

白细胞五分类多维光学系统的优化设计

万里霞¹ 龙 伟¹ 赵雄锋^{1,2} 李富贵¹ 罗 亮¹

¹南昌大学信息工程学院, 江西 南昌 330031

²南昌百特生物高新技术股份有限公司, 江西 南昌 330012

摘要 传统的五分类血液分析仪一般与化学方法配合使用以提高白细胞的分类精度,增加了仪器结构的复杂程度和仪器的使用、维修成本。设计了一种特殊结构的光学系统,该系统引入了对后向散射光的检测,并采用直流(DC)信号、激光前向散射信号和后向散射信号相结合的方式实现了白细胞五分类。实验结果表明装有该系统的样机对LYM、MON、NEU、EOS、BAS的分类相对偏差均小于5%,其性能与血液分析仪Mythic 22接近。优化后的光学系统可完成对白细胞的原位检测和分类,且具有结构简单、性能稳定的特点。

关键词 医用光学; 血液分析仪; 细胞分类; 光学系统; 后向散射光; 原位检测

中图分类号 TP212 文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201542.0704001

Optimal Design of Multidimensional Optical System for WBC Five Classification

Wan Lixia¹ Long Wei¹ Zhao Xiongfeng^{1,2} Li Fugui¹ Luo Liang¹

¹Information Engineering Institute, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China

²Biotech A & C Biotechnical Industry Incorporated Company, Nanchang, Jiangxi 330012, China

Abstract Traditional five classification hematology analyzers usually improve white blood cell (WBC) classification accuracy by combining chemical methods, which will increase the complexity of instrument structure and the cost of use and repair. An optical system with a special structure is designed, which introduces the detection of back scattered light by the means of combining direct current (DC) signal, laser forward scattering signal and back scattering signal to achieve the WBC five classification. The experiment results show that the relative deviation of the prototype with the sensing system for LYM, MON, NEU, EOS and BAS is less than 5%, and its performance is close to the hematology analyzer Mythic 22. The optical system after optimization can complete *in situ* detection and classification of WBC and has the characteristics of simple structure and stable performance.

Key words medical optics; hematology analyzer; cell classification; optical system; back scattered light; *in situ* detection

OCIS codes 170.1530; 170.3890; 120.3890; 120.4570

1 引 言

五分类血液分析仪器一般采用各种物理和化学技术对白细胞(WBC)进行检测和分类,以获得外周血液中白细胞的五种常见类型(LYM、MON、NEU、EOS、BAS)的百分率和绝对值,并具有提示异常白细胞和初步分类的功能^[1-2]。目前主流白细胞分类检测技术采用光电法,该技术一般以激光前向、侧向散射光相结合的方

收稿日期: 2015-01-16; 收到修改稿日期: 2015-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(61261011)

作者简介: 万里霞(1990—),男,硕士研究生,主要从事计算机控制与嵌入式智能仪表技术方面的研究。

E-mail: 1240147131@qq.com

导师简介: 龙 伟(1952—),男,教授,主要从事自动化控制技术、光机电一体化技术和医学检验技术等方面的研究。

E-mail: 13803535927@163.com(通信联系人)

式探测细胞体积大小和分布的变化,但对细胞内部结构间的差异、细胞核以及颗粒情况的检测,通常需与其他方法相结合,从而导致仪器结构复杂,成本昂贵,增加了仪器的使用和维修成本^[3-5]。

Slout 等^[6-8]的研究表明,血细胞被光照射后产生的弹性光散射形式取决于细胞的形态、结构、成份,表征了各自的物理特征,且后向散射光(BSC)强度是由细胞核与细胞质的比率所决定,并随细胞质和细胞核的光密度变化。基于以上原理,本文设计了一种特殊结构的多维光学系统,该系统首次引入对后向散射光的检测以获取白细胞的核质比,同时以前向散射光(FSC)反映细胞体积大小,根据两种信号在不同类型白细胞中的差异完成白细胞的分类。白细胞的检测与分类过程完全由光学系统完成,测试过程中无需直接接触细胞,使用生物化学药剂少,从而实现了细胞的原位检测和初步分类。系统具有结构简单、灵敏度高、测量精度和自动化程度高等优点。

