

血细胞分析仪维修基础

原理篇

郑振寰

血细胞分析仪维修基础

原理篇

目录

1 电阻法原理

- 1.1 库尔特原理
- 1.2 鞘流电阻法原理
- 1.3 电阻法原理的延伸

2 光学散射法原理



1 电阻法原理

细胞单体可以认作颗粒，对细胞进行计数及粒径分析是颗粒测试的主要两项内容。

方法有：光学散射法及库尔特法（亦称电阻法、电脉冲法与电感应区技术）。

库尔特原理：对颗粒个体的测量，能准确测量颗粒的粒径分布，更能作粒子绝对数目和浓度的测量。其所测粒径更接近真实，不受颗粒的颜色和浓度的影响。

光学散射原理分析粒径范围广、多种分散形式。速度快，但受颗粒颜色和浓度影响较大。

库尔特的各种计数器广泛的应用于工业、医疗及航天领域。

被NASA指定为太空计划中测试外星土壤的粒度分析，也被ASTM在九大领域的材料分析标准当中列为标准的测试方法。

1947年，华莱士.H. 库尔特发现了库尔特原理的一种表现形式。

小约瑟夫.R. 库尔特帮助解决了将库尔特原理应用到自动化仪器中碰到的许多难题。

1953年10月20日库尔特原理被授予了具有开创性的专利权。

1958年，库尔特兄弟创办了库尔特电子有限公司

1.1 库尔特原理

电阻法（库尔特）颗粒计数工作原理：

采用小孔电阻原理，即库尔特法测量颗粒的大小。小孔管浸泡在电解液中。小孔管内外各有一个电极，电流可以通过孔管壁上的小圆孔从阳极流到阴极。小孔管内部处于负压状态，因此管外的液体将流动到管内。测量时将颗粒分散到液体中，颗粒就跟着液体一起流动。当其经过小孔时，小孔的横截面积变小，两电极之间的电阻增大，电压升高，产生一个电压脉冲。当电源是恒流源时，可以证明在一定的范围内脉冲的峰值正比于颗粒体积。仪器只要准确测出每一个脉冲的峰值，即可得出各颗粒的大小，统计出粒度的分布。

电阻法（库尔特）颗粒计数功能用途：适合于测量粒度均匀（即粒度分布范围窄）的粉体样品，也适用于测量水中稀少的固体颗粒的大小和个数。

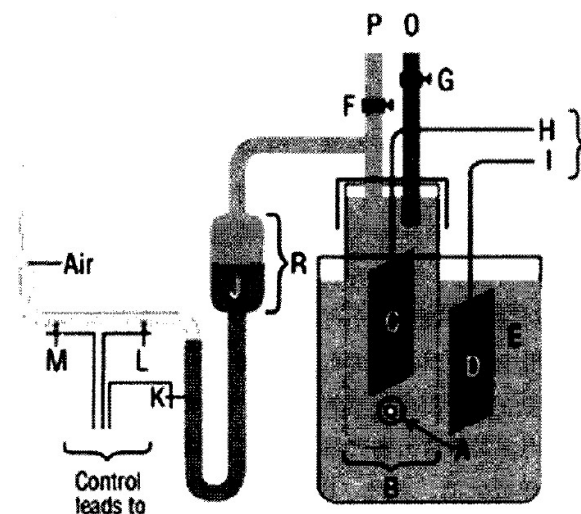
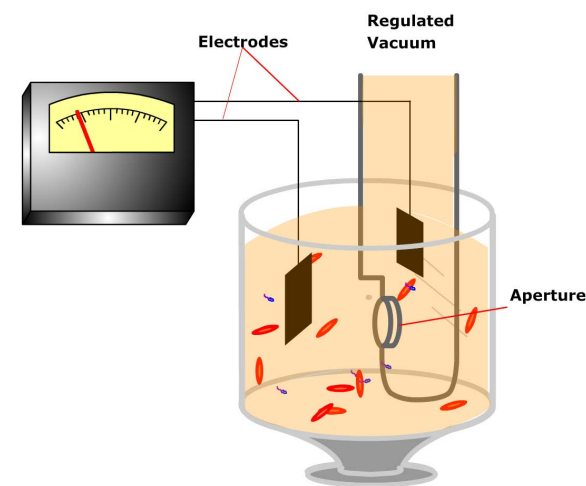


图3 计数器样品台的功能示意图

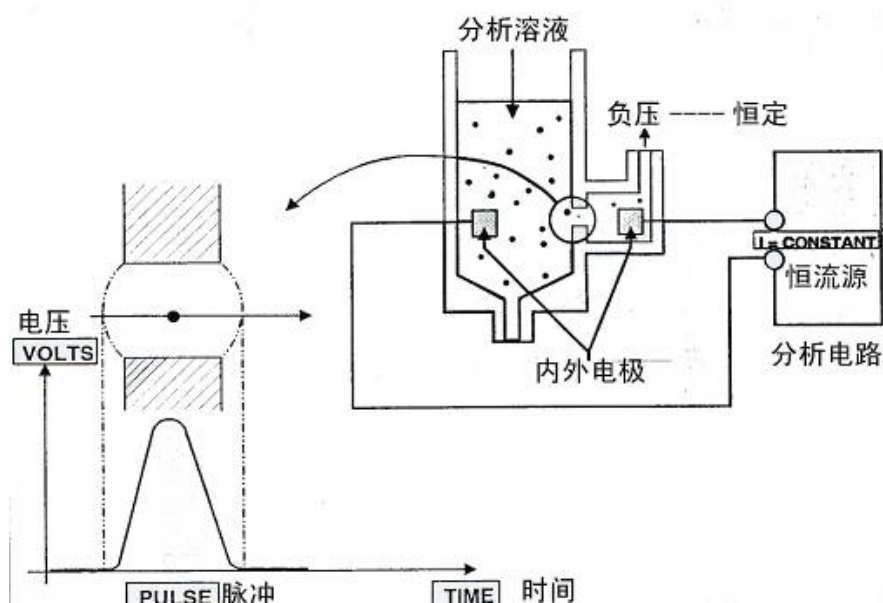


库尔特原理的实现：

库尔特原理检测电信号方法采用的是欧姆定律，即“在同一电路中，通过某一导体的电流跟这段导体两端的电压成正比，跟这段导体的电阻成反比，这就是欧姆定律。”

欧姆定律的公式为： $I=U/R$ ，变形公式为： $U=IR$

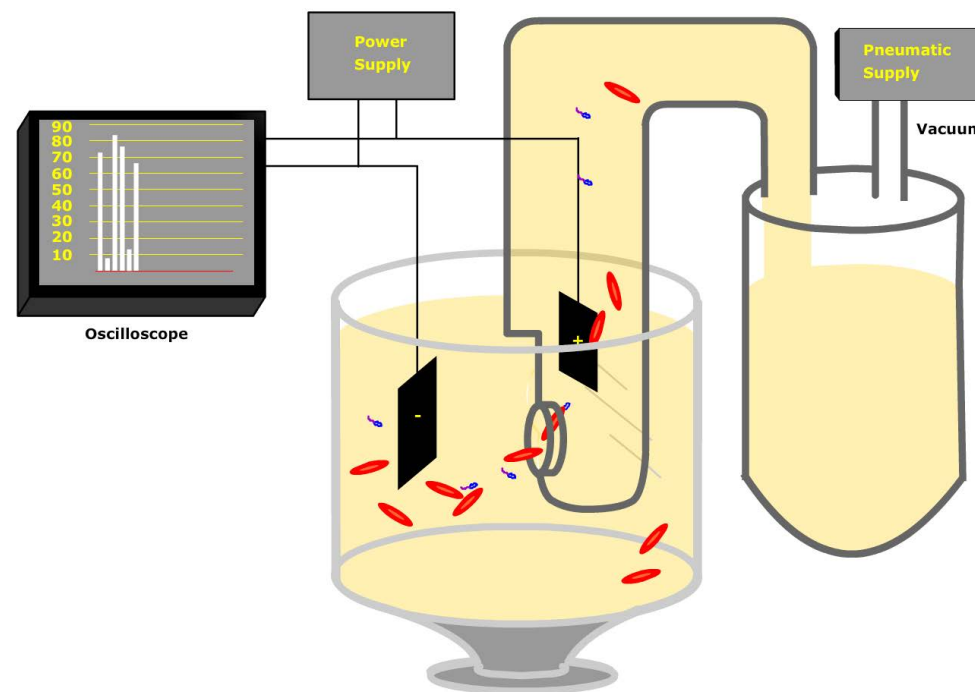
细胞是绝缘体，在欧姆定律中相当于电阻，细胞的大小与电阻的大小成正比关系，所以库尔特原理又被称为电阻法。



由欧姆定律公式可以知道，三个参数必须恒定一个，使其成为常数，不然三个变量很难判断。U是电压，其与R电阻成正比关系，那么就只剩下一个I电流，只能恒定I电流值。

所以，在检测电路实现中，恒流电源是必须的，一般是uA或mA级别的，当电流恒定加载在小孔两端时，小孔通过细胞（电阻）就会产生脉冲（电压的变化）。

由于血细胞的体积很小，所以产生的电阻变化仅仅是几万分之一，后续需要放大电路处理才能监测到脉冲信号。

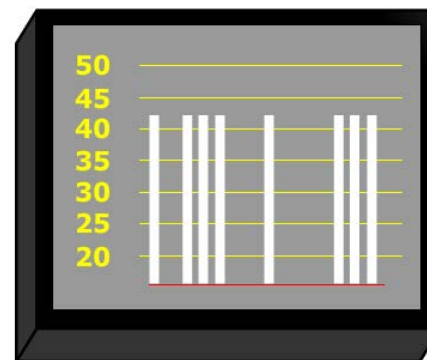


检波:

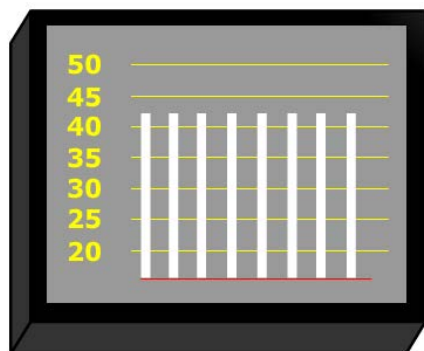
细胞脉冲被检测器检测到，相同间隔的脉冲是理想的检测状态。

细胞间隔的保证是稀释、混匀在起作用，同时传送及动力系统也是关键因素。

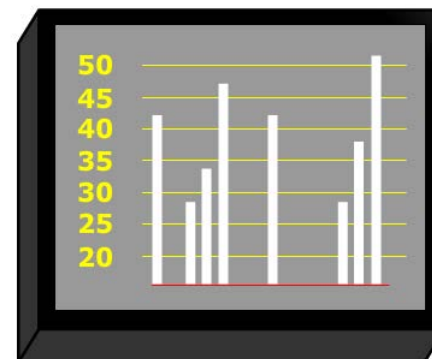
脉冲大小一致，间隔不一致



脉冲大小间隔一致



脉冲大小间隔不一致

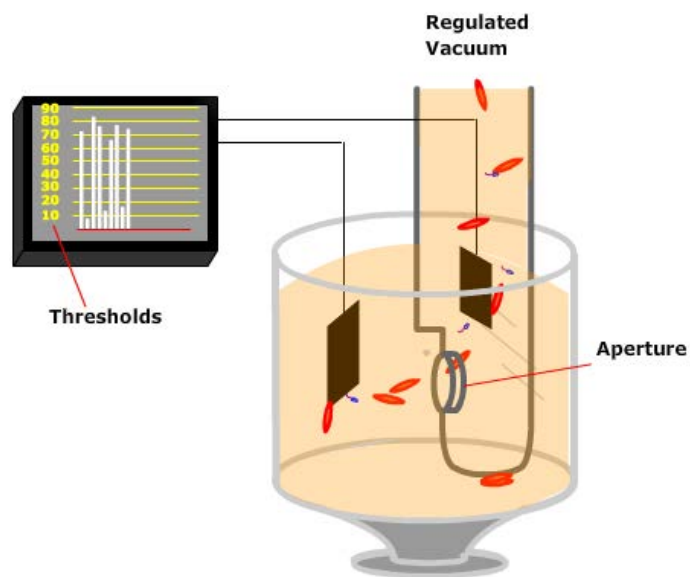


阈值和通道：

脉冲检波后，数据将设定脉冲阈值（范围）进行通道划分。

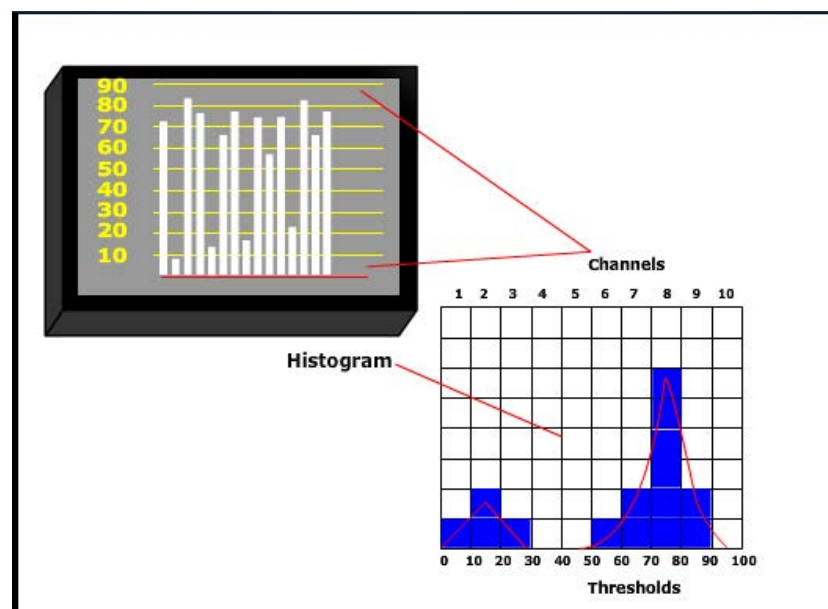
下面的演示中，每隔10个f1的范围设定一个阈值，两个阈值之间的脉冲归一个通道所有，这样每个通道有多少脉冲，也就是有多少细胞就会被计数下来。

之所以采用通道分割，是为将来的直方图绘制提供依据。



每个通道内的脉冲数计算后，建立直方图，这个过程叫脉冲分选过程。

直方图用来进行细胞形态分析、细胞分布的分析以及提供直观的图像显示。



结果判别:

为了保证计数的准确可靠，需要对计数脉冲的结果进行判别。

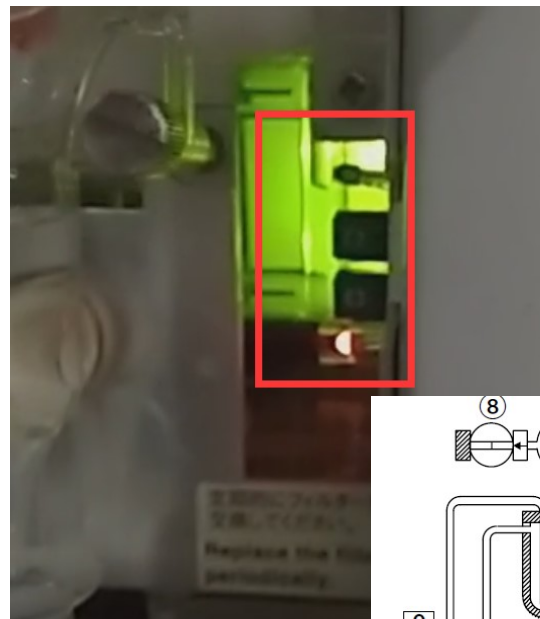
计数的判别方法有：体积定量+时间验证方式、多次相同计数时间比较方式、相同时间多次计数比较方法、单次计数分段比较方式等。

