



(43)申请公布日 2019.02.05

凯夫·达利沃

Figure 1 is a schematic diagram of the optical system for a multi-wavelength fluorescence microscope. The system includes a light source (60) for parallel imaging and spectral analysis, a beam splitter (62), a dichroic mirror (70), a mirror (72), a filter wheel (50) with a multi-wavelength emission filter, a multi-wavelength dichroic mirror (26), a microscope objective (30), a multi-wavelength emission filter (24), a beam splitter (22), and three light sources (101, 102, 103). The system also includes a color CMOS camera (80), a camera (92), a trigger light source (106), a trigger LED (100), and a trigger unit (96). The system is controlled by a PC (90) via a communication line (94). The output is a fiber optic image (40) and a camera (44).

1. 一种内窥镜成像装置,包括:

至少一个光源,其被配置为经由公共传输路径向成像区域提供激励信号,每个激励信号具有多种不同颜色中的一种;

控制器,其被配置为控制所述至少一个光源以提供作为重复时间交织序列的所述激励信号,所述重复时间交织序列至少包括第一种所述颜色的激励信号和第二种所述颜色的后续激励信号;以及

单色检测器,其被配置为对于至少一些所述激励信号中的每一个,响应于所述激励信号接收从所述成像区域发射的相应响应信号的至少一部分,并基于所述响应信号的所述至少一部分生成图像数据。

2. 如权利要求1所述的装置,其特征在于,所述至少一个光源和单色检测器被耦合到光纤装置的近端,所述光纤装置包括所述公共传输路径的至少一部分,并且所述成像区域位于所述光纤装置的远端处或附近。

3. 如权利要求1或2所述的装置,包括另一检测器和可选的分离设备,其被配置为从所述成像区域接收所述响应信号,以将所述响应信号的所述至少一部分传递到所述单色检测器并将所述响应信号的另一部分传递到所述另一检测器。

4. 如权利要求3所述的装置,其特征在于,所述单色检测器被配置为接收所述响应信号的所述至少一部分,并且所述另一检测器被配置为至少部分地经由相同的光路接收所述响应信号的所述另一部分。

5. 如权利要求3或4所述的装置,其特征在于,所述另一检测器包括光谱仪或时间分辨检测器,例如荧光寿命成像检测器。

6. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,每个激励信号包括脉冲和/或已调制光,并且其中,所述单色检测器或所述另一检测器或另一检测器包括时间分辨检测器,其被配置为对于每个激励信号响应于所述激励信号,执行从所述成像区域发射的所述响应信号的所述至少一部分或所述另一部分的荧光寿命成像。

7. 如权利要求5或6所述的装置,其特征在于,所述时间分辨检测器包括时间分辨相机、时间选通增强型CCD相机、时间选通增强型sCMOS相机、CMOS SPAD阵列、可调制相机中的至少一个。

8. 如权利要求5至7中任一项所述的装置,其特征在于,对于每个激励信号,所述时间分辨检测器被配置为确定至少一个荧光寿命。

9. 如权利要求8所述的装置,包括处理资源,所述处理资源被配置为对于至少一些所述激励信号中的每一个,基于所述确定的至少一个荧光寿命来区分所述成像区域中的不同材料。

10. 如权利要求5至9中任一项所述的装置,其特征在于,所述脉冲和/或已调制光的脉冲和/或调制速率在0.1MHz和1000MHz之间,可选地在1MHz和100MHz之间。

11. 如权利要求5至10中任一项所述的装置,其特征在于,所述至少一个光源被配置为提供已调制光,并且所述时间分辨检测器被配置为执行已调制的荧光寿命成像。

12. 如权利要求5至11中任一项所述的装置,其特征在于,所述另一检测器包括光谱仪,每个激励信号包括脉冲和/或已调制光,并且所述光谱仪被配置为执行时间分辨光谱法。

13. 如权利要求12所述的装置,其特征在于,所述脉冲和/或已调制光的脉冲和/或调制

速率在0.1MHz和1000MHz之间,可选地在1MHz和100MHz之间。

14.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述至少一个光源包括多个光源,每个光源被配置为提供所述多种不同颜色中相应的一种的所述激励信号。

15.如权利要求14所述的装置,还包括转向装置,其被配置为将所述激励信号引导到所述公共传输路径,其中可选地,所述转向装置包括至少一个分色镜。

16.如前述权利要求中任一项所述的装置,还包括至少一个滤波器,其被布置为向所述响应信号的所述至少一部分或所述响应信号的所述另一部分进行滤波。

17.如权利要求16所述的装置,其特征在于,所述至少一个滤波器包括可变滤波器,例如滤光轮,与所述至少一个光源和/或检测器或另一检测器同步操作,以为从不同颜色的所述激励信号获得的所述响应信号提供不同的滤波。

18.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述控制器还被配置为控制所述单色检测器和/或另一检测器。

19.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述控制器被配置为使所述至少一个光源、所述检测器、所述另一检测器、分离器、所述滤波器、光圈元件、所述传输路径中的光圈元件、所述光路中的光圈元件中的至少两个同步操作。

20.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述光源或每个光源包括LED、激光二极管、连续波LED、连续波激光器、脉冲LED、脉冲激光器、可调制LED、超连续谱激光器中的至少一种。

21.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述激励信号包括可见光、紫外光、红外光中的至少一种。

22.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,每个所述激励信号占据在5ms和500ms之间的相应时间间隔,可选地在10ms和100ms之间,可选地在5ms和50ms之间,可选地小于50ms,可选地小于30ms,进一步可选地小于20ms。

23.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述激励信号使得能够在所述成像区域中存在的至少一种荧光材料中产生荧光,并且所述响应信号包括由所述至少一种荧光材料发射的荧光。

24.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,选择所述不同颜色的所述激励信号,以便在不同的荧光材料中产生荧光。

25.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述至少一种荧光材料包括至少一种智能探针,可选地至少一种智能探针,其被配置为在相应的至少一种生物目标的存在下和/或依赖于至少一种环境条件(例如pH、氧气、葡萄糖水平,二氧化碳),响应于至少一种所述激励信号而发荧光。

26.如权利要求25所述的装置,其特征在于,所述生物目标或每个生物目标包括以下组中的至少一种:细菌、真菌、酶、蛋白质、细胞、炎性细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、白细胞、上皮细胞、内皮细胞。

27.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述多个激励信号中的至少一个使得所述成像区域中的组织自发荧光。

28.如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述单色检测器包括单色相机、稳态相机、CMOS相机、CCD相机、红外相机、InGaAs相机中的至少一种。

29. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,每个激励信号包括连续波光。

30. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述多种不同颜色分布在大于100nm,可选地大于250nm,进一步可选地大于400nm的波长范围内。

31. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,被配置为以在0.1fps和400fps之间的帧速率提供所述多种不同颜色中的每种颜色的成像。

32. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,被配置为以至少0.1fps,可选地至少1fps,进一步可选地至少5fps,进一步可选地至少10fps的帧速率提供所述多种不同颜色中的每种颜色的成像。

33. 如前述权利要求中任一项所述的装置,还包括处理资源,其被配置为从所述图像数据产生代表至少一个图像的至少一个图像数据集。

34. 如权利要求33所述的装置,其特征在于,所述至少一个图像包括单个图像,例如叠加图像,其基于从响应于不同颜色的所述激励信号而获得的多个所述响应信号获得的图像数据。

35. 如权利要求33或34所述的装置,其特征在于,所述至少一个图像数据集代表来自所述相机的图像数据和来自至少一个所述另一检测器的数据的组合,例如荧光寿命成像数据或光谱数据。

36. 如前述权利要求中任一项所述的装置,包括所述处理资源或处理资源,其被配置为对准来自所述相机的图像数据和来自所述至少一个另一检测器的数据。

37. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,所述控制器被配置为接收用户输入并基于所述用户输入控制曝光时间、帧速率、脉冲速率、照明水平中的至少一个。

38. 如前述权利要求中任一项所述的装置,还包括至少一个光圈元件,其被配置为选择所述装置的视野的一部分,其中,所述图像数据代表所述成像区域的所述所选部分的图像。

39. 如从属于权利要求2的权利要求3至38中任一项所述的装置,其特征在于,所述光纤装置被配置为执行接触成像。

40. 如从属于权利要求2的权利要求3至38中任一项所述的装置,其特征在于,所述光纤装置由自聚焦透镜透镜化。

41. 如从属于权利要求2的权利要求3至40中任一项所述的装置,其特征在于,所述光纤装置包括多根光纤,并且其中,每根光纤的尺寸,可选地每根光纤和所述光纤之间的包层的尺寸,被选择为大于目标物体的尺寸,以便当所述目标物体相对于所述光纤移动时引起闪烁效应。

42. 如从属于权利要求2的权利要求3至41中任一项所述的装置,其特征在于,所述光纤装置的所述远端被配置为用于附着液滴,所述液滴包括组织、荧光材料中的至少一种。

43. 一种内窥镜成像方法,包括:

至少一个光源经由公共传输路径向成像区域提供激励信号,每个激励信号具有多种不同颜色中的一种;

由控制器控制所述至少一个光源,以提供作为重复时间交织序列的所述激励信号,所述重复时间交织序列至少包括第一种所述颜色的激励信号和第二种所述颜色的后续激励信号;以及

对于至少一些所述激励信号中的每一个,由单色检测器响应于所述激励信号接收从所

述成像区域发射的相应响应信号的至少一部分,并基于所述响应信号的所述至少一部分生成图像数据。

44. 如前述权利要求中任一项所述的装置,还包括光学元件,所述光学元件位于所述公共传输路径中并且被配置为将每个所述激励信号的至少一部分朝向所述成像区域反射,并且将每个所述响应信号的至少一部分传输到所述检测器。

45. 如权利要求44所述的装置,其特征在于,所述光学元件被配置为用作包括所述多种颜色中的至少一种的第一波长范围的分色镜,以及用作包括所述多种颜色中的至少另一种的不同的第二波长范围的分束器。

46. 如权利要求45所述的装置,其特征在于,所述装置被配置为使用具有所述多种颜色中的所述至少一种的激励信号来执行荧光成像,以及使用具有所述多种颜色中的所述至少另一种的激励信号来执行反射成像。

47. 如权利要求44至46中任一项所述的装置,其特征在于,所述光学元件是单个集成元件。

48. 如权利要求47所述的装置,其特征在于,所述光学元件包括薄膜干涉滤波器。

49. 一种内窥镜成像装置,包括:

至少一个光源,其被配置为经由公共传输路径向成像区域提供激励信号,每个激励信号具有多种不同颜色中的一种;

控制器,其被配置为控制所述至少一个光源以提供所述激励信号;

检测器,其被配置为对于至少一些所述激励信号中的每一个,响应于所述激励信号接收从所述成像区域发射的相应响应信号的至少一部分,并基于所述响应信号的所述至少一部分生成图像数据;以及

光学元件,其位于所述公共传输路径中,并且被配置为将每个所述激励信号的至少一部分朝向所述成像区域反射,并将每个所述响应信号的至少一部分传输到所述检测器;

其中,所述光学元件被配置为用作包括所述多种颜色中的至少一种的第一波长范围的分色镜,以及用作包括所述多种颜色中的至少另一种的不同的第二波长范围的分束器。

内窥镜成像装置及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于多色荧光和/或反射内窥镜的方法和装置。

背景技术

[0002] 可以使用内窥镜来进行人体或动物体内的成像。显微内窥镜可包括使用内窥镜来提供显微图像。显微内窥镜成像可以是基于相机的或共焦的。

[0003] 共焦显微内窥镜可包括在组织上扫描激光光斑以在特定深度处对组织成像。在一些情况下,共焦显微内窥镜可以在小于20 μ m至30 μ m的范围内将组织光学切片。

[0004] 基于相机的显微内窥镜(其也可以称为宽视野显微内窥镜)可以包括一次成像整个视野,而不是扫描。基于相机的显微内窥镜可以捕获来自组织深处的信号。然而,在一些情况下,在基于相机的内窥镜中获取的信号可能如此模糊以至于产生不想要的背景。

[0005] 在下面的描述中,术语“宽视野”可以用于表示基于相机的。

[0006] 临床分子影像(MI)可涵盖广泛的技术,包括荧光、正电子发射断层扫描(PET)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)和磁共振成像(MRI)。

[0007] MI旨在通过利用针对组织中特定疾病目标的目标报告分子(可以称为智能探针)来改善诊断。智能探针可以包含可以通过与特定目标相互作用而被激活(或失活)的探针。例如,智能探针的发光特性可以在与目标的相互作用上改变。

[0008] 光学分子成像(OMI)已被证明可有效对抗多种疾病目标,例如细菌感染,炎症和癌症。已经设计了几种候选智能探针,例如针对中性粒细胞募集、细菌检测和纤维增生的智能探针。

[0009] 可能需要方法以理解人体肺部以及人体和其他动物体内的其他器官和组织中的疾病过程。尽管进行了数十年的研究和众多疾病模型,但对于可能导致人类肺病或其他人类疾病的疾病病理学的动态事件知之甚少。

[0010] 危重病患者的肺部炎症和感染可能具有高水平的死亡率,通常高于70%。死后,肺炎可能在病理学上定义为渗入细菌和炎症细胞的肺泡(远端肺)组织的活组织检查。从活着的患者获得有关细菌信息的信息可能更困难。确定呼吸系统重症监护中细菌负荷的最常用方法依赖于支气管肺泡灌洗液(BALF)的培养。在支气管肺泡灌洗液中,将液体引入患者肺部,然后收集进行检查。危重病患者中BALF的主要局限之一可能是产生结果所需的时间,最长可达48小时。另一个问题可能是近端气道取样造成的污染。在获得BALF结果之前的这段干预时间内,患者可能会被处方不当或在等待确诊时迅速恶化。

发明内容

[0011] 在本发明的第一方面,提供了一种内窥镜成像装置,包括:至少一个光源,被配置为经由公共传输路径向成像区域提供激励信号,每个激励信号具有多种不同颜色中的一种;控制器,其被配置为控制至少一个光源以提供作为重复时间交织序列的激励信号,该序列至少包括第一种颜色的激励信号和第二种颜色的后续激励信号;以及单色检测器,其被

配置为对于至少一些激励信号中的每一个,响应于激励信号接收从成像区域发射的相应响应信号的至少一部分,并基于响应信号的至少一部分生成图像数据。

[0012] 通过使用不同颜色的激励信号,可以同时成像多个疾病目标。与单色激励光相比,可以获得更多信息。通过提供作为重复时间交织序列的目标,可以合适的帧速率(例如以视频速率)获得来自不同颜色的激励信号的图像数据。来自不同颜色的图像数据可用于创建多色图像。

[0013] 不同颜色的数量可以是例如三、四、五或六种或更多。重复时间交织序列可以至少包括第一种颜色的激励信号,第二种颜色的后续激励信号,以及第三种颜色的另一后续激励信号。

[0014] 至少一个光源和单色检测器可以耦合到光纤装置的近端。光纤装置可以包括公共传输路径的至少一部分。成像区域可以位于光纤装置的远端处或附近。使用公共传输路径可以降低装置的复杂性。

[0015] 该装置可以包括另一检测器和可选的分离设备,其被配置为从成像区域接收响应信号,以将响应信号的至少一部分传递到单色检测器并将响应信号的另一部分传递到另一检测器。使用一个以上的检测器可以允许获得增加的信息。响应信号的分离可以确保由另一检测器接收的光对应于在单色检测器处接收的光。

[0016] 单色检测器可以被配置为接收响应信号的至少一部分。另一检测器可以被配置为至少部分地经由相同的光路接收响应信号的另一部分。至少部分地经由相同光路接收响应信号的至少一部分和响应信号的另一部分可以降低装置的复杂性。

[0017] 另一检测器可以包括光谱仪或时间分辨检测器,例如荧光寿命成像 (FLIM) 检测器。每个激励信号可以包括脉冲和/或已调制光。单色检测器或者另一检测器可以包括时间分辨检测器,其被配置为对于每个激励信号响应于激励信号,执行从成像区域发射的响应信号的至少一部分或另一部分的荧光寿命成像 (FLIM)。FLIM的使用可以允许获得关于成像区域的增加的信息。

[0018] 时间分辨检测器可以包括时间分辨相机、时间选通增强型CCD相机、时间选通增强型sCMOS相机、CMOS SPAD阵列、可调制相机中的至少一个。

[0019] 对于每个激励信号,时间分辨检测器可以被配置为确定至少一个荧光寿命。

[0020] 该装置还可以包括处理资源,该处理资源被配置为针对至少一些激励信号中的每一个,基于所确定的至少一个荧光寿命来区分成像区域中的不同材料。

[0021] 脉冲和/或已调制光的脉冲和/或调制速率在0.1MHz和1000MHz之间,可选地在1MHz和100MHz之间。

[0022] 至少一个光源可以被配置为提供已调制光。时间分辨检测器可以被配置为执行已调制FLIM。

[0023] 另一检测器可包括光谱仪。每个激励信号可以包括脉冲和/或已调制光。光谱仪可以被配置为执行时间分辨光谱法。

[0024] 脉冲和/或已调制光的脉冲和/或调制速率在0.1MHz和1000MHz之间,可选地在1MHz和100MHz之间。

[0025] 至少一个光源可包括多个光源,每个光源被配置为提供多种不同颜色中的相应一种的激励信号。使用多个光源可以允许以简单和/或成本有效的方式提供时间交织序列。

[0026] 该装置还可以包括转向装置,其被配置为将激励信号引导到公共传输路径,其中可选地,转向装置包括至少一个分色镜。

[0027] 该装置还可以包括至少一个滤波器,其被布置向响应信号的至少一部分或响应信号的另一部分进行滤波。

[0028] 至少一个滤波器可包括可变过滤器,例如滤光轮。可变滤波器可以为从不同颜色的激励信号获得的响应信号提供不同的滤波。可变滤波器可以与至少一个光源和/或检测器或另一检测器同步操作,以为从不同颜色的激励信号获得的响应信号提供不同的滤波。

[0029] 控制器还可以被配置为控制单色检测器和/或另一检测器。

[0030] 控制器可以被配置为使至少一个光源、检测器、另一检测器、分离器、滤波器、光圈元件、传输路径中的光圈元件、光路中的光圈元件中的至少两个同步操作。

[0031] 该光源或每个光源可包括LED、激光二极管、连续波LED、连续波激光器、脉冲LED、脉冲激光器、可调制LED、超连续激光器中的至少一种。

[0032] 激励信号可包括可见光、紫外光、红外光中的至少一种。至少有一种颜色可以是可见的。至少一种颜色可以是红外线。至少一种颜色可以是紫外线。

[0033] 每个激励信号可以占据在5ms和500ms之间的相应时间间隔,可选地在10ms和100ms之间,可选地在5ms和50ms之间,可选地小于50ms,可选地小于30ms,进一步可选地小于20ms。激励信号的长度可以使得由在时间上相邻的激励信号生成的图像数据形成的图像可以不需要配准。

[0034] 激励信号使得能够在成像区域中存在的至少一种荧光材料中产生荧光。响应信号可包括由至少一种荧光材料发射的荧光。

[0035] 可以选择不同颜色的激励信号,以便在不同的荧光材料中产生荧光。

[0036] 至少一种荧光材料可包括至少一个智能探针,可选地至少一个智能探针,其被配置为在相应的至少一种生物目标的存在下和/或依赖于至少一种环境条件(例如pH、氧气、葡萄糖水平,二氧化碳),响应于至少一种激励信号而发荧光。

[0037] 生物目标或每个生物目标可包括以下组中的至少一种:细菌、真菌、酶、蛋白质、细胞、炎性细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、白细胞、上皮细胞、内皮细胞。

[0038] 激励信号可以使得可能存在于成像区域中的至少一种材料反射。响应信号可包括由所述至少一种材料反射的反射光。

[0039] 多个激励信号中的至少一个可以使得成像区域中的组织自发荧光。

[0040] 单色检测器可以包括单色相机、稳态相机、CMOS相机、CCD相机中的至少一个。

[0041] 每个激励信号可以包括连续波光。

[0042] 多种不同颜色可以分布在大于100nm,可选地大于250nm,进一步可选地大于400nm的波长范围内。

[0043] 该装置可以被配置为以在0.1fps和400fps之间的帧速率提供多种不同颜色中的每种颜色的成像。

[0044] 该装置可以被配置为以至少0.1fps,可选地至少1fps,进一步可选地至少5fps,进一步可选地至少10fps的帧速率提供多种不同颜色中的每种颜色的成像。该装置可以被配置为以在0.1fps和400fps之间的帧速率提供多种不同颜色中的每种颜色的成像。该装置可以向临床医生提供实时信息。

