

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 028**

51 Int. Cl.:

G02B 21/24 (2006.01)

H04N 5/232 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2009 PCT/US2009/037839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2009 WO09117678**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009 E 09721793 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2260343**

54 Título: **Método y aparato para determinar una posición de enfoque de un dispositivo de representación de imágenes adaptado para representar por imágenes una muestra biológica**

30 Prioridad:
21.03.2008 US 38572

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2017

73 Titular/es:
**ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)
400 College Road East
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:
**WARDLAW, STEPHEN, C.;
LALPURIA, NITEN, V. y
UNFRICHT, DARRYN, W.**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 599 028 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para determinar una posición de enfoque de un dispositivo de representación de imágenes adaptado para representar por imágenes una muestra biológica

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente invención se refiere a la representación de imágenes de muestras biológicas en general, y al enfoque de la imagen de las muestras biológicas en particular.

2. Información sobre antecedentes

15 Los sistemas de microscopía automatizados que toman múltiples imágenes a lo largo de la superficie de una muestra biológica requieren, en general, que el sistema de representación de imágenes se reenfoque para cada campo representado por imágenes. El reenfoque es necesario debido a que la precisión necesaria de enfoque para tales sistemas, a ampliaciones útiles, puede ser tan poca como un micrómetro y es prácticamente imposible mantener las tolerancias mecánicas del soporte de muestra a estas dimensiones. Para representar por imágenes completamente incluso una pequeña muestra biológica en reposo que reside dentro de una cámara de análisis tal como la desvelada en la patente de Estados Unidos n.º 6.723.290, titulada "Container for Holding Biologic Fluid for Analysis", es necesario tomar más de un centenar de imágenes individuales, y para realizar esta operación en un tiempo razonable, es necesario reenfocar cada campo de imagen lo más rápidamente posible. El documento US 2002/0028158A describe un aparato para analizar fluidos biológicos.

25 Las técnicas de enfoque automático convencionales suelen usar las características de la imagen en sí misma para adquirir el enfoque adecuado, o pueden usar un dispositivo que es independiente del dispositivo de captura de imágenes, tal como un interferómetro o similar para medir y mantener una distancia determinada entre la lente objetivo y el sujeto. En el primer caso, normalmente es necesario tener varios ciclos de captura de imágenes con el dispositivo de captura de imágenes para calcular el mejor punto de enfoque. Este proceso de imágenes múltiples es tiempo que se consume y por lo tanto no deseable. En el segundo caso, el dispositivo independiente añade normalmente una complicación y un gasto considerable para el sistema de representación de imágenes. La presente invención, por el contrario, proporciona un medio barato de garantizar un enfoque rápido que es preciso consistentemente, uno que puede usarse en una variedad de configuraciones del sistema de representación de imágenes, y uno que se basa solo en el sistema de representación de imágenes en sí mismo.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un método para determinar una posición de enfoque de un dispositivo de representación de imágenes adaptado para representar imágenes de una muestra biológica, de acuerdo con la reivindicación 1.

45 Se describe también un método y aparato para enfocar un dispositivo de representación de imágenes, dispositivo de representación de imágenes que está adaptado para representar por imágenes una muestra biológica, muestra que tiene un índice de refracción.

50 Se describe un método para enfocar un dispositivo de representación de imágenes, que comprende las etapas de: 1) disponer unas lentillas dentro de un campo de una muestra biológica, lentillas que tienen una altura, y tienen un índice de refracción y el índice de refracción que es diferente del de la muestra; 2) en el que uno o ambos de entre el dispositivo de representación de imágenes y la muestra pueden localizarse relativamente por lo que una posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes puede moverse a lo largo de la altura de las lentillas; 3) representar por imágenes al menos una parte de la muestra que incluye una pluralidad de lentillas que usan la transmitancia en una o más longitudes de onda predeterminadas; 4) determinar una intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra en las longitudes de onda; 5) determinar una intensidad de transmitancia de luz promedio de una región de cada lentilla en las longitudes de onda; y 6) determinar la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes usando la intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra y la intensidad de transmitancia de luz promedio de la región de las lentillas.

60 Se describe un aparato para representar por imágenes una muestra biológica. El aparato incluye una cámara, una pluralidad de lentillas, un iluminador de campo, un disector de imágenes, un posicionador, y un analizador programable. La cámara está formada entre un primer panel y un segundo panel, paneles que son transparentes. La cámara es capaz de funcionar para mantener la muestra en reposo. La pluralidad de lentillas está dispuesta dentro de la cámara. Cada lentilla tiene una altura y un índice de refracción, índice de refracción que es diferente del de la muestra. El iluminador de campo puede funcionar para iluminar selectivamente al menos un campo de muestra. El disector de imágenes puede funcionar para reunir una imagen de la luz que pasa a través del campo de muestra y las lentillas en un formato de datos electrónico. El posicionador puede funcionar para cambiar selectivamente la

posición relativa de una o más de las cámaras que contienen las lentillas, el iluminador de campo, y el disector de imágenes para cambiar selectivamente una posición de enfoque del aparato a lo largo de la altura de las lentillas. El analizador programable está adaptado para funcionar junto con el iluminador de campo y el disector de imágenes para representar por imágenes al menos el campo de la muestra y una pluralidad de las lentillas que usan la transmitancia en una o más longitudes de onda predeterminadas. El analizador está adaptado además para: 1) determinar una intensidad de transmitancia de luz representativa del campo de muestra en las longitudes de onda; 2) determinar una intensidad de transmitancia de luz representativa de al menos una región de las lentillas en las longitudes de onda; y 3) determinar la posición de enfoque del aparato que usa la intensidad de transmitancia de luz representativa del campo de muestra y la intensidad de transmitancia de luz representativa de la región de las lentillas.

La presente invención presenta numerosas ventajas sobre la tecnología de representación de imágenes y análisis de muestras biológicas disponibles actualmente. Por ejemplo, la presente invención proporciona un medio barato de garantizar un enfoque rápido de una muestra biológica que es preciso consistentemente, uno que puede usarse en una variedad de configuraciones del sistema de representación de imágenes, y uno que se basa solo en el sistema de representación de imágenes en sí mismo. La presente invención también puede determinar, normalmente a partir de una sola imagen, si el sistema de representación de imágenes está o no en exposición perfecta, y si no, la presente invención puede determinar a menudo la cantidad exacta de movimiento necesario para llevar la imagen de la muestra a un enfoque perfecto. La presente invención también proporciona un método y un aparato de representación de imágenes que es insensible a la intensidad de luz de exposición real o de imagen, y por lo tanto proporciona un método y aparato más robustos.

El presente método y las ventajas asociadas con el mismo se harán más fácilmente evidentes a la vista de la descripción detallada proporcionada a continuación, incluyendo los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos:

La figura 1 es un esquema en diagrama de un dispositivo de análisis que puede usarse con el presente método.

La figura 2 es una vista plana esquemática de una realización de cámara de análisis.

La figura 3 es una vista en sección transversal esquemática de una cámara de análisis.

La figura 4 es una vista plana esquemática de una realización de una cámara de análisis.

La figura 5 es una vista esquemática ampliada de una muestra de fluido biológico dispuesto dentro de la cámara del recipiente mostrado en la figura 4.

La figura 6 es una ilustración gráfica de un patrón de transmitancia de luz de lentillas.

La figura 7 es una ilustración gráfica del patrón de transmitancia de luz de lentillas, que ilustra las secciones del patrón.

