



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1880942 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200610098740. 9

5-17 行.

(22) 申请日 2006. 07. 12

CN 1158997 A, 1997. 09. 10, 全文.

(30) 优先权数据

2005-203279 2005. 07. 12 JP

Robert F. Vogt et. al. Model System

Evaluating Flurescein-Labeled Microbeads as Internal Standards to Calibrate

(73) 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县神户市中央区脇浜海岸通
1 丁目 5 番 1 号 5-1

Fluorescence Intensity on Flow Cytometers. Cytometry 10. 1989, 10294-302.

审查员 金伟华

(72) 发明人 川手康德

(74) 专利代理机构 北京市安伦律师事务所

11339

代理人 刘良勇

(51) Int. Cl.

G01N 15/14 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5084394 A, 1992. 01. 28, 全文.

US 2003/0219850 A1, 2003. 11. 27, 全文.

WO 91/00509 A1, 1991. 01. 10, 第 13 页第

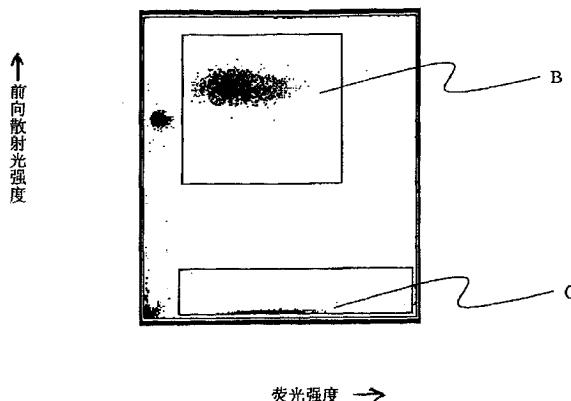
权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 6 页

(54) 发明名称

粒子分析仪用参照物

(57) 摘要

本发明提供一种可以检测出以往参照物无法检测出的粒子分析仪故障的参照物。上述参照物是粒子分析仪用参照物, 该粒子分析仪对生物试样中所含被测粒子用一定的色素进行荧光染色处理, 再对经荧光染色的被测粒子进行分析。参照物由经上述荧光染色处理的第一标准粒子和预先经染色制备的、可以显示一定荧光强度的第二标准粒子组成。本发明还提供用参照物推断粒子分析仪的异常部位的方法和装置。



1. 一种粒子分析仪用参照物,其特征在于:所述粒子分析仪对生物试样中所含被测粒子进行第一荧光色素的荧光染色处理,然后分析被荧光染色的被测粒子;所述参照物包括:

经所述荧光染色处理而用第一荧光色素荧光染色的、预先不含有荧光色素的第一标准粒子;及

预先含有第二荧光色素的、且实质上没有被所述第一荧光色素染色的第二标准粒子,所述第二荧光色素与第一荧光色素不同。

2. 根据权利要求1的一种粒子分析仪用参照物,其特征是:所述第一标准粒子被所述第一荧光色素染色,以显示与生物试样中所含第一被测粒子相近的荧光强度;

所述第二标准粒子显示与经所述第一荧光色素染色的试样中所含第二被测粒子相近的荧光强度。

3. 根据权利要求2的一种粒子分析仪用参照物,其特征是:

所述第一标准粒子显示与所述第一被测粒子相近的散射光强度,

所述第二标准粒子显示与所述第二被测粒子相近的散射光强度。

4. 根据权利要求2的一种粒子分析仪用参照物,其特征是:

所述生物试样为尿液;

所述第一被测粒子选自白血球、红血球、上皮细胞及管型体构成的群体;

所述第二被测粒子是微生物。

5. 根据权利要求1的一种粒子分析仪用参照物,其特征是:

所述第一标准粒子是选自以下粒子群中的至少一种粒子:醋酸乙烯基聚合物粒子、聚丙烯酰胺粒子、亲水的乙烯基聚合物粒子、胶乳粒子和二氧化硅粒子;

所述第二标准粒子是荧光胶乳粒子。

6. 根据权利要求1的一种粒子分析仪用参照物,其特征是:所述粒子分析仪包括以下部分:

将生物试样与所述第一荧光色素混合,制备测定试样的测定试样制备部分;

用光束照射测定试样的光源;

检测发自测定试样的荧光的荧光检测器。

7. 根据权利要求6的一种粒子分析仪用参照物,其特征是:所述粒子分析仪包括接受所述测定试样发出的散射光的散射光检测器。

8. 一种推断粒子分析仪异常部位的方法,所述粒子分析仪包括:用于混合生物试样和第一荧光色素以制备测定试样的测定试样制备部分、对测定试样进行光照的光源以及检测测定试样发出的荧光的荧光检测器,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

用所述粒子分析仪测定第一标准粒子和第二标准粒子,检测出与第一标准粒子相关的第一荧光的强度和与第二标准粒子相关的第二荧光的强度,其中所述第一标准粒子预先不含有荧光色素、被第一荧光色素荧光染色,所述第二标准粒子是预先含有与所述第一荧光色素不同的第二荧光色素、且实质上没有被所述第一荧光色素染色的粒子;

将所述第一荧光的强度与荧光强度的第一范围进行比较,取得第一比较结果;

将所述第二荧光的强度与荧光强度的第二范围进行比较,取得第二比较结果;

根据所述第二比较结果推断出光源或荧光检测器的故障;

根据所述第一比较结果和所述第二比较结果推断出试样制备部分的故障。

9. 根据权利要求 8 的推断粒子分析仪异常部位的方法,还包括步骤:将含有所述第一标准粒子和所述第二标准粒子的参照物与所述第一荧光色素混合,制备测定试样,再从制备出的测定试样中检测出与第一标准粒子相关的第一荧光的强度和与第二标准粒子相关的第二荧光的强度。

10. 根据权利要求 8 的推断粒子分析仪异常部位的方法,还包括步骤:

将含有所述第一标准粒子的第一参照物与所述第一荧光色素混合,制备第一测定试样,从制备出的第一测定试样中检测出与第一标准粒子相关的第一荧光的强度;

从含有所述第二标准粒子的第二参照物中制备第二测定试样,从制备出的第二测定试样中检测出与第二标准粒子相关的第二荧光的强度。

11. 一种粒子分析仪,其特征在于:包括以下部分:

测定试样制备部分:将含有第一标准粒子和第二标准粒子的参照物与第一荧光色素混合,制备测定试样,其中所述第一标准粒子预先不含有荧光色素、被所述第一荧光色素染色,所述第二标准粒子是一种预先含有与第一荧光色素不同的第二荧光色素、且实质上没有被所述第一荧光色素染色的粒子;

光源:用光束照射所述测定试样;

荧光检测器:用于检测与测定试样中的第一标准粒子相关的第一荧光的强度和与测定试样中的第二标准粒子相关的第二荧光的强度;

分析部分:比较所述第一荧光的强度和荧光强度的第一范围,获得第一比较结果,以及比较所述第二荧光的强度和荧光强度的第二范围,获得第二比较结果,并根据所述第二比较结果,推断光源或荧光检测器的故障,以及根据所述第一比较结果和所述第二比较结果,推断测定试样制备部分的故障。

12. 根据权利要求 11 的粒子分析仪,包括:

散射光检测器:用于检测与所述测定试样中的第一标准粒子相关的第一散射光和与所述测定试样中的第二标准粒子相关的第二散射光;

所述分析部分根据第一散射光检测结果和第二散射光检测结果,推断光源或散射光检测器的故障。

13. 一种粒子分析仪,其特征在于:包括以下部分:

测定试样制备部分:将含有第一标准粒子的第一参照物与第一荧光色素混合,制备出第一测定试样,从含有第二标准粒子的第二参照物中制备第二测定试样,其中所述第一标准粒子预先不含有荧光色素、被所述第一荧光色素染色,所述第二标准粒子是一种预先含有与第一荧光色素不同的第二荧光色素、且实质上没有被所述第一荧光色素染色的粒子;

光源:用光束照射所述第一和第二测定试样;

荧光检测器:检测与所述第一测定试样中的第一标准粒子相关的第一荧光的强度,检测与所述第二测定试样中的第二标准粒子相关的第二荧光的强度;

分析部分:比较所述第一荧光的强度和荧光强度的第一范围,获得第一比较结果,以及比较所述第二荧光的强度和荧光强度的第二范围,获得第二比较结果,并根据所述第二比较结果,推断光源或荧光检测器的故障,以及根据所述第一比较结果和所述第二比较结果,推断测定试样制备部分的故障。

14. 根据权利要求 13 的粒子分析仪,包括:

散射光检测器:用于检测与所述第一测定试样中的第一标准粒子相关的第一散射光和与所述第二测定试样中的第二标准粒子相关的第二散射光;

所述分析部分根据第一散射光检测结果和第二散射光检测结果,推断光源或散射光检测器的故障。

粒子分析仪用参照物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于粒子分析仪精度管理等的粒子分析仪用参照物。

