



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 27 183 T2 2004.01.29**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 864 082 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 27 183.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/19166**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 940 930.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/020198**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.11.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.06.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.09.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.01.2004**

(51) Int Cl.7: **G01N 15/14**

(30) Unionspriorität:

26805 P 30.11.1995 US

(73) Patentinhaber:

**Chromavision Medical Systems, Inc., San Juan
Capistrano, Calif., US**

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**DOUGLASS, W., James, Indialantic, US; RIDING,
J., Thomas, West Melbourne, US; RING, E., James,
Palm Bay, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR AUTOMATISCHEN BILDANALYSE BIOLOGISCHER PROBEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Auf dem Gebiet medizinischer Diagnostik einschließlich der Onkologie, sind die Detektion, Identifikation, Quantifizierung und Charakterisierung von im Interesse stehenden Zellen, wie zum Beispiel Krebszellen, durch Überprüfen biologischer Proben ein wichtiger Aspekt der Diagnose. Typischerweise werden biologische Proben, wie zum Beispiel Knochenmark, Lymphknoten, peripheres Blut, cerebrospinale Flüssigkeit, Urin, Ergüsse, Aspirate mittels feiner Nadeln, periphere Blutabschabungen und andere Materialien, durch Färben der Probe präpariert, um interessierende Zellen zu identifizieren. Ein Verfahren einer Zellprobenpräparation besteht darin, eine Probe mit einer spezifischen Probe zu reagieren, die ein monoklonaler Antikörper, ein polyklonales Antiserum oder eine Nukleinsäure sein kann, die bezüglich einer Komponente der interessierenden Zellen reaktiv ist, wie zum Beispiel Tumorzellen. Die Reaktion kann detektiert werden, indem eine enzymatische Reaktion, wie zum Beispiel alkalische Phosphatase oder Glukooxidase oder Peroxidase verwendet werden, um ein lösbares farbloses Substrat in ein gefärbtes nicht lösliches Präzipitat umzuwandeln, oder indem ein Farbstoff mit der Probe unmittelbar konjugiert wird.

[0002] In der Vergangenheit wurde die Untersuchung biologischer Proben entweder durch einen Labortechniker oder einen Pathologen manuell durchgeführt. Bei dem manuellen Verfahren wird ein mit einer biologischen Probe präparierter Objektträger bei geringer Vergrößerung unter einem Mikroskop betrachtet, um die im Interesse stehenden Zielzellen visuell zu lokalisieren. Diejenigen Bereiche des Objektträgers, wo Zellen von Interesse lokalisiert werden, werden dann bei stärkerer Vergrößerung betrachtet, um diejenigen Objekte als interessierende Zellen zu bestätigen, wie zum Beispiel Tumor- oder Krebszellen. Das manuelle Verfahren ist zeitaufwändig und einschließlich eines Auslassens von Bereichen des Objektträgers fehleranfällig.

[0003] Es wurden automatisierte Zellanalysesysteme entwickelt, um die Geschwindigkeit und Genauigkeit des Überprüfungsprozesses zu verbessern. Ein bekanntes interaktives System umfasst ein einzelnes Hochleistungsmikroskopobjektiv, um ein Gestell mit Objektträgern abzutasten, von denen Bereiche zur Überprüfung durch eine Bedienperson zuvor identifiziert wurden. Bei diesem System tastet die Bedienperson zuerst jeden Objektträger bei geringer Vergrößerung vergleichbar zu dem manuellen Verfahren ab und notiert die interessierenden Stellen auf dem Objektträger für eine spätere Analyse. Die Bedienperson speichert dann die Adresse der notierten Stelle und die zugeordnete Funktion in einem Datenfile. Wenn die interessierenden Stellen von der Bedienperson lokalisiert und gespeichert wurden, wird der

Objektträger dann in einer Vorrichtung zur automatisierten Analyse angeordnet, die Bilder des Objektträgers an den markierten Stellen aufnimmt und eine Bildanalyse durchführt.

[0004] EP-A-0 213 666 offenbart ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Wiedergeben eines Einzelparameterbildes, insbesondere eines Graustufenbildes. Jedes Pixel des ursprünglichen Bildes kann einen durch 8-32 Bit wiedergegebenen Kontrastbereich aufweisen. Um diesen großen Kontrastbereich für den Benutzer sichtbar zu machen, wird gelehrt, eine komprimierte lokale Signalkomponente des ursprünglichen Bildes in Intensitätsinformationen und eine Hintergrundsignalkomponente in Farbinformationen eines wiedergegebenen Bildes abzubilden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Ein Problem bei dem vorherigen automatisierten System besteht in der kontinuierlichen Notwendigkeit einer Eingabe durch eine Bedienperson, um Zellobjekte zur Analyse anfänglich zu lokalisieren. Eine solche kontinuierliche Abhängigkeit von einer manuellen Eingabe kann zu Fehlern einschließlich des Auslassens interessierender Zellen führen. Solche Fehler können insbesondere bei Untersuchungen sogenannter seltener Fälle kritisch sein, zum Beispiel beim Auffinden einer Tumorzelle in einer Zellpopulation von einer Million normaler Zellen. Zusätzlich können manuelle Verfahren äußerst zeitaufwändig sein und ein hohes Maß an Training erfordern, um Zellen richtig zu identifizieren und/oder quantifizieren. Dies trifft nicht nur für eine Tumorzell-detektion, sondern auch für andere Anwendungen zu, die von neutrophilen alkalischen Phosphataseuntersuchungen, dem Zählen von Retikulozyten und der Reifebeurteilung und andere umfassen. Die verbundene manuelle Arbeit führt zu hohen Kosten für diese Vorgehensweisen zusätzlich zu den möglichen Fehlern, die aus langen, ermüdenden manuellen Untersuchungen herrühren können. Daher besteht ein Bedarf an einem verbesserten automatisierten Zellanalysesystem, welches schnell und genau große Mengen biologischen Materials auf einem Objektträger abtasten kann. Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur automatisierten Zellanalyse bereit, das die Notwendigkeit einer Eingabe durch eine Bedienperson beseitigt, um Zellobjekte zur Analyse zu lokalisieren.

[0006] Gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst ein Verfahren zur automatischen Analyse eines Farbbildes in einem ersten Farbraum eines Objektträgers, der eine mit einem Reagens präparierte biologische Probe aufweist, die in Anspruch 1 aufgeführten Schritte. Zum Ausführen des erfinderischen Verfahrens wird ein mit einer biologischen Probe und einem Reagens präparierter Objektträger in einer Objektträgerträgervorrichtung angeordnet, die vorzugsweise vier Objektträger hält. Die Objektträgerträgervorrichtungen werden in ein Eingabemagazin des automati-

schen Systems geladen. Die Bedienperson kann dann Daten eingeben, die die Größe, Form und Stelle eines Abtastbereichs auf jedem Objektträger angeben, oder vorzugsweise das System lokalisiert automatisch einen Abtastbereich für jeden Objektträger während einer Objektträgerverarbeitung. Die Bedienperson aktiviert dann das System zum Verarbeiten der Objektträger. Bei der Systemaktivierung wird eine Objektträgerträgervorrichtung an einer X-Y-Stufe eines optischen Systems positioniert. Barcodes, die verwendet werden, um Objektträger zu identifizieren, werden dann ausgelesen und für jeden Objektträger in einer Trägervorrichtung gespeichert. Der gesamte Objektträger wird dann bei einer geringen Vergrößerung schnell abgetastet, typischerweise 10× An jeder Stelle der Abtastung wird ein Bild geringer Vergrößerung aufgenommen und verarbeitet, um interessierende Zielobjekte zu detektieren. Vorzugsweise werden Farbe, Größe und Form verwendet, um interessierende Objekte zu identifizieren. Die Stelle jedes interessierenden Zielobjekts wird gespeichert.

[0007] Bei Beendigung der Abtastung niedrigen Pegels für jeden Objektträger in der Trägervorrichtung auf der Stufe wird das optische System Wert auf eine große Vergrößerung, wie zum Beispiel 40-× oder 60-×, eingestellt und die X-Y-Stufe wird auf die gespeicherten Stellen für die interessierenden Zielobjekte auf jedem Objektträger in der Trägervorrichtung positioniert. Für jedes interessierende Zielobjekt wird ein Bild starker Vergrößerung aufgenommen und eine Reihe von Bildverarbeitungsschritten wird durchgeführt, um die Analyse zu bestätigen, die bei geringer Vergrößerung durchgeführt wurde. Für jedes bestätigte interessierende Objekt wird ein Bild großer Vergrößerung gespeichert. Diese Bilder sind dann zur Wiedererlangung durch einen Pathologen oder Zytotechnologen zur erneuten Ansicht für eine endgültige Evaluierung der Diagnose verfügbar. Hat man die Stelle jedes interessierenden Objekts gespeichert, kann ein aus den interessierenden Zielobjekten zusammengesetztes Mosaik für einen Objektträger erzeugt und gespeichert werden. Der Pathologe oder Zytotechnologe kann das Mosaik betrachten oder kann auch den Objektträger unmittelbar an der Stelle eines interessierenden Objekts in dem Mosaik für eine weitere Evaluierung betrachten. Das Mosaik kann auf einem magnetischen Medium zur späteren Berücksichtigung gespeichert oder kann zur erneuten Ansicht und/oder Speicherung zu einer entfernten Stelle übertragen werden. Der gesamte beim Untersuchen eines einzelnen Objektträgers involvierte Prozess benötigt in der Größenordnung von 2-15 Minuten abhängig von der Größe des Abtastbereichs und der Anzahl detektierter interessierender Zielobjekte.

[0008] Die vorliegende Erfindung ist im Bereich der Onkologie nützlich, um minimale Resterkrankungen ("Mikrometastasen") früh zu erkennen. Andere nützliche Anwendungen umfassen die pränatale Diagnose fötaler Zellen in Mutterblut und auf dem Gebiet in-

fektiöser Krankheit, um pathogene und virale Belastungen zu identifizieren, Alkaliphosphataseüberprüfungen, das Zählen von Retikulozyten und andere.

[0009] Das Verarbeiten von bei dem automatisierten Abtasten gemäß der vorliegenden Erfindung erfassten Bildern umfasst den Schritt, das Bild in einen anderen Farbraum zu transformieren. Das Verarbeiten von Bildern umfasst ferner vorzugsweise die Schritte, das transformierte Bild mit einem Tiefpassfilter zu filtern, die Pixel des gefilterten Bildes dynamisch einer Grenzwertbetrachtung zu unterziehen, um Hintergrundmaterial zu unterdrücken, eine morphologischen Funktion auszuführen, um Artefakte von dem einer Grenzwertbetrachtung unterzogenen Bild zu entfernen, das einer Grenzwertbetrachtung unterworfenen Bild zu analysieren, um das Vorhandensein eines oder mehrerer Bereiche verbundener Pixel mit der gleichen Farbe zu bestimmen und jeden Bereich als interessierendes Zielobjekt zu kategorisieren, der eine Größe größer als eine minimale Größe aufweist.

[0010] Um das erfinderische Verfahren auszuführen, kann der Abtastbereich automatisch festgelegt werden, indem der Objektträger abgetastet wird, an jeder Objektträgerposition ein Bild aufgenommen wird, Texturinformationen jedes Bildes analysiert werden, um die Ränder der Probe zu detektieren, und die Stellen gespeichert werden, die den detektierten Rändern entsprechen, um den Abtastbereich zu definieren.

[0011] Ein automatisches Fokussieren des optischen Systems zum Ausführen des erfinderischen Verfahrens wird erreicht, indem anfänglich aus einer Anordnung von Punkten oder Stellen in dem Abtastbereich eine Fokusebene bestimmt wird. Die erhaltene Fokusebene erlaubt ein nachfolgendes schnelles automatisches Fokussieren bei dem Abtastbetrieb geringer Leistung. Die Fokusebene wird bestimmt, indem über einer Anordnung von Stellen geeignete Fokuspositionen bestimmt und eine Analyse, wie zum Beispiel eine Anpassung gemäß kleinster Quadrate, der Anordnung von Fokuspositionen durchgeführt werden, um eine Fokusebene über der Anordnung zu erhalten. Vorzugsweise wird an jeder Stelle eine Fokusposition bestimmt, indem die Position einer Z-Stufe für eine festgelegte Anzahl von groben und feinen Iterationen inkrementiert wird. Bei jeder Iteration wird ein Bild aufgenommen und eine Pixelvarianz oder ein anderer optischer Parameter über einem Pixelmittelwert wird für das aufgenommene Bild wird berechnet, um einen Satz Varianzdaten zu bilden. Eine Anpassung gemäß kleinster Quadrate wird gemäß einer bekannten Funktionsdauer Grundlage der Varianzdaten durchgeführt. Der Spitzenwert der Anpassungskurve gemäß kleinster Quadrate wird als Abschätzung der besten Fokusposition ausgewählt.

[0012] Ein anderes Fokuspositionsverfahren für starke Vergrößerung lokalisiert einen interessierenden Bereich, der über einem interessierenden Zielob-

jekt in einem Objektträger zentriert ist, das während einer Analyse der Bilder geringer Vergrößerung lokalisiert wird. Der interessierende Bereich ist vorzugsweise n Spalten breit, wobei n eine Potenz von 2 ist. Die Pixel dieses Bereichs werden dann unter Verwendung einer schnellen Fourier-Transformation verarbeitet, um ein Spektrum von Frequenzkomponenten und eine entsprechend komplexe Größe für jede Frequenzkomponente zu erzeugen. Vorzugsweise werden die komplexen Größen der Frequenzkomponenten, die von 25% bis 75% der maximalen Frequenzkomponente reichen, quadriert und summiert, um die gesamte Leistung des interessierenden Bereichs zu erhalten. Dieser Prozess wird für andere Z-Positionen wiederholt und die Z-Position, die der größten Gesamtleistung für den interessierenden Bereich entspricht, wird als beste Fokusposition ausgewählt. Dieser Prozess wird vorzugsweise verwendet, um eine Z-Position für interessierende Bereiche für Objektträger auszuwählen, die mit Fast Red gefärbte neutrophile Leukozyten enthalten, um im Zellzytoplasma Alkaliphosphatase zu identifizieren, und die mit Hämotoxylin gegengefärbt sind, um den Nukleus der neutrophilen Zelle zu identifizieren. Dieses Fokusverfahren kann ebenfalls mit anderen Färbemitteln und Typen biologischer Proben verwendet werden.

[0013] Um das erfinderische Verfahren auszuführen, wird ein Objektträger auf einer Objektträgerträgervorrichtung mit einer Anzahl weiterer Objektträger seitlich nebeneinander befestigt. Die Objektträgerträgervorrichtung wird in einer Eingabezufuhrvorrichtung mit weiteren Objektträgerträgervorrichtungen positioniert, um eine automatische Analyse einer Charge Objektträger zu erleichtern. Die Objektträgerträgervorrichtung wird auf die X-Y-Stufe des optischen Systems zur Analyse der Objektträger darauf geladen. Nachfolgend wird die erste Objektträgerträgervorrichtung nach einer automatischen Bildanalyse in eine Ausgabetransportvorrichtung entladen und die nächste Trägervorrichtung wird automatisch geladen.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0014] Die obigen und andere Merkmale der Erfindung einschließlich verschiedener neuer Konstruktions- und Kombinationsdetails von Teilen werden nun unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen spezieller beschrieben und in den Ansprüchen dargestellt. Es ist verständlich, dass die spezielle Vorrichtung zum Ausführen der Erfindung lediglich der Veranschaulichung halber und nicht als Einschränkung der Erfindung gezeigt ist. Die Prinzipien und Merkmale dieser Erfindung können ohne sich vom Umfang der Erfindung zu entfernen bei verschiedenen und zahlreichen Ausführungsformen verwendet werden.

[0015] **Fig. 1** ist eine perspektivische Ansicht einer Vorrichtung zur automatischen Zellanalyse.

[0016] **Fig. 2** ist ein Blockdiagramm der in **Fig. 1** ge-

zeigten Vorrichtung.

[0017] **Fig. 3** ist ein Blockdiagramm der Mikroskopsteuereinrichtung von **Fig. 2**.

[0018] **Fig. 4** ist eine Ansicht der Vorrichtung von **Fig. 1**, bei der das Gehäuse entfernt ist.

[0019] **Fig. 5** ist eine Seitenansicht eines Mikroskopteilsystems der Vorrichtung von **Fig. 1**.

[0020] **Fig. 6a** ist eine Ansicht von oben auf eine Objektträgerträgervorrichtung zur Verwendung mit der Vorrichtung von **Fig. 1**.

[0021] **Fig. 6b** ist eine Ansicht von unten der Objektträgerträgervorrichtung von **Fig. 6a**.

[0022] **Fig. 7a** ist eine Ansicht von oben eines Teilsystems zum automatisierten Handhaben von Objektträgern der Vorrichtung von **Fig. 1**.

[0023] **Fig. 7b** ist eine Teilquerschnittsansicht des Teilsystems zum automatisierten Handhaben von Objektträgern von **Fig. 7a** entlang der Linie A-A.

[0024] **Fig. 8** ist eine Seitenansicht des Eingabemoduls des Teilsystems zum automatisierten Handhaben von Objektträgern.

[0025] **Fig. 8a–8d** veranschaulichen den Eingabebetrieb des Teilsystems zum automatisierten Handhaben von Objektträgern.

[0026] **Fig. 9a–9d** veranschaulichen den Ausgabebetrieb des Teilsystems zum automatisierten Handhaben von Objektträgern.

[0027] **Fig. 10** ist ein Flussdiagramm des Verfahrens zum automatischen Bestimmen eines Abtastbereichs.

[0028] **Fig. 11** zeigt den Abtastweg auf einem präparierten Objektträger bei dem Verfahren von **Fig. 10**.

[0029] **Fig. 12** veranschaulicht ein Bild eines bei dem Verfahren von **Fig. 10** erhaltenen Feldes.

[0030] **Fig. 13A** ist ein Flussdiagramm eines bevorzugten Verfahrens zum Bestimmen einer Fokusposition.

[0031] **Fig. 13B** ist ein Flussdiagramm eines bevorzugten Verfahrens zum Bestimmen einer Fokusposition für mit Fast-Red gefärbte und mit Hämotoxylin gegengefärbte neutrophile Leukozyten.

[0032] **Fig. 14** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zum automatischen Bestimmen eines anfänglichen Fokus.

[0033] **Fig. 15** zeigt eine Anordnung von Objektträgerpositionen zur Verwendung bei dem Verfahren von **Fig. 14**.

[0034] **Fig. 16** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zum automatischen Fokussieren bei starker Vergrößerung.

[0035] **Fig. 17A** ist ein Flussdiagramm einer Gesamtansicht des bevorzugten Prozesses, um interessierende Objekte in einer gefärbten biologischen Probe auf einem Objektträger zu lokalisieren und zu identifizieren.

[0036] **Fig. 17B** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zur Farbraumumwandlung.

[0037] **Fig. 18** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zur Hintergrundunterdrückung über eine dyna-

mische Grenzwertbetrachtung.

[0038] **Fig. 19** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zum morphologischen Verarbeiten.

[0039] **Fig. 20** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zur Blob-Analyse.

[0040] **Fig. 21** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zur Bildverarbeitung bei stärker Vergrößerung.

[0041] **Fig. 22** veranschaulicht ein Mosaik von durch die Vorrichtung erzeugten Zellbildern.

[0042] **Fig. 23** ist ein Flussdiagramm eines Verfahrens zum Abschätzen der Anzahl kernhaltiger Zellen in einem Abtastbereich.

[0043] **Fig. 24** veranschaulicht die bei einer Benutzerschnittstelle der Vorrichtung verfügbaren Vorrichtungsfunktionen.

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform

[0044] Bezugnehmend auf die Figuren ist eine Vorrichtung zur automatischen Zellanalyse biologischer Proben im Ganzen durch das Bezugszeichen **10** angegeben, wie in der perspektivischen Ansicht in **Fig. 1** und in Form eines Blockdiagramms in **Fig. 2** gezeigt. Die Vorrichtung **10** umfasst ein Mikroskopteilsystem **32**, das in einem Gehäuse **12** untergebracht ist. Das Gehäuse **12** umfasst ein Eingabemagazin **16** für Objektträgerträgervorrichtungen und ein Ausgabemagazin **18** für Objektträgerträgervorrichtungen. Eine Tür **14** in dem Gehäuse **12** sichert das Mikroskopteilsystem von der äußeren Umgebung. Ein Computerteilsystem umfasst einen Computer **22** mit einem Systemprozessor **23**, einem Bildprozessor **25** und einem Kommunikationsmodem **29**. Das Computerteilsystem umfasst ferner einen Computermonitor **26** und einen Bildmonitor **27** und weitere externe periphere Geräte einschließlich einer Speichervorrichtung **21**, einer Trackball-Vorrichtung **30**, einer Tastatur **28** und einem Farbdrucker **35**. Eine externe Leistungsversorgung **24** zur Versorgung des Systems ist ebenfalls gezeigt. Betrachtungsokulare **20** des Mikroskopteilsystems ragen zum Betrachten durch eine Bedienperson aus dem Gehäuse **12** vor. Die Vorrichtung **10** umfasst ferner eine CCD-Kamera **42** zum Aufnehmen von Bildern durch das Mikroskopteilsystem **32**. Eine Mikroskopsteuereinrichtung **31** unter Steuerung des Systemprozessors **23** steuert eine Anzahl von im einzelnen weiter beschriebenen Funktionen des Mikroskopteilsystems. Ein automatischer Objektträgerzufuhrmechanismus **37** in Verbindung mit einer X-Y-Stufe **38** sorgt für eine automatische Handhabung von Objektträgern in der Vorrichtung **10**. Eine Lichtquelle **48** zur Beleuchtung projiziert Licht auf die X-Y-Stufe **38**, die nachfolgend durch das Mikroskopteilsystem **32** abgebildet und durch die CCD-Kamera **42** zum Verarbeiten in dem Bildprozessor **25** aufgenommen wird. Eine Z-Stufe oder Fokusstufe **46** unter Steuerung der Mikroskopsteuereinrichtung **31** sorgt zum Fokussieren für eine Verschiebung des Mikroskopteilsystems in der

Z-Ebene. Das Mikroskopteilsystem **32** umfasst ferner einen motorisierten Objektivrevolver **44** zum Auswählen von Objektiven.