[0045] 该装置还可以包括处理资源,该处理资源被配置为从图像数据产生代表至少一个图像的至少一个图像数据集。

[0046] 至少一个图像可以包括单个图像,例如叠加图像,其基于从响应于不同颜色的激励信号而获得的多个响应信号获得的图像数据。

[0047] 至少一个图像数据集可以代表来自相机的图像数据和来自至少一个另一检测器的数据的组合,例如FLIM数据或光谱数据。来自至少一个另一检测器的图像数据和数据的组合可以允许将更多信息呈现给用户。来自至少一个另一检测器的图像数据和数据的组合可以允许区分更多数量的生物目标。

[0048] 该装置可以包括处理资源或处理资源,其被配置为对准来自相机的图像数据和来自至少一个另一检测器的数据。

[0049] 控制器可以被配置为接收用户输入并基于用户输入控制曝光时间、帧速率、脉冲速率、照明水平中的至少一个。

[0050] 该装置还可包括至少一个光圈元件。至少一个光圈元件可以被配置为选择装置的视野的一部分,其中图像数据代表成像区域的所选部分的图像。

[0051] 光纤装置可以被配置为执行接触成像。

[0052] 该光纤装置可以由自聚焦透镜透镜化。

[0053] 光纤装置可包括多个光纤。可以选择每根光纤的尺寸为大于目标物体的尺寸。可以选择每个光纤和光纤之间的包层的尺寸为大于目标物体的尺寸。可以选择每根光纤的直径为大于目标物体的尺寸。每根光纤的尺寸可以大于目标物体的尺寸,以便当目标物体相对于光纤移动时引起闪烁效应。物体的尺寸小于每根光纤的包层可能导致闪烁效应。当目标物体相对于多个光纤移动时,它可以在光纤和包层之间移动,因此改变可见度。目标物体可包括以下组中的至少一种:细菌、真菌、酶、蛋白质、细胞、炎性细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、白细胞、上皮细胞、内皮细胞。光纤可以由任何合适的材料制成和/或包括任何合适的材料,例如任何合适的玻璃或塑料材料。

[0054] 光纤装置的远端可以被配置用于附着液滴。液滴可包括组织、荧光材料中的至少一种。荧光材料可包括至少一种探针,可选的至少一种智能探针。可以在液滴上进行成像和/或光谱分析。液滴的使用可以提供可以基本上没有组织背景的成像和/或光谱分析。

[0055] 该装置还可包括位于公共传输路径中的光学元件。光学元件可以被配置为或可配置为将每个激励信号的至少一部分朝向成像区域反射,并且将每个响应信号的至少一部分传输到检测器。

[0056] 光学元件可以被配置为用作包括多种颜色中的至少一种的第一波长范围的分色镜,以及用作包括多种颜色中的至少另一种的不同的第二波长范围的分束器。

[0057] 光学元件可以被配置为基本上反射第一波长范围内的所有入射光。光学元件可以被配置为反射第一波长范围内的大部分入射光。对于第一波长范围内的入射光,光学元件可以被配置为反射大于70%的入射光,可选地大于80%的入射光,进一步可选地大于90%的入射光,进一步可选地大于95%的入射光。对于第一波长范围内的入射光,光学元件可以被配置为传输小于20%的入射光,可选地小于10%的入射光,进一步可选地小于5%的入射光。

[0058] 可能无法制造光学元件,使得第一波长范围内的所有入射光都被反射。然而,第一

波长范围内的入射光传输的量可以是最小的或可忽略的。

[0059] 光学元件可以被配置为或可配置成在与响应于第一波长范围内的光而产生的荧光相对应的另一波长范围内传输基本上所有的入射光。对于在另外波长范围内的入射光，光学元件可以被配置为传输大于70%的入射光，可选地大于80%的入射光，进一步可选地大于90%的入射光，进一步可选地大于95%的入射光。

[0060] 光学元件可以被配置为或可配置为通过传输第一部分光并反射第二部分光而将第二波长范围内的入射光分成两部分。这些部分的比例可以在80/20和20/80之间，可选地在60/40和40/60之间，进一步可选地在55/45和45/55之间。

[0061] 光学元件可以被配置为用作包括多种颜色中的至少一种的第一波长范围的分色镜，以及用作包括多种颜色中的另一种的不同的第二波长范围的分束器，以用于以在30%至60%之间的角度入射在分色镜上的光，可选地在40%至50%之间的角度入射在分色镜上的光。

[0062] 光学元件可以是单个集成元件。光学元件可包括薄膜干涉滤波器。

[0063] 该装置可以被配置为使用具有第一种多种颜色中的至少一种的激励信号来执行荧光成像，以及使用具有第二种多种颜色中的至少一种的激励信号来执行反射成像。

[0064] 在本发明的另一方面，提供了一种内窥镜成像装置，包括：至少一个光源，其被配置为经由公共传输路径向成像区域提供激励信号，每个激励信号具有多种不同颜色中的一种；控制器，其被配置为控制至少一个光源以提供激励信号；检测器，其被配置为对于至少一些激励信号中的每一个，响应于激励信号接收从成像区域发射的相应响应信号的至少一部分，并基于响应信号的至少一部分生成图像数据；以及光学元件，其位于公共传输路径中，并且被配置为将每个激励信号的至少一部分朝向成像区域反射，并将每个响应信号的至少一部分传输到检测器；其中光学元件被配置为用作包括多种颜色中的至少一种的第一波长范围的分色镜，以及用作包括多种颜色中的至少另一种不同的第二波长范围的分束器。

[0065] 在本发明的另一方面，提供了一种如本文所要求保护或描述的集成的，整体的或统一的光学元件。光学元件可以是单个光学元件，其被配置为用作包括多种颜色中的至少一种的第一波长范围的分色镜，以及用作包括多种颜色中的至少一种不同的第二波长范围的分束器。

[0066] 在本发明的另一方面，提供了一种内窥镜成像方法，包括：经由公共传输路径将至少一个光源激励信号提供给成像区域，每个激励信号具有多种不同颜色中的一种；由控制器控制至少一个光源，以提供作为重复时间交织序列的激励信号，该序列至少包括第一种颜色的激励信号和第二种颜色的后续激励信号；以及，对于至少一些激励信号中的每一个，由单色检测器响应于激励信号接收从成像区域发射的相应响应信号的至少一部分，并基于该响应信号的至少一部分产生图像数据。

[0067] 一个方面的特征可以适当地作为任何其他方面的特征提供。例如，可以提供方法的特征作为装置的特征，反之亦然。一个方面中的任何一个或多个特征可以与任何其他方面中的任何合适的特征组合提供。

附图说明

- [0068] 现在通过非限制性示例描述本发明的实施例,并且在以下附图中示出,其中:
- [0069] 图1是根据一个实施例的三色荧光系统的示意图;
- [0070] 图2a是四个或更多LED的组合的示意图;
- [0071] 图2b是示出LED的脉冲的曲线图;
- [0072] 图3表示显示三种颜色的离体肺组织成像的图像;
- [0073] 图4是来自肺组织的多个光谱的曲线图;
- [0074] 图5a是实施例的激励光谱曲线图;
- [0075] 图5b是实施例的发射光谱曲线图;
- [0076] 图6a示出了离体人肺部组织的稳态相机图像;
- [0077] 图6b示出了使用百万帧(Megaframe)相机获得的单光子计数图像;
- [0078] 图6c示出了使用百万帧相机获得的FLIM图像;
- [0079] 图6d是来自肺组织的样本衰变曲线图;
- [0080] 图7a是概括地表示实施例的方法的流程图;
- [0081] 图7b是概括地表示另一实施例的方法的流程图;
- [0082] 图8是双色荧光系统的示意图;
- [0083] 图9是图8系统的LED光源光谱和发射滤波器吸收曲线的曲线图;
- [0084] 图10是使用图6系统的发射滤波器和拜耳滤波器曲线重叠的荧光发射曲线图;
- [0085] 图11a和11b是由相机获取的光纤束的图像;
- [0086] 图12a是使用偶数荧光信号照射的USAF 1951测试目标的图像;
- [0087] 图12b是图12a的USAF 1951测试目标的第6组元件的线轮廓;
- [0088] 图13是光谱通量的曲线图;
- [0089] 图14a,14b和14c分别是 $-5\mu\text{m}$ 、 $0\mu\text{m}$ 和 $+5\mu\text{m}$ 焦点偏移的点的图像;
- [0090] 图15a示出了穿过绿色微球的绿色通道的线轮廓;
- [0091] 图15b示出了穿过红色微球的红色通道的线轮廓;
- [0092] 图16a是具有0.3% Inspeck微球的20fps图像;
- [0093] 图16b是具有3% Inspeck微球的20fps图像;
- [0094] 图16c是具有0.3% Inspeck微球的200fps图像;
- [0095] 图16d是具有3% Inspeck微球的200fps图像;
- [0096] 图17a,17b和17c分别是包括单核细胞、中性粒细胞和真菌的离体肺组织中目标的图像;
- [0097] 图18a和18b分别是没有和有细菌的离体肺组织的图像;
- [0098] 图19a,19b和19c是三个图像的序列,显示了在光纤芯之间移动的细菌闪烁的一种机制;
- [0099] 图20a是在1mW 470nm LED照射下对背景可见的0.3% Inspeck微球的图像;
- [0100] 图20b是在2.4mW 470nm LED照射下对背景不可见的0.3% Inspeck微球的图像;
- [0101] 图21是光纤束荧光光谱的曲线图;
- [0102] 图22是分色镜/反射器的示意图;以及
- [0103] 图23是三个波段的传输曲线图。

具体实施方式

[0104] 图1是根据实施例的基于相机的(宽视野)荧光显微内窥镜系统的示意图。图1的系统基于光源的顺序脉冲。图1的系统包括使用快速CMOS相机和三个不同波长的触发LED以生成多色荧光的光学设备。图1的系统可以经由基于相机的(宽视野)检测提供低成本且简单的多色荧光内窥镜路线。

[0105] 除了组织的多色荧光成像之外,图1的系统还被配置为提供光谱。在其他实施例中,可以省略系统的光谱能力。

[0106] 在本实施例中,图1的系统用于经由光纤束对远端肺中的组合生理学(例如组织结构)和病理学(细菌和/或中性粒细胞的存在)进行成像。图1的系统可用于同时成像和/或检测许多不同的疾病目标,例如成像和/或检测细菌、中性粒细胞、巨噬细胞或真菌中的一种或多种。多种颜色的使用以及多色和光谱的组合可以允许区分不同的疾病目标。

[0107] 进一步的实施例可以被配置为用于对不同的解剖区域成像。进一步的实施例可以被配置为用于成像和/或检测不同的疾病目标。

[0108] 图1的系统包括光学仪器、光纤束40和PC 90。光学仪器包括除光纤束40和PC 90之外的图1系统的所有组件,并且容纳在单个外壳中。在其他实施例中,图1的组件可以任何合适的方式被布置为一个或多个装置,并且可以适当地容纳在一个或多个外壳中。图1的每个组件可以由提供单个组件功能的多个组件代替,或者图1的多个组件可以由具有多个组件功能的单个组件代替。在一些实施例中,省略了图1中所示的一个或多个组件,或者添加了附加组件。例如,在一些实施例中,提供了一种单元,其包括光源、控制电子器件,并且在一些情况下包括光谱仪或FLIM检测器,并且提供包括单色相机的单独单元。在一些实施例中,提供了一种便携式单元,其包括光学组件和单色相机,并且还提供了包括光源,触发单元和光谱仪的单元。便携式单元可包括显示器。在某些情况下,在便携式单元中提供显示器可以提高对临床医生的可用性。在替代实施例中可以提供包括组件的不同组合的单元的任何其他合适的组合。使用两个或更多单元可以提供模块化。

[0109] 图1的系统包括三个不同颜色的光源1,2,3。不同颜色的光源可以是配置为发射不同频率的光的光源,例如具有不同范围或波段的光。每个光源1,2,3可以发射不同频率范围或波段的光。范围或波段可以至少部分重叠。光可以是人眼可见的或人眼不可见的光,并且可以是电磁光谱的任何合适的部分。每个光源1,2,3可以发射具有不同频谱的光。每种不同颜色可包括可见光、红外光或紫外光。

[0110] 在本实施例中,光源是近红外LED 3(780nm,3mW功率),红色LED 2(625nm,3mW功率)和蓝色LED 1(470nm,2mW功率)。在其他实施例中,可以使用任何合适的光源。例如,光源可以包括LED或激光二极管。光源可以是稳态,例如连续波(CW)LED或CW激光器。光源可以是脉冲的或可调制的。例如,光源可包括脉冲LED,脉冲激光器或可调制LED光源。

[0111] 可以使用任何合适数量的不同颜色的光源,例如三、四、五或六个或更多个光源。在一些实施例中,使用更多数量的不同颜色的光源可以允许更多数量的疾病目标被成像和/或检测。

[0112] 在一些实施例中,单个光源可用于在不同时间提供不同颜色的光。例如,不同颜色的光可以由单个超连续谱激光器提供,其前面具有适当快速的滤波器,例如声光滤波器。

[0113] 图1的系统还包括第一分色镜20、第二分色镜22、多波段激励滤波器24、光圈控制

器25和多波段分色镜26。第一分色镜20被配置为组合来自光源3和光源2的光。第二分色镜22被配置为将第一分色镜20的输出与来自光源1的光组合。由此将来自三个光源1,2,3的光组合并准直到单个传输路径。

[0114] 尽管本实施例使用三个LED,但是在其他实施例中,可以使用更多数量的LED。图2a示出了可以将多个($N > 3$) LED组合成单个路径。每个LED由聚光透镜准直,合适的分色镜反射该准直光束。每个分色镜的限制包括每个分色镜需要反射其各自的LED并且使所有LED进一步向上链接到LED N。例如,图2a的LED 2的分色镜需要反射来自LED 2的光并且传输从高达LED N数量的LED的光。

[0115] LED的准直光束朝向多波段滤波器22和多波段分色镜26。在一些实施例中,每个LED不需要具有单独的波段。几个LED可以提供相同的波段。例如,本实施例的配置具有430nm至500nm的蓝色波段。该波段中的三个标准LED波长是455nm、470nm和490nm,每个LED可用于潜在的宽蓝色LED照明或荧光团的有序激励,并与所涉及的LED的吸收光谱匹配。这可以产生多个绿色荧光图像,其可以通过应用标准光谱解混技术适当地合并。

[0116] 多波段激励滤波器24和光圈控制器25定位成使得从第二分色镜22射出的光在从多波段分色镜26反射之前通过多波段激励滤波器24,然后通过光圈控制器25。

[0117] 图1的系统还包括显微镜物镜30和光纤成像束40。光纤束40具有近端42和远端44。显微镜物镜30耦合到光纤束40的近端42。来自所有三个光源1,2,3的光沿着单个光路通过显微镜物镜30并进入光纤束40。多波段分色镜26被定位成将从多波段分色镜26反射的光引导到显微镜物镜30中并由此进入光纤束40。

[0118] 在本实施例中,显微镜物镜30是玻璃显微镜物镜。显微镜物镜30可以是任何合适的无限远校正的折射物镜,例如Thorlabs RMS10x。在一些实施例中,可以使用反射显微镜代替玻璃显微镜。使用反射显微镜可能导致消色差系统较少。在图1的系统中,其使用显微镜物镜中的透镜,不同颜色的光可能不会聚焦在完全相同的位置。如果使用凸面镜而不是透镜,则不同颜色的光可以相同的方式反射。显微镜物镜30可以是任何合适的反射物镜,例如Edmund Optics#59-888。由于设计中的宽带反射镜,反射物镜可能本质上是消色差的,这可以允许从UV到IR获得更好的多色成像性能。

[0119] 在使用中,光纤束40的远端44定位在人或动物对象的体内,例如在患者的肺内。可以使用任何合适方法在受试者体内部署光纤束40。

[0120] 在本实施例中,图1的系统与柔性支气管镜结合使用,用于远端肺部的成像。选择的光纤束40比支气管镜的工作通道窄。现代柔性支气管镜上可用的工作通道的直径可以在例如1mm至3mm的范围内。光纤束的直径可以选择为例如小于1mm或小于2mm。

[0121] 现代柔性支气管镜的直径可以是例如4mm至6mm。在某些情况下,柔性支气管镜可能能够进入气管、支气管和细支气管,但本身可能无法进入远端肺部。

[0122] 窄光纤束40穿过支气管镜的工作通道插入并从工作通道部署到远端肺部。因为光纤束40比支气管镜窄,所以它可以进一步延伸到远端肺中。可以使用比支气管镜窄的微内窥镜探针(诸如光纤束40),以通过经支气管传递安全进入远端肺(肺泡区域)。

[0123] 支气管镜介入治疗可持续长达60分钟(例如,20至30分钟),并且可通过先前的X射线照片或计算机断层(CT)扫描来引导导航。可以部署自动导航软件。

[0124] 在使用中,当光纤束40的远端位于受试者体内时,来自光源1,2,3的光沿光纤束40

向下传递到其远端44。来自所有三个光源1,2,3的光遵循公共光路。然而,来自不同光源的光在不同时间被传输,如下面参考图2b所述。

[0125] 来自光源1,2,3的光照射成像区域中的组织。成像区域是位于光纤束40的远端处或附近的区域,并且可以与光纤束40的远端44接触。例如,成像区域可以在对应于光纤束40的视野的区域上延伸,并且可以延伸到组织中达例如100 μm 或200 μm 的深度。对于不同波长的光,成像区域的延伸范围可以是不同的。在一些实施例中,一种或多种探针的分子(例如,一种或多种智能探针)可以存在于成像区域中,如下文更详细描述。

[0126] 在本实施例中,光纤成像束40是来自法国巴黎的Mauna Kea Technologies的AlveoflexTM内窥镜。光纤成像束40包括25000个芯,并且具有600 μm 直径(视野)和0 μm 工作距离。零工作距离需要触摸要成像的组织。因此,成像区域包括与内窥镜接触的组织。零工作距离可能与捕获大量发射的荧光有关。在其他实施例中,可以使用任何合适的光纤束,例如具有任何合适数量的芯的光纤束。

[0127] 来自每个光源1,2,3的光激发成像区域中的组织和/或智能探针。来自不同光源的光可以激发不同的材料,例如不同的智能探针。响应于来自每个光源1,2,3的光的激励,从成像区域发射荧光。荧光由光纤束40的远端44收集并传递到光纤束40的近端42。

[0128] 在其他实施例中,由光纤束40收集的光可以是反射光,即在解调波长处的光。例如,可以利用透镜化光纤束40执行反射成像,例如由自聚焦透镜(GRIN)透镜化的光纤束40。在一些实施例中,纤维束用于暗场成像,其可以是反射的。

[0129] 图1的系统还包括位于滤光轮(未示出)上的多波段发射滤波器50,以及另一个光圈控制器52。从光纤束40的远端44返回的荧光通过显微镜物镜30,通过多波段分色镜26,通过多波段发射滤波器50,然后通过另一个光圈控制器52。

[0130] 在本实施例中,滤光轮是手动的。在其他实施例中,滤光轮可以是电机控制的。在一些实施例中,滤光轮的控制可以用作优化步骤。例如,如果感兴趣的仅是绿色荧光,则可以从滤光轮中选择仅绿色滤波器以抑制红色荧光。

[0131] 在进一步的实施例中,任何适当的组件可以是电动机控制的,例如分束器60(下面描述)。在一些实施例中,可以自动控制任何适当的组件,例如任何适当的滤光轮、分束器、分色镜、虹膜或光圈。

[0132] 光圈控制器25,52可以用于选择光纤束40的视野的一部分。然后可以在视野的选定部分上执行成像和/或光谱分析,其可以是总可用视野的一部分。在进一步的实施例中,可以从系统中省略光圈控制器25,52。

[0133] 图1的系统还包括分束器60、透镜62和光谱仪64。分束器60接收已经通过多波段发射滤波器50和光圈控制器52的荧光。在本实施例中,分束器60是一个90:10的分束器,并被配置为经由透镜62将其接收的光的10%发送到光谱仪64。在其他实施例中,分束器60可以将不同比例的光发送到光谱仪64。例如,分束器60可以是50:50的分束器。在进一步的实施例中,可以不存在光谱仪64。在一些这样的实施例中,可以省略分束器60和透镜62。

[0134] 图1的系统还包括镜筒透镜70、反射镜72和检测器80。在本实施例中,检测器80是单色CMOS(互补金属氧化物半导体)相机80。分束器60被配置为发送通过镜筒透镜70接收的荧光的90%。已经通过镜筒透镜70的荧光从反射镜72反射到单色CMOS相机80中。

[0135] 在其他实施例中,可以使用任何合适的检测器80。检测器80可以是任何合适的相

机,例如任何合适的CMOS或CCD相机。检测器80可以是任何合适的单色相机。单色相机可以是相机,其中基本上相机的所有传感器元件被配置为在由相机感测的整个频率范围内响应或获取光。基本上所有传感器元件可以具有相同的灵敏度分布。(相比之下,彩色相机可以是其中不同的传感器元件被配置为响应巡回获取不同颜色的相机,例如通过使用拜耳滤波器。)单色相机可以被配置为接受一系列波长的光,其包括响应于光源1,2,3中的每一个的照射而由成像区域发射的荧光的波长。