La figura 8 es un diagrama de bloques que proporciona las etapas de un método de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

Haciendo referencia ahora a las figuras 1-5, la presente invención proporciona un método y un aparato para enfocar un dispositivo analítico, dispositivo que puede funcionar para representar por imágenes una muestra biológica. El dispositivo analítico se denomina en adelante en el presente documento como un "dispositivo de representación de imágenes". La invención puede usarse para enfocar los dispositivos de representación de imágenes operables para analizar una variedad de diferentes tipos de muestras biológicas, incluyendo muestras de líquido, muestras de tejidos, citologías, etc. La presente invención es específicamente útil para, pero no se limita a, los dispositivos de representación de imágenes de enfoque operables para analizar muestras biológicas líquidas; por ejemplo, sustancialmente muestras no diluidas de sangre entera anticoagulada. La expresión "sustancialmente puro" como se usa en el presente documento describe una muestra que o bien no se diluye en absoluto o no se ha diluido intencionadamente, pero ha tenido algunos reactivos añadidos a la misma con fines del análisis; por ejemplo, anticoagulantes, colorantes, etc.

Debido a que las propiedades de representación por imágenes de las muestras biológicas, tal como la sangre entera, son muy variables, no existe una única métrica que pueda aplicarse a una sola imagen que pueda determinar si el dispositivo de representación de imágenes está enfocado. Para superar este problema, los dispositivos de representación de imágenes existentes normalmente utilizan un proceso de enfoque iterativo que requiere múltiples imágenes (al menos dos, y muchas veces muchas más) para determinar la mejor posición de enfoque relativa para la muestra; por ejemplo, el dispositivo buscará una profundidad de enfoque que proporcione el mayor contraste, los bordes más agudos o similares. La presente invención, por el contrario, puede determinar a partir de una sola imagen si el sistema de representación de imágenes está o no en una exposición perfecta, y si no, la presente invención puede determinar a menudo la cantidad exacta de movimiento necesario para que la imagen de muestra esté en un enfoque perfecto.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el método incluye las etapas de: 1) colocar las lentillas 10 en relación con un campo de una muestra biológica 11, en el que uno o ambos de entre el dispositivo de representación

de imágenes 12 y la muestra 11 pueden localizarse relativamente de manera que una posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes 12 puede moverse a lo largo de la altura 14 de las lentillas 10; 2) representar por imágenes al menos una parte de la muestra biológica 11 que contiene una pluralidad de las lentillas 10 que usan la transmitancia en una o más longitudes de onda predeterminadas; 3) determinar una intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra 11 en las longitudes de onda; 4) determinar una intensidad de transmitancia de luz promedio de una región de las lentillas 10 en las longitudes de onda; y 5) determinar la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes 12 usando la intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra 11 y la intensidad de transmitancia de luz promedio de la región de las lentillas 10.

Las lentillas 10 tienen una altura 14, un índice de refracción, una forma regular, y un patrón de transmitancia de luz característico. La altura 14 de las lentillas 10 es paralela al eje a lo largo del que se ajusta la posición de enfoque; por ejemplo, normalmente denominado como el eje "Z" de un dispositivo de representación de imágenes 12. El índice de refracción de las lentillas 10 es diferente del índice de refracción de la muestra 11. Cada una de las lentillas 10 tiene la misma forma regular, forma que es normalmente simétrica (por ejemplo, esférica).

El patrón de transmitancia de luz característico de una lentilla 10 es una función de varios factores, incluyendo el índice de refracción de la lentilla 10. Las lentillas 10 actúan para curvar la luz transmitida a través de la muestra 11 lejos de la trayectoria de imagen, y por lo tanto hace que al menos algunas partes de las lentillas 10 aparezcan más oscuras que el fondo. La intensidad relativa de la luz transmitida a través de cada parte de la lentilla 10 (es decir, la "intensidad de transmitancia de luz") es también una función de la forma de la lentilla 10 y la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes 12. Si todas las lentillas 10 tienen una forma regular y preferentemente simétrica, la variabilidad de intensidad de transmitancia de luz en relación con la geometría de la lentilla 10 puede eliminarse sustancialmente, y la relación entre la intensidad de transmitancia de luz relativa y la posición de enfoque puede usarse para determinar el punto exacto de enfoque del dispositivo de representación de imágenes 12.

El patrón de transmitancia de luz característico de una lentilla 10 puede repetirse y es consistente entre las lentillas 10 del mismo tipo, y puede describirse como una referencia. El patrón de transmitancia de luz puede producirse usando una o más de una pluralidad de diferentes longitudes de onda de la luz, siempre que las longitudes de onda de la luz no se absorban apreciablemente por la lentilla 10. El patrón de transmitancia de luz puede describirse en términos de la intensidad de transmitancia de luz relativa a través las lentillas 10 como una función de la posición de enfoque a lo largo de la altura 14 de las lentillas 10. El término "relación" se usa para describir la intensidad de transmitancia de luz de las diferentes regiones de la lentilla 10, en relación con las otras (por ejemplo, la región central vs. regiones exteriores), y en relación con la intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra 11 con las lentillas 10 que están dispuestas. Las figuras 6 y 7 muestran un ejemplo de una representación gráfica de un patrón de transmitancia de luz característico. La representación gráfica es un ejemplo del patrón y la presente invención no se limita a la misma. El patrón puede tomar la forma de expresiones matemáticas que describen las curvas de transmitancia de luz relativas, o podría ser en forma de una tabla de datos, etc.

Un ejemplo de un tipo aceptable de lentillas 10 es una perla esférica que puede mezclarse íntimamente con la muestra 11. Como se detalla a continuación, las perlas esféricas fabricadas de un material polimérico funcionan bien como lentillas 10 cuando se mezclan con una muestra de fluido biológico 11 (por ejemplo, sangre completa sustancialmente sin diluir, anticoagulada) que está dispuesta con una cámara de análisis delgada 17 a través de la que la luz de investigación puede transmitirse. Tales esferas pueden fabricarse de poliestireno y están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Thermo Scientific de Fremont, California, U.S.A. n.º de catálogo 4204A, en cuatro micrómetros (4 mm) de diámetro. Las lentillas 10 no están limitadas a una forma esférica, o cualquier material o tamaño específico, siempre que pueda transmitirse una cantidad de luz a su través que sea suficiente para el proceso de enfoque actual.

El dispositivo de representación de imágenes 12 incluye una lente objetivo 18, un dispositivo de sujeción de cámara 20, un iluminador de muestra 22, un disector de imágenes 24, y un analizador programable 26. Uno o ambos de entre la lente objetivo 18 y la cámara de sujeción 20 pueden moverse hacia y lejos el uno del otro para cambiar una posición de enfoque relativa. El iluminador de muestra 22 se coloca para iluminar la muestra 11 transmitiendo luz en una o más longitudes de onda predeterminadas a través de la muestra 11. La luz transmitida a través de la cámara 17 se captura por el disector de imágenes 24 y se procesa en una imagen. La imagen se produce de una manera que permite que la intensidad de transmitancia de luz capturada dentro de la imagen se determina sobre una base por unidad. La expresión "base por unidad", significa una unidad incremental de la que la imagen de la muestra 11 puede diseccionarse; por ejemplo, un "pixel" se define en general como el elemento más pequeño de una imagen que puede procesarse individualmente dentro de un sistema de representación de imágenes específico. El presente método no está, sin embargo, limitado al uso de cualquier dispositivo de representación de imágenes específico 12. En una realización alternativa, el dispositivo de representación de imágenes 12 podría incluir una cámara asociada con el dispositivo 12 que está destinado a usarse múltiples veces, en lugar de uno desechable, la cámara independiente se localiza dentro del dispositivo de representación de imágenes 12 mediante un dispositivo de sujeción de cámara.