2 白细胞五分类多维光学系统的总体结构

设计的多维光学系统如图1所示,其中R为半导体激光器,P为流式盒,M1、M2为相同结构、对称放置的接收镜筒,L1、L2为相同结构的准直镜筒,C、E为单面镀膜的反射镜,D为特殊反射镜,Q1、Q2为光电探测器。

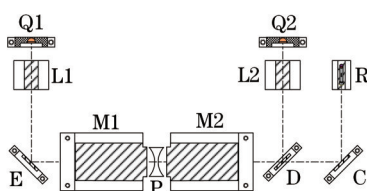


图1 光学系统结构

Fig.1 Structure of optical system

系统开机初始化后,激光器R发射出波长为450 nm的蓝光,经过反射镜C的反射(反射率为99%),激光光线进入特殊反射镜D中。反射镜C、D与光束方向成45°夹角,且反射镜D为双面镀膜的特殊结构,中间嵌有一直径为1 mm的分光镜,该设计可让入射激光束透过反射镜D并进入接收镜筒M2。激光束经过M2的光束聚焦处理,在流式盒P的微孔中形成一个直径为90 μm的小光斑并对通过微孔的白细胞进行照射,其中透射出小孔且偏离激光入射方向1°~5°的散射光为前向光,偏离激光入射方向约180°的散射光为后向光。前向光经过M1的光束整形之后变为平行光,经过反射镜E(反射率为99%)与准直镜筒L1的聚焦,会聚在光电探测器Q1以完成前向光检测;后向光则由接收镜筒M2的光束整形与特殊反射镜D的反射,再经过准直镜筒L2的光束会聚作用聚焦在光电探测器Q2上以完成后向光检测。

3 光学系统的核心部件设计

3.1 流式盒的设计

流式盒是整个系统的关键部件,用于将血液样本转变为由白细胞组成的单细胞列并使每个细胞依次通过光学系统进行参数检测,结构设计如图2所示,主要由激光束、光学窗、高压注射器和被动鞘流组成。

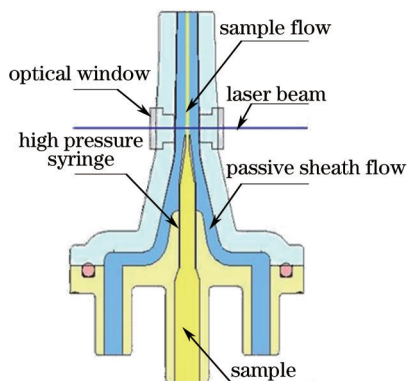


图2 流式盒结构图

Fig.2 Structure diagram of flow type box

流式盒的工作流程为:仪器的采样机构吸取 20 μL 血液样本,经过稀释、混匀等处理后,待测样本进入流式盒的高压注射器内,由于高压注射器的喷嘴是直径为 60 μm 的毛细管结构,样本流由高压注射器喷射后可转化为为由白细胞构成的单细胞列,然后每个细胞进入激光照射区完成前、后向光的参数检测。图 2 中被动鞘流的作用是防止已检细胞重新返回检测区,并将待检细胞维持在正常形态。

3.2 接收镜筒的设计

入射激光是直径为 1.2 mm 的平行光束,而微孔的直径约为 0.15 mm,因此在照射细胞之前需要对入射激光束进行聚焦处理。此外,细胞经过照射之后得到的前、后向散射光均为发散光,需将其转变为平行光以便光线的传输与收集,这两部分工作由两个对称放置的接收镜筒完成。接收镜筒的结构如图 3 所示,其中微孔处于双凸透镜 1 的焦点上,接收镜筒 M2 可完成对入射光的会聚作用,光线照射细胞之后,产生的不同角度的后向散射光反射到接收镜筒 M2 上,根据光路可逆原理可知,后向散射光经过接收镜筒 M2 处理之后可转化为一组平行光。同理,前向散射光经过接收镜筒 M1 的光学处理也变为平行光,并经过反射镜 E 投射到准直镜 L1 上。

