



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0129708  
(43) 공개일자 2015년11월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 15/14 (2006.01) G01N 1/30 (2006.01)  
G01N 21/53 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
G01N 33/80 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
G01N 15/1404 (2013.01)  
G01N 1/30 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7024439  
(22) 출원일자(국제) 2014년03월18일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2015년09월08일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/030939  
(87) 국제공개번호 WO 2014/146061  
국제공개일자 2014년09월18일  
(30) 우선권주장  
61/799,152 2013년03월15일 미국(US)  
14/217,034 2014년03월17일 미국(US)
- (71) 출원인  
아이리스 인터내셔널 인크.  
미국 캘리포니아주 91311 체스워스 이튼 에비뉴 9172
- (72) 발명자  
아담스, 토마스 에이치.  
미국 92024 캘리포니아주 엔시니타스 넵툼 에비뉴 1054  
원더스, 바트 제이.  
미국 캘리포니아주 트라부코 캐니언 우드브리지 코트 10  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 김영

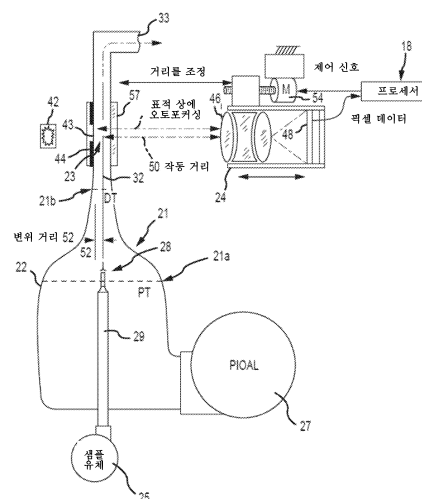
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 혈액 샘플에서의 입자 분석을 위한 동적 범위 확대 시스템 및 방법

(57) 요약

적어도 2개의 범주의 입자들을 함유하는 샘플, 예컨대 혈구들을 함유하는 샘플을 분석하기 위하여, 검출 한계의 적용을 받는 입자 카운터가 입자 개수 비들을 판별할 수 있는 분석기, 예컨대 시각적 분석기, 및 프로세서와 커플링된다. 입자들의 제1 범주는 검출 범위 한계들을 넘어서 존재할 수 있으며, 반면 입자들의 제2 범주는 각각의 검출 범위 한계들 내에 존재한다. 입자들의 제2 범주의 농도는 입자 카운터에 의해 결정된다. 제1 범주 대 제2 범주의 카운트들의 비가 분석기 상에서 결정된다. 제1 범주 내의 입자들의 농도는 그러한 비 및 제2 범주 내의 입자들의 카운트 또는 농도에 기초하여 프로세서 상에서 계산된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*G01N 15/1434* (2013.01)

*G01N 15/1463* (2013.01)

*G01N 15/1468* (2013.01)

*G01N 15/147* (2013.01)

*G01N 15/1475* (2013.01)

*G01N 21/53* (2013.01)

*G01N 33/5091* (2013.01)

*G01N 33/5094* (2013.01)

*G01N 33/80* (2013.01)

(72) 발명자

로셰, 존

미국 메인주 스카버러 핀네아스 레인 2

카스단, 하비 엘.

미국 캘리포니아주 로스앤젤레스 에스. 캔필드 애  
비뉴 1543

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제2 세포 유형을 포함하는 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형의 양을 측정하기 위한 방법으로서,

상기 샘플의 제1 부피를 혈액학 세포 카운터(hematology cell counter)를 통해 유동시킴으로써 상기 제1 부피 내의 상기 제2 세포 유형의 집단을 결정하는 단계;

상기 샘플의 제2 부피를 플로우셀 내에서 유동하는 시스 유체(sheath fluid) 내로 주입하여 두께 및 상기 두께 보다 더 큰 폭을 갖는 샘플 스트림을 제공하도록 함으로써, 제1 개수의 상기 제1 유형 세포들 및 제2 개수의 상기 제2 세포 유형들의 이미지들을 획득하는 단계 - 상기 획득된 이미지들은 상기 샘플 스트림의 두께를 가로지르는 이미지 경로를 따라 획득됨 -;

상기 획득된 이미지들을 사용하여 상기 제1 세포 유형의 제1 개수 대 상기 제2 세포 유형의 제2 개수의 비를 결정하는 단계; 및

상기 비 및 상기 제2 세포 유형의 집단을 사용하여 상기 샘플 중의 상기 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치(cell quantity measure)를 계산하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포량 측정기준치는 상기 혈액 유체 샘플 중의 상기 제1 세포 유형에 대한 세포 농도를 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포량 측정기준치는 상기 혈액 유체 샘플 중의 상기 제1 세포 유형에 대한 세포 카운트를 포함하는, 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포 카운터는 상기 제1 세포 유형의 카운팅과 관련된 제1 정확도 및 상기 제2 세포 유형의 카운팅과 관련된 제2 정확도를 가지며, 상기 제2 정확도는 상기 제1 정확도보다 더 우수한, 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 혈액학 세포 카운터는 원하는 정확도 범위를 가지며, 상기 원하는 정확도 범위는 상기 제1 부피 내의 세포들의 최소 집단과 상기 제1 부피 내의 세포들의 최대 집단 사이에서 확대되며, 상기 부피 내의 결정된 제2 세포 유형 집단은 상기 원하는 정확도 범위 내에 있고, 상기 샘플의 제1 세포 유형의 계산된 세포량 측정기준치는 상기 원하는 정확도 범위 밖에 있는, 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 혈액학 세포 카운터를 통해 상기 샘플의 제1 부피를 유동시킨 결과로서 상기 제1 부피 내의 제1 세포 유형의 집단을 결정하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 제1 부피 내의 결정된 제1 세포 유형 집단은 상기 제1 세포 유형에 대해 원하는 정확도 범위를 초과하거나 그 미만이고, 상기 제1 세포 유형의 계산된 세포량 측정기준치와 상이한, 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 결정된 제1 세포 유형 집단은 0인, 방법.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 결정된 제1 세포 유형 집단은 0 초과인, 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 혈액학 세포 카운터는 상기 세포 카운터를 통해 유동하는 제2 유형 세포에 응답하여 전기 임피던스의 변화를 검출하는 센서 메커니즘을 포함하는, 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 혈액학 세포 카운터는 상기 세포 카운터를 통해 유동하는 제2 유형 세포에 응답하여 광로의 차단을 검출하는 센서 메커니즘을 포함하는, 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 혈액학 세포 카운터는, 상기 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 농도 한계 및 최대 검출가능 농도 한계를 갖고, 상기 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 농도 한계 및 최대 검출가능 농도 한계를 가지며,

상기 결정된 제2 세포 유형 집단은 상기 제2 세포 유형에 대해 검출된 농도 파라미터 - 상기 검출된 농도 파라미터는 상기 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만임 - 에 기초하고,

상기 제1 세포 유형은 상기 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 농도로 존재하는, 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 혈액학 세포 카운터는, 상기 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 부피 한계 및 최대 검출가능 부피 한계를 갖고, 상기 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 부피 한계 및 최대 검출가능 부피 한계를 가지며,

상기 결정된 제2 세포 유형 집단은 상기 제2 세포 유형에 대해 검출된 부피 파라미터 - 상기 검출된 부피 파라미터는 상기 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만임 - 에 기초하고,

상기 제1 세포 유형은 상기 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 부피 파라미터로 존재하는, 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 혈액학 세포 카운터는, 상기 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 크기 한계 및 최대 검출가능 크기 한계를 갖고, 상기 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 크기 한계 및 최대 검출가능 부피 크기를 가지며,

상기 결정된 제2 세포 유형 집단은 상기 제2 세포 유형에 대해 검출된 크기 파라미터 - 상기 검출된 크기 파라미터는 상기 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만임 - 에 기초하고,

상기 제1 세포 유형은 상기 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 크기 파라미터로 존재하는, 방법.

#### 청구항 14

제1항에 따르면, 상기 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단의 결정은 상기 제1 세포 유형의 세포들과 상기 제2 세포 유형의 세포들을 함께 그룹화하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 15

제6항에 있어서, 상기 비 및 상기 제2 세포 유형의 집단을 사용하여 상기 샘플 중의 제2 세포 유형의 세포량 측정기준치를 계산하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, 상기 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단의 결정은 상기 제1 세포 유형의 세포들과 상

기 제2 세포 유형의 세포들을 함께 그룹화하는 단계를 포함하며, 상기 방법은 상기 혈액학 세포 카운터를 통해 상기 샘플의 제1 부피를 유동시킨 결과로서 상기 제1 부피 내의 제1 세포 유형의 집단을 결정하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 샘플 중의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치의 계산은 상기 비, 상기 제2 세포 유형의 집단, 및 상기 제1 세포 유형의 집단을 사용하는, 방법.

#### 청구항 17

제2 세포 유형을 포함하는 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형의 양을 측정하기 위한 시스템으로서,  
채널 및 출력부 - 상기 출력부는 상기 채널을 통해 유동하는 상기 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단을 나타내는 신호들을 생성하도록 상기 채널에 작동식으로 커플링된 - 를 갖는 혈액학 세포 카운터;  
샘플 스트림의 유동을 용이하게 하도록 구성된 플로우셀 - 상기 샘플 스트림은 상기 샘플의 제2 부피 및 시스템 유체를 포함하고, 두께 및 상기 두께보다 더 큰 폭을 가짐 -;  
제1 개수의 상기 제1 유형 세포들 및 제2 개수의 상기 제2 세포 유형들의 이미지들을 획득하도록 구성된 이미징 장치 - 상기 획득된 이미지들은 상기 샘플 스트림의 두께를 가로지르는 이미지 경로를 따라 획득됨 -;  
상기 획득된 이미지들을 사용하여 상기 제1 세포 유형의 제1 개수 대 상기 제2 세포 유형의 제2 개수의 비를 결정하고, 상기 비 및 상기 제2 세포 유형의 집단을 나타내는 상기 신호들을 사용하여 상기 샘플 중의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치를 계산하는 프로세서를 포함하는, 시스템.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 프로세서는 상기 제2 세포 유형의 집단을 나타내는 신호들을 수신하도록 상기 혈액학 세포 카운터에 커플링되는, 시스템.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, 상기 프로세서는 상기 획득된 이미지들을 수신하도록 상기 이미징 장치에 커플링되는, 시스템.

#### 청구항 20

제17항에 있어서, 상기 플로우셀 및 상기 이미징 장치는 상기 혈액 유체 샘플 중의 세포들을 이미징하기 위한 조합된 점도 및 기하학적 하이드로포커싱(combined viscosity and geometric hydrofocusing)을 수행하는 혈액학 분석기의 구성요소들인, 시스템.

#### 청구항 21

제17항에 있어서, 상기 시스템 유체와 상기 혈액 유체 샘플 사이의 점도 차이가, 상기 플로우셀의 유로 크기의 감소부와 조합하여, 상기 플로우셀의 이미지 캡처 영역에서 상기 샘플 스트림을 하이드로포커싱하기에 효과적인, 시스템.

### 발명의 설명

### 배경 기술

[0001]

관련 출원과의 상호참조

[0002]

본 출원은 2013년 3월 15일에 출원된 미국 가특허 출원 제61/799,152호에 대해 비잠정적이고 그에 대한 우선권의 이득을 주장하며, 이 출원의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 출원은 또한 미국 특허 출원 제 14/215,834호, 제14/216,533호, 제14/216,339호, 제14/216,811호 및 제14/217,034호와 국제 특허 출원 제 (오토포커스, 플로우셀, 시스템 유체, 조영제, 혈액학(*autofocus, flowcell, sheath fluid, contrast agent, hematology*))과 관련되며, 이들 모두는 2014년 3월 17일에 출원된 것이다. 각각의 이들 출원의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003]

본 발명은 입자들의 분석을 위한 장치, 시스템, 조성물, 및 방법의 분야에 관한 것으로, 이는 전체 또는 부분 자동화 디바이스를 사용하여, 유체 샘플 중의 입자들을 이미징하여, 샘플 중의 혈구들과 같은 입자들을 구별하고 정량화하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 대상체로부터의 샘플 중의 입자들을 분석하는 데 유용한 입자

및/또는 세포내 세포소기관 정렬 액체(particle and/or intracellular organelle alignment liquid, PIOAL), 그 액체를 생성하기 위한 방법, 및 입자들을 검출하고 분석하기 위해 그 액체를 사용하기 위한 방법에 관한 것이다. 이미지-기반 생물학적 유체 샘플의 분석을 수행하는 데 유용한 조성물, 시스템, 디바이스 및 방법이 또한 개시된다. 본 발명의 조성물, 시스템, 디바이스, 및 방법은 또한 생물학적 유체 중의 입자들, 예컨대 적혈구, 망상적혈구(reticulocyte), 유핵 적혈구, 혈소판을 검출하고, 카운팅하고, 특성화하는 데, 그리고 이미지 및 형태학-기반 백혈구 감별 카운팅(differential counting), 범주화, 하위범주화, 특성화 및/또는 분석에 유용하다.

[0004]

혈구 분석은 환자의 건강 상태의 개관을 제공하기 위해 가장 일반적으로 수행되는 의학적 검사들 중 하나이다. 혈액 샘플이 환자의 신체로부터 채취되고, 혈액형성(clotting)을 방지하기 위해 항응고제를 함유하는 시험관 내에 저장될 수 있다. 전혈 샘플은 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 포함한 3가지 주요 부류의 혈구들을 통상 포함한다. 각각의 부류는 구성원들의 하위부류들로 추가로 세분될 수 있다. 예를 들어, 백혈구(WBC)의 5가지 주요 유형 또는 하위부류는 상이한 형상 및 기능을 갖는다. 백혈구는 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 및 호염기구를 포함할 수 있다. 또한, 적혈구 유형들의 하위부류들이 있다. 샘플 중의 입자의 외관은 병리학적 상태, 세포 성숙 및 다른 원인들에 따라 상이할 수 있다. 적혈구의 하위부류들은 망상적혈구 및 유핵 적혈구를 포함할 수 있다.

[0005]

RBC, WBC 또는 혈소판의 농도를 평가하는 혈구 카운트(blood cell count)는 수동으로 또는 자동 분석기를 사용하여 행해질 수 있다. 혈구 카운트가 수동으로 행해지는 경우, 혈액 한 방울을 박층 도말(thin smear)로서 현미경 슬라이드에 적용한다. 전통적으로, 5가지 유형의 백혈구의 수 또는 상대량을 결정하기 위해 현미경 슬라이드 상에서의 혈액의 건조된 염색 도말의 수동 검사가 사용되어 왔다. 세포 또는 세포 구조를 염색하기 위해 조직학적 염료(dye) 및 염색제(stain)가 사용되어 왔다. 예를 들어, 라이트 염색제(Wright's stain)는 광학 현미경 하에서의 검사를 위한 혈액 도말을 염색하는 데 사용되어 온 조직학적 염색제이다. 자동화 분석기를 사용하여 온혈구 카운트(Complete Blood Count, CBC)가 얻어질 수 있는데, 이러한 자동화 분석기의 하나의 유형은 혈액 샘플 중의 상이한 입자들 또는 세포들이 소형 관을 따라 감지 영역(sensing area)을 통과함에 따라 임피던스 또는 동적 광 산란에 기초하여 이러한 입자들 또는 세포들의 수를 카운팅한다. 자동화 CBC는 RBC, WBC 및 혈소판(PLT)을 포함한 세포들의 상이한 유형들 사이를 감별하기 위하여 기기 또는 방법을 사용할 수 있으며, 이때 이들 세포는 별개로 카운팅될 수 있다. 예를 들어, 대세포(large cell)만을 카운팅하기 위하여 최소 입자 크기 또는 부피를 필요로 하는 카운팅 기술이 사용될 수 있다. 혈액 중의 비정상 세포와 같은 소정의 세포가 올바르게 카운팅되지 않거나 식별되지 않을 수 있다. 서로에게 부착되는 소세포들이 대세포로서 잘못 카운팅될 수 있다. 잘못된 카운트가 의심되는 경우에는, 세포를 입증 및 식별하기 위하여 기기의 결과에 대해 수작업으로 재검토하는 것을 필요로 할 수 있다.

[0006]

자동화 혈구 카운팅 기술은 유세포분석(flow cytometry)을 포함할 수 있다. 유세포분석은 좁은 유로를 제공하는 것, 및 개별 혈구들의 통과를 감지 및 카운팅하는 것을 포함한다. 유세포분석 방법은 유체 중에 현탁된 입자들, 예컨대 혈액 샘플 중의 세포들을 검출하는 데, 그리고 이러한 입자들을 입자 유형, 치수, 및 부피 분포에 대해 분석하여 혈액 샘플 중의 각각의 입자 유형 또는 입자 부피의 농도를 추론하도록 하는 데 사용되어 왔다. 유체 중에 현탁된 입자들을 분석하기에 적합한 방법의 예에는 침강, 현미경적 특성화(microscopic characterization), 임피던스에 기초한 카운팅, 및 동적 광 산란이 포함된다. 이들 툴(tool)은 검사 오류가 일어나기 쉽다. 다른 한편으로, 입자의 농도 및 유형의 정확한 특성화는 의학적 진단과 같은 응용에서 결정적일 수 있다.

[0007]

이미징에 기초한 카운팅 기술에서는, 관찰 영역(viewing area)을 통과하는 중일 수 있는 준비된 샘플의 픽셀 데이터 이미지가, 디지털 카메라에 커플링된 현미경 대물 렌즈를 사용하여 캡처된다. 픽셀 이미지 데이터는 데이터 처리 기술을 사용하여 분석되고, 또한 모니터 상에 표시될 수 있다.

[0008]

플로우셀(flowcell)에 의한 자동화 진단 시스템의 태양들이, 터너(Turner) 등에게 허여된 미국 특허 제 6,825,926호 및 모두가 카스단(Kasdan) 등에게 허여된 미국 특허 제 6,184,978호; 제 6,424,415호; 및 제 6,590,646호에 개시되어 있으며, 이들은 마치 본 명세서에 완전히 기술된 것처럼 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0009]

동적 광 산란 또는 임피던스를 사용하는 자동화 시스템이 온혈구 카운트(CBC), 즉 전체 백혈구 카운트(WBC), 적혈구의 전체 세포 부피(RBC 분포), 헤모글로빈 HGB(혈액 중의 헤모글로빈의 양); 평균 세포 부피(MCV)(적혈구의 평균 부피); MPV(평균 PLT 부피); 적혈구용적률(HCT); MCH(HGB/RBC)(적혈구당 헤모글로빈의 평균량); 및 MCHC(HGB/HCT)(세포 중의 헤모글로빈의 평균 농도)를 얻는 데 사용되어 왔다. 백혈구 5종 감별 카운팅 및 혈액

샘플 분석을 가능하게 하기 위하여 자동화 공정 또는 부분 자동화 공정이 사용되어 왔다.

[0010] 그러한 현재 알려진 입자 분석 시스템 및 방법은, 관련 의학적 진단 기술과 함께, 의사, 임상사, 및 환자에게 현실적인 이점을 제공할 수 있기는 하지만, 한층 더한 개선이 요망된다. 본 발명의 실시 형태들은 이들 미해결된 요구 중 적어도 일부에 대한 해결책을 제공한다.

### 발명의 내용

[0011] 본 발명의 실시 형태들은, 예시적인 동적 또는 검출 범위 확대 기술을 사용하여, 혈액 유체 샘플 중에 존재하는 세포들 또는 입자들을 정량화하기 위한 시스템 및 방법을 포함한다.

[0012] 예를 들어, 예시적인 실시 형태들은, 입자 부피와 같은 파라미터에 기초하여, 적어도 하나의 검출 범위와 관련된 부정확한 입자 카운트를 정정하기 위한 기술을 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 농도에 대해 그리고/또는 부피 기준으로 검출 범위 밖에 있는 입자들이 정확하게 검출 및 측정될 수 있다.

[0013] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 본 명세서에 나타난 입자 카운터와 관련된 용어 "검출 한계" 또는 "검출 범위의 밖"은 일정 범위를 포함하며, 이러한 범위 내에서 입자 카운트는 더 정확하고/하거나 이러한 범위 밖에서 입자 카운트는 덜 정확하거나 심지어 실시 불가능한 것으로 이해될 것이다. 검출 범위는 검출 상한 및/또는 검출 하한을 포함할 수 있으며, 이들은 전형적으로는 최대 또는 최소 농도로 표현되지만, 또한 가능하게는 입자들이 주어진 정확도 공차 내에서 카운팅되는 최대 또는 최소 빈도수로도 표현된다. 따라서, 본 발명의 실시 형태들은 회박한 중 및/또는 방대한 종의 카운트를 정량화하기 위한 혈액 유체 샘플의 평행 플로우셀 및 임피던스 분석을 위한 시스템 및 방법을 포함한다.

[0014] 검출 범위는 농도를 기준으로 할 수 있으며, 이에는 국소 농도, 및/또는 다른 명시된 기준 또는 기준들이 포함될 수 있다. 예를 들어, 정상 PLT(즉, 직경이 2  $\mu\text{m}$  미만인 PLT)보다 더 작은 혈구 또는 단편과 같은 입자는 입자 카운터에서 정확하게 검출 및 카운팅하기가 어려울 수 있다. 정상 백혈구(즉, 직경이 15  $\mu\text{m}$  초과인 백혈구)보다 더 큰 비정상 세포는 입자 카운터에서 정확하게 검출 및 카운팅하기가 어려울 수 있다. 게다가, 높은 농도에서, RBC 및 PLT는 정확하게 카운팅하기가 어려울 수 있다. 회석 후에도, RBC 및 PLT는 응집되어 응괴(clump)를 형성할 수 있으며, 그 결과 입자 카운터를 사용하여 얻어진 입자 카운트의 잘못된 판독을 가져올 수 있다. 더욱이, 낮은 농도로 샘플 중에 존재하는 일부 미성숙 또는 비정상 혈구들의 정확한 카운트를 제공하기가 어렵다.

[0015] 일 예로서, 본 명세서에 기재된 장치를 사용함으로써, 측정의 검출 범위, WBC에 대한 검출 상한은 일부 실시 형태에서 (단위 부피) 당 최대 300,000, 400,000, 500,000, 600,000, 700,000, 800,000, 900,000, 또는 1,000,000으로 확대될 수 있다. PLT에 대한 검출 하한은 일부 실시 형태에서  $\mu\text{L}$ 당 20,000, 19,000, 18,000, 17,000, 16,000, 15,000, 14,000, 13,000, 12,000, 11,000, 10,000, 9,500, 9,000, 8,500, 8,000, 7,500, 7,000, 6,500, 6,000, 5,500, 5,000, 4,500, 4,000, 3,500, 3,000, 2,500, 2,000, 1,500 또는 1,000, 또는 500 미만으로 확대될 수 있다.

[0016] 이와 관련하여, 예시적인 실시 형태들은 하나의 채널 내에서 검출되는 입자들의 상이한 부류들(각각의 부류의 구성원들을 포함함)을 감별함으로써 입자 카운터에서 얻어진 부정확한 결과를 정정하기 위한 기술을 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 일부 입자들은 유사한 부피 또는 형태를 가지며, 하나의 채널 내에서 검출될 수 있다. 예를 들어, "거대(giant)" PLT, PLT 응집체(aggregate) 또는 응괴, 및 유핵 RBC는 WBC를 검출하도록 설계된 하나의 채널 내에서 "WBC"로서 카운팅될 수 있다. 게다가, 비용해(unlysed) 세포, 저온글로불린(cryoglobulin), 하인즈 소체(heinz body), 및 말라리아 기생충과 같은 다른 종들이 "WBC"로 카운팅되어, 샘플 중에 실제로 존재하는 것보다 더 높은 WBC 카운트를 제공할 수 있다. 유사하게, 높은 농도의 WBC 및 거대 PLT는 "RBC"로 카운팅될 수 있으며, 그 결과 RBC 카운트가 실제값보다 더 높아지게 된다. 소구성(microcytic) 적혈구, 적혈구 봉입체, 백혈구 단편, 먼지 입자, 용혈/분열적혈구(Schistocyte), 및 심지어 전자/전기 노이즈(noise)의 존재는 실제보다 더 높은 PLT의 카운트를 가져올 수 있다. 다른 한편으로, 동일한 부류 내의 혈병형성 및 압착(smudge) 세포들, 또는 한 부류의 세포들과 다른 한 부류의 세포들의 혼돈(confusion)은 입자 카운터 상에서의 상응하는 부류의 세포들의 부정확하고 더 낮은 카운트를 가져올 수 있다.

[0017] 본 발명의 방법의 일부 태양에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위를 초과하는 농도로 샘플 중에 존재하고; 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 본 발명의 방법의 다른



태양들에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출가능한 범위 미만의 농도로 샘플 중에 존재하고, 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 다른 태양들에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는 비정상 혈구, 미성숙 혈구, 응괴된 혈구, 직경이 15 마이크로미터보다 더 큰 혈구, 및 직경이 2 마이크로미터보다 더 작은 혈구 중 적어도 하나의 유형을 포함하고, 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주는 백혈구를 포함한다.

[0018]

본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 입자 카운터의 하나의 채널 내에서 다른 유형의 입자로 잘못 카운팅된 입자들이 별도로 그리고 정확하게 측정될 수 있다. 예시적인 방법은 또한 입자 카운터 상에서 정확하게 검출될 수 없는 입자들의 농도 또는 입자 카운트를 결정하는 데 사용될 수 있다. 이러한 입자들에는 입자 카운터 상에서 검출가능한 농도의 상한 또는 하한 부근 또는 밖의 농도로 존재하는 입자들 및/또는 정상 부피 범위 밖에 있는 입자들이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 이와 관련하여, 기재된 바와 같은 시스템 장치, 특히 본 명세서에 기재된 바와 같은, 예시적인 입자 조영제 조성물 및 PIOAL과 조합된 이미지 분석기 및 입자 카운터를 포함하는 시스템 장치를 작동시킴으로써, 입자 카운터의 하나의 채널 내에서 다른 유형의 입자로서 잘못 카운팅될 수 있는 일부 입자들이 별도로 그리고 정확하게 측정될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 일부 경우에 입자 카운터 상에서 정확하게 검출될 수 없는 입자들의 농도 또는 입자 카운트를 결정하는 데 사용될 수 있다. 이러한 입자들에는 입자 카운터 상에서 검출가능한 농도의 상한 또는 하한 부근 또는 밖의 농도로 존재하는 입자들 및/또는 검출 범위 밖에 있는 입자들이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 이는 이미지 분석기로부터 얻어진 정보를 적용시킴으로써 행해진다.

[0019]

전체적으로, 본 명세서에 개시된 바와 같은 장치, 예를 들어 예시적인 입자 조영제 조성물 및 PIOAL 시스템 유체를 사용하는 장치를 작동시킴으로써, 혈구 또는 다른 단편과 같은 입자들을 함유하는 샘플의 분석이, 입자 카운터에 대해 정상 검출 범위 밖에 있는 검출 범위 내에서 수행될 수 있다. 이와 관련하여, 본 명세서에 기재된 바와 같은 시스템 및 조성물을 사용하여, 농도 또는 입자 부피와 같은 파라미터에 기초하여 확대된 검출 범위 내에서 혈액 유체 샘플의 분석이 수행될 수 있다. 확대된 검출 범위는 입자 카운터에 대한 검출 범위 밖에 있을 수 있다.

[0020]

일부 실시 형태에서, 시스템 또는 장치는 입자 카운터를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 이러한 입자 카운터는 적어도 하나의 검출 범위를 갖는다. 소정 태양에서, 분석기 및 프로세서는 입자 카운터와 관련된 검사 오류를 정정하기 위한 추가 정보를 제공하도록 구성되고, 샘플 중의 입자들의 상이한 범주들 및/또는 하위범주들의 정확한 입자 카운트 또는 농도를 추가로 결정할 수 있다. 입자들의 범주들 및/또는 하위범주들 중 적어도 2개에 걸친 분포, 하나 이상의 비, 및/또는 카운트에 대한 정보가 입자 카운터 및 분석기로부터 입수가능하다면, 이때에는 입자 카운터로부터의 카운트, 범주화 및/또는 하위범주화에서의 오류가 정정될 수 있고, 입자 카운터에 의해 초기에 기록되지 않았던 카운트, 범주 및/또는 하위범주가 도출될 수 있다.

[0021]

본 발명의 실시 형태들은, 예시적인 동적 또는 검출 범위 확대 기술을 사용하여, 혈액 유체 샘플 중에 존재하는 세포들 또는 입자들을 정량화하기 위한 시스템 및 방법을 포함한다.

[0022]

예를 들어, 예시적인 실시 형태들은, 입자 부피와 같은 파라미터에 기초하여, 적어도 하나의 검출 범위와 관련된 부정확한 입자 카운트를 정정하기 위한 기술을 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 농도에 대해 그리고/또는 부피 기준으로 검출 범위 밖에 있는 입자들이 정확하게 검출 및 측정될 수 있다.

[0023]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 본 명세서에 나타난 입자 카운터와 관련된 용어 "검출 한계" 또는 "검출 범위의 밖"은 일정 범위를 포함하며, 이러한 범위 내에서 입자 카운트는 더 정확하고/하거나 이러한 범위 밖에서 입자 카운트는 덜 정확하거나 심지어 실시 불가능한 것으로 이해될 것이다. 검출 범위는 검출 상한 및/또는 검출 하한을 포함할 수 있으며, 이들은 전형적으로는 최대 또는 최소 농도로 표현되지만, 또한 가능하게는 입자들이 주어진 정확도 공차 내에서 카운팅되는 최대 또는 최소 빈도수로도 표현된다. 따라서, 본 발명의 실시 형태들은 희박한 종 및/또는 방대한 종의 카운트를 정량화하기 위한 혈액 유체 샘플의 평행 플로우셀 및 임피던스 분석을 위한 시스템 및 방법을 포함한다.

[0024]

검출 범위는 농도를 기준으로 할 수 있으며, 이에겐 국소 농도, 및/또는 다른 명시된 기준 또는 기준들이 포함될 수 있다. 예를 들어, 정상 PLT(즉, 직경이 2  $\mu\text{m}$  미만인 PLT)보다 더 작은 혈구 또는 단편과 같은 입자는 입자 카운터에서 정확하게 검출 및 카운팅하기가 어려울 수 있다. 정상 백혈구(즉, 직경이 15  $\mu\text{m}$  초과인 백혈구)보다 더 큰 비정상 세포는 입자 카운터에서 정확하게 검출 및 카운팅하기가 어려울 수 있다. 게다가, 높은



농도에서, RBC 및 PLT는 정확하게 카운팅하기가 어려울 수 있다. 회석 후에도, RBC 및 PLT는 응집되어 응괴를 형성할 수 있으며, 그 결과 입자 카운터를 사용하여 얻어진 입자 카운트의 잘못된 판독을 가져올 수 있다. 더욱이, 낮은 농도로 샘플 중에 존재하는 일부 미성숙 또는 비정상 혈구들의 정확한 카운트를 제공하기가 어렵다.

[0025]

일 예로서, 본 명세서에 기재된 장치를 사용함으로써, 측정의 검출 범위, WBC에 대한 검출 상한은 일부 실시 형태에서 (단위 부피)당 최대 300,000, 400,000, 500,000, 600,000, 700,000, 800,000, 900,000, 또는 1,000,000으로 확대될 수 있다. PLT에 대한 검출 하한은 일부 실시 형태에서  $\mu\text{l}$ 당 20,000, 19,000, 18,000, 17,000, 16,000, 15,000, 14,000, 13,000, 12,000, 11,000, 10,000, 9,500, 9,000, 8,500, 8,000, 7,500, 7,000, 6,500, 6,000, 5,500, 5,000, 4,500, 4,000, 3,500, 3,000, 2,500, 2,000, 1,500 또는 1,000, 또는 500 미만으로 확대될 수 있다.

[0026]

이와 관련하여, 예시적인 실시 형태들은 하나의 채널 내에서 검출되는 입자들의 상이한 부류들(각각의 부류의 구성원들을 포함함)을 감별함으로써 입자 카운터에서 얻어진 부정확한 결과를 정정하기 위한 기술을 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 일부 입자들은 유사한 부피 또는 형태를 가지며, 하나의 채널 내에서 검출될 수 있다. 예를 들어, "거대" PLT, PLT 응집체 또는 응괴, 및 유핵 RBC는 WBC를 검출하도록 설계된 하나의 채널 내에서 "WBC"로서 카운팅될 수 있다. 게다가, 비용해 세포, 저온글로불린, 하인즈 소체, 및 말라리아 기생충과 같은 다른 종들이 "WBC"로 카운팅되어, 샘플 중에 실제로 존재하는 것보다 더 높은 WBC 카운트를 제공할 수 있다. 유사하게, 높은 농도의 WBC 및 거대 PLT는 "RBC"로 카운팅될 수 있으며, 그 결과 RBC 카운트가 실제값보다 더 높아지게 된다. 소구성 적혈구, 적혈구 봉입체, 백혈구 단편, 먼지 입자, 용혈/분열적혈구, 및 심지어 전자/전기 노이즈의 존재는 실제로 더 높은 PLT의 카운트를 가져올 수 있다. 다른 한편으로, 동일한 부류 내의 혈병형성 및 압좌 세포들, 또는 한 부류의 세포들과 다른 한 부류의 세포들의 혼화는 입자 카운터 상에서의 상응하는 부류의 세포들의 부정확하고 더 낮은 카운트를 가져올 수 있다.

[0027]

본 발명의 방법의 일부 태양에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위를 초과하는 농도로 샘플 중에 존재하고; 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 본 발명의 방법의 다른 태양들에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 가능한 범위 미만의 농도로 샘플 중에 존재하고, 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 다른 태양들에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는 비정상 혈구, 미성숙 혈구, 응괴된 혈구, 직경이 15 마이크로미터보다 더 큰 혈구, 및 직경이 2 마이크로미터보다 더 작은 혈구 중 적어도 하나의 유형을 포함하고, 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주는 백혈구를 포함한다.

[0028]

본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 입자 카운터의 하나의 채널 내에서 다른 유형의 입자로 잘못 카운팅된 입자들이 별도로 그리고 정확하게 측정될 수 있다. 예시적인 방법은 또한 입자 카운터 상에서 정확하게 검출될 수 없는 입자들의 농도 또는 입자 카운트를 결정하는 데 사용될 수 있다. 이러한 입자들에는 입자 카운터 상에서 검출가능한 농도의 상한 또는 하한 부근 또는 밖의 농도로 존재하는 입자들 및/또는 정상 부피 범위 밖에 있는 입자들이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 이와 관련하여, 기재된 바와 같은 시스템 장치, 특히 본 명세서에 기재된 바와 같은, 예시적인 입자 조영제 조성물 및 PIOAL과 조합된 이미지 분석기 및 입자 카운터를 포함하는 시스템 장치를 작동시킴으로써, 입자 카운터의 하나의 채널 내에서 다른 유형의 입자로서 잘못 카운팅될 수 있는 일부 입자들이 별도로 그리고 정확하게 측정될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 일부 경우에 입자 카운터 상에서 정확하게 검출될 수 없는 입자들의 농도 또는 입자 카운트를 결정하는 데 사용될 수 있다. 이러한 입자들에는 입자 카운터 상에서 검출가능한 농도의 상한 또는 하한 부근 또는 밖의 농도로 존재하는 입자들 및/또는 검출 범위 밖에 있는 입자들이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 이는 이미지 분석기로부터 얻어진 정보를 적용시킴으로써 행해진다.

[0029]

전체적으로, 본 명세서에 개시된 바와 같은 장치, 예를 들어 예시적인 입자 조영제 조성물 및 PIOAL 시스템 유체를 사용하는 장치를 작동시킴으로써, 혈구 또는 다른 단편과 같은 입자들을 함유하는 샘플의 분석이, 입자 카운터에 대해 정상 검출 범위 밖에 있는 검출 범위 내에서 수행될 수 있다. 이와 관련하여, 본 명세서에 기재된 바와 같은 시스템 및 조성물을 사용하여, 농도 또는 입자 부피와 같은 파라미터에 기초하여 확대된 검출 범위 내에서 혈액 유체 샘플의 분석이 수행될 수 있다. 확대된 검출 범위는 입자 카운터에 대한 검출 범위 밖에 있을 수 있다.

[0030]

일부 실시 형태에서, 시스템 또는 장치는 입자 카운터를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 이러한 입자 카

운터는 적어도 하나의 검출 범위를 갖는다. 소정 태양에서, 분석기 및 프로세서는 입자 카운터와 관련된 검사 오류를 정정하기 위한 추가 정보를 제공하도록 구성되고, 샘플 중의 입자들의 상이한 범주들 및/또는 하위범주들의 정확한 입자 카운트 또는 농도를 추가로 결정할 수 있다. 입자들의 범주들 및/또는 하위범주들 중 적어도 2개에 걸친 분포, 하나 이상이 비, 및/또는 카운트에 대한 정보가 입자 카운터 및 분석기로부터 입수가능하다면, 이때에는 입자 카운터로부터의 카운트, 범주화 및/또는 하위범주화에서의 오류가 정정될 수 있고, 입자 카운터에 의해 초기에 기록되지 않았던 카운트, 범주 및/또는 하위범주가 도출될 수 있다.