背景技术

[0002] 众所周知,粒子分析仪是用荧光色素对尿液和血液等生物试样中的粒子染色,再用光束照射粒子,通过测定粒子发出的荧光和前方散射光来对粒子进行分类和计数的。

[0003] 这种粒子分析仪必须随时进行精度管理,以获取正确的检测结果。即当用粒子分析仪检测精度管理用参照物得不到正确的检测值时,必须校正粒子分析仪使参照物的检测值达到所规定的范围。

[0004] 美国专利 No. 5, 888, 823 中描述的标准液为流式细胞仪使用的,该检查仪包括对尿液中含有的有形成份用色素进行荧光染色处理的测定试样制备部分和从荧光染色后的有形成份中检测出荧光的荧光检测器。这个标准液中含有标准粒子。标准粒子经荧光染色处理可以显示出与被测有形成份同样的荧光强度。一旦流式细胞仪的测定试样制备部分发生问题,无法正常染色时,通过测定上述标准粒子即可检出染色设备异常。

[0005] 用美国专利 No. 5, 888, 823 中描述的标准液对粒子分析仪进行精度管理的话,得出的测定值(荧光强度)如果在所规定的范围之外,可以通过调整荧光检测器的感光度来校正,以得出适当的测定值。

[0006] 但是,美国专利 No. 5, 888, 823 对于用粒子分析仪测定参照物以检查出装置的异常部位没有任何描述。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供可以推断出粒子分析仪的异常部位的参照物。同时,本发明还提供可以用参照物推断粒子分析仪异常部位的方法及装置。

[0008] 即,本发明提供对生物试样中所含被测粒子用色素进行荧光染色处理、再分析经荧光染色的被测粒子的粒子分析仪用参照物,提供含有以下第一标准粒子和第二标准粒子的参照物。

[0009] • 经前述荧光染色处理染色的第一标准粒子。

[0010] • 预先制备成含有一定荧光色素(predetermined fluorescencedye)的第二标准粒子。

[0011] 同时,本发明提供推断粒子分析仪异常部位的方法。该粒子分析仪包括:将生物试样与第一荧光色素混合、制备测定试样的测定试样制备部分;用于照射测定试样的光源及用于检测试样发出的荧光的荧光检测器。提供包括以下步骤(a)及步骤(b)的方法。

[0012] • 步骤(a):用上述粒子分析仪测定第一标准粒子和第二标准粒子,检测出与第一标准粒子相关的第一荧光和与第二标准粒子相关的第二荧光。上述第一标准粒子被上述第一荧光色素染色,上述第二标准粒子是预先含有第二荧光色素的粒子。

[0013] • 步骤(b):根据前述(a)步骤中得到的第一荧光的检测结果和第二荧光的检测结

果推断粒子分析仪的异常部位。

[0014] 另外,本发明提供包括以下部分的粒子分析仪。

[0015] • 测定试样制备部分:将含有第一标准粒子和第二标准粒子的参照物与第一荧光色素混合,制备测定试样。上述第一标准粒子被该第一荧光色素染色,上述第二标准粒子是已含有第二荧光色素的粒子。

[0016] • 光源:对上述测定试样进行光照。

[0017] • 检测部分:检测与上述测定试样中所含的第一标准粒子相关的第一荧光和与第二标准粒子相关的第二荧光。

[0018] • 分析部分:根据第一荧光的检测结果和第二荧光的检测结果推断粒子分析仪的异常部位。

附图说明

[0019] 【图 1】尿液有形成份分析仪外观示意图。

[0020] 【图 2】尿液有形成份分析仪的内部结构概略图。

[0021] 【图 3】尿液有形成份分析仪的检测单元的流式细胞仪的说明图。

[0022] 【图 4】尿液有形成份分析仪细菌测定结果显示图。

[0023] 【图 5】尿液有形成份分析仪白血球测定结果显示图。

[0024] 【图 6】尿液有形成份分析仪在本发明实施形式下的细菌用标准粒子的测定结果显示图。

[0025] 【图 7】尿液有形成份分析仪在本发明实施形式下的白血球用标准粒子测定结果显示图。

[0026] 【图 8】显示尿液有形成份分析仪推断异常部位的流程图。

[0027] 【图 9】显示尿液有形成份分析仪推断异常部位的流程图。

具体实施方式

[0028] 粒子分析仪用参照物是用于对生物试样中所含被测粒子进行色素荧光染色处理、再对染色后的被测粒子进行分析的粒子分析仪的参照物,其包括经上述荧光染色处理的第一标准粒子和事先制备有一定荧光色素的第二标准粒子。上述第一标准粒子在粒子分析仪的荧光染色处理过程中被染色,显示出荧光的强度。与此相反,上述第二标准粒子实际上并未染色,本身已含有一定的荧光色素,故可显示出一定的荧光强度。

[0029] 用粒子分析仪测定上述参照物时,因可以分别检测出具有不同特性的第一和第二标准粒子的各检测值,从而使检测装置故障比以往更精确。具体来说,就是可以判断出粒子分析仪发生异常的部位。据此可以在校对装置时对需要校对的设备等进行准确的维修,防患于未然。

[0030] 用于粒子分析仪精度管理的具有染色性能的第一标准粒子优选测定时使用色素染色时可以染成发出与生物试样中的被测粒子同等强度荧光的粒子。而实际上不具染色性、但能发荧光的第二标准粒子优选以适当方法预先制备成含荧光色素、可以发出与生物试样中的被测粒子同等强度荧光的粒子。

[0031] 下面对本实施方式的参照物进行说明,但本发明并不限于这一实施方式。

[0032] 本实施方式的参照物用于分析生物试样中所含粒子的粒子分析仪的精度管理与校正。参照物含有经荧光染色处理染色的第一标准粒子和预先制备为含一定荧光色素的第二标准粒子。上述第二标准粒子因含有一定的荧光色素,故可以显示出一定的荧光强度。

[0033] 作为本实施方式的标准粒子所适用的粒子分析仪有诸如血液分析仪(analyzer for analyzing blood cell)、尿液有形成份(尿液沉渣)分析仪(analyzer for analyzing particle components in urea)等分析仪,这些分析仪具有用荧光色素对尿液和血液等生物试样染色、制备测定试样的测定试样制备系统,将制备好的测定试样提供给流式细胞仪,用光束照射通过流式细胞仪的测定试样中的粒子,再用荧光检测器检测并分析被染色粒子发出的荧光。

[0034] 下面以本实施方式的标准粒子适用的粒子分析仪之一尿液有形成份分析仪为例进行说明。此尿液有形成份分析仪可以测定尿液中所含粒子白血球、红血球、上皮细胞、管型体(cylinder)和细菌。该装置特别提高了对被测粒子中微小细菌的测定精度,针对细菌使用细菌测定用稀释液和细菌测定用染色液,对于其他四种粒子(白血球、红血球、上皮细胞、管型体)使用四粒子测定用稀释液和染色液进行测定。下面把四粒子测定用稀释液称为第一稀释液,把四粒子测定用染色液称为第一染色液,细菌测定用稀释液称为第二稀释液,细菌测定用染色液称为第二染色液。

[0035] 图1是尿液有形成份分析仪的外观示意图。该尿液有形成份分析仪有仪器本体1、激光电源2和空压源3。仪器本体1包括:电源开关4、移送装有尿样的样品管(sample tube)自动输送到吸滤器5的输送单元6、从样品管抽吸尿液的吸滤器5、启动吸滤器5的开关7和供使用者进行操作输入、同时显示尿液分析结果等信息的触摸屏式液晶显示面板8。

[0036] 分析仪本体1如图2所示,有试样制备部分11、检测部分41、分析部分56。试管14中的生物试样(尿液)被注射泵15抽入吸管16。抽入的生物试样用样品阀17定量,分别供给反应室18和19。也就是说,同一生物试样源要定量注入不同的反应室18、19。容纳第二稀释液(细菌用稀释液)的容器20和容纳第二染色液(细菌用染色液)的容器21与反应室18连接,第二稀释液和第二染色液分别被注射泵22、23通过软管定量输送到反应室18。容纳第一稀释液(四粒子用稀释液)的容器24和容纳第一染色液(四粒子用染色液)的容器25与反应室19连接,第一稀释液和第一染色液分别被注射泵26、27通过软管定量输送到反应室19,制备四粒子测定试样(以下称:测定试样A)。

[0037] 检测部分41用于检测测定试样中所含各种粒子发出的荧光和散射光等光学信息,由流式细胞仪构成。

[0038] 流式细胞仪有:输送测定试样的流通池42、照射通过流通池42的测定试样的激光器47、接受测定试样中粒子发出的侧向荧光的光电倍增管52、接受前向散射光的发光二极管49。

[0039] 图3对流式细胞仪做了详细描述。如图2所示,反应室18和19与流通池42相接。测定试样通过的流通池42是激光照射的部分,有内径非常细的锐孔43、向上的锐孔喷射测定试样的喷嘴44、包裹液供给口45、废液口46。激光光源47是发射波长633nm激光的红色半导体激光器。检测部分41中有:将激光器发出的激光聚向流通池42的聚光镜48、用于接受被激光照射的测定试样中的粒子发出的前向散射光,并转换成电信号的发光二极管49、负责将前向散射光聚集到发光二极管49的集光镜50和小孔51、接受被激光照射的测定