La figura 1 ilustra un ejemplo de un dispositivo de representación de imágenes de muestra biológica 12 que puede adaptarse para su uso con el presente método, el dispositivo 12 incluye un iluminador de muestra 22, un disector de

imágenes 24, y un analizador programable 26. El iluminador de muestra 22 incluye una fuente de luz que produce selectivamente la luz a lo largo de una o más longitudes de onda que no se absorbe apreciablemente por o la muestra 11 o por las lentillas 10 dispuestas dentro de una cámara 17 que mantienen en reposo la muestra 11 a ensayarse. El dispositivo de representación de imágenes 12 incluye normalmente la óptica para la manipulación de la luz (por ejemplo, la ampliación, el filtrado, etc.). El iluminador de muestra 22 produce luz a lo largo de las longitudes de onda predeterminadas (o a lo largo de un espectro de longitudes de onda que posteriormente se limita a las longitudes de onda predeterminadas) que se transmite a través de la muestra 11. La intensidad de transmitancia de luz de las lentillas 10 y la muestra 11 se mide, por ejemplo, colocando una fuente de luz en un lateral de la cámara 17, dirigiendo la luz a través de la cámara 17, y capturando después de esto la luz usando el disector de imágenes 24. Un ejemplo de un disector de imágenes aceptable 24 es un sensor de imagen de tipo dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) que convierte una imagen de la luz que pasa a través de la muestra 11 en un formato de datos electrónico. Los sensores de imagen de tipo semiconductores complementarios de óxido de metal ("CMOS") son otro ejemplo de un sensor de imagen que puede usarse. La presente invención no se limita a cualquiera de estos ejemplos. El analizador programable 26 incluye una unidad de procesamiento central (CPU) y está conectado con el iluminador de muestra 22 y con el disector de imágenes 24. La CPU está adaptada (por ejemplo, programada) para realizar selectivamente las funciones necesarias para realizar el presente método. Debería observarse que la funcionalidad del analizador programable 26 puede implementarse usando hardware, software, firmware, o una combinación de los mismos. Un experto en la materia debería ser capaz de programar la unidad de procesamiento para realizar la funcionalidad descrita en el presente documento sin excesiva experimentación. La patente de Estados Unidos n.º 6.866.823 titulada "Apparatus for Analyzing Biologic Fluids" expedida el 15 de marzo de 2005, desvela un dispositivo de representación de imágenes 12 de este tipo.

Una cámara de análisis 17 que puede usarse dentro del dispositivo de análisis está definida por un primer panel 28 y un segundo panel 30, separados uno de otro. Los paneles 28, 30 son ambos suficientemente transparentes para permitir la transmisión de la luz a lo largo de las longitudes de onda predeterminadas a su través en una cantidad suficiente para realizar el análisis de la muestra 11, incluyendo la metodología de enfoque descrita a continuación. El presente método puede usar una variedad de diferentes tipos de cámara de análisis que tienen las características mencionadas anteriormente, y por lo tanto no está limitado a ningún tipo específico de cámara de análisis 17.

Un ejemplo de una cámara aceptable 17 se muestra en las figuras 2 y 3, la cámara 17 que incluye un primer panel 28, un segundo panel 30, y al menos tres separadores 32 dispuestos entre los paneles 28, 30. Los separadores 32 separan los paneles 28, 30 unos de otros. La dimensión de un separador 32 que se extiende entre los paneles se denomina en el presente documento como la altura 34 del separador 32. Las alturas 34 de los separadores 32 por lo general no son iguales entre sí exactamente (por ejemplo, tolerancias de fabricación), pero están dentro de la tolerancia comercialmente aceptable para separar los medios usados en los aparatos de análisis similares. Las perlas esféricas son un ejemplo de un separador aceptable 32. Este ejemplo de una cámara de análisis aceptable 17 se describe con mayor detalle en la publicación solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0243117, 2007/0087442, y en los números de solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/041.783, presentada 2 de abril de 2008; y 61/110.341, presentada el 31 de octubre de 2008.

En algunas realizaciones, los separadores 32 y las lentillas 10 son uno y el mismo; es decir, las perlas esféricas, tienen un tamaño que es aceptable para separar los paneles de la cámara 17, y tienen unas propiedades ópticas que los hacen aceptables como lentillas 10. Puede ser ventajoso en algunas aplicaciones tener las perlas esféricas que actúen tanto como separadores 32 como lentillas 10. Debido a que las esferas actúan como un separador en estas realizaciones (por ejemplo, en contacto con o cerca de las superficies interiores), es poco probable que se disponga de alguna cantidad apreciable de material de muestra 11 entre la esfera y, o bien la superficie interior de los paneles. La ausencia de cualquier material de muestra apreciable 11 disminuye o elimina la posibilidad de que el material de muestra interfiera con cualquier análisis de transmitancia de luz de las esferas. No hay ningún requisito, sin embargo, de que cualquiera de los separadores 32 o las lentillas 10 funcione como el otro; por ejemplo, los separadores 32 pueden usarse independiente de y junto con las lentillas 10.

Otro ejemplo de una cámara aceptable 17 está dispuesta en un contenedor desechable como se muestra en la figura 4. La cámara 17 está formada entre un primer panel y un segundo panel. Tanto el primer panel como el segundo panel son transparentes para permitir que la luz pase a través de la cámara 17. Esta realización de la cámara 17 se describe con mayor detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.723.290.

Las cámaras de análisis 17 mostradas en las figuras 2-4, representan unas cámaras que son aceptables para su uso en el presente método. En ambos casos, la cámara 17 está normalmente dimensionada para contener cerca de 0,2 a 1,0 μl de muestra 11, pero la cámara 17 no se limita a cualquier capacidad de volumen específico, y la capacidad puede variar para adaptarse a la aplicación de análisis. Estas cámaras 17 pueden hacerse funcionar para contener una muestra 11 en reposo dentro de la cámara 17. El término "reposo" se usa para describir que la muestra 11 se deposita dentro de la cámara 17 para el análisis, y no se mueve de manera intencionada durante el análisis. En la medida en que un movimiento está presente dentro de la muestra de sangre, será predominantemente debido al movimiento Browniano de los constituyentes formados de la muestra de sangre, movimiento que no es incapacitante del uso del dispositivo de esta invención. El presente método no está, sin embargo, limitado a estas realizaciones específicas de la cámara 17.

Ejemplo:

El siguiente es un ejemplo ilustrativo de un enfoque de un dispositivo de representación de imágenes 12 de acuerdo con el presente método. La figura 8 proporciona un diagrama de bloques de acuerdo con un aspecto del método de la presente invención. La invención no está, sin embargo, limitada a este ejemplo.

Una muestra 11 de fluido biológico (por ejemplo, sangre entera anticoagulada sustancialmente no diluida), se deposita dentro de una cámara 17. Una serie de lentes 10 se colocan en relación con la muestra 11, de tal manera que permanezcan a una distancia fija del punto en la muestra 11 donde se requiere el mejor enfoque para la duración del análisis. El número de lentes 10 puede variar en función de la aplicación, pero debería ser suficiente de tal manera que haya un número suficiente de lentes 10 en cada campo de visión para practicar con precisión el método (por ejemplo, un número de lentes 10 lo suficientemente grande como para que puedan calcularse estadísticamente unos valores de intensidad de transmitancia de luz promedios aceptables, etc.). Las lentes 10 pueden dispersarse aleatoriamente o en un patrón. El método se facilita si las lentes 10 están dispuestas dentro del plano de enfoque de la muestra 11, incluyendo que se dispongan íntimamente dentro de la muestra 11 en sí, como es el caso en la cámara 17 descrito anteriormente y mostrado en las figuras 2-5. Sin embargo, el método no requiere que las lentes 10 estén dispuestas dentro del plano de enfoque de muestra. El plano de enfoque de las lentes 10 puede desplazarse desde el plano de enfoque de la muestra 11; por ejemplo, los planos de enfoque de las lentes 10 y de la muestra 11 pueden ser diferentes, donde cada uno se ilumina usando diferentes longitudes de onda. Los dos planos de enfoque pueden desplazarse también si las lentes 10 no son físicamente coplanarias con la parte de muestra de interés. En los casos de un desplazamiento de plano de enfoque, una vez que se determina la distancia de ajuste de enfoque para las lentes 10, se añade a la cantidad del desplazamiento de plano de enfoque entre las lentes 10 y la muestra 11, que se conoce o puede determinarse, para llegar a la posición de enfoque adecuada.