除了采用上述方式外，还有堵孔电平监测、压力检测、混匀监测等等辅助手段。

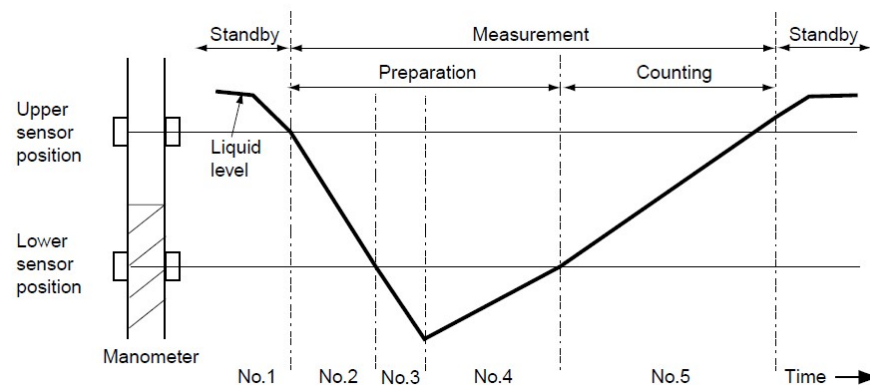
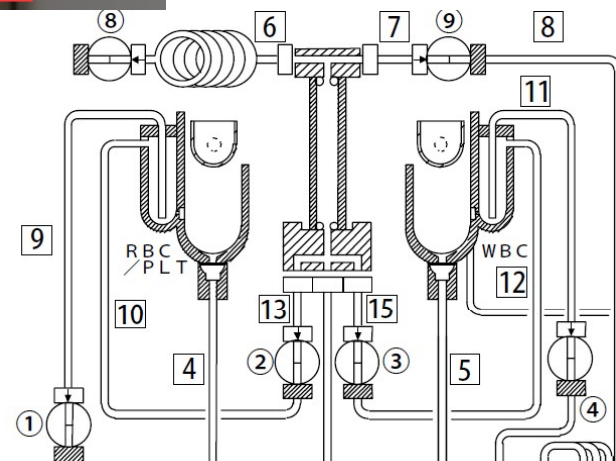
体积定量+时间验证方式:

这是比较传统的判别方式，很多老式机型上都有存在。这种方式俗称定量管方式。其大致原理是：

在固定截面积的玻璃管上下两端设有检测光耦，用来判断液面或浮球的到达，当通过小孔后的液体的液面或浮球依次通过上下两个光耦时，这段液体的体积是已经被确定的，通过两个光耦的时间同时也被计数下来，只要计数时间在规定的范围内，就被认为是合格；否则短于规定的时间被认为是气泡或小孔破损；高于规定的时间被认为是堵孔。



此种方式计数时间较长，附属部件增加很多，故障点多，所受到的影响因素也很多。目前现存的代表机型有NihonKohden、ABBOTT、Sysmex等。



多次相同计数时间比较方式：

是较晚出现的判别方式，基本原理是多次用固定的时间对细胞进行计数，得出的计数结果相互比较，误差不能超过一定的范围，否则就会被认为不准确，提示用户。

代表机型是Horiba-ABX。

在ABX机型中，相同的计数条件计数分别连续计数两次，比如一次5/6秒，经过冲洗后继续测量5/6秒，两次5/6秒的计数结果不能超过5%的误差，否则*号提示。

在其三分类中，采用的是2+1方式，如果两次的误差超过5%，则进行第三次计数。

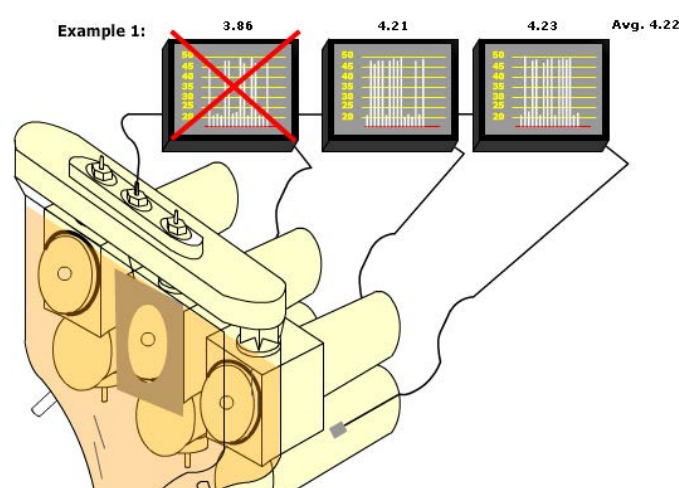
当第三次和前两次的比较在7%之内，提示！号，报告两次接近值的均值；如果超过7%，则*号提示，显示第三次的值，如果是分类项目则不显示分类值。

这种方法通过恒定的负压，恒定的孔径可以计算出每次计数时间内流过小孔的液体体积，从而可以换算出细胞的标准单位下的数量。

相同时间多次计数比较方法：

这是库尔特大型机的看家法宝，基本原理是在一个计数池内放置三套计数装置，在相同条件下计数同样的时间，所得到的结果应符合一定的范围。当有一套计数装置偏离时，废弃这套装置的计数值，报告另外两套装置计数的均值；当三套计数结果均背离时，结果被拒绝，不显示；当然理想状态是三套计数结果均在范围内，报告均值。

这就是三孔鉴别方式。定量原理与前者相同。这种方式可以直接判断堵孔、混匀、泄漏及反应不完全等情况。



单次计数分段比较方式:

基本原理是在一次计数过程中，将计数时间分段，每段时间内计数的结果的最大最小差值与总计数值进行比较，小于一定的范围被认为是合理的，报告总数；超过一定的范围被认为是不准确的，错误提示，结果被拒绝。

这种方式的代表机型是Sysmex。

以电阻法的KX21机型为例，WBC计数时间为10秒，被分为20段，每段0.5秒。

每段的计数结果出来后，将最大和最小相减，再减去一个常数200，然后除以10秒的计数总数，结果大于2%。

$$\frac{(\text{Maximum value} - \text{Minimum value} - 200)}{\text{Sum of sampling values}} \times 100 > 2.0 [\%]$$

要说明的时，由于压力的关系，最大最小值的选取并不是全段，是从3-19段中选取的，这样排除掉压力因素导致的前后端计数减少区域。总数的计算也是在这个区域内进行，前后端并不参与计数。

The screenshot shows a Sysmex KX21 WBC count screen. At the top, it says '*Service Data*' and '准备测量' (Preparation for measurement). Below that, it displays 'No.66', 'WB', and the date/time '08/04 10:33'. The main part of the screen shows a table of segmented WBC counts. The bottom right corner displays 'TOTAL 5301' and 'RATIO 29'. At the very bottom, there is a '1:Print' option.

Segment	Min	Max	Count
0	0	310	46
1	129	286	14
2	278	274	4
3	272	286	3
4	281	285	9
5	263	296	7
6	280	307	19
7	296	299	14
8	304	245	17
9	278	199	

TOTAL 5301
RATIO 29

1:Print

这种方式可以直观的看出混匀和压力存在的问题，但无法判断是否堵孔，特别是半堵孔或轻微堵孔的情况。

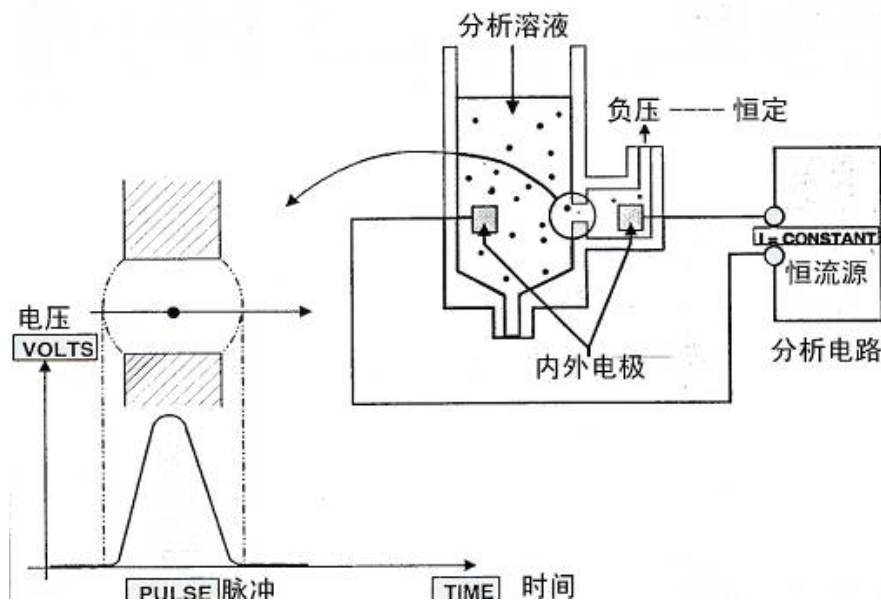
因此采用这样方式一般辅助带有堵孔电平监测。

堵孔电平监测:

基本原理是小孔本身也是电阻，恒流源加在小孔两端后，恒流源电压就会下降一个幅度并稳定下来，这时有细胞通过小孔就会形成一个脉冲。

在小孔两端没有导电液体的时候，两端的电压就是计数电压；当有导电液体存在的时候，两端的电压就是基础电压。

堵孔电平就是依据基础电压进行计算的。当这个电压在一定的百分比范围内，会被认为没有堵孔，当超过范围会被认为是堵孔，当低于范围会被认为是孔破裂等情况。



在Sysmex的运用中，堵孔电平经过复杂的运算得出的。冲洗状态下的判断公式是：

$$C \leq 120$$

$$C = 3.333 \times 10 \times D \times 5.05 / 256$$

$$- 2.961 \times T_{TD}^2 \times 10^{-2}$$

$$+ 3.376 \times T_{TD}$$

$$- 6.590 \times 10$$

C是堵孔率，不能超过120

D是堵孔电压的AD值

T_{TD} 是小孔的温度

当计数状态下，堵孔的判断依据是：

$$S_E / S_H \geq 0.5$$

S_E 是完成计数前的三组分段数据的均值

S_H 是3-19分段数据的均值

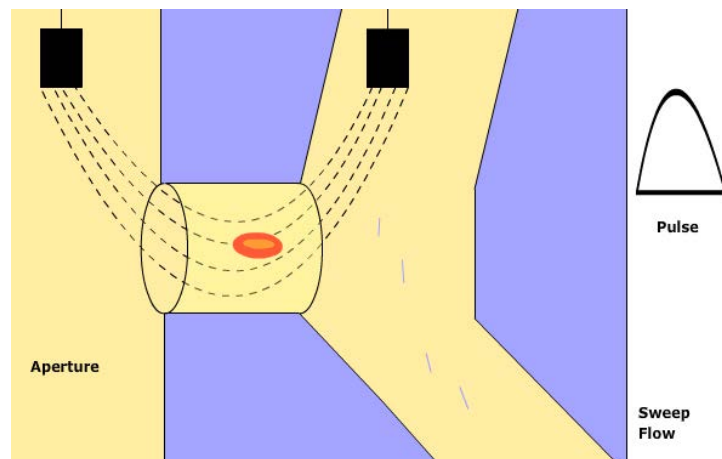
在冲洗过程结束前，通过电压进行判断；在样品计数结束前通过分段值比较。所以在Sysmex的设备中，经常出现开机就报堵孔错误和计数的时候报堵孔错误这样不同的情况。

扫流:

以上基本原理实现后，就可以进行最基本的颗粒计数。但在实现过程中发现，当细胞通过小孔后，由于湍流的存在，会造成通过小孔后的细胞在电极区回游，从而形成多个脉冲信号，造成计数不准确。

扫流技术就是在细胞通过小孔后，被本底液体带走，不会形成回游。

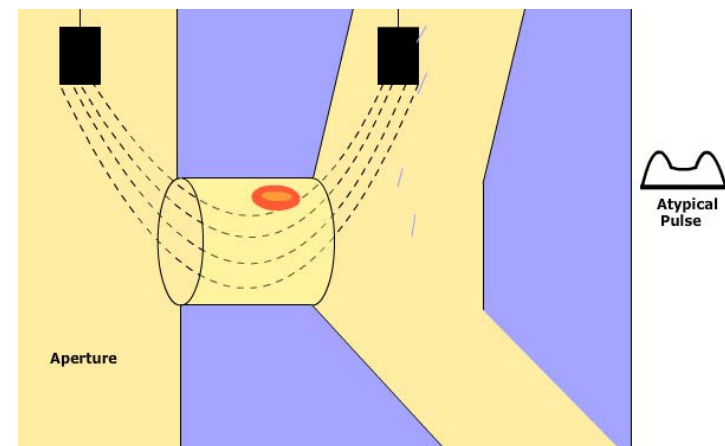
扫流技术的出现使血细胞计数，特别是血小板计数的准确性问题得到根本的改观。



脉冲编辑技术:

当细胞从小孔正中心通过时，检波器得到理想的脉冲。但当细胞贴着孔壁通过小孔时，会与孔壁发生连续碰撞或在孔壁上翻滚，这样得到的脉冲信号就是带有连续峰值的波形，这样的波形直接交给后面的计数部分是无法进行识别的，必须进行脉冲整形，也就是脉冲编辑。此类计数在过去都是采用通过细胞间隔用硬件进行编辑的方法。而现在根据有些厂家的资料显示，采用算法进行判别。

正是这个原因不好解决影响计数准确性，才引发了鞘流电阻法的革新，从根本上防止碰撞和翻滚的发生。

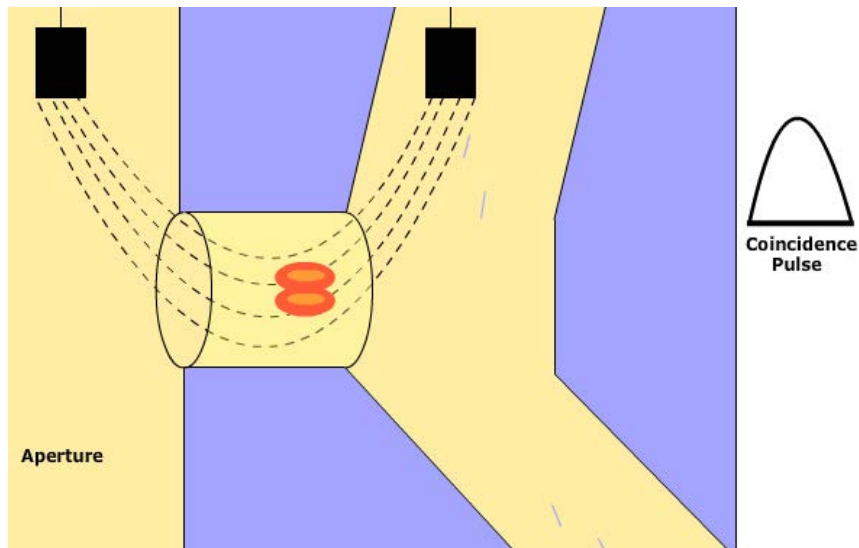


同频校正技术:

当两个或多个细胞粘连或叠加通过小孔，得到的脉冲数值会高于普通的单个细胞，如果不加以处理会造成计数分型的错误。

常用的方法有滤除、抑制、同比计算等方式，后者都采用算法处理。

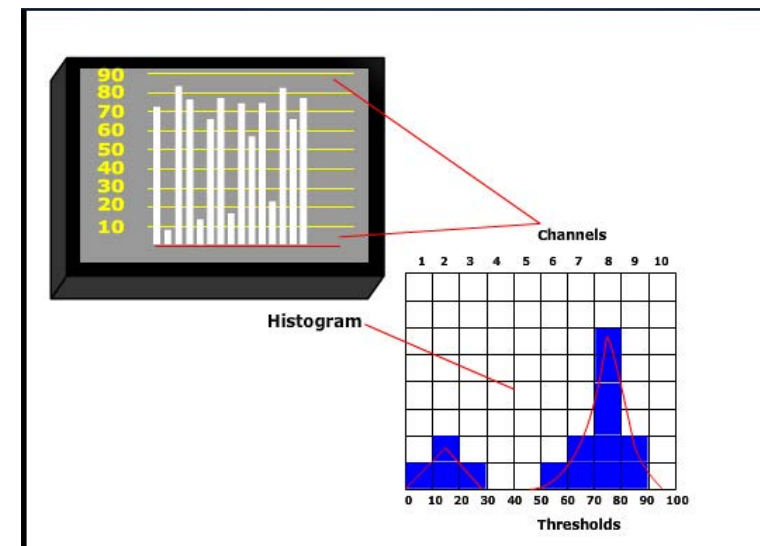
出现这种情况，一般与样品准备、稀释混匀有关。



直方图的建立:

经过处理后的脉冲，进过阈值和通道归类后，就可以绘制直方图。

不同细胞类型绘制不同的直方图。



直方图提供的信息：

峰值通道

在每个通道的细胞平均体积（fL）

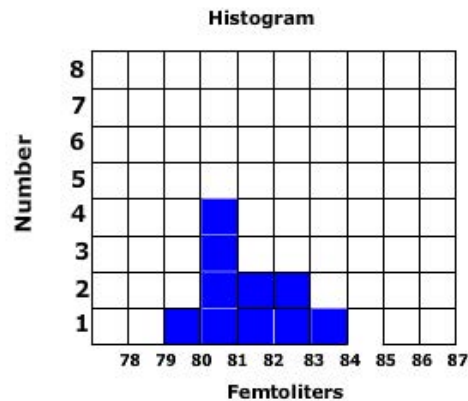
细胞平均体积

X轴：体积（fL）

Y轴：数量（无单位，相对值）

用户通过总数和分类可以看到相应的数值，单纯在直方图上无法看到计数值，只能看到相对关系，具体的计数值在后台处理。

直方图的Y轴是相对数量，并不是绝对数量，目的就是可观测性。



Avg. Vol	78.5	79.5	80.5	81.5	82.5	83.5	84.5
No. Cells	0	1	4	2	2	1	0
Tot. Vol/Channel	0	79.5	322	163	165	83.5	0

Total Vol. All Cells 813

Total Counts = 10

红细胞直方图信息：

红细胞直方图在X轴的范围一般为36-360fL之间。

1 峰值

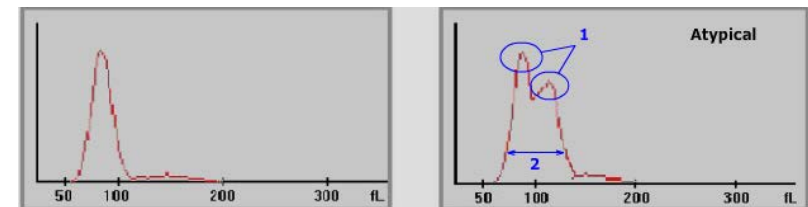
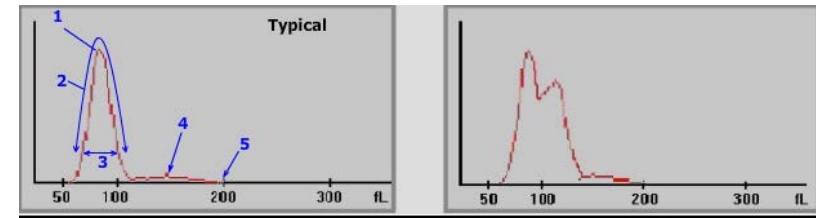
2 曲线的上升下降

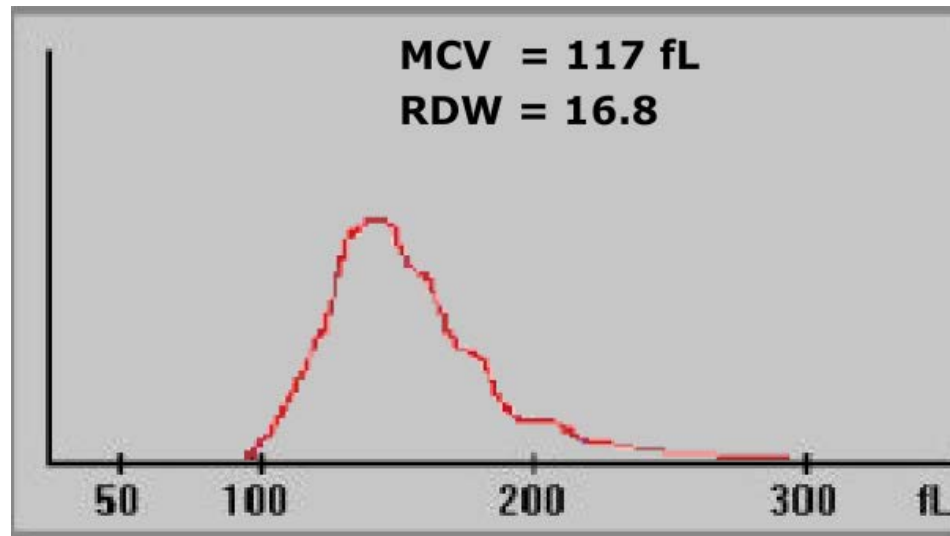
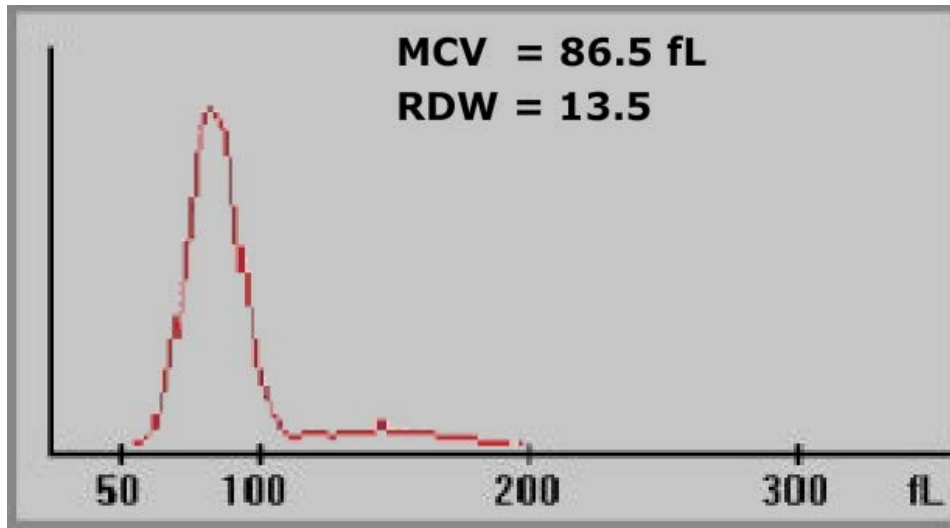
3 曲线分布宽度

4 小白细胞或大红细胞分布区域，接近基线

5 正常红细胞直方图在200-250fL结束

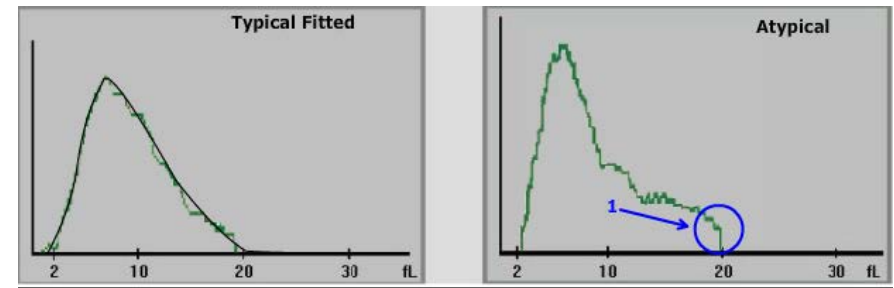
不正常的红细胞直方图有多个峰值，分布宽度过大。

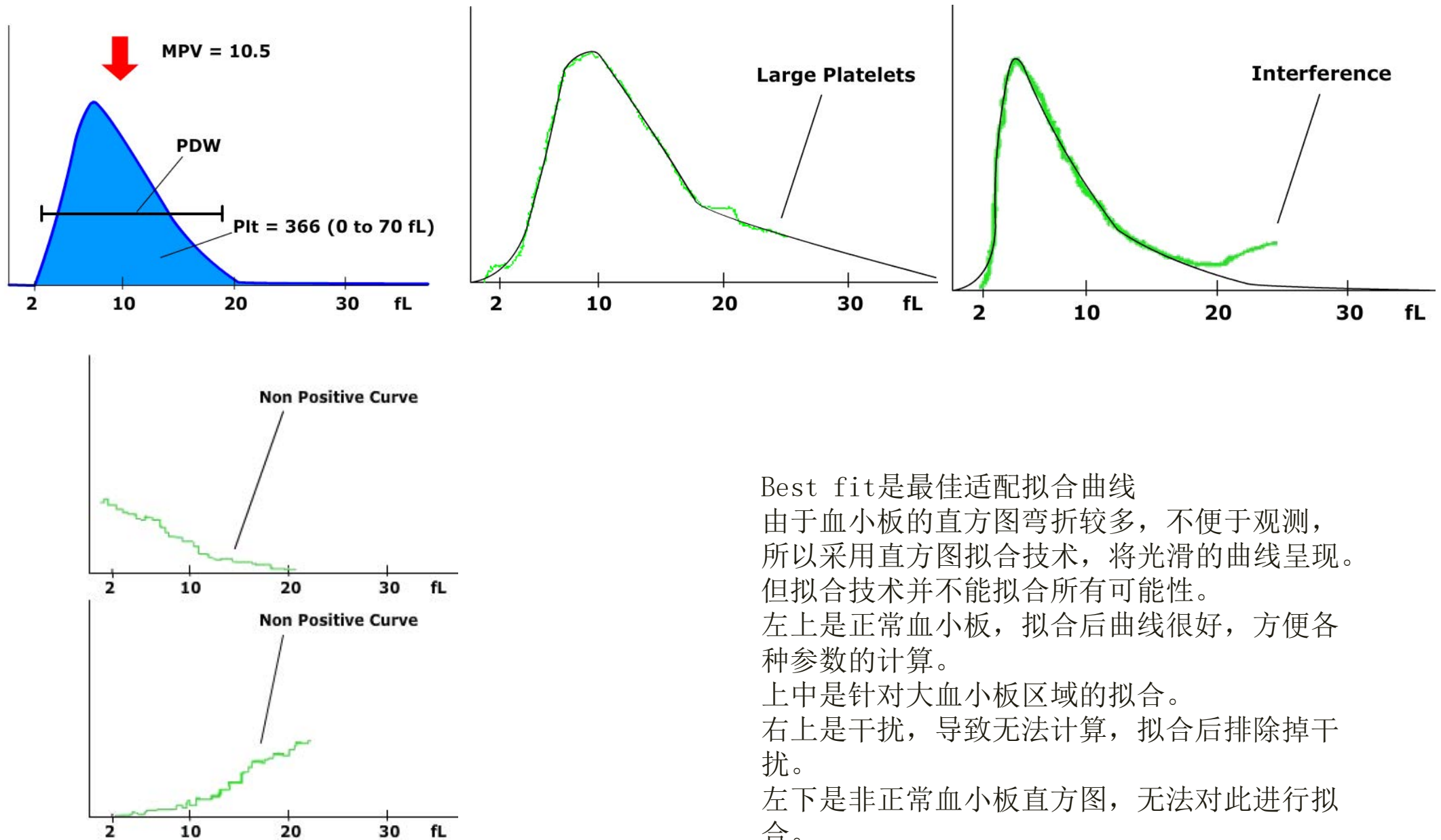




血小板直方图信息：

血小板直方图在X轴的2-35fL，正常血小板在2-20fL之间，超过20fL属于大血小板区域，超过30fL，甚至上抬翘尾，会被认为是红细胞左移。不正常的曲线是大血小板，20fL以后的区域没有拟合曲线，强行终止。其它机型会发生翘尾。



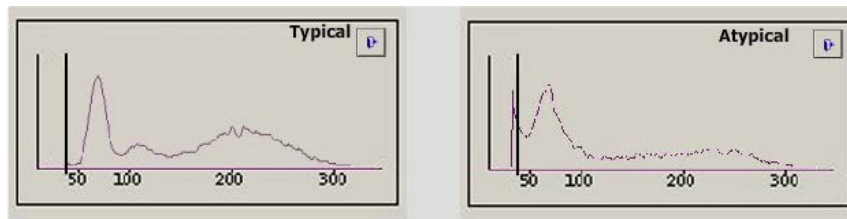


Best fit是最佳适配拟合曲线
 由于血小板的直方图弯折较多，不便于观测，
 所以采用直方图拟合技术，将光滑的曲线呈现。
 但拟合技术并不能拟合所有可能性。
 左上是正常血小板，拟合后曲线很好，方便各
 种参数的计算。
 上中是针对大血小板区域的拟合。
 右上是干扰，导致无法计算，拟合后排除掉干
 扰。
 左下是非正常血小板直方图，无法对此进行拟
 合。

白细胞直方图信息：

白细胞直方图分布宽度较大，从10fL到500多fL，不同机型有不同的分布方法。

红细胞碎片或溶血不足会导致前锋，有些机型会滤除掉。



界标：

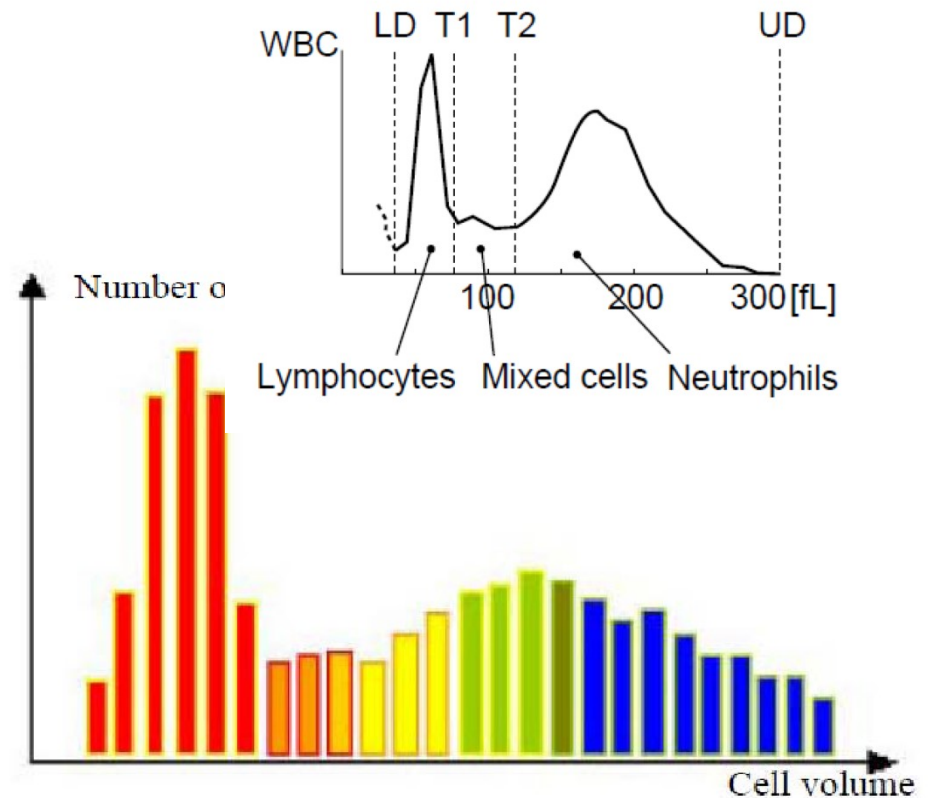
界标是直方图上的分类界限，可见与否并不重要。

界标分为固定界标、浮动界标、混合界标。

以库尔特为代表的机型是固定界标，有ABBOTT和Horiba-ABX等。

以Sysmex为代表的机型是浮动界标。

新上市的机型大多采用混合界标技术。



电阻法血细胞分析的试剂：

稀释液：稀释血细胞，将细胞游离在稀释液中，将细胞保持一种特定的形态；稀释液是导电溶液，这是电阻法库尔特原理必要的条件之一。

溶血剂：溶解红细胞；与红细胞流失出来的血红蛋白结合，形成稳定的溶液；是白细胞穿孔，胞浆流失（形成细胞膜包裹细胞核）；

有些机型将血红蛋白溶血剂和白细胞溶血剂分开，分别测试两组参数。还有的机型为血红蛋白增加参比液。

清洗剂：清洗样品针、管道、计数池、小孔，以及血细胞分析仪内部的诸多液路上的部件。

清洗剂分为在机清洗剂和脱机清洗剂。
在机清洗剂每次计数间隔会对相关部件进行冲洗，然后进行下次计数；或者间隔多少测试进行一次重新，使用率较频繁，消耗量也大。
脱机清洗剂本身与主机不连，保养或开关机时使用，一般是浓缩液，消耗量较少，价格较贵。