[0136] 图1的系统还包括计算装置90和触发单元100。在本实施例中,计算装置90包括具有专用软件的PC。在其他实施例中,可以使用任何合适的计算装置90。

[0137] 在其他实施例中,单个装置可以提供计算装置90和触发单元100的功能。在进一步的实施例中,计算装置90和/或触发单元100的功能可以分布在多个装置之间。

[0138] 在本实施例中,计算装置90连接到单色相机80、光谱仪64和触发单元100。PC 90经由通信链路92连接到单色CMOS相机80,在本实施例中,通信链路92是USB3链路。在进一步的实施例中,通信链路92可以包括任何快速链路,例如USB3、千兆以太网、火线或相机链路。PC 90经由通信链路94连接到光谱仪64,在本实施例中,通信链路94是USB2链路。PC 90经由通信链路96连接到触发单元100,通信链路96在本实施例中是USB2链路。通信链路94,96中的每一个可包括任何合适的链路。单色相机80、光谱仪64和触发单元100中的每一个可以经由其相应的链路从PC90接收信息和/或向PC 90发送信息。

[0139] 触发单元100分别通过通信链路101,102和103连接到光源1,2,3。触发单元100通过通信链路105连接到单色CMOS相机80,并通过通信链路106连接到光谱仪64。通信链路101,102,103,105,106每个可包括任何合适的链路,例如USB3、千兆以太网或火线。

[0140] 触发单元100可以被描述为控制器。触发单元100被配置为控制光源1,2,3、单色相机80和光谱仪64的定时,使得单色相机80和光谱仪64与光源1,2,3同步。在其他实施例中,触发单元100被配置为控制更多数量的光源的定时。

[0141] 触发单元100以预定义的顺序打开和关闭光源1,2,3。在图2b的图中表示了由本实施例中的触发单元100触发光源1,2,3。

[0142] 触发单元100以30ms的时间间隔接通光源1(蓝色LED,470nm)。在该30ms时间间隔期间由蓝色LED 1发射的光可以被描述为30ms脉冲。在该30ms时间间隔期间由蓝色LED 1发射的光可以被描述为具有30ms持续时间的激励信号。如上参照图1所述,激励信号被传输到成像区域。激励信号激励成像区域中的荧光材料。响应于激励信号,荧光材料发射包括荧光的响应信号。

[0143] 触发单元100触发单色相机80以获取与激励信号的时间间隔同步的30ms时间间隔的数据。单色相机80响应于激励信号接收由成像区域发射的部分响应信号。(在本实施例中,单色相机80可以接收由分束器接收的90%的荧光。)

[0144] 单色相机80使用其接收的响应信号的一部分来获得第一组图像数据。第一组图像数据表示当由来自蓝色LED 1的30ms激励信号照射时成像区域的图像。该组图像数据可包括相机80的每个像素的强度值。强度值可以对应于每个像素接收的荧光量。

[0145] 尽管未在图2b中示出,但是触发单元100还触发光谱仪64以获取同步的30ms时间间隔的数据。光谱仪64响应于激励信号接收由成像区域发射的部分响应信号。(在本实施例中,光谱仪64可以接收由分束器接收的10%的荧光。)光谱仪64获得响应信号的光谱,即由

成像区域响应激励信号发射的荧光光谱。

[0146] 触发单元100对相机80、光谱仪64和光源3的同步允许响应于来自光源3的激励在该30ms周期内接收的响应信号与光源3相关联。在进一步的实施例中,触发单元100还可以使滤波器50的操作同步。触发单元100可以使分束器60的操作同步。触发单元100可以使发射路径中的激励路径和/或光圈元件52中的光圈元件25的操作同步。

[0147] 接下来是短的间隔(例如,5ms),其中触发单元100关闭所有光源1,2,3。在该间隔中,相机80和光谱仪64也可以关闭和/或相机80和光谱仪64可以不记录任何接收的数据。在一些实施例中,相机80和光谱仪64连续记录数据,但激励信号之间的短间隔内的数据不用于后续处理。

[0148] 然后,触发单元100以30ms的时间间隔接通光源2(红色LED,625nm),以提供第二激励信号。第二激励信号激励成像区域中的荧光材料(其可以是由第一蓝色激励信号激发的与该荧光材料不同的荧光材料)。触发单元100触发相机80和光谱仪64以获取与在光源2开启时的30ms周期同步的时间间隔的数据。相机80和光谱仪64中的每一个响应于第二激励信号接收由成像区域中的荧光材料发射的响应信号的一部分。相机80获得第二组图像数据。光谱仪64获得第二光谱。

[0149] 触发单元100以另一个短的间隔(例如,5ms)将所有光源1,2,3关闭,其中相机80和光谱仪64可以不记录数据。

[0150] 然后,触发单元100以30ms的时间间隔接通光源3(近红外LED,780nm),以提供第三激励信号。第三激励信号激发成像区域中的荧光材料(其可以是由第一和/或第二激励信号激发的与该荧光材料不同的荧光材料)。触发单元100触发相机80和光谱仪64以获取与在光源2开启时的30ms周期同步的时间间隔的数据。相机80和光谱仪64中的每一个响应于第三激励信号接收由成像区域中的荧光材料发射的响应信号的一部分。相机80获得第三组图像数据。光谱仪64获得第三光谱。

[0151] 相机80将第一,第二和第三组图像数据发送到PC 90。PC 90使用第一,第二和第三组图像数据来生成并向用户显示三色图像,其中三色的光源中的每一种的图像被覆盖。

[0152] 在其他实施例中,PC90、相机80或另外的处理设备可以将第一、第二和第三组图像数据存储在存储器中。PC90、相机80或另外的处理设备可以使用第一、第二和第三组图像数据来生成并且可选地向用户显示对应于第一、第二和第三激励信号的相应的第一、第二和第三图像。PC90、相机80或另外的处理设备可以使用第一、第二和第三组图像数据来生成并可选地向用户显示三色图像,其中三种颜色中的每一种的图像被覆盖。

[0153] 在一段时间内重复图2b中所示的激励信号的100ms三色时间交织序列,例如以几秒或几分钟的时间段。尽管图2b仅示出了光源1,2,3和相机80的触发序列,但是光谱仪64也在与相机80相同的时间被触发。

[0154] 触发光源以提供重复的激励信号序列(在这种情况下,1,2,3,1,2,3等),其中来自每个光源的激励信号是时间交织的。每个激励信号包括来自相应一个光源的光脉冲。来自每个光源的光以交替的时间间隔提供给成像区域。

[0155] 单色相机80和光谱仪64的触发允许光源开/关序列中的每个间隔与限定的荧光通道相关联。

[0156] 对于图2b的三色序列的每次重复,PC 90根据响应于该重复的第一,第二和第三激

励信号而获得的图像数据生成并显示相应的三色图像。PC 90通过覆盖三种颜色中的每种颜色的图像来获得三色图像。PC 90以10帧/秒 (fps) 的帧速率生成并显示三色图像。在其他实施例中,可以为每个单独的激励信号生成图像,图像在蓝色、红色和近红外照射之间交替。例如,可以每秒获得30个图像,包括在蓝色照射下的成像区域的10个图像,在红色照射下的10个图像和在近红外照射下的10个图像。

[0157] 在本实施例中,已经发现LED被触发的速度足够快,使得三种不同颜色的每个叠加图像很好地被对准。在其他实施例中,可以使用任何合适的方法来覆盖不同颜色的图像。

[0158] 对于每个激励信号,光谱仪64和/或PC 90可用于分析由光谱仪64从相应的响应信号获得的光谱。由光谱仪64接收的光谱可用于区分成像区域中的不同材料,例如以区分产生相似波长的荧光的材料。

[0159] 荧光返回到相机80和光谱仪64的成像区域的景深可以是例如100 μm 或200 μm 。基于相机的系统的景深可以允许同时从大体积获得光谱。

[0160] 图4展示了图1的系统从肺组织获取光谱的能力。从孔板的5个位置获得5个光谱,证明了组织光谱的可变性。图4展示了许多光谱可以从许多位置获得。

[0161] 图1的系统被配置为获得光纤束40的远端44处的成像区域中的组织的图像,并且对成像区域中的组织执行光谱检查。在本实施例中,待成像的组织是远端肺的组织。在其他实施例中,可以对任何合适的人或动物组织成像。通过使用不同颜色的光,并通过组合成像和光谱分析,可以区分多种不同的疾病目标。

[0162] 在一些实施例中,包括本实施例,将一种或多种探针的分子引入成像区域。每个探针被配置为在一个或多个光源的照射下发荧光。一个或多个探针可以是智能探针,其被配置为通过与特定目标的相互作用而被激活(或失活),例如用特定疾病目标激活。

[0163] 在本实施方案中,将两种不同智能探针的分子引入待由图1的系统成像的成像区域中。第一智能探针是用于标记巨噬细胞的智能探针。NIR光源3的频率被配置为激励第一智能探针的分子。因此,使用NIR光源3获得的图像可以用于对成像区域中的巨噬细胞成像,例如以确定成像区域中是否存在巨噬细胞。

[0164] 本实施例中的第二智能探针是用于标记细菌聚落的智能探针。红光源2的频率被配置为激励第二智能探针的分子。因此,使用NIR光源3获得的图像可用于将成像区域中的细菌聚落成像,例如以确定成像区域中是否存在细菌聚落。

[0165] 蓝光源1的频率被配置为激励肺组织的自发荧光。由于存在诸如弹性蛋白,胶原蛋白和/或其他蛋白质的化合物,肺或任何动物组织可能发荧光。自发荧光可以包括许多蛋白质的集体荧光,例如几十种蛋白质。当在UV中激励时可能发生峰值自发荧光,但是当将470nm LED光发送到组织中时也可以激励自发荧光。

[0166] 在本实施例中,巨噬细胞用IRDye800CW预先标记,细菌聚落用PKH红 (CellClaret) 预标记。在其他实施例中,可以使用不同的探针和/或探针可以用于标记不同的疾病目标。在本实施例中,测试系统以检测不同颜色的物体。在其他实施例中,如果使用标记具有相同强度的相同物体的智能探针,则物体将是可见的。

[0167] 可以部署定制智能探针。每个智能探针可以被配置为用于成像相应的病理学,例如成像细菌或中性粒细胞。一些智能探针可以指示酶的活性。一些智能探针可以提供关于炎症的信息。一些智能探针可以将癌症组织与良性组织区分开来。

[0168] 智能探针可提供有关化学活性的信息。在这种情况下，系统可以返回信号而不是该智能探针的图像。与要使用较低景深的情况相比，基于相机的系统的景深可以允许获得更大的信号。在某些情况下，探针可能会扩散到大面积区域。

[0169] 在本实施例中，每个光源打开30ms然后再次关闭。每个光源使用周期性照明（例如，每100ms周期仅打开每个光源30ms）可以防止或减少荧光材料的猝灭，例如，智能探针的淬灭。荧光材料的任何猝灭可能小于在连续照射下可能发生的猝灭。在再次照射该光之前，每种荧光材料在有特定颜色的光照射后可能有机会恢复。

[0170] 图3是显示临床相关帧速率（在这种情况下，10fps）的离体人体组织中多个生物目标的成像的图像。在图3中可以观察到在图像中核心的影响（图像看起来像是由点组成）。在一些情况下，光纤束40的核心间距可能限制使用图1的系统获得的图像的解析度。

[0171] 使用具有如上所述的第一和第二智能探针的图1的系统获得图3的图像。图3是分别由来自光源1,2和3的激励信号照射下获得的第一、第二和第三组图像数据生成的三色图像。图3显示使用NIR标记（由箭头107指示）成像的巨噬细胞、肺组织绿色自发荧光（由箭头109指示），和使用红色标记（由箭头108指示）成像的细菌聚落。

[0172] 可以通过任何合适的方法将探针引入成像区域。例如，可以通过将含有探针的液体喷射到成像区域中以将探针引入成像区域。

[0173] 在本实施例中，光源之一（蓝色光源1）被配置为激励肺部自发荧光，并且每个其他光源被配置为激励相应智能探针的分子。在其他实施例中，光源可以被配置为激励不同的探针。对于所使用的每个探针，可以选择相应颜色的光源。

[0174] 通过改变光源和滤波器，图1的系统可以是可重新配置的，以用于不同的探针（例如，具有与当前使用的激励频率不同的激励频率的探针）。如果选择使用不同的智能探针，则该不同的智能探针可能具有与系统最初被配置的智能探针不同的激励频率。如果是这样，则可以相应地将一个或多个光源改变为具有不同频率的光源。在本实施例中，光源1,2,3是LED光源。替换LED光源可能是简单和/或便宜的。在一些情况下，多波段发射滤波器可以在重新配置图1的系统以使用不同的智能探针时所需的唯一定制组件。重新配置系统的能力可以允许适应不同的医疗问题，例如紧急医疗问题。

[0175] 在一些实施例中，特定频率的光可以激励多于一种物质。例如，一个频率的光可以激励自发荧光和智能探针。在这样的实施例中，在给定时间间隔内接收的光可以包括由不同物质发射的光的混合物。由光谱仪64获得的光谱可用于区分由相同频率的光激励的不同材料。在一些实施例中，特定物质（例如，特定智能探针）可以被从一个以上光源发射的光激励。在一些实施例中，来自多于一种颜色的光源的图像和/或光谱数据可用于成像和/或检测特定荧光材料。

[0176] 在一个实施例中，组织信号和来自智能探针的信号频率接近，均为蓝色。使用的两个LED源也可能在频率上接近。响应于两个LED源中的第一发射的荧光包括组织信号的较大部分和智能探针信号的较小部分。响应于两个LED光源中的第二个发射的荧光包括组织信号的较小部分和智能探针信号的较大部分。可以组合来自两个LED源中的每一个光下照射的结果，以获得关于组织和与智能探针对应的疾病目标或状况的信息。

[0177] 在一些实施例中，可能存在来自相机80和光谱仪64接收的响应信号中的组织和/或光纤的一些背景。在一些情况下，在一个或多个光源的照射下获得的数据可用于去除或

减少在另一个光源照射下获得的数据中的背景。在某些情况下，一次测量的背景可能是另一次测量的有用信号。

[0178] 图5a和5b显示使用图1的系统获得的光谱图(尽管使用来自上述那些不同的荧光团)。

[0179] 图5a是激励光谱。线500是激励滤波器24的激励光谱。线501是蓝色LED1 (470nm) 的光谱。线502是红色LED2 (625nm) 的光谱。线503是近红外LED3 (780nm) 的光谱。

[0180] 线510是FITC (荧光素) 的吸收光谱。线512是Cy5 (花青5) 的吸收光谱。线514是ICG (吲哚菁绿) 的吸收光谱。

[0181] 图5b还示出了455nm LED (线520) 和490nm LED (线522) 的光谱。图5b示出了这样的事实: 在一些实施例中, 多个LED可以填充相同的激励滤波器带。这可以允许使用LED的组合。自发荧光发射光谱可能不会像荧光团发射光谱那样变化。在一些实施例中, 455nm LED和490nm LED均可用于提供自发荧光。490nm LED可以获得比455nm更多的FITC信号。在这样的实施例中, 从490nm和455nm LED中减去信号可以允许去除一些自发荧光信号。其他频段也可采用类似的方法。例如, 617nm和660nm LED可广泛使用。

[0182] 图5b是发射光谱的图。图5b显示了发射滤波器50的光谱530。FITC (荧光素) 的发射光谱由线532表示。Cy5 (花青5) 的发射光谱由线534表示。ICG (吲哚菁绿) 的发射光谱由线536表示。ICG已经被临床批准, 但在某些情况下可能是一个不好的标记。ICG可用于血管标记。图1的系统可以检测低至5nM浓度的ICG。

[0183] 在本实施例中, 错过了FITC发射峰值, 但是捕获了大部分FITC发射。几乎捕获了Cy5发射峰值。

[0184] Cy5和荧光素衍生物通常可用作智能探针中的荧光团。当与智能探针的功能部分缀合时, 荧光团可以经历吸收和发射光谱的偏移, 例如不大于5至10nm的偏移。

[0185] 在本实施例中, 三个光源被多路复用。在其他实施例中, 四个光源被多路复用。在进一步的实施例中, 多路复用五个或更多个光源。可以成像和/或检测的疾病目标的数量可以随着使用的光源的数量而增加。

[0186] 三色成像与光谱的组合可以允许使用三种颜色的光来区分三种以上的疾病目标, 因为通过光谱仪获得的光谱可以允许区分在相似波长发荧光的不同物质。

[0187] 在一些情况下, 可以使用形状来区分响应于相同激励光频率的荧光的不同疾病目标。例如, 在某些情况下, 可以使用形状来区分细菌和细胞。在一些实施例中, 可以自动分析来自相机80的多组图像数据, 以确定该图像数据内的特征的形状。在一些实施例中, 可以向用户显示与一组或多组图像数据相对应的图像, 以使用户通过形状识别疾病目标。在某些情况下, 如果还使用形状, 则使用4个LED可以允许多达8个变量(因此可以区分多达8个疾病目标)。

[0188] 多色图像(例如, 图3的三色图像)可以允许用户观看单个图像中的生理学(组织结构)和病理学(例如, 细菌和/或中性粒细胞的存在)的组合图像。用户可以具有关于远端肺环境的更多信息, 而不是例如通过白光内窥镜获得的信息。可以选择智能探针用于任何适当病理或特征的成像。可以使用任何适当的智能探针组合。

[0189] 已经表明, 智能探针可以与体内肺显微内窥镜一起被部署以对疾病相关目标成像。在本实施例中, 智能探针与微型光纤成像束耦合以进入远端肺泡区域并将图像从光纤

束的远端传输到光学器件的其余部分。

[0190] 通过在多色情况下集成智能探针可以增强荧光内窥镜。智能探针的使用可以允许获得关于被成像的组织的信息,这些信息在没有智能探针的情况下是不可获得的。使用一种以上类型的智能探针,例如发射不同颜色光的智能探针,可以允许获得更多信息。在某些情况下,可以使用检测化学活性的智能探针。

[0191] 图1的系统可以扩展分子成像的使用以同时成像多个疾病目标。图1的系统可用于获得可用于确定细菌或炎症标志物的不存在或存在的即时信息,例如与重症患者中疑似肺炎相关的浸润先天免疫细胞(例如,单核细胞和中性粒细胞)。

[0192] 破坏性光学技术,例如使用如上所述的智能探针的显微内窥镜,可能在临床实践中具有高度影响。例如,这些技术可能对危重病患者的肺部炎症和感染的快速诊断具有高度影响。

[0193] 图1的系统可以提供关于远端肺的状态的实时信息。通过执行实时成像和检测,可以在进行显微内窥镜检查程序的同时执行诊断,而不用等待实验室结果。可以提高诊断速度,允许适当的治疗无延迟地传递给患者。

[0194] 图1的系统被配置为以视频速率提供成像。从图1的系统获得的实时信息还可以包括光谱信息。可以快速且廉价地提供信息。

[0195] 在一些情况下,诸如图1的基于相机的显微内窥镜系统可以提供比一些基于共聚焦的显微内窥镜系统更快的成像,因为基于相机的显微内窥镜系统可能不需要扫描。基于相机的系统可以提供多色荧光检测的强大且经济的途径。

[0196] 宽视野内窥镜成像系统可以允许比共焦系统更大的采样深度,尤其是在近红外系统中。即使本实施例的系统可能无法深入成像,但临床上它可用于检测疾病目标的存在。信号(例如近IR信号)的存在可用于通知在例如0 μ m至200 μ m的深度处测量的疾病目标的存在。

[0197] 图1的系统可以是可缩放的。在某些情况下,可以直接向图1的系统添加额外的光源。额外的光源可以允许使用额外的智能探针。额外的光源可以允许区分一个或多个其他疾病目标。

[0198] 图1的系统可以是可重新配置的。在某些情况下,用不同频率的光源替换其中一个光源可能是直截了当的。发射滤波器也可以是可变的。光源的改变可以允许用于与不同的智能探针交换的智能探针之一,例如对不同的疾病目标成像。如果开发了新的智能探针,则可以重新配置图1的系统以与该智能探针一起操作。在一些实施例中,图1的系统可以用于校准新的智能探针。如果开发新的LED光源,例如更接近地匹配特定智能探针的激励频率的LED,则可以重新配置系统以使用该LED光源。

[0199] 使用LED作为光源可以允许触发多色能力。用于弧光灯和超连续光源的一些其他光源是宽带的,但同时发射所有波长,因此在某些情况下可能不会以上述方式单独触发。

[0200] 已经在450nm和850nm之间的400nm波段使用图1的系统。可以在400nm或更大的带宽上使用单个检测器。在一些实施例中,可以使用图1系统的多次迭代,每次迭代具有不同的带宽,从而增加组合系统的带宽。