[0031]

일 태양에서, 본 발명의 실시 형태들은 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형의 양을 측정하기 위한 방법을 포함한다. 샘플은 제2 세포 유형을 포함할 수 있다. 예시적인 방법은 샘플의 제1 부피를 혈액학 세포 카운터(hematology cell counter)를 통해 유동시킴으로써 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단을 결정하는 단계; 샘플의 제2 부피를 플로우셀 내에서 유동하는 시스 유체 내로 주입하여 두께 및 두께보다 더 큰 폭을 갖는 샘플 스트림을 제공하도록 함으로써, 제1 개수의 제1 유형 세포들 및 제2 개수의 제2 세포 유형들의 이미지들을 획득하는 단계 - 획득된 이미지들은 샘플 스트림의 두께를 가로지르는 이미지 경로를 따라 획득됨 -; 획득된 이미지들을 사용하여 제1 세포 유형의 제1 개수 대 제2 세포 유형의 제2 개수의 비를 결정하는 단계; 및 비 및 제2 세포 유형의 집단을 사용하여 샘플 중의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치(cell quantity measure)를 계산하는 단계를 포함한다. 일부 경우에, 세포량 측정기준치는 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형에 대한 세포 농도를 포함한다. 일부 경우에, 세포량 측정기준치는 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형에 대한 세포 카운트를 포함한다. 일부 경우에, 세포 카운터는 제1 세포 유형의 카운팅과 관련된 제1 정확도 및 제2 세포 유형의 카운팅과 관련된 제2 정확도를 가지며, 제2 정확도는 제1 정확도보다 더 우수하다. 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터는 원하는 정확도 범위를 가지며, 원하는 정확도 범위는 제1 부피 내의 세포들의 최소 집단과 제1 부피 내의 세포들의 최대 집단 사이에서 확대되며, 여기서 부피 내의 결정된 제2 세포 유형 집단은 원하는 정확도 범위 내에 있고, 샘플의 제1 세포 유형의 계산된 세포량 측정기준치는 원하는 정확도 범위 밖에 있다. 일부 경우에, 방법은 혈액학 세포 카운터를 통해 샘플의 제1 부피를 유동시킨 결과로서 제1 부피 내의 제1 세포 유형의 집단을 결정하는 단계를 포함하며, 제1 부피 내의 결정된 제1 세포 유형 집단은 제1 세포 유형에 대해 원하는 정확도 범위를 초과하거나 그 미만이고, 제1 세포 유형의 계산된 세포량 측정기준치와 상이하다. 일부 경우에, 결정된 제1 세포 유형 집단은 0이다. 일부 경우에, 결정된 제1 세포 유형 집단은 0 초과이다. 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터는 세포 카운터를 통해 유동하는 제2 유형 세포에 응답하여 전기 임피던스의 변화를 검출하는 센서 메커니즘을 포함한다. 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터는 세포 카운터를 통해 유동하는 제2 유형 세포에 응답하여 광로의 차단을 검출하는 센서 메커니즘을 포함한다. 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터는, 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 농도 한계 및 최대 검출가능 농도 한계를 갖고, 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 농도 한계 및 최대 검출가능 농도 한계를 가지며, 결정된 제2 세포 유형 집단은 제2 세포 유형에 대해 검출된 농도 파라미터 - 검출된 농도 파라미터는 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만임 - 에 기초하고, 제1 세포 유형은 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 농도로 존재한다. 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터는, 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 부피 한계 및 최대 검출가능 부피 한계를 갖고, 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 부피 한계 및 최대 검출가능 부피 한계를 가지며, 결정된 제2 세포 유형 집단은 제2 세포 유형에 대해 검출된 부피 파라미터 - 검출된 부피 파라미터는 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만임 - 에 기초하고, 제1 세포 유형은 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 부피 파라미터로 존재한다. 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터는, 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 크기 한계 및 최대 검출가능 크기 한계를 갖고, 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 크기 한계 및 최대 검출가능 부피 크기를 가지며, 결정된 제2 세포 유형 집단은 제2 세포 유형에 대해 검출된 크기 파라미터 - 검출된 크기 파라미터는 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만임 - 에 기초하고, 제1 세포 유형은 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 크기 파라미터로 존재한다. 일부 경우에, 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단의 결정은 제1 세포 유형의 세포들과 제2 세포 유형의 세포들을 함께 그룹화하는 단계를 포함한다. 일부 경우에, 방법은 비 및 제2 세포 유형의 집단을 사용하여 샘플 중의 제2 세포 유형의 세포량 측정기준치를 계산하는 단계를 포함한다. 일부 경우에, 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단의 결정은 제1 세포 유형의 세포들과 제2 세포 유형의 세포들을 함께 그룹화하는 단계를 포함하며, 본 방법은 혈액학 세포 카운터를 통해 샘플의 제1 부피를 유동시킨 결과로서 제1 부피 내의 제1 세포 유형의 집단을 결정하는 단계를 추가로 포함하고, 샘플 중의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치의 계산은 비, 제2 세포 유형의 집단, 및 제1 세포 유형의 집단을 사용한다.

[0032]

다른 태양에서, 본 발명의 실시 형태들은 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형의 양을 측정하기 위한 시스템을 포함한다. 샘플은 제2 세포 유형을 포함할 수 있다. 예시적인 시스템은, 채널 및 출력부 - 출력부는 채널을

통해 유동하는 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단을 나타내는 신호들을 생성하도록 채널에 작동식으로 커플링됨 - 를 갖는 혈액학 세포 카운터; 샘플 스트림의 유동을 용이하게 하도록 구성된 플로우셀 - 샘플 스트림은 샘플의 제2 부피 및 시스 유체를 갖고, 두께 및 두께보다 더 큰 폭을 가짐 -; 제1 개수의 제1 유형 세포들 및 제2 개수의 제2 유형 세포들의 이미지들을 획득하도록 구성된 이미징 장치 - 획득된 이미지들은 샘플 스트림의 두께를 가로지르는 이미지 경로를 따라 획득됨 -; 프로세서; 획득된 이미지들을 사용하여 제1 세포 유형의 제1 개수 대 제2 세포 유형의 제2 개수의 비를 결정하기 위한, 프로세서 상에서 실행되는 기계-판독가능 코드를 구현하는 유형적(tangible) 매체를 갖는 이미지 분석 모듈; 및 비 및 제2 세포 유형의 집단을 나타내는 신호들을 사용하여 샘플 중의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치를 계산하기 위한, 프로세서 상에서 실행되는 기계-판독가능 코드를 구현하는 유형적 매체를 포함하는 세포량 모듈을 포함한다. 일부 경우에, 프로세서는 제2 세포 유형의 집단을 나타내는 신호들을 수신하도록 혈액학 세포 카운터에 커플링된다. 일부 경우에, 프로세서는 획득된 이미지들을 수신하도록 이미징 장치에 커플링된다. 일부 경우에, 플로우셀 및 이미징 장치는 혈액 유체 샘플 중의 세포들을 이미징하기 위한 조합된 점도 및 기하학적 하이드로포커싱(combined viscosity and geometric hydrofocusing)을 수행하는 혈액학 분석기의 구성요소들이다. 일부 경우에, 시스 유체와 혈액 유체 샘플 사이의 점도 차이가, 플로우셀의 유로 크기의 감소부와 조합하여, 플로우셀의 이미지 캡처 영역에서 샘플 스트림을 하이드로포커싱하는 데 효과적이다.

[0033] 본 발명의 실시 형태의 전송된 특징 및 부수하는 이점과 많은 다른 특징 및 부수하는 이점이, 첨부된 도면과 함께 고려할 때 하기의 상세한 설명을 참고함으로써 명백해지고 한층 더 이해될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 디지털 이미지 처리를 사용하는 샘플 이미지 분석을 위한, 예시적인 플로우셀, 오토포커스 시스템 및 광학 고분해능 이미징 디바이스의 작동상의 태양들을 도시하는, 비축적 부분 단면 개략도이다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 실시 형태들에 따른 플로우셀의 추가 단면도를 제공한다.

도 2는 예시적인 일 실시 형태에 따른 플로우셀의 사시도이다.

도 3은 도 2에 도시된 플로우셀의 라인 3-3을 따른 종방향 정중 단면도이다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 실시 형태들에 따른 플로우셀의 추가 단면도를 제공한다.

도 4는 본 발명의 실시 형태들에 따른 이미징 시스템의 태양들을 예시한다.

도 4a 및 도 4b는 본 발명의 실시 형태들에 따른 플로우셀의 태양들을 도시한다.

도 4a-1 및 도 4a-2는 본 발명의 실시 형태들에 따른, 각각 캐논러 출구 및 이미지 캡처 영역에서의 플로우셀 내의 시스 유체(예를 들어, PIOAL) 봉입물 및 샘플 유체 스트림의 치수의 단면도를 도시한다.

도 4k 및 도 4l은 본 발명의 실시 형태들에 따른 플로우셀의 이미지 캡처 영역을 통과하는 샘플 스트림을 도시한다.

도 4o는 본 발명의 실시 형태들에 따른 PIOAL을 사용하여 얻어진 이미지 대 비 PIOAL 시스 유체를 사용하여 얻어진 이미지의 비교를 보여준다.

도 4p 및 도 4q는 본 발명의 실시 형태들에 따른 예시적인 PIOAL 유체를 사용하여 얻어진 이미지와 표준 시스 유체를 사용하여 얻어진 이미지의 비교를 보여준다.

도 5는 본 발명의 실시 형태들에 따른, 혈액 샘플에서의 입자 분석을 위한 동적 또는 검출 범위 확대를 달성하기 위한 시스템 및 방법의 추가 태양들을 보여주는 블록 다이어그램이다.

도 6은 본 발명의 실시 형태들에 따른, 샘플을 분석하기 위한 예시적인 장치를 도시한다.

도 6a는 본 발명의 실시 형태들에 따른 예시적인 카운터 또는 카운팅 모듈의 태양들을 도시한다.

도 6b는 본 발명의 실시 형태들에 따른 모듈 시스템의 태양들을 도시한다.

도 7은 본 발명의 실시 형태들에 따른, 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형의 양을 측정하기 위한 시스템 및 방법의 태양들을 도시한다.

도 8은 본 발명의 실시 형태들에 따른, 입자들을 함유하는 샘플을 분석하기 위한 방법을 도시한다.

도 9는 본 발명의 실시 형태들에 따른, 입자들의 2개의 하위범주의 농도를 결정하는 예시적인 방법을 예시한다.

도 10a, 도 10b, 도 10c, 및 도 10d는 본 발명의 실시 형태들에 따른 입자들의 범주들의 검출을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035]

본 발명은 입자들을 함유하는 샘플을 분석하기 위한 장치, 시스템, 조성물, 및 방법에 관한 것이다. 일 실시 형태에서, 본 발명은, 예를 들어 시각적 분석기일 수 있는 분석기를 포함하는 자동화 입자 이미징 시스템에 관한 것이다. 일부 실시 형태에서, 시각적 분석기는 이미지의 자동화 분석을 용이하게 하기 위하여 프로세서를 추가로 포함할 수 있다.

[0036]

본 발명에 따르면, 액체 중에 현탁된 입자들을 포함하는 샘플의 이미지를 얻기 위한, 시각적 분석기를 포함하는 시스템이 제공된다. 본 시스템은, 예를 들어 생물학적 유체 중의 입자들을 특성화하는 데, 예컨대 적혈구, 망상적혈구, 유핵 적혈구, 혈소판, 및 백혈구를 검출 및 정량화하는 데 유용할 수 있으며, 이에는 백혈구 감별 카운팅, 범주화 및 하위범주화 및 분석이 포함된다. 다른 유체들로부터 혈구들을 특성화하는 것과 같은 다른 유사한 용도가 또한 고려된다.

[0037]

혈액 샘플 중의 혈구들의 구별은 본 발명의 요지가 특히 잘 적합한 예시적인 응용이다. 샘플은 자동화 기술에 의해 준비되고, 박형 리본형 샘플 스트림으로서 광학 고분해능 이미징 디바이스에 제공되어서, 리본형 샘플 스트림이 시야를 가로질러 유동하는 동안에 주기적으로 이미징된다. 입자들(예컨대, 혈구들)의 이미지는, 오로지 자동적으로 또는 제한된 인력 지원 하에, 픽셀 이미지 데이터 프로그래밍된 처리 기술을 사용하여 서로 구분되고, 범주화되고, 하위범주화되고, 카운팅되어서 세포들 또는 입자들을 식별 및 카운팅하게 할 수 있다. 입자들의 특이하거나 중대한 특징부의 경우에 저장되고 입수가 가능하게 될 수 있는 세포 이미지에 더하여, 출력 데이터는 기록된 샘플 이미지에서 구분되는 세포 또는 입자의 각각의 특정 범주 및/또는 하위범주의 발생 카운트를 포함한다.

[0038]

각각의 이미지에서 발견되는 상이한 입자들의 카운트는 추가로 처리될 수 있는데, 예를 들어 전체로서 샘플 중의 각각의 구분된 범주 및/또는 하위범주의 세포들의 정확하고 통계학적으로 유의한 비를 측정하는 데 사용될 수 있다. 시각적 구별에 사용되는 샘플은 회석될 수 있지만, 각각의 범주 및/또는 하위범주 내의 세포들의 비율은, 특히 다수의 이미지들이 처리된 후에, 회석된 샘플에서 나타난다.

[0039]

본 명세서에 개시된 장치 및 방법은 시각적 구분에 기초한 샘플 중의 세포들의 구별 및 정량화에 유용하다. 샘플은 생물학적 샘플, 예를 들어, 백혈구를 포함하는 체액 샘플일 수 있으며, 이에는 제한 없이, 혈액, 혈청, 골수, 세척액(lavage fluid), 침출물, 삼출물, 뇌척수액, 흉막액, 복수, 및 양수가 포함된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 고형 조직 샘플, 예를 들어 세포 현탁액을 생성하도록 처리된 생검 샘플일 수 있다. 샘플은 또한 배설물 샘플을 처리해서 얻어진 현탁액일 수 있다. 샘플은 또한 입자들을 포함하는 실험실 또는 생산 라인 샘플, 예컨대 세포 배양물 샘플일 수 있다. 용어 샘플은 환자 또는 실험실로부터 얻어진 샘플 또는 이의 임의의 분획, 부분 또는 분취물을 지칭하는 데 사용될 수 있다. 샘플은 일부 과정에서 회석되거나, 부분들로 나누어지거나, 염색될 수 있다.

[0040]

일 태양에서, 본 발명의 시스템, 조성물 및 방법은 유동 중인 세포들의 대단히 고품질의 이미지를 제공한다. 일 태양에서, 시각적 분석기는 자동화 이미지-기반 WBC 감별 카운팅을 제공하기 위하여 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 본 발명의 방법은, 대상체가 건강한지 또는 질병, 질환, 비정상 및/또는 감염을 갖는지, 그리고/또는 치료에 반응성인지 또는 비반응성인지를 결정, 진단, 예후, 예측, 및/또는 그러한 지의 진단을 지원하기 위한 형태학적 특징부 및/또는 비정상을 포함한 시각적 구분의 자동화 식별에 관한 것이다. 일부 실시 형태에서, 본 시스템은 입자 카운터를 추가로 포함할 수 있다. 응용에는 유체 샘플, 예컨대 혈액 샘플 중의 세포들의 범주화 및/또는 하위범주화, 그리고 카운팅이 포함된다. 추가 유형의 입자들 및/또는 다른 유체 샘플 중의 입자들을 카운팅하기 위한 다른 유사한 용도가 또한 고려된다. 본 발명의 시스템, 조성물, 및 방법은 임의의 적합한 자동화 입자 인식 알고리즘을 사용하는 이미지의 실시간 범주화 및 하위범주화와 관찰에 사용될 수 있다. 각각의 샘플에 대해 캡처된 이미지는 추후에 관찰되도록 저장될 수 있다.

[0041]

다른 태양에서, 본 발명의 장치, 조성물, 및 방법은 매우 더 정확한 이미지-기반 세포 범주화 및 하위범주화와, 현재의 자동화 분석기를 사용하는 경우의 수동 재검토율과 비교하여 수동 재검토율을 감소시키는 플래깅(flagging)을 제공한다. 이러한 시스템, 조성물, 및 방법은 수동 재검토율을 감소시키고, 수동 재검토가 기기 상에서 수행될 수 있게 한다. 게다가, 본 발명의 시스템, 조성물, 및 방법은 또한 수동 재검토를 필요로 하는



것으로서의 자동화 분석 동안 플래깅된 샘플들의 백분율을 감소시킨다.

- [0042] 본 발명은 추가로, 온혈구 카운트(CBC) 카운터를 분석기, 예컨대 시각적 분석기와 조합하기 위한 시스템, 방법 및 조성물에 관한 것으로, 이는 CBC와 이미지-기반의 확장된 백혈구 감별 카운트 및 이미지-기반의 확장된 혈소판 카운트를 얻음으로써 혈소판을 카운팅하기 위한 유효 검출 범위를 확대시키기 위한 것이다.
- [0043] 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명은 입자들, 예를 들어 혈구들을 함유하는 샘플을 분석하기 위한 장치 및 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 액체 중에 현탁된 입자들을 포함하는 샘플의 이미지를 얻기 위한, 시각적 분석기가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 시각적 분석기는 플로우셀 및 오토포커스 구성요소를 포함하며, 여기서 관심 대상인 입자들을 함유하는 액체 샘플이, 관찰구를 갖는 플로우셀을 통해 유동되게 하며, 관찰구를 통해, 대물 렌즈에 커플링된 카메라가 입자들의 디지털 이미지를 캡처링한다. 플로우셀은 샘플 유체, 예컨대 희석 및/또는 처리된 혈액 샘플, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 다른 체액 샘플의 공급원에, 그리고 투명한 시스 유체, 또는 입자 및/또는 세포내 세포소기관 정렬 액체(PIOAL)의 공급원에 커플링된다.
- [0044] 일 실시 형태에서, 본 장치는 또한 적어도 하나의 검출 범위를 갖는 입자 카운터뿐만 아니라, 분석기, 및 프로세서도 포함한다. 분석기 및 프로세서는 입자 카운터와 관련된 카운팅, 범주화, 및 하위범주화 오류를 정정하기 위한 추가 정보를 제공하도록 구성되고, 샘플 중의 입자들의 상이한 범주들 및/또는 하위범주들의 정확한 입자 카운트 또는 농도를 추가로 결정한다.
- [0045] 본 발명은 이미지-기반 샘플 분석을 수행함에 있어서 입자 및/또는 세포내 세포소기관 정렬에 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은, 예를 들어 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구, 망상적혈구, 유핵 RBC, 아세포, 전골수세포, 골수세포, 또는 후골수세포를 포함한 WBC, RBC, 및/또는 혈소판과 같은 세포 유형을 식별 및 카운팅할 수 있는 온혈구 카운트(CBC) 및 이미지-기반의 확장된 백혈구(WBC) 감별을 수행하는 능력, 및 WBC 카운트와 형태, 적혈구(RBC) 카운트와 형태, 및 혈소판(PLT) 카운트와 형태에 대한 이미지-기반 정보를 제공하는 능력을 갖는, 조합된 카운팅 및 이미징 시스템을 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같이 입자들의 이미지-기반 분석에서 사용될 수 있는 PIOAL에 관한 것이다. 혈액 샘플 중의 세포 범주 및/또는 하위범주 카운트는 분석될 수 있는 샘플들의 종류의 비제한적인 예로서 본 발명에서 사용된다. 일부 실시 형태에서, 샘플 중에 존재하는 세포들은 또한 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판뿐만 아니라 세균성 또는 진균성 세포들도 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 조직 또는 흡인물로부터 얻어진 입자 현탁액이 분석될 수 있다.
- [0047] 혈액 샘플 중의 혈구들의 구별은 본 발명의 요지가 특히 잘 적합한 예시적인 응용이다. 샘플은 자동화 기술에 의해 준비되고, 리본형 샘플 스트립으로서 광학 고분해능 이미징 디바이스에 제공되어서, 샘플이 시야를 가로질러 유동하는 동안에 주기적으로 이미징된다. 입자들(예컨대, 혈구들)의 이미지는, 오로지 자동적으로 또는 제한된 인력 지원 하에, 픽셀 이미지 데이터 프로그래밍된 처리 기술을 사용하여 서로 구분되고/되거나, 범주화되고/되거나, 하위범주화되고/되거나, 카운팅되어서 세포들 또는 입자들을 식별 및 카운팅하게 할 수 있다. 특이하거나 중대한 특징부의 경우에 저장되고 입수가능하게 될 수 있는 세포 이미지에 더하여, 출력 데이터는 기록된 샘플 이미지에서 구분되는 세포 또는 입자의 각각의 특정 범주 및/또는 하위범주의 발생 카운트를 포함한다. 각각의 이미지에서 발견되는 상이한 입자들의 카운트는 추가로 처리될 수 있는데, 예를 들어 전체로서 샘플 중의 각각의 구분된 범주 및/또는 하위범주의 세포들의 정확하고 통계학적으로 유의한 비례적인 비(proportionate ratio), 또는 그의 함수를 축적하는 데 사용될 수 있다. 시각적 구별에 사용되는 샘플은 또한 고도로 희석될 수 있지만, 각각의 범주 및/또는 하위범주 내의 세포들의 비율은, 특히 다수의 이미지들이 처리된 후에, 희석된 샘플에 대한 분포에서 나타난다.
- [0048] 일부 태양에서, 샘플은 자동화 방식으로 제공되고, 이미징되고 분석된다. 혈액 샘플의 경우에, 이러한 샘플은 물 또는 식염수 용액을 사용하여 사실상 희석될 수 있는데, 이는 일부 세포들의 모습이 희석되지 않거나 덜 희석된 샘플 중의 다른 세포들에 의해 가려질 수 있는 정도를 감소시킨다. 세포들은, 예를 들어 세포막이 투과성이 되게 하기 위한 투과화제, 및 특징부들, 예컨대 과립 및 핵에 부착되어 이들을 드러내는 조직학적 염색제를 사용하여, 일부 세포 양상들의 조영을 증강시키는 작용제로 처리될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 망상적혈구, 유핵 적혈구, 및 혈소판을 포함하는 입자들을 카운팅 및 특성화하기 위해, 그리고 백혈구 감별, 특성화 및 분석을 위해 샘플의 분취물을 염색하는 것이 바람직할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 적혈구를 함유하는 샘플은 플로우셀로의 도입 및 이미징 전에 희석될 수 있다.
- [0049] 샘플 희석, 투과화 및 조직학적 염색을 위한 샘플 준비 장치 및 방법의 상세 사항은 일반적으로, 하나 이상의

프로그래밍가능한 제어기에 의해 작동되는 정밀 펌프 및 밸브를 사용하여 달성되는데, 본 발명에 중심이 되지 않는다. 인터내셔널 리모트 이미징 시스템즈, 인크.(International Remote Imaging Systems, Inc.)에 양도된 특허, 예컨대 미국 특허 제7,319,907호에서 예를 찾아볼 수 있는데, 이는 프로그래밍가능한 제어에 관한 것이다. 마찬가지로, 소정의 세포 범주 및/또는 하위범주 사이를 상대 크기 및 색과 같은 그들의 속성에 의해 구분하기 위한 기술을, 백혈구와 관련된 미국 특허 제5,436,978호에서 찾아볼 수 있다. 이들 특허의 개시내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0050] 세포들과 같은 입자들을 범주화 및/또는 하위범주화하는 수단인 용량, 속도 및 유효성을 촉진하기 위하여, 데이터 처리 시스템에 의한 자동화 분석을 위하여 혈구들의 선명한 고품질 이미지를 제공하는 것이 유리하다. 본 발명에 따르면, 준비된 샘플 스트림이 플로우셀의 대향하는 벽들 사이에서 안정한 위치를 갖는 박형 리본으로 배열된다. 샘플 스트림의 위치설정 및 박형 리본 형상으로서의 그의 편평화는, 샘플 유체와 점도가 상이하고 대칭 유동 채널을 통해 유동되는, 플로우셀 내로 도입된 PIOAL의 층들 사이에서의 유동에 의해 달성될 수 있다.

[0051] PIOAL은 적합한 점도 및 밀도를 가지며, 플로우셀로의 샘플의 도입 지점에서의 유량은 샘플 유체가 박형 리본으로 편평화되도록 하는 유량이다. 리본형 샘플 스트림은 PIOAL과 함께 운반되어서 관찰구의 전방을 지나가는데, 이때 관찰구에서는 대물 렌즈 및 광원이 리본형 샘플 스트림의 관찰을 가능하게 하도록 배열되어 있다. 샘플 유체가 도입되는데, 이는 예를 들어 PIOAL의 유로가 대칭적으로 협소화되는 지점에서 주입된다. 결과적으로, 샘플 유체 스트림은 박형 리본으로 편평화되고 연신된다. 본 발명의 PIOAL은 본 발명의 임의의 시각적 분석기와 함께 시스 유체로서 사용될 수 있다. 일 실시 형태에서, PIOAL은 플로우셀의 단부 내로 도입되어서, 샘플 유체와 함께 방출구를 향해 운반될 수 있다.

[0052] 관찰 구역에서의 리본형 샘플 스트림의 치수는, PIOAL 유로의 기하학적 박형화 및 샘플 유체와 PIOAL의 차별적인 선속도에 의해 영향을 받으며, 이는 리본형 샘플 스트림의 박형화 및 연신을 가져온다. 샘플 대 PIOAL의 초기의 차별적인 선속도는 0.5:1 내지 5:1의 범위일 수 있다. PIOAL 유로 단면은 약 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1, 100:1, 105:1, 110:1, 115:1, 125:1, 130:1, 140:1, 150:1, 160:1, 170:1, 180:1, 190:1, 또는 200:1의 비율로 깊이를 감소시킴으로써 박형화될 수 있다. 일 실시 형태에서, 기하학적 박형화는 40:1이다. 일 실시 형태에서, 기하학적 박형화는 30:1이다. 고려되는 인자는 플로우셀을 통한 수송 시간, 원하는 샘플 처리율, 입자 크기에 비견되는 리본형 샘플 스트림 두께의 달성, 입자들 및 세포소기관들의 정렬의 달성, 입자들의 인-포커스 내용물의 달성, 작동 한계 이내의 압력, 유동, 및 점도의 균형, 리본형 샘플 스트림 두께의 최적화, 원하는 선속도의 달성, 제조 가능성 고려, 및 샘플 및 PIOAL의 필요 부피이다.

[0053] 캐논러의 길이 및 부피와 단면 편평화는 샘플 유동 불안정성의 기간을 감소시킴으로써 처리량을 증가시키도록 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 유동 불안정성의 기간은 약 3, 2.75, 2.5, 2.25, 2, 1.75, 1.5 1.25초 미만, 또는 약 1초 미만일 수 있다. 더 작은 캐논러 부피는 또한 샘플 실시들 사이에 캐논러를 세정하는 데 필요한 시간 및 희석제의 부피를 감소시킬 수 있다. 일부 실시 형태에서, 플로우셀을 통한 수송 시간은 1, 2, 3, 또는 4초이거나, 또는 이들 시간 중 임의의 2개 사이의 임의의 범위이다. 일부 실시 형태에서, 수송 시간은 4, 3 또는 2초 미만일 수 있다.

[0054] 샘플 유체 및 PIOAL의 점도 및 유량과 플로우셀의 윤곽은, PIOAL 유동이, 신뢰할 수 있는 위치에서 관찰 구역을 통해 일관성 있게, 샘플 유동을 편평한 리본으로 편평화하고 연신시키도록 배열된다. 샘플 유체 스트림은 유체 유동 두께가 대략 2 내지 3  $\mu\text{m}$ 로 압축될 수 있다. 몇몇 혈구 유형들은 스트림 두께보다 더 큰 직경을 갖는다. 유동 방향에 평행한 방향으로의 전단력은, 광학 고분해능 이미징 디바이스의 초점 평면에서의 이미징 조건 하에서의 입자들의 이미지 투영의 증가를 야기시키고/시키거나, 입자내 구조, 예를 들어 세포내 구조, 세포소기관 또는 엽이 유동 방향에 사실상 평행하도록 위치설정, 위치재설정, 및/또는 더 우수하게 위치설정되게 한다. 광학 고분해능 이미징 디바이스의 피사계 심도는 최대 7  $\mu\text{m}$ , 예를 들어 1 내지 4  $\mu\text{m}$ 이다.

[0055] 리본형 샘플 스트림이 함께 운반되고 있는 PIOAL의 유동 단면은 관찰구의 전방에서 관찰 구역을 통해 일정하며, 이때 관찰구를 통해 대물 렌즈가 지향된다. 대물 렌즈는 광학 고분해능 이미징 디바이스 또는 디지털 이미지 캡처 디바이스의 대물 구성요소일 수 있다. 리본형 샘플 스트림은 플로우셀 내의 기지의 반복가능한 위치에서, 예를 들어 플로우셀의 2개의 벽으로부터의 기지의 반복가능한 거리에서 관찰 구역을 가로지르는 경로를 따르며, 하류에서 방출된다.

[0056] 샘플 중의 입자들로부터의 광학 정보는, 리본형 샘플 스트림이 관찰구의 전방에서 관찰 구역을 통해 운반될 때, 분석기 내의 검출 섹션에 의해 검출되며, 그럼으로써 샘플 중에 함유된 입자들/세포들로부터의 데이터를 생성한



다. 이러한 분석기의 사용은 샘플 중에 함유된 세포들 및/또는 입자들의 캡처, 처리, 범주화 및 하위범주화와 카운팅을 가능하게 한다. PIOAL 액체는 점도 개질제, 완충제, pH 조정제, 항미생물제, 이온 강도 개질제, 계면활성제, 및/또는 킬레이트화제의 첨가에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에서의 분석기의 예시적인 기능적 구성요소 및/또는 특징부에는, 예를 들어 이미지 분석으로부터 데이터를 획득 및/또는 처리하는 능력, 샘플 검색 처리, 이미지 처리, 및/또는 입자 이미지 식별, 카운팅, 및/또는 범주화 및 하위범주화가 포함될 수 있다.

[0057]

일 실시 형태에서, 본 발명은 PIOAL 중의 적합한 양의 점도제의 첨가가, 플로우셀 내에서의 입자/세포 정렬을 상당히 개선하며, 이는 더 높은 백분율의 인-포커스 세포들 또는 세포 성분들, 및 유동 중인 세포들 및/또는 입자들의 더 높은 품질의 이미지로 이어진다는 의외의 예기치 않은 발견에 기초한다. 점도제의 첨가는 RBC와 같은 세포들 상에 전단력을 증가시키고, 이는 유동 방향에 사실상 평행한 평면 내의 세포들의 정렬을 개선하며, 이는 결국 이미지 최적화를 가져온다. 이는 또한, 유동 방향에 사실상 평행한 입자내 구조, 예컨대 세포내 구조, 세포소기관 또는 엽의 위치설정, 위치재설정, 및/또는 더 우수한 위치설정을 가져오며, 이는 결국 이미지 최적화를 가져온다. 점도제는 또한 세포들의 오정렬을 감소시키지만, 일반적으로, 유동 스트림보다 직경이 더 작은 세포들로 제한되지 않는다.

[0058]

유동 스트림보다 직경이 더 작은 세포들, 예를 들어 적혈구의 정렬은, 예를 들어 PIOAL의 점도를 증가시킴으로써, 또는 유속비를 증가시킴으로써 얻어질 수 있다. 이는 유동 방향에 평행한 RBC의 정렬을 가져온다. 일부 실시 형태에서, PIOAL의 점도를 증가시킴으로써 RBC 오정렬의 감소 및/또는 RBC 정렬의 증가가 달성된다.

[0059]

리본형 샘플 스트림 두께는 샘플 유체 및 PIOAL의 상대 점도 및 유량에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 정밀 변위 펌프를 포함하는 샘플의 공급원 및/또는 PIOAL의 공급원은, 리본형 샘플 스트림의 치수를 최적화하기에 제어가능한 유량으로, 즉 적어도 광학 고분해능 이미징 디바이스 또는 디지털 이미지 캡처 디바이스의 시야만큼 넓은 박형 리본으로서 샘플 및/또는 PIOAL을 제공하도록 구성될 수 있다.

[0060]

리본형 샘플 스트림이 함께 운반되고 있는 PIOAL의 유동 단면은 관찰구의 전방에서 관찰 구역을 통해 일정하며, 이때 관찰구를 통해 광학 고분해능 이미징 디바이스가 지향된다. 리본형 샘플 스트림은 플로우셀의 전방 벽 및 후방 벽 중 어느 하나로부터의 기지의 반복가능한 거리에서 관찰 구역을 가로지르는 경로를 따르며, 그의 하류에서 방출된다.

[0061]

용어 광학 고분해능 이미징 디바이스는 형태학적 특징부 및/또는 변화를 감별하기에 충분한 시각적 구분을 갖는 입자 이미지를 얻을 수 있는 디바이스를 포함할 수 있다. 예시적인 광학 고분해능 이미징 디바이스는 1  $\mu\text{m}$  이하 - 예를 들어, 0.4 내지 0.5  $\mu\text{m}$ , 예컨대 이를 테면 0.46  $\mu\text{m}$ 를 포함함 - 의 광학 분해능을 갖는 디바이스를 포함할 수 있다.

[0062]

일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물 및/또는 방법 중 임의의 것에서 얻어진 이미지는 디지털화 이미지일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 얻어진 이미지는 현미경 이미지이다. 소정 실시 형태에서, 이미지는 수동으로 얻어질 수 있다. 다른 실시 형태에서, 이미지를 얻기 위한 절차의 적어도 일부분은 자동화된다. 일부 실시 형태에서, 이미지는 플로우셀, 광학 고분해능 이미징 디바이스 또는 디지털 이미지 캡처 디바이스 - 선택적으로 오토포커스 특징부를 가짐 - 를 포함하는 시각적 분석기를 사용하여 얻어질 수 있다.

[0063]

일 실시 형태에서, 이미지는 세포의 세포질, 세포핵 및/또는 핵 성분들에 관한 정보를 제공한다. 일 실시 형태에서, 이미지는 세포의 과립 성분 및/또는 다른 형태학적 특징부에 관한 정보를 제공한다. 일 실시 형태에서, 이미지는 세포의 세포질, 핵 및/또는 과립 성분들에 관한 정보를 제공한다. 이러한 과립 및/또는 핵 이미지 및/또는 특징부는, 둘 모두 독립적으로 또는 서로 조합하여, 세포 범주화 및 하위범주화에 있어 결정적이다.

[0064]

본 발명의 방법의 일 태양에서, 입자 조영제 조성물과 접촉되고/되거나 이미징된 세포들은 유핵 적혈구이다. 또 다른 태양에서, 본 발명의 방법은 이미지-기반 적혈구 범주화 및 하위범주화를 수행하기 위한 방법에 관한 것으로, 본 방법은 a) 적혈구의 일부분을 이미징하는 단계; 및 b) 이미징된 적혈구의 형태를 결정하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 적혈구(RBC)에는, 예를 들어 정상 또는 비정상 적혈구, 망상적혈구, 유핵 적혈구, 및/또는 말라리아-감염된 세포가 포함될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이미징은 본 발명의 장치, 예컨대 입자 카운터, 시각적 분석기 및 프로세서를 포함하는 장치를 사용하여 수행된다.

[0065]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 예시적인 온혈구 카운트(CBC)는 의사 또는 다른 의학 전문가에 의해 전형적으로 요구되는 테스트 패널을 포함할 수 있는데, 이러한 테스트 패널은 환자의 혈액 샘플 중의 입자들 및/또는 세포들에 대한 정보를 제공한다. 혈류 중에서 순환하는 예시적인 세포들은 일반적으로 3가지 유형으로 나누어질 수 있으며, 이에, 예를 들어 백혈구(예를 들어, 백혈구(leukocyte)), 적혈구(예를 들어, 적혈구

(erythrocyte)), 및 혈소판(예를 들어, 혈소판(thrombocyte))이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0066] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 비정상적으로 높거나 낮은 카운트는 질병, 장애, 및/또는 질환의 존재를 나타낼 수 있다. 따라서, CBC는 의료에서 일반적으로 수행되는 혈액 검사들 중 하나인데, 그것이 환자의 전반적인 건강 상태의 개관을 제공할 수 있기 때문이다. 따라서, CBC는 매년마다의 신체 검사 동안 일상적으로 수행된다.

[0067] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 전형적으로 사혈전문원은 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하며, 그러한 혈액은 일반적으로, 항응고제(예를 들어, EDTA, 때때로 시트레이트)가 전형적으로 담긴 시험관 내로 채취되어서, 그것이 혈병형성되는 것을 중지시킨다. 이어서, 샘플은 실험실로 이송된다. 때때로, 샘플은 자동화 카운터에 의한 즉각적인 처리를 위하여 파스퇴르 피펫을 사용하여 손가락 단자(finger prick)로부터 채취된다. 일 실시 형태에서, 입자 이미지는 입자가 시스 유체 또는 P10AL 내에 봉입되어 있는 동안에 획득된다. 소정 실시 형태에서, 혈액 샘플은 현미경 하에서 환자 혈액의 샘플(혈액막(blood film), 또는 말초혈액 도말(peripheral smear))이 준비된 슬라이드 상에서 관찰될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 온혈구 카운트는 자동화 분석기에 의해 수행된다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 일반적으로, 혈액 분석기는 협관(narrow tubing)을 통해 매우 소량의 검체를 흡입할 수 있다. 센서가 그러한 관을 통과하는 세포들의 수 및/또는 카운트를 검출할 수 있고, 세포의 유형을 식별할 수 있다. 예시적인 센서에는 광(예를 들어, 가시광, UV 또는 IR) 및/또는 전기 임피던스의 검출기가 포함될 수 있다. 예시적인 검출 파라미터에는 크기, 부피, 및/또는 세포 특징부들이 포함될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 센서는 약 200 nm 내지 약 10000 nm 범위의 파장 스펙트럼 내의 가시광 및 비가시광을 검출할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 센서는 약 380 nm 내지 약 760 nm의 파장을 검출할 수 있다.

