



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103823051 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201410023739. 4

(22) 申请日 2009. 03. 20

(30) 优先权数据

61/038, 545 2008. 03. 21 US

61/038, 557 2008. 03. 21 US

61/038, 559 2008. 03. 21 US

61/038, 574 2008. 03. 21 US

(62) 分案原申请数据

200980116926. 4 2009. 03. 20

(73) 专利权人 艾博特健康公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 斯蒂芬·C·沃德洛

罗伯特·A·莱文

达瑞恩·W·温弗里希特

尼滕·V·拉尔普里亚

杰里米·R·希尔

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理

有限公司 11112

代理人 陈源 顾丽波

(51) Int. Cl.

G01N 33/49(2006. 01)

G01N 15/05(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101228426 A , 2008. 07. 23,

CN 1093167 A , 1994. 10. 05,

CN 1196393 A , 1998. 10. 21,

CN 1292685 A , 2001. 04. 25,

CN 1294677 A , 2001. 05. 09,

CN 1379694 A , 2002. 11. 13,

CN 1957254 A , 2007. 05. 02,

US 5731212 A , 1998. 03. 24,

WO 8103080 A1 , 1981. 10. 29,

WO 9958954 A1 , 1999. 11. 18,

审查员 于园园

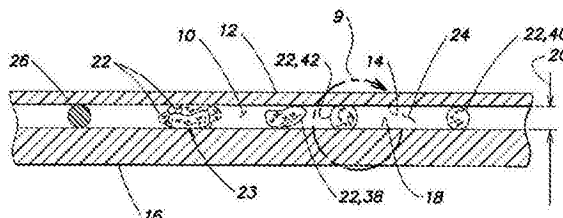
权利要求书3页 说明书10页 附图8页

(54) 发明名称

利用红细胞内含有的血红蛋白的本征色素沉着来确定血样的红细胞指数的方法及设备

(57) 摘要

用于确定红细胞内的血红蛋白的浓度的方法及设备。将未稀释的、全血样本滴落在透明的分析腔室(10)中,该分析腔室的高度使得红细胞与两个表面(14,18)接触。然后,测量红细胞上与两个表面接触的部分的光密度。根据该光密度和血红蛋白的已知差异系数来计算红细胞的血红蛋白浓度。对其他细胞重复该操作,直到能够可靠地确定平均血红蛋白浓度。从属权利要求包括利用两性离子等容球状试剂来使得该测量与几何形状因子无关。



CN 103823051 B

1. 一种用于确定血液样本内的红细胞的细胞体积的方法,包括以下步骤:

将样本滴落在适于静止地保持样本以进行分析的分析腔室中,该腔室由第一平板的内表面和第二平板的内表面限定,其中两个平板都是透明的,并且所述腔室具有在两个平板的内表面之间延伸的已知高度或可确定的高度,该高度使得样本内的至少一个红细胞与两个内表面都接触;

对与两个内表面都接触的所述至少一个红细胞成像,并且产生图像信号;

基于每个图像单位来确定该红细胞上与两个内表面接触的部分的平均光密度以及该红细胞的总的光密度;以及

使用细胞上与内表面接触的部分的平均光密度、总的光密度和所述腔室的高度,来确定被成像的红细胞的体积。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述血液样本是未稀释的。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述血液样本是全血。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述图像单位是像素。

5. 一种用于确定血液样本内的红细胞的细胞体积的方法,包括以下步骤:

将血液样本滴落在适于静止地保持样本以进行分析的分析腔室中,该腔室由第一平板的内表面和第二平板的内表面限定,其中两个平板都是透明的,并且所述腔室具有在两个平板的内表面之间延伸的已知高度或可确定的高度,该高度使得样本内的至少一个红细胞与两个内表面都接触;

对与两个内表面都接触的所述至少一个红细胞成像,所述至少一个红细胞包括该红细胞上与两个表面接触的部分和与两个内表面接触的部分;

基于每个图像单位,来确定红细胞上与两个内表面接触的部分的光密度,以及不与两个内表面接触的部分的光密度;

使用为被成像的红细胞上与两个内表面接触的部分确定的每个图像单位的光密度,来确定该部分的体积;

使用为被成像的红细胞上不与两个内表面接触的部分确定的每个图像单位的光密度和为与两个内表面接触的部分确定的每个图像单位的光密度,来确定被成像的红细胞上不与两个内表面接触的部分的体积;以及

使用为被成像的红细胞上与两个内表面接触的部分确定的体积和为被成像的红细胞上不与两个内表面接触的部分确定的体积,来确定所述至少一个红细胞的细胞体积。

6. 如权利要求 5 所述的方法,包括以下步骤:

确定与两个内表面都接触的多个红细胞的细胞体积;以及

使用为所述多个红细胞中的每个红细胞确定的细胞体积,来确定平均细胞体积。

7. 如权利要求 5 所述的方法,其中对整个样本进行成像。

8. 如权利要求 5 所述的方法,进一步包括在至少一部分样本中掺合等容球状试剂的步骤。

9. 如权利要求 8 所述的方法,所述等容球状试剂是两性离子去污剂。

10. 如权利要求 5 所述的方法,其中两个平板的内表面是平行的,并且在确定血红蛋白浓度之前已知腔室高度。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述腔室高度处于 2 微米到 6 微米的范围内。

12. 如权利要求 5 所述的方法,进一步包括以下步骤:

对样本内的多个红细胞成像,每个红细胞的一部分与两个内表面接触;

基于每个图像单位,为每个红细胞确定该红细胞上与两个内表面接触的部份的光密度;以及

使用为所述多个红细胞中的每个红细胞上与两个内表面接触的部份确定的光密度,来确定平均最大光密度。

13. 如权利要求 12 所述的方法,进一步包括以下步骤:

对不与两个内表面都接触的一个或多个红细胞成像;

确定不与两个内表面都接触的红细胞的光密度;

使用不与两个内表面都接触的红细胞的光密度、所确定的平均最大光密度、和腔室高度,来确定不与两个内表面都接触的所述一个或多个红细胞的细胞体积。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述样本具有掺合有等容球状试剂的第一部分和没有掺合等容球状试剂的第二部分。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中不与两个内表面都接触的所述一个或多个红细胞中的至少一些红细胞存在于样本的第二部分内,以及该方法进一步包括确定第二部分内不与两个内表面都接触的所述一个或多个红细胞中的至少一个红细胞的未改变的形态。

16. 如权利要求 12 所述的方法,进一步包括以下步骤:

对不与两个内表面都接触的至少一个红细胞成像;

确定不与两个内表面都接触的红细胞的光密度;

使用为与两个内表面都接触的红细胞确定的平均光密光,来确定不与两个内表面都接触的红细胞的血红蛋白浓度。

17. 如权利要求 5 所述的方法,进一步包括在样本中掺合体外活体染料的步骤,该染料可用于使样本内的网状细胞内的网状蛋白被一个或多个预定波长的光激发时发出荧光。

18. 如权利要求 17 所述的方法,进一步包括确定一个或多个发出荧光的网状细胞内的网状蛋白的相对量的步骤。

19. 如权利要求 17 所述的方法,进一步包括以下步骤:

对多个红细胞成像,每个这种红细胞的至少一部分与内表面接触,其中使用被红细胞内的血红蛋白吸收的光来执行该成像;

以用于使得样本内的网状细胞内的网状蛋白发出荧光的预定波长对所述多个红细胞成像;

为所述多个红细胞中的每个红细胞确定细胞体积;以及

使用所述多个红细胞中的每个红细胞的细胞体积来确定平均细胞体积,从该平均细胞体积中排除发出荧光的每个红细胞的细胞体积。

20. 如权利要求 5 所述的方法,其中以—个或多个预定波长执行成像步骤,并且血红蛋白浓度的确定利用了针对所述一个或多个预定波长的血红蛋白的摩尔消光系数。

21. 如权利要求 5 所述的方法,进一步包括以下步骤:

使用为红细胞上与两个内表面接触的部份确定的光密度,来确定红细胞的血红蛋白浓度;以及

使用血红蛋白浓度和细胞体积,来确定红细胞内的血红蛋白含量。

22. 如权利要求 21 所述的方法,进一步包括以下步骤:
确定多个红细胞内的血红蛋白含量,每个红细胞的一部分与两个内表面接触;
使用为所述多个红细胞中的每个红细胞确定的血红蛋白含量,来确定平均血红蛋白含量。
23. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述血液样本是未稀释的。
24. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述血液样本是全血。
25. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述图像单位是像素。
26. 一种用于确定未稀释的血液样本内的至少一个红细胞的细胞体积的设备,包括:
分析腔室,适于静止地保持样本以进行分析,所述腔室由第一平板的内表面和第二平板的内表面限定,其中两个平板都是透明的,并且所述腔室具有在两个平板的内表面之间延伸的已知高度或可确定的高度,所述高度使得所述至少一个红细胞与两个内表面都接触;
成像单元,其包括照明器和析像器,该单元用于对与内表面接触的至少一个红细胞进行成像,并且产生表示该被成像的红细胞的图像信号;以及
可编程分析器,适于使用所述图像信号来确定与两个内表面都接触的红细胞的平均光密度和该红细胞的总的光密度,并且使用平均光密度、总的光密度和腔室的高度来确定该被成像的红细胞的体积。

利用红细胞内含有的血红蛋白的本征色素沉着来确定血样的红细胞指数的方法及设备

[0001] 本申请是基于申请日为 2009 年 3 月 20 日、申请号为 200980116926.4 (国际申请号为 PCT/US2009/037815)、发明名称为“利用红细胞内含有的血红蛋白的本征色素沉着来确定血样的红细胞指数的方法及设备”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求以下美国临时专利申请的优先权:2008 年 3 月 21 日提交的 No. 61/038,557;2008 年 3 月 21 日提交的 No. 61/038,574;2008 年 3 月 21 日提交的 No. 61/038,545;和 2008 年 3 月 21 日提交的 No. 61/038,559,这些临时专利申请在此以引文方式整体并入本申请。