[0201] 图1的系统没有移动部件,这可以使系统稳定、紧凑和/或便宜。

[0202] 依次触发不同光源可以允许在检测路径中进行快速多色内窥镜检查。光源1,2,3的接通和断开可以减少光谱混合,同时允许灵活性以适应所需的场景。在改变LED和滤波器

以适应不同的荧光团时,软件,电子和大多数光学器件可以保持相同。

[0203] 光源的接通和断开可以减少或消除智能探针的猝灭。

[0204] 在图1的实施例中,相同的光纤芯用于收集成像和光谱分析的光。使用单个光纤束40。用于光谱的光遵循与用于成像的光相同的光路。通过使用单个光纤束40来获取成像和光谱分析的光,可以降低图1系统的复杂性。

[0205] 在图1的系统中,光圈控制器25,52可用于选择光纤束40的视野的一部分。在本实施例中,光纤束的视野直径为600 μ m。光圈控制器可以是手动或运动控制的。光圈控制器25,52可用于定位视野内的区域。然后,系统可以对所选区域执行成像和/或光谱分析。在一些实施例中,用户可以识别视野内的感兴趣特征。光圈控制器可用于选择包括感兴趣特征的视野的一部分。

[0206] 通过操纵图1的光圈,图1的系统可适用于暗视野内窥镜和/或白色内窥镜。在一些实施例中,通过提供来自所有光源、来自光源的子集,或来自单个光源的环形照明来实现暗视野反射显微术。可以通过光圈(例如,图1的光圈25)掩蔽照明中心来获得环形照明。然后用图1的光圈52掩蔽环形照明,这可以仅允许来自暗区的散射光进入相机80。

[0207] 在一些实施例中,光圈元件52可以用傅里叶域光学滤波器代替。通过用傅里叶域光学滤波器或任何其他适当的滤波器替换光圈元件,系统可以适用于光学信号处理。傅里叶域光学滤波器可以去除背景组织的平滑过渡,同时保留可以用于例如识别细菌结构的高光学空间特征。

[0208] 在一些实施例中,用户可以使用软件来控制图1系统操作的各方面。例如,用户可以控制曝光时间,以便为每个图像获得更短或更长的曝光。用户可以控制帧速率。用户可以控制脉冲速率。用户可以控制每个激励信号占用的时间间隔。用户可以控制照明水平。

[0209] 在一些实施例中,诸如LED照明和检测参数的参数可以适合于被成像的组织。触发可以使用脉冲宽度调制(PWM)来或多或少地照射组织。可以调整相机的曝光时间以收集最佳的荧光量。

[0210] 图1的系统包括单色相机80和光谱仪64。在其他实施例中,光谱仪64从系统中省略。

[0211] 具有被配置为接收来自多个光源的光的一个相机的系统可以被称为单相机系统(无论该系统是否还包括光谱仪)。单相机多色系统可以被配置为通过颜色和/或形状来区分不同的疾病目标。

[0212] 在一些情况下,具有单个稳态相机的系统可以提供时间复用的多色成像,同时小且便宜并且在宽波长范围(例如500nm至900nm)下工作。使用三色荧光的系统可能能够区分至少三个目标。在不同的系统中,可以使用三种以上的颜色。

[0213] 图1的系统被配置为执行稳态成像和光谱分析。相机80是稳态相机。对于每个激励信号(例如,30ms激励信号),相机80接收荧光,其持续时间间隔对应于激励信号所占用的时间间隔(例如,30ms),并使用在整个时间间隔内接收的荧光来产生一组图像数据。该组图像数据表示在该时间间隔期间由每个像素接收的荧光量。光源1,2,3是在每个脉冲期间连续发光的连续波LED。例如,给定的LED可以在其打开的每30ms时间间隔内连续发光。

[0214] 除了时间复用成像之外,具有单个稳态相机和稳态光谱的系统可以获取时间复用的光谱。每个图像可以具有至少一个相关的光谱。在某些情况下,添加光谱可能有助于解开

目标探针和酶活性探针。分子成像可能变得更强。该系统可以提供样本的双重视图,显示样本的外观以及与样本相对应的至少一个光谱的外观。系统可以通过多种颜色进行缩放。

[0215] 在其他实施例中,系统被配置为用于时间分辨操作。该系统可以被配置为执行荧光寿命成像显微术 (FLIM)。荧光寿命成像显微镜使用荧光信号的衰变时间来获得关于被成像的组织的额外信息,而不是使用稳态成像获得的信息。该系统还可以被配置为执行时间分辨光谱分析。

[0216] 不同分子可具有不同的荧光寿命。即使是在被给定频率的光激发时发出相同颜色的荧光的分子也是如此。通过使用FLIM,可以区分不同的目标,在某些情况下可能无法使用稳态成像来区分,例如如上所述的稳态多色成像。例如,在某些情况下,来自智能探针的绿光可以与由组织的自发荧光引起的绿光区分开。在某些情况下,FLIM可用于区分死组织和活组织。FLIM可用于测量可放入组织的任何合适探针的寿命。探针可用于测量组织的状况,例如测量组织pH。探针可以在不同条件下改变其寿命。

[0217] 在时间分辨系统的实施例中,每个光源是脉冲或已调制光源。每个激励信号包括以比激励信号的长度高得多的速率脉冲或已调制光。脉冲或已调制光源可具有纳秒或皮秒脉冲或调制速率。脉冲或调制速率可以在例如1MHz和100MHz之间。

[0218] 例如,在一个实施例中,图1的光源1,2,3由脉冲光源代替,每个脉冲光源具有500ps的脉冲长度。每个光源以相应的30ms时间间隔打开,如图2b所示。在LED以30毫秒的时间间隔打开内,LED发出大量500ps脉冲。

[0219] 每个光源可包括任何合适的脉冲或已调制光源,例如纳秒至皮秒脉冲LED、纳秒至皮秒脉冲激光光源或可调制LED。

[0220] 相机80可以由时间分辨检测器替换或补充。时间分辨相机可以包括例如时间选通增强型CCD相机、时间选通增强型CMOS相机或CMOS SPAD阵列。例如,时间分辨检测器可以是 32×32 阵列、 64×64 阵列或 128×128 阵列的CMOS时间分辨SPAD。

[0221] 时间分辨检测器被配置为记录荧光的到达时间。例如,时间分辨检测器可以被配置为使用时间相关的单光子计数 (TCSPC) 记录它接收的每个光子的到达时间。时间分辨检测器可以与光源的脉冲同步。所确定的每个光子的到达时间可以是相对于引起该光子发射的皮秒光脉冲时间的时间。

[0222] 在一个实施例中,时间分辨检测器是 32×32 阵列的SPAD。由SPAD阵列接收的每个光子被单独记录。记录其到达时间和到达位置(例如,到达位置可以对应于光子到达的阵列元件的位置)。

[0223] 对于时间分辨检测器的每个元件,可以绘制(例如,作为直方图)由该元件接收的光子的到达时间以确定荧光寿命。在其他实施例中,可以通过时间分辨检测器检测光子使用任何合适方法来确定荧光寿命。时间分辨检测器生成一组图像数据,其中每个像素的强度代表相应检测器元件确定的荧光寿命。

[0224] 光谱仪还可以确定时间分辨光谱分析。在一些实施例中,时间分辨成像和时间分辨光谱法的组合可用于成像和/或检测不同的疾病目标。

[0225] 图6a显示使用图1的系统获得的离体肺组织的稳态相机图像。图6b至6d显示图1的系统的修改形式在离体人组织上执行FLIM的能力。在图1的修改版本中,光源1,2,3由脉冲长度为500ps的脉冲LED代替。相机80由百万帧相机代替。百万帧相机包括一个 32×32 SPAD阵

列。百万帧相机被配置为以1000帧或更高fps的帧速率成像。百万帧相机通过使用时间相关单光子计数(TCSPC)操作。

[0226] 图6b至6d示出了使用百万帧相机而不是稳态相机80获得的结果。图6b至6d的结果是从FLIM采集花费5秒而获得的。在进一步的实施例中,FLIM获取可以更短,例如2秒。

[0227] 在一些实施例中,对于每个色带的每个FLIM图像使用250ms触发来执行FLIM获取。取决于荧光团,触发时间可以更短或更长。通过使用更好的检测器和源可以加速FLIM获取。触发和排序可以使用任何合适的触发时间用于FLIM和/或时间分辨光谱分析。

[0228] 图6b示出了使用百万帧相机获得的单光子计数图像。单个光子计数图像可以是其中每个像素强度值表示由与该像素对应的检测器阵列元件接收的光子数量的图像。

[0229] 图6c示出了使用百万帧相机获得的FLIM图像。FLIM图像可以是这样的图像,其中每个像素强度表示由对应于该像素的检测器阵列元件接收的光子的确定的荧光寿命。

[0230] 图6d表示来自肺组织的样本衰变。图6d中的暗实线表示测量的衰减。图6d中的实线表示与测量衰变的拟合。点划线代表仪器响应功能(IRF)。在图6d的图中,荧光寿命确定为1.93ns。

[0231] 使用时域FLIM获得图6c和6d的结果。在其他实施例中,该系统被配置为执行频域FLIM。时间分辨检测器可以是可调制用于频域FLIM的任何相机。光源被配置为产生已调制光。例如,光源可以是可调制的LED。

[0232] 由每个光源产生的光在频率上在纳秒到皮秒的时间尺度上变化。由成像区域发射的荧光具有相应的频率变化。荧光的频率变化可用于确定荧光寿命。可以使用锁定方法确定荧光寿命。

[0233] 通过获得荧光寿命,可以区分不同的材料,即使这些材料发出相同颜色的光。FLIM与稳态成像和/或光谱分析的组合可以允许成像和/或检测另外的疾病目标。FLIM与稳态成像和/或光谱分析的组合可以允许除了疾病目标的成像/检测之外还确定成像区域中的组织的进一步条件。例如,可以确定成像区域的pH。

[0234] 使用FLIM的系统可能比稳态系统更昂贵,因为需要脉冲光源(例如,脉冲激光器)。然而,在某些情况下,通过改进探针的多路复用可以证明增加的成本是合理的。调制或脉冲LED可能比脉冲激光器便宜。调制或脉冲光源(例如,调制或脉冲LED)可以与调制相机或同步时间分辨相机(例如,CMOS SPAD阵列或时间选通相机)组合。

[0235] 在时间分辨系统的一些实施例中,稳态相机80由时间分辨检测器代替,并且光谱仪64由时间分辨光谱仪代替。对于每个目标,系统可以提供时间分辨光谱和成像。可以许多不同方式组合光谱和成像以区分许多探针,例如用于3或4色系统的多于12个探针。

[0236] 在其他实施例中,稳态相机80可以由被配置成执行稳态成像和FLIM的单个检测器代替。例如,耦合到sCMOS或EMCCD相机的时间选通增强器可用于提供稳态成像和FLIM。

[0237] 在其他实施例中,该系统包括稳态相机80和时间分辨检测器。例如,在一些实施例中,时间分辨相机取代图1系统中的光谱仪64。

[0238] 在某些情况下,提供与稳态相机80分开的时间分辨检测器可以允许在一个专用功能中选择每个检测器的性能水平,而不是在稳态和时间分辨性能之间做出妥协。例如,在某些情况下,时间分辨检测器在稳态成像中可能比专用稳态相机具有更差的性能。在某些情况下,使用的稳态相机可能是现成的相机,这可能很便宜。提供时间分辨检测器和单独的稳

态相机可以允许系统以合理的成本执行良好的时间分辨成像和良好的稳态成像。

[0239] 稳态成像和FLIM的组合可用于提供多色FLIM。几个目标可以是时间复用的。通过使用FLIM,可以多路复用每种颜色的2个或更多个目标。例如,如果FLIM允许每种颜色的3个目标被多路复用,则可以使用3种颜色多路复用9个目标。在某些情况下,可以使用FLIM比使用光谱分析更有效地区分不同的目标。

[0240] 稳态相机和FLIM相机可用于时间复用的多色场景中以实现共定位的多色图像,从而允许区分许多探针。

[0241] 在其他实施例中,该系统包括稳态相机80、时间分辨检测器和光谱仪64。荧光可以在稳态相机80、时间分辨相机和光谱仪64之间分离,例如通过添加额外的分束器。

[0242] 在一些实施例中,该系统不包括光谱仪。该系统可以是单个相机溶液,仅包括成像(可以是稳态、时间分辨或两者)。

[0243] 在一些实施例中,该系统包括稳态相机和时间分辨光谱仪。例如,图1的光谱仪64可以用时间分辨光谱仪代替,而不用替换图1的稳态相机80。时间分辨光谱仪的使用可以允许更好的光谱视图。每个图像将具有相关的时间分辨光谱,这可以允许每个颜色通道的多个探针被解开。

[0244] 在上述实施例中,使用单个光纤束40。然而,在其他实施例中,可以使用多个光纤束40。例如,不同的光纤束40可以被插入内窥镜的不同工作通道中。在一些实施例中,不同的光纤束40可以在不同的频率范围内成像,从而增加系统成像的整个频率范围。

[0245] 图7a是表示图1的系统的使用方法的实施例的流程图。在阶段600,将光纤束40输送到目标组织区域。在阶段602,找到最佳焦点,例如通过获得重复图像并评估图像(自动地或由用户执行)。在阶段604,将荧光分子成像探针递送到目标区域。在阶段606,执行成像和光谱分析。

[0246] 图7b是表示图1的系统的另一使用方法的实施例的流程图。阶段600至604与图7a的方法相同。在阶段610,通过表面张力将液体附着到光纤尖端上来进行取样(液滴附着)。在阶段612,回收光纤束40(即,从大部分组织液体中取出光纤束),一滴组织液体附着在纤维束尖端上。在阶段614,对组织液滴进行成像和光谱分析。然后将尖端涂抹在一些相邻组织的表面区域上,从光纤束尖端除去液滴。在其他实施例中,可以省略阶段602。

[0247] 在某些情况下,液滴容易附着在光纤束尖端上。在一些情况下,液滴的使用可以提供酶活性和/或细菌或另一种目标存在的基本无背景的视图。

[0248] 在某些情况下,可能需要组织背景。例如,组织背景可用于导航到期望的片段和结构。然而,一旦光纤束尖端定位在期望的区段和结构中,移除背景可能是有用的。可以执行功能成像而不是结构成像。

[0249] 使用图1的系统,可以几种不同的方式减少或去除组织背景(自发荧光)。可以通过使用液滴附着来减少或去除背景。可以通过部署几个相似颜色的LED来减少或消除背景,例如通过部署几个蓝色LED。可以通过使用傅立叶域光学滤波器来减少或去除背景,在某些情况下,该滤波器可以用作高通空间滤波器以用于背景减少或去除。在一些情况下,可以通过使用FLIM成像来减少或去除背景。

[0250] 图8涉及另一种荧光显微内窥镜系统。图8的系统包括彩色CMOS相机112、红色LED 114、蓝色LED 116、显微镜物镜120、多波段发射滤波器122和多波段分色镜124。图8的系统

还包括光纤成像束128,其具有耦合到显微镜物镜120的近端126,以及用于成像远端肺的远端130。图8的系统还包括镜筒透镜132、反射镜134和多波段发射滤波器136。彩色CMOS相机112通过USB3链路138与专用软件耦合到PC 140。

[0251] 图8的系统是双色荧光系统。该系统可以被认为是基于单色荧光内窥镜平台,其中荧光滤波器组被交换为集成的双色(绿色和红色)荧光光谱范围的荧光滤波器组。

[0252] 简而言之,两个LED 114,116与分色镜118组合,并且经由激励滤波器122和另一个双频段分色镜124将照明发送到显微镜物镜120。来自成像束128的荧光经由200mm焦距的镜筒透镜132聚焦在彩色CMOS相机112上。在彩色CMOS相机112上收集图像。

[0253] 我们转向图8系统的组件及其操作的进一步细节。在图8的系统中,所有组件都是现成的商品。在其他系统中,可以使用任何合适的组件。

[0254] 两个LED用于提供照明:红色LED 114和蓝色LED 116。蓝色LED 116提供470nm的照明,红色LED 114提供625nm的照明。在图8的系统中,使用的LED是M470L3和M625L3,Thorlabs,USA。在其他系统中,可以使用不同的LED。在一些系统中,可以使用两个以上的LED。

[0255] 来自LED 114,116的光使用消色差聚光透镜(未示出)进行准直。在本实施例中,聚光透镜是ACL2520-A,Thorlabs用于470nm LED 116和ACL2520-B,Thorlabs用于625nm LED 114。图7是包括红色LED 114和蓝色LED 116的LED光谱的曲线图。蓝色LED 116的光谱是图9的虚线140。红色LED 114的光谱是图9的虚线142。

[0256] 来自两个LED114,116的准直光束使用分色镜分束器118(在本实施例中是FF506-DI03-25X36,Semrock,USA)组合。

[0257] 使用双色滤波器组实现双色落射荧光,在本实施例中,双色滤波器组包括英国Horiba的XF454中的发射滤波器136、分色镜124和激励滤波器122。来自分色镜分束器118的双色光通过激励滤波器122并由分色镜124引导到显微镜物镜120。

[0258] 在本实施例中,显微镜物镜120是无限远校正的显微镜物镜,其数值光圈(NA)为0.3,工作距离为10mm(RMS10x-PF,Thorlabs,USA)。

[0259] 激励滤波器122的光谱如图9中的线144所示。在本实施例中,所用的荧光团是PKH67和Cellvue®Claret。图9还显示了PKH67(图9的第146行)和Cellvue®Claret(图9的第148行)的归一化吸收光谱。

[0260] 图10示出了作为线150的发射滤波器136的光谱。图10还示出了PKH67(图10的线152)和Cellvue®Claret的细化(图10的线154)的归一化发射光谱。荧光发射曲线152,154与发射滤波器光谱150和拜耳滤波器光谱重叠。拜耳蓝色,绿色和红色分别由线156,158和160示出。

[0261] 来自显微镜物镜120,来自LED的光被传递到光纤成像束128的近端126。在本实施例中,光纤成像束128是Alveoflex™,Mauna Kea Technologies,Paris,France。图11a是由相机获取的Alveoflex™光纤成像束28的图像。图11b是图11a的图像的放大的插图,示出了光纤芯(亮区)和包层(芯之间的暗区)。在单色模式中以全分辨率(1920×1200)获得图11a的图像,以改善芯的采样。

[0262] 光纤成像束128的近端126(Alveoflex™,Mauna Kea Technologies,Paris,France)通过将其安装到30mm笼式Z轴平移支架(未示出:SM1Z,Thorlabs USA)上而被带到

物镜120的焦点,使得能够精确聚焦并优化图像从光纤的远端130到光学器件的其余部分的耦合。Alveoflex™成像光纤128具有大约30,000个芯和0mm工作距离(即接触成像),因此仅来自光纤尖端130的荧光被很好地成像。

[0263] 在使用中,来自LED的滤波光沿光纤成像束128向下传递到样本(未示出)中。在图8的系统中,同时提供来自两个LED的光。样本发出荧光。来自样本的发射光将光纤成像束128向上传递到显微镜物镜120。

[0264] 离开显微镜物镜120的荧光成像到彩色CMOS相机112上(在本实施例中,GS3-U3-23S6C-C,Grasshopper3,Point Grey Research,Canada)。相机112具有到计算机的通用串行总线3(USB3)连接,在全分辨率 1900×1200 时允许高达每秒162帧(fps)。

[0265] 彩色CMOS相机112包括颜色滤波器(未示出)。在本实施例中,颜色滤波器是标准拜耳图案滤波器(图10中示出了曲线156,158和160),其可以部署在许多消费者,机器视觉和显微镜相机中。CMOS相机传感器是Sony IMX174,具有7个光电子(e^-)读取噪声。

[0266] 我们将绿色和红色通道称为从设置到相机捕获的绿色(510nm至560nm)和红色(660nm至700nm)荧光,并通过CMOS芯片上的拜耳滤波器进行滤波。如图10所示,拜耳颜色滤波器(拜耳绿色滤波器,58)与所使用的两个颜色滤波器组(XF454,Horiba,UK;50行)的绿色通道重叠,而红色通道中的重叠较小(拜耳红色滤波器,60;发射滤波器,50)。红色通道中的较小重叠被两个通道的较大分离(绿色通道和红色通道分开约100nm)抵消,这可能减少光谱混合。

[0267] 图8的架构可以将标准宽视野内窥镜扩展到双色,同时利用改进的成像和照明技术。

[0268] 图8系统的系统性能的特征在于测量空间分辨率、照明和荧光收集的光谱通量、彩色焦点偏移、相机读取噪声的验证以及高帧速率采集(例如 >30 fps)时的性能。目的是在从细菌($0.5\mu\text{m}$ 至 $2\mu\text{m}$)到细胞(例如单核细胞和中性粒细胞($10\mu\text{m}$ 至 $15\mu\text{m}$))和真菌($100\mu\text{m}$ 或更多)的大小范围内实现最佳对比度。

