和分散颗粒的装置和方法”（Apparatus and Methods for Separating Agglutinants and Disperse Particles），其于2001年11月20日提出申请；美国专利申请序列 No.09/977,741，题目

为“包括光生物盘的双珠化验及其相关方法”(Dual Bead Assays Including Optical Biodiscs and Methods Relating Thereto), 其于 2001 年 11 月 27 日提出申请; 美国专利申请序列 No.09/977,895, 题目为“用于分离特殊悬浊液组分的装置和方法”(Apparatus and Methods for Separating Component of Particulate Suspension), 其于 2001 年 11 月 30 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/005,313, 题目为“用于测量分析物的光盘”(Optical Discs for Measuring Analytes), 其于 2001 年 12 月 7 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/006,371, 题目为“使用光盘和光盘阅读器探测分析物的方法”(Methods for Detecting Analytes Using Optical Discs and Optical Disc Readers), 其于 2001 年 12 月 10 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/006,620, 题目为“用于探测分析物的多数据层光盘”(Multiple Data Layer Optical Discs for Detecting Analytes), 其于 2001 年 12 月 10 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/006,619, 题目为“用于执行化验的光盘组件”(Optical Disc Assemblies for Performing Assays), 其于 2001 年 12 月 10 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/020,140, 题目为“用于基于光盘的实验室的探测系统和包括该系统的改良光生物盘”(Detection System For Disk-Based Laboratory and Improved Optical Bio-Disc Including Same), 其于 2001 年 12 月 14 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/035,836, 题目为“用于固定 DNA 捕获探针的表面组件和包括光生物盘的基于珠子的化验及其相关方法”(Surface Assembly for Immobilizing DNA Capture Probes and Bead-Based Assay Including Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto), 其于 2001 年 12 月 21 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/038,297, 题目为“包括用于改进特异性的共价键合的双珠化验及相关分析光盘”(Dual Bead Assays Including Covalent Linkages for Improved Specificity and Related Optical Analysis Discs), 其于 2002 年 1 月 4 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/043,688, 题目为“光盘分析系统及用于生物学和医学成像的相关方法”(Optical Disc Analysis

System Including Related Methods for Biological and Medical Imaging), 其于 2002 年 1 月 10 日提出申请; 美国临时专利申请序列 No.60/348,767, 题目为“光盘分析系统及相关信号处理的方法和软件”

(Optical Disc Analysis System Including Related Signal Processing Methods and Software), 其于 2002 年 1 月 14 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/086,941, 题目为“用于将 DNA 结合在固相上的方法及相关光生物盘和光驱系统” **(Methods for DNA Conjugation Onto Solid Phase Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems)**, 其于 2002 年 2 月 26 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/087,549, 题目为“用于减少双珠化验中珠子非特异键合的方法及相关光生物盘和光驱系统” **(Methods for Decreasing Non-Specific Binding of Beads in Dual Bead Assays Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems)**, 其于 2002 年 2 月 28 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/099,256, 题目为“使用可断开连接臂和/或结扎以提高特异性和敏感性的双珠化验及相关方法和装置” **(Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus)**, 其于 2002 年 3 月 14 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/099,266, 题目为“使用限制性酶和其它化学方法减少双珠化验中的非特异键合及用于探测药物靶标的相关光生物盘、方法和系统装置” **(Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets)**, 其也于 2002 年 3 月 14 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/121,281, 题目为“多参数化验及其相关分析光盘和方法” **(Multi-Parameter Assays Including Analysis Discs and Methods Relating Thereto)**, 其于 2002 年 4 月 11 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/150,575, 题目为“用于在光生物盘组件内提供分析结果像素的可变取样控制及其相关装置” **(Variable Sampling Control for**

Rendering Pixelization of Analysis Results in a Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto), 其于 2002 年 5 月 16 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/150,702, 题目为“在使用酶反应在光生物盘内产生信号的基因化验中用于固定 DNA 探针的表面组件及其相关方法” (**Surface Assembly for Immobilizing DNA Capture probes in Genetic Assays Using Enzymatic Reactions to Generate Signals in Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto**), 其于 2002 年 5 月 17 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/194,418, 题目为“用于分析显微结构的光盘系统及相关探测和解码方法” (**Optical Disc System and Related Detecting and Decoding Methods for Analysis of Microscopic Structures**), 其于 2002 年 7 月 12 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/194,396, 题目为“用于指导化验的多目的分析光盘及用于使用该光盘的各种指示剂” (**Multi-Purpose Optical Analysis Disc for Conducting Assays and Various Reporting Agents for Use Therewith**), 其于 2002 年 7 月 12 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/199,973, 题目为“用于执行体质测量的可传送光盘组件及其相关方法” (**Transmissive Optical Disc Assemblies for Performing Physical Measurements and Methods Relating Thereto**), 其于 2002 年 7 月 19 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/201,591, 题目为“用于执行反应离心的分析光盘及相关驱动组件” (**Optical Analysis Disc and Related Drive Assembly for Performing Interactive Centrifugation**), 其于 2002 年 7 月 22 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/205,011, 题目为“用于光生物盘键合流体线路的方法和装置” (**Methods and Apparatus for Bonded Fluidic Circuit for Optical Bio-Disc**), 其于 2002 年 7 月 24 日提出申请; 美国专利申请序列 No.10/205,005, 题目为“使用光盘驱动的磁珠磁辅助探测” (**Magnetic Assisted Detection of Magnetic Beads Using Optical Disc Drives**), 其也于 2002 年 7 月 24 日提出申请。本文全文引用所有这些专利申请作为参考。因此, 它们提供了背景和相关公开, 作为本文所重复内容的支持。

本发明用于执行化验的一个方法是基于位于在光生物盘特殊沟道内的血细胞的光学成像原理。大约数微升的全血注射到光盘上特殊设计的沟道内。使用细胞识别软件分析图象，辨认各种白细胞亚型并生成白细胞差分计数。该方法以使用抗特定细胞的细胞特异抗体捕获特定细胞为基础。在特殊实例中，抗体定向地抗淋巴细胞（CD2、CD19）、单核细胞（CD14）、嗜伊红细胞（CD15）等。这些白细胞亚型特异抗体组装并附着在光生物盘内的固体表面上，该光生物盘包括流动室（flow chamber）。

光生物盘驱动组件用于旋转光盘，阅读和处理任何存储在光盘内的编码信息，并分析光生物盘流动室内的细胞捕获区。光生物盘驱动安装有用于旋转光生物盘的马达，用于控制光盘旋转速度的控制器，用于处理从光盘返回的信号的处理单元，和用于分析已处理信号的分析器。旋转速度可变，并可以密切地控制速度、方向和旋转时间。光生物盘也可以用于将信息写入到光生物盘上，其可以发生在利用驱动的阅读波束询问流动室和靶区内的检测材料之前、之中或之后，并用分析器加以分析。光生物盘可以含有用于控制光盘旋转的编码信息，提供特定于（specific to）待执行免疫分类化验类型的处理信息，和用于在与生物驱动关联的监视器上显示任何期望的结果。

差分细胞计数方案（protocol），通常上且特别地，差分白细胞计数方案是为 CD、CD-R 或 DVD 格式、这些格式的修改版本及其替代物开发的。驱动的阅读或询问波束探测分析样品中的各种细胞，并产生能够用差分细胞计数器软件加以分析的图象。

显微方法或精致的细胞计数器对于执行这些费事的细胞计数化验是至关重要的。在其它根据本发明进行的化验中，细胞能够替换为珠子（基于珠子的化验）、凝集物质、沉淀（酶反应），或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。

本方法使用光生物盘和相关的光盘组件。通过细胞识别软件程序产生和分析在分析室内游离的或者通过特异抗体方法捕获的各种白细胞亚型的光学图象，该程序通过它们的光散射性鉴别血液或其它体液

中的各种细胞基本组分 (cellular element)。本发明在分析之前不需要对样品进行任何的处理, 例如细胞染色、RBC 清除和其它艰苦的规程。这些方法包括在 CD 型阅读器、DVD 型阅读器或其它光盘阅读器中使用顶部探测器 (top detector)、底部探测器 (bottom detector)、事件计数器 (event counter) 或细胞计数器 (cell counter) 进行显微分析或细胞探测。

下述关于聚类指示分析 (cluster designation analysis), 例如获得 CD4/CD8 比率代表了能够应用本方法、装置、系统和光盘系统的相关化验的特定组群。

光盘制备: 金反射光盘或透射光盘用空气枪 (air gun) 清洁用以除去任何的灰尘颗粒。使用旋转涂布机 (spin coater) 用异丙二醇漂洗光盘两次。将 2% 聚苯乙烯旋转涂布在光盘上从而提供相对厚的涂布 (coating throughout)。

化学沉积: 一个实施例包括三步培育 (incubate) 沉积方案: 链霉素 (streptavidin), 培育 30 分钟; 生物素标记的 (biotinylated) 第一抗体, 培育 60 分钟; 和第二捕获抗体, 培育 30 分钟。所有的步骤都适宜在潮湿箱 (humidity chamber) 内在室温下进行, 在沉积之间进行严格的冲洗和干燥步骤。

简而言之, 磷酸盐缓冲液中 1 μ l 1mg/ml 的链霉素层积 (layered) 在每个窗口上, 并培育 30 分钟。用蒸馏水冲洗掉多余的链霉素, 并干燥光盘。通过合并等体积的生物素标记的 IgG (125 μ g/ml 置于 PBS 中) 和乙醛激活的葡聚糖 (200 μ g/ml) 制备生物素标记的 IgG-葡聚糖复合物。葡聚糖-乙醛生物素标记-IgG 复合物层积在每个捕获窗口中的链霉素上, 并培育 60 分钟或者在冰箱中过夜。冲洗掉多余的试剂并旋转干燥光盘。通过在光生物盘狭槽上的指定点上层积捕获抗体产生特殊的条码捕获模式。为了差分计数, 抗嗜中性粒细胞 (CD128 或其它)、抗淋巴细胞 (CD2、CD19、CD56 及其它)、抗嗜伊红细胞 (CD15)、抗单核细胞 (CD14)、抗嗜碱细胞 (CD63) 和抗血小板 (CD32 和 CD151) 的抗体层积在每个狭槽的指定点内。下面的表 1 列举了用于

捕获层组件的各种捕获模式的实例。培育 30 分钟或在冰箱中过夜。组装光盘使用 25 μ m、50 μ m 或 100 μ m(50 μ m 沟道需要的样品体积是 25 μ m 室所需要的 2 倍)、直的、U 形的或其它的沟道格式, 以及透明(用于顶部探测器)或反射(用于底部探测器)顶盖光盘(cover disc)。

表 1: 捕获层组件及变型

窗口	1	2	3	4	5	6
第一层 (激活层)	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯
第二层		链霉素	链霉素	链霉素	链霉素	链霉素
第二抗体		B 抗鼠 IgG+DCHO	B 抗鼠 IgG+DCHO	B 抗鼠 IgG+DCHO	B 抗鼠 IgG+DCHO	B 抗鼠 IgG+DCHO
第一抗体	参考点	淋巴细胞 特异抗体	嗜中性粒细胞 特异抗体	嗜伊红细胞 特异抗体	嗜碱细胞 特异抗体	单核细胞 特异抗体

光盘泄漏检查: 因为典型分析的是血液, 一种生物危害性物质, 所以这些光盘要进行泄漏检查以保证含有样品的光盘在原位旋转期间, 没有室发生泄漏。每个沟道用阻塞剂(blocking agent)StabilGuard 填充, 并阻塞一小时。光盘以 5,000rpm 旋转 5 分钟, 并检查泄漏和光盘稳定性。检查泄漏之后, 光盘在真空室内放置 24 小时。抽真空之后, 充满磷酸缓冲盐(PBS)缓冲液的, 或者选择地, 空的室放置在真空袋内, 并冷冻保存直至使用。

从全血中分离血沉棕黄层(buffy coat): 通过在 1,500 x g 下离心离心管内的静脉血 15 分钟制备血沉棕黄层, 该静脉血含有抗凝剂, 如乙二胺四乙酸(EDTA)或酸性柠檬酸葡聚糖(acid citrate dextran) (ACD)。白细胞在血浆与红细胞之间形成层, 称为血沉棕黄层。用精确的移液管小心地除去血浆, 然后收集血沉棕黄层。一种无离心地从血液中获得血沉棕黄层的可选择方法是允许血液与沉淀作用增强剂, 例如纤维蛋白原、葡聚糖、阿拉伯树胶、Ficoll 或甲基纤维素, 一起沉淀。Boyum 试剂(甲基纤维素和甲泛影酸钠)特别适合于获得

没有任何红细胞污染的白细胞制品。

光盘上化验——基本技术说明：差分白细胞计数光盘检测的一个优选实施例包括三个单独的部件，(1)含有化学试剂的基础光盘(base disc)，(2)沟道层，和(3)顶盖光盘(cover disc)。

血沉棕黄层或白细胞(7微升置于PBS中)注射到光盘室内，室的入口和出口部分用封闭标签密封，并且光盘在室温下培育15分钟。对于第一方法，光盘上的给定区域(例如1平方毫米的面积)用具有顶部或底部探测器的光驱动器的标准780nm激光加以扫描。根据本发明的细胞识别软件自动地从1平方毫米的捕获图象中给出差分总数，并且外推所获得的值确定每毫升全血的总数。对于第二条形码方法，用标准780nm激光扫描光盘以成像捕获区(淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱细胞、嗜伊红细胞、单核细胞和血小板)。本发明的细胞识别软件除其他事务之外执行如下程序：(a)离心光盘以旋出多余的未键合细胞，(b)成像每个特定细胞捕获区内的限定区域，(c)处理数据，其包括计数每个捕获区中特定的捕获细胞，和(d)获得每毫升全血中不同亚型白细胞的数量。

根据本发明的一个方面，在处理步骤期间，识别软件通读每一个捕获区，并在遇到细胞的时候标记细胞。在其它化验中，细胞能够替换为珠子(基于珠子的化验)、凝集物、沉淀(酶反应)或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。随后处理来自每个捕获区的数据，软件显示每微升或毫升血液体积中淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱细胞、嗜伊红细胞、单核细胞和血小板区的数量。从将光盘插入光驱动器到获得并显示期望的总数或比率，整个处理花费大约10-15分钟。在本发明这一方面的另一个实施例中，从捕获区读出电响应(electrical response)，并存储在光盘上或存储器内，形成可以进行后处理的数据文件以实现在下文中更详细说明的识别目的。

光盘详细说明：下面的分部(subsection)用于概述某些光生物盘的特殊实施例，其可以有利地与本发明一起使用。

(A) 跟踪设计 (*tracking design*): 在本发明的一个优选实施例中, 光盘是涂布有 300nm 的金的前摆动序列 (*forward Wobble Set*) FDL21:13707 或 FDL21:1270。在该反射光盘上, 通过平版印刷术 (*lithography*) 腐蚀出尺寸为 2x1mm 的椭圆形数据窗口。U-形沟道用于产生高度为 25-100 微米的室。充满整个室, 包括入口和出口部分, 需要大约 7 μ l 的样品。可以优选地使用 4 窗口/4 沟道格式。然而在透射光盘上不腐蚀数据窗口, 并且整个光盘都可以使用。

(B) 粘着与键合: 使用磨损锁定 U-形粘合剂 (*Fraylock U-shaped adhesive*) DBL 201 Rev C 3M94661 或直沟道形成室。

(C) 顶盖光盘: 使用干净光盘 (*clear disc*), 其完全反射, 具有 48 个直径为 0.040 英寸的在半径 26mm 上等距离放置的样品入口。

数据捕获与处理: 用本发明的软件使用特定细胞识别方法以 $\times 4$ 的速度和 2.67MHz 的取样速度扫描和阅读数据光盘。

软件: 本发明进一步包括处理方法和相关细胞识别和成像的软件。该软件致力于实施和显示细胞计数和差分细胞计数。在其它化验中, 细胞能够替换为珠子 (基于珠子的化验)、凝集物、沉淀 (酶反应) 或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。本软件可以存储在光盘驱动阅读器中的光生物盘上, 或者选择地, 只能够通过可靠服务器上的光学阅读器加以访问。该服务器可以在计算网络, 例如局域网 (LAN)、广域网 (WAN), 中实现, 或者可以在指定的期限和条件下在整个互联网上都能够获得。该分配方法在如下专利申请中公开, 即共同转让的美国临时专利申请 No.60/246,824, 题目为“用于分析生物样品的交互方法和系统和使用专门制备的光生物盘、光盘驱动和网络连接处理相关的医学信息”, 其于 2000 年 11 月 8 日提出申请, 并对应于美国专利申请序列 No.09/986,078。

用于实践本文所公开的不同优选实施例的材料包括前摆动金喷涂光致抗蚀剂光盘 (*forward wobble gold metalized photo-resist disc*), a_透射金喷涂光盘 (*a_transmissive gold metalized disc*), 移液管和

吸头 (tip), 旋转涂布器、离心机、回旋转子 (swing-out rotor), 含有抗凝剂, 例如柠檬酸钠或乙二胺四乙酸 (EDTA), 的 Vacutainer™ CPT 管, 潮湿室, 绞干机 (wringer), 粘合剂, 顶盖光盘, 干净顶盖光盘, 磁带或等价物, 真空装置, 黄吸头和真空室。

在本发明的一个实施例中, 含有血细胞的实验室样品沉积在光生物盘上或者沉积在形成于光盘组件内的流体沟道内。在其它化验中, 细胞能够替换为珠子 (基于珠子的化验)、凝集物、沉淀 (酶反应) 或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。光生物盘是专门制造的 CD 尺寸的光盘, 具有流体沟道和/或混合室, 其含有特效的用于原位锁定血细胞成分的抗原。因为它们用仔细层积 (layered) 的金属和物质制成, 所以光生物盘具有特殊的光学性能, 其允许电磁波束与沉积的测试样品相互作用。一旦光生物盘插入到光驱动器内, 驱动便旋转光盘, 并且在一些实施例中可以将样品和其它所需溶液混合在一起。电磁波束被导向到驱动器内的光生物盘上。在一个称作反射光盘的实施例中, 波束从光生物盘的反射表面上反射, 且光驱动器内的探测器收集反射的波束。在另一个称作透射光盘的实施例中, 部分波束通过光生物盘, 并透射到光驱动器内的另一类型探测器上。在上述任一实例中, 探测器收集的波束都含有关于光生物盘上实验室样品的信息。然后将该信息发送到模拟-数字处理器, 在该处产生表示来自探测器的电信号的数字数据。该数字数据可以实时地加以处理, 存储在存储器内或光盘上, 然后整体地或部分地作为粗数据加以处理, 或者输出成各种格式, 包括图象格式。这些格式的任何一种都可以进一步通过其它装置或设备加以处理从而生成预期的结果。该数字数据对于自动的、电的、计算机控制的, 和/或机械的计数或分析是有用的。该数字数据也可以用于产生适合于熟练手工计数 (expert hand counts)、识别或其它手动分析的可视图象。在本发明的另一个实施例中, 粗数据、数字数据、可能含有图象的输出数据存储在存档 (archive) 中。这样, 本发明的方法通常可以应用于如本文所使用的“调查数据”(investigational data), 其包括但不限于, 粗探测器输出

数据、粗信号数据、数字数据、输出数据、或含有图象或图象数据的输出数据。存档提供一个位置，在该处调查数据能够被分类，并且如果期望的话，与其它辨识信息，诸如例如人口统计学、地理学、医学、历史学或个人数据相结合。随后，能够分析调查数据的组从而进行例如不同人群的健康趋势研究。

本发明的一个实施例致力于计数血细胞的需要。本发明包括处理方法和相关细胞识别和成像的软件。该软件致力于执行细胞计数和显示相应的结果。在本发明的一个实施例中，执行各种图象处理方法，例如二值化（**binarization**）、背景均匀化、标准化（**normalization**）和过滤，以强化调查数据（**investigational data**）中细胞的显现，从而辅助细胞计数的处理。执行其它的技术以修正细胞计数的不规则，例如调查数据中的截留气泡、裂缝和模糊细胞（**dim cell**）。

本发明的实施例将软件存储在光生物盘上、光盘驱动阅读设备内，或者选择地，仅能通过可靠服务器的光学阅读器加以访问。该服务器可以在计算机网络中实现，例如局域网（**LAN**）、广域网（**WAN**）或者整个互联网在特定期限和条件下都可以获得。该分配方法在如下专利申请中公开，即共同转让的美国专利申请 No.09/898,078，题目为“用于分析生物样品和处理相关信息的交互系统及其使用”，其于 2001 年 11 月 7 日提出申请，在这里引用作为参考。

更特别地，本发明涉及计数细胞或其它调查特征（**investigational feature**）的方法。该方法包括如下步骤：获得含有细胞的样品的调查数据，在调查数据中选择估计矩形（**evaluation rectangle**），强化估计矩形内的调查数据，和计数估计矩形中显示的细胞。在本发明的一个特殊实施例中，细胞计数通过识别明亮中心或者选择地黑暗边缘加以执行。

本发明的另一个方面致力于为估计矩形选择自定义尺寸（**custom size**）的方法。

本发明的再一个方面致力于选择多个估计矩形的方法。

本发明进一步的方面致力于通过如下步骤强化估计矩形内的调

查数据，即对调查数据执行背景照明均匀化，对调查数据执行标准化，和过滤调查数据。

本发明附加的方面致力于通过如下步骤对调查数据执行背景照明均匀化，即为相邻矩形（**neighborhood rectangle**）选择一个尺寸，在调查数据中选取一个点，执行水平扫描以便为定位在将中心定于该点的相邻矩形内的所有相邻点计算第一滑动平均值（**sliding average**），执行垂直扫描以便为定位在将中心定于该点的相邻矩形内的所有相邻点计算第二滑动平均值，组合第一滑动平均值与第二滑动平均值产生整体平均值，将点的原始值再分配为通过获得整体平均值与原始值之间的差值并将该差值加和到背景值上计算出来的结果值（**resultant value**），和重复执行水平扫描、执行垂直扫描、组合两个平均值和为调查数据内的所有点再分配原始值的步骤。

在本发明的另一个方面中，对调查数据执行标准化的步骤进一步包括如下步骤：计算调查数据中所有点的数值的平均值和标准偏差，使用该平均值和标准偏差使调查数据中所有点的数值标准化，和如果需要的话，截去一些点的数值。

根据本发明的另一个方面，提供了一种过滤调查数据的方法，其包括如下步骤：为相邻矩形选择尺寸，在调查数据中选取一个点，发现所有定位在将中心定于该点的相邻矩形内的足够区别的点，如果足够区别点的数量大于预先确定的标准则再分配点的值，和重复发现所有足够区别的点和为调查数据内的所有点再分配数值的步骤。

根据本发明更进一步的方面，提供了一种处理方法，包括如下步骤：从调查数据中除去不合需要的成分，该步骤包括如下步骤：选择阈值，使用阈值对调查数据执行二值化，对调查数据执行规则化（**regularization**），提取关联成分（**connected components**），选择尺寸阈值（**size threshold**）和除去不能满足尺寸阈值的成分。

本发明的另一个附加方面致力于通过明亮中心计数调查数据内的细胞的方法。该方法包括如下步骤：对调查数据进行卷积，寻找多个局部最大值，从多个局部最大值中除去冗余的局部最大值，断言

(**declaring**) 剩余的最大值为细胞中心, 和计数细胞中心。

根据本发明另一个方面, 提供了另一种通过明亮中心计数调查数据中的细胞的方法。这种可选择的方法包括对所述调查数据进行反转 (**inversion**), 进行多次使用移动环 (**shifted rings**) 的卷积, 总计所述多次卷积的结果, 发现局部最大值, 断言局部最大值为细胞中心, 和计数所述细胞中心。

进一步, 本发明的另一个实施例致力于一种方法, 其包括如下步骤: 从已经通过明亮中心加以计数的调查数据中除去已计数的细胞, 通过它们的黑暗边缘计数细胞, 和将通过识别明亮中心计数细胞的步骤的总数加和于通过识别黑暗边缘计数细胞的步骤的总数。

本发明的再一个方面包括通过调查数据中的黑暗边缘计数细胞的方法。该方法包括如下步骤: 对调查数据进行反转, 执行多次使用移动环的卷积, 总计该多次卷积的结果, 断言最大值是细胞中心, 和计数细胞。

在本发明的另一个实施例中, 出于细胞计数的目的强化调查数据的方法进一步包括如下步骤: 对调查数据进行标准化, 对调查数据进行过滤, 选择阈值数量, 通过用该阈值数量确定调查数据是否与已设定的背景值不同对调查数据进行二值化, 对调查数据进行规则化, 在调查数据中提取一个像素宽度的边界, 填充由一个像素边界限定的区域, 和在所填充区域内进行卷积。

本发明的另一个方面涉及获得含细胞样品数字数据的方法。该方法包括如下步骤: (1) 在光盘表面提供血液样品, (2) 将光盘装载到光学阅读器内, (3) 旋转光盘, 和 (4) 将电磁辐射的入射波束导向到光盘上的一个捕获区。该表面上设置有具有一种或多种捕获剂的一个或多个捕获区。该方法接着包括步骤 (5) 用探测器 (**detector**) 探测与光盘在捕获区相互作用之后形成的电磁辐射波束, (6) 将探测到的波束转换为模拟输出信号, 和 (7) 将模拟输出信号转换为含有在捕获区捕获到的细胞的数字数据。

根据本发明的另一个方面提供了一种将模拟输出转换为数字数

据的方法。该转换方法包括如下步骤：以固定的间隔采样模拟信号的振幅，将采样振幅记录在一维阵列内，利用采样和记录步骤产生多个一维阵列，和组合该多个一维阵列生成含有样品的数字数据的二维阵列。

本发明再一个方面涉及获得含细胞样品的数字数据的方法。该方法包括如下步骤：在光盘表面上提供血液样品（该表面包括含有一种或多种捕获剂的一个或多个捕获区），将光盘装载到光学阅读器内，旋转光盘，将电磁辐射的入射波束导向到光盘的一个捕获区上，用探测器探测与光盘在捕获区相互作用之后形成的电磁辐射波束，和将探测到的波束转换为模拟输出信号。本发明的该特殊实施例包括如下步骤：将模拟输出信号转换成含有在捕获区内捕获的细胞的数字数据。该光盘用反射层构建，从而导向到捕获区的光线被反射到探测器，且探测器是底部探测器。在本发明的另一个方面中，使用顶部探测器或分波探测器（split detector）。

本发明的另一个方面致力于选择估计矩形的方法。该方法包括如下步骤：（1）在调查数据中发现多个窗口中的一个，和（2）在窗口内修剪（cropping）标准尺寸的估计矩形，该步骤包括（a）对调查数据进行压缩，（b）对图象进行阈值估计，（c）对调查数据进行二值化，（d）对调查数据进行规则化，（e）从调查数据中提取关联成分，和（f）从相应于窗口的关联成分中发现成分。

本发明再进一步的方面致力于从调查数据中提取关联成分的方法。该方法包括如下步骤：向调查数据上所有黑色点（black point）的成分分配初始成分数目，设定初始扫描方向，和扫描调查数据重新分配成分数目，从而使关联黑色点的成分数目相同。

且本发明再附加的一个方面致力于在从使用暗点的光盘实施例中获得的调查数据中选择估计矩形的方法。该方法包括如下步骤：在调查数据中发现至少一个暗点，和生成标准尺寸的估计矩形，其中心定位在通过从暗点移动预先确定的距离所发现的点处。

根据本发明的显示方案，提供了一种强化调查数据图象显示的方

法。该方法包括如下步骤：对调查数据进行快速傅立叶变换，除去频域（frequency domain）中数据频谱的一些部分，和执行逆变换以恢复调查数据的已修改版本。

同样根据本发明的显示方案，提供了另一种强化调查数据图象显示的方法。该方法包括如下步骤：确定图象是否歪斜（skewed），发现歪斜方向，和修正图象的歪斜。

本发明的另一个方面涉及从存档中获取先前存储的调查数据并对调查数据进行分析的方法。该存档能够根据提供检验样品的患者的特征对存储的调查数据进行分类。在本发明的一个方面中，符合从患者特征中选择出的多个标准的样品被选择进行人口健康趋势研究。

本发明的另一个方面涉及在白细胞计数中计数不同的组分，并显示 $CD4^+$ 细胞和 $CD8^+$ 细胞的数量和 $CD4$ 与 $CD8$ 细胞的比率。

附图说明

本发明进一步的目的、方面和方法以及有助于它的附加特点及由其产生的优点，从下文对附图所显示的本发明优选实施例的说明中将显而易见，其中：

图 1 是根据本发明的光生物盘系统的图示；

图 2 是结合本发明使用的反射光生物盘的分解透视图；

图 3 是图 2 所示光盘的顶视平面图。

图 4 是图 2 和 3 所示出的光盘的透视图，其具有显示光盘不同层的切除部分；

图 5 是结合本发明使用的透射光生物盘的分解透视图；

图 6 是图 5 所示光盘的顶视平面图；

图 7 是图 5 和 6 所示出的透射光盘的透视图，其具有显示光盘不同层，包括图 8 所示半反射层类型，的切除部分；

图 8 是描绘图 7 所示光盘的透视图，其具有示出光盘半反射层功能方面（functional aspect）的切除部分；

图 9 是显示薄金膜厚度与透射性之间关系的图示；

图 10A 是示出根据本发明一个实施例的系统操作的透视图和框图；

图 10B 显示了分波探测器 (split detector) 和根据本发明一个实施例的透射光生物盘的横截面；

图 11 是垂直于图 2、3 和 4 中示出的反射光生物盘的半径获得的部分剖面图，其显示了在其中形成的流动沟道；

图 12 是垂直于图 5、6 和 7 中示出的透射光生物盘的半径获得的部分剖面图，其显示了在其中形成的流动沟道和单一的顶部探测器；

图 13 是图 2、3 和 4 中显示的反射光生物盘的部分纵向剖面图，其示出了在其中形成的摆动凹槽 (wobble groove)；

图 14 是图 5、6 和 7 中显示的透射光生物盘的部分纵向剖面图，其示出了在其中形成的摆动凹槽 (wobble groove) 和顶部探测器；

图 15 是类似于图 11 的简图，显示了反射光盘的全部厚度及其初始折射性能；

图 16 是类似于图 12 的简图，显示了透射光盘的全部厚度及其初始折射性能；

图 17 是显示使用本发明的方法处理从光生物盘上收集的信息的流程图；

图 18 是将取样模拟信号转变为存储成一维阵列的相应数字信号的图示；

图 19 是光盘的透视图，其具有象征性显示相对于光生物盘轨道定位的被捕获白细胞的放大细节图，该光生物盘在与入射波束相互作用之后产生含有信号的波束；

图 20A 是根据本发明相对于光生物盘轨道定位的白细胞的图示；

图 20B 是根据本发明从图 20A 的白细胞获得的一系列信号迹线 (trace)；

图 21 是示出图 21A、21B、21C 和 21D 之间关系的图示；

图 21A、21B、21C 和 21D 组合在一起是将图 20B 的信号迹线转变为数字信号的图示，其中数字信号存储成一维阵列并组合成用于数

据输出的二维阵列;

图 22 是描述用于根据本发明的处理方法和计算法则进行数据估计的步骤的流程图;

图 23 是显示在根据本发明的一个实施例选择估计矩形时所含步骤的流程图;

图 24 是具有如根据本发明一个特殊实施例的软件所显示的窗口的光生物盘的图示;

图 25 是示出根据本发明一个实施例在从具有窗口的光生物盘上收集的调查数据中发现窗口时所含步骤的流程图;

图 26 显示了调查数据阵列的一个示例行, 该调查数据阵列出于根据本发明的一个方案发现阈值的目的进行了扫描处理;

图 27 是显示在根据本发明的另一个方案从调查数据中提取关联成分时所含分步的流程图;

图 28 描述了根据本发明的一个实施例在软件显示上发现窗口之后修剪估计矩形的结果;

图 29 显示了无窗口光盘上的示例暗点和含有被捕获细胞的靶区;

图 30 是类似于图 29 的简图, 其显示了如何根据本发明的一个实施例在无窗口的光盘中利用示例暗点发现细胞;

图 31 是显示根据本发明的某个方案对调查数据进行背景照明均匀化时所含步骤的流程图;

图 32 显示了在进行背景照明均匀化之前调查数据的实例, 如本发明的软件所显示;

图 33 显示了在进行背景照明均匀化之后调查数据的实例, 如本发明的软件所显示;

图 34 是示出根据本发明的特殊执行对调查数据进行标准化时所含步骤的流程图;

图 35 显示了逐步标准化期间如软件所显示的示例调查数据的图示;

图 36 显示了在标准化之后示例调查数据的图示, 如本发明的软

件所显示;

图 37 是显示根据本发明的优选实施例对示例调查数据进行过滤时所含步骤的流程图;

图 38 显示了在过滤步骤之后示例调查数据的图示, 如本发明的软件所显示;

图 39 是图 38 所示图示的近视图 (close-up view), 其具有相应的点值图迹线 (point value graph trace);

图 40 是显示在根据本发明某些方案的特殊实施例从调查数据中除去不需要的成分时所含步骤的流程图;

图 41 显示了在除去裂缝之前示例调查数据的图示, 如本发明的软件所显示;

图 42 是在除去裂缝之后图 41 中示例调查数据的图示, 如本发明的软件所显示;

图 43 是显示在根据本发明的明亮中心法标记和计数细胞时所含步骤的流程图;

图 44 显示了充满由明亮中心法计数的细胞的示例调查数据的图示;

图 45 显示了图 44 所示图示一部分的近视图 (up-close view) 和数值迹线图;

图 46A 是显示在根据本发明的黑暗边缘法标记和计数细胞时所含步骤的流程图;

图 46B 是使用移动环的卷积的图示;

图 47 是示例调查数据的图示, 该调查数据中已计数细胞用十字标记, 如本发明的软件所显示;

图 48 提供了显示在使用本发明不同方法所利用的算法提取红细胞时所含步骤的示例流程图;

图 49 显示了在执行图 48 所概述的算法之前含有红细胞的调查数据的图示;

图 50 示出了在执行了图 48 所概述算法的第一步之后图 49 的示

例调查数据的图示；

图 51 描述了在应用了图 48 所概述算法的第二步之后图 49 的示例调查数据的图示；

图 52 可视地提供了在执行了图 48 所概述算法的第三步之后图 49 的示例调查数据；

图 53 显示了在执行了图 48 所概述算法的第四步之后图 49 的示例调查数据的图示；

图 54 示出了在应用执行了图 48 所概述算法的第五步之后图 49 的示例调查数据的图示；

图 55 是显示用图 48 所概述的算法计数的红细胞的近视图；

图 56A 是在使用本发明的绝对值计数法计数分散细胞（discrete cells）之前它们的图示屏幕拍摄（pictorial screen shot）；

图 56B 是显示在利用本发明绝对值计数法的一个实施例计数细胞时所含步骤的流程图；

图 57 是在执行了根据本发明绝对值计数法的该实施例的标准化和过滤步骤之后最初在图 56A 中显示的分散细胞的图示屏幕拍摄；

图 58 是在应用了根据本发明绝对值计数法的背景去除和二值化步骤之后最初在图 56A 中显示的分散细胞的图示屏幕拍摄；

图 59 是在执行了根据本发明绝对值计数法的规则化步骤之后最初在图 56A 中显示的分散细胞的图示屏幕拍摄；

图 60 是在应用了根据本发明绝对值计数法的所示出实施例的一个像素宽度边界提取（one-pixel wide boundary extraction）步骤之后最初在图 56A 中显示的分散细胞的图示屏幕拍摄；

图 61 是在执行了根据本发明绝对值计数法的填充成分步骤之后最初在图 56A 中显示的分散细胞的图示屏幕拍摄；

图 62 是在应用了根据本发明绝对值计数法的该特殊实施例的填充调查数据步骤之后最初在图 56A 中显示的分散细胞的图示屏幕拍摄；

图 63 是在根据本发明的方法对分散细胞进行计数并用十字标记

之后最初在图 56A 中显示的分散细胞的图示屏幕拍摄;

图 64 显示了用于计数凝集和分散红细胞的绝对值计数法的结果;

图 65 是显示在根据本发明的可选择实施例对图象进行快速傅立叶变换时所含步骤的流程图;

图 66 是在根据本发明进行快速傅立叶变换之前示例调查数据的图示;

图 67 显示了在执行了快速傅立叶变换之后图 66 的示例调查数据的图示;

图 68 示出了在重新对准 (realignment) 之前调查数据歪斜图象表示 (skewed graphical representation) 的实例;

图 69 描述了图 68 所示图象表示的歪斜方向;

图 70 显示了在重新对准之后图 68 的图象表示;

图 71A 是描述在为气泡痕迹情况修正细胞计数时所含步骤的流程图;

图 71B 是根据本发明的另一个方案为气泡痕迹情况修正细胞计数的图象表示;

图 71C 是通过被捕获红细胞靶区的气泡痕迹的实例, 如在 5X 显微镜下所见到的;

图 71D 是图 71 中的气泡痕迹和被捕获红细胞周围的放大图, 如在 40X 显微镜下所见到的; 和

图 72 是显示使用本发明的方法分析血液样品的图示流程图。

具体实施方式

本发明致力于成像和计数实验室样品中的细胞物质的方法和装置。这些方法和装置可以用于成像和计数光盘上或光盘内的目标 (interest) 的任何类型调查特征。本发明的实施例产生样品中调查特征或细胞的调查数据, 并对调查数据进行计算机分析。在其它化验中, 细胞能够替换为珠子 (基于珠子的化验)、凝集物、沉淀 (酶反应) 或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示

标记。

在随后的描述中，提出了大量的特殊细节以便为本发明的实施例提供更完全的说明。然而本领域的技术人员应当意识到，本发明的实现可以没有这些特殊细节。在其它的例子中，没有详细描述众所周知的特征以便不掩蔽本发明。

这里更详细地讨论使用光盘数据进行白细胞计数的大量实施例。这些实施例并不仅限于成像和计数白细胞，而是可以容易地用于进行任何类型细胞物质的计数。这可以包括，但不限于，红细胞、白细胞、珠子和任何其它产生类似的能够被光学阅读器探测的光学信号的物质，包括生物的和非生物的。在其它化验中，目标的调查特征，除了细胞以外，可以替换为珠子（基于珠子的化验）、凝集物、沉淀（酶反应）或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。下面在讨论细胞计数时进一步详细说明了将本发明用于除白细胞之外的物质所需要的一些修改。

在下面的讨论中，提供了两个主要部分，用于示出关于本发明的数据收集和数据分析方案。第一部分提供了用于从实验室样品中收集调查数据并将该调查数据转换成基于阵列的存储装置、方法和算法的详细说明。第二部分提供了用于分析调查数据的方法和算法的详细说明。这两个部分之后，提供了关于执行白细胞计数化验的方法的部分。

1. 数据收集

本发明的实施例包括检索（retrieval）调查数据，该调查数据来自实验室样品中的细胞物质。图 1 是根据本发明的光生物盘 110 的透视图。本光生物盘 110 结合光盘驱动 112 和显示器 114 一起显示。测试样品沉积在光生物盘 110 的指定区域上。一旦光生物盘插入到光盘驱动 112 中，光盘驱动便使用电磁辐射波束从样品收集信息，该波束通过与测试样品相互作用被调整或调制。在对信息进行分析和处理之后，计算机监视器 114 显示结果。

能够在本发明中使用的光生物盘 110 有两个主要的实施例。图 2、

3 和 4 示出了光生物盘 110 的反射实施例，而图 5、6 和 7 示出了光生物盘 110 的透射实施例。

A. 反射实施例

图 2 是光生物盘 110 一个实施例的结构元件的分解透视图。图 2 是可以在本发明中使用的反射区光生物盘 110 (下文称为“反射光盘”) 的实例。结构元件包括帽部分 (cap portion) 116、粘合剂或沟道部件 118 和基片 120。帽部分 116 包括一个或多个入口 122 和一个或多个出口 (vent port) 124。帽部分 116 可以由聚碳酸酯形成，并优选地在其底部上涂布反射表面 146 (如图 4 中更详细示出的)，如透视图 2 所示。在优选实施例中，在反射层 142 的表面上含有触发标记 (trigger marking) 126，见图 4。触发标记 126 可以包括位于光生物盘所有三个层内的干净窗口 (clear window)、不透光区域、或者用信息编码的反射或半反射区域。编码信息用于向处理器 166 (如图 10A 所示) 发送数据，处理器 166 顺次与图 8 和 10A 所示的询问或入射波束 152 的操作功能相互作用。图 2 所示的第二元件是粘合剂或沟道部件 118，在其中形成了流体线路 128 或 U 形沟道。流体线路 128 优选地通过冲压或切除膜以除去塑料膜并形成所示的形状而形成。每个流体线路 128 都包括流动沟道 130 和返回沟道 (return channel) 132。图 2 中示出的一些流体线路 128 包括混合室 134。示出了两种不同类型的混合室 134。第一种是对称混合室 136，其相对于流动沟道 130 对称地形成。第二种是偏置混合室 138。偏置混合室 138 形成于图示流动沟道 130 的一侧。图 2 中示出的第三元件是基片 120，其包括靶或捕获区 140。基片 120 优选地用聚碳酸酯制成，并在其顶部沉积有反射层 142，见图 4。靶区 140 通过除去呈图示形状或者选择地呈任何期望形状的反光层 142 而形成。选择地，靶区 140 可以通过掩模技术形成，该技术包括在施加反射层 142 之前掩蔽靶区 140。反射层 142 可以由金属例如铝或金形成。

图 3 是图 2 中示出的光生物盘 110 的顶视平面图，其在帽部分 116

上具有反射层 142，帽部分 116 被透明地显示以显现位于光盘内的流体线路 128、靶或捕获区 140 和触发标记 126。因为每个捕获区都具有一种或多种特异抗原以锁定 (lock down) 样品中的不同组分 (或不同细胞)，所以在化验处理之后，室内的每个捕获区都含有一类细胞或细胞组分。锁定或捕获通过使一种或多种抗原具有能够“锁定”在血细胞的特定组分上从而捕获特定细胞的化学结构而实现。分离细胞组分对于对血细胞，例如白细胞，进行差分计数是至关重要的。在其它化验中，除了细胞以外，调查特征能够是珠子 (基于珠子的化验)、凝集物、沉淀 (酶反应) 或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。靶或捕获区 140 限定了电磁询问波束与测试样品相互作用的位置。

图 4 是根据本发明一个实施例的反射区类型光生物盘 110 的放大透视图。该图包括其各种层的部分，并经过切除从而示出每个层、基片、涂层或膜的部分剖面图。图 4 显示了涂布有反射层 142 的基片 120。活性层 (active layer) 144 施加在反射层 142 上面。在优选实施例中，活性层 144 可以由聚苯乙烯制成。选择地，可以使用聚碳酸酯、金、活化玻璃、经过改性的玻璃、或者经过改性的聚苯乙烯例如聚苯乙烯交联顺丁烯二酸酐 (polystyrene-co-maleic anhydride)。此外，能够使用水凝胶。如本特殊实施例所例证的，塑料粘合剂部件 118 施加在活性层 144 上。塑料粘合剂部件 118 的暴露部分示出了被切除或冲压的 U 形形状，其产生了流体线路 128。本光生物盘该反射区实施例中的最终结构层是帽部分 116。帽部分 116 包括在其顶部上的反射表面 146。反射表面 146 可以由金属如铝或金制成。

B. 透射实施例

图 5 是根据本发明的透射类型光生物盘 110 结构元件的分解透视图。透射型光生物盘 110 的结构元件类似地包括帽部分 116、粘合剂或沟道部件 118 和基片 120 层。帽部分 116 包括一个或多个入口 122 和一个或多个出口 124。帽部分 116 可以由聚碳酸酯层形成。可选择

的触发标记 126 可以包含在薄半反射层 143 的表面上,如图 7 和 8 所详细示出的。触发标记 126 可以包括位于光生物盘所有三个层内的干净窗口、不透明区、或者用信息编码的反射或半反射区。编码信息用于向处理器 166 (图 10A 所示) 发送数据,处理器 166 然后与图 8 和 10A 所示的询问或入射波束 152 的操作功能相互作用。

图 5 所示的第二元件是粘合剂或沟道部件 118,在其中形成了流体线路 128 或 U 形沟道。流体线路 128 通过冲压或切除膜以除去塑料膜并形成所示的形状而形成。每个流体线路 128 都包括流动沟道 130 和返回沟道 (return channel) 132。图 5 中示出的一些流体线路 128 包括混合室 134。示出了两种不同类型的混合室 134。第一种是对称混合室 136,其相对于流动沟道 130 对称地形成。第二种是偏置混合室 138。偏置混合室 138 形成于图示流动沟道 130 的一侧。