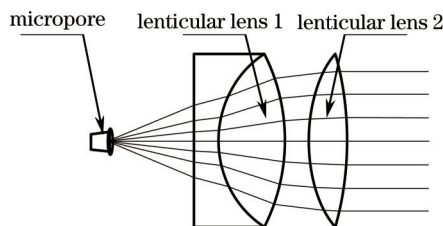


图 3 接收镜筒结构图

Fig.3 Structure diagram of receiving barrel

3.3 特殊反射镜 D 的设计

由于入射光与后向散射光的光路存在重叠,如何将二者进行有效分离成为系统设计的难点,且后向散射光的信号强度较弱,散射光由小孔到达光电探测器的接收效率也需适当提高。传统的收发共用光路通常设计一个分束片,该分束片与入射光方向成 45° 夹角,可将入射光束与接收光束分离^[9-10]。设接收光束与发射光束的光强之比为 λ ,信号检测区的散射光功率为 P_1 ,则光电探测器接收的光功率 P_2 可表示为

$$P_2 = \eta P_1 \varepsilon (1 - \lambda), \quad (1)$$

式中 ε 为光线反射率, η 为后向光接收系统的光学效率。设计系统的特殊反射镜如图 4 所示,该反射镜采用双面镀膜结构,中镜嵌有一个直径为 1 mm 的分光镜,可让入射激光光束透过反射镜 D。

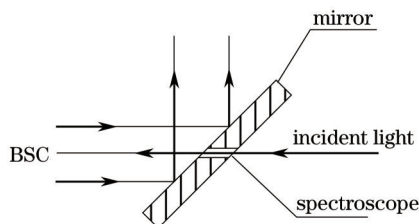


图 4 反射镜 D 光路结构图

Fig.4 Optical structure diagram of mirror D

设反射镜的有效接收面积为 S_1 ,分光镜的接收面积为 S_2 ,此时光电探测器接收的光功率 P_2' 为

$$P_2' = \eta P_1 \varepsilon \left[\frac{S_2}{S_1} (1 - \lambda) + \left(1 - \frac{S_2}{S_1} \right) \right] = \eta P_1 \varepsilon \left(1 - \lambda \frac{S_2}{S_1} \right). \quad (2)$$

令 $\varphi = \frac{S_2}{S_1}$,则两个系统的接收功率的比值为

$$\frac{P_2'}{P_2} = \frac{1 - \lambda \varphi}{1 - \lambda}, \quad (3)$$

式中 $\varphi = \left(\frac{0.5}{8} \right)^2 = 0.004$,取 $\lambda = 0.5$,代入(3)式可得 $P_2'/P_2 \approx 2$ 。由此可知,设计的特殊反射镜 D 是传统分束片结构接收功率的 2 倍,即提高了到达光电探测器的后向散射光强度。

3.4 准直镜筒的设计

前、后向散射光线经过接收镜筒的光学处理后,转变为直径约为 1.5 mm 的平行光束,且光强较弱,一般情况下需要将该平行光进行聚焦处理以便于光电探测器的有效检测。传统的散射光聚焦光路主要由两片柱面透镜(平凸柱面透镜和双凹柱面透镜)和两个双凸透镜构成^[11-12],如图 5 所示,其中两柱面镜主要完成垂直于样本流方向散射光的整形,两凸透镜对整形后的光束进行二次聚焦。此光路结构设计虽能完成对散射光的聚焦,但实际应用中存在信噪比差、像差较大、信息完整性缺失等问题^[13-15]。

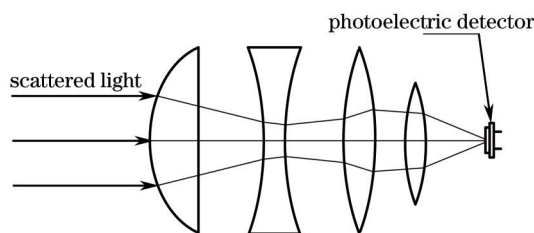


图 5 传统整形聚焦光路结构图

Fig.5 Structure of traditional plastic focusing optical configuration

对传统的聚焦光路进行了改进,光路结构如图 6 所示,该光路由两片柱面透镜、一个平凹透镜和平凸透镜构成,其中柱面镜 1、2 对散射光线进行整形,并有效滤除偏振光,平凹透镜和平凸透镜则完成对整形光束的聚焦。经过处理的光束可在光电探测器处形成直径为 0.4 mm 大小的光斑。通过对两种光路结构的波相差对比分析可知,改进后的光路系统能降低背景杂散光,减小像差,提高了检测结果的准确性。