[0069] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 혈구 카운트의 데이터/파라미터에는, 예를 들어 전체 적혈구; 헤모글로빈 - 혈액 중의 헤모글로빈의 양; 적혈구용적률(hematocrit) 또는 충전 세포 부피(packed cell volume, PCV); 평균 적혈구 부피(mean corpuscular volume, MCV) - 적혈구의 평균 부피(빈혈은 이 값이 예측 정상 범위의 초과인지 미만인지에 기초하여 소구성(microcytic) 또는 대구성(macrocytic)으로 분류된다. MCV에 영향을 줄 수 있는 다른 질환에는 지중해빈혈증, 망상적혈구증가증 및 알코올 중독이 포함됨); 평균 적혈구 헤모글로빈(mean corpuscular hemoglobin, MCH) - 적혈구당 헤모글로빈의 평균량(피코그램 단위); 평균 적혈구 헤모글로빈 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) - 세포 중의 헤모글로빈의 평균 농도; 적혈구 분포 폭(RDW) - RBC 집단의 세포 부피의 변동; 전체 백혈구; 호중성 과립구(전형적으로 급성 바이러스 감염에서 증가된 세균성 감염을 지시할 수 있음)가 포함될 수 있다. 핵의 분절된(segmented) 외관으로 인해, 호중구는 때때로 "세그(seg)"라 지칭된다. 덜 성숙한 호중구의 핵은 분절되지 않지만, 띠 또는 세장형 형상을 갖는다. 덜 성숙한 호중구 - 최근에 골수로부터 혈류 내로 방출된 것 - 는 "밴드(band)"로 알려져 있다. 혈구 카운트에 대한 다른 데이터/파라미터에는 또한, 예를 들어 림프구(예를 들어, 선열(glandular fever)과 같은 일부 바이러스성 감염에 의해, 그리고 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서 증가되거나, 또는 HIV 감염에 의해 감소됨); 단핵구(세균성 감염, 결핵, 말라리아, 록키산 홍반열, 단핵구성 백혈병, 만성 궤양성 결장염 및 국소성 장염에서 증가될 수 있음); 호산성 과립구(예를 들어, 기생충성 감염, 천식, 또는 알러지성 반응에서 증가됨); 호염기성 과립구(예를 들어, 백혈병 또는 림프종과 같은 골수 관련 질환에서 증가됨)가 포함될 수 있다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 혈구 카운트의 데이터/파라미터에는 또한, 예를 들어 혈소판과 관련된 데이터가 포함될 수 있으며, 이러한 데이터에는 혈소판 수, 혈액 중에서의 그의 크기 및 크기 범위에 대한 정보; 평균 혈소판 부피(MPV) - 혈소판의 평균 크기의 측정치 - 가 포함된다.

[0071] 본 발명의 방법의 다른 태양에서, 입자 조영제 조성물과 접촉되고/되거나 이미징된 세포들은 비정상 세포, 예컨대 말라리아-감염된 세포, 비정형 림프구이다. 본 발명의 일부 태양에서, 세포는 질환, 질병, 감염 및/또는 증후군을 식별, 예측, 진단, 예후하거나, 또는 이들의 진단을 지원하는 데 사용될 수 있는 비정상 세포이다.

[0072] 본 발명의 방법의 다른 태양에서, 세포들은 혈소판이다.

[0073] 명백히 달리 나타나 있지 않는 한, 본 명세서에서의 "입자" 또는 "입자들"에 대한 언급은 유체 중에 분산된 임의의 개별적 또는 유형적(formed) 물체를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "입자"는 생물학적 유체 중의 (예를 들어, 이미지 및/또는 다른 측정가능한 파라미터에 의해) 모든 측정가능하고 검출가능한 성분들을 포함할 수 있다. 입자들은 임의의 재료, 임의의 형상 및 임의의 크기를 갖는다. 소정 실시 형태에서, 입자들은 세포들을 포함할 수 있다. 입자들의 예에는, 혈구, 태아 세포, 상피, 줄기 세포, 종양

세포를 포함한 세포, 또는 세균, 기생충, 또는 상기 중 임의의 것의 단편 또는 생물학적 유체 내의 다른 단편이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 혈구는 생물학적 유체 내에 잠재적으로 존재하는 임의의 정상 또는 비정상, 성숙 또는 미성숙 세포를 포함한 임의의 혈구, 예를 들어 적혈구(RBC), 백혈구(WBC), 혈소판(PLT) 및 다른 세포 들일 수 있다. 이들 구성원에는 또한 미성숙 또는 비정상 세포가 포함된다. 미성숙 WBC에는 후골수세포, 골수 세포, 전골수세포 및 아세포가 포함될 수 있다. 성숙 RBC에 더하여, RBC의 구성원에는 유핵 RBC(NRBC) 및 망상 적혈구가 포함될 수 있다. PLT에는 "거대" PLT 및 PLT 응괴가 포함될 수 있다. 혈구 및 유형적 요소는 본 명 세서의 어딘가 다른 곳에서 추가로 설명되어 있다.

[0074] 예시적인 입자들에는 생물학적 유체 샘플 중의 유형적 요소들이 포함될 수 있으며, 이러한 유형적 요소들에는, 예를 들어 구형 및 비구형 입자들이 포함된다. 소정 실시 형태에서, 입자들은 비구형 성분들을 포함할 수 있다. 비구형 성분들의 이미지 투영은 광학 고분해능 이미징 디바이스의 초점 평면에서 최대화될 수 있다. 소 정 실시 형태에서, 비구형 입자들은 광학 고분해능 이미징 디바이스의 초점 평면 내에 정렬된다(유동 방향에 사 실상 평행한 평면 내에 정렬된다). 일부 실시 형태에서, 혈소판, 망상적혈구, 유핵 RBC, 및 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구, 및 미성숙 WBC - 아세포, 전골수세포, 골수세포, 또는 후골수세포를 포함함 - 를 포 함한 WBC가 입자들로서 카운팅되고 분석된다.

[0075] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 검출가능하고 측정가능한 입자 파라미터에는, 예를 들어 크기, 형상, 대칭, 윤곽 및/또는 다른 특성들의 시각적 및/또는 이미지-비기반 지표가 포함될 수 있다.

[0076] 샘플은 단리되고/되거나 준비된 생물학적 샘플일 수 있으며, 이에, 예를 들어 체액 샘플, 혈액, 혈청, 뇌척수 액, 흉막액, 복수, 타액, 정액, 눈물, 땀, 젖, 양수, 세척액, 골수 흡인물, 침출물, 삼출물, 또는 대상체로부터 얻어진 다른 샘플(예를 들어, 세포 현탁액을 생성하도록 처리된 생검 샘플, 또는 입자들을 포함하는 실험실 또 는 생산 라인 샘플)이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 고형 조직 샘플, 예를 들어 세포 현탁액을 생성 하도록 처리된 생검 샘플일 수 있다. 샘플은 또한 배설물 샘플을 처리해서 얻어진 현탁액일 수 있다. 샘플은 또한 입자들을 포함하는 실험실, 화학적, 산업적 또는 생산 라인 샘플, 예컨대 세포 배양물 샘플일 수 있다. 용어 샘플은 환자 또는 실험실로부터 얻어진 샘플 또는 이의 임의의 분획, 부분 또는 분취물을 지칭하는 데 사 용될 수 있다. 샘플은 일부 과정에서 희석되거나, 부분들로 나누어지거나, 조영제로 처리될 수 있다.

[0077] 본 명세서에 개시된 방법은 광범위한 유기체로부터의 샘플들에 적용가능하며, 이러한 유기체에는 포유류, 예를 들어 인간, 인간 이외의 영장류(예를 들어, 원숭이), 말, 소 또는 다른 가축, 개, 고양이, 또는 애완동물, 래트, 마우스, 또는 다른 실험실용 동물로서 사용되는 다른 포유류; 조류, 예를 들어 닭; 파충류, 예를 들어 악 어; 어류, 예를 들어 연어 및 다른 양식종; 및 양서류가 포함된다.

[0078] 샘플은 어떠한 종래의 방법에 의해서도, 예를 들어 배설, 채취, 수거(harvesting), 흡인, 또는 생검에 의해서 얻어질 수 있다. 샘플은 건강한 것으로 여겨지는 대상체로부터의 것, 예를 들어 일상적인 신체 검사의 일부로 서 수집된 샘플일 수 있다. 샘플은 또한 장애를 갖고 있거나 이를 가질 위험이 있거나 이를 갖는 것으로 의심 되는 대상체로부터의 것일 수 있다. 장애는 질병, 유전적 비정상, 감염, 상처 또는 알려지지 않은 원인의 결과 일 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 본 방법은 장애에 대한 치료 과정 동안 대상체를 모니터링하는 데 유용할 수 있다. 치료 및/또는 요법에 대한 비반응성의 징후가 있는 경우에, 임상의는 대체제 또는 보조제를 선택할 수 있다. 만약 있다면, 대상체의 질환 및 특정 장애에 따라, 샘플이 매일, 매주, 매월, 또는 매년 1회 (또는 2회, 3회 등) 수집될 수 있다.

[0079] 입자들은 샘플에 따라 변할 수 있다. 입자들은 생물학적 세포들, 예를 들어 혈구, 태아 세포, 줄기 세포, 종양 세포 또는 이들의 단편일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 입자들은 감염성 인자, 예를 들어 바이러스 또는 세균 일 수 있다.

[0080] 본 명세서에서의 "혈구"에 대한 언급은, 생물학적 유체 내에 잠재적으로 존재하는 임의의 정상 또는 비정상, 성 숙 또는 미성숙 세포, 예를 들어 적혈구(RBC), 백혈구(WBC), 혈소판(PLT) 및 다른 세포들을 포함하는 것으로 이 해될 것이다. 일반적으로, 정상 RBC, PLT, 및 WBC는 각각 6 내지 8  $\mu\text{m}$ , 2 내지 3  $\mu\text{m}$ , 및 8 내지 15  $\mu\text{m}$  범 위의 입자 직경을 갖는다. 정상 RBC, PLT 및 WBC는 정상 환자로부터의 전혈 샘플 내에 각각 3.9 내지 5.7 x 10<sup>12</sup> 세포/L, 1.4 내지 4.5 x 10<sup>11</sup> 세포/L, 3.5 내지 11 x 10<sup>9</sup> 세포/L의 대략적인 농도 범위로 존재한다. 문 헌[Barbara J. Bain, Blood Cells, A Practical Guide, 4th ed., Blackwell Publishing, 2007, 34-36]을 참 조한다.

[0081] "유형적 요소"에 대한 언급은 생물학적 유체 샘플 내에 존재하는 비-유체 요소를 포함하는 것으로 이해될 것이

다. 유형적 요소에는, 예를 들어 과학적 분류 또는 생리학적 기능에 기초한 혈구들의 부류들이 포함되는데, 이들 부류에는 적혈구(RBC), 백혈구(WBC) 및 혈소판(PLT), WBC 응괴, 성숙 림프구 및 미성숙 백혈구를 포함한 백혈구의 하위부류들, 예컨대 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구가 포함된다. 본 명세서에서 사용하기 위해 "유형적 요소"는 또한 미생물, 세균, 진균, 기생충, 또는 이들의 단편 또는 다른 세포 단편들과 같은 입자들을 포함할 것이다. WBC의 주요 구성원들에는 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 및 호염기구가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 이들 구성원에는 또한 미성숙 또는 비정상 세포가 포함된다. 예를 들어, 미성숙 WBC에는 후골수 세포, 골수세포, 전골수세포가 포함될 수 있다. 성숙 RBC에 대하여, RBC의 구성원에는 유핵 RBC(NRBC) 및 망상 적혈구가 포함될 수 있다. PLT에는 정상 PLT, 및 크기가 정상 WBC의 크기에 근접하는 "거대" PLT가 포함될 수 있다. 본 명세서에서의 입자들의 범주 및/또는 하위범주의 "구성원" 또는 "구성원들"에 대한 언급은 입자들의 범주 또는 하위범주 내의 개별 입자들을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0082] 달리 명백히 나타내지 않는 한, 본 명세서에서의 입자들의 "범주"에 대한 언급은 측정, 검출 또는 도출된 적어도 하나의 검출 기준, 예컨대 크기, 형상, 텍스처, 또는 색을 사용하여 검출된 입자들의 군을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 장치에 의해 카운팅되는 입자들의 적어도 하나의 범주 및/또는 하위범주의 구성원들은 동일한 유형의 유형적 요소일 것이다.

[0083] 그러한 입자들은 "채널" 내에서 검출될 수 있다. 본 명세서에서의 "채널"에 대한 언급은, 적어도 하나의 채널 검출 기준을 충족시키는 입자들의 검출이 많은 적든 간에 이에 따라 변하는 출력을 제공하는, 신호원(signal source)에 커플링된 검출기를 포함하는 입자 카운터의 일부분을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 채널 검출 기준은 입자들의 크기 또는 부피에 기초할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 입자 카운터 내의 채널들의 수는 하나이다. 일부 다른 실시 형태에서, 입자 카운터 내의 채널들의 수는 2개 이상이다.

[0084] 입자 카운터의 하나의 채널 내에서 검출되는 입자들의 하나의 범주 및/또는 하위범주는 입자들의 상이한 부류들 및 하위부류들, 및 둘 이상의 하위부류들 내의 입자들의 그룹화된 구성원들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서의 입자들의 "범주(category)"에 대한 언급은 측정, 검출 또는 도출된 기준, 예컨대 크기, 형상, 텍스처, 또는 색에 상응하는 입자들의 그룹화를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 장치에 의해 카운팅되는 입자들의 적어도 하나의 범주 및/또는 하위범주의 구성원들은 동일한 유형의 유형적 요소일 것이다.

[0085] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 광학 고분해능 이미징 디바이스는 형태학적 특징부 및/또는 변화를 감별하기에 충분한 시각적 구분을 갖는 입자 이미지를 얻을 수 있는 디바이스를 포함할 수 있다. 예시적인 광학 고분해능 이미징 디바이스는 1  $\mu\text{m}$  이하 - 예를 들어, 0.4 내지 0.5  $\mu\text{m}$ , 예컨대 이를 테면 0.46  $\mu\text{m}$ 를 포함함 - 의 광학 분해능을 갖는 디바이스를 포함할 수 있다.

[0086] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 입자 조영제 조성물은 대상체로부터의 샘플 중의 입자들을 분석하기 위한 시각적 분석기에서 입자 및/또는 세포내 세포소기관 정렬 액체(PIOAL)와 조합하여 사용하기에 적합하게 될 수 있다. 예시적인 PIOAL은, 일 예로서, 대상체로부터의 샘플 중의 입자들의 상이한 유형들의 자동화 인식을 위한 방법에 유용하다.

[0087] 다른 태양에서, 세포들은, 이미지가 얻어질 때, PIOAL 내에 봉입될 수 있다. 적합한 예시적인 세포내 세포소기관 정렬 액체가 본 명세서에 기술되어 있다.

[0088] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "정렬"은 구형 및/또는 비구형 입자들의 정렬에 의해 부분적으로 특징지어질 수 있다. 예를 들어, 비구형 입자들과 같은 입자들은 유동 방향에 사실상 평행한 평면 내에 정렬될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 비구형 입자들의 정렬은 광학 고분해능 이미징 디바이스의 초점 평면 내에 이미징 조건 하에서 비구형 입자들의 이미지 투영을 증가시키는 입자들의 배향에 의해 특징지어진다. 구형 입자들과 같은 입자들은, 입자 범주화 및 하위범주화를 위한 시각적 구분을 생성하기에 유효한, 입자들 및 세포들의 인-포커스 입자내 내용물의 양에 있어서의 증가를 가질 수 있다. 구형 입자들과 같은 입자들의 입자내 구조들은 유동 방향에 사실상 평행하도록 위치설정, 위치재설정 및/또는 더 우수하게 위치설정될 수 있다. 예를 들어, 세포내 구조들, 세포소기관들 또는 엽들은 또한 유동 방향에 사실상 평행하도록 위치설정, 위치재설정 및/또는 더 우수하게 위치설정될 수 있다.

[0089] 본 명세서에서의 입자들의 "부류(class)"에 대한 언급은 과학적 분류에 기초한 입자들의 군을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 혈구들의 3가지 주요 부류가 전혈 샘플 내에 존재하며, 이에 RBC, WBC 및 PLT가 포함된다.



- [0090] 본 명세서에서의 입자들의 "구성원" 또는 "구성원들"에 대한 언급은 입자들의 하나의 범주 또는 하위범주 내의 입자들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 혈구들의 각각의 범주는 하위범주들 또는 구성원들로 추가로 세분될 수 있다. WBC의 주요 구성원들에는 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 및 호염기구가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 이들 구성원에는 또한 미성숙 또는 비정상 세포가 포함된다. 예를 들어, 미성숙 WBC에는 후골수세포, 골수세포, 및 전골수세포가 포함될 수 있다. 성숙 RBC에 더하여, RBC의 구성원에는 유헤 RBC(NRBC) 및 망상적혈구가 포함될 수 있다. PLT에는 정상 PLT, 및 크기가 정상 WBC의 크기에 근접하는 "거대" PLT가 포함될 수 있다.
- [0091] "미성숙 세포"에 대한 언급은, 소정 발달 단계 - 예를 들어, 골수 내부에서 - 에 있거나, 골수로부터 방출된 직후이지만 성숙 세포로 완전히 발달되기 전의 세포들을 포함하는 것으로 이해될 것이다.
- [0092] "비정상 세포"에 대한 언급은, 불규칙한 형태학적 특성을 갖는 세포들, 또는 소정 질병 또는 질환, 또는 일부 경우에 소정 질병 또는 질환과 관련될 수 있는 불규칙성(irregularity)과 관련된 세포들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 소정 질병의 예에는 적혈구증가증, 다혈구증, 빈혈, 적아구감소증, 백혈구증가증, 백혈구감소증, 림프구증가증, 림프구감소증, 과립구증가증, 과립구감소증 또는 무과립구증, 호중구증가증, 호중구감소증, 호산구증가증, 호산구감소증, 호염기구증가증, 호염기구감소증, 혈소판증가증, 혈소판감소증, 및 범혈구감소증이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 세포들의 일 부류가 혈류 중에서 증가 또는 감소될 수 있다. 일부 질환에서는, 정상 백혈구보다 훨씬 더 큰 비정상 세포들이 혈액 샘플 중에 낮은 농도로 존재한다. 크기, 형상, 색, 및/또는 세포내 구조들의 변동은 소정 질병 또는 질환과 관련될 수 있다.
- [0093] 본 명세서에서의 입자들의 "카운트" 또는 "입자 카운트"에 대한 언급은 입자 카운터의 하나의 채널로부터 얻어진 입자들의 수를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서의 입자들의 부류 또는 구성원의 "농도"에 대한 언급은 단위 부피당(예를 들어, 리터당) 또는 기지 부피의 샘플당 입자들의 수를 의미하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 입자 카운터는 입자들의 범주들에 대한 카운트 또는 농도 또는 다른 카운트 기반 함수를 제공할 수 있으며, 반면 시각적 분석기는 입자들의 각각의 범주 또는 하위범주에 대한 카운트, 농도, 비 또는 다른 농도 기반 파라미터를 제공할 수 있다.
- [0094] 본 명세서에서의 "비"에 대한 언급은 입자들의 2가지 범주/하위범주, 부류 또는 구성원의 임의의 정량적 및/또는 비례적인 비를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 그러한 비의 예에는 입자들의 농도, 중량을 기준으로 한 그리고/또는 입자들의 수를 기준으로 한 비가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 전형적으로, 이러한 비는 하나의 범주, 부류 또는 구성원의 카운트의 다른 하나의 그러한 범주, 부류 또는 구성원의 카운트에 대한 수치 비율에 관련된다. 일부 실시 형태에서는, 가중 카운트 또는 가중 및/또는 비례적인 비를 사용하여 결정이 또한 이루어질 수 있다.
- [0095] **혈액학 - 입자 분석 시스템**
- [0096] 이제 도면을 참고하면, 도 1은 디지털 이미지 처리를 사용하여 샘플 유동 스트림(32) 중의 현미경적 입자를 이미징하기 위한 구성에서 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)의 관찰 구역(23)을 통해 샘플 유체를 수송하기 위한 예시적인 플로우셀(22)을 개략적으로 도시한다. 플로우셀(22)은 샘플 유체의 공급원(25)에 커플링되는데, 이러한 샘플 유체는 처리, 예컨대 입자 조영제 조성물과의 접촉 및 가열을 거쳤을 수 있다. 플로우셀(22)은 또한 입자 및/또는 세포내 세포소기관 정렬 액체(PIOAL), 예컨대 샘플 유체의 점도보다 더 큰 점도를 갖는 투명 글리세롤 용액의 하나 이상의 공급원(27)에 커플링된다.
- [0097] 샘플 유체는, 샘플 공급관(29)의 원위 단부(28)에서 납작한 개구부를 통해, 그리고 PIOAL 유동이 사실상 확립된 지점에서 플로우셀(22)의 내부 내로 주입되어서, 리본형 샘플 스트림의 위 및 아래에서(또는 대향하는 면들 상에서) PIOAL의 안정하고 대칭인 층류가 생성되게 된다. 샘플 스트림 및 PIOAL 스트림은, 사실상 협소화되는 유로를 따라, 주입된 샘플 유체와 함께 PIOAL을 이동시키는 정밀 계량 펌프들에 의해 공급될 수 있다. PIOAL은 유로가 협소화되는 구역(21)에서 샘플 유체를 봉입 및 압축한다. 따라서, 구역(21)에서의 유로 두께의 감소는 샘플 스트림(32)의 기하학적 포커싱(geometric focusing)에 기여할 수 있다. 샘플 유체 리본(32)은 협소화 구역(21)의 하류에서 PIOAL에 의해 봉입되고 그와 함께 운반되어, 예를 들어 CCD(48)를 사용하여 이미지가 수집되는 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)의 전방에서, 또는 아니면 관찰 구역(23)을 통해 통과한다. 프로세서(18)는 입력으로서 CCD(48)로부터 픽셀 데이터를 받아들이 수 있다. 샘플 유체 리본은 PIOAL과 함께 배출구(33)로 유동한다.
- [0098] 여기에 나타낸 바와 같이, 협소화 구역(21)은, 원위 두께 DT가 근위 두께 PT보다 더 작도록, 근위 두께 PT를 갖

는 근위 유로 부분(21a) 및 원위 두께 DT를 갖는 원위 유로 부분(21b)을 가질 수 있다. 따라서, 샘플 유체는 근위 부분(21a)에 대해 원위이고 원위 부분(21b)에 대해 근위인 위치에서 샘플관(29)의 원위 단부(28)를 통해 주입될 수 있다. 따라서, 샘플 유체는 PIOAL 스트림이 구역(21)에 의해 압축됨에 따라 PIOAL 봉입물로 진입될 수 있으며, 이때 구역(21)에서 샘플 유체 주입관은 원위 출구를 가지며, 이를 통해 샘플 유체가 유동하는 시스템 유체 내로 주입되고, 이러한 원위 출구는 플로우셀의 유로 크기의 감소에 의해 경계 지어진다.

[0099] 대물 렌즈(46)를 갖는 디지털 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)는 리본형 샘플 스트림(32)과 교차하는 광학 축을 따라 지향된다. 대물 렌즈(46)와 플로우셀(33) 사이의 상대 거리는 광센서 어레이 상의 포커싱된 디지털 화 이미지를 분해 및 수집하기 위하여 모터 드라이브(54)의 작동에 의해 변동가능하다.

[0100] **플로우셀**

[0101] 플로우셀(22)의 실용적인 실시 형태가 도 2 및 도 3에 추가로 도시되어 있다. 여기에 도시된 바와 같이, 플로우셀(22)은 샘플 공급원(25)과 커플링되고 또한 PIOAL 재료의 공급원(27)에 커플링될 수 있다. 샘플 유체는 캐놀러(29)를 거쳐, 예를 들어 캐놀러(29)의 원위 출구(31)를 통해 플로우셀(22) 내로 주입된다. 전형적으로, PIOAL 시스템 유체는, 그것이 공급원(27)으로부터 관찰 구역(23)을 향해 플로우셀 내의 곡선형 채널 섹션(41)을 통해 이동함에 따라 층류 상태에 있지 않다. 그러나, 플로우셀(22)은, 유동하는 PIOAL 시스템 유체 내로 샘플 유체가 도입되는 곳인 원위 출구(31)를 지나서 PIOAL 시스템 유체가 유동함에 따라, PIOAL 시스템 유체가 층류이거나 층류가 되도록 또는 편평한 속도 프로파일을 제공하도록 구성될 수 있다. 샘플 유체 및 PIOAL은 화살표 A로 대체로 표시된 방향으로 플로우셀(22)을 따라 유동하고, 이어서 배출구(33)를 통해 플로우셀(22)로부터 유출될 수 있다. 플로우셀(22)은 유동 방향(A)으로 (예를 들어, 전이 구역(21)에서) 대칭적으로 협소화되는 내부 유로(20)를 한정한다. 유로의 대칭은 샘플 스트림의 확고하고 중심화된 유동에 기여한다. 플로우셀(22)은 PIOAL로 봉입된 샘플의 유동(32)을 플로우셀 내의 관찰 구역(23) - 즉, 관찰구(57) 뒤에 있음 - 을 통해 지향시키도록 구성된다. 오토포커스 패턴(44)이 관찰구(57)와 관련된다. 플로우셀(22)은 또한 현미경 대물 렌즈(도시되지 않음)를 수용하거나 받아들일도록 구성된 둥근형 또는 리세스형 안착부(seat)(58)를 갖는다.

[0102] 일부 실시 형태에 따르면, 오토포커스 패턴(44)은 플로우셀(22)에 대해 고정되고 리본형 샘플 스트림(32)의 평면으로부터의 변위 거리에 놓여진 위치를 가질 수 있다. 여기에 도시된 실시 형태에서, 오토포커스 패턴(표적(44))은 광학 고분해능 이미징 디바이스(도시되지 않음)에 의해 관찰구(57)를 통해 수집된 이미지에서 가시적인 위치에서 플로우셀(22)에 직접 적용된다. 플로우셀(22)은 제1 또는 상부 섹션 또는 층(22a) 및 제2 또는 하부 섹션 또는 층(22b)으로 구성될 수 있다. 여기에 도시된 바와 같이, 유리 또는 투명 창 판자(60)가 제1 섹션(22a)에 부착되거나 그와 일체화된다. 판자(60)는 플로우셀 내의 샘플 유로의 적어도 일부분을 한정할 수 있다. 광원(42)으로부터의 광은 유동 스트림(32) 내에서 유동하는 샘플 입자들을 조명하도록 오토포커스 패턴(44)의 개구부 또는 통로를 통해 이동할 수 있다.

[0103] 일부 경우에, 판자(60)의 두께는 약 150  $\mu\text{m}$  내지 약 170  $\mu\text{m}$  범위의 값을 가질 수 있다. 상기에 기재된 바와 같이, 판자(60)는 유로 또는 시스템(예를 들어, PIOAL) 채널의 일부를 한정 또는 형성할 수 있다. 박형 판자(60)를 사용함으로써, 샘플 유체 리본에 매우 근접하게 현미경 대물 렌즈를 배치하고, 이에 따라 유로를 따라 유동하는 입자들의 고확대 이미지를 얻는 것이 가능하다.

[0104] 도 3a는 플로우셀 실시 형태의 태양들을 도시하는데, 이 실시 형태에서는 이미징 축(355)과 원위 전이 구역 부분(316) 사이의 거리가 약 8.24 mm이다. 원위 전이 구역 부분(316)과 캐놀러 출구(331) 사이의 거리는 약 12.54 mm이다. 캐놀러 출구(331)와 시스템 유체 입구(301) 사이의 거리는 약 12.7 mm이다. 캐놀러 출구(331)와 근위 전이 구역 부분(318) 사이의 거리는 약 0.73 mm이다. 도 3b는 플로우셀 실시 형태의 태양들을 도시하는데, 이 실시 형태에서는 도 3a의 실시 형태와 비교하여 캐놀러 출구가 전이 구역에 대해 더 원위인 위치로 이동되었다. 여기에 도시된 바와 같이, 캐놀러 원위 단부는 플로우셀의 협소화 전이 구역 내로 전진되어 있으며, 이미징 축(355)과 원위 전이 구역 부분(316) 사이의 거리가 약 16 mm 내지 약 26 mm 범위이다. 일부 경우에, 이미징 축(355)과 원위 전이 구역 부분(316) 사이의 거리는 약 21 mm이다.

[0105] 도 1을 다시 참고하면, (예를 들어, 전이 구역(21)에서의) 플로우셀 내부 윤곽 및 PIOAL과 샘플의 유량은, 샘플이 리본형 스트림(32)으로 형성되도록 조정될 수 있다. 이러한 스트림은 대략적으로, 리본형 샘플 스트림 내에 봉입되는 입자들만큼 박형이거나 또는 심지어 이들보다 더 박형일 수 있다. 백혈구는, 예를 들어 직경이 약 10  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 두께가 10  $\mu\text{m}$  미만인 리본형 샘플 스트림을 제공함으로써, 리본형 샘플 스트림이 시스템 유체 또는 PIOAL에 의해 연신될 때 세포들이 배향될 수 있다. 의외로 리본형 샘플 스트림과 상이한 점도의, 예컨대 더 높은 점도의 PIOAL 층들 내의 협소화 유로를 따라 리본형 샘플 스트림을 연신하는 것은, 유리하게는 유동 방



향과 사실상 평행한 평면 내에 비구형 입자들을 정렬시키고 세포들 상에 힘을 인가하여 세포들의 세포내 구조의 인-포커스 내용물을 개선하는 경향이 있다. 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)의 광학 축은 리본형 샘플 스트립의 평면에 사실상 수직(직각)이다. 이미징 지점에서의 리본형 샘플 스트립의 선속도는, 예를 들어 20 내지 200 mm/sec일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 리본형 샘플 스트립의 선속도는, 예를 들어 50 내지 150 mm/sec일 수 있다.

[0106] 리본형 샘플 스트립 두께는 샘플 유체 및 PIOAL의 상대 점도 및 유량에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 정밀 변위 펌프를 포함하는 샘플의 공급원(25) 및/또는 PIOAL의 공급원(27)은 리본형 샘플 스트립(32)의 치수를 최적화하기 위해 제어가능한 유량으로, 즉 적어도 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)의 시야만큼 넓은 박형 리본으로서 샘플 및/또는 PIOAL을 제공하도록 구성될 수 있다.

[0107] 일 실시 형태에서, PIOAL 공급원(27)은 사전결정된 점도의 PIOAL을 제공하도록 구성된다. 그러한 점도는 샘플의 점도와 상이할 수 있으며, 샘플의 점도보다 더 높을 수 있다. PIOAL의 점도 및 밀도, 샘플 재료의 점도, PIOAL의 유량 및 샘플 재료의 유량을 조정하여, 오토포커스 패턴으로부터의 변위 거리에서, 그리고 사전결정된 치수 특성으로, 예컨대 유리한 리본형 샘플 스트립 두께로 리본형 샘플 스트립을 유지한다.

[0108] 실용적인 실시 형태에서, PIOAL은 샘플보다 더 높은 선속도 및 샘플보다 더 높은 점도를 가지며, 그럼으로써 샘플을 편평한 리본으로 연신시킨다. PIOAL의 점도는 최대 10 센티푸아즈일 수 있다.

[0109] 도 2 및 도 3을 또한 참고하면, 플로우셀의 내부 유로는 PIOAL 내로의 리본형 샘플 스트립의 주입 지점의 하류에서 협소화되어, 예를 들어 최대 7  $\mu\text{m}$ 의 리본형 샘플 스트립 두께를 생성하고/하거나, 내부 유로는 500 내지 3,000  $\mu\text{m}$ 의 리본형 샘플 스트립 폭을 생성한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 예시적인 실시 형태에서, 플로우셀의 내부 유로는 PIOAL 내로의 샘플 스트립의 주입 지점의 상류에서 협소화 전이 구역을 시작한다.

[0110] 다른 실시 형태에서, 내부 유로는 협소화되어서 2 내지 4  $\mu\text{m}$  두께의 리본형 샘플 스트립 두께를 생성하고/하거나, 내부 유로는 2000  $\mu\text{m}$  폭의 리본형 샘플 스트립을 생성한다. 이들 치수는 혈액학에 특히 유용하다. 이러한 경우에 스트립의 두께는 일부 입자들, 예컨대 완전된 상태에서의 적혈구의 직경 미만이다. 따라서, 이러한 입자들은 그들의 더 넓은 치수가 이미징 축에 대면하도록 재배향되게 될 수 있으며, 이는 구분되는 특성을 밝혀내는 데 도움이 된다.

[0111] 리본형 샘플 스트립의 선속도는 광센서 어레이의 이미지 노출 시간에 디지털화 이미지의 모션 블러링(motion blurring)을 방지하도록 충분히 제한될 수 있다. 광원은 선택적으로, 짧은 시간 동안 높은 입사 진폭을 적용하도록 플래싱되는(flashed) 스트로브 광일 수 있다. 오토포커스 패턴(44) 및 이미지가 동일한 시야에 있기 때문에, 광원은 리본형 샘플 스트립 및 오토포커스 패턴을 동시에 조명하도록 구성된다. 그러나, 다른 실시 형태에서, 이미징을 위한 시야와 오토포커스를 위한 시야는 상이할 수 있으며, 예를 들어 별개로 조명 및/또는 이미징될 수 있다.

[0112] 본 발명은 장치뿐만 아니라 방법 태양들도 갖는다. 시각적 분석기를 포커싱하는 방법은 광학 고분해능 이미징 디바이스(24) - 이는 디지털 광학 고분해능 이미지 디바이스 또는 디지털 이미지 캡처 디바이스일 수 있음 - 를 플로우셀(22)에 대해 고정된 오토포커스 패턴(44) 상에 포커싱하는 단계를 포함하며, 여기서 오토포커스 패턴(44)은 리본형 샘플 스트립(32)으로부터의 변위 거리(52)에 위치된다. 디지털 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)는 리본형 샘플 스트립(32)과 교차하는 광학 축을 갖는 대물 렌즈를 갖는다. 대물 렌즈와 플로우셀(22) 사이의 상대 거리는 모터 드라이브(54)의 작동에 의해 변동되며, 한편 광학 고분해능 이미징 디바이스와 최적 포커스의 지점 사이의 광학 축을 따른 거리는 알고 있다. 디지털 광학 고분해능 이미징 디바이스는 광센서 어레이 상의 디지털화 이미지를 분해 및 수집하도록 구성된다. 모터 드라이브는 오토포커스 과정에서 오토포커스 패턴 상에 포커싱하도록 작동된다. 이어서, 모터 드라이브는 변위 거리에 걸쳐 작동되며, 그럼으로써 광학 고분해능 이미징 디바이스를 리본형 샘플 스트립 상에 포커싱한다.

[0113] 본 방법은 리본형 샘플 스트립을 리본 형상으로 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 리본 형상은, 광학 고분해능 이미징 디바이스의 광학 축이 리본형 샘플 스트립에 사실상 직각이 되도록, 즉 리본형 스트립의 평면에 수직이 되도록 제공된다.

[0114] 도 4는 혈액 유체 샘플 중의 입자들을 이미징하기 위한 시스템(400)의 태양들을 도시한다. 여기에 도시된 바와 같이, 시스템(400)은 샘플 유체 주입 시스템(410), 플로우셀(420), 및 이미지 캡처 디바이스(430), 및 프로세서(440)를 포함한다. 플로우셀(420)은 시스 유체의 유동을, 선택적으로 샘플 유체와 조합하여 전송하는 유로(422)를 제공한다. 일부 실시 형태에 따르면, 샘플 유체 주입 시스템(410)은 캐플러 또는 관(412)을 포함하

나 또는 이와 커플링될 수 있다. 샘플 유체 주입 시스템(410)은 유로(422)와 유체 연통될 수 있으며, 캐놀러(412)의 원위 출구(413)를 통해 그리고 플로우셀(420) 내의 유동하는 시스 유체(426) 내로 샘플 유체(424)를 주입하여 샘플 유체 스트림(428)을 제공하도록 작동될 수 있다. 예를 들어, 프로세서(440)는 컴퓨터 애플리케이션을 갖는 저장 매체를 포함하거나 또는 이와 작동식으로 관련될 수 있는데, 컴퓨터 애플리케이션은, 프로세서에 의해 실행될 때, 샘플 유체 주입 시스템(410)으로 하여금 샘플 유체(424)를 유동하는 시스 유체(426) 내로 주입하게 하도록 구성된다. 여기에 도시된 바와 같이, 시스 유체(426)는 시스 유체 주입 시스템(450)에 의해 플로우셀(420) 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 프로세서(440)는 컴퓨터 애플리케이션을 갖는 저장 매체를 포함하거나 또는 이와 작동식으로 관련될 수 있는데, 컴퓨터 애플리케이션은, 프로세서에 의해 실행될 때, 시스 유체 주입 시스템(450)으로 하여금 시스 유체(426)를 플로우셀(420) 내로 주입하게 하도록 구성된다.

[0115] 샘플 유체 스트림(428)은 주입관(412)에 인접해서 제1 두께 T1을 갖는다. 플로우셀의 유로(422)는, 샘플 유체 스트림(428)의 두께가 초기 두께 T1로부터 이미지 캡처 영역(432)에 인접하여 제2 두께 T2로 감소되도록 한 유로 크기의 감소부를 갖는다. 이미지 캡처 디바이스(430)는, 플로우셀(420)의 이미지 캡처 영역(432)에서 제1 샘플 유체로부터의 제1 복수의 입자들을 이미징하도록, 이미지 캡처 영역(432)과 정렬된다.