图 5 中示出的第三元件是基片 120,其包括靶或捕获区 140。基片 120 优选地用聚碳酸酯制成,并在其顶部沉积有反射层 143,见图 8。与图 5 中示出的光盘 110 的基片 120 连接的半反射层 143 显著薄于图 2、3 和 4 中示出的反射光盘 110 基片 120 上的反射层 142。更薄的反射层 143 允许一些询问波束 152 透射通过透射光盘的结构层,如图 11 所示。薄半反射层 143 可以由金属如铝或金形成。

图 6 是图 4 中示出的透射型光生物盘的顶视平面图,其具有显示位于光盘内的流体沟道、触发标记 126 和靶或捕获区 140 的透明帽部分 116。靶或捕获区 140 是电磁波束与测试样品相互作用的位置。在光盘旋转之后,样品内细胞的特定组分被预先装载在室内的各种捕获剂或抗原捕获在不同捕获区内。

图 7 是根据本发明透射光盘的光生物盘 110 的放大透视图。光盘 110 示出了具有各种层的部分,它们被切除掉以显示每个层、基片、涂层或膜的部分剖面图。图 7 示出了具有透明帽部分 116、位于基片 120 上的薄半反射层 143 和触发标记 126 的透射光盘格式。触发标记 126 包括布置在帽顶部上的不透明材料。选择地,触发标记 126 可以由干净的、在光盘的薄反射层 143 上被腐蚀的非反射窗口,或者任何

吸收或不反射来自触发探测器 160 的信息的标记形成, 见图 10A。图 7 还显示, 靶区 140 通过标记呈图示形状, 或者选择地呈任何期望形状的指定区域形成。指示靶区 140 的标记可以在位于基片 120 上或者位于基片 120 底部上(在光盘下)的薄半反射层 143 上制成。选择地, 靶区 140 可以通过掩模技术形成, 该技术包括掩蔽除了靶区 140 之外的整个薄半反射层 143。在这一实施例中, 靶区 140 可以通过丝网油墨(silk screening ink)建立到薄半反射层 143 上产生。活性层 144 施加在薄半反射层 143 上。在优选实施例中, 活性层 144 是 40-200 μm 的 2%聚苯乙烯厚层。选择地, 可以使用聚碳酸酯、金、活化玻璃、经过改性的玻璃、或者经过改性的聚苯乙烯例如聚苯乙烯交联顺丁烯二酸酐(polystyrene-co-maleic anhydride)。此外, 能够使用水凝胶。如本实施例所示出的, 塑料粘合剂部件 118 施加在活性层 144 上。塑料粘合剂部件 118 的暴露部分示出了产生流体线路 128 的被切除或冲压掉的 U 形形状。本光生物盘 110 的这一透射实施例的最终结构层是干净、非反射帽部分 116, 其包括入口 122 和出口 124。

C. 光盘实施例的光学性能

两个光盘实施例之间的主要差异之一是光盘顶层涂层的厚度。在透射光盘的实例中, 在基片层 120 的顶部上沉积薄的半反射层 143。在反射光盘实例中, 在其基片层 120 的顶部上沉积基本上更厚的半反射层。在图 8 中示出的优选实施例中, 透射光盘的薄半反射层 143 的厚度大约为 100-300 $\text{\AA}$, 不超过 400 $\text{\AA}$ 。这是因为金膜层在厚度大于 800 $\text{\AA}$ 时完全反射, 而在厚度低于大约 400 $\text{\AA}$ 时允许光线透过金膜。如下所示, 表 2 提供了金膜相对于膜厚度的反射和透射性能。

表 2 Au 膜反射率和透射率（绝对值）

厚度（埃）	厚度（nm）	反射率	透射率
0	0	0.0505	0.9495
50	5	0.1683	0.7709
100	10	0.3981	0.5169
150	15	0.5873	0.3264
200	20	0.7142	0.2057
250	25	0.7959	0.1314
300	30	0.8488	0.0851
350	35	0.8836	0.0557
400	40	0.9067	0.0368
450	45	0.9222	0.0244
500	50	0.9328	0.0163
550	55	0.9399	0.0109
600	60	0.9488	0.0073
650	65	0.9482	0.0049
700	70	0.9505	0.0033
750	75	0.9520	0.0022
800	80	0.9531	0.0015

光线透过金膜的阈值密度大约是 $400\text{\AA}$ 。除表 2 之外，图 9 提供了薄半反射层 143 根据金的厚度其反射和透射性质成反比例图示。图 9 中示出的曲线图所使用的反射和透射值是绝对值。如图 8 所示，更薄的半反射层 143 允许部分的入射或询问波束 152 穿透和通过。从而入射或询问波束 152 能够由如图 10A 所示的顶部探测器 158 加以探测。

在反射光生物盘的实例中，返回波束 154 携带关于生物样品的信息。如上面所讨论的，基本上只有在入射波束处于流动沟道 130 或靶（或捕获）区 140 内从而与样品接触时，该关于生物样品的信息才包含在返回波束中。返回波束 154 也可以携带编码在反射层 142 内或上或者编码在摆动凹槽 170 内的信息，如图 13 和 14 所示出的。正如对

于本领域技术人员所显而易见的，只有在相应的入射波束与反射层 142 接触时，预先记录的信息才包含在具有靶或捕获区的反射光盘的返回波束 154 中。当入射波束 152 位于除去了或者不存在信息携带反射层（information bearing reflective layer）142 的区域内时，该信息不包含在返回波束 154 中。

本发明的方法也可以容易地用于包括等半径沟道(equi-radio channels)的光生物盘，例如在共同转让的美国临时专利申请序列 No.60/353,014 中所公开的，其题目为“包括等半径和/或螺旋分析区的光盘及相关的光盘驱动系统和方法”（Optical Discs Including Equi-Radial and/or Spiral Analysis Zones and Related Disc Drive Systems and Methods），其于 2002 年 1 月 29 日提出申请，在这里引用作为参考。

D. 系统装置

图 10A 是示出系统装置操作的透视图和框图，该系统装置包括光学组件 148，和产生入射或询问波束 152、返回波束 154 和透射波束 156 的光源 150。在反射光生物盘实例中，返回波束 154 从光生物盘 110 帽部分 116 的反射表面 146 反射。在本光生物盘 110 的该反射实施例中，返回波束 154 由底部探测器 157 加以探测和用于分析信号媒介的存在。在透射光生物盘实施例中，透射波束通过顶部探测器 158 加以探测，也用于分析信号媒介的存在。在透射实施例中，光电探测器可以用作顶部探测器 158。

图 10A 还显示了硬件触发机构，其包括光盘上的触发标记 126 和触发探测器 160。硬件触发机构在反射光生物盘和透射光生物盘中都使用。触发机构允许处理器 166 只有在询问波束 152 处于各自的靶或捕获区 140 上时收集数据。而且，在透射光生物盘系统中，还使用软件触发器。软件触发器使用底部探测器向处理器 166 发送信号以便在询问波束 152 到达各自靶或捕获区 140 的边缘时收集数据。图 10A 还示出了驱动马达 162 和用于控制光生物盘 110 旋转的控制器 164。

图 10A 进一步显示了在可选择实施例中实现的处理器 166 和分析器 168，它们用于处理返回波束 154 和与透射光生物盘相伴的透射波束 156。在透射光生物盘的例子中，透射波束 156 携带关于生物样品的信息。在该实施例中，光盘上有预先记录的信息。探测器 158 收集该波束。

在本发明的另一个实施例中，分波顶部探测器用于收集透射波束 156。图 10B 显示了根据本发明一个实施例的分波探测器。探测器 170 具有两个探测器组件 172 和 174。这两个探测器组件收集被物体 186（例如细胞）折射的透射波束 156 并产生两个信号 A 和 B。物体 186 能够是调查特征，例如生物细胞如红或白细胞。通过从一个信号中减去另一个信号（也就是 A-B 或 B-A）能够获得差分信号。当探测器组件位于含有散射入射波束 152 的物体的区域上方时，它们探测信号中的变化。每个探测器察看到与另一个探测器的所见相反的变化。换言之，当光线向一个探测器弯曲时，它看到信号增加，而另一个探测器看到信号减小。由于这个性质，能够通过产生如下信号显著地增加信噪比，该信号是两个探测器的每一个所产生信号的差分。该差分信号具有两个优点。第一，差分信号中消除了系统中的任何等量影响两个探测器的噪音。第二，光盘上能够折射光线而不只是吸收光线的目标物体会在差分信号中引起较大而且容易探测的变化。这有助于分析任务，其需要分离从背景噪音中由目标物体产生的信号。

分波探测器更全面的讨论存在于共同拥有的美国临时专利申请 No.60/355,090 中，其于 2002 年 2 月 14 日提出申请，题目为“用于生物驱动的分割区域探测器及其相关方法”（Segmented Area Detector for BioDrive and Methods Relating Thereto），和相同题目的相关临时专利申请中，其序列编号为 No.60/335,123；60/352,649；60/353,739 和 60/355,090，它们分别于 2001 年 10 月 10 日；2002 年 1 月 28 日；2002 年 1 月 30 日和 2002 年 4 月 7 日提出申请，它们全部引用在这里作为参考。能够与本发明联合使用的不同类型探测器更全面的讨论存在于共同拥有的美国专利申请 No.10/043,688，其与 2002 年 1 月 10 日

提出申请，题目为“光盘分析系统及用于生物和医学成像的相关方法”（**Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging**），其也在这里引用作为参考。

图 11-16 显示了反射和透射实施例的剖面图，用于示出光盘的光学性质和探测器如何用于从光盘收集携带信息的波束。

现在更详细地参考图 11，其显示了根据本发明的光生物盘 110 反射光盘实施例的部分剖面图。图 11 示出了基片 120 和反射层 142。如上所示，反射层 142 可以由材料例如铝、金或其它合适的反射材料制成。在该实施例中，基片 120 的顶表面光滑。图 11 还显示了施加在反射层 142 上的活性层 144。如图 11 所示，靶区 140 通过除去反射层 142 期望位置处的区域或部分而形成，或者选择地，通过在施加反射层 142 之前掩蔽期望区域而形成。如图 11 进一步示出的，塑料沟道部件 118 施加在活性层 144 上。图 11 还显示了帽部分 116 和与之连接的反射表面 146。这样，当帽部分 116 施加在含有期望切除形状的塑料沟道部件 118 上时，借此形成流动沟道 130。如图 11 显示的箭头所示，入射波束 152 的路径从光盘 110 的下方朝基片 120 初始导向。然后入射波束聚焦在紧邻反射层 142 的点处。因为这一聚焦发生在靶区 140 内，在该处除去了反射层 142 的一部分，所以入射波束继续沿着路径通过活性层 144 并且进入到流动沟道 130 内。然后入射波束 152 继续向上传播通过流动沟道最终入射(fall incident)到反射表面 146 上。在该点处，入射波束 152 沿着入射路径返回或反射从而形成返回波束 154。

图 12 是根据本发明的光生物盘 110 透射实施例的部分剖面图。图 12 示出了具有干净帽部分 116 和位于基片 120 上的半反射层 143 的透射光盘格式。图 12 还显示了施加在薄半反射层 143 上的活性层 144。在优选实施例中，透射光盘具有用金属例如铝或金制成的薄半反射层 143，其厚度为大约 100-300 埃，优选地不超过 400 埃。该薄半反射层 143 允许部分来自光盘 150（见图 10A）的入射或询问波束 152 穿过并向上通过待被顶部探测器 158 探测的光盘，同时一些光线被沿

着与入射波束相同的路径但沿着相反的方向反射回来。在这一布置中，返回或反射波束 154 从半反射层 143 反射。这样在该方式中，返回波束 154 不进入流动沟道 130。反射光线或返回波束 154 可以用于跟踪预先记录信息轨道上的入射波束 152，预先记录信息轨道形成于半反射层 143 内或上，如图 13 和 14 更详细描述。在图 12 示出的光盘实施例中，可以存在或者可以不存在所限定的靶区 140。靶区 140 可以由在基片 120 的薄半反射层 143 上制成的直接标记产生。这些标记可以使用丝网印刷或者任何等效的方法实现。在可选择实施例中，其不使用物理标记限定靶区，流动沟道 130 有效地用作受限制的(confined)靶区域，在其中对调查特征进行检查。

图 13 是根据本发明的光生物盘 110 反射光盘实施例轨道的纵向(taken across)剖面图。该图是纵向沿着光盘的半径和流动沟道获取的。图 13 包括基片 120 和反射层 142。在该实施例中，基片 120 包括凹槽 170 系列。凹槽 170 呈从光盘的中心附近向外周延伸的螺旋形状。实现凹槽 170 使得询问波束 152 可以沿着光盘上的螺旋凹槽寻轨(track)。这种类型的凹槽 170 称作“摆动凹槽”。具有波浪或波形侧壁的底部分形成凹槽 170，同时被提高或提升的部分隔离螺旋中的相邻凹槽 170。施加在本实施例中的凹槽 170 上的反射层 142，如图所示，实际上(in nature)是共形的(conformal)。图 13 还显示了施加在反射层 142 上的活性层 144。如图 13 所示，靶区 140 通过除去反射层 142 期望位置处的区域或部分形成，或者选择地，通过在施加反射层 142 之前掩蔽期望区域形成。如图 13 中进一步示出的，塑料粘合剂或沟道部件 118 施加在活性层 144 上。图 13 还显示了帽部分 116 和与之连接的反射表面 146。这样，当帽部分 116 施加在含有期望切除形状的塑料粘合剂部件 118 上时，借此形成流动沟道 130。

图 14 是根据本发明的光生物盘 110 透射光盘实施例，如图 12 所描述的轨道的纵向(taken across)剖面图。该图是纵向沿着光盘的半径和流动沟道获取的。图 14 示出基片 120 和薄半反射层 143。该薄半反射层 143 允许来自光源 150 的入射或询问波束 152 穿过和通过待被顶

部探测器 158 探测的光盘，同时一些光线以返回波束 154 的形式反射回来。薄半反射层 143 的厚度由光盘阅读器维持其寻轨能力（track ability）所需的最小量反射光线决定。本实施例中的基片 120 与图 13 中所讨论的相似，包括凹槽 170 系列。本实施例中的凹槽 170 也优选地呈从光盘的中心附近向外周延伸的螺旋形状。实现凹槽 170 使得询问波束 152 可以沿着凹槽寻轨。图 14 还显示了施加在薄半反射层 143 上的活性层 144。如图 14 中进一步示出的，塑料粘合剂或沟道部件 118 施加在活性层 144 上。图 14 还显示了无反射表面 146 的帽部分 116。这样，当帽部分 116 施加在含有期望切除形状的塑料粘合剂部件 118 上时，借此形成流动沟道 130 并允许部分入射波束 152 基本上无反射地通过其间。

图 15 是与图 11 类似的简图，显示了反射光盘的全部厚度及其初始折射性能。图 16 是与图 12 类似的简图，显示了透射光盘的全部厚度及其初始折射性能。凹槽 170 在图 15 和 16 中没有显示，因为这些部分是沿着凹槽 170 切割的。图 15 和 16 显示了狭窄流动沟道 130 的存在，其在这些实施例中垂直于凹槽 170 定位。图 13、14、15 和 16 显示了各自反射和透射光盘的全部厚度。在这些图中，入射波束 152 被示出与基片 120 初始相互作用，基片 120 具有改变入射波束路径的折射性能，如图所示，从而将波束 152 聚焦在反射层 142 上或者薄半反射层 143 上。

E. 模拟-数字处理

无论是从反射光盘的返回波束 154 获得的还是从透射光盘的透射波束获得的，关于生物测试样品的信息都被导向到处理器 166（见图 10A）用于信号处理。该处理包括将由底部探测器 157（反射光盘）或顶部探测器 158（透射光盘）探测的模拟信号转换为离散的数字形式。

图 17 是与图 10B 所示装置相关的信息检索处理的概要流程图。在步骤 270 中，如果实施例是透射光生物盘，那么通过探测器 158 探测携带关于生物样品信息的透射波束。如果实施例是反射光生物盘，

那么在步骤 272 中通过探测器 157 探测反射波束 154。在任何一个实例中，在步骤 274 将信息发送到模拟-数字转换。在步骤 276 中，结果数字数据是阵列。

图 18 显示了通过处理器 166 执行的模拟-数字转换。该转换包括以固定的时间间隔 212 取样模拟信号 210，和将信号的相应瞬时模拟振幅 214 编码成为离散的二进制整数 216。取样在某一开始时间 218 开始，并在某一结束时间 220 停止。与任何模拟-数字转换处理相关的两个通用值是取样频率和比特深度 (bit depth)。取样频率，也称作取样速度，是每单位时间所取的样品数目。较高的取样频率在连续样品之间产生较小的时间间隔 212，这导致数字信号 222 与原始模拟信号 210 相比具有更高的保真度。比特深度是每个指向 (point to) 编码模拟信号 210 的采样振幅 214 的样品中使用的比特数目。比特深度越大，二进制整数与原始模拟振幅 214 的近似度越好。在本发明的一个实施例中，取样速度是 8MHz，每个样品的比特深度是 12 比特，其允许的整数样品范围是 0-4,095 (0 至 2^n-1 ，其中 n 是比特深度)。

在其它实施例中，比特深度和取样频率的组合能够被自定义 (customized) 以适应特殊的精度需要。通过非限制性的实施例，可以期望提高实施例中的取样频率，该实施例包括用于计数通常比细胞小的珠子。在模拟-数字转换期间，沿激光路径的每个连续样品点 224 都连续存储在光盘上或存储器内成为一维阵列 226。每个连续轨道提供一个独立的一维阵列。所有的一维阵列都组合在一起形成二维阵列 228 (如图 21B 所示)，其类似于普通图象表示。

这里提供数据收集实例以进一步示出在从光生物盘收集数据时涉及的细节。图 19 显示了本发明的光生物盘 110 的透视图。图 19 包括被指定显示相对于光生物盘轨道 232 定位的被捕获白细胞 230 的部分的放大详细透视图。如图所示，入射波束 152 与白细胞 230 的相互作用产生了含有信号的波束，其或者处于反射光盘返回波束 154 的形式，或者处于透射光盘透射波束 156 的形式，这些光盘由底部探测器 157 或顶部探测器 158 加以探测。

图 20A、20B 和图 21A-21D 示出了细胞如何被捕获进入数字数据。在其它化验中，目标的调查特征不是细胞，而是珠子（基于珠子的化验）、凝集物、沉淀（酶反应）或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。图 20A 是相对于光生物盘 110 的轨道 232 定位的白细胞 230 的图示。细胞 230 定位在类似于图 19 所示光盘的光盘上。图 20B 是根据本发明源自于图 20A 中的白细胞 230 的信号轨迹系列。图 20B 描绘了标志有 A、B、C 和 D 的相应轨迹。然后模拟信号轨迹（信号）210 被导向到处理器 166 用于转换成相应的数字信号 222（如图 21A-21D 所示）。图 20B 进一步显示出，对白细胞 230 的扫描产生了能够被探测和处理的入射波束的扰动（perturbation）231。

图 21 是示出图 21A、21B、21C 和 21D 之间布置关系的图示，这些图组合在一起示出了来自图 20B 的四个轨道 A、B、C 和 D 如何转换为单一的二维数字数据阵列 228。

现在特别参考图 21A，其显示了来自图 20A 所示光生物盘轨道 A 和 B 的取样模拟信号 210。然后处理器 166 将模拟信号 210 的相应瞬时模拟振幅 214 编码成离散的二进制整数 216（见图 12）。数据点的结果系列是类似于取样模拟信号 210 的数字信号 222。

现在转移到图 21B，来自轨道 A 和 B（图 21A）的数字信号存储为独立的一维存储阵列 226。每个连续轨道都提供相应的一维存储阵列，其在与先前的一维阵列组合时产生数字数据的二维阵列 228。然后数字数据存储存储在存储器中或光盘上作为样品点 224（图 18）的二维阵列 228，该样品点表示样品区域中特殊点处的返回波束 154 或透射波束 156 的相对密度。然后二维阵列以原文件（raw file）或图象文件 240 的形式存储在存储器中或光盘上。然后从存储器 242 检索存储在文件 240 中的数据，并用作输入到分析器 168（图 10A）的数据输出 244。

图 21C 显示了来自图 20A 所示光生物盘轨道 C 和 D 的取样模拟信号 210。然后处理器 166 将模拟信号 210 的相应瞬时模拟振幅 214

编码成离散的二进制整数 216 (图 18)。数据点的结果系列是与取样模拟信号 210 类似的数字信号 222。

现在参考图 21D, 来自轨道 C 和 D (图 21C) 的数字信号 222 存储为独立的一维存储阵列 226。每个连续轨道提供一个相应的一维阵列, 其在与先前的一维阵列组合时产生与图象类似的二维阵列 228 (图 21B)。如上, 数字数据而后存储在存储器内或光盘上作为样品点 224 (图 18) 的二维阵列 228, 样片点表示样品区域特殊点处返回波束 154 或透射波束 156 (图 19) 的相对强度。而后二维阵列以原文件、数据文件或图象文件 240 的形式存储在存储器内或光盘上。然后从存储器 240 检索存储在文件 240 内的数据, 并用作向分析器 168 (图 10A) 的数据输出。

从光生物盘捕获数据并将该数据转换成二维整数阵列的附加方法和算法具有广泛的应用性, 并且在如下专利申请中公开, 即美国临时专利申请序列 No.60/291,233, 题目为“用于在光生物盘组件中提供分析结果像素的可变取样控制及相关装置”(Variable Sampling Control for Rendering Pixelation of Analysis Results in Optical Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto), 其于 2001 年 5 月 16 日提出申请, 并在这里引用作为参考。

本发明的另一个实施例将调查数据存储在存档内。该存档提供能够对调查数据加以分类的空间。随后, 能够分析各组数据指导不同人类群体的健康趋势研究。例如, 调查数据能够联系患者的信息产生能够通过患者的属性(attributes)加以分类的调查数据目录。诸如年龄、性别、种族和血型的信息例如能够用于分类调查数据。该存档能够利用可搜索的相关数据库。一旦建立这样的存档, 就能够对特定分类的调查数据进行分析。例如, 人口健康趋势研究可以通过检索调查数据并分析这些调查数据加以执行, 调查数据由特定城市的患者捐赠。该优势在于研究的执行不需要人群本身到场。一段时间之后, 能够建立历史存档, 并能够对一段时期的特殊人口进行研究以及能够分析一段时间的趋势。

II. 数据分析

下述部分涉及本发明的数据分析方案。这里特别地结合图 22-71D 并一般地参考先前的图 1-21 进行讨论。

A. 数据收集和处理

在一个实施例中，对来自光生物盘的调查数据加以分析用于细胞计数，其中调查数据以数字数据的形式存储。在另一个实施例中，使用其它形式的调查数据进行分析。在其它化验中，调查数据能够含有用于计数珠子（bead）（基于珠子的化验）、凝集物质、沉淀（酶反应）或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记的信息。本发明的一个实施例将该调查数据实时发送到数据分析器。在另一个实施例中，存储调查数据并在后来加以检索进行分析。在两个实施例中，本发明的计算和处理算法存储在分析器 168(图 10A) 内，并应用于输入调查数据 244 以产生有用的输出结果 262(图 22)，该结果可以显示在显示器 114(图 10A) 上。作为非限制性实例，下文说明了用于处于数字数据阵列形式的调查数据的分析方法。考虑到本发明，本领域技术人员可以意识到，除了数字数据阵列格式以外，本发明的方法能够用于各种形式的调查数据。

现在继续到图 22，其显示的流程图提供了根据本发明的处理方法和计算算法进行数据分析的步骤的一般概览。本处理方法的第一步包括收到输入调查数据 244。如上所述，数据分析以二维整数阵列开始，其范围为 0-4,095。下一步 246 是选择用于计数的光盘估计矩形。一旦限定该矩形，目标便成为得出矩形内所含全部白细胞的实际数量。这一区域称作“调查数据区域”。步骤 246 的实现取决于光盘的构型。两种可能的光盘构型包括具有窗口的光盘和没有窗口的光盘。

作为非限制性的实例，在本发明使用的具有窗口，例如图 2 和 4 所示靶或捕获区 140，的光盘实施例中，软件识别窗口并切割其一部分用于分析和计数。在一个优选实施例中，如图 2 所示出的，每个窗

口(或捕获区)都具有矩形的形状,该矩形为 $1 \times 2\text{mm}$ 并在其每端(end)上具有半圆形部分。在该实施例中,软件在各自窗口内切割 $1 \times 2\text{mm}$ 的标准尺寸估计矩形。在该实施例的方案中,阅读器可以获取数个连续的样品值,以比较数个不同窗口内的细胞数目。

在本发明使用的无窗口透射光盘的实施例中,如图4所示,步骤246以一种或两种方式执行。标准矩形位置的选择或者通过相对于具有固定坐标的点定位其中心或者通过发现校准点执行,校准点优选地是具有特殊特性的暗染色点。在采用校准点的实例中,具有期望对比度的染料相对于两个细胞群沉积在光盘的特殊位置处。然后光盘阅读器被引导跳跃到其中一个细胞群的中心,而后标准尺寸($1 \times 2\text{mm}$)估计矩形居中在所选择群上。在其它化验中,细胞可以替换为珠子(bead)(基于珠子的化验)、凝集物质、沉淀(酶反应)或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。

除了提供两种类型的光盘之外,步骤246还允许用户进行选择。用户可以通过直接用鼠标选择或者其它方法直接交互地指定期望的用于细胞计数的样品区域形状,例如矩形区域。在软件的这一实施例中,涉及使用鼠标在显示于监视器114(图1)上的调查数据图示的期望部分上点击并拖动一个形状。不管估计区域的选择方法,在下一步骤248对各个矩形区域进行估计用以计数。

图22的第三步是步骤248,其致力于背景照明均匀化。该处理通过一硬件构型修正可能的背景均匀性波动。背景照明均匀化补偿每个样品点的强度水平,从而使整个背景或者非细胞的调查数据的一部分接近一个具有任意背景值 $V_{\text{背景}}$ ($V_{\text{background}}$) 的平面。尽管 $V_{\text{背景}}$ 可以通过许多方式决定,例如采用整个标准矩形样品区的平均值,但在本实施例中 $V_{\text{背景}}$ 被设定为 2,000。所选矩形样品区每个点P处的值V用数值($V_{\text{背景}} + (\text{P附近区域的V平均值})$)代替。如果需要,结果V可以缩小以适合数值实际可能的范围,其在本发明优选实施例中为 0-4,095。相邻矩形的尺寸选择得比细胞的尺寸充分地大,比标准矩形的尺寸充分地小。在其它化验中,为珠子(bead)(基于珠子的化验)、凝集

物质、沉淀（酶反应）或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记选择相邻矩形。

图 22 中流程图的下一步是标准化步骤 250。在执行标准化步骤 250 中，对标准矩形样品区域内的数据进行线性转换，从而使平均值为 2,000，标准偏差为 600。如果需要，缩小该数值以适应 0-4,095 的范围。这一步骤 250 以及背景照明均匀化步骤 248，使软件对硬件修改和调谐较不敏感。作为非限制性实例，探测电路例如顶部探测器 158（图 13）内的信号增益可以改变而不会显著影响结果细胞计数。

如图 22 所示，接下去执行过滤步骤 252。对于标准矩形内的每个点 P，计算 P 附近区域内点的数目，该区域的尺寸小于步骤 248 所示的尺寸，数值与 $V_{\text{背景}}$ 显著不同。被计算的点的数目应当接近调查数据中细胞的尺寸。在其它化验中，被计算点的数目应当接近于目标物，目标物包括珠子（bead）（基于珠子的化验）、凝集物质、沉淀（酶反应）或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。如果所发现区别点的数目足够大，P 处的数值保持不变；否则将其指定为 $V_{\text{背景}}$ 。执行该过滤操作是为了除去噪音，并且在最佳情况下，只有细胞保留在调查数据中，而背景均一地等于 $V_{\text{背景}}$ 。

可以执行致力于除去坏成分的可选择步骤 254，如图 22 所示。缺陷例如划痕、气泡、灰尘以及其它类似的不规则，可以经过过滤步骤 252。这些缺陷可以通过直接或间接地影响调查数据直方图中的整体分布导致细胞计数误差。该步骤利用如下事实，即这些缺陷的尺寸显著大于细胞的尺寸，并通过适当的算法除去它们。在其它化验中，其可以实际地应用到其它调查特征中，例如珠子（bead）（基于珠子的化验）、凝集物质、沉淀（酶反应）或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。在确定除去缺陷有多好时要考虑它们的尺寸。在可选择步骤 254 之后，优选地重复步骤 248、250 和 252。

如图 22 所示，下一处理步骤是步骤 256，其致力于通过明亮中心计数细胞。计数步骤 256 包括数个分步骤。它们是（1）利用卷积使细

胞中心更加可见，(2) 标记这些中心，和 (3) 对细胞进行真实计数。在一些硬件构型中，一些细胞可以显示出没有明亮中心。在这些例子中，只有黑暗边缘可见，从而下述的两个可选择步骤 258 和 260 是有用的。

步骤 258 致力于从图象中除去所发现的细胞。在步骤 258 中，围绕每个已发现细胞的圆形区域填充数值 2,000（背景缺省值）从而使同时具有明亮中心和黑暗边缘的细胞不会被发现两次。步骤 260 致力于通过识别黑暗边缘计数额外的细胞。步骤 258 之后对调查数据进行两种转换。目的在于使黑暗边缘更加明显从而能够计数在步骤 256 中未通过明亮中心方法计数的细胞。在另一个实施例中，通过黑暗边缘计数细胞的方法能够代替通过明亮中心计数细胞的方法。

在计数步骤 256 之后，或者在选择地采用计数步骤 260 之后，图 2 所示的最后一个步骤是结果输出步骤 262。在标准矩形中发现的细胞数目显示在图 1 所示的监视器 114 上。所识别的每个细胞在所显示的得自光生物盘的调查数据上用十字标记。

下面联系详细概述分步骤的框图给出图 22 所示每一步骤的详细说明。

步骤 1: 数据输入

步骤 244 检索存储在二维阵列内的范围为 0-4,095 的数据。黑色部分填充数值常数 0，而光线探测的面积范围为 1-4,095。在结果数据估计中，忽略 0。

步骤 2a: 在具有窗口的光盘中选择估计矩形

图 23 显示了选择估计矩形的详细处理过程（图 22 的步骤 246）。在步骤 300，确定选择的类型。第一选择 302 包括从光生物盘选择估计矩形，该光生物盘具有物理嵌入的窗口，例如图 2 和 4 所示的靶或捕获区 140。图 24 显示了具有窗口 326 和 328 的光盘的调查数据实例的图示，其通过根据本发明实施例的软件加以显示。

根据一个实施例的步骤 304 的详细处理如图 25 所示。在步骤 330, 图 25, 调查数据阵列以如下方式压缩, 即只考虑每个第 n 行和每个第 n 列。然后在步骤 332, 以逐行的方式扫描经过压缩的调查数据以确定二值化步骤中使用的阈值。图 26 提供了用于示出的示例。在示例行 342 中, 每个细胞代表调查数据上的一个点, 且每个细胞内的数值表示该点处探测到的光线强度。扫描通过为调查数据阵列的每一行选择所有可能的段 (segment) 长度 L 开始。从而, 图 26 为来自调查数据阵列的该示例行显示了所有可能的段长度 L 。实际阵列将具有许多这样的示例行。 L 被选择为略小于光盘上窗口的宽度。然后, 使用所考虑段内的所有整数值为每个段计算平均值。因为段沿着行“滑动”, 所以该处理称作发现“滑动平均值”。一旦发现了所有行段长度 L 的平均值, 便确定了平均值的最小值和最大值。阈值 T 计算为 (最小 (平均值) + 最大 (平均值)) / 2。该处理减少了搜索窗口以发现覆盖窗口区域的段的任务量。因为窗口区域比非窗口区域亮, 所以这些段的平均值高于阈值 T , 并且在后面的步骤能够更容易地识别。

一个实施例加速了段 L 平均值的计算, 如下。在计算段中所有数值的总和 $a(n)$ 时, 其中 n 从 $K+1$ 到 $K+L$ ($K+1$ 是段的开始点), $a(K+L)$ 加到总和 $a(n)$ 上并从总和 $a(n)$ 减去 $a(K)$ 。对 K 的所有数值重复该步。这使得算法不必在从行中移下一个单元时将段所有数值的总和再重新全加一遍。对每一行重复该发现阈值的整个处理直到以这种方法扫描完所有行为止。

返回图 25, 在步骤 334 中执行二值化。在该步中, 数值超过阈值 T 的点显示为黑色, 而其余的则显示为白色。所以现在调查数据能够象是黑色和白色的图象一样加以处理。随后的二值化, 在步骤 336 对调查数据进行规则化。规则化包括两个部分: 侵蚀 (erosion) 和扩展 (expansion)。侵蚀的执行如下。对于图象 P , 构建相应的图象 P' 。如果 (1) P 中相应点 X 为白色, 或者 (2) X 的任何相邻点为白色, 则 P' 中的点 X' 显示为白色。如果每个条件都未满足, 则 X' 显示为黑色。 P' 是侵蚀的结果图象。以相反的方式执行扩展。对于图象 R , 构

建相应的图象 R' 。如果 (1) R 中相应点 X 为黑色, 或者 (2) Y 的任何相邻点为黑色, 则 P' 中的点 Y' 显示为黑色。如果每个条件都未满足, 则 Y' 显示为白色。 R' 是侵蚀的结果图象。多个侵蚀和扩展的组合使得二值化图象更加规则 (单一黑色和单一白色消失)。

在执行规则化之后, 结果调查数据传递到步骤 338 用于提取关联成分。在该步骤中, 对调查数据加以扫描, 从而定义关联成分。对于调查数据中任何给定的黑色点对, 如果两个点被它们之间一连串的黑点连接, 则该对定义为处于同一成分。这一步骤的主要目的在于将调查数据分解成用白色空间分隔的关联黑色成分的集合。

图 27 显示了提取关联成分的分步。第一步骤 350 包括分配初始成分数字。以如下方式扫描调查数据, 即给被扫描的第一黑色点分配“0”, 下一个分配“1”, 如此继续。所有白色点分配“-1”。在步骤 352, 设定初始扫描方向。有四个方向:

- (1) “++”表示从上到下, 从左到右,
- (2) “+-”表示从上到下, 从右到左,
- (3) “-+”表示从下到上, 从左到右,
- (4) “--”表示从下到上, 从右到左。

初始扫描方向设定为“++”, 意味着从上到下, 从左到右。在步骤 354, 对调查数据的扫描如下。具有如下黑色相邻点 P' 的每个黑色点 P 获得 P' 的分配数字, 该黑色相邻点 P' 的分配数字 (在步骤 350 中分配) 小于 P 的分配数字。例如, 如果 P 的数字为 7, 其相邻点 P' 的分配数字为 6, 则 P 的新数字为 6。

接着改变确定步骤 356。算法检查, 看是否调查数据点中的任何黑色点都通过步骤 354 分配了新的数字。如果是, 则在步骤 358 中改变扫描方向。方向的改变遵循如下法则:

- (1) 如果当前方向为“++”, 则新方向为“+-”。
- (2) 如果当前方向为“+-”, 则新方向为“-+”。
- (3) 如果当前方向为“-+”, 则新方向为“--”。
- (4) 如果当前方向为“--”, 则新方向为“++”。

在步骤 354 中再次以新方向开始扫描。该循环持续到扫描完成而在成分数目中检测不到任何改变时为止。根据成分数目变化改变扫描方向减小了处理所需的扫描经过次数。

步骤 356 之后，关联成分内的所有点都应当具有相同的数字。在步骤 360，对成分中的点重新编号。这一步骤是需要的，因为一些数字可能已经消失了。例如，如果初始调查数据中有 20 个黑色点，那么每个点都会获得 0-19 的数字。如果扫描之后，发现有 5 个成分，则 20 个初始数字中有 5 个会消失。在 5 个数字为例如 1, 4, 9, 16 和 18 的成分中将留下黑色的点。重新编号步骤将这 5 个成分中的点重新编号为 0-4。大体上，调查数据中 N 个成分的编号 (enumeration) 从 0 到 N-1。这便完成了关联成分提取的处理。

返回图 25，在提取关联成分之后 (步骤 338) 进行发现落入窗口内的成分的步骤 (步骤 340)。选择满足特定逻辑限制的最大的黑色成分。逻辑限制包括能够位于光盘上的窗口的数目以及窗口之间的近似距离。这便完成了发现窗口的处理，其将整个矩形选择处理 (图 23 中) 带到下一在窗口内切割标准矩形的步骤 (步骤 306)。

为了发现标准矩形，其具有 (1) 最大的总和照明 (summary illumination) 和 (2) 位于相应于窗口的成分的一个点处的中心，包括该成分的区域扫描如下。首先，算法沿着水平方向扫描并计算滑动平均值，如图 26 所示。然后算法沿着垂直方向扫描并计算滑动平均值。这包括产生如下段，其垂直地穿过调查数据阵列中的多个行。段的长度近似于窗口的高度。水平滑动平均值与垂直滑动平均值的最大平均值的交点显示为估计矩形的中心。该点具有最大值，因为它是窗口中最亮的点。将该点选择作为估计矩形的中心。一旦定义了该中心，在步骤 312 中，通过从中心点进行测量产生 1 x 2 mm (标准尺寸) 的估计矩形。图 28 显示了在根据本发明实施例的软件显示上发现窗口之后，切割估计矩形的结果。

其它发现中心点的技术包括使用边缘跟踪(edge tracing)发现窗口，发现窗口的中心 (使用点值)，和通过检查代表调查数据的图象

人工选择点。

步骤 2b: 在无窗口的光盘内选择估计矩形

选择估计矩形的第二个选择是图 23 中的步骤 308, 为无窗口的光生物盘选择。一个实施例使用光盘上的暗点定位估计矩形的期望位置。算法开始于步骤 310, 图 23, 发现作用于标定光盘上样品不同区域的标记的暗点。暗点能够以如下的方式发现, 该方式与结合图 26 讨论的在发现窗口中使用的滑动平均值相同。因为现在靶标是非常小的暗点 (而不是窗口), 所以发现暗点中使用的段要短得多。它们的长度接近于暗点的尺寸。然而, 发现滑动平均值的操作原理相同。具有最低滑动平均值的段鉴别为暗点。

图 29 示出了暗点 366 的实例。在步骤 312, 图 23, 一旦发现了暗点, 算法移离暗点以产生估计矩形。切割标准尺寸的估计矩形, 其中该矩形具有定位在通过从所发现的暗点移离预先确定距离而发现的点处。图 30 显示了在从所发现的暗点 366 移离预先确定距离后切割的估计矩形 368 的实例。虚椭圆 368、370 和 372 鉴别了其它的细胞区域。在本发明的优选实施例中, 估计矩形的位置信息能够嵌入在光盘上。代替发现暗点, 系统能够从光盘阅读位置信息以定位用于放置估计矩形的区域。

步骤 2c: 选择估计矩形, 包括用户选择的选项

选择估计矩形中的第三个且是最后一个选项涉及用户通过软件用户界面的输入, 如图 23 的步骤 316 所示。在屏幕上, 将根据调查数据生成的光生物盘的图象显示给用户, 用户通过在图象上定义 (defining) 矩形选择估计矩形。在步骤 316, 确认用户所选的矩形是否大于标准尺寸。如果否, 则意味着用户的矩形小于标准尺寸 (步骤 318, 图 23)。在这种情况下, 在步骤 322 使用用户所选择的矩形进行计数。如果用户的矩形大于标准尺寸 (步骤 320, 图 23), 在步骤 324 中切出标准尺寸估计矩形。

步骤 3: 背景照明均匀化

图 31 给出了图 22 中步骤 248 的更详细说明。选择出估计矩形之后, 在以估计矩形为边界的区域内(称作“调查数据区域”)执行背景照明均匀化。这一步骤的主要目的是消除背景噪音, 从而使背景更加均匀。为了实现它, 在电执行(electrical implementation)中, 背景照明均匀化使用软件算法模拟增益控制(gain control)的效果。

在图 31 的步骤 380, 选择相邻矩形(标准矩形内)的标准尺寸。注意相邻矩形不要与估计矩形混淆。相邻矩形设定在单一估计点的周围。其尺寸选择成比细胞足够地大, 但受背景照明不均匀的影响足够地小。在其它化验中, 能够替代细胞的调查特征是珠子(bead)(基于珠子的化验)、凝集物质、沉淀(酶反应)或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。从而, 根据所进行化验的类型选择相邻矩形的尺寸。相邻矩形的尺寸为给定点 P 确定了在 P 附近有多少点被估计用于背景照明均匀化的处理。

在步骤 382 和 384 中分别进行垂直扫描和水平扫描以计算调查数据中每个点的 K 均值。

K 以如下方式导出。首先, 执行垂直扫描。在一个实施例中, 首先计算调查数据区域中所有点的垂直平均值。点(x,y)的垂直平均值 K_{vert} 是(x,y-dy)-(x,y+dy)的范围中所有点的平均值。实际上, 所有点列均沿着垂直方向加以扫描。dy 项是相邻矩形的半高, 该相邻矩形的尺寸在步骤 380 中确定。这里应用图 26 所描述的滑动平均值计算技术, 除了现在的处理是沿着垂直方向进行之外。

一旦发现所有点的 K_{vert} , 便如下地执行水平扫描。对于点(x,y), 该点的最终平均值通过获取(x-dx,y)-(x+dx,y)范围内所有点的 K_{vert} 给出。实际上, 所有行均沿着水平方向加以扫描。dx 项是相邻矩形的半宽, 该相邻矩形的尺寸在步骤 380 中确定。总体结果是, 对于特定点 P, 将 P 的相邻矩形内与 P 在同一行的所有预先计算的 K_{vert} 值加以平均以获得 P 的最终平均值。预先计算 K_{vert} 值减少了计算时间。计算时

间不是与调查数据区域的尺寸乘以相邻矩形的尺寸成比例，而是计算时间仅与调查数据区域成比例。

继续参考图 31，在步骤 386，通过将每个点 P 的值 V 再分配给 $V_{\text{background}} + (V - K_{\text{neighbor}})$ ，其中 K_{neighbor} 是以 P 的相邻矩形为边界的所有点的平均值。在一个实施例中，背景值 $V_{\text{background}}$ 设定为整个调查数据区的平均值。在另一个实施例中， $V_{\text{background}}$ 设定为 2,000。如果 P 的新值大于 4,000，则使用 4,000。如果它小于 1，则使用 1。先前为 0 的 P 值替换为 2,000。该步之后，调查数据任何大区域内的平均值大约为 2,000。换言之，整个背景接近一个具有任意背景值 $V_{\text{background}}$ 的平面。图 32 显示了如背景照明均匀化之前软件所显示的调查数据，而图 33 显示了如背景照明均匀化之后软件所显示的调查数据。已成像的调查数据 572，其是以图象格式提供的调查数据，表示了调查目标的数据。在图 32 和图 33 中，已成像的调查数据 572 标记或相应于被捕获的细胞。不使用滑动平均值，另一个实施例在背景照明均匀化步骤中使用傅立叶变换 (FT)。在执行傅立叶变换时，调查数据首先转化为频域。然后，除去频域内的一部分频谱。这除去了一部分由光生物盘以及电路中的电噪音和其它不规则产生的背景噪音。在一个实施例中，除去了波长非常短或非常长的频谱（频率除以波长为 1）。这些被除去波长的阈值经验地加以确定。最后，执行逆变换从而将数据还原成空间域。

步骤 4: 标准化

图 34 详细示出了图 2 的步骤 250 中所包含的步骤。如本文上面所概述的，需要进行标准化使标准偏差为 600 左右的数值，而调查数据的平均值为 2,000 左右的数值。标准化还使软件对硬件修改和调谐较不敏感。例如，探测电路，例如图 10A 的顶部探测器 158，中的信号增益可以改变而不会显著影响结果细胞计数。

为了实现它，在一个实施例中，处理在步骤 390 开始，为来自上一步骤（背景照明均匀化）的结果调查数据计算平均值 A 和标准偏差

S。忽略数值为 0 的点。在步骤 392，图 34，如下地对调查数据中的每一个点执行标准化。在一个实施例中，对于每个点 P，P 的值 v 替代为 $2,000+(v-A)*600/(S)$ 。成分 $(v-A)$ 使每个点集中，同时成分 $(600/S)$ 调节振幅。结果与背景值 2,000 相加。数值 600 能够被调整以便获得期望的振幅范围。图 36 的数值曲线 400 显示了标准化之后曲线的一个实例。注意，数值曲线在 2,000 附近波动，波动振幅保持在 600 左右。