试样的粒子发出的荧光,将其转换为电信号的光电倍增管 52、负责向光电倍增管汇聚荧光的集光镜 53、滤光器 54、小孔 55、将发光二极管 49 和光电倍增管 52 输出的电信号放大,作为前向散射光信号和荧光信号输出到分析部分 56 的放大器 57、58。一旦测定试样流入流通池 42,试样中所含的粒子就会横向截断激光器 47 发射的激光照射区域,每当这时,就会产生荧光和散射光。光电倍增管 52 和发光二极管 49 分别将侧向荧光和前向散射光接收,并进行光电转换,再将称作侧向荧光信号和前向散射光信号的光检测信号输送到分析部分 56。

[0040] 图 3 的分析部分 56 由放大检测部分 41 检测出的每个粒子的光检测信号并除去杂波的电路和由 CPU、ROM、RAM 等构成的计算机组成。分析部分 56 将存储检测部分 41 检测出的每个粒子的光检测信号,然后对存储的每个粒子的光检测信号进行分析,制出平面分布图,对测定试样中所含粒子计数,即可从光检测信号的脉冲峰值级得出信号强度。荧光信号的强度表示从测定试样的各粒子中检测出的荧光强度,将成为反映用荧光色素染色程度的参数。前向散射光信号的强度表示从测定试样的各粒子检测出的前向散射光的强度,将成为反映粒子大小的参数。将这些参数组合起来就绘制出平面分布图。关于出现在分布图上的粒子,通过计算出现在依测定试样所含粒子各自的出现位置而定的区域内的粒子点数,获得测定结果。

[0041] 另外,如图 2 所示,分析部分 56 与触摸屏式液晶显示面板 8 连接,经其分析得出的测定结果显示在触摸屏式液晶显示面板上。

[0042] 下面以尿液有形成份分析仪用的参照物为例进行说明。参照物由相应于被测粒子的标准粒子和分散标准粒子的溶剂构成。标准粒子使用的是可以与被测粒子基本同程度染色的第一标准粒子和预先制备成含有一定荧光色素的第二标准粒子。在此,经色素染色的第一标准粒子呈现的荧光强度与被色素染色的被测粒子所呈现的荧光强度大致相同。第二标准粒子实际上并未被色素染色,但也能呈现出与经染色的被测粒子所呈现的荧光强度差不多的荧光强度。

[0043] 下面,用与白血球对应的白血球用标准粒子作为第一标准粒子、与细菌对应的细菌用标准粒子作为第二标准粒子,制备出参照物的一例,并用上述尿液有形成份分析仪 1 测定。

[0044] 标准粒子:

[0045] 细菌用标准粒子使用的是平均粒径为 $1\mu\text{m}$ 的荧光胶乳粒子 (Duke 公司制、DUKE4010A+ 荧光 1.0%)。白血球用标准粒子使用的是平均粒径 $7\mu\text{m}$ 的醋酸乙烯基聚合物粒子。

[0046] 缓冲液 1 和缓冲液 2 的制备:

[0047] 在 1L 蒸馏水中添加氯化钠、防腐剂、醋酸,使三者溶液中的浓度分别达 0.3%、0.08%、0.035%,制备缓冲溶液 1。再在这个缓冲溶液中添加氯化钠直至其最终浓度达到 1.65%,再添加丙三醇使其最终浓度达到 9.0%,配制出缓冲液 2。

[0048] 细菌用标准粒子悬浮液的制备:

[0049] 在 $250\mu\text{l}$ 荧光胶乳粒子 (500 个/ μl) 中添加 1ml 浓度为 6% 的聚乙烯醇溶液,进行涡流式搅拌,使荧光胶乳粒子悬浮。将锥型腔体 (horn) 8mm 的超声波细胞粉碎机设定为 50mW、30sec,用丙三醇包封悬浮液中的荧光胶乳粒子。在此悬浮液中适量加入上述缓冲液

1 净化,用 12000rpm 离心力除去上清液。反复两次这种净化工序后,添加 2ml 上述缓冲液 2 配制出细菌用标准粒子悬浮液。

[0050] 白血球用标准粒子悬浮液的制备:

[0051] 在 250 μ l 醋酸乙烯基聚合物粒子 (200 个 / μ l) 中加入适量缓冲液 1,用 3000rpm 离心力除去上清液。反复二次后添加 2ml 上述缓冲液 2,即配制出白血球用标准粒子悬浮液。

[0052] 上述制备的细菌用标准粒子悬浮液和白血球用标准粒子悬浮液混合后作为参照物使用。

[0053] 四粒子测定用稀释液 (第一稀释液) 的制备:

[0054] 第一稀释液是用 1L 蒸馏水中添加 HEPES 50mM、EDTA-3K 0.40%、2-苯氧基乙醇 0.75%、丙酸钠 0.6%、苛性钠 0.052%、 C_5H_4NOSNa 350ppm、Proxel GX-L (一种防腐剂商品名)350ppm 配制而成的。

[0055] 细菌测定用稀释液 (第二稀释液) 的制备:

[0056] 第二稀释液是添加柠檬酸 100mM、硫酸钠 90mM、氨基磺酸 100mM、十四 (烷) 三甲基铵溴 0.1%,并添加苛性钠,使溶液的 PH 值达到 pH2.5 配制而成的。

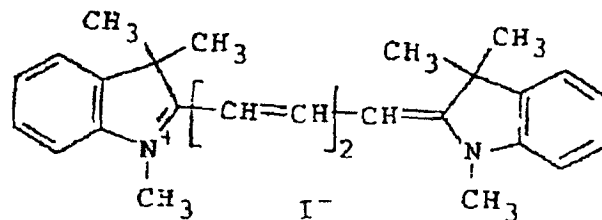
[0057] 四粒子测定用染色液 (第一染色液) 的制备:

[0058] 将以下化学式 1 所示的荧光色素 NK-529 (日本感光色素研究所 (株) 制)240ppm、化学式 2 所示的荧光色素 NK-136 (日本感光色素研究所 (株) 制)25.2ppm 溶解到乙二醇中得到的即是第一染色液。

[0059] 化学式 1

[0060]

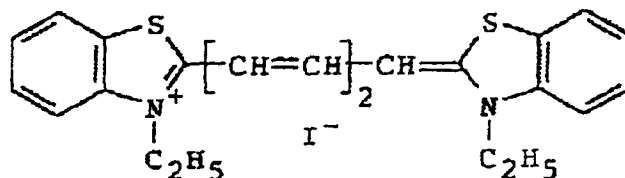
NK-529



[0061] 化学式 2

[0062]

NK-136

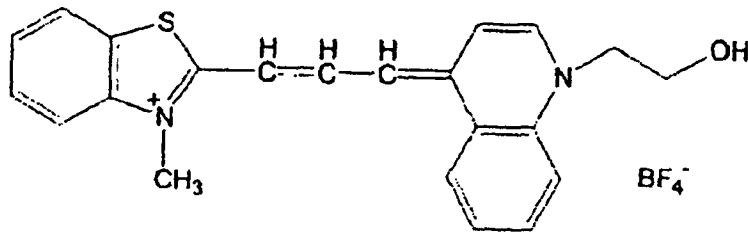


[0063] 细菌测定用染色液 (第二染色液) 的制备:

[0064] 以下化学式 3 所示荧光色素溶解到乙二醇中 40ppm 即得到第二染色液。

[0065] 化学式 3

[0066]



[0067] 首先,分别将第二稀释液装入尿液有形成份分析仪 1 的容器 20,第二染色液装入容器 21,第一稀释液装入容器 24,第一染色液装入容器 25,测定尿样。以发光二极管 49 检测出的前向散射光强度为纵坐标、光电倍增管 52 检测出的侧向荧光强度为横坐标的分布图如图 4 和图 5 所示。图 4 比图 5 提高了前向散射光感光度。

[0068] 图 4 是从由尿样、第二稀释液和第二染色液制备的测定试样 B 中得出的测定结果。为了测定尿样中所含细菌,图 4 提高了前向散射光感光度,在图中的 A 区(前向散射光强度:约 70 ~ 110 道、荧光强度:约 100 ~ 160 道)观察到了细菌。

[0069] 图 5 是从由尿样、第一稀释液和第一染色液制备的测定试样 A 中得出的测定结果。图 5 前向散射光感光度比图 4 设定得低,因此,在图中 C 区观察到细菌, B 区(前向散射光强度:约 170 ~ 230 道,荧光强度:约 30 ~ 170 道)观察到白血球。

[0070] 接着,用尿液粒子分析仪 1 测定参照物。所得分布图如图 6 和图 7。图 6 是从由参照物、第二稀释液和第二染色液制备的测定试样 B 得出的测定结果。图 7 是从由参照物、第一稀释液和第一染色液制备的测定试样 A 中得到的测定结果。图 6 和图 7 是以前向散射光强度为纵坐标、侧向荧光强度为横坐标的分布图。与图 4 和图 5 的情况一样,图 6 比图 7 前向散射光感光度高。