[0116] 프로세서(440)는 샘플 유체 주입 시스템(410), 이미지 캡처 디바이스(430), 및 선택적으로 시스 유체 주입 시스템(450)과 커플링된다. 프로세서(440)는 유동하는 시스 유체(426) 내로의 제1 샘플 유체의 주입을 종료하고 유동하는 시스 유체(426) 내로의 제2 샘플 유체의 주입을 시작하여 샘플 유체 과도상태(transient)가 개시되도록 구성된다. 예를 들어, 프로세서(440)는 컴퓨터 애플리케이션을 갖는 저장 매체를 포함하거나 또는 이와 작동식으로 관련될 수 있는데, 컴퓨터 애플리케이션은, 프로세서에 의해 실행될 때, 샘플 유체 주입 시스템(410)으로 하여금 제2 샘플 유체를 유동하는 시스 유체(426) 내로 주입하여 샘플 유체 과도상태가 개시되게 하도록 구성된다.

[0117] 또한, 프로세서(440)는 샘플 유체 과도상태 후에 그리고 제1 복수의 입자들을 이미징하고 나서 4초 이내에 플로우셀(420)의 이미지 캡처 영역(432)에서 제2 샘플 유체로부터의 제2 복수의 입자들의 이미지의 캡처를 개시하도록 구성된다. 예를 들어, 프로세서(440)는 컴퓨터 애플리케이션을 갖는 저장 매체를 포함하거나 또는 이와 작동식으로 관련될 수 있는데, 컴퓨터 애플리케이션은, 프로세서에 의해 실행될 때, 이미지 캡처 디바이스(430)로 하여금 샘플 유체 과도상태 후에 그리고 제1 복수의 입자들을 이미징하고 나서 4초 이내에 플로우셀(420)의 이미지 캡처 영역(432)에서 제2 샘플 유체로부터의 제2 복수의 입자들의 이미지의 캡처를 개시하게 하도록 구성된다.

[0118] 도 4a에 도시된 플로우셀 실시 형태에 도시된 바와 같이, (예를 들어, 전이 구역(419a)에서의) 유로 크기의 감소부는 유로(422a)의 대향되는 벽들(421a, 423a)에 의해 한정될 수 있다. 대향되는 벽들(421a, 423a)은, 샘플 유체 스트림(428a)을 이등분하는 횡방향 평면(451a) 주위에서 대체로 대칭인 유로(422a)를 따라 반경방향으로 내향으로 경사질 수 있다. 평면(451a)은 샘플 스트림(428a)을 이등분할 수 있으며, 여기서 샘플 스트림은 샘플 스트림(428a)이 캐놀러 또는 샘플 주입관(412a)의 원위 부분(427a)을 빠져나가는 위치에서 제1 두께 T1을 갖는다. 유사하게, 평면(451a)은 샘플 스트림(428a)을 이등분할 수 있으며, 여기서 샘플 스트림은 샘플 스트림(428a)이 이미지 캡처 영역(432a)을 통과하는 위치에서 제2 두께 T2를 갖는다. 일부 실시 형태에 따르면, 제1 두께 T1은 약 150  $\mu\text{m}$ 의 값을 갖고, 제2 두께 T2는 약 2  $\mu\text{m}$ 의 값을 갖는다. 그러한 경우에, 샘플 리본 스트림의 압축비는 75:1이다. 일부 실시 형태에 따르면, 제1 두께 T1은 약 50  $\mu\text{m}$  내지 약 250  $\mu\text{m}$  범위의 값을 갖고, 제2 두께 T2는 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 10  $\mu\text{m}$  범위의 값을 갖는다. 샘플 스트림 유체가 플로우셀을 통해 유동함에 따라, 리본은 그것이 가속되고 연신됨에 따라 박형화된다. 플로우셀의 2가지 특징은 샘플 유체 리본의 박형화에 기여할 수 있다. 첫째, 시스 유체 봉입물과 샘플 유체 리본 사이의 속도 차이가 리본의 두께를 감소시키도록 작동할 수 있다. 둘째, 전이 구역의 테이퍼진(tapered) 기하학적 형태가 리본의 두께를 감소시키도록 작동할 수 있다.

[0119] 전형적으로, 제1 두께 T1은 샘플 입자들의 크기보다 훨씬 더 크며, 이에 따라 이들 입자는 샘플 리본 스트림 내에 완전히 수용된다. 그러나, 제2 두께 T2는 소정 샘플 입자들의 크기보다 더 작을 수 있으며, 이에 따라 이러한 입자들은 샘플 유체로부터 나와서 주위의 시스 유체 내로 연장될 수 있다. 도 4a에 도시된 바와 같이, 샘플 리본 스트림은 그것이 캐놀러를 빠져나가서 이미지 캡처 영역을 향해 이동함에 따라 동일 평면을 따라 대체로 유동할 수 있다.

[0120] 플로우셀은 또한 캐놀러 원위 부분(427a)과 이미지 캡처 영역(432a) 사이에 분리 거리(430a)를 제공할 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 샘플 유체 주입관(412a)의 원위 부분(427a)은 이미지 캡처 영역(432a)으로부터 축상

분리 거리(430a)에 위치될 수 있으며, 여기서 측정 분리 거리(432a)는 약 21 mm의 값을 갖는다. 일부 경우에, 측정 분리 거리(430a)는 약 16 mm 내지 약 26 mm 범위의 값을 갖는다.

[0121] 캐논러 출구와 이미지 캡처 영역 사이의 측정 분리 거리(430a)는 유체가 출구로부터 이미지 캡처 영역으로 이동함에 따라 샘플 유체에 대한 전이 시간에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 상대적으로 더 짧은 측정 분리 거리(430a)는 더 짧은 전이 시간에 기여할 수 있고, 상대적으로 더 긴 측정 분리 거리(430a)는 더 긴 전이 시간에 기여할 수 있다.

[0122] 유로 전이 구역(419a)에 대한, 또는 유로 전이 구역(419a)의 근위 부분(415a)에 대한 캐논러 원위 부분(427a)에서의 출구의 위치도 또한, 유체가 출구로부터 이미지 캡처 영역으로 이동함에 따라 샘플 유체에 대한 전이 시간을 추론할 수 있다. 예를 들어, 시스 유체는 근위 부분(415a)에서 상대적으로 더 느린 속도를, 그리고 근위 부분(415a)과 원위 부분(416a) 사이의 위치에서 상대적으로 더 빠른 속도를 가질 수 있다. 따라서, 원위 부분(427a)에서의 캐논러 출구가 근위 부분(415a)에 위치된다면, 샘플 유체가 이미지 캡처 영역에 도달하는 데 더 긴 시간이 걸리게 될 것인데, 그 이유는 이동 거리가 더 길기 때문일 뿐만 아니라, 샘플 유체가 캐논러 원위 포트를 빠져나간 후의 샘플 유체의 초기 속도가 (더 느린 시스 유체 속도로 인해) 더 느리기 때문이기도 하다. 바꿔 말하면, 샘플 유체가 플로우셀의 더 두꺼운 부분에(예를 들어, 근위 부분(415a) 부근에) 더 오래 존재할수록, 샘플이 이미지 캡처 영역에 도달하는 데 더 오래 걸린다. 역으로, 원위 부분(427a)에서의 캐논러 출구가 근위 부분(415a)에 대해 원위에(예를 들어, 도 4a에 도시된 바와 같이 근위 부분(415a)과 원위 부분(416a) 사이의 중심 위치에) 위치된다면, 샘플 유체가 이미지 캡처 영역에 도달하는 데 더 짧은 시간이 걸리게 될 것인데, 그 이유는 이동 거리가 더 짧기 때문일 뿐만 아니라, 샘플 유체가 캐논러 원위 포트를 빠져나간 후의 샘플 유체의 초기 속도가 (더 빠른 시스 유체 속도로 인해) 더 빠르기 때문이기도 하다. 본 명세서의 어딘가 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 전이 구역(419a)의 협소화되는 단면적으로 인해, 시스 유체는 그가 구역(419a)을 통해 유동됨에 따라 가속된다.

[0123] 일부 실시 형태에 따르면, 더 짧은 전이 시간으로, 이미지 캡처 영역에서의 이미지 수집에 있어서 더 많은 시간이 이용가능하다. 예를 들어, 캐논러 원위 선단으로부터 이미징 영역까지의 전이 시간의 지속기간이 감소됨에 따라, 특정 시간 내에 더 많은 샘플을 처리하는 것이 가능하며, 이와 관련하여 특정 시간 내에 더 많은 이미지(예를 들어, 분당 이미지 수)를 얻는 것이 가능하다.

[0124] 캐논러 원위 부분(427a)의 출구를 이미지 캡처 영역(432a)에 더 근접하게 위치설정하는 것과 관련된 이점이 있더라도, 출구와 캡처 영역 사이에 소정 거리를 유지하는 것이 또한 바람직하다. 예를 들어, 도 3에 도시된 바와 같이, 이미징 디바이스의 광학 대물 렌즈 또는 전면 렌즈가 플로우셀(22)의 안착부(58)에 위치될 수 있다. 캐논러의 출구(31)가 안착부(58)에 너무 근접해 있다면, 이때 샘플 유체는, 그것이 시스 유체 내로 주입된 후에 충분히 안정화될 수 없어서, 이미지 캡처 영역에서 원하는 이미징 특성을 제공하게 될 수 없다. 유사하게, 관찰 구역(23)으로부터 일정 거리에서 테이퍼진 전이 구역(21)을 유지하여, 테이퍼진 구역이 이미지 캡처 디바이스 대물 렌즈를 받아들이는 안착부(58)의 위치설정을 방해하지 않도록 하는 것이 바람직할 수 있다.

[0125] 도 4a를 계속 참고하면, 샘플 유체 주입관(412a)의 하류 단부(427a)는 유로 전이 구역(419a)의 근위 부분(415a)에 대해 원위에 위치될 수 있다. 이와 관련하여, 샘플 유체 주입관(412a)의 하류 단부(427a)는 유로 전이 구역(419a)의 원위 부분(416a)에 대해 근위에 위치될 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에 따르면, 샘플 유체는 전이 구역(419a) 내의 위치에서 주입 캐논러(412a)로부터 플로우셀 내로 주입될 수 있다.

[0126] 일부 실시 형태에 따르면, (예를 들어, 유로 전이 구역(419a)에서의) 유로 크기의 감소부에서의 대칭은 혈액 유체 샘플 내에서의 입자 오정렬을 제한하도록 작동한다. 예를 들어, 그러한 대칭은 혈액 유체 샘플 내에서의 적혈구 이미징 배향 오정렬을 약 20% 미만으로 제한하는 데 효과적일 수 있다.

[0127] 일부 실시 형태에 따르면, 본 명세서에 개시된 방법은 혈구 카운트 분석 동안 샘플의 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6% 또는 5% 미만으로의 플래깅률(flagging rate)로 작동가능하다.

[0128] 일부 실시 형태에 따르면, 이미지 캡처 영역(432a)은 약 150  $\mu\text{m}$  x 150  $\mu\text{m}$  내지 400  $\mu\text{m}$  x 400  $\mu\text{m}$ 의 시야(433a)를 갖는다. 일부 경우에, 이미지 캡처 영역(432a)은 약 275  $\mu\text{m}$  x 275  $\mu\text{m}$ 의 시야(433a)를 갖는다. 일부 경우에, 시야는 길이 x 폭의 관점에서 한정될 수 있다. 표면적으로 표현된다면, 275  $\mu\text{m}$  x 275  $\mu\text{m}$ 의 시야는 75,625  $\mu\text{m}^2$ 의 면적을 갖는다. 일부 실시 형태에 따르면, 시야는 이미징 디바이스 대물 렌즈 및 그의 배율에 의해 결정될 수 있다. 일부 경우에, 시야는 수집 광학장치(예를 들어, 대물 렌즈, 튜브 렌즈, 및 카메라)에

의해 이미징되는 필드(영역)의 범위에 상응할 수 있다. 일부 경우에, 시야는 이미지 캡처 영역에서의 투명 영역의 관찰구보다 훨씬 더 작다.

[0129] 도 4a-1 및 도 4a-2는 샘플 스트림이 캐플러 출구로부터 이미지 캡처 영역으로 이동함에 따라 샘플 스트림에 대해 하이드로포커싱이 미치는 영향을 예시한다. 도 4a-1에 도시된 바와 같이, 샘플 스트림은 높이  $H(S)$ 가 약  $150\ \mu\text{m}$ 이고, 폭  $W(S)$ 가 약  $1350\ \mu\text{m}$ 일 수 있다. 또한, PIOAL 시스 스트림은 높이  $H(P)$ 가 약  $6000\ \mu\text{m}$ 이고, 폭  $W(P)$ 가 약  $4000\ \mu\text{m}$ 일 수 있다. 하이드로포커싱 후에, 도 4a-2에 도시된 바와 같이, 샘플 스트림은 높이  $H(S)$ 가 약  $2\ \mu\text{m}$ 이고, 폭  $W(S)$ 가 약  $1350\ \mu\text{m}$ 일 수 있다. 또한, PIOAL 시스 스트림은 높이  $H(P)$ 가 약  $150\ \mu\text{m}$ 이고, 폭  $W(P)$ 가 약  $4000\ \mu\text{m}$ 일 수 있다. 일 실시 형태에서, 캐플러 출구에서의 PIOAL 시스 스트림의 단면적은 이미지 캡처 영역 부근의 단면적보다 40배 더 크다.

[0130] 일부 실시 형태에 따르면, 이미지 캡처 영역에서 플로우셀 채널의 단면을 결정하는 것이 유용할 수 있다. 이는 도 4a-2에 도시된 바와 같이 PIOAL 시스 스트림 높이  $H(P)$  약  $150\ \mu\text{m}$  및 폭  $W(P)$  약  $4000\ \mu\text{m}$ 에 상응할 수 있다. 또한, 이미지 캡처 영역에서 플로우셀을 통해 스트리밍하는 조합된 샘플 및 시스 유체의 부피 유량(volumetric flow rate)을 결정하는 것이 유용할 수 있다. 이러한 단면적 및 유량을 알고 있을 경우, 이미지 캡처 영역에서의 조합된 샘플 및 시스 유체의 속도를 결정할 수 있다.

[0131] 일부 실시 형태에 따르면, 플로우셀을 통한 샘플 유체 및 시스 유체의 유동은 평행관 프로파일 모델로 근사될 수 있다. 이와 관련하여, (예를 들어, 도 4a-2에 도시된 바와 같은) 샘플 유체 스트림의 중심에서의 유량은 조합된 샘플 및 시스 유체 스트림의 평균 유량의 약 1.5배일 수 있다.

[0132] 일부 실시 형태에 따르면, 캐플러 출구에서의 샘플 유동의 단면적(예를 들어, 도 4a-1에서의  $W(S) \times H(S)$ )은 이미징 영역에서의 샘플 유동의 단면적(예를 들어, 도 4a-2에서의  $W(S) \times H(S)$ )보다 40배 더 크다. 이미징 영역에서의 시스 유체의 부피 유량은 약  $45\ \mu\text{L/sec}$ 일 수 있다. 이미징 영역에서의 샘플 유체의 부피 유량은 약  $0.232\ \mu\text{L/sec}$ 일 수 있다. 일부 경우에, 이미징 영역에서의 조합된 시스 및 샘플 스트림의 단면적은  $600,000\ \mu\text{m}^2$ 이다. 일부 경우에, 이미징 영역에서의 평균 유동 스트림 속도는  $75\ \text{mm/sec}$ 이다.

[0133] 유량 또는 유속은 선명하고 포커싱된 세포 이미지를 생성하는 속도로서 결정될 수 있다. 예시적인 유량 및 유속은 이미징 영역에서 소정의 샘플 유동 스트림 리본 형상 또는 특성을 달성하는 것으로 관찰된 2개의 샘플의 유량에 기초하여 알아내었다. 예를 들어, 약  $75\ \text{mm/sec}$ (또는 20 내지  $200\ \text{mm/sec}$  범위)의 유량에서, 세포들은 연속된 이미지들에서 세포들의 중첩이 있을 정도로 너무 느리게 유동하지 않으며, 세포들은 고스팅 효과(ghosting effect)가 생성될(이미지가 블러링될) 정도로 너무 빠르게 유동하지 않는다. 이와 관련하여, 과도하게 높은 유량을 피함으로써, 더 많은 시야 및 샘플을 절약할 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 캐플러의 형상 또는 부피 유량(펌프 속도)을 변화시킴으로써 최적의 또는 원하는 전속도가 달성될 수 있다.

[0134] 이미지 캡처 구역을 통한 샘플 스트림의 유속은 또한 플로우셀 기능에 대한 이미지 캡처 디바이스의 성능과 관련될 수 있다. 예를 들어, 샘플 스트림이 너무 빨리 유동한다면, 샘플 중에 함유된 입자들의 선명한 이미지를 얻기가 어려울 수 있다(예를 들어, 이미지 캡처 디바이스의 셔터 속도는 너무 느릴 수 있으며, 이에 따라 블러링된 이미지를 생성할 수 있다). 유사하게, 샘플 스트림이 너무 느리게 유동한다면, 이미지 캡처 디바이스는 동일 입자의 연속된 이미지들을 얻을 수 있다(예를 들어, 2회의 이미지 캡처 동안 동일 입자가 캡처 프레임 내에 남아 있다). 일부 실시 형태에서, 샘플 리본의 속도는 이미지 캡처 속도에 대해 (예를 들어, 다양한 플로우셀 작동 파라미터들 중 임의의 것을 조정함으로써) 조절될 수 있어서, 프레임 캡처들 사이에 최소한의 유동이 있게 되며, 이에 따라 샘플의 높은 백분율이 이미징되게 된다.

[0135] 일부 실시 형태에 따르면, 입자 분석 시스템 및 관련 구성요소들은, 시스 유체 및 유체 샘플이 플로우셀을 통해 유동함에 따라, 시스 유체는  $45\ \mu\text{L/s}$ 의 시스 유체 부피 유량으로 유동할 수 있고, 유체 샘플은  $0.232\ \mu\text{L/s}$ (또는 0.2 내지  $0.35\ \mu\text{L/s}$ 의 범위)의 유체 샘플 부피 유량으로 유동할 수 있도록 구성될 수 있다. 일부 경우에, 시스 유체 유량 대 샘플 유체 유량의 비는 약 200이다. 일부 경우에, 시스 유체 유량 대 샘플 유체 유량의 비는 약 70 내지 200 범위의 값을 갖는다. 일부 경우에, 시스 유체 유량 대 샘플 유체 유량의 비는 약 193이다. 일부 경우에, 시스 유체 유량 대 샘플 유체 유량의 비는 약 70이다. 일부 경우에, 플로우셀 내에서 유동하는 시스 유체 부피 대 유체 샘플 부피의 비는 25:1 내지 250:1의 범위일 수 있다.

[0136] 일부 실시 형태에 따르면, 이러한 시스템 및 관련 구성요소들은, 시스 유체 및 유체 샘플이 플로우셀(420)을 통해 유동함에 따라, 시스 유체는 이미징 영역 전에서  $75\ \text{mm/sec}$ 의 시스 유체 속도로 유동할 수 있고, 유체 샘플은 이미징 영역 전에서  $130\ \text{mm/sec}$ 의 유체 샘플 속도로 유동할 수 있도록 구성될 수 있다. 일부 경우에, 플로우



유셀 내에서 유동하는 시스 유체 부피 대 유체 샘플 부피의 비는 100:1 내지 200:1의 범위일 수 있다.

[0137] 일부 경우에, 플로우셀은 약 50:1의 최소 압축비 및 약 125:1의 최대 압축비를 가질 수 있다. 일부 경우에, 최소 압축비는 약 30:1 또는 20:1일 수 있다. 이러한 압축비는 도 4a-1과 도 4a-2를 비교할 때의 유동 스트림 두께들의 비  $H(S):H(S)$ 를 지칭한다. 이러한 압축비는 기하학적 압축(예를 들어, 도 4a-1과 도 4a-2를 비교할 때의 시스 유체 두께들의 비  $H(P):H(P)$ , 이는 또한 도 4a에 도시된, 플로우셀이 협소화되는 테이퍼진 전이 구역(419a)의 치수들에 대체로 상응할 수 있음)과 유체역학적 압축(예를 들어, 이는 또한 속도의 차이에 상응함)의 조합에 의해 영향을 받을 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 기하학적 압축비는 약 40:1이다.

[0138] 전이 구역에 상응하는 유로 크기의 감소부는, 근위 두께 또는 높이를 갖는 근위 유로 부분, 및 근위 두께 또는 높이보다 더 작은 원위 두께 또는 높이를 갖는 원위 유로 부분에 의해 한정될 수 있다. 예를 들어, 도 4b의 부분도에 도시된 바와 같이, 유로의 전이 구역(419b)은 근위 부분(415b)과 원위 부분(416b) 사이에 길이 L을 가질 수 있으며, 여기서 근위 부분(415b)은 근위 높이(417b)를 갖고, 원위 부분(416b)은 원위 높이(418b)를 갖는다. 본 명세서의 어딘가 다른 곳에서 기재된 바와 같이 전이 구역의 형상 또는 윤곽은 곡선형이거나 매끄러울 수 있으며, 예를 들어 S-곡선 또는 탄젠트 곡선의 형상으로 제공될 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 근위 높이(417b)는 약 6000  $\mu\text{m}$ 의 값을 갖는다. 일부 경우에, 근위 높이(417b)는 약 3000  $\mu\text{m}$  내지 약 8000  $\mu\text{m}$  범위의 값을 갖는다. 일부 실시 형태에 따르면, 원위 높이(418b)는 약 150  $\mu\text{m}$ 의 값을 갖는다. 일부 경우에, 원위 높이(418b)는 약 50  $\mu\text{m}$  내지 약 400  $\mu\text{m}$  범위의 값을 갖는다.

[0139] 전이 구역(419a)의 기하학적 형태는 제1 유로 경계(403b)와 이등분 횡방향 평면(451b) 사이에 제1 각도  $\alpha_1$ 을, 그리고 제2 유로 경계(404b)와 이등분 횡방향 평면(451b) 사이에 제2 각도  $\alpha_2$ 를 제공할 수 있다. 일부 경우에, 각도  $\alpha_1$ 은 약 45도이고, 각도  $\alpha_2$ 는 약 45도이다. 일부 경우에, 각도  $\alpha_1$ 은 약 10도 내지 약 60도 범위의 값을 갖는다. 일부 경우에, 각도  $\alpha_2$ 는 약 10도 내지 약 60도 범위의 값을 갖는다. 일부 실시 형태에 따르면, 각도  $\alpha_1$  및  $\alpha_2$ 는 동일한 값을 갖는다. 각도  $\alpha_1$  및  $\alpha_2$ 는, 샘플 유체가 근위 부분(415b)으로부터 원위 부분(416b)으로 이동함에 따라, 샘플 유체의 층류를 유지하거나 이의 난류(turbulence)를 최소화하도록 선택될 수 있으며, 이는 다시, 횡방향 평면(451b)을 따라 샘플 내에서의 입자들의 정렬을 향상시킬 수 있다. 도 4a를 참고하여 상기에 기재된 바와 같이, 전이 구역의 원위 및 근위 경계 또는 부분은 각진 대신에 곡선형이거나 매끄러울 수 있다.

[0140] 도 4k에 도시된 바와 같이, 플로우셀(420k)의 이미지 캡처 영역(432k)을 통해 유동하는 샘플 스트림 리본(R)은 약 2  $\mu\text{m}$ 의 두께 T를 가질 수 있다. 일부 경우에, 샘플 스트림 리본의 두께 T는 최대 약 3  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 전형적으로, 샘플 스트림 두께보다 더 작은 세포들 또는 입자들이 리본 내에 함유될 것이다. 예시적인 적혈구(RBC)는 양요 원판(biconcave disk)으로서 존재할 수 있으며, 약 6.2  $\mu\text{m}$  내지 약 8.2  $\mu\text{m}$ 의 직경 D를 가질 수 있다. 또한, 예시적인 적혈구는 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 2.5  $\mu\text{m}$ 의 최대 두께 T1 및 약 0.8  $\mu\text{m}$  내지 약 1  $\mu\text{m}$ 의 최소 두께 T2를 가질 수 있다. 일부 경우에, 적혈구는 최대 약 3  $\mu\text{m}$ 의 두께를 가질 수 있다. 예시적인 인간 혈소판은 크기가 다양할 수 있으며, 또한 약 2  $\mu\text{m}$ 의 두께 또는 직경을 가질 수 있다. 여기에 축적대로 도시되어 있지는 않지만, 플로우셀은 이미지 캡처 영역에서 약 150  $\mu\text{m}$ 의 값을 갖는 유로 두께 H를 한정할 수 있다. 일부 경우에, 유로 두께 F는 50  $\mu\text{m}$  내지 400  $\mu\text{m}$ 의 값을 갖는다. 이러한 유로 두께 F는 또한 도 4b에 도시된 원위 부분(461b)의 원위 높이(418b)에 상응할 수 있다.

[0141] 도 4k에 도시된 바와 같이, 샘플 유체 스트림의 두께 T 대 입자(적혈구)의 두께의 비는 약 1:1이다. 일부 실시 형태에 따르면, 이미지 캡처 영역에서의 샘플 유체 스트림의 두께 T 대 입자들 중 하나의 크기의 비는 0.25 내지 25의 범위이다. 일부 경우에, 두께 T는 0.5  $\mu\text{m}$  내지 5  $\mu\text{m}$  범위의 값을 가질 수 있다. 시스 유체와 샘플 유체 사이의 점도 차이는 플로우셀 내에서의 리본 샘플 스트림의 원하는 위치설정을 달성하도록 선택될 수 있다.

[0142] 본 명세서의 어딘가 다른 곳에서뿐만 아니라 공개류 중인 미국 특허 출원 제 \_\_\_\_\_호에 논의된 바와 같이, 샘플 리본(R)의 유체와 시스 유체 사이의 점도 차이는, 유동 방향을 따라 샘플 스트림 내의 입자들, 예를 들어 적혈구를 정렬 또는 배향시키도록 작동할 수 있다. 그렇게 정렬될 때, 도 4k에 도시된 바와 같이, 이미징 디바이스 또는 카메라는, 혈구의 주 표면이 카메라를 향해 대면하고 있기 때문에, 적혈구가 등갈게 보이도록 적혈구의 이미지를 얻을 수 있다. 이러한 방식으로, 적혈구는 유동에 대한 낮은 저항을 제공하는 정렬을 나타낸다. 따라서, 시스 유체 및 샘플 유체의 상대 점도 특성은 카메라를 향해 대면하는 적혈구의 높은 백분율 또는 수에 기여하며, 이에 따라 입자 분석 시스템의 평가 능력을 향상시킬 수 있다.

[0143] 일부 실시 형태에 따르면, 시스 유체의 점도 특성은 혈액 유체 샘플 내에서의 입자 오정렬을 제한하도록 작동한

다. 예를 들어, 점도 차이는 혈액 유체 샘플 내에서의 적혈구 이미징 배향 오정렬을 약 10% 미만으로 제한하는데 효과적일 수 있다. 즉, 샘플 중의 100개의 적혈구 중 90개 이상의 적혈구가 그들의 주 표면들이 이미징 디바이스를 향해 대면하도록 정렬될 수 있다. 대칭 협소화 전이 구역은 20%의 값을 제공할 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 시스 유체는 물의 굴절률(즉,  $n=1.3330$ )과 유사한 굴절률을 갖는다. 일부 경우에, 시스 유체는 약 89%의 물 함량을 갖는다. 점도 차이의 결과로서 관찰된 정렬 효과에 더하여, 양측방향(bilateral) 테이퍼진 전이 구역의 결과로서 정렬 효과가 또한 관찰된다. 일부 경우에, 양측방향(즉, 대칭) 테이퍼진 전이 구역이, 비대칭 테이퍼진 전이 구역 설계와 비교하여, 입자들을 정렬하는 데 2배 더 효과적인 것으로 관찰된다.

[0144]

적혈구의 효율적인 정렬은 개선된 진단에 기여할 수 있다. 일부 경우에, 이미징된 적혈구의 형상은, 샘플이 얻어진 환자가 특정 생리학적 질환 또는 질병을 갖는지를 결정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 겸상 적혈구 질병을 갖는 환자에게는 비정상 형상(즉, 낫의 형상임)을 갖는 혈구가 나타난다. 따라서, 정렬된 적혈구의 고품질 이미지를 얻음으로써, 정확한 진단을 보장할 수 있다. 적혈구의 다른 형상 변형, 예를 들어 얇은 주연 영역 및 크고 편평한 중심 영역을 가짐으로써 자전거 타이어의 외형을 갖는 것으로 보이는 적혈구가 본 발명의 정렬 기술을 사용하여 효과적으로 이미징될 수 있다. 유사하게, 작은 중심 부분 및 두꺼운 주연 영역을 가져서 트럭 타이어의 외형을 갖는 것으로 보이는 적혈구가 진단 목적으로 이미징될 수 있다. 본 명세서에 개시된 개선된 이미징 기술은 또한 다른 적혈구 특성, 예컨대 헤모글로빈 함량, 철 함량 등을 평가하는 데 유용하다.

[0145]

어떠한 특정 이론에 의해서도 구애됨이 없이, 시스 유체의 점도와 샘플 유체의 점도 사이의 점도 차이가, 변경된 포물선 프로파일을 생성하는 것으로 여겨지는데, 여기서 이러한 프로파일은 대체로 포물선이고, 가속이 증가되는 곳인 유동의 중심 영역에 상응하는 중심 범프(central bump)를 가지며, 이러한 중심 범프는 샘플 입자들 또는 입자내 세포소기관들의 정렬에 기여한다. 일부 실시 형태에 따르면, 시스와 샘플 리본 사이의 속도 차이 및 점도 차이는 전단력을 발생시켜서 세포소기관들 또는 세포내 입자들의 정렬을 증가시킨다. 시스 유체 포물선 프로파일의 예시적인 양상들이 공개류 중인 미국 특허 출원 제\_\_\_\_\_호에 논의되어 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0146]

백혈구는 전형적으로 적혈구 및 혈소판보다 더 크다. 예를 들어, 예시적인 호중구 및 호산구는 약 10  $\mu\text{m}$  내지 약 12  $\mu\text{m}$ 의 직경을 가질 수 있다. 예시적인 호염기구는 약 12  $\mu\text{m}$  내지 약 15  $\mu\text{m}$ 의 직경을 가질 수 있다. 예시적인 (소)림프구는 약 7  $\mu\text{m}$  내지 약 8  $\mu\text{m}$ 의 직경을 가질 수 있고, 예시적인 (대)림프구는 약 12  $\mu\text{m}$  내지 약 15  $\mu\text{m}$ 의 직경을 가질 수 있다. 예시적인 단핵구는 약 12  $\mu\text{m}$  내지 약 20  $\mu\text{m}$ 의 직경을 가질 수 있다. 시스 유체 및 유체 샘플 리본이 플로우셀을 통과함에 따라 이들 사이에서의 상호작용을 포함하는 입자 분석 시스템의 구성은, 도 41에 나타난 바와 같이, 백혈구가 이미지 캡처 영역(4321)을 통해 이동함에 따라 백혈구를 압축시키도록 작동할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 백혈구(WBC)의 중심 부분은 샘플 유체 리본(R) 내에 위치될 수 있고, 백혈구의 주연 부분은 시스 유체 내에 위치될 수 있다. 따라서, 백혈구가 리본에 의해 플로우셀을 통해 수송됨에 따라, 백혈구의 측부들은 시스 유체 내로 연장될 수 있다.

[0147]

일부 실시 형태에 따르면, 시스 유체와 샘플 유체 사이의 점도 차이는 백혈구와 같은 세포들 내에 존재하는 세포소기관들 또는 다른 세포내 특징부들을 정렬시키도록 작동할 수 있다. 어떠한 특정 이론에 의해서도 구애됨이 없이, 시스 유체와 샘플 유체 사이의 점도 차이와 관련된 전단력이, 세포내 특징부들을 정렬시키도록 백혈구 상에 작용할 수 있는 것으로 여겨진다. 일부 경우에, 시스 유체와 샘플 유체 사이의 속도 차이와 관련된 전단력이 그러한 정렬에 기여할 수 있다. 이러한 정렬 효과는 마찬가지로 입자들과 샘플 유체 리본 사이의 크기 차이에 의해서도 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 입자들의 부분들이 샘플 유체 리본으로부터 주위의 시스 유체 내로 연장되는 경우, 점도 차이와 관련된 전단력은 세포내 특징부 정렬에 대해 현저한 효과를 가질 수 있다.

[0148]

도 41에 도시된 바와 같이, 백혈구와 같은 세포의 부분들이 시스 유체 내로 연장될 수 있다. 본 발명의 실시 형태들은, 세포가 시스 유체에 노출될 때, 세포를 용해시키지 않거나 찢지 않거나, 또는 달리 외부 세포막의 완전성을 손상시키지 않는 시스 유체 조성물을 포함한다. 시스 유체 내의 점도제는, 세포막 또는 세포벽이 샘플 유체 리본과 시스 유체 봉입물 사이의 계면을 횡단하거나 또는 달리 샘플 유체 스트림으로부터 유동하는 시스 유체 내로 연장될 때, 샘플 유체 스트림 내의 세포들의 생존능력을 유지하여 세포들의 구조(예를 들어, 형상) 및 내용물(예를 들어, 핵)을 온전하게 하도록 작동할 수 있다.

[0149]

종종, 세포들 또는 입자들이 플로우셀을 따라 샘플 유체 리본 내에서 유동함에 따라 이들 상에 작용하는 압축력이 있다. 따라서, 협소화 전이 구역의 결과로서 세포들이 압축된 상태에 있거나 달리 압축력을 받는 동안에, 세포들은 시스 유체와 접촉될 수 있다. 시스 유체의 점도제는, 압축된 세포들이 박형 샘플 유체 리본으로부터 방출되고 점성 시스 유체에 노출되게 될 때, 적어도 그러한 세포들이 이미지 캡처 영역에 도달할 때까지, 찢어



지거나 파괴되는 것으로부터 그러한 세포들을 보호하도록 작동할 수 있다. 따라서, 시스 유체의 점도제 조성물은 세포 보호제로서 작동하면서, 또한 입자들 또는 입자내 내용물의 정렬을 향상시킬 수 있다.

[0150]

도 4k 및 도 4l을 참고하면, 일부 경우에, 세포 또는 입자의 부분들이 박형 샘플 유체 리본(R)으로부터 주위의 시스 유체 내로 연장될 수 있다. 공개류 중인 미국 특허 출원 제\_\_\_\_호에 논의된 바와 같이, 시스 유체는 시스 유체가 세포들 또는 입자들을 붕괴 또는 용해시키는 것을 억제 또는 방지하는 세포 보호제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 시스 유체는, 세포들이 시스 유체의 화학적 환경에 노출됨에 따라, 세포벽의 구조적 완전성을 보존하는 세포 보호제를 함유할 수 있다. 유사하게, 세포 보호제는 또한, 세포들이 플로우셀 기하학적 형태에 의해 유도된 어떠한 전단력이라도 겪고, 샘플 유체와 시스 유체 사이의 속도 및/또는 점도 차이를 겪음에 따라, 세포벽의 구조적 완전성을 보존하도록 작동할 수 있다. 이와 관련하여, 보호제는 샘플 유체와 시스 유체 사이의 속도 차이로부터 기인되는 힘으로부터 세포들 또는 입자들을 보호할 수 있다. 이러한 방식으로, 세포들은 그들이 이미지 캡처 영역에 도달함에 따라 그들의 생존능력을 유지할 수 있다.

[0151]

전단력은 샘플 유체 리본과 시스 유체 봉입물 사이의 계면에서 상당할 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 플로우셀 유로 내에서의 유동은 포물선 유동 프로파일에 의해 특징지어질 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 크기가 충분히 큰 입자들은, 그러한 입자들이 완전히 단일 유체 상(fluid phase) 내에(즉, 시스 유체 봉입물 내에, 또는 대안적으로 샘플 유체 리본 내에) 함유되어 있는 경우에도, 어느 정도의 전단력을 받을 것이다.

[0152]

일부 경우에, 시스 유체의 속도는 샘플 유체의 속도와 상이할 수 있다. 예를 들어, 시스 유체는 80 mm/sec로 이동 중일 수 있고, 샘플 유체는 60 mm/sec로 이동 중일 수 있다. 따라서, 일부 경우에, 샘플 유체는 주위 봉입물의 시스 유체 속도보다 더 느린 샘플 유체 속도로 캐논리 원위 포트를 빠져나간다. 따라서, 시스 유체는 캐논리의 유로를 따라 샘플 유체를 드래깅(dragging)하도록 작동할 수 있으며, 이에 따라 샘플 유체를 가속시키고 샘플 유체 리본의 두께를 감소시킬 수 있다. 샘플 유체 리본은 전체 부피 및 질량을 유지하여, 그것이 더 빨리 이동함에 따라 더 박형이 된다. 일부 실시 형태에 따르면, 시스 유체 및 샘플 유체 둘 모두는 이미지 캡처 영역에서 약 20 내지 200 mm/sec의 속도를 갖는다.

[0153]

전형적으로, 샘플 유체가 캐논리 출구로부터 이미지 캡처 영역으로 이동함에 따라 샘플 유체의 속도는 증가된다. 일부 경우에, 이미지 캡처 영역에서의 샘플 유체의 속도는, 샘플 유체가 캐논리 원위 부분에서 캐논리 포트를 빠져나갈 때의 샘플 유체의 속도의 40배이다. 일부 실시 형태에 따르면, 샘플 리본의 단면적의 감소는 속도의 증가에 대해 선형이다. 일부 실시 형태에 따르면, 캐논리 출구에서의 시스 속도가 샘플 리본 속도보다 더 높다면, 이는 또한 이미징 영역에서의 최종 샘플 리본 속도를 증가시킬 것이다.