[0045] Der Zweck der Vorrichtung **10** besteht darin, präparierte Mikroskopobjektträger zur Detektion und Zählung von interessierenden Zielobjekten, wie zum Beispiel normalen und abnormalen Zellen, z. B. Tumorzellen, unbeaufsichtigt automatisch abzutasten. Die Vorrichtung **10** kann zur Detektion seltener Ereignisse verwendet werden, bei der lediglich ein interessierendes Zielobjekt pro einige hunderttausend normale Zellen vorliegen kann, z. B. ein bis fünf interessierende Zielobjekte pro Quadratzentimeterbereich auf dem Objektträger. Die Vorrichtung **10** lokalisiert und zählt automatisch interessierende Zielobjekte und schätzt auf der Grundlage von Farb-, Größen- und Formcharakteristika die in einer biologischen Probe vorhandenen normalen Zellen ab. Eine Anzahl von Färbemitteln wird verwendet, um interessierende Zielobjekte und normale Zellen in bevorzugter Weise in unterschiedlichen Farben zu färben, so dass solche Zellen von einander unterschieden werden können.

[0046] Wie im Hintergrund der Erfindung angemerkt, kann eine biologische Probe mit einem Reagens präpariert sein, um ein gefärbtes nicht lösliches Präzipitat zu erhalten. Die Vorrichtung wird verwendet, um dieses Präzipitat als interessierendes Zielobjekt zu detektieren.

[0047] Beim Betrieb der Vorrichtung **10** befestigt ein Pathologe oder Labortechniker präparierte Objektträger auf Objektträgerträgervorrichtungen. Eine Objektträgerträgervorrichtung **60** ist in **Fig. 8** veranschaulicht und wird unten weiter beschrieben. Jede Objektträgervorrichtung hält bis zu vier Objektträger. Bis zu 25 Objektträgerträgervorrichtungen werden dann in das Eingabemagazin **16** geladen. Die Bedienperson kann dann die Größe, Form und Stelle des abzutastenden Bereichs spezifizieren oder alternativ kann das System diesen Bereich automatisch lokalisieren. Über eine grafische Benutzerschnittstelle weist die Bedienperson dann das System an, ein automatisches Abtasten der Objektträger zu starten. Ein unbeaufsichtigtes Abtasten beginnt mit dem automatischen Laden der ersten Objektträgervorrichtung und Objektträgers auf die präzisionsmotorisierte X-Y-Stufe **38**. Ein an dem Objektträger befestigtes Barcode-Etikett wird von einem Barcode-Lesegerät **33** während dieses Ladevorgangs gelesen. Jeder Objektträger wird dann bei einer benutzergewählten schwachen Mikroskopvergrößerung abgetastet, beispielsweise 10-x, um Zielzellen basierend auf deren Farb-, Größen- und Formcharakteristika zu identifizieren. Die X-Y-Stellen der Zielzellen werden gespeichert, wenn das Abtasten abgeschlossen ist.

[0048] Nachdem das Abtasten mit geringer Vergrößerung abgeschlossen ist, kehrt die Vorrichtung automatisch zu jeder Zielzelle zurück, bildet diese erneut ab und fokussiert diese erneut bei einer stärkeren Vergrößerung, wie zum Beispiel 40x, und führt

eine weitere Analyse durch, um die Zielzelle zu bestätigen. Die Vorrichtung speichert ein Bild der Zelle für eine spätere erneute Betrachtung durch einen Pathologen. Alle Ergebnisse und Bilder können in einer Speichervorrichtung **21** gespeichert werden, wie zum Beispiel eine entfernbare Festplatte oder ein DAT-Band, oder zu einer entfernten Stelle zur erneuten Betrachtung oder Speicherung übertragen werden. Die gespeicherten Bilder für jeden Objektträger können für eine spätere erneute Betrachtung in einem Mosaik von Bildern betrachtet werden. Zusätzlich kann der Pathologe oder die Betriebsperson eine detektierte Zelle auch unmittelbar durch das Mikroskop unter Verwendung des umfassten Okulars **20** oder auf dem Bildmonitor **27** betrachten.

[0049] Nachdem der Gesamtbetrieb der Vorrichtung **10** von einem hohen Niveau beschrieben wurde, werden die weiteren Details der Vorrichtung nun beschrieben. Bezugnehmend auf **Fig. 3** ist die Mikroskopsteuereinrichtung **31** detaillierter gezeigt. Die Mikroskopsteuereinrichtung **31** umfasst eine Anzahl von Teilsystemen, die über einen Systembus verbunden sind. Ein Systemprozessor **102** steuert diese Teilsysteme und wird über eine RS-232-Steuereinrichtung **110** von dem Vorrichtungssystemprozessor **23** gesteuert. Der Systemprozessor **102** steuert eine Gruppe von Motorsteuerteilsystemen **114** bis **124**, die die Eingabe- und Ausgabetransportvorrichtungen, den motorisierten Revolver **44**, die X-Y-Stufe **38** und die Z-Stufe **46** (**Fig. 2**) steuern. Ein Histogrammprozessor **108** erhält von der CCD-Kamera **42** eine Eingabe, um während des hier weiter beschriebenen Fokussierbetriebs Varianzdaten zu verarbeiten.

[0050] Der Systemprozessor **102** steuert ferner eine Beleuchtungssteuereinrichtung **106** zur Steuerung der Teilstufenbeleuchtung **48**. Die Lichtausbeute der Halogenglühbirne, die die Beleuchtung für das System bereitstellt, kann sich aufgrund der Alterung der Glühbirne, Änderungen der optischen Ausrichtung und weiteren Faktoren mit der Zeit ändern. Zusätzlich können Objektträger, die "überfärbt" wurden, die Kamerabelichtung auf ein nicht akzeptable Niveau reduzieren. Um diese Effekte zu kompensieren ist die Beleuchtungssteuereinrichtung **106** enthalten. Diese Steuereinrichtung wird in Verbindung mit Software zur Lichtsteuerung verwendet, um die Variationen des Lichtpegels zu kompensieren. Die Software zur Lichtsteuerung tastet die Ausgabe der Kamera in Intervallen (wie zum Beispiel zwischen dem Laden von Objektträgerträgervorrichtungen) ab und weist die Steuereinrichtung an, den Lichtpegel auf die gewünschten Pegel einzustellen. Auf diese Weise findet die Lichtsteuerung automatisch statt und ist für den Benutzer transparent und verlängert den Systembetrieb nicht zusätzlich.

[0051] Der Systemprozessor **23** ist vorzugsweise aus zwei parallelen Intel-Pentium-90-MHz-Vorrichtungen aufgebaut. Der Bildprozessor **25** ist vorzugsweise ein Matrox-Imaging-Series-640-Modell. Der Mikroskopsteuereinrichtungssystemprozessor **102**

ist eine Advanced-Micro-Devices-AMD 29K-Vorrichtung.

[0052] Bezugnehmend auf **Fig. 4** und **5** ist ein weiteres Detail der Vorrichtung **10** gezeigt. **Fig. 4** zeigt eine Ansicht der Vorrichtung **10**, bei der das Gehäuse **12** entfernt ist. Ein Teil des automatischen Objektträgerzufuhrmechanismus **37** ist links von dem Mikroskopteilsystem **32** gezeigt und umfasst eine Entladeanordnung **34** für Objektträgerträgervorrichtungen und eine Entladeplattform **36**, die in Verbindung mit dem Ausgabemagazin **18** für Objektträgerträgervorrichtungen arbeitet, um Objektträgerträgervorrichtungen aufzunehmen, die analysiert wurden.

[0053] Vibrationsisolationsbefestigungen **40**, die detaillierter in **Fig. 5** gezeigt sind, werden bereitgestellt, um das Mikroskopteilsystem **32** vor mechanischer Erschütterung und Vibration zu isolieren, die in einer typischen Laborumgebung auftreten können. Zusätzlich zu externen Vibrationsquellen kann der Hochgeschwindigkeitsbetrieb der X-Y-Stufe **38** Vibration in das Mikroskopteilsystem **32** induzieren. Solche Vibrationsquellen können von den elektro-optischen Teilsystemen isoliert werden, um unerwünschte Effekte auf die Bildqualität zu vermeiden. Die Isolationsbefestigungen **40** umfassen eine Feder **40a** und einen Kolben **4b**, der in einem Siliziumgel hoher Viskosität eingetaucht ist, das in einer Elastomermembran eingeschlossen ist, die an einem Gehäuse gefesselt ist, um Dämpfungsfaktoren in der Größenordnung von 17% bis 20% zu erreichen.

[0054] Das Merkmal, Objektträger automatisch zu handhaben, wird nun beschrieben. Das automatische Objektträgerhandhabungsteilsystem arbeitet zu einem Zeitpunkt an einer einzelnen Objektträgerträgervorrichtung. Eine Objektträgerträgervorrichtung **60** ist in **Fig. 6a** und **6b** gezeigt, die eine Ansicht von oben bzw. von unten bereitstellen. Die Objektträgerträgervorrichtung **60** umfasst bis zu vier Objektträger **70**, die mit einem Klebeband **62** befestigt sind. Die Trägervorrichtung **60** umfasst Ösen **64**, um die Trägervorrichtung in das Ausgabemagazin **80** zu hängen. Ein Hinterschnitt **66** und ein Teilungsrahmen **68** sind an dem oberen Rand der Objektträgerträgervorrichtung **60** zur mechanischen Handhabung der Objektträgerträgervorrichtung ausgebildet. Ein Keilnutausschnitt **65** ist in einer Seite der Trägervorrichtung **60** ausgebildet, um eine Ausrichtung von Trägervorrichtungen zu erleichtern. Ein präparierter Objektträger **72**, der auf der Objektträgerträgervorrichtung **60** befestigt ist, umfasst einen Probenbereich **72a** und einen Barcode-Etikettenbereich **72b**.

[0055] **Fig. 7a** stellt eine Ansicht von oben des Teilsystems zum Handhaben von Objektträgern bereit, das ein Objektträgerereingangsmodul **15**, ein Objektträgerausgabemodul **17** und ein X-Y-Stufenantriebsband **50** umfasst. **Fig. 7b** stellt eine Teilquerschnittsansicht entlang der Linie A-A von **Fig. 7a** bereit.

[0056] Das Objektträgerereingangsmodul **15** umfasst ein Eingangsmagazin **16** für Objektträgerträgetvorrichtungen, eine Ladeplattform **52** und eine Teilan-

ordnung **54** zum Laden von Objektträgerträgervorrichtungen. Das Eingangsmagazin **16** nimmt eine Reihe von Objektträgerträgervorrichtungen **60** (Fig. 6a und 6b) in einem Stapel auf der Ladeplattform **52** auf. Ein Führungszapfen **57** ragt von einer Seite des Eingangsmagazins **60** vor, an den der Keilnutausschnitt **65** (Fig. 6a) der Trägervorrichtung angepasst ist, um eine geeignete Ausrichtung zu erreichen.

[0057] Das Eingangsmodul **15** umfasst ferner in der Ladeplattform **52** befestigt eine sich drehende Schaltnocke **56** und einen Schalter **90**, deren Betrieb weiter unten beschrieben ist. Die Trägereinrichtungsladeteilanordnung **54** umfasst ein von einem Motor **86** angetriebenes Zufuhrantriebsband **59**. Das Zufuhrantriebsband **59** weist einen Mitnehmer **58** auf, um die Objektträgerträgervorrichtung horizontal in Richtung zu der X-Y-Stufe **38** zu befördern, wenn das Band angetrieben wird. Ein Rücklaufschalter **95** erfasst den Mitnehmer **58** während einer Umdrehung des Bandes **59**.

[0058] Insbesondere bezugnehmend auf Fig. 7a ist die X-Y-Stufe **38** mit X-Positions- und Y-Positions-Motoren **96** bzw. **97** gezeigt, die von der Mikroskopsteuereinrichtung **31** (Fig. 3) gesteuert und nicht als Teil des Objektträgerhandhabungsteilsystems betrachtet werden. Die X-Y-Stufe **38** umfasst ferner eine Öffnung **55**, um zu ermöglichen, dass die Beleuchtung die Objektträgerträgervorrichtung erreicht. Ein Schalter **91** ist benachbart der Öffnung **55** angebracht, um einen Kontakt mit der Trägervorrichtung zu erfassen und daraufhin einen Motor **87** zu aktivieren, um ein Stufenantriebsband **50** (Fig. 7b) anzutreiben. Das Antriebsband **50** ist ein doppelseitiger Synchronriemen mit Zähnen, um an dem Teilungsrahmen **68** der Trägervorrichtung **60** (Fig. 6b) anzugreifen.

[0059] Das Objektträgerausgabemodul **17** umfasst ein Ausgabemagazin **18** für Objektträgerträgervorrichtungen, eine Entladeplattform **36** und eine Teilanordnung **34** zum Entladen von Objektträgerträgervorrichtungen. Die Entladeteilanordnung **34** umfasst einen Motor **89**, um während eines weiter unten beschriebenen Entladebetriebs die Entladeplattform **36** um eine Welle **98** zu drehen. Ein durch einen Motor **88** angetriebenes Ausfuhrzahnrad **93** greift drehend an dem Teilungsrahmen **68** der Trägervorrichtung **60** (Fig. 6b) an, um die Trägervorrichtung zu einer Ruheposition gegen einen Schalter **92** zu transportieren. Ein federbelasteter Mechanismus zum Herunterhalten hält die Trägervorrichtung auf der Entladeplattform **36** an Ort und Stelle.

[0060] Nun wird der Objektträgerhandhabungsprozess beschrieben. Bezugnehmend auf Fig. 8 ist eine Reihe von Objektträgerträgervorrichtungen **60** gezeigt, die mit den oberen Rändern **60a** ausgerichtet in dem Eingabemagazin **16** gestapelt sind. Wenn der Objektträgerhandhabungsbetrieb beginnt, bewegt sich die von dem Motor **85** angetriebene Schaltnocke **56** um eine Umdrehung weiter, um zu ermöglichen,

dass lediglich eine Objektträgerträgervorrichtung auf den Boden des Magazins **16** und auf die Ladeplattform **52** fällt.

[0061] Fig. 8a–8d zeigen die Funktionsweise der Nocke detaillierter. Die Nocke **56** umfasst eine Nabe **56a**, an der obere und untere Blätter **56b** bzw. **56c** befestigt sind. Die Blätter **56b**, **56c** sind halbkreisförmige Fortsätze, die gegenüberliegend angeordnet und vertikal beabstandet sind. In einer ersten, in Fig. 8a gezeigten Position unterstützt das obere Blatt **56b** die untere Trägereinrichtung an dem Hinterschnittbereich **66**. Bei einer in Fig. 8b gezeigten Position der um 180° gedrehten Nocke **56** unterstützt das obere Blatt **56b** die Trägervorrichtung nicht länger und statt dessen ist die Trägervorrichtung etwas hinunter gefallen und wird von dem unteren Blatt **56c** unterstützt. Fig. 8c zeigt die Position der um 270° gedrehten Nocke **56**, bei der sich das obere Blatt **56** ausreichend gedreht hat, um anzufangen, an dem Hinterschnitt **66** der nächsten Objektträgerträgervorrichtung anzugreifen, während das gegenüberliegende untere Blatt **56c** weiterhin die untere Trägervorrichtung unterstützt. Nach einer vollen Umdrehung von 360°, wie in Fig. 8d gezeigt, hat sich das untere Blatt **56c** gegenüber dem Trägervorrichtungsstapel gedreht und unterstützt die untere Trägervorrichtung nicht länger, die nun auf der Ladeplattform **52** ruht. In der gleichen Position unterstützt das obere Blatt **56b** die nächste Trägervorrichtung, um den Zyklus zu wiederholen.

[0062] Bezugnehmend auf Fig. 7a und 7b schließt der Kontakt, wenn die Trägervorrichtung auf die Ladeplattform **52** fällt, den Schalter **90**, der die Motoren **86** und **87** aktiviert. Der Motor **86** treibt das Zufuhrantriebsband **59** an, bis der Mitnehmer **58** Kontakt mit der Trägervorrichtung herstellt und die Trägervorrichtung auf das X-Y-Stufenantriebsband **50** befördert. Das Stufenantriebsband **50** bewegt die Trägervorrichtung weiter, bis ein Kontakt mit dem Schalter **91** hergestellt wird, dessen Schließen den hier weiter beschriebenen Objektträgerabtastprozess einleitet. Bei Abschluss des Abtastprozesses bewegt sich die X-Y-Stufe **38** zu einer Entladeposition und die Motoren **87** und **88** werden aktiviert, um die Trägervorrichtung unter Verwendung des Stufenantriebsbandes **50** zu der Entladeplattform **36** zu transportieren. Wie angemerkt, treibt der Motor **88** das Ausfuhrzahnrad **93** an, um an dem Trägervorrichtungsteilungsrahmen **98** der Trägervorrichtung **60** (Fig. 6b) anzugreifen, bis der Schalter **92** kontaktiert wird. Ein Schließen des Schalters **92** aktiviert den Motor **89**, um die Entladeplattform **36** zu drehen.

[0063] Der Entladebetrieb ist detaillierter in den Seitenansichten des Ausgabemoduls **17** (Fig. 9a – 9d) gezeigt. In Fig. 9a ist die Entladeplattform **36** in einer horizontalen, eine Objektträgerträgervorrichtung **60** abstützenden Position gezeigt. Der Mechanismus **94** zum Herunterhalten sichert die Trägervorrichtung **60** an einem Ende. Fig. 9b zeigt das Ausgabemodul **17** nachdem der Motor **89** die Entladeplattform **36** in

eine vertikale Position gedreht hat, wo der federbelastete Mechanismus **94** zum Herunterhalten die Objektträgerträgervorrichtung **60** in das Ausgabemagazin **18** freigibt. Die Trägervorrichtung **60** wird in dem Ausgabemagazin **18** mittels Ösen **64** (Fig. 6a und 6b) abgestützt. Fig. 9c zeigt die Entladeplattform **36** zurück in Richtung zu der horizontalen Position gedreht. Wenn sich die Plattform **36** nach oben dreht, kontaktiert sie die abgelegte Trägervorrichtung **60** und die Bewegung nach oben schiebt die Trägervorrichtung in Richtung zu der Vorderseite des Ausgabemagazins **18**. Fig. 9d zeigt die Entladeplattform **36** in ihrer ursprünglichen horizontalen Position, nachdem eine Reihe von Objektträgerträgervorrichtungen **60** zu dem Ausgabemagazin **18** ausgegeben wurden.

[0064] Nachdem das Gesamtsystem und das Merkmal, Objektträger automatisch zu handhaben, beschrieben wurden, werden nun die Aspekte der Vorrichtung **10** detaillierter beschrieben, die das Abtasten, Fokussieren und die Bildverarbeitung betreffen.

[0065] In einigen Fällen wird eine Bedienperson vorab wissen, wo sich der interessierende Abtastbereich auf dem Objektträger befindet. Eine herkömmliche Präparation von Objektträgern zur Untersuchung sorgt für eine wiederholbare und bekannte Anordnung der Probe auf dem Objektträger. Die Bedienperson kann daher das System anweisen, immer den gleichen Bereich an der gleichen Stelle jedes Objektträgers abzutasten, der auf diese Weise präpariert ist. Aber es gibt auch andere Gelegenheiten, wo der interessierende Bereich nicht bekannt ist, zum Beispiel wenn Objektträger mit einer bekannten Abstrichtechnik manuell präpariert werden. Ein Merkmal der Erfindung bestimmt den Abtastbereich automatisch, wobei ein Texturanalyseverfahren verwendet wird.

[0066] Fig. 10 ist ein Flussdiagramm, das das Verfahren beschreibt, das mit dem automatischen Lokalisieren eines Abtastbereichs verbunden ist. Wie in dieser Figur gezeigt, besteht das grundlegende Verfahren darin, die gesamte Objektträgerfläche vorab abzutasten, um Texturmerkmale zu bestimmen, die das Vorhandensein eines Abstrichs angeben, und diese Bereiche von Schmutz und anderen Artefakten zu unterscheiden.

[0067] An jeder Stelle dieser Rasterabtastung wird bei Schritten 204 und 206 ein Bild, wie zum Beispiel in Fig. 12, aufgenommen und hinsichtlich Texturinformationen analysiert. Da es erwünscht ist, die Ränder einer Abstrichprobe innerhalb eines vorgegebenen Bildes zu lokalisieren, werden Texturanalysen über als Fenster **78** bezeichnete Bereiche ausgeführt, die kleiner sind, als das gesamte in Fig. 12 gezeigte Bild. Das Verfahren iteriert die Abtastung über den Objektträger bei Schritten 208, 210, 212 und 214.

