

ÖSSZEFOGLALÁS:

A COULTER – SZÁMLÁLÓ: Az elektromosan rosszul vezető részecskéket tartalmazó, jól vezető híg diszperziót egy kis nyíláson szívják át, miközben elektródokon állandó intenzitású áramot vezetnek a diszperzió kapillárisal elválasztott két felébe. Ha egy részecske kerül a nyílásba, a keresztmetszet leszűkül, így a nyílásban lévő oldat ellenállása megnő, és a részecske térfogatával arányos feszültségimpulzus keletkezik.

ÁRAMGENERÁTOR: olyan áramforrás, amelynek kimenőárama állandó, belső ellenállása végtelen. A rákapcsolt ellenállás nagyságától függően pólusain $U = I_{\text{gen}} \cdot R$ feszültség keletkezik.

INTEGRÁL DISZKRIMINÁTOR: olyan jelszelektáló eszköz, amely egy bizonyos feszültség szintnél, az integrál diszkriminátor szintjénél (U_d) nagyobb amplitúdójú impulzusokat átengedi, de a kisebb amplitúdójúakat nem. A jelhez képest kis amplitúdójú impulzusok (pl. zajimpulzusok) kiszűrésére alkalmas.

DIFFERENCIÁL DISZKRIMINÁTOR: olyan jelszelektáló eszköz, amely két feszültség szint közötti, ún. csatornába eső amplitúdójú impulzusokat átengedi, a kívülre esőket viszont nem. A csatorna helyzete (közepes diszkriminációs szint, U_d), és a csatorna szélessége változtatható. A jelek amplitúdója szerinti osztályozásra alkalmas eszköz.

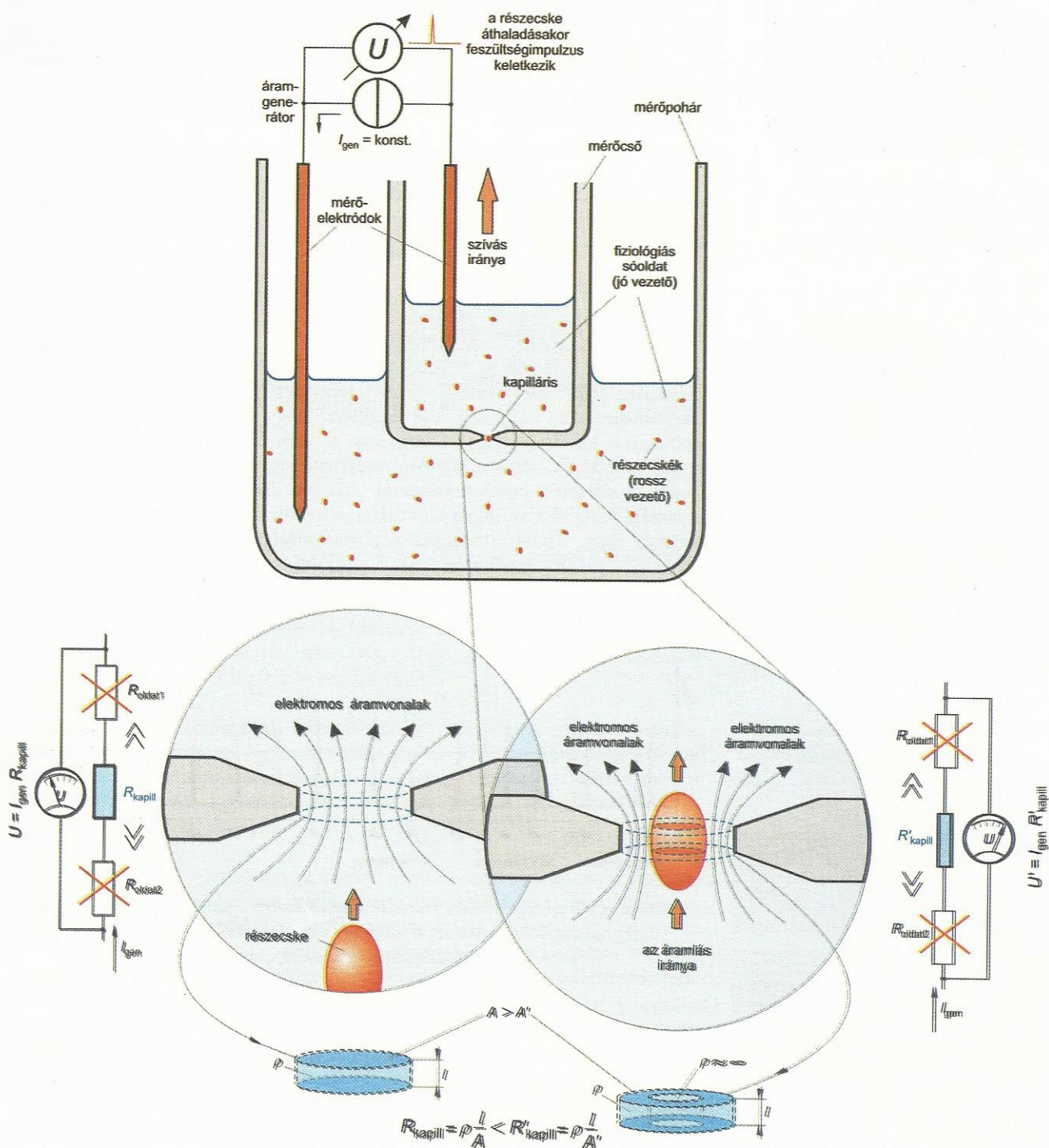
SOKCSATORNÁS ANALIZÁTOR: Ha sok differenciál diszkriminátor áramkört úgy működtetünk egymás mellett, hogy azok csatornái egymáshoz illeszkednek, az ún. **sokcsatornás analizátorhoz** jutunk. Az impulzusok amplitúdó szerinti gyakorisági eloszlása hisztogram formájában egyidőben kijelezhető.