技术领域

[0003] 本发明总的来说涉及分析血样的设备及方法,具体地讲,涉及确定样本的红细胞体积以及平均细胞体积的设备及方法。

背景技术

[0004] 内科医生、兽医和科学家检查人类和动物的生物流体(尤其是血液),以确定组分的微粒数量以及识别是否存在健康的受试者中没有发现的异常微粒。通常被测量、定量和识别的微粒包括红细胞(RBC)、白细胞(WBC)和血小板。RBC 分析包括确定 RBC 数目、大小、体积、形状、血红蛋白含量和浓度、以及血细胞比容(也被称为红细胞压积)。RBC 分析还可以包括确定红细胞(诸如 DNA, RNA)内是否存在某些成分和/或确定这些成分的浓度,包括检测 RBC 中是否存在和/或存在多少血液寄生虫(例如疟原虫)或者检测 WBC 中是否存在和/或存在多少细胞外的或利什曼原虫组织的睡病虫,以及检测是否存在和/或存在多少其他血液寄生虫。WBC 分析可以包括确定 WBC 子类型的族群(population)频率,通常称为分类 WBC 计数,以及通知任何在健康的受试者中没有发现的异常细胞类型。血小板(或者在包括鸟、爬行动物和鱼的某些动物中为凝血细胞(thrombocyte),该凝血细胞在功能上类似于哺乳动物的血小板,但是比哺乳动物的血小板大约 10 倍且是有核的)分析可以包括对血小板数目、大小、形状结构和体积的确定,包括确定样本中是否存在血小板或凝血细胞的凝块。

[0005] 在诸如 Wintrobe's Clinical Hematology 第 12 版的医学文献中详细描述已知的血液检查技术通常将检查方法分为手动、离心和阻抗型方法。用于细胞计数的手动方法通常涉及产生精确确定的血液或流体样本的体积,该血液或流体样本被定量稀释并且在计数室中被直观计数。手动检查方法包括检查其中通过目测确定微粒类型的相对量的外周涂片。离心检查方法涉及对样本进行离心,使得根据组分的相对密度将样本分成多个组分层。可以给组分层染色,以增强可见性或检测性。阻抗型方法涉及检查根据被测量的颗粒而经过处理的血液的精确体积;例如溶解 RBC 来计数有核细胞以及在导电流体中体积(volumetrically)稀释样本。该过程通常涉及监视施加给通过窄通道的样本的电流或电压,以确定当微粒以单行通过时微粒对电流/电压的影响。其他技术涉及对通过光束入

射到以单行通过的微粒的光的强度和散射角的分析。还可以使用流式细胞测定法,该方法涉及利用附着于针对细胞或微粒类型上存在的表面抗原决定簇的抗体的荧光基团给悬浮中的感兴趣的微粒染色、用适当波长的光激发染色微粒、以及分析各个微粒/细胞的发光(emission)。

[0006] 除了外周涂片或离心分离之外,上述所有方法都要求滴涂精确的样本体积。样本体积的不精确将导致相关分析中同一数量的定量误差。除了离心方法之外,上述所有方法还都要求样本与一种或多种液体试剂或稀释剂混合,并且为了获得精确的结果还要求对仪器进行校准。在外周涂片的情况下,需要高度训练来正确地检查涂片。上述的许多方法产生大量的污染物,而处理这些污染物是昂贵的。另外,上述方法不适于确定其中红细胞和凝血细胞有核的鸟、爬行动物和鱼中的以及其中红细胞尺寸非常小并且可能与血小板混淆的某些哺乳动物中的全血计数(CBC)。

[0007] 可以通过检查人类或动物的血液确定的信息量是巨大的。确定 RBC 指数尤其有用;例如,单个细胞大小、单个细胞血红蛋白含量和浓度、以及样本内的 RBC 的族群统计。如上述引用的 Wintrobe 的文献中的讨论所表明,对于上述参数中的每种参数的平均和离差统计(例如,变异系数)还可以提供重要信息,这已经使得外科医生能够对 RBC 紊乱进行更好地分类。

发明内容

[0008] 根据本发明,提供了一种确定 RBC 指数的方法,RBC 指数包括单个 RBC 的体积、以及血红蛋白含量和浓度;以及 RBC 族群统计,包括样本中存在的 RBC 的总量,和基本上未稀释的血液样本内的上述每个指数的平均值。

[0009] 根据本发明的一方面,提供了一种方法,其包括以下步骤:1)提供基本上未稀释的血液样本;2)将样本滴落在适于静止保持样本以进行分析的分析腔室中,该分析腔室由第一平板的内表面和第二平板的内表面限定,其中两个平板都是透明的,并且该腔室的高度在两个平板的内表面之间延伸,该高度使得样本内的至少一个红细胞与这两个内表面都接触;3)对与内表面接触的所述至少一个红细胞成像;4)确定被成像的红细胞上与两个内表面接触的部分的光密度;以及5)使用所确定的与在两个内表面之间延伸的红细胞的所述部分光学对准的像素的光密度值,来确定与内表面接触的红细胞的血红蛋白浓度。

[0010] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于确定基本上未稀释的血液样本内的红细胞的细胞体积的方法。该方法包括以下步骤:1)提供基本上未稀释的血液样本;2)将该样本滴落在适于静止保持样本以进行分析的分析腔室中,该腔室由第一平板的内表面和第二平板的内表面限定,其中两个平板都是透明的,并且该腔室的高度在两个平板的内表面之间延伸,该高度使得样本内的至少一个红细胞与两个内表面都接触;3)对与内表面接触的所述至少一个红细胞进行成像,包括对红细胞上与两个内表面接触的部分进行成像;4)确定红细胞上与两个内表面接触的部分的平均光密度;5)确定整个红细胞的总的光密度;以及6)使用腔室的高度、为被成像的红细胞上与两个内表面接触的部分确定的平均光密度、和为整个被成像的红细胞确定的光密度,来确定所述至少一个红细胞的细胞体积。

[0011] 本发明的一个优点在于本发明可以用来利用极少的样本量来确定血液样本的特性,该极少的样本量可以通过毛细管穿刺从病人直接获得,从而使得本发明对现场护理应

用更加有用,或者可以根据需要从静脉样本获得该极少的样本量。

[0012] 本发明的另一个优点在于其可用于利用血红蛋白的本征色素沉着来确定血液样本的特性,因此不需要添加任何染料或着色剂。血红蛋白的高摩尔消光系数使得能够精确地确定其在小到几微米的非常小的光路距离内的相对或绝对浓度。

[0013] 本发明的另一个优点在于可以确定一个特定细胞上的单个 RBC 指数,从而可以识别指数之间的相关性。

[0014] 本发明的方法的另一个优点在于其对于外部和内部流体都适用,并且与重力和方位无关,因此该方法适于用在手持式设备中和微重力条件下。

[0015] 本发明的方法的另一个优点在于与阻抗计数器不同,本发明的设备不需要在每次使用时都进行校准。本发明的设备不易受诸如细胞流经阻抗型细胞计数器量孔以进行测量时的细胞形状、细胞方位之类的扰动,或者不易受到阻抗计数所需的稀释液体的渗透压影响。

[0016] 通过下面提供的包括附图的详细描述,本发明的方法及与其有关的优点将更加显然。

附图说明

[0017] 图 1 至图 4 是可用在本发明的方法中的分析腔室的截面示意图。

[0018] 图 5 是具有多个分析腔室的条带的示意平面图。

[0019] 图 6 是具有分析腔室的一次性容器的示意平面图。

[0020] 图 7 是具有分析腔室的一次性容器的示意截面图。

[0021] 图 8 是可与本发明的方法一起使用的分析设备的示意图。

[0022] 图 9 是图 1 所示的分析腔室的一部分的放大视图。

[0023] 图 10 是示出根据本发明的一个方面的用于确定红细胞内的血红蛋白浓度和多个红细胞内的平均血红蛋白浓度的方法步骤的框图。

[0024] 图 11 是示出根据本发明的一个方面的用于确定红细胞的细胞体积和红细胞族群的平均细胞体积的方法步骤的框图。

[0025] 图 12 是示出根据本发明的一个方面的用于确定红细胞的血红蛋白含量和红细胞族群的平均血红蛋白含量的方法步骤的框图。

具体实施方式

[0026] 本发明的用于分析基本上未稀释的全血样本的方法及设备能够确定红细胞(RBC)细胞体积(CV)、平均细胞体积(MCV)、细胞血红蛋白浓度(CHC)、平均细胞血红蛋白浓度(MCHC)、和平均细胞血红蛋白含量(MCH),以及它们的族群统计,而不需要添加任何染料、试剂(除了一些实施例中的抗凝血剂之外)或者对样本进行稀释的稀释液。

[0027] 本发明的方法利用了分析腔室,该分析腔室可用于静止地保持基本上未稀释的抗凝全血样本以进行分析。该腔室的典型大小可以保持大约 0.2 至 1.0 μ l 的样本,但是该腔室不限于任何特定的体积容量,该容量可以为适应分析应用而改变。在此使用的术语“基本上未稀释的”表示根本未被稀释的血液样本或者未被故意稀释的血液样本,但是为了进行分析,可以对血液样本添加一些试剂。如果添加有试剂的话,就该试剂添加对样本稀释