[0154]

시스 유체는 샘플 유체 리본 상에, 그리고 샘플 유체 리본 내의 입자들 상에 상당한 전단력을 인가하도록 작동할 수 있다. 일부 힘은 유동 방향에 평행하고, 입자들은 또한 유동 방향에 직각인 힘에 접할 수 있다. 종종, 시스 유체 및 샘플 유체가 이미지 캡처 영역 또는 구역에 접근함에 따라, 시스 및 샘플 유체는 동일한 속도로 또는 거의 동일한 속도로 이동하고 있다. 따라서, 시스 유체 및 샘플 유체가 이미지 캡처 영역을 지나감에 따라, 이들 사이의 경계 또는 계면은, 캐논리 원위 출구에서의 또는 테이퍼진 전이 구역에서의 경계 또는 계면과 비교하여, 더 낮은 전단력을 제공할 수 있다. 예를 들어, 테이퍼진 전이 구역에서, 시스 유체 봉입물과 샘플 유체 리본 사이의 경계 또는 계면은, 초기에 더 느리고 더 두꺼운 샘플 리본이 더 빠르고 더 얇아지도록 그리고 샘플 유체 내의 입자들이 더 많이 정렬되게 되도록 전이 상태에 있을 수 있다. 바꿔 말하면, 전단력은 테이퍼진 전이 구역에서 현저할 수 있으며, 이미지 캡처 영역으로 향하면서 소산될 수 있다. 이미지 캡처 영역에서의 전단력은 포물선 프로파일로 나타날 수 있으며, 테이퍼진 전이 구역에서의 전단력보다 훨씬 더 낮을 수 있다. 따라서, 세포들 또는 입자들은, 이들이 전이 구역을 통과함에 따라 더 높은 전단력을 겪을 수 있고, 이들이 이미지 캡처 영역을 통과함에 따라 더 낮은 전단력을 겪을 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 시스 유체와 샘플 유체 사이의 점도 차이는 적혈구를 정렬되게 하고, 그럼으로써 포커싱되게 할 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 시스 유체와 샘플 유체 사이의 점도 차이는 백혈구 세포소기관을 정렬되게 하고, 그럼으로써 포커싱되게 할 수 있다. 이와 관련하여, 스트림의 기하학적 협소화 및 시스 유체와 샘플 유체 사이의 속도 차이로부터 기인된, 정렬되고 포커싱되게 한 세포 및 세포소기관 성분들에 대해 증강된 이미징 결과가 얻어질 수 있다.

[0155]

본 명세서의 어딘가 다른 곳에 기재된 바와 같이, 그리고 도 4k 및 도 4l을 참고하여, 시스 유체 및 샘플 유체(R)가 플로우셀의 유로 크기의 감소부 또는 전이 구역을 통해 이미징 영역(432k 또는 432l)을 향해 유동함에 따라, 시스 유체 점도와 샘플 유체 점도 사이의 점도 차이와 관련된 시스 유체와 샘플 유체(R) 사이의 상호작용에 의해 유도된 점도 하이드로포커싱 효과가, 유로 크기의 감소부 또는 전이 구역과 관련된 시스 유체와 샘플 유체(R) 사이의 상호작용에 의해 유도된 기하학적 하이드로포커싱 효과와 조합하여, 이미징 영역(432k 또는 432l)에

서 복수의 입자들 중 적어도 일부에 표적 이미징 상태를 제공한다.

[0156] 일부 경우에, 본 발명의 실시 형태들은 본 명세서에 기재된 바와 같은 혈액학 시스템과 함께 사용하기 위한 조성물, 예컨대 시스 유체 또는 입자 및 세포내 세포소기관 정렬 액체(PIOAL)를 포함한다. 그러한 시스 유체 또는 PIOAL은 조합된 점도 및 기하학적 하이드로포커싱 시각적 분석기에서 사용하기에 적합하다. PIOAL은 시각적 분석기의 협소화 플로우셀 전이 구역을 통한 주어진 점도의 혈액 샘플 유체의 유동을 지향시키거나 용이하게 하도록 작동할 수 있다. PIOAL은 샘플의 점도보다 더 높은 점도를 갖는 유체를 포함할 수 있다. 점도 차이와 관련된 PIOAL 유체와 샘플 유체 사이의 상호작용에 의해 유도된 점도 하이드로포커싱 효과는, 협소화 플로우셀 전이 구역과 관련된 PIOAL 유체와 샘플 유체 사이의 상호작용에 의해 유도된 기하학적 하이드로포커싱 효과와 조합하여, 혈액 샘플 유체 중의 세포들의 생존능력을 유지하면서 시각적 분석기의 이미징 영역에서 복수의 입자들 중 적어도 일부에 표적 이미징 상태를 제공하는 데 효과적일 수 있다.

[0157] 도 4m은 내부 세포소기관들, 예컨대 엽(410m)들을 갖는 예시적인 호중구(400m)(일 유형의 백혈구)를 도시한다. 샘플 유체와 시스 유체 사이의 점도 차이의 결과로서, 도 4n에 의해 나타낸 바와 같이, 내부 세포소기관들은 세포 내에 정렬될 수 있다. 따라서, 세포내 세포소기관들은, 이러한 세포소기관들이 서로 중첩되지 않고서, 이미지 캡처 디바이스(430m)를 사용하여 효과적으로 이미징될 수 있다. 즉, 도 4m에 도시된 바와 같이, 엽들이 서로 적층되는 대신에, 이미지 캡처 디바이스의 이미징 또는 광학 축으로부터 관찰했을 때, 도 4n에 도시된 바와 같이 엽들은 정렬되고 나란히 배치되어 있다. 따라서, 엽들은 캡처된 이미지에서 더 효과적으로 시각화될 수 있다. 내부 세포소기관 정렬은 샘플 유체와 시스 유체 사이의 점도 차이의 의외의 예기치 않은 결과이다. 따라서, 점도 차이, 유체역학적 유동, 및 기하학적 압축 특징들을 사용하여, 세포 정렬 및 인-포커스에 상응하는 증강된 이미징 결과가 달성된다.

[0158] 본 명세서의 어딘가 다른 곳에 기재된 바와 같이, 그리고 도 4m 및 도 4n을 참고하여, 시스 유체 및 샘플 유체(R)가 플로우셀의 유로 크기의 감소부 또는 전이 구역을 통해 이미지 캡처 디바이스(430m 또는 430n)의 이미징 영역을 향해 유동함에 따라, 시스 유체 점도와 샘플 유체 점도 사이의 점도 차이와 관련된 시스 유체와 샘플 유체(R) 사이의 상호작용에 의해 유도된 점도 하이드로포커싱 효과가, 유로 크기의 감소부 또는 전이 구역과 관련된 시스 유체와 샘플 유체(R) 사이의 상호작용에 의해 유도된 기하학적 하이드로포커싱 효과와 조합하여, 이미징 영역에서 복수의 입자들 중 적어도 일부에 표적 이미징 상태를 제공한다. 일부 실시 형태에 따르면, 표적 이미징 상태는 이미징 상태들의 분포에 상응할 수 있다.

[0159] 일부 경우에, 표적 이미징 상태는 이미징 영역에서의 초점 평면에 대한 표적 입자내 구조 배향(예를 들어, 정렬 및/또는 위치)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 4n에 도시된 바와 같이, 내부 구조(410m)들(예를 들어, 세포내 구조, 세포소기관, 엽 등)은 초점 평면(F)에 대해 배향될 수 있다. 일부 경우에, 표적 정렬은 이미징 영역에서의 초점 평면(F)에 대한 표적 입자내 구조 정렬을 포함하는데, 이는 도 4k-3에 도시된 입자 정렬 관계와 유사하다. 일부 경우에, 표적 위치는 이미징 영역에서의 초점 평면에 대한 표적 입자내 구조 위치를 포함하는데, 이는 도 4k-1에 도시된 입자 위치 관계와 유사하다. 일부 경우에, 입자내 구조의 표적 배향은 초점 평면에 대한 표적 정렬 및 또한 초점 평면에 대한 표적 위치 둘 모두를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 표적 이미징 상태는 이미징 영역에서의 표적 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 4n에 도시된 바와 같이, 입자(400m)는 도 4m에 도시된 입자 형상과 비교하여 압축된 형상을 갖는다. 따라서, 플로우셀의 작동은 입자 형상에 대한 측방향 압축 효과를 생성할 수 있음을 알 수 있다. 이와 관련하여, 입자내 특징부들은, 입자 그 자체가 형상에 있어서 압축됨에 따라, 위치적으로 또는 방향적으로 배향될(예를 들어, 초점 평면(F) 및/또는 리본 유동 평면에 대해 정렬될) 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 시스 유체와 샘플 유체 사이의 속도 차이는 유동 스트림 내에서 마찰을 생성할 수 있고, 시스 유체와 샘플 유체 사이의 점도 차이는 유체역학적 마찰을 증폭시킬 수 있다.

[0160] 다양한 혈액학 또는 혈액 입자 분석 기술들 중 어느 것도 플로우셀을 통해 유동하는 샘플 유체의 이미지를 사용하여 수행될 수 있다. 종종, 이미지 분석은 소정의 세포 또는 입자 파라미터들을 결정하는 것, 또는 소정의 세포 또는 입자 특징부들을 측정, 검출, 또는 평가하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이미지 분석은 세포 또는 입자 크기, 세포 핵 특징부, 세포 세포질 특징부, 세포내 세포소기관 특징부 등을 평가하는 것을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 분석 기술은, 백혈구(WBC) 감별을 포함하여, 소정의 카운팅 또는 분류 방법 또는 진단 검사를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 플로우셀을 사용하여 얻어진 이미지는 5종 WBC 감별 검사를 지원할 수 있다. 일부 경우에, 플로우셀을 사용하여 얻어진 이미지는 9종 WBC 감별 검사를 지원할 수 있다. 이와 관련하여, 도 4를 참고하면, 프로세서(440)는 컴퓨터 애플리케이션을 갖는 저장 매체를 포함하거나 또는 그와 작동식으로 관련될 수 있는데, 컴퓨터 애플리케이션은, 프로세서에 의해 실행될 때, 시스템(400)으로 하여금 이미지 캡처 디바이스로부터 얻어진 이미지에 기반하여 상이한 유형들의 세포들을 감별하게 하도록 구성된다. 유사하

게, 도 6b를 참고하면, 프로세서(604b)는 컴퓨터 애플리케이션을 갖는 저장 매체를 포함하거나 또는 그와 작동식으로 관련될 수 있는데, 컴퓨터 애플리케이션은, 프로세서에 의해 실행될 때, 시스템(600b) 또는 시스템(642b)으로 하여금 이미지 캡처 디바이스로부터 얻어진 이미지에 기반하여 상이한 유형들의 세포들을 감별하게 하도록 구성된다. 예를 들어, 다양한 세포들(예를 들어, 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구, 후골수세포, 골수세포, 전골수세포, 및 아세포)을 감별하기 위해 진단 또는 검사 기술이 사용될 수 있다.

[0161]

도 4o는 PIOAL을 사용하여 얻어진 이미지 대 비 PIOAL 시스 유체를 사용하여 얻어진 이미지의 비교를 보여준다. PIOAL의 사용은 더 많은 인-포커스 세포 내용물, 예컨대 엽, 세포질, 및/또는 과립을 생성하였다. 이 실시예에서는, 점도제(약 30% 글리세롤)를 포함하는 PIOAL을 사용하여 샘플을 처리하였다. pH를 약 6.8 내지 7.2의 pH로 조정하였으며, 샘플 혼합물을 (0.9% 염화나트륨)에 의해 등장성으로 만들었다. 여기서 보여주는 결과는 세포들 및 세포내 세포소기관들을 정렬하기 위해 이미지 분석기 상에서 사용되는 예시적인 PIOAL의 효능을 입증한다.

[0162]

도 4p 및 도 4q는 표준 시스 유체를 사용하여 얻어진 이미지(도 p의 상측 및 하측 패널) 대 예시적인 PIOAL 유체를 사용하여 얻어진 이미지(도 4q의 상측 및 하측 패널)의 비교를 보여준다. 여기서 보여주는 바와 같이, PIOAL의 사용은 개선된 RBC 정렬을 가져왔다. (도 1에 도시된 바와 같은 예시적인 표적(44) 상에서) 기기 포커싱 프로토콜을 사용하여 샘플을 분석하였으며, 시각적 분석기에 의해 표적을 포커싱되게 하였다. 이어서, 포커싱 시스템을 변위 거리(52)만큼 오프셋하였으며, 그 결과 리본형 샘플 스트림 내의 입자들이 인-포커스 상태가 되었다. 혈액 샘플을 샘플 희석제를 사용하여 사전에 희석시켰다. 샘플은 캐놀러를 통해 플로우셀의 유로를 따라 유동하였으며, 그림으로써 PIOAL 또는 표준 시스(대조군에서)의 2개의 층들 사이에 있는 리본형 샘플 스트림(예를 들어, 2 마이크로미터 두께)을 생성하였다. 이어서, 시각적 분석기는 분석에 사용될 리본형 샘플 스트림 내의 입자들의 포커싱된 이미지를 (예를 들어, 초당 약 60 프레임으로) 생성한다. 혈액 샘플은 대상체로부터 얻고 혈액 분석기에 의한 분석을 위해 처리한다. 표준 시스 유체 또는 PIOAL을 사용하여 샘플을 처리하고 있는 동안에 플로우셀 내의 RBC의 이미지를 캡처링한다. 상대 백분율은 이미징 데이터(예를 들어, 4p 및 4q)에 기초한 정렬된 RBC의 수에 있어서 상당한 개선을 입증한다. 이러한 결과는 PIOAL이, 본 명세서에 기술된 바와 같이 포커싱 기기/프로토콜을 사용하여 리본형 샘플 스트림으로 유동 중인 동안에, RBC 정렬의 백분율을 증가시키는 데 효능적임을 입증하였다.

[0163]

또한, PIOAL의 구현은 대칭 및 비대칭 플로우셀 내에서의 증가하는 수준의 글리세롤(gly)의 사용에 기초하여 개선된 정렬을 가져오는 것으로 관찰되었다.

[0164]

이러한 결과들은 소정의 PIOAL 조성물이 이미지-기반 입자/세포 분석을 수행하는 데 사용될 때, 세포들을 정렬시키고 세포내 구조들을 위치재설정하는 예기치 않은 특성을 갖는다는 의외의 예기치 않은 발견에 대한 증거를 제공한다.

[0165]

## 동적 범위 확대

[0166]

도 5는 본 발명의 실시 형태들에 따른, 혈액 샘플에서의 입자 분석을 위한 동적 또는 검출 범위 확대를 달성하기 위한 시스템 및 방법의 추가 태양들을 보여주는 블록 다이어그램이다. 여기에 도시된 바와 같이, 적어도 하나의 디지털 프로세서(18)는 모터 드라이브(54)를 작동시키도록, 그리고 표적 오토포커스 패턴(44)에 대하여 상이한 포커스 위치들에서 수집된 바와 같은 광센서 어레이로부터의 디지털화 이미지를 분석하도록 커플링된다. 프로세서(18)는 오토포커스 패턴(44)의 포커스 위치를 결정하도록, 즉 표적 오토포커스 패턴(44) 상에 오토포커싱하고, 이에 따라 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)와 오토포커스 패턴(44) 사이의 최적 거리를 확립하도록 구성된다. 이는, 알고리즘을 적용하여 제1 거리에 있는 이미지 내의 조명 수준을 평가하는 단계와 같은 이미지 처리 단계들에 의해 수행될 수 있으며, 이러한 단계는 전체 이미지에 또는 적어도 오토포커스 패턴(44)의 에지에서 적용될 수 있다. 프로세서는 모터(54)를 다른 위치로 이동시키고 그 위치 또는 에지에서 조명을 평가하고, 2회 이상의 반복 후에 오토포커스 패턴(44) 상에의 포커스의 정확도를 최대화하는(또는 그 위치로 이동되는 경우 포커스의 정확도를 최적화하게 할) 최적 거리를 결정한다. 프로세서는 오토포커스 표적 오토포커스 패턴(44)과 리본형 샘플 스트림 사이의 고정된 간격에 의지하며, 이어서 프로세서(18)는 모터(54)를 제어하여 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)를 올바른 거리로 이동시켜 리본형 샘플 스트림(32) 상에 포커싱한다. 보다 상세하게는, 프로세서는 모터를 작동시켜서, 광학 고분해능 이미징 디바이스와 리본형 샘플 스트림(32) 사이의 거리를, 리본형 샘플 스트림이 표적 오토포커스 패턴(44)으로부터 변위되는 변위 거리(52)(도 1 참조)만큼 변위시킨다. 이러한 방식으로, 광학 고분해능 이미징 디바이스가 리본형 샘플 스트림 상에 포커싱된다.

[0167]

일부 실시 형태에 따르면, 시각적 분석기(17)가 도 1의 예시적인 분석기(17)이다. 시각적 분석기(17)는 적어도

하나의 플로우셀(22) 및 적어도 하나의 이미징 디바이스(24), 예컨대 디지털 카메라와 같은 이미징 센서를 갖는 광학 고분해능 이미징 디바이스를 포함할 수 있다. 시각적 분석기(17)는 또한 샘플 주입기(29)를 포함할 수 있다. 샘플 주입기(29)는 샘플(12)을 적어도 하나의 플로우셀(22) 내로 제공하도록 구성된다. 플로우셀(22)은 내부 PIAL 유로를 한정하는데, 이러한 유로는, 예를 들어 유동 방향으로 대칭적으로 협소화된다. 플로우셀(22)은 샘플의 유동(32)을 플로우셀(22) 내의 관찰 구역을 통해 지향시키도록 구성된다.

[0168]

도 5는 기재된 바와 같은 디지털 이미징의 오토포커스 및 다른 태양을 예시한다. 그러한 기술은 이미징을 기반으로 하지 않거나 아마도 기재된 실시 형태들보다는 이미지와 덜 관련된 혈구 장치, 예컨대 컬터(Coulter) 혈구 카운터- 유세포분석기(flow cytometer)로도 알려짐 - 와 함께 사용될 수 있다. 그러한 카운터는 유체 중의 혈구들 및 입자들을 검출 및 카운팅하기 위한 것으로 알려져 있지만, 이는 통상 이미징에 의해 행해지지 않는다. 그러한 유형의 카운터에서는, 유체 내에 봉입된 입자들의 유동을 운반하도록 플로우셀이 배열된다. 플로우셀은 협소화되어서 강제로 유로 내의 입자들을 일렬 종대로 되게 한다. 유로에 걸쳐 있는 한 쌍의 전극 또는 다른 검출기들이, 전기 임피던스의 펄스형 변화의 검출에 의해, 또는 세포들이 지나갈 때 광원과 광검출기 사이의 광로의 차단에 의해 카운트를 생성한다.

[0169]

유세포분석기가 유리한데, 그 이유는 시각적 카운터에서 실제로 이미징될 수 있는 세포들의 수보다 훨씬 더 많이 다수의 세포들 또는 다른 입자들이 카운팅될 수 있기 때문이다. 그러나, 유세포분석기는 유형에 의해 세포들 사이를 구분하는 데, 또는 정상 세포와 비정상 세포 사이의 구분을 가능하게 하는 데, 또는 개별 혈구들로부터 혈소판 응괴와 같은 그룹화된 세포들을 구분하는 데 효과적이지 않다. 기재된 바와 같이, 분석기, 예를 들어 시각적 분석기를 작동시키으로써, 리본형 샘플 스트림의 통계학적으로 유의한 이미지 프레임 수를 통해, 혈구 유형들의 분포 또는 비례적인 비가 측정될 수 있다. 시각적 분석기로부터 결정된 비례적인 비, 또는 이의 함수는 혈구 카운트, 및 유세포분석기에 의해 카운팅된 더 많은 수의 혈구들에 적용되어서, 비록 세포 유형에 대한 구별이 더 적게 이루어지거나 전혀 이루어지지 않더라도, 두 유형의 분석기 모두의 특유의 이점들을 활용한, 정확한 총 혈구 카운트를 제공한다.

[0170]

일부 실시 형태에 따르면, 입자 카운트는 알고리즘, 예를 들어 입자 카운트의 비례적인 비에 기초한 알고리즘을 적용함으로써 추론될 수 있다. 도 5는 혈액 분석에 적합하게 된 예시적인 장치를 예시한다. 일부 실시 형태에서, 입자 카운터(15)와 시각적 분석기(17)는 병렬이 아닌 직렬로 연결될 수 있다. 입자 카운터(15)는, 예를 들어 컬터 혈구 카운터일 수 있는데, 이는 유체 중의 혈구들 및 입자들을 검출 및 카운팅한다. 그러한 유형의 카운터에서는, 유체 내에 봉입된 입자들의 유동을 운반하도록 유로(도시되지 않음)가 배열된다. 유로는 협소화되어서 강제로 유로 내의 입자들을 일렬 종대로 되게 한다. 유로에 걸쳐 있는 한 쌍의 전극 또는 다른 검출기들이, 전기 임피던스의 펄스형 변화의 검출에 의해, 또는 세포들이 지나갈 때 광원과 광검출기 사이의 광로의 차단에 의해 카운트를 생성한다. 입자 카운터(15)는 다수의 세포들 또는 다른 입자들을 카운팅하도록 구성된다. 그러나, 입자 카운터(15)는 세포들의 하위범주들 내의 구성원들 사이를 구분하지 못할 것이고, 그리고/또는 정상 세포와 비정상 세포 사이를 구분하지 못할 것이거나, 또는 개별 혈구들로부터 혈소판 응괴와 같은 그룹화된 세포들을 구분하지 못할 것이다.

[0171]

시각적 분석기(17)는 또한 입자 범주화 및/또는 하위범주화를 위한 시각적 구분을 생성하기에 효과적인 희석제, 투과화제, 조영제 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 화학물질을 제공하도록 구성된 적어도 하나의 접촉 챔버(contacting chamber)(25)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 1 및 도 5를 참고하여 도시된 바와 같이, 접촉된 샘플은 샘플 주입기(29)를 통해 플로우셀 내로 도입되고, 시스 시약 또는 세포내 세포소기관 정렬 시약이 주입기(27)로부터 도입된다. 샘플을 적합한 농도로 희석시키기 위해 희석제가 사용될 수 있다. 입자들의 범주화 및/또는 하위범주화를 위한 시각적 구분을 생성하기 위해 조영제 및/또는 투과화제가 사용된다. 소정 유형의 세포들 또는 세포 구조들을 더 우수한 이미징을 위한 방향으로 정렬하기 위해 PIAL이 사용된다. 일부 실시 형태에서, 적어도 하나의 화학물질은 먼저 샘플과 접촉하도록 적용될 수 있으며, 이어서 처리된 샘플은 시각적 분석기(17) 상에 제공된다. 적어도 하나의 화학물질을 적어도 첨가하는 것에 의한 샘플의 처리는 실온에서 수행될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 그러한 처리는 10, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 37, 38, 38, 39, 40, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50℃와 같은 온도에서 수행될 수 있다. 선택된 온도에서의 처리는 인큐베이터 내에서 수행될 수 있는데, 인큐베이터는 시각적 분석기(17)로부터 분리되어 있거나, 또는 온도 제어되는 시각적 분석기(17) 상에 있다.

[0172]

일부 실시 형태에서, 시각적 분석기는 샘플을 조영제 및/또는 투과화제 또는 계면활성제와 접촉되게 하기 위한 조영제 주입기를 가질 수 있다. 다른 실시 형태에서, 샘플은 시각적 분석기 내로 주입하기 전에 조영제, 투과화제와 접촉될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 시각적 분석기는 제어된 시간 동안 제어된 온도에서 조영제 및/



또는 투과화제와 접촉되는 동안에 샘플을 가열하기 위한 가열 요소를 포함한다. 시각적 분석기는 또한 가열 단계 후에 샘플 혼합물을 냉각시키기 위한 냉각 요소를 가질 수 있다. 혈액 유체 샘플을 처리하는 데 사용될 수 있는 예시적인 조영제 조성물 및 방법이 공개류 중인 미국 특허 출원 제\_\_\_\_\_호에 개시되어 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0173] 기재된 바와 같이 시각적 분석기(17)를 작동시킴으로써, 리본형 샘플 스트립의 통계학적으로 유의한 이미지 프레임 수를 통해, 세포 범주 및/또는 하위범주 내의 세포들의 비례적인 비가 프로세서(18)에 의해 결정될 수 있다. 시각적 분석기(17)로부터 결정된 비례적인 비는 혈구 카운트, 및 입자 카운터(15)에 의해 카운팅된 더 많은 수의 혈구들에 적용되어서, 비록 세포 범주 및/또는 하위범주 내의 구성원들에 대한 구별이 더 적게 이루어지거나 전혀 이루어지지 않더라도, 입자 카운터(15) 및 시각적 분석기(17) 둘 모두의 특유의 이점들을 활용한, 정확한 총 혈구 카운트를 제공한다.

[0174] 정확한 결과를 제공하는 것에 더하여, 입자 카운터(15) 및 시각적 분석기(17)를 포함하는 장치는 분석 속도를 개선하는 데 있어서 상당한 이점을 제공한다. 도 5에서, 상이한 혈구들의 정확한 카운팅 결과가 디스플레이(63)를 통해 출력될 수 있다. 분석 과정 동안, 작업자는 단말기(65)를 통해 프로세서(18)와 상호작용할 수 있다. 이전에는, 조영제를 사용하여 슬라이드를 만들고 이를 작업자에 의해 현미경 하에서 검사함으로써 결과의 최대 약 25% 내지 30%를 수동으로 재검토하였다. 비교에서, 본 발명의 장치를 사용하는 예시적인 방법은, 일부 실시 형태에 따라, 입자 카운터 상에서의 CBC, 및 혈구들의 범주화 및/또는 하위범주화를 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 이미지가 시각적 분석기 상에서 재검토될 수 있으며, 샘플은 더 적은 빈도의 수동 재검토를 필요로 할 것이다.

[0175] 모터(54)는 광학 고분해능 이미징 디바이스 또는 디지털 이미지 캡처 디바이스에 의해 이미징되는 구분되는 특징부들, 특히 혈구의 양상들보다 다소 더 작은 정밀도를 갖는 기어드 스텝핑 모터(g geared stepping motor)를 포함할 수 있다. 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)의 위치가, 광학 대물 렌즈의 위치를 리본형 샘플 스트립의 폭 내에 두도록 조정되면, 리본형 샘플 스트립 내의 세포/입자의 관찰은 인-포커스 상태에 있다. 오토포커스 패턴은 광학 고분해능 이미징 디바이스 또는 디지털 이미지 캡처 디바이스의 시야의 에지에 위치될 수 있으며, 그러한 이유로 관찰을 방해하지 않는다.

[0176] 더욱이, 광학 고분해능 이미징 디바이스가 변위 거리에 걸쳐 이동되고 오토포커스 패턴이 포커스를 벗어나게 될 때, 인-포커스인 것으로 보이는 특징부들은 오토포커스 패턴에 대향된 것과 같은 혈구들이다. 일부 실시 형태에 따르면, 오토포커스 패턴은 시야 내에 있는 형상들에 의해 한정될 수 있다. 이러한 형상들은 제한된 크기의 비교적 얇은 개별 형태들이며, 이에 따라 변위 거리만큼 이동한 후에, 리본형 샘플 스트립 상에 포커싱될 때, 형태들은 디지털화 이미지에서 사실상 비가시적이게 된다. 전형적인 변위 거리는, 혈액(혈구) 이미징 적용을 위한 치수를 갖는 플로우셀에서, 예를 들어 50 내지 100  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 오토포커스 특징부는 최적 포커스 거리의 1  $\mu\text{m}$  이내에 광학 고분해능 이미징 디바이스를 유지한다.

[0177] 플로우셀 내부 윤곽 및 PIOAL과 샘플의 유량은, 샘플이 리본형 스트립으로 형성되도록 조정될 수 있다. 이러한 스트립은 대략적으로, 리본형 샘플 스트립 내에 봉입되는 입자들만큼 박형이거나 또는 심지어 이들보다 더 박형일 수 있다. 백혈구는, 예를 들어 직경이 약 10  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 두께가 10  $\mu\text{m}$  미만인 리본형 샘플 스트립을 제공함으로써, 리본형 샘플 스트립이 시스 유체 또는 PIOAL에 의해 연신될 때 세포들이 배향될 수 있다. 의외로 리본형 샘플 스트립과 상이한 점도의, 예컨대 더 높은 점도의 PIOAL 층들 내의 협소화 유로를 따라 리본형 샘플 스트립을 연신하는 것은, 유리하게는 유동 방향과 사실상 평행한 평면 내에 비구형 입자들을 정렬시키고 세포들 상에 힘을 인가하여 세포들의 세포내 구조의 인-포커스 내용물을 개선하는 경향이 있다. 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)의 광학 축은 리본형 샘플 스트립의 평면에 사실상 수직(직각)이다. 이미징 지점에서의 리본형 샘플 스트립의 선속도는, 예를 들어 20 내지 200 mm/sec일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 리본형 샘플 스트립의 선속도는, 예를 들어 50 내지 150 mm/sec일 수 있다.

[0178] 리본형 샘플 스트립 두께는 샘플 유체 및 PIOAL의 상대 점도 및 유량에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 정밀 변위 펌프를 포함하는 샘플의 공급원(25) 및/또는 PIOAL의 공급원(27)은 리본형 샘플 스트립(32)의 치수를 최적화하기에 제어가능한 유량으로, 즉 적어도 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)의 시야만큼 넓은 박형 리본으로서 샘플 및/또는 PIOAL을 제공하도록 구성될 수 있다.

[0179] 일 실시 형태에서, PIOAL 공급원(27)은 사전결정된 점도의 PIOAL을 제공하도록 구성된다. 그러한 점도는 샘플의 점도와 상이할 수 있으며, 샘플의 점도보다 더 높을 수 있다. PIOAL의 점도 및 밀도, 샘플 재료의 점도, PIOAL의 유량 및 샘플 재료의 유량을 조정하여, 오토포커스 패턴으로부터의 변위 거리에서, 그리고 사전결정된

치수 특성으로, 예컨대 유리한 리본형 샘플 스트립 두께로 리본형 샘플 스트립을 유지한다.

- [0180] 실용적인 실시 형태에서, PIOAL은 샘플보다 더 높은 선속도 및 샘플보다 더 높은 점도를 가지며, 그림으로써 샘플을 편평한 리본으로 연신시킨다. PIOAL의 점도는 최대 10 센티푸아즈일 수 있다.
- [0181] 도 5에 도시된 실시 형태에서는, 광센서 어레이로부터 얻어진 픽셀 디지털 이미지를 분석하는 데 사용되는 동일한 디지털 프로세서(18)가 또한 오토포커싱 모터(54)를 제어하는 데 사용된다. 그러나, 광학 고분해능 이미징 디바이스(24)는 캡처링되는 이미지마다 오토포커싱되지는 않는다. 오토포커싱 과정은 주기적으로, 또는 예를 들어 온도 또는 다른 과정 변화가 적절한 센서에 의해 검출될 때, 또는 이미지 분석이 재포커싱에 대한 잠재적 필요성을 검출할 때 수행될 수 있다. 또한, 다른 실시 형태에서는, 혈액학 이미지 분석이 하나의 프로세서에 의해 수행되게 하는 것 그리고 선택적으로 자신의 광센서 어레이와 관련된 별개의 프로세서가 고정된 표적(44)에 대한 오토포커싱 단계들을 취급하도록 배열되게 하는 것이 가능하다.
- [0182] 도 5에서, 적어도 하나의 상기 디지털 프로세서(18)는 프로그래밍된 시간에 또는 프로그래밍된 조건에서 또는 사용자 요구시에 오토포커싱하도록 구성되고, 또한 입자들의 이미지-기반 범주화 및 하위범주화를 수행하도록 구성된다. 예시적인 입자들에는 세포, 백혈구, 적혈구 등이 포함된다.
- [0183] 일 실시 형태에서, 적어도 하나의 상기 디지털 프로세서(18)는 오토포커싱 재개시 신호를 검출하도록 구성된다. 오토포커싱 재개시 신호는 검출된 온도 변화, 픽셀 이미지 데이터의 파라미터들에 의해 인식된 바와 같은 포커스 품질의 감소, 시간 경과, 또는 사용자 입력에 의해 촉발될 수 있다. 유리하게, 재교정하기 위해 변위 거리(52)를 측정한다는 의미에서 재교정하는 것이 필요하지 않다. 선택적으로, 오토포커싱은 품질 제어를 위한 실시들 사이의 소정의 빈도수/간격으로 재교정되도록 그리고/또는 포커스를 유지하도록 프로그래밍될 수 있다.
- [0184] 변위 거리(52)는 플로우셀마다 약간 변하지만, 주어진 플로우셀에 대해서는 일정하게 유지된다. 플로우셀과 함께 이미지 분석기를 구비할 때 셋업 과정으로서, 변위 거리를 먼저 평가하고, 이어서 오토포커싱 및 이미징 양상들이 발휘되는 교정 단계 동안에, 플로우셀에 대한 정확한 변위 거리가 결정되고 프로세서(18)의 프로그래밍 내로 상수로 입력된다.
- [0185] 도 6을 참고하면, 입자들을 함유하는 샘플(12)을 분석하기 위한 예시적인 장치(10)는, 일부 실시 형태에 따라, 적어도 하나의 검출 범위를 갖는 입자 카운터(15), 분석기(17), 및 프로세서(18)를 포함한다. 도 6의 블록 다이어그램은 예시 목적을 위한 것이다. 입자 카운터(15), 분석기(17), 및 프로세서(18)는 서로 연결될 수 있거나 연결되지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 프로세서는 분석기 및/또는 입자 카운터에 커플링될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 프로세서는 분석기 및/또는 입자 카운터의 구성요소일 수 있다.
- [0186] 입자 카운터(15)는 적어도 하나의 채널을 포함하고, 입자들의 적어도 하나의 범주 및/또는 하위범주에 대한 입자 카운트를 제공하도록 구성된다. 일부 실시 형태에서는, 입자 카운터(15)가 입자들의 상이한 범주들 및/또는 하위범주들을 위한 적어도 2개의 채널을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 입자들은 샘플의 전기 임피던스 또는 광 산란을 감지함을 통해 카운팅된다. 적합한 입자 카운터(15)의 일 예에는 유세포분석기가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 상이한 물리적 특성들에 응답하는 복수의 채널들 각각에서 동시에 또는 순차적으로 검출이 일어날 수 있다.
- [0187] 분석기(17)는 입자들의 상이한 범주들 및/또는 하위범주들 및 그들의 각각의 범주 및/또는 하위범주의 상응하는 구성원들을 감별하도록 구성된다. 적합한 분석기(17)의 예에는 시각적 분석기, 디지털 카메라, 또는 픽셀 데이터를 캡처링할 수 있으며, 픽셀 파일에서 나타나는 속성들을 구별하도록 프로그래밍되는 임의의 다른 픽셀 데이터 분석기가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 프로세서(18) 및 분석기(17)는, 알고리즘, 예컨대 입자들의 2개의 범주 또는 2개의 상응하는 하위범주의 카운트들의 비례적인 비를 결정하는 알고리즘을 적용하도록, 그리고 그러한 비례적인 비를 입자 카운터(15)의 적어도 하나의 채널에서 얻어진 입자들의 적어도 하나의 범주 및/또는 하위범주의 입자 카운트에 적용하도록 구성된다. 데이터 분석 후, 프로세서(18)는, 출력(20)에서, 샘플(12) 중의 입자들의 각각의 범주 및 각각의 상응하는 하위범주의 농도의 정확한 측정을 제공한다.
- [0188] 일부 실시 형태에서는, 샘플(12) 중에, 적어도 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 밖의 농도로 존재할 수 있으며, 반면 적어도 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내의 농도로 존재한다. 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 농도가 입자 카운터(15) 상에서 결정된다. 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주 대 제2 범주 및/또는 하위범주의 비례적인 비가 분석기(17) 상에서 결정된다. 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 농도에 그러한 비례적인 비를 적어도 부분적으로 적용시킴으로써, 프로세서(18) 상에서, 제1 범주 및/또는



하위범주 내의 입자들의 농도가 계산된다.

[0189] 일부 실시 형태에서, 입자 카운터(15)의 적어도 하나의 채널 내에서 검출되는 입자들의 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 적어도 2개의 부류를 포함할 수 있다. 그리고 입자들의 각각의 부류는 복수의 하위부류들을 포함할 수 있다. 입자 카운터(15)는, 예를 들어 사전결정된 크기 범위에 기초하여, 하나 이상의 선택 기준을 충족시키는 복수의 입자들을 검출하도록, 그리고 그들의 입자 카운트를 제공하도록 구성된다. 선택 기준은 입자들의 적어도 2개의 부류의 구성원들을 포함한다. 분석기(17) 및 프로세서(18)는 입자들의 적어도 2개의 범주 및/또는 하위범주의 구성원들을 구분하도록 프로그래밍된다. 적어도 2개의 범주 및/또는 하위범주에 걸친 각각의 구성원의 분포가 프로세서(18) 상에서 결정된다. 프로세서(18)는 그러한 분포를 사용하여, 입자 카운터(15) 상에서 얻어진 적어도 2개의 범주 및/또는 하위범주 중 적어도 하나의 구성원들에 대한 입자 카운트를 정정한다.

[0190] 보다 구체적으로는, 장치(10)는 RBC, WBC, PLT, 및 다른 혈구를 포함한 상이한 혈구들, 태아 세포, 또는 세균성 세포, 바이러스성 입자, 기생충, 기생충 낭포를 포함한 낭포, 결정(crystal), 또는 이들의 단편 또는 샘플 중의 다른 세포 단편을 식별 및 정량화하는 데 사용될 수 있다.