一旦 P 值被标准化，便如下地执行截取（步骤 394）：1）如果 P 的新值超过 4,000，则数值截取为 4,000；2）如果 P 的新值小于 1，则数值截取为 1。

在一个实施例中，软件的绘图用户界面显示调查数据中所有点的直方图，从而使用户看到标准化过程。图 35 显示了在逐步标准化期间软件所显示的示例调查数据的一部分。已成像调查数据 572 表示调查目标的数据。在图 35 中，已成像调查数据 572 表示或相应于被捕获细胞。输入框（input box）要求标准化的范围。如图所示，使用的数值为 0-4,000。应当意识到，能够根据期望地使用任何范围的数值。

图 36 显示了标准化步骤之后的软件显示。顶部窗口 396 显示了一部分示例调查数据的近视图（close-up view）。已成像调查数据 572 表示被捕获细胞。底部曲线 400 显示了窗口 396 中水平虚线 398 所经过的点的相应数值。底部曲线 400 显示出，调查数据的背景区域被标准化（也就是具有小噪音的稳定值），其中含有细胞的区域在曲线上具有明显的“尖峰”。例如，在底部曲线 400 中，尖峰信号 402 相应于特定位置处的特定示例细胞 404。尖峰信号 402 与背景噪音 406 显著不同。这简化了细胞识别的处理。

步骤 5: 过滤

图 37 详细示出了图 22 的步骤 250 中所包含的步骤。在图 37 的步骤 410 中，选择相邻矩形的尺寸。这些相邻矩形与背景照明均匀化步骤（图 22 的步骤 248）中所使用的在概念上相似。然而，这一步骤中使用的相邻矩形大约为细胞的尺寸，且小于在背景照明均匀化中使

用的相邻矩形。在步骤 412, 对调查数据中的每个点 P, 计算数值“足够区分”于 $V_{\text{background}}$ 的 P 的附近点的数目。在一个实施例中, $V_{\text{background}}$ 的数值设定为 2,000。通过阈值数目确定多大的差异 (所调查点与 $V_{\text{background}}$ 之间) 构成“足够区分”。在一个实施例中, 阈值数目通过检查调查数据的信号模式指出 (note) 背景数值与细胞 (或者样品中目标的其它物质) 的数值之间的差异加以确定。在其它化验中, 调查特征除细胞之外, 还能够是珠子 (bead) (基于珠子的化验)、凝集物质、沉淀 (酶反应) 或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。在其它实施例中, 阈值数目通过校准机制产生, 该校准机制基于可变条件确定背景噪音和背景值。这些条件包括光生物盘的反射率, 光生物盘驱动内光生物盘的不平衡, 光生物盘的颤动 (rattle)、震动 (vibration) 或不稳定, 电噪音, 光生物盘的金属化, 所涉及样品的类型 (白细胞或其它), 和任何其它需要通过校准调节加以补偿或修正的条件。

在步骤 414, 检测“足够区分”点的数目, 看是否该数目大于预先确定的过滤标准。如果是, 则 P 值保持与步骤 416 一样。否则变为步骤 418 的 $V_{\text{background}}$ (或 2,000)。这一步骤的期望效果是除去噪音, 从而只有细胞保留在调查数据中并且背景均匀地等于 $V_{\text{background}}$ 。图 38 显示了过滤步骤之后软件所显示的示例调查数据。已成像调查数据 572 标记或表示被捕获的细胞。注意, 背景与调查数据中的细胞具有良好的对比度。图 39 提供了图 39 调查数据一部分的近视图。已成像调查数据 572 标记并相应于被捕获细胞。如图 39 的底部曲线 420 所示, 现在背景具有平线值 (flat line value), 且含有细胞的区域被尖峰 422 良好地限定。对比度的改良有助于下一步骤的细胞计数。

步骤 5a: 除去不合需要的成分

图 40 详细显示了图 22 的步骤 254 所涉及的步骤。这是一个设定为消除不合需要的成分, 例如可能干扰细胞计数的空气泡、灰尘和裂缝, 的可选择步骤。这里使用的处理与结合图 25 说明的发现窗口中使

用的处理相似。在步骤 428, 图 40, 选择阈值 T 。在一个实施例中, T 设定为在背景照明均匀化步骤中发现的 $V_{\text{background}}$ 。然后在步骤 430, 执行二值化。类似于在窗口发现 (图 25 的步骤 334) 中使用的二值化步骤, 在步骤 430 中, 数值超过阈值 T 的点显示黑色, 而其余的显示白色。从而现在, 调查数据能够认为是黑与白的图象, 并能够用 1 比特表示。在步骤 432, 以和图 25 的步骤 336 中相同的方法对调查数据进行规则化。

在执行规则化之后, 结果调查数据传递到步骤 434 用于提取关联成分。在这一步骤中, 扫描调查数据从而定义关联成分。对于任何给定的一对调查数据中的黑点, 如果两个点能够用它们之间一连串的黑点连接, 则该对定义为相同的成分。本步骤的主要目的是将调查数据分解成用白色空间分隔的关联黑色成分的集合。这里采用的关联成分提取处理可以与图 27 中详细显示的处理相同。

本去除处理的下一步是步骤 436, 其致力于除去不规则尺寸的成分。用户选择的尺寸阈值应用于所有的关联成分。如果成分小于或大于尺寸阈值, 则从调查数据中除去整个成分。该方法是有用的, 因为不规则成分 (例如气泡, 裂缝) 的尺寸通常比典型的细胞尺寸大得多。同样, 用户能够根据计数细胞的类型选择阈值。在一个实施例中, 通过用具有恒定值 2,000 (背景值) 的成分替代所有的点实现。优选地, 在实现图 40 的所有步骤时, 调查数据应当返回步骤 248-步骤 252 (图 22) 进行重新处理。

图 41 显示了除去裂缝之前调查数据的实例。已成像调查数据 572 相应于被捕获细胞。如图所示, 裂缝 574 遍布该区域。图 42 显示了除去裂缝后图 41 的相同调查数据。只保留标记被捕获细胞的已成像调查数据 572。

步骤 6: 通过明亮中心计数细胞

现在参考图 43, 其详细显示了图 22 的步骤 256 中所涉及的步骤。在步骤 440, 图 43, 对调查数据进行卷积。在卷积期间, 形成代表卷

积图象的辅助阵列。卷积图象的每个点 P 是调查数据在 P 的圆形邻域中过滤后积分 (integration) 的结果。如本领域技术人员将意识到的, 图象处理中使用的通用卷积方法包括两个函数。两个函数 f 和 $g: \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$ 的卷积是函数:

$$F(x,y)=f \otimes g(x,y)=\iint_{\mathbb{R}^2} f(x+u), y+v)g(u,v)dudv。$$

更精确地, 在本发明的一个实施例中, 被积分的函数 f 是函数:

$$f(x,y)=h(x,y)-2,000 \quad \text{如果 } h(x,y)>2,000 \quad \text{或} \\ =0 \quad \text{如果 } h(x,y)\leq 2,000$$

其中 $h(x,y)$ 是描述先前步骤中 x,y 点的数值的函数。一旦确定了 $f(x,y)$, 使用圆形邻域 (neighborhood) 指示函数 g 进行卷积, 其中:

$$g(u,v)=1 \quad \text{如果 } u^2+v^2\leq r^2, \quad \text{或者} \\ =0 \quad \text{其它}$$

其中 r 是细胞预期的半径。卷积积分是

$$F(x,y)=\iint_{(u-x)^2+(v-y)^2\leq r^2} f(x+u,y+v)dudv。$$

用所有格点 (u,v) 内 f 的总和值代替积分, 格点处于如下限定的圆形邻域内:

$$(u-x)^2+(v-y)^2<r^2。$$

卷积之后, 对步骤 442, 图 43, 中的卷积图象进行局部最大值的寻找。卷积步骤使调查数据中的明亮中心突出作为局部最大值, 从而更容易识别。因为使用整数值, 所以舍入 (rounding) 能够产生多余的局部最大值。为了修正它, 在步骤 444 中除去位于同样紧邻的邻域内的冗余局部最大值。然后在步骤 446 中, 所有保留的局部最大值显示为细胞中心。在其它化验中, 细胞能够替换为珠子 (基于珠子的化验)、凝集物质、沉淀 (酶反应), 或其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。局部最大值用于发现这些目标或者这些化验中靶定的调查特征的中心。在本发明其它实施例中, 计数方法考虑细胞凝集的效果。彼此接近的最大值不会被自动地忽略。在一个实施例中, 局部峰在一个附近的下陷 (nearby dip) 之后被断言为细胞中心。参数能够加以调节, 从而如果凝集细胞显示在调查数

据上,限定局部冗余最大值的距离阈值能够被调节得更小。类似地,能够为正在计数的细胞类型调节距离阈值。例如,因为红细胞具有更一致的尺寸,所以假定的细胞尺寸能够用作距离阈值。

在另一个实施例中,能够对细胞的分布进行统计分析。从而每个区域上细胞的平均数目能够用于估计位于由于可见性低或者细胞凝集使它们不能计数的区域中的细胞数目。在其它化验中,细胞能够替换为珠子(基于珠子的化验)、凝集物、沉淀(酶反应)或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。另一个实施例允许用户以更高的分辨率重新采样调查数据区域以执行更加完全而精确的计数。

图 44 显示了充满用明亮中心法计数的细胞的示例调查数据。已成像调查数据 572 标记被捕获细胞。在明亮中心法中执行的步骤有助于突出细胞,从而它们相对于背景的黑暗对比显得明亮。如软件所示,它们被单个地标记和计数。图 45 显示了图 44 所示一部分调查数据的近视图和数值迹线曲线。已成像调查数据 572 相应于被捕获细胞。

步骤 7 和 8: 细胞标记和通过黑暗边缘附加计数细胞

步骤 7 和 8, 图 22, 是能够执行用于提高细胞计数精度的可选择步骤。在图 2 中, 它们参考步骤 258 和 260。在硬件构型可能会剩下没有明亮中心的细胞的情况下, 这两个可选择步骤可以用于修正细胞的欠计数。在其它化验中, 本方法不是应用于细胞, 而是能够应用于珠子(基于珠子的化验)、凝集物、沉淀(酶反应)或者其它尺寸能够通过本发明光学系统的入射波束检测到的生物指示标记。选择地, 可以使用这两个步骤代替通过识别明亮中心计数细胞。

如果一些细胞已经通过识别明亮中心法加以计数了, 那么执行步骤 7 标记这些已计数细胞并将它们从调查数据中除去。然后通过识别具有黑暗边缘的细胞进行计数。图 46A 详细示出了图 22 的步骤 260 (主要步骤 8) (principal step 8) 中所包含的步骤。在步骤 450, 对调查数据进行反转(inversion)。每个点 P 的数值 v 替换为 $2,000-v$ 。如果结果数值为负, 则用 0 代替。以等式形式表达反转, 我们进行如

下:

假定 $h(x,y)$ 为以前的调查数据, 我们引入 $f(x,y)$ 使

$$f(x,y) = \begin{cases} 2,000 - h(x,y) & \text{如果 } h(x,y) < 2,000 \\ 0 & \text{其它} \end{cases}$$

这保证在我们执行卷积时, 具有低数据值的黑暗边缘具有较高的值。在步骤 452, 执行使用移动环 (shifted ring) 的卷积。本领域技术人员会意识到, 在图象处理中使用的通用卷积方法包括两个函数。

两个函数, f 和 $g: R^2 \rightarrow R$, 的卷积是函数

$$F(x,y) = f \otimes g(x,y) = \iint_{R^2} f(x+u, y+v) g(u,v) du dv$$

以等式形式表达卷积有:

$$F(x,y) = \iint_{g(u,v)} f(x+u, y+v) du dv$$

用圆形邻域指示函数 (circular neighborhood indicator function) g 执行卷积, 其中

$$g(u,v) = \begin{cases} 1 & \text{如果 } u^2 + v^2 \leq r^2 \text{ 或} \\ 0 & \text{其它} \end{cases}$$

其中 r 是细胞的预期半径。在本实施例中, g 是具有内径 r_1 和外径 r_2 的环的指示函数, 其中 r_1 和 r_2 限定细胞预期半径 r 的界限。这产生:

$$F(x,y) = \iint_{r_1^2 \leq (u-x)^2 + (v-y)^2 \leq r_2^2} f(x+u, y+v) du dv$$

用环内所有格点 (u,v) 的总和值 f 代替积分。进行四次卷积, 我们得到四个函数: $f_1(x,y) = f(x+hx, y)$;

$$f_2(x,y) = f(x-hx, y);$$

$$f_3(x,y) = f(x, y+hy); \text{ 和}$$

$$f_4(x,y) = f(x, y-hy),$$

其中 hx 和 hy 是沿 x 和 y 方向的特定移动。它们等于细胞估计尺寸的一半。四个函数意味着用内径为 r_1 , 外径为 r_2 的环的指示函数进行四次卷积。数值 r_1 和 r_2 分别限定细胞预期半径 r 的最小值和最大值。用沿左、右、上和下方移动距离 r 的环进行四次卷积。图 46B 显示了这样的一个示例。首先产生环 458, 限定细胞黑暗边缘的边界。

四次移动的卷积产生四个环。在步骤 454, 图 46A, 总和四次移动的结果。再次返回图 46B, 我们看到总和的环在点 457 产生局部最大值。然后断言点 457 为这一细胞的局部最大值并加以计数。注意, 图 46B 是应用到细胞的一个示例。在卷积环不限定细胞黑暗边缘边界的位置, 不存在最大值。这样, 卷积步骤通过突出细胞的黑暗边缘发现潜在的细胞。在步骤 456, 图 46A, 在卷积计数局部最大值之后, 计数步骤检查所有 (go through) 调查数据。

图 47 显示了调查数据的图象, 在调查数据中通过该方法发现(计数)的细胞用十字标记。已成像调查数据 572 相应于被捕获的细胞。十字 580 标记已计数细胞。

选择地, 能够根据如下等式形式执行卷积步骤:

$F(x,y)=f1(x,y)+f2(x,y)+f3(x,y)+f4(x,y)$, 如果 $f1$ 、 $f2$ 、 $f3$ 或 $f4$ 中至少有三个 (或者选择地, 两个) 大于 0, 和

$F(x,y)=0$ 其它。

注意, 如果函数中有两个或三个大于 0, 则该卷积无移动环地加以执行。卷积步骤的另一个选择是使用众所周知的光滑函数来卷积函数 f 。在另外一个能够用于本卷积步骤和在识别明亮中心中使用的卷积步骤的选择中, 采用不同的指示函数 g 。在其一个特殊实施例中, g 能够是高斯形式:

$$g(u,v)=e^{-\left(\frac{u^2}{a^2}+\frac{v^2}{b^2}\right)}$$

或者其它用于执行卷积的合适函数, 其中执行卷积的目的在于突出细胞的特征。

步骤 9: 数据输出

在步骤 9, 数据输出到合适的显示装置上。软件的一个实施例具有用户界面, 以便为由估计矩形限定边界的调查数据区域显示细胞计数的结果。另一个实施例显示了调查数据区域的图象, 该区域的每个细胞用十字标记, 如图 47 所示。

B. 红细胞实例

本领域技术人员会意识到，数据分析的各种步骤和方法能够以不同的方式组合用于分析各种类型的调查数据。图 48 提供了一个流程图，其示出了计数调查数据中红细胞的实例。在步骤 460，选择阈值并进行二值化，其中数值超过阈值的点显示为黑色，其余的显示白色。二值化步骤将高数值的点与低数值的点分离开，高数值的点通常表示细胞，而低数值的点通常表示背景或背景噪音。

图 49 显示了执行步骤 460 之前调查数据的图示。已成像调查数据 572 相应于被捕获细胞。图 50 显示了二值化结果（步骤 460）。二值化成像数据 576 标记或指示调查目标的数据。在这一例子中，二值化成像数据 576 指示细胞。非细胞标记二值化成像数据 578 指出了不代表细胞的数据。

然后在步骤 462，图 48，执行构成规则化的两个部分，侵蚀和扩展，以填充细胞边界的缺失部分。此处的目的是获得清晰划分出单个细胞的细胞边界。图 51 显示了侵蚀和扩展（步骤 462）的结果。二值化成像数据 576 标记调查目标的数据。在这个实例中，二值化成像数据 576 标记细胞。非细胞标记的二值化成像数据 578 指出了不代表细胞的数据。

在图 48 的步骤 464 中，为每个细胞提取一个像素宽的细胞边界。图 52 显示了提取一个像素宽度边界（步骤 464，图 48）的结果。二值化成像数据 576 标记调查目标的数据。在这一实例中，二值化成像数据 576 标记细胞。非细胞标记的二值化成像数据 578 指出了不代表细胞的数据。在提取一个像素宽度的边界时，选择出所有同时具有黑色和白色邻域的黑色点使其保持黑色。相邻点不同时具有这两种颜色的黑色点被转变为白色。这产生了粗边界，其位于数个像素宽度的位置内。然后应用细化处理（thinning process）消除边界内多余的点，直到仅剩下一个像素显示调查数据中的轮廓。细化处理通过从边界上除去冗余的黑色点开始，直到只有一个像素宽度的线标记每个黑色区域的边界为止。如图 52 所示，在图 51 中存在的非细胞标记的二值化成

像图象 578 现在不存在了。

细化处理首先以粗边界开始。粗边界包括所有同时具有位于细胞内部和外部的相邻点的像素。在粗边界提取之后，数据包括三类：

- (1) 细胞内的像素，
- (2) 标记细胞边界的像素，和
- (3) 细胞外的像素。

这三类根据三个条件相关。

(A) 所有三类都相连，

(B) (1) 通过 (2) 与 (3) 不相连，和最后

(C) (2) 中的每个点都具有位于 (1) 或 (2) 内的相邻点，但不同时具有位于 (1) 和 (2) 内的相邻点。

然后细化处理逐个检查 (2) 内的像素。如果 (2) 内的像素 P 具有 (1) 或 (3) 内的相邻点，那么进行检查，看重新涂色 P (例如由黑色变为白色) 使之从 (2) 变到 (1) 或 (3) 是否仍保持 (preserve) 条件 (A)、(B) 和 (C)。如果是，则进行重新涂色。执行该涂色直到为每个细胞获得一个像素宽的边界。

在提取一个像素宽的边界之后，被一个像素宽度的边界限定的区域用黑色点填充 (步骤 466, 图 48)。图 53 显示了步骤 466 的结果。二值化成像数据 576 标记细胞。非细胞标记的二值化成像数据 578 指出不代表细胞的数据，例如图 51 所示。使用这一系列黑色和白色点作为标记，填充原始数据点以代替黑色点。从而，细胞区域被隔离并且现在容易加以分析。

图 54 显示了填充原始数据点的结果。已成像调查数据 572 标记被捕获细胞。该方法的优点在于能够精确地提取细胞。该提取使用户能够测量细胞的直径，检查细胞内的其它特征，如被染色细胞核的形态。关于这类应用进一步的细节在共同转让 (commonly assigned) 美国专利申请序列 No.10/xxx,xxx 中有所讨论，其题目为“基于使用光生物盘系统鉴定和量化白细胞类型的细胞核形态学”，(Nuclear Morphology Based Identification and Quantification of White Blood

Cell Types Using Optical Bio-Disc Systems), 于 2002 年 9 月 6 日提出申请, 在这里引用作为参考。

除了检查已成像细胞以外, 用户能够通过采用本发明的用户特征 (user feature) 标记和计数细胞。图 55 是图 49-54 的调查数据原始图示的近视图, 该调查数据具有用十字标记以显示它们已被计数的红细胞。已成像调查数据 572 相应于被捕获细胞。十字 580 标记已计数的细胞。

C. 可选择算法

本发明包括大量用于处理在细胞计数操作期间可能出现的特殊情况的可选择算法。

图 56A-64 显示了本发明的实施例, 其处理计数没有明显的明亮中心或黑暗边缘的细胞的情况。该方法称作“绝对值计数”, 主要处理细胞看上去没有明显的明亮中心或黑暗边缘的情况。明亮中心法依赖于隔离调查数据的高数值区域 (亮点) 以计数细胞。黑暗边缘法依赖于隔离调查数据的低数值区域 (暗点) 以计数细胞。相反, 该绝对值计数法隔离如下区域, 该区域可以不具有由先前的一种或两种方法可探测的明显的高或低的数值, 但是仍然含有能够区分于背景噪音的数值模式。

图 56A 是在它们根据绝对值计数法用十字标记之前, 分散细胞的图示屏幕拍摄 (pictorial screen shot)。已成像调查数据 572 代表被捕获细胞。图 56B 是描述绝对值计数所含步骤的流程图。在步骤 480, 对调查数据进行标准化和过滤。图 57 是最初在图 56A 中显示的分散细胞在标准化和过滤步骤 (步骤 480, 图 56B) 之后的图示屏幕拍摄。已成像调查数 572 相应于被捕获细胞。标准化和过滤处理与本文上面所说明的处理相同。

在标准化和过滤之后, 下一步骤包括背景去除和二值化 (步骤 482, 图 56B)。图 58 是最初在图 56A 中显示的分散细胞在背景去除和二值化步骤 (步骤 482, 图 56B) 之后的图示屏幕拍摄。在该实例

中，二值化成像数据 576 表示细胞。非细胞标记二值化成像图象 578 指出不代表细胞的数据。除去背景以隔离细胞定位的位置。然后对调查数据进行二值化从而在调查数据中产生黑色和白色的点。二值化处理的进行如下。首先检查每个点的数值。当点值与背景值之差大于预先确定的阈值时，点显示为黑色。否则点显示为白色。在一个实施例中，选择阈值使与背景值差异小的点（背景或背景噪音）成为白色，而与背景值差异大的点（细胞的黑暗或明亮区域）成为黑色。在其它实施例中，阈值通过校准机制产生，该校准机制根据可变条件确定背景噪音和背景值。这些条件包括光生物盘的反射率，光生物盘驱动内光生物盘的不平衡，光生物盘的颤动（rattle）、震动（vibration）或不稳定，电噪音，光生物盘的金属化，所涉及样品的类型（白细胞或其它），和任何其它需要补偿或修正的条件类型。

规则化（步骤 484，图 56B）是处理的下一步。图 59 是最初在图 56A 中显示的分散细胞在规则化步骤（步骤 482，图 56B）之后的图示屏幕拍摄。二值化成像数据 576 标记调查目标的数据。在该实例中，二值化成像数据 576 表示细胞。非细胞标记二值化成像图象 578 指出不代表细胞的数据。规则化包括侵蚀和扩展。侵蚀的执行如下。对于图象 P，构建相应的图象 P'。如果（1）P 中相应的点 X 为白色，或者（2）X 的任何邻域为白色，则 P' 中的点 X' 显示为白色。如果哪个条件都不满足，则 X' 显示为黑色。P' 是侵蚀的结果图象。扩展操作是相反的形式。对于图象 R，构建相应的图象 R'。如果（1）R 中相应的点 Y 为黑色，或者（2）Y 的任何邻域为黑色，则 R' 中的点 Y' 显示为黑色。如果哪个条件都不满足，则 Y' 显示为白色。R' 是扩展的结果图象。多个侵蚀和扩展的组合使得二值化图象更加规则（单一黑色和单一白色点消失）。

下一步骤是提取一个像素宽度的边界。该提取步骤参考图 56B 的步骤 486。图 60 是一些最初在图 56A 中显示的分散细胞在应用一个像素宽度边界提取的步骤 486 之后的图示屏幕拍摄。二值化成像数据 576 标记调查目标的数据。在该实例中，二值化成像数据 576 相应于细胞。

非细胞标记二值化成像图象 578 指出不代表细胞的数据。在提取一个宽度的边界中，选择所有同时具有黑色和白色邻域的黑色点保持其黑色。相邻点不同时具有两种颜色的黑色点转换为白色。这产生了粗边界，其位于数个像素宽度的位置内。然后应用细化处理（thinning process）消除边界内冗余的点，直到仅剩下一个像素显示调查数据中的轮廓。细化处理通过从边界上除去冗余的黑色点开始，直到只有一个像素宽度的线标记每个黑色区域的边界为止。

细化处理首先以粗边界开始。粗边界包括所有同时具有位于细胞内部和外部的相邻点的像素。在粗边界提取之后，数据包括三类：

- (1) 细胞内的像素，
- (2) 标记细胞边界的像素，和
- (3) 细胞外的像素。

这三类根据三个条件相关。

- (A) 所有三类都相连，
- (B) (1) 通过 (2) 与 (3) 不相连，和最后

(C) (2) 中的每个点都具有位于 (1) 或 (2) 内的相邻点，但不同时具有位于 (1) 和 (2) 内的相邻点。

然后细化处理逐个检查 (2) 内的像素。如果 (2) 内的像素 P 具有 (1) 或 (3) 内的相邻点，那么进行检查，看从 (2) 到 (1) 或 (3) 的重新涂色 P (例如由黑色变为白色) 是否仍保留 (preserve) 条件 (A)、(B) 和 (C)。如果是，则进行重新涂色。执行该涂色直到为每个细胞获得一个像素宽的边界。

在提取一个像素宽的边界之后，被一个像素宽度的边界限定的区域用黑色点填充（步骤 488，图 56B）。图 61 是一些最初在图 56A 中显示的分散细胞在执行根据本发明的填充成分步骤 488 之后的图示屏幕拍摄。二值化成像数据 576 标记调查目标的数据。在该实例中，二值化成像数据 576 标记细胞。非细胞标记的二值化成像数据 578 指出不代表细胞的数据。使用这一系列黑色和白色点作为标记，填充原始数据点以代替黑色点（步骤 490，图 56B）。从而，细胞区域被隔离

并且能够加以计数。在一个实施例中，卷积应用于调查数据中被隔离的区域，并标记局部最大值以鉴定细胞。如先前所显示的实施例，能够应用具有圆形邻域的卷积。因为在卷积中使用的圆形邻域的尺寸大约为细胞的尺寸，所以局部最大值能够确定为细胞中心。图 62 是最初在图 56A 中显示的分散细胞在调查数据填充步骤之后的图示屏幕拍摄。成像调查数据 572 标记被捕获细胞。最后，图 63 显示了根据图 56B 的步骤 492 加以计数并用十字标记的细胞。成像调查数据 572 相应于被捕获细胞。十字 580 标记已计数的细胞。然而，图 63 只显示了凝集的细胞，图 64 显示了应用于稀疏群集 (packed) 样品的绝对值计数法，该样品具有单个的细胞和多个凝集细胞区域。类似地，成像调查数据 572 相应于被捕获细胞，且十字 580 标记已计数细胞。

本发明的另一个实施例改良了标记用于细胞计数的估计矩形的屏上显示。在细胞计数期间，有时需要向用户显示估计矩形的图象。除了提供样品的可视表示以外，高品质的图象能够帮助用户确定应当使用什么方法计数和分析细胞。例如，清晰的图象可以提醒用户存在许多没有明亮中心的细胞。这样，用户可以选择也通过黑暗边缘方法计数细胞。本实施例通过快速傅立叶变换法改良了图象的品质。如本公开所给出领域的技术人员会意识到的，快速傅立叶变换 (FFT) 是傅立叶变换 (FT) 的变型。傅立叶变换的任何变型都能够在这里应用。傅立叶变换在较早前结合背景照明均匀化时有所讨论。图 65 提供了示出本发明该实施例的流程图。在步骤 520，对调查数据执行快速傅立叶变换。调查数据转换为频域。然后在步骤 522，除去频域内的一部分频谱。最后，在步骤 524，执行逆变换。图 66 显示了快速傅立叶变换之前的示例调查数据。已成像调查数据 572 表示被捕获细胞。图 67 显示了快速傅立叶变换之后的同一调查数据。已成像调查数据 572 表示被捕获细胞，且十字 580 标记已计数细胞。从而改良了屏上显示。

本发明的另一个实施例处理窗口区域的屏上显示。在具有窗口的光盘上进行细胞计数期间，有时需要向用户显示窗口区域。有时窗口区域的图象是歪斜的 (skewed)，如图 68 所示。为了适当地显示窗

口区域，需要修正歪斜。修正方法的第一步发现歪斜的方向。该发现歪斜的步骤利用如下事实，即窗口是黑暗背景中的明亮区域——这方便地显示为白色。为了澄清这些项目，窗口是在其顶部和底部具有半圆形接触的矩形，且该矩形的宽度在下文称作窗口宽度。歪斜发现步骤进行如下。首先，数字地差分图象每条线的点。这意味着，对于每个点 (x,y) ，从 (x,y) 到 $(x+dx,y)$ 间隔内的平均值中减去 $(x-dx,y)$ 到 (x,y) 间隔内所有点的平均值。这里 dx 是选择用于消除噪音的特殊间隔长度。

对于与窗口一致的图象的线，该减法的结果在窗口的左边界采用最大值，在右边界采用最小值。这是因为明亮窗口内的平均值大大高于黑暗背景的平均值。在位于窗口外的图象的线中，这最大值和最小值可以发生在别的任意位置，因为平均值来自于可能具有一些噪音的黑暗背景。利用这一性质，在下一步骤中，为每条线计算最大值和最小值之间的距离 D 。接着，该处理选择具有选择作为标准窗口宽度的 D 值的线。之后，在这些被选线中标记最大值点。最后，直线拟合通过这些最大值点。该直线的方向是歪斜的方向。图 69 显示了具有已发现方向线的结果。最后，使用该方向线作为导向并且据此除去所有相应点以修正歪斜。图象适当地加以对准并显示给用户，如图 70 所示。

本发明的一个实施例包括用于从调查数据中除去气泡痕迹的方法。有时空气泡可以截留在光盘上的沟道内。该空气泡可能通过样品，并且在其通过捕获区时除去一些沿着其路径的细胞。该细胞去除可能导致细胞分布的不均匀。因为报告的最终结果为每平方毫米区域 (mm^2) 的细胞数目，所以不规则细胞必须加以修正。修正的执行如下。图 71A 显示了处理的流程图。在步骤 540，如前地执行细胞计数。然后在步骤 542 分析细胞的分布。在步骤 544 忽略细胞局部浓度太小的区域，因为这些区域内的细胞可能已经被气泡擦除。

在一个实施例中，正在计数的整个区域划分成盒形的格子。图 71B 显示了这种实例。已成像调查数据 572 标记被捕获细胞（用圆表示）。气泡痕迹 548 通过由方形 550、552、554 和 556 限定边界的区

域。忽略由这些方形限定边界的区域。一旦忽略这些区域，在图 71A 的步骤 546 中重新计算细胞计数。图 71C 和 71D 显示了气泡痕迹的实例。图 71C 显示了通过样品的气泡痕迹（包括痕迹 548 和 558），如 5X 显微镜下所见。图 71D 显示了另一个实例，其中示出了 40X 显微镜下通过样品的气泡痕迹 548。

III. 白细胞计数方法

图 72 提供了如何利用本发明的方法执行用于快速确定 CD4+ 和 CD8+T-淋巴细胞种群绝对数值的类均匀固相细胞捕获化验（generic homogeneous solid phase cell capture assay）。该检测在整合于光生物盘上的小流动沟道内执行，确定 7-15 μ l 从全血中分离的单核细胞（MNC）中被捕获区内特异抗体捕获的 CD4+、CD8+CD2+、CD3+、CD19+ 和 CD45+ 细胞的数目。该检测根据在光盘的局部位置上进行特定细胞捕获的原理。在光盘上通过基于单克隆或多克隆特殊血细胞表面抗原的抗体局部应用捕获化学剂产生多个特殊的细胞捕获区。在充满 25-100 μ l 具有 MNC 血液（10,000-30,000 细胞/ μ l）的室时，表达 CD4、CD8、CD2、CD3、CD19 和 CD45 抗原的细胞被捕获在光盘的捕获区内。同时在捕获区内限定阴性和阳性控制区域（negative and positive control areas）。

在图 72 的步骤 1 中，血液（4-8ml）和抗凝血剂如 EDTA、ACD 或肝素直接收集到 4 或 8ml 的 Becton Dickinson CPT Vacutainer™ 中。在本发明另一实施例的等价步骤中，3ml 含有抗凝血剂的血液覆盖含有分离梯度（separation gradient）176 如 Histopaque 1077 的管 172。在任何情况下，血液样品 174 优选地用在 2 小时以内的收集中。血液样品所覆盖的含有分离梯度 176 的管 172 在具有水平马达的生物危害物质离心机(biohazard centrifuge) 中在 1,500-1,800RCF（2,800rpm）下离心。离心之后，除去血浆层 178（步骤 2），在单核细胞（MNC）部分 180 上方留下大约 2mm 的血浆。收集并用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗 MNC 层 180。细胞在室温下以 300RCF（1200rpm）离心 10 分

钟成为小球(pelleted)，从而除去任何残留的血小板。除去上清液，并通过轻轻敲打管使 MNC 小球 180 在 PBS 中重新悬浮。根据光生物盘 110 流动沟道 130 的高度，将最终的小球 180（步骤 3）重新悬浮为 10,000-30,000 细胞/ μl 的细胞数。

光生物盘 110 的流动沟道 130 充满 7 μl 的 MNC 悬液，且室的入口 122 和出口 124（图 3 和 5）用密封标签密封（步骤 4）。光生物盘 110 在室温下培育 15 分钟，然后用光驱动器 112 内的 780nm 激光器扫描以成像捕获区域（步骤 5）。应当理解，如果使用透射光生物盘 110，光驱动器 112 选择地包括顶部探测器 158（图 10A）以成像捕获区域。软件优选地编码在光盘上指导驱动自动地执行如下操作：(a)离心光盘从而在一个或多个阶段中旋出多余的未键合细胞，(b)在显示器 114 上成像特殊捕获窗口，和(c)处理数据。数据处理包括，但不仅限于，计数每个捕获区内特异捕获的细胞并得出 CD4+/CD8+的比率或任何其它可以相应编程的期望计数或定量。

如图 72 进一步示出的，本发明致力于用光盘和光驱动器执行聚类指示计数（cluster designation count）的方法。该方法包括如下步骤：在含有分离梯度的第一管内提供血液样品，在某时旋转第一管且速度足以使血液样品分离成层，重新悬浮含有 T-细胞的 MNC 层形成 MNC 悬液，在包括至少一个含有至少一种捕获剂的捕获区的光盘表面提供 MNC 悬液样品，将光盘装载到光学阅读器内，旋转光盘，将电磁辐射的入射波束导向到捕获区，探测在与光盘捕获区相互作用之后形成的电磁辐射波束，将探测到的波束转换为输出信号，和分析输出信号以提取有关捕获区内捕获的细胞数目的信息。在本发明的一个实施例中，光盘用反射层加以构建，从而反射被导向到捕获区的并与细胞相互作用的光线。在本发明的另一个实施例中，构建光盘使得被导向到捕获区的并与细胞相互租用的光线透过光盘。

在分析/处理步骤期间，软件通读每个捕获区图象并在其遇到细胞图象时标记细胞图象。例如，在估计 CD4+和 CD8+细胞之后，软件计算 CD4+/CD8+细胞的比率，并同时显示 CD4+、CD8+、CD3+和

CD45+捕获区内每毫升全血的细胞绝对数目和 CD4+/CD8+的比率。整个处理从将光盘插入光驱动器内到获得数目和比率花费大约 12 分钟。

在一个实施例中，光盘是前摆动系列 FDL21:13707 或 FDL21:1270 CD-R 光盘，其涂覆有 300nm 的金作为编码信息层。在反射光盘上，通过众所周知的平版印刷技术从反射层腐蚀掉尺寸为 2 x 1mm 的观察窗口。在透射光盘的一些设计中，不腐蚀单独的观察窗口，且整个光盘都可以使用。附加层是 Fraylock 粘合剂 DBL 201 Rev C 3M94661。顶盖是具有 48 个直径为 0.040 英寸的样品入口的干净光盘，样品入口等距离地分布在 26mm 的半径上。使用 CD4+/CD8+计数软件以 4X 速度和 2.67MHz 的取样速度扫描并阅读数据光盘。

IV. 结论

这样，结合一个或多个特殊的实施例说明了用于成像实验室样品中的细胞和分析该图象的方法和装置。尽管参考某些优选实施例详细地说明了本发明，但是应当意识到，本发明并不仅限于那些确定的实施例。而是，由于说明了用于实践本发明的当前最佳模式的本公开，许多修改和变化将自身提供给本领域的技术人员而不背离本发明的范围和精神。因此本发明的范围由下文的权利要求指明而不是前述的说明。在权利要求等价物的意思和范围内出现的所有改变、修改和变化均认为包含在其范围之内。

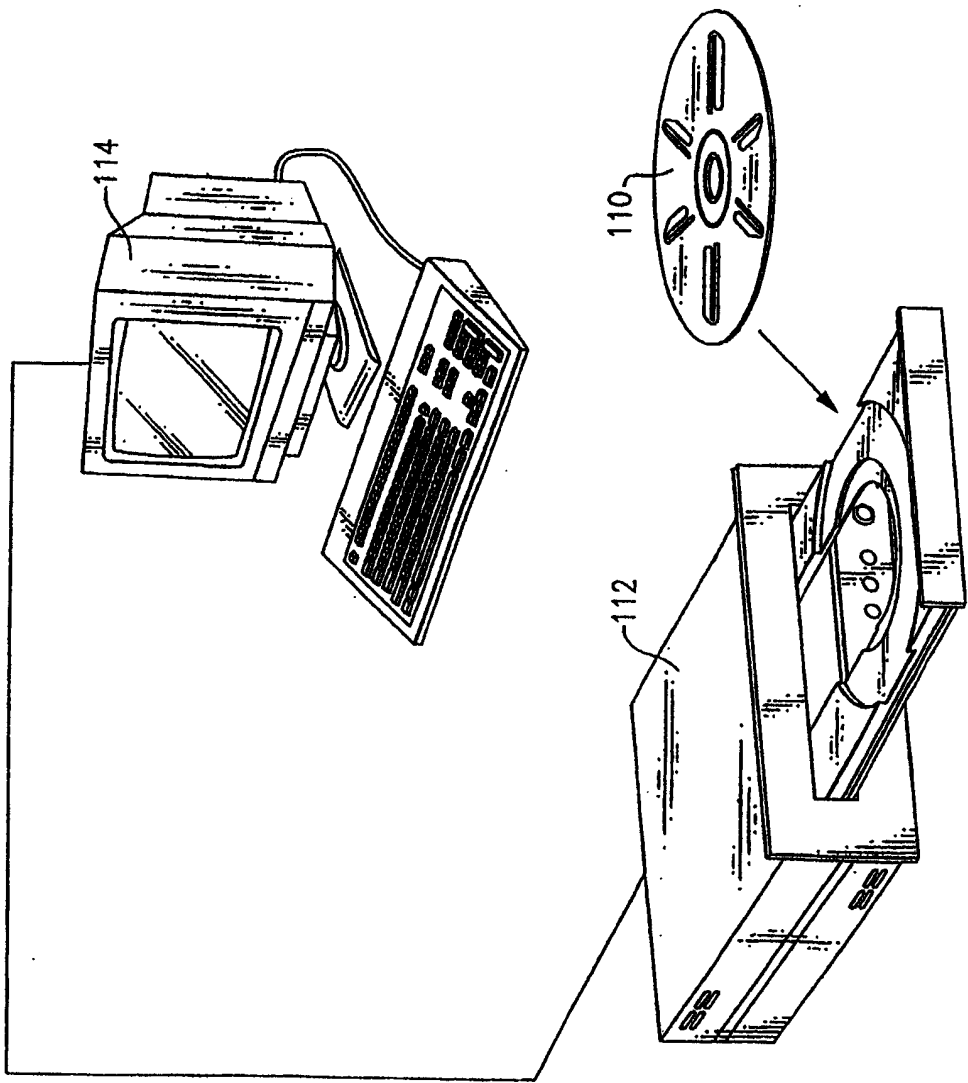
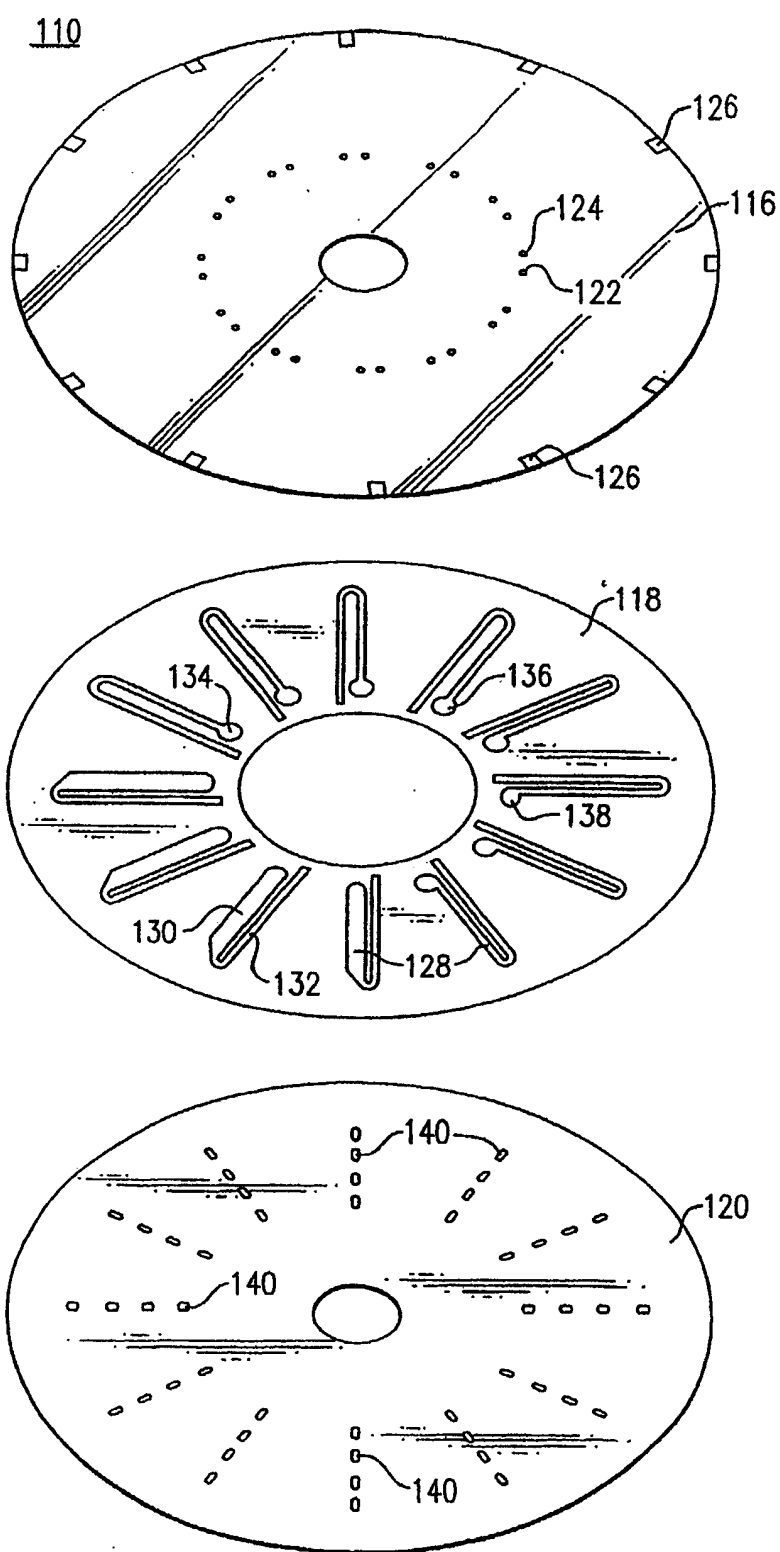