Las lentes 10 y la muestra 11 se iluminan en una o más longitudes de onda que no se absorben apreciablemente por cualquiera de las lentes 10 o la muestra 11. A modo de ejemplo, la luz producida en las longitudes de onda de aproximadamente 620 nm o mayor no se absorbe apreciablemente por una muestra 11 de sangre completa sustancialmente sin diluir o por unas lentes esféricas de cuatro micrómetros (4 μm) 10 que están formadas de poliestireno. La luz en otras longitudes de onda puede usarse para análisis alternativos, y la presente invención no se limita al uso de cualquier longitud de onda específica. Una imagen de la intensidad de transmitancia de luz se captura usando un disector de imágenes digital 24, tal como una cámara CCD o CMOS. La intensidad de transmitancia de luz de la muestra 11 se determina para la muestra representada por las imágenes 11 sobre una base por unidad, y se determina un valor promedio del valor de intensidad de transmitancia de luz de la muestra 11. Aunque no es un requisito que se determinen los valores de intensidad de transmitancia de luz para toda el área de la muestra 11, es preferible ya que hacerlo proporciona normalmente un análisis más completo de la muestra y un aumento concomitante en la precisión. La imagen digital se analiza usando técnicas convencionales de procesamiento de imágenes para localizar las lentes 10, que aparecen como objetos oscuros dentro de la imagen. En función de en donde se localiza inicialmente el plano de enfoque del dispositivo de representación de imágenes 12, los centros de las lentes 10 pueden aparecer con una luz relativa a las otras partes de las lentes 10. La figura 5 muestra unas lentes esféricas 10 que aparecen circulares, con las regiones centrales de color más claro.

Para facilitar el análisis de imágenes, la imagen puede segmentarse y solo aquellos objetos que tienen un valor de transmitancia de luz promedio relativo por debajo de un valor de corte predeterminado (por ejemplo, 0,90) se seleccionan a continuación para el análisis. La figura 7 muestra, por ejemplo, un patrón de intensidad de transmitancia de luz característico segmentado para definir los diferentes cuadrantes de intensidad que tienen las diferentes características regionales (por ejemplo, demanda baja, intervalo objetivo, demanda alta). Los criterios de corte alternativos y/o adicionales también pueden usarse para disminuir la cantidad de análisis necesario; por ejemplo, el área que corresponde a aproximadamente el de una lente 10. Estos valores de corte pueden elegirse a través de ensayo y error para aumentar la precisión y la velocidad del análisis. A continuación, los objetos seleccionados se analizan en conjunto adicionalmente para determinar los valores de intensidad de transmitancia de luz en puntos específicos en los objetos, objetos que son las lentes 10. Como se ha indicado anteriormente, la intensidad de transmitancia de luz se determina sobre una base por unidad (por ejemplo, por cada píxel) dentro de la imagen. En consecuencia, la imagen de una lente 10 se representa por un número de píxeles en función del tamaño de la lente 10 y el factor de ampliación del dispositivo de representación de imágenes 12 (por ejemplo, una lente esférica 10 que es de cuatro micrómetros (4 μm) de diámetro, representada por imágenes usando un aumento de 0,5 micrómetros por píxel, tendrá un diámetro representado por aproximadamente ocho (8) píxeles). Los valores de transmitancia de luz en cada punto se promedian. La uniformidad física de las lentes 10 y el cálculo del promedio de los valores de intensidad aumenta la fiabilidad de los valores de intensidad.

La posición de enfoque existente del dispositivo de representación de imágenes 12 puede determinarse usando el patrón de transmitancia de luz característico predeterminado de las lentes 10, los valores de intensidad de transmitancia de luz promedios de al menos una región dentro de las imágenes de las lentes 10, y los valores de intensidad de transmitancia de luz promedios de la muestra 11.

El patrón de intensidad de transmitancia de luz característico predeterminado para una lentilla 10 puede repetirse y es consistente para un tipo dado de lentilla 10. El patrón, que se almacena en el dispositivo de representación de imágenes 12, es una función de los valores de intensidad de transmitancia de luz relativos de las diferentes regiones de la lentilla 10, una en relación con la otra, y en relación con la intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra 11. El patrón mostrado en las figuras 6 y 7, por ejemplo, es una gráfica representativa de un patrón para una lentilla de diámetro de cuatro micrómetros (4 μm). El eje vertical de cada gráfica es la intensidad promedio de una región de interés dentro de la lentilla 10 en relación con la intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra 11. El eje horizontal de cada gráfica es la posición de enfoque relativa.

El patrón de intensidad de transmitancia de luz característico que se muestra en las figuras 6 y 7 incluye una primera línea de datos 36 que representa un valor promedio para una región de lentilla que tiene un valor de alta intensidad, una segunda línea de datos 38 que representa un valor promedio de una región de lentilla que tiene un valor de baja intensidad, una tercera línea de datos 40 que representa un valor de intensidad promedio para todas las regiones de la lentilla 10, una cuarta línea de datos 42 que representa un valor promedio para una región adyacente, pero en el exterior de la lentilla 10, y una quinta línea de datos 44 que representa un valor de intensidad promedio para la región central de la lentilla, todas las líneas se representan como una función de la posición de enfoque. Las posiciones de estas líneas de datos una en relación con la otra son una característica repetible y consistente de la lentilla. Debido a que estas líneas de datos se crean como una función de la intensidad de transmitancia de luz relativa (por ejemplo, una en relación con la otra y en relación con la intensidad promedio de la muestra 11), el presente método es insensible a la exposición real o a la intensidad de luz de imagen, y puede funcionar siempre que haya suficiente señal disponible para el análisis.

De particular interés son los valores de intensidad de transmitancia de luz en el centro de la lentilla, que varían cíclicamente desde un máximo a un mínimo; es decir, una representación gráfica en "S". Los valores de intensidad de máximo a mínimo para la región central de la lentilla esférica 10 se producen dentro de una distancia de enfoque correspondiente a dos diámetros de lentilla; por ejemplo, para una lentilla de diámetro de cuatro micrómetros (4 μm), la propagación intensidad de demanda valle es de aproximadamente ocho micrómetros (8 μm). Esta curva es altamente reproducible, y la intensidad de transmitancia de luz relativa en el medio de la curva se usa como un valor objetivo para una posición de enfoque óptima. El medio de la curva en forma de "S" de la región central se usa como un valor objetivo, ya que reside en una parte de pendiente constante relativamente lineal de la curva, que proporciona una sensibilidad de posición de enfoque deseable. Los datos recogidos por las regiones centrales de las lentillas 10 también tienen un mayor grado de fiabilidad que otras regiones. En el patrón mostrado en las figuras 6 y 7, el medio de la curva en forma de "S" de la región central está alineado con un valor de aproximadamente 0,75 en el eje Y; es decir, una posición en la que los valores de intensidad de transmitancia de luz promedios de la región central son de aproximadamente tres cuartas partes (0,75) del valor de intensidad de transmitancia de luz promedio de la muestra 11 en términos relativos. El valor de posición de enfoque asociado con el medio de la curva en "S" (es decir, en la intersección 0,75) representa la posición de enfoque objetivo que se ha determinado para proporcionar el enfoque deseado del dispositivo de representación de imágenes 12 en relación con las lentillas 10.

La determinación de la posición de enfoque existente del dispositivo de representación de imágenes 12 se realiza localizando una curva dentro del patrón característico (por ejemplo, la curva de región central, etc.) el valor de intensidad promedio de al menos una región dentro de las lentillas 10 en relación con el valor de intensidad promedio para la muestra 11 (por ejemplo, el valor del eje y) y encontrar el valor de posición de enfoque existente correspondiente (es decir, el valor del eje x). El desplazamiento entre la posición de enfoque existente y la posición de enfoque objetivo (es decir, la posición de enfoque óptimo) representa el ajuste necesario para llevar el dispositivo de representación de imágenes 12 a la posición de enfoque objetivo.