[0191] 도 6a는 본 발명의 실시 형태들에 따른 예시적인 카운터 또는 카운팅 모듈(600a)의 태양들을 도시한다. 그러한 카운터는 WBC, RBC 및 PLT 세포 카운팅 및 헤모글로빈 측정을 위한 다양한 기계적 기능뿐만 아니라 전자적 및 광도 측정 기능도 제어 또는 수행하도록 작동될 수 있다. 예시적인 카운터는 CBC 분석을 위한 샘플을 준비하는데, 그리고 개구 베스 조립체(aperture bath assembly)(예를 들어, WBC 베스(610a) 및 RBC 베스(620a))를 통해 CBC 파라미터 측정치를 생성하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 도 6의 카운터(15)는 도 6a의 카운터(600a)로 나타낼 수 있다. 유사하게, 일부 실시 형태에 따르면, 도 5의 카운터(15)는 도 6a의 카운터(600a)로 나타낼 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 도 7의 카운터(722)는 도 6a의 카운터(600a)로 나타낼 수 있다.

[0192] 혈액의 세포 요소들(예를 들어, 적혈구, 백혈구, 및 혈소판)이 전기 임피던스 방법을 사용하여 카운팅될 수 있다. 예를 들어, 흡인된 전혈 샘플이 2개의 분취물로 나뉘 수 있고 등장성 회석제와 혼합될 수 있다. 제1 회석물은 RBC 개구 베스(620a)에 전달될 수 있고, 제2 회석물은 WBC 개구 베스(610a)에 전달될 수 있다. RBC 챔버에서는, RBC 및 혈소판 둘 모두는 세포들이 감지 개구를 통과함에 따라 전기 임피던스에 의해 카운팅 및 구별될 수 있다. 예를 들어, 2 내지 20 fL의 입자들은 혈소판으로 카운팅될 수 있고, 36 fL 초과 입자들은 RBC로 카운팅될 수 있다. WBC 챔버 처리의 경우, RBC-용해 시약이 WBC 회석 분취물에 첨가되어 RBC를 용해시키고 헤모글로빈을 유리시킬 수 있으며, 이어서 WBC가 WBC 베스의 감지 개구들에서 임피던스에 의해 카운팅될 수 있다. 일부 경우에, 베스들은 다수의 개구들을 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 혈구 계수 기술에 사용되는 혈구 카운트가 RBC 삼중 개구 베스를 사용하여 얻어질 수 있다.

[0193] 예시적인 CBC 샘플 준비 기술은 2개의 과정, 즉 샘플 획득 및 샘플 전달을 포함할 수 있다. 샘플 획득은, 165  $\mu$ L의 환자 샘플이 흡인되고 혈액 샘플링 밸브(Blood Sampling Valve, BSV)에 보내질 때 일어날 수 있다. BSV는 2개의 삼중-개구 베스에 전달하기 위해 처리 시약들과 함께 특정 부피의 환자 샘플을 보내도록 작동할 수 있다. 환자 샘플 및 처리 시약들은, 동글게 설계되어, 샘플 및 시약들이 기포를 혼합시키지 않고서 완전히 혼합될 수 있게 하는 경사진 개구 베스들의 하부로 전달될 수 있다. 이어서, 샘플은 측정 및 분석을 위해 준비될 수 있다. 일부 실시 형태들에 따르면, WBC 베스에서는, 6.0 mL( $\pm$ 1.0%)의 회석제와 28  $\mu$ L의 샘플이, 1:251의 최종 회석률을 위해, 1.08 mL( $\pm$ 1.0%)의 DxH 세포 용해제와 배합될 수 있다. 일부 실시 형태들에 따르면, RBC 베스에서는, 10 mL( $\pm$ 1.0%)의 회석제와 1.6  $\mu$ L의 샘플이 1:6250의 최종 회석률을 위해 배합될 수 있다. 환자 샘플 및 시약들이 혼합된 후, 진공 및 개구 전류가 세포 카운트 및 세포 부피의 측정을 위해 개구들에 인가될 수 있다. RBC 및 PLT 카운트는 또한 개구 부근에서의 세포들의 재순환을 방지하기 위해 스위프 유동(sweep flow)의 적용을 포함할 수 있다. 소정 실시 형태에서, RBC 및 PLT에 대한 데이터 획득은 최대 20초일 수 있고, WBC의 경우 최대 10초일 수 있다. 소정 실시 형태에서, 개구 조립체들에 의해 생성되는 모든 아날로그 펄스들은 전치 증폭 카드(preamp card)에 의해 증폭되고, 이어서 아날로그-디지털 변환 및 파라미터 추출을 위한 CBC 신호 컨디셔너 분석기에 보내질 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 각각의 세포 사건(cellular event)에 대한 다수의 파라미터들을 측정하기 위해 시스템이 사용될 수 있고, 시간, 부피(진폭 및 펄스 폭을 포함한 펄스 속성들), 카운트 및 카운트율(count rate), 및 대기 시간과 같은 디지털 측정치를 제공하기 위해 디지털 파라미터 추출 과정이 사용될 수 있다. 그러한 측정치는 펄스 편집, 동시 정정, 카운트 보팅(count voting), WBC, RBC 및 PLT에 대한 히스토그램의 생성, 히스토그램 보팅, 패턴 분석, 및 간섭 정정 등에 사용될 수 있다.

[0194] 도 6b는 예시적인 모듈 시스템의 간략화한 블록 다이어그램으로, 이는 모듈 시스템(600b)을 위한 개별 시스템

요소들이 어떻게 분리된 방식 또는 더 통합된 방식으로 구현될 수 있는지를 대략적으로 예시한다. 모듈 시스템(600b)은, 본 발명의 실시 형태들에 따른, 혈액 샘플 유체 중의 입자들을 이미징하기 위한 입자 분석 시스템의 일부이거나 또는 그와 접속될 수 있다. 모듈 시스템(600b)은, 본 명세서의 어딘가 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 동적 범위 확대 기술에 관한 데이터 또는 명령어를 생성하고/하거나, 동적 범위 확대 기술에 관한 입력을 받아들이고/이거나 동적 범위 확대 기술에 관한 정보 또는 데이터를 처리하는 데 잘 적합하게 되어 있다. 일부 경우에, 모듈 시스템(600b)은, 버스 서브시스템(602b)을 통해 전기적으로 결합되는 하드웨어 요소들을 포함하는데, 이러한 요소들에는 하나 이상의 프로세서들(604b), 사용자 인터페이스 입력 디바이스들과 같은 하나 이상의 입력 디바이스들(606b), 및/또는 사용자 인터페이스 출력 디바이스들과 같은 하나 이상의 출력 디바이스들(608b)이 포함된다. 일부 경우에, 시스템(600b)은 네트워크 인터페이스(610b), 및/또는 분석기/카운터 시스템(642b)으로부터 신호들을 수신할 수 있고/있거나 그에 신호들을 송신할 수 있는 분석기/카운터 시스템 인터페이스(640b)를 포함한다. 일부 경우에, 분석기/카운터 시스템(642b)은 도 6에 도시된 바와 같은 분석기(17) 및/또는 입자 카운터(15)를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 시스템(600b)은 소프트웨어 요소들을 포함하는데, 예를 들어 여기에서는, 본 명세서에 개시된 기술들의 하나 이상의 태양들을 구현하도록 구성된 프로그램과 같은, 메모리(614b)의 작업 메모리(612b), 운영 체제(616b), 및/또는 기타 코드(618b) 내에 현재 위치되어 있는 것으로 도시되어 있다.

[0195]

일부 실시 형태에서, 모듈 시스템(600b)은 본 명세서에 개시된 다양한 기술들의 기능을 제공하는 기본 프로그래밍 및 데이터 구성들을 저장할 수 있는 저장 서브시스템(620b)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법 태양들의 기능을 구현하는 소프트웨어 모듈들이 저장 서브시스템(620b)에 저장될 수 있다. 이들 소프트웨어 모듈들은 하나 이상의 프로세서들(604b)에 의해 실행될 수 있다. 분산형 환경에서, 소프트웨어 모듈들은 복수의 컴퓨터 시스템들 상에 저장될 수 있고, 복수의 컴퓨터 시스템들의 프로세서들에 의해 실행될 수 있다. 저장 서브시스템(620b)은 메모리 서브시스템(622b) 및 파일 저장 서브시스템(628b)을 포함할 수 있다. 메모리 서브시스템(622b)은, 프로그램 실행 동안 명령어들 및 데이터의 저장을 위한 메인 랜덤 액세스 메모리(RAM)(626b), 및 고정 명령어들이 저장되는 판독 전용 메모리(ROM)(624b)를 포함한 다수의 메모리들을 포함할 수 있다. 파일 저장 서브시스템(628b)은 프로그램 및 데이터 파일들을 위한 지속적(비휘발성) 저장소를 제공할 수 있고, 선택적으로 샘플, 환자, 치료, 평가, 또는 기타 데이터를 구현할 수 있는 유형적 저장 매체들을 포함할 수 있다. 파일 저장 서브시스템(628b)에는 하드 디스크 드라이브, 관련된 탈착식 매체들과 함께 있는 플로피 디스크 드라이브, 콤팩트 디지털 판독 전용 메모리(CD-ROM) 드라이브, 광학 드라이브, DVD, CD-R, CD RW, 솔리드-스테이트 탈착식 메모리, 기타 탈착식 매체 카트리지를 또는 디스크들 등이 포함될 수 있다. 드라이브들 중 하나 이상은 모듈 시스템(600b)에 연결된 다른 장소에 있는 다른 접속된 컴퓨터들 상의 원격 위치들에 위치될 수 있다. 일부 경우에, 시스템들은, 하나 이상의 프로세서들에 의해 실행될 때, 하나 이상의 프로세서들로 하여금 본 명세서에 개시된 기술 또는 방법의 임의의 태양을 수행하게 할 수 있는 명령어들의 하나 이상의 시퀀스들을 저장하는 컴퓨터-판독가능 저장 매체 또는 다른 유형적 저장 매체를 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 기술들의 기능을 구현하는 하나 이상의 모듈들이 파일 저장 서브시스템(628b)에 의해 저장될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 소프트웨어 또는 코드는 모듈 시스템(600b)이 통신 네트워크(630b)와 통신할 수 있게 하는 프로토콜을 제공할 것이다. 선택적으로, 그러한 통신에는 다이얼-업(dial-up) 또는 인터넷 접속 통신이 포함될 수 있다.

[0196]

시스템(600b)이 본 발명의 방법의 다양한 태양들을 수행하도록 구성될 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 프로세서 컴포넌트 또는 모듈(604b)은 센서 입력 디바이스 또는 모듈(632b)로부터, 사용자 인터페이스 입력 디바이스 또는 모듈(606b)로부터, 그리고/또는 분석기/카운터 시스템(642b)으로부터, 선택적으로 분석기/카운터 시스템 인터페이스(640b) 및/또는 네트워크 인터페이스(610b)와 통신 네트워크(630b)를 통해, 신호 또는 데이터를 수신하도록 구성된 마이크로프로세서 제어 모듈일 수 있다. 일부 경우에, 센서 입력 디바이스(들)는 혈액 유체 샘플의 이미지들을 얻도록 구비된 입자 분석 시스템을 포함할 수 있거나 또는 그의 일부일 수 있다. 일부 경우에, 사용자 인터페이스 입력 디바이스(들)(606b) 및/또는 네트워크 인터페이스(610b)는 이미지 파라미터들을 얻도록 구비된 입자 분석 시스템에 의해 생성된 이미지 파라미터 신호들을 수신하도록 구성될 수 있다. 일부 경우에, 분석기/카운터 시스템(642b)은 혈액 유체 샘플에 관한 이미지 파라미터들 및/또는 카운팅 파라미터들을 얻도록 구비된 입자 분석 시스템을 포함할 수 있거나 또는 그의 일부일 수 있다.

[0197]

프로세서 컴포넌트 또는 모듈(604b)은 또한, 본 명세서에 개시된 기술들 중 임의의 것에 따라 선택적으로 처리되는, 입자 분석 파라미터 신호들 또는 이미지 파라미터 신호들을 센서 출력 디바이스 또는 모듈(636b)에, 사용자 인터페이스 출력 디바이스 또는 모듈(608b)에, 네트워크 인터페이스 디바이스 또는 모듈(610b)에, 분석기/카운터 시스템 인터페이스(640b)에, 또는 이들의 임의의 조합으로 송신하도록 구성될 수 있다. 본 발명의 실시

형태들에 따른 디바이스들 또는 모듈들 각각은 프로세서에 의해 처리되는 컴퓨터 판독가능 매체 상의 하나 이상의 소프트웨어 모듈들, 또는 하드웨어 모듈들, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 윈도우(Windows), 매킨토시(MacIntosh), 및 유닉스(Unix)와 같이 보편적으로 사용되는 다양한 플랫폼들 중 임의의 것이, 보편적으로 사용되는 다양한 프로그래밍 언어들 중 임의의 것과 함께, 본 발명의 실시 형태들을 구현하는 데 사용될 수 있다.

[0198] 사용자 인터페이스 입력 디바이스들(606b)에는, 예를 들어 터치패드, 키보드, 포인팅 디바이스, 예컨대 마우스, 트랙볼, 그래픽 태블릿, 스캐너, 조이스틱, 디스플레이 내에 포함된 터치 스크린, 오디오 입력 디바이스들, 예컨대 음성 인식 시스템들, 마이크로폰들, 및 기타 유형의 입력 디바이스들이 포함될 수 있다. 사용자 입력 디바이스들(606b)은 또한 유형적 저장 매체들로부터 또는 통신 네트워크(630b)로부터 컴퓨터 실행가능 코드를 다운로드할 수 있으며, 이러한 코드는 본 명세서에 개시된 방법 또는 그의 태양들 중 임의의 것을 구현한다. 단말기 소프트웨어가 때때로 업데이트될 수 있고 적절한 경우에 단말기에 다운로드될 수 있음이 이해될 것이다. 일반적으로, "입력 디바이스"라는 용어의 사용은 정보를 모듈 시스템(600b)에 입력하기 위한 다양한 종래의 전용 디바이스들 및 방식들을 포함하는 것으로 의도된다.

[0199] 사용자 인터페이스 출력 디바이스들(606b)에는, 예를 들어 디스플레이 서브시스템, 프린터, 팩시밀리, 또는 오디오 출력 디바이스들과 같은 비시각적 디스플레이들이 포함될 수 있다. 디스플레이 서브시스템은 음극선관(CRT), 액정 디스플레이(LCD)와 같은 평판 디바이스, 프로젝션 디바이스 등일 수 있다. 디스플레이 서브시스템은 또한 비시각적 디스플레이를 제공할 수 있으며, 예컨대 오디오 출력 디바이스들을 통해 제공할 수 있다. 일반적으로, "출력 디바이스"라는 용어의 사용은 정보를 모듈 시스템(600b)으로부터 사용자에게 출력하기 위한 다양한 종래의 전용 디바이스들 및 방식들을 포함하는 것으로 의도된다.

[0200] 버스 서브시스템(602b)은 모듈 시스템(600b)의 다양한 컴포넌트들 및 서브시스템들이 의도에 따라 또는 요구에 따라 서로 통신하게 하기 위한 메커니즘을 제공한다. 모듈 시스템(600b)의 다양한 서브시스템들 및 컴포넌트들은 동일한 물리적 위치에 있어야 하는 것이 아니라, 분산형 네트워크 내의 다양한 위치들에 분포될 수 있다. 버스 서브시스템(602b)이 개략적으로 단일 버스로서 도시되어 있지만, 버스 서브시스템의 대안적인 실시 형태들은 다수의 버스들을 이용할 수 있다.

[0201] 네트워크 인터페이스(610b)는 외부 네트워크(630b) 또는 기타 디바이스들에 대한 인터페이스를 제공할 수 있다. 외부 통신 네트워크(630b)는 필요에 따라 또는 요구에 따라 제3자와의 통신을 실시하도록 구성될 수 있다. 이에 따라, 그것은 모듈 시스템(600b)으로부터 전자 패킷을 수신할 수 있고, 필요에 따라 또는 요구에 따라 임의의 정보를 모듈 시스템(600b)으로 다시 송신할 수 있다. 여기에 도시된 바와 같이, 통신 네트워크(630b) 및/또는 분석기/카운터 시스템 인터페이스(642b)는 혈액 유체 샘플에 상응하는 이미지들 또는 이미지 파라미터들 및/또는 카운팅 파라미터들을 얻도록 구비된 분석기/카운터 시스템(642b)으로 정보를 송신할 수 있거나 또는 그로부터 정보를 수신할 수 있다.

[0202] 시스템 내부에 그러한 인프라구조 통신 링크들을 제공하는 것 외에도, 통신 네트워크 시스템(630b)은 또한 인터넷과 같은 다른 네트워크들에 대한 접속을 제공할 수 있고, 유선, 무선, 모뎀, 및/또는 기타 유형의 인터페이싱 접속을 포함할 수 있다.

[0203] 사실상의 변형들이 특정 조건들에 따라 사용될 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 맞춤형 하드웨어가 또한 사용될 수 있고/있거나 특정 요소들이 하드웨어, 소프트웨어(애플릿(applet)들과 같은 휴대용 소프트웨어를 포함함), 또는 둘 모두로 구현될 수 있다. 또한, 네트워크 입력/출력 디바이스들과 같은 다른 컴퓨팅 디바이스들에 대한 접속이 채용될 수 있다. 모듈 단말기 시스템(600b) 자체는 컴퓨터 단말기, 개인용 컴퓨터, 휴대용 컴퓨터, 워크스테이션, 네트워크 컴퓨터, 또는 임의의 다른 데이터 처리 시스템을 포함한 다양한 유형의 것일 수 있다. 컴퓨터들 및 네트워크들의 변화무쌍한 성격으로 인해, 도 6b에 도시된 모듈 시스템(600b)의 설명은 본 발명의 하나 이상의 실시 형태를 예시하려는 목적을 위한 구체적인 예인 것으로만 의도된다. 모듈 시스템(600b)의 많은 다른 구성들은 도 6b에 도시된 모듈 시스템보다 더 많거나 또는 더 적은 컴포넌트들을 갖는 것이 가능하다. 모듈 시스템(600b)의 모듈들 또는 컴포넌트들, 또는 그러한 모듈들 또는 컴포넌트들의 임의의 조합 중 임의의 것이, 본 명세서에 개시된 입자 분석 및/또는 이미징 시스템 실시 형태들 중 임의의 것과 결합될 수 있거나, 또는 그에 통합될 수 있거나, 또는 달리 그와 접속하도록 구성될 수 있다. 이와 관련하여, 상기에 논의된 하드웨어 및 소프트웨어 컴포넌트들 중 임의의 것이, 다른 위치들에서 사용되는 다른 의료 평가 또는 치료 시스템들과 통합될 수 있거나 또는 그와 인터페이싱하도록 구성될 수 있다.

[0204] 일부 실시 형태에서, 모듈 시스템(600b)은 입력 모듈에서 혈액 유체 샘플의 하나 이상의 이미지 파라미터들을

수신하도록 구성될 수 있다. 이미지 파라미터 데이터는 평가 모듈로 송신될 수 있는데, 여기서는 이미지 데이터의 분석에 기초하여 진단 결과 또는 다른 결과가 예측 또는 결정될 수 있다. 이미지 데이터 또는 진단 데이터는 출력 모듈을 통해 시스템 사용자에게 출력될 수 있다. 일부 경우에, 모듈 시스템(600b)은, 예를 들어 진단 모듈을 사용함으로써 혈액 유체 샘플에 대한 진단 결과를 결정할 수 있다. 진단 정보는 출력 모듈을 통해 시스템 사용자에게 출력될 수 있다. 선택적으로, 진단의 소정 양상들은 출력 디바이스에 의해 결정되고, 진단 시스템으로 또는 진단 시스템의 서브디바이스로 송신될 수 있다. 혈액 유체 샘플, 또는 샘플을 얻은 환자에 관한 다양한 데이터 중 임의의 것이 모듈 시스템에 입력될 수 있으며, 이러한 데이터에는 연령, 체중, 성별, 치료 이력, 병력 등이 포함된다. 그러한 데이터에 기초하여 치료 계획(treatment regimen) 또는 진단 평가의 파라미터들이 결정될 수 있다.

[0205]

이와 관련하여, 일부 경우에, 시스템은 입력으로서 이미지 데이터를 수신하도록 구성된 프로세서를 포함한다. 선택적으로, 프로세서, 저장 매체, 또는 둘 모두가 혈액학 기계 또는 입자 분석 기계 내에 포함될 수 있다. 일부 경우에, 혈액학 기계는 프로세서 내로의 입력을 위한 이미지 데이터 또는 기타 정보를 생성할 수 있다. 일부 경우에, 프로세서, 저장 매체, 또는 둘 모두가 컴퓨터 내에 통합될 수 있고, 컴퓨터는 혈액학 기계와 통신할 수 있다. 일부 경우에, 프로세서, 저장 매체, 또는 둘 모두가 컴퓨터 내에 포함될 수 있고, 컴퓨터는 네트워크를 통해 혈액학 기계와 원격 통신할 수 있다.

[0206]

도 7은 본 발명의 실시 형태들에 따른, 혈액 유체 샘플 중의 제1 세포 유형의 양을 측정하기 위한 시스템 및 방법의 태양들을 도시하는데, 여기서 샘플은 또한 제2 세포 유형을 포함한다. 여기서 보여주는 바와 같이, 방법(700)은 혈액 유체 샘플(710)로부터 샘플의 제1 부피(720) 및 샘플의 제2 부피(730)를 얻는 단계를 포함할 수 있다. 단계(724)에서 나타난 바와 같이, 방법은 혈액학 세포 카운터(722)를 통해 샘플의 제1 부피(720)를 유동 시킴으로써 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 종종, 세포 카운터(722)는, 샘플 중에 충분한 양의 전기적으로 구분가능한 세포 유형이 있을 때 세포들을 정확하게 카운팅하기에 적합하며, 세포 유형의 양이 소정 한계 또는 역치를 초과할 때는 그렇지 않다. 세포 카운터는 단시간 내에 혈액 샘플 중의 적혈구를 카운팅하거나 또는 다른 성분들(예를 들어, 대형 성분들)의 총 개수를 카운팅하는 데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 세포 카운터는 혈액 중의 백혈구와 다른 성분들(예를 들어, 대형 성분들) 사이를 구별할 때, 또는 몇몇 상이한 중들이 있을 수 있지만, 각각이 비교적 적은 수를 가질 때 어려움에 접할 수 있다.

[0207]

또한, 방법(700)은, 샘플의 제2 부피(730)를 플로우셀 내에서 유동하는 시스템 유체 내로 주입하여 두께 및 두께보다 더 큰 폭을 갖는 샘플 스트림을 제공하도록 함으로써, 단계(732)에 의해 나타난 바와 같이, 제1 개수의 제1 유형 세포들 및 제2 개수의 제2 세포 유형들의 이미지들을 획득하는 단계를 포함할 수 있으며, 획득된 이미지들은 샘플 스트림의 두께를 가로지르는 이미지 경로를 따라 획득된다. 일부 경우에, 이미지 획득(732)은 도 5 및/또는 도 6에 도시된 바와 같은 분석기(17)를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 경우에, 분석기는 혈액 유체 샘플 중의 백혈구, 거대 혈소판, 및 다른 대형 성분들 사이를 효율적으로 구별할 수 있다. 그러나, 그러한 분석기를 사용하여 샘플 중의 완전 입자 카운트를 얻는 데에는 어려움이 있을 수 있다. 또한, 일부 경우에, 소정 카운트(예를 들어, 모든 적혈구의 카운트)를 얻기 위해 이러한 분석기를 사용하는 것이 바람직하지 않을 수 있는데, 그 이유는 그러한 카운팅 절차가 또한, 카운트를 얻는 것에 더하여, 마찬가지로 입자들의 특성화를 수행하는 것을 포함할 수 있기 때문이다. 일부 실시 형태에 따르면, 분석기는 분석기를 통해 처리되는 샘플의 단지 일정 백분율 또는 일부분에 대한 이미지들을 얻기 위해 사용된다.

[0208]

도 7에 도시된 바와 같이, 방법(700)은, 단계(738)에 나타난 바와 같이, 획득된 이미지들을 사용하여 제1 세포 유형의 제1 개수(734) 대 제2 세포 유형의 제2 개수(736)의 비를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 또한, 단계(740)에 나타난 바와 같이, 비(738) 및 제2 세포 유형의 집단(724)을 사용하여 샘플 중의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치를 계산하는 단계를 포함한다.

[0209]

일부 실시 형태에 따르면, 단계(740)에서 계산된 세포량 측정기준치는 혈액 유체 샘플(710) 중의 제1 세포 유형에 대한 세포 농도이다. 일부 경우에, 단계(740)에서 계산된 세포량 측정기준치는 혈액 유체 샘플(710) 중의 제1 세포 유형에 대한 세포 카운트이다. 일부 경우에, 세포 카운터(722)는 제1 세포 유형의 카운팅과 관련된 제1 정확도 및 제2 세포 유형의 카운팅과 관련된 제2 정확도를 가지며, 여기서 제2 정확도는 제1 정확도보다 더 우수하거나 또는 더 높다. 일부 경우에, (예를 들어, 도 10a 및 도 10b 참조하면) 혈액학 세포 카운터(722)는 원하는 정확도 범위를 가지며, 원하는 정확도 범위는 제1 부피(720) 내의 세포들의 최소 집단과 제1 부피(720) 내의 세포들의 최대 집단 사이에서 확대되며, 여기서 단계(724)에서 결정된 부피 내의 제2 세포 유형의 집단은 원하는 정확도 범위 내에 있고, 단계(740)에서 계산된 샘플의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치는 원하는 정



확도 범위 밖에 있다.

- [0210] 도 7에 추가로 도시된 바와 같이, (그리고 도 10a 및 도 10b를 계속 참고하면) 방법은 혈액학 세포 카운터(72)를 통해 샘플의 제1 부피를 유동시킨 결과로서 제1 부피 내의 제1 세포 유형의 집단을 결정하는 단계(726)를 포함할 수 있다. 제1 부피 내의 결정된 제1 세포 유형 집단(726)은 제1 세포 유형에 대해 원하는 정확도 범위를 초과하거나 그 미만일 수 있으며, 또한 단계(740)에서 계산된 바와 같은 제1 세포 유형의 세포량 측정치와 상이할 수 있다. 일부 경우에, (예를 들어, 도 10a에서), 결정된 제1 세포 유형 집단(726)은 0이다. 일부 경우에, (예를 들어, 도 10b에서), 결정된 제1 세포 유형 집단(726)은 0 초과이다.
- [0211] 본 발명의 일부 실시 형태에 따르면, 혈액학 세포 카운터(722)는 세포 카운터를 통해 유동하는 제2 유형 세포에 응답하여 전기 임피던스의 변화를 검출하는 센서 메커니즘을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 혈액학 세포 카운터(722)는 세포 카운터를 통해 유동하는 제2 유형 세포에 응답하여 광로의 차단을 검출하는 센서 메커니즘을 포함한다.
- [0212] 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터(722)는, 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 농도 한계 및 최대 검출가능 농도 한계를 갖고, 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 농도 한계 및 최대 검출가능 농도 한계를 갖는다. 결정된 제2 세포 유형 집단(724)은 제2 세포 유형에 대해 검출된 농도 파라미터에 기초할 수 있는데, 이러한 농도 파라미터는 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만이다. 제1 세포 유형은 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 농도로 존재할 수 있다.
- [0213] 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터(722)는, 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 부피 한계 및 최대 검출가능 부피 한계를 갖고, 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 부피 한계 및 최대 검출가능 부피 한계를 갖는다. 결정된 제2 세포 유형 집단(724)은 제2 세포 유형에 대해 검출된 부피 파라미터에 기초할 수 있는데, 이러한 부피 파라미터는 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만이다. 제1 세포 유형은 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 부피 파라미터로 존재할 수 있다.
- [0214] 일부 경우에, 혈액학 세포 카운터(722)는, 제1 세포 유형에 대해 최소 검출가능 크기 한계 및 최대 검출가능 크기 한계를 갖고, 제2 세포 유형에 대해 최소 검출가능 크기 한계 및 최대 검출가능 부피 크기를 갖는다. 결정된 제2 세포 유형 집단(724)은 제2 세포 유형에 대해 검출된 크기 파라미터에 기초할 수 있으며, 이러한 크기 파라미터는 제2 세포 유형에 대해 최소 한계 초과이고 최대 한계 미만이다. 제1 세포 유형은 제1 세포 유형에 대해 최소 한계 미만이거나 최대 한계 초과인 크기 파라미터로 존재할 수 있다.
- [0215] 본 발명의 일부 실시 형태에 따르면, (도 13b, 도 13c를 참고하면), 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단의 결정(724)은 제1 세포 유형의 세포들과 제2 세포 유형의 세포들을 함께 그룹화하는 단계를 포함한다. 일부 경우에, 방법은 또한, 비 및 제2 세포 유형의 집단을 사용하여 샘플 중의 제2 세포 유형의 세포량 측정기준치를 계산하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에(예를 들어, 도 10d에 도시된 바와 같이), 샘플의 제1 부피 내의 제2 세포 유형의 집단의 결정(724)은 제1 세포 유형의 세포들과 제2 세포 유형의 세포들을 함께 그룹화하는 단계, 및 혈액학 세포 카운터(722)를 통해 샘플의 제1 부피를 유동시킨 결과로서 제1 부피 내의 제1 세포 유형의 집단을 결정하는 단계(726)를 포함한다. 단계(740)에서 계산되는 바와 같은 샘플 중의 제1 세포 유형의 세포량 측정기준치는 비(738), 제2 세포 유형의 집단(724), 및 제1 세포 유형의 집단(726)을 사용할 수 있다.
- [0216] 다른 태양들에서, 예를 들어 도 8 및/또는 도 10a 및 도 10b에 도시된 바와 같이, 입자들을 함유하는 샘플을 분석하기 위한 방법이 제공된다. 그러한 방법에서는, 도 8의 방법(70)에서의 단계(72)에서 나타난 바와 같이, 검출 한계들을 갖는 입자 카운터 상에 샘플이 제공된다. 적어도 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 밖의 농도로 샘플 중에 존재할 수 있으며, 적어도 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주가 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 단계(74)에서 나타난 바와 같이, 입자 카운터 상에서, 샘플 중의 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 농도가 결정된다. 단계(76)에서 나타난 바와 같이, 샘플을 또한 분석기 상에 제공하여, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주 대 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 비례적인 비를 결정한다. 이어서, 단계(78)에서 나타난 바와 같이, 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 농도에 그러한 비례적인 비를 적어도 부분적으로 적용시킴으로써, 제1 범주 및/또는 하위범주 내의 입자들의 농도가 계산될 수 있다. 도 10a는 검출 범위 미만으로 샘플 중에 존재하는 입자들의 검출을 보여주고, 도 10b는 검출 범위를 초과하여 샘플 중에 존재하는 입자들의 검출을 보여준다.
- [0217] 따라서, 도 8은, 일부 실시 형태에 따라, 입자들의 제1 범주의 농도를 결정하는 예시적인 방법(70)을 예시하는

데, 이때 입자들의 제1 범주는 입자 카운터 상에서의 검출 범위 밖의 농도로 샘플 중에 존재한다. 단계(72)에서는, 도 6 및 도 8을 또한 참고하면, 샘플(12)이 입자 카운터(15) 상에 제공되며, 이때 입자 카운터는 적어도 하나의 검출 범위를 갖는다. 샘플(12)은 입자들을 포함하는데, 이때 이들 입자는 유체 중에 분산될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 입자들의 제1 범주는 입자들의 제1 범주에 적용가능한 검출 범위의 상한을 초과하는 농도로 샘플 중에 존재한다. 입자들의 제2 범주는 입자들의 제2 범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 예를 들어, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는 WBC를 포함할 수 있다. 입자들의 제2 범주는 혈소판을 포함할 수 있다.

[0218] 일부 실시 형태에서, 입자들의 제1 범주는 입자들의 제1 범주에 적용가능한 검출가능한 범위의 하한 미만의 농도로 샘플 중에 존재한다. 입자들의 제2 범주는 입자들의 제2 범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 예를 들어, 입자들의 제1 범주는 혈소판을 포함한다. 입자들의 제2 범주는 백혈구를 포함한다.

[0219] 도 8의 단계(74)에서는, 샘플(12) 중의 입자들의 제2 범주의 농도가 입자 카운터(15) 상에서 결정된다. 입자 카운터는 적어도 하나의 채널을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 입자들의 제2 범주가 채널들 중 하나에서 측정된다. 일부 실시 형태에서, 입자 카운터는 적어도 2개의 채널을 포함할 수 있다. 입자들의 제1 범주는, 그 농도가 입자들의 제1 범주에 적용가능한 검출 범위 내에 있다면, 다른 채널 내에서 카운팅될 수 있다.

[0220] 도 8의 단계(76)에서는, 샘플(12)을 (예를 들어, 도 5 또는 도 6에 도시된 바와 같은) 시각적 분석기(17)와 같은 분석기 상에 제공하여, 입자들의 제1 범주 대 입자들의 제2 범주의 비례적인 비를 결정한다. 일부 실시 형태에서, 시각적 분석기(17)는 전술된 바와 같이 이미징 디바이스에 연결된 플로우셀(22)을 포함한다. 입자들의 제1 범주 대 입자들의 제2 범주의 비례적인 비는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 회석제, 투과화제, 및 조영제 중 적어도 하나를 포함한 적어도 하나의 화학물질이 샘플에 도입될 수 있다. 혈액 유체 샘플을 처리하는 데 사용될 수 있는 예시적인 화학물질, 조성물, 조영제, 및 관련 조성물이 공개류 중인 미국 특허 출원 제\_\_\_\_호에 논의되어 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 조영제는 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주 및 제2 범주 및/또는 하위범주를 감별하는 시각적 구분을 생성하는 데 효과적일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 도 5에 도시된 준비된 샘플(12B)은 적어도 하나의 플로우셀(22)에 적용될 수 있다. 준비된 샘플(12B)의 입자들의 이미지들이 캡처된다. 시각적 분석기(17)일 수 있는 분석기 및/또는 프로세서(18)에 의해 이미지 분석이 수행된다. 이어서, 리본형 샘플 스트림의 복수의 이미지들을 분석함으로써 입자들의 제1 범주 대 입자들의 제2 범주의 비례적인 비가 결정된다.

[0221] 이어서, 도 8의 단계(78)에서는, 입자들의 제2 범주의 농도에 그러한 비례적인 비를 적어도 부분적으로 적용시킴으로써, (예를 들어, 도 6에 도시된 바와 같은) 프로세서(18)에 의해 제1 범주 내의 입자들의 농도가 계산될 수 있다.

[0222] 본 발명은 또한 입자들을 함유하는 샘플을 분석하기 위한 방법을 제공한다. 도 9는, 일부 실시 형태에 따라, 입자들의 2개의 하위범주의 농도를 결정하는 예시적인 방법(80)을 예시하는데, 이러한 입자들은 입자 카운터에 의해 구분될 수 없는 것이다. 단계(82)에서는, 샘플(예를 들어, 도 6의 샘플(12))이 입자 카운터(예를 들어, 도 6의 입자 카운터(15)) 상에 제공되며, 입자 카운터는, 구분되도록 요구되는 입자들의 적어도 2개의 범주 또는 하위범주에 의해 충족되는 검출 기준을 갖는다. 입자 카운터로부터의 결과는, 도 9의 단계(84)에서, 단일 카운트 내에 이들 범주 또는 하위범주를 포함한다.

[0223] 단계(86)에서는, 샘플을 분석기(예컨대, 시각적 분석기) 상에 제공하여, 입자들의 제1 범주 또는 하위범주 대 입자들의 제2 범주 또는 하위범주의 비례적인 비를 결정한다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어 도 5 및/또는 도 6에 도시된 바와 같이, 시각적 분석기(17)는 이미징 디바이스에 연결된 플로우셀(22)을 포함한다.

[0224] 입자들의 제1 범주 또는 하위범주 대 입자들의 제2 범주 또는 하위범주의 비례적인 비는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 결정될 수 있다. 회석제, 투과화제, 및 조영제 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 화학물질이 샘플에 도입된다. 조영제는 입자들의 제2 범주 또는 하위범주로부터 제1 범주 또는 하위범주를 감별하는 입자 범주화 및 하위범주화를 위한 시각적 구분을 생성하는 데 효과적이다. 일부 실시 형태에서, 도 5에 도시된 바와 같이, 준비된 샘플(12B)은 적어도 하나의 플로우셀(22)에 적용될 수 있다. 준비된 샘플(12B)의 입자들의 이미지들이 캡처된다. 시각적 분석기 및/또는 프로세서(18)에 의해 이미지 분석이 수행된다. 이어서, 복수의 이미지들을 분석함으로써, 적어도 입자들의 제1 하위범주 대 입자들의 제2 하위범주의 비례적인 비가 결정된다.

