



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103987834 B

(45)授权公告日 2017.03.29

(21)申请号 201280023386.7

(72)发明人 吴炯 贾科莫·瓦卡

(22)申请日 2012.04.26

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务所(普通合伙) 11363

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103987834 A

代理人 郭放 荣文英

(43)申请公布日 2014.08.13

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C12M 1/34(2006.01)

61/482,541 2011.05.04 US

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.11.13

(56)对比文件

US 5631165 A, 1997.05.20, 全文.

US 5891734 A, 1999.04.06, 全文.

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/035158 2012.04.26

CN 101349644 A, 2009.01.21, 全文.

US 2009/0023129 A1, 2009.01.22, 第20,

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/151102 EN 2012.11.08

36, 21-27, 32-34, 44-45, 46, 48段及图1-3.

审查员 王斌

(73)专利权人 雅培制药有限公司  
地址 美国伊利诺伊州

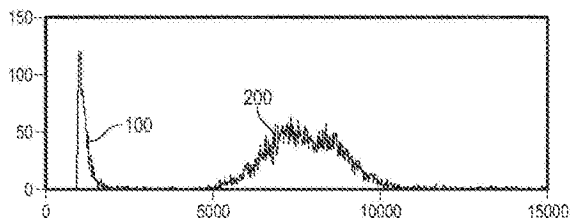
权利要求书2页 说明书9页 附图13页

(54)发明名称

白细胞分析系统和方法

(57)摘要

本发明提供用于分析血液样本、且更具体来说用于进行白细胞(WBC)差异分析的系统和方法。所述系统和方法借助于荧光染色和荧光触发策略来筛查WBC。因此,来自未溶解红细胞(RBC)和溶解RBC的片段的干扰被大致上消除。所述系统和方法还使得能够开发适用于测定含有易碎WBC的样本的相对温和的WBC试剂。在一个实施方案中,所述系统和方法包括:(a)用就发射光谱而言对应于血液学仪器的激发源的专有细胞膜可透性荧光染料染色血液样本;(b)使用荧光触发器筛查所述血液样本的WBC;并且(c)使用(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3)90°偏振侧向散射、(4)90°去偏振侧向散射以及(5)荧光发射的测量结果来进行差异分析。



1. 一种用于对包含多个核红细胞nRBC的血液样本进行白细胞WBC差异分析的血液学分析仪,所述分析仪包括:

激发源,其被定位来激发所述血液样本内的粒子;

多个检测器,包括(1)轴向光损失检测器,其被定位来测量所激发血液样本的轴向光损失;(2)中等角度散射检测器,其被定位来测量所激发血液样本的中等角度散射;(3)偏振侧向散射检测器,其被定位来测量所激发血液样本的90°偏振侧向散射;(4)去偏振侧向散射检测器,其被定位来测量所激发血液样本的90°去偏振侧向散射;以及(5)荧光检测器,其被定位来测量从所激发血液样本发射的荧光;以及

处理器和包括指令的计算机可读存储介质,其中所述处理器被配置来执行所述指令以使所述血液学分析仪实施以下步骤:

(a)用WBC试剂稀释血液的样本,所述WBC试剂包括红细胞RBC溶解剂和细胞膜可透性核酸结合荧光染料;

(b)以孵育期孵育步骤(a)所稀释的血液样本;

(c)将来自步骤(b)的孵育样本递送至血液学分析仪中的流动池;

(d)当所述孵育样本横穿过所述流动池时,用激发源激发来自步骤(c)的所述孵育样本;

(e)收集来自所激发的样本的多个光散射信号和荧光发射信号;

(f)在执行WBC差异分析之前,仅使用荧光触发器来排除非核事件而保留含核事件,所述荧光触发器限定于荧光发射信号并设定为比来自包括RBC片段在内的RBC的荧光发射信号大而比来自白细胞WBC的荧光发射信号小的荧光量级;以及

(g)针对在步骤(f)中收集的含核事件进行WBC差异分析。

2. 如权利要求1所述的血液学分析仪,其中所述轴向光损失检测器测量在0°散射下的轴向光损失。

3. 如权利要求1所述的血液学分析仪,其中所述中等角度散射检测器测量在3°至15°下的光角度散射。

4. 如权利要求1所述的血液学分析仪,其中所述多个检测器包括一个或多个光电倍增管。

5. 如权利要求1所述的血液学分析仪,其中所述激发源是激光器。

6. 如权利要求5所述的血液学分析仪,其中所述激光器被配置来在对应于所述荧光染料的波长下发射光。

7. 如权利要求1所述的血液学分析仪,其中所述荧光染料被选择来与所述激发源对应,并且其中所述荧光染料是细胞膜可透性和核酸结合性的。

8. 如权利要求1所述的血液学分析仪,其进一步包括:

孵育子系统,其用于以WBC试剂稀释所述血液样本。

9. 如权利要求8所述的血液学分析仪,其中所述WBC试剂包括所述荧光染料和溶解剂。

10. 如权利要求8所述的血液学分析仪,其中所述WBC试剂包括(a)至少一种表面活性剂;(b)至少一种缓冲剂或至少一种盐;(c)至少一种抗微生物剂;以及(d)所述荧光染料。

11. 如权利要求8所述的血液学分析仪,其中所述孵育子系统被配置来在小于25秒的时期以所述WBC试剂孵育所述血液样本。

12. 如权利要求8所述的血液学分析仪,其中所述孵育子系统被配置来在小于17秒的时期以所述WBC试剂孵育所述血液样本。

13. 如权利要求8所述的血液学分析仪,其中所述孵育子系统被配置来在小于9秒的时期以所述WBC试剂孵育所述血液样本。

14. 如权利要求8所述的血液学分析仪,其中所述孵育子系统被配置来在范围从30℃至50℃的温度下以所述WBC试剂孵育所述血液样本。

15. 如权利要求9所述的血液学分析仪,其中所述孵育子系统被配置来在40℃的温度下以所述WBC试剂孵育所述血液样本。

16. 一种用自动血液学分析仪进行白细胞WBC分析的方法,所述方法包括:

(a) 用WBC试剂稀释全血样本,其中所述WBC试剂包括红细胞RBC溶解剂和穿透WBC膜并且结合WBC核酸的荧光染料;

(b) 以孵育期孵育步骤(a)的所稀释血液样本;

(c) 将来自步骤(b)的所孵育样本递送至所述血液学分析仪中的流动池;

(d) 当所孵育样本横穿过所述流动池时,用激发源激发来自步骤(c)的所孵育样本;

(e) 收集来自所激发样本的多个光散射信号和荧光发射信号;

(f) 在执行WBC差异分析之前,仅使用荧光触发器来排除非核事件而保留含核事件,所述荧光触发器限定于荧光发射信号并设定为比来自包括RBC片段在内的RBC的荧光发射信号大而比来自白细胞WBC的荧光发射信号小的荧光量级;以及

(g) 基于步骤(e)中收集的所有信号,针对在步骤(f)中收集的含核事件进行WBC差异分析。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述WBC试剂包括(a)至少一种表面活性剂;(b)至少一种缓冲剂或至少一种盐;(c)至少一种抗微生物剂;以及(d)至少一种荧光染料。

18. 如权利要求16所述的方法,其中所述激发源的波长为350nm至700nm。

19. 如权利要求16所述的方法,其中通过带通滤光片或长通滤光片在360nm至750nm的波长下收集荧光发射。

## 白细胞分析系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据美国法典35篇119条(e)款要求题为分析白细胞的方法(Method For Analyzing White Blood Cells)并在2011年5月4日提交的美国临时专利申请号61/482,541的权益,所述临时专利申请的全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0003] 本申请还涉及2012年4月26日提交的、代理人案卷号为ADDV-017(11041US01),题为“有核红细胞分析系统和方法(NUCLEATED RED BLOOD CELL ANALYSIS SYSTEM AND METHOD)”的申请号xx/xxx,xxx;和2012年4月26日提交的、代理人案卷号为ADDV-018(11042US01),题为“嗜碱性粒细胞分析系统和方法(BASOPHIL ANALYSIS SYSTEM AND METHOD)”的申请号xx/xxx,xxx,这些申请的全部公开内容以引用的方式整体并入本文。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及血液学系统和方法。更具体来说,本发明涉及用于分析血液样本以鉴定、分类和/或定量血液样本中的白细胞(WBC)和WBC子群体的系统和方法。

### 背景技术

[0005] 开发用于分析WBC(包括计数和分类)的准确且高效的血液学测定已成为一个挑战。开发准确且高效的测定具有困难的一个原因在于WBC在样本中的总血细胞中的浓度相对较低(约0.1%至0.2%)。努力使用于分析WBC以及配制强健WBC试剂的先进方法工程化仍然是自动血液学分析仪领域中的一个最优先考虑事项。

[0006] 通常,溶解红细胞(RBC)是在计数和分类WBC和WBC子群体之前消除来自RBC的干扰且浓缩WBC所需的。更具体来说,准确且高效的WBC分析要求:(1)在小于30秒内完全溶解RBC;(2)在溶解之后使RBC的大片段断裂成小片;以及(3)保存WBC用于准确计数和恰当分类。如果血液样本“溶解不足”,那么未溶解RBC即使在极小浓度下也会干扰WBC计数和差异分析。类似地,溶解RBC的较大片段可干扰WBC计数和差异分析。实际上,难以使未溶解RBC和/或溶解RBC的较大片段与淋巴细胞(最小的WBC)分离。如果血液样本“溶解过度”,那么由于对WBC的细胞膜的过度损伤对WBC的分类可能会受不利影响。

[0007] 在一些情况下,WBC分析的困难性可能因为存在两种特殊类型的样本:即含有溶解抗性红细胞(rstRBC)的样本和含有易碎淋巴细胞的样本而加剧。在样本含有rstRBC的情况下,WBC计数和淋巴细胞百分比由于除真实淋巴细胞以外的粒子的影响而被错误地报道为“较高”,从而对患者造成不当诊断和治疗的风险。在样本含有易碎淋巴细胞的情况下,损伤淋巴细胞在WBC差异分析中可能不显示其特征。此外,暴露的WBC核可被计数为有核红细胞(nRBC),从而在某些测定中产生假阳性nRBC计数。

### 发明内容

[0008] 本文提供用于分析血液样本、且更具体来说用于进行白细胞(WBC)差异分析的系统和方法。一般说来,所公开的系统和方法借助于荧光染色和荧光触发策略筛查WBC。因此,

来自未溶解RBC(例如rstRBC)和RBC片段的干扰被大致上或完全消除,由此确保对WBC和WBC子群体的准确计数和区别。所述系统和方法还使得能够开发适用于测定含有易碎淋巴细胞(或其它易碎WBC)的样本(包括老化样本)的相对温和的WBC试剂。

[0009] 在一个实施方案中,举例而言,本文公开的系统和方法包括:(a)用就发射光谱而言对应于血液学仪器的激发源的专有细胞膜可透性荧光染料染色血液样本;(b)使用荧光触发器筛查所述血液样本的WBC;以及(c)使用(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3)90°偏振侧向散射、(4)90°去偏振侧向散射以及(5)荧光发射的测量结果的组合来进行差异分析。

## 附图说明

[0010] 并入本文的附图构成说明书的一部分。附图连同本书面描述一起进一步用于说明提供的系统和方法的原理,并且使得相关领域技术人员能够制造和使用提供的系统和方法。在附图中,相同参考数字指示相同或功能上类似的元件。