几种试剂都是导电溶液。

稀释液除了有机无机成分外，主要的指标是PH酸碱度和渗透压。

等渗等张的稀释液会保持细胞的原始形态，低渗会导致细胞（特别是红细胞血小板等）膨胀充盈。

加上PH酸碱度的配合，可以用于血细胞检测中，得到不同细胞形态，从而绘制出不同的直方图。这也是固定界标和浮动界标起因之一。

在老式的机型中，医用生理盐水也可以进行血细胞计数。

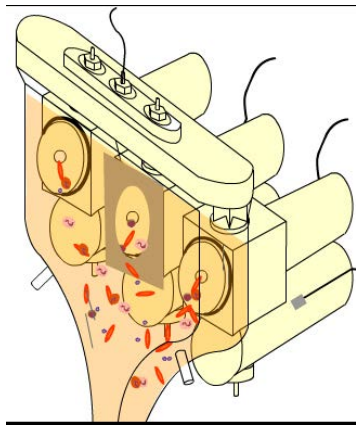
溶血剂过去都采用氰化高铁法，用氰化物与血红蛋白结合，形成稳定的氰化高铁，用来血红蛋白比色。

由于氰化物的环保和安全性受到重视，目前多采用无氰化物的溶血剂。

清洗剂分为有色和无色两种，有些机型比如Abbott使用清洗剂对血红蛋白空白进行测试，所以一定要是无色的。而且清洗剂的起泡程度也受到约束，过多的气泡冲洗不便，可能会干扰下次计数，甚至会造成故障。

电阻法血细胞分析参数的测试方法：

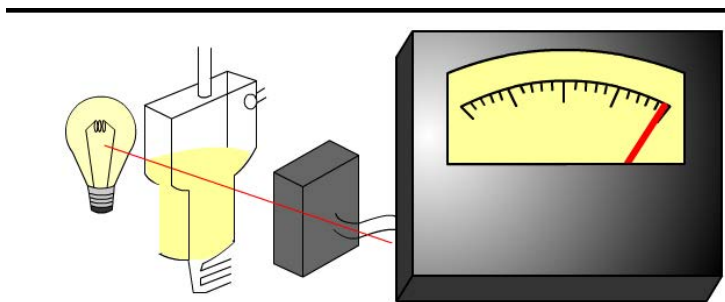
WBC白细胞、RBC红细胞（PLT血小板）通过库尔特原理直接得到数值。



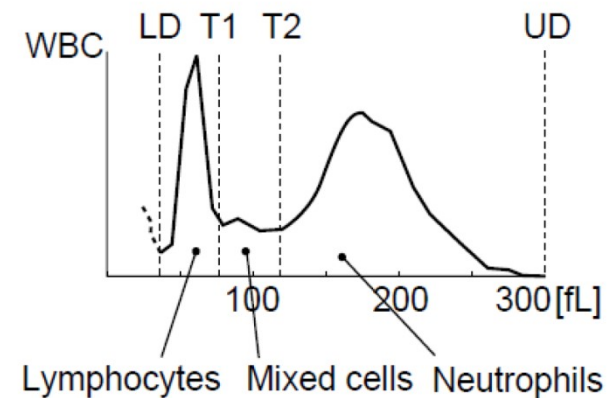
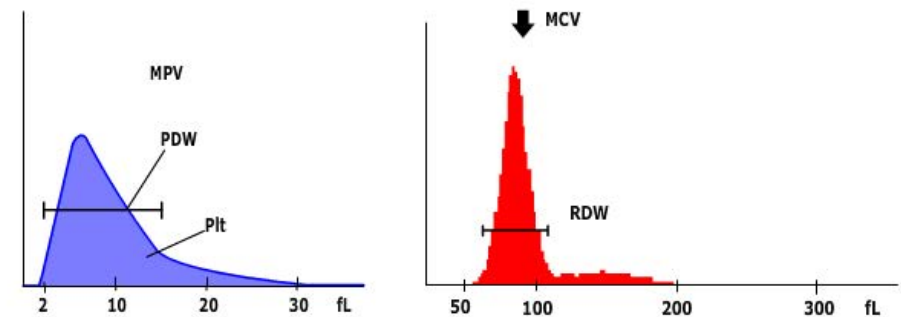
HGB血红蛋白通过光电比色进行测量，遵循朗伯-比尔定律。公式为：

$HGB = \log(\text{空白值}/\text{样本值}) \times \text{常数}$

比色波长氰化高铁法为540nm，非氰法为555nm。



在得到的三个直方图中，可以测算出PDW血小板分布宽度和MPV平均血小板体积、RDW红细胞分布宽度和MCV红细胞平均体积（也可直接得到HCT）、WBC白细胞分类中的LYM%淋巴百分比、MON%单核百分比、GRA%中性细胞百分比（也可直接得出绝对值）（PLT血小板）



通过前面的数值通过公式可以计算出下列参数：

HCT红细胞压积（单位体积内红细胞所占百分比），公式为： $HCT = RBC \times MCV / 10$

由于HCT和MCV通过公式可以互相换算，所以有些机型是直接得出HCT，计算得出MCV。

MCH平均红细胞血红蛋白量，公式为：

$MCH = HGB / RBC \times 10$

MCHC红细胞平均血红蛋白浓度，公式为：

$MCHC = HGB / HCT \times 100$

PCT血小板压积，公式为：

$PCT\% = (PLT) \times MPV / 10000$

WBC白细胞分类值中的LYM#淋巴绝对值、MON#单核绝对值、GRA#中性细胞绝对值。

公式为： $X\# = (X\% \times WBC) / 100$

分类值的百分比和绝对值可以相互换算，有些机型在直方图上直接得出绝对值，再换算出百分比。

有些机型在WBC直方图中测算出疑似嗜酸细胞的百分比，但只能作为研究项目使用，并不准确。还有些机型，在PLT直方图中将20-35f1之间的分布认为是大血小板比值LCR报告。

因此，在整个测量与计算结束后，可以得到18（19）项参数结果和三个直方图，这也是电阻法血细胞分析仪的18项或19项或21项的来历。

通过各项参数结果和直方图结合，可以对某些病症得出辅助性的临床诊断，比如病毒、细菌感染，贫血，血液类疾病等。

但在我个人所写的所有讲义中，除摘抄文献外，不会涉及到临床应用，仅对仪器故障结合各项参数和直方图（散点图）进行分析判断。

因为非检验或医疗人员不能也不允许对检验结果做出临床判断。

血细胞分析仪往往被简称为血球仪，在其功能区分上以三分类、五分类等作为主要参数指标。分类这个词是根据外文翻译而来，英文单词是Differential，直译就是差异，字面意思是分检出有明显差异的细胞群体。

但在中文中，认为分类这个约定俗称的名词并不准确。分类是带有准确的含义，应该采用分群这个词，毕竟血细胞分析无论用什么方法都只是筛查结果，并不是绝对准确的结果，最终判定还得依靠血图片或特定标记物分析。因此在我个人所写的所有讲义中，还是以俗称分类进行讲解。

原理篇 1 电阻法原理

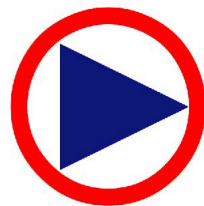
1.1 库尔特原理



血细胞分析仪维修基础

1.2 鞘流电阻法原理

依据库尔特原理应用而来的颗粒计数仪，最初都采用负压吸引的方式，而这种方式带来的速度慢、颗粒间隔不均匀（非混匀原因）、过孔回流、颗粒滚动碰撞、颗粒粘连等情况，无法彻底根除；而且负压吸引方式所吸取的样品溶液浓度不能过高，这就会导致采样数据过少，误差相对较大。



点击播放演示

针对这个问题，流体学中运用成熟的层流技术被用到颗粒分析中，很好的解决了上述问题。

层流的概念：是流体的一种流动状态，它作层状的流动。流体在管内低速流动时呈现为层流，其质点沿着与管轴平行的方向作平滑直线运动。流体的流速在管中心处最大，其近壁处最小。

形成层流的条件是雷诺系数 $Re < 2300$ ，而雷诺系数 $Re = \rho UL / \mu$

其中

ρ 是流体的密度

U 是流体的流速

L 是流体所在管道的直径

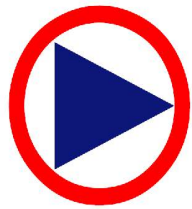
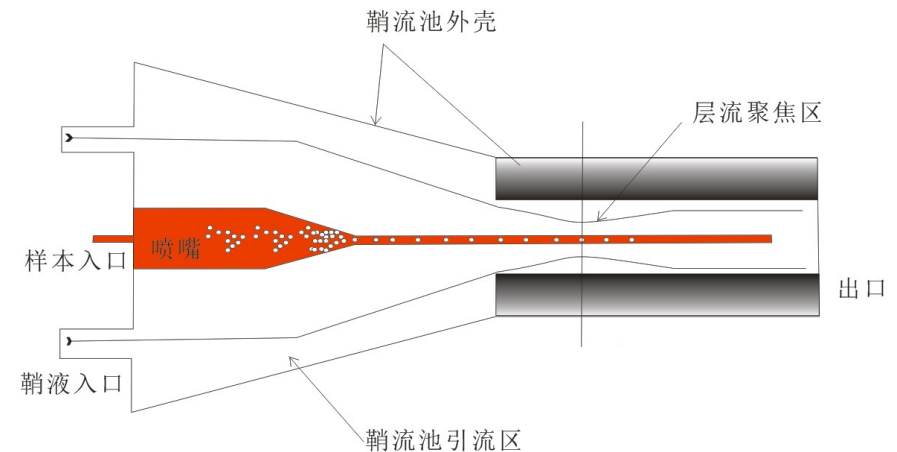
μ 是流体的粘度

当管径、密度和粘度都为定值的时候，雷诺系数与流速成正比关系，而流速与压力又称正比关系，所以在实现单一流体层流的时候，通过调节喷射压力就会得到。

层流的实现还不能完全用到颗粒分析上，因为层流仅仅保证了颗粒在管道（小孔）中心通过这一单一条件，我们所关心的回流、重叠、翻滚、碰撞和间隔问题无法解决。

因此层流的基础上引入了鞘流（Sheath Flow）的概念，并将其实现，从而解决了上述问题。鞘流的技术其实是湍流技术，在样品喷射形成层流后，其外部有湍流，一般是鞘液（稀释液），相当于保护鞘一样的，围绕着样品一起通过检测区。

由于二者是层流和湍流，所以不会发生干涉，间隔不规则的颗粒会顺序等距通过。

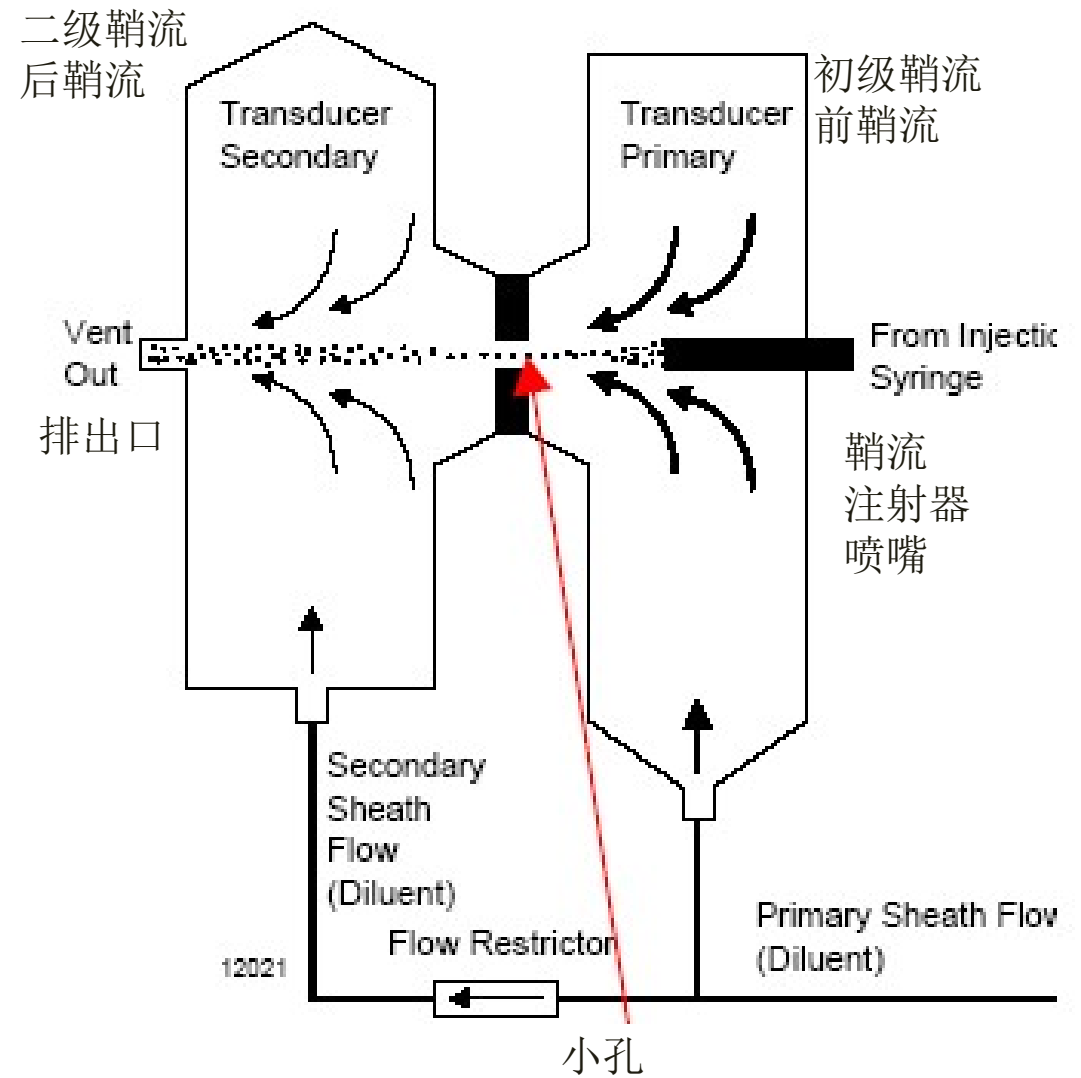


点击播放演示

鞘流技术本来用在高端的流式细胞仪，并简化成为光学五分类血细胞分析仪的应用技术。本世纪初期，五分类价格高昂，三分类还大行其道，所以有厂家把鞘流技术运用到三分类中，在中国市场上能见到的有Abbott的CD1200和Sysmex的Poch机型，其中Abbott是双鞘结构，Sysmex为单鞘结构。而且Sysmex的WBC还是负压吸引，RBC/PLT是单鞘。事实证明，简化的鞘流技术运用并不成功。