图1

图 2



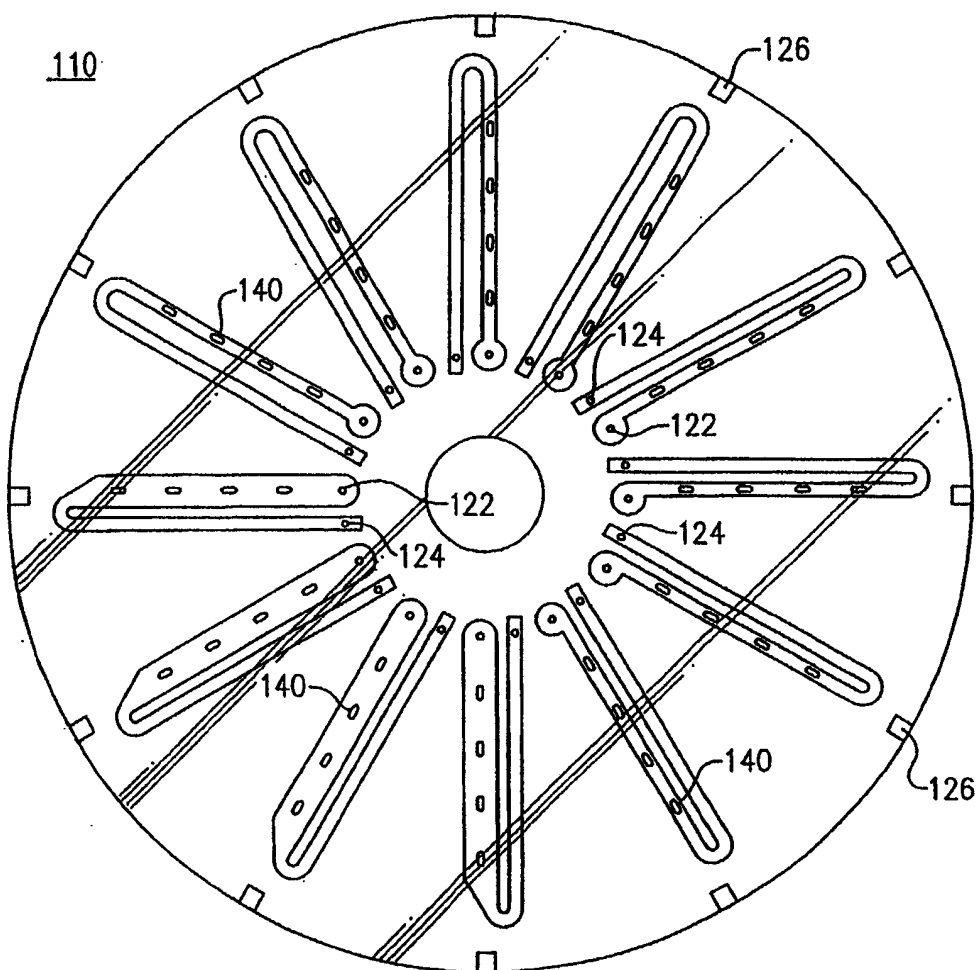


图 3

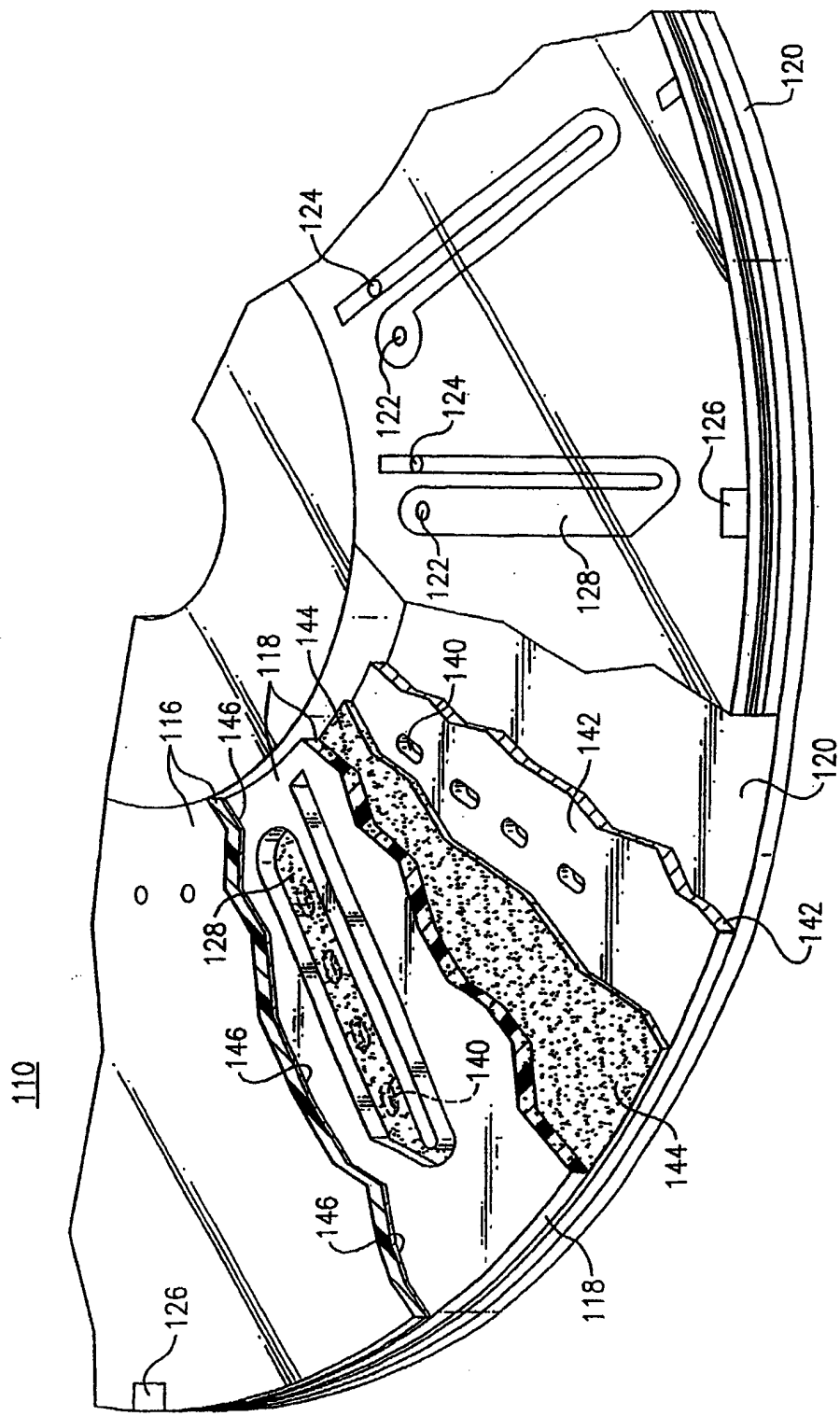
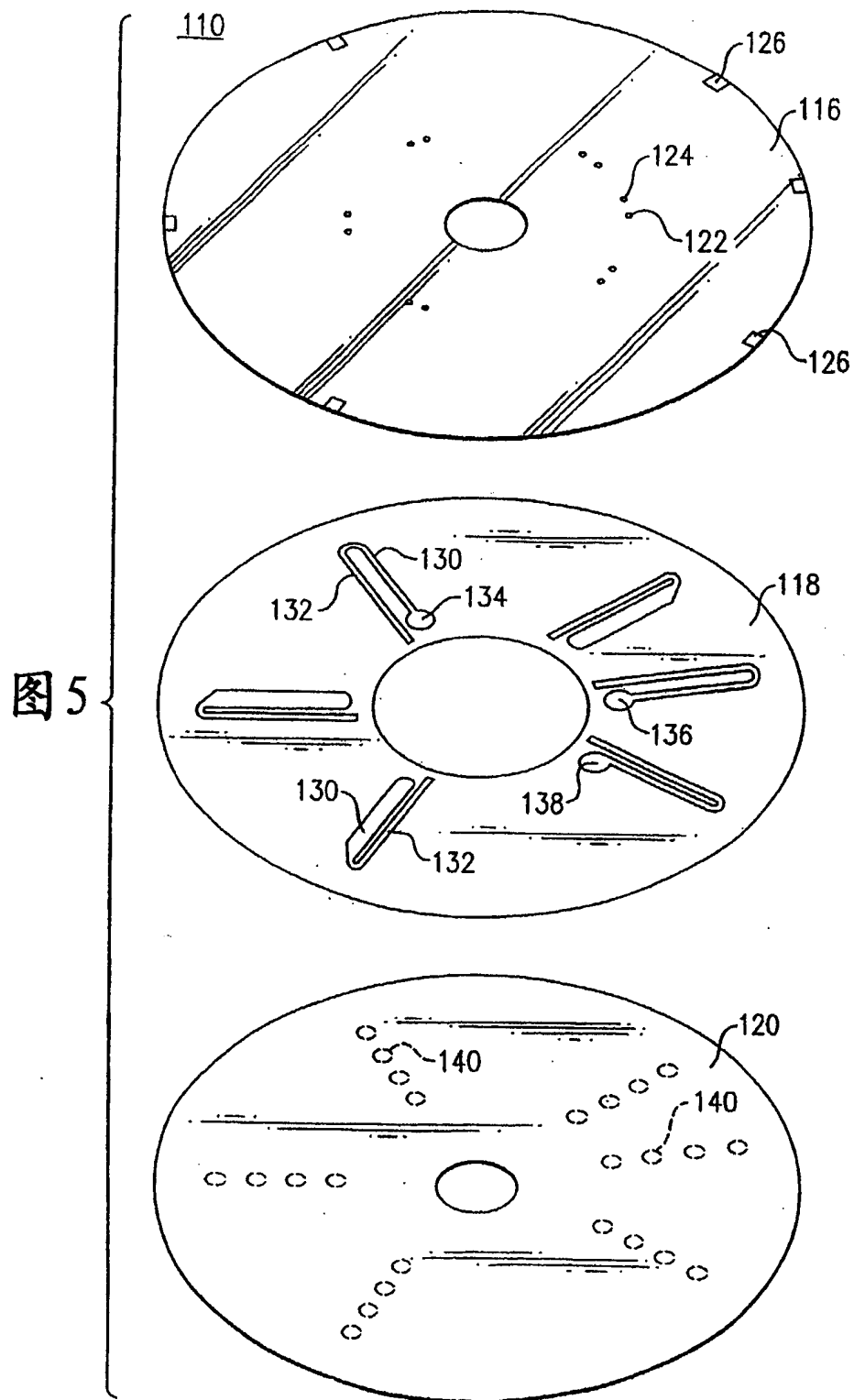