[0071] 图 6 在细菌出现区域 A 区内观察到细菌用标准粒子(荧光胶乳粒子)。这个细菌用标准粒子的分布范围在细菌出现区域 A 的略靠中间处,其前向散射光强度约为 81 ~ 88 沟道(channel),荧光强度约为 110 ~ 140 沟道。细菌用标准粒子实际上并未被第二染色液染色。

[0072] 图 7 是在白血球出现区域 B 区内观察到白血球用标准粒子(醋酸乙烯基聚合物粒子)的。观测到的白血球用标准粒子的分布范围为前向散射光强度约为 200 ~ 220 沟道、荧光强度约为 30 ~ 140 沟道。此外,还在区域 C 观察到细菌用标准粒子,细菌用标准粒子实际上并未被第一染色液染色。

[0073] 与图 7 显示白血球用标准粒子的出现区域和细菌用标准粒子的出现区域相反,图 6 未明确显示白血球用标准粒子的出现区域。这是因为图 6 为了测定试样中的细菌提高了前向散射光的感光度。如上所述,细菌用标准粒子和白血球用标准粒子的粒径相差很大,加之前向散射光是反映粒子大小的参数,故从细菌用标准粒子得到的前向散射光强度和从白血球用标准粒子得到的前向散射光强度其大小不同。因此,对于图 6,可以通过绘制降低前向散射光感光度的分布图来确认白血球用标准粒子的出现区域。

[0074] 用尿液有形成份分析仪 1 分析尿样时检测出的粒子荧光强度取决于以下两个条件:

[0075] (1) 检测部分 41 的条件:比如荧光检测器(光电倍增管 52)的感光度(输出电压)和激光器 47 的发光强度等

[0076] (2) 试样制备部分 11 的条件:比如染色液的注入量等。在此,假设比较通过测定

标准粒子得到的荧光强度平均值和荧光强度的规定范围,判断其结果为 ±(正常范围内)、+(比正常范围高 10)、-(比正常范围低 10)。当由第一稀释液和第一染色液制备出的测定试样 A 获得的第一标准粒子和第二标准粒子的判断结果如下表 1 所示时,可以推断检测部分 41 和试样制备部分 11(特别是与用第一稀释液和第一染色液制备测定试样 A 相关的部分)的故障。

[0077] 表 1

	判断结果	异常部位 (可考虑的原因举例)		判断结果	异常部位 (可考虑的原因举例)
第一标准粒子	+	试样制备部分 (染色液量多等)	第一标准粒子	-	试样制备部分 (染色液量少等)
	±		第二标准粒子	±	
第一标准粒子	+	检测部分 (荧光检测器的感光度高等)	第一标准粒子	-	检测部分 (荧光检测器的感光度低等)
	+		第二标准粒子	-	
第一标准粒子	±	试样制备部分及检测部分 (染色液量多、荧光检测器的感光度低等)	第一标准粒子	-	试样制备部分及检测部分 (染色液量少、荧光检测器的感光度高等)
第二标准粒子	-		第二标准粒子	+	

[0079] 从第二稀释液和第二染色液制备的测定试样 B 得出的第一标准粒子及第二标准粒子的判断结果也同样,通过上述分析,可以推断出检测部分 41 和试样制备部分 11(特别是与用第二稀释液及第二染色液制备测定试样 B 相关的部分)的故障。

[0080] 本实施方式中使用的尿液有形成份分析仪 1 可如上所述自动判断异常部位。下面用图 8 就其判断过程进行说明。

[0081] 首先,使用者将含有第一标准粒子及第二标准粒子的参照物放入规定位置,按启动开关 7,开始抽吸参照物。

[0082] 步骤 S1:步骤 S1 制备测定试样 A 和测定试样 B。

[0083] 装在试管 14 中的参照物被注射泵 15 经吸管 16 推入。推入的参照物由样品阀 17 定量,分别注入反应室 18、19。装在容器 20 中的第二稀释液被注射泵 22 通过软管定量供给反应室 18,装在容器 21 的第二染色液被注射泵 23 通过软管定量供给反应室 18。这样,测定试样 B 就被制备出来。装在容器 24 的第一稀释液被注射泵 26 通过软管定量供给反应室 19,装在容器 25 中的第一染色液被注射泵 27 通过软管定量供给反应室 19,这样,测定试样 A 即制备出来。

[0084] 步骤 S2:步骤 S2 是从各测定试样所含第一标准粒子和第二标准粒子中获得荧光强度和前向散射光强度。

[0085] 首先,反应室 19 中的测定试样 A 从喷嘴 44 喷入流通池内,同时,包裹液从包裹液供给口 45 喷入包裹液流通池。测定试样 A 在流通池内被包裹液包封,再由锐孔 43 呈细流流出。激光器 47 发出的激光被聚光镜聚光后照射从锐孔 43 流过的测定试样 A,受光照的测定试样 A 中的第一标准粒子和第二标准粒子发出的前向散射光在发光二极管被接受,并进行光电转换,作为前向散射光信号输出。测定试样 A 中的第一标准粒子和第二标准粒子发

出的侧向荧光被光电倍增管 52 接受,并进行光电转换,作为侧向荧光信号输出。各种信号输出到分析部分 56。分析部分 56 对检测部分检测出的前向散射光信号和侧向荧光信号进行分析,获得前向散射光强度和荧光强度。如此,从测定试样 A 中的第一标准粒子获得第一荧光强度和第一前向散射光强度;从测定试样 A 中的第二标准粒子获得第二荧光强度和第二前向散射光强度。

[0086] 同样,反应室 18 中的测定试样 B 从喷嘴 44 喷入流通池内,流过流通池。受激光照射的测定试样 B 中的第一标准粒子和第二标准粒子发出的前向散射光在发光二极管 49 被接受,并被进行光电转换,作为前向散射光信号输出。测定试样 B 中的第一标准粒子和第二标准粒子发出的侧向荧光被光电倍增管 52 接受并转换为电信号,作为侧向荧光信号输出。各种信号均输出到分析部分 56。分析部分 56 对检测部分 41 检测出的前向散射光信号和侧向荧光信号进行分析,得出前向散射光强度和荧光强度。这样即可从测定试样 B 中的第一标准粒子得到第三荧光强度和第三前向散射光强度。还可从测定试样 B 中的第二标准粒子得到第四荧光强度和第四散射光强度。

[0087] 步骤 S3:在步骤 S3,分析部分 56 储存前述步骤 S2 所获得的前向散射光强度和荧光强度。

[0088] 步骤 S4:步骤 S4,分析部分 56 取得有关第一标准粒子的荧光强度的判断结果和关于第二标准粒子的荧光强度的判断结果,并根据这个判断结果以与表 1 同样的标准推断异常部位。

[0089] 首先,分析部分 56 就获得的第一荧光强度计算出其平均值(以下称平均值 X),然后,如果所得平均值 X 在所规定的上限值和下限值的范围内,则判断为 ±(正常范围内),如果超过其上限值,则判断+(值高于正常范围),若低于下限值,则判断为-(值低于正常范围)。同样,分析部分 56 对第二荧光强度、第三荧光强度和第四荧光强度也分别算出其平均值,做出上述同样的判断。

[0090] 如此,分析部分 56 获得有关第一标准粒子荧光强度(第一荧光强度和第三荧光强度)的判断结果和关于第二标准粒子荧光强度(第二荧光强度和第四荧光强度)的判断结果,并根据这个判断结果以与表 1 同样的标准推断异常部位。

[0091] 步骤 S5:步骤 S5 将上述步骤 S4 中推断异常部位的结果输出到触摸屏式液晶显示面板 8 上。

[0092] 如上所述,通过使用本例的标准粒子,诸如试样制备部分的荧光染色性能下降、荧光检测器的感光度升高等情况下,过去的技术检测不出来的异常都可以检测出来,由于知道异常发生的部位,对仪器进行维修也变得更加容易。

[0093] 另外,在上述实施方式中,描述了通过测定标准粒子的荧光强度来探知异常部位的情况,其实还可以测定荧光脉冲持续时间来探知异常部位。不仅标准粒子的荧光,通过测定散射光(强度或脉冲持续时间)也可以确认散射光检测器有无故障。

[0094] 在上述实施方式中,虽然就使用含有第一标准粒子和第二标准粒子的参照物进行测定的过程进行了说明,但本发明并非仅限于此。比如,还可以使用含有第一标准粒子的第一参照物和含有第二标准粒子的第二参照物。下面用图 9 就这种情况下的过程进行说明。

[0095] 首先,使用者将含有第一标准粒子的第一参照物和含有第二标准粒子的第二参照物分别放入规定的位置,按启动开关 7,则第一参照物和第二参照物依次被吸入。

[0096] 步骤 S6 :步骤 S6 由第一参照物制备第一测定试样 A 和第一测定试样 B。有关制备各测定试样的仪器的运行步骤与上述步骤 S1 相同。

[0097] 步骤 S7 :步骤 S7 从上述步骤 S6 制备的各测定试样所含的第一标准粒子和第二标准粒子获得荧光强度和前向散射光强度。有关获得荧光强度和前向散射光强度的仪器的运行步骤与上述步骤 S2 相同。如此,从上述步骤 S6 制备的第一测定试样 A 中的第一标准粒子获得第一荧光强度和第一前向散射光强度;从测定试样 B 中的第一标准粒子取得第三荧光强度和第三前向散射光强度。