这是双鞘电阻法示意图，后鞘相当于扫流。但这种结构对于鞘液和样品的层流湍流控制和保持很难，故障频发，直接导致计数结果问题。但这属于应用问题，原理上没有错误。

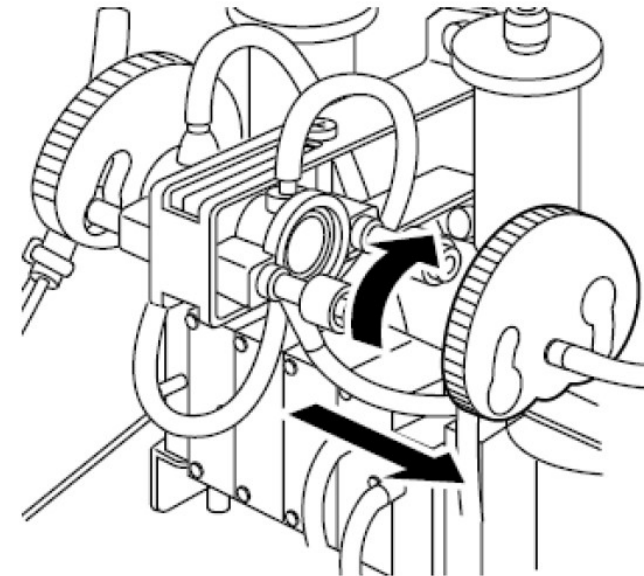
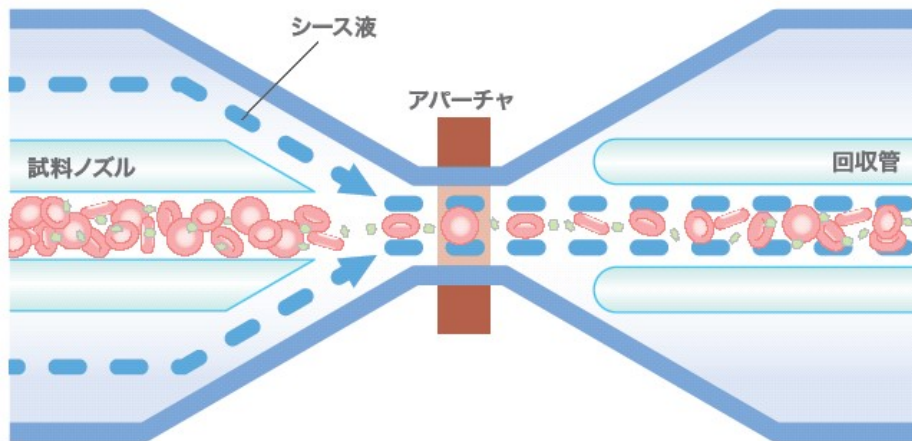
鞘流电阻法仍然是库尔特原理，仍然受专利约束。



由于Abbott的放弃，Sysmex转而把重新设计的单鞘技术推翻，优化五分类的鞘流技术，但不再运用到三分类当中，而是在五分类当中用作RBC/PLT计数。三分类当中还是采用负压吸引方式。

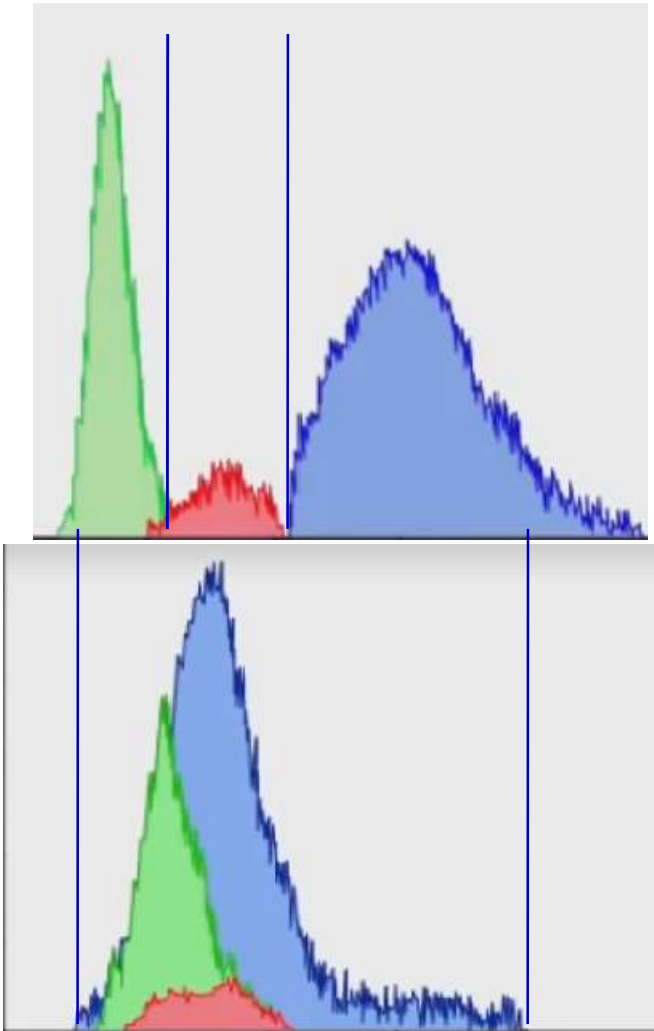
其它厂家无论是五分类还是三分类在细胞计数方面都采用负压吸引技术。

Sysmex的鞘流电阻法原理的计数池形状设计趋于合理。

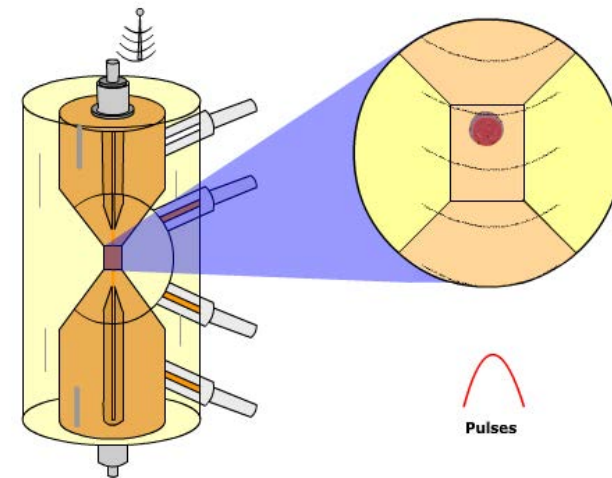
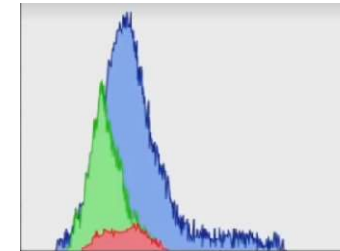


1.3 电阻法原理的延伸

由于恒流源电阻法有很强的局限型，只能对体积进行分群，并不能对准确的细胞类型进行区分，得出的结果往往不准确。所以，人们在想办法让电阻法得到更多的信息。

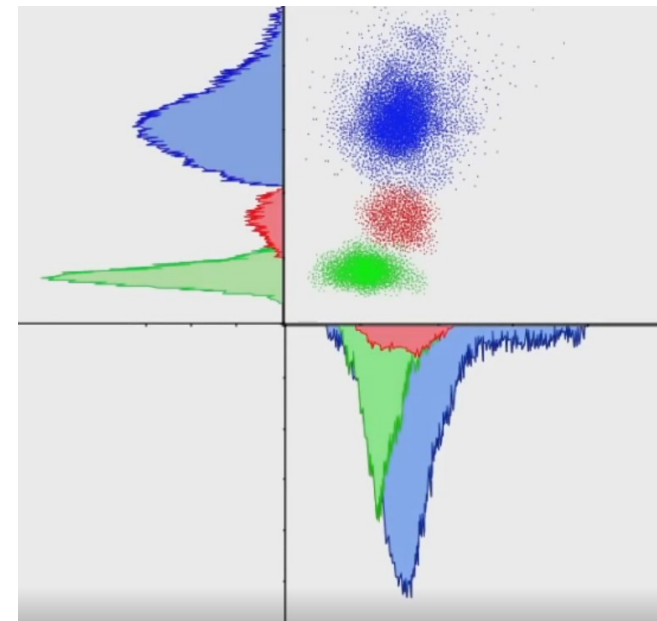
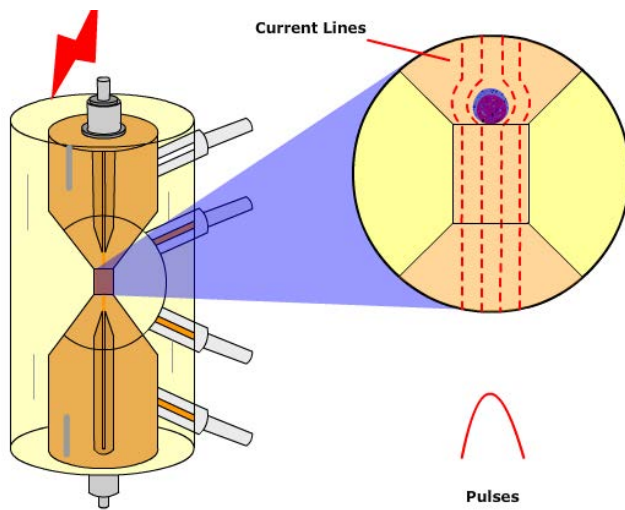
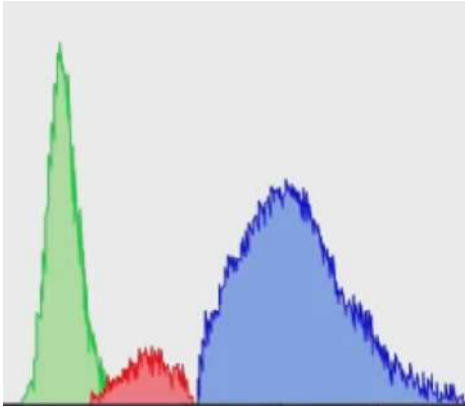


射频传导技术被引入到血细胞计数中，还是遵循库尔特原理，只不过在恒流源上叠加一个高频传导信号，高频经过细胞后，会穿透细胞膜，被粗糙复杂的细胞核阻挡，根据核型的复杂程度，其表现出来的脉冲型号不同，基本上呈正比关系。



在射频传导的同时恒流电阻法也在进行测试。

当一个细胞有两个信号参数时，就可以绘制出散点图，在散点图上就可以得到不用于直方图的信息，其结果更为准确。



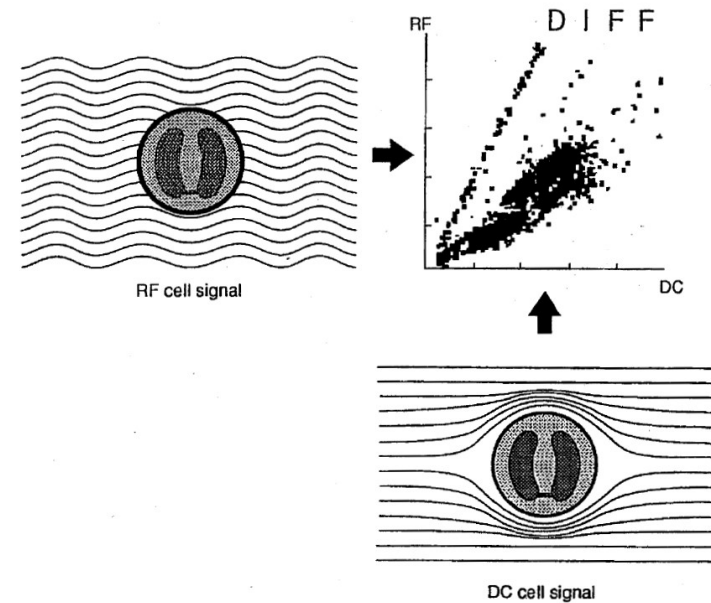
射频RF+恒流DC技术用来计数血细胞分析的首创还是库尔特，不过库尔特不仅仅使用RF+DC，还使用了光散射技术。

RF+DC的组合大规模运用还是在Sysmex。

在很多机型中，有IMI幼稚细胞参数，就是在单独的计数池内采用RF+DC的方式检测出来的。

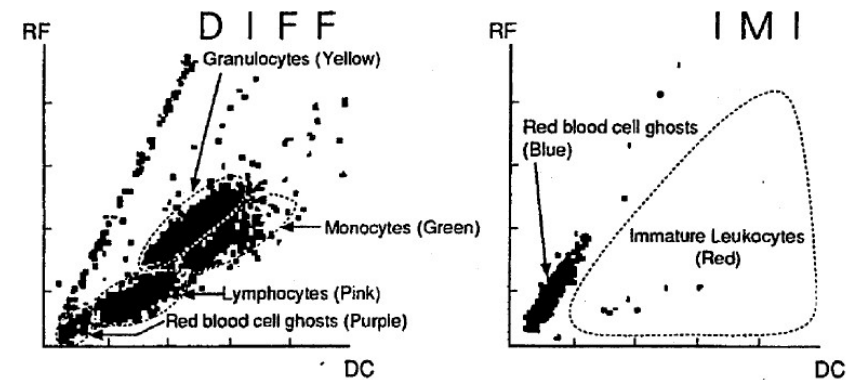
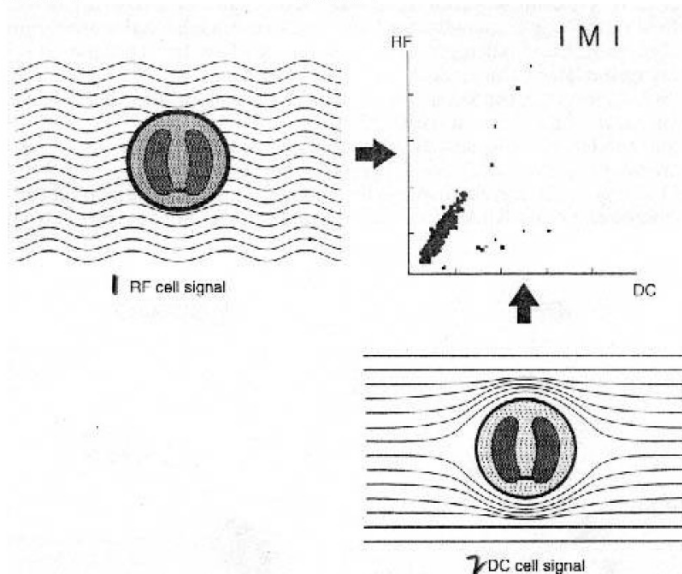
在Sysmex的众多机型中，SE系列是相当成功的纯电阻法五分类的机型，其充分运用了DC电阻法、RF+DC电阻法和鞘流电阻法，三种方法的组合运用，得出了全部五分类和IMI数据。

3分类
和IMI
采用
RF+DC

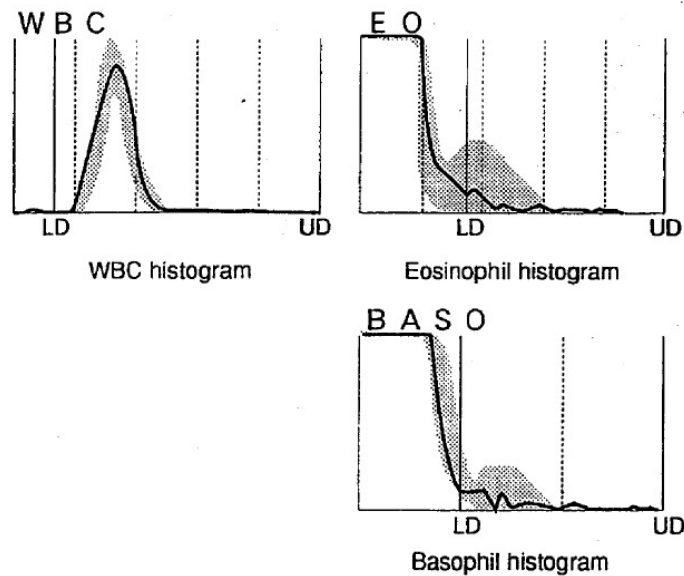


1- RF 细胞信号

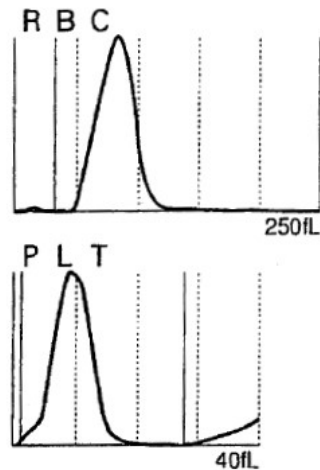
2- DC 细胞信号



通过细胞的特性采用特异性试剂用DC电阻法分出EO和BASO。



用鞘流电阻法分出RBC/PLT相关参数。



电阻法或者库尔特原理在血细胞计数方面的发挥到此基本上遇到瓶颈了，无法进一步拓展。在更精确的计数更准确的分型方面无法产生再大的突破。因此，需要一种全新的方法来解决这个瓶颈。

