

使用 AccuSizer 780 对红、白血细胞进行粒径检测及颗粒计数

传统意义上,红细胞和白细胞都是用电阻法计数的。这种方法测量的是当分散在导电介质中的粒子通过小孔时,电阻的增加或相反,电导率的减少。这种反应的大小与粒子的体积和大小有关。尽管这项技术多年来一直适用,但本文证明,使用 SPOS(单粒子光学传感)结合自动稀释功能对红细胞和白细胞的大小及颗粒计数检测,可以比电阻法更易于使用和更少的稀释剂限制。

AccuSizer 780 利用光阻或单粒子光学传感(SPOS)的原理来计数及检测粒子大小,一次检测一个粒子。单个粒子通过传感器,并进入激光带。当它们进入激光束时,光线被阻挡,探测器记录下光强度的下降。光强减少的值,当然,与粒子的横截面积成正比。在我们的自动稀释模块中,如果超过一个粒子通过敏感区的概率高(这个概率与粒子浓度有关),样品将自动稀释。分散液的粒子可被稀释,并以一种可以在短时间间隔(500,000 粒子/分钟)内计数的速度流入感应区,而不会产生重合效应。这意味着得到的颗粒大小分布是一个真实的颗粒大小分布,一次建立一个颗粒,具有很大的统计精度。不需要复杂的数学算法,只需要一条校准曲线来转换脉冲高度到直径。由于自动稀释的能力,我们可以确定在一个时间只有一个粒子在检测区域,所以所有进入到检测区域的粒子都是完整的计数,并且只计数一次。这样的测量可以直接测定高分辨率颗粒粒径分布(psd),或者在 psd 主要低于一微米的情况下,可以观察到粗颗粒尾部的复杂形状。如前所述,780 大小和计数粒子。这样不仅可以得到粒度分布数据,而且可以得到定量计数信息。

本文采用带有自动稀释装置的 AccuSizer 780 进行实验,它被用来测试一种将全血分离成初始状态的新仪器的效率。在大多数医院,血细胞计数使用电阻法。电阻法采用一种电化学电池,由浸入盐水中的两个电极组成,并由一个带有小孔的非导电玻璃屏障隔开,允许电荷从一个电极流向另一个电极。血液样本会从细胞的一测注入。玻璃屏障上的压力差会导致液体流过小孔。流动的液体会带着细胞穿过小孔。由于细胞是不导电的,一旦进入小孔,它们就会减少电极间的电荷流动,从而测量到相应的电流减少(或维持电流所需的电压增加)。这个响应与单元的排除体积成比例。通过这种方式,可以对细胞进行粒径大小检测和计数。

在多年的使用中,电阻法存在着一些缺点。首先是需要一种高导电性的稀释剂来悬浮粒子。这大大增加了操作成本。其次,小孔容易堵塞。最后,由于孔径如此之小,液体的流动速度和计数颗粒的速度都有限制。所有这些问题都阻碍了将电阻法作为被测血液分离设备的附加模块的使用。AccuSizer 780 没有受到上述问题的阻碍。由于该技术是基于光学的,任何合适的稀释剂都可以使用。这对于血液分离装置的使用很重要,因为它需要不同的缓冲溶液来实现不同程度的分离。其他离子的存在会对期望的分离产生不利影响。780 中使用的流通池相对于红细胞和白细胞(以及血块和其他大的聚集物)的大小相当大,所以阻塞很少。最重要的是,大流量流通池将允许流速高达 120 cc/min。这样的流速使得样品在分析前的自动稀释是可行的。

由于来自分离器的血液成分非常浓,因此需要稀释才能准确计算血细胞数量。为这个实验生产的血细胞馏分从主要含有红细胞到含有大量白细胞的馏分不等。6 种不同百分比的血液检测结果如图线 4-9,图线由 ZETA 电位检测结果建立(AN 160 文献),其中百分比 4 号几乎全是红细胞。浓度 5-9 号分别含有的白细胞数量逐步上升。