[0098] 步骤 S8 :在步骤 S8,分析部分 56 对上述步骤 S7 获得的前向散射光强度和荧光强度进行存储。

[0099] 步骤 S9 :步骤 S9 从第二参照物制备第二测定试样 A 和第二测定试样 B。关于制备各测定试样的仪器的运行步骤与上述步骤 S1 相同。

[0100] 步骤 S10 :步骤 S10 从上述步骤 S9 制备的各测定试样所含的第一标准粒子和第二标准粒子获得荧光强度和前向散射光强度。有关获得荧光强度和前向散射光强度的仪器的运行步骤与上述步骤 S2 相同。如此,从上述步骤 S9 制备的第二测定试样 A 中的第一标准粒子获得第二荧光强度和第二前向散射光强度;从测定试样 B 中的第一标准粒子获得第四荧光强度和第四前向散射光强度。

[0101] 步骤 S11 :在步骤 S11,分析部分 56 对上述步骤 S10 获得的前向散射光强度和荧光强度进行存储。

[0102] 步骤 S12 :在步骤 S12,分析部分 56 得出有关第一标准粒子的荧光强度的判断结果和关于第二标准粒子的荧光强度的判断结果,并根据这些判断结果以与表 1 相同的基准推断异常部位。仪器有关检测结果的判断和异常部位的推断等运行步骤与上述步骤 S4 相同。这样即取得有关第一标准粒子的荧光强度(第一荧光强度和第三荧光强度)的判断结果和关于第二标准粒子的荧光强度(第二荧光强度和第四荧光强度)的判断结果,并根据这个判断结果以与表 1 同样的标准推断异常部位。

[0103] 步骤 S13 :步骤 S13 是将上述步骤 S12 中推断异常部位的结果输出到触摸屏式液晶显示面板 8。

[0104] 在步骤 S5 或步骤 S13,不仅异常部位的推断结果,第一标准粒子和第二标准粒子的 ±、+ 或 - 的结果也可以显示在触摸屏式液晶显示面板 8 上。

[0105] 上述实施方式中虽然使用白血球用标准粒子作为相应于第一标准粒子的标准粒子,使用细菌用标准粒子作为相应于第二标准粒子的标准粒子,但并不仅限于此。例如,作为第一标准粒子除白血球用标准粒子外,还可以使用红血球用标准粒子、上皮细胞用标准粒子和管型体用标准粒子等。

[0106] 作为与白血球对应的白血球用标准粒子,可以使用醋酸乙烯基聚合物粒子和多孔硅石粒子等。这种标准粒子用色素染色后能显示出与白血球大致相同的荧光强度,理想的是能显示与白血球大致相同的散射光强度、平均粒径 5 ~ 15 μm、最好是 7 ~ 12 μm 的粒子。

[0107] 作为对应于上皮细胞的上皮细胞用标准粒子,可使用聚丙烯酰胺粒子和纤维素冻胶粒子、亲水性乙烯基聚合物冻胶粒子等。该标准粒子经色素染色,可显示与上皮细胞相近的荧光强度,优选能显示与上皮细胞略同的散射光强度、平均粒径为 20 ~ 150 μm、最好是 45 ~ 90 μm 的粒子。

[0108] 作为对应于管型体的管型体用标准粒子,可使用亲水性乙烯基聚合物粒子和桥连琼脂冻胶等。这种标准粒子用色素染色后可显示出与管型体相近的荧光强度,优选可显示出与管型体相近的散射光强度、平均粒径 $5 \sim 60 \mu\text{m}$ 、最好 $10 \sim 40 \mu\text{m}$ 的粒子。

[0109] 作为相应于红血球的红血球用标准粒子,可使用胶乳粒子和高纯度二氧化硅粒子等。这种标准粒子用色素染色后会显示出与红血球相近的荧光强度,优选能显现与红血球相近的散射光强度、平均粒径为 $3 \sim 20 \mu\text{m}$ 最好 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ 的粒子。

[0110] 作为对应于细菌的细菌用标准粒子,可使用荧光胶乳粒子等,这种标准粒子优选对粒子分析仪使用的色素实际上不会染色的粒子,而且它最好能显示与被色素荧光染色的细菌相近的荧光强度,显示与细菌相近的散射光强度的更好,其平均粒径为 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 、最好为 $0.8 \sim 3 \mu\text{m}$ 。

[0111] 在实施方式中,虽然对应于细菌的标准粒子使用的是荧光胶乳粒子,对应于白血球的标准粒子使用的是在粒子分析仪中经荧光染色处理的粒子,但并不仅限于此。比如,对应于细菌的标准粒子可以使用被色素荧光染色得与细菌相近的粒子,对应于白血球、红血球、上皮细胞或管型体的标准粒子也可以使用预先制备成含有一定荧光色素的荧光粒子。为了提高作为标准粒子使用的胶乳粒子等的分散性,也可以对胶乳粒子施以聚乙烯醇涂覆。

[0112] 作为参照物使用的溶剂可以使用水性溶剂,最好使用缓冲剂。为了提高标准粒子的分散性,缓冲剂中也可加入表面活性剂等分散性提高剂。

[0113] 与尿样混合制备测定试样的试剂最好象上述实施方式那样,分别使用测定红血球、白血球、上皮细胞和管型体用的第一染色液和第一稀释液及测定细菌用的第二染色液和第二稀释液。这是因为尿样所含粒子中,细菌比其他粒子小,使用检测细菌专用的稀释液和染色液可以提高细菌的检测精度。

[0114] 比如,尿样中常常可以看到粘液丝、结晶、无晶性盐类和细胞碎片等所谓的杂物,这些大小相似,妨碍对细菌的检测。从杂物检出的前向散射光的强度与从细菌检测出的强度重合,有时难以辨别。因此,最好制备可以抑制杂物染色且能溶解杂物的第二稀释液。

[0115] 为了提高细菌的染色性、抑制杂物染色且一定程度溶解杂物,第二稀释液最好制备在 $\text{pH}2.0 \sim 4.5$ 、最理想的是 $\text{pH}2.0 \sim 3.0$ 范围内。

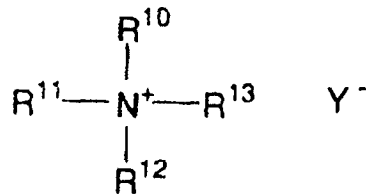
[0116] 为了维持第二稀释液的上述 pH 值,可以使用酸或 $\text{pKa} 1 \sim 5$ 的缓冲剂。只要能维持上述 pH 范围,并没有特别限定,但最好使用柠檬酸盐、磷酸盐、邻苯二甲酸盐、甘氨酸、丁二酸、乳酸、 β -氨基丙酸、 ϵ -氨基己酸和富马酸等。使用量以可维持上述 pH 值的量和 $10 \sim 500\text{mM}$ 的范围内即可。

[0117] 另外,在第二稀释液中添加表面活性剂最好添加阳离子型表面活性剂,可以破坏细菌的细胞膜,使色素容易渗入,其结果是细菌更好地染色,更易与杂物甄别。另一方面,粘液丝和红血球、细胞碎片等会溶解或收缩,从而减少对细菌检测的影响。

[0118] 阳离子型表面活性剂并没有特别限定,比较合适的可以举出以下化学式 4 所示的四级铵盐。在化学式 4 中 R^{10} 表示碳数 $6 \sim 18$ 的烷基或 $(\text{C}_6\text{H}_5)\text{-CH}_2\text{-}$, R^{11} 、 R^{12} 及 R^{13} 表示碳数 $1 \sim 3$ 的烷基或苯甲基, Y^- 表示卤离子。另外, R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 可以相同,也可以不同。

[0119] 化学式 4

[0120]



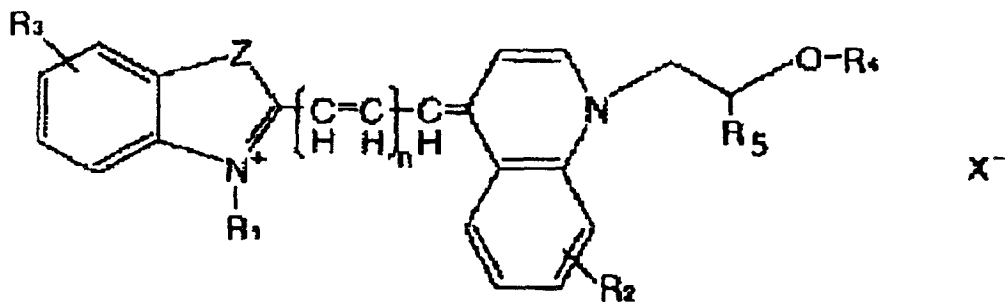
[0121] 例如：癸基三甲铵盐、十二（烷）三甲铵盐、十四（烷）三甲铵盐、十六（烷）三甲铵盐和十八（烷）三甲铵盐均适宜使用。使用量可以是 10 ~ 30000mg/L, 最好为 100 ~ 3000mg/L。