- [0225] 이어서, 도 9의 단계(88)에서는, 입자 카운터로부터 얻어진 단일 카운트(예를 들어, 도 9의 단계(84))에 그러한 비례적인 비를 적어도 부분적으로 적용시킴으로써, 도 5 또는 도 6에 도시된 바와 같은 프로세서(18)에 의해, 제1 범주 또는 하위범주 내의 입자들의 농도가 계산될 수 있다.
- [0226] 일부 실시 형태에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위의 상한을 초과하는 농도로 샘플 중에 존재한다. 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주는 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 예를 들어, 입자들의 제1 범주는 백혈구를 포함한다. 입자들의 제2 범주는 혈소판을 포함한다. 도 10b에 예시된 바와 같이, 본 발명의 분석기로부터의 입자 카운트는, 입자 카운터에 의해 사용되는 적어도 하나의 검출 범위, 예컨대 입자 농도, 부피 및/또는 크기와 관련된 부정확한 입자 카운트들을 정정하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 검출 범위의 상한을 초과하는 양으로 존재하는 입자들이 정확하게 검출 및 측정될 수 있다.
- [0227] 일부 실시 형태에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는, 도 10a에 예시된 바와 같이, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한, 일부 파라미터, 예를 들어 농도의 검출가능한 범위의 하한 미만으로 샘플 중에 존재한다. 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주는 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 도 10a에 예시된 바와 같이, 본 발명의 분석기로부터의 2개의 범주 및/또는 하위범주 내의 입자 카운트들의 비례적인 비는 적어도 하나의 범주 및/또는 하위범주에 대한 입자 카운터로부터의 부정확한 카운트들을 정정하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 입자 카운터에 의해서는 검출되지 않는, 검출 범위 한계 미만으로 존재하는 입자들이 정확하게 측정될 수 있다.
- [0228] 도 10a에 도시된 바와 같이, 입자 카운터는 범주 2에 대한 입자 카운트를 제공한다. 분석기는 범주 1과 범주 2에 대한 입자 카운트들의 비례적인 비를 제공한다. 비례적인 비를 범주 2에 대한 입자 카운트에 곱함으로써, 이 과정은 범주 1에 대한 입자 카운트에 이른다. 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는, 예를 들어 혈소판을 포함할 수 있다. 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주는 백혈구를 포함한다. 일부 실시 형태에 따르면, 본 명세서에 개시된 동적 또는 검출 범위 확대 시스템 및 방법은, 샘플 중에 함유된 혈소판의 개수가 낮은 경우에, 정확한 혈소판 카운트를 얻는 데 사용될 수 있다.
- [0229] 일부 실시 형태에서, 분석기는, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주 내 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 비례적인 비를 결정하기 위해, 이미징 디바이스 및 이미징 디바이스에 연결된 플로우셀을 포함한다. 희석제, 투과화제, 조영제 중 적어도 하나가 샘플에 도입된다. 적어도 하나의 화학물질은 입자들의 제1 및 제2 범주 및/또는 하위범주를 감별하는 시각적 구분을 생성하는 데 효과적이다. 그러한 비례적인 비를 결정하는 단계에서, 샘플은 일부 실시 형태에서 존재하는 적어도 하나의 플로우셀에 적용된다. 샘플의 입자들의 복수의 이미지들을 캡처하여 카운트 또는 비례적인 비의 통계학적으로 유의한 평가를 제공한다. 이어서, 입자들의 제1 및 제2 범주 및/또는 하위범주 각각의 내의 입자들을 카운팅함으로써, 입자들의 적어도 제1 범주 및/또는 하위범주 내 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 비례적인 비를 결정한다.
- [0230] 다른 태양에서, 도 9 및/또는 도 10d에 도시된 바와 같이, 입자 카운터 상에서 얻어진 입자 카운트를 정정하기 위해, 입자들을 함유하는 샘플을 분석하기 위한 방법(80)이 제공된다. 예를 들어, 본 발명의 분석기로부터의 결과, 예를 들어 상대적 카운트는, 입자 카운터 단독에 의해 사용되는 검출 기준 또는 기준들에 의해 감별될 수 없는 입자들의 범주들 및/또는 하위범주들의 정확한 입자 카운트들을 얻는 데 사용될 수 있다.
- [0231] 도 10c에 도시된 다른 실시 형태에서, 카운터는 복수의 입자들에 대해 사실상 정확한 카운트를 제공할 수 있다. 복수의 입자들은 적어도 2개의 하위범주의 구성원들을 포함하지만, 카운트는 하위범주들 사이를 구분하지 않는다. 적어도 2개의 하위범주의 각각의 구성원의 분포가 분석기 상에서 결정될 수 있다. 하위범주들의 분포는 총 카운트에 대한 각각의 하위범주들의 카운트들의 비례적인 비이다. 적어도 2개의 하위범주의 구성원들을 구분하도록 프로세서를 프로그래밍한다. 이어서, 예를 들어 도 10c에 도시된 바와 같이, 분석기로부터의 분포 및 입자 카운터로부터의 총 입자 카운트를 사용함으로써, 각각의 구성원의 분포를 사용함으로써 프로세서에 의해 적어도 2개의 하위범주 중 적어도 하나의 구성원들에 대한 입자 카운트를 결정할 수 있다.
- [0232] 일부 실시 형태에 따르면, 도 10d에 도시된 바와 같이, 샘플은 존재하는 입자들의 2개의 범주를 가질 수 있다. 이와 관련하여, 범주들은 다수의 범주들 및/또는 다수의 하위범주들의 가능성을 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 입자들의 카운트에 대한 정정이 이루어질 수 있는데, 이러한 카운트에는 입자들의 적어도 하나의 추가 범주로부터의 적어도 일부 구성원들이, 입자 카운터에 의해, 입자들의 제1 범주의 구성원들로서 올바르게 않게 범주화 또는 하위범주화되어 있다. 그러한 방법에서, 복

수의 입자들에 대한 카운트는 사전결정된 범위, 예를 들어 크기 및/또는 부피 범위를 사용하여, 입자 카운터 상에서 이들의 입자 카운트들을 제공함으로써 결정될 수 있다. 사전결정된 범위는 입자들의 제1 범주의 구성원들과 적어도 입자들의 제2 범주의 적어도 일부 구성원들을 입자 카운터 내에 함께 그룹화시킨다. 장치의 하나의 채널에서 입자의 다른 범주로서 올바르게 않게 카운팅되는 하나 이상의 범주 또는 하위범주 내의 그러한 입자들은, 샘플 중의 입자들의 제1 범주 및 적어도 입자들의 제2 범주에 걸친 입자들의 분포를 구분하도록 구성된 분석기를 사용하여 별도로 그리고 정확하게 측정될 수 있다. 범주들 및/또는 하위범주들의 분포는 총 카운트에 대한 각각의 범주들 및/또는 하위범주들의 카운트들의 비례적인 비이다. 이어서, 프로세서는 그러한 분포를 사용하여 입자들의 제1 범주 및 적어도 제2 범주 및/또는 하위범주의 구성원들에 대한 입자 카운트를 계산한다. 이러한 실시 형태에서는, 도 10d에 예시된 바와 같이, 본 발명의 장치 및 방법과 각각의 범주 및/또는 하위범주 내의 입자들의 카운트가 결정될 수 있다.

[0233] 도 10d에 도시된 바와 같이, 입자 카운터는 2개의 범주를 포함하는 사실상 정확한 총 카운트를 제공할 수 있다. 이 카운트는 범주 1 및 범주 2에 대해 추정된 카운트들을 포함할 수 있다. 그러나, 추정된 카운트는, 입자 카운터가 범주 2의 적어도 하나의 구성원을 범주 1과 함께 잘못 분류하였다는 점에서 부정확하다. 분석기는, 범주 1 및 범주 2에 대해, 입자 카운터에서 사용된 샘플보다 더 작은 샘플에 기초한 입자 카운트들의 분포를 제공하지만, 분석기는 정확한 분포를 생성한다. 프로세서는 이러한 정보를 사용하여, 두 범주 모두에 대해 정확한 카운트에 이른다. 이와 동일한 과정이 입자들의 2개 초과 범주 및/또는 하위범주를 포함하는 샘플들에 대해 사용될 수 있다.

[0234] 예를 들어, 유사한 크기 또는 형태를 갖는 상이한 입자 범주들 또는 하위범주들의 구성원들은 입자 카운터에 의해 정확하게 범주화 또는 하위범주화될 수 없다. 예를 들어, "거대" PLT, PLT 응집체, 응괴, 다수의 혈소판 및 유핵 RBC가 WBC로서 잘못 카운팅될 수 있으며, 그 결과 WBC 카운트가 샘플 중에 실제로 존재하는 것보다 더 높게 된다. 다른 예로서, 미소성 적혈구, 세포 단편, 인공물(artifact), 및 심지어 전자 노이즈가 혈소판으로서 잘못 카운팅될 수 있으며, 그 결과 PLT의 카운트가 부정확하게 높게 된다.

[0235] 일부 실시 형태에서, 분석기는 이미징 디바이스 및 플로우셀을 포함하는 시각적 분석기이다. 일 예로서, 희석제, 투과화제, 조영제 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 화학물질이 샘플에 도입된다. 적어도 하나의 화학물질은 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주와 제2 범주 및/또는 하위범주를 감별하는 시각적 구분을 생성하는 데 효과적이다. 일부 실시 형태에서, 그러한 분포를 결정하는 단계에서, 샘플은 존재하는 적어도 하나의 플로우셀에 적용된다.

[0236] 입자들의 적어도 2개의 범주 및/또는 하위범주의 각각의 구성원의 분포를 결정하는 단계에서는, 샘플의 적어도 일부분이 적어도 하나의 플로우셀 내로 적용된다. 적어도 하나의 화학물질은 입자들의 범주들 및/또는 하위범주들의 구성원들을 감별하는 시각적 구분을 생성하는 데 효과적이다. 샘플의 입자들의 복수의 이미징이 캡처링된다. 샘플의 입자들의 복수의 이미지들을 캡처링하여 카운트 또는 비례적인 비의 통계학적으로 유의한 평가를 제공한다. 이어서, 입자들의 제1 및 제2 범주 및/또는 하위범주 각각의 내의 입자들을 카운팅함으로써, 적어도 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주 내 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 비례적인 비를 결정한다.

[0237] 입자들의 범주 및/또는 하위범주 내의 입자들의 2개 이상의 하위범주 각각의 구성원들의 비례적인 비, 및/또는 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주의 구성원들 내 입자들의 적어도 하나의 다른 범주 및/또는 하위범주의 구성원들의 비례적인 비가, 샘플의 입자들의 복수의 이미지들에 기초하여 결정될 수 있다. 이어서, 입자들의 각각의 범주 및/또는 하위범주에 대한 카운트 또는 농도 값이 계산, 추산, 추론 및/또는 도출될 수 있다. 일 예로서, 입자들의 하위범주들의 농도는 분석기로부터의 입자들의 각각의 하위범주의 비례적인 비, 및 입자 카운터로부터의 그 범주 내의 입자들의 총 개수의 카운트에 기초하여 결정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 적어도 2개의 하위범주의 구성원들은 백혈구, 혈소판, 및 적혈구의 하위범주들로 이루어진 군으로부터 선택되는 입자들의 적어도 하나의 유형을 포함한다.

[0238] 따라서, 일부 실시 형태에서, 방법은, 분석기 및/또는 프로세서로부터의 샘플의 입자들의 복수의 이미지들에 기초하여, 입자 카운터의 입자들의 하나의 범주에 적용가능한 검출 범위 밖의 농도로 존재하는 입자들의 하나의 범주 및/또는 하위범주 내의 입자들의 카운트 내 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 검출 범위 내에 있는 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주 내의 입자들의 카운트의 비례적인 비를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 이어서, 입자 카운터 상에서 얻어진 입자 카운트에 그러한 비례적인 비를 적용시킴으로써, 입자 카운터의 검출 범위 밖에 있는 입자들의 범주 및/또는 하위범주의 샘플 중의 농도가 결정될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한



검출 범위 한계의 상한을 초과하는 농도로 샘플 중에 존재한다. 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주는 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주에 적용가능한 (검출 범위의 상한 미만이고 하한을 초과하는) 입자 카운터의 검출 범위 내에서 샘플 중에 존재한다. 다른 예로서, 입자 카운터에 의해 사용되는 검출 기준 또는 기준들이, 제1 범주 및/또는 하위범주의 입자들을 적어도 제2 범주 및/또는 하위범주의 입자들과 함께 그룹화함으로써 입자들을 잘못 범주화하는 경우에, 제1 및 제2 범주 및/또는 하위범주에 대한 입자 카운트는 시각적 분석기 및/또는 프로세서로부터의 샘플의 입자들의 복수의 이미지들로부터 결정된 입자들의 비례적인 비로부터 정정될 수 있다.

[0239]

측정의 검출 범위는 도 6에서의 입자 카운터(15)에 대해서만 제한될 수 있다. 예를 들어, WBC에 대한 검출 상한은 입자 카운터(15) 상에서  $\mu\text{L}$ 당 100,000 내지 200,000 미만일 수 있다. PLT에 대한 검출 하한은  $\mu\text{L}$ 당 10,000 초과일 수 있다. 본 명세서에 기재된 장치를 사용함으로써, 측정의 유효 검출 범위는 확대될 수 있는데, 예를 들어 WBC에 대한 검출 상한은, 일부 실시 형태에서, 최대 약 300,000, 350,000, 400,000, 410,000, 420,000, 430,000, 440,000, 450,000, 460,000, 470,000, 480,000, 490,000, 500,000, 510,000, 520,000, 530,000, 540,000, 550,000, 560,000, 570,000, 580,000, 590,000, 600,000, 610,000, 620,000, 630,000, 640,000, 650,000, 660,000, 670,000, 680,000, 690,000, 700,000, 710,000, 720,000, 730,000, 740,000, 750,000, 760,000, 770,000, 780,000, 790,000, 800,000, 810,000, 820,000, 830,000, 840,000, 850,000, 860,000, 870,000, 880,000, 890,000, 900,000, 910,000, 920,000, 930,000, 940,000, 950,000, 960,000, 970,000, 980,000, 990,000, 또는 1,000,000, 1,000,000, 1,010,000, 1,020,000, 1,030,000, 1,040,000, 1,050,000, 1,060,000, 1,070,000, 1,080,000, 1,090,000, 1,100,000, 1,110,000, 1,120,000, 1,130,000, 1,140,000, 1,150,000, 1,160,000, 1,170,000, 1,180,000, 또는 약 1,190,000 세포/ $\mu\text{L}$ , 또는 이들 값 중 임의의 둘 사이의 임의의 범위로 확대될 수 있다. PLT에 대한 검출 하한은, 일부 실시 형태에서, 10,000, 9,500, 9,000, 8,500, 8,000, 7,500, 7,000, 6,500, 6,000, 5,500, 5,000, 4,500, 4,000, 3,500, 3,000, 2,500, 2,000, 1,500 또는 1,000, 또는 500, 400, 300, 200, 또는 100 세포/ $\mu\text{L}$ 에 이르기까지 확대될 수 있다.

[0240]

분석기는 바람직하게는, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주 대 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주의 비례적인 비를 결정하도록 작동가능한 시각적 분석기(17)를 포함한다. 이러한 실시 형태에서, 전술된 바와 같은 비례적인 비는 시각적 분석기(17) 상에서 촬영된 샘플 중의 입자들의 복수의 이미지들을 분석함으로써 결정될 수 있다.

[0241]

시각적 분석기(17)는 입자 범주화 및 하위범주화를 위한 시각적 구분을 생성하기 위해 회색제, 투과화제, 및/또는 조영제 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 화학물질을 샘플에 도입하도록 구성될 수 있다. 그러한 시각적 구분은 적어도 2개의 범주의 구성원들을 감별한다. 샘플의 입자들의 이미지들이 캡처된다. 시각적 분석기(17) 및 프로세서(18)는, 샘플의 입자들의 이미지들 사이를 구별함으로써, 입자들의 각각의 범주 또는 하위범주의 비례적인 비를 결정하도록 구성된다. 이어서, 입자들의 각각의 범주 또는 하위범주의 농도가 계산된다. 예를 들어, WBC, 거대 PLT 및 NRBC의 정확한 결과가 결정될 수 있다. 입자 카운터 상에서는, 유사한 크기 또는 형태로 인해, 거대 PLT 및 NRBC가 WBC로서 카운팅된다. 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 거대 PLT 및 NRBC의 입자 카운트 또는 농도가 정확하게 기록될 수 있다.

[0242]

일부 실시 형태에서, 샘플은 입자 카운터(15)의 검출 크기 범위 밖의 크기를 갖는 입자들을 포함할 수 있다. 시각적 분석기(17) 및 프로세서(18)는, 샘플의 입자들의 이미지들에 기초하여, 입자들을 검출하도록, 그리고 입자 카운터(15)의 검출 크기 범위 밖에 있는 입자들 대 검출 크기 범위 내에 있는 입자들의 비례적인 비를 결정하도록 구성된다. 이어서, 입자 카운터(15)의 검출 크기 범위 밖에 있는 입자들의 범주 및 하위범주의 농도가 계산될 수 있다.

[0243]

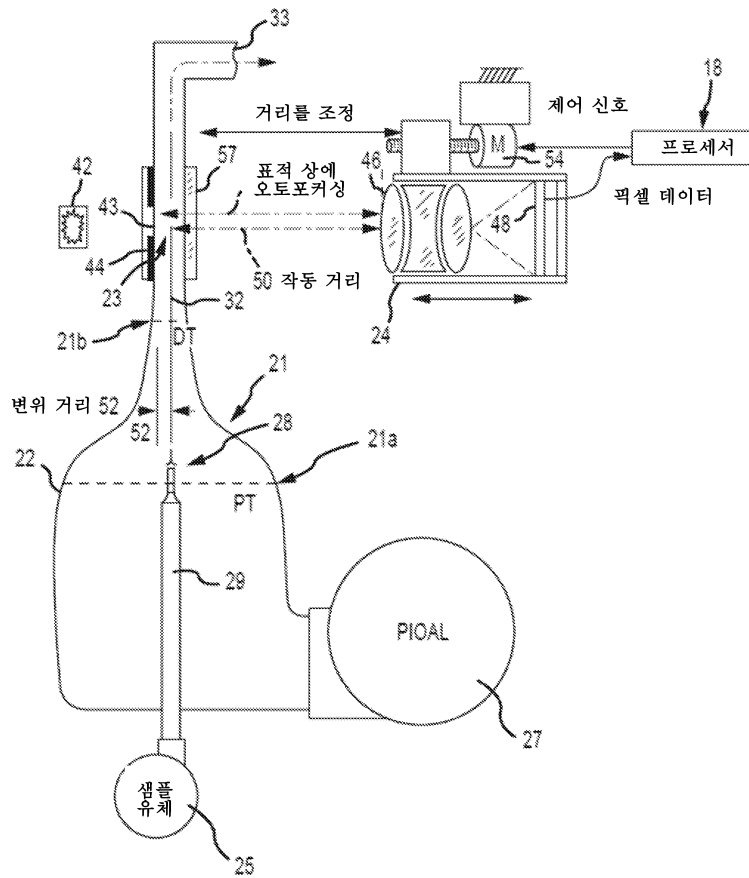
일반적으로, 입자 카운터 상에서 얻어진 입자 카운트를 정정하기 위해, 입자들을 함유하는 샘플을 분석하기 위한 방법이 제공된다. 예를 들어 도 5 및 도 6에 도시된 바와 같은 입자 카운터(15) 상에서 입자들의 동일한 범주 및/또는 하위범주 내에 속하는 입자들의 상이한 범주들 - 상응하는 하위범주들을 포함함 - 을 감별하기 위한 예시적인 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 입자 카운터(15)에서 얻어진 입자 카운트들을 정정하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어, 입자들의 제1 범주 및/또는 하위범주는 비정상 혈구, 미성숙 혈구, 응괴된 혈구, 또는 비정상 크기의 혈구의 하나 이상의 유형을 포함한다. 입자들의 제2 범주 및/또는 하위범주는 백혈구를 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 작동시킴으로써, 하위범주들 내의 입자들은 분석기에 의해 구분될 수 있으며, 입자 카운터로부터 얻어진 입자들의 범주들 및/또는 하위범주들의 카운트들이 정정될 수 있다.

- [0244] 샘플 또는 그의 일부분을 입자 카운터(15) 상에 제공하여, 입자들의 적어도 2개의 범주의 하위범주들을 포함할 수 있는 하나 이상의 선택 기준들에 기초하여, 입자들을 검출하고 입자 카운트들을 제공한다. 예를 들어, 입자 카운터로부터 알려진 WBC 범주는 또한 소량의 거대 PLT 및 NRBC를 함유할 수 있다. 입자 카운터로부터의 그러한 범주는 입자 카운터에 의해 구분될 수 없는 백혈구의 하위범주들을 추가로 포함할 수 있다. 샘플의 다른 일부분을 또한, 하기에 기재된 바와 같이 시각적 분석기 상에서 분석하여, 이러한 잘못된 범주화를 해결하고/하거나 구분되지 않은 WBC 하위범주들을 하위범주화할 수 있다.
- [0245] 적어도 2개의 하위범주 또는 범주 각각의 분포가 도 5에 도시된 바와 같은 분석기(17) 상에서 결정될 수 있다. 그러한 분포는 상대적 카운트들의 수치적인 비, 비례적인 비 및/또는 다른 함수로 제공될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 그러한 분포는 플로우셀(22) 및 이미징 디바이스(24)를 포함하는 시각적 분석기(17) 상에서 본 명세서에 개시된 방법에 따라 결정될 수 있다. 기재된 바와 같이, 샘플(12A) - 이는 샘플의 일부분일 수 있음 - 이 적어도 하나의 플로우셀(22)에 적용된다. 희석제, 투과화제, 조영제 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 화학물질이 샘플(12A)에 도입된다. 희석제, 투과화제, 및/또는 조영제 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 화학물질은 입자들의 적어도 2개의 범주를 감별하고, 입자들의 적어도 하나의 범주의 적어도 2개의 하위범주들을 감별하는 시각적 구분을 생성하는 데 효과적이다. 샘플(12B)의 입자들의 복수의 이미지들이 캡처된다. 이미지 분석이 시각적 분석기(17) 및/또는 프로세서(18) 상에서 수행된다.
- [0246] 일부 실시 형태에서, 프로세서(18)는 적어도 2개의 범주 및/또는 하위범주의 구성원들을 구분하도록 프로그래밍된다. 입자들의 적어도 2개의 하위범주 또는 범주 각각의 내의 입자들의 카운트의 비례적인 비가, 샘플의 입자들의 복수의 이미지들에 기초하여 결정될 수 있다. 이어서, 입자 카운터(15)로부터 얻어진 적어도 2개의 범주 중 적어도 하나의 하위범주들에 대한 입자 카운트가, 하위범주들 각각의 분포를 사용함으로써 프로세서(18) 상에서 결정될 수 있다. 입자들의 각각의 하위범주의 농도가, 입자들의 각각의 하위범주의 비례적인 비 및 입자 카운터로부터 얻어진 입자들의 범주의 입자 카운트에 기초하여, 프로세서(18) 상에서 계산될 수 있다.
- [0247] 본 명세서에 개시된 방법은 또한, 일부 실시 형태에 따라, 입자 카운터(15) 상에서의 검출 범위 밖에 있는 입자들의 하나 이상의 유형을 감별하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이들 입자는 입자 카운터(15) 상에서 검출되기에 너무 크거나 너무 작은 혈구 또는 다른 단편일 수 있다. 시각적 분석기(17) 상에서, 입자 카운터 상에서의 검출 범위 밖에 있는 입자의 한 유형 대 입자 카운터의 검출 범위 내에 있는 입자의 다른 한 유형의 카운트들의 비례적인 비가, 샘플의 입자들의 복수의 이미지들에 기초하여 결정될 수 있다. 이어서, 입자 카운터(15) 상에서 얻어진 입자 카운트에 그러한 비례적인 비를 적어도 부분적으로 적용시킴으로써, 샘플 중의 검출 범위 밖에 있는 입자들의 유형의 농도가 결정될 수 있다.
- [0248] 따라서, 본 발명의 실시 형태들은 하이브리드 시스템 및 방법- 예를 들어, 이는 전자적 세포 카운팅 기술과 포토그래픽 세포 이미징 기술을 결합시킨 것임 - 을 포함하여, 예를 들어 전기적으로 구분하기가 어려울 수 있는 세포들을 분석하거나 또는 그의 정확한 전자적 카운트를 얻기가 어려운 양으로 존재하는 세포들을 분석한다.
- [0249] 본 명세서에 기술된 각각의 계산 또는 작동은 하드웨어, 소프트웨어, 및/또는 펌웨어를 갖는 컴퓨터 또는 다른 프로세서를 사용하여 수행될 수 있다. 다양한 방법 단계들은 모듈에 의해 수행될 수 있으며, 이러한 모듈은 본 명세서에 기술된 방법 단계들을 수행하도록 배열된 임의의 매우 다양한 디지털 및/또는 아날로그 데이터 처리 하드웨어 및/또는 소프트웨어를 포함할 수 있다. 이러한 모듈은 선택적으로 데이터 처리 하드웨어를 포함하는 데, 이러한 데이터 처리 하드웨어는 그와 관련된 적절한 기계 프로그래밍 코드를 가짐으로써 이들 단계 중 하나 이상을 수행하도록 구성되며, 둘 이상의 단계(또는 둘 이상의 단계 중 일부)를 위한 모듈은 임의의 매우 다양한 분산형 및/또는 통합형 처리 아키텍처 내의 상이한 프로세서 보드들로 분리되거나 또는 단일 프로세서 보드 내에 통합된다. 이들 방법 및 시스템은 종종 전술된 방법 단계들을 수행하기 위한 명령어들을 갖는 기계 판독가능 코드를 구현하는 유형적 매체를 채용할 것이다. 적합한 유형적 매체는 메모리(휘발성 메모리 및/또는 비휘발성 메모리를 포함함), 저장 매체(예컨대, 플로피 디스크, 하드 디스크, 테이프 등 상의; CD, CD-R/W, CD-ROM, DVD 등과 같은 광학 메모리 상의; 또는 임의의 다른 디지털 또는 아날로그 저장 매체 상의 자기 기록) 등을 포함할 수 있다.
- [0250] 본 명세서에 논의된 모든 특허, 특허 공보, 특허 출원, 학술지 기사, 서적, 기술 참고 문헌 등이 모든 목적들을 위해 그들 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.
- [0251] 전술되거나 도면에 도시된 구성요소들뿐만 아니라 도시되거나 기술되지 않은 구성요소들 및 단계들의 상이한 배열들도 가능하다. 유사하게, 일부 특징들 및 하위조합들이 유용하며, 다른 특징들 및 하위조합들에 상관없이 채용할 수 있다. 본 발명의 실시 형태들은 예시적인 그러나 비제한적인 목적을 위해 기술되었으며, 대안적인

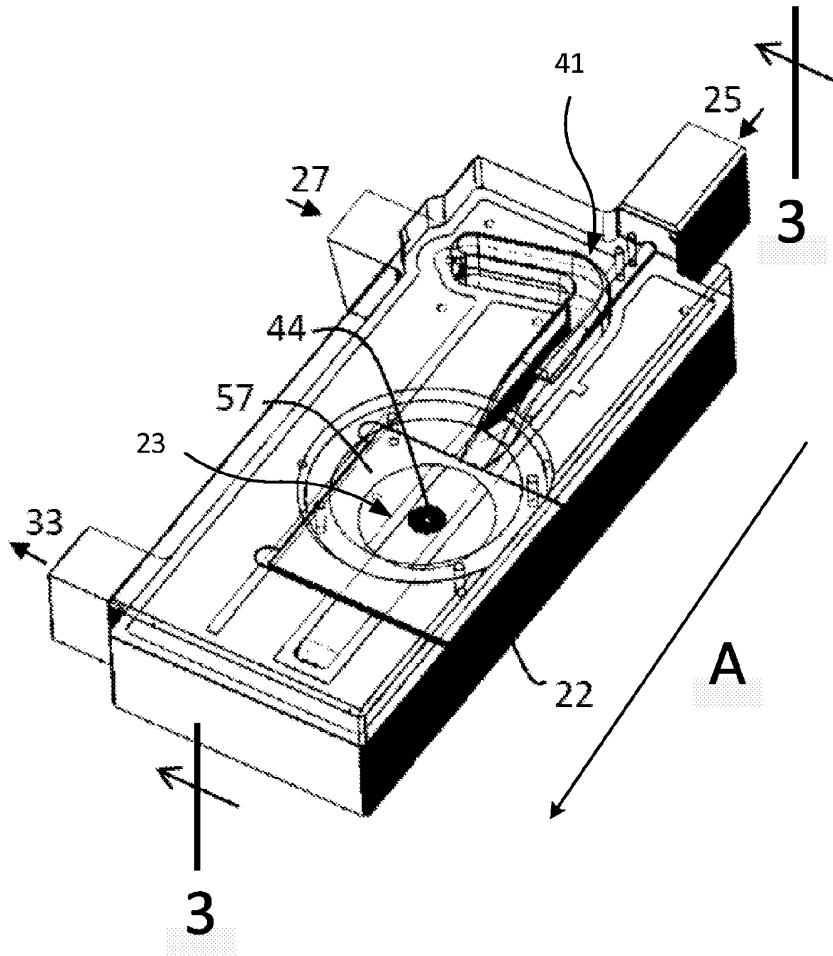
실시 형태들이 본 특허의 독자들에게 명백해질 것이다. 소정의 경우에, 방법 단계들 또는 동작들이 상이한 순서대로 수행 또는 실행될 수 있거나, 동작들이 추가, 삭제 또는 변형될 수 있다. 본 발명의 소정 태양에서는, 요소 또는 구조를 제공하거나 주어진 기능 또는 기능들을 수행하기 위하여, 단일 구성요소가 다수의 구성요소들로 대체될 수 있고, 다수의 구성요소들이 단일 구성요소로 대체될 수 있음이 이해될 수 있다. 그러한 치환이 본 발명의 소정 실시 형태를 실시하도록 작용하지 않게 될 경우를 제외하고는, 그러한 치환은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려된다. 따라서, 본 발명은 전술되거나 도면에 도시된 실시 형태들로 제한되지 않으며, 하기의 특허청구범위의 범주로부터 벗어나지 않고서 다양한 실시 형태 및 변형이 이루어질 수 있다.