在经历了电容法、平推图像法之后，激光器的出现，让几乎所有人的目光都转向了光学散射法。

注：

所谓的三分类、五分类甚至六分类等血细胞分析仪的指标，其实是指针对WBC的参数而言。

当机器的WBC检测能提供除总数外的LYM、MON、GRA三个参数时，为三分类；除上述参数外还能提供EO、BASO时为五分类。

这是目前最主要的机型。过渡机型还有4分类，提供EO的计数。但仅提供百分比的不算。

在血细胞分析仪中其它的参数，比如RETIC网织红细胞、NRBC有核红细胞等不算分类，只算测试参数之一。往往高端的机型测试参数多。

CBC计数：Complete Blood Count全血细胞计数，在血细胞分析中指WBC、RBC、PLT、HGB、HCT（MCV）、PCT（MVP）、PDW、RDW这八项参数，或增加MCH、MCHC、LCR等形成十一项或十三项参数。

CBC+DIFF计数：表示能检测所有CBC参数和分类参数。

在三分类当中，一般没有CBC和DIFF的选择，所有参数一并出来。但在五分类中，可以单独做CBC参数，也可以CBC和DIFF一起测试，这是由于多检测通道的存在。

在五分类机型中，还可以选择CBC+DIFF+RET，或者CBC+DIFF+NRBC等等，目的都是有选择的进行参数测试。



2 光学散射法原理

光学散射法最早运用在流式细胞仪上，后来逐渐简化，运用到血细胞分析仪上。

光学散射法运用到的主要技术有：

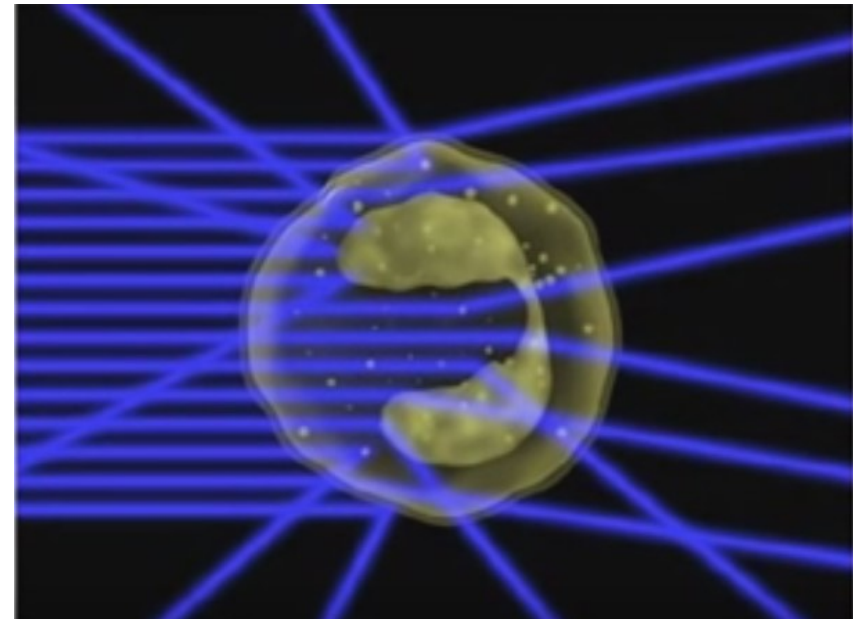
鞘流技术
光电转换技术

为了获得更多的更准确的参数，或者其它考虑，在光学散射法中还加入了DC电阻法、RF射频传导等技术。

在鞘流技术的运用上，分为双鞘和单鞘两种模式。

光学散射法原理：

细胞经过光线照射后，细胞形态不同，光线会出现各种散射情况。一般取前向散射光（正对激光束的接收端）和侧向散射光（与激光束呈90度角，正对细胞通路的接收端）两种散射光进行取样。



前向散射光:

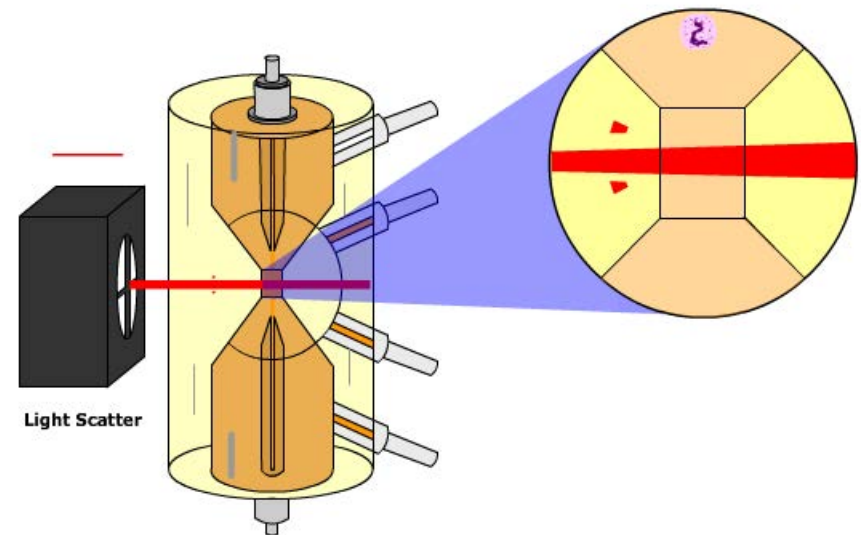
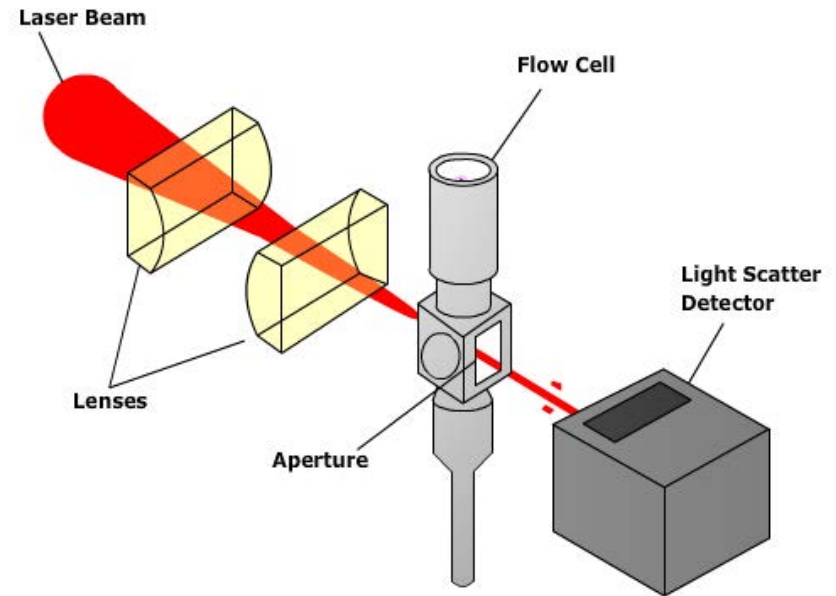
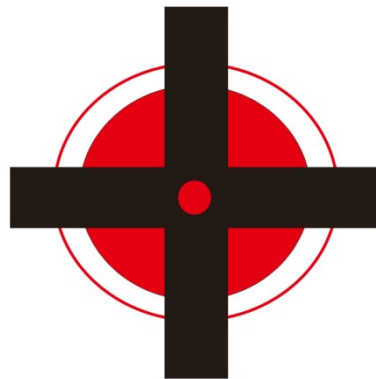
当光束通过细胞时，细胞核会阻挡部分光束，前向散射光接收器的接收面其实是四周接收到光信号，中心是没有光信号的。

而在没有细胞核的细胞中，细胞膜的阻光作用，会形成接收器四周的信号远远低于或高于中心的信号，这样会造成信号判断的错误。

因此，前向散射光接收最好不要接收中心区域的光束，这就需要对光束形状和接收角度做出调整。



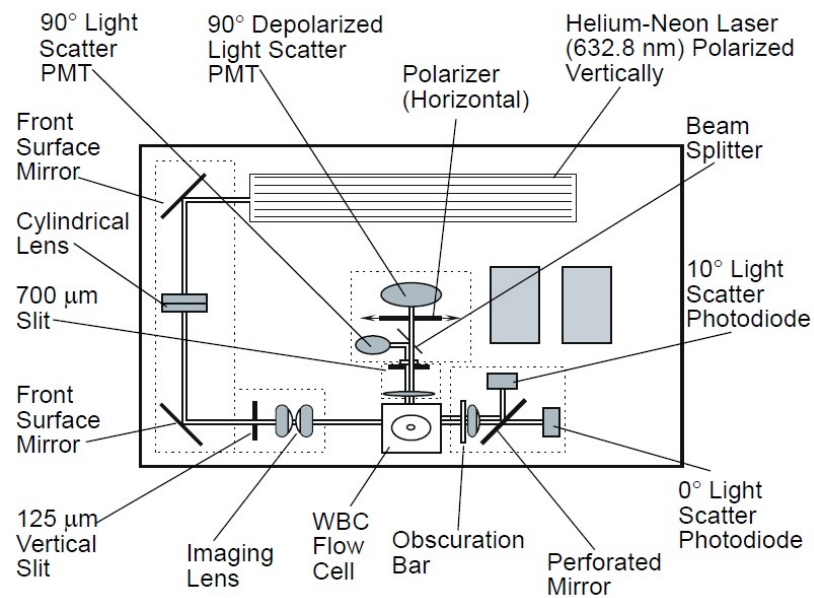
中心光束的去除，可以在接收器上想办法进行遮挡，也可以在光路增加阻挡器吸收掉。



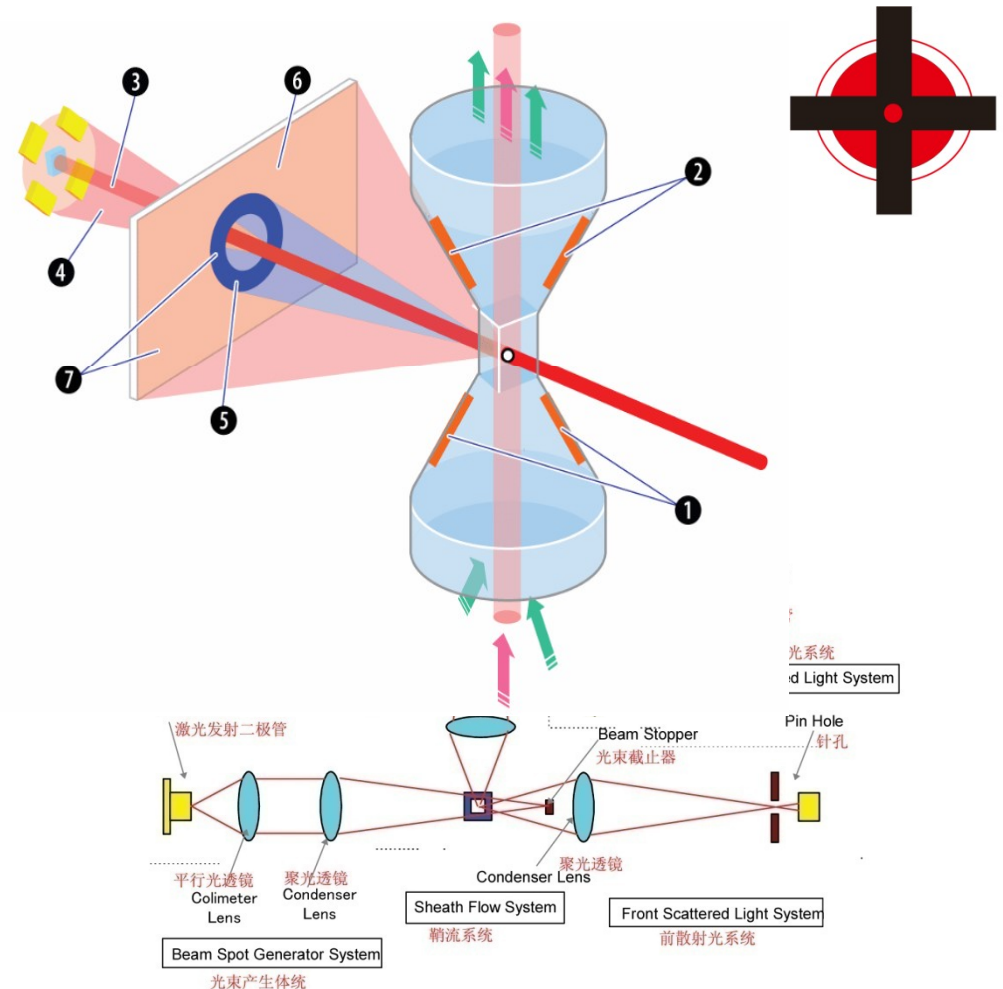
前向散射光主要用来检测细胞的体积，等同电阻法。发散的光束夹角一般分为低角度和高角度。低角度前向散射光大约 7° 以内，反应体积信息，高角度前向散射光大约 8° 以上，反应细胞的内部信息，比如分叶、细胞质颗粒是否存在等。

因此，一个单纯的前向散射光就会得到两组细胞信息，它自己就可以组成一张散点图。但这种做法对于激光束和接收器的要求和设计、取样都很困难。

这种结构在Abbott上采用。



为了简化这种结构，在前向散射光接收器上增加一个透镜。中间区域不透光，用来抵消中心点的信号，其余信息被聚焦到接收管上，这个夹角范围很大，大约是为 $10^\circ - 70^\circ$ 之间。采用这种结构的有库尔特、Sysmex等，不过库尔特采用十字透镜，Sysmex采用阻挡器。



侧向散射光:

由于是与光路成 90° ，所以不需要中心阻挡器。侧向散射光主要对细胞膜，胞质、核膜的变化更为敏感，所以某种意义上讲，侧向散射光与前向高角度散射光的功能相同。

侧向散射光的信号较弱，所以在光路元件和接收及放大元件上考虑较多。

侧向散射荧光:

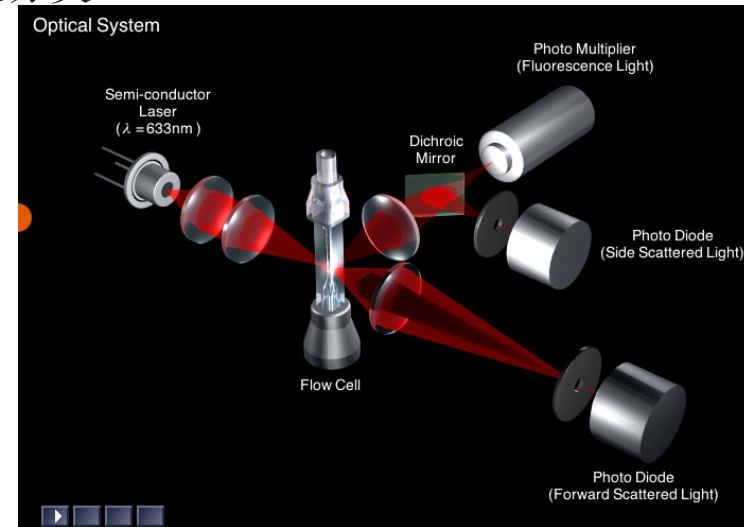
由于激光器的采用，对某些细胞进行特异型荧光染色，通过激光激发荧光，在侧向接收荧光信号，这样又增加了一个细胞信息。