的程度来说,在临床上这种稀释对所进行的分析没有显著的影响。通常,将在执行本发明的方法过程中使用的试剂只有抗凝血剂(例如,EDTA、肝素),在一些实例中为等容球状试剂(isovolumetric sphering agent)。这些试剂通常以干粉形式来添加,其目的是不稀释样本。在某些情况下(例如,非常快速的分析),不必添加抗凝血剂,但是在大多数情况下优选的是添加抗凝血剂以确保样本处于分析可接受的形式。术语“静止”用来描述样本被滴落在腔室内以进行分析,并且在分析过程中该样本不会相对于腔室故意移动;即,样本静止地处于腔室内。就血液样本内存在运动的程度来说,血液样本的形成组分的布朗运动占主导,该运动不会破坏本发明的设备的使用。

[0028] 现在参照图 1,分析腔室 10 由具有内表面 14 的第一平板 12 和具有内表面 18 的第二平板 16 限定。平板 12、16 都是足够透明的,以使得能够有足以执行如下所述的光密度分析的预定波长的光的量通过。平板 12、16 的至少一部分是彼此平行的,在该部分内,内表面 14 和内表面 18 彼此间隔开高度 20,使得样本内的至少一些单个 RBC 均单独地接触两个内表面 14、18,和 / 或样本内的一个或多个 RBC 聚合物 23 均接触腔室平板 12、16 的内表面 14、18,以及静止样本内的一个或多个无 RBC 的区域(例如,腔隙)24 在所述内表面之间延伸,如下将更详细地说明。本发明的方法可以利用具有上述特性的各种不同的分析腔室类型,因此不限于任何特定类型的分析腔室。具有平行的平板 12、16 的分析腔室简化了该分析,因此是优选的,但是并不是本发明所必需的;例如,可以使用这样一种腔室,即,该腔室的一个平板相对于另一个平板成已知的非平行角度布置。

[0029] 现在参照图 2 至图 5,示出了一个可接受的腔室 10 的示例,该腔室 10 包括第一平板 12、第二平板 16、以及至少三个布置在平板 12 和平板 16 之间的隔离物 26。隔离物 26 可以是可布置在平板 12 和平板 16 之间的用于将平板 12 和平板 16 彼此分隔的任何结构。在平板 12 和平板 16 之间延伸的隔离物 26 的尺寸 28 在此被称为隔离物 26 的高度 28。隔离物 26 的高度 28 通常不精确地彼此相等(例如,存在制造公差),但是处于商业上可接受的用于类似分析设备中的分隔装置的公差内。球状珠是可接受隔离物 26 的一个示例,并且商业上可从例如 Bangs Laboratories of Fishers, Indiana, U. S. A. 获得。

[0030] 在图 3 所示的腔室实施例中,隔离物 26 由弹性大于第一平板 12 和第二平板 16 中的一个或者两个的材料组成。从图 3 可以看出,较大的隔离物 26 被压缩到大多数隔离物 26 接触平板 12、16 的内表面 14、18 的程度,从而使得腔室高度仅仅稍微小于平均的隔离物 26 的直径。在图 4 所示的腔室实施例中,隔离物 26 由弹性小于第一平板 12 和第二平板 16 中的一个或两个的材料组成。在图 4 中,第一平板 12 由比球状隔离物 26 和第二平板 16 更有弹性的材料形成,并且将以帐篷式(tent-like)的方式覆盖隔离物 26。在该实施例中,虽然腔室 10 的小局部区域可能偏离期望的腔室高度 20,但是腔室 10 的平均高度 20 将非常接近平均的隔离物 26 的直径高度。分析显示使用该实施例可以将平均腔室高度 20 控制为小于 4 微米的腔室高度的上下 1% 或更好。除了受到上述的弹性特性(以及诸如隔离物的分布密度之类的其他因素)的限制,隔离物 26 和平板 12、16 可以由各种材料制备,只要平板 12、16 足够透明。由丙烯酸(acrylic)或者聚苯乙烯(polystyrene)组成的透明塑料薄膜是可接受的平板 12、16 的示例,并且由聚苯乙烯、聚碳酸酯(polycarbonate)、硅酮(silicone)等制成的球状珠是可接受的隔离物 26。可接受的隔离物的特定示例是由聚苯乙烯制成的球体,在商业上可以从例如 Thermo Scientific of Fremont, California, U. S. A. 目录编号为

4204A 获得 4 微米 ($4\ \mu\text{m}$) 直径的这种球体。参照图 5, 垂直布置在另一个平板上方的平板 12 包括多个以规则的间隔布置的口 30 (例如, 用作气孔), 并且平板 12 和平板 16 在多个点处结合在一起。在一些实施例中, 结合材料 32 形成了可用于将样本 34 横向地包含在分析腔室 10 内的外腔室壁。这个可接受的分析腔室的示例在美国专利申请公开 No. 2007/0243117、2007/0087442、以及 2008 年 4 月 2 日提交的美国临时专利申请 No. 61/041, 783 和 2008 年 10 月 31 日提交的美国临时专利申请 No. 61/110, 341 中详细地进行了描述, 这些文献在此以引用方式整体并入本文。

[0031] 另一个可接受的腔室 10 的示例布置在如图 6 和图 7 所示的一次性容器 36 中。腔室 10 形成在第一平板 12 和第二平板 16 之间。第一平板 12 和第二平板 16 都是透明的, 以允许光穿过腔室 10。第一平板 12 和第二平板 16 的至少一部分彼此平行, 在该部分内, 内表面 14 和内表面 18 彼此间隔开高度 20。该腔室 10 的实施例在美国专利 No. 6, 723, 290 中更详地进行了描述, 该专利以引用方式整体并入本文。图 2 至图 7 所示的分析腔室表示可接受的用于本发明方法的腔室。然而, 本发明的方法不限于这些特定实施例。

[0032] 可接受的腔室高度是这样的一个高度, 即, 其中样本内的至少一些 RBC 单独地接触腔室平板的两个内表面, 和 / 或一个或多个 RBC 聚合物接触腔室平板的两个内表面, 和静止样本内的一个或多个无 RBC 区域 (例如, 腔隙) 在所述内表面之间延伸。由于血液样本内的 RBC 的大小是被分析 (例如人类、猴子、马、山羊、鱼、鸟等) 的血液样本类型的函数, 因此可接受的腔室高度将根据被测试对象而改变。基于典型的 RBC 大小和 RBC 在一定程度上可以变形 (例如, 上述的被部分压缩的球体) 的事实, 对于大多数动物品种来说, 大约 2 至 6 微米 ($2\text{--}6\ \mu\text{m}$) 的腔室高度对于单个 RBC 是可接受的。可以分别在分别具有较大或较小腔室高度的腔室中执行其 RBC 基本上大于或小于人类 RBC 的动物品种的血细胞比容 (hematocrit) 分析。另外, 利用 RBC 聚合体的红细胞压积分析的腔室高度可以由 RBC 聚合体的高度决定。

[0033] 在不利用隔离物 26 的那些腔室的实施例中, 腔室 10 的高度 20 可以作为腔室的制造工艺的一部分来确定并且提供给腔室。作为选择, 可以使用包括利用已知的可感觉的着色剂、或者利用布置在腔室内的几何特征的各种技术来确定腔室 10 的高度 20, 其中布置在腔室内的几何特征可以用来确定已知领域的样本的体积, 从而确定腔室的高度。在美国专利 No. 6, 723, 290 和 No. 6, 929, 953 中描述了这些技术和其他技术。然而, 本发明不限于这些技术。

[0034] 在一些应用中, 在至少一部分样本中掺合等容球状试剂 (例如, 两性离子去污剂或者类似功能的试剂), 以使至少一些 RBC 呈现基本上为球状的几何形状。自然形式的 RBC 通常是双凹圆盘状 38 (见图 1), 而不是球状 40。因此, 没有等容球状试剂的影响, 很大一部分圆盘状 22 将不会与两个腔室平板 12、16 都接触。增大具有基本上为球状的几何形状的数量将会增大与两个平板 12、16 都接触的 RBC 的数量, 这其中包括被腔室平板限制的可以用其他不同方法成为球状的一些细胞 42。等容球状试剂 (例如, 通过滴落在内表面的特定部分上) 可以布置在腔室 10 的分立区域中。在腔室 10 内没有样本混合时, 该试剂将仅与靠近该试剂的样本部分掺合, 从而留下未被球状试剂处理的其他样本部分。这种有选择地使一部分 RBC 免受等容球状处理的步骤容许 (如下将要描述的) 通过图像分析来检查 RBC 的定性形态以及容许将图像呈现给内科医生来检查诸如其圆度、形状和细胞上存在突起之类的特征。该等容球状处理不会干扰任何的 RBC 的定量分析。

[0035] 使用分析设备来执行对静止地置于腔室 10 内的样本的分析,该分析设备可用于对至少一部分样本进行成像并且对该图像进行分析。以容许基于基本单位来确定样本的光密度的方式产生该图像。术语“基本单位”或者“图像单位”是指所定义的能够分辨样本图像的增量单位。通常被定义为在特定成像系统内能够单独处理的最小图元的像素是图像单位的一个示例,并且图像单位还可以包括集合单位形式的少量像素。还可以以线性项(例如,在焦平面上每像素几微米)来描述成像设备的放大倍数,其中线性维度沿着应用于图像的正交网格的一个特定轴。在焦平面上被传感器像素(或者其他图像单位)捕获的实际样本面积因此是成像设备所应用的放大系数的函数。因此,成像设备的放大倍数应当已知或者应当能够确定。与该像素有关的体积因此是每个像素的图像的面积与已知的腔室高度的乘积,这是因为腔室中被感测的点是 RBC 延伸贯穿整个腔室的点。例如,如果放大倍数为每像素 0.5 微米,则占据 200 个像素的图像将具有 50 平方微米的面积,而体积则为 50 平方微米与腔室高度的乘积。