[0068] Aus Geschwindigkeitsgründen wird das Texturanalyseverfahren bei einer geringeren Vergrößerung durchgeführt, vorzugsweise bei einem 4x-Objektiv. Ein Grund, bei geringer Vergrößerung zu arbei-

ten, besteht darin, den größten Objektträgerbereich lediglich einmal abzubilden. Da bei dieser Stufe der Analyse des gesamten Bildes Zellen noch nicht aufgelöst werden müssen, ist die 4x-Vergrößerung bevorzugt. Auf einem typischen Objektträger, wie zum Beispiel in Fig. 11 gezeigt, ist ein Bereich **72b** des Endes des Objektträgers **72** zum Etikettieren mit Identifikationsinformationen reserviert. Mit der Ausnahme dieses Etikettienbereichs wird der gesamte Objektträger in eine Rasterabtastweise **76** abgetastet, um eine Anzahl benachbarter Bilder zu erhalten. [0069] Texturwerte für jedes Fenster umfassen die Pixelvarianz über einem Fenster, den Unterschied zwischen dem größten und dem kleinsten Pixelwert innerhalb eines Fensters und andere Indikatoren. Das Vorhandensein eines Abstrichs erhöht verglichen mit einem leeren Bereich die Texturwerte.

[0070] Ein Problem bei einem Abstrich, dessen Stelle zu bestimmen, besteht in seiner nicht gleichmäßigen Dicke und Textur. Beispielweise neigt der Abstrich dazu, an den Rändern relativ dünn und in Richtung zu der Mitte aufgrund des Charakters des Abstrichverfahrens dicker zu sein. Um diese Ungleichmäßigkeit zu berücksichtigen, stellt die Texturanalyse einen Texturwert für jeden analysierten Bereich bereit. Der Texturwert tendiert dazu, allmählich anzusteigen, wenn die Abtastung über einen Abstrich von einem dünnen Bereich zu einem dicken Bereich fortschreitet, erreicht einen Spitzenwert und fällt dann wiederum auf einen niedrigeren Wert ab, wenn ein dünner Bereich an dem Rand erreicht wird. Das Problem besteht dann darin, aus der Reihe von Texturwerten den Anfang und das Ende oder die Ränder des Abstrichs zu bestimmen. Die Texturwerte werden an eine Rechteckwellenform angepasst; da die Texturdaten keine klaren Anfänge und Enden aufweisen.

[0071] Nachdem dieser Abtast- und Texturevaluierungsbetrieb durchgeführt ist, ist zu bestimmen, welche Bereiche mit erhöhten Texturwerten den gewünschten Abstrich **74** wiedergeben und welche unerwünschte Artefakte wiedergeben. Dies wird erreicht, indem im Schritt 216 eine Sprungfunktion zeilenweise auf Texturwerte angepasst wird. Diese Funktion, die einer einzelnen Rechteckwelle über dem Abstrich mit einem Anfang an einem Rand und einem Ende an dem anderen Rand ähnlich ist, und eine Amplitude stellen die Mittel zur Unterscheidung bereit. Die Amplitude der Bestangepassungssprungfunktion wird verwendet, um festzustellen, ob ein Abstrich oder eine Verunreinigung vorhanden ist, da relativ hohe Werte einen Abstrich angeben. Wenn festgestellt ist, dass ein Abstrich vorhanden ist, werden die Anfangs- und Endkoordinaten dieses Musters notiert, bis alle Zeilen verarbeitet wurden, und der Abstrichprobenbereich bei 218 definiert ist.

[0072] Nach einem anfänglichen, hier ferner beschriebenen Fokussierbetrieb, wird der interessierende Abtastbereich abgetastet, um Bilder zur Bildanalyse aufzunehmen. Das bevorzugte Betriebsver-

fahren besteht darin, anfänglich eine vollständige Abtastung des Objektträgers bei geringer Vergrößerung durchzuführen, um interessierende Zielobjekte zu identifizieren und zu lokalisieren, gefolgt von einer weiteren Bildanalyse der interessierenden Zielobjekte bei starker Vergrößerung, um die Objekte als Zellen zu bestätigen. Ein alternative Betriebsverfahren besteht darin, eine Bildanalyse jedes interessierenden Zielobjekts bei starker Vergrößerung durchzuführen, unmittelbar nachdem das Objekt bei geringer Vergrößerung identifiziert worden ist. Das Abtasten bei geringer Vergrößerung wird dann fortgesetzt, wobei weitere interessierende Zielobjekte gesucht werden. Da es in der Größenordnung von wenigen Sekunden dauert, Objektive auszutauschen, würde dieses alternative Betriebsverfahren länger benötigen, um abgeschlossen zu werden.

[0073] Die Bedienperson kann eine Vergrößerungsstufe vorab wählen, die für den Abtastbetrieb verwendet werden soll. Eine geringe, ein 10×-Objektiv verwendende Vergrößerung ist für den Abtastbetrieb bevorzugt, da anfänglich ein größerer Bereich für jedes aufgenommene Abtastbild analysiert werden kann. Der gesamte Detektionsprozess für eine Zelle umfasst eine Kombination von Entscheidungen, die sowohl bei geringen (10×) als auch starken (40×) Vergrößerungsstufen getroffen werden. Die Entscheidungsfindung bei der 10×-Vergrößerungsstufe ist im Umfang größer, das heißt Objekte, die den relevanten Farb-, Größen- und Formcharakteristika in etwa entsprechen, werden bei der 10×-Stufe identifiziert. Die Analyse bei der 40×-Vergrößerungsstufe geht dann weiter, um die Entscheidungsfindung zu verfeinern und Objekte als in Frage kommende Zellen oder interessierende Zielobjekte zu bestätigen. Beispielsweise ist es bei der 40×-Stufe nicht ungewöhnlich, festzustellen, dass einige Objekte, die bei 10× identifiziert wurden, Artefakte sind, die der Analyseprozess dann verwerfen wird. Zusätzlich werden bei der 40×-Stufe bei 10× dicht gepackt erscheinende interessierende Objekte getrennt.

[0074] In einer Situation, in der eine Zelle sich über benachbarte Bildfelder erstreckt oder diese überlappt, könnte eine Bildanalyse der einzelnen benachbarten Bildfelder dazu führen, dass die Zelle verworfen oder nicht entdeckt wird. Um ein Auslassen derartiger Zellen zu vermeiden, kompensiert der Abtastbetrieb, indem sowohl in den X- als auch den Y-Richtungen benachbarte Bildfelder überlappt werden. Eine Überlappung, größer als die Hälfte des Durchmessers einer durchschnittlichen Zelle, wird bevorzugt. Bei der bevorzugten Ausführungsform wird die Überlappung als Anteil des Bildfeldes in den X und Y-Richtungen spezifiziert.

[0075] Die Zeitdauer, um eine Bildanalyse abzuschließen, kann von der Größe des Abtastbereichs und der Anzahl von identifizierten Zielzellen oder interessierenden Objekten abhängen. Beispielsweise kann eine vollständige Bildanalyse eines Abtastbereichs von zwei Quadratentimetern, in dem 50 inter-

essierende Objekte bestätigt werden, in etwa 12 bis 15 Minuten durchgeführt werden. Dieses Beispiel umfasst nicht nur das Fokussieren, Abtasten und die Bildanalyse, sondern auch das Speichern von 40×-Bilder als Mosaik auf einer Festplatte **21 (Fig. 2)**. [0076] Zu berücksichtigen ist die Brauchbarkeit der vorliegenden Erfindung bei einer "seltenes Ereignis"-Anwendung, wo ein, zwei oder eine sehr geringe Anzahl von interessierenden Zellen irgendwo auf dem Objektträger angeordnet sein können. Um die Eigenart dieses Problems mittels Analogie zu veranschaulichen, würde beispielsweise eine Tumorzelle in etwa die Größe eines Flaschenverschlusses aufweisen, wenn man einen Objektträger auf die Größe eines Football-Feldes skaliert. Das Problem besteht dann darin, dass Football-Feld schnell zu untersuchen und die geringe Anzahl von Flaschenverschlüssen zu finden und eine hohe Sicherheit zu erhalten, dass keiner ausgelassen wurde.

[0077] Wenn jedoch der Abtastbereich definiert ist, muss vor einem Abtasten an jedem Objektträger ein anfänglicher Fokussierbetrieb durchgeführt werden. Dies ist erforderlich, da sich Objektträger im Allgemeinen hinsichtlich ihrer Anordnung in einer Trägervorrichtung unterscheiden. Diese Unterschiede umfassen geringe (aber signifikante) Variationen der Neigung des Objektträgers in seiner Trägervorrichtung. Da jeder Objektträger beim Abtasten im Fokus bleiben muss, ist der Neigungsgrad jedes Objektträgers zu bestimmen. Dies wird mit einem anfänglichen Fokussierbetrieb erreicht, der den exakten Neigungsgrad bestimmt, so dass beim Abtasten die Fokussierung automatisch beibehalten werden kann.

[0078] Der anfängliche Fokussierbetrieb und andere später zu beschreibende Fokussieroperationen verwenden ein Fokussierverfahren, das auf einer Verarbeitung von mittels dem System aufgenommenen Bildern basiert. Dieses Verfahren wurde aufgrund seiner Einfachheit gegenüber anderen Verfahren einschließlich der Verwendung von von der Objektträgeroberfläche reflektierten IR-Strahlen und der Verwendung von mechanischen Lehren gewählt. Diese anderen Verfahren würden auch nicht ordnungsgemäß funktionieren, wenn die Probe mit einem Abdeckglas geschützt ist. Das bevorzugte Verfahren resultiert in geringeren Systemkosten und einer verbesserten Zuverlässigkeit, da keine zusätzlichen Teile aufgenommen werden müssen, um eine Fokussieren durchzuführen.

[0079] **Fig. 13a** stellt ein Flussdiagramm bereit, das die "Fokuspunkt"-Prozedur beschreibt. Das grundlegende Verfahren beruht auf dem Umstand, dass die Pixelwertvarianz (oder Standardabweichung) über dem Pixelwertmittelwert beim besten Fokus maximal ist. Ein "Gewalt"-Verfahren könnte einfach schrittweise fokussieren, wobei die computergesteuerte Z- oder Fokusstufe verwendet wird, bei jedem Schritt die Pixelvarianz berechnen und zu der Fokusposition zurückkehren, die die maximale Varianz bereitstellt. Ein derartiges Verfahren wäre zu zeitaufwändig. Da-

her wurden zusätzliche Merkmale, wie in **Fig. 13A** gezeigt, hinzugefügt.

[0080] Diese Merkmale umfassen die Bestimmung der Pixelvarianz bei einer relativ groben Anzahl von Fokuspositionen und dann das Anpassen einer Kurve an die Daten, um ein schnelleres Mittel bereitzustellen, um den optimalen Fokus zu bestimmen. Dieser grundlegende Prozess wird in zwei Schritten, einem Groben und einem Feinen, angewendet.

[0081] Während des groben Schritts bei 230–230 wird die Z-Stufe über einen von dem Benutzer spezifizierten Bereich von Fokuspositionen schrittweise weiterbewegt, wobei die Schrittgrößen auch von dem Benutzer spezifiziert sind. Es wurde festgestellt, dass zum groben Fokussieren diese Daten eine gute Anpassung an eine Gaußfunktion darstellen. Daher wird bei 228 dieser anfängliche Datensatz von Varianzen gegenüber Fokuspositionen einer Anpassung gemäß kleinster Quadrate an eine Gaußfunktion unterworfen.

[0082] Die Stelle des Spitzenwerts dieser Gaußkurve bestimmt die anfängliche oder grobe Abschätzung der Fokusposition für die Eingabe zu Schritt 232.

[0083] Diesem Folgend wird ein zweiter Schrittbetrieb 232–242 durchgeführt, wobei kleinere Schritte über einen kleineren Fokusbereich verwendet werden, der bezüglich der Position des groben Fokus zentriert ist. Die Erfahrung zeigt, dass diese über diesen kleineren Bereich aufgenommenen Daten im Allgemeinen mittels eines Polynoms zweiter Ordnung am besten angepasst werden. Wenn diese Anpassung gemäß kleinster Quadrate bei 240 durchgeführt ist, stellt der Spitzenwert der Kurve zweiter Ordnung bei 244 die Position des genauen Fokus bereit.

[0084] **Fig. 14** veranschaulicht eine Prozedur, wie dieses Fokussierverfahren verwendet wird, um die Orientierung eines Objektträgers in ihrer Trägervorrichtung zu bestimmen. Wie gezeigt, werden, wie oben beschrieben, bei 264 Fokuspositionen für ein 3×3-Gitter bestimmt, das bezüglich des Abtastbereichs zentriert ist. Sollte einer oder mehrerer dieser Punkte außerhalb des Abtastbereichs liegen, erkennt das Verfahren bei Schritt 266 dies aufgrund der geringen Werte der Pixelvarianz. In diesem Fall werden zusätzliche Punkte näher zu der Mitte des Abtastbereichs gewählt. **Fig. 15** zeigt die anfängliche Anordnung von Punkten **80** und einen neuen Punkt **82**, der näher der Mitte gewählt ist. Wenn diese Anordnung von Fokuspositionen bei 268 bestimmt ist, wird bei 270 eine Ebene kleinster Quadrate auf diese Daten angepasst. Fokuspunkte, die zu weit oberhalb oder unterhalb dieser Bestangepassungsebene liegen, werden bei 272 verworfen (was zum Beispiel von einem schmutzigen Abdeckglas über dem Abtastbereich herrühren kann), wobei die Daten dann erneut angepasst werden. Diese Ebene stellt bei 274 dann die gewünschte Z-Positionsinformation bereit, um beim Abtasten die Fokussierung beizubehalten.

[0085] Nach Bestimmung der Bestangepassungsebene wird der Abtastbereich, wie vorher beschrie-

ben, in einer X-Rasterabtastung abgetastet. Beim Abtasten wird die X-Stufe auf den Startpunkt des Abtastbereichs positioniert, wird die Fokus-(Z)-Stufe auf die Bestangepassungsebene positioniert, wird ein Bild aufgenommen und wie später beschrieben verarbeitet, wobei dieser Prozess für alle Punkte über dem Abtastbereich wiederholt wird. Auf diese Weise wird die Fokussierung automatisch beibehalten, ohne dass dabei ein zeitaufwändiges erneutes Fokussieren an Punkten beim Abtasten erforderlich ist. [0086] Vor einer Bestätigung von Zellobjekten bei einer 40×- oder 60×-Stufe wird ein Refokussierbetrieb durchgeführt, der die Verwendung dieser stärkeren Vergrößerung einen präziseren Fokus erfordert, als die Ebene bester Anpassung bereitstellt. **Fig. 16** stellt das Flussdiagramm für diesen Prozess bereit. Wie zu sehen, ist dieser Prozess mit dem vorher beschriebenen Feinfokusverfahren dahingehend vergleichbar, dass es das Ziel ist, die Bildpixelvarianz zu maximieren. Dies wird erreicht, indem bei 276, 278 durch einen Bereich von Fokuspositionen mit der Z-Stufe schrittweise vorgegangen, bei 278 die Bildvarianz an jeder Position berechnet, bei 282 ein Polynom zweiter Ordnung an diese Daten angepasst und bei 284, 286 der Spitzenwert dieser Kurve berechnet werden, um eine Abschätzung der besten Fokusposition zu erreichen. Dieser letzte Fokussierschritt unterscheidet sich von den vorherigen dahingehend, dass der Fokusbereich und die Fokusschrittgröße kleiner sind, da diese Vergrößerung Fokuseinstellungen auf innerhalb von 0,5 Mikron oder besser erfordert.

[0087] Es sollte angemerkt werden, dass für einige Kombinationen von Zellfärbungscharakteristika ein verbesserter Fokus erreicht werden, indem die Fokusposition, die die größte Varianz bereit stellt, im Gegensatz zur Auswahl des Spitzenwerts des Polynoms numerisch ausgewählt wird. In solchen Fällen wird das Polynom verwendet, um eine Abschätzung des besten Fokus bereitzustellen, und ein letzter Schritt wählt die tatsächliche Z-Position aus, die die höchste Pixelvarianz liefert. Es sollte auch angemerkt werden, dass, falls zu einem Zeitpunkt während des Fokussierprozesses bei 40× oder 60× die Parameter angeben, dass die Fokusposition unzulänglich ist, das System automatisch zu einem groben Fokussierprozess, wie oben unter Bezugnahme auf

[0088] **Fig. 13A** beschrieben, zurückkehrt. Dies gewährleistet, dass Variationen der Probendicke auf schnelle Weise berücksichtigt werden können.

[0089] Für einige biologische Proben und Färbemittel stellen die oben diskutierten Fokussierverfahren keine optimal fokussierten Ergebnisse bereit. Beispielsweise können bestimmte weiße, als Neutrophile bekannte Blutzellen mit Fast-Red, einem allgemein bekannten Färbemittel, gefärbt sein, um eine alkalische Phosphatase in dem Zytoplasma der Zellen zu identifizieren. Um diese Zellen und das Material in diesen weiter zu identifizieren, kann die Probe mit

Hämotoxylin gegengefärbt sein, um den Nukleus der Zellen zu identifizieren. Bei so behandelten Zellen nimmt das die alkalische Phosphatase tragende Zytoplasma einen roten Farbton an, der zu der Menge alkalischer Phosphatase in dem Zytoplasma proportional ist, wobei der Nukleus blau wird. Dort, wo sich das Zytoplasma und der Nukleus überlappen, erscheint die Zelle jedoch purpurrot. Diese Farbkombinationen scheinen das Auffinden einer fokussierten Z-Position unter Verwendung des oben diskutierten Fokusprozesses auszuschließen.

[0090] Im Bemühen, bei starker Vergrößerung eine beste Fokusposition zu finden; kann ein Fokusverfahren, wie das in **Fig. 13B** gezeigte, verwendet werden. Dieses Verfahren beginnt, indem ein Pixel nahe des Mittelpunkts eines interessierenden Zielobjekts ausgewählt (Block **248**) und ein interessierender, über dem ausgewählten Pixel zentrierter Bereich definiert werden (Block **250**). Vorzugsweise entspricht die Breite des interessierenden Bereichs einer Anzahl von Spalten, die ein Vielfaches von 2 ist. Diese Breitenpräferenz rührt von dem nachfolgenden Verarbeiten des interessierenden Bereichs her, wobei vorzugsweise ein eindimensionales schnelles Fourier-Transformations(FFT)--Verfahren verwendet wird. Wie auf dem Gebiet gut bekannt, wird ein Verarbeiten von Spalten von Pixelwerten unter Verwendung des FFT-Verfahrens erleichtert, indem die Anzahl von zu verarbeitenden Spalten als Vielfaches von 2 angelegt wird. Während die Höhe des interessierenden Bereichs bei der bevorzugten Ausführungsform ebenfalls eine Vielfache von 2 ist, muss sie dies nicht sein, sofern nicht ein zweidimensionales FFT-Verfahren verwendet wird, um den interessierenden Bereich zu verarbeiten.

[0091] Nachdem der interessierende Bereich ausgewählt ist, werden die Spalten von Pixelwerten verarbeitet, wobei die bevorzugte eindimensionale FFT verwendet wird, um ein Spektrum von Frequenzkomponenten für den interessierenden Bereich zu bestimmen (Block **252**). Das Frequenzspektrum reicht von DC zu einer Höchstfrequenzkomponente. Für jede Frequenzkomponente wird eine komplexe Größe berechnet. Vorzugsweise werden die komplexen Größen für die Frequenzkomponenten, die von näherungsweise 25 % der größten Komponente zu näherungsweise 75 % der größten Komponente reichen, quadriert und summiert, um die Gesamtleistung für den interessierenden Bereich zu bestimmen (Block **254**). Alternativ kann der interessierende Bereich mit einem Glättungsfenster, wie z. B. einem Hanning-Fenster, bearbeitet werden, um die unerwünschten Hochfrequenzkomponenten zu reduzieren, die von der FFT-Verarbeitung der Pixelwerte in dem interessierenden Bereich erzeugt werden. Eine solche Vorverarbeitung des interessierenden Bereichs erlaubt es, alle komplexen Größen über dem gesamten Frequenzbereich zu quadrieren und zu summieren. Nachdem die Leistung für einen Bereich berechnet und gespeichert wurde (Block **256**), wird

eine neue Fokusposition ausgewählt, der Fokus eingestellt (Blöcke **258**, **260**) und der Prozess wiederholt. Nachdem jede Fokusposition evaluiert wurde, wird die, die den größten Leitungsfaktor aufweist, als die am Besten fokussierte ausgewählt (Block **262**).

[0092] Das Folgende beschreibt die Bildverarbeitungsverfahren, die verwendet werden, um zu entscheiden, ob ein interessierendes Zielobjekt, wie z. B. eine gefärbte Tumorzelle, in einem vorgegebenen Bild oder Feld während des Abtastprozesses vorhanden ist. Interessierende Zielobjekte, die während des Abtastens detektiert werden, werden bei stärkerer (40× oder 60×) Vergrößerung erneut wiedergegeben, die Entscheidung wird bestätigt und ein interessierender Bereich für diese Zelle wird für eine spätere Überprüfung durch den Pathologen gespeichert.

[0093] Die Bildverarbeitung umfasst eine Farbraumumwandlung, Tiefpassfilterung, Hintergrundunterdrückung, Artefaktunterdrückung, eine morphologische Verarbeitung und Blob-Analyse. Einer oder mehrere der letzteren Schritte kann optional weggelassen werden. Der Bedienperson wird eine Option bereitgestellt, um das System zu konfigurieren, um einen oder alle dieser Schritte durchzuführen, und ob bestimmte Schritte mehr als einmal oder zu mehreren Zeitpunkten in einer Reihe durchzuführen sind. Es sollte auch angemerkt werden, dass die Schrittfolge variiert und dadurch für spezifische Reaktanden oder Reaktandenkombinationen optimiert werden kann; die hier beschriebene Abfolge ist jedoch bevorzugt. Es sollte angemerkt werden, dass die Bildverarbeitungsschritte der Tiefpassfilterung, der Grenzwertbetrachtung, der morphologischen Verarbeitung und der Blob-Analyse allgemein bekannte Bildverarbeitungsbausteine sind.