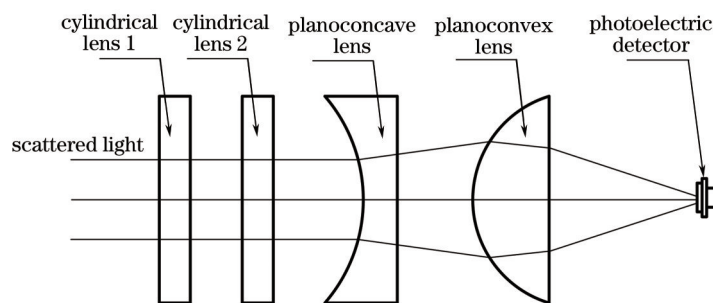


图 6 改进型整形聚焦光路结构图

Fig.6 Structure of improved plastic focusing optical configuration

3.5 信号处理电路的设计

信号处理电路的结构框图如图 7 所示,该部分主要由光电转换电路、信号放大电路和滤波电路组成。前、后向散射光分别经光电转换电路处理后转化为 0.2~3 mV 的电压信号,频率为 0.5~70 kHz。由于转换后的电压信号较弱,且供电电源易引入工频信号的干扰,本文设计了一种两级放大电路和信号滤波电路,用以完成微弱电压信号的放大和滤波。光学数据(FSC、BSC)经过信号电路的处理之后,输出电压大小为 0.9~4.95 V,二者的示波器检测信号如图 8、9 所示,图 8、9 中第一路信号为直流(DC)信号,第二路信号为散射光信号。

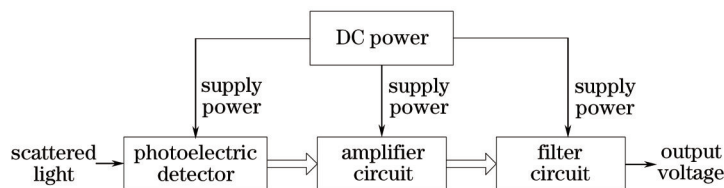


图 7 光电转换电路的结构框图

Fig.7 Structure diagram of photoelectric conversion circuit

4 光学数据的接收与信号处理过程

前、后向散射光经过上述处理后,由控制器对数据进行接收并通过 USB2.0 发送至上位机,以完成光学数据的接收、存储和处理。具体工作流程为:仪器吸取定量的血液样本,经过稀释、溶血等处理后,待测样本进



图 8 白细胞的前向光散射信号
Fig.8 Forward light scattering signal

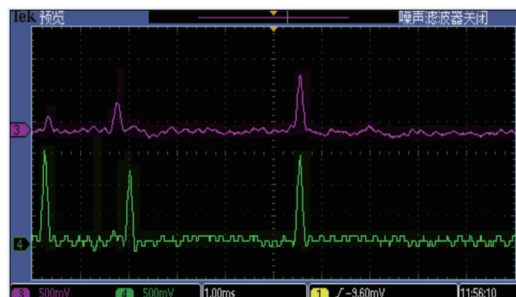


图 9 白细胞的后向光散射信号
Fig.9 Back light scattering signal

入激光照射区并得到每个白细胞的两路光学信号 FSC、BSC,再由控制器将这些数据发送至上位机。上位机接收到一系列白细胞的光学数据后,根据 NEU、LYM、MON、EOS、BAS 之间体积大小与核质比的差异,采用期望最大化(EM)聚类算法完成白细胞的五分类工作。图 10 为某样本的白细胞测试散点图,其中横轴为光学信号 FSC,纵轴为光学信号 BSC,且散点图中共有 5 个分布区域,每个区域代表一种细胞类型,通过统计各区域内数据点的个数即可完成白细胞的五分类。

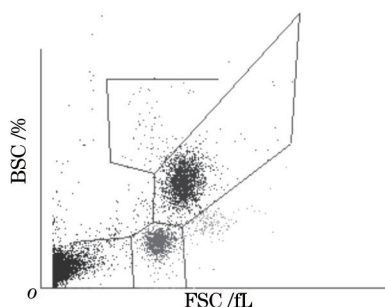


图 10 白细胞散点图
Fig.10 Scatter diagram of WBC

5 实验测试结果

在临床检验与诊断领域,白细胞分类的精密度和相关性 r 是评价五分类血液分析仪的重要指标之一^[16-17]。为验证提出的多维光学系统的可靠性,检验人员按照《中华人民共和国医药行业标准——血液分析仪》的检验方法对 20 位患者的血液样本进行了测试,其中每位患者的样本分为两份,分别用于参考方法和仪器法测试。同时以国外高档五分类血液分析仪 Mythic 22 的检测结果作为对比,测定提出的多维光学系统的分类精密度,其中一份血液样本的测试结果如表 1、表 2 所示,光学系统的相关性测试结果如表 3 所示。