[0036] 现在参照图 8,适于用于本发明方法的分析设备 44 的示例包括样本照明器 46、析像器 48、以及可编程分析器 50。样本照明器 46 包括光源,并且通常包括用于控制光的光学器件,该光源选择性地产生整个波长范围内的光,该波长范围宽到足以用于进行红细胞压积分析(例如,大概 400-670nm;鉴于在大约 413nm 和大约 540nm 波长时血红蛋白内出现的高光吸收度(这在大约 413nm 和大约 540nm 波长时的高摩尔消光系数(ϵ)中得到反映),因此,在确定人类血液样本内的 RBC 的光密度方面,大约 413nm 和大约 540nm 的光尤其有效)。样本照明器 46 利用透光度来产生图像。例如可以通过将光源定位在停留于腔室 10 内的样本的一侧、引导光通过静止布置在腔室平板之间的样本、然后使用析像器捕获光来测量样本的透光特性。可接受的析像器 48 的示例是电耦合器件(CCD)类型的图像传感器,其将穿过样本的光的图像转换成为电子数据形式。互补金属氧化物半导体(“CMOS”)类型的图像传感器是另一种可以使用的图像传感器的示例,然而本发明不限于这些示例中的任意一个。可编程分析器 50 包括中央处理单元(CPU)并且连接至样本照明器 46 和析像器 48。CPU 适于(即,被编程为)选择性地执行进行本发明方法所必需的功能。应当注意,可以使用硬件、软件、固件或者其结合来实现可编程分析器 50 的功能。所属领域的技术人员将能够对处理单元进行编程以执行在此所述的功能,而不需要进行过度的实验。题目为“Apparatus for Analyzing Biologic Fluids”且于 2005 年 3 月 15 日发布的美国专利 No. 6,866,823 公开了这种分析设备 44,该美国专利内容以引文方式整体并入本文。

[0037] 分析设备 44 适于针对被成像的样本部分基于每个图像单位来确定与检测到的光信号相关的 OD 值。RBC22 的 OD 由细胞内的血红蛋白浓度、在给定波长的血红蛋白的摩尔消光系数(也被称为摩尔吸收率)、以及传播通过血红蛋白的光路的距离来确定,并且可由以下关系来表示:

$$[0038] \quad OD = \epsilon cL$$

[0039] 其中 ϵ = 血红蛋白摩尔消光系数, c = 血红蛋白浓度,以及 L = 传播通过 RBC22 (即,细胞内的血红蛋白)的距离。摩尔消光系数是血红蛋白的固有特性,可以由实验方法或者通过当前可获得的经验数据导出。在利用具有误差容限的光源(例如,具有设定的额定波长加上或减去某一数量的波长的 LED)的分析设备的实施例,为了精确的目的,初始校正设备并且确定血红蛋白摩尔消光系数是有用的,然后该摩尔消光系数可与该特定设备结合使

用,直到该光源被替换为止,此时可以重新校准该设备。

[0040] 所检测到的光信号(即, OD 值)可被边缘检测算法(edge finding algorithm)用来识别 RBC 的位置和边界。与腔室 10 的两个内表面都接触的 RBC22 的 OD 分布类似于被部分压缩的球体的 OD 分布。与表面 14、18 不接触的细胞 22 的横向边缘的 OD (相对而言)可以认为趋近于 0。所确定的 OD 的值如下:1)在朝向 RBC22 的中心的上方上行进时(即,随着通过细胞的光传输路径增大)增大;2)在 RBC 与平板内表面 14、18 接触时(即,当通过 RBC 的光传输路径恒定时),达到最大值并且基本上保持恒定;以及 3)在远离 RBC22 的中心的上方上行进时(即,随着通过细胞的光传输路径减小)减小。RBC 的 OD 分布的这种表征对于球状的 RBC 来说尤其一致,并且不限于与两个内表面都接触的那些 RBC。

[0041] 在一些实施例中,分析设备 44 还适于确定与两个内表面都接触的一组 RBC22 和/或 RBC 聚合物 23 的平均最大 OD 值。可以基于每个样本分析来确定与所述内表面接触的可接受组大小的一组 RBC 和/或 RBC 聚合体的构成,或者可以针对同一类型(例如,人类血液样本)的“n”个样本分析周期性地地进行这种确定。例如,可以对被识别为与两个内表面 14、18 都接触的一组 RBC22 进行比较估计,以确定该组内的平均最大 OD 和 OD 的统计偏差。希望确定平均最大 OD,这是因为细胞 22 内的血红蛋白的 OD 即使在一个特定样本内也会根据细胞而发生变化。如果标准偏差大于预定阈值,则可以选择与两个平板 12、16 都接触的新的 RBC22,或者可以扩大现有的组,直到上述分析建立了这样一组 RBC22,即,该组 RBC22 的平均最大 OD 具有可接受的标准偏差。例如,一组内的 RBC22 的平均最大 OD,如果大约为加上或减去该样本内与两个表面 14、18 都接触的所有 RBC 的平均最大 OD 的百分之一(1%),则处于可接受的标准偏差值内。然而,可以根据当前的应用和正在使用的特定统计分析(例如,标准误差等)来改变可接受的标准偏差值的构成。可以获得与 RBC22 的 OD 相关的现有统计数据并且可以将其用于确定可接受的 OD 统计值。对一个特定组内的 RBC 的平均最大 OD 是否处于临床上可接受的标准偏差内的确定也是适应性的,这是由于,如上所述,公知的是个体内的 RBC 族群通常在血红蛋白浓度上的变化很小,并且可以使用该结果的连续(running)标准偏差来确定在获得可接受准确性的平均值之前必须检查多少细胞;例如,对于来自具有正常血液特征的对象样本,可接受的组大小可以仅仅为 100 个 RBC,而来自具有异常血液特征的对象样本可能需要分析 1000 个或更多个 RBC。用于确立可接受的平均最大 OD 的、与两个内表面都接触的特定数目的 RBC22 和/或 RBC 聚合物 23 不限于样本内的任何具体数目或者百分比的 RBC22 和/或 RBC 聚合物 23,并且可以包括与两个表面 14、18 都接触的所有(例如,成千上万个)RBC22 和/或 RBC 聚合物 23。

[0042] 现在参照图 9 和 10,分析设备 44 还适于通过检查与腔室 10 的两个内表面 14、18 都接触的 RBC22 的一部分 25 来确定 RBC22 的血红蛋白浓度(“CHC”)。血红蛋白浓度在任何给定的 RBC22 内都是一致的。基于每个像素(或者其他图像单位)来确定 OD 值。每个像素的 OD 信号表示可归因于与该像素“对准”的腔室部分的高度“L”的 OD 信号。在确定 CHC 的过程中,感测 OD、已知或者可以确定腔室的高度,以及已知血红蛋白摩尔消光系数(ϵ)。因此,使用光密度(OD)、血红蛋白消光系数(ϵ)、以及通过血红蛋白的路径长度(L)之间的关系来确定 CHC,其中,对于与腔室的内表面接触的 RBC22 的一部分 25 来说,通过血红蛋白的路径长度(L)等于腔室的高度:

[0043] $OD = \epsilon cL, c = OD / \epsilon L$ 。

[0044] 使用以下步骤来确定 RBC22 的平均细胞血红蛋白浓度(“MCHC”)：使用上述用于确定单个 RBC 的 CHC 的同样方法，针对与腔室的两个内表面都接触的一些 RBC 重复该方法，使用这些结果来确定平均值和可接受的标准偏差。

[0045] 现在参照图 9 和 11，分析设备 44 还适于通过整合(integrating)作为 RBC 内血红蛋白的 OD 的函数的 RBC 体积来确定与腔室 10 的两个内表面都接触的单个 RBC22 的细胞体积(“CV”)。可以通过使用各种分析技术来执行体积的整合。例如，根据第一技术，可以使用腔室高度 20、为被成像的 RBC22 上与两个内表面 14、18 接触的部分 25 确定的平均最大光密度、以及为整个被成像的 RBC22 确定的光密度来确定与两个内表面 14、18 都接触的单个 RBC22 的细胞体积。被成像的 RBC 的总的光密度除以平均最大光密度，并且针对腔室高度来校正该结果。根据另一个技术，通过将单个 RBC22 划分成不同的部分来确定细胞体积：与两个表面接触的部分 25 (“区域 I”)，以及不与内表面 14、18 中的任何一个接触的部分 27 (“区域 II”)。通过感测部分 25 (即，区域 I) 的 OD 来确定细胞上与内表面 14、18 接触的部分 25 的体积。该 OD 是基于每个像素(或者其他图像单位)来进行感测和定义的。如上所述，通过作为仪器放大系数的函数的每个像素的图像大小来确定由该像素表示的腔室面积。因此，与该像素相关的体积是每个像素的图像面积与已知腔室高度的乘积，这是因为腔室中被感测的点是 RBC22 延伸贯穿整个腔室高度 20 的点。通过对与两个表面接触面积内的每个像素相关的体积求和来确定与两个表面 14、18 接触的 RBC 部分 25 (即，区域 I) 的体积。以类似的方式确定 RBC22 上不与两个表面 14、18 接触的部分 27 (即，区域 II) 的体积。对为两个表面接触面积确定的 OD 值和为不与两个表面 14、18 接触的 RBC22 的部分 27 (即，区域 II) 内的每个像素确定的 OD 值进行比较。由于血红蛋白摩尔消光系数(ϵ)是线性函数，则区域 II 内的每个像素的相对 OD 值也表示与该像素相关的 RBC22 的高度；例如，如果该像素的 OD 是区域 I 中的 OD 的 50%，则该点处的 RBC22 的高度就是区域 I 中的 RBC 高度(即，腔室高度 20)的 50%。如上所述，基于每个像素来确定与区域 II 中的每个像素相关的体积并且将所确定的体积进行求和以确定 RBC22 的区域 II 中的体积。RBC22 的体积是区域 I 和 II 的和。减小每个像素上的图像面积(即，增大分辨率)可以提高细胞体积确定的准确性。提供这些技术作为可使用技术的示例，然而本发明不限于这些技术。