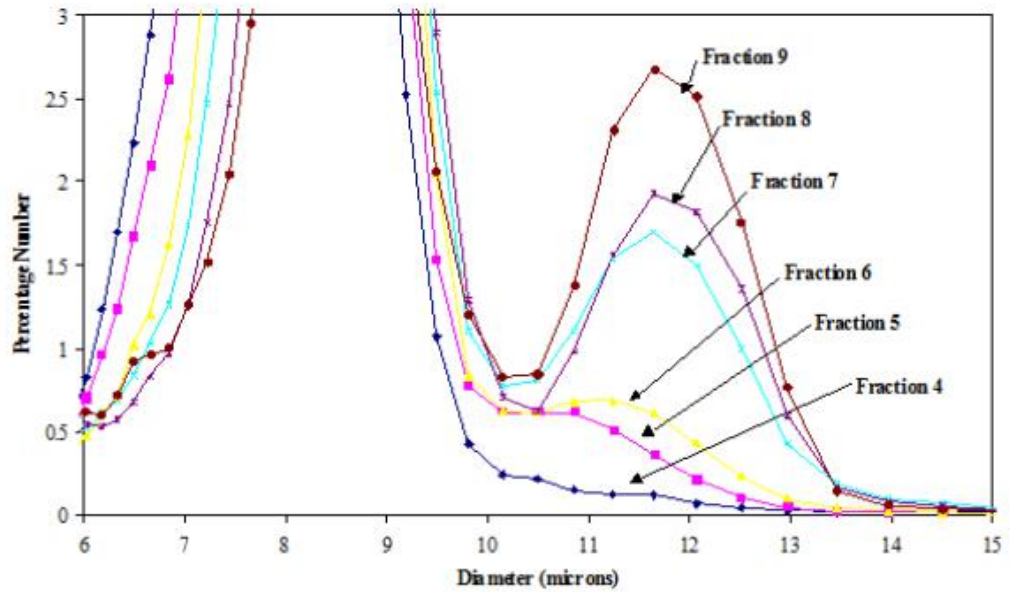


图 1: 不同细胞含量的对比图

除分数 4 外, 每个分布由两个窄峰组成。第一个红细胞的平均直径为 8.5 微米, 与已知红细胞大小相关。另一个峰的平均直径为 11-12 微米。这个峰值与白细胞的已知值相匹配。所以把第一个峰(峰 1)归为红细胞第二个峰(第 2 峰)归为白细胞是有理有据的。注意, 在图 1 中, 第二个峰值中的计数从分数 4 中的几乎为零增加到后面每个分数中的越来越大的数量。首先, 这表明分数 4 实际上完全是红细胞。这一数据还表明, 其他部分的白细胞变得更丰富。图 2 包含了用几种方法绘制白细胞和红细胞比例的图表。