En ciertas partes del patrón característico de lentes, las curvas pueden intersectarse en más de un punto por una línea horizontal que se extiende desde el eje y. En tales casos, más de una posición de enfoque existente puede estar asociada con un valor de intensidad relativa. Para determinar la posición de enfoque existente correcta, se determina otro punto de datos a partir del patrón característico. Estos datos pueden obtenerse a partir de la imagen existente o una imagen posterior. Por ejemplo, el valor de intensidad promedio a partir de una región de alto valor en las lentillas 10 dividido por el valor de intensidad de muestra promedio (por ejemplo, el valor del eje y) puede representarse gráficamente en la curva de alto valor dentro del patrón. Una vez que se determina la posición en la curva de alto valor, puede determinarse el valor de posición de enfoque existente asociado a partir del eje x. El valor de posición de enfoque existente de la curva alta estará de acuerdo con una de las posiciones de enfoque determinadas fuera de la curva de región central, confirmando de este modo una de las posiciones de enfoque como la posición de enfoque existente correcta. El mismo proceso puede realizarse en relación con otra curva dentro del patrón para proporcionar datos de confirmación adicionales, si se desea. Una vez que se confirma la posición de enfoque existente, puede determinarse el desplazamiento entre la posición de enfoque existente y la posición de enfoque objetivo, por lo que el desplazamiento representa el ajuste necesario para llevar el dispositivo de representación de imágenes 12 a la posición de enfoque de destino.

Debería observarse que la posición de enfoque existente correcta (y por lo tanto el desplazamiento del enfoque óptimo) puede determinarse usando cualquiera de las curvas representadas gráficamente dentro del patrón característico. Como se ha indicado anteriormente, sin embargo, la curva de región central ofrece unas ventajas en

relación con la sensibilidad y la fiabilidad. En consecuencia, la precisión del proceso se mejora usando la curva de región central para al menos uno de los puntos de datos usados para establecer la posición de enfoque existente.

- 5 En algunos casos, el valor de intensidad relativa determinado por el patrón característico puede alinearse con unas partes de curva (por ejemplo, los segmentos sustancialmente horizontales) que pueden estar asociados con una pluralidad de posiciones de enfoque sobre el eje y. En esos casos, se realiza la metodología anterior y se elige una de las posibles posiciones de enfoque existentes. La metodología se repite a continuación con una nueva imagen y los ajustes realizados en la posición de enfoque si son necesarios.
- 10 En el caso de que la posición de enfoque original de la parte de representación de imágenes del dispositivo analítico esté tan lejos que los valores de intensidad determinados a partir de los datos de rendimiento de posición en el exterior del patrón característico para ese lente, puede llevarse primero la parte de representación de imágenes del dispositivo de análisis a un enfoque aproximado mediante una técnica convencional tal como maximizar el contraste.
- 15 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito en relación con las realizaciones detalladas de la misma, se entenderá por los expertos en la materia que pueden hacerse diversos cambios en forma y detalle sin alejarse del alcance de la invención. Por ejemplo, el patrón de intensidad de transmitancia de luz característico para las lentes 10 se ha descrito anteriormente dentro de la parte de descripción detallada de una forma gráfica. El patrón no se limita a una expresión gráfica, y puede tomar la forma de expresiones matemáticas que describen las curvas de
- 20 transmitancia de luz relativas, o podría ser en forma de una tabla de datos, etc. Como otro ejemplo, las realizaciones detalladas anteriormente tratan la invención en términos de una muestra biológica 11 que se dispone dentro de una cámara independiente 17. En realizaciones alternativas, el dispositivo de representación de imágenes 12 puede incorporar un hardware de manejo de muestras. Como otro ejemplo, los patrones de transmitancia de luz característicos se describen en términos de valores de transmitancia de luz promedios. En realizaciones alternativas,
- 25 la información útil puede accederse a partir de datos de lentes individuales 10, o mediante otra información estadística distinta de los valores promedios.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una posición de enfoque de un dispositivo de representación de imágenes adaptado para representar por imágenes una muestra biológica, muestra que tiene un índice de refracción, que comprende las etapas de:
- 5 disponer unas lentillas (10) en relación con un campo de una muestra biológica de tal manera que las lentillas (10) estén sustancialmente fijas de manera posicional en relación con la muestra, lentillas (10) que tienen una altura (14), y tienen un índice de refracción, índice de refracción que es diferente del de la muestra;
- 10 en el que uno o ambos de entre el dispositivo de representación de imágenes (12) y las lentillas (10) pueden localizarse relativamente, por lo que la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes (12) puede moverse a lo largo de la altura (14) de las lentillas (10);
- representar por imágenes al menos el campo de muestra y una pluralidad de las lentillas (10) usando una transmitancia en una o más longitudes de onda predeterminadas;
- 15 determinar una intensidad de transmitancia de luz representativa del campo de muestra en las longitudes de onda;
- determinar una intensidad de transmitancia de luz representativa de al menos una región de las lentillas (10) en las longitudes de onda; y
- 20 determinar la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes (12) usando la intensidad de transmitancia de luz del campo de muestra y la intensidad de transmitancia de luz representativa de la región de las lentillas (10).
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de determinar la posición de enfoque incluye además usar un patrón de intensidad de transmitancia de luz característico para las lentillas (10).
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en el que el patrón de intensidad de transmitancia de luz característico para las lentillas (10) es uno de entre un patrón expresado gráficamente, uno expresado matemáticamente, o uno dispuesto dentro de una tabla de consulta.
- 30 4. El método de la reivindicación 2, en el que la intensidad de transmitancia de luz representativa del campo de muestra es una intensidad de transmitancia de luz promedio, y la intensidad de transmitancia de luz representativa de al menos una región de las lentillas (10) es una intensidad de transmitancia de luz promedio de la al menos una región de las lentillas (10).
- 35 5. El método de la reivindicación 4, en el que las lentillas (10) están dispuestas dentro del campo de muestra biológica.
- 40 6. El método de la reivindicación 2, en el que el patrón de intensidad de transmitancia de luz característico para las lentillas (10) representa un valor de la intensidad de transmitancia de luz de al menos una región de las lentillas (10) en relación con un valor de intensidad de transmitancia de luz para la muestra como una función de la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes en relación con las lentillas (10).
- 45 7. El método de la reivindicación 2, en el que el patrón de intensidad de transmitancia de luz característico para las lentillas (10) representa un valor de intensidad de transmitancia de luz promedio para al menos una región de las lentillas (10) en relación con un valor de intensidad de transmitancia de luz promedio para la muestra como una función de la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes en relación con las lentillas (10).
- 50 8. El método de la reivindicación 2, que comprende además la etapa de determinar un desplazamiento entre la posición de enfoque determinada del dispositivo de representación de imágenes y una posición de enfoque de destino del dispositivo de representación de imágenes (12).
- 55 9. El método de la reivindicación 2, en el que las lentillas (10) son todas sustancialmente de la misma forma.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la al menos una región de las lentillas (10) es una región central de las lentillas (10).
- 60 11. El método de la reivindicación 10, que comprende además las etapas de: determinar una posición de enfoque de destino usando la intensidad de transmitancia de luz determinada de la región central de las lentillas (10); y determinar un desplazamiento entre la posición de enfoque determinada del dispositivo de representación de imágenes (12) y una posición de enfoque de destino del dispositivo de representación de imágenes (12).
- 65 12. El método de la reivindicación 2, en el que la etapa de determinar la intensidad de transmitancia de luz representativa de al menos una región de las lentillas (10) comprende determinar las intensidades de transmitancia de luz representativas de una primera región de las lentillas (10) y una segunda región de las lentillas (10) en las longitudes de onda; y en el que la etapa de determinar la posición de enfoque del dispositivo de representación de imágenes (12) usa la

intensidad de transmitancia de luz representativa del campo de muestra y las intensidades de transmitancia de luz representativas de la primera región de las lentillas (10) y la segunda región de la lentillas (10).

5 13. El método de la reivindicación 2, en el que sustancialmente la totalidad del campo se representa por imágenes en la etapa de representación por imágenes, y la intensidad de transmitancia de luz representativa del campo de muestra es un promedio de la intensidad de transmitancia de luz de sustancialmente la totalidad de la muestra en las longitudes de onda.