[0046] 用于确定细胞体积的上述技术可用于确定为获得 OD 而感测的特定 RBC22 的体积。由于 RBC22 内的血红蛋白的 OD 即使在一个特定样本内也会根据 RBC 的不同而不同，因此，使用针对特定细胞感测到的 OD 来确定细胞 22 的体积可以提高体积确定的准确性。然而，大量 RBC22 不与腔室 10 的两个内表面 14、18 都接触。对于不与两个表面都接触的那些 RBC22，可以使用先前获得的与两个表面 14、18 都接触的 RBC22 的平均最大光密度来确定细胞体积。如所述获得的平均最大光密度的准确性足以提供那些其他细胞 22 的准确体积。作为进一步的选择，对于本发明的那些利用等容球状试剂的实施例来说，还可以通过假定上述的 RBC 片段或 RBC 是球状的来确定与两个内表面 14、18 不接触的 RBC 片段或 RBC22 的细胞体积。如果可以使用上述剖析技术(profileing technique)来确定 RBC22 的周长，则可以使用该圆形面积来确定球体的大小，从而确定 RBC22 的体积。

[0047] 分析设备 44 还适于使用以下步骤来确定样本内的 RBC22 的平均细胞体积(“MCV”)：使用上述的同样方法，针对一些 RBC 重复该方法，使用这些结果来确定平均值以及该平均值的准确性或置信度的度量(例如，可接受的平均值的标准误差)。确定具有可接

受的准确性度量的 MCV 所需要的 RBC 数目取决于所分析的 RBC 族群, 该数目范围可以为从大约几百个到几千个 RBC22。用于确定已经确定了其细胞体积的 RBC 数目是否是为了确定 MCV 而可接受的族群的一种方法是迭代地确定该族群内的样本平均细胞体积并且确定这些平均值的标准误差(即, 平均值的标准偏差)。一旦准确性度量(例如, 标准误差)处于预定的可接受范围内, 则接受该 MCV。

[0048] 现在参照图 9 和 12, 分析设备 44 还适于通过对所确定的单个 RBC22 占据的体积上的血红蛋白浓度进行积分来确定 RBC22 的细胞血红蛋白含量(“CH”)。对于与腔室 10 的两个内表面 14、18 都接触的那些 RBC22 来说, 使用如上所述的针对特定 RBC22 确定的浓度(CHC)和体积(CV)来确定 CH。如果基于单个 RBC22 来确定 CH, 则可以使用为该特定 RBC22 确定的 CHC 而不使用平均 CHC (MCHC) 来确定 CH, 从而提高精确度。对于不与腔室 10 的两个内表面 14、18 接触的那些 RBC22, 通过使用平均最大光密度确定针对该特定 RBC22 的浓度和体积来确定 CH。

[0049] 分析设备 44 还适于通过以下步骤来确定样本内 RBC22 的平均细胞血红蛋白含量(“MCH”): 使用上述的同样方法, 针对一些 RBC22 重复该方法, 使用这些结果来确定平均值以及可接受的准确性度量(例如, 平均值的标准误差)。确定具有可接受的准确性度量的 MCH 所需要的 RBC 数目取决于所分析的 RBC 族群, 该数目范围可以从大约几百个 RBC22 到几千个 RBC22。一旦准确性度量(例如, 标准误差)处于可接受的范围内, 则接受该 MCH。

[0050] 用于确定 CHC、MCHC、CV、MCV、CH 和 MCH 的上述方法是本发明如何使用所述腔室和分析设备来确定基本上未稀释的血液样本的这些特征的示例。本发明不限于这些特定示例。

[0051] 根据本发明的方法, 如上所述, 基本上未稀释的全血样本被置于腔室 10 中。在将样本引入腔室之前或者在将样本引入腔室时, 将抗凝血剂(在一些实例中为等容球状试剂和 / 或凝聚剂)与样本混合。以干粉或半干粉形式(例如通过表面涂覆)添加的试剂尤其易于使用。但是, 本发明不限于干粉形式的试剂, 例如可以使用不会有意图地稀释样本的液态试剂。样本静止地停留在腔室中。在某些情况下(例如, 非常快速的分析), 可以不必添加抗凝血剂, 但是在大多数情况下, 添加抗凝血剂是优选的, 以确保样本处于分析可接受的形式。在某些分析(例如, 提供有关单个 RBC 的信息)中, 可能优选的是不包括凝聚剂。

[0052] 使用分析设备 44, 通过使光透射穿过样本并且检测透射光, 来对静止停留在腔室 10 内的样本的至少一部分成像。虽然不要求对停留在腔室 10 内的整个样本进行成像, 但是这是优选的, 因为这么做通常会提供对样本(以及其所有组分)的更全面的分析并且伴随着准确性的提高, 这是因为对于基本上未稀释的全血样本来说, 腔室内的 RBC22 和没有 RBC 的区域 24 的分布通常是不均匀的。

[0053] 通过分析设备 44, 使用样本部分的图像来确定与腔室 10 的内表面 12、16 相接触的一组 RBC22。取决于被请求的血液样本的特征, 分析设备 44 将确定一个或多个特征值得出被请求的特征值。

[0054] 本发明的优点是不必使样本内的所有 RBC22 都与每个腔室平板接触。可以仅使用与腔室 10 的两个内表面 14、18 都接触的一些 RBC22 来执行该方法。不使用较小的 RBC22 和 RBC 片段来校准该分析, 但是测量它们对红细胞压积的贡献。另外, 根据本发明, 可以确定样本的 CHC、MCHC、CV、MCV、CH 和 MCH, 而不需要知晓腔室 10 内的样本的总面积或体积。

[0055] 根据本发明识别和分析的 RBC22 包括网状细胞(未成熟的红细胞),该细胞在骨髓中生长成为有核细胞。在网状细胞释放到循环之前,剥去它们的核。网状细胞在失去它们的网状染色(为细胞质 RNC 和细胞核 DNA 的染色残留部分的功能)之前在血流中循环大约一天并且生长为基本上只包含血红蛋白的成熟 RBC22。血液样本内的网状细胞的相对数目是各种状态的重要指标。例如,网状细胞数目是骨髓红细胞生产活动的良好指标,这是因为它代表最近的生产。异常低的绝对网状细胞数目表示再生障碍性贫血、恶性贫血、骨髓肿瘤、红细胞生成素生产问题、各种维生素或者矿物质缺乏症(B9、B12、以及铁)等。异常高的绝对网状细胞数量可以表示由于身体对出血或溶血所引起的失血进行补充所导致的快速生产。因此,能够检测和计数网状细胞有重要的价值。根据本发明,网状细胞被识别为 RBC22,这是因为它们包含有血红蛋白,并且因为可以对它们进行染色以识别剩余的 RNA 和 DNA。

[0056] 还可以通过将样本与诸如体外活体染料(如吖啶橙、astrozone orange 等)之类的着色剂掺合来将网状细胞与其他 RBC22 区分开并且对网状细胞进行计数。该染料使自然存在于网状细胞内的网状蛋白在被约 470nm 的紫光激发时发出荧光。通过由于所有网状细胞中包含的血红蛋白引起的并且根据样本图像来确定的 RBC 光密度,可以确定 RBC22 在静止样本内的位置。可以通过在与体外活体染料相关的一个或多个被选波长(例如 470nm)下对样本成像并且在荧光下对样本进行检查来将网状细胞与不包含网状蛋白的 RBC22 和白细胞区分开。对于通过血红蛋白的存在和网状蛋白的荧光而被识别为网状细胞的那些 RBC,可以使用用于确定细胞体积、细胞血红蛋白含量、以及细胞血红蛋白浓度的上述方法来确定各个网状细胞的这些特征。另外,可以确定统计信息(例如,平均值和准确性度量)。还可以通过荧光信号的强度来确定每个网状细胞内的网状细胞的相对量,该相对量与网状细胞的成熟度成反比。因此,可以确定与单个网状细胞以及网状细胞的族群有关的甚至更加具体的信息。可以使用荧光面积或荧光强度来确定单个网状细胞中的网状蛋白的相对量,并且可以作为单个网状细胞的体积的函数来计算该相对量。

[0057] 使用本发明,还可以在包含或排除网状细胞的情况下确定 RBC 指数。例如,可以在包括和不包括网状细胞贡献的体积的两种情况下都绘制样本的 MCV。在没有网状细胞的情况下确定 MCV 可以揭示受大尺寸网状细胞影响的族群小红细胞症。可以确定 RBC 和网状细胞之间的多种其他数学关系。

[0058] 如上所述,根据本发明,可以为不与两个平板内表面 14、18 接触的 RBC22 确定各个指数。可以以同样的方式分析 RBC 片段,从而使得能够将 RBC 片段与血液样本内发现的其他组分(例如,血小板、血小板凝块、白细胞片段、剩余物等)区分开。使用本发明检测 RBC 片段的能力尤其有用,这是因为 RBC 片段可以表示诸如微血管病性溶血性贫血、重度炎症、以及弥散性恶性肿瘤之类的状态。没有经过等容球状试剂处理的血液样本内的 RBC 片段的分析例如可以包括形态分析以确定未被改变的形态特征,例如大小确定、与圆度的偏差、周长与面积之比等。使用本发明产生的 OD 图像能够确定每个 RBC 片段的诸如圆度、椭圆度、突出度等之类的特征,这些特征有助于上述的形态分析。另外,通过测量红细胞片段的直径或周长并且用这些尺寸计算球体的体积,可以确定红细胞片段的体积。