[0122] 用于细菌的荧光染色处理的色素只要可以在上述 pH 值范围内使细菌染色即可，并无特别要求。至于浓度，每种色素的适宜浓度各异，但在诸如 0.1 ~ 100ppm（最终浓度）的范围内使用即可。另外，从检测细菌的能力这一点来说，使用的色素至少应与细菌的构成成份之一结合，使用发荧光的荧光色素比较有利。

[0123] 具体来说，以下化学式 5 所示色素比较理想。在化学式 5 中， R_1 表示氢原子或碳数 1 ~ 3 的烷基， R_2 和 R_3 表示氢原子、碳数 1 ~ 3 的烷基或碳数 1 ~ 3 的烷氧基， R_4 表示氢原子、酰基或碳数 1 ~ 3 的烷基， R_5 表示氢原子、可取代的碳数 1 ~ 3 的烷基、 Z 表示硫原子、氧原子或以碳数 1 ~ 3 的烷基取代的碳原子， n 表示 1 或 2 整数， X^- 表示阴离子。

[0124] 化学式 5

[0125]



[0126] 另一方面，检测尿样中除细菌以外的红血球、白血球、上皮细胞和管型体四种粒子用的稀释液（第一稀释液）最好制备到红血球不溶血的渗透压强和 pH 的范围。

[0127] 为了把第一稀释液制备在红血球不溶血的渗透压强和 pH 的范围内，可以添加缓冲剂和渗透压强补偿剂。第一稀释液的 pH 值可在 3.8 ~ 10.5、最好 6.3 ~ 8.5 的范围内。这是因为一旦第一稀释液的 pH 值呈强碱性，红血球就可能溶血，若呈酸性，则尿检体中的 pH 变化大，可能造成红血球受损或尿液中的粒子的染色性整体下降。

[0128] 添加在第一稀释液中的缓冲剂可用历来大家熟悉的东西，诸如饱和酚（Tris）、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS 等好的缓冲剂。所用缓冲剂的浓度通常为 20 ~ 500mM、最好为 50 ~ 200mM 之间。

[0129] 作为添加在第二稀释液的渗透压强补偿剂可选用无机盐和丙酸盐等有机盐类、糖类等。无机盐类可使用的有：氯化钠、氯化钾、溴化钠等。在有机盐类中作为丙酸盐可使用丙酸钠、丙酸钾、丙酸铵等。其他有机盐类有溴酸盐、醋酸盐等。糖类可使用山梨（糖）醇、葡萄糖、甘露（糖）醇等。添加渗透压强补偿剂的目的是防止红血球溶血、得到稳定的荧光强度。尿液的渗透压强分布很广，为 50 ~ 1300mOsm/kg。分析用试剂的渗透压强过低，红血球的溶血会在早期进行，过高则尿样中的粒子受损加大，因此，渗透压强最好在 100 ~

600mOsm/kg, 150 ~ 500mOsm/kg 更好。

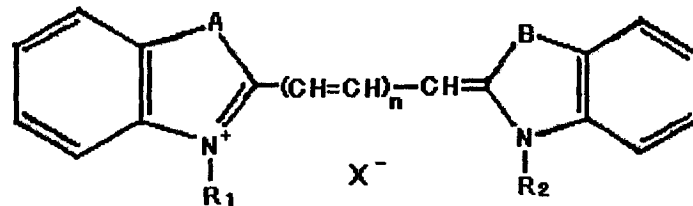
[0130] 为了减少出现在尿样中的非晶盐类(如磷酸铵、磷酸镁、碳酸钾)的影响,还可在四粒子用稀释液添加溶解这些盐类的螯合剂。螯合剂只要是脱钾剂、脱镁剂即可,没有特定的种类。例如:EDTA 盐、CyDTA、DHEG、DPTA-OH、EDDA、EDDP、GEDTA、HDTA、HIDA、Methyl-EDTA、NTA、NTP、NTPO、EDDPO 等。最合适的是 EDTA 盐、CyDTA、GEDTA。浓度在 0.05 ~ 5w/w% 范围内即可,最好是 0.1 ~ 1w/w%。在此所谓的脱钾剂或脱镁剂指与钾离子或镁离子结合,形成水溶性化合物的物质。

[0131] 若尿样中出现酵母样真菌,则从酵母样真菌检测出的前向散射光和荧光的强度会与从红血球检测出的强度重合,造成分辨困难。因此,可以在有形成份用稀释液中添加使酵母样真菌与红血球之间荧光色素的染色性产生差异的物质,通过添加这种物质,就可以使从酵母样真菌和红血球检测出的荧光强度不同,从而提高红血球的辨别准确度。这种物质可以是破坏酵母样真菌细胞膜、加速色素对细胞内部的渗透而不损伤红血球细胞膜的物质。红血球的细胞膜一旦受损,就会发生溶血,给红血球计数带来困难。满足上述条件的物质以有苯环的非离子型有机化合物为好,如苄醇、β 苯乙醇、苯酚、1-苯氧基乙酸-2-丙醇、2-苯氧基乙酸乙醇等芳族醇、2-氨基苯噻唑和苯噻唑等噻唑化合物以及醋酸苯基等。

[0132] 本实施方式中可染色的粒子和用于给尿样有形成份染色的荧光色素可以使用以下化学式 6 和化学式 7 中所示缩合苯衍生物。

[0133] 化学式 6

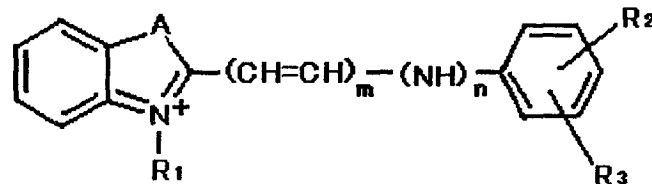
[0134]



[0135] 在化学式 6 中, R_1 和 R_2 表示氢原子或碳数 1 ~ 6 的烷基或用羟基取代的碳数 1 ~ 6 的烷基。A 和 B 表示硫或氧或氮或含从甲基和乙基中选择的低级烷基的碳。n 为 1 或 2, X^- 是阴离子。

[0136] 化学式 7

[0137]



[0138] 在化学式 7 中, R_1 表示碳数 1 ~ 6 的烷基。 R_2 表示氢或碳数 1 ~ 3 的烷氧基。 R_3 表示碳数 1 ~ 3 的烷氧基、被碳数 1 ~ 3 的烷基取代的次低级烷基胺基和 $N(CH_3)C_2H_4CN$ 。A 表示硫或氧或含从甲基和乙基选择的低级烷基的碳。m 表示 1 或 2, n 则是 0 或 1。

[0139] 以上列举了在尿液有形成份分析仪 1 上应用本发明的参照物的实施方式,该尿液有形成份分析仪 1 用试样制备部分制备并测定用于测定白血球、红血球、上皮细胞和管型体四粒子的测定试样 A 和用于测定细菌的测定试样 B。但是,并非仅限于此,只要是对生物试样中的粒子进行荧光染色处理的试样制备装置和具备荧光检测器的粒子分析仪都可使

用本发明的参照物。比如,这种粒子分析仪还有:在尿液有形成份分析仪 1 中未安装细菌测定试样制备装置(容器 20 和 21、注射泵 22 和 23、反应室 18) 只用一个试样制备装置(容器 24 和 25、注射泵 26 和 27、反应室 19) 制备测定白血球、红血球、上皮细胞、管型体和细菌用的测定试样的仪器。