[0269] 最低可检测光强度定义了物体相对于本底噪声的可见度,而色差可能潜在地影响检测到的每个光谱范围的对比度水平。

[0270] 用于荧光显微内窥镜的评估的帧速率可以是每秒10到15帧(fps)。虽然在速度和噪声方面使用CMOS相机技术可以容易地实现10到15fps,但是可以评估这种帧速率如何影响检测极限。高帧速率可能指向这种形式的应用,例如组织弹性成像和肺泡水平的肺顺应性。

[0271] 通过使Alveoflex™光纤128的远端与玻璃USAF 1951目标(Thorlabs,USA,部件号R1DS1N)上的标准铬接触来测量空间分辨率。通过将允许来自510nm至560nm光谱范围内的目标(荧光块,Chroma,USA)的荧光通过经由Alveoflex™光纤28传递的激励已经照射的测试目标(USAF目标),在传输中进行该测量,并且以传统方式通过光学系统成像。在从测试目标(USAF目标)获得的图像上获取强度线轮廓,以随着分辨率的增加估计对比度降低。

[0272] 通过在以下位置插入连接到光谱仪(连接到USB2000光谱仪,Ocean Optics,USA的200 μm 光纤)的光纤探针进行光谱通量测量:1) Alveoflex™128的远侧130(在光源前面)、2) Alveoflex™128的近端126以及3) 相机成像平面。Alveoflex™128的远端130由白色LED灯(未示出)照亮。通过用白色LED照射光纤128的远端并测量:1) Alveoflex™128的近端126以

及2)相机成像平面的光学功率来测量荧光收集效率。

[0273] 确定荧光素(Sigma Aldrich,USA)和Cy5(Sigma Aldrich,USA)溶液的检测极限(LOD)。制备1nM,10nM,50nM和100nM水溶液。将Alveoflex™128插入溶液中,每种浓度以曝光时间设定为80毫秒来拍摄10张图像。如在正常操作中那样通过两个LED 114,116照射Alveoflex™128获得背景图像,但没有任何荧光或杂散光进入尖端。保存了50个背景图像,并从溶液中获取的图像中减去它们的平均值。从Alveoflex™成像光纤束的中心区域选择 40×40 像素区域。计算 40×40 像素区域的平均值和标准偏差,用于指示信噪比(SNR)的单个80ms曝光时间图像。

[0274] 色彩效应可能与多色荧光显微内窥镜特别相关。通过用0.3%相对强度的标准荧光微球(绿色Inspeck™1-7219和红色Inspeck™I-7224,Life Technologies,USA)加载Alveoflex™128的远端130来评估色彩效应。

[0275] 溶液中的荧光微球可以容易地附着到远端尖端130,这可以提供用于评估对比度和对比度降低的良好目标。为了优化荧光聚焦到相机上,相对于CMOS传感器相机调节镜筒透镜132的位置,并且相对于显微镜物镜120调节近端光纤端126的位置。镜筒透镜132是如M.Pierce,D.Yu和R.Richards-Kortum,“用于原位细胞成像的高分辨率光纤显微内窥镜”,“可视化实验期刊”(2011)中所述进行预对准并保持固定。Alveoflex™128的近端126移动到3个位置。发现绿色荧光的最佳聚焦并且在该位置周围移动 $\pm 5\mu\text{m}$ 。

[0276] 通过在暗室条件下使用100个偏置帧(0ms曝光时间)并在传感器上使用金属C形安装盖来测量相机读取噪声。相机增益设置为0dB,相机视频模式设置为7(此特定相机的最低噪声模式)。从样本偏置帧中减去所有偏置帧的平均值,标准偏差以模拟-数字单元(ADU)提供读取噪声。我们使用 $0.51\text{e}^-/\text{ADU}$ 作为系统增益来得出 e^- 中的读取噪声。我们还使用单色版相机传感器进行读取噪声测量(部件号GS3-U3-23S6M-C,Point Grey Research,Canada)。如上所述,通过在暗室条件下拍摄3秒曝光时间图像来测量暗噪声。从3秒曝光帧中减去平均偏置帧,并将得到的图像的标准偏差除以3,以获得1秒曝光的暗噪声。

[0277] 对于所有实验,在成像会话之前获取背景图像并从获取的图像中减去背景图像。虽然下面进一步讨论图像处理的潜在改进,但是没有进行帧平均或图像处理。

[0278] 在图12a和图12b中显示结果的实验在510nm至560nm光谱范围内进行,具有8位图像,80ms曝光时间(12fps),增益15dB。图10a显示具有均匀荧光照明的USAF测试目标。图10b示出了跨越USAF测试目标的第6组元件的线轮廓,其中最小可分辨线(组6,元件6)的线厚度是 $4.38\mu\text{m}$ 。在该分辨率下可以清楚地区分各个测试图线。光纤芯尺寸和间距可能会限制系统的空间分辨率,从而限制图像质量(参见图9b,光纤芯填充密度的示范)。

[0279] 测得读取噪声为 8e^- 和暗噪声 $1\text{e}^-/\text{s}$ 。由于使用的帧速率至少为12fps,因此暗噪声的影响可能很小。信号可以是读取噪声,其主要用于检测高达约 400e^- 的噪声,其中读取噪声是泊松噪声的35%。

[0280] 发现视野的均匀性如下:用于绿色通道边缘强度是中心强度的54%,用于红色通道边缘强度是中心强度的76%。虽然未来的工作需要解决当前系统中绿色通道的一致性,但发现这并不会严重影响成像质量。

[0281] 离开远端光纤130的光功率和荧光收集效率总结在下表1中。

[0282] 表1

[0283]

照明和荧光收集效率	
测量	结果
离开 Alveoflex™远端的 470 nm LED 光功率	1.8 mW
离开 Alveoflex™远端的 625 nm LED 光功率	3.4 mW
绿色通道上的荧光收集效率	53.1%
红色通道上的荧光收集效率	52.8%

[0284] 对于470nm LED,Alveoflex™128的最大光功率耦合为2.4mW,但由于Alveoflex™的固有红色自发荧光,我们将此限制为1.8mW,请参阅下面的光纤背景讨论。对于625nm LED,在光纤128的远端130处测量的光学功率为3.4mW。总光功率在BS EN 60825-1:2007-激光产品安全性中定义的最大曝光范围内。设备分类和要求-BSI英国标准。对于荧光收集,我们测量了两个通道的53%效率。

[0285] 在图11中分析了光谱通量。虽然发现光谱衰减对相机平面不显着,但发现拜耳滤波器衰减红色通道。

[0286] 在所研究的光谱范围内,光纤荧光通量高于85%,其为500至750nm。在相机图像平面(图13的线70)处测量系统荧光通量,并且包括光纤束128、物镜120、分色镜124、发射滤波器136和反射镜134的衰减。它可以反映所使用的分色镜124和发射滤波器136的预期。增加的红色衰减可能是由于镜筒透镜132和显微镜物镜120引起的。图11示出了叠加的拜耳滤波器光谱(线156,158和160),以说明信号在相机上的预期减少。线172表示近端光纤端126处的光谱通量。

[0287] 表2中给出了荧光素和Cy5的均匀溶液的SNR分析。

[0288] 表2

[0289]

FITC 和 Cy5 溶液的 SNR	
实验	SNR
1 nM 荧光素	1.5:1
10 nM 荧光素	2.3:1
50 nM 荧光素	2.9:1
100 nM 荧光素	3.4:1
1 nM Cy5	1.4:1
10 nM Cy5	1.3:1
50 nM Cy5	1.6:1
100 nM Cy5	2.5:1

[0290] 已发现荧光素具有10nM的LOD浓度,并且发现Cy5具有50nM的LOD浓度。一些已知的系统可以获得较低的检测限制,例如由于在每个相机上部署具有最佳光谱范围的几个EMCCD相机。图8的系统使用单色相机112,其可以具有比使用每种颜色的单独相机更高的固有读取噪声。通过使用科学的CMOS相机(PCO.edge mono 4.2LT,PCO AG,德国)代替图8系统的Grasshopper3的GS3-U3-23S6C-C来验证相机之间的LOD差异。使用科学的CMOS相机,对于荧光素,LOD改善至1nM,对于Cy5,LOD改善至10nM。

[0291] 图14a至14c示出了对于绿色和红色荧光的散焦的对比度降低。示出了单个红色和绿色微球的对比度降低。图14a至14c示出了在不同焦点偏移处的点的视觉外观(图14a中的-5 μ m,图14b中的0 μ m,图14c中的+5 μ m)。在每个图中,红色微球176存在于图像的顶部,绿色微球178存在于图像的顶部。每个微球176,178的焦点随焦点偏移而变化。

[0292] 图13示出了绿色通道上绿色微球的线轮廓。线180是-5 μ m焦点偏移处的线轮廓。线182是0 μ m焦点偏移处的线轮廓。线184是+5 μ m焦点偏移处的线轮廓。图15a表明,通过对比判断,0 μ m位置可能是绿色微球的最佳焦点。

[0293] 图13b示出了红色通道上红色微球的线轮廓。线186是-5 μ m焦点偏移处的线轮廓。线188是0 μ m焦点偏移处的线轮廓。线190是+5 μ m焦点偏移处的线轮廓。图15b表明5 μ m可能是红色微球的最佳焦点。红色通道在绿色通道上的轴向位移可能是由于色差引起的。

[0294] 一些成像光纤束具有可检测的光纤背景自发荧光。图13b中针对5 μ m位置的调制可能是由于来自光纤芯的红色荧光,并且可以提供进一步的证据,即5 μ m位置是红色通道的最佳焦点。

[0295] 折衷方案可以是将Alveoflex™128的远侧尖端放置在被确定为最佳的两个焦点位置之间(绿色为0mm,红色为5mm),这可以使0.3NA显微镜物镜120的色彩效应最小化。

[0296] 目前用于确定疑似呼吸机相关性肺炎 (VAP) 中细菌负荷的一些方法依赖于BALF的培养。高于 10^4 或 10^5 的每毫升菌落形成单元 (CFU/ml) 的生长可以被认为是VAP的诊断。由于支气管肺泡灌洗涉及液体的滴注和回收, 可以看到稀释效应。感染的远端肺中的真实细菌负荷可能是 10^5 至 10^6 CFU/ml。

[0297] 为了确定图8的系统对远端肺中细菌检测的下限的适合性, 在两种情况下进行初始实验, 其中微球用作细菌的替代物。第一实验包括在黑色Eppendorf管中单独成像微球, 以避免管荧光。第二实验包括放置在孔板中的离体肺组织中的微球成像。

[0298] 使用0.3% Inspeck™ 2.5 μ m微球 (绿色Inspeck™ I-7219和红色Inspeck™ I-7224) 作为指示标记细菌的荧光发射标准。绿色0.3% Inspeck™ 微球可被认为具有与绿色OMI智能探针标记的细菌 (铜绿假单胞菌) 相同的发射, 红色0.3% Inspeck™ 微球比PKH红 (Cellvue® Claret, Sigma Aldrich, USA) 标记的细菌 (铜绿假单胞菌) 弱1.5倍。

[0299] 将变黑的微管充满微球浓度为 10^3 /ml、 10^4 /ml、 10^5 /ml和 10^6 /ml, 以得到没有肺组织存在的系统的检测极限。在每次实验之前将管离心10秒。

[0300] 将切除的肺组织置于孔板中, 其中0.3% Inspeck™ 2.5 μ m微球以下列浓度 10^3 /ml、 10^4 /ml、 10^5 /ml和 10^7 /ml沉积。对照包括单独切除的肺组织、肺组织中每毫升 10^6 个空微球和蒸馏水。每个样本成像30秒, 相机设置如下: 8位图像采集, 增益24dB, 曝光时间80ms (12fps)。在30秒实验期间, 在获得的图像上目测评估弱荧光微球的检测。成功检测被定义为至少看到一个目标。

[0301] 图16a至16d显示了离体肺自发荧光的快速图像采集。图16a是使用弱荧光微球 (0.3% Inspeck) 以20fps拍摄的图像。图16b是使用更多荧光微球 (3% Inspeck) 以20fps拍摄的图像。图16c是使用弱荧光微球 (0.3% Inspeck) 以200fps拍摄的图像。图16d是使用更多荧光微球 (3% Inspeck) 以200fps拍摄的图像。

[0302] 虽然在20fps和200fps下均可见3% Inspeck™ 微球 (图16b中的箭头200和16d指向可见的3% Inspeck微球), 但在20fps和200fps时, 发现较弱的荧光0.3%微球几乎看不见 (图16a和16c)。尽管更快的帧速率导致传感器上捕获的荧光减小, 但仍然发现自发荧光和组织结构在200fps处可见。证明肺自发荧光可以200fps成像并且可能更多。已经制备了可视化视频, 其示出了肺组织和红色3% Inspeck™ 微球在200fps下的可见性。

[0303] 更快的帧速率可能需要更快的显示硬件 (监视器上的显示速率目前可能限制在60Hz至120Hz)。在该实验中产生的200fps视频序列的一个有趣观察是将显微内窥镜成像扩展到组织弹性成像的可能性。

[0304] 尽管荧光信号较低, 但对比度通常会随着帧速率的增加而增加, 这可能是由于物体的更好定位。由于快速移动的内窥镜环境, 较慢的帧速率可能会污染所研究的对象的对比度。据我们所知, 这可能是显微内窥镜报告的最高帧速率。

[0305] 将切除的人肺部组织置于具有五个实验条件的孔板中:

[0306] 1) 具有PKH红色新鲜分离的人单核细胞 (Cellvue® Claret, Sigma Aldrich, USA),

[0307] 2) 具有PKH绿色新鲜分离的人中性粒细胞 (PKH67, SigmaAldrich, USA),

[0308] 3) 用PKH红色标记的烟曲霉,

[0309] 4) 单孔中的单核细胞、中性粒细胞和真菌 (烟曲霉),

[0310] 5) 在PKH绿色 (PKH67, Sigma Aldrich, USA) 中标记的 10^7 CFU/ml的细菌 (铜绿假单

胞菌)。

[0311] 人体组织与区域伦理委员会批准一起使用,该批准从取自肺癌切除的样本的外围检索。从健康志愿者的外周血中分离和纯化单核细胞和中性粒细胞。每个样本成像30秒,相机设置如下:8位图像采集,增益24dB,曝光时间80ms (12fps)。将具有PKH绿色标记的铜绿假单胞菌的孔板5另外在5ms曝光时间 (200fps) 下成像,以研究下面描述的光纤芯闪烁事件的动态。根据制造商的说明使用PKH红色和绿色。

[0312] 对于红色和绿色0.3% Inspeck™ 珠子,LOD被确定为每毫升 10^4 个微球。表3和表4显示嵌入切除的人肺组织中的绿色和红色0.3% Inspeck™ 微球的LOD分别相当于 10^5 /ml和 10^4 /ml。对照显示两种情况下均未检测到微球。

[0313] 表3

[0314]

用于绿色 0.3 % Inspeck™ 微球的孔板实验		
实验	重复孔板的数量	成功检测的数量
在肺中每毫升含 10^3 个绿色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	0
在肺中每毫升含有 10^4 个绿色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	0
在肺中每毫升含 10^5 个绿色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	2
在肺中每毫升含有 10^6 个绿色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	4
单独肺部	2	0
蒸馏水	2	0
肺中每毫升 10^6 个空微球	2	0
在蒸馏水中每毫升 10^6 个空微球	2	0

[0315] 表4

[0316]

用于红色 0.3 % Inspeck™ 微球的孔板实验		
实验	重复孔板的数量	成功检测的数量

[0317]

在肺中每毫升含 10^3 个红色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	1
在肺中每毫升含有 10^4 个红色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	4
在肺中每毫升含 10^5 个红色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	4
在肺中每毫升含有 10^6 个红色 0.3 % Inspeck™ 微球	4	4
单独肺部	2	0
蒸馏水	2	0
肺中每毫升 10^6 个空微球	2	0
在蒸馏水中每毫升 10^6 个空微球	2	0

[0318] 绿色微球的较高LOD可能是由于绿色中高水平的肺组织自发荧光。人肺部弹性蛋白和胶原蛋白的自发荧光可以使气道和肺泡之间的解剖学导航成为可能。然而，一旦到达远端肺，如果我们试图成像的物体具有广泛等效的激励波长，则可能需要去除背景自发荧光。绿色中的肺组织自发荧光可能是设计肺部红色和近红外分子探针与显微内窥镜相结合的原因，因为背景荧光可能随着波长的增加而急剧下降。

[0319] 图17a, 17b和17c是离体肺组织中多个目标的图像。图17a是包括单核细胞的肺组织的图像。箭头202表示单核细胞的示例。图17b是包括中性粒细胞的肺组织的图像。箭头204表示中性粒细胞的示例。图17c是包括真菌(烟曲霉)的肺组织的图像。图17a, 17b和17c的图像的曝光时间设置为80ms (12fps)，增益为24dB, 8位图像。还准备了视频可视化。可以认为图17a, 17b和17c示出了图8的双色宽视野系统执行与肺部炎症和感染直接相关的多个目标的荧光成像的能力。

[0320] 总之，图17a显示离体肺组织中PKH红色标记的单核细胞。图17b显示离体肺组织中

PKH绿色标记的中性粒细胞。图17c显示来自烟曲霉的强信号。由于其大尺寸,烟曲霉可能是相对容易成像的目标。已经进行了单核细胞中性粒细胞和烟曲霉的同时检测,并在可视化视频中进行了演示。

[0321] 由于组织自发荧光具有强烈的绿色成分,绿色目标的分子成像在某些情况下可能比其他颜色的可视化更难。然而,对于尺寸为15 μm 或更大的细胞目标,绿色目标的分子成像在某些条件下可能是可行的,例如假设背景信号大于10%。

[0322] 从高信号到背景可以看到较小的物体,例如细菌。然而,快速移动的显微内窥镜环境可能需要大量的点以便临床医生立即观察到它们。

[0323] 图18a和18b显示离体肺的两个图像,一个没有细菌(图18a),一个有细菌(图18b,箭头206表示的细菌)。曝光时间设定为80毫秒。还制备了进一步的视频可视化,其中发现细菌作为闪烁的荧光点可见。与第二可视化视频(具有细菌)相比,在第一视觉视频(没有细菌)中发现闪烁点的数量较少。第一和第二可视化视频被认为经由更高的绿色点存在来证明细菌检测,并且在细菌存在的情况下绿点的闪烁更明显。

[0324] 闪烁可以解释如下。如果荧光物体小于光纤芯和包层,则光纤束128的远端130相对于组织的固有相对运动可以诱导物体在芯(使得物体是可见的)和包层(使得物体不可见)的前面移动。

[0325] 光纤束可以增加细菌闪烁的方式设计。可以改善细菌检测的方式设计光纤束。

[0326] 图19a至19c示出了来自另一可视化视频的三个图像中的该机制。具有PKH绿色标记的铜绿假单胞菌的离体人肺组织以200fps成像以详细研究闪烁的机制。建议这种机制可以很好地利用,只要细菌聚落足够小和足够亮。可以想到设计光纤芯和包层(或用于体外研究测定的网格)以匹配需要检测的物体的尺寸,从而最大化闪烁。在某些情况下,观察者甚至可以在低于1的SNR下容易地检测到闪烁。但是,任何小于光纤包层的物体都可能最终闪烁,无论是否有细菌,因此可能出现误报。另外,许多细菌聚落的大小可能很大(例如,大于20 μm)。大尺寸的细菌聚落可能不会闪烁。

[0327] 尽管图18a至19b的图像是利用图8的系统获得的,但是图1的系统也可以设计成产生闪烁效果,例如通过选择光纤束中的光纤尺寸大于期望的生物目标(例如,细菌)。

[0328] 自发荧光可用于在远端肺部中结构成像。可以部署智能探针以评估特定病理学的诊断。

[0329] 在某些情况下,绿色自发荧光可能会干扰绿色荧光智能探针。绿色自发荧光信号可能必须在体内原位从绿色荧光智能探针信号中解开。在某些情况下,即使智能探针强烈发射,也可以使用超过背景水平10%的信号水平来进行定量评估。在一些情况下,背景信号的非均匀和动态性质可能限制所研究的病理学的均匀性,这可能在某些情况下降低下限的检测限制。

[0330] 在某些情况下,可以使用红色和近红外(NIR)荧光。红色和/或NIR的背景可能要弱得多。在红色和NIR中,荧光收集效率和相机读取噪声可能变得有限。在某些情况下可以改善荧光收集效率和相机读取噪声。例如,可以部署sCMOS相机,其可能具有小于 $1e^{-}$ 的读取噪声。