10 14. El método de la reivindicación 2, en el que las lentillas (10) y la muestra están dispuestas en el mismo plano de enfoque.

15 15. El método de la reivindicación 2, en el que las lentillas (10) están en un primer plano de enfoque, y la muestra está en un segundo plano de enfoque diferente del primer plano de enfoque, que incluye además la etapa de determinar un desplazamiento entre el primer y segundo planos de enfoque.

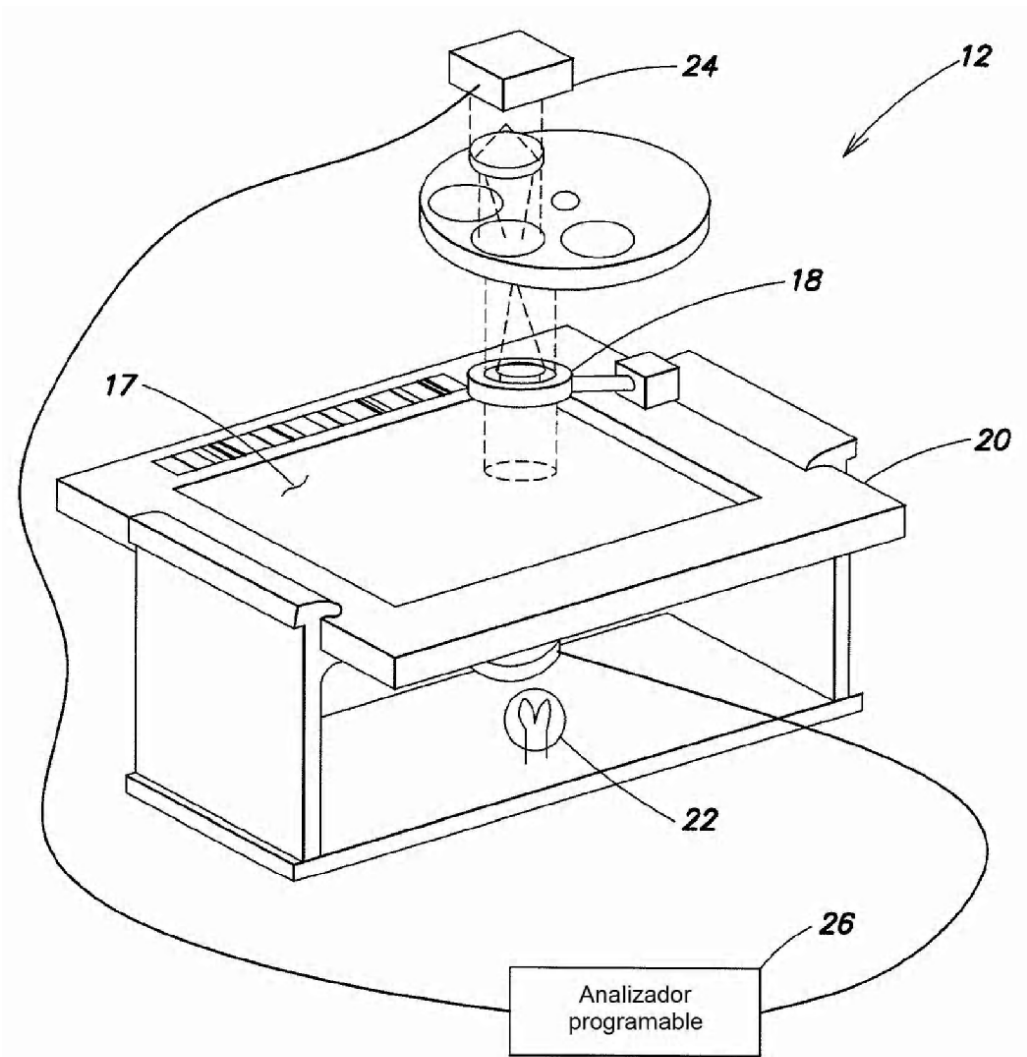


FIG. 1

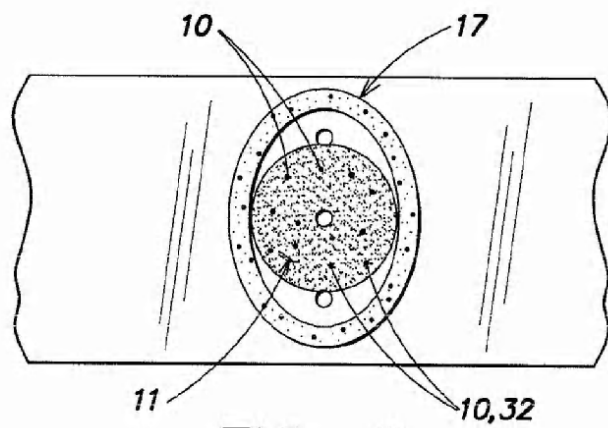


FIG. 2

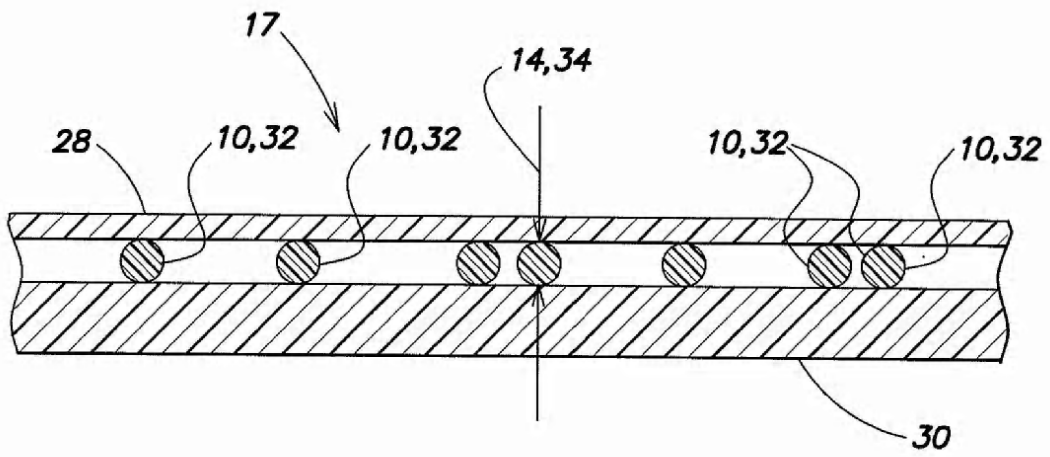