表 1 光学系统的测试结果

Table 1 Precision result of optical system

Item	Result/($10^9/L$)	Manual/($10^9/L$)	Range/($10^9/L$)	Deviation /%
LYM	2.76	2.80	0.80~4.00	1.43
MON	0.65	0.68	0.10~1.80	4.41
NEU	5.30	5.10	2.00~7.80	3.92
EOS	0.35	0.34	0.00~0.50	2.94
BAS	0.41	0.42	0.00~0.20	2.38

表 2 Mythic 22 的测试结果

Table 2 Precision result of Mythic 22

Item	Result /(10 ⁹ /L)	Manual /(10 ⁹ /L)	Range /(10 ⁹ /L)	Deviation /%
LYM	2.76	2.80	0.80~4.00	1.43
MON	0.70	0.68	0.10~1.80	2.94
NEU	5.20	5.10	2.00~7.80	1.96
EOS	0.33	0.34	0.00~0.50	2.94
BAS	0.44	0.42	0.00~0.20	4.76

表 3 光学系统相关性检测结果

Table 3 Correlation result of optical system

Item	Mean /%		Slope <i>a</i>	Intercept <i>b</i>	<i>r</i>
	Instrument	Manual			
NEU	64.89	64.93	0.917	1.973	0.9335
LYM	23.63	23.71	0.902	4.683	0.9531
MON	9.34	9.19	0.499	4.976	0.6873
EOS	1.72	1.75	0.047	0.935	0.9277
BAS	0.47	0.46	0.261	0.467	0.5573

由表 1~3 数据可知,两款仪器的相对偏差值接近(小于 5%),且装有该光学系统的样机对 NEU、LYM、BAS 的相关性 $r > 0.9$, MON 与 BAS 的相关性 $r > 0.5$,满足国家医药行业标准中的相关要求,实现了高精度和高性能。

6 结 论

设计了一种应用于五分类血液分析仪的多维光学系统,并详细介绍了系统中各光学部件的结构设计和上位机对光学信号的处理过程。该系统引入对后向散射光的检测完成了细胞核质比的测定,与目前广泛应用的光电检测技术的系统结构相比,该系统具有结构简单、测试精度高、通用性强等优势。从测试结果看,装有该系统的样机对 LYM、MON、NEU、EOS 和 BAS 的测试相对偏差小于 5%,与国外高档分析仪 Mythic 22 的测试性能接近。该系统可完成细胞体积和核质比的检测,并能对白细胞进行准确识别和初步分类,但对血细胞形态和细胞图像等具体参数的获取还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Yan Zhidan, Sun Lidong, Hu Chunguang, *et al.*. Real-time fluorescence microscopic image acquisition and analysis system for thin-film growth investigation[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(9): 0931002.
鄢志丹, 孙立东, 胡春光, 等. 薄膜生长荧光显微图像实时采集与分析系统[J]. *光学学报*, 2012, 32(09): 0931002.
- 2 Wu Jian, Zhao Ting, Tan Yingjun, *et al.*. Subcellular spot detection for fluorescence microscopic images[J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2012, 31(6): 925-933.
吴 坚, 赵 挺, 谭映军, 等. 荧光显微图像亚细胞斑点检测方法研究进展[J]. *中国生物医学工程学报*, 2012, 31(6): 925-933.
- 3 Li Zhen, Qu Junle, Shao Yonghong, *et al.*. Multiple variational field-of-view multifocal multiphoton fluorescence microscope[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(10): 1018001.
李 震, 屈军乐, 邵永红, 等. 多变视场的多焦点多光子激发荧光显微技术[J]. *光学学报*, 2012, 32(10): 1018001.
- 4 Sun Han, Grazia Lamanna, Bernhard Weigand. Measurement technique and verification of accuracy for particle sizing by low angle elastic light scattering[J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(3): 0308004.
孙 晗, Grazia Lamanna, Bernhard Weigand. 小角弹性光散射粒径测量技术与准确性验证[J]. *中国激光*, 2013, 40(3): 0308004.
- 5 Li Huiguang, Wang Shuai, Sha Xiaopeng, *et al.*. Study of auto focusing technique of micro-vision system[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2014, 41(8): 1-9.
李惠光, 王 帅, 沙晓鹏, 等. 显微视觉系统中自动聚焦技术的研究[J]. *光电工程*, 2014, 41(8): 1-9.
- 6 Zhang Shuqing, Wang Jingyang, Wang Zhile, *et al.*. Design of infrared optical system for multi-target compounded simulator[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2014, 22(6): 1454-1460.
张树青, 王敬洋, 王治乐, 等. 红外多目标复合仿真光学系统设计[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(6): 1454-1460.