图 4



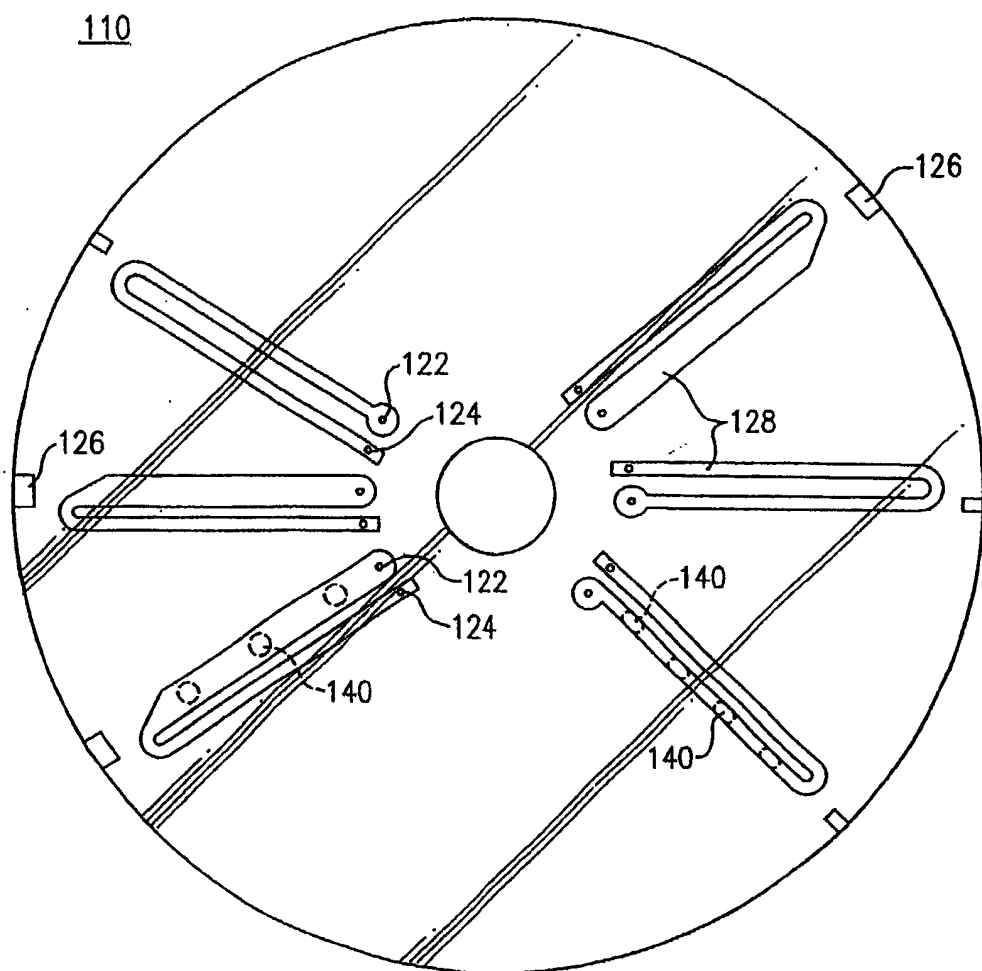


图6

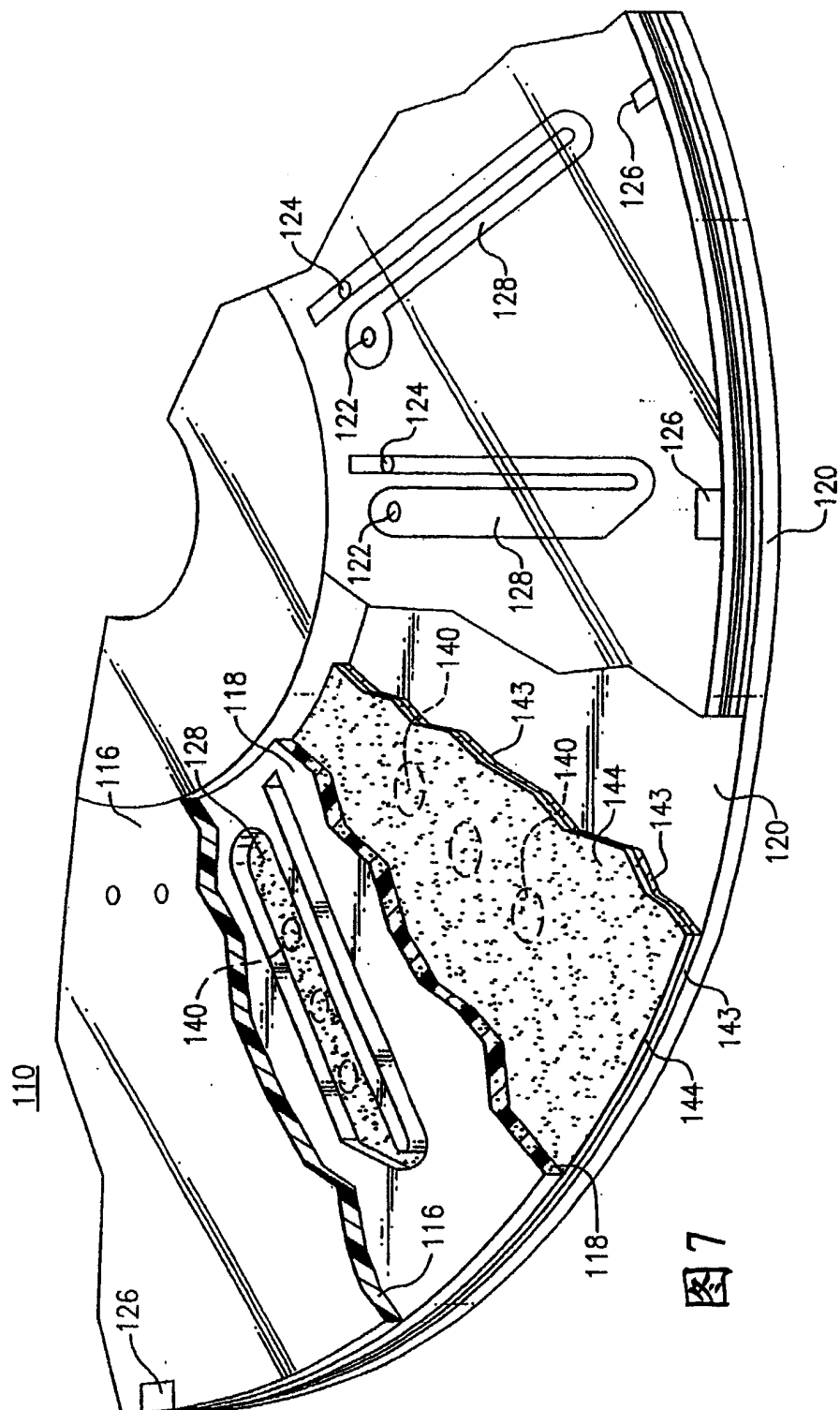


图 7

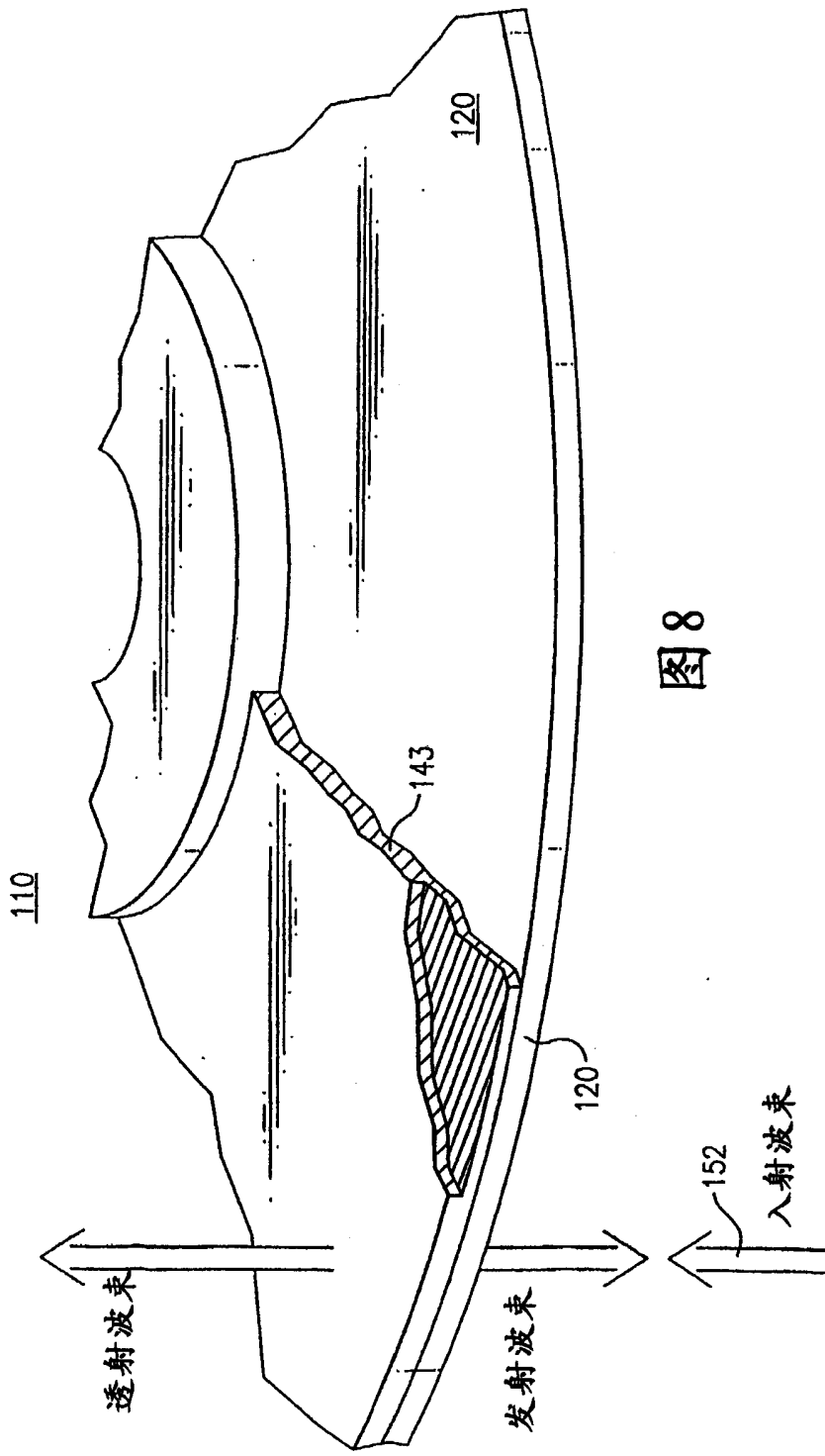


图8

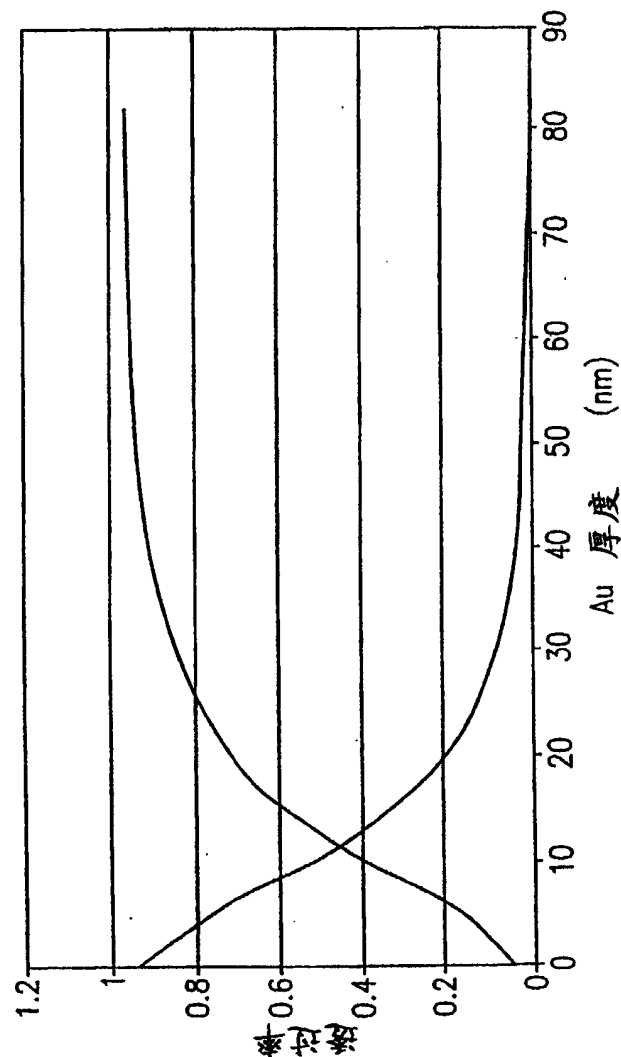


图9

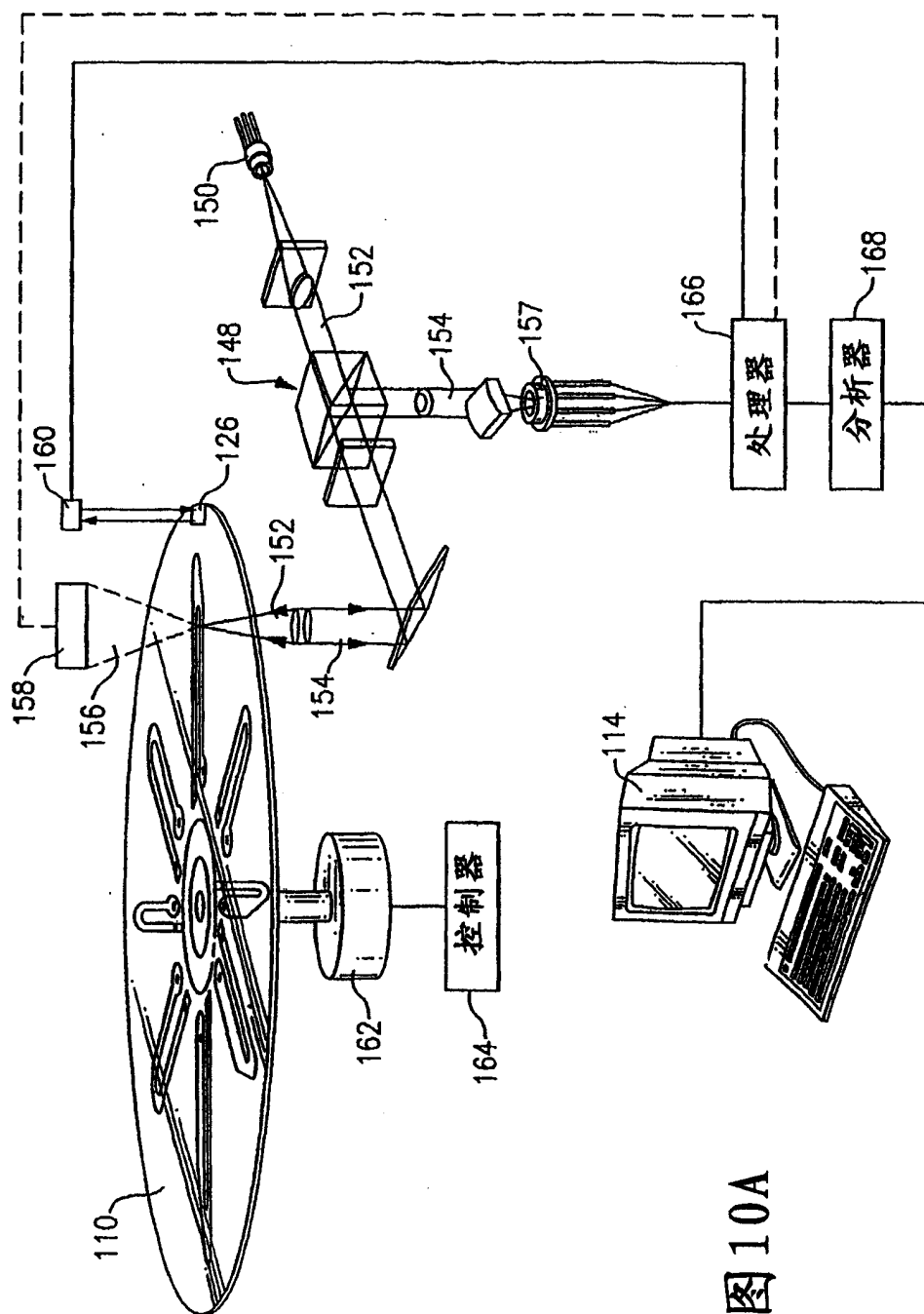


图 10A

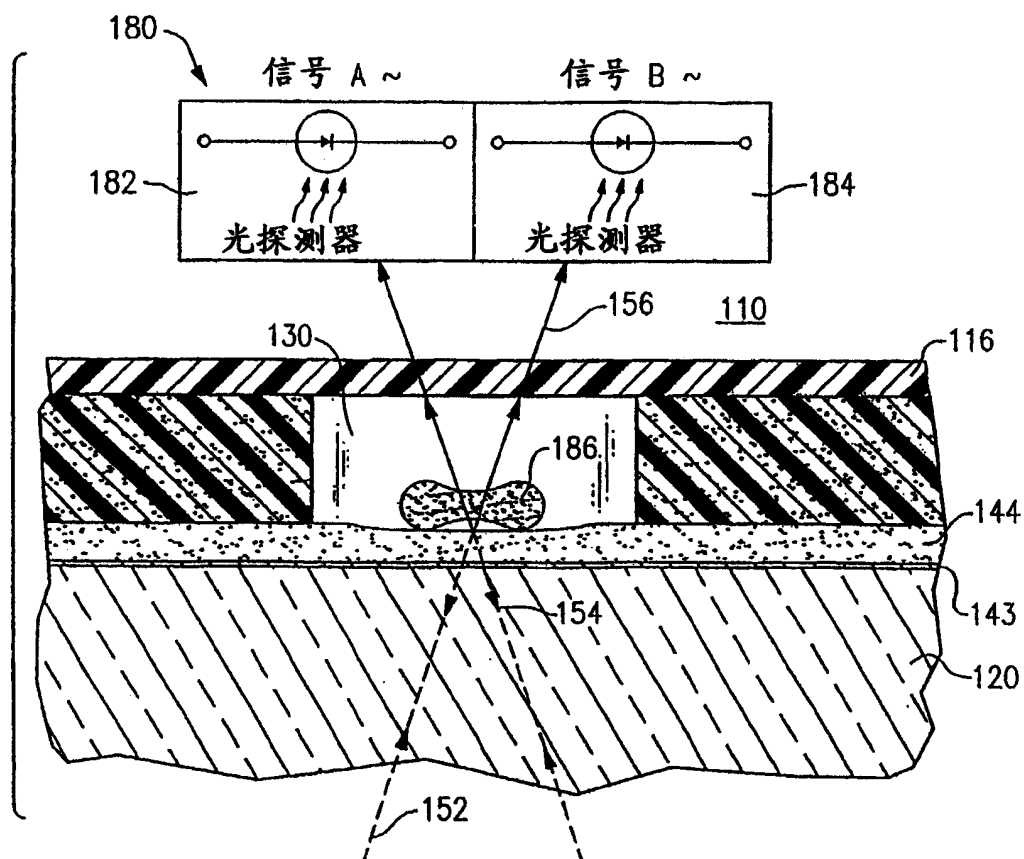


图 10B

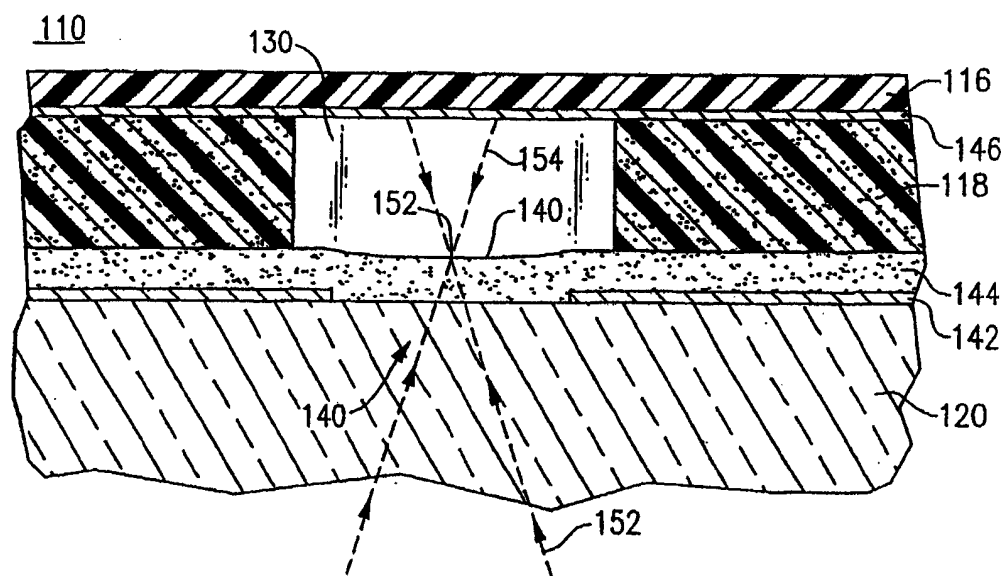


图 11

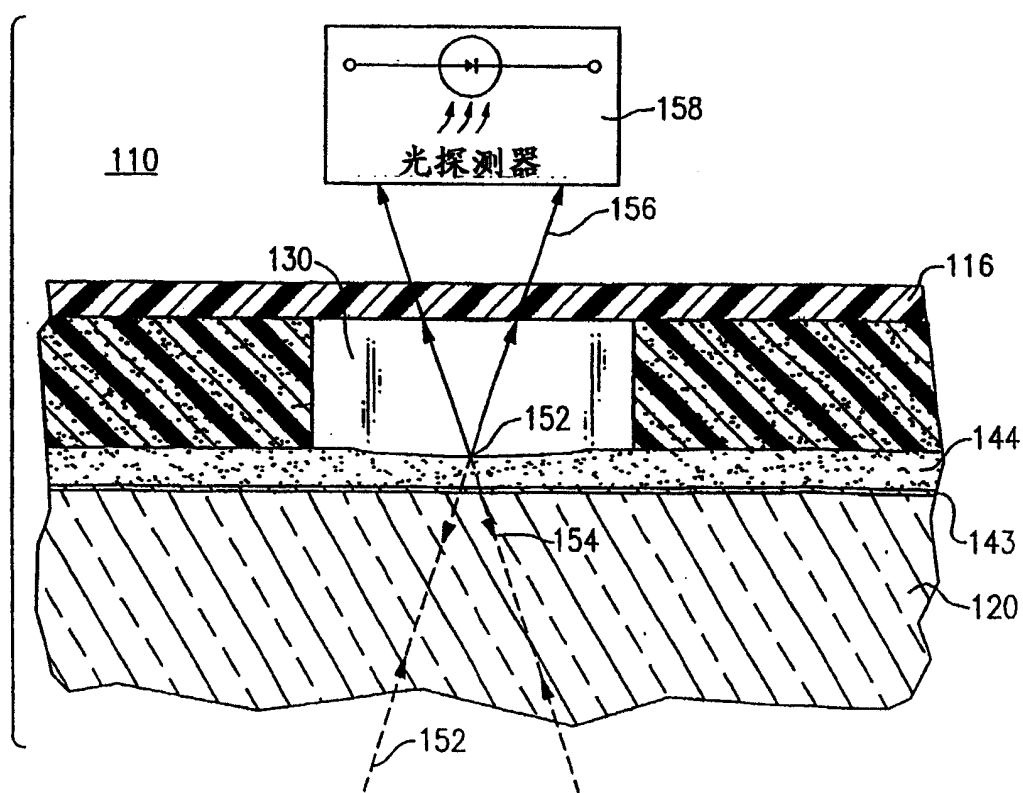


图 12

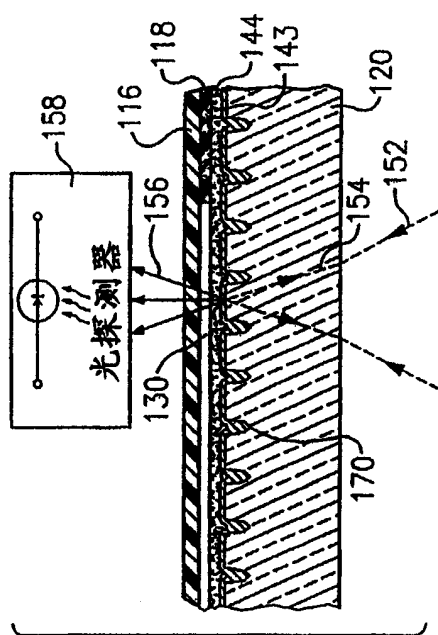


图14

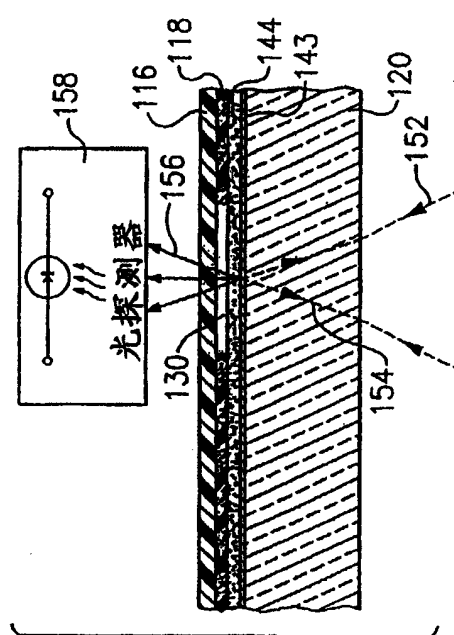


图16

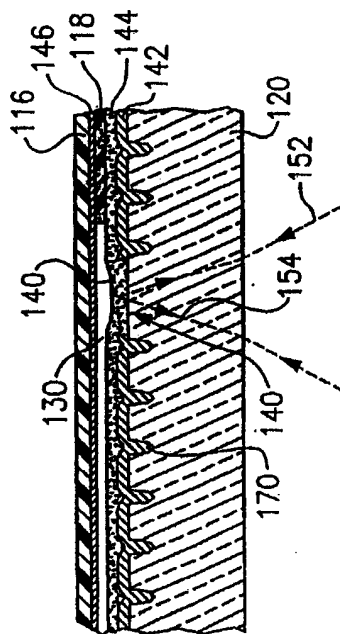


图13

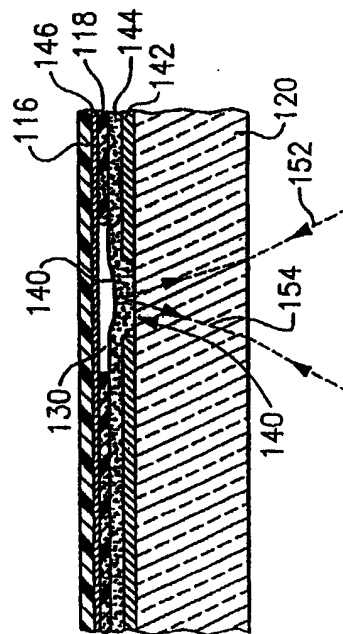


图15

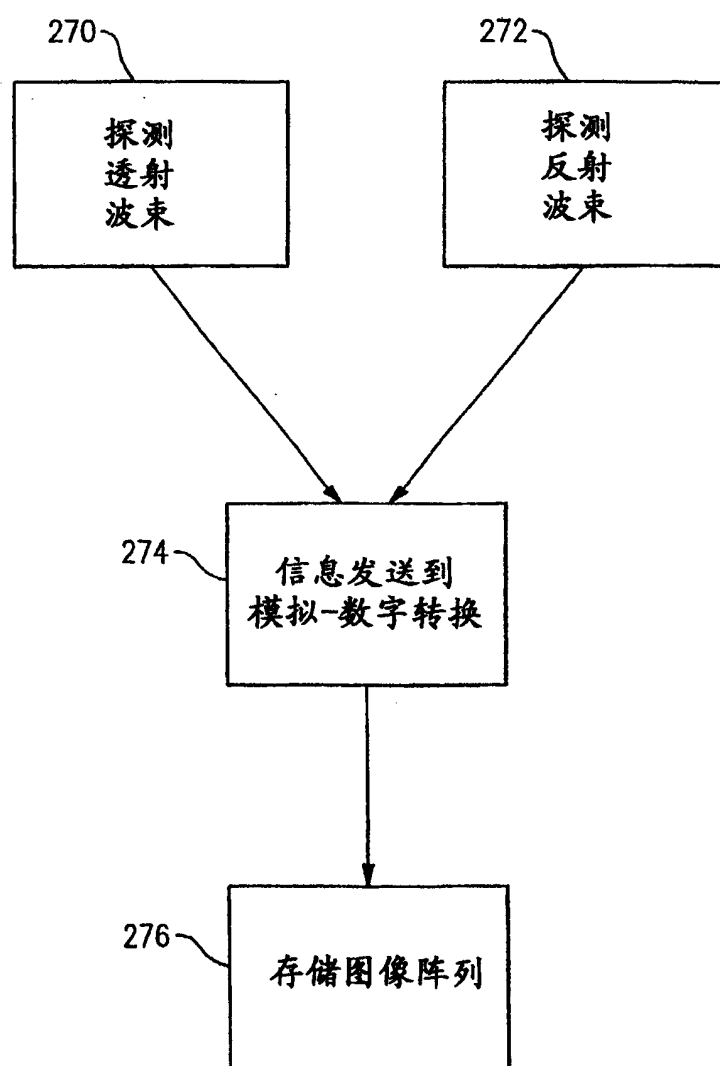


图 17

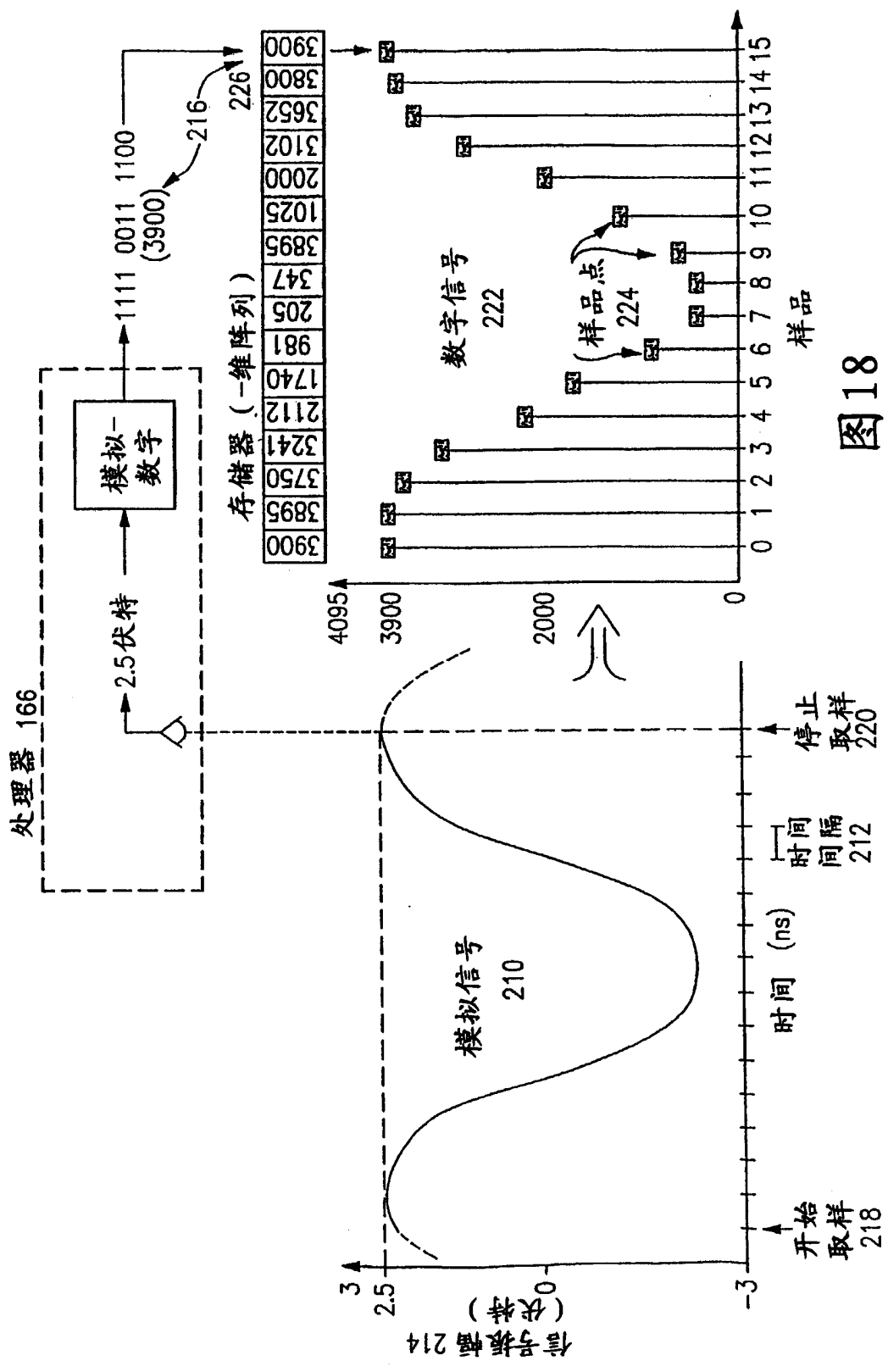


图18

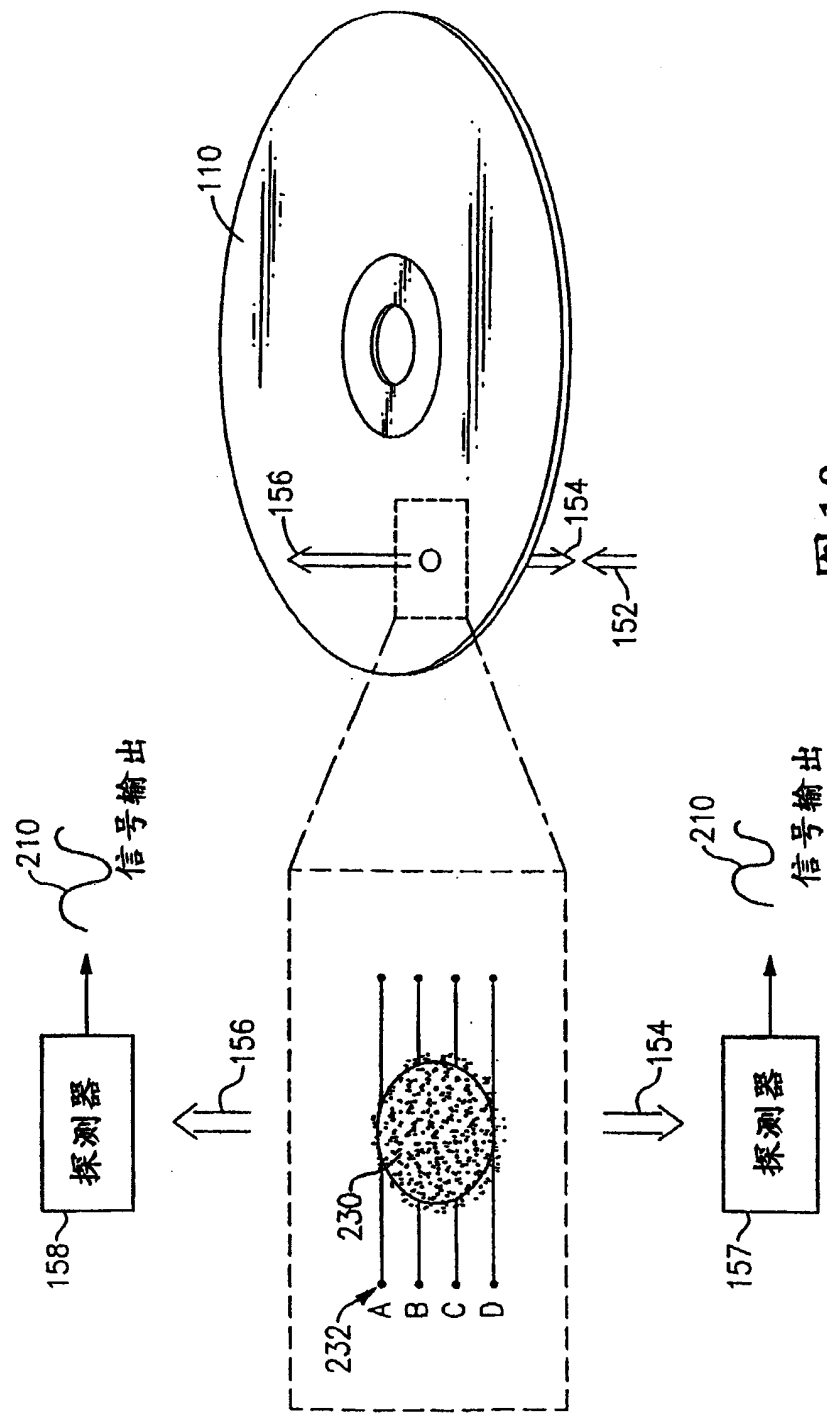


图19

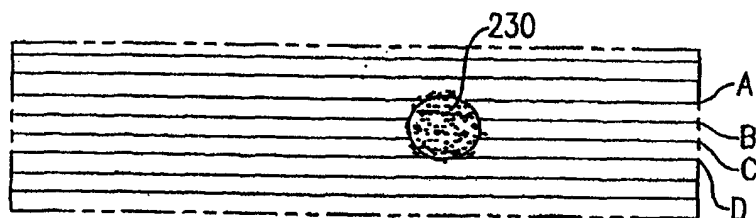


图 20A

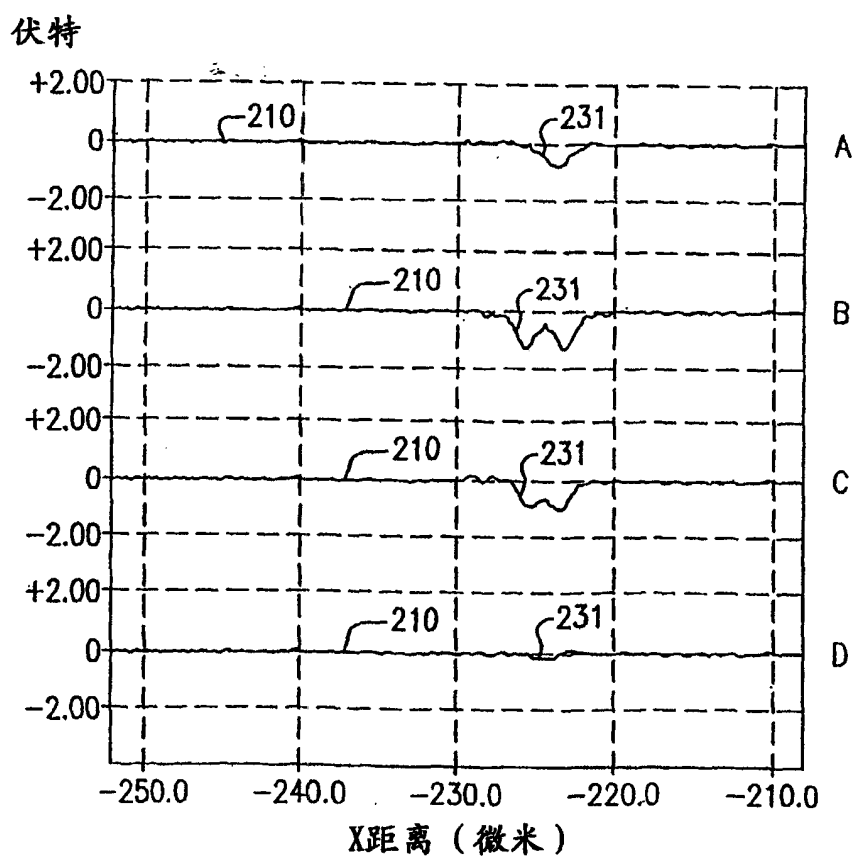


图 20B

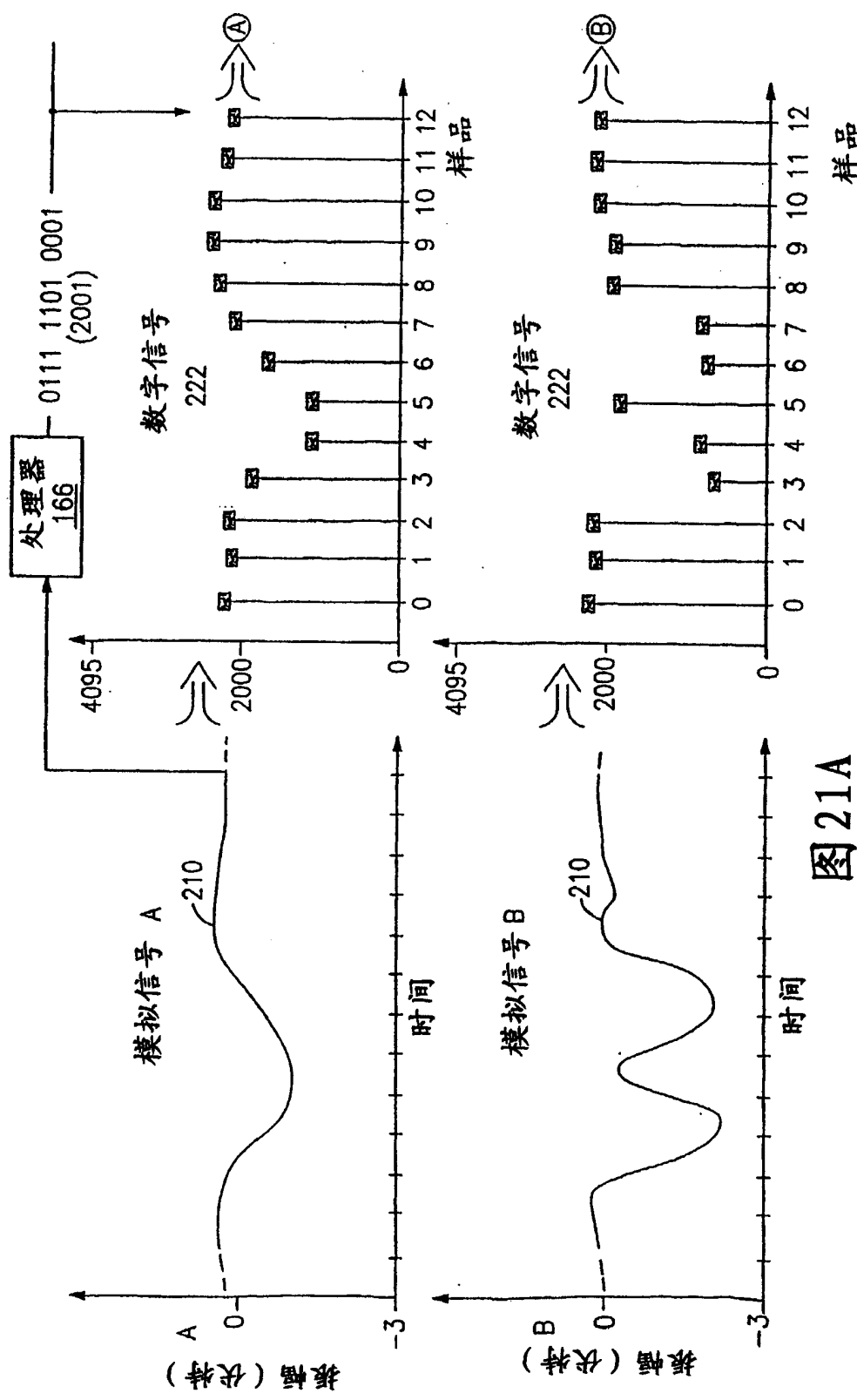


图 21A

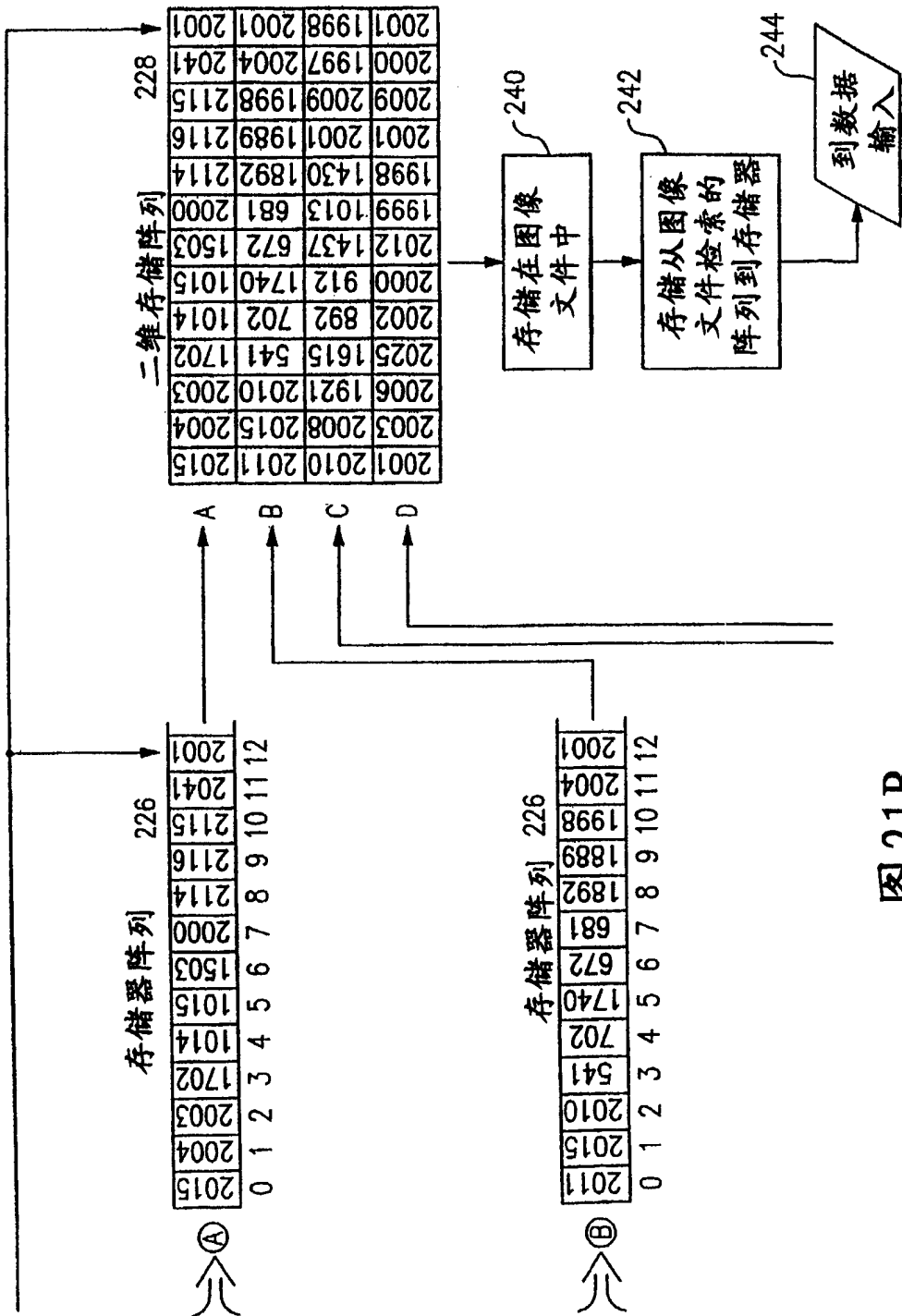


图21B

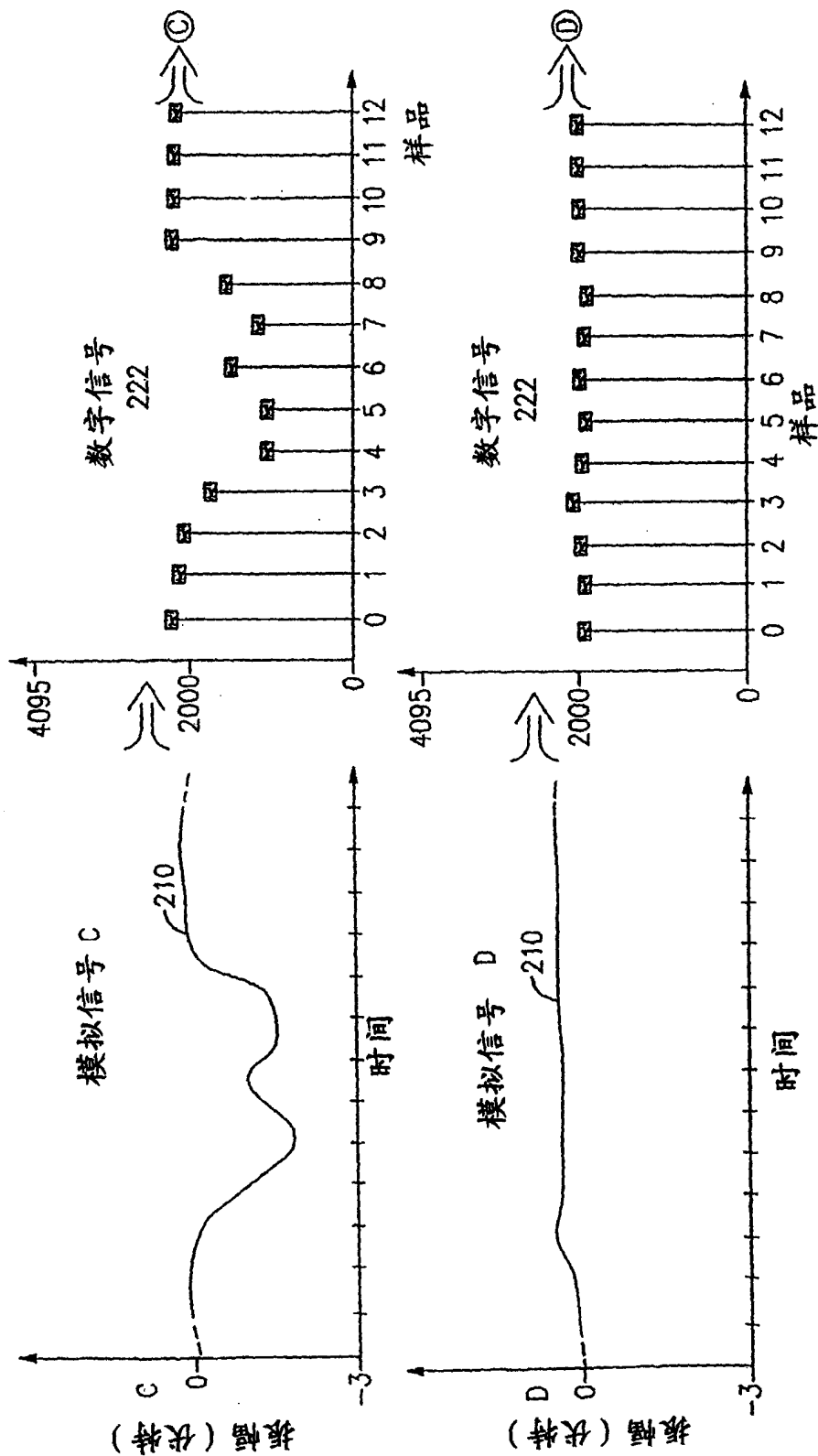
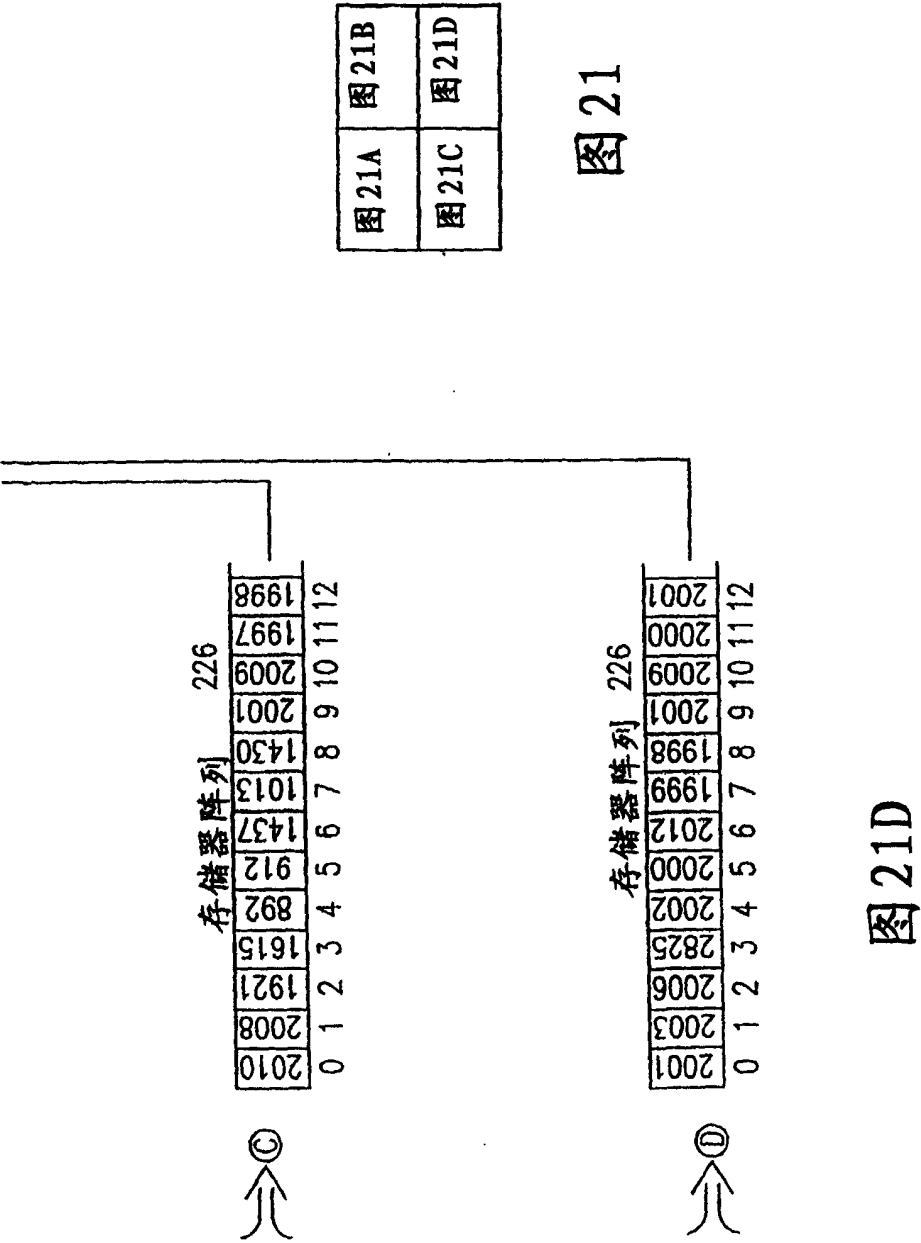
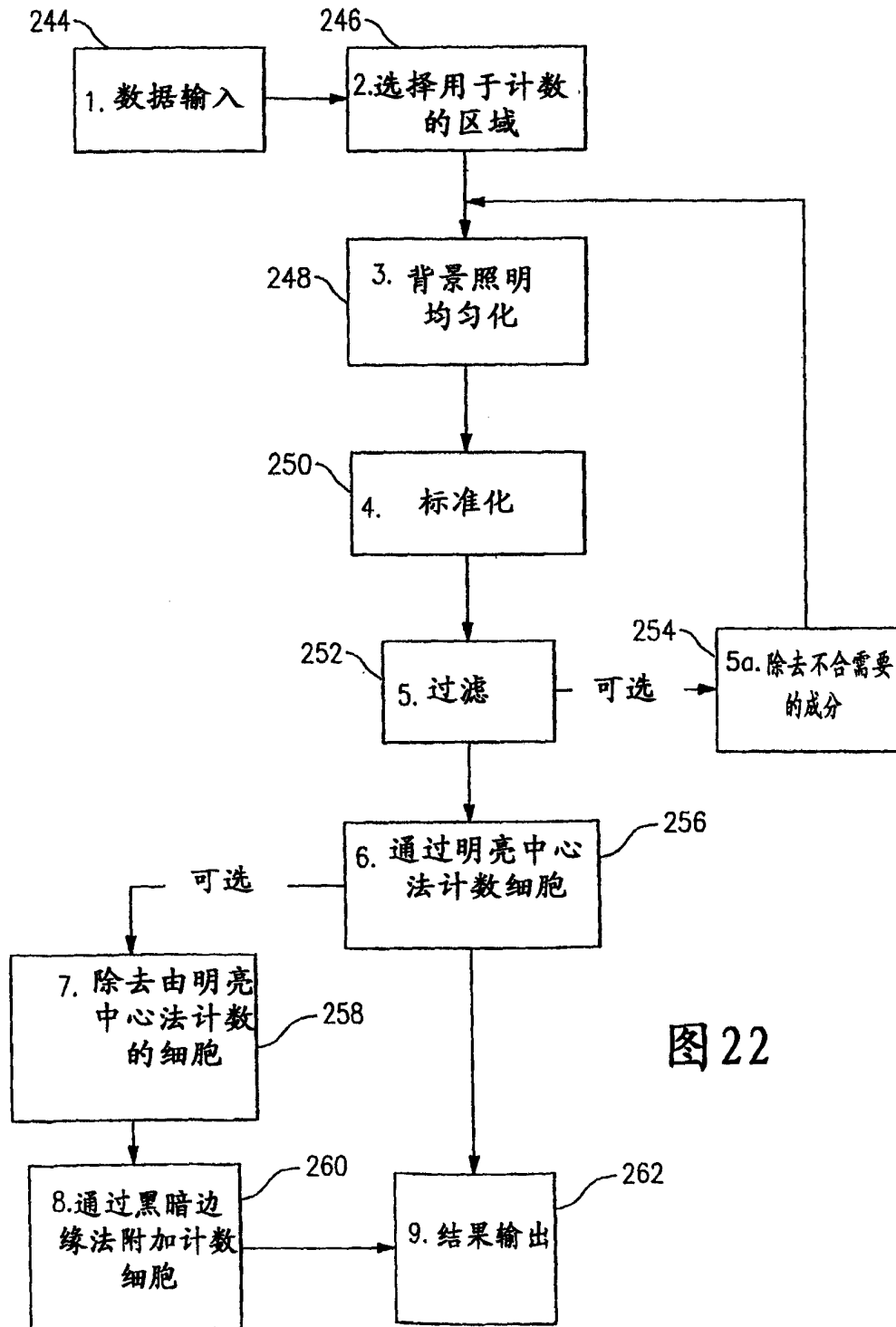
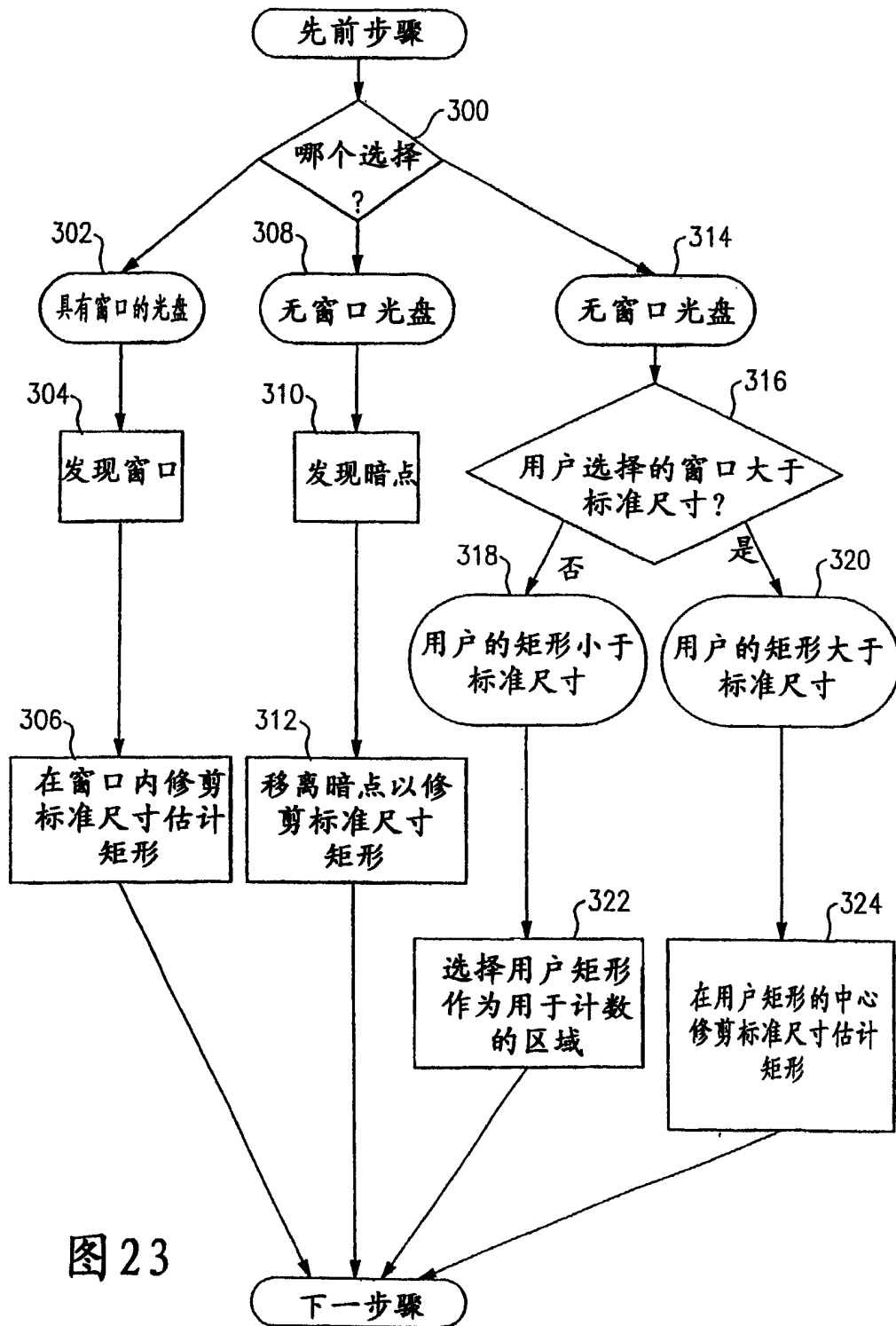