[0331] 在某些情况下,宽视野系统可能具有比光束扫描共焦系统更差的光学截面。然而,随着自发荧光在近红外中显着减少,改善的SNR可能意味着基于宽视野的设置的光

学切片可能变得越来越不受限制。所需的分辨率可能取决于分子目标。例如,使用在底物裂解时显示荧光扩增的智能探针分子检测酶活性可能不需要分辨,仅需要荧光检测。

[0332] 当用470nm LED照射时,红色通道中的光纤荧光的效果显示在图20a,20b和21中。结果显示在图20a,20b和21中的实验包括用0.3%Inspeck™微珠对离体肺组织成像。提供恒定的625nm LED照明,并且470nm LED上升和下降(从1mW到2.4mW)以说明Alveoflex™的红色荧光与Inspeck™微球的成像的光谱混合的影响。

[0333] 发现通过Alveoflex™的1mW引起明显的红色荧光,但在图18a中仍然可见Inspeck™0.3%微球(参见图18a左上方的放大插图以及白色圆圈表示的微球)。图20a显示在1mW 470nm LED照射下可见背景下的0.3%Inspeck™微球。

[0334] 当470nm LED设定为2.4mW时,来自光纤的红色荧光使传感器的红色通道饱和。图20b显示在2.4mW 470nm LED照射下对背景不可见的0.3%Inspeck™微球。准备了附带的视频可视化。

[0335] 之前已经分析了来自光纤束的荧光。图19显示了500nm至850nm的纤维荧光光谱。通过使用宽FITC滤波器组(FITC-LP01-Clinical-000, Semrock, USA)和放置在照相机图像平面(USB2000光谱仪, Ocean Optics, USA)上的光谱仪获得光谱。大多数光纤束荧光集中在600nm至700nm的区域中,并且可以进行进一步的工作以减少或去除它,同时保持多色能力。

[0336] 在上面参考图9至21描述的实验中没有使用图像处理。相反,我们关注于临床相关限制下的基础光学系统的原始性能。

[0337] 先前已经证明,共焦显微内窥镜可以从图像处理中受益。一种图像处理方法是对光纤芯图案进行过采样,计算来自每个芯的信号,并将随机芯图案插入矩形图像。这可以提供来自每个芯的可靠信息摘要。在上述图像中,呈现过采样的原始图像。未来的工作可能会探索图像处理技术,以部署实时处理,以改进标记疾病目标的多色检测。

[0338] 已经提出了用于系统空间分辨率、相机读取噪声、荧光收集、荧光光谱通量、彩色焦点偏移的测量结果。已经提出了对离体肺组织的高速性能的评估。

[0339] 已经证明,图8的系统可以提供快速的双色宽视野荧光显微内窥镜系统,其能够同时检测完整的人离体肺组织中的几种疾病目标。该系统的特征在于来自激励发光二极管(LED)的光通量,荧光收集效率和彩色焦点偏移。通过在离体人肺组织中成像细菌(铜绿假单胞菌)已经证明了该系统的有效性。

[0340] 已经描述了通过光纤束进行细菌检测的方法。细菌检测的方法使用细菌的闪烁效应,因为它们更多地处于光纤芯的前面,提供比光纤芯和包层小的物体的检测(例如,约3μm)。细菌检测方法可以增加4μm系统的测量空间分辨率。

[0341] 已经显示了离体人体组织中中性粒细胞、单核细胞和真菌(烟曲霉)的同时成像。

[0342] 已经显示图8的系统分别对荧光素和Cy5溶液具有10纳摩尔(nM)和50nM的灵敏度。肺组织自发荧光显示在高达200帧/秒(fps)的相机采集速率下仍然可见。由于高荧光灵敏度,简单性和同时复用多个病理分子成像目标的能力,图8的光学系统可以使其自身用于临床转化。

[0343] 在一些情况下,多色荧光显微内窥镜可以在限时体内原位干预期间为临床医生提供即时病理学。通过利用从现成组件设计的简单成像平台,可以容易地实现在很少或没有图像处理的情况下检测重要的病理目标。使用合适的荧光智能探针,可以解开背景自发荧

光并获得与病理学相关的重要信息。诸如LED和CMOS传感器之类的低成本技术正在逐渐成熟,以至于可以开发诸如图8的系统之类的设备以供广泛使用。

[0344] 为了理解通常引起细菌和真菌感染等疾病的过程,显微内窥镜与光学成像剂相结合。快速双色荧光显微内窥查被证明并详细表征,用于远端肺成像。在高质量图像和视频中检测细菌,展示切除的人肺组织的基于相机的双色荧光内窥镜。

[0345] 已经证明图8的宽视野系统通过成像尺寸为 $2\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 或更大的目标在远端肺中起作用,例如细菌聚落、单核细胞、中性粒细胞和沉积在离体人肺泡组织中的真菌烟曲霉。

[0346] 上面已经描述了内窥镜成像系统的特定实施例。在进一步的实施例中,上述任何系统的特征可以与任何其他系统的特征组合。例如,图1的系统的特征可以与图8的系统的特征组合。

[0347] 特别地,尽管在图8的系统的上下文中描述了闪烁,但是当使用图1的系统成像时也可以使用闪烁效应。

[0348] 现在转向另一实施例,其中使用反射器-分色镜组合以在相同光路上进行反射和荧光成像。

[0349] 以上参照图1至21描述了荧光成像。上述荧光内窥镜装置使用分色镜分离激励光和荧光。分色镜可以是波长选择性的,其取决于入射光的方向。

[0350] 在图1的实施例中,多波段分色镜26用于将来自LED 1,2,3的激励光反射到显微镜物镜30中。激励光在成像区域中引起荧光。从成像区域返回的荧光具有与激励光不同的波长。多波段分色镜26被配置为基本上不传输从成像区域返回的激励光,例如由于反射或散射,而传输从成像区域接收的荧光。多波段分色镜26被配置为反射一些波段(LED1,2,3的波长),同时传输其他波段(由LED1,2,3激励成像区域产生的荧光响应信号的波长)。

[0351] 落射荧光设置通常可以反射模式照射分色镜。返回的荧光(可以具有更高的波长)通过分色镜传输并发送到检测器。

[0352] 反射内窥镜是另一种类型的内窥镜,其中检测来自成像区域的反射光。反射光包括具有存在于用于照明的光中的波长的光。反射内窥镜通常可以利用光源(例如,一个或多个LED)经由分束器照射内窥镜来操作。然后可以沿相同的路径将反射光传递到相机。

[0353] 例如,为了在反射模式下操作类似于图1的装置,多波段分色镜26可以用分束器代替,例如50/50分束器。分束器配置成将来自LED 1,2,3的光的一部分反射到显微镜30中,并且传输从成像区域返回的部分反射光。在其他实施例中,可以使用任何合适的分束器将入射在分束器上的光分成两部分。

[0354] 图22是一个实施例的示意图,其中相同的光路用于荧光成像,如用于反射成像。

[0355] 光学元件210被配置为通过在第一波长范围内反射50%的光并在第一波长范围内传输50%的光,在第一波长范围内用作50/50分束器。光学元件210被配置为通过反射第二波长范围内的基本上所有光,在第二波段处用作分色镜,当激励光处于第二波长范围时,基本上传输由激励光产生的所有荧光。荧光与产生它的激励光具有不同的波长。

[0356] 光学元件210可以称为分色镜/反射或元件。在本实施例中,光学元件210是薄膜干涉滤波器,其可以用作一个波段中的落射荧光照射器并且用作其他带中的反射器。光学元件210使用现有的薄膜干涉滤波器制造技术被制造,例如使用改进的磁控管薄膜溅射技术、溅射氧化物-电介质涂层、溅射金属、溅射金属-电介质涂层、电子束和热电阻涂层中的至少

一种。在其他实施例中,可以使用任何合适的制造方法。

[0357] 光学元件210提供单个集成元件,其能够根据波长作为分束器和分色镜。

[0358] 在图22中,来自一个或多个LED光源212的光遵循描绘为垂直线214的公共光路。来自一个或多个光源212的光以45°的入射角入射在光学元件210上。在其他实施例中,可以使用任何合适的入射角。

[0359] 曲线220是反射对波长的曲线图,并且示出了两个波段222,224,其中光学元件210被配置为反射光。波段222为450nm至500nm。波段224为600nm至650nm。在其他实施例中,光学元件210可以被配置为反射任何合适波段的光。

[0360] 从光学元件210反射的光遵循由图22中的水平线216指示的光路并照射成像区域(未示出)。光沿着线216从成像区域返回并入射在光学元件210上。

[0361] 曲线230是传输对波长的曲线图,并且示出了两个波段232,234,其中光学元件210被配置为传输光。波段232为500至550nm。波段234为600至650nm。在其他实施例中,光学元件210可以被配置为传输任何合适的波长。

[0362] 当被600nm至650nm波段的光被照射时,光学元件210用作分束器。它既反射又传输600至650nm波段的光。在本实施例中,传输率与反射率之比为50/50。在其他实施例中,可以使用任何比率。分束器可以将入射在其上的光分成任何适当大小的两个部分。

[0363] 当被450nm至500nm波段的光照射时,光学元件210用作分色镜。它反射450nm至500nm波段的光,并传输500nm至550nm波段234的光。

[0364] 通过提供在某些波长处充当分色镜并且在其他波长处充当分束器的单个滤波器,可以在所选波段的荧光模式和其他互补波段中的反射模式下执行显微内窥镜。

[0365] 相同的光路可以用于荧光成像,如用于反射成像。对荧光和反射成像使用相同的光路可以产生具有增加功能的紧凑和/或成本有效的成像装置。

[0366] 上面的图22显示了要反射的红色波段和外延荧光的绿色波段。在其他实施例中,其他波段可以是反射的或荧光的。

[0367] 图23是光学元件的传输率与波长的示意图。线240示出了光学元件的传输分布。在包括蓝光的第一波段242处,光学元件的传输率非常低,例如小于10%,小于5%或可忽略的量。在包括绿光的第二波段244处,光学元件的传输率高,例如大于90%。在包括红光的第三波段246处,传输率为50%。因此,在蓝色和绿色中,光学元件用作分色镜,而在红色中,光学元件用作分束器。

[0368] 我们已经证明了上述三色荧光宽视野显微内窥镜,例如使用图1的装置。

[0369] 在另一实施例中,图1的装置的一个波段被选择为反射的。例如,如果荧光目标是红色和绿色,则可以选择NIR波段是反射的。图1的多波段分色镜被光学元件代替,该光学元件被配置为用作NIR波段的反射器并且用作剩余波段的分色镜。

[0370] 在进一步的实施例中,波段的任何组合可以用于荧光成像和反射成像。

[0371] 在另一实施例中,图1的LED1,2,3中的一个用白色LED代替。用光学元件代替图1的多波段分色镜26,该光学元件被配置成反射和透射白光。使用白色LED作为光源进行白光内窥镜。NIR被保持为荧光波段。

[0372] 可以对图1的装置进行其他改变,例如通过改变历时20,22和/或滤波器24,50以对应于所使用的波长。

[0373] 通过使用适当的滤波器和适当的光源,在引入反射内窥镜的特征的同时,可以保持上述多波段架构的简单性(例如,关于图1)。可以使用公共光路执行反射内窥镜和荧光内窥镜。可以使用一组光源和一个相机来提供能够执行反射成像和荧光成像的装置。

[0374] 在某些情况下,当从反射光切换到荧光时,可以改变相机增益和/或其他相机设置。在一些实施例中,相机增益可以被设置为自动(自动模式)。当设置为自动时,相机可以将增益调整到光照水平。

[0375] 在一些实施例中,荧光成像和反射成像是时间交织的。可以如上所述执行光源的定时交织。

[0376] 在其他实施例中,该装置可以非时间交织模式使用,其中反射器模式成像用于一段时间(例如,捕获一系列图像),然后荧光模式成像用于另一段时间。该时间段可以是例如秒或更长的量级。在某些情况下,可能最好将荧光或反射的相机设置设置为不经常更改它们。这可能取决于相机固件的灵活性。

[0377] 上述实施例的特征可以与其他实施例的特征组合。例如,其中所有颜色的激励信号用于荧光成像的实施例的特征可以与其中一些颜色的激励信号用于荧光成像而其他颜色用于反射成像的实施例的特征组合。

[0378] 上述实施例用于执行远端肺的成像(和任选的光谱学)。进一步的实施例可以用于执行任何合适的解剖区域的成像,例如能够经由内窥镜进入的任何解剖区域。例如,实施例可用于进行支气管、胃肠道或泌尿道的成像。可以对任何合适的人或动物受试者进行成像。可以对任何合适的医学或兽医应用进行成像。

[0379] 尽管上文描述了特定智能探针的使用,但是在其他实施例中,可以将任何合适的荧光材料引入成像区域,例如任何合适的染料、染色剂或探针。可以选择光源来激励荧光材料或每种荧光材料。通过使用荧光材料,可以获得关于组织结构以及其他波长的分子信号的信息。