A vér alakoselem-koncentrációjának meghatározására a legelterjedtebb módszer az elektronikus számlálási eljárás, ezt valósítják meg a **Coulter-számlálók**. A korszerűen felszerelt orvosi laboratóriumokban egyszerre sok paramétert meghatározó és méreteloszlást is készítő hematológiai automatákat használnak. Gyakorlatunk célja egy elektronikus úton történő alakoselem számlálási módszer megismertetése.

Kapcsolódó részek:
Damjanovich-Fidy-Szöllösi:
VII/1.1.4.

ELMÉLETI ÖSSZEFOGLALÁS

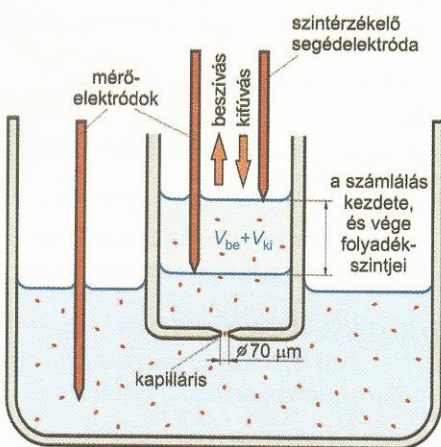
A berendezés elvi felépítése az 1. ábrán látható. Működése a következő: A fiziológias sóoldatban (elektrolit, jó vezető) előírás szerinti mértékben **hígított vérmintát** egy szivattyú felszívja a mérőcsőbe, a mérőcső alján lévő kis nyíláson, a **kapillárison** keresztül. Amint az elektrolit eléri a mérőcsőbeli mérőelektrodot, záródik a mérőáramkör, amelynek ellenállását a **mérőcső kapillárisában lévő elektrolit ellenállása** adja (az egyéb ellenállások ehhez képest elhanyagolhatók). Amíg tiszta elektrolit tölti ki a kapillárist, annak ellenállásán az állandó intenzitású mérőáram állandó feszültségességet hoz létre.