[0094] Ein Überblick des bevorzugten Prozesses ist in **Fig. 17A** gezeigt. Der bevorzugte Prozess zum Identifizieren und Lokalisieren interessierender Zielobjekte in einer gefärbten biologischen Probe auf einem Objektträger beginnt mit einer Erfassung von Bildern, die durch Abtasten des Objektträgers bei geringer Vergrößerung erhalten werden (Block **288**). Jedes Bild wird dann von einem ersten Farbraum zu einem zweiten Farbraum umgewandelt (Block **290**) und das farbumgewandelte Bild wird tiefpassgefiltert (Block **292**). Die Pixel des tiefpassgefilterten Bildes werden dann mit einem Grenzwert verglichen (Block **294**) und vorzugsweise werden diejenigen Pixel, die einen Wert gleich oder größer als der Grenzwert aufweisen, als Zielobjekt interessierender Pixel identifiziert und die kleiner als der Grenzwert werden als Artefakt- oder Hintergrundpixel festgelegt. Das Zielobjekt interessierender Pixel wird dann morphologisch verarbeitet, um Gruppen von Zielobjekten interessierender Pixel als die interessierenden Zielobjekte zu identifizieren (Block **296**). Diese interessierenden Zielobjekte werden dann mit Blob-Analyse-Parametern verglichen (Block **298**), um interessierende Zielobjekte weiter von Objekten zu unterscheiden, die nicht mit den Blob-Analyse-Parametern übereinstimmen.

men und dementsprechend ein weiteres Verarbeiten nicht gewährleisten. Die Stelle der interessierenden Zielobjekte kann vor einer Bestätigung bei starker Vergrößerung gespeichert werden. Der Prozess setzt sich fort, indem festgestellt wird, ob die interessierenden Zielobjekte bestätigt wurden (Block **300**). Wenn diese nicht bestätigt wurden, wird das optische System auf eine starke Vergrößerung eingestellt (Block **302**) und Bilder auf dem Objektträger an den Stellen, die den interessierenden, in den Bildern geringer Vergrößerung identifizierten Zielobjekten entsprechen, werden aufgenommen (Block **288**). Diese Bilder werden dann farbumgewandelt (Block **290**), tiefpassgefiltert (Block **292**), mit einem Grenzwert verglichen (Block **294**), morphologisch verarbeitet (Block **296**) und mit Blob-Analyse-Parametern verglichen (Block **298**), um zu bestätigen, welche interessierenden, aus den Bildern geringer Vergrößerung lokalisierten Zielobjekten interessierende Objekte sind. Die Koordinaten der interessierenden Objekte werden dann zur späteren Verwendung gespeichert (Block **303**).

[0095] Verarbeitungsschemata mit neuronalen Netzen wurden aus verschiedenen Gründen für die bevorzugte Ausführungsform nicht berücksichtigt. Erstens ist die bevorzugte Ausführungsform für "seltene Ereignis"-Detektion optimiert, auch wenn sie nicht auf diesen Fall beschränkt ist. Da neuronale Netze trainiert werden müssen, wonach sie suchen sollen, müssen dem neuronalen Netz manchmal einige tausend Beispiele für dieses Training präsentiert werden. Dies ist für eine Anwendung bei seltenen Ereignissen unpraktisch. Zweitens kann eine Verarbeitung mit neuronalen Netzen manchmal um große Faktoren langsamer als "deterministische" Verfahren sein. Daher wurden neuronale Netze als nicht geeignet für diese Erfindung erachtet, auch wenn bestimmte Merkmale der Erfindung vorteilhafterweise auf neuronale Netzwerke angewendet werden können.

[0096] Im Allgemeinen werden interessierende Zielobjekte, wie z. B. Tumorzellen, basierend auf einer Kombination von Charakteristika, einschließlich Größe, Farbe und Form, detektiert. Die Kette der Entscheidungsfindung basierend auf diesen Charakteristika beginnt vorzugsweise mit einem Farbraumumwandlungsprozess. Die mit dem Mikroskopteilsystem verbundene CCD-Kamera gibt ein Farbbild aus, das eine Matrix von 640×480 Pixel umfasst. Jedes Pixel umfasst rote, grüne und blaue (RGB) Signalwerte.

[0097] Es ist wünschenswert, die Matrix von RGB-Werten in einen anderen Farbraum umzuwandeln, da der Unterschied zwischen interessierenden Zielobjekten und ihrem Hintergrund, wie z. B. Tumorzellen und normalen Zellen, aus deren entsprechenden Farben bestimmt werden kann. Proben werden im Allgemeinen mit einem oder mehreren Industriestandardfärbemitteln (z. B. DAB, New Fuchsin, AEC) gefärbt, die "rötlich" sind. Interessierende Zielobjekte binden mehr des Färbemittels und erscheinen somit rot, während normale Zellen ungefärbt bleiben. Die Proben können auch mit Hämatoxylin gegengefärbt

werden, so dass die Nuklei normaler Zellen oder Zellen die kein interessierendes Objekt enthalten, blau erscheinen. Zusätzlich zu diesen Objekten können Schmutz und Kleinteile als schwarz, grau erscheinen oder können auch abhängig von den verwendeten Färbeverfahren leicht rot oder blau gefärbt sein. Das restliche Plasma oder andere Fluide, die ebenfalls auf einem Abstrich vorhanden sind, können auch eine Farbe haben.

[0098] Bei der Farbumwandlungsoperation wird ein Verhältnis von zwei der RGB-Signalwerte gebildet, um ein Mittel zum Unterscheiden von Farbinformationen bereitzustellen. Mit drei Signalwerten für jedes Pixel können neun unterschiedliche Verhältnisse gebildet werden:

R/R, R/G, R/B, G/G, G/B, G/R, B/B, B/G, B/R

[0099] Das auszuwählende optimale Verhältnis hängt von dem Bereich von Farbinformationen ab, die in der Objektträgerprobe erwartet werden. Wie oben angemerkt, sind typische Färbungen, die zum Detektieren von interessierenden Zielobjekten, wie z. B. Tumorzellen, verwendet werden, überwiegend rot im Gegensatz zu überwiegend Grünen oder Blauen. Somit enthalten die Pixel einer interessierenden Zelle, die gefärbt wurde, eine rote Komponente, die größer als entweder die grünen oder die blauen Komponenten ist. Ein Verhältnis von Rot dividiert durch Blau (R/B) stellt einen Wert bereit, der größer als einer für Tumorzellen ist, aber näherungsweise einem für freie oder weiße Bereiche auf dem Objektträger entspricht. Da die übrigen Zellen, d. h. normale Zellen, typischerweise blau gefärbt sind, ergibt das R/B-Verhältnis für Pixel dieser letzteren Zellen Werte kleiner als eins. Das R/B-Verhältnis ist bevorzugt, um die bei diesen Anwendungen typischen Farbinformationen klar zu unterscheiden.

[0100] **Fig. 17B** veranschaulicht das Flussdiagramm, mittels dem diese Umwandlung durchgeführt wird. Im Interesse der Verarbeitungsgeschwindigkeit ist die Umwandlung mit einer Nachschlagetabelle implementiert. Die Verwendung einer Nachschlagetabelle für Farbumwandlung erfüllt drei Funktionen: 1) Durchführung einer Division; 2) Skalieren des Verarbeitungsergebnisses als Bild mit Pixelwerten, die von 0 bis 255 rangieren; und 3) Definieren von Objekten, die in jedem Farbband (R, G, B) niedrige Pixelwerte, wie z. B. "schwarz", aufweisen, um infinite Verhältnisse (d. h. Division durch null) zu vermeiden. Diese "schwarzen" Objekte sind typischerweise Färbefaktoren oder können Ränder von Blasen sein, die durch Aufbringen eines Abdeckglases über die Probe verursacht werden.

[0101] Wenn bei 304 die Nachschlagetabelle für das spezifische Farbverhältnis (d. h. Auswählen von Färbemitteln für Tumorzellen und kernhaltige Zellen) aufgestellt ist, wird bei 308 jedes Pixel in dem ursprünglichen RGB-Bild umgewandelt, um die Ausgabe zu erzeugen. Da es von Interesse ist, die rot gefärbten Tumorzellen von blau gefärbten Normalen zu trennen, wird das Verhältnis von Farbwerten dann

durch einen Benutzer spezifizierten Faktor skaliert. Beispielsweise würden für einen Faktor von 128 und des Verhältnisses von (roter Pixelwert)/(blauer Pixelwert) freie Bereiche auf dem Objektträger ein Verhältnis von 1 aufweisen, das durch 128 auf einen endgültigen X-Wert von 128 skaliert wird. Pixel, die in rot gefärbten Tumorzellen liegen, würden einen X-Wert größer als 128 aufweisen, wohingegen blau gefärbte Nuklei normaler Zellen Werte kleiner als 128 aufweisen würden. Auf diese Weise können interessierende gewünschte Objekte numerisch unterschieden werden. Die resultierende 640×480 Pixelmatrix, die als X-Bild bezeichnet wird, ist ein Graustufenbild mit Werten, die von 0 bis 255 reichen.

[0102] Es existieren andere Verfahren, um Farbinformationen zu unterscheiden. Ein klassisches Verfahren wandelt die RGB-Farbinformationen in einen anderen Farbraum um, wie z. B. einen HSI-(Farbe, Sättigung, Intensität; engl.: hue, saturation, intensity)-Raum. In einem solchen Raum können unterscheidbar unterschiedliche Farben, wie z. B. Rot, Blau, Grün, Gelb, ohne weiteres getrennt werden. Zusätzlich können relativ leicht gefärbte Objekte von intensiver Gefärbten aufgrund unterschiedlicher Sättigungen unterschieden werden. Eine Umwandlung von dem RGB-Raum in den HSI-Raum erfordert jedoch eine komplexere Berechnung. Umwandlung zu einem Farbverhältnis ist schneller; beispielsweise kann ein Vollbild mittels des Verhältnisverfahrens der vorliegenden Erfindung in etwa 30 ms umgewandelt werden, während eine HSI-Umwandlung einige Sekunden benötigen kann.

[0103] Bei einem anderen Ansatz könnte man Farbinformationen erhalten, indem ein einzelner Farbkanal von der Kamera verwendet wird. Berücksichtige beispielsweise einen blauen Kanal, in dem Objekte, die rot sind, relativ dunkel sind. Objekte die blau oder weiß sind, sind in dem blauen Kanal relativ hell. Im Prinzip könnte man einen einzelnen Farbkanal verwenden und einfach einen Grenzwert festlegen, wobei alles, was dunkler als ein Grenzwert ist, als interessierendes Zielobjekt eingestuft wird, beispielsweise eine Tumorzelle, da sie rot und in dem überprüften Kanal somit dunkel ist. Ein Problem bei dem Einzelkanalansatz tritt jedoch auf, wo die Beleuchtung nicht gleichmäßig ist. Ungleichmäßigkeit der Beleuchtung resultiert in einer Ungleichmäßigkeit über den Pixelwerten in jedem Farbkanal, die beispielsweise dazu tendiert, in der Mitte des Bildes einen Spitzenwert anzunehmen und an den Rändern abzufallen, wo die Beleuchtung nachlässt. Das Durchführen einer Grenzwertbetrachtung hinsichtlich dieser nicht gleichmäßigen Farbinformation führt zu Problemen, da die Ränder manchmal unter den Grenzwert fallen und es daher schwieriger wird, das geeignete Grenzwertniveau auszuwählen. Wenn die Werte des roten Kanals vom Mittelpunkt zum Rand hin abfallen, fallen bei dem Verhältnisverfahren die Werte des blauen Kanals jedoch ebenfalls vom Mittelpunkt zum Rand hin ab, was zu einem gleichmäßigen Verhältnis führt.

Daher ist das Verhältnisverfahren gegenüber Beleuchtungsungleichmäßigkeiten in höherem Maße immun.

[0104] Wie zuvor beschrieben, ist das Farbumwandlungsschema relativ unempfindlich hinsichtlich Veränderungen in der Farbbalance, d. h. die relativen Ausgaben der roten, grünen und blauen Kanäle. Es ist jedoch eine gewisse Steuerung notwendig, um eine Kamerasättigung oder unzulängliche Belichtungen in einem der Farbbänder zu vermeiden. Dieses Farbbalancieren wird automatisch durchgeführt, indem eine Kalibrierobjektträger verwendet wird, der aus einem freien Bereich und einem "dunklen" Bereich besteht, der eine bekannte optische Durchlässigkeit oder Dichte aufweist. Das System nimmt Bilder von den freien und "dunklen" Bereichen auf, berechnet "weiß"- und "schwarz"-Einstellungen für den Bildprozessor **25** und sorgt dadurch für eine korrekte Farbbalance.

[0105] Zusätzlich zu der Farbbalancesteuerung sind bestimmte mechanische Abgleiche bei diesem Prozess automatisiert. Der Mittelpunkt des Gesichtsfeldes für die verschiedenen Mikroskopobjektive kann, gemessen auf dem Objektträger, um einige (oder einige zehn) Mikron variieren. Dies ist das Ergebnis leichter Variationen der Position der Mikroskopobjektive **44a**, wie von dem Revolver **44** (**Fig. 4**) bestimmt, kleiner Variationen der Ausrichtung der Objektive hinsichtlich zu der optischen Achse des Systems und anderer Faktoren. Da es erwünscht ist, dass jedes Mikroskopobjektiv auf die gleiche Stelle zentriert ist, müssen diese mechanischen Versetzungen gemessen und automatisch kompensiert werden.

[0106] Dies wird erreicht, indem ein Testobjektträger aufgenommen wird, der ein erkennbares Merkmal oder Markierung enthält. Ein Bild dieses Musters wird von dem System mit einem vorgegebenen Objektiv aufgenommen und die Position der Markierung wird bestimmt. Das System dreht dann den Revolver zu der nächsten Objektivlinse, nimmt ein Bild des Testobjekts auf und dessen Position wird erneut bestimmt. Ersichtliche Änderungen der Position der Testmarkierung werden für dieses Objektiv aufgezeichnet. Dieser Prozess wird für alle Objektive fortgesetzt.

[0107] Wenn diese räumlichen Versetzungen bestimmt wurden, werden sie automatisch kompensiert, indem während des Wechsels von Objektiven die Stufe **38** um einen gleich großen (aber entgegengesetzten) Versetzungswert bewegt wird. Auf diese Weise liegt sie dort keine ersichtliche Verschiebung des Mittelpunkts oder des betrachtenden Bereichs vor, wenn unterschiedliche Objektivlinsen ausgewählt werden.

[0108] Ein Tiefpassfilterprozess geht der Grenzwertbetrachtung voraus. Ein Ziel der Grenzwertbetrachtung ist es, eine Pixelbildmatrix zu erhalten, die nur interessierende Zielobjekte, wie z. B. Tumorzellen, oberhalb eines Grenzwerts und alles andere un-

ter diesem aufweist. Ein tatsächlich aufgenommenes Bild wird jedoch Rauschen enthalten. Das Rauschen kann verschiedene Formen annehmen, einschließlich weißen Rauschens und Artefakte. Der Mikroskopobjektträger kann kleine Partikelfragmente aufweisen, die bei dem Färbeprozess Farbe aufnehmen können, wobei diese als Artefakte bekannt sind. Diese Artefakte sind im Allgemeinen kleine und verstreute Bereiche in der Größenordnung weniger Pixel, die sich oberhalb des Grenzwerts befinden. Der Zweck einer Tiefpassfilterung besteht darin, das gesamte farbumgewandelte Bild im Wesentlichen zu verwischen oder zu verschmieren. Der Tiefpassfilterprozess wird Artefakte in höherem Maß als größere interessierende Objekte, wie z. B. Tumorzellen, verschmieren und dadurch die Anzahl von Artefakten beseitigen oder verringern, die den Grenzwertbetrachtungsprozess passiert haben. Das Ergebnis ist ein klareres einer Grenzwertbetrachtung unterzogenes Bild stromabwärts.

[0109] Bei dem Tiefpassfilterprozess wird auf jedes Pixel in dem 640×480 Bild eine 3×3 Koeffizientenmatrix angewendet. Eine bevorzugte Koeffizientenmatrix ist wie folgt:

$$\begin{bmatrix} 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \end{bmatrix}$$

An jeder Pixelstelle wird eine 3×3 Matrix, die das interessierende Pixel und dessen Nachbarn umfasst, mit der Koeffizientenmatrix multipliziert und summiert, um einen einzelnen Wert für das interessierende Pixel zu erhalten. Die Ausgabe dieses räumlichen Faltungsprozesses ist wiederum eine 640×480 Matrix.

[0110] Ziehe beispielweise einen Fall in Betracht, wo das Mittelpunktspixel und nur das Mittelpunktspixel einen Wert von 255 aufweist und jeder seiner anderen Nachbarn oben links, oben, oben rechts usw. Werte von 0 aufweist. Dieser Fall mit einem einzelnen weißen Pixel entspricht einem kleinen Objekt. Das Ergebnis der Matrixmultiplikation und Addition unter Verwendung der Koeffizientenmatrix ist ein Wert von 1/9 (255) oder 28 für das Mittelpunktspixel, ein Wert der unter dem nominellen Grenzwert von 128 liegt. Ziehe nun einen anderen Fall in Betracht, bei dem alle Pixel einen Wert von 255 aufweisen, was einem großen Objekt entspricht. Eine Durchführung der Tiefpassfilteroperation auf eine 3×3 Matrix für diesen Fall ergibt einen Wert für 255 für das Mittelpunktspixel. Folglich behalten große Objekte ihre Werte bei, wohingegen kleine Objekte in der Amplitude reduziert oder eliminiert werden. Bei dem bevorzugten Operationsverfahren wird der Tiefpassfilterprozess an dem X-Bild zweimal in Folge durchgeführt.

[0111] Um interessierende Objekte zu unterscheiden, wie z. B. eine Tumorzelle in dem X-Bild, von anderen Objekten und dem Hintergrund, wird eine

Grenzwertbetrachtungsoperation durchgeführt, die ausgelegt ist, um Pixel in interessierenden Zellen auf einen Wert von 255 und alle anderen Bereich auf 0 zu setzen. Die Grenzwertbetrachtung ergibt Idealerweise ein Bild, in dem interessierende Zellen weiß und das Übrige des Bildes schwarz ist. Ein Problem, dem man bei einer Grenzwertbetrachtung gegenüber steht, besteht darin, wo der Grenzwert festzulegen ist. Man kann nicht einfach annehmen, dass interessierende Zellen durch einen Pixelwert oberhalb des nominellen Grenzwerts von 128 angegeben werden. Ein typisches Bildverarbeitungssystem kann eine weißglühende Halogenlichtbirne als Lichtquelle verwenden. Wenn die Glühlampe altert, können sich die relativen Anteile der roten und blauen Ausgabe ändern. Wenn die Glühlampe altert, besteht die Tendenz darin, dass die blaue stärker abfällt als die rote und die grüne. Um diese zeitliche Lichtquellenvariation zu berücksichtigen, wird ein dynamischer Grenzwertbetrachtungsprozess verwendet, wodurch der Grenzwert für jedes aufgenommene Bild dynamisch eingestellt wird. Somit wird für jedes 640×480 Bild ein einzelner Grenzwert hergeleitet, der für dieses Bild spezifisch ist.

[0112] Wie in **Fig. 18** gezeigt, besteht das grundsätzliche Verfahren darin, bei 312 für jedes Feld den Mittel-X-Wert und die Standardabweichung um diesen Mittelwert zu berechnen. Der Grenzwert wird dann bei 314 auf den Mittelwert zuzüglich eines Betrages festgesetzt, der durch das Produkt eines (benutzerspezifisierten) Faktors und der Standardabweichung der farbumgewandelten Pixelwerte definiert ist. Die Standardabweichung korreliert zu der Struktur und Anzahl von Objekten in dem Bild. Vorzugsweise liegt der benutzerspezifizierte Faktor in dem Bereich von etwa 1,5 bis 2,5. Für Objektträger, bei denen das Färbemittel in erster Linie in Zellgrenzen geblieben ist, wird der Faktor so gewählt, dass er in dem unteren Ende des Bereichs liegt, und für Objektträger, bei denen das Färbemittel beherrschend über den gesamten Objektträger vorhanden ist, wird der Faktor so gewählt, dass er in dem oberen Ende des Bereichs liegt. Auf diese Weise kann, wenn auf dem Objektträger Bereiche mit größeren oder geringeren Hintergrundintensitäten auftreten, der Grenzwert angehoben oder abgesenkt werden, um das Reduzieren von Hintergrundobjekten zu unterstützen. Bei diesem Verfahren ändert sich der Grenzwert zusammen mit dem Altern der Lichtquelle, so dass die Auswirkungen der Alterung ausgeglichen werden. Die Bildmatrix, die bei 316 aus dem Grenzwertbetrachtungsschritt resultiert, ist ein Binärbild schwarzer (0) und weißer (255) Pixel.

[0113] Wie es oftmals bei Grenzwertbetrachtungsoperationen, wie der oben beschriebenen, der Fall ist, werden einige nicht erwünschte Bereiche aufgrund von Rauschen, gering gefärbten Zellfragmenten und anderen Artefakten oberhalb des Grenzwerts liegen. Es ist erwünscht und möglich, diese Artefakte aufgrund ihrer geringen Größe verglichen mit interessie-

renden richtigen Zellen zu beseitigen. Morphologische Prozesse werden verwendet, um diese Funktion auszuführen.