侧向散射光和侧向散射荧光接收的是同一束散射光，通过分光镜进行分离，同时检测。一般采用与光轴呈 45° 放置的双色镜。二者波长不同。

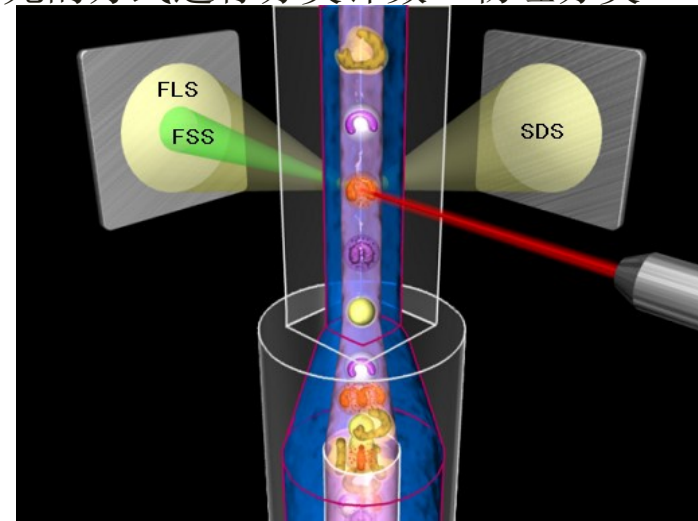
库尔特由于采用VCS技术（电阻、射频、光学）进行五分类检测，所以光路只有一个前向散射光接收。属于物理分类。

Horiba-ABX由于采用电阻和光学技术，所以它的光路也只有一个前向散射光接收。属于染色分类。

Sysmex采用一路前向散射光，一个侧向散射光 and 一路侧向散射荧光的方式进行分类计数。染色分类。



NihonKohden采用高低角度前向散射光和侧向散射光的方式进行分类计数。物理分类。

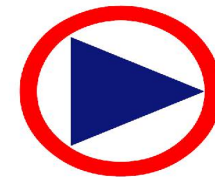


而Abbott采用了两路前向散射光（高低角度）和两路侧向散射光（侧向散射光和侧向偏振光），多达四路的光路接收系统，也是物理分类。

由上述可以知道，大多数五分类血细胞分析仪都采用一个细胞最少2组信号，多的有四组信号的分析方法，因此它们都能提供散点图，个别仪器还能提供立体图，比如库尔特和Abbott等。

除Sysmex外，其余各机型（仅指Beckman-Coulter、Horiba-ABX、Abbott、NihonKohden）都需要电阻法进行WBC总数的测量或辅助，鞘流得到的信号仅用来分类和验证总数。

由于鞘流技术最早应用与流式细胞仪，血细胞分析的运用也是从流式细胞仪而来，因此下面的视频将以流式细胞仪为例，演示鞘流细胞计数的过程和原理。

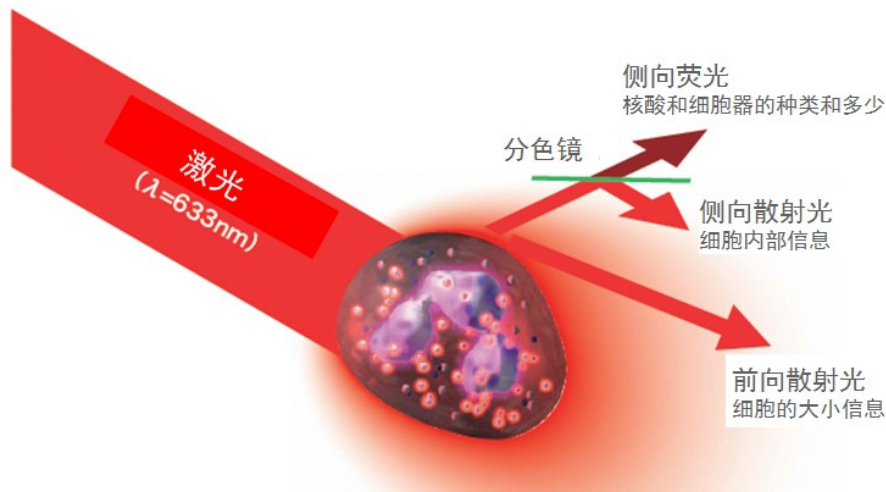


点击播放演示

在鞘流方式中，特殊情况下细胞重叠不能完全避免，这时一般通过荧光面积和宽度阈值进行抑制。由于鞘流方式采集细胞数很多，数千到上万，因此个把信号的滤除不影响整体计数。

在Sysmex机型中，采用的单鞘流方式，鞘液采用稀释液。

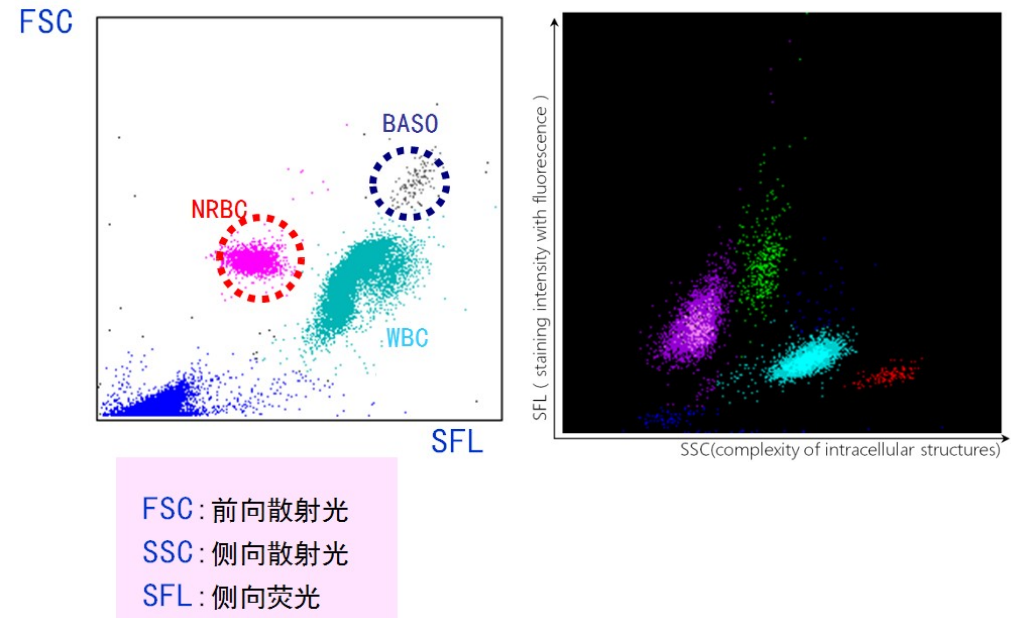
三路光学信号并不能一次将五分类信息确认，所以采用了双通道技术，即WBC/BASO一个通道（物理分类），DIFF一个通道（染色染色），分别进行光路计数。因此，Sysmex的WBC分类有两张散点图。



三个信号数据用于绘制散点图时，只是用其中的两个。

前向散射光作为主要的总数计数参数，与其它两个信号数据做比较，而且应该相等，或在一定的范围内，否则会被认为是计数错误，结果被抑制。

举例说明此种常见的情况是：当气泡通过鞘流时，气泡体积会被前向散射光记录，但不会被侧向任何的散射光记录，因此这就产生一个差异，过多的气泡自然会导致错误。



血细胞计数的开山鼻祖库尔特针对鞘流计数采用的是VCS技术。

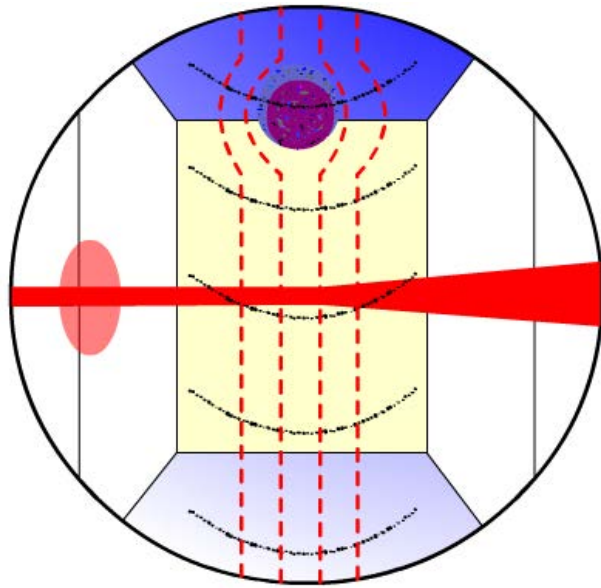
V是恒流DC电阻法，用来测量体积；

C是高频传导RF法。用来探测核型，与细胞大小无关。

S是激光，用来检测细胞内部颗粒特性，接收角度范围是 $10^{\circ} - 70^{\circ}$ 。

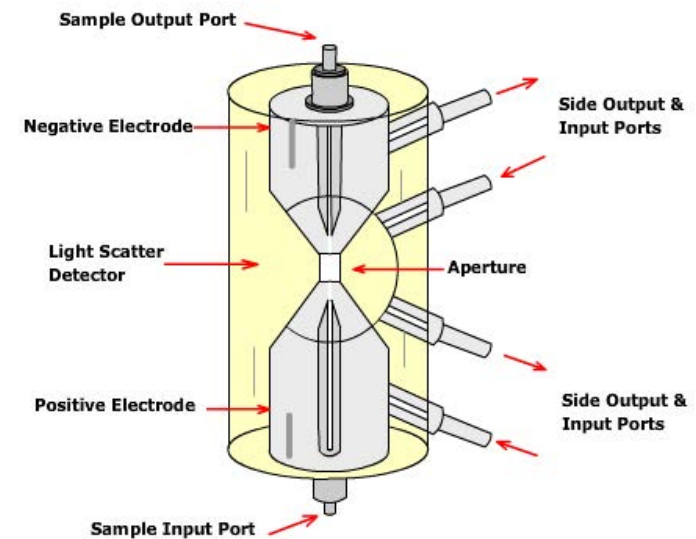
VCS是运用三种独立的能量探针来分析细胞，而且宁死不放弃开山法宝库尔特原理。

但是在一个鞘流池上，叠加三种方法，也是独创。

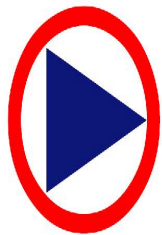
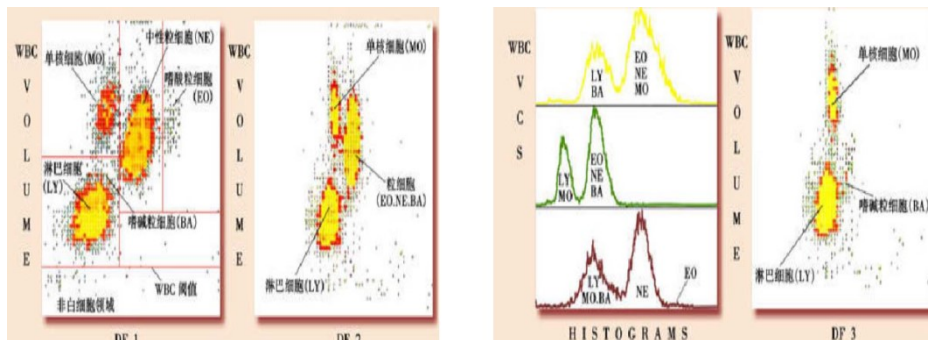


库尔特的鞘流池采用双鞘结构，前鞘进行样品喷射，经过小孔时进行电阻和射频以及光学计数，通过小孔的后鞘类似扫流。

VCS之间的值进行比对，举例等同上页的气泡。除三者比对外，库尔特还利用三孔电阻法进行WBC总数的测试，与VCS再次进行比对，确保准确可靠。



库尔特的WBC散点图是三张，都是自三维图中选择不同角度呈现的，同时还有VCS三个信号的直方图。



点击播放演示

除了VCS三个参数外，还有引申参数：

OP：不透光度，根据RF和S的比率计算，作为放弃细胞计数的依据，更好的判断细胞内容物。 $OP \approx RF/DC$

RLS：旋转吸光度，S对数值与DC的比率计算。作为放弃细胞计数的依据，更好的判断DIFF细胞内容物。 $RLS \approx \log_{10}(S)/DC$

LLS：线性吸光度，S值与DC的比率计算。作为放弃细胞计数的依据，更好的判断RETIC网织红细胞内容物。 $LLS \approx S/DC$

三个引申参数作为三维图和二维图的坐标轴。

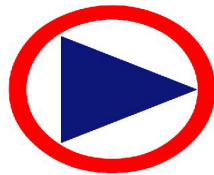
在三维图中，X轴是DC值V（绿色轴），Y轴是RLS值（或LLS值，用于RETIC网织红细胞测定，红色轴），Z轴是OP值（蓝色轴）。

在二维散点图中，Y轴都是DC值，也就是体积，X轴根据不同的角度可以是RF、RLS和LLS中的一个。

而Horiba-ABX的五分类血细胞计数仪中，也是采用双鞘，不过布局是内外鞘结构。

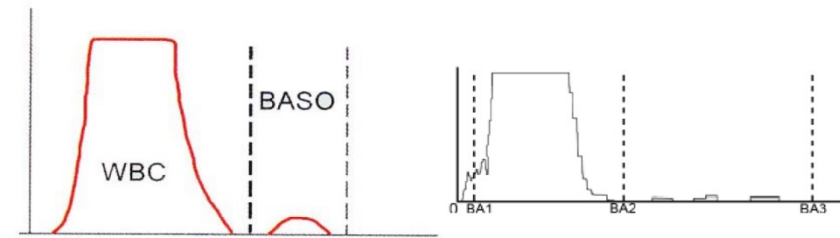
内鞘保护样品通过小孔，进行体积测定，之后外鞘继续保护样品进过光路检测吸光度，顺便扫流。

这种结构会造成光学和电阻检测有一个延时，这个延时被厂家假设在一个范围内。同样二者还有一个比对，鞘流电阻和鞘流光学相比较，确认是否是干扰气泡之类的问题，超过一定的范围会旗标提示。



点击播放演示

同时，在演示中我们只发现四个分类群，缺少嗜碱细胞BASO。因此，此类机型也是WBC双通道计数，在常规电阻法通道进行WBC和BASO的计数。电阻通道和鞘流的两个通道计数只相互比较，确保计数准确。