[0059] 虽然已经通过本发明的具体实施例示出和描述了本发明,但是所属领域的技术人员应当理解在不脱离本发明的思想和范围的情况下可以在形式上或细节上进行各种变化。

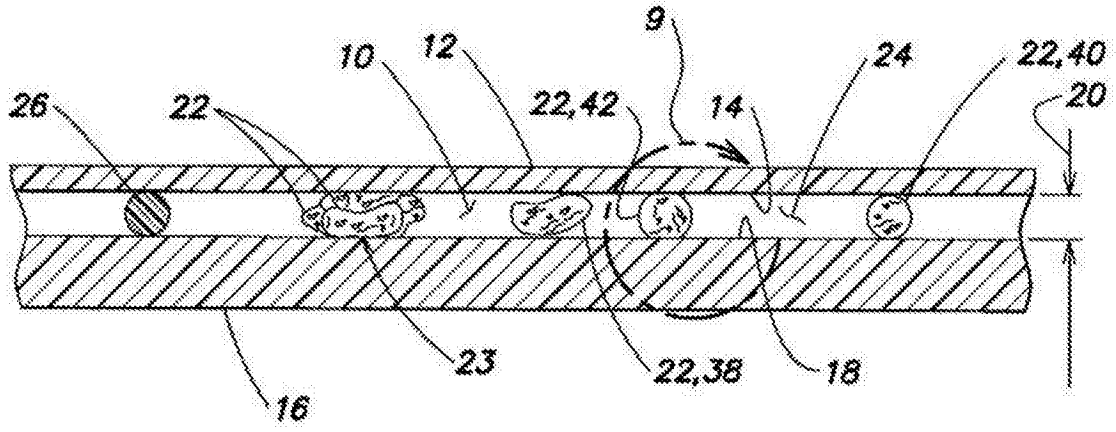


图 1

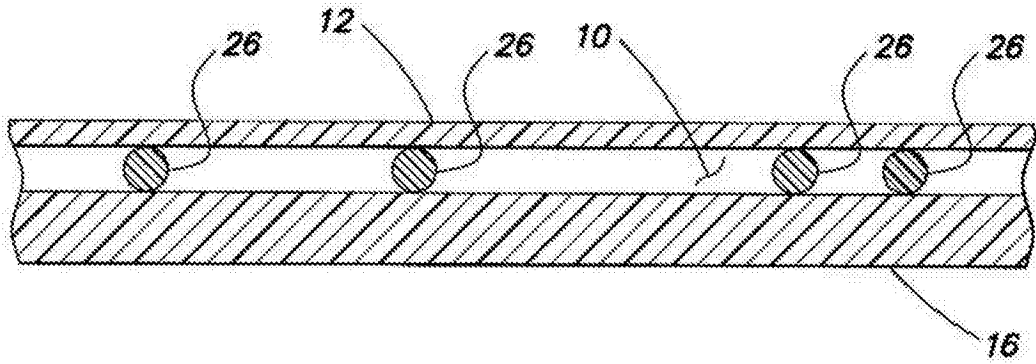


图 2

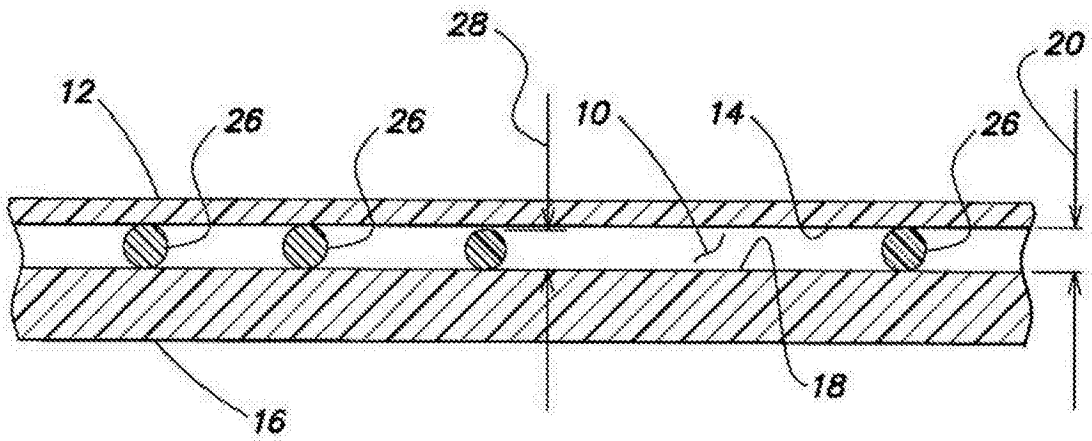