[0011] 图1A-1E显示全血样本的频率曲线,其显示在溶解之后的WBC和RBC残余物。

[0012] 图1A是显示轴向光损失信号的测量结果的频率曲线。

[0013] 图1B是显示中等角度散射的测量结果的频率曲线。

[0014] 图1C是显示90°偏振侧向散射的测量结果的频率曲线。

[0015] 图1D是显示90°去偏振侧向散射的测量结果的频率曲线。

[0016] 图1E是显示荧光的测量结果的频率曲线。

[0017] 图2是显示使用荧光触发器排除对RBC的任何片段的考虑的细胞图。

[0018] 图3是显示使用荧光触发器排除对RBC的任何片段的考虑的另一细胞图。

[0019] 图4是示出血液学仪器的示意图。

[0020] 图5A-5J显示五部分WBC差异分析的细胞图。

[0021] 图5A是描绘轴向光损失对中等角度散射的细胞图。

[0022] 图5B是描绘90°偏振侧向散射对轴向光损失的细胞图。

[0023] 图5C是描绘90°偏振侧向散射对中等角度散射的细胞图。

[0024] 图5D是描绘90°去偏振侧向散射对轴向光损失的细胞图。

[0025] 图5E是描绘90°去偏振侧向散射对中等角度散射的细胞图。

[0026] 图5F是描绘90°去偏振侧向散射对90°偏振侧向散射的细胞图。

[0027] 图5G是描绘荧光对轴向光损失的细胞图。

[0028] 图5H是描绘荧光对中等角度散射的细胞图。

[0029] 图5I是描绘荧光对90°偏振侧向散射的细胞图。

[0030] 图5J是描绘荧光对90°去偏振侧向散射的细胞图。

[0031] 图6A是示出使用传统方法分析含有溶解抗性RBC的全血样本的细胞图。

[0032] 图6B是根据所提出的一个实施方案由荧光触发的血液学分析仪产生的显示轴向光损失对中等角度散射的细胞图。

[0033] 图7A是示出使用传统方法分析老化全血样本的细胞图。

[0034] 图7B是根据所提出的一个实施方案由荧光触发的血液学分析仪产生的显示轴向光损失对中等角度散射的细胞图。

## 具体实施方式

[0035] 本文提供用于分析血液样本、且更具体来说用于进行白细胞(WBC)差异分析以鉴定、分类并且计数WBC和WBC子群体的系统和方法。一般说来,所公开的系统和方法借助于荧光染色和荧光触发策略来筛查WBC。因此,来自如溶解抗性红细胞(rstRBC)的未溶解红细胞(RBC)和RBC片段的干扰被大致上消除。所公开的系统和方法由此确保对WBC和WBC子群体的准确计数和区别。所述系统和方法也使得能够开发适于测定含有易碎淋巴细胞(或其它易碎WBC)的样本(包括老化样本)的相对温和的WBC试剂。

[0036] 在一个实施方案中,举例而言,本文公开的系统和方法包括:(a)用就发射光谱而言对应于血液学仪器的激发源的专有细胞膜可透性荧光染料染色血液样本;(b)使用荧光触发器筛查所述血液样本的WBC;以及(c)使用(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3)90°偏振侧向散射、(4)90°去偏振侧向散射以及(5)荧光发射的测量结果的组合来进行WBC差异分析。

[0037] 如本文所用,表述“荧光信息”意指从血液学分析仪的荧光通道收集的数据。如本文所用,表述“荧光通道”意指设置在合适的波段下的用于测量自样本发射的荧光的量的检测装置,如光电倍增管。

[0038] (1) 荧光染料的使用。

[0039] WBC在其核中含有相对较高浓度的DNA。然而,成熟RBC不含有DNA。因此,选择荧光染料来区别两类血细胞;即含有核酸的血细胞和不含有核酸的血细胞。染料的目的在于易于穿透到活细胞中,以高亲和力结合DNA,并且在染料由适当光源激发时以足够斯托克斯位移(Stokes shift)发射强烈荧光。染料在可见波段中的峰吸收大致上匹配光源波长(在50nm光源波长内、更优选在25nm光源波长内)以适当激发染料并获得最佳结果。

[0040] 所选荧光染料优选:1)能够结合核酸,2)能够穿透WBC的细胞膜,3)当经受光源时可在所选波长下激发,4)在由光源激发后发射荧光,并且5)在液体中具有生物稳定性和可溶性。染料可选自由以下组成的组:吖啶橙(acridine orange)、SYBR11、SYBR绿系列染料、碘化己锭(hexidium iodide)、SYTO11、SYTO12、SYTO13、SYTO14、SYTO16、SYTO21、RNA选择性SYTO、SYTO24、SYTO25及其任何等效物。染料用于“活化”WBC,并且基于血液学分析仪中配置的荧光触发器来“筛出”未溶解RBC和RBC的片段。染料通常以约0.1ng/mL至约0.1mg/mL的浓度存在。尽管各种染料可用,但所选染料通常与血液学分析仪的激发源配对以便使用单一专有染料在意图受鉴定、定量和/或分析的所有WBC子群体中进行染色并激发荧光发射。因此,单一(即专有)染料可用于同时鉴定、定量和分析所有WBC子群体。

[0041] 在一个实施方案中,以WBC试剂形式、以足以进行染色并且活化多达每微升 $1,000 \times 10^3$ 个WBC的量、与以下各物组合来提供荧光染料:1)至少一种表面活性剂;2)至少一种缓冲剂;3)至少一种盐;以及/或4)至少抗微生物剂。如“TRITON”X-100或皂素(saponin)的至少一种表面活性剂用于破坏RBC的膜,并且减小RBC的片段的大小。所述至少一种表面活性剂通常以约0.001%至约5%的浓度存在。如来自“TRIADINE”或“PROCLIN”家族的抗微生物剂的至少一种抗微生物剂用于防止试剂受微生物污染。至少一种抗微生物剂的浓度应足以在所需保存期限保存试剂。如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)的至少一种缓冲剂用于调整反应混合物的pH以控制RBC的溶解和保存WBC。至少一

种缓冲剂通常以约0.01%至约3%的浓度存在。pH通常在约3至约12的范围内。如NaCl或Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的至少一种盐用于调整重量摩尔渗透浓度(osmolality,或同渗重摩)以增加溶解效应和/或使WBC保存最优化。至少一种盐可以约0.01%至约3%的浓度存在。在某些情况下,至少一种缓冲剂可充当至少一种盐,或至少一种盐可充当至少一种缓冲剂。一般说来,较低重量摩尔渗透浓度或低张性用于加速RBC溶解。重量摩尔渗透浓度通常在约20mOsm至约250mOsm的范围内。

[0042] 可在以约1体积份样本对约35体积份WBC试剂的比率混合血液样本与WBC试剂之后,使RBC在高于室温的温度(例如在约30℃至约50℃之间,如约40℃)下历经相对较短的时期(例如小于约25秒、小于约17秒、或甚至小于约9秒)发生溶解。用多个光学通道和至少一个荧光通道收集分析数据。

[0043] 图1A-E用收集的光学信息的频率曲线和荧光信息的频率曲线显示真实WBC与未溶解RBC和RBC片段的分离。图1A中的频率曲线显示轴向光损失(ALL)的测量结果。图1B中的频率曲线显示中等角度散射(1AS)的测量结果。图1C中的频率曲线显示90°偏振侧向散射(PSS)的测量结果。图1D中的频率曲线显示90°去偏振侧向散射(DSS)的测量结果。图1E中的频率曲线显示荧光(FL1)的测量结果。在频率曲线(histograms)中,水平轴指示检测通道的值(或通道名称,即ALL、1AS、PSS、DSS或FL1)。垂直轴指示血液样本的组分的计数。在频率曲线中,线100指示RBC残余物,并且线200指示WBC。如本文所用,“RBC残余物”与“RBC的片段”同义。如通过比较图1E与图1A-1D所示,荧光信息显示两组粒子(即WBC和RBC残余物)之间的分离比任何光学通道获得的分离好得多,由此有助于随后分析。

[0044] (2) 荧光触发器的使用。

[0045] 在由光源激发荧光染料后,血细胞发射不同量级的荧光信号。荧光信号的量级差异由细胞内部的核酸(即DNA)的量产生。DNA的量越大,荧光信号较高的可能性越大。此外,穿透细胞膜的功效、染料大小、染料与DNA之间的结合动力学、染料与DNA之间的亲和力及其它因素也会影响荧光信号。成熟RBC发射最小荧光信号,因为在成熟RBC内不存在DNA。有核红细胞(nRBC)发射非常强的荧光信号,不仅因为nRBC的核内部存在DNA,而且因为nRBC的膜在溶解程序期间被破坏所以染色也更容易。未溶解RBC或RBC片段不发射荧光,但其可发射非常弱的自体荧光。如参照图1E所示,发射强得多的荧光信号的细胞是具有核的细胞,即WBC(和nRBC,当存在时)。

[0046] 因此,本文提供的系统和方法使用荧光触发器来收集和分析WBC。举例而言,通常在来自RBC的信号与来自WBC的信号之间设置的荧光触发器可用于单独收集来自WBC的信号供进一步分析用。使用FL1触发器的两个实施例显示于图2和图3中。图2是显示使用荧光触发器消除RBC的任何片段(无核粒子)以及收集含核事件(例如WBC和/或nRBC)的细胞图。荧光染料是吖啶橙并且荧光染料的浓度是3μg/mL。荧光光电倍增管的电压设定为350伏特。图3是显示使用荧光触发器消除RBC的任何片段(无核粒子)以及收集含核事件(例如WBC和/或nRBC)的细胞图。荧光染料是吖啶橙并且荧光染料的浓度是0.03μg/mL。荧光光电倍增管的电压设定为500伏特。在使用吖啶橙染色(即使在染料浓度显著不同下,即图2中的3μg/mL和图3中的0.03μg/mL)和适当设置FL1触发器的WBC测定中,仅FL1触发器以上的事件是含核事件(例如WBC和/或nRBC(如果存在))并且因此被捕获供进一步分析用。

[0047] (3) 用于分析的多个光学通道和至少一个荧光通道的使用。

[0048] 在一个实施方案中,借助于多角度偏振散射分离技术(MAPSS)进行WBC差异分析,其中荧光信息得以增强。至少一个光电二极管或至少一个光电倍增管或至少一个光电二极管与至少一个光电倍增管两者是检测由穿过流动池的各血细胞散射的光所需的。两个或更多个光电二极管用于测量度量约 $0^\circ$ 散射的ALL信号和度量低角度(例如约 $3^\circ$ 至约 $15^\circ$ )散射的IAS信号。两个或更多个光电倍增管用于检测 $90^\circ$ PSS信号和 $90^\circ$ DSS信号。对适当波长范围内的FL1测量来说,取决于对光源波长的选择而需要其它光电倍增管。因此,在系统上捕获的各事件展现多方面的信息,如ALL、IAS(一个或多个通道)、PSS、DSS和荧光(一个或多个通道)。来自这些检测通道的信息用于进一步分析血细胞。

[0049] 图4是示出适于血液学分析(包括流式细胞术)的装置的发光和检测光学器件的示意图。现参照图4,装置10包括光源12、用于光束弯曲的前镜14和后镜16、含有第一圆柱形透镜20和第二圆柱形透镜22的光束扩展器模块18、聚焦透镜24、精细光束调整器26、流动池28、前向散射透镜30、靶心检测器32、第一光电倍增管34、第二光电倍增管36和第三光电倍增管38。靶心检测器32具有用于 $0^\circ$ 光散射的内部检测器32a和用于 $7^\circ$ 光散射的外部检测器32b。