图21C







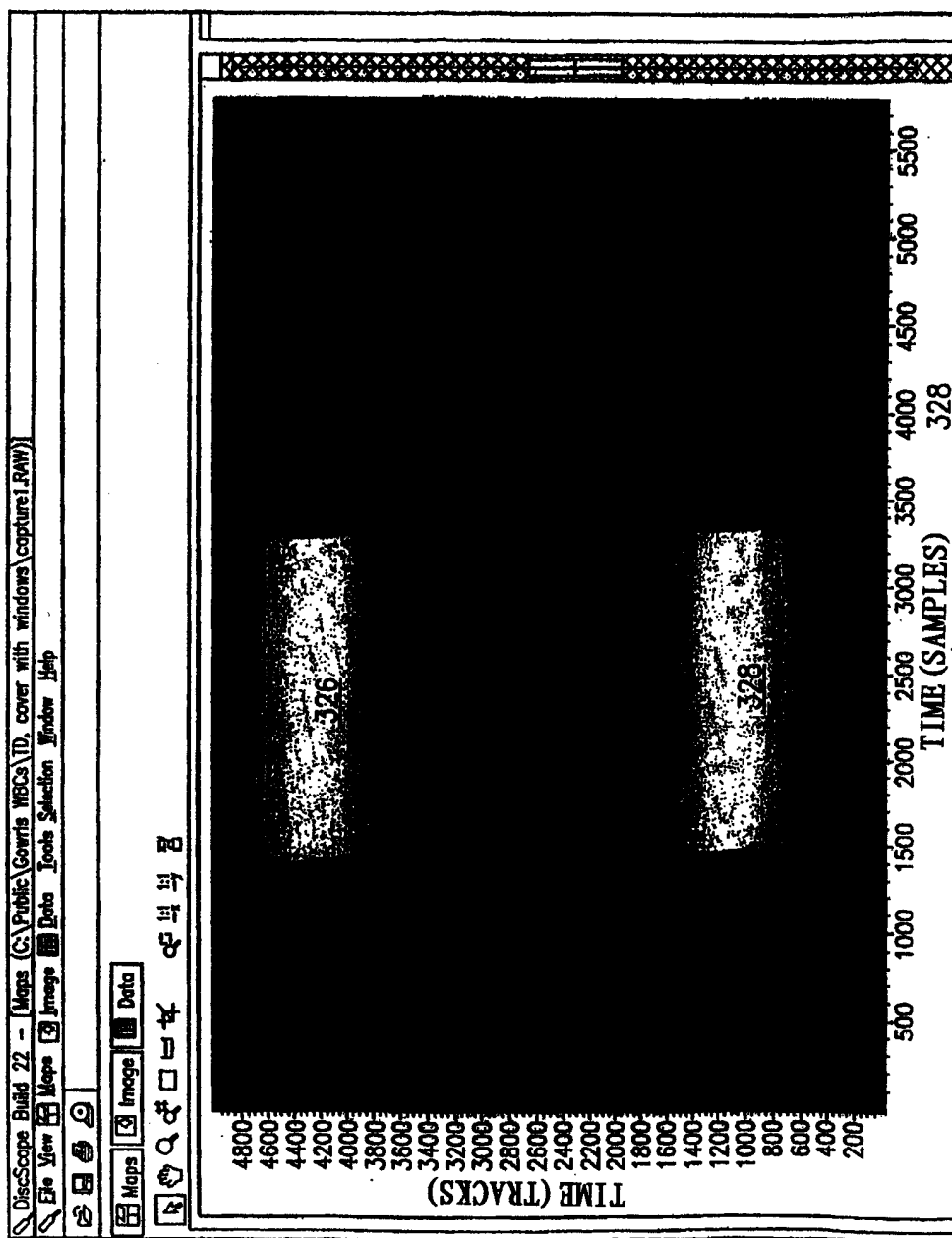


图 24

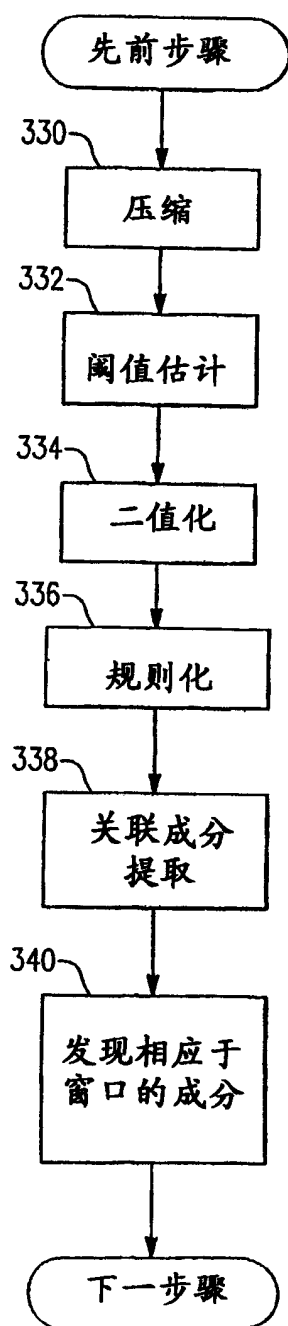


图 25

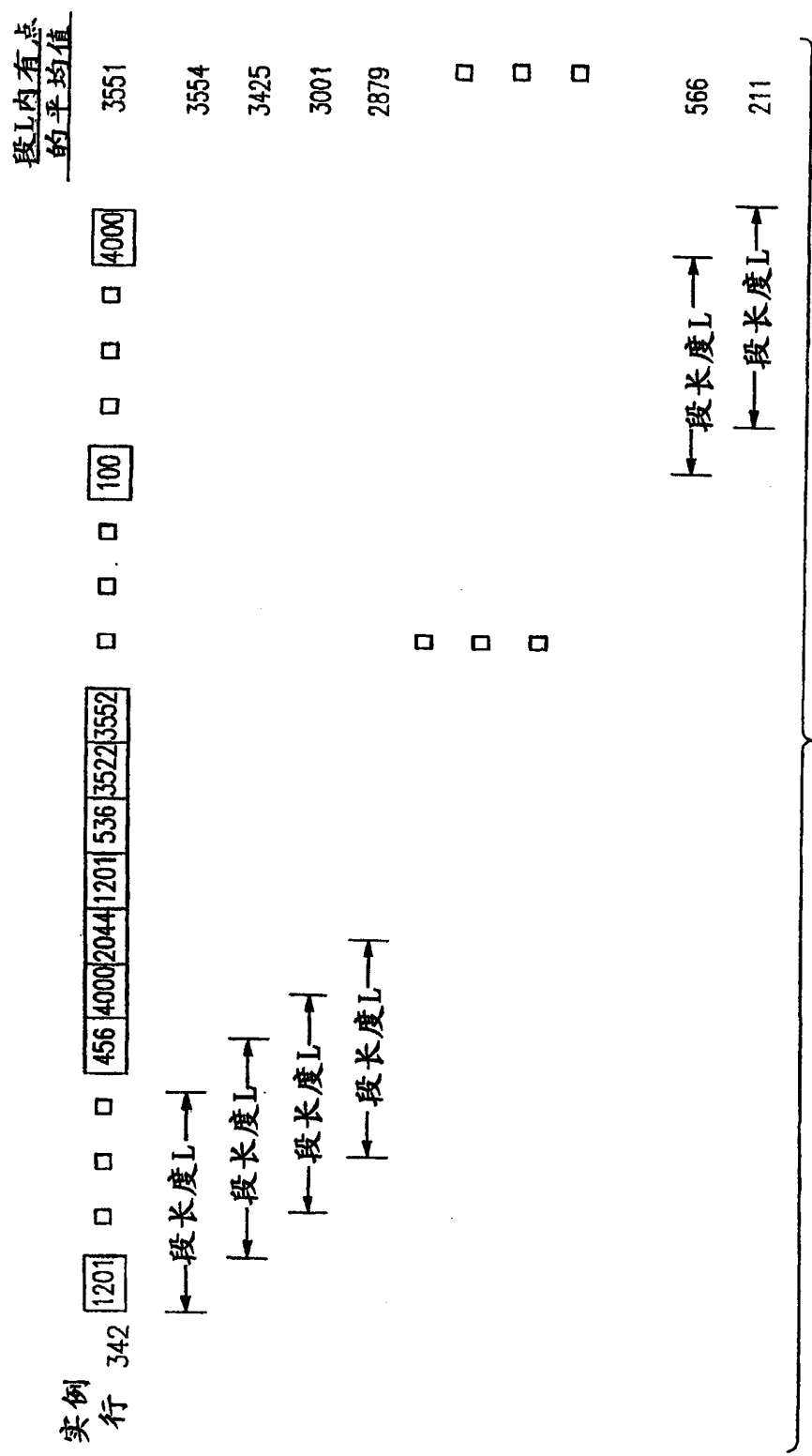


图 26

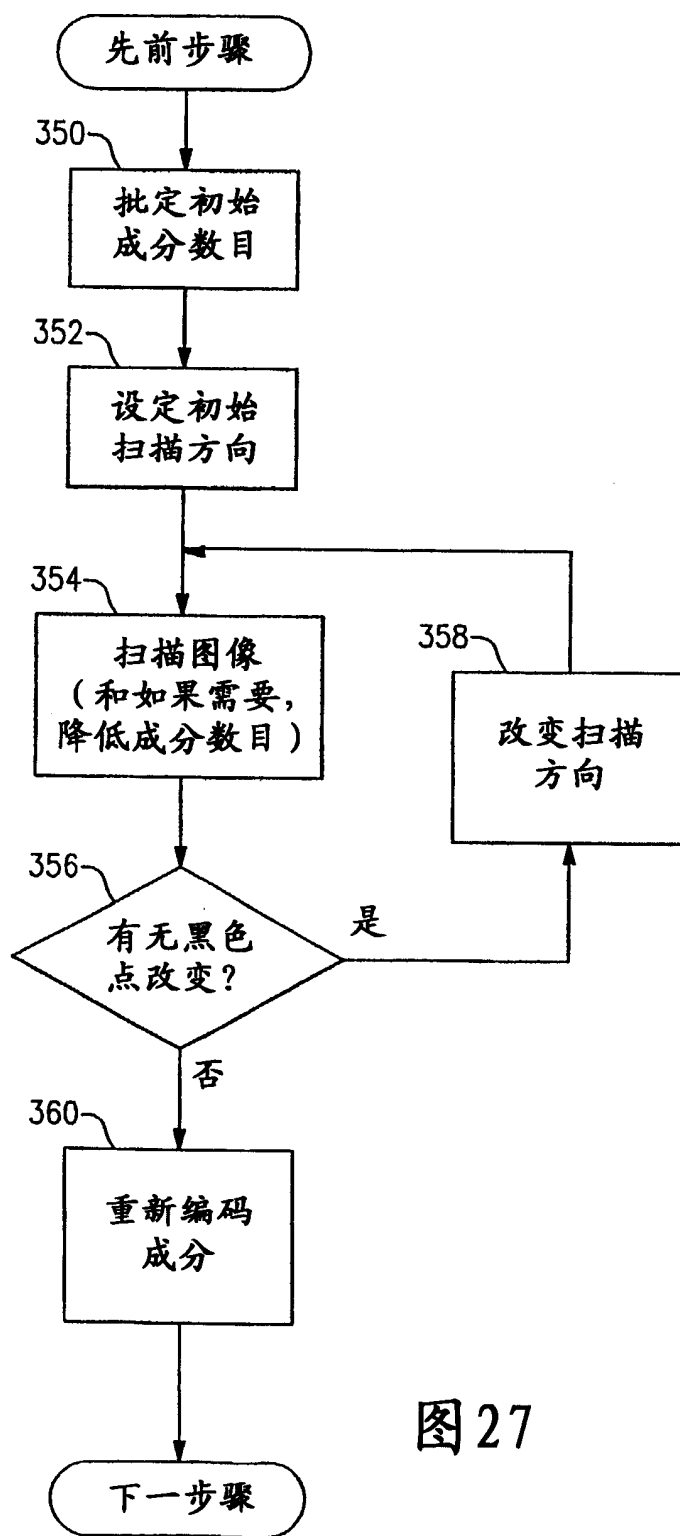


图 27



图 28

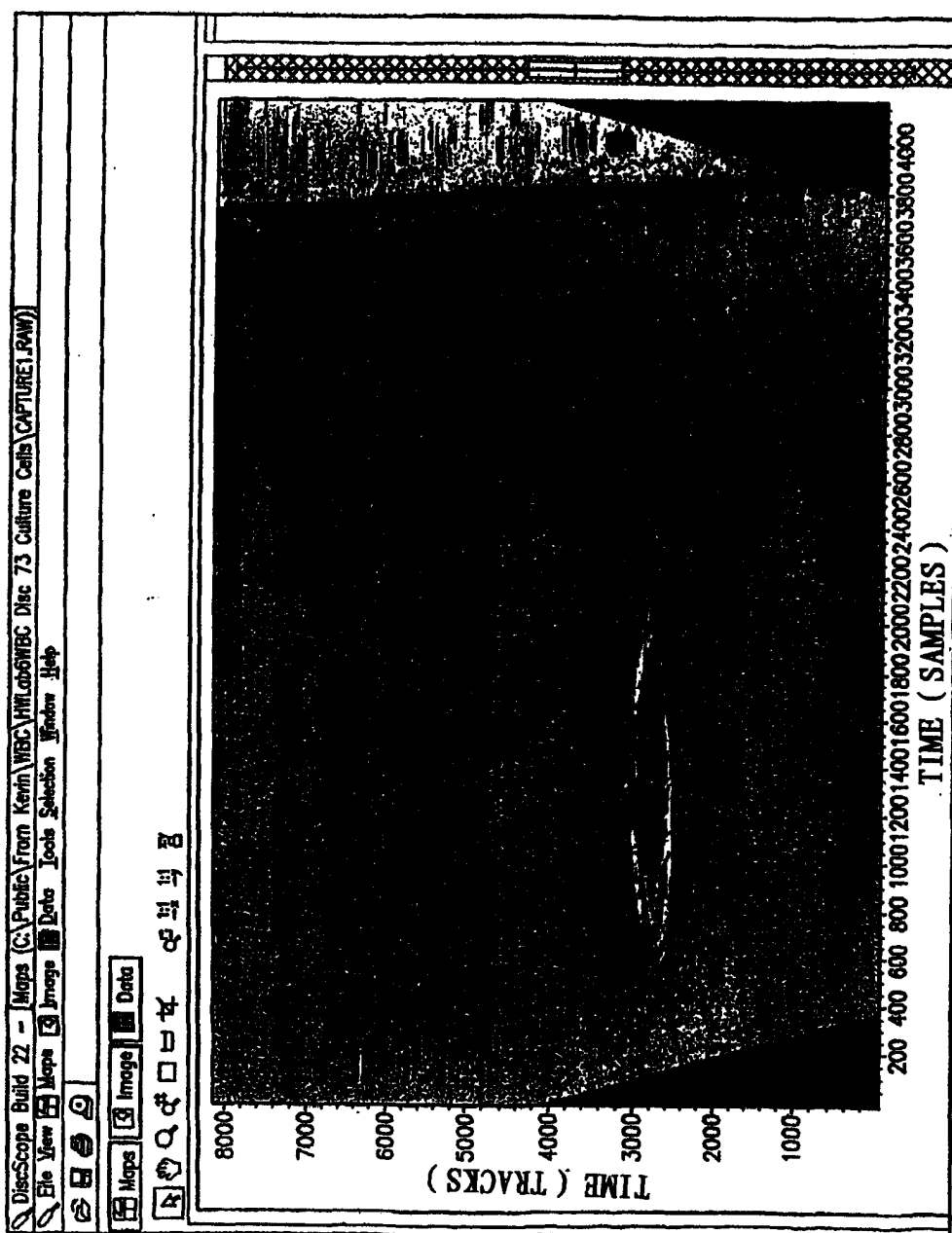


图 29

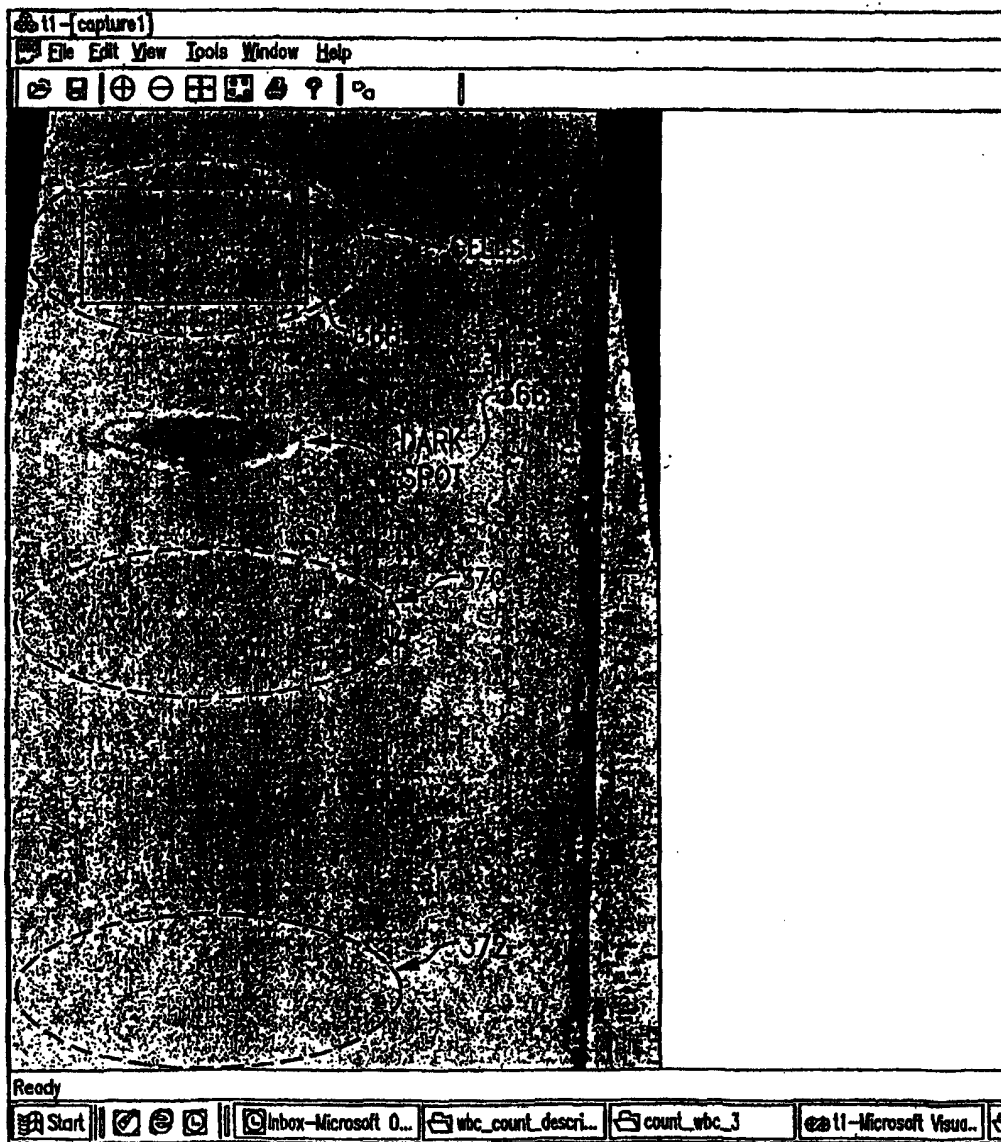


图 30

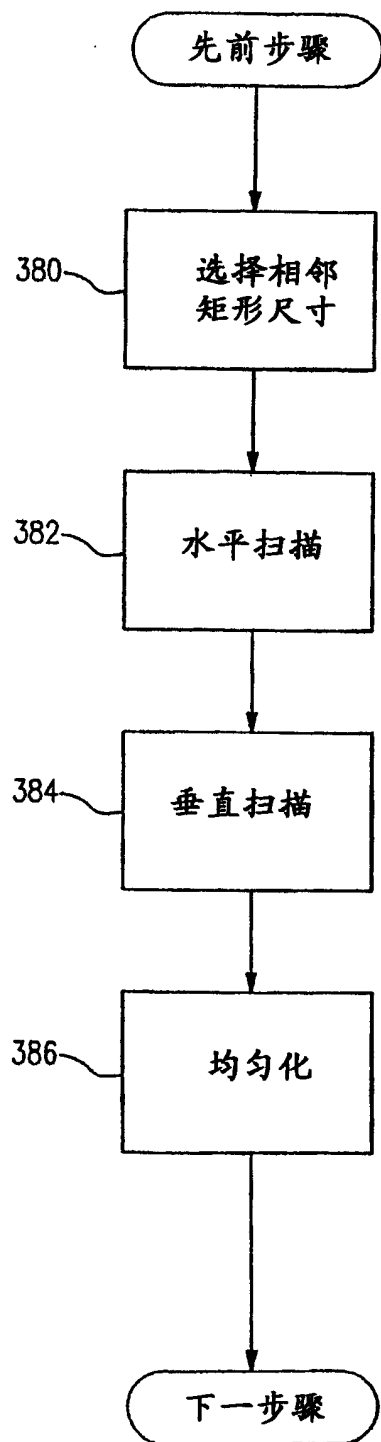


图 31

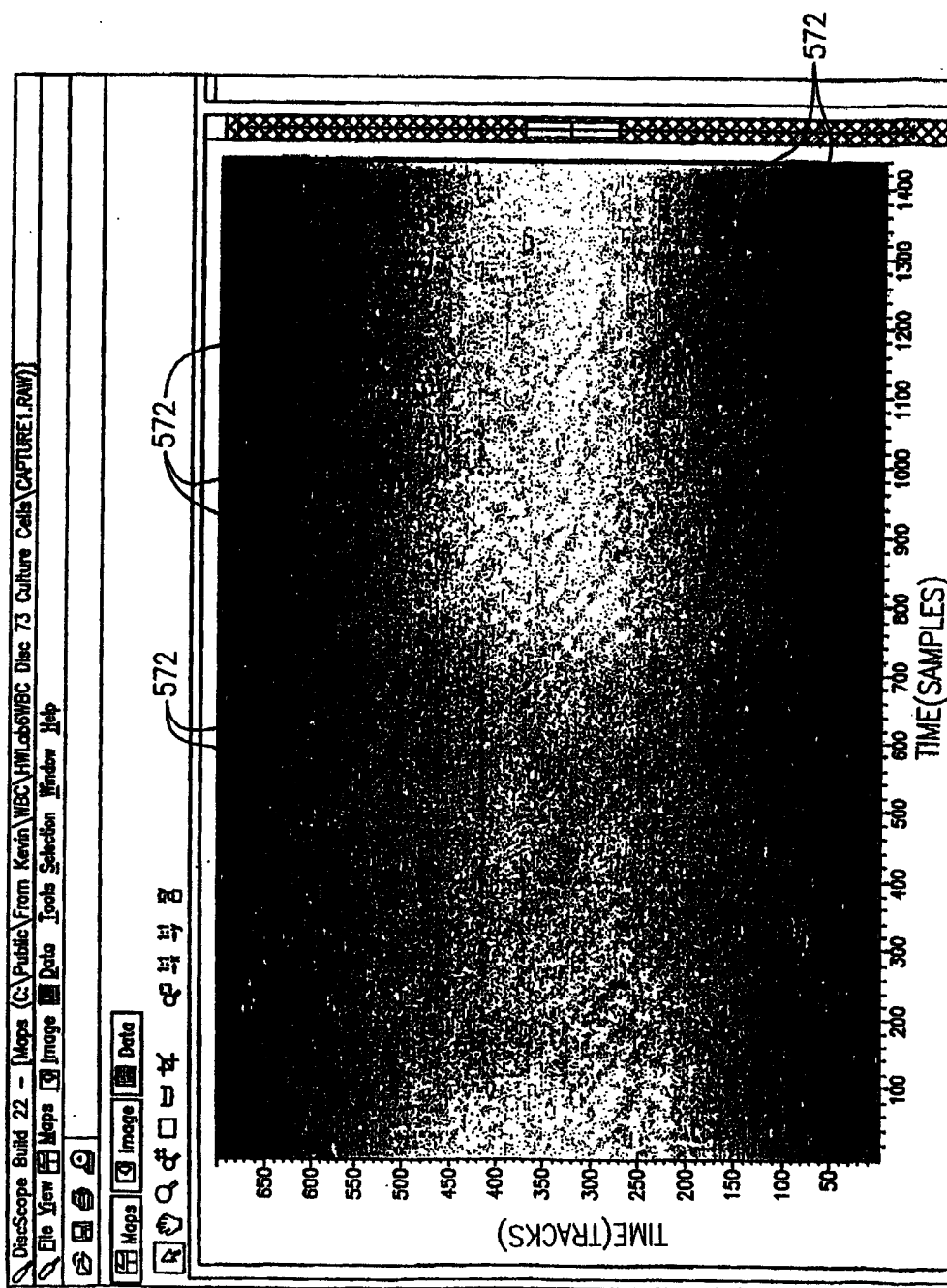


图 32

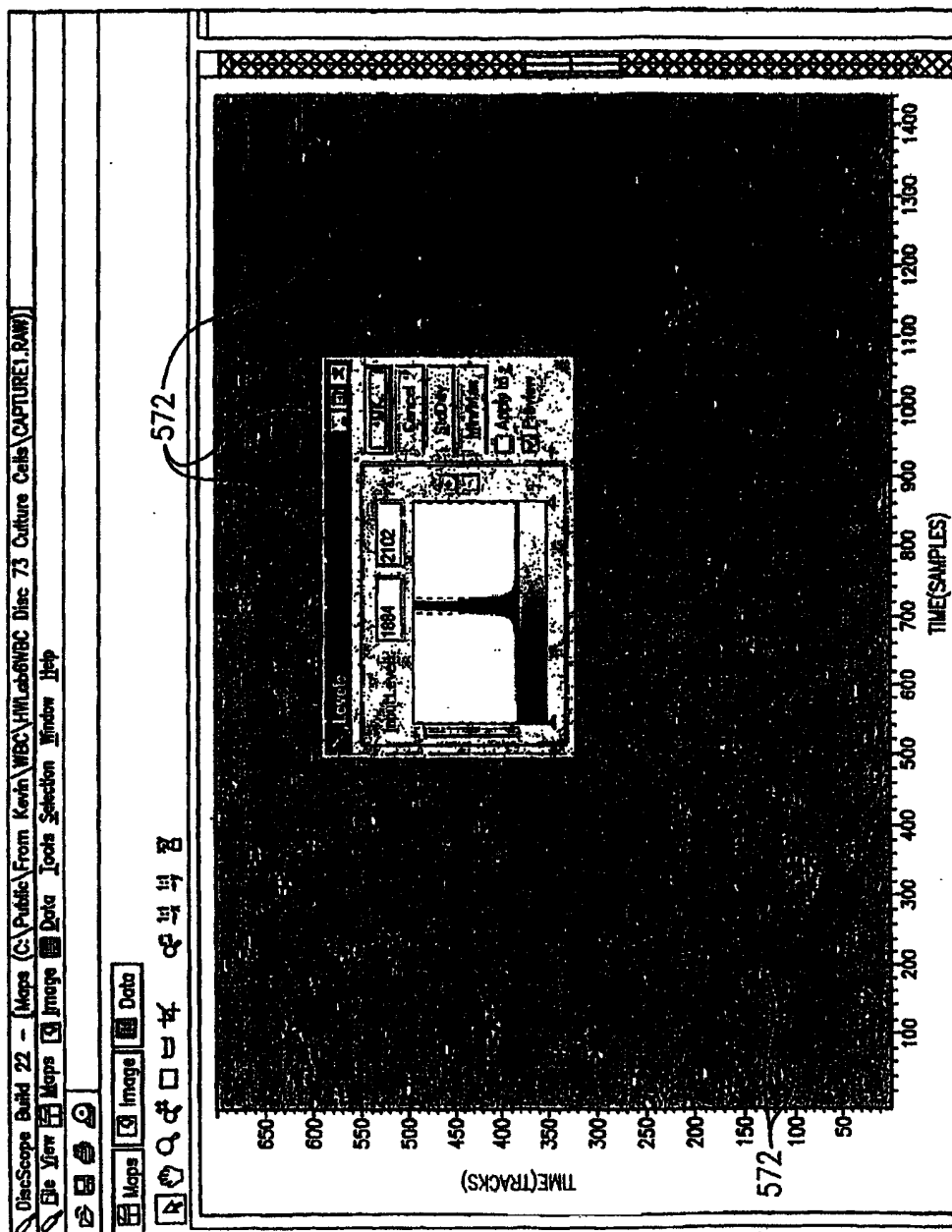


图 33

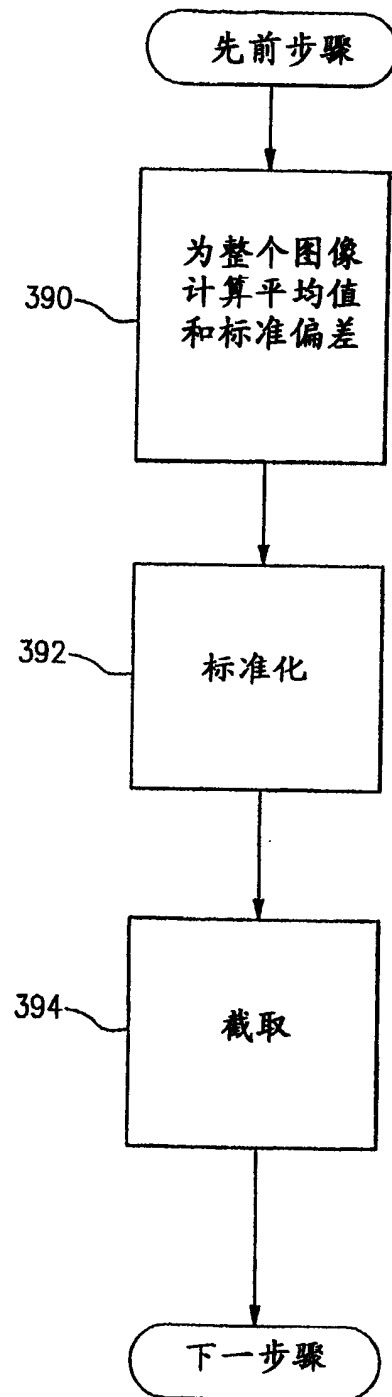


图 34

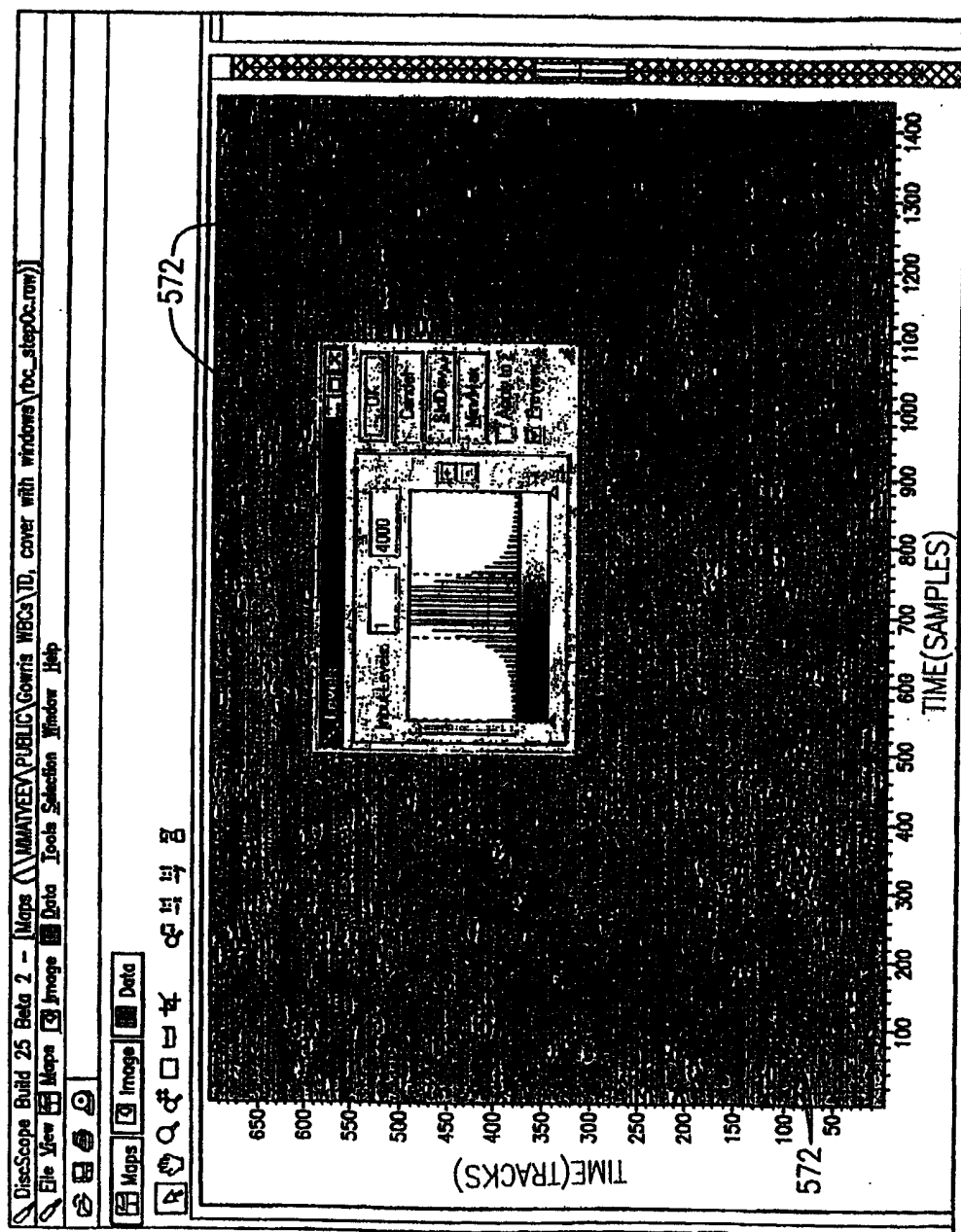


图 35

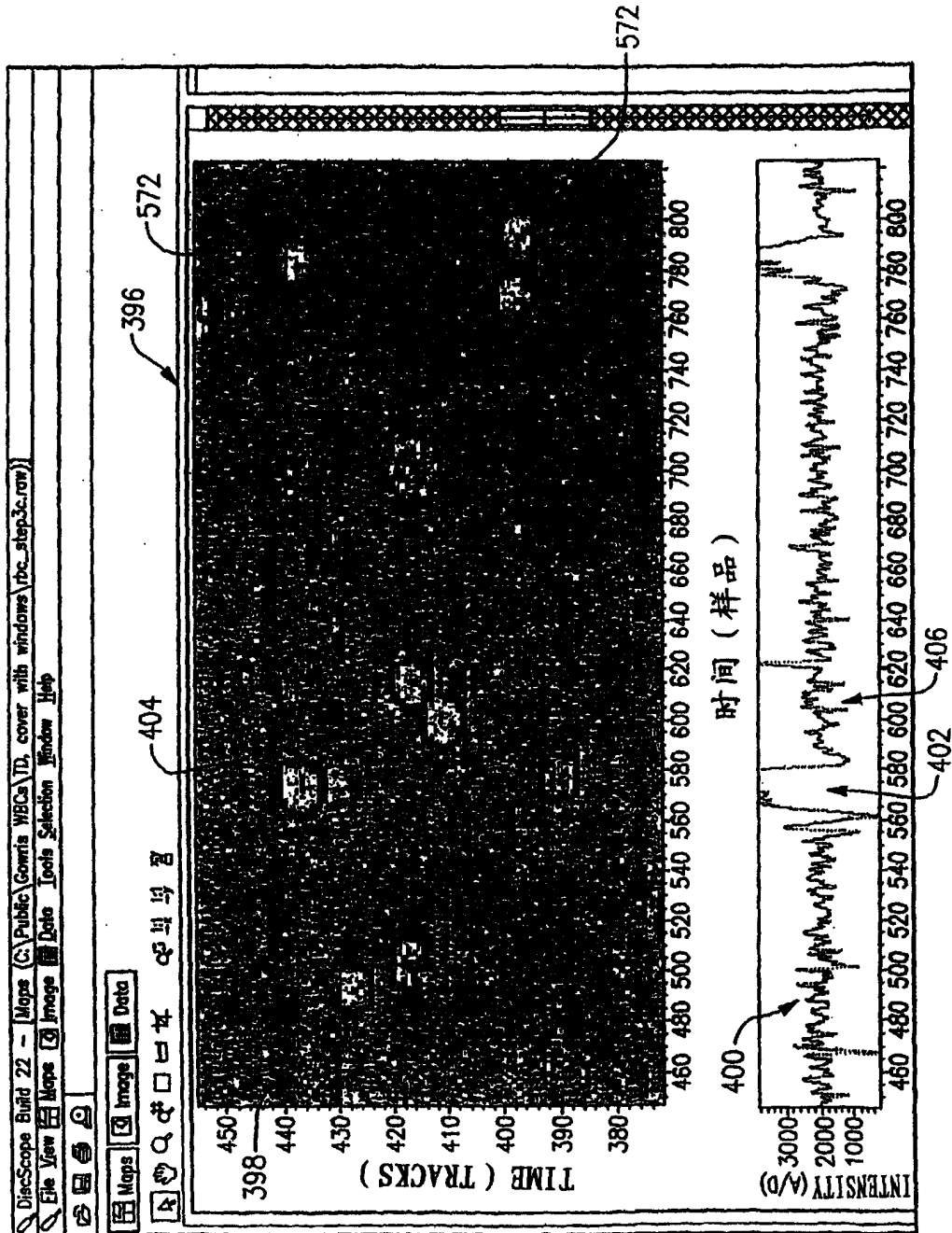


图 36

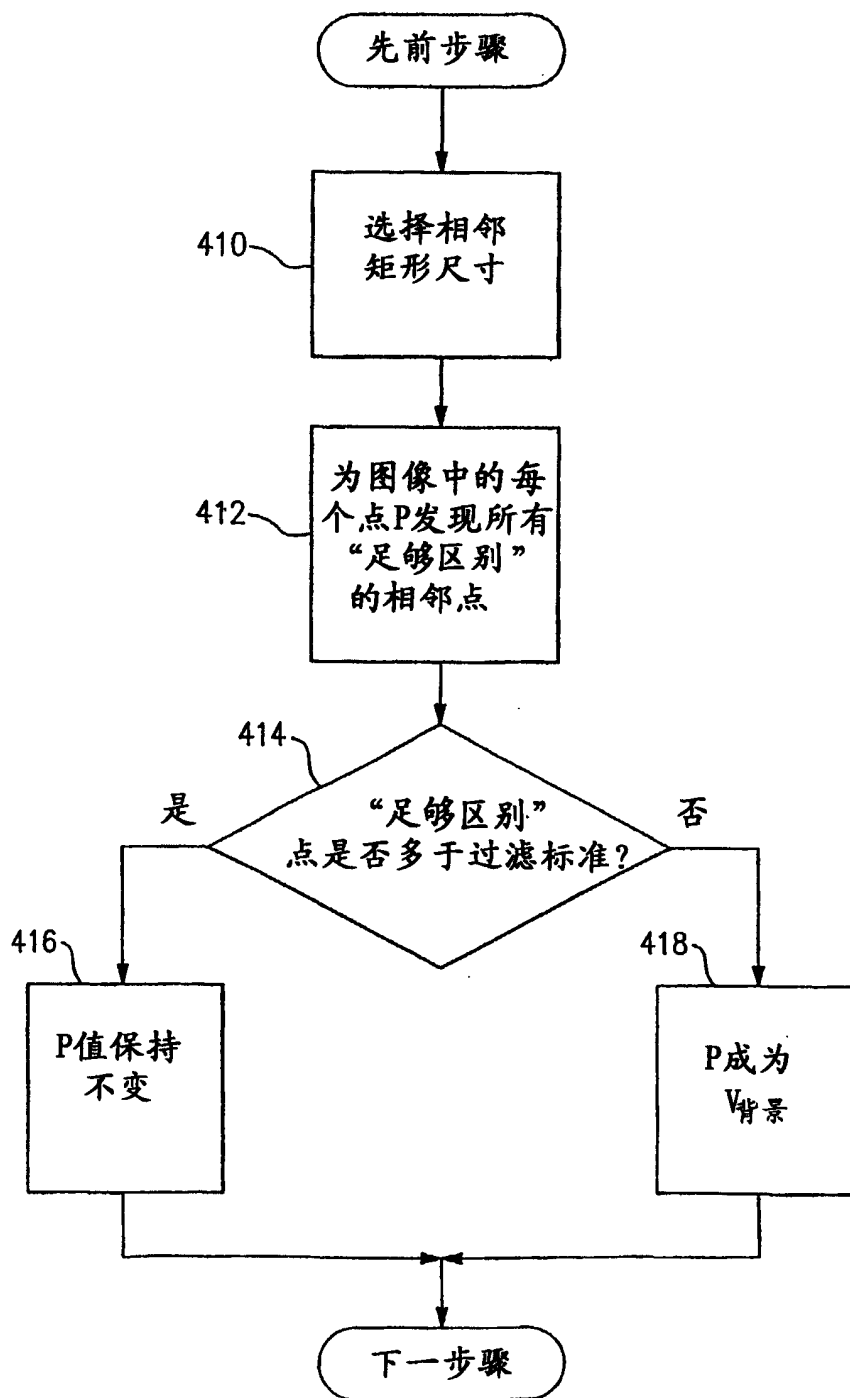


图 37

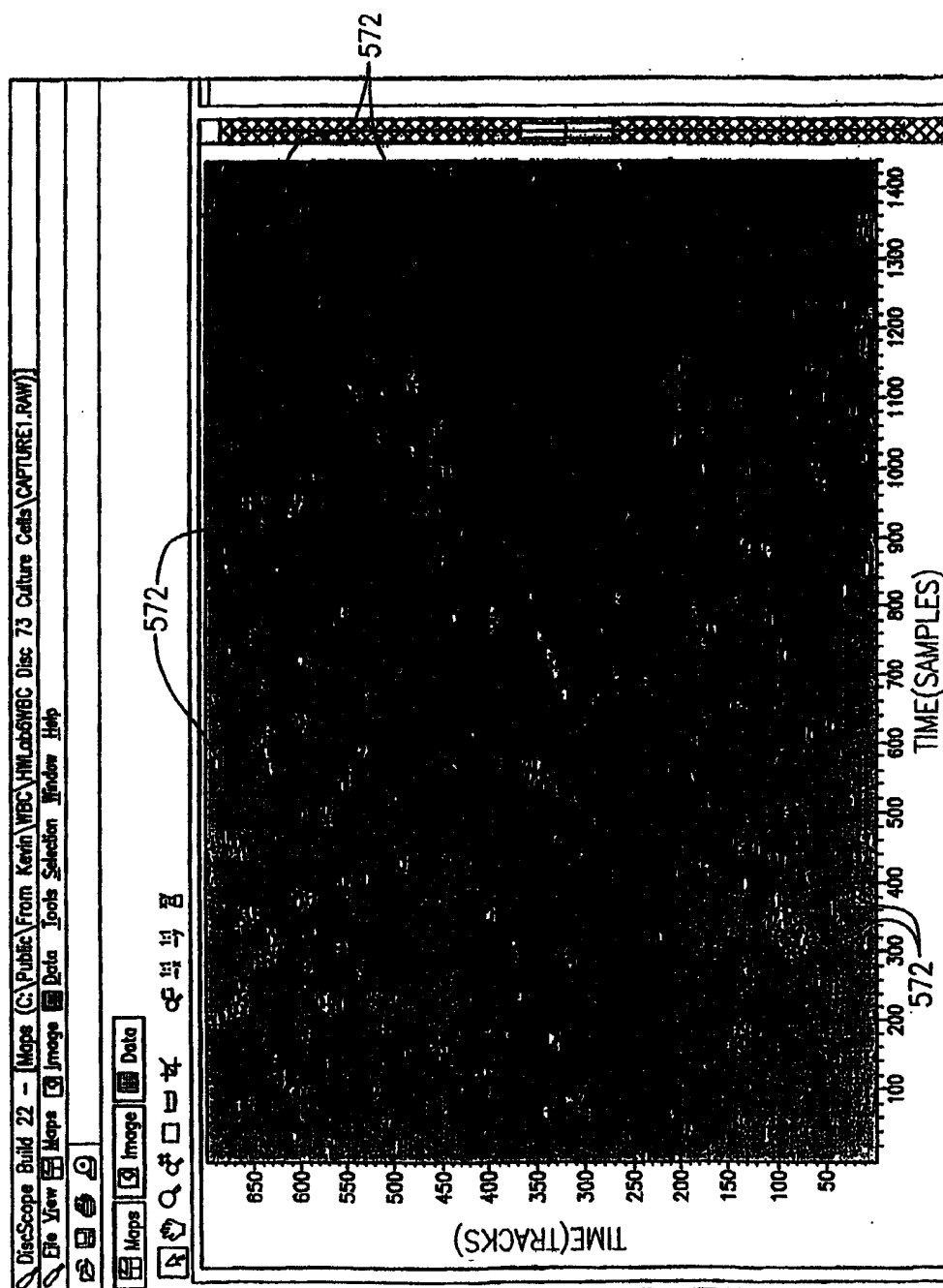


图 38

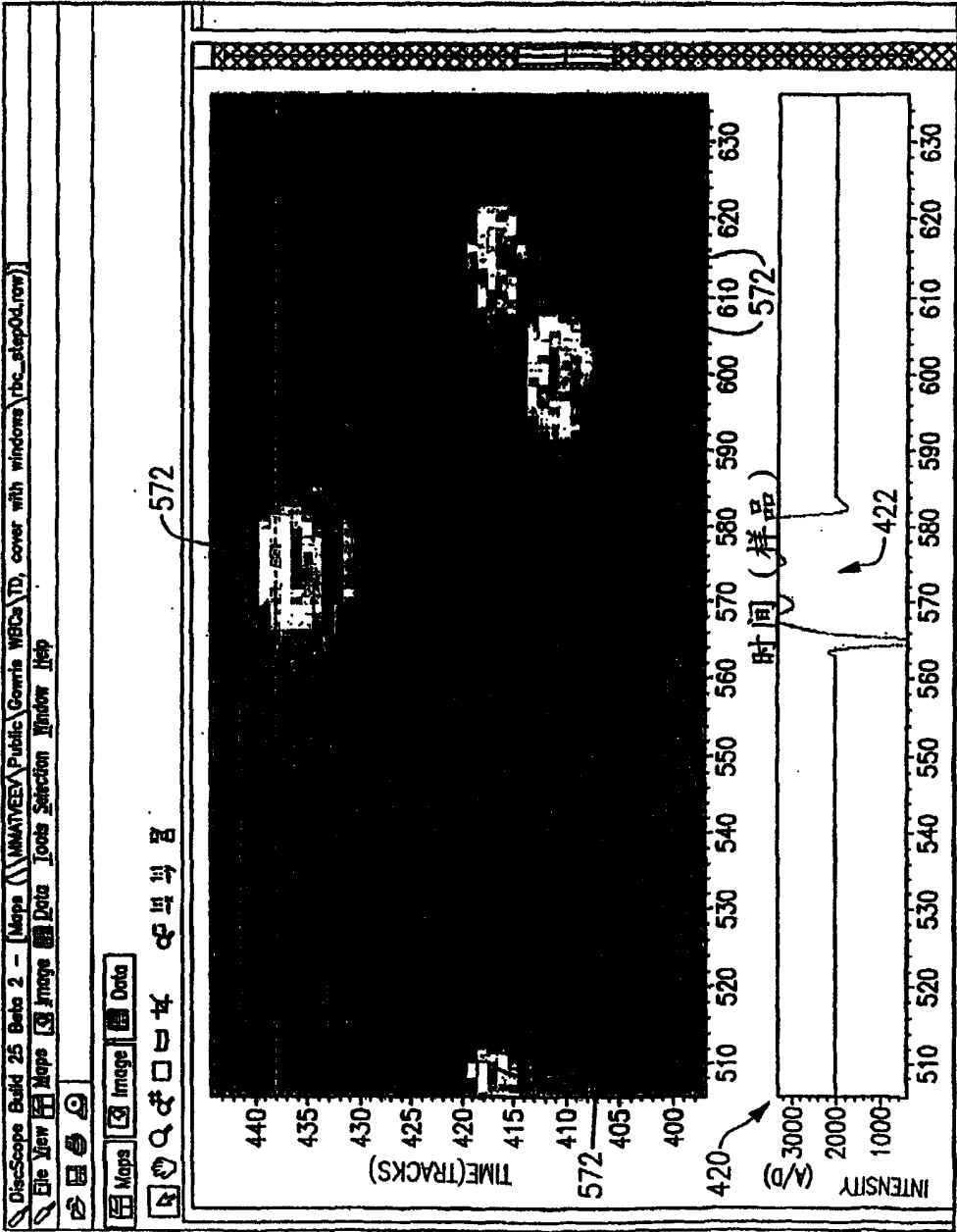


图 39

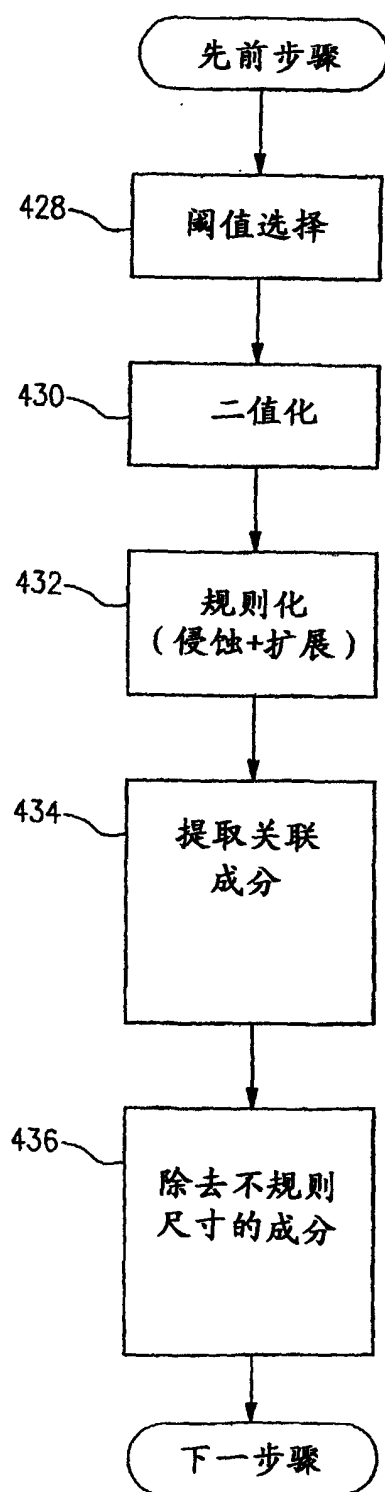


图 40

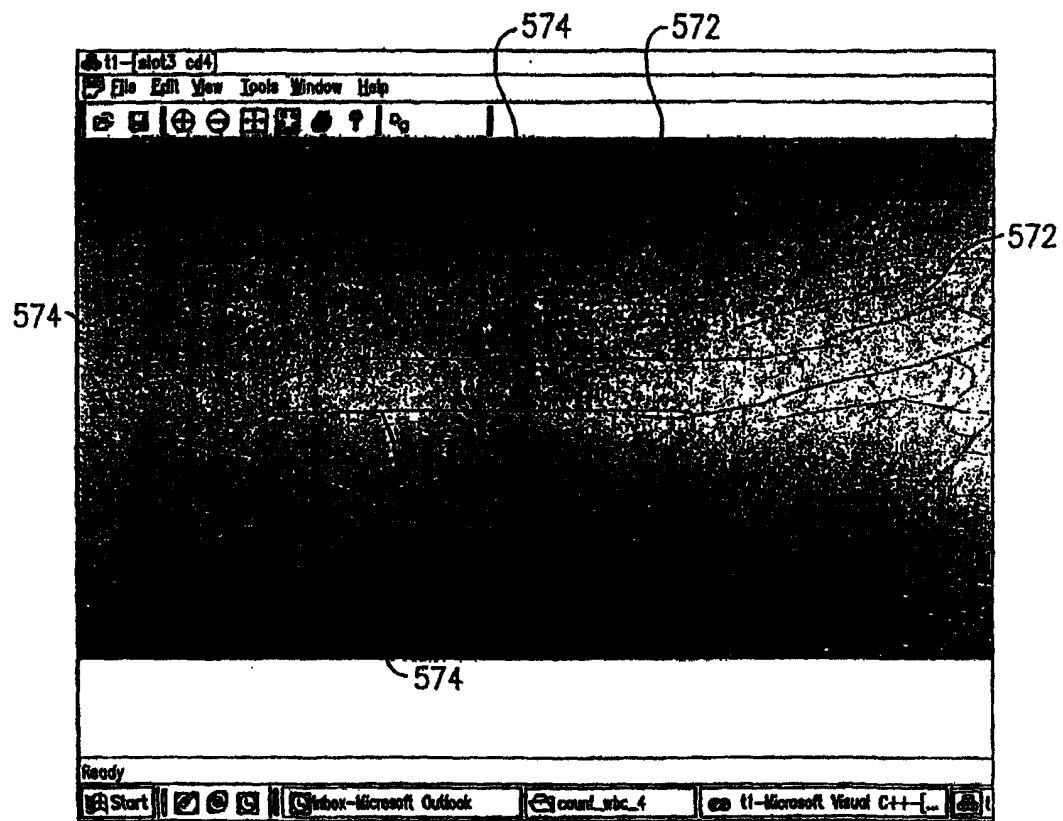