[0380] 可以理解,上面仅通过示例的方式描述了本发明,并且可以在本发明的范围内进行细节的修改。

[0381] 在说明书和(在适当的情况下)权利要求和附图中公开的每个特征可以独立地或以任何适当的组合提供。

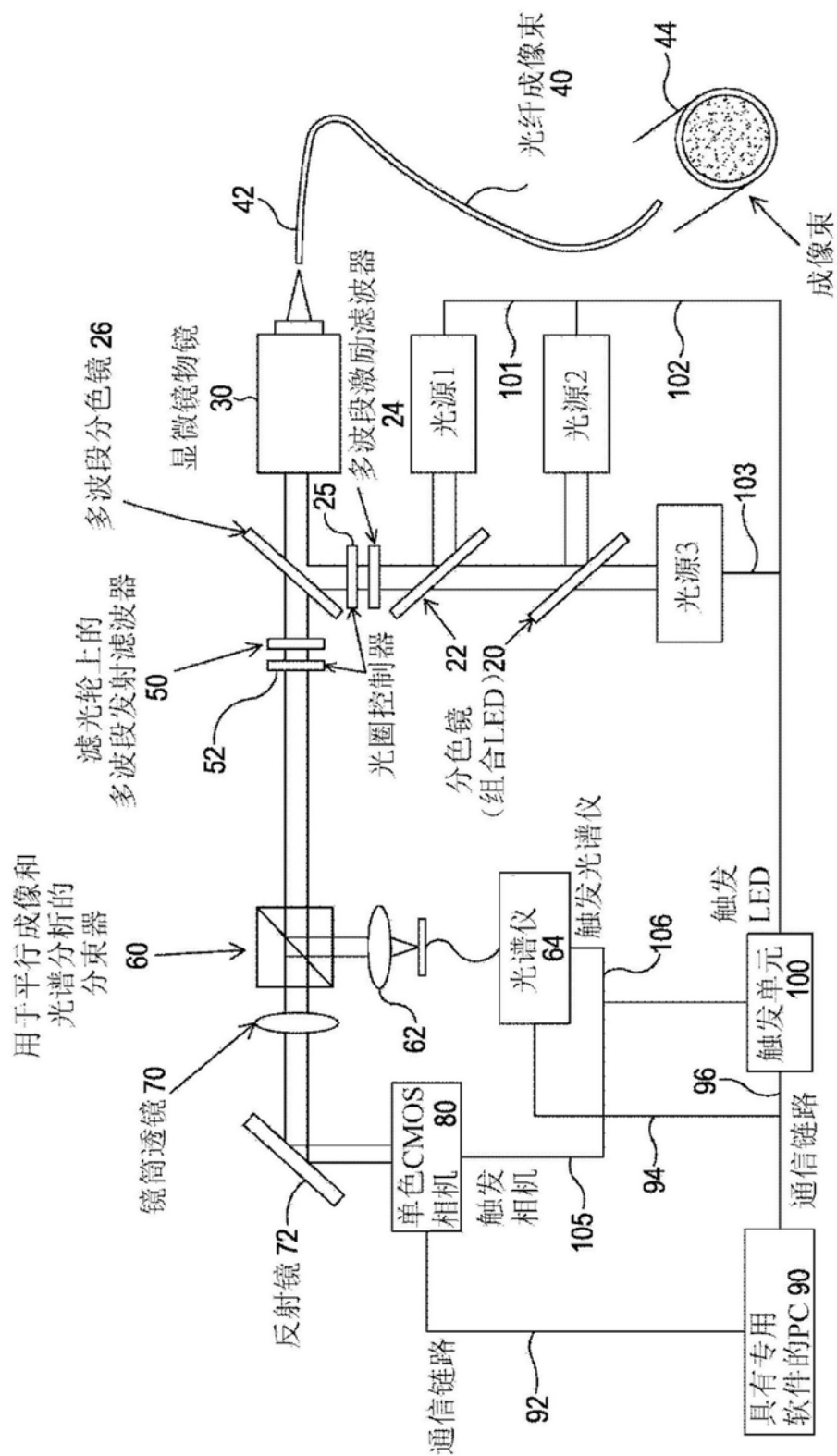


图1

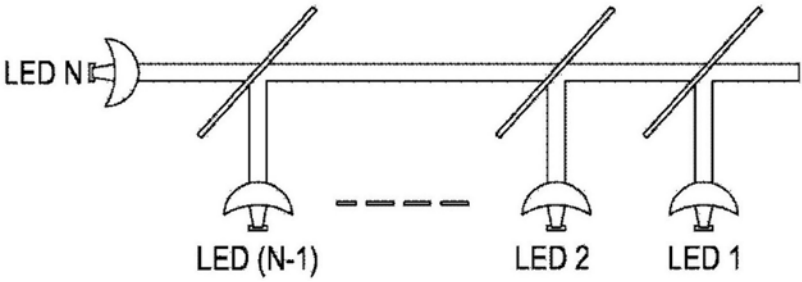


图2a

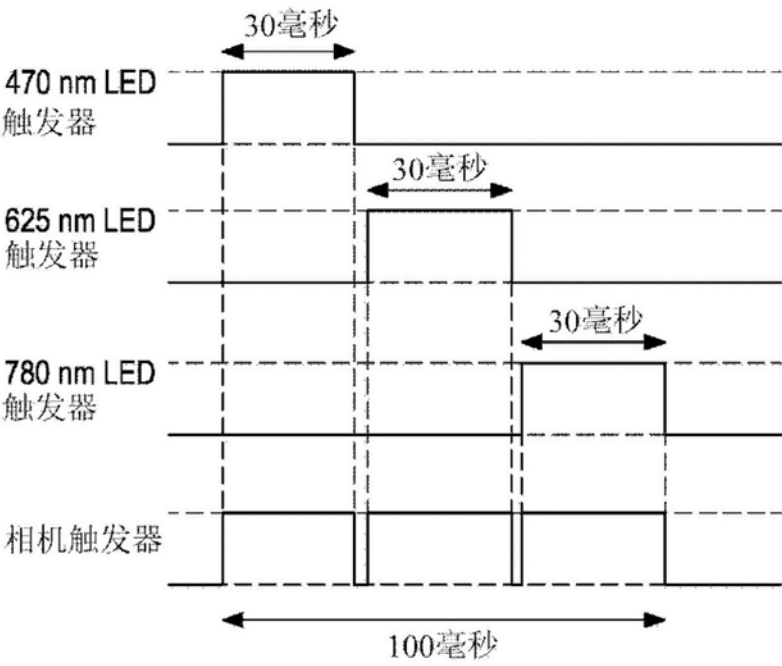


图2b

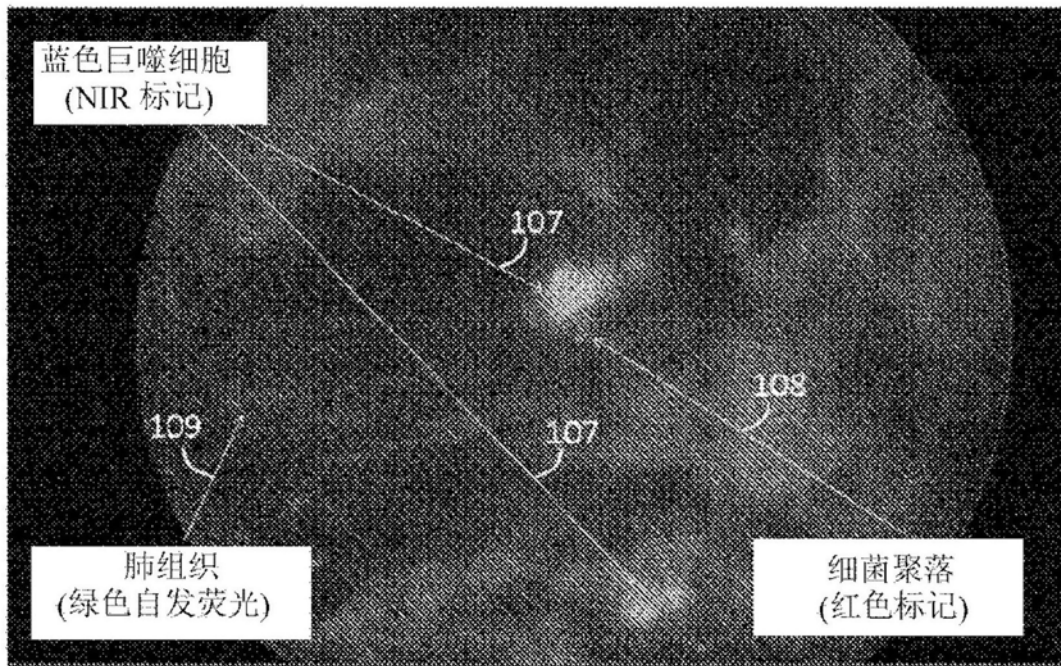


图3

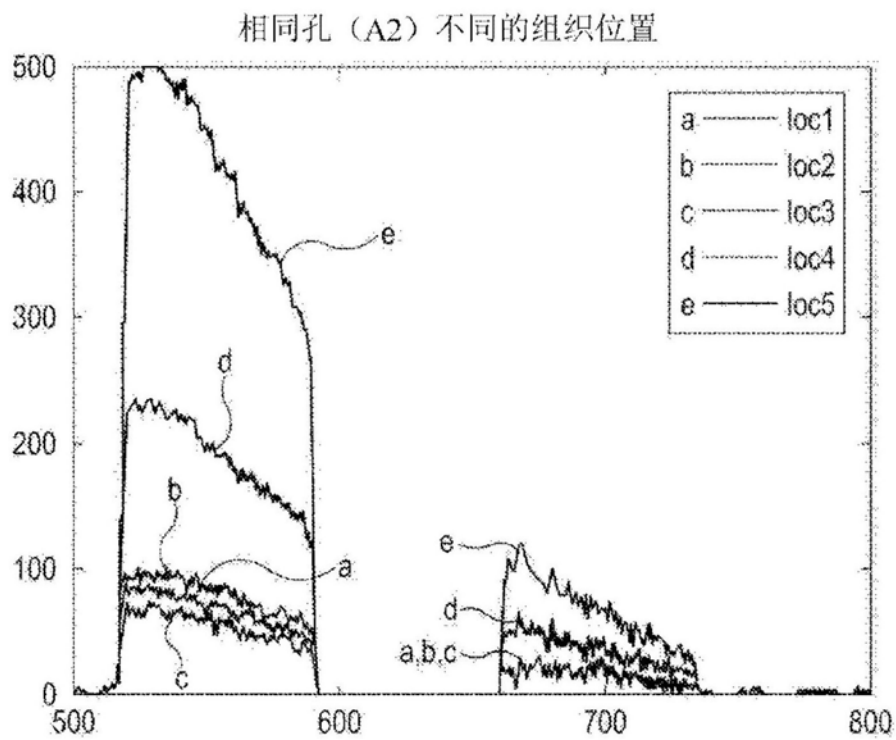


图4

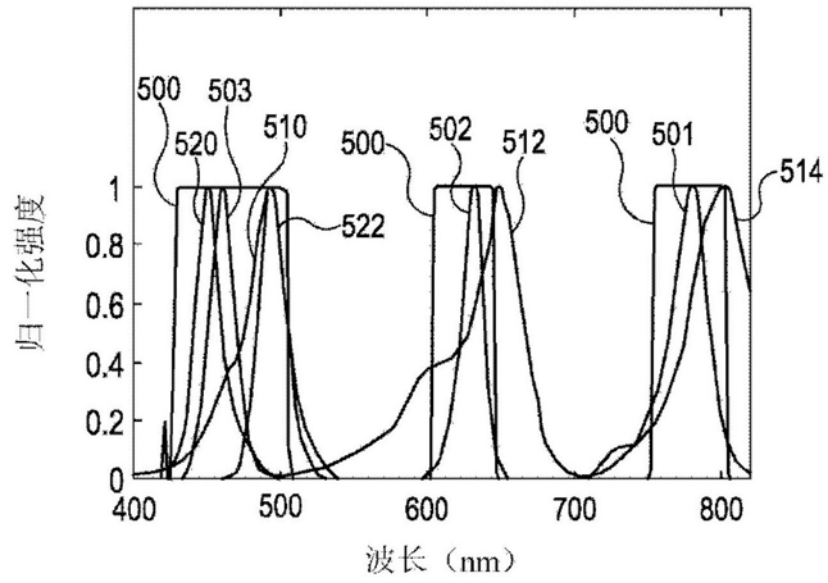


图5a

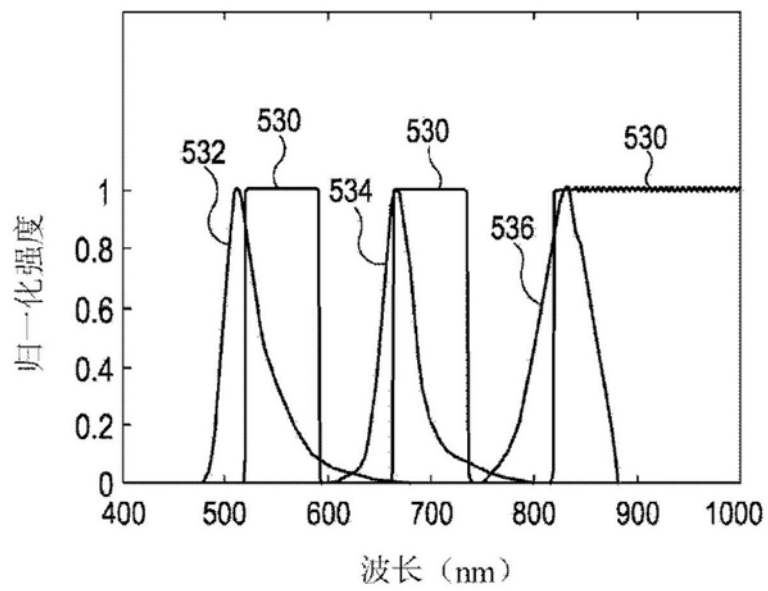


图5b

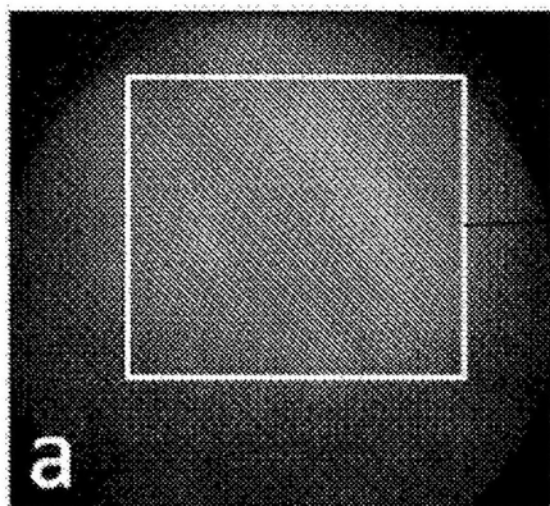


图6a

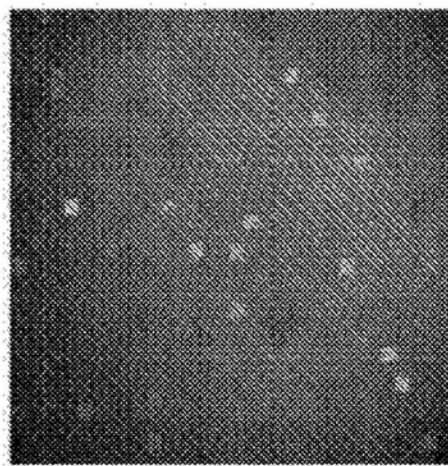


图6b

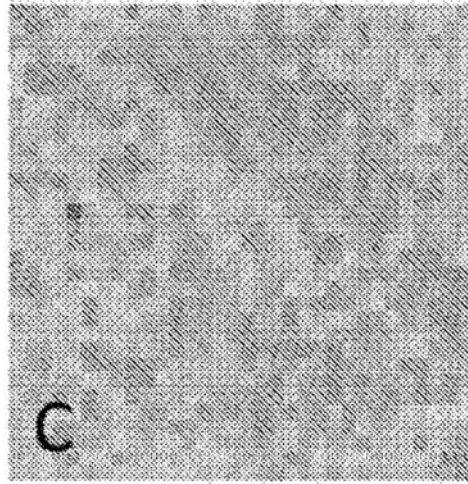


图6c

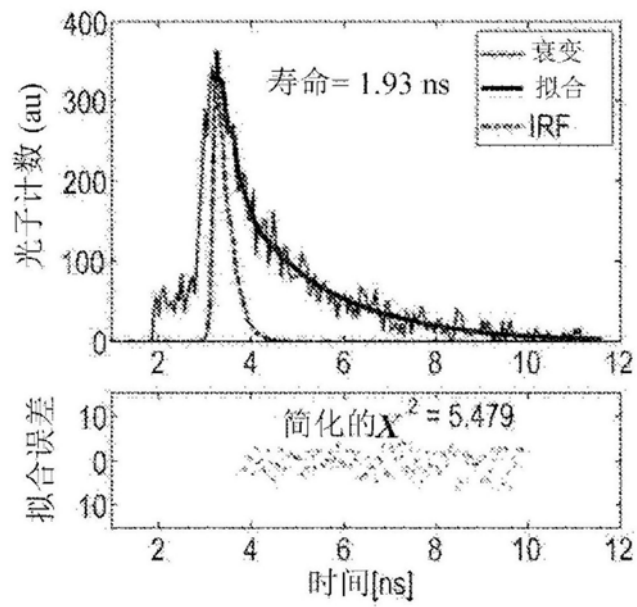


图6d

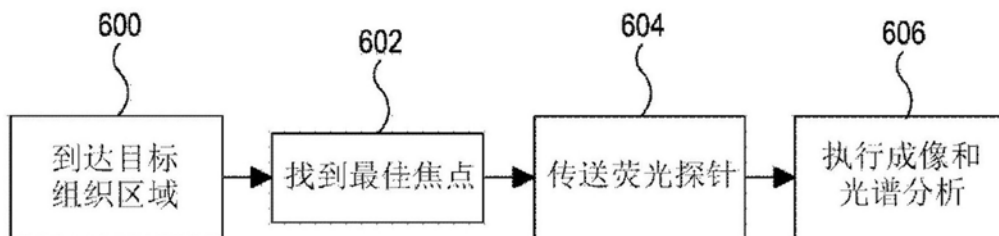


图7a

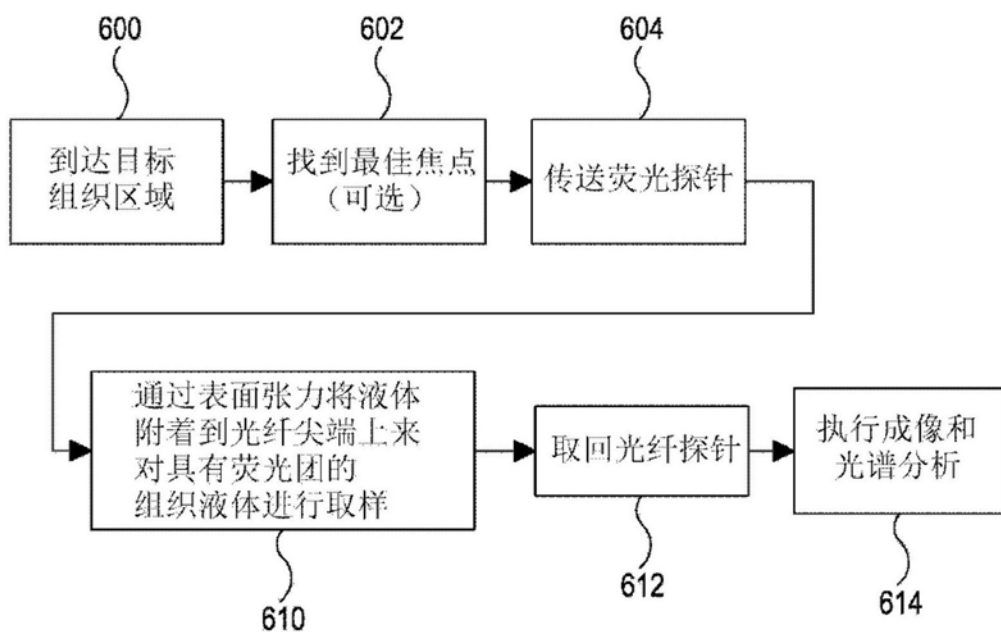


图7b

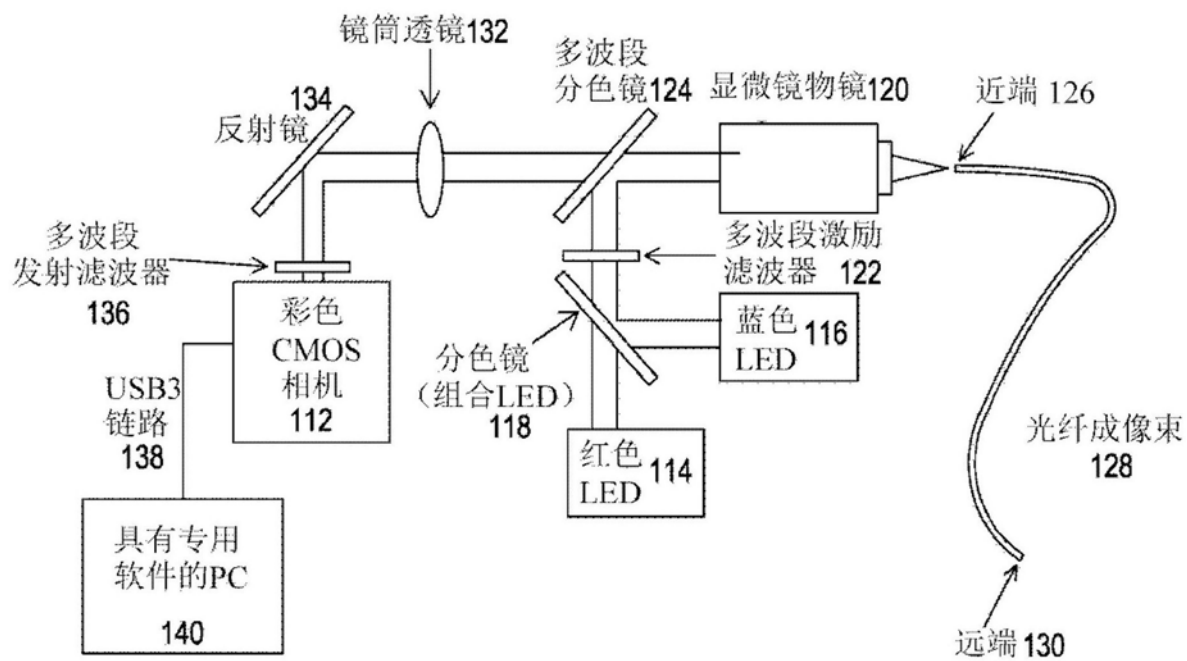


图8

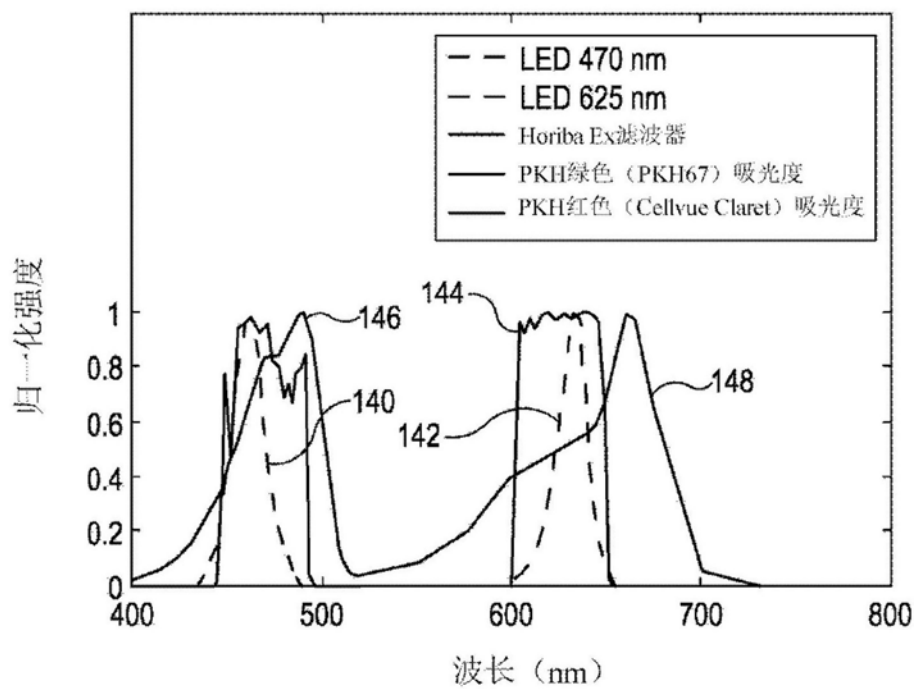


图9

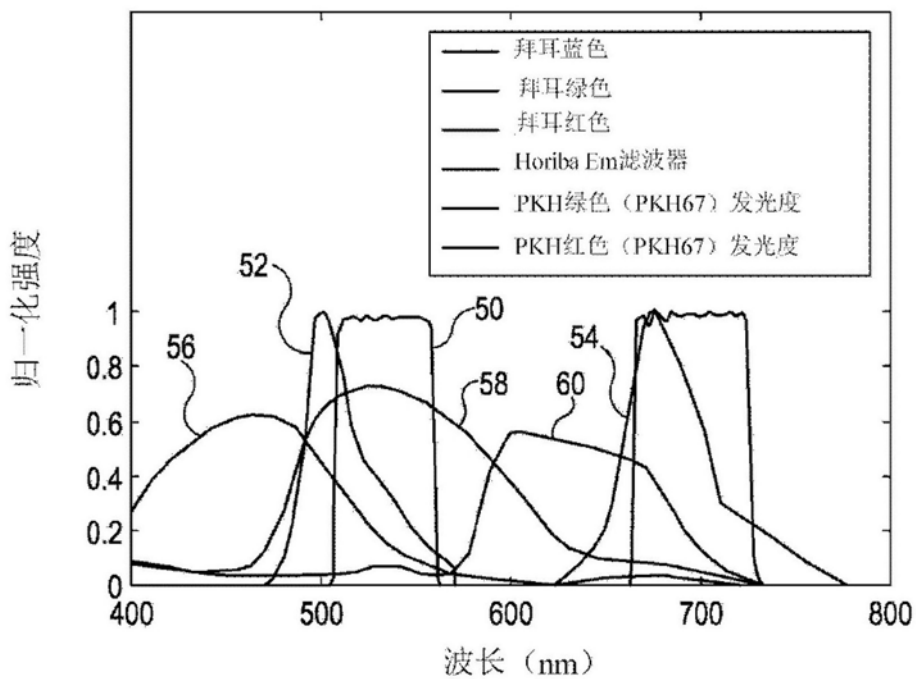


图10

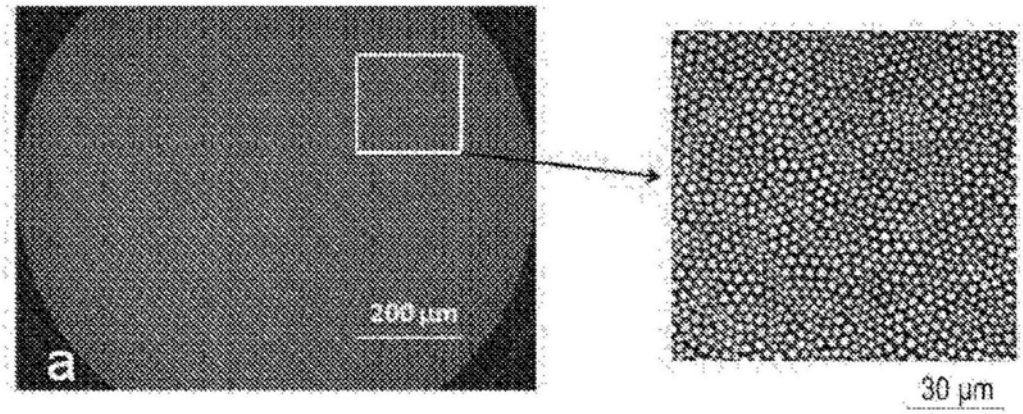


图11a

图11b

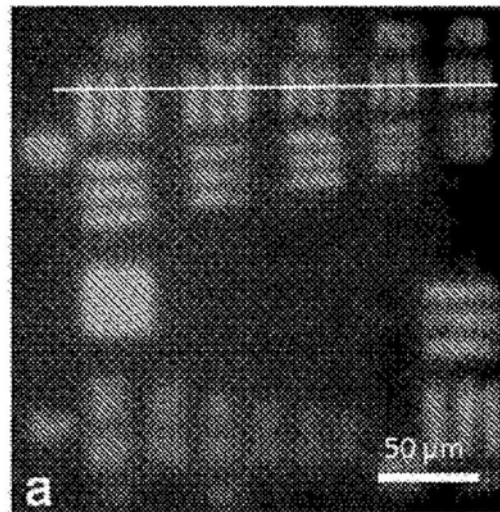


图12a

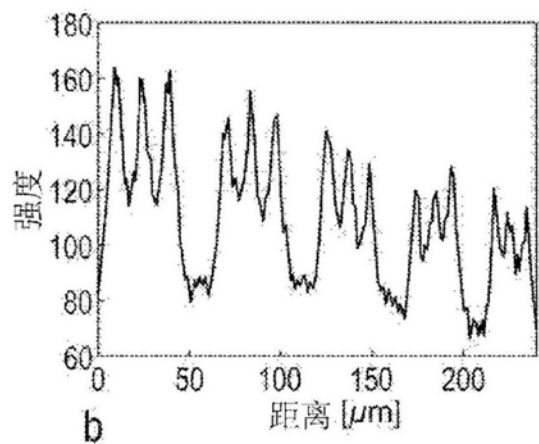


图12b

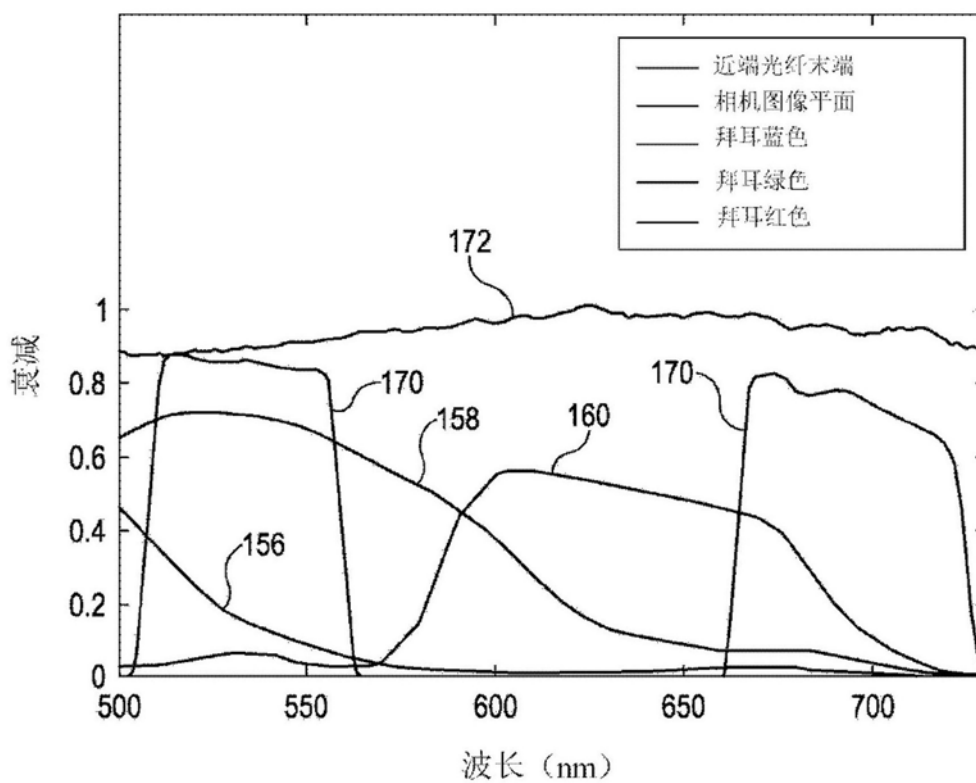


图13

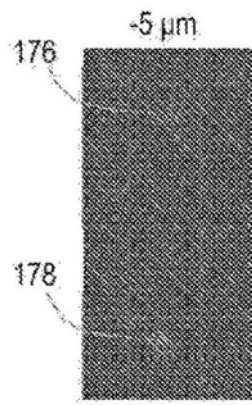


图14a

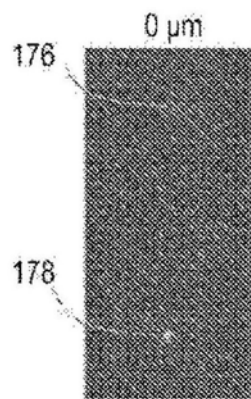


图14b

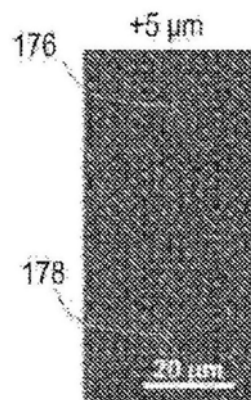


图14c

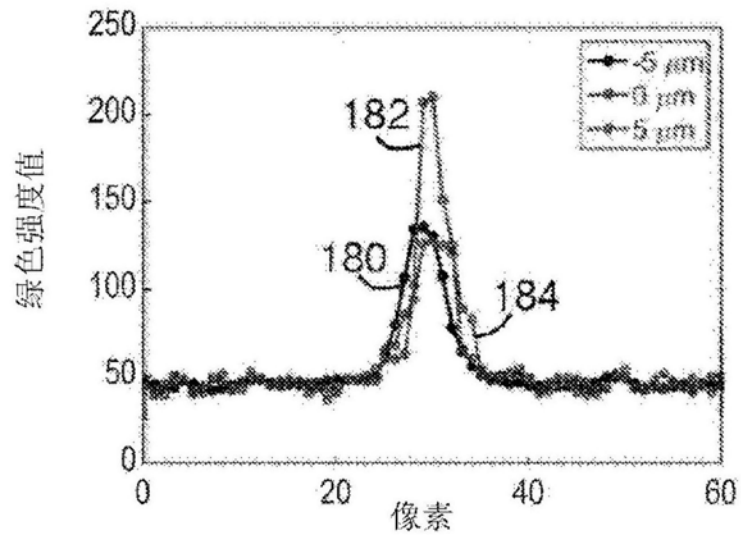


图15a

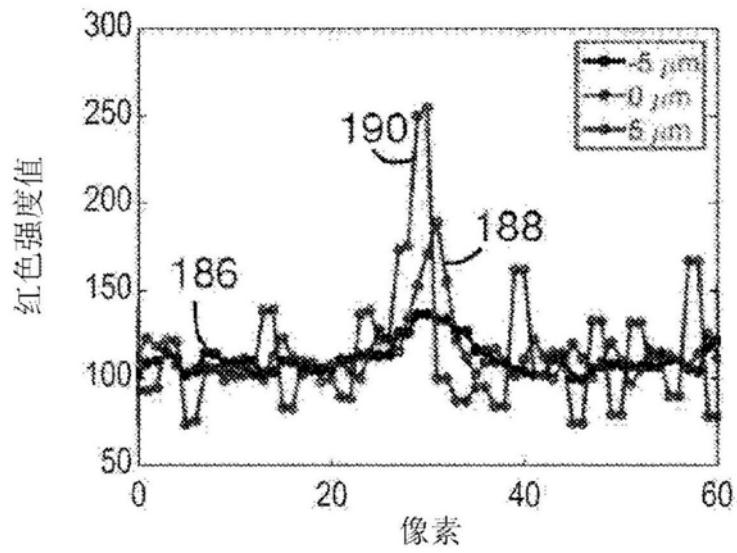


图15b

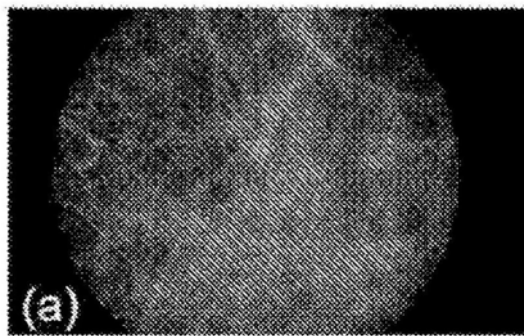


图16a

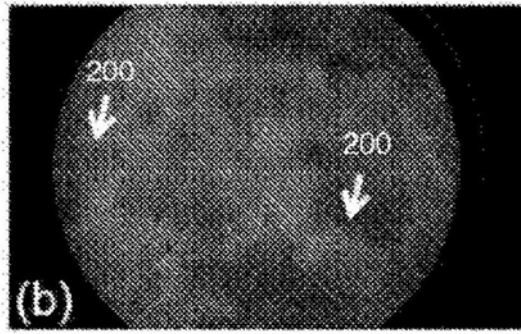


图16b