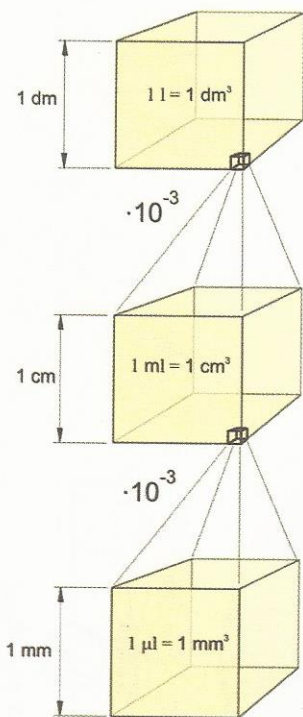
1. ábra. A Coulter-számláló elvi működése.

Áramgenerátor: olyan áramforrás, amelynek kimenőárama állandó, belső ellenállása végtelen. A rákapcsolt ellenállás nagyságától függően pólusain $U = I_{gen} \cdot R$ feszültség keletkezik.

Feszültséggenerátor: olyan feszültségforrás, amelynek kimenőfeszültsége állandó, belső ellenállása nulla. A rákapcsolt ellenállás nagyságától függően $I = U_{gen} / R$ áram folyik.



2. ábra. A beszívás és a kifúvás alatt a készülék kétszer számolja le az adott térfogatban lévő alakos elemeket.



3. ábra. $1 \mu\text{l} = 10^{-6}\text{l}$.

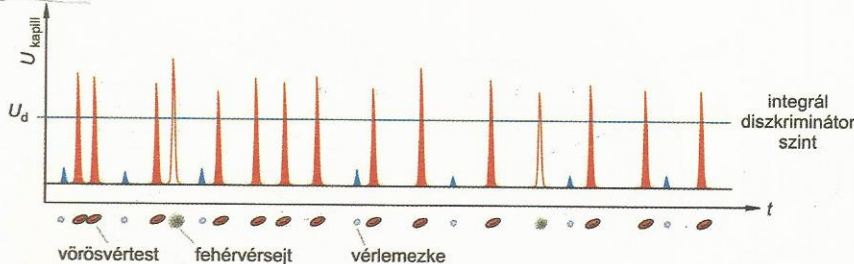
Amikor azonban — eltérő fajlagos ellenállású — alakoselem (általában rossz vezető, $\rho \approx \infty$) halad át a kapillárison, a kapilláris áramvezető keresztmetszete lecsökken (1. jobb alsó ábra). Ez a kapilláris ellenállásának (R_{kapill}) pillanatnyi megnövekedését okozza ($R'_{kapill} > R_{kapill}$). Mivel a mérőáram (I_{gen}) állandó, az Ohm-törvény értelmében ($U = I_{gen} R'_{kapill}$) a feszültség az áthaladás ideje alatt megnő, azaz minden egyes részecske áthaladása egy feszültségimpulzust vált ki. Az impulzusok amplitúdója a részecske térfogatával arányos.

Az oldat beszívása addig tart, amíg az elektrolit el nem éri a segédelektrodát (2. ábra), amelynek áramköre ekkor kifúvásra állítja át a szivattyút. A mérőcső kiürülése folyamán (a készülék ekkor is számlál) az elektrolit elhagyja a mérőcsőbeli mérőelektrodát, ekkor megszakad a mérőáramkör, és véget ér az impulzusok kialakulása és számlálása. Végül is a mérőcsőbeli mérő- és segédelektrod magassága és a mérőcső keresztmetszete által meghatározott térfogatot a készülék kétszer méri meg ($V_{be} + V_{ki}$), de ezt automatikusan figyelembe veszi a kijelzett eredményben.