图 41

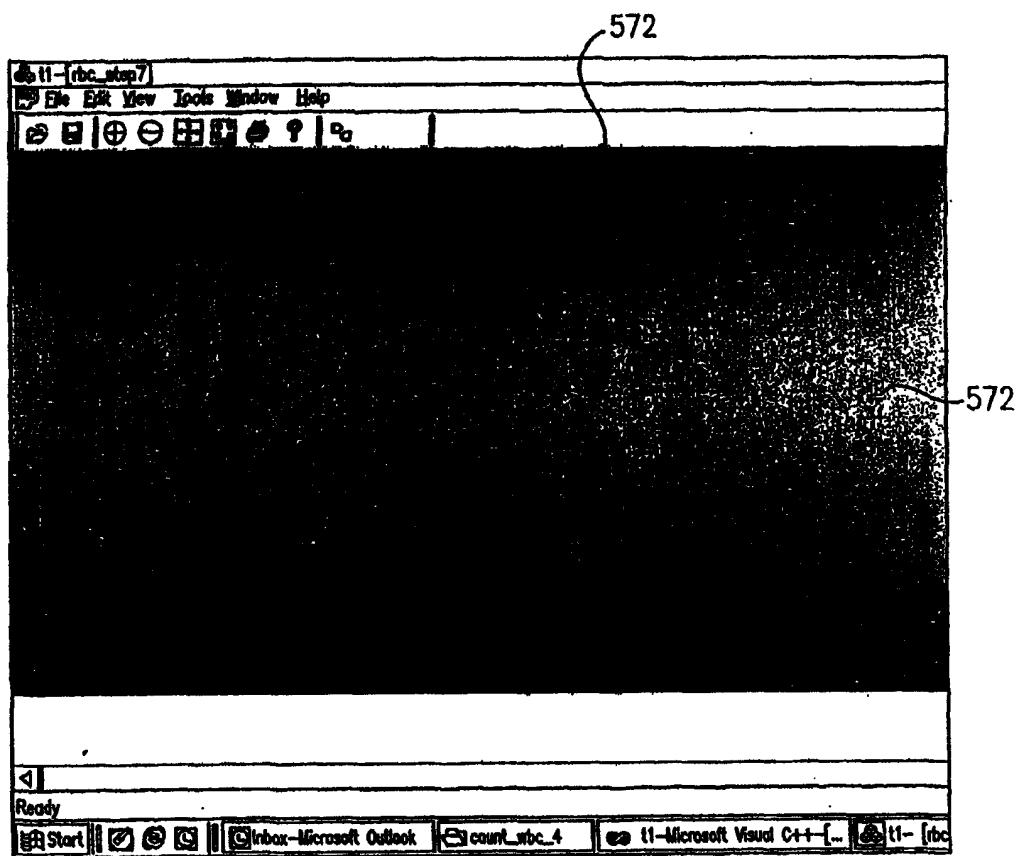


图 42

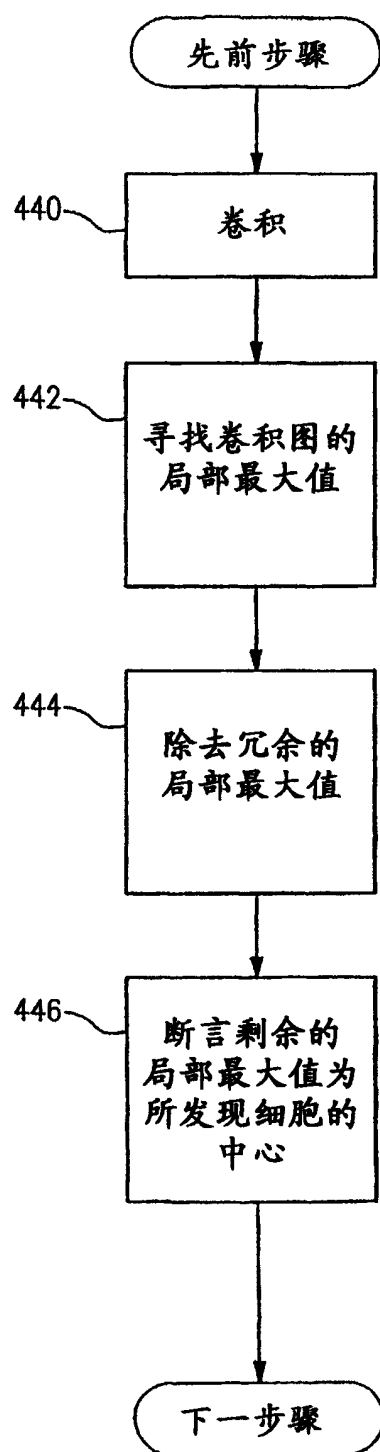


图43

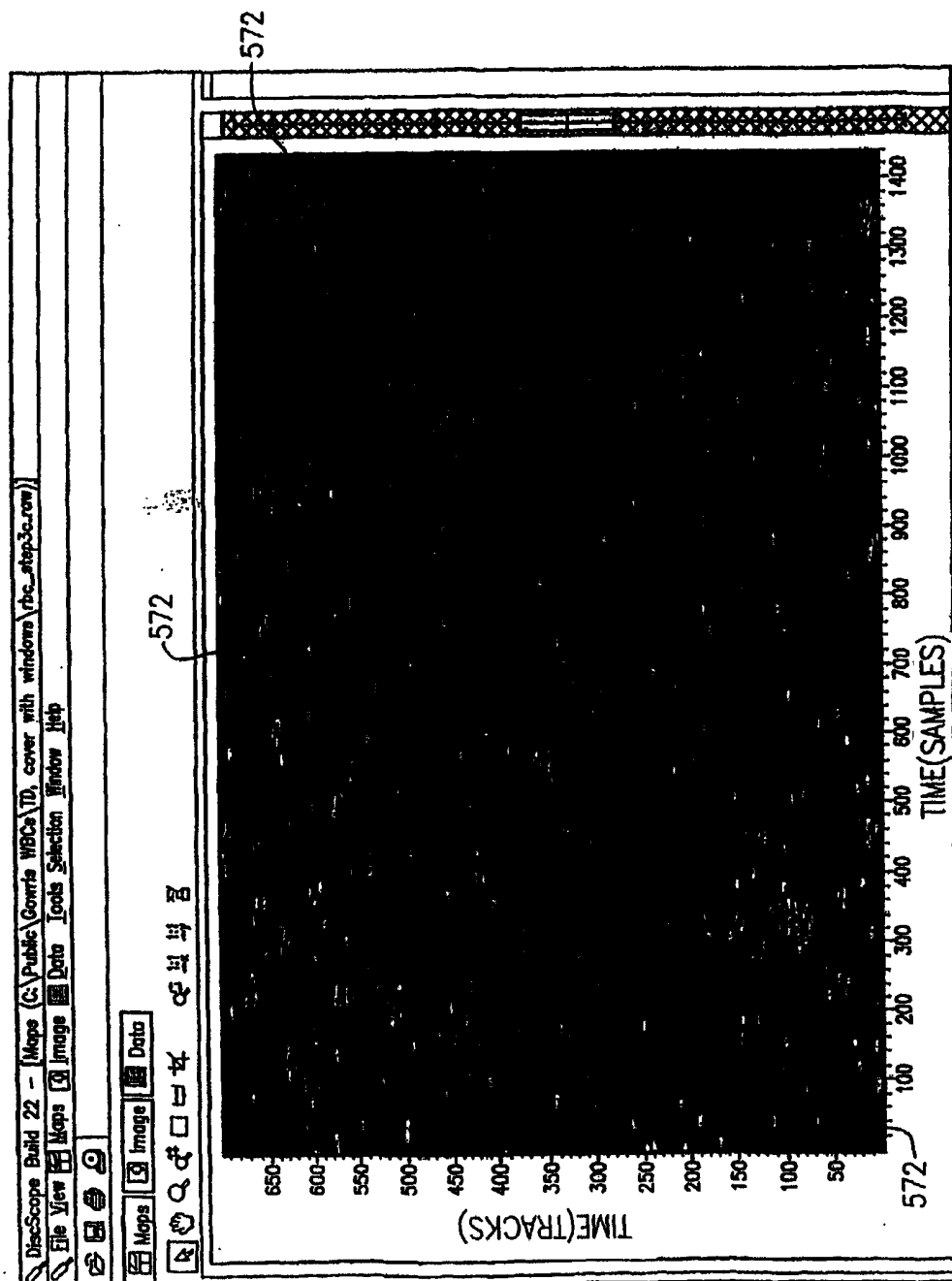


图 44

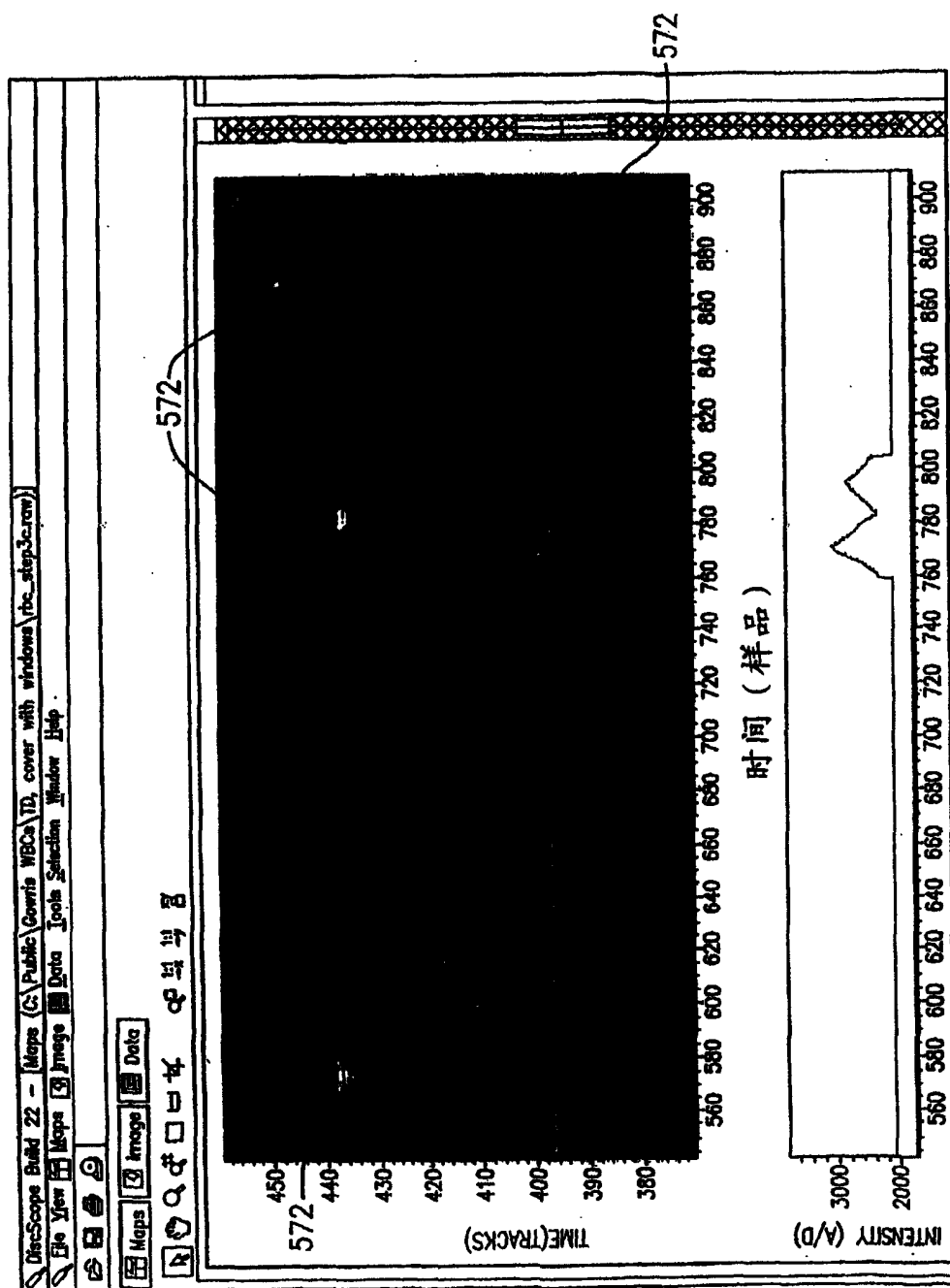


图 45

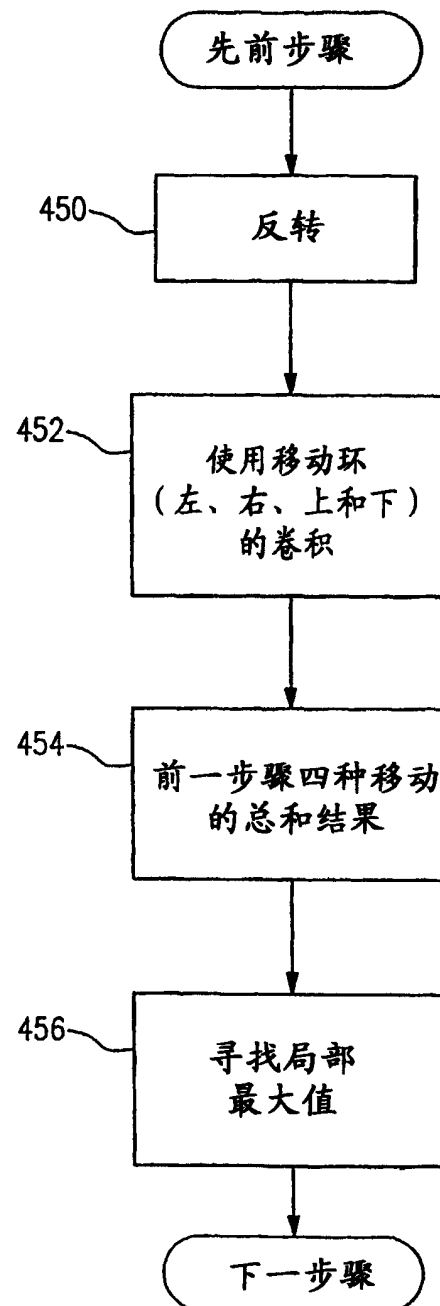


图 46A

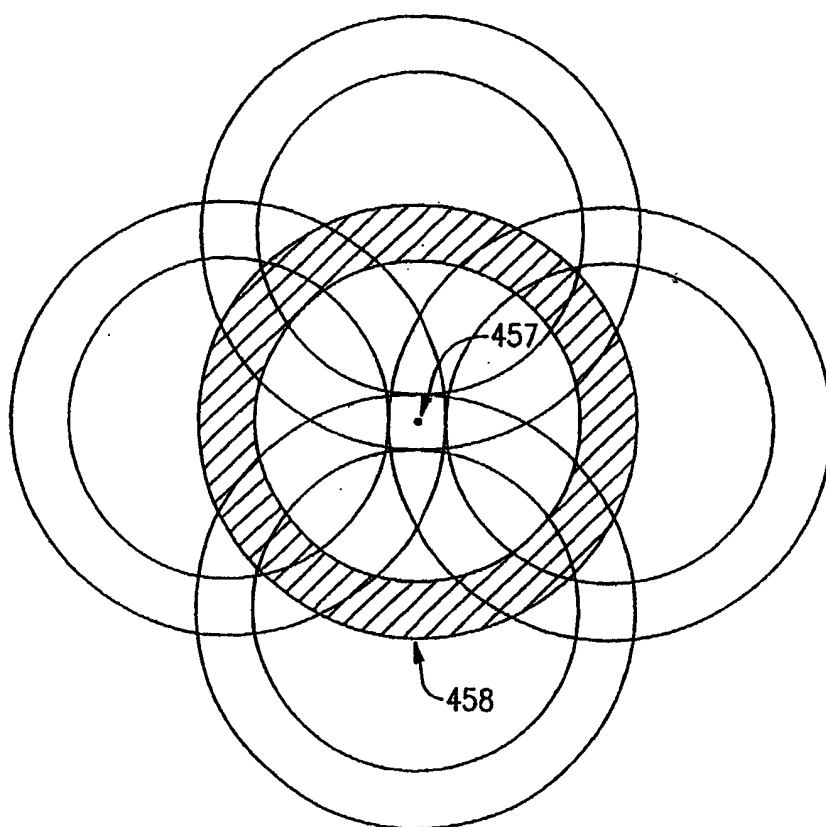


图 46B

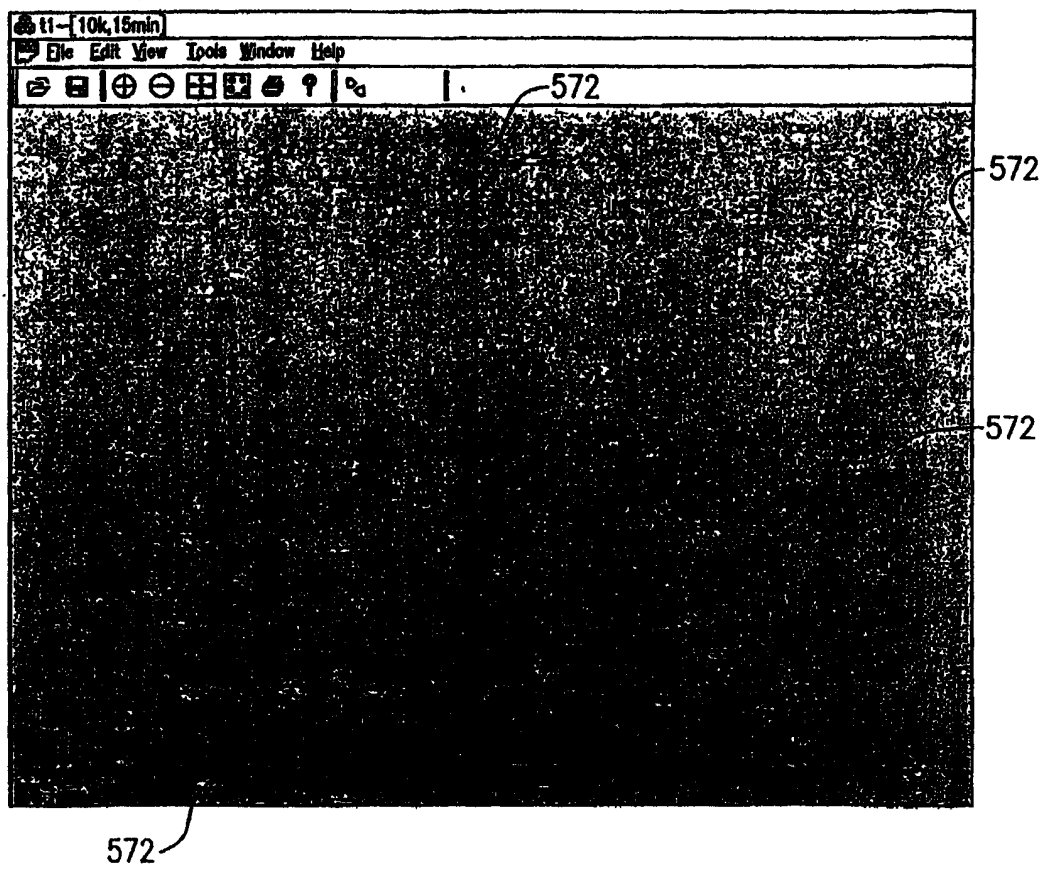


图 47

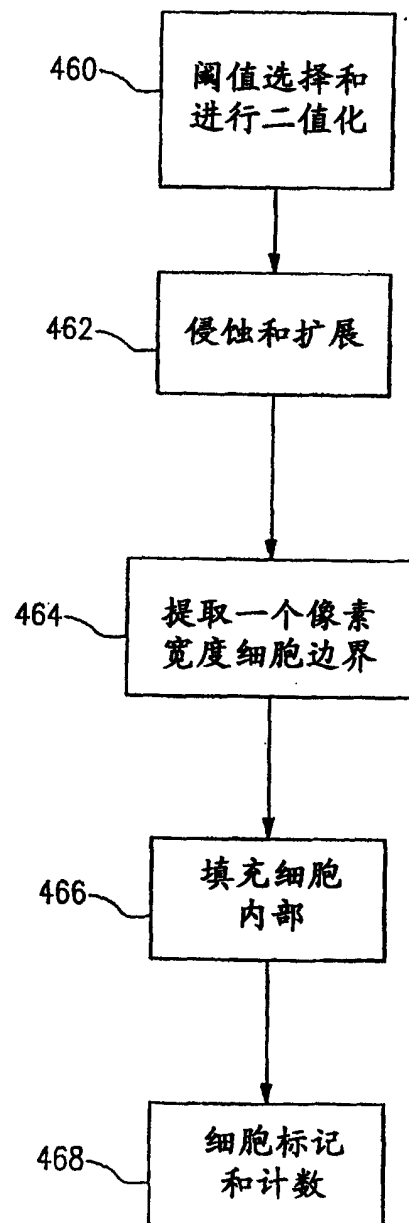


图 48

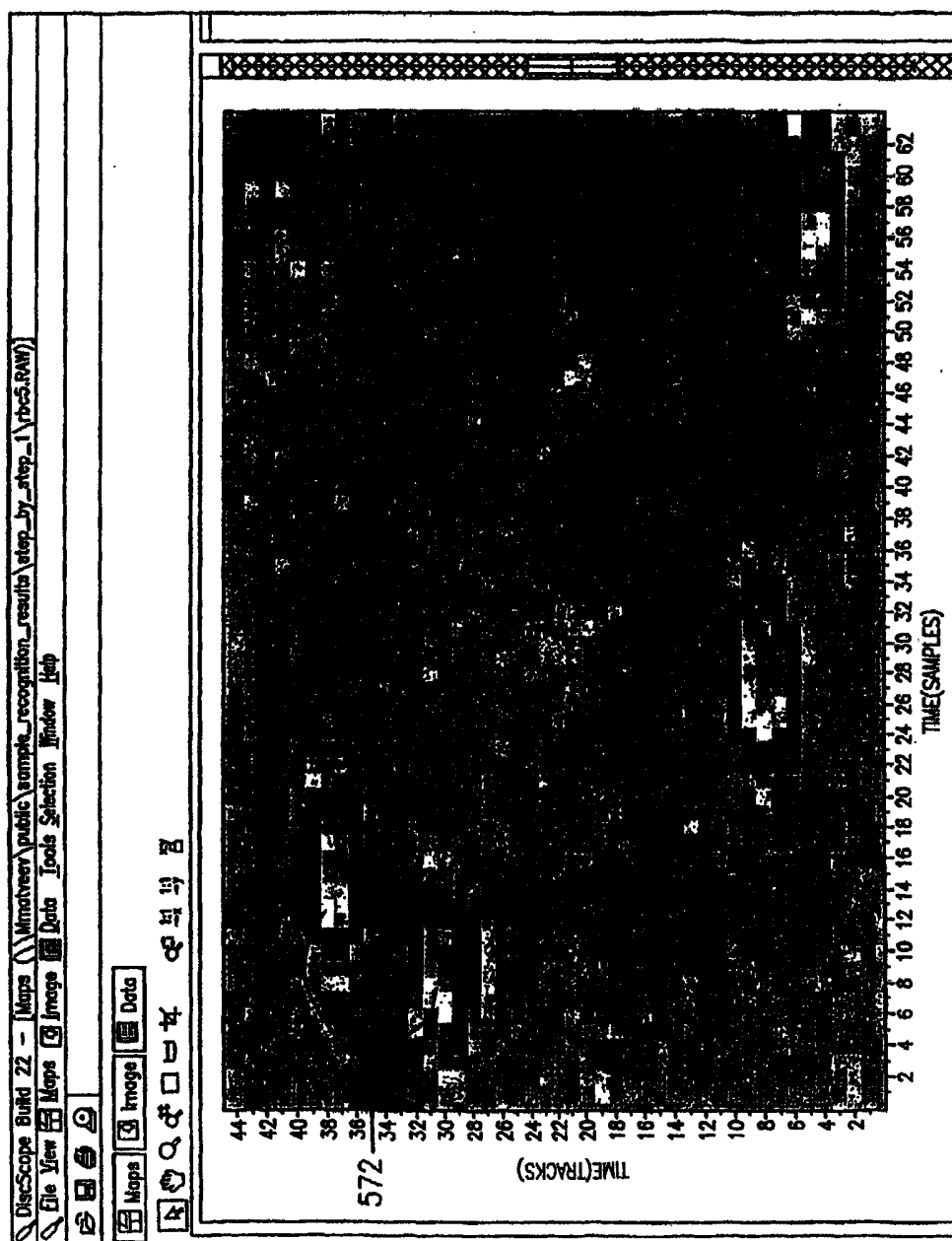


图 49

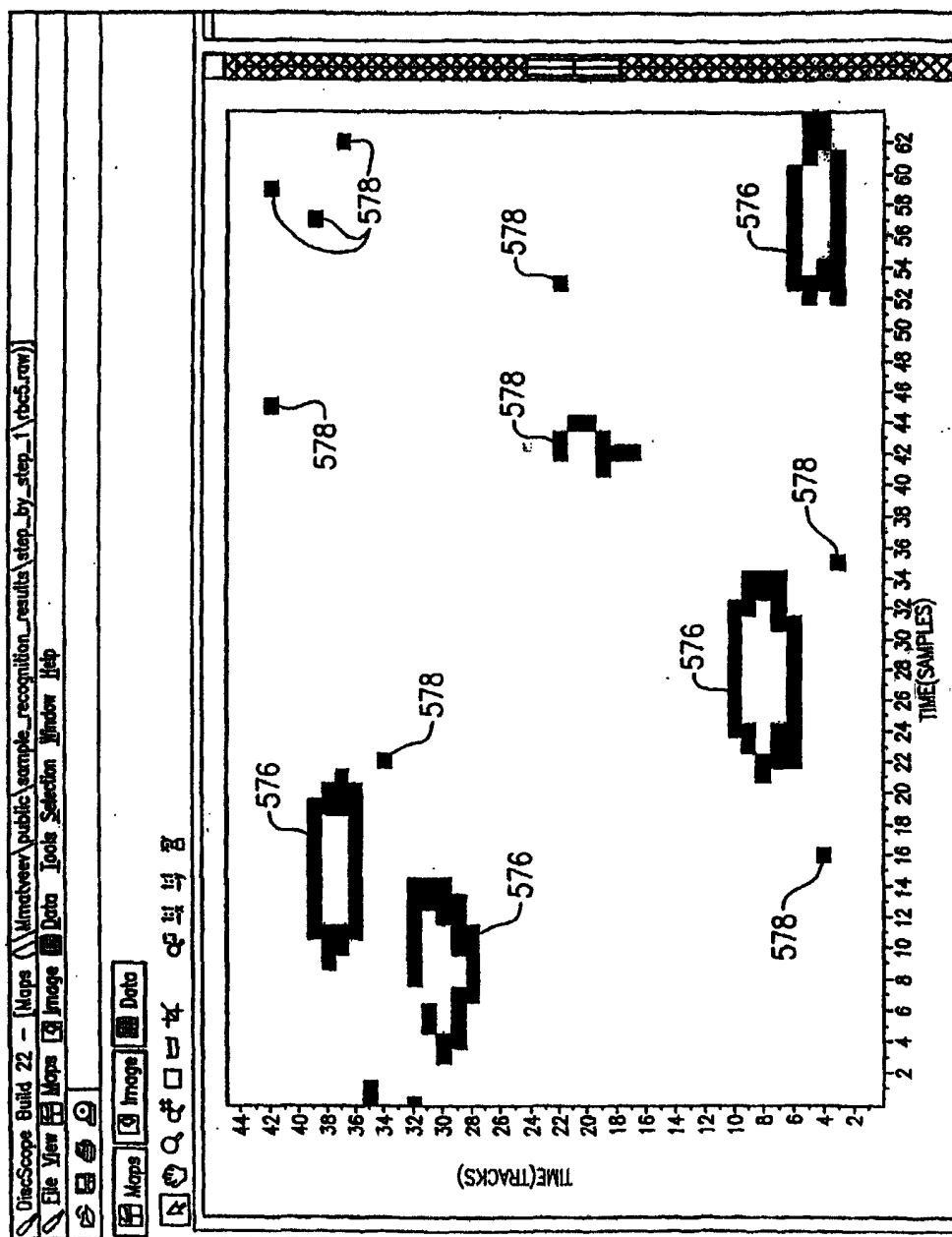


图 50

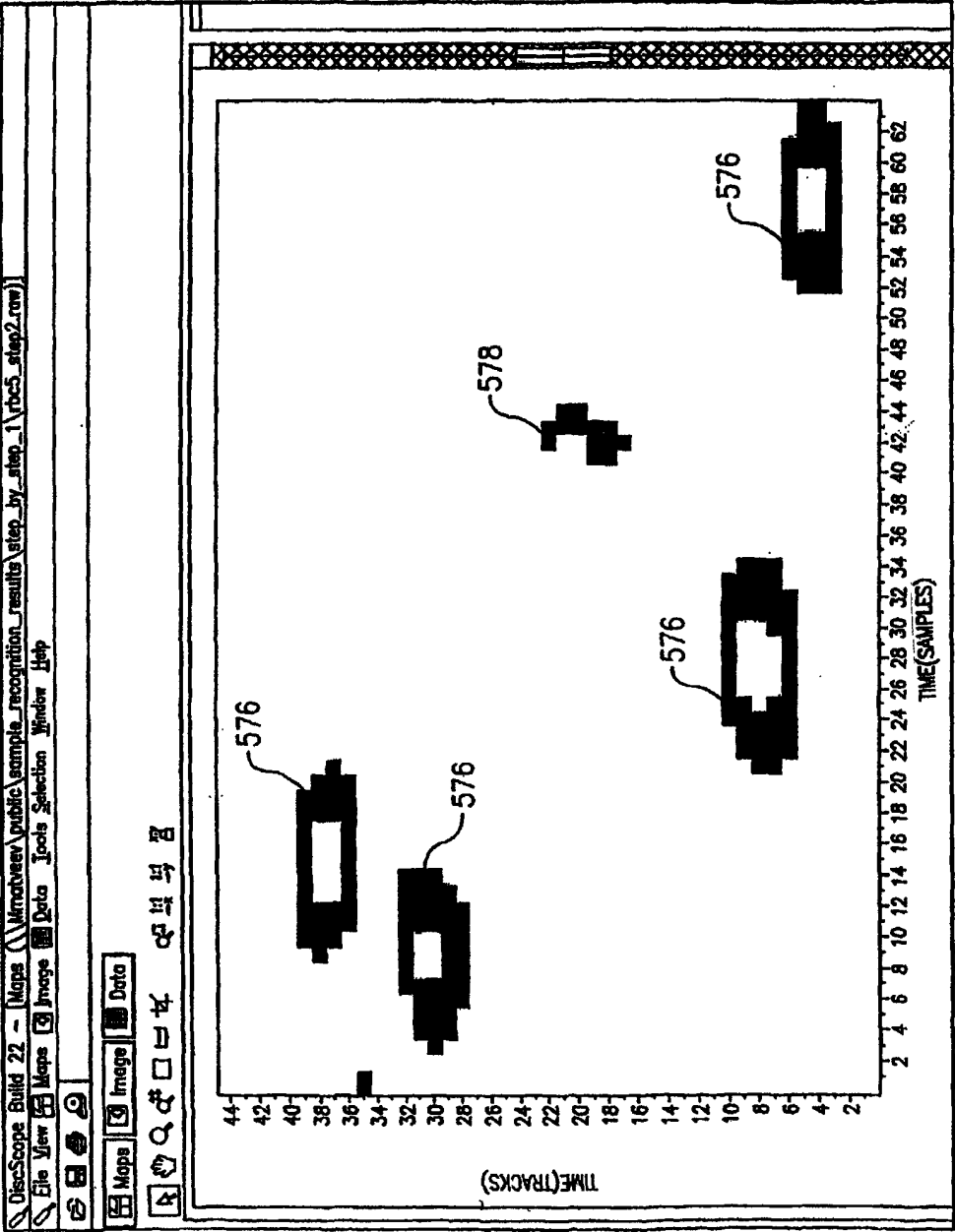


图 51

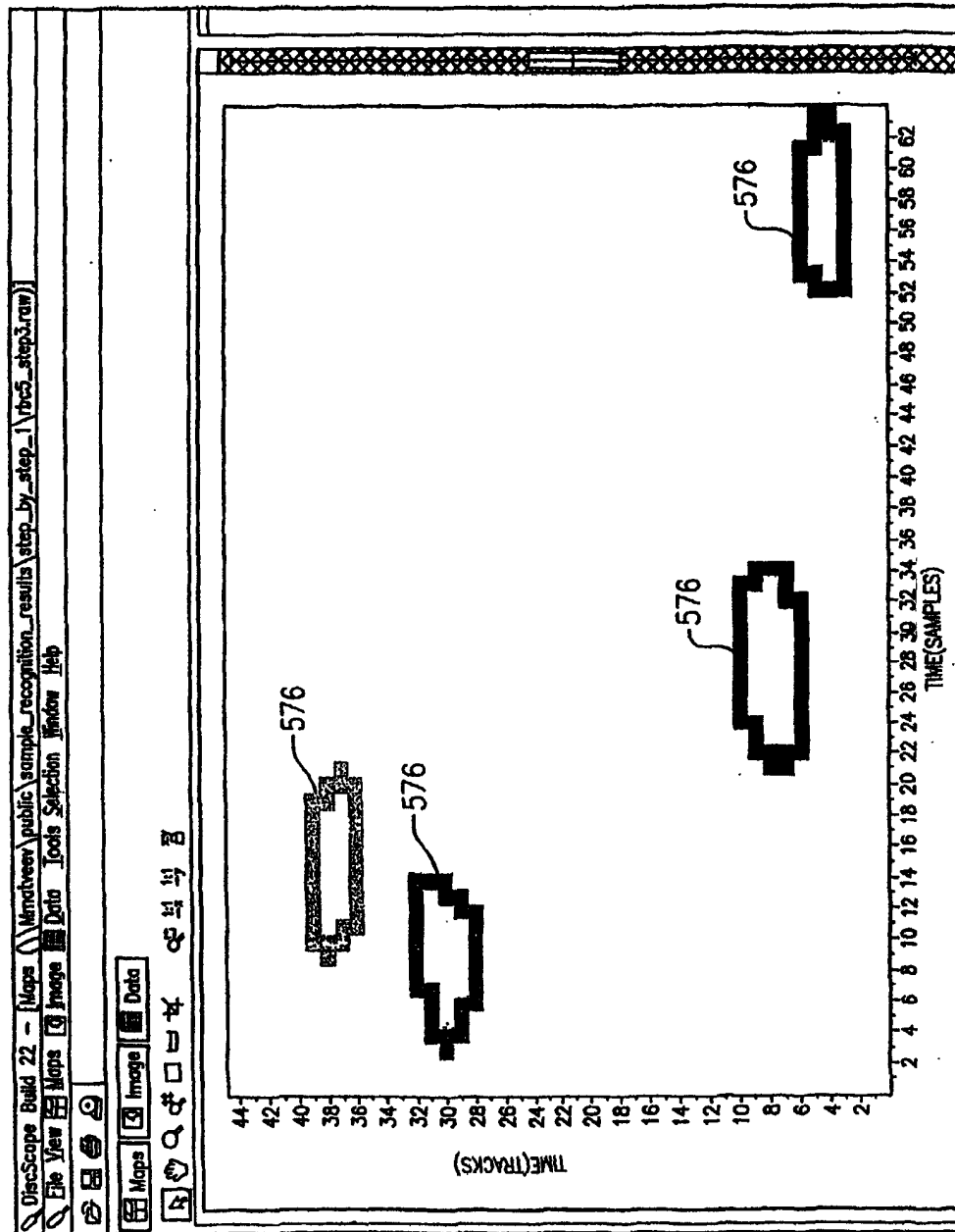


图 52

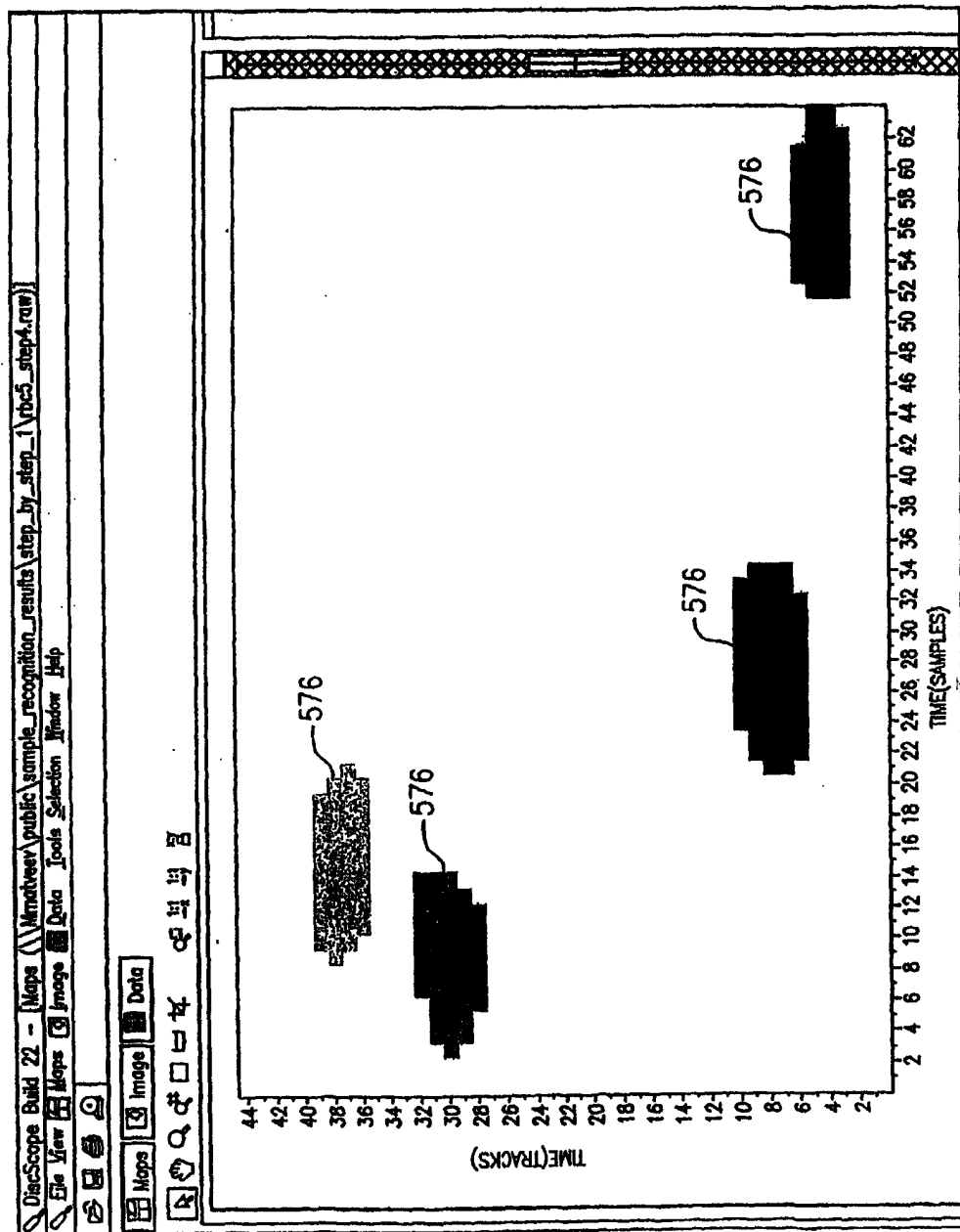


图 53

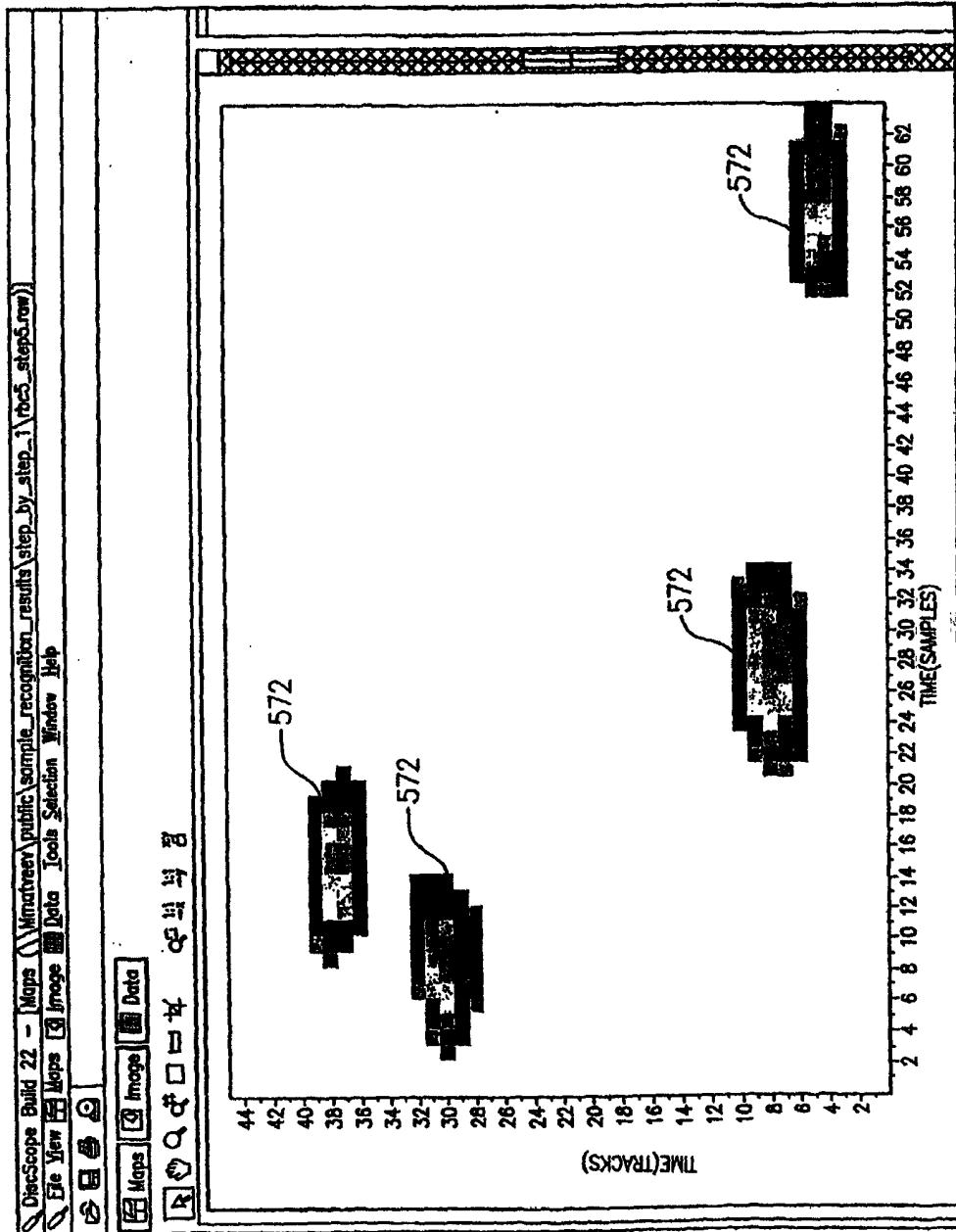


图 54

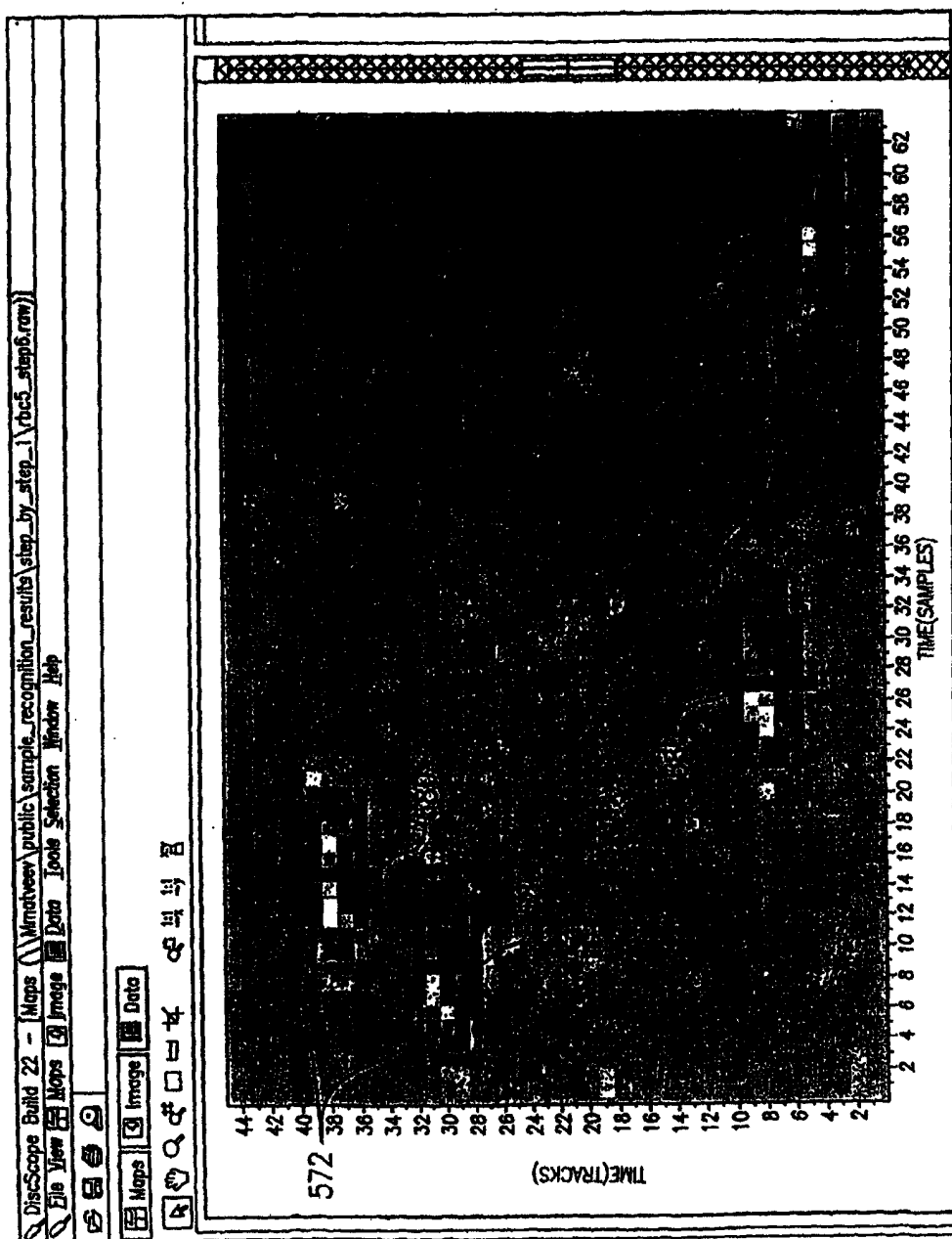


图 55

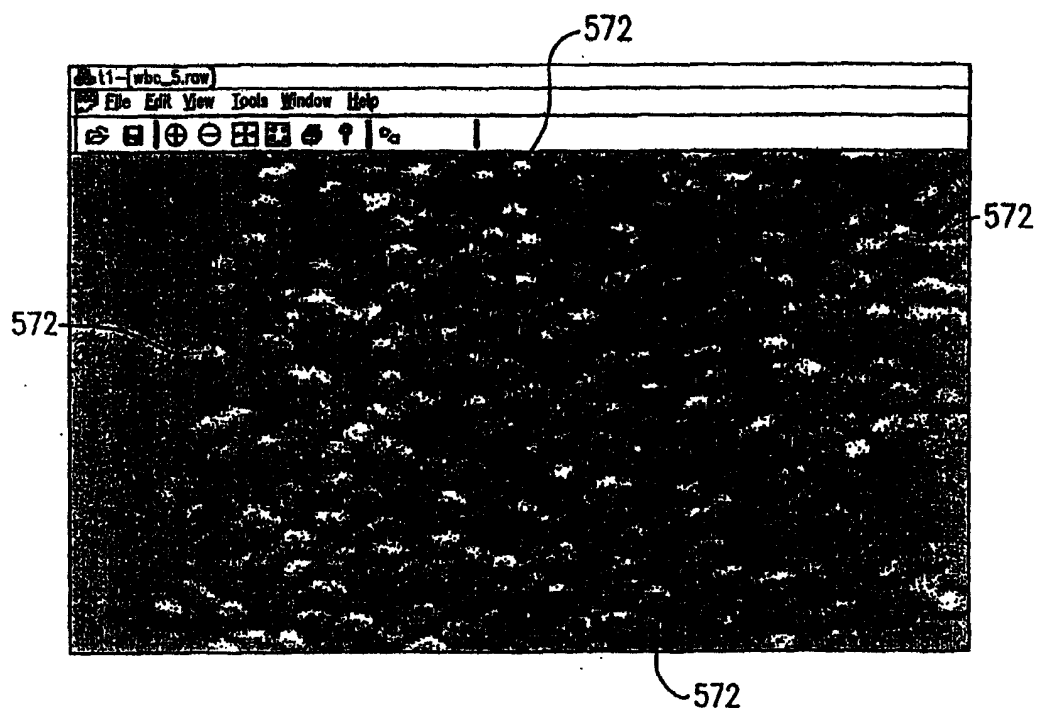


图 56A

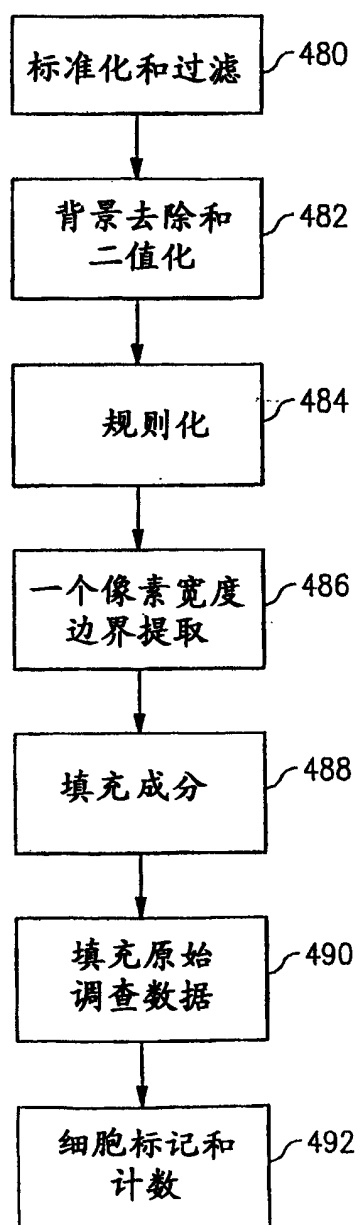