[0114] Eine morphologische Verarbeitung ist mit dem vorher beschriebenen Tiefpassfilterfaltungsprozess abgesehen davon vergleichbar, dass sie auf ein Binärbild angewendet wird. Vergleichbar zu einer räumlichen Faltung überschreitet der morphologische Prozess eine Eingangsbildmatrix Pixel für Pixel und ordnet die verarbeiteten Pixel in einer Ausgabematrix an. Vielmehr als eine gewichtete Summe benachbarter Pixel zu berechnen, wie bei dem Tiefpassfaltungsprozess, verwendet der morphologische Prozess Mengenlehreoperationen, um benachbarte Pixel in nicht linearer Weise zu kombinieren.

[0115] Erosion ist ein Prozess, wodurch eine einzelne Pixelschicht vom Rand eines Objekts entfernt wird. Dilatation ist der entgegengesetzte Prozess, der eine einzelne Pixelschicht zu den Rändern eines Objekts hinzufügt. Die Stärke einer morphologischen Verarbeitung besteht darin, dass sie für eine weitere Unterscheidung sorgt, um kleine Objekte zu beseitigen, die den Grenzwertbetrachtungsprozess überlebt haben und wahrscheinlich keine Tumorzellen sind. Die Erosions- und Dilatationsprozesse, die ein morphologisches "Öffnen" ausmachen, bewirken vorzugsweise, dass kleine Objekte verschwinden, jedoch zulassen, dass große Objekte zurück bleiben. Die morphologische Verarbeitung binärer Bilder ist im Detail in "Digital Image Processing", Seiten 127–137, G. A. Baxes, John Wiley & Sons (1994) beschrieben.

[0116] **Fig. 19** veranschaulicht das Flussdiagramm für diesen Prozess. Wie hier gezeigt, leistet ein morphologischer "Öffnungs"-Prozess diese Unterdrückung. Ein einzelnes morphologisches Öffnen besteht aus einer einzelnen morphologischen Erosion **320** gefolgt von einer einzelnen morphologischen Dilatation **322**. Mehrfaches "Öffnen" besteht aus mehreren Erosionen gefolgt von mehreren Dilatationen. Bei der bevorzugten Ausführungsform haben sich eine oder zwei morphologische Öffnungen als geeignet herausgestellt.

[0117] An dieser Stelle in der Prozesskette enthält das verarbeitete Bild interessierende, einer Grenzwertbetrachtung unterzogene Objekte, wie z. B. Tumorzellen (falls irgend welche in dem ursprünglichen Bild vorhanden waren), und möglicherweise einige Restartefakte, die zu groß waren, um durch die obigen Prozesse beseitigt zu werden.

[0118] **Fig. 20** stellt ein Flussdiagramm bereit, das eine Blob-Analyse veranschaulicht, die durchgeführt wird, um die Anzahl, Größe und Stelle von Objekten in dem einer Grenzwertbetrachtung unterworfenen Bild zu bestimmen. Ein Blob ist als Bereich verbundener Pixel definiert, die die gleiche "Farbe" aufweisen, in diesem Fall einen Wert von 255. Die Verarbeitung wird über das gesamte Bild durchgeführt, um bei **324** die Anzahl derartiger Bereiche zu bestimmen und bei **326** den Bereich und die x,y-Koordinaten für jeden detektierten Blob zu bestimmen.

[0119] Ein Vergleich der Größe jedes Blobs mit einem bekannten Minimalbereich bei **328** für eine Tumorzelle erlaubt eine Verfeinerung bei Entscheidungen darüber, welche Objekte interessierender Objekte, wie z. B. Tumorzellen, und welche Artefakte sind. Die Stelle (x,y-Koordinaten) von Objekten, die in diese Stufe als interessierende Zellen identifiziert wurden, werden für den letzten, unten beschriebenen Schritt zur erneuten 40×-Bilderfassung gespeichert. Objekte, die den Größentest nicht bestehen, werden als Artefakte außer Acht gelassen.

[0120] Die oben beschriebene Prozesskette identifiziert bei der Abtastvergrößerung Objekte als Zellen interessierender Ziele. Wie in **Fig. 21** veranschaulicht, schaltet bei der Beendigung des Abtastens das System bei **330** zu dem 40×-Vergrößerungsobjektiv um und jedes Ziel wird erneut aufgenommen, um die Identifikation **332** zu bestätigen. Jedes 40×-Bild wird bei **334** erneut verarbeitet, wobei die gleichen, wie oben beschriebenen Schritte, aber mit Testparametern verwendet werden, die in geeigneter Weise für die stärkere Vergrößerung (z. B. Bereich) modifiziert sind. Bei **336** wird ein interessierender Bereich, der bezüglich jeder bestätigten Zelle zentriert ist, zur Nachprüfung durch den Pathologen auf der Festplatte gespeichert.

[0121] Wie zuvor angemerkt, wird ein Mosaik gespeicherter Bilder zur Betrachtung durch den Pathologen verfügbar gemacht. Wie in **Fig. 22** gezeigt, ist eine Reihe Bilder von Zellen, die durch die Bildanalyse bestätigt wurden, in dem Mosaik **150** wiedergegeben. Der Pathologe kann dann die Bilder visuell untersuchen, um eine Feststellung zu treffen, jedes Zellbild zu akzeptieren (**152**) oder zurückzuweisen (**153**). Eine solche Bestimmung kann notiert und mit dem Mosaik von Bildern gespeichert werden, um einen gedruckten Bericht zu erzeugen.

[0122] Zusätzlich zum Speichern des Bildes der Zelle und dessen Bereich, werden die Zellkoordinaten gespeichert, sollte es der Pathologe wünschen, die Zelle durch die Okulare oder auf dem Bildmonitor unmittelbar zu betrachten. In diesem Fall lädt der Pathologe erneut die Objektträgerträgervorrichtung, wählt den Objektträger und die Zelle zur Nachprüfung von einem Mosaik von Zellbildern aus und das System positioniert die Zelle automatisch unter dem Mikroskop zum Betrachten.

[0123] Es wurde festgestellt, dass normale Zellen, deren Nuklei mit Hämatoxylin gefärbt wurden, oftmals recht zahlreich sind, wobei sie pro 10×-Bild eine Anzahl in Tausenden ausmachen. Da diese Zellen so häufig sind und da sie dazu neigen, zu verklumpen, würde ein Zählen jeder einzelnen kernhaltigen Zelle eine übermäßige Prozessbelastung zu Lasten der Geschwindigkeit hinzufügen und würde aufgrund des Verklumpens nicht notwendigerweise für eine genaue Zählung sorgen. Die Vorrichtung führt einen Abschätzprozess durch, bei dem der Gesamtbereich jedes Feldes, das hämtoxylin-blau gefärbt ist, gemessen und dieser Bereich durch die mittlere Größe einer

kernhaltigen Zelle dividiert wird. **Fig. 23** skizziert diesen Prozess.

[0124] Bei diesem Prozess wird ein einzelnes Farbband (der rote Kanal stellt den besten Kontrast für blau gefärbte kernhaltige Zellen bereit) verarbeitet, indem bei **342** der mittlere Pixelwert für jedes Feld berechnet, zwei Grenzwerte (hoch und niedrig) wie bei **344**, **346** angegeben festgelegt und bei **348** die Anzahl von Pixeln zwischen diesen zwei Werten gezählt wird. Beim Fehlen von Schmutz oder anderen opaken Partikeln sorgt dies für eine Zählung der Anzahl vorherrschend blauer Pixel. Durch Teilen dieses Werts durch den mittleren Bereich für eine kernhaltige Zelle bei **350** und durch Durchlaufen über alle Felder bei **352** wird eine näherungsweise Zellzählung erhalten. Vorbereitende Tests dieses Prozesses geben eine Genauigkeit von $\pm 15\%$ an. Es sollte angemerkt werden, dass für einige Verfahren zur Präparation von Objektträgern die Größe kernhaltiger Zellen deutlich größer als die typische Größe sein kann. Die Betriebsperson kann die geeignete Größe kernhaltiger Zellen wählen, um diese Charakteristika zu kompensieren.

[0125] Wie bei jedem Bildverarbeitungssystem gibt es aufgrund der Modulationsübertragungsfunktions-(MTF; engl.: modulation transfer function)-Charakteristika der bildgebenden Optiken, Kamera, Elektronik und anderen Komponenten einen gewissen Verlust an Modulationsübertragung (d. h. Kontrast). Da es erwünscht ist, "hochqualitative" Bilder von interessierenden Zellen sowohl zur Nachprüfung durch einen Pathologen als auch zur Archivierung zu speichern, ist es erwünscht, diese MTF-Verluste zu kompensieren.

[0126] Eine MTF-Kompensation oder MTFC wird als digitaler Prozess durchgeführt, der auf die aufgenommenen digitalen Bilder angewendet wird. Ein digitaler Filter wird verwendet, um den Anteil hoher räumlicher Frequenzen der Bilder beim Speichern wiederherzustellen, wobei niedrige Rauschpegel beibehalten werden. Mit dieser MTFC-Technologie wird durch die Verwendung digitaler Verarbeitungsverfahren im Gegensatz zu herkömmlichen Öl-Immersion- oder anderen Hardware-basierten Verfahren die Bildqualität verbessert oder wiederhergestellt. MTFC ist in "The Image Processing Handbook", Seiten 225 und 337, J. C. Rues, CRC press (1995) weiter beschrieben.

[0127] Bezugnehmend auf **Fig. 24** sind die Funktionen gezeigt, die in einer Benutzerschnittstelle der Vorrichtung **10** verfügbar sind. Aus der Benutzerschnittstelle, die auf dem Computermonitor **26** grafisch wiedergegeben ist, kann eine Bedienperson unter Vorrichtungsfunktionen wählen, die Erfassung **402**, Analyse **404** und Systemkonfiguration **406** umfassen. Bei der Erfassungsstufe **402** kann die Bedienperson zwischen manuellen **408** und automatischen **410** Betriebsmodi wählen. Bei dem manuellen Modus werden der Bedienperson manuelle Operationen **409** präsentiert. Patienteninformationen **414**, die

eine Probe betreffen, können bei **412** eingegeben werden.

[0128] In der Analysestufe **404** sind Nachprüfungs-**416**- und Berichts-**418**-Funktionen verfügbar gemacht. Bei der Nachprüfungsstufe **416** kann die Betriebsperson eine Montagefunktion **420** auswählen. Bei dieser Montagesstufe kann ein Pathologe diagnostische Nachprüfungsfunktionen ausführen, einschließlich einer Inspektion eines Bildes **422**, Akzeptierens/Zurückweisens von Zellen **424**, Zählens kernhaltiger Zellen **426**, Akzeptierens/Zurückweisens von Zellzählungen **428** und Speicherns von Seiten bei **430**. Die Berichtsstufe **480** erlaubt es einer Bedienperson, Patientenberichte **432** zu erzeugen.

[0129] In der Konfigurationsstufe **406** kann die Bedienperson wählen, um bei **434** Präferenzen zu konfigurieren, bei **436** Bedienpersoninformationen **437** einzugeben, bei **438** einen Systembericht zu erzeugen und bei **440** ein Menübedienfeld umzuschalten. Die Konfiguration von Präferenzen umfasst Funktionen zur Auswahl von Abtastbereichen bei **442**, **452**, Montagespezifikationen bei **444**, den Umgang mit Bar-Codes bei **446**, Standardzellzählungen bei **448**, Färbemittelauswahl bei **450** und Abtastobjektivauswahl bei **454**.

Äquivalente

[0130] Obwohl diese Erfindung unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen derselben im speziellen gezeigt und beschrieben wurde, ist es für Fachleute auf dem Gebiet verständlich, dass verschiedene Änderungen in der Form und Einzelheiten darin vorgenommen werden können, ohne sich dabei von dem Umfang der Erfindung zu entfernen, wie sie in den beigefügten Ansprüchen definiert ist.

[0131] Beansprucht wird:

Patentansprüche

1. Verfahren zur automatischen Analyse eines Farbbildes in einem ersten Farbraum eines vergrößerten Bereichs eines Objektträgers, der eine mit einem Reagens präparierte biologische Probe aufweist, gekennzeichnet durch die Schritte:

– Transformieren von Pixeln des Bildes in dem ersten Farbraum in einen zweiten Farbraum, um ein Zielobjekt interessierender Pixel von Hintergrundpixeln zu unterscheiden, und

– Identifizieren von interessierenden Zielobjekten von dem Zielobjekt interessierender Pixel in dem zweiten Farbraum.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der erste Farbraum für jedes Pixel rote, grüne und blaue Komponenten aufweist und der Transformationsschritt ein Bilden eines Verhältnisses zwischen zwei Komponenten der roten, blauen und grünen Komponenten für jedes Pixel in dem ersten Farbraum umfasst, um die Pixel in den zweiten Farbraum zu transformieren.

3. Verfahren nach Anspruch 2, ferner mit dem Schritt:

– auswählen eines Graustufenwerts für jedes Pixel in dem zweiten Farbraum, der dem Verhältnis von Komponenten in dem ersten Farbraum entspricht.

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der erste Farbraum für jedes Pixel rote, grüne und blaue Komponenten umfasst und der Transformationsschritt ein Konvertieren von Komponenten der roten, blauen und grünen Komponenten für jedes Pixel in dem ersten Farbraum zu Pixelwerten in einem Farbton-, Sättigungs- und Intensitätsraum umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der erste Farbraum für jedes Pixel rote, grüne und blaue Komponenten umfasst und der Transformationsschritt ein Vergleichen von Pixelwerten für eine einzelne Komponente für jedes Pixel mit einem Grenzwert umfasst, um Pixel, die einen Komponentenwert aufweisen, der gleich oder größer als der Grenzwert ist, als Zielobjekt interessierender Pixel und Pixel, die einen Komponentenwert aufweisen, der kleiner als der Grenzwert ist, als Hintergrundpixel zu identifizieren.

6. Verfahren nach Anspruch 1, ferner mit den Schritten:

– morphologisches Verarbeiten des Zielobjektes interessierender Pixel, um Artefaktpixel zu identifizieren, und
– Identifizieren der interessierenden Zielobjekte von dem verbleibenden Zielobjekt interessierender, nicht als Artefaktpixel identifizierter Pixel.

7. Verfahren nach Anspruch 6, ferner mit den Schritten:

– Filtern des Zielobjektes interessierender Pixel mit einem Tiefpassfilter vor einem morphologischen Verarbeiten des tiefpassgefilterten Zielobjektes interessierender Pixel.

8. Verfahren nach Anspruch 7, ferner mit den Schritten:

– Vergleichen des tiefpassgefilterten Zielobjektes interessierender Pixel mit einem Grenzwert vor einem morphologischen Verarbeiten des Zielobjektes interessierender Pixel, die Werte aufweisen, die größer als oder gleich dem Grenzwert sind.

9. Verfahren nach Anspruch 8, ferner mit den Schritten:

– Berechnen eines Mittelwertes des Zielobjektes interessierender Pixel,
– Spezifizieren eines Grenzwertfaktors,
– Berechnen einer Standardabweichung für das Zielobjekt interessierender Pixel und
– Festlegen des Grenzwertes auf die Summe des Mittelwertes und des Produkts des Grenzwertfaktors und der Standardabweichung vor einem Vergleichen des Zielobjektes interessierender Pixel mit dem

Grenzwert.

10. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem das Identifizieren ferner die Schritte umfasst:

– Gruppieren des morphologisch verarbeiteten Zielobjektes interessierender Pixel in Bereiche eines verbundenen Zielobjektes interessierender Pixel, um interessierende Objekte zu identifizieren,
– Vergleichen der interessierenden Objekte mit Parametern einer Blob-Analyse, und
– Speichern von Ortskoordinaten der interessierenden Zielobjekte, die eine i Bereich aufweisen, der den Parametern der Blob-Analyse entspricht.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem die vorher durchgeführten Verfahrensschritte für bei geringer Vergrößerung aufgenommene Bilder durchgeführt werden und das Verfahren ferner die Schritte umfasst:

– Einstellen eines optischen Systems, das den Objektträgern betrachtet, von dem die interessierenden Objekte identifiziert wurden, auf eine starke Vergrößerung,
– Aufnehmen eines stark vergrößerten Bildes des Objektträgers an den entsprechenden Ortskoordinaten für jedes interessierende Zielobjekt,
– Transformieren von Pixeln des stark vergrößerten Bildes in dem ersten Farbraum in einen zweiten Farbraum, um stark vergrößerte Zielobjekte interessierender Pixel von Hintergrundpixeln zu unterscheiden, und
– Identifizieren stark vergrößerter interessierender Objekte von dem Zielobjekt interessierender Pixel in dem zweiten Farbraum.

12. Verfahren nach Anspruch 11, ferner mit den Schritten:

– morphologisches Verarbeiten des stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel, um Artefaktpixel zu identifizieren, und
– Identifizieren der stark vergrößerten interessierenden Zielobjekte von dem verbleibenden stark vergrößerten Zielobjekt interessierender, nicht als Artefaktpixel identifizierter Pixel.

13. Verfahren nach Anspruch 12, ferner mit den Schritten:

– Filtern des stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel mit einem Tiefpassfilter vor einem morphologischen Verarbeiten des tiefpassgefilterten stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel.

14. Verfahren nach Anspruch 13, ferner mit den Schritten:

– Vergleichen des tiefpassgefilterten stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel mit einem Grenzwert vor einem morphologischen Verarbeiten des stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel, die Werte aufweisen, die größer als oder gleich

dem Grenzwert sind.

15. Verfahren nach Anspruch 14, ferner mit den Schritten:

- Berechnen eines Mittelwertes des stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel,
- Spezifizieren eines Grenzwertfaktors,
- Berechnen einer Standardabweichung für das stark vergrößerte Zielobjekt interessierender Pixel und
- Festlegen des Grenzwertes auf die Summe des Mittelwertes und des Produktes des Grenzwertfaktors und der Standardabweichung vor einem Vergleichen des stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel mit dem Grenzwert.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das Identifizieren ferner die Schritte umfasst:

- Gruppieren des morphologisch verarbeiteten stark vergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel in Bereiche eines verbundenen starkvergrößerten Zielobjektes interessierender Pixel, um interessierende Objekte zu identifizieren,
- Vergleichen der interessierenden Objekte mit Parametern einer Blob-Analyse, und
- Speichern von Ortskoordinaten der interessierenden stark vergrößerten Zielobjekte, die einen Bereich aufweisen, der den Parametern der Blob-Analyse entspricht.

17. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem ein optisches System vor einer Durchführung der Schritte geringer Vergrößerung anfänglich fokussiert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, bei dem das anfängliche Fokussieren des optischen Systems vor einer Durchführung der Schritte mit geringer Vergrößerung ferner die Schritte umfasst:

- (a) Positionieren des optischen Systems an einer anfänglichen Z-Stufenposition
- (b) Aufnehmen eines Bildes eines Objektträgers bei geringer Vergrößerung, der eine gefärbte biologische Probe darauf aufweist, und Berechnen einer Pixelvarianz über einem Pixelmittelwert für das aufgenommene Bild,
- (c) Inkrementieren der Position der Z-Stufe,
- (d) Wiederholen der Schritte (b) und (c) für eine festgelegte Anzahl grober Näherungen, um einen ersten Satz von Varianzdaten zu bilden,
- (e) Ausführen einer Anpassung des ersten Satzes von Varianzdaten gemäß kleinster Quadrate an eine erste Funktion,
- (f) Positionieren der Z-Stufe an einer Position nahe des Spitzenwertes der ersten Funktion,
- (g) Wiederholen der Schritte (b) und (c) für eine festgelegte Anzahl feiner Iterationen, um einen zweiten Satz von Varianzdaten zu bilden,
- (h) Durchführen einer Anpassung des zweiten Satzes von Varianzdaten gemäß kleinster Quadrate an eine zweite Funktion,
- (i) Auswählen des Spitzenwertes der Anpassungs-

kurve gemäß kleinster Quadrate als Abschätzung der besten Fokusposition, und

(j) Durchführen der obigen Schritte für ein Array von X-Y-Stufenpositionen, um ein Array von Fokuspositionen zu bilden, und Durchführen einer Anpassung gemäß kleinster Quadrate des Arrays von Fokuspositionen, um eine angepasste Fokusebene zu erhalten.

19. Verfahren nach Anspruch 17, bei dem das anfängliche Fokussieren des optischen Systems vor einer Durchführung der Schritte mit geringer Vergrößerung ferner die Schritte umfasst:

- (a) Positionieren des optischen Systems an einer anfänglichen Z-Stufenposition,
- (b) Aufnehmen eines Bildes und Berechnen einer Pixelvarianz über einem Pixelmittelwert für das aufgenommene Bild
- (c) Inkrementieren der Position der Z-Stufe,
- (d) Wiederholen der Schritte (b) und (c) für eine festgelegte Anzahl von Iterationen,
- (e) Durchführen einer Anpassung der Varianzdaten gemäß kleinster Quadrate an eine bekannte Funktion, und

(f) Auswählen des Spitzenwertes der Anpassungskurve gemäß kleinster Quadrate als Abschätzung der besten Fokusposition.

20. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem der Schritt zum Einstellen des optischen Systems ferner die Schritte umfasst:

- (a) Positionieren des optischen Systems an einer anfänglichen Z-Stufenposition,
- (b) Aufnehmen eines Bildes und Auswählen eines mittleren Pixels eines interessierenden Zielobjektes,
- (c) Definieren eines interessierenden Bereiches, der über dem ausgewählten mittleren Pixel zentriert,
- (d) Durchführen einer schnellen Fourier-Transformation des interessierenden Bereiches, um Frequenzkomponenten des interessierenden Bereiches und komplexe Größen für die Frequenzkomponenten zu identifizieren,
- (e) Berechnen eines Potenzwertes durch Summieren des Quadrates der komplexen Größen für die Frequenzkomponenten, die im Bereich von Frequenzen von 25% bis 75% einer maximalen Frequenzkomponente für die schnelle Fourier-Transformierte des interessierenden Bereiches liegen,
- (f) Inkrementieren der Position der Z-Stufe,
- (g) Wiederholen der Schritte (b)–(e) für eine festgelegte Anzahl von Iterationen,
- (h) Auswählen der Z-Stufenpositionen, die dem größten Potenzwert entspricht, als die beste Fokusposition.

21. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem der Schritt zum Einstellen des optischen Systems ferner die Schritte umfasst:

- (a) Positionieren des optischen Systems an einer an-

- fänglichen Z-Stufenposition,
- (b) Aufnehmen eines Bildes und Auswählen eines mittleren Pixels eines interessierenden Zielobjektes,
 - (c) Definieren eines interessierenden Bereichs, der über dem ausgewählten mittleren Pixel zentriert ist,
 - (d) Anwenden einer Hanning-Fensterfunktion auf den interessierenden Bereich,
 - (d) Durchführen einer schnellen Fourier-Transformation des interessierenden Bereiches nach der Anwendung der Hanning-Fensterfunktion, um Frequenzkomponenten für den interessierenden Bereich und komplexe Größen für die Frequenzkomponenten zu identifizieren,
 - (e) Berechnen eines Potenzwertes durch Summieren des Quadrates der komplexen Größen für die Frequenzkomponenten für die schnelle Fourier-Transformierte des interessierenden Bereichs,
 - (f) Inkrementieren der Position der Z-Stufe,
 - (g) Wiederholen der Schritte (b)–(e) für eine festgelegte Anzahl von Iterationen und
 - (h) Auswählen der Z-Stufenposition, die dem größten Potenzwert entspricht, als die beste Fokusposition.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