도면

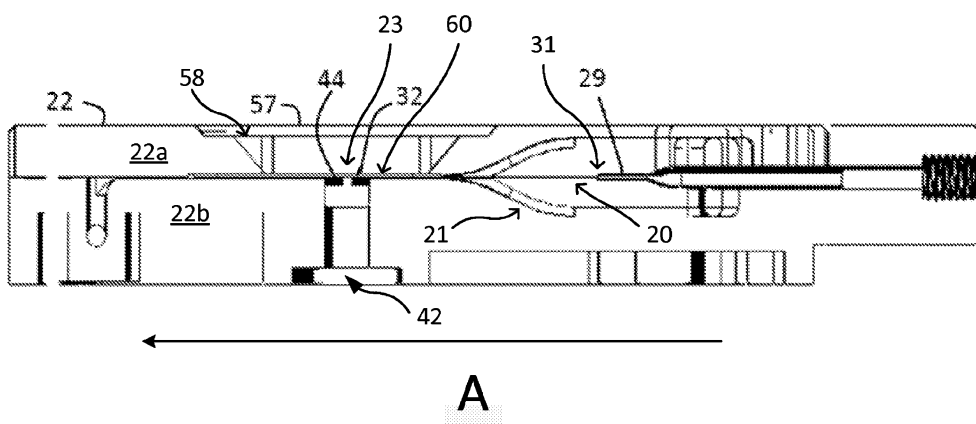
도면1



도면2

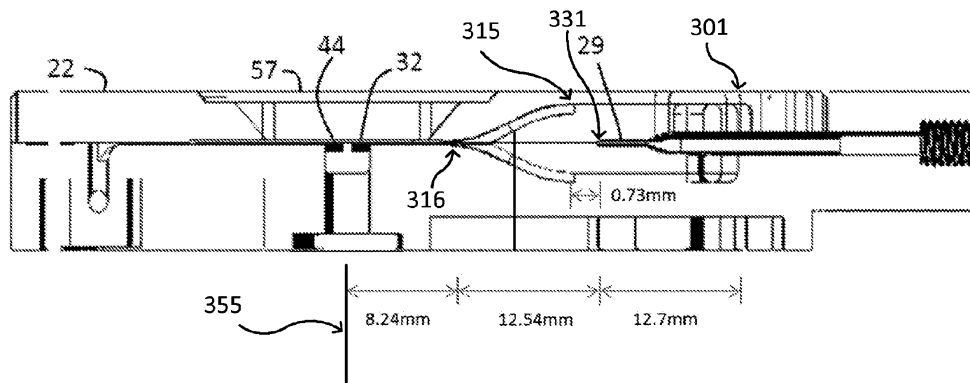


도면3

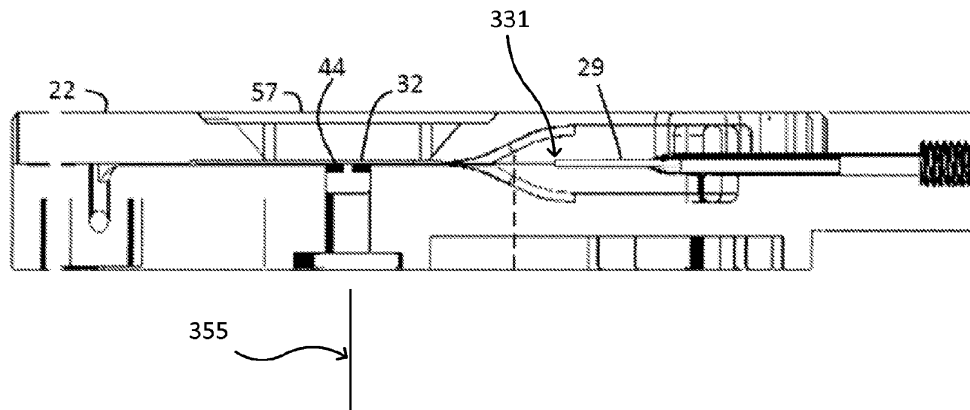




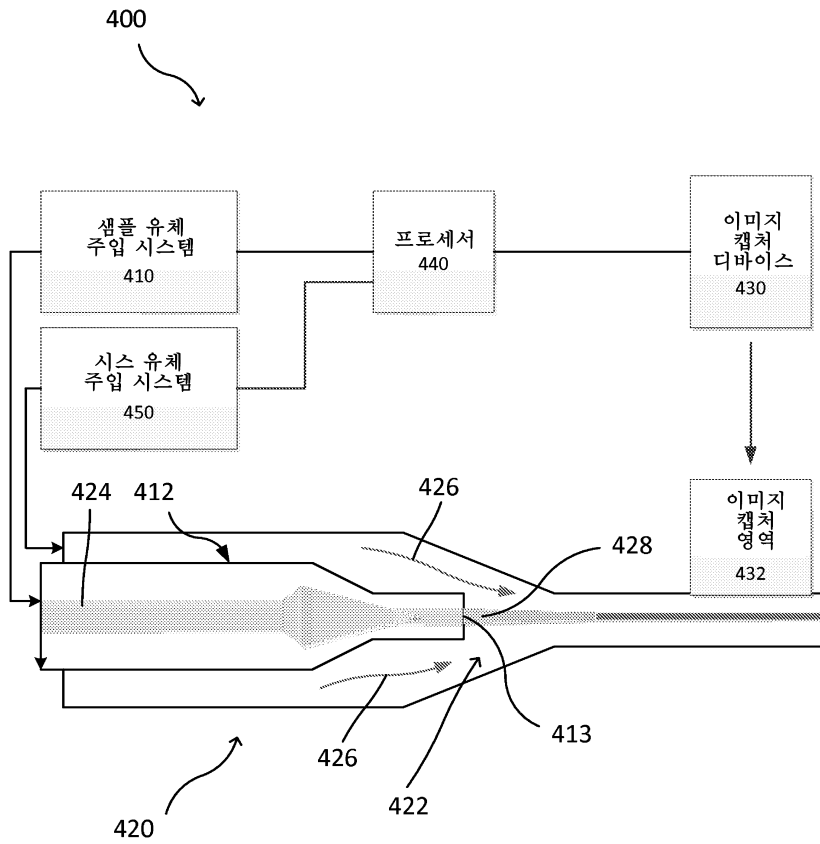
도면3a



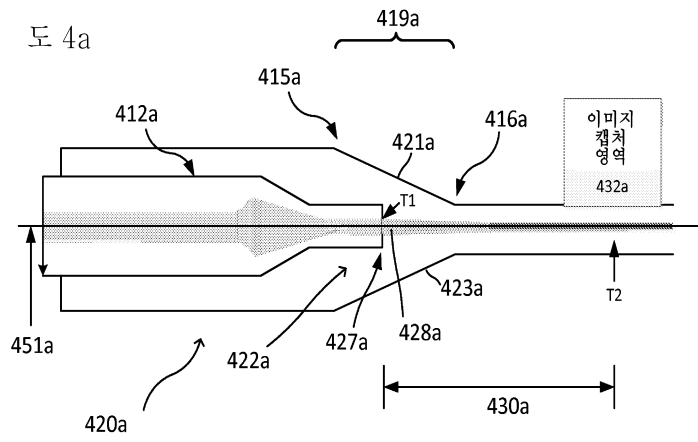
도면3b



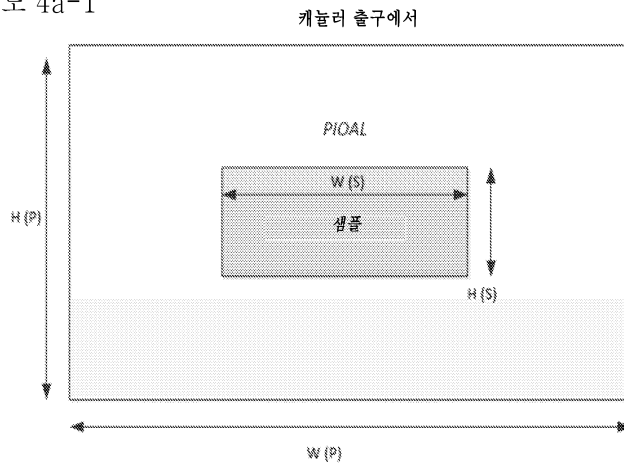
도면4



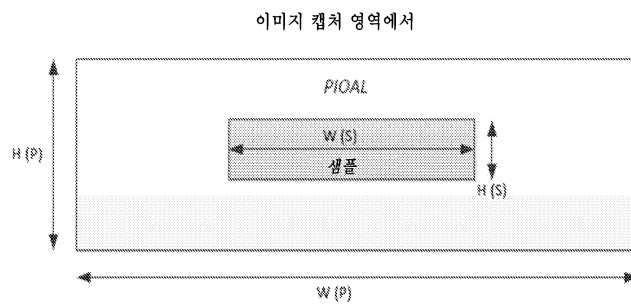
도면4a



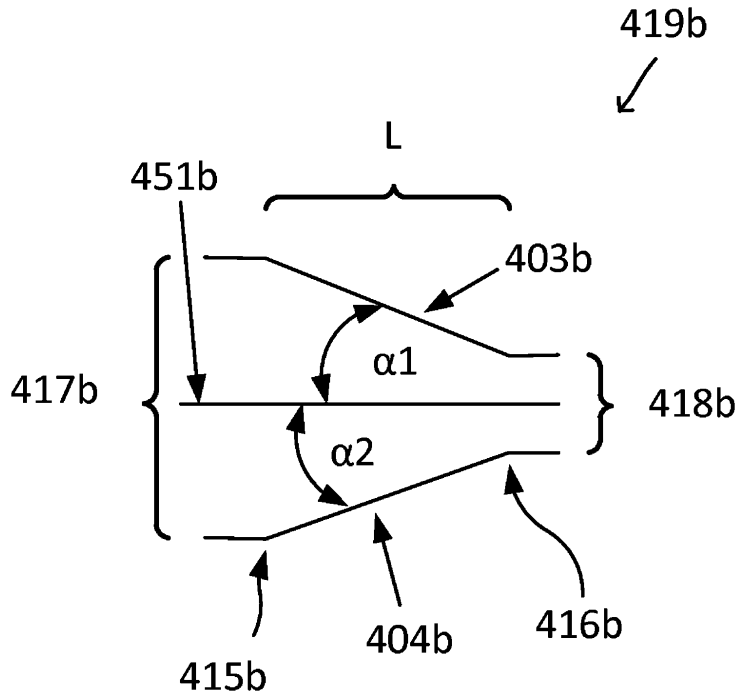
도 4a-1



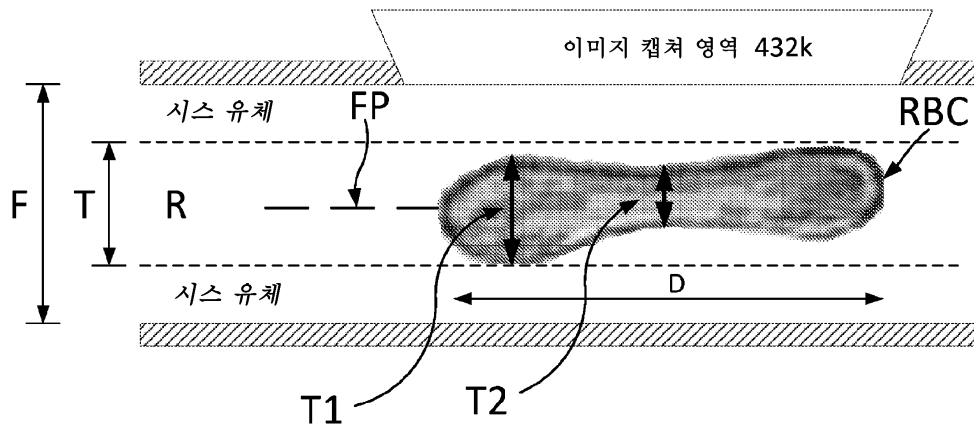
도 4a-2



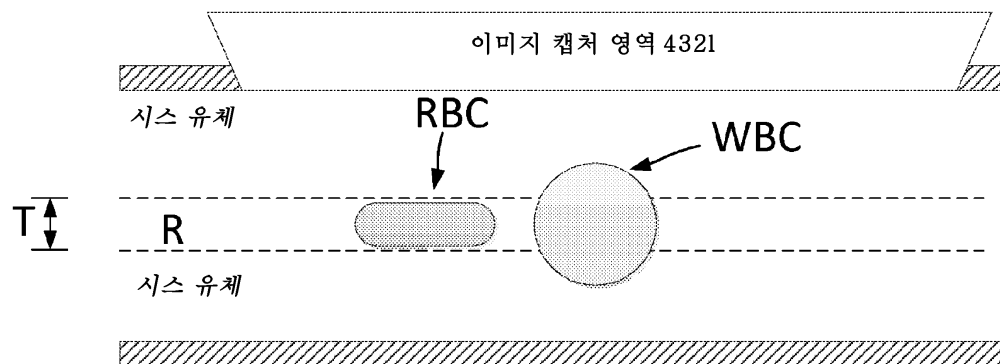
도면4b



도면4k

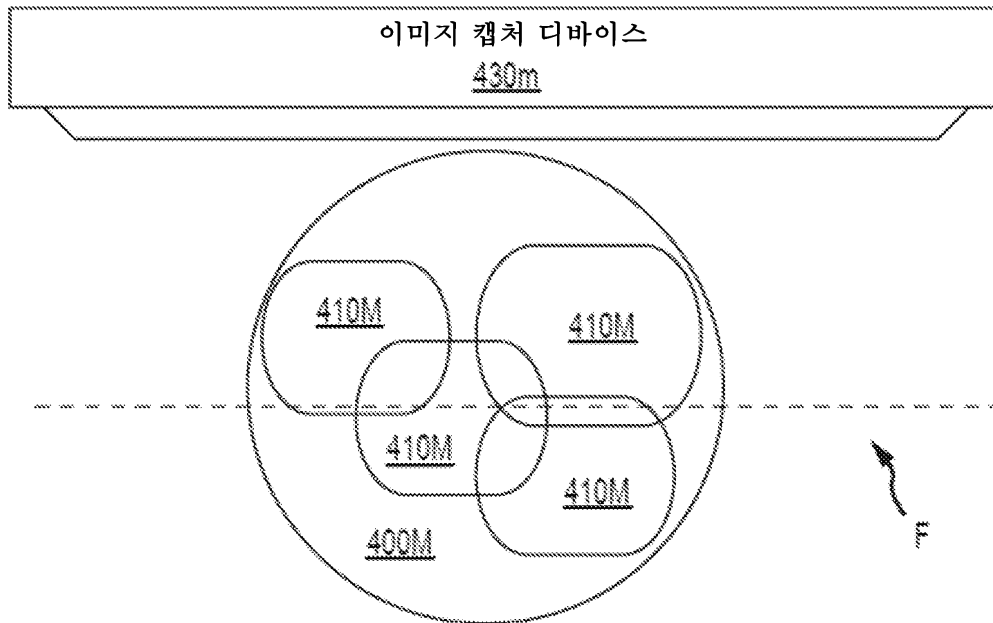


도면4l

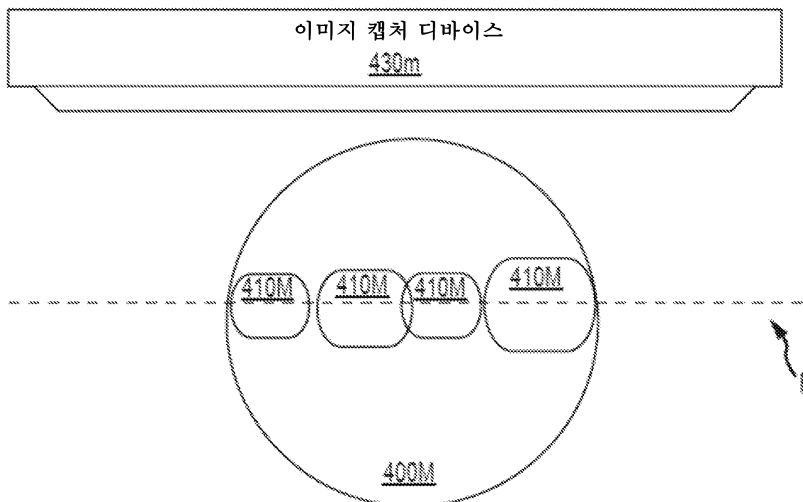




도면4m



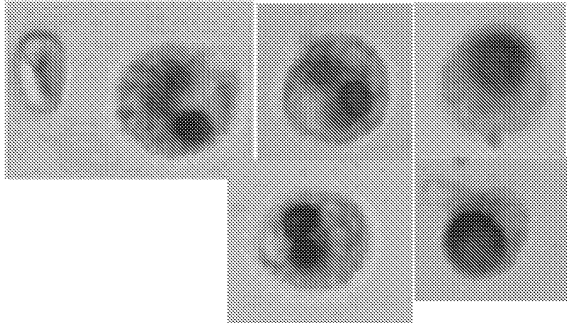
도면4n



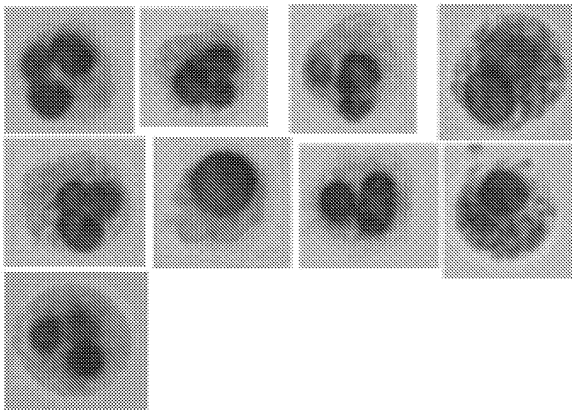
도면40

PIOAL은 더 많은 인-포커스 세포 내용물을 생성한다  
(PIOAL: 입자 및/또는 세포내 세포소기관 정렬 액체)

종래의 시스

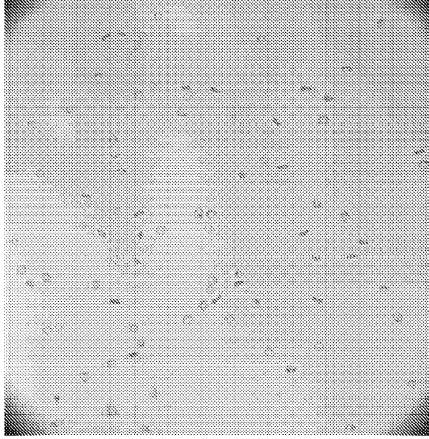


PIOAL

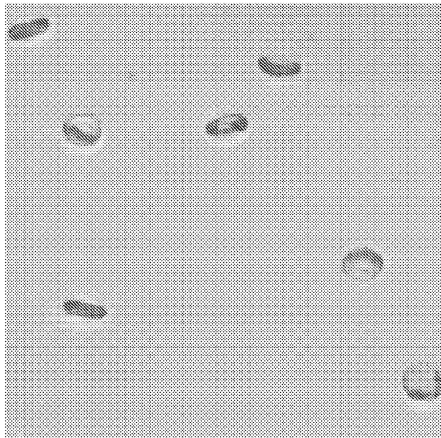


도면4p

중래의 시스에 의한  
샘플 스트립 내의 RBC



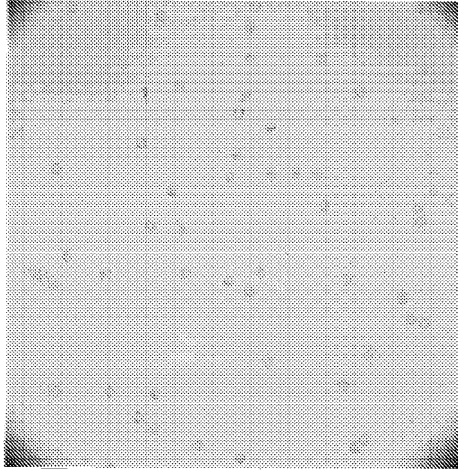
중래의 시스에 의한 20X  
배율에서의 샘플 스트립 내의 RBC



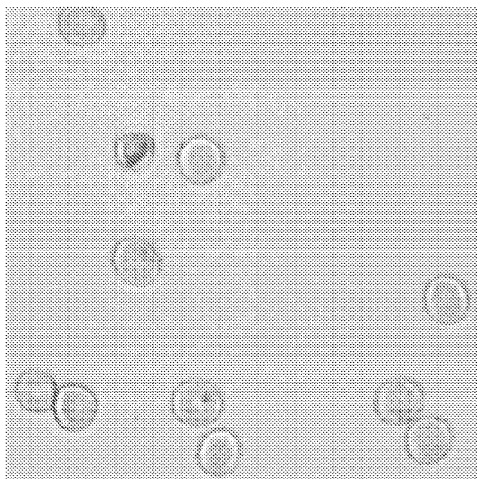
도면4q



PIOAL에 의한  
샘플 스트림 내의 RBC

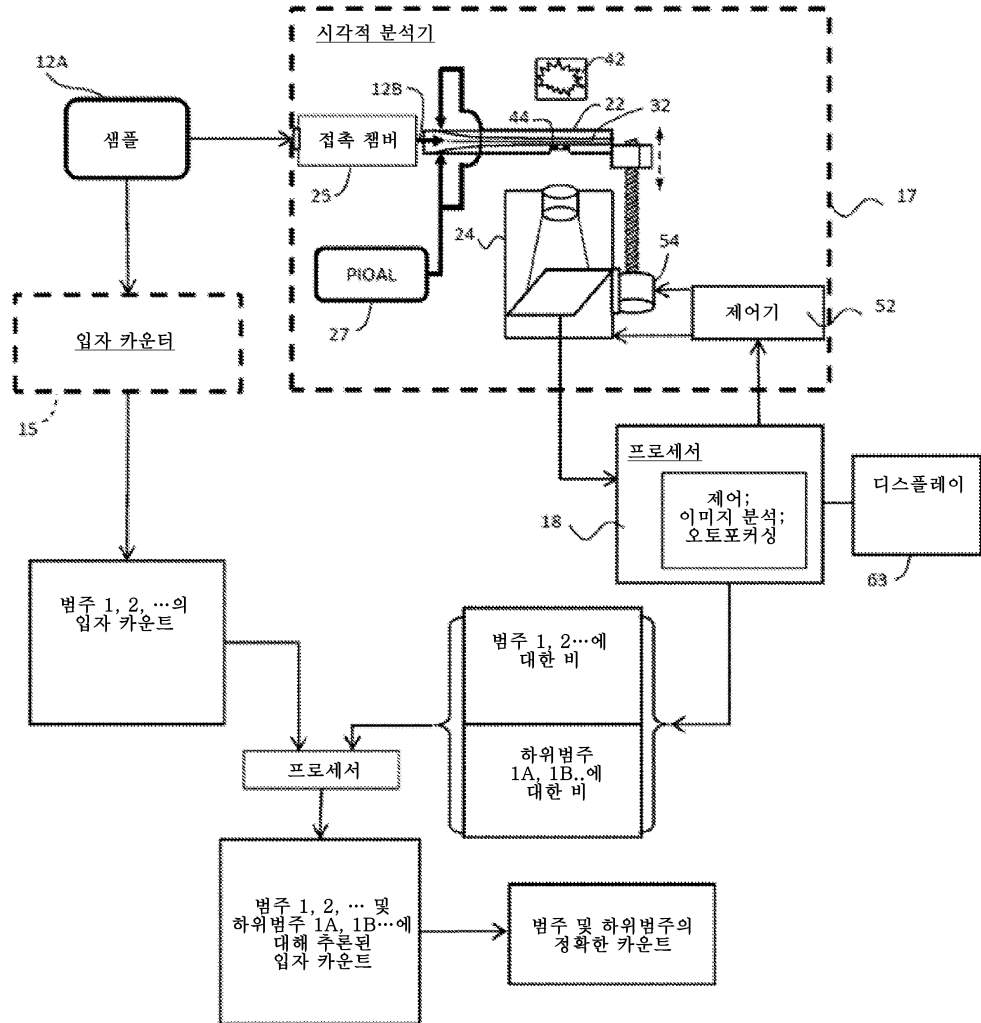


PIOAL에 의한 20X 배율에서의  
샘플 스트림 내의 RBC

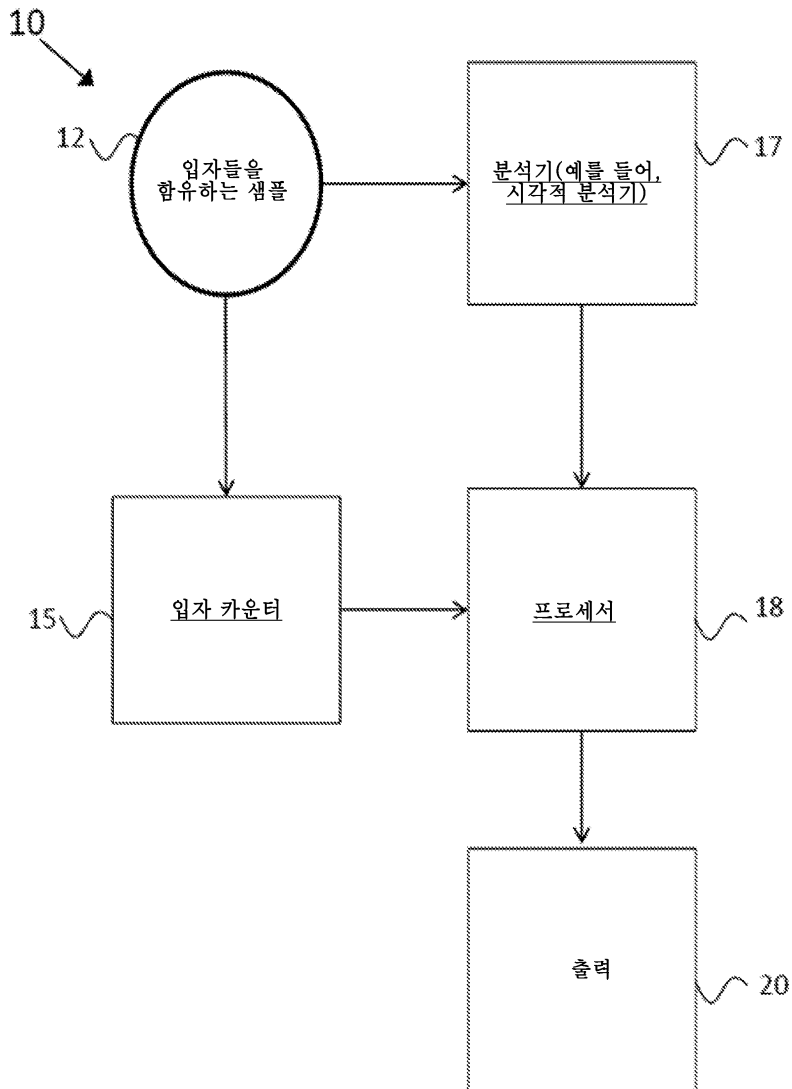




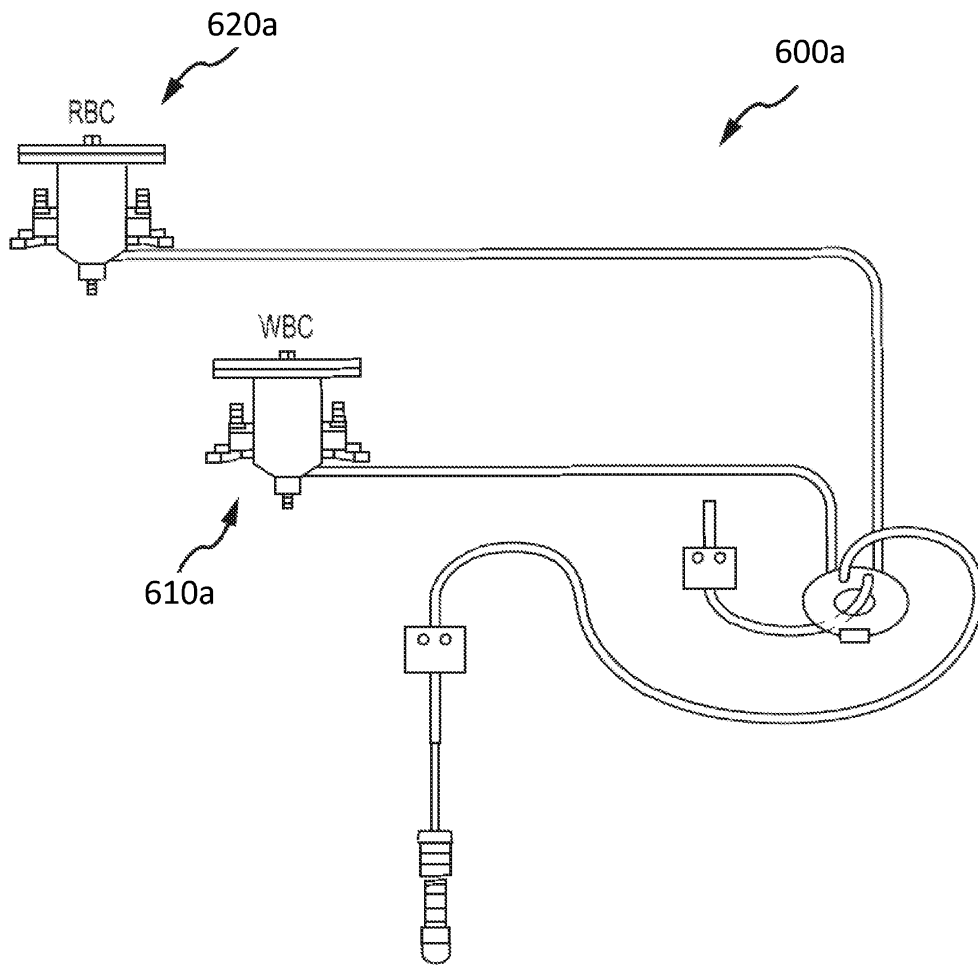
도면5



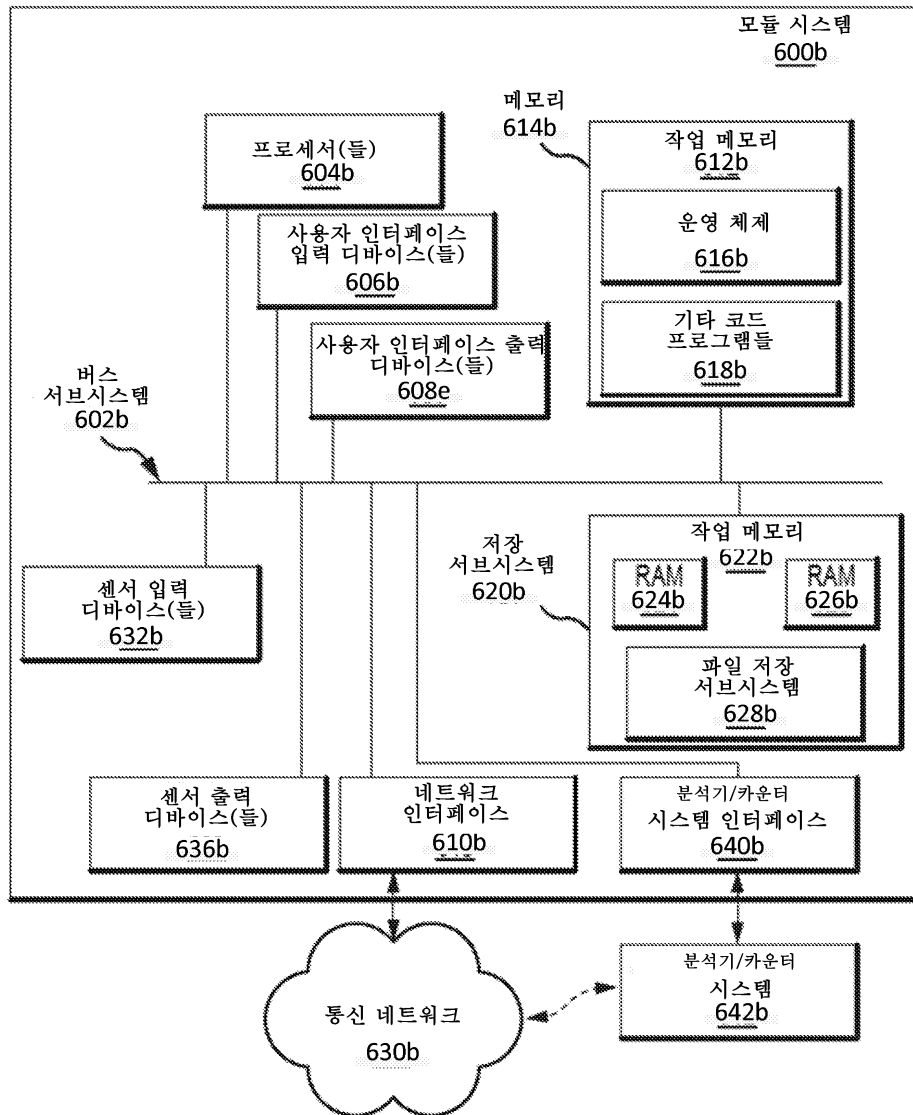
도면6



도면6a

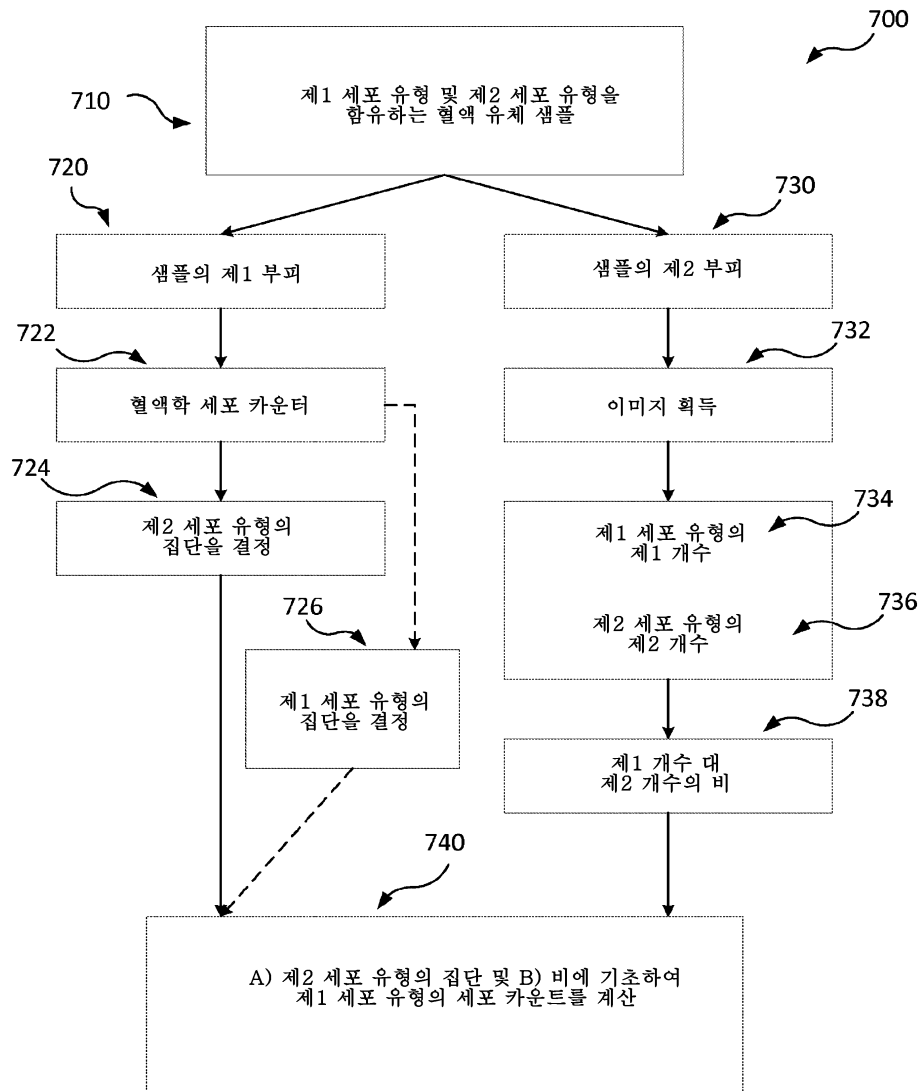


도면6b

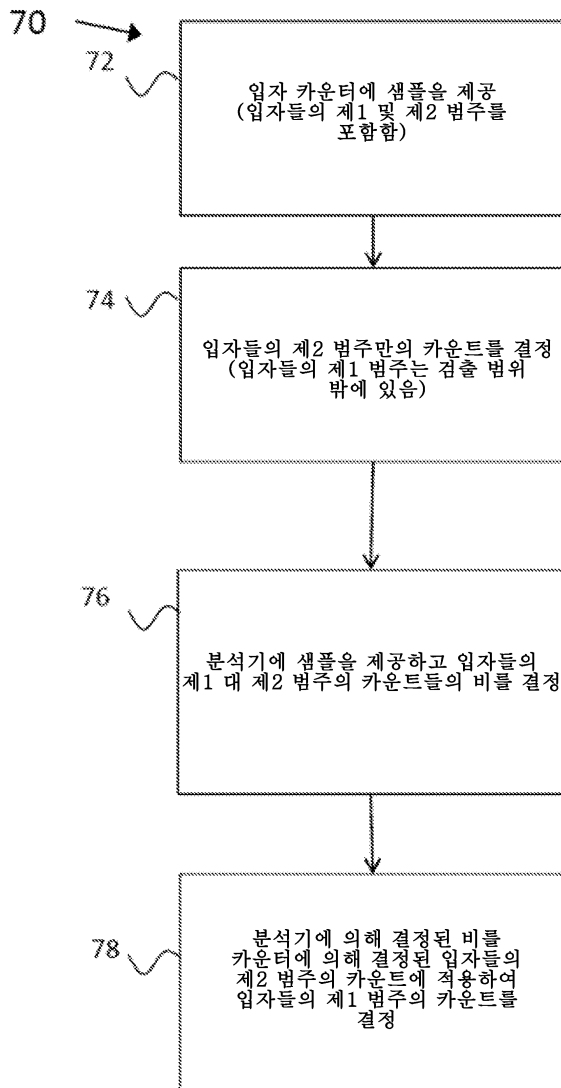




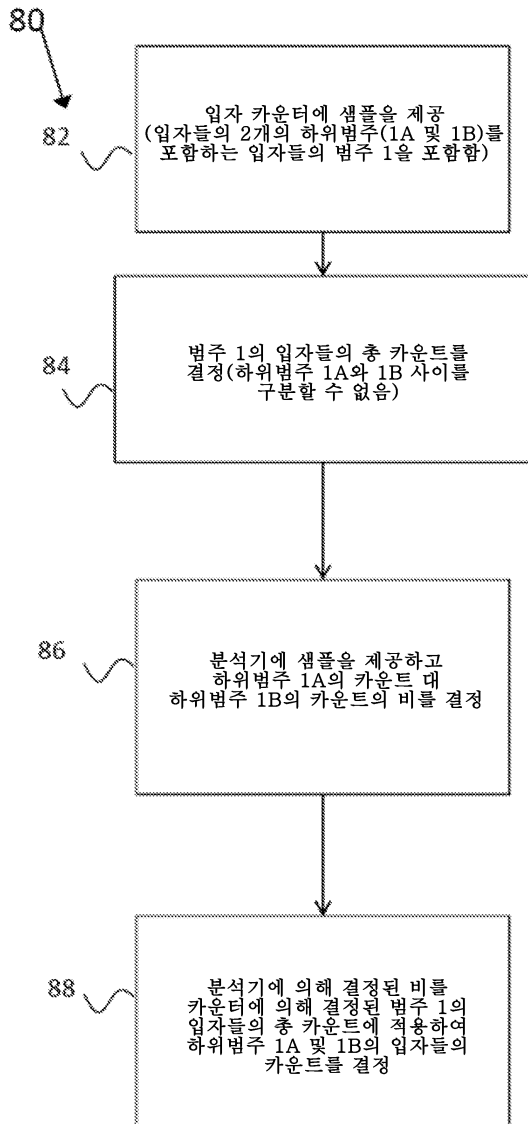
도면7



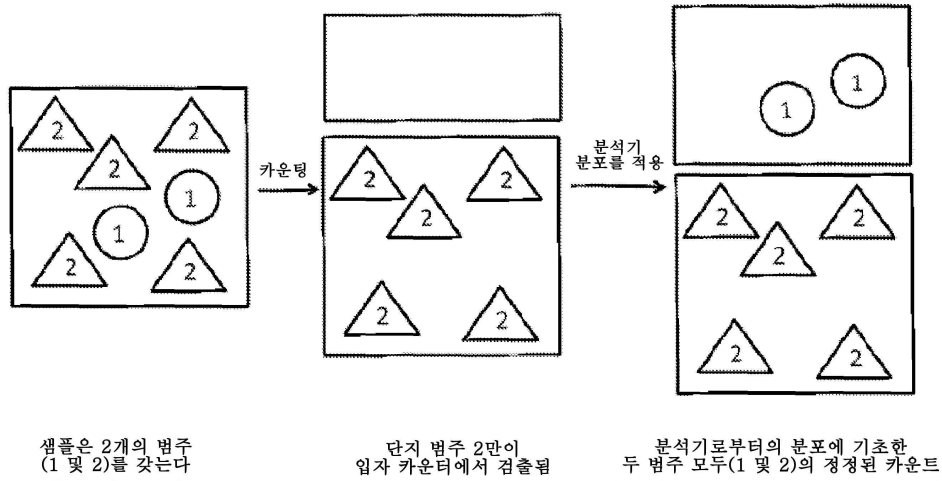
도면8



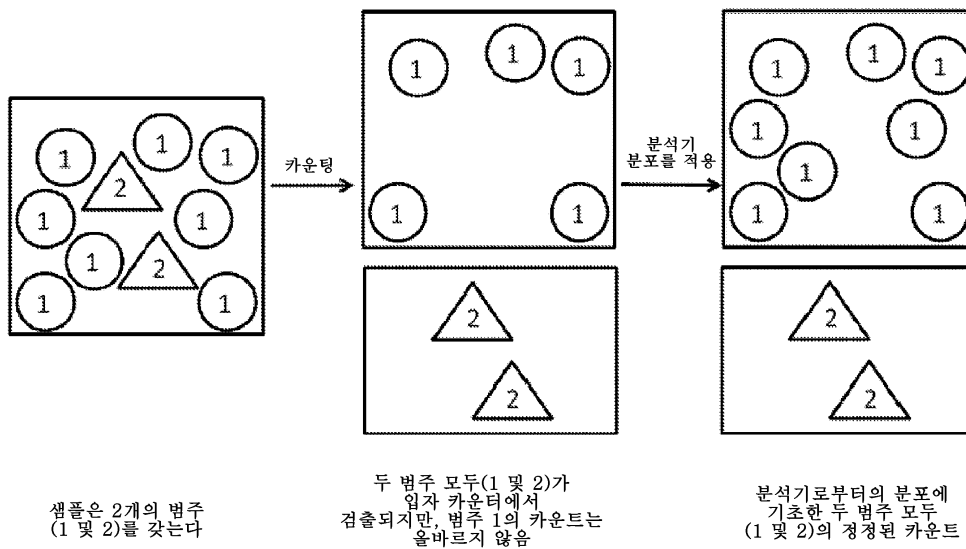
도면9



도면10a

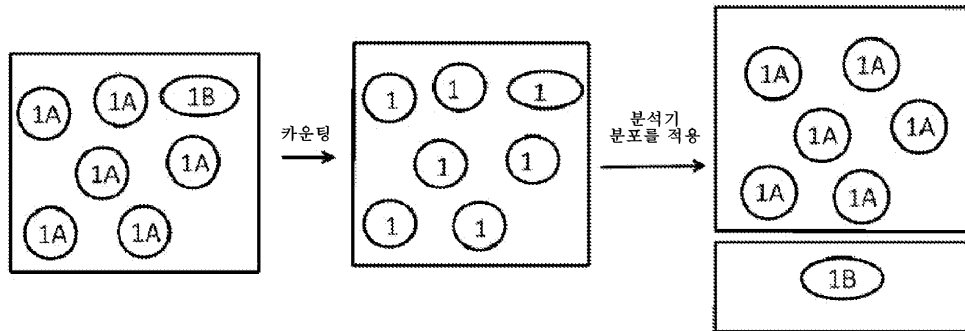


도면10b





도면10c

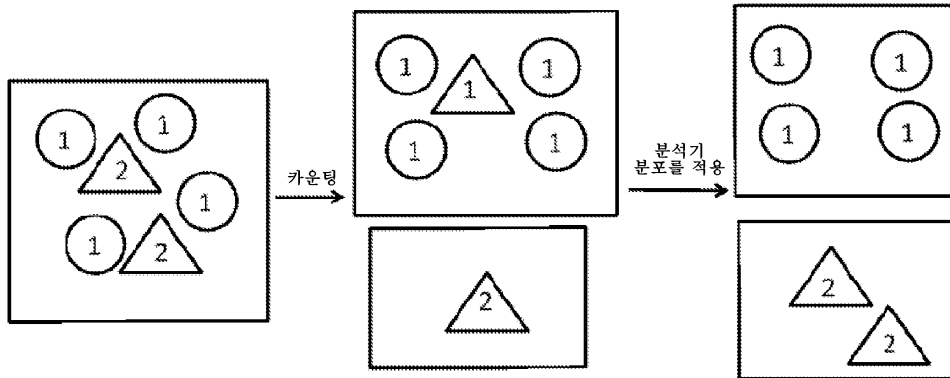


샘플은 적어도 2개의 하위범주  
(1A 및 1B)를 갖는  
하나의 범주(1)를 포함한다

단지 범주 1만이 검출된다  
(하위범주 1A와 1B 사이를  
구분할 수 없다)

분석기로부터의 분포에  
기초한 하위범주  
1A 및 1B에 대한 개별 카운트들

도면10d



샘플은 2개의 범주  
(1 및 2)를 갖는다

두 범주 모두(1 및 2)가  
입자 카운터에서 검출되지만,  
카운트들은 올바르지 않다

분석기로부터의  
분포에 기초한 두 범주 모두  
(1 및 2)의 정정된 카운트