图 3

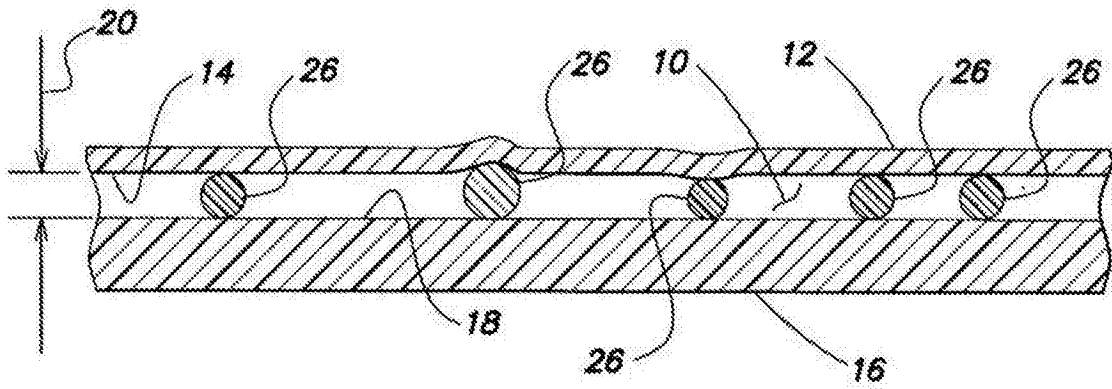


图 4

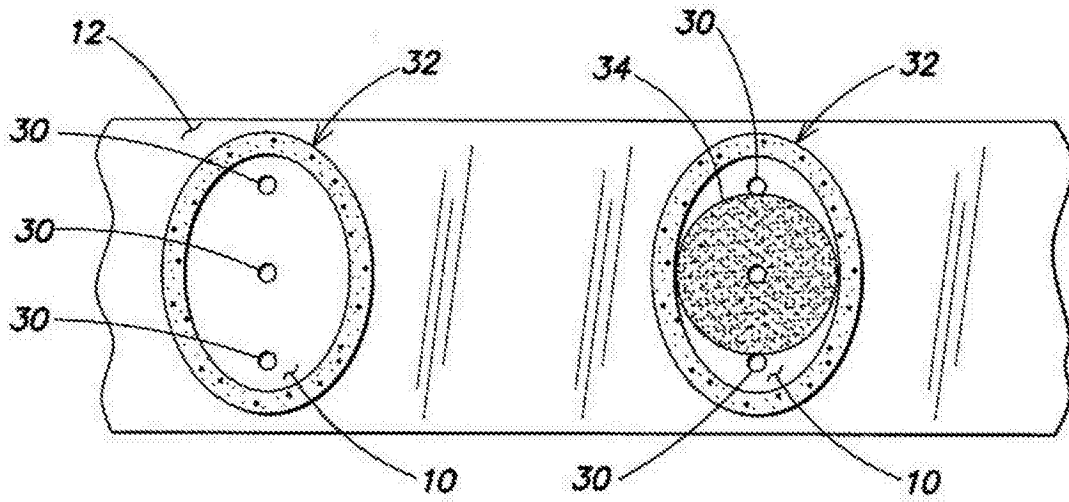


图 5

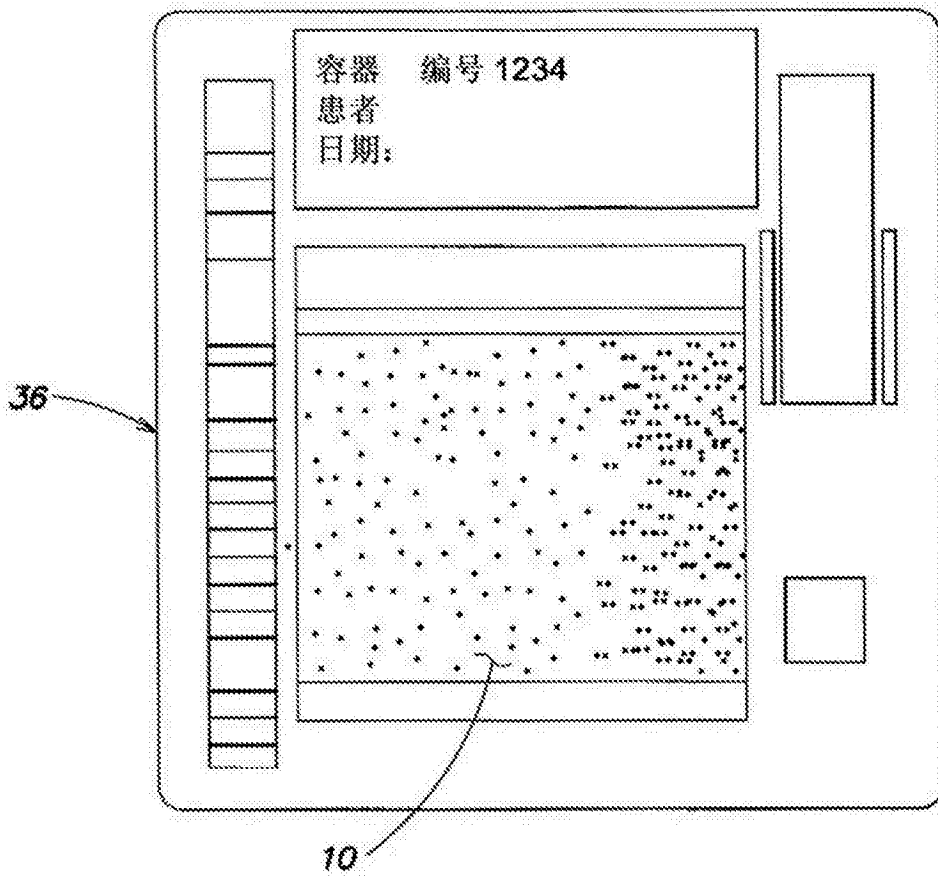


图 6

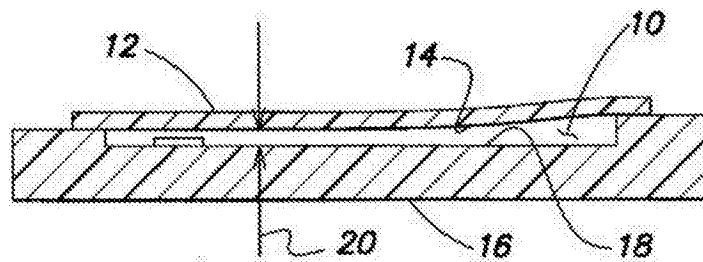


图 7