[0050] 在随后论述中,光源优选是激光器。然而,也可使用其它光源,例如像灯(例如汞灯、氙灯)。光源12可为可商购自Coherent, Inc., Santa Clara, CA的垂直偏振气冷Coherent Cube激光器。可使用波长在350nm至700nm的范围内的激光器。激光器的操作条件大致上与当前与“CELL-DYN”自动血液学分析仪一起使用的激光器的操作条件类似。

[0051] 关于流动池、透镜、聚焦透镜、精细光束调整机构和激光聚焦透镜的其它细节可见于以引用的方式并入本文的美国专利号5,631,165中,尤其在第41栏第32行至第43栏第11行。图4中所示的前向光路系统包括球面平凸透镜30和位于透镜的后聚焦平面中的两元件光电二极管检测器32。在这个构造中,两元件光电二极管检测器32内的每个点映射来自穿过流动池28移动的细胞的光的一个特定收集角。检测器32可以是能够检测轴向光损失(ALL)和中等角度前向散射(IAS)的靶心检测器。美国专利号5,631,165在第43栏第12-52行描述这个检测器的各种替代物。

[0052] 第一光电倍增管34(PMT1)测量去偏振侧向散射(DSS)。第二光电倍增管36(PMT2)测量偏振侧向散射(PSS),并且视所选荧光染料和所用光源而定,第三光电倍增管38(PMT3)测量自440nm至680nm的荧光发射。光电倍增管在广泛波长范围内收集荧光信号以增加信号强度。侧向散射和荧光发射由二向色光束分离器40和42导向这些光电倍增管,所述二向色光束分离器在所需波长下高效传输和反射以使得能够进行高效检测。美国专利号5,631,165在第43栏第53行至第44栏第4行描述关于光电倍增管的各种其它细节。

[0053] 当通过使用浸渍收集系统(immersion collection system)测量荧光时,在光电倍增管34、36和38处的灵敏性得以增强。浸渍收集系统是借助于折射率匹配层使第一透镜30光学连接于流动池28,从而使得能够在宽泛角度上收集光的收集系统。美国专利号5,631,165在第44栏第5-31行描述这个光学系统的各种其它细节。

[0054] 集光器44是一种用于高分辨率显微术中的具有足够用于受衍射限制的成像的像差校正的光学透镜系统。美国专利号5,631,165在第44栏第32-60行描述这个光学系统的各种其它细节。

[0055] 图4中所示的其它部件(即狭缝46、场透镜48和第二狭缝50)的功能描述于美国专

利号5,631,165第44栏第63行至第45栏第26行中。插入光电倍增管的光路中以改变所检测光的波长或偏振化或波长与偏振化两者的光学滤光片52或56和偏光器52或56也描述于美国专利号5,631,165第44栏第63行至第45栏第26行中。适用于本文中的光学滤光片包括带通滤光片和长通滤光片。

[0056] 光电倍增管34、36和38检测侧向散射(在轴近似垂直于入射激光光束的锥体中散射的光)或荧光(在与入射激光光束的波长不同的波长下自细胞发射的光)。

[0057] 尽管以上参考美国专利号5,631,165的所选部分,但美国专利号5,631,165以引用的方式整体并入本文。

[0058] 图5A-J显示增强的五部分WBC差异分析的一个实施例。使用MAPSS技术和FL1通道分离嗜中性粒细胞(NE)、淋巴细胞(LY)、单核细胞(MO)、嗜酸性粒细胞(EO)和嗜碱性粒细胞(BA)。图5A中的细胞图显示ALL对1AS。图5B中的细胞图显示90°PSS对ALL。图5C中的细胞图显示90°PSS对1AS。图5D中的细胞图显示90°DSS对ALL。图5E中的细胞图显示90°DSS对1AS。图5F中的细胞图显示90°DSS对90°PSS。图5G中的细胞图显示FL1对ALL。图5H中的细胞图显示FL1对1AS。图5I中的细胞图显示FL1对90°PSS。图5J中的细胞图显示FL1对90°DSS。

[0059] 除从四个传统MAPSS通道(ALL、1AS、PSS、DSS)收集的信息之外,FL1通道进一步区分细胞子群体(图5G至5J,包括图5G和5J)。对于使用吖啶橙作为筛查WBC的染料的情况,相对于其它WBC子群体,即嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞,嗜碱性粒细胞显示相对较低的FL1信号,并且单核细胞显示相对较高的FL1信号。在细胞图中,点510代表嗜中性粒细胞,点520代表嗜酸性粒细胞,点530代表淋巴细胞,点540代表嗜碱性粒细胞,并且点550代表单核细胞。来自所有光学维度和荧光维度的组合定量信息提供对含有WBC的血液样本的增强且更可靠的差异分析。

[0060] 图6A是示出使用传统方法分析含有rstRBC的全血样本的细胞图。图6A显示使用可商购的“CELL-DYN”Sapphire™血液学分析仪获得的ALL对1AS的细胞图。图6B是使用FL1触发器增强的血液学分析仪获得的显示ALL对1AS的细胞图。全血样本与图6A中分析的全血样本相同。荧光染料吖啶橙的浓度为3μg/mL。结果显示本文所述的方法准确且高效用于先前提及的两种最具挑战性的情况。在传统方法中,未溶解RBC(即出现在细胞图的左下方的事件)被认为是淋巴细胞,由此导致WBC计数较高和淋巴细胞百分比高。图6B显示通过本文所述的方法分析含有rstRBC的样本的WBC的结果。在本文所述的方法中,对WBC的分析是准确的,因为无RBC或RBC残余物被识别到。

[0061] 图7A是示出使用传统方法分析含有更多易碎WBC的老化(28小时之久)全血样本的细胞图。图7A是使用“CELL-DYN”Sapphire™血液学分析仪获得的显示ALL对1AS的细胞图。图7B是使用FL1触发器增强的血液学分析仪获得的显示ALL对1AS的细胞图。全血样本与图7A中分析的全血样本相同。荧光染料吖啶橙的浓度为3μg/mL。

[0062] 本文所述的方法增强血液学分析仪对WBC的分析。本文所述的方法提供更准确的WBC计数和对WBC子群体的更准确分类,因为来自未溶解RBC和RBC片段的干扰被大致上消除。使用荧光为改进WBC的差异分析提供进一步信息。当分析具有rstRBC的样本和具有易碎WBC的样本时,本文所述的方法显示超过传统方法的优势。

[0063] 其它实施方案

[0064] 在一个实施方案中,提供一种用于对已用荧光染料染色的血液样本进行WBC差异

分析的血液学分析仪。所述分析仪包括被定位来激发血液样本内的粒子的激发源。所述分析仪进一步包括多个检测器,包括:(1)轴向光损失检测器,其被定位来测量所激发血液样本的轴向光损失;(2)中等角度散射检测器,其被定位来测量所激发血液样本的中等角度散射;(3)偏振侧向散射检测器,其被定位来测量所激发血液样本的 $90^\circ$ 偏振侧向散射;(4)去偏振侧向散射检测器,其被定位来测量所激发血液样本的 $90^\circ$ 去偏振侧向散射;以及(5)荧光检测器,其被定位来测量从所激发血液样本发射的荧光。所述分析仪进一步包括处理器,其被配置来接收来自所述多个检测器的(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3) $90^\circ$ 偏振侧向散射、(4) $90^\circ$ 去偏振侧向散射以及(5)荧光的测量结果。所述处理器也被配置来基于发射高于荧光阈值的荧光的粒子的所有五种测量结果进行血液样本的WBC差异分析。处理器可进一步被配置来预筛查接收的测量结果排除对不满足荧光阈值的任何粒子的考虑。轴向光损失检测器可测量在 $0^\circ$ 散射下的轴向光损失。中等角度散射检测器可测量在约 $3^\circ$ 至约 $15^\circ$ 下的光角度散射。多个检测器可包括一个或多个光电倍增管。激发源可为被配置来在对应于荧光染料的波长下发射光的激光器。或者,可选择荧光染料以与激发源对应。荧光染料可以是细胞膜可透性和核酸结合性的。

[0065] 血液学分析仪可进一步包括用于以WBC试剂稀释血液样本的孵育子系统。WBC试剂可包括荧光染料和一种或多种溶解剂。或者,WBC试剂可包括(a)至少一种表面活性剂;(b)至少一种缓冲剂或至少一种盐;(c)至少一种抗微生物剂;以及(d)荧光染料。孵育子系统可被配置来持续小于约25秒、小于约17秒或小于约9秒的时期以WBC试剂孵育血液样本。孵育子系统还可被配置来在范围从约 $30^\circ\text{C}$ 至约 $50^\circ\text{C}$ 的温度,如约 $40^\circ\text{C}$ 下以WBC试剂孵育血液样本。

[0066] 在另一实施方案中,提供一种配置血液学分析仪以对已用荧光染料染色的血液样本进行WBC差异分析的方法。所述方法包括定位激发源以激发血液样本内的粒子。所述方法进一步包括定位多个检测器以测量所激发血液样本的(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3) $90^\circ$ 偏振侧向散射、(4) $90^\circ$ 去偏振侧向散射以及(5)荧光。所述方法进一步包括配置处理器,其被配置来接收来自多个检测器的(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3) $90^\circ$ 偏振侧向散射、(4) $90^\circ$ 去偏振侧向散射以及(5)荧光的测量结果。所述方法还包括配置处理器以基于发射高于荧光阈值的荧光的粒子的所有五种测量结果进行血液样本的WBC差异分析。所述方法可包括配置处理器以预筛查所接收的测量结果从而排除对不满足荧光阈值的任何粒子的考虑。轴向光损失检测器可测量在 $0^\circ$ 散射下的轴向光损失。中等角度散射检测器可测量在约 $3^\circ$ 至约 $15^\circ$ 下的光角度散射。多个检测器可包括一个或多个光电倍增管。所述方法还可包括配置激发源以在对应于荧光染料的波长下发射光。或者,可选择荧光染料以与激发源对应。荧光染料可以是细胞膜可透性和核酸结合性的。

[0067] 所述方法可进一步包括配置血液学分析仪的孵育子系统以用WBC试剂孵育血液样本。WBC试剂可包括荧光染料和溶解剂。或者,WBC试剂可包括(a)至少一种表面活性剂;(b)至少一种缓冲剂或至少一种盐;(c)至少一种抗微生物剂;以及(d)荧光染料。孵育子系统可被配置来持续小于约25秒、小于约17秒或小于约9秒的时期以WBC试剂孵育血液样本。孵育子系统还可被配置来在范围从约 $30^\circ\text{C}$ 至约 $50^\circ\text{C}$ 的温度,如约 $40^\circ\text{C}$ 下以WBC试剂孵育血液样本。

[0068] 在另一实施方案中,提供一种用于进行WBC差异分析的血液学分析仪,所述血液学

分析仪包括：(1) 用于激发血液样本内的粒子的装置，其包括定位激光光源以当所述血液样本横穿过所述血液学分析仪的流动池或其等效物时激发所述血液样本；(2) 用于测量来自所述血液样本内的所激发粒子的多个光散射信号的装置，其包括多个检测器(如上所论述)或其等效物；(3) 用于测量来自所述血液样本内的所激发粒子的荧光信号的装置，其包括荧光检测器(如上所论述)或其等效物；(4) 用于筛查所激发粒子以排除对不满足荧光阈值的任何粒子的考虑的装置，其包括配置有荧光触发器的处理器(如上所论述)或其等效物；以及(5) 用于基于穿过所述筛查装置的粒子的多个光散射信号和荧光信号进行WBC差异分析的装置，其包括被配置来进行WBC差异分析的处理器(如上所论述)或其等效物。血液学分析仪可进一步包括用于持续小于约25秒的孵育期以WBC试剂孵育血液样本的装置，其包括孵育子系统(如上所论述)或其等效物。血液学分析仪可进一步包括用于在范围从约30°C至约50°C的温度下以WBC试剂孵育血液样本的装置，其包括孵育子系统(如上所论述)或其等效物。