Horiba-ABX的WBC有一个直方图和一个散点图可以报告，隐含一个鞘流电阻的直方图。

Horiba-ABX的鞘流方案最大的不同是光源是卤素灯，价格低廉，容易实现。细胞染色后通过卤素光源在接收器上得到的吸光度值，与手工涂片镜检相似。

在WBC计数和分类中，分类值可以由散点图数出绝对值再计算得出百分比，也可以反之。

五分类的主要参数有：

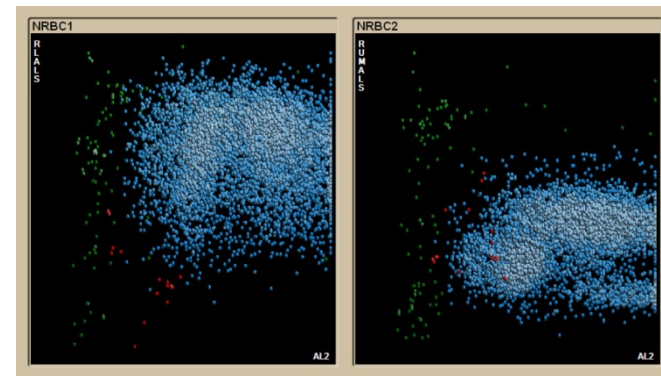
中性细胞GRA%/#

淋巴细胞LYM%/#

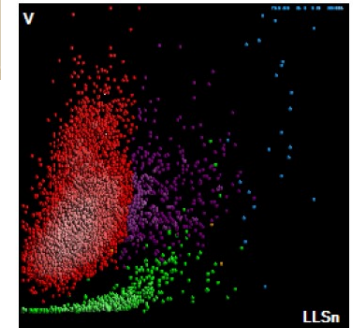
单核细胞MON%/#

嗜酸细胞EO%/#

嗜碱细胞BASO%/#



库尔特的有核红细胞和网织红细胞



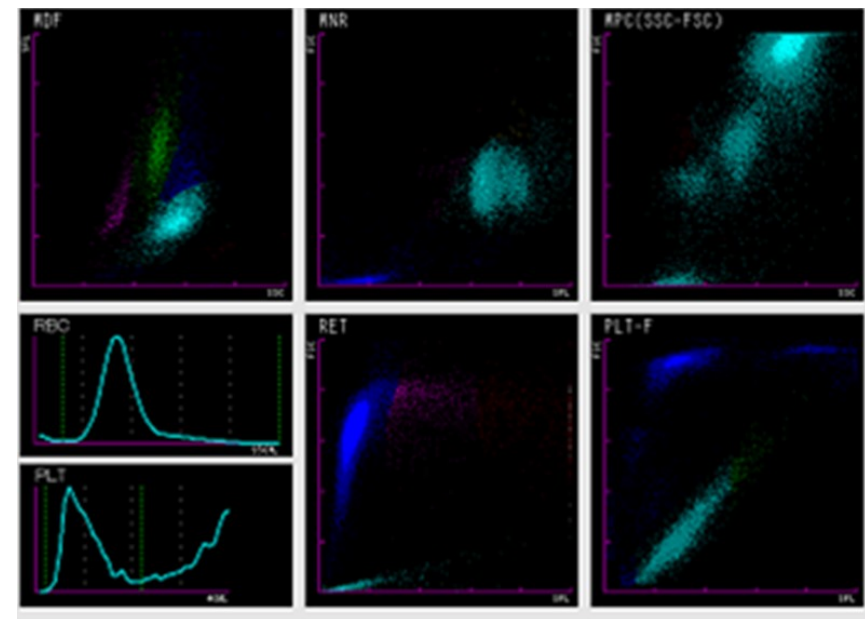
Sysmex的全图

由于光路和鞘流池的存在，特别是多光路或多检测手段的实现，所以不仅仅可以检测WBC参数，与细胞有关的参数几乎都可以进行检测，前提是有试剂支持。

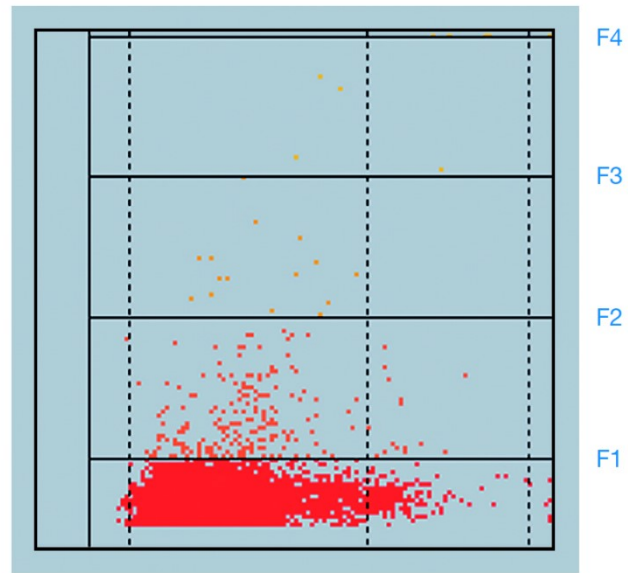
几乎所有五分类厂家的产品，都可以采用鞘流计数进行RETIC、NRBC的测试，有些还能检测幼稚细胞、光学血小板等等参数。

这也就是很多大型机的测试参数多达数十个，研究参数则更多。

还有用单克隆抗体标记特异性细胞进行计数，逐步往流式细胞仪方向靠拢。



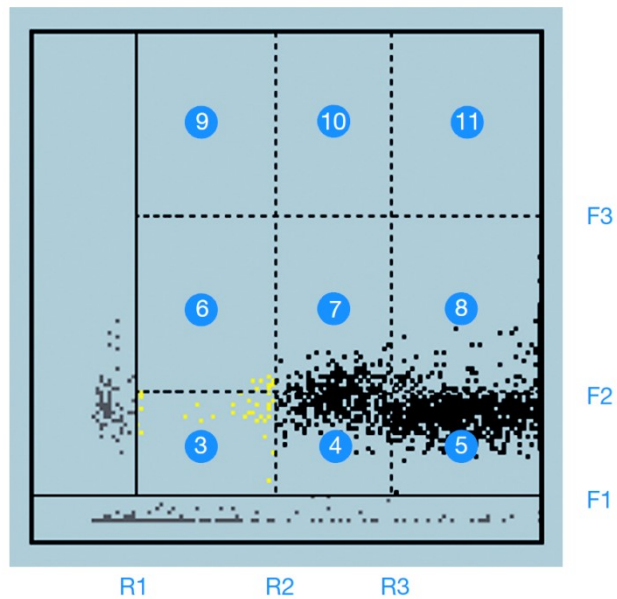
Horiba-ABX的RETIC、NRBC及DIFF图



R1 R2

R3

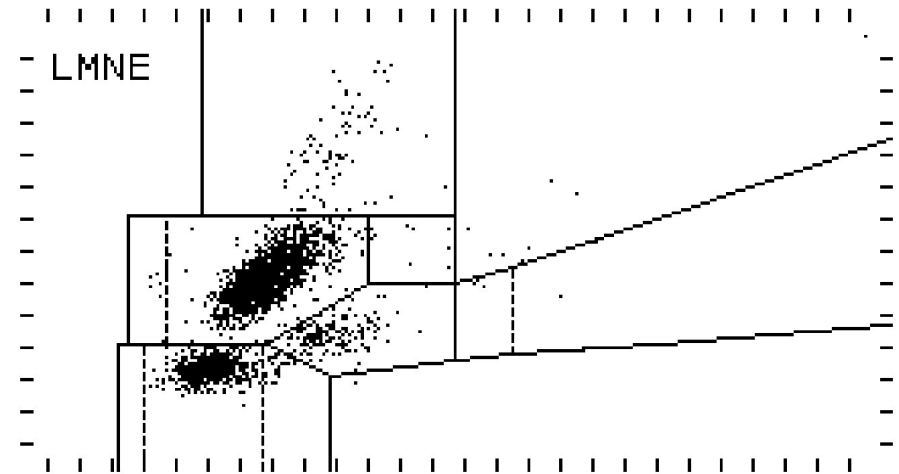
R4



R1

R2

R3



Horiba-ABX和Siemens Advia2120机型一样，无法用同一套光源和鞘流进行RETIC和NRBC的测定，因此有两套光源和鞘流系统。

五分类血细胞分析的试剂:

除三分类用的稀释液、溶血剂和清洗剂外，五分类由于检测项目众多，检测通道也很多，所以相应的试剂也就会很多。

大部分机型的鞘液借用的是稀释液，也有采用专门鞘液的机型。

在WBC计数方面，物理分类的机型试剂较少，一般只需要溶血后就可以直接上鞘流检测，也有机型需要缓冲固定终止溶血反应在上鞘流。

染色分类的试剂较多，以Sysmex为代表的机型是先进行溶血，溶解RBC/PLT，让WBC穿孔，然后再加入染液进入WBC内部染色，这个过程染液用量很少，速度极快，但成分的选择非常困难。以Horiba-ABX为代表的机型是先进行染色，同时涨破RBC/PLT，WBC得到充盈。染色结束后，需要加入缓冲液终止反应，并洗掉多余的染料。这个过程速度慢，试剂染料用量大。二者在结果方面各有千秋，特别是特异性标本的识别和判读方面存在明显的差异。

RETIC检测方面，几乎都是专用的稀释液、染液等。

在IMI、NRBC检测方面，有采用单独的溶血剂和染液的，也有与WBC采用相同试剂一个通道检测出来的。

为了对血小板进行准确的计数，很多厂家采用了血小板充盈方法，使其球形化，还有的采用单抗表达方法。计数手段方便除传统的库尔特原理外，鞘流光学检测也是选项之一，这样的结果一般称为光学血小板。这类试剂也是单独的。

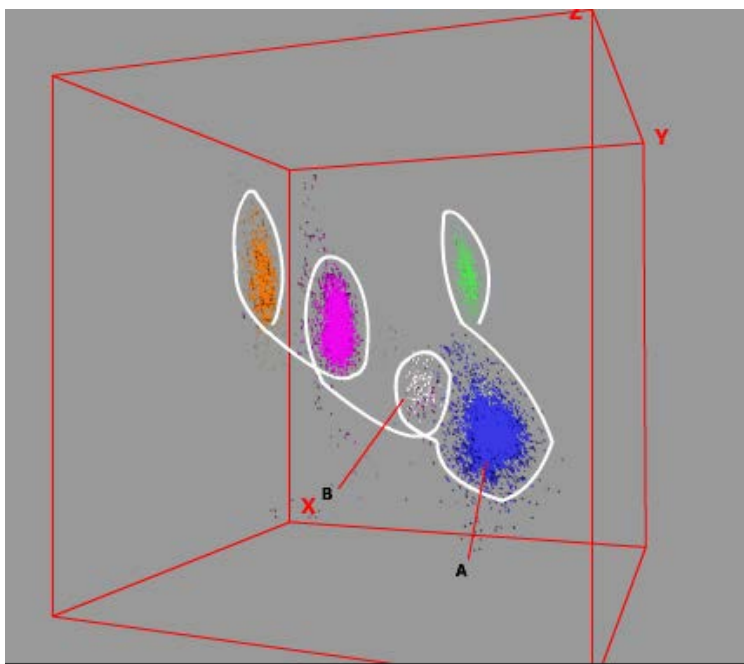
五分类的试剂少则三四种，多则十几种，都与检测项目的多少有直接的关系。

散点图的识别:

由于散点图过于凌乱，固定界面识别困难，再加上有些立体图，在空间坐标采用固定界标更是困难，所以大部分厂家都采用“浮动界标”技术。

这里指的“浮动界标”是指通过软件算法自动识别分群区的峰值区，通过灵敏度增益等参数进行辅助判读，将同区散点归类识别计数。

下面两个演示可以看出三维图在异常散点图中分类的明显优势。此类异常图形在二维图中是无法进行分类的。

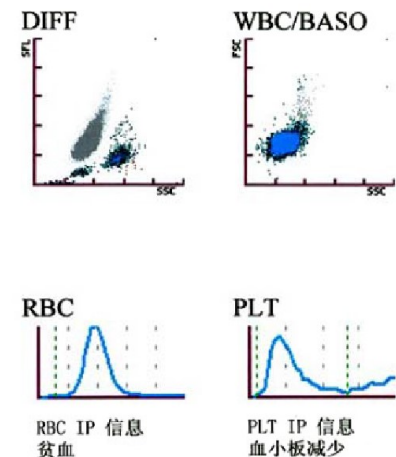


WBC	154.23 *	[10 ⁹ /L]		
RBC	2.30 -	[10 ¹² /L]		
HGB	68 -	[g/L]		
HCT	22.4 -	[%]		
MCV	97.4	[fL]		
MCH	29.6	[pg]		
MCHC	304 -	[g/L]		
PLT	41 -	[10 ⁹ /L]		
RDW-SD	60.0 +	[fL]		
RDW-CV	17.9 +	[%]		
PDW	12.6	[fL]		
MPV	10.3	[fL]		
P-LCR	27.2	[%]		
PCT	0.04 -	[%]		
NEUT	---	[10 ⁹ /L]	---	[%]
LYMPH	---	[10 ⁹ /L]	---	[%]
MONO	---	[10 ⁹ /L]	---	[%]
EO	0.05 *	[10 ⁹ /L]	0.0 *	[%]
BASO	0.41 *	[10 ⁹ /L]	0.3 *	[%]

评语:
阳性
Diff. Morph.
Count

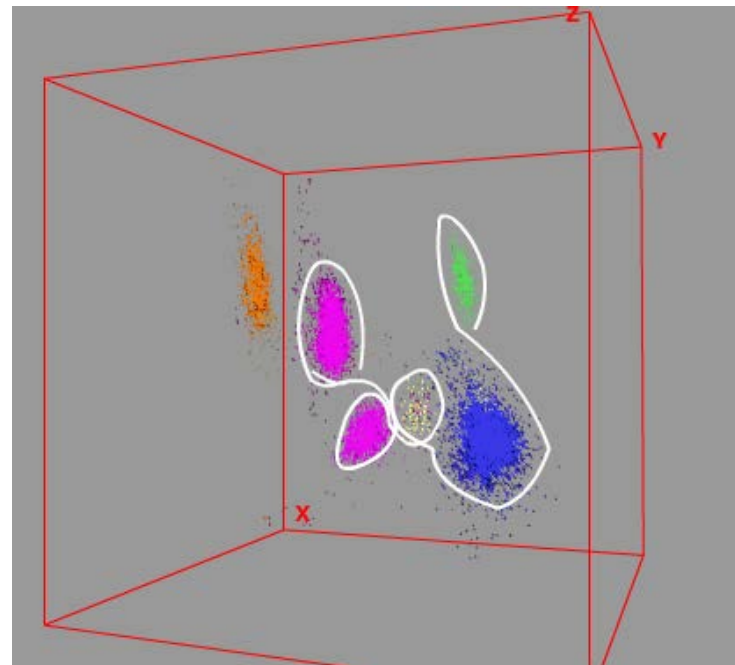
WBC IP 信息
白细胞异常散点图
嗜碱细胞增多
白细胞增多

原始细胞?
幼稚粒细胞?
有核红细胞?

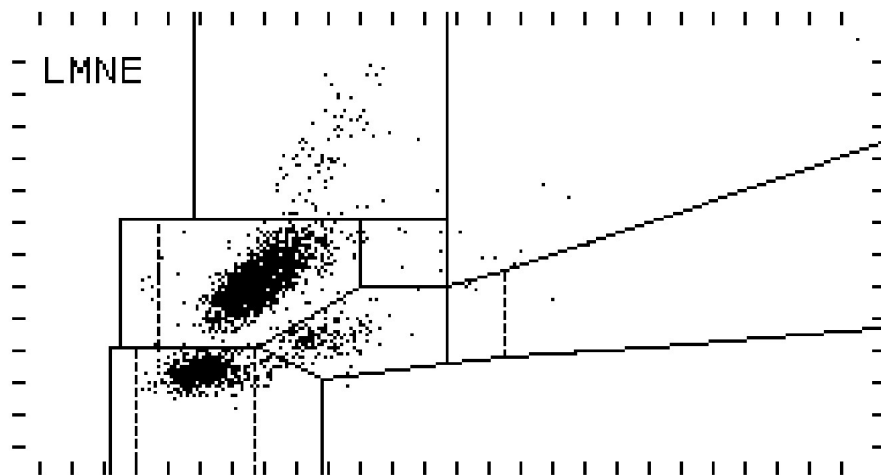


RBC IP 信息
贫血

PLT IP 信息
血小板减少



Horiba-ABX是为数不多的继续采用固定界标进行分类的厂家，这得益于其测试原理，电阻和吸光度的检测方法，加上试剂原理的准确运用，使各细胞形态基本上处于固定的区域中，因此可以很好的进行固定界标分群。但在LMNE图中的E0线段，却是浮动界标，这也是厂家不得已而为之。



End

但是，无论哪种方法和实现手段，都无法做到绝对准确，总有这样那样的不足。而临床的要求越来越高，漏诊误诊对患者的伤害太大。因此，血细胞分析仪一直作为筛查设备使用，并不作为确诊依据。为临床提供尽可能准确的参考，提醒医生采取多种手段进行确诊。

血细胞分析仪的基本原理大致就是这些，以后通过分厂家分机型进行进一步的详细介绍。毕竟每个型号每个厂家的实现原理并不相同。

yeec维修网



yeec维修网淘宝店铺



yeec维修网微信公众号



yeec维修网QQ群



yeec维修网站长QQ



yeec维修网站长微信



血细胞分析仪维修基础

本讲义归属权为原作者，由<http://www.yeec.com>压缩整理，未经许可不得传播或用于商业用途