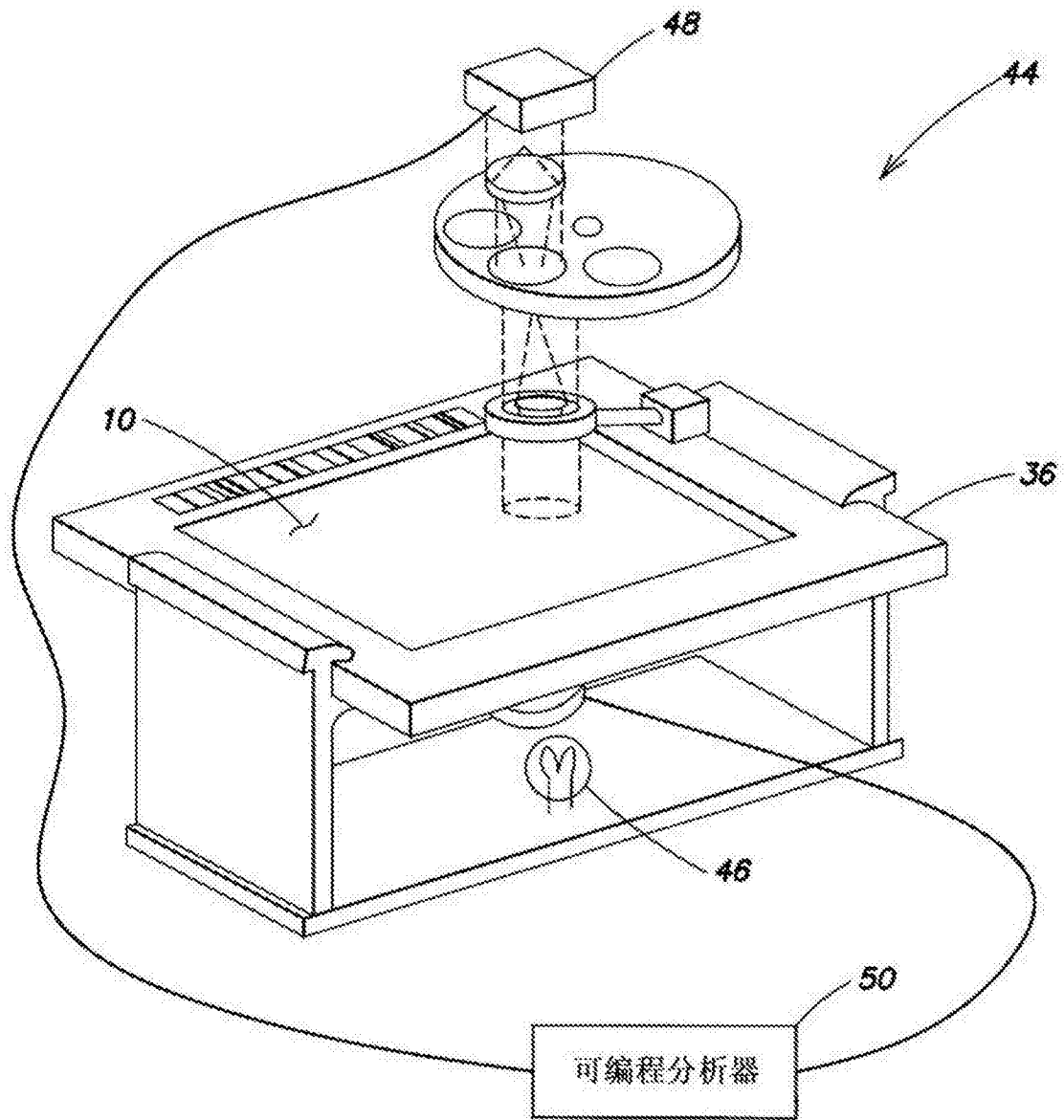


图 8

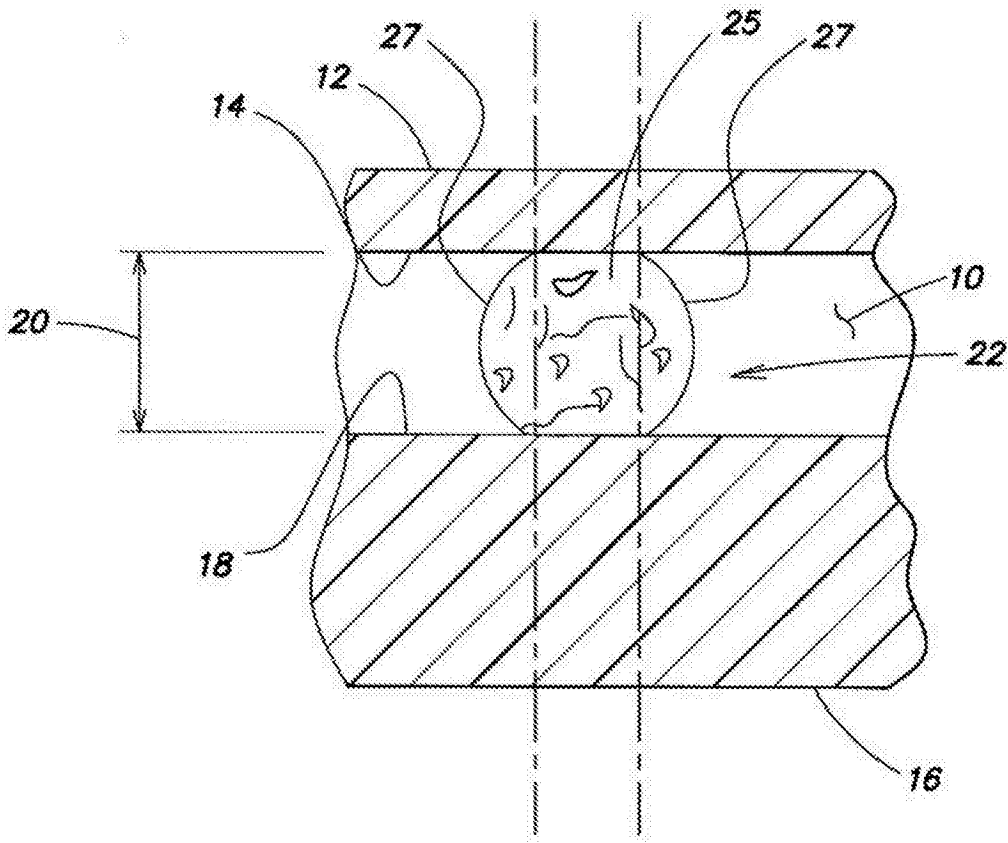


图 9

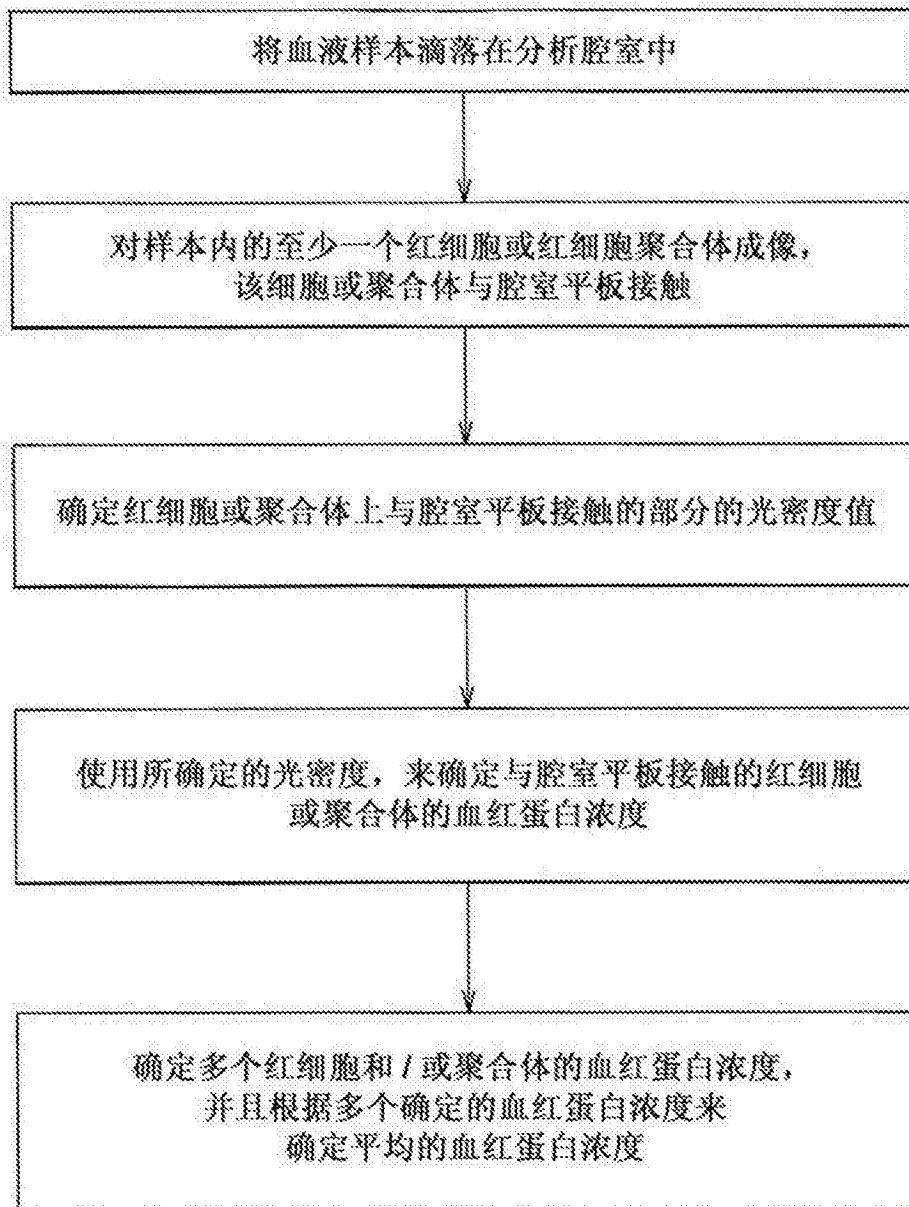


图 10

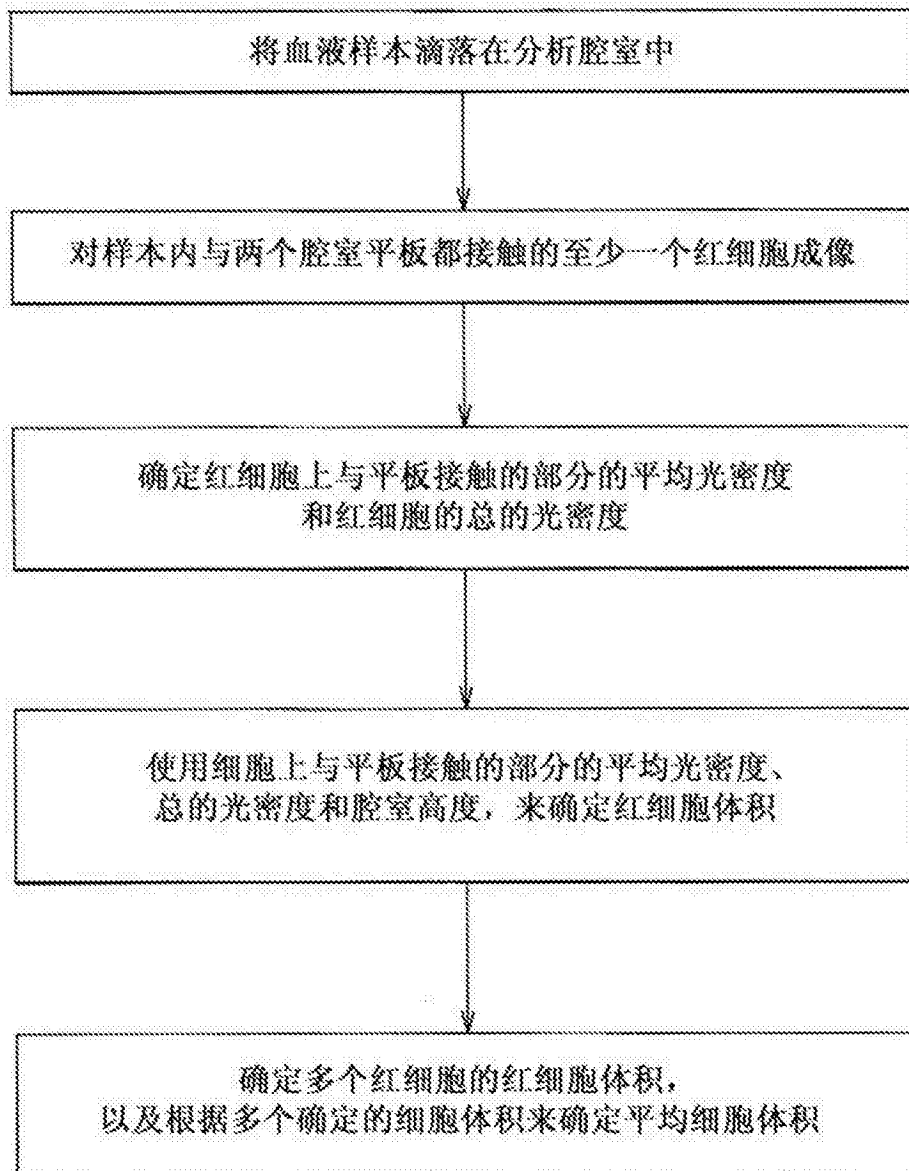


图 11

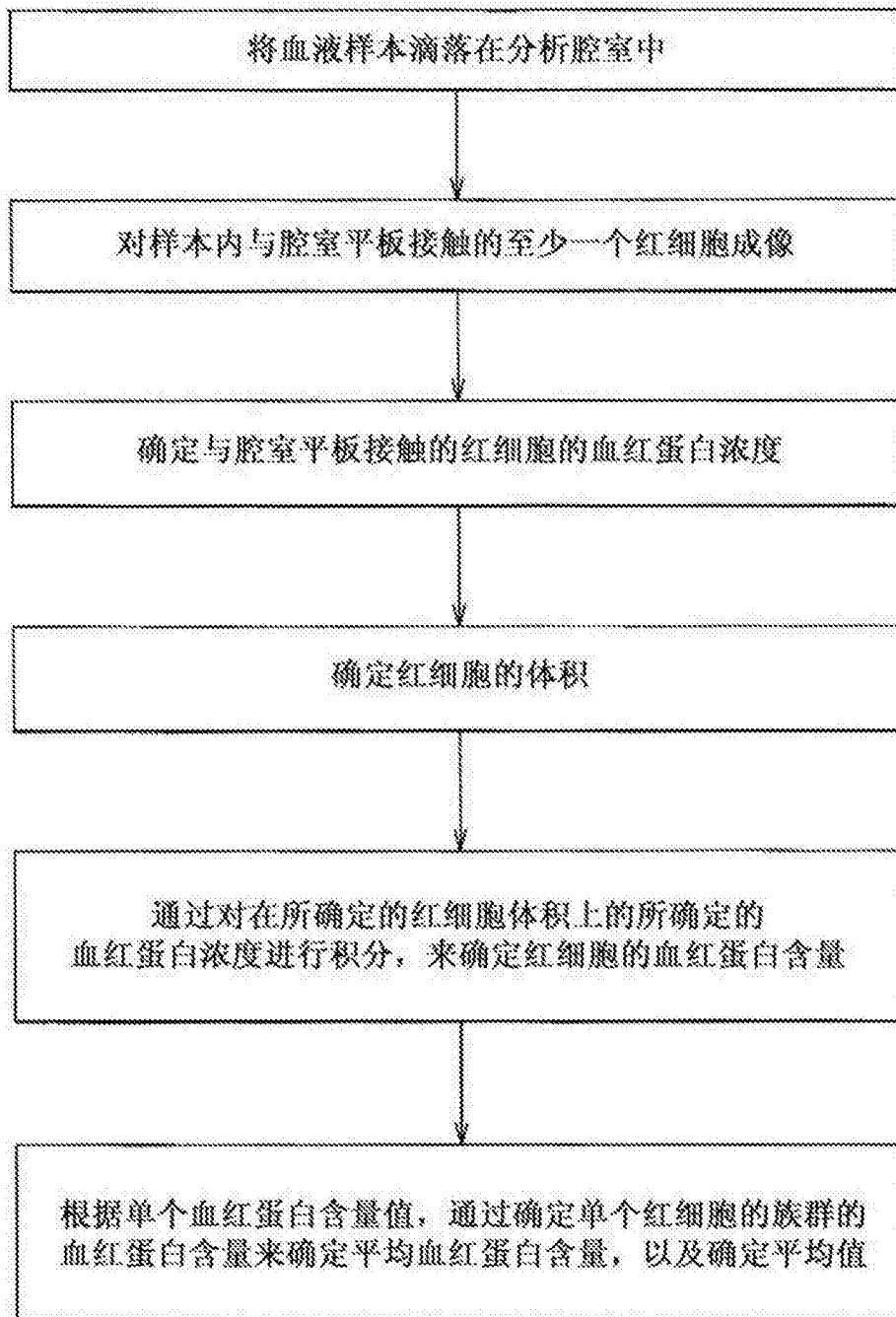


图 12