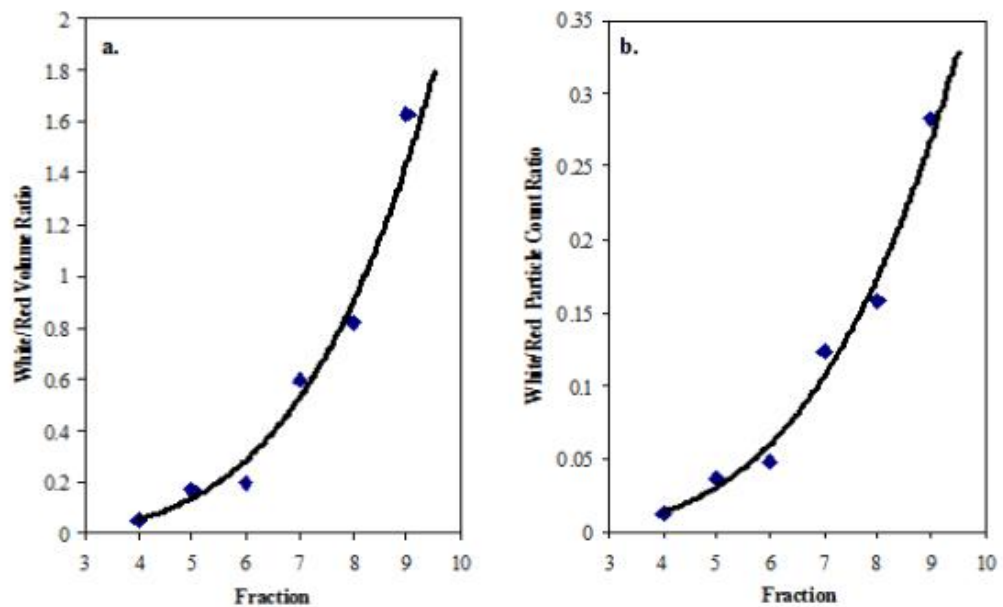


图 2:a. 白、红细胞体积百分数与血液百分数比值;b. 白、红细胞计数与血液百分数的比值

图 2a 是峰 2 粒子体积与峰 1 粒子体积之比, 图 2b 是峰 2 粒子数量与峰 1 粒子数量之比。这些计算证明, 血液分离装置能够分离红细胞和白细胞, 并分离到何种程度。为了便于比较, 值得一提的是, 红细胞与白细胞的正常比率约为 500 比 1(数值比为 0.002)。我们可以看到分数 5-9 有更大的比率(分数 9 的比率接近 0.3, 是比正常情况高出 100)进一步说明了分离

装置的效率。该数据还表明，780 可以用于定量地测量一次测量中红细胞和白细胞的相对数量。当使用电阻法来计数白细胞时，必须先溶解(破坏)红细胞，因为红细胞的绝对数量往往会使计数白细胞更加困难和不准确。众所周知，溶解作用同时影响红细胞和白细胞:红细胞几乎全部被破坏，而白细胞的细胞膜被剥离，但倾向于结合在一起作为不同的颗粒。图 3 包含测量前从裂解分数 6 获得的分布。裂解后，在约 6-7 微米处出现一个单峰。计数的数量大大减少。根据我们所知道的溶解化学物质的影响，图 3 中计数的颗粒是由于溶解而缩小的白细胞的残留物。溶菌前峰值 2 的实际计数与溶菌运行时的计数数接近。

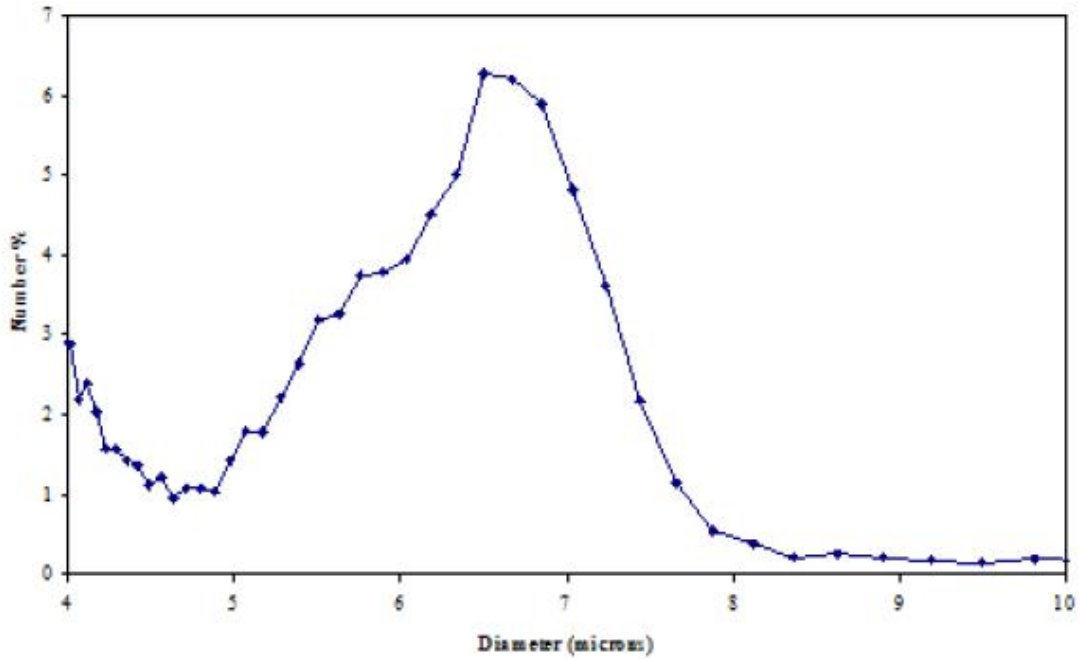


图 3: 红细胞溶解后分数 6 的 PSD

综上所述，本文的数据说明 SPOS 可以同时计数红细胞和白细胞。此外，它可以自动检测，AccuSizer 780 可进行自动稀释。红和白细胞都可以通过这种方式定量分析，而不需要溶解红细胞。研究人员确定，溶解确实完全破坏了红细胞，但它只是将白细胞的大小从 12 微米减小到 6.5 微米。