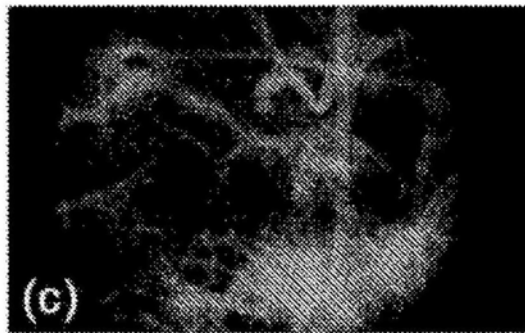


图16c

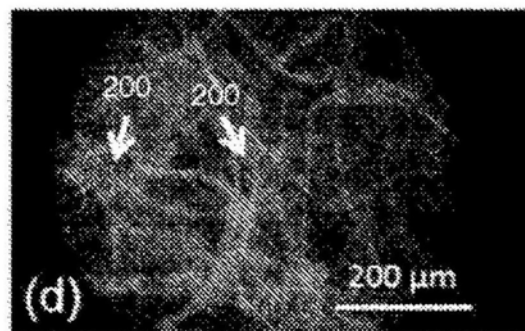


图16d

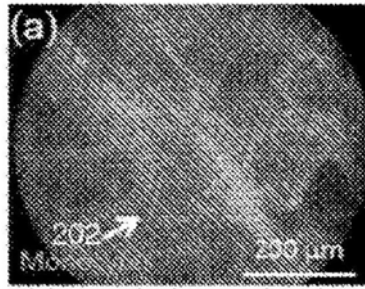


图17a

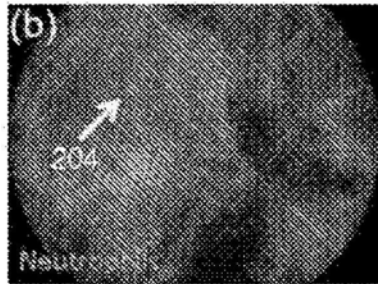


图17b

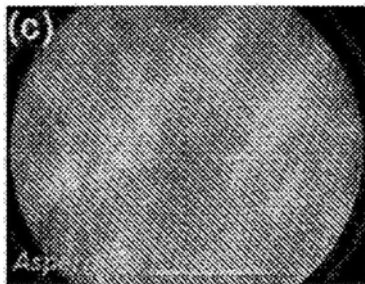


图17c

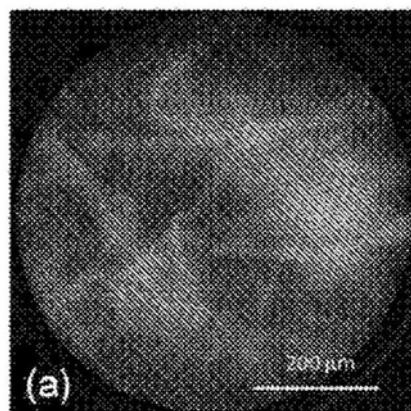


图18a

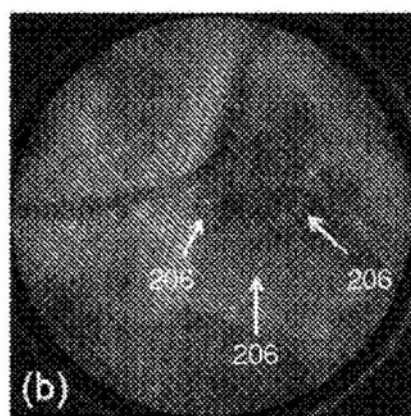


图18b

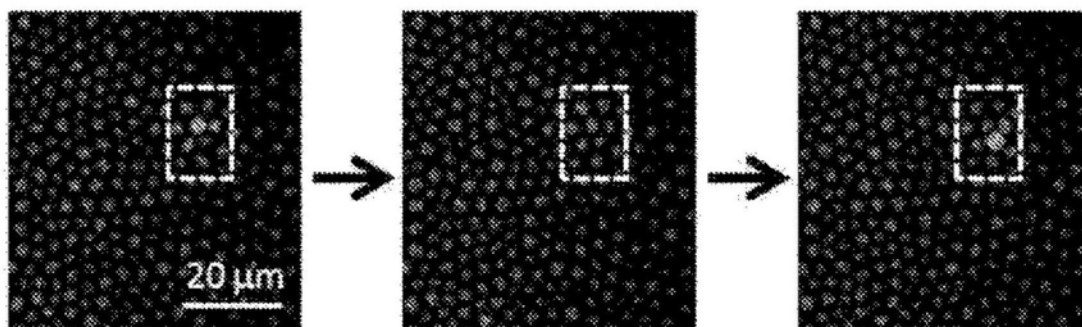


图19a

图19b

图19c

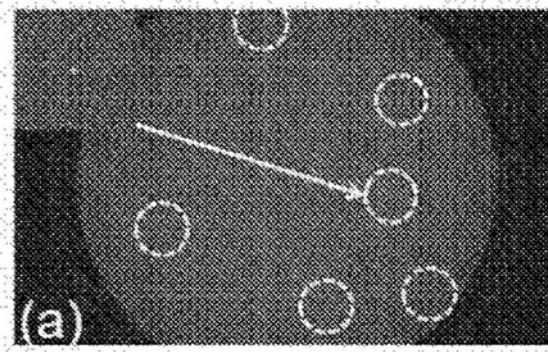


图20a

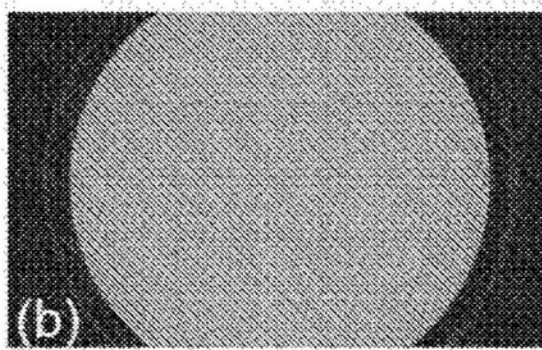


图20b

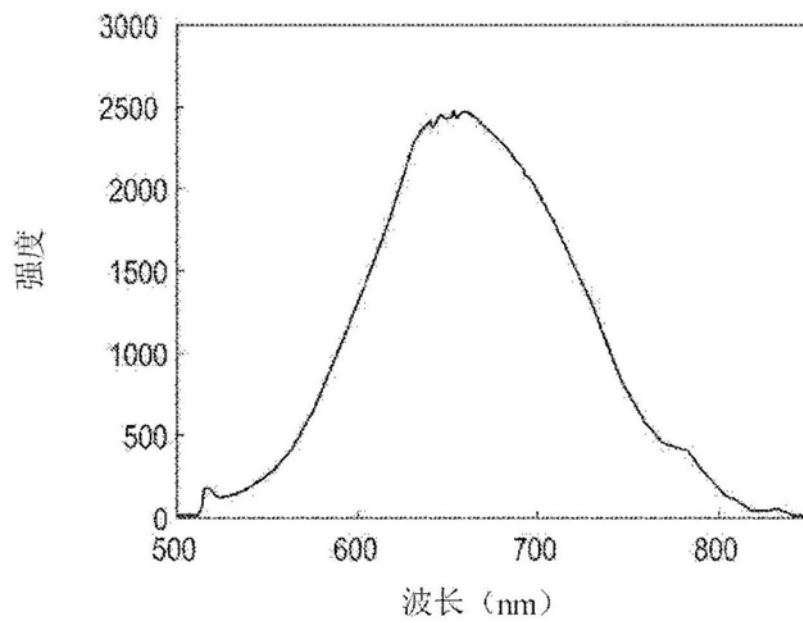


图21

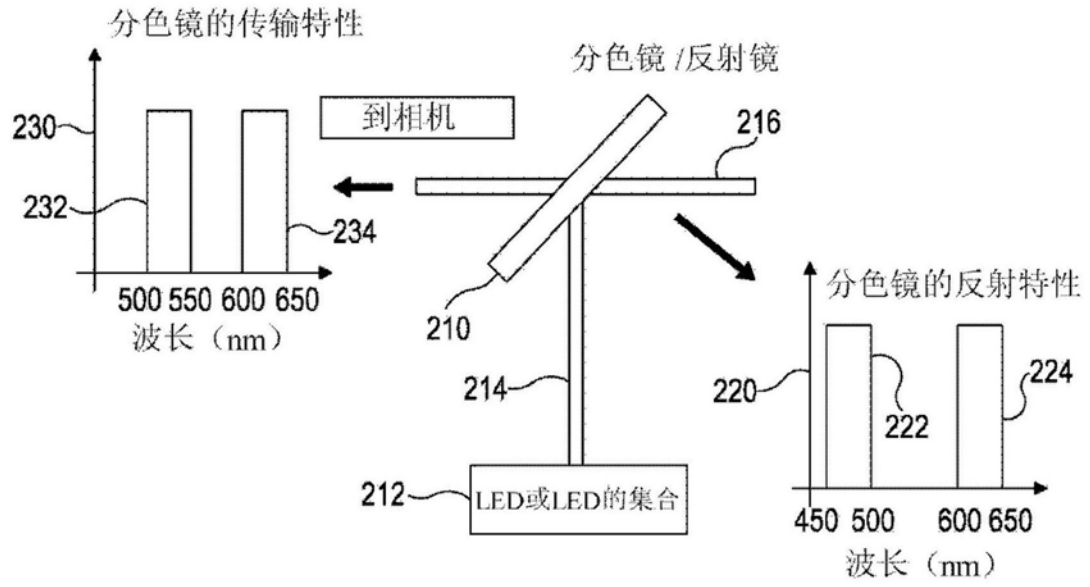


图22

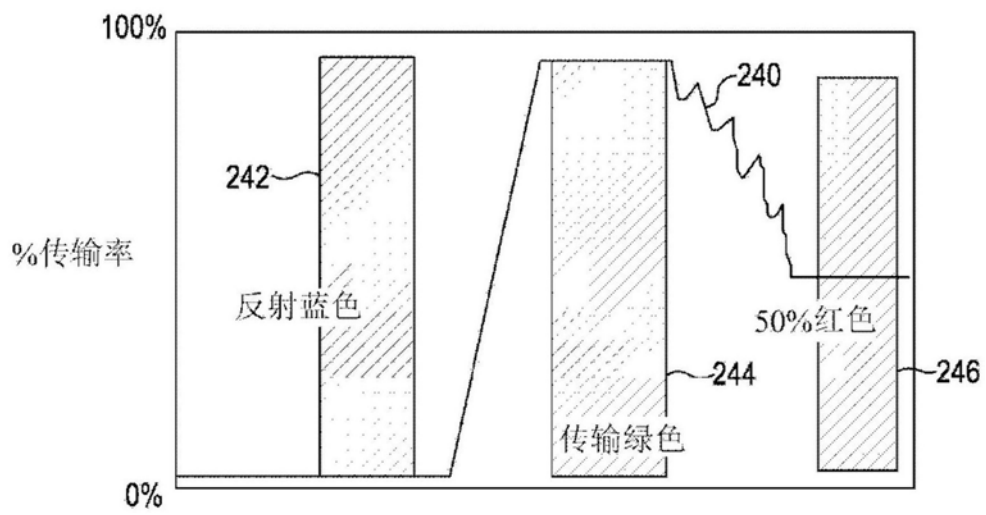


图23

专利名称(译)	内窥镜成像装置及方法		
公开(公告)号	CN109310296A	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201780034948.0	申请日	2017-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	爱丁堡大学		
申请(专利权)人(译)	爱丁堡大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	爱丁堡大学董事会		
[标]发明人	尼古拉克尔斯塔季奇 凯夫达利沃		
发明人	尼古拉·克尔斯塔季奇 凯夫·达利沃		
IPC分类号	A61B1/04 A61B1/06 A61B5/00		
CPC分类号	A61B1/043 A61B1/00009 A61B1/0005 A61B1/00186 A61B1/042 A61B1/0638 A61B1/0669 A61B1/07 A61B5/0071 A61B5/0075 A61B5/0084 A61B5/7203		
代理人(译)	陈平		
优先权	2016005873 2016-04-06 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种内窥镜成像装置，其包括至少一个光源(1, 2, 3)，其被配置为经由公共传输路径向成像区域提供激励信号。每个激励信号具有多种不同颜色中的一种。控制器(100)被配置为控制至少一个光源(1, 2, 3)以提供作为重复时间交织序列的激励信号，该序列至少包括第一种颜色的激励信号以及第二种颜色的后续激励信号。对于至少一些激励信号中的每一个，单色检测器(80)被配置为响应于激励信号接收从成像区域发射的相应响应信号的至少一部分，并基于响应信号的至少一部分生成图像数据。