[0069] 在另一实施方案中，提供一种用自动血液学分析仪进行WBC分析的方法。所述方法包括：(a) 用WBC试剂稀释全血样本，其中所述WBC试剂包括RBC溶解剂(lysing agent, 裂解剂)和穿透WBC膜并且结合WBC核酸的荧光染料；(b) 在范围从约30°C至约50°C的温度下持续小于约25秒的孵育期孵育步骤(a)的所稀释血液样本；(c) 将来自步骤(b)的所孵育样本递送至血液学分析仪中的流动池；(d) 当所孵育样本横穿过所述流动池时，用激发源激发来自步骤(c)的所孵育样本；(e) 收集来自所激发样本的多个光散射信号和荧光发射信号；以及(f) 基于步骤(e)中收集的所有信号进行WBC差异分析，同时基于荧光发射信号排除对所述稀释血液样本内不满足荧光阈值的任何粒子的考虑。WBC试剂可包括：(a) 至少一种表面活性剂；(b) 至少一种缓冲剂或至少一种盐；(c) 至少一种抗微生物剂；以及(d) 至少一种荧光染料。激发源的波长可为约350nm至约700nm。可通过带通滤光片或长通滤光片在约360nm至约750nm的波长下收集荧光发射。

[0070] 在又一实施方案中，提供一种借助于自动血液学分析仪计数和分类WBC的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 用至少一种WBC试剂稀释全血样本；(b) 在所选温度范围内持续足够时期孵育步骤(a)的所稀释样本以溶解RBC，保存WBC，使至少一种荧光染料穿透所述WBC的细胞膜，并且结合所述WBC的核内的核酸；(c) 以液流形式将步骤(b)的所孵育样本递送至流动池；(d) 当所孵育样本横穿过所述流动池时借助于光源激发步骤(c)的所孵育样本；(e) 同时收集多个光学散射信号与至少一个荧光发射信号；以及(f) 借助于步骤(e)中收集的信号区别和定量WBC。实施方案的特征包括但不限于：(1) 在溶解RBC的程序期间使用至少一种荧光染料来结合和染色给定血液样本中的WBC和其它含核细胞中的核酸，并且在由来自如激光光束的给定光源的光子在适当波长下激发后诱导荧光发射；(2) 使用荧光触发器来分离和收集发射强烈荧光的事件(例如涉及WBC和其它含核细胞的事件)；(3) 使用多个光学通道和至少一个荧光通道来收集数据和分析如此收集的数据以便鉴定每个细胞群体并揭示其它信息。

[0071] 在又一实施方案中，本文公开的系统和方法包括：(a) 用就发射光谱而言对应于血液学仪器的激发源的专有细胞膜可透性荧光染料染色血液样本；(b) 使用荧光触发器来筛查所述血液样本的WBC；以及(c) 使用测量结果的组合来进行差异分析。测量结果的组合可包括一个或多个选自由以下组成的组的测量结果：轴向光损失、中等角度散射、90°偏振侧

向散射、90°去偏振侧向散射、一个或多个荧光发射测量结果、多环中等角度散射及其任何组合或等效物。

[0072] 在一个实施方案中,本发明涉及一种或多种能够执行本文所述的功能性的计算机系统。举例而言,本文论述的任何方法/分析步骤都可在具有一个或多个处理器、数据通信基础结构(例如通信总线、交叉条或网络)、显示器接口和/或存储体或存储单元的计算机系统中实施。存储体或存储单元可包括具有在执行时使处理器执行本文所述的一个或多个功能的指令(例如控制逻辑或软件)的计算机可读存储介质。术语“计算机可读存储介质”、“计算机程序介质”和“计算机可用介质”用于泛指介质,如可移动存储驱动器、可移动存储单元、通过通信接口传输的数据和/或安装在硬盘驱动器中的硬盘。所述计算机程序产品向计算机系统提供计算机软件、指令和/或数据,所述计算机程序产品也用于将所述计算机系统从通用计算机转变成被编程来执行本文所述的特定功能的专用计算机。当适当时,处理器、相关部件和等效系统以及子系统因此充当用于执行所选操作和功能的“装置”的实例。用于执行所选操作和功能的这类“装置”也用于将通用计算机转变成被编程来执行所述所选操作和功能的专用计算机。

[0073] 结论

[0074] 已出于说明和描述目的提出本发明的以上描述。本篇描述不意图是详尽的或将本发明限于所公开的精确形式。鉴于以上教导,其它修改和变化可为可能的。选择和描述这些实施方案是为最佳地说明本发明的原理和它的实际应用,并且由此使得本领域其他技术人员能够最佳地利用如适于所涵盖的特定用途的各种实施方案和各种修改形式中的发明内容。意图将随附权利要求解释为包括本发明的其它替代性实施方案;包括等效结构、部件、方法和装置。

[0075] 以上详述涉及说明一个或多个示例性实施方案的附图。其它实施方案是可能的。可在不脱离本发明的精神和范围下对所述实施方案进行修改。因此,详述不意图具有限制性。此外,概述和摘要章节可阐述本发明的一个或多个而非所有如由发明者所设想的示例性实施方案,并且因此不意图以任何方式限制本发明和随附的权利要求。