FIG. 3

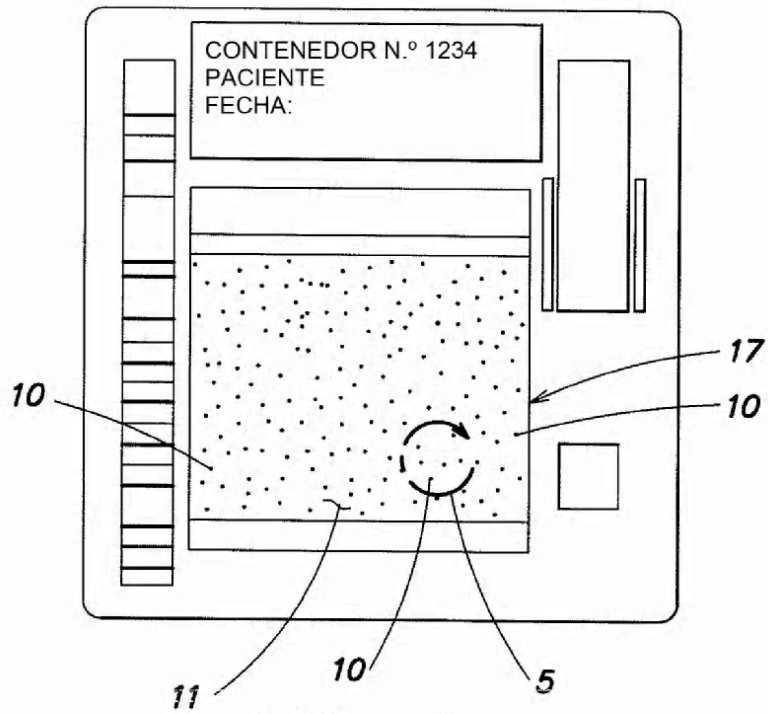


FIG. 4

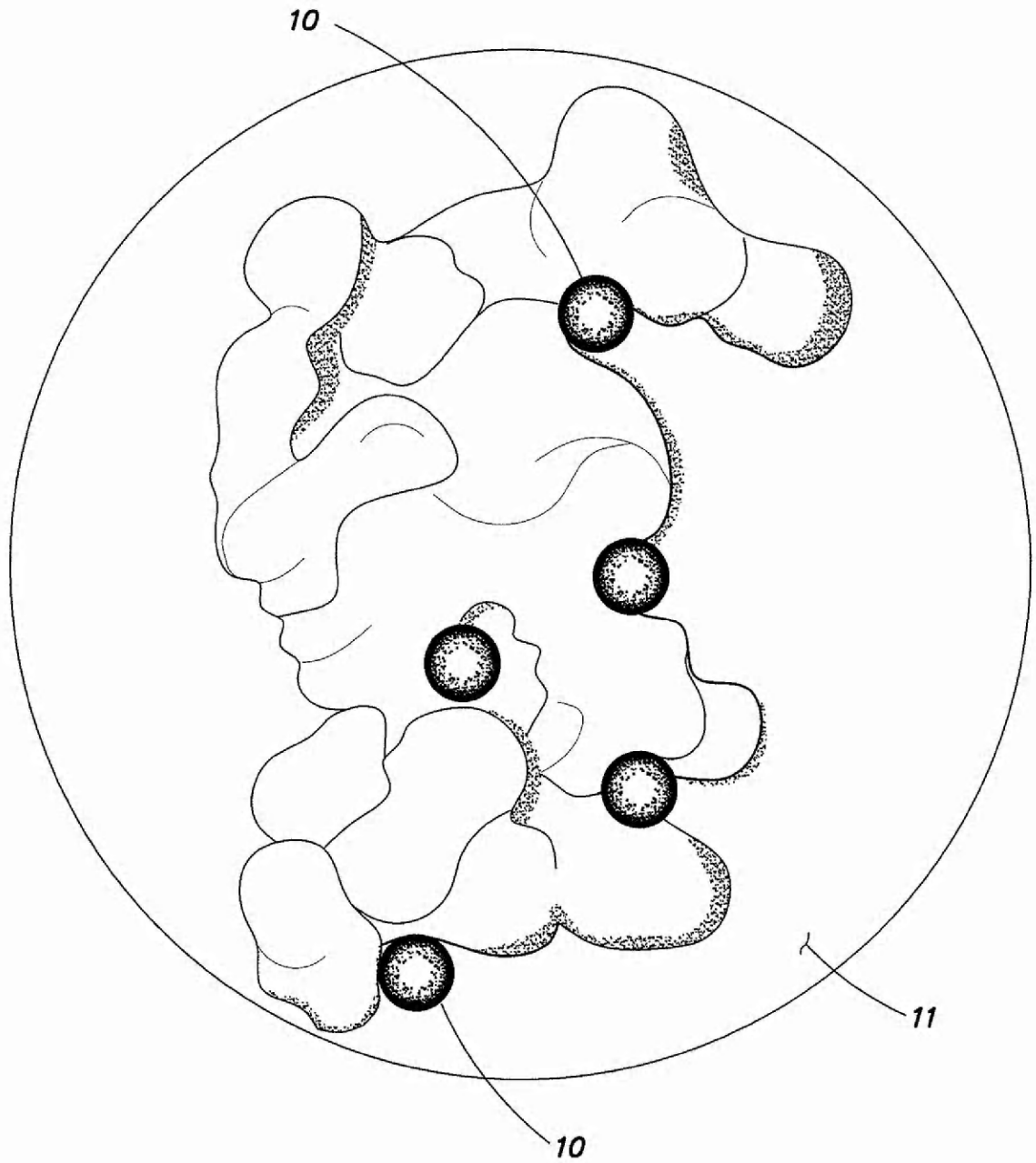


FIG. 5

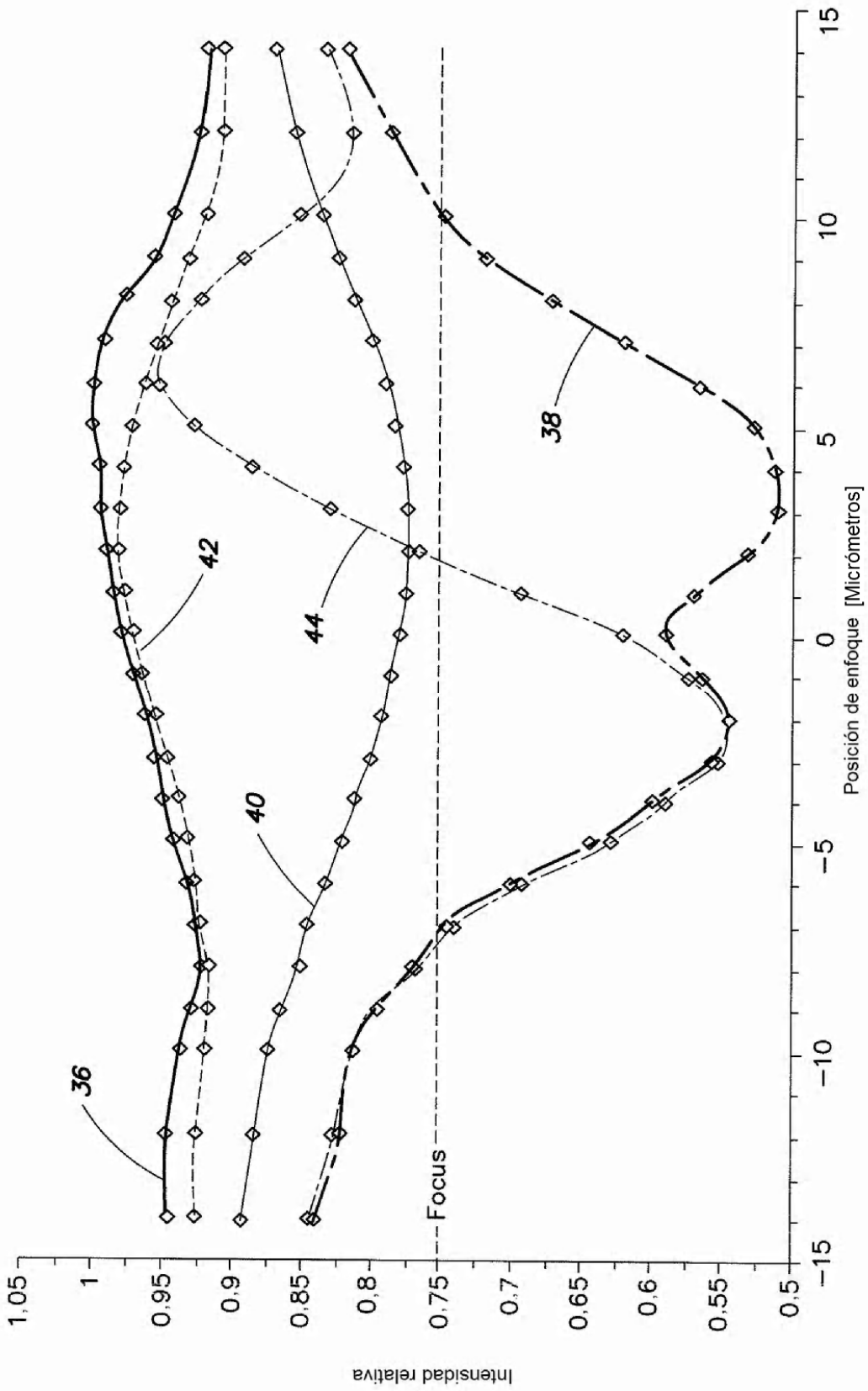


FIG. 6

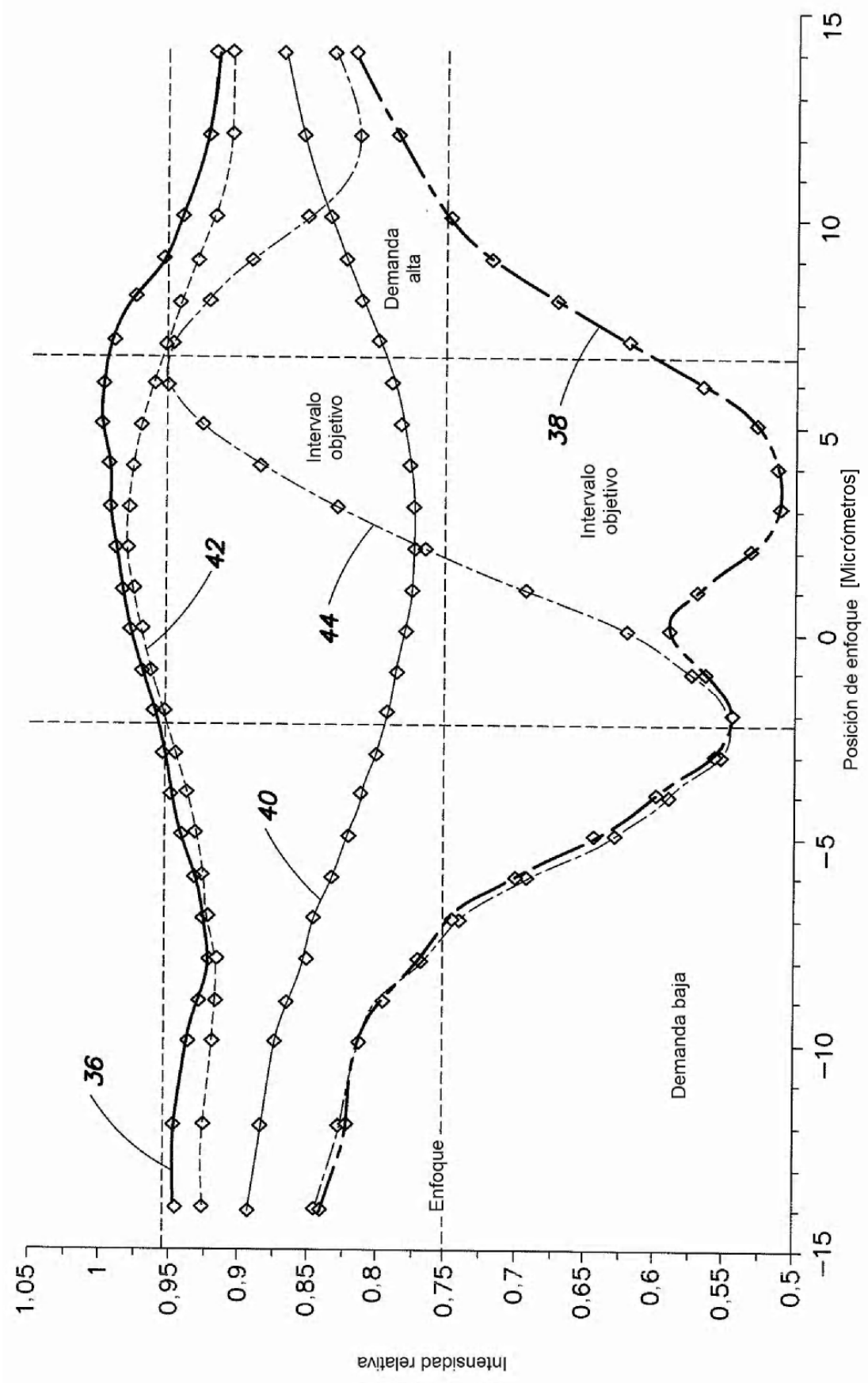


FIG. 7

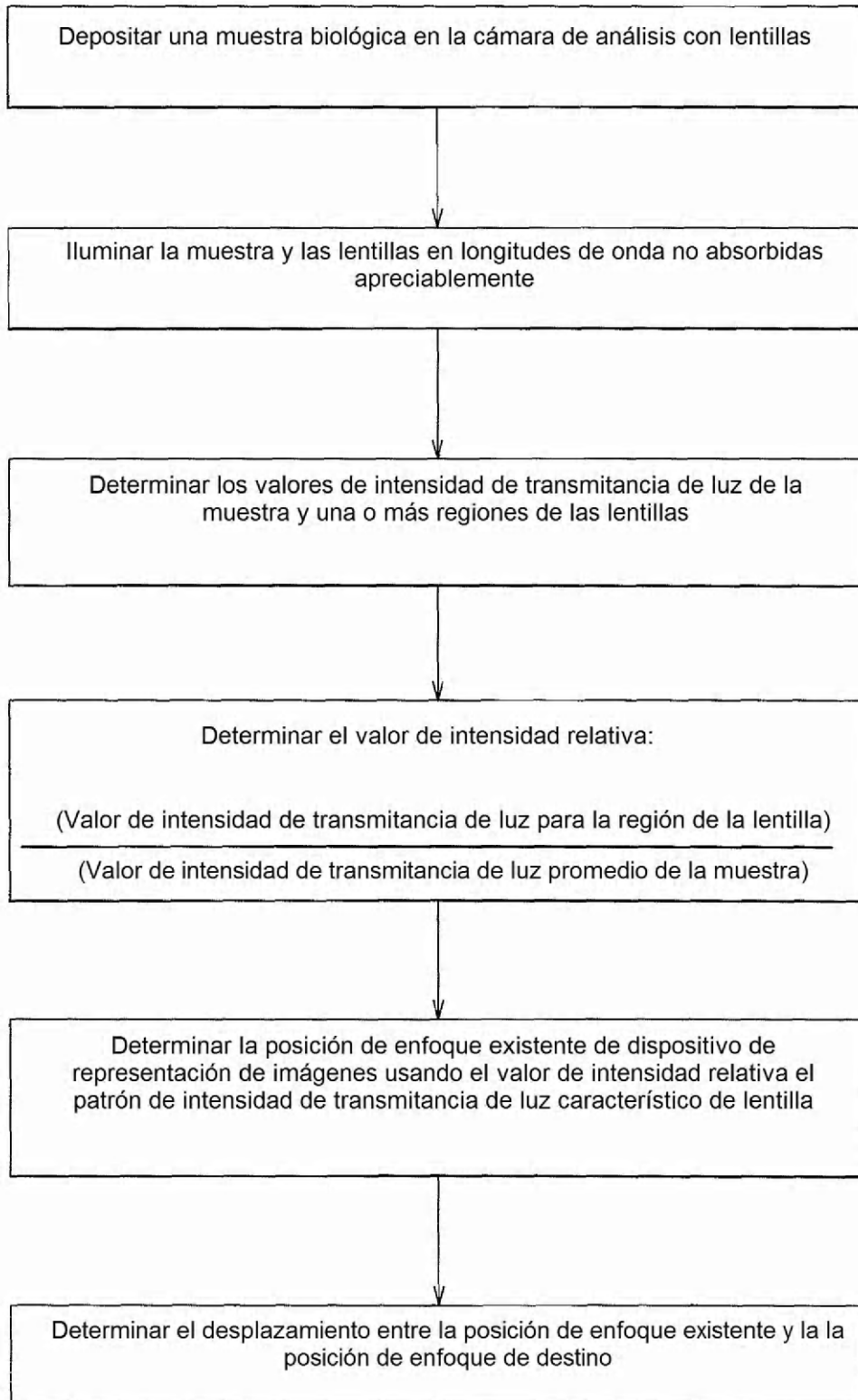


FIG. 8