[0140] 本发明涉及的参照物作为可以对自动粒子分析仪进行精度管理或校正的参照物是有用的。

图 1

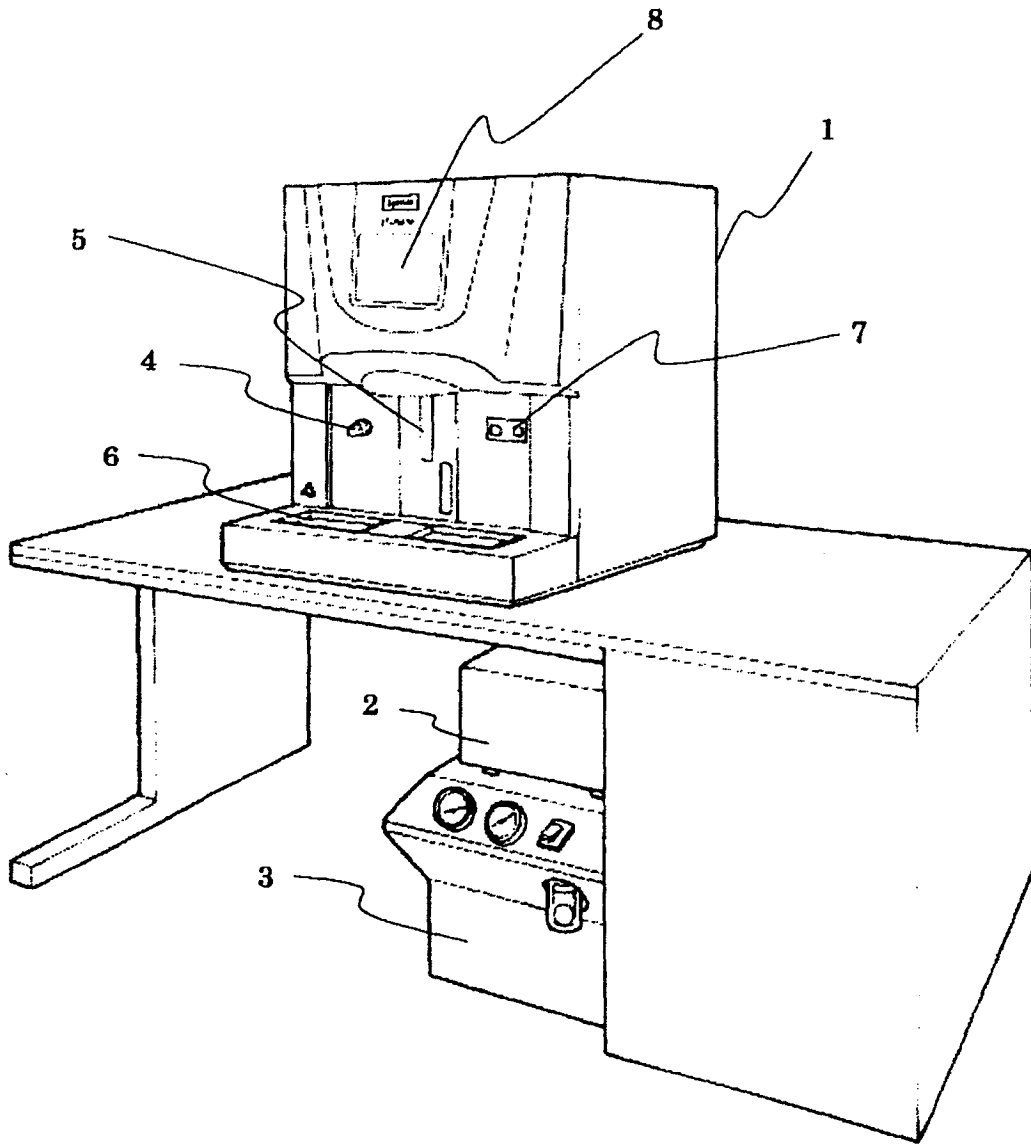


图 2

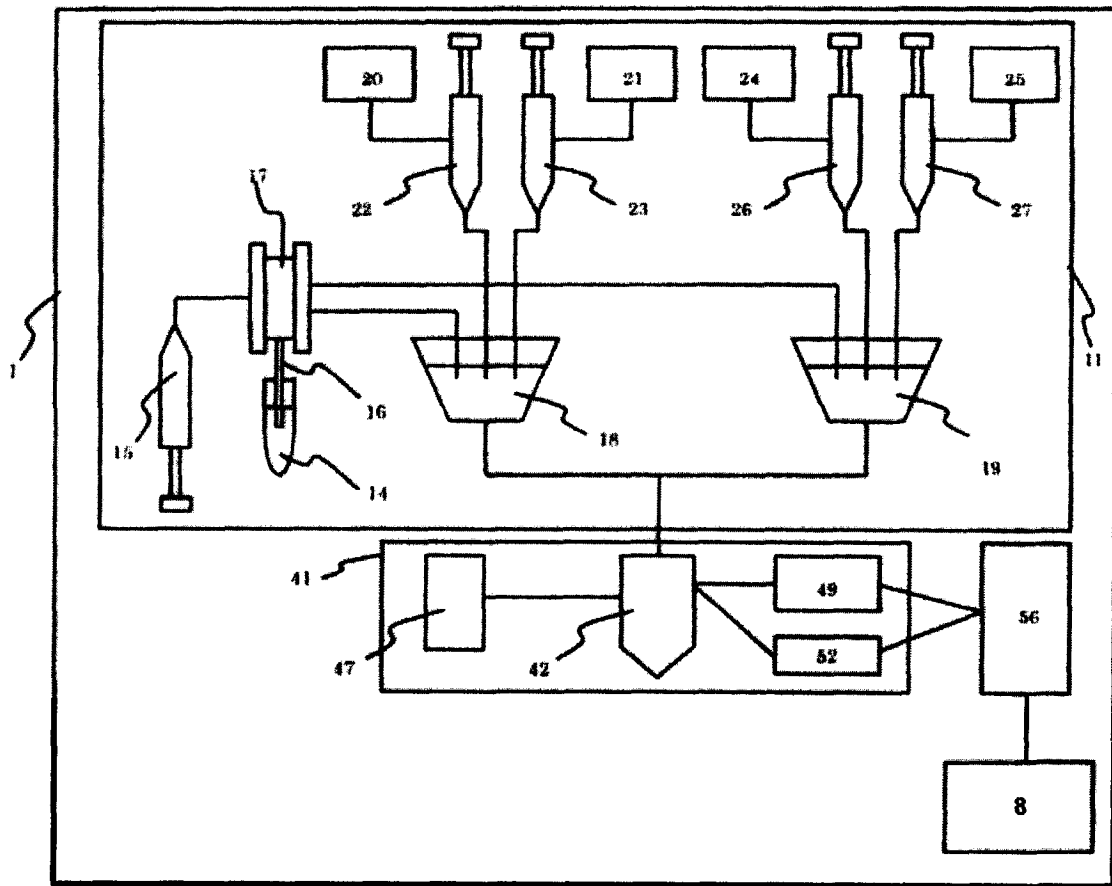


图 3

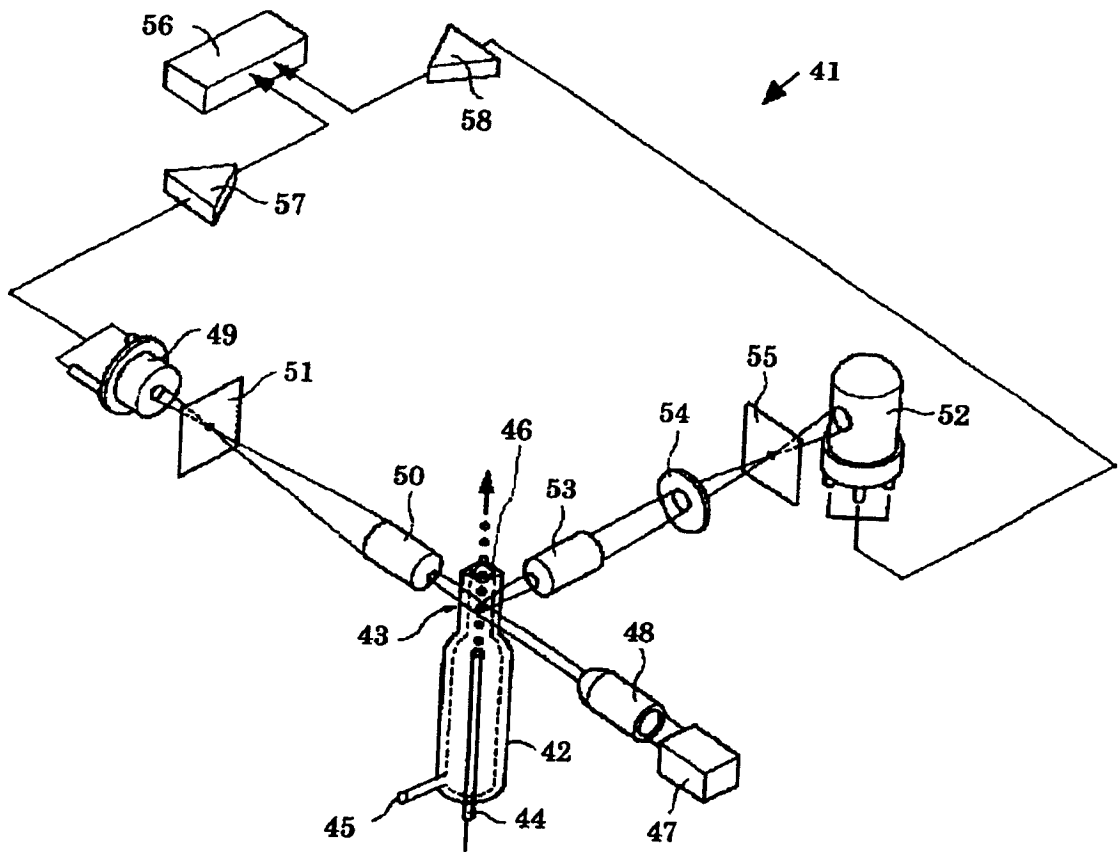
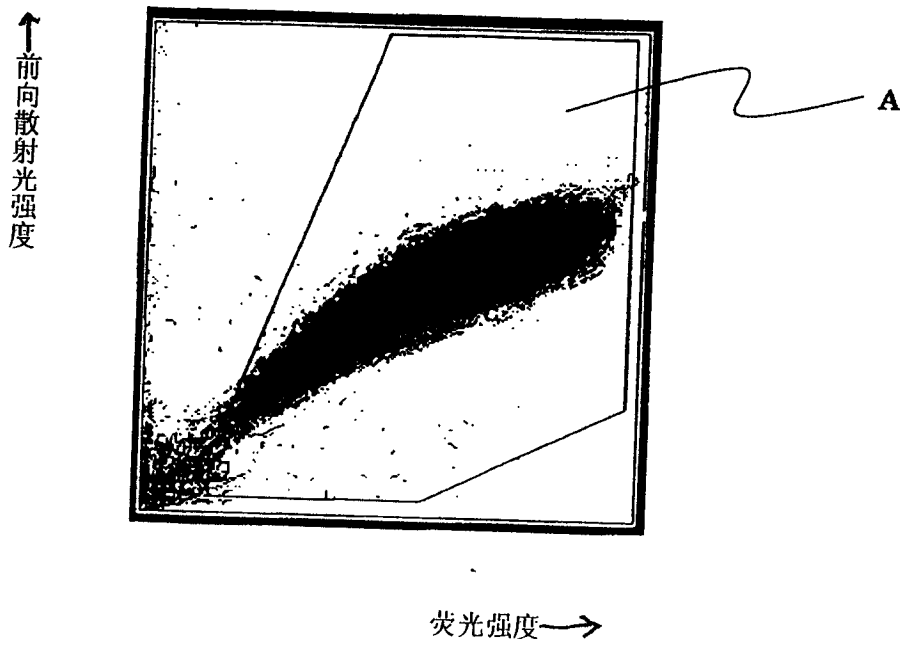