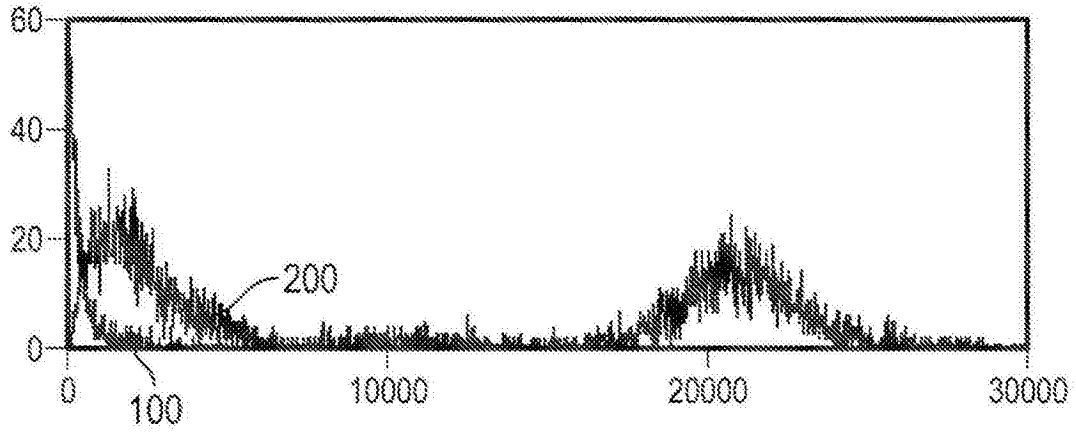


图1A

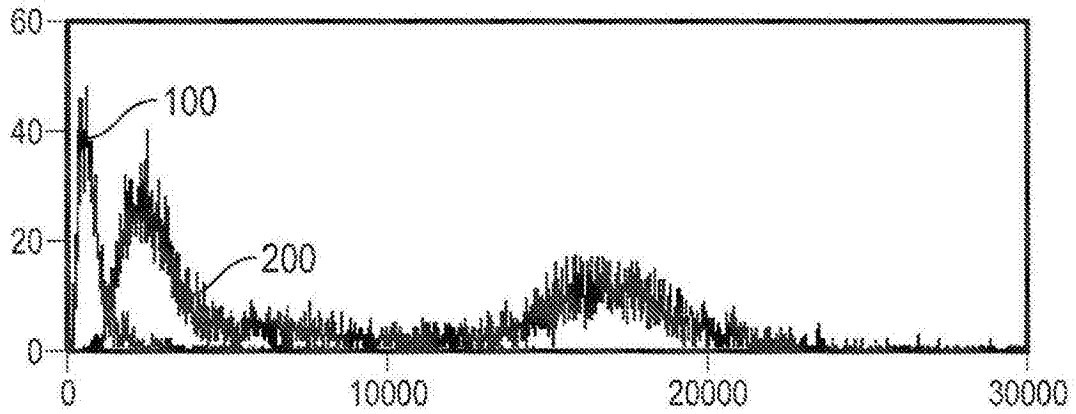


图1B

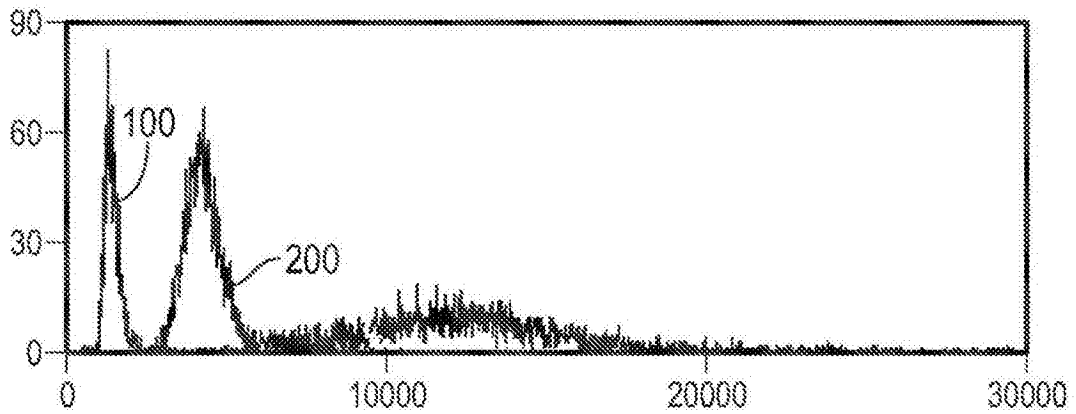


图1C

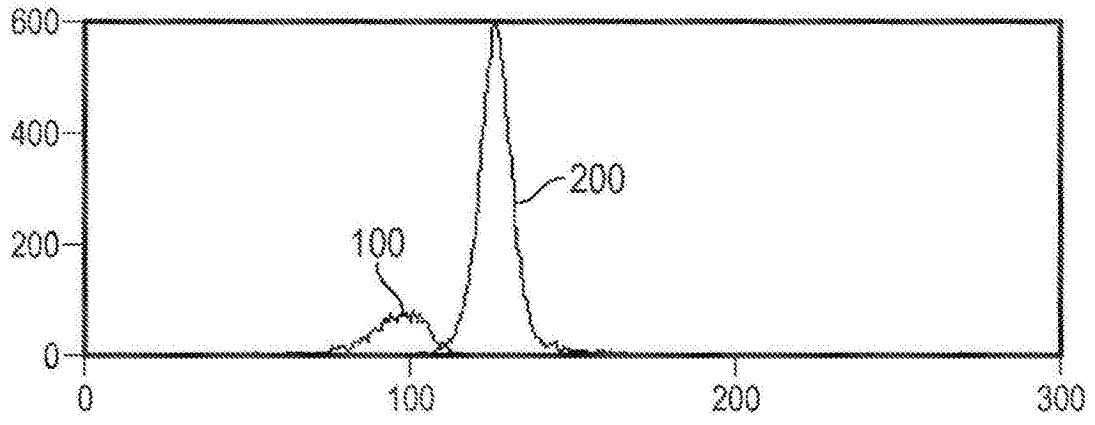


图1D

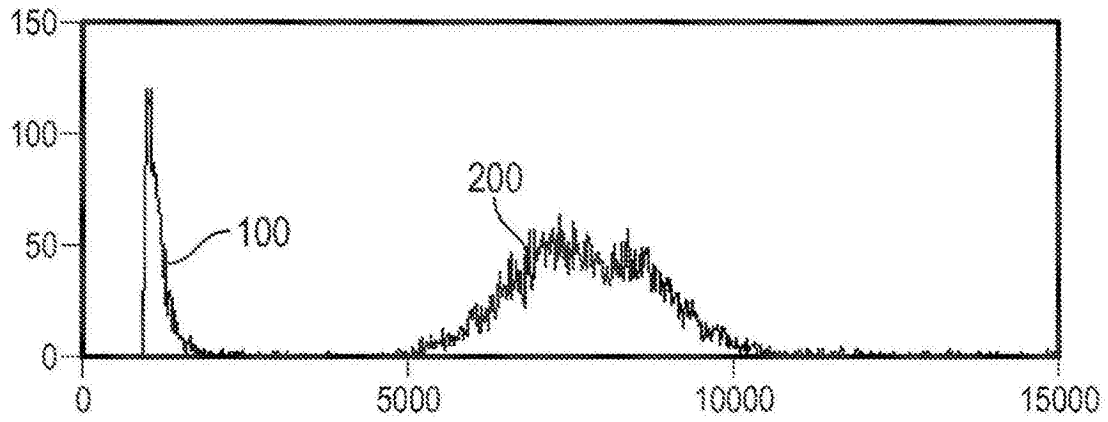


图1E

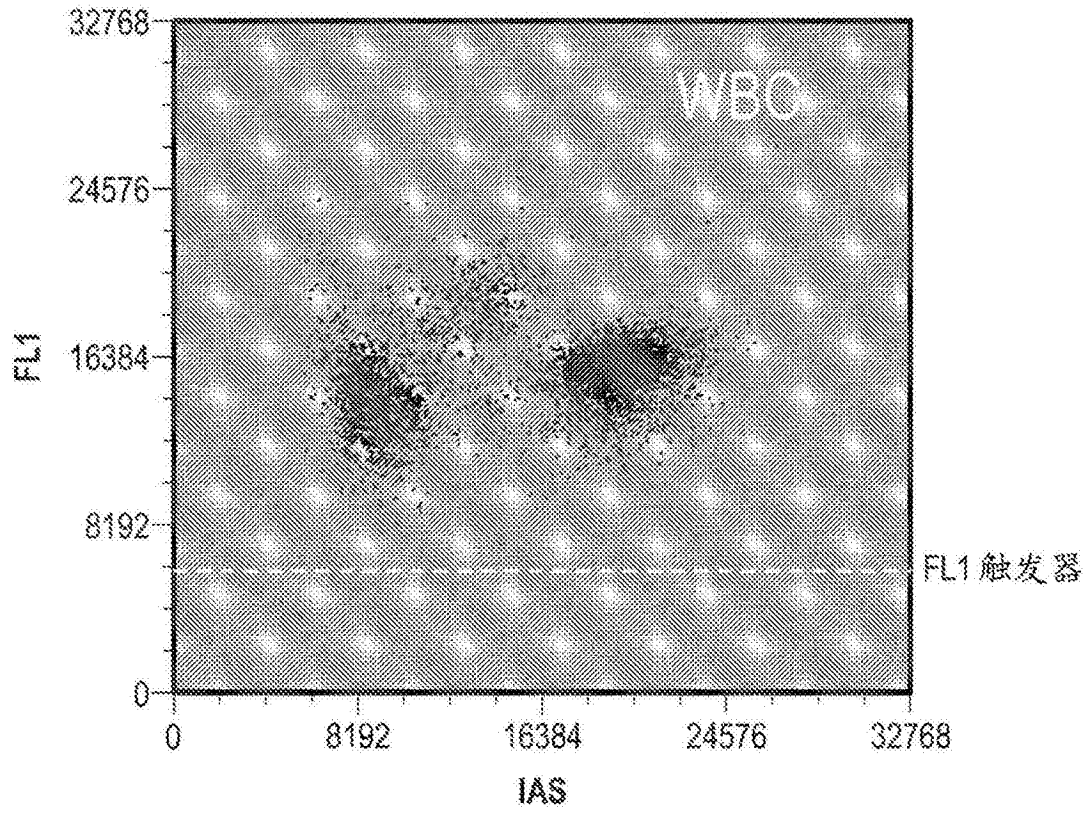


图2

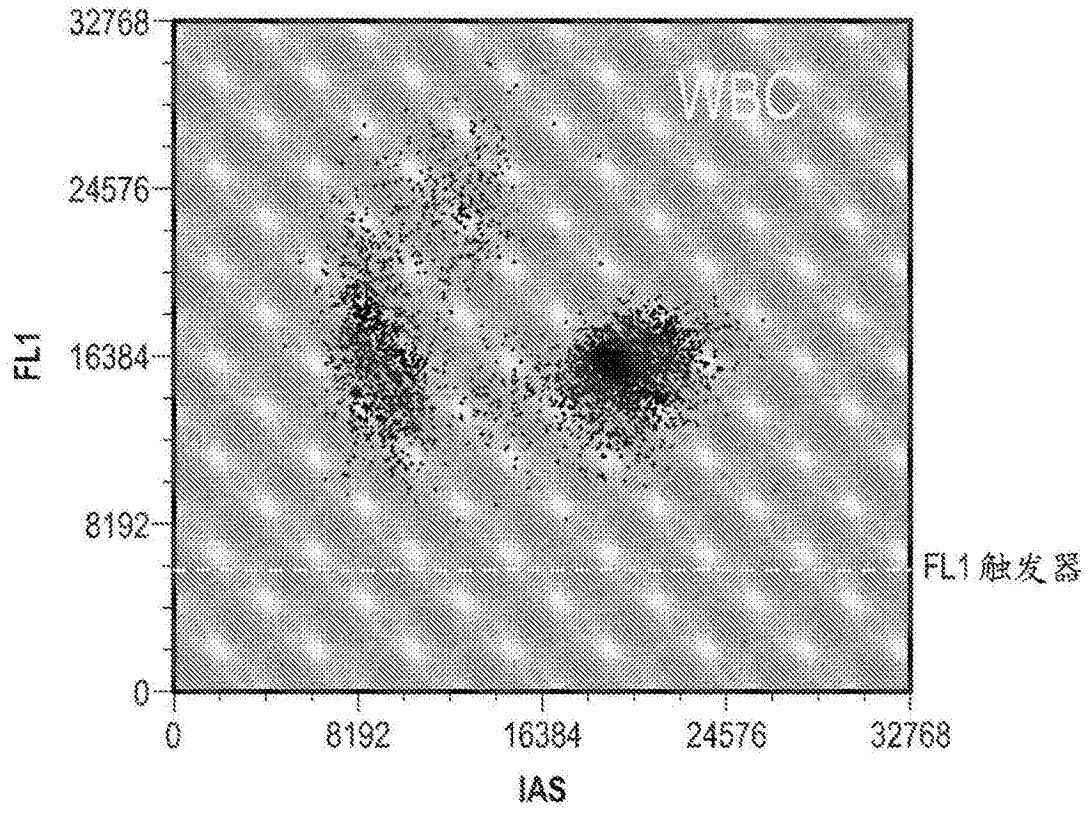


图3

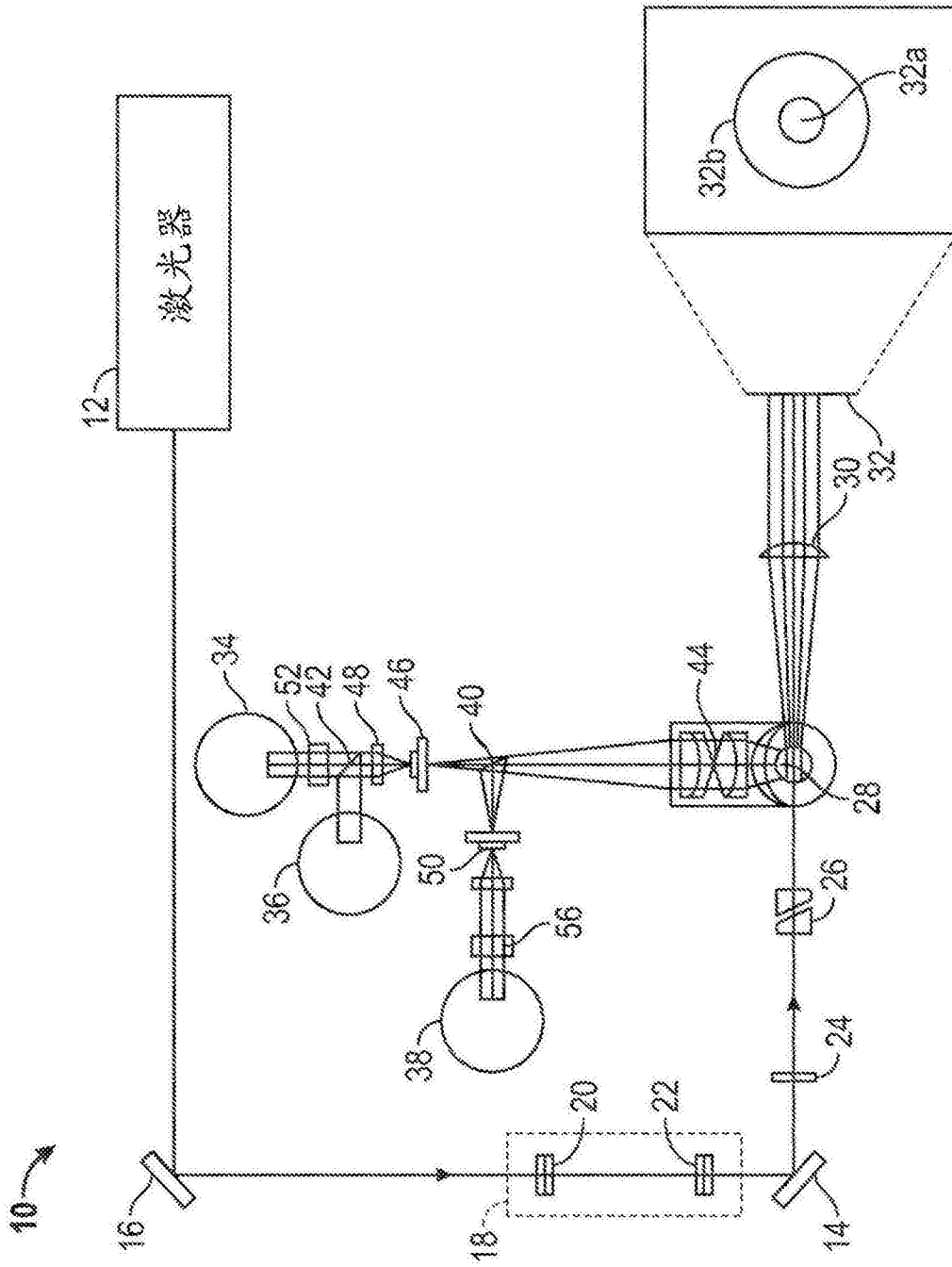


图4

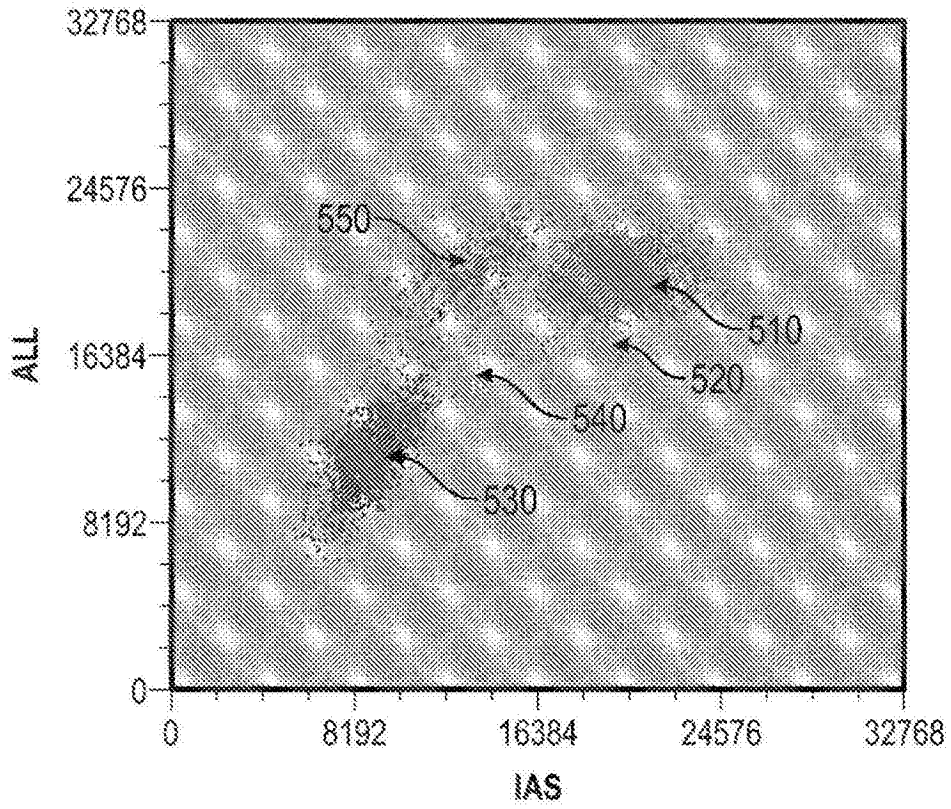


图5A

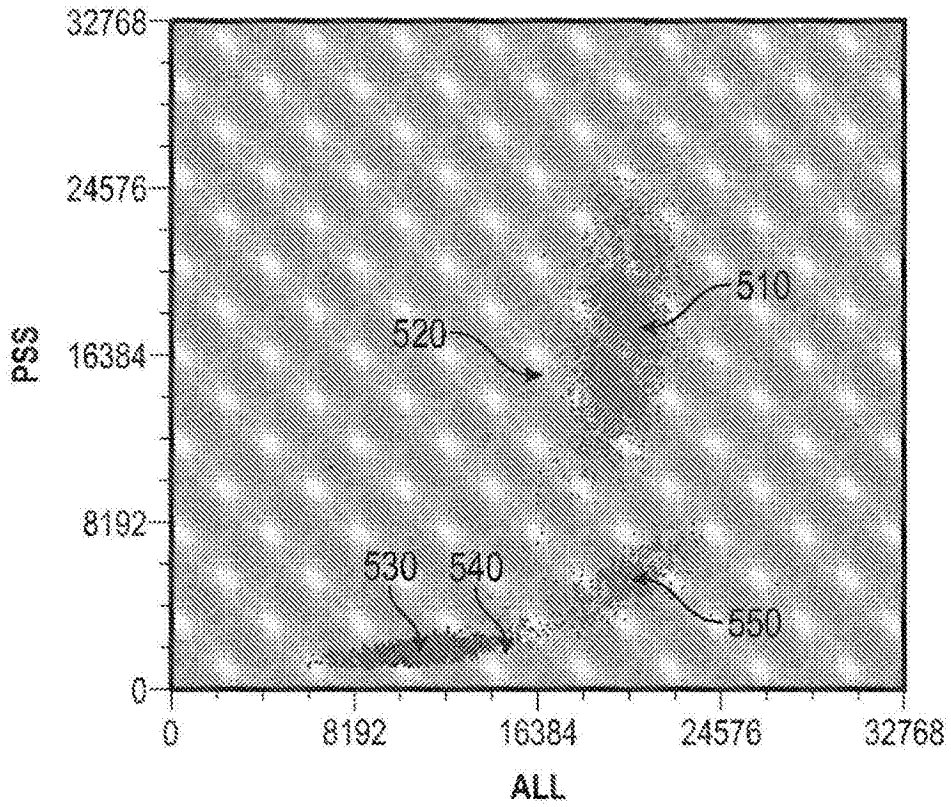


图5B