- 7 Ding Chizhu, Yang Kecheng, Li Wei, *et al.*. Intensity distribution of polarized light scattering for a nucleated cell[J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(11): 1129001.
丁驰竹, 杨克成, 李 微, 等. 有核细胞对偏振光的散射强度分布[J]. *光学学报*, 2013, 33(11): 1129001.
- 8 Su Hangli, Lu Yongsheng. Measurement of particle size by KML back extinction equation[J]. *Acta Electronica Sinica*, 2014, 42(4): 736-739.
苏杭丽, 卢永生. 库莫洛后向消光理论在测量颗粒粒径中的应用[J]. *电子学报*, 2014, 42(4): 736-739.
- 9 Wang Yawei, Wang Xiankai, Shang Xuefu, *et al.*. Optimal design of a multidimensional optical sensing system in biological cell subclass identification[J]. *Laser Journal*, 2011, 32(4): 41-44.
王亚伟, 王先凯, 尚学府, 等. 生物细胞亚类识别多维光学传感光路优化设计[J]. *激光杂志*, 2011, 32(4): 41-44.
- 10 Liu Xuening, Wang Jiming, He Chongjun, *et al.*. Backward focus engineering with controlled cylindrical vector beams under different numerical apertures[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(1): 0114004.
刘雪宁, 王吉明, 赫崇君, 等. 不同数值孔径下调控矢量光束聚焦场的反向构建[J]. *光学学报*, 2014, 34(1): 0114004.
- 11 Lü Weizhen, Liu Weiqi, Wei Zhonglun, *et al.*. Design of optical systems in large screen projection ultrathin display[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2014, 22(8): 2020-2025.
吕伟振, 刘伟奇, 魏忠伦, 等. 大屏幕投影显示光学系统的超薄化设计[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(8): 2020-2025.
- 12 Ren Guangsen, Wu Wuming, Ning Yu, *et al.*. Tight focusing of a radially polarized coherent beams array[J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(1): 0102003.
任广森, 吴武明, 宁 禹, 等. 径向偏振相干光束阵列的深聚焦[J]. *中国激光*, 2014, 41(1): 0102003.
- 13 Gong Dun, Wang Hong. Optical design of large field and low distortion coaxial three mirror system with free form surface[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(7): 0722001.
巩 盾, 王 红. 含有自由曲面的大视场低畸变同轴三反射光学系统设计[J]. *光学学报*, 2014, 34(7): 0722001.
- 14 Gong Dun, Wang Hong. Optical design of hyperspectral imaging spectrometer on space[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2014, 43(2): 541-545.
巩 盾, 王 红. 空间高光谱成像仪的光学设计[J]. *红外与激光工程*, 2014, 43(2): 541-545.
- 15 Feng Fan, Duan Fajie, Bo En, *et al.*. An optical design of small-size echelle spectrograph[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2014, 41(7): 20-25.
冯 帆, 段发阶, 伯 恩, 等. 一种小型中阶梯光栅光谱仪的光学设计[J]. *光电工程*, 2014, 41(7): 20-25.
- 16 Chen Huayu, Zhang Li, Li Nan, *et al.*. Evaluation on method performance decision chart of automatic blood coagulation analyzer[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2014, 35(15): 2071-2072.
陈化禹, 张 立, 李 楠, 等. 全自动血凝分析仪的方法性能决定图评估[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(15): 2071-2072.
- 17 Jia Lifang, Huang Hui, Zhang Yunfei. Performance evaluation of Orphee-Mythic22 automatic hematology analyzer and the comparative analysis with sysmex[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2013, 10(8): 949-952.
贾黎方, 黄 辉, 张云飞. 不同型号血细胞分析仪的性能评价及对比分析[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(8): 949-952.

栏目编辑: 吴秀娟