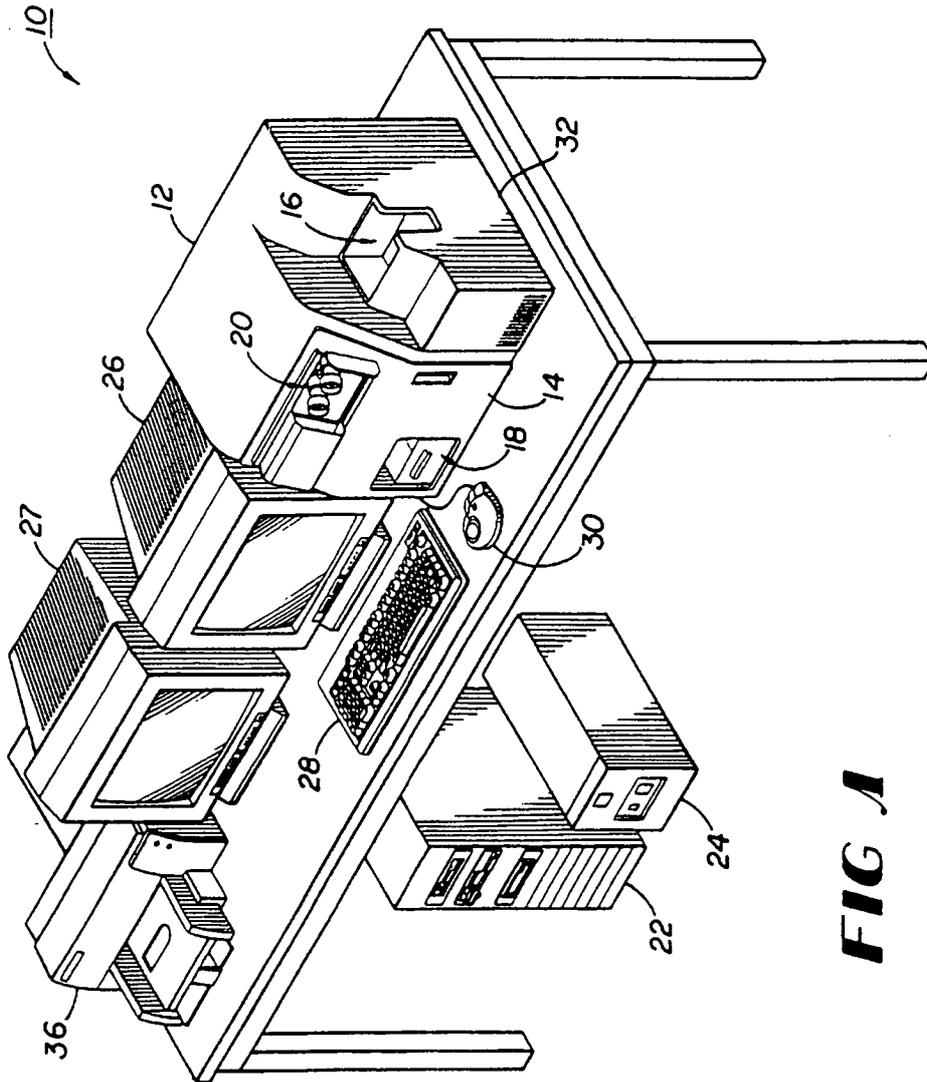


FIG 1

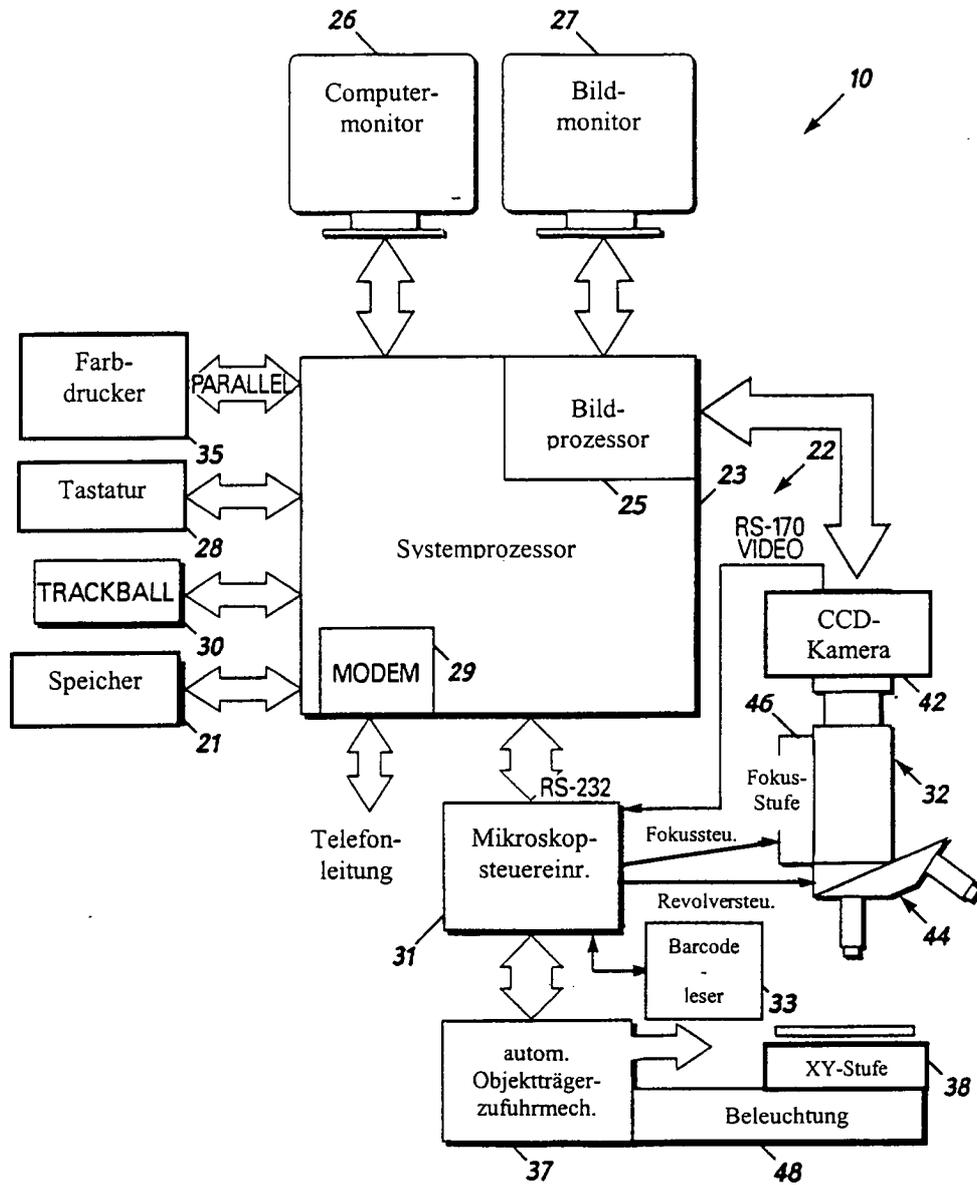


FIG 2

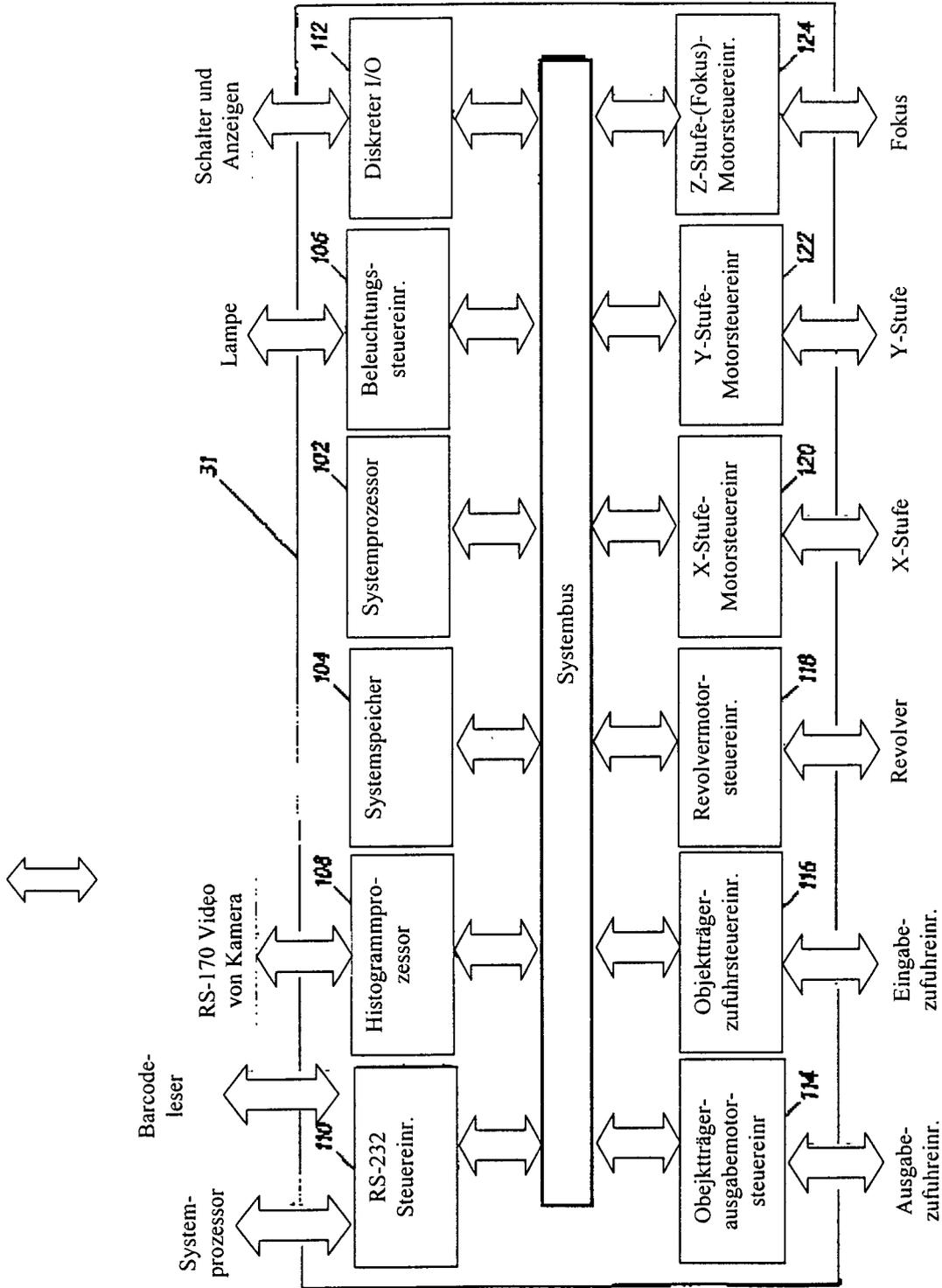


FIG 3

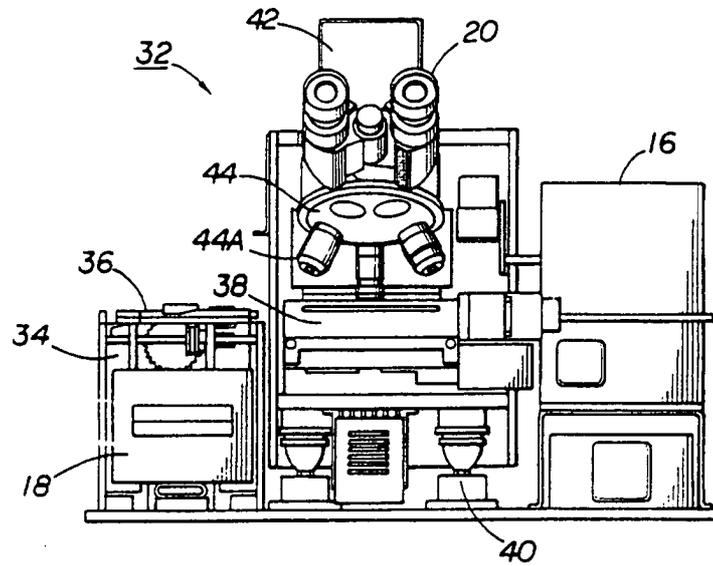


FIG 4

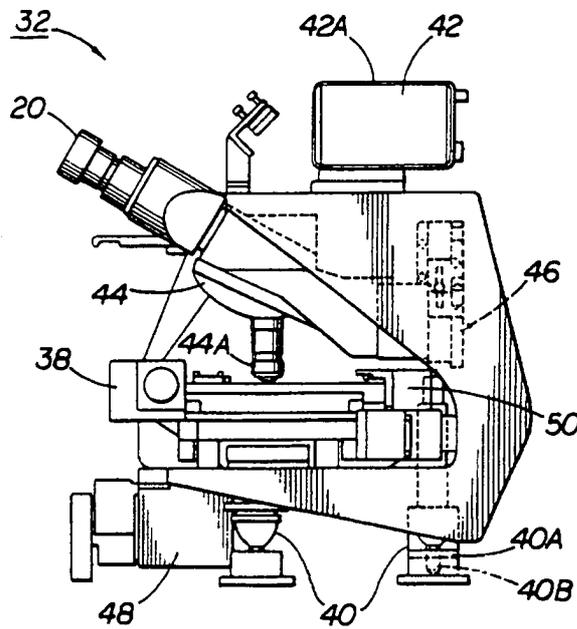


FIG 5

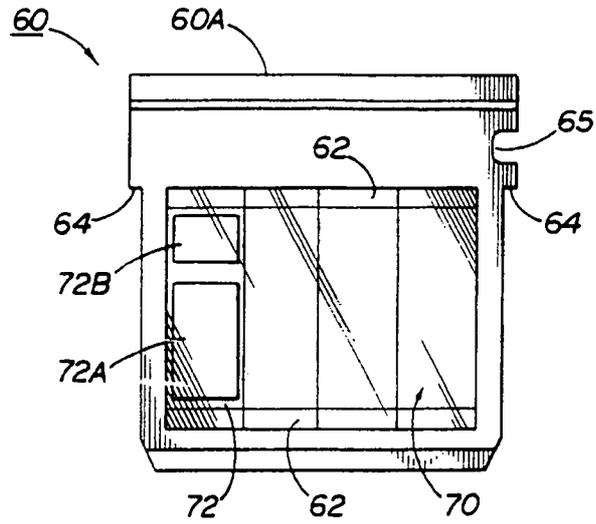


FIG 6A

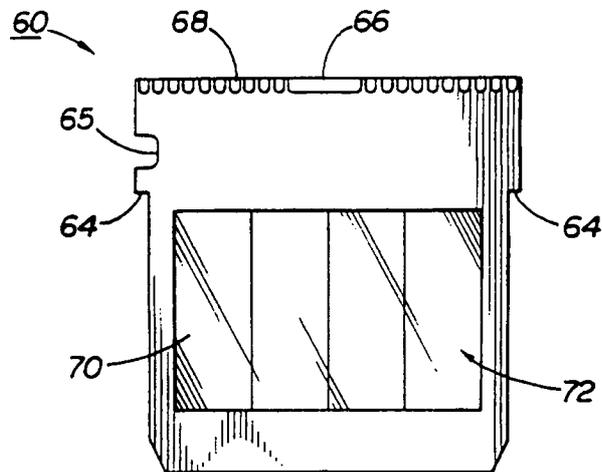


FIG 6B

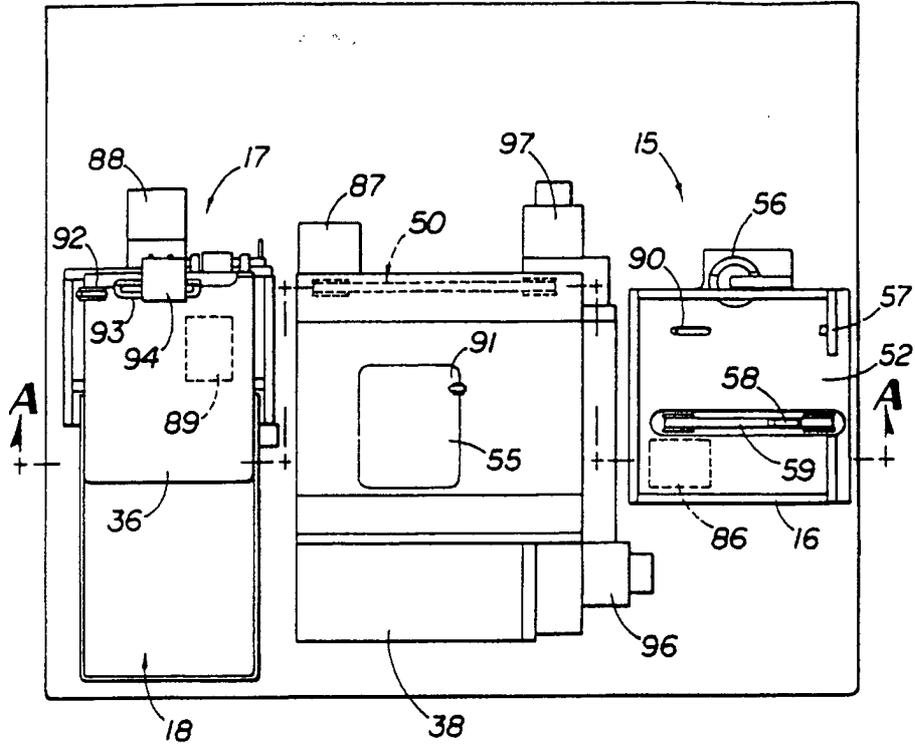


FIG 7A

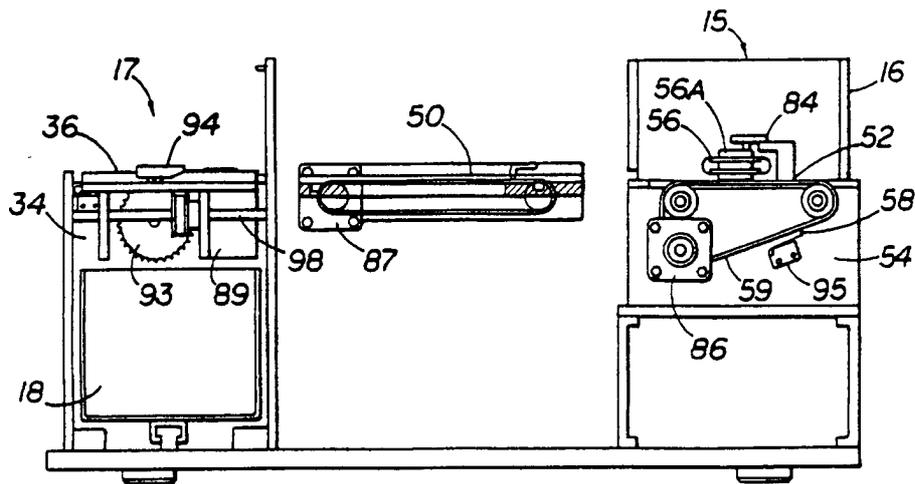


FIG 7B

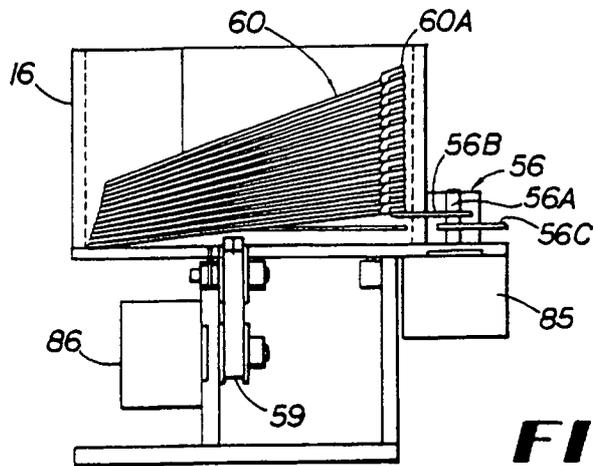


FIG 8

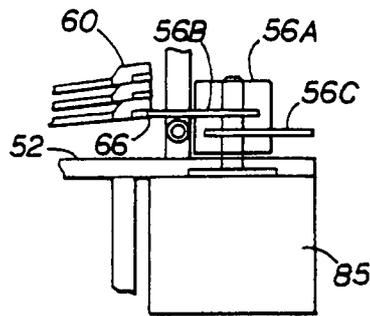


FIG 8A

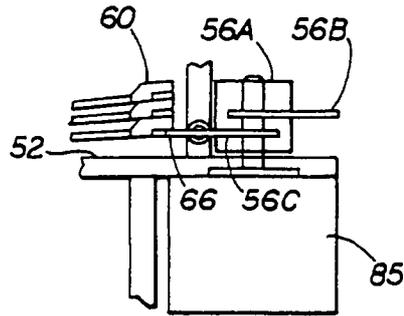


FIG 8B

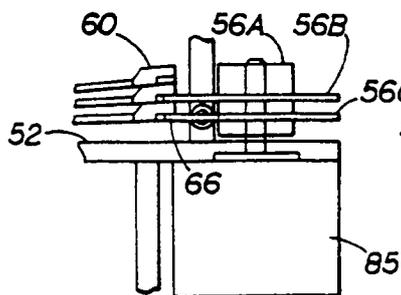


FIG 8C

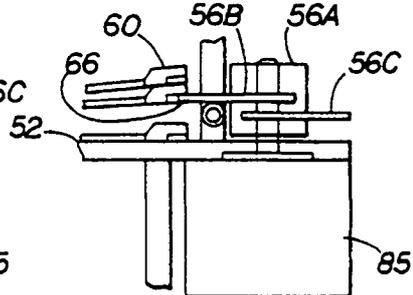


FIG 8D

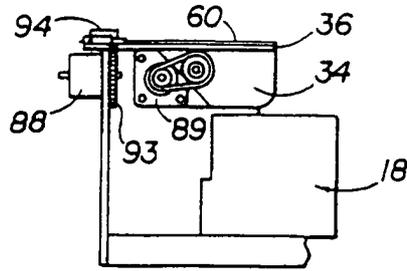


FIG 9A

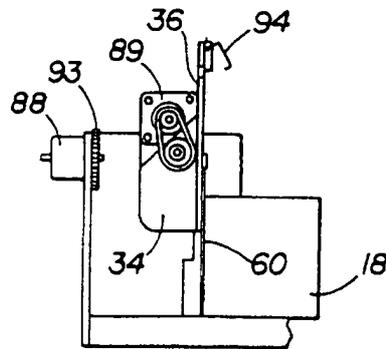


FIG 9B

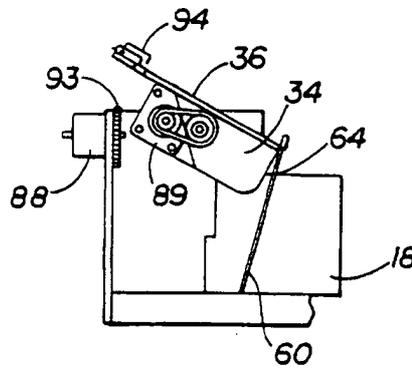


FIG 9C

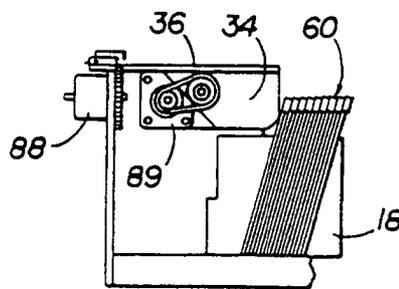


FIG 9D

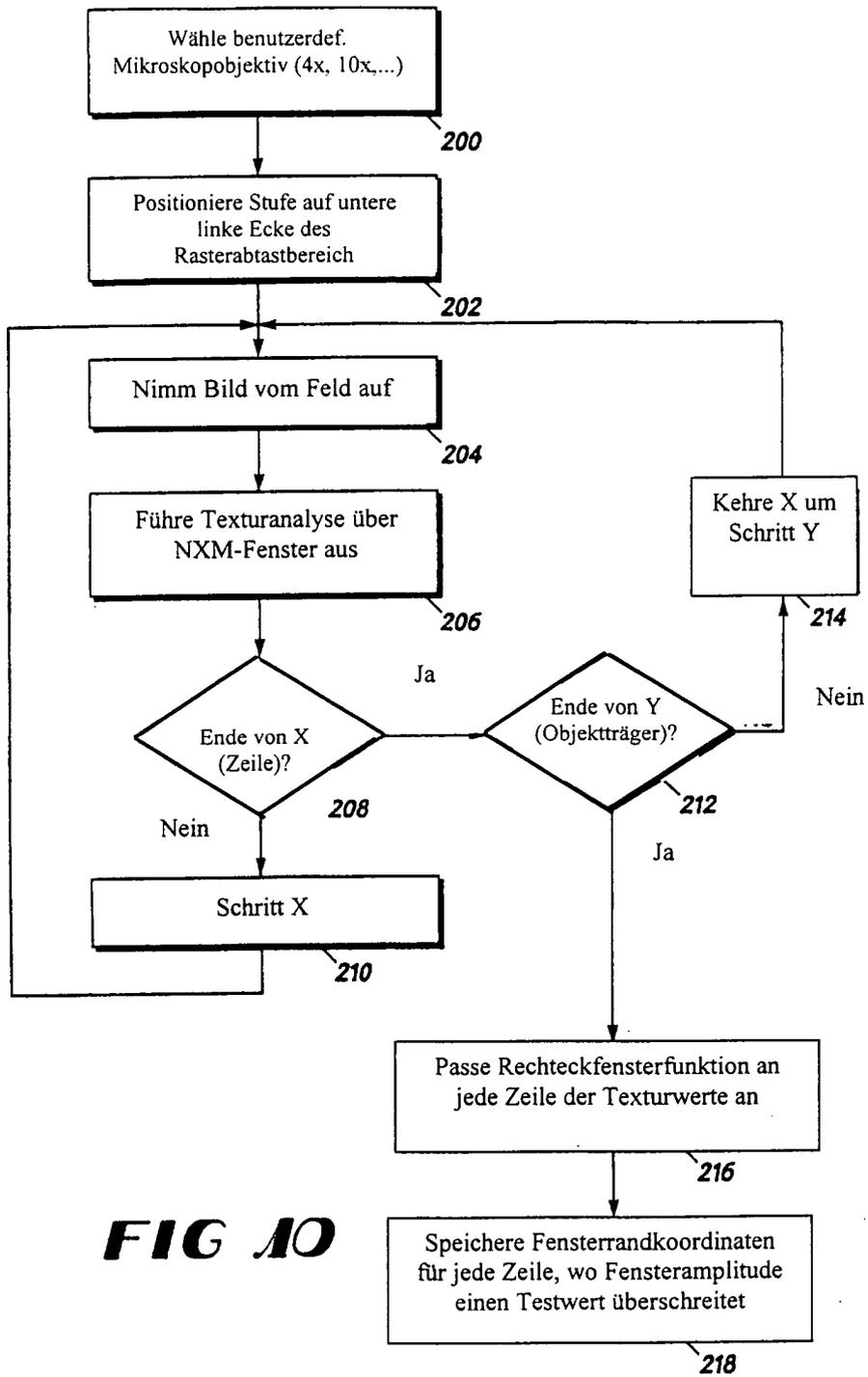


FIG 10

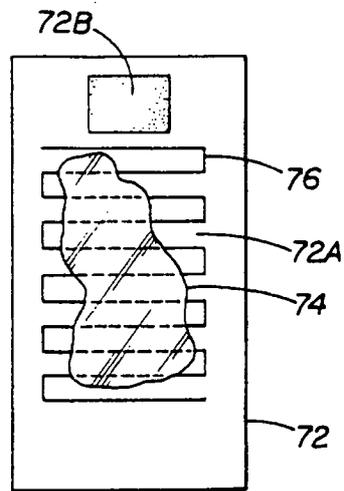


FIG 11

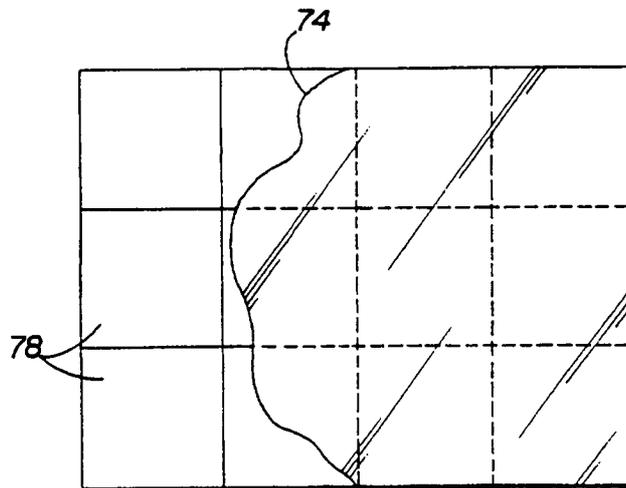


FIG 12

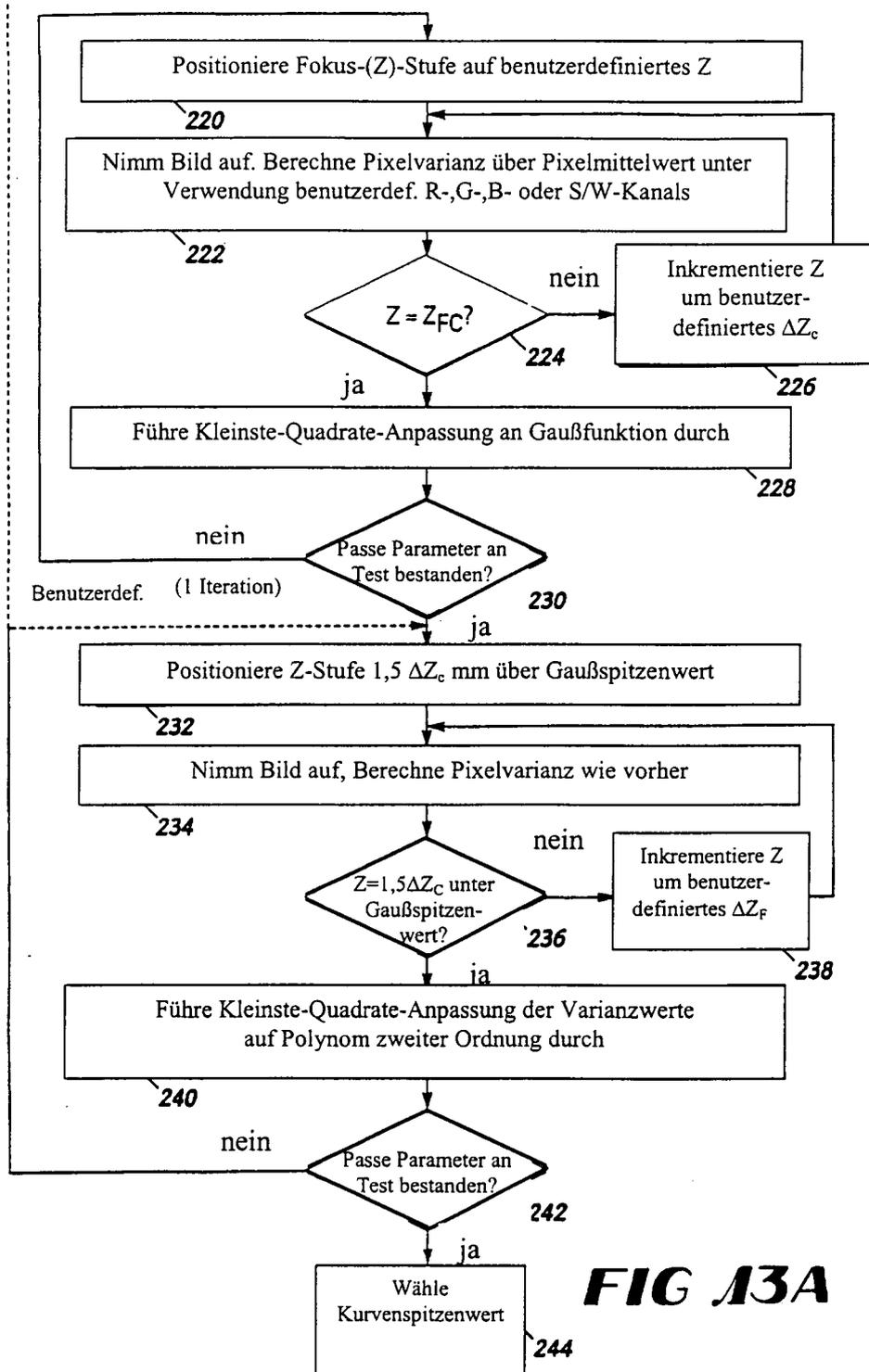


FIG 13A

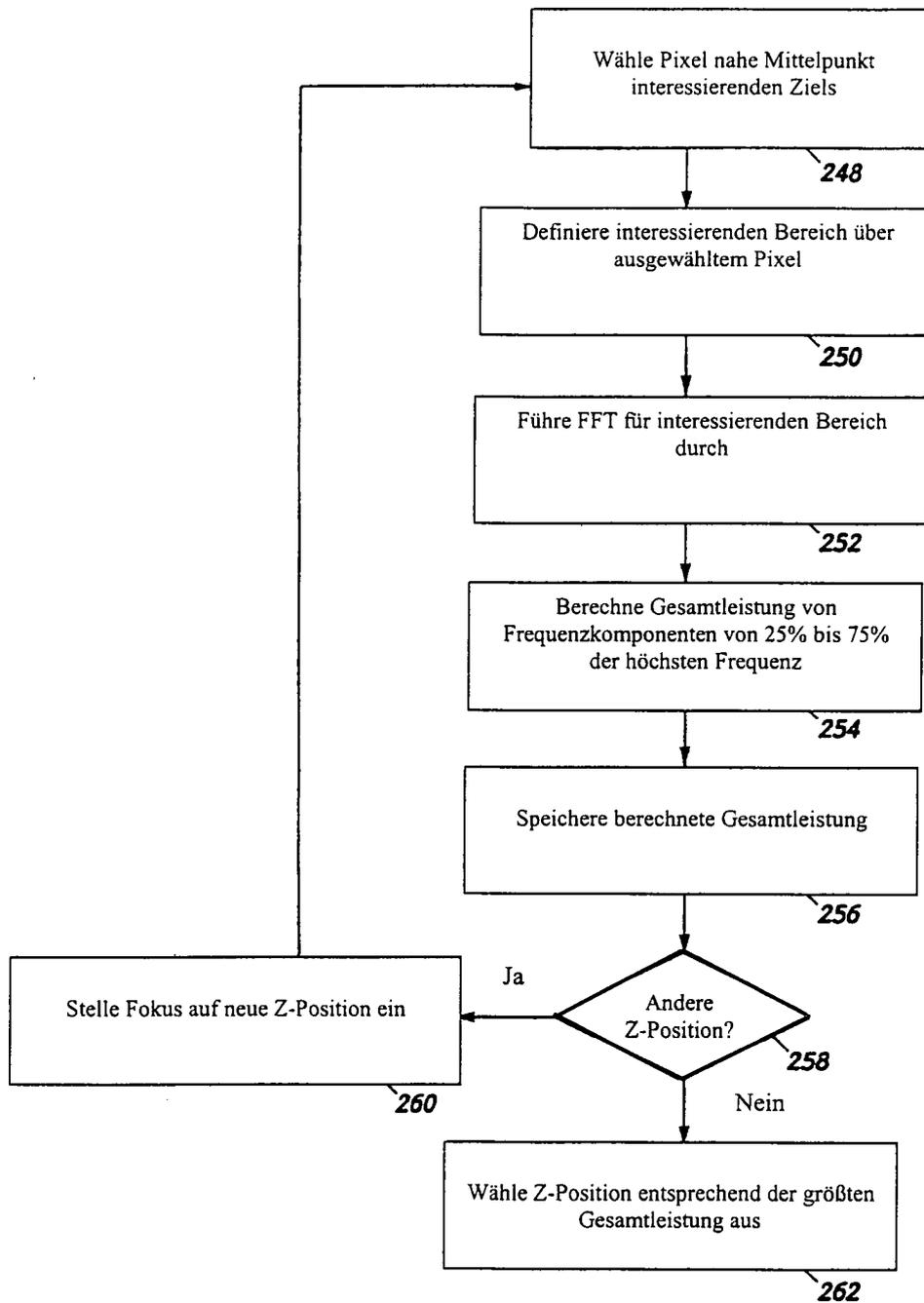
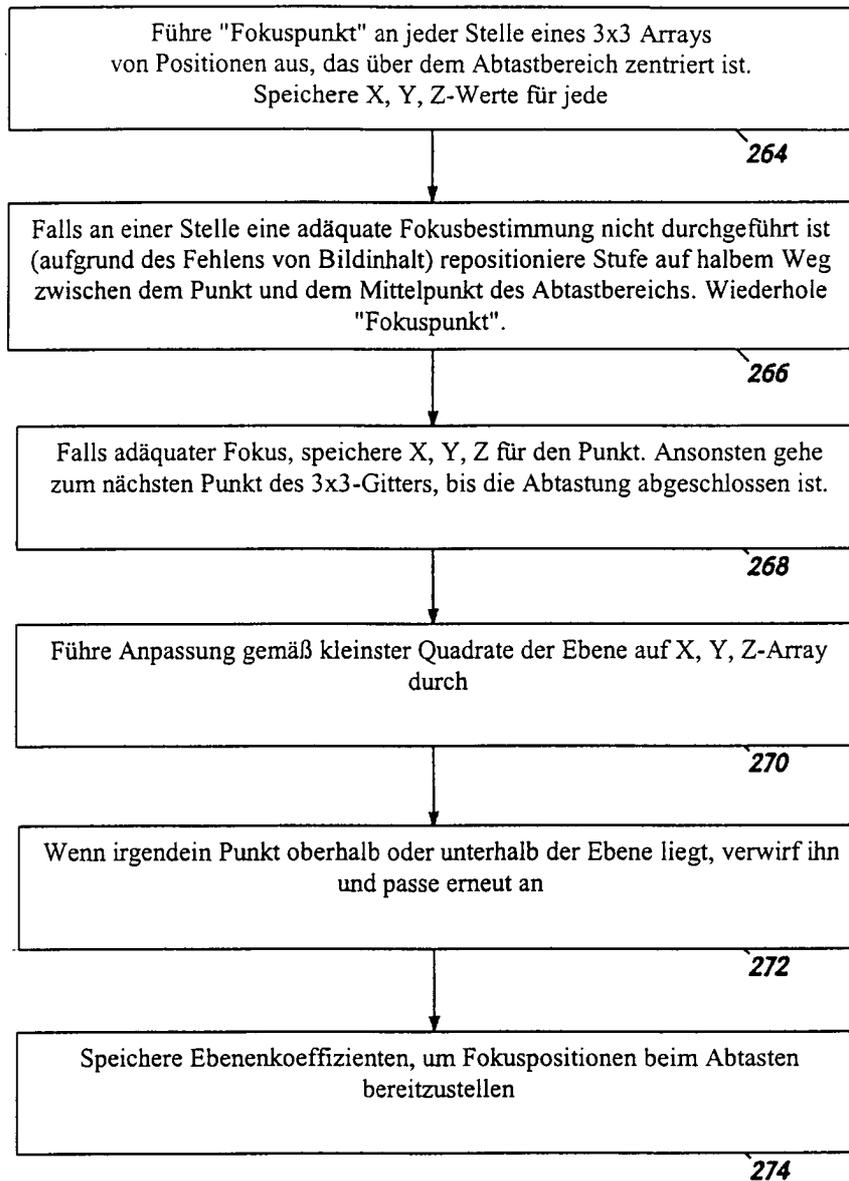