Alakoselem - koncentráció az 1 µl (ill. 1 liter) vérben lévő alakoselemek számát értjük; pl. az emberi vér vörösvértest-koncentrációja kerekítve $c_{vvt} = 5 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$ (ill. $c_{vvt} = 5 \cdot 10^{12} / \text{l}$, 3. ábra). Az alábbi táblázatban a vér alakos elemeinek tipikus koncentrációira, ill. a méreteire vonatkozó referencia tartományokat ($\bar{x} \pm 2s$) közöljük:

	vörösvértest	fehérvérsejt (granulocita)	fehérvérsejt (limfocita)	vérelemzke
koncentráció (1/µl)	4-5,9 · 10 ⁶	3-7 · 10 ³	1,2-3 · 10 ³	1,5-4 · 10 ³
átmérő (µm)	7-8	10-12	5-6	2-3

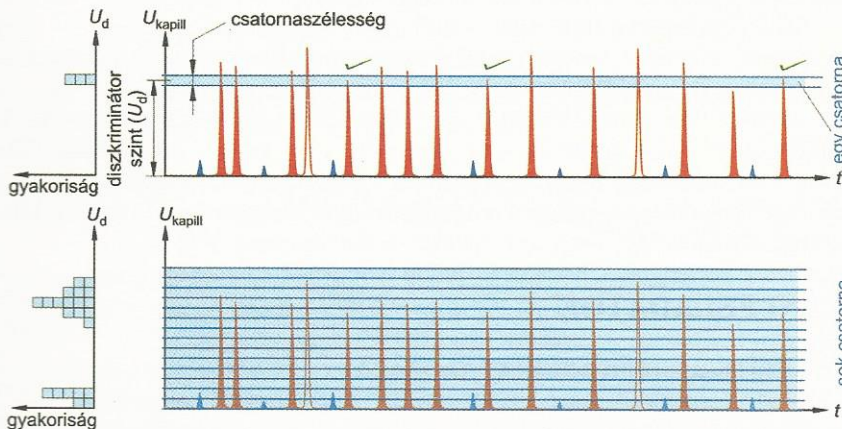
A mérésünkben használt Coulter-számlálóban (PICOSCALE) az impulzusok amplitúdóját egy erősítő megnöveli. Ezután egy integrál diszkriminátor (ID, lásd 9. NUKLEÁRIS ALAPMÉRÉS) kiszűri az alacsony amplitúdójú zajimpulzusokat, amelyek pl. a mérendőnél kisebb méretű szennyező részecskéktől származnak. Pl. vörösvértest, vagy fehérvérsejt mérésekor, az integrál diszkriminátor szint (U_d) úgy van beállítva, hogy az áramkör a vérelemzkek impulzusait is kiszűri (4. ábra). Ezután egy, az impulzusszámot csökkentő leosztó-áramkör következik, végül a kijelzőn megjelenik egy számérték, amely az eredeti vérminta alakoselem-koncentrációjával arányos (lásd a címlap ábráját). Az arányossági tényező a vérminta hígításától, a mérőtérfogattól és az impulzusosztás mértékétől függ. Vörösvértestszám meghatározásához előírt hígítás esetén ez az együttható $10^4 / \mu\text{l}$ tehát ha pl. a kijelző $n = 661$ -et mutat, akkor $n \cdot 10^4 = 6\,610\,000 / \mu\text{l}$ az eredmény. Ez annyit jelent, hogy az eredeti hígítatlan vérmintának 1 µl térfogata 6,61 millió vörösvértestet tartalmazott, ha a hitelesítési érték = 1 (lásd később).



4. ábra. A vér alakos elemei méretük szerint szétválaszthatóak. Az ábrán az integrál diszkriminátor szint vörösvértest számolására van beállítva (a fehérvérsejtek kis száma nem okoz számottevő hibát).