图 56B

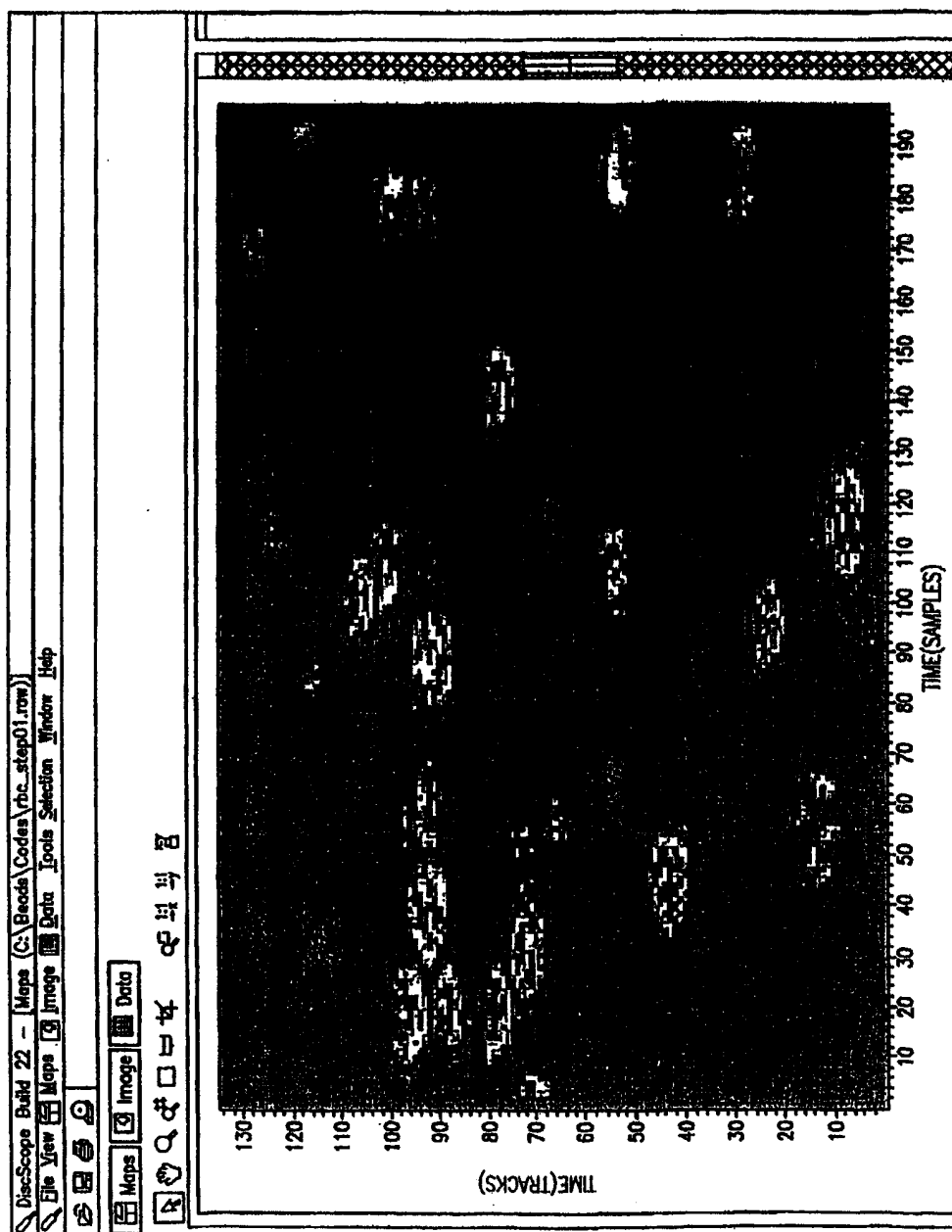


图 57

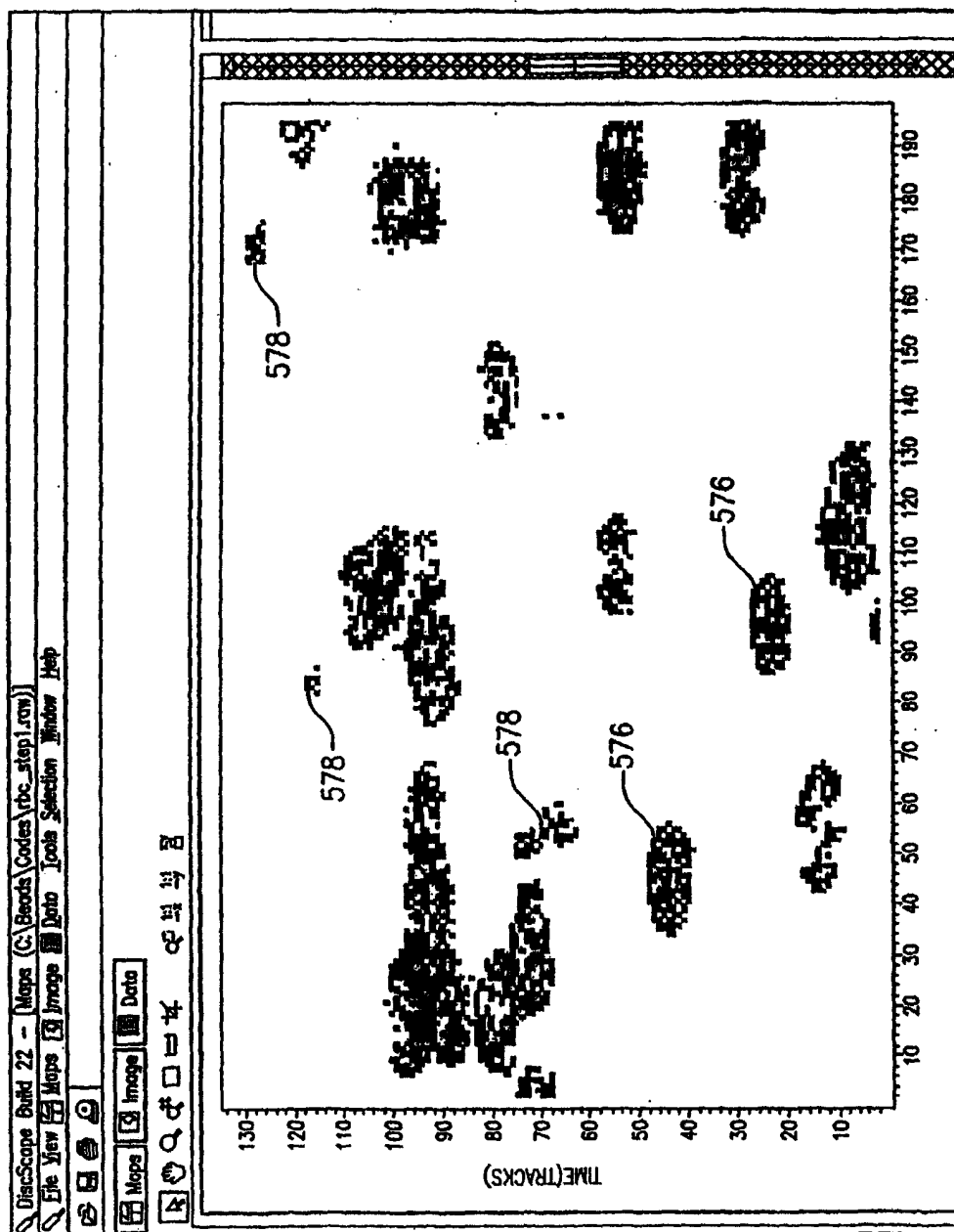


图 58

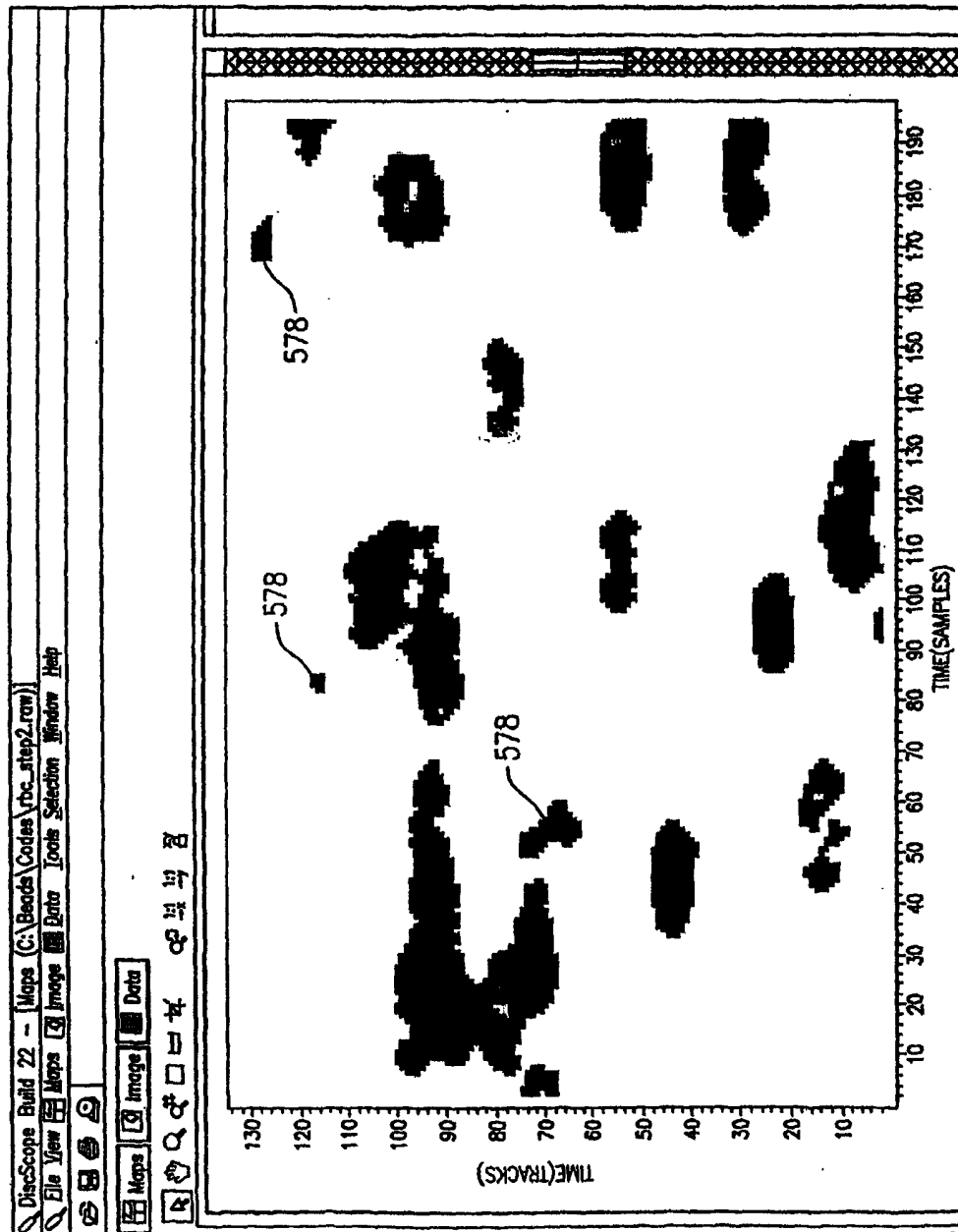


图 59

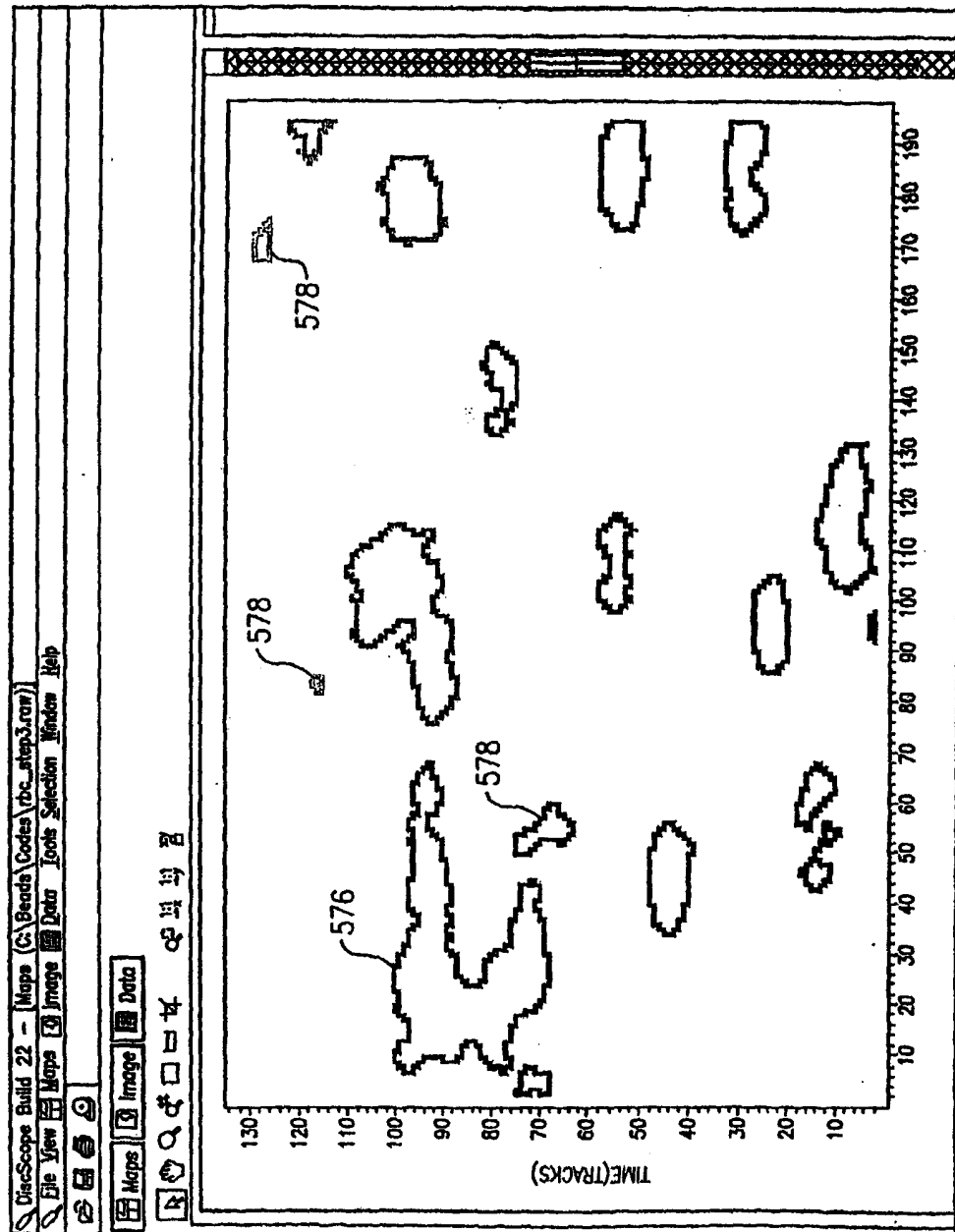


图 60

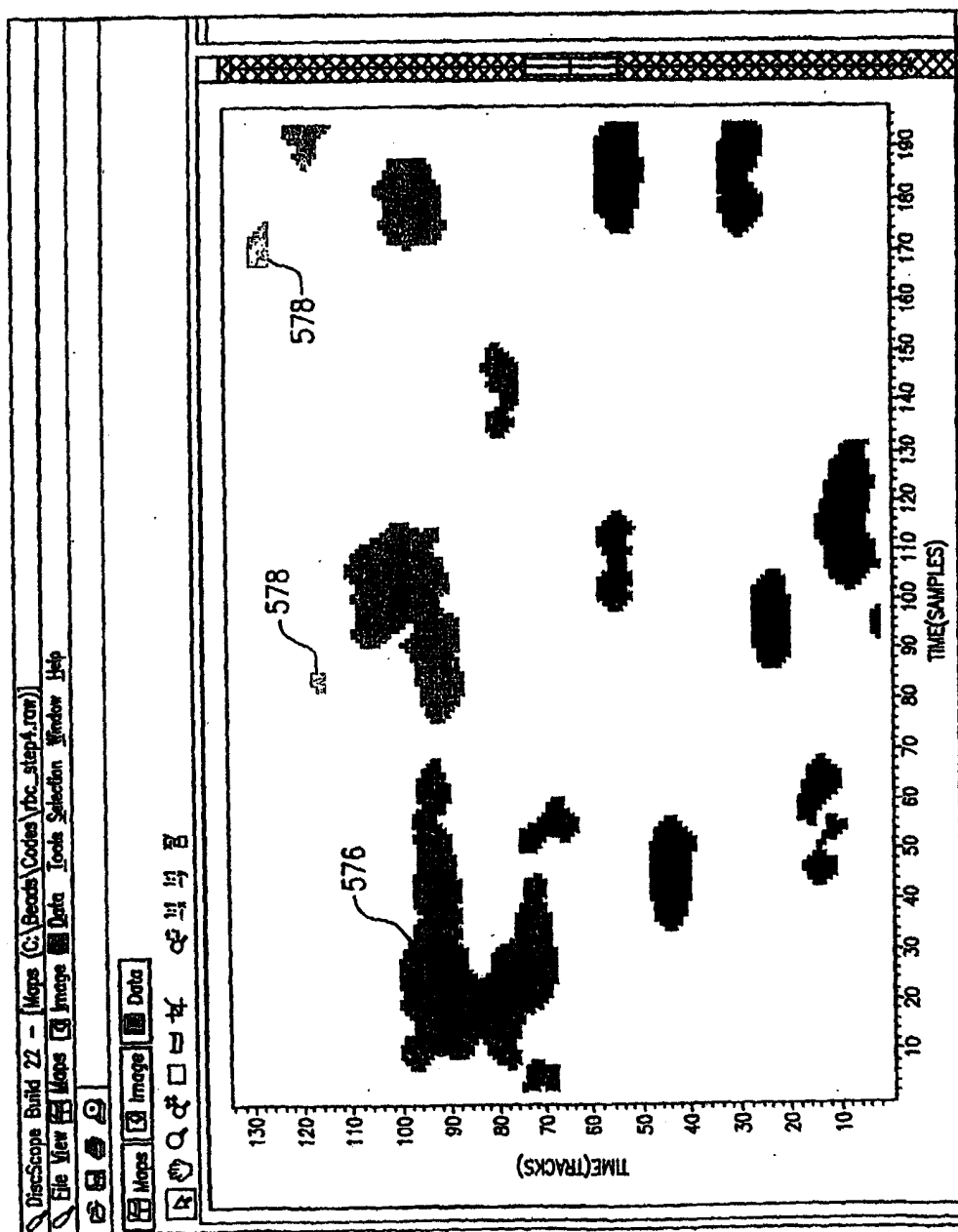


图 61

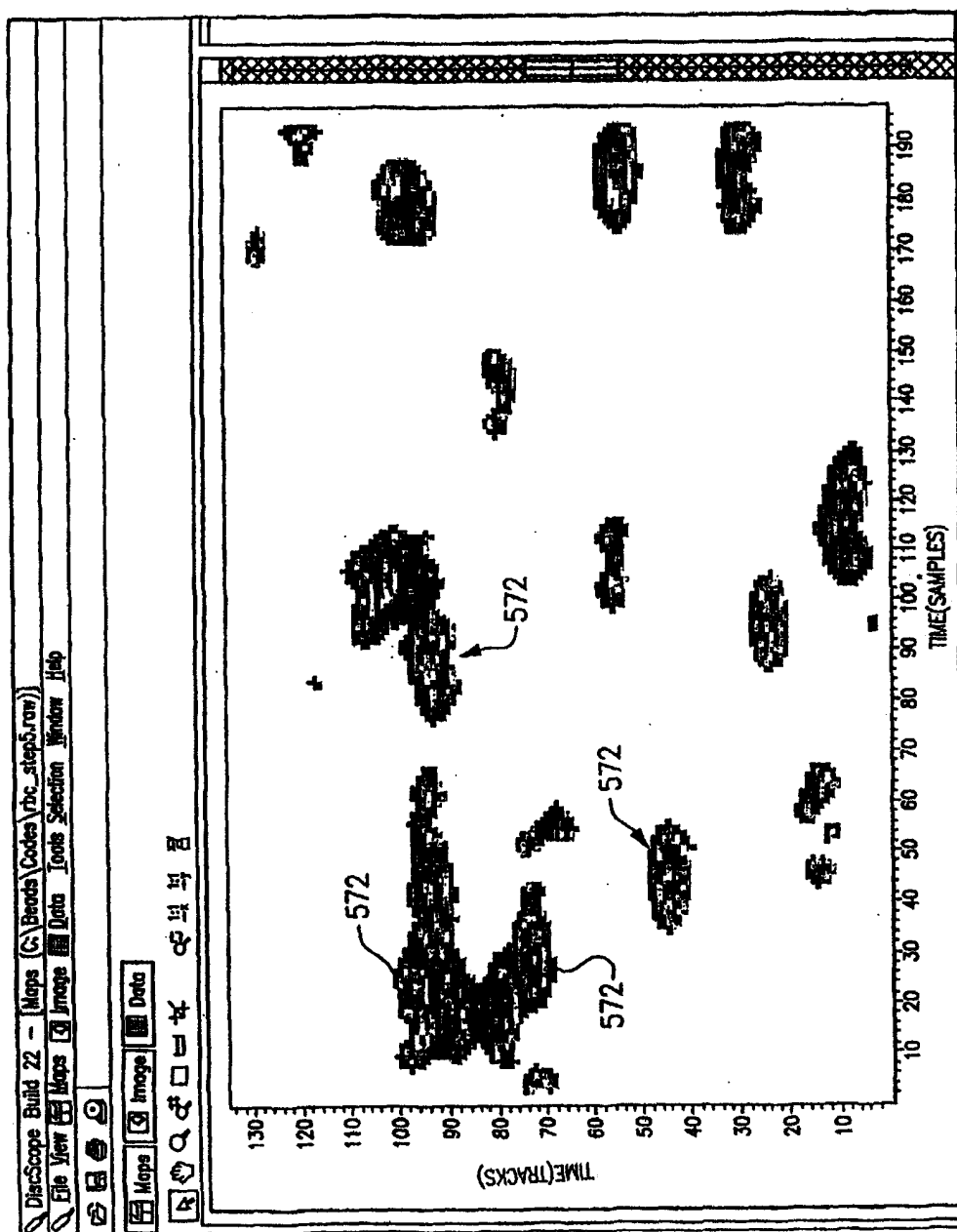


图 62

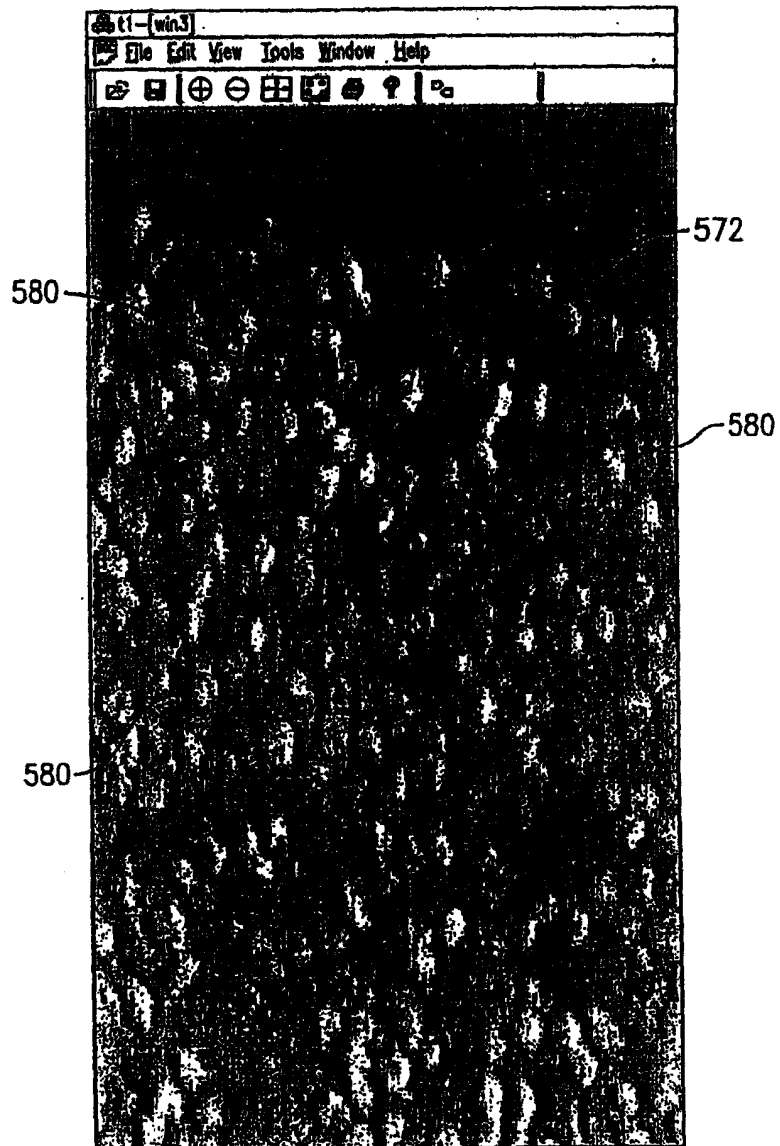


图 63

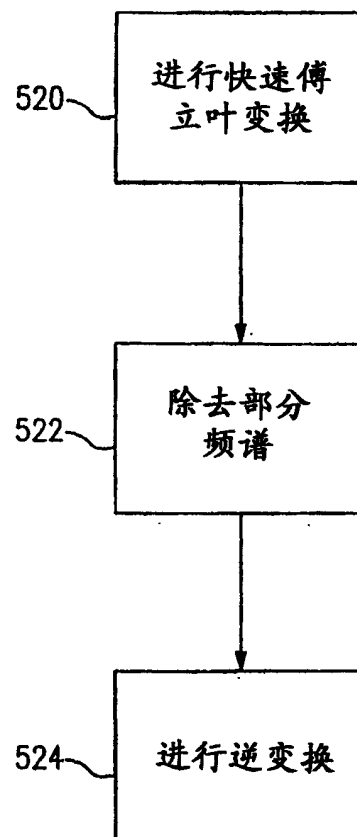


图 65

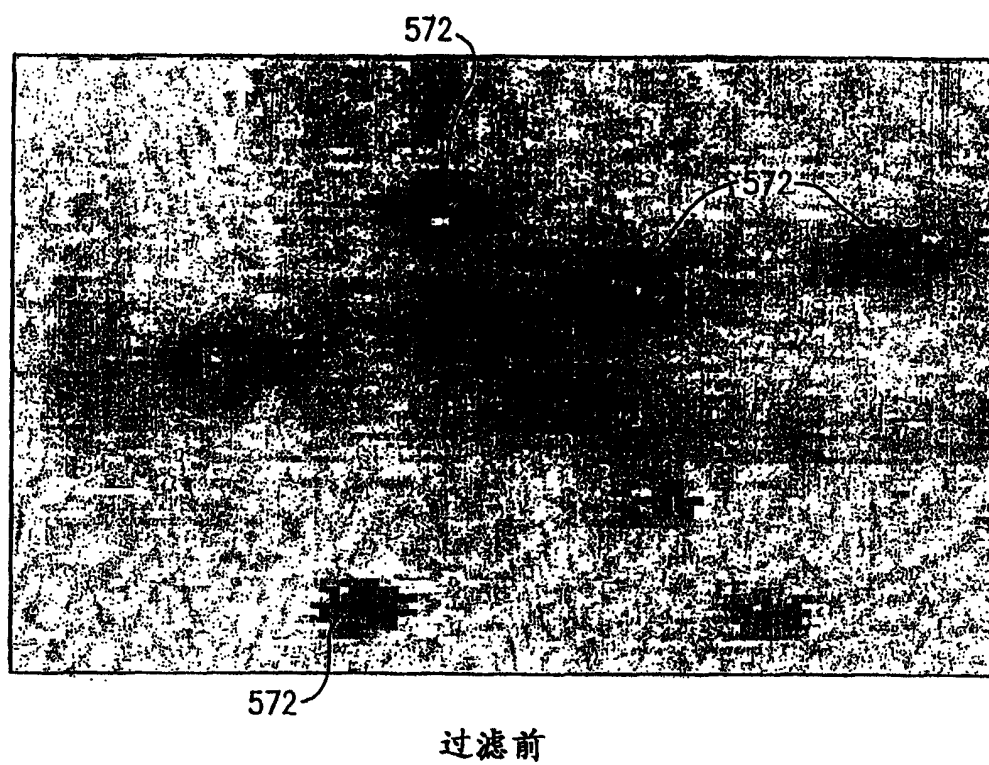


图 66



过滤后

图 67

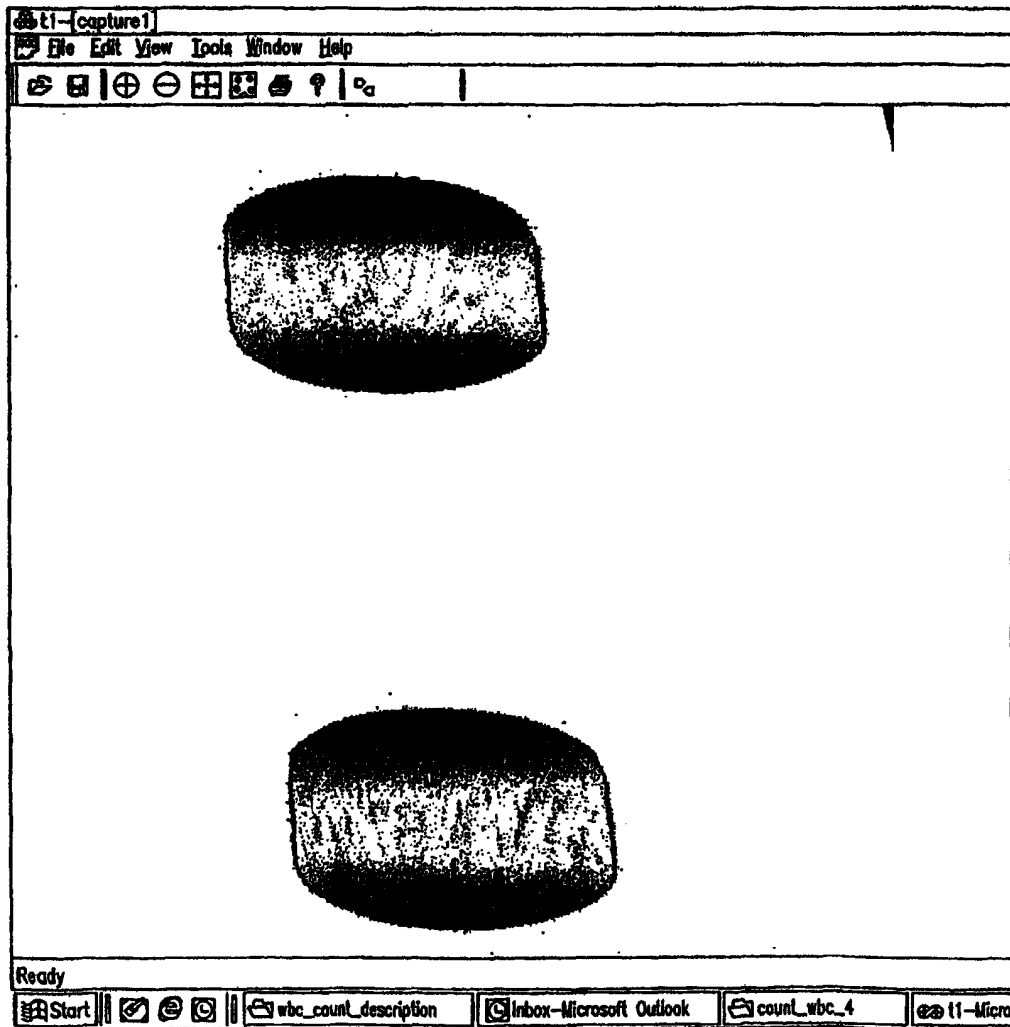


图 68

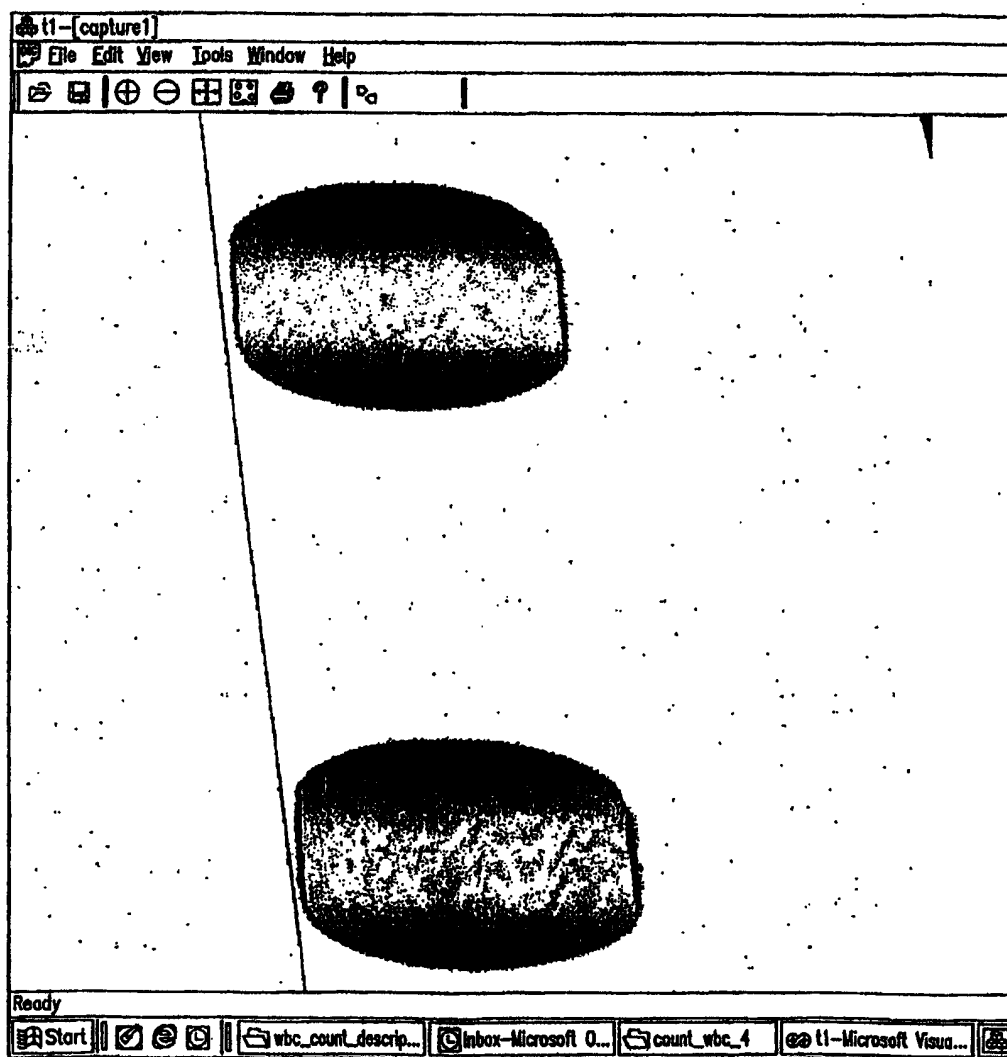


图 69

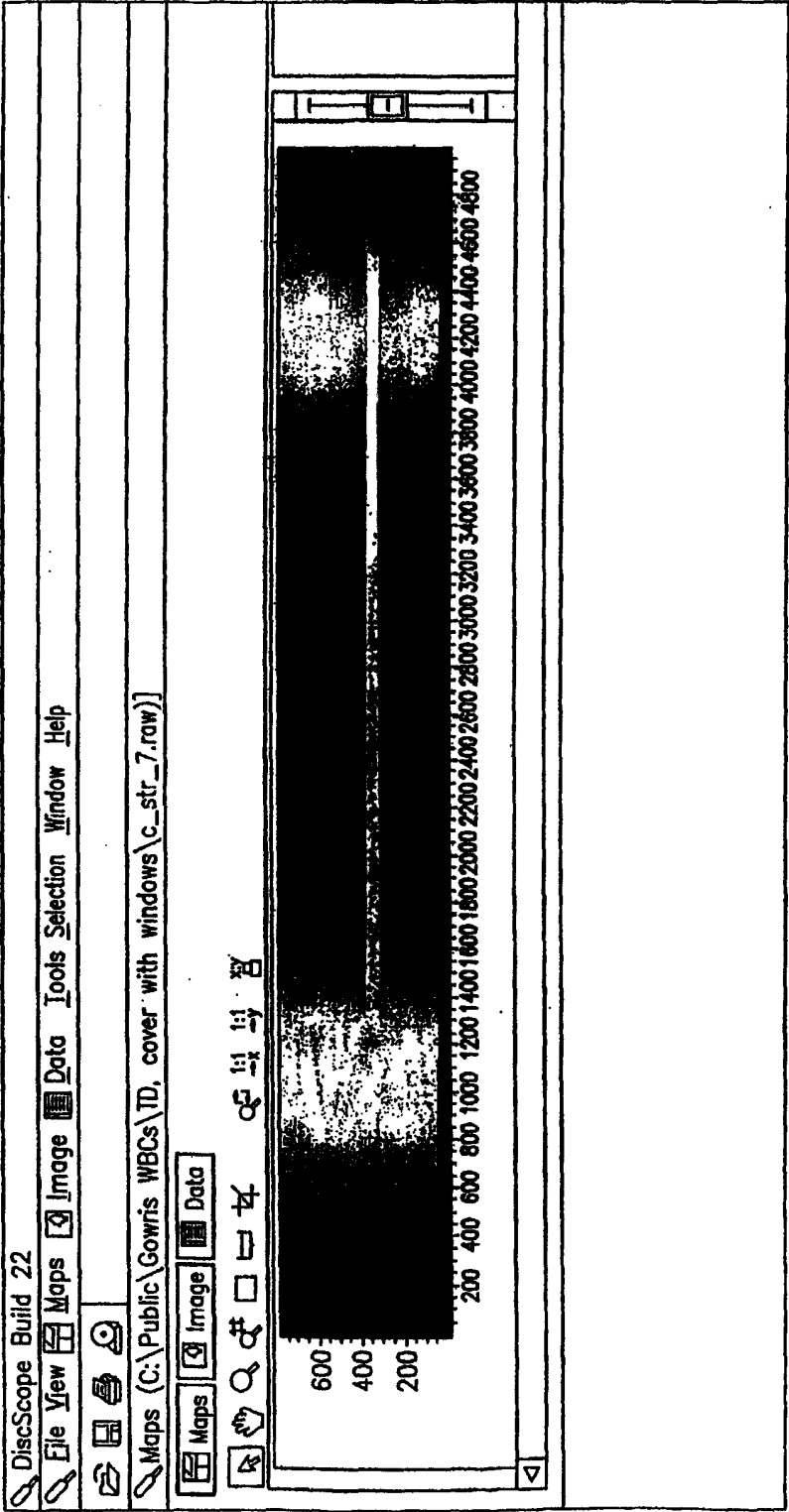


图70

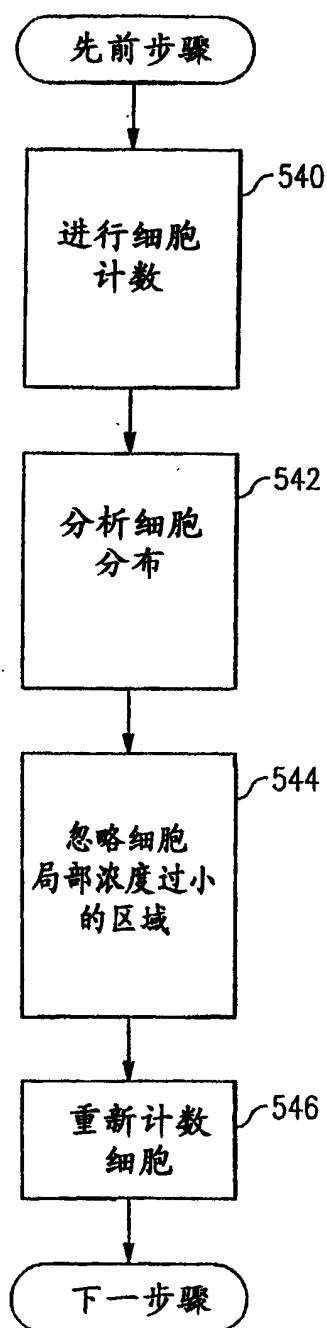


图 71A

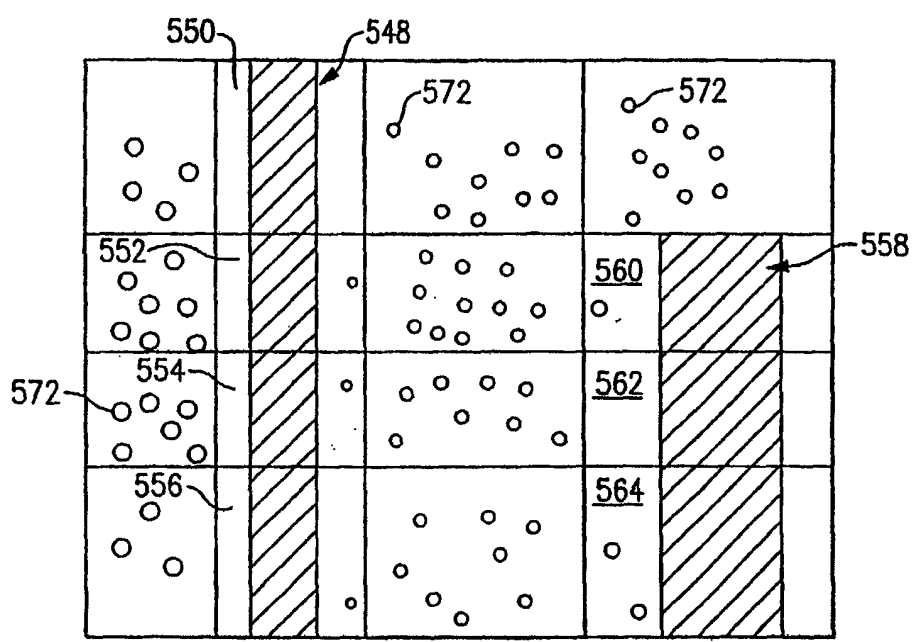
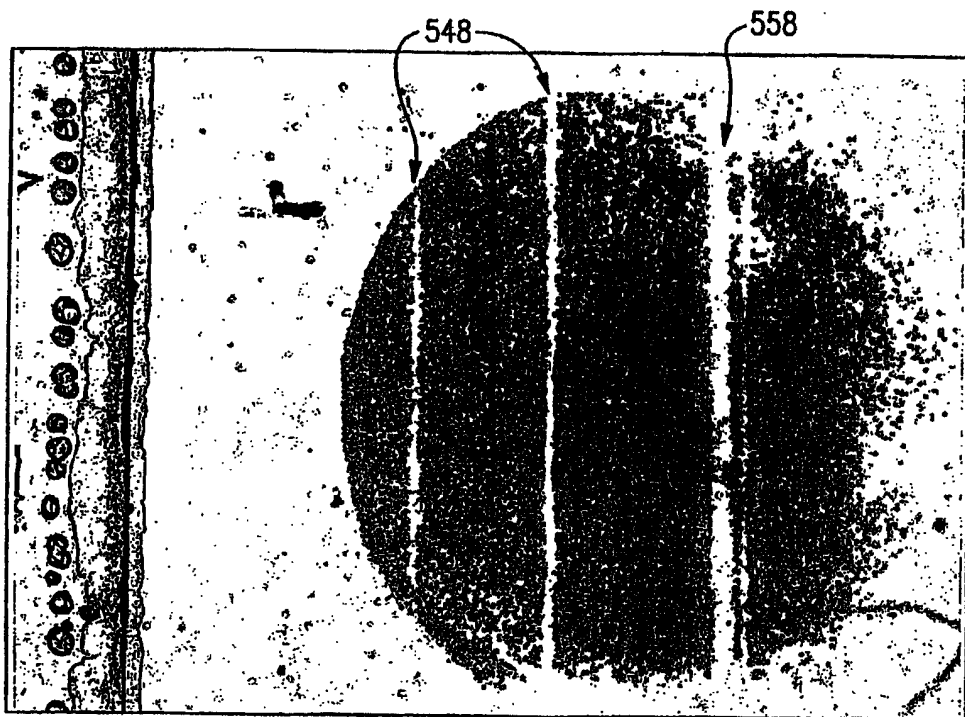
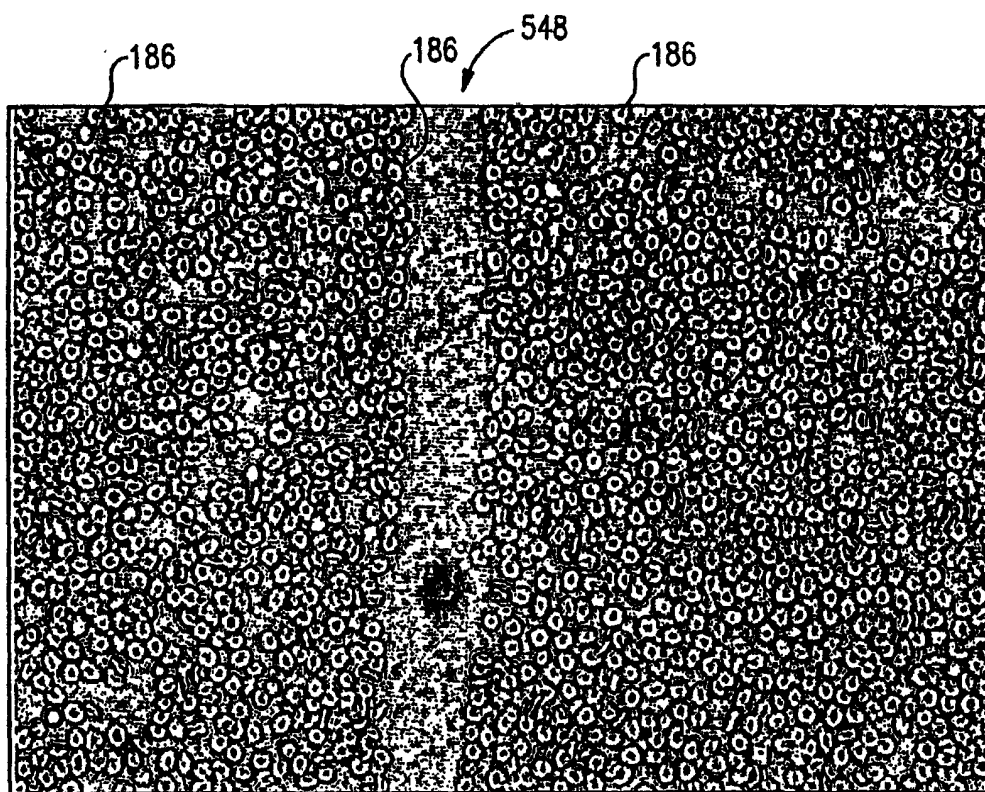


图 71B



3个痕迹 5X

图 71C



1个痕迹 40X

图 71D