FIG 13B

**FIG 14**

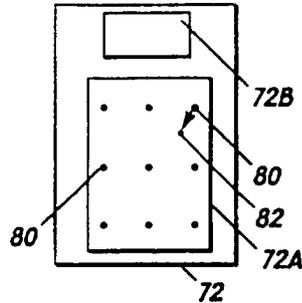


FIG 15

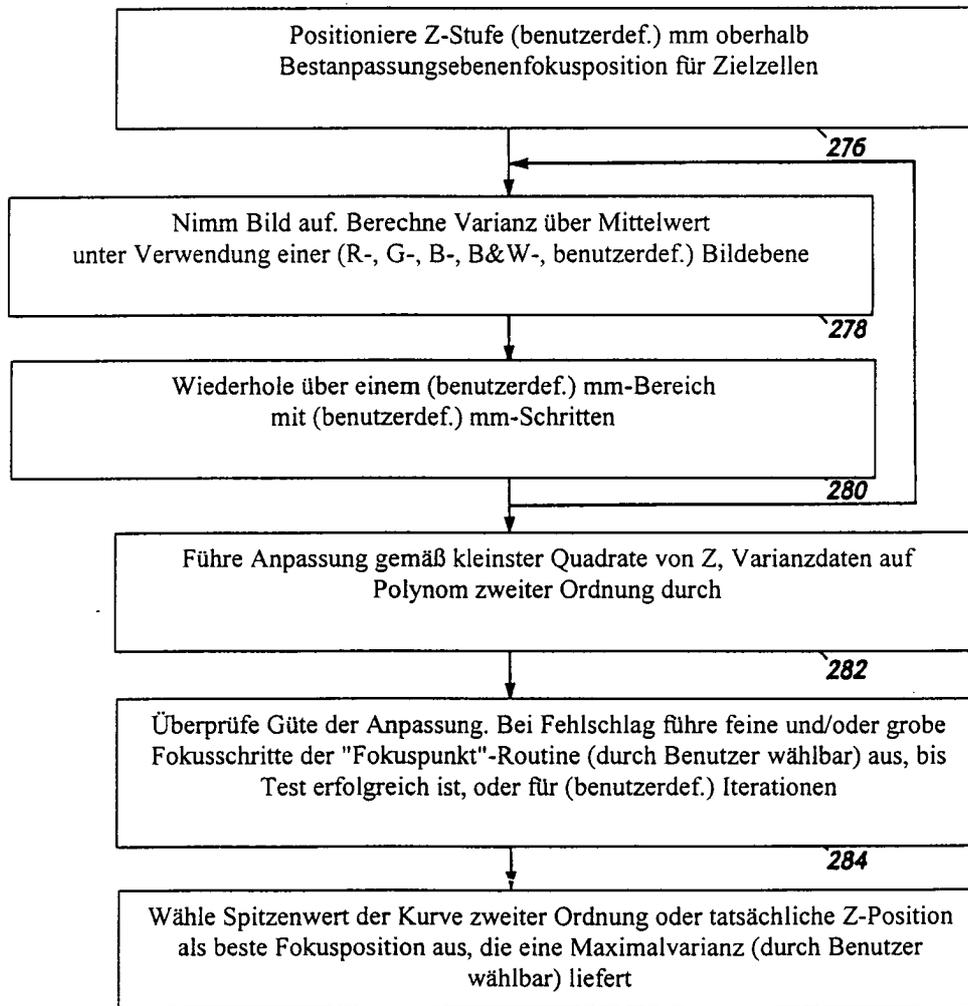


FIG 16

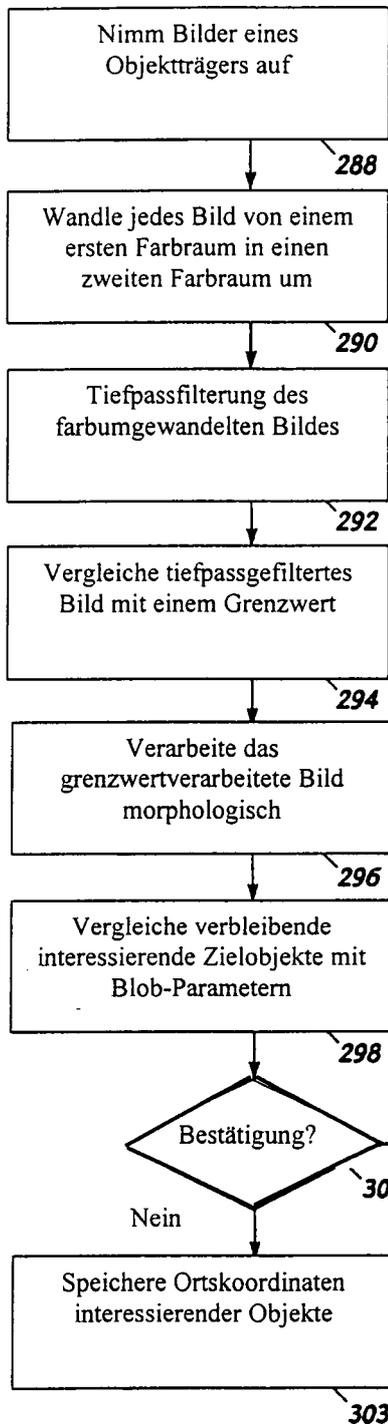


FIG 17A

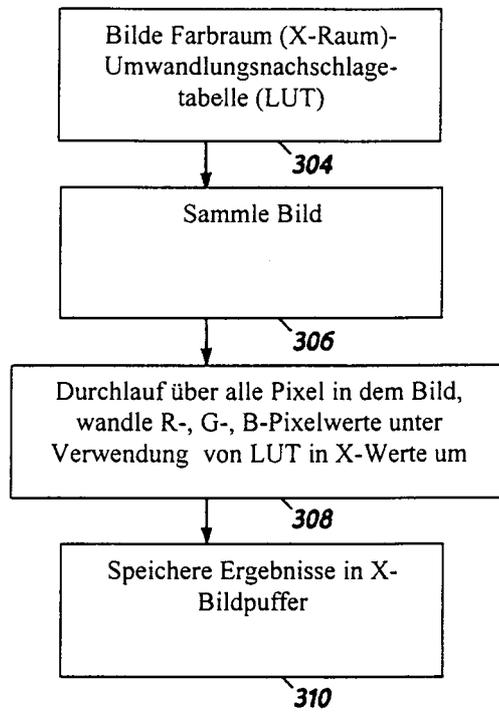


FIG 17B

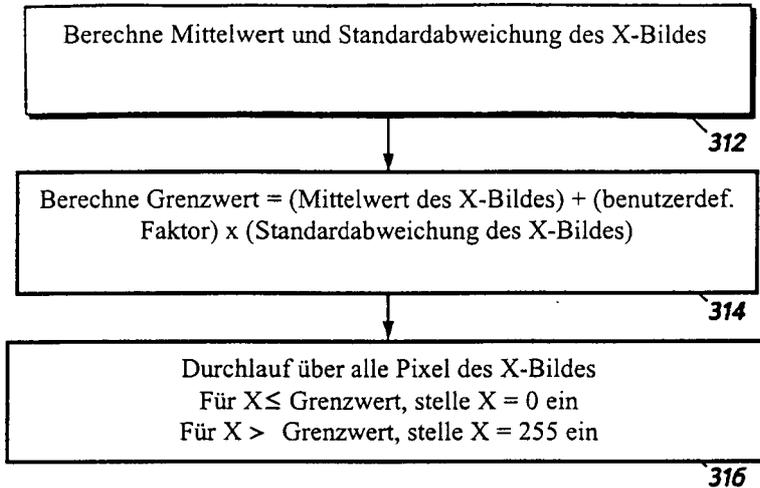


FIG 18

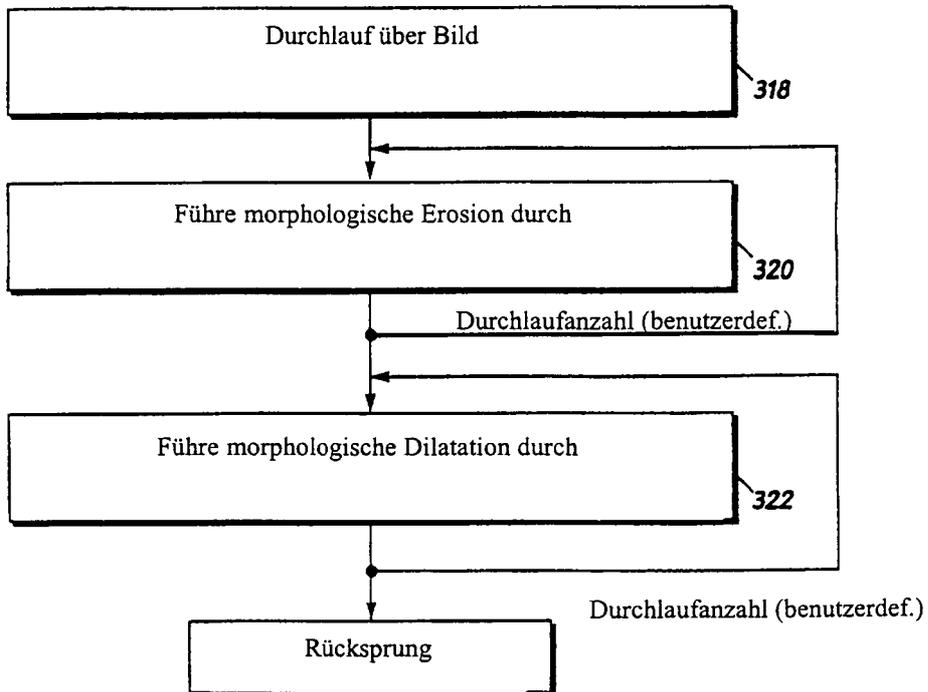


FIG 19

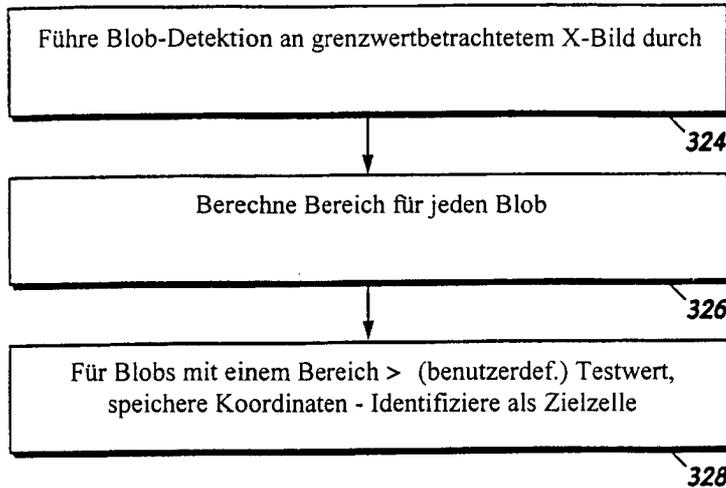


FIG 20

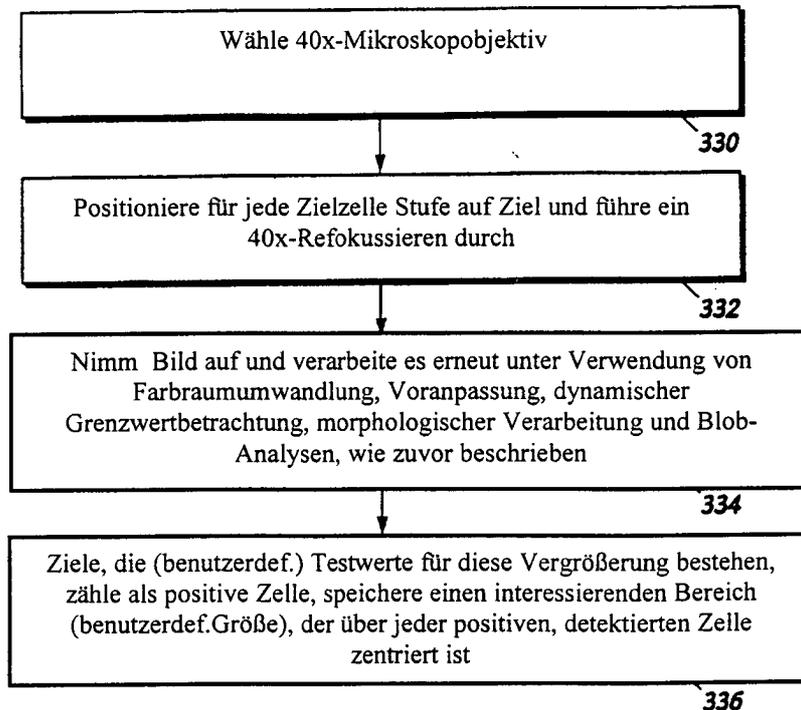


FIG 21

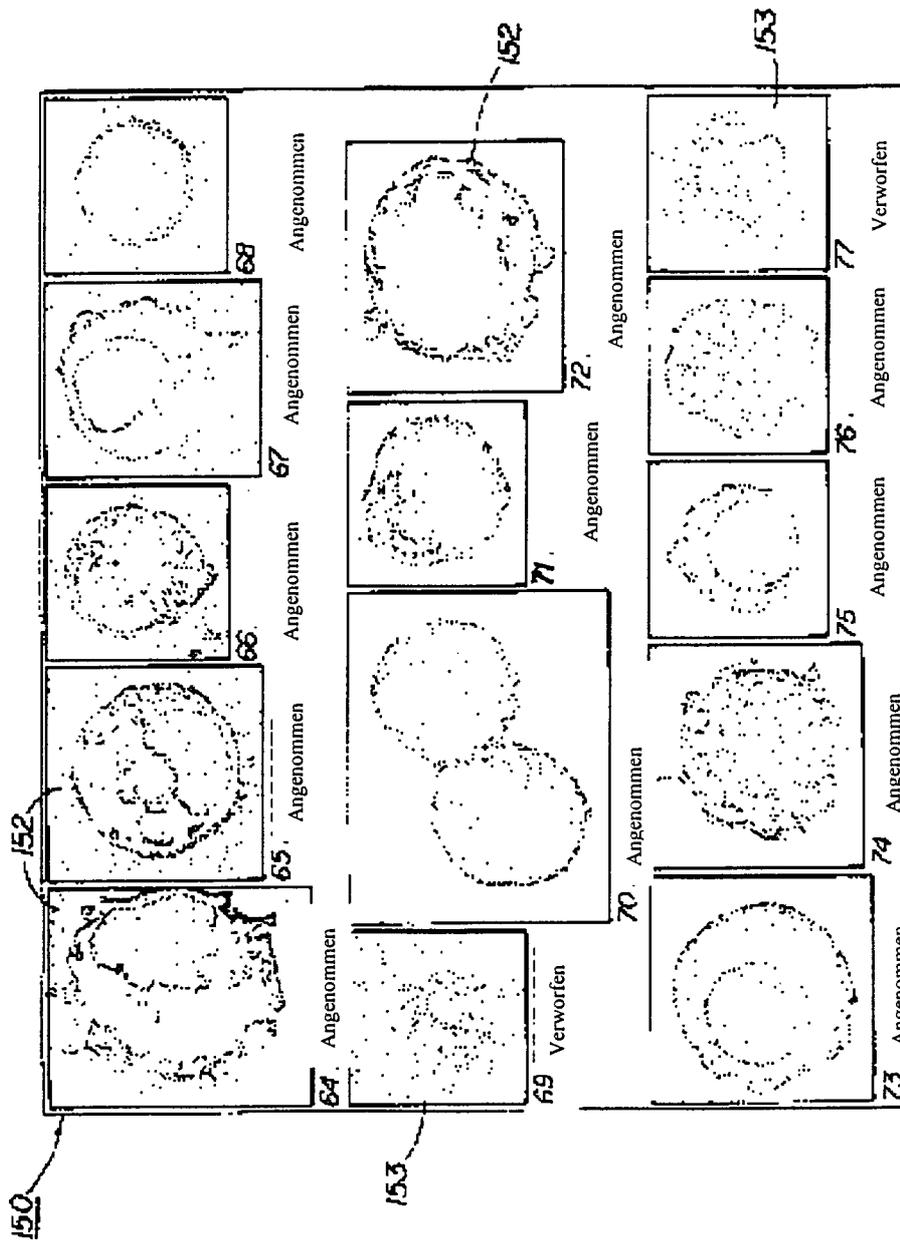
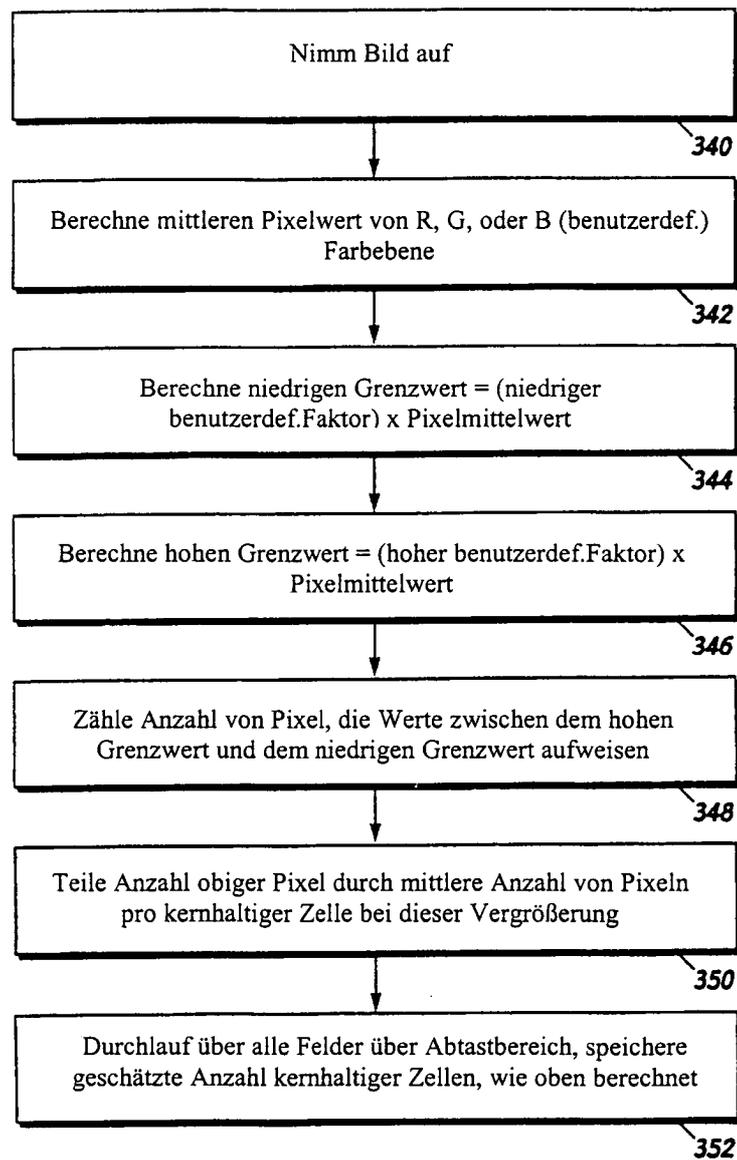


FIG 22

**FIG 23**

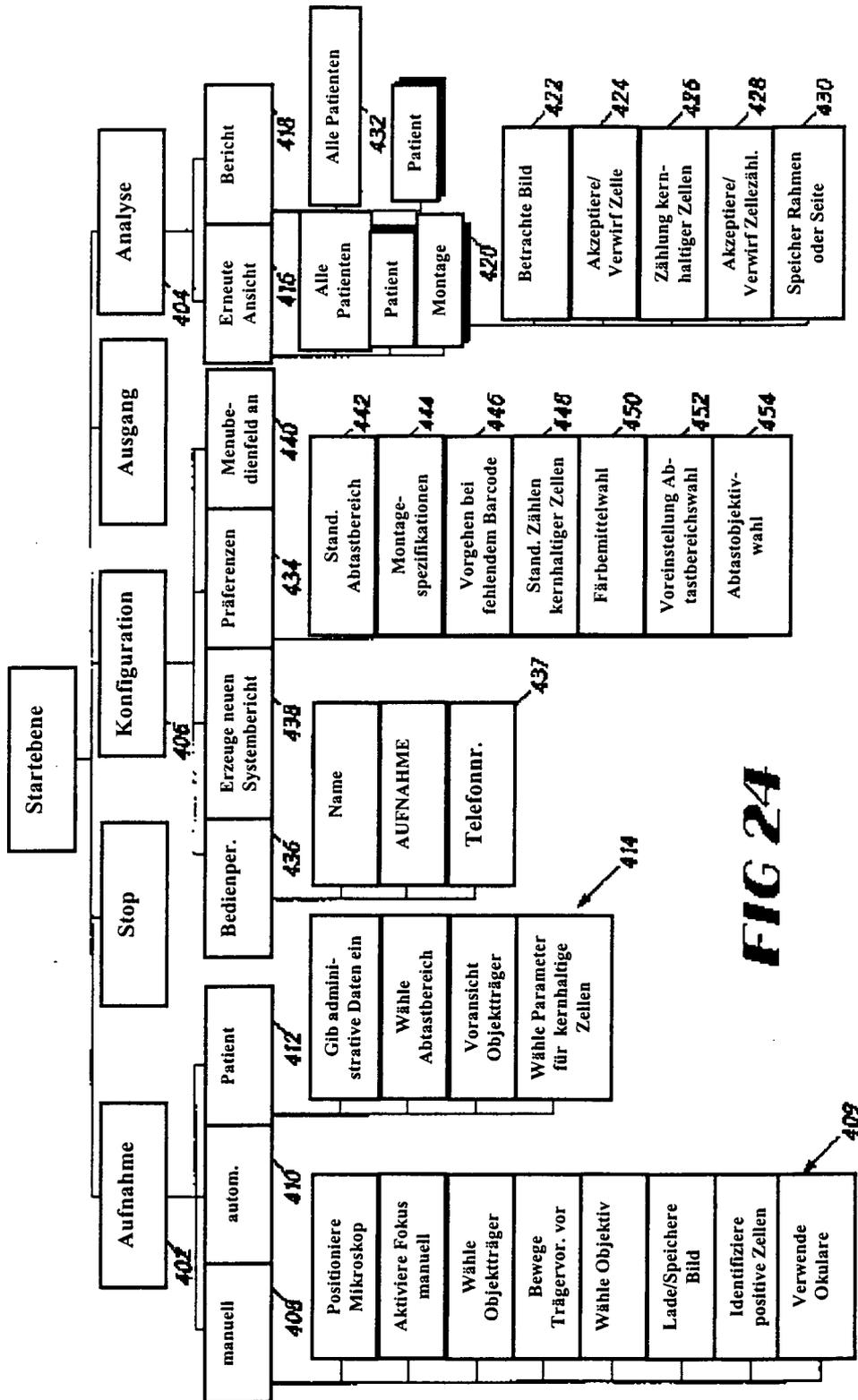


FIG 24