图 4



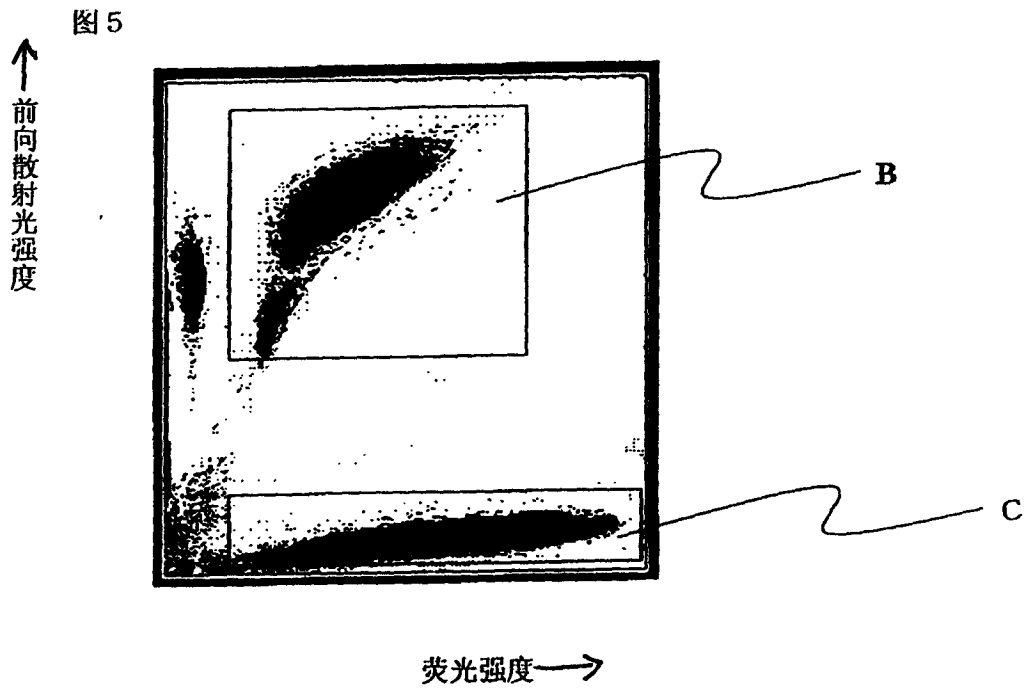


图6

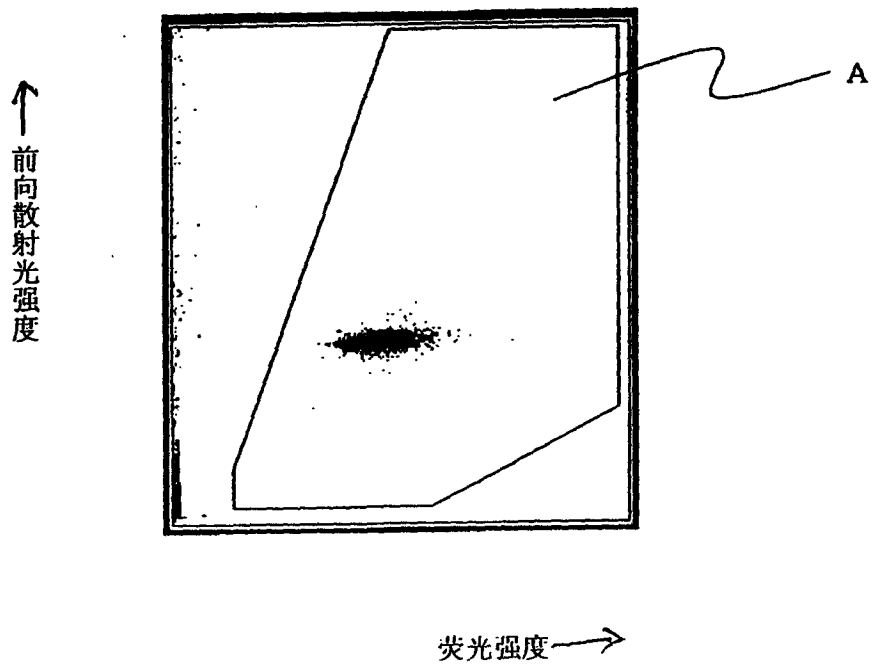


图 7

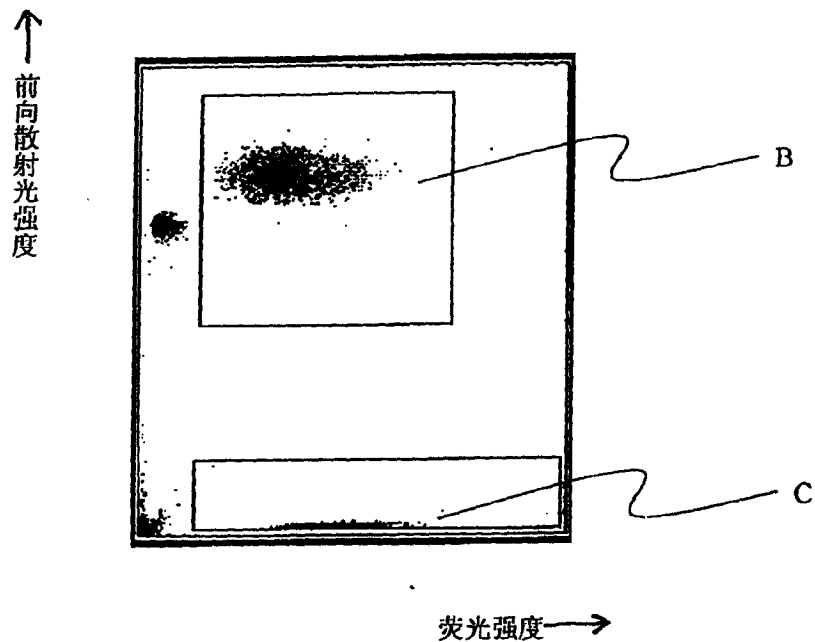


图 8

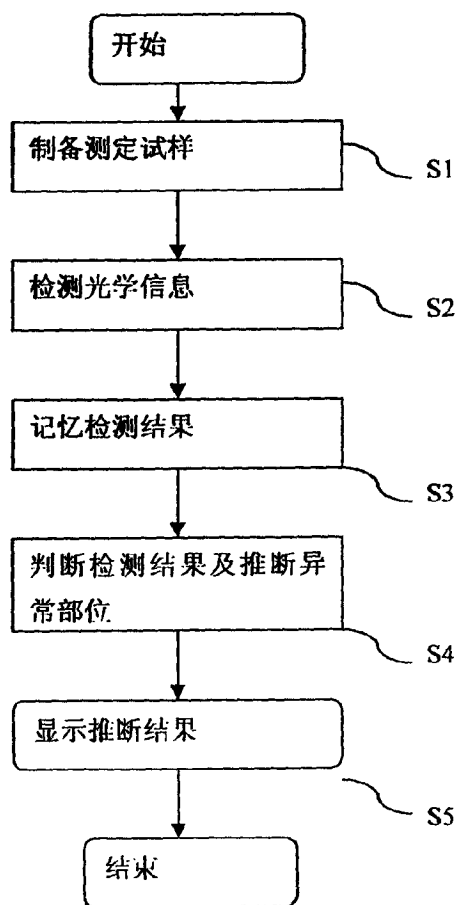


图9