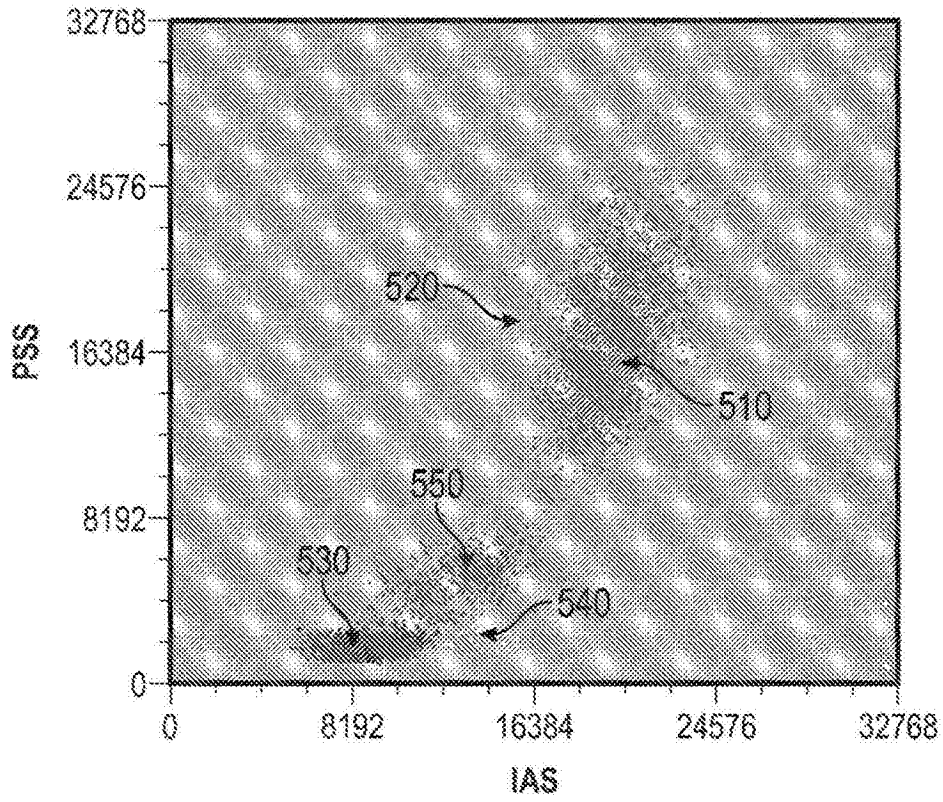


图5C

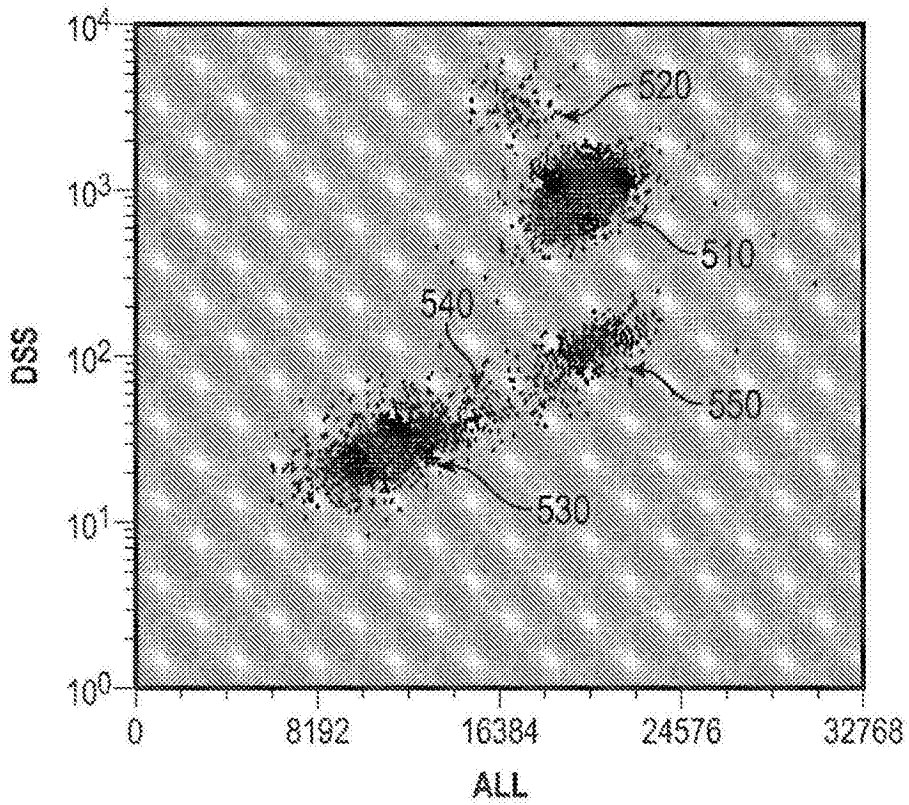


图5D

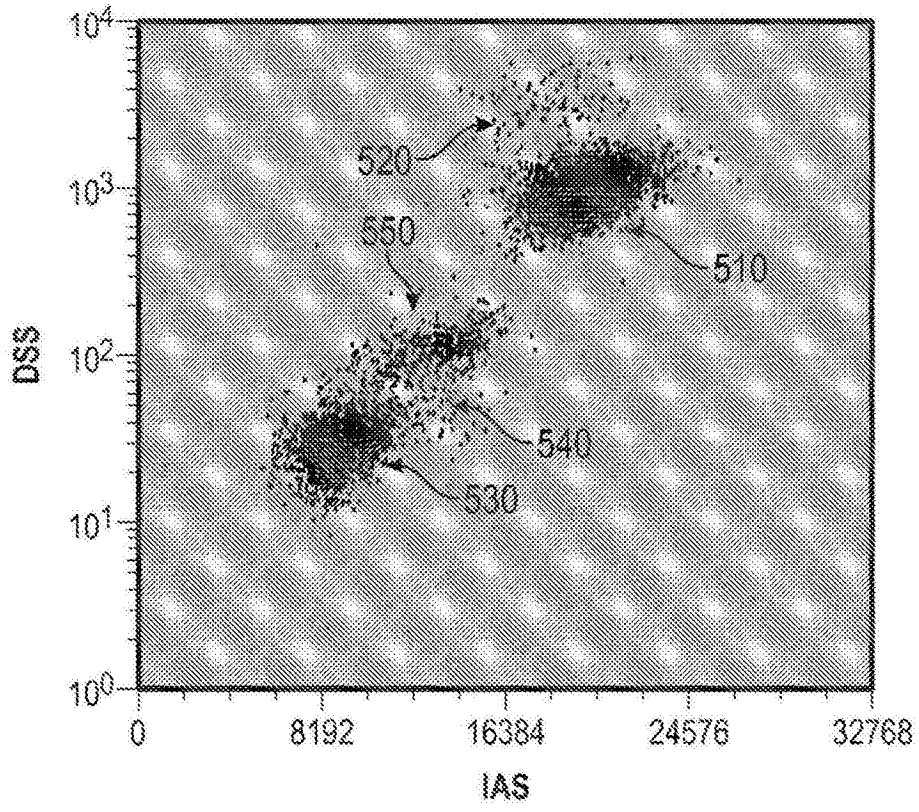


图5E

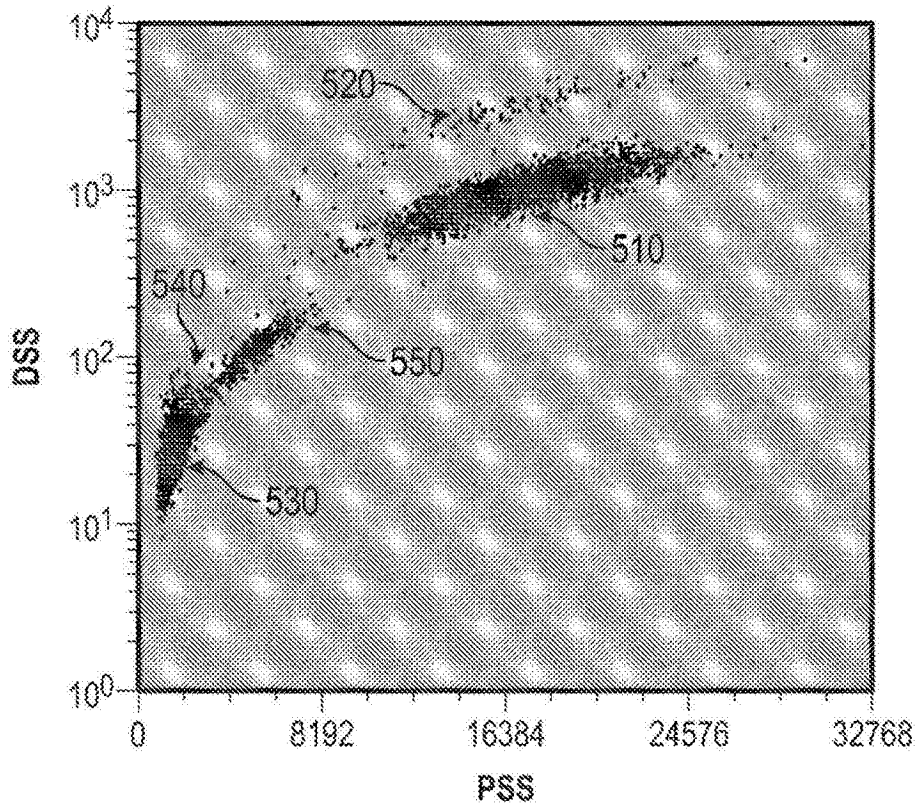


图5F

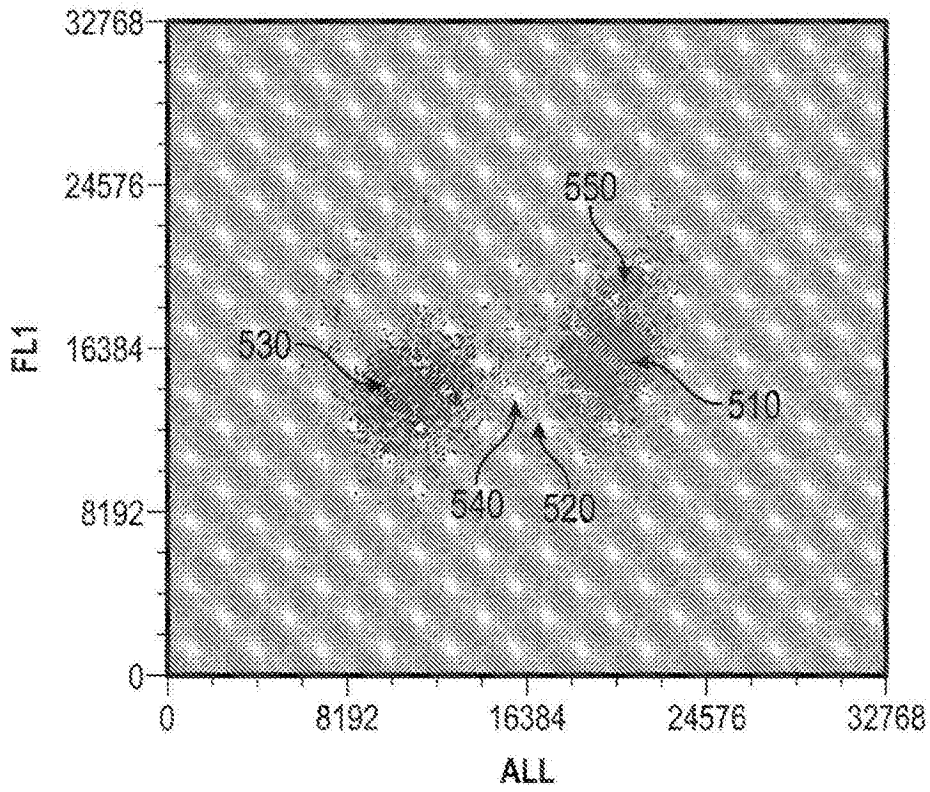


图5G

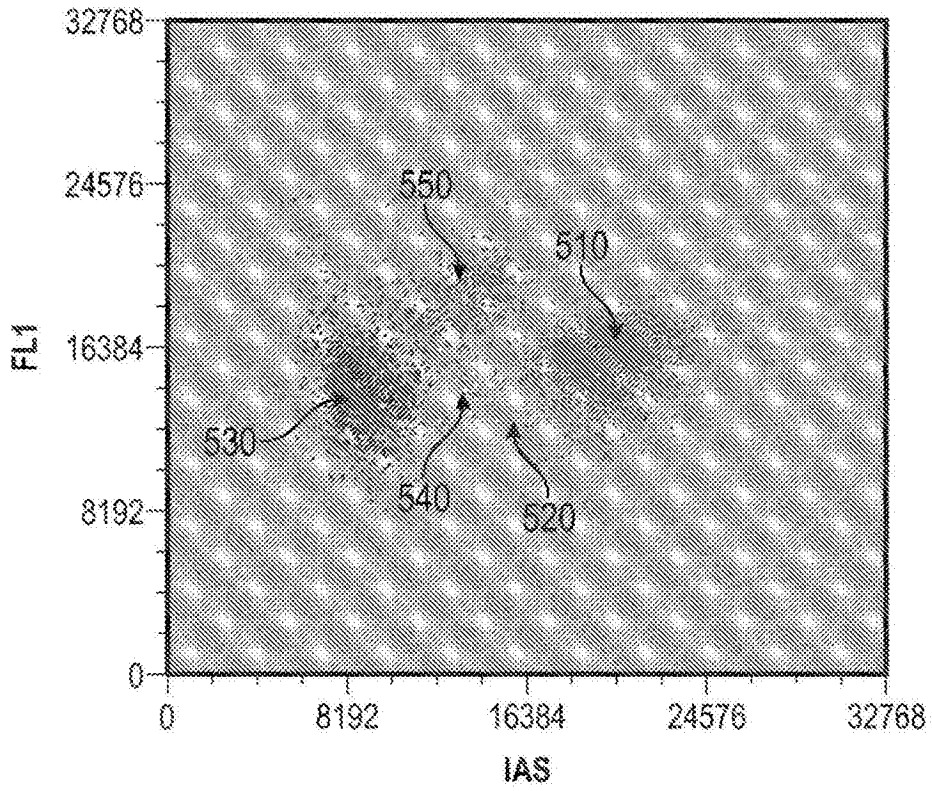


图5H

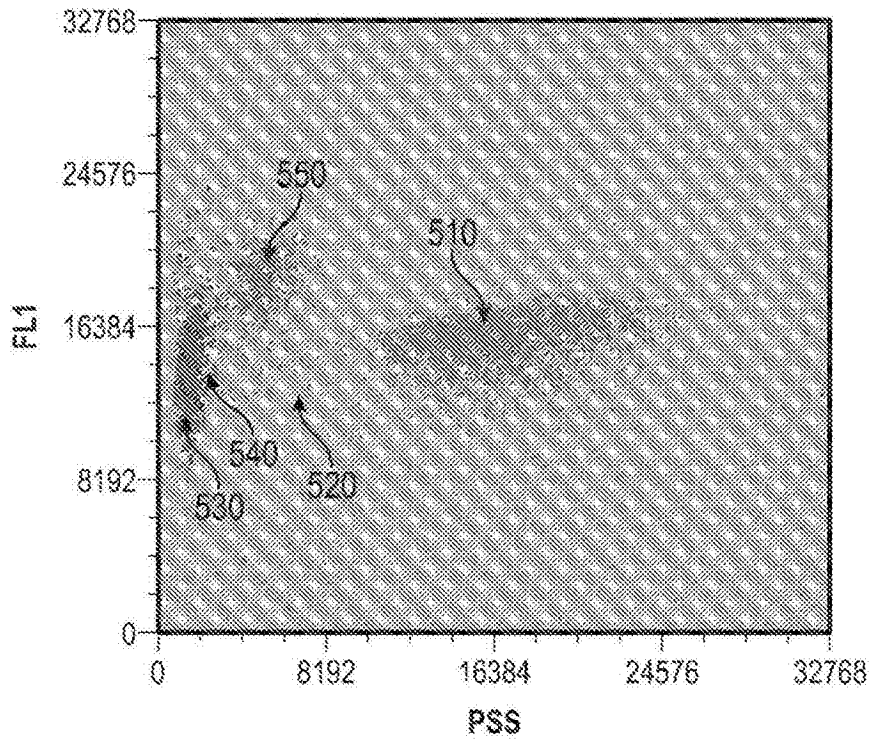


图5I

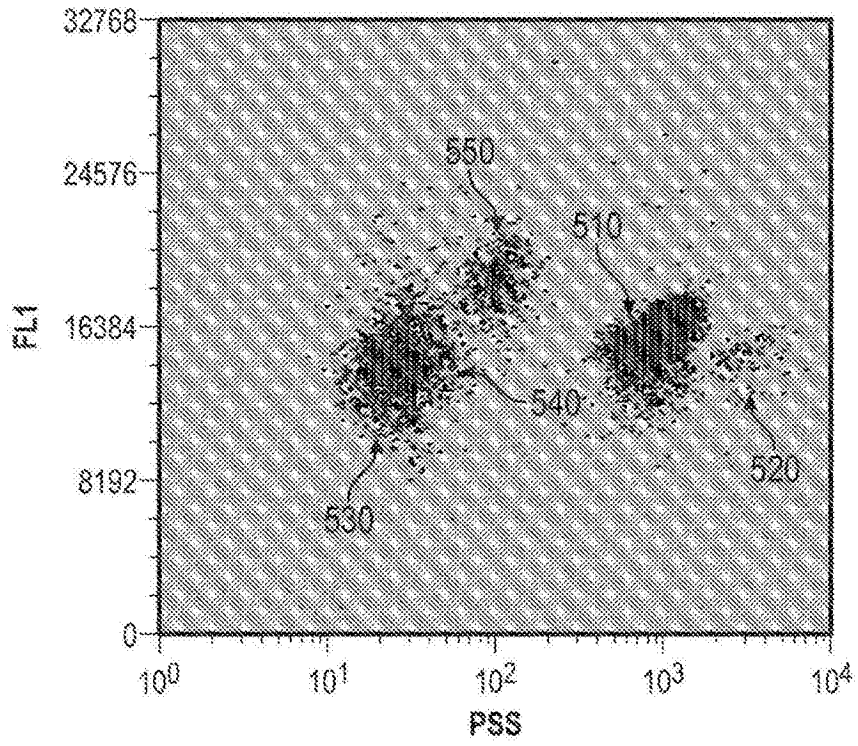


图5J

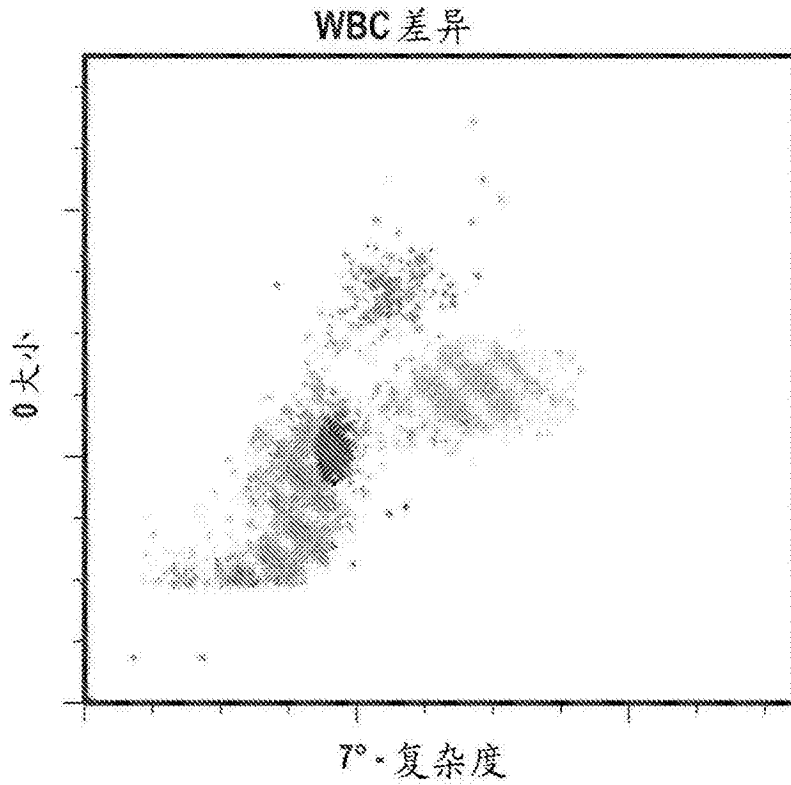


图6A

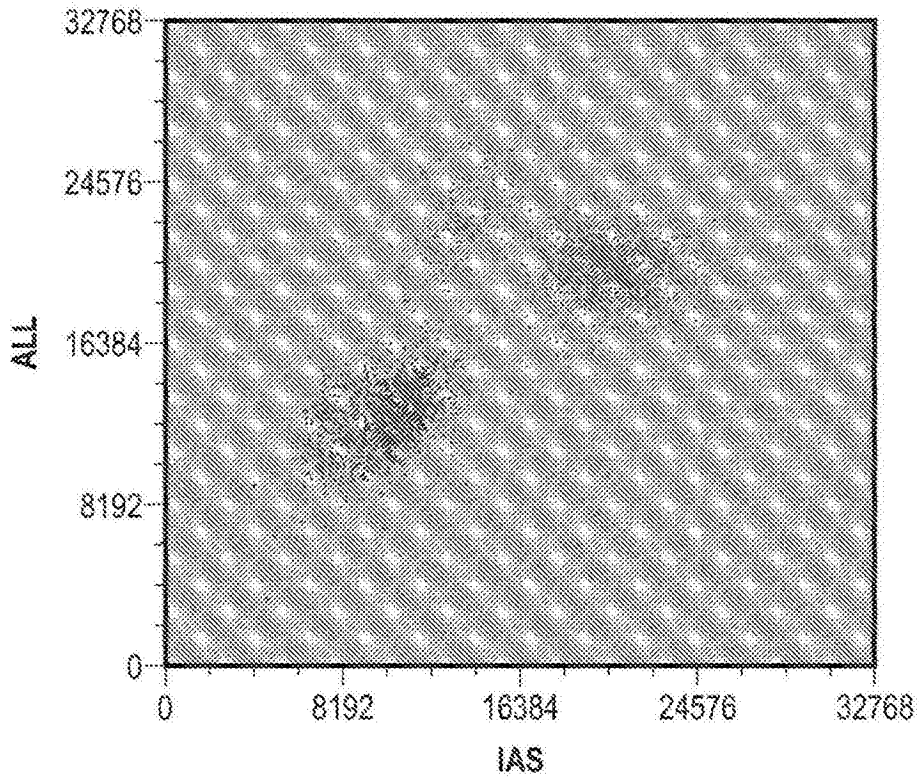


图6B

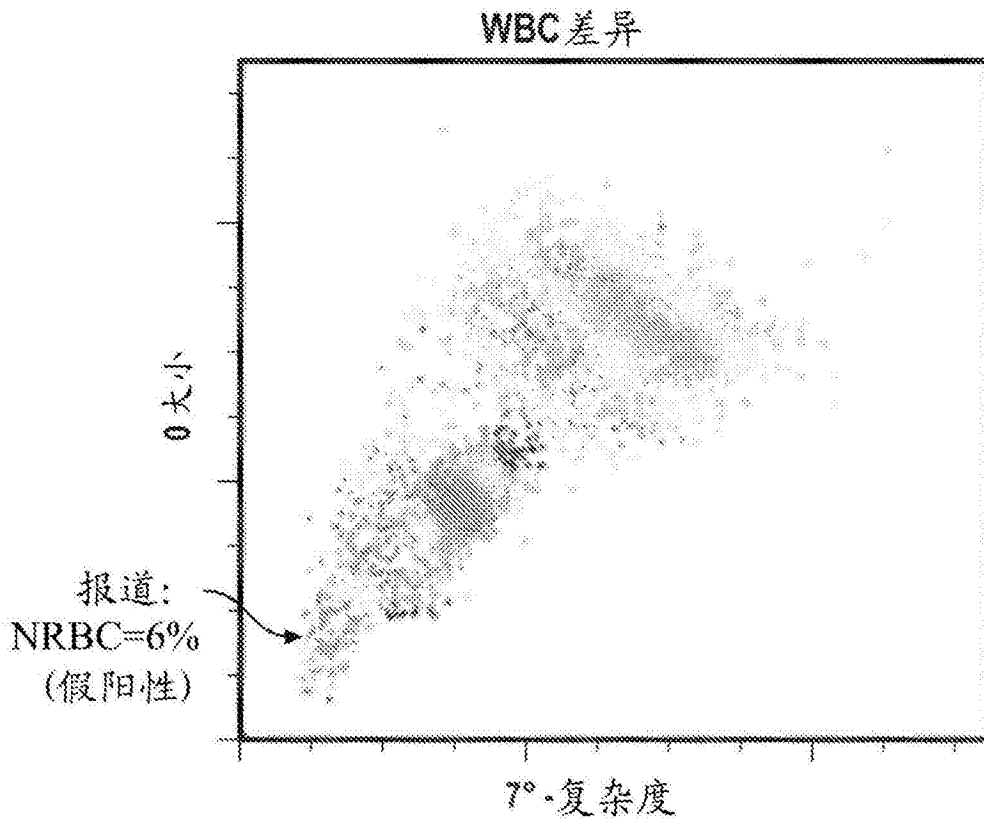


图7A

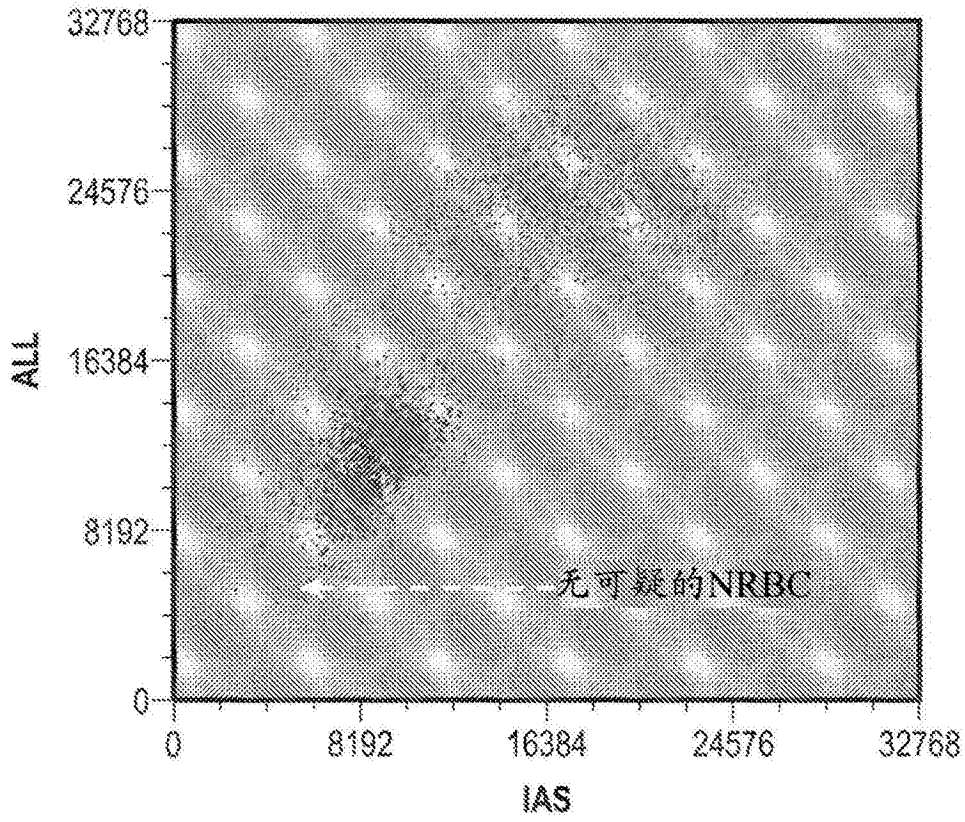


图7B

专利名称(译)	白细胞分析系统和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103987834B</a>	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201280023386.7	申请日	2012-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
[标]发明人	吴炯 贾科莫瓦卡		
发明人	吴炯 贾科莫·瓦卡		
IPC分类号	C12M1/34 G01N33/53		
CPC分类号	G01N15/1434 G01N15/1459 G01N2015/1006 G01N2015/1477 G01N2015/1488 G01N33/49 G01N21/6428 G01N2015/008 G01N2021/6439		
代理人(译)	郭放		
审查员(译)	王斌		
优先权	61/482541 2011-05-04 US		
其他公开文献	CN103987834A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供用于分析血液样本、且更具体来说用于进行白细胞(WBC)差异分析的系统和方法。所述系统和方法借助于荧光染色和荧光触发策略来筛查WBC。因此，来自未溶解红细胞(RBC)和溶解RBC的片段的干扰被大致上消除。所述系统和方法还使得能够开发适用于测定含有易碎WBC的样本的相对温和的WBC试剂。在一个实施方案中，所述系统和方法包括：(a)用就发射光谱而言对应于血液学仪器的激发源的专有细胞膜可透性荧光染料染色血液样本；(b)使用荧光触发器筛查所述血液样本的WBC；并且(c)使用(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3)90°偏振侧向散射、(4)90°去偏振侧向散射以及(5)荧光发射的测量结果来进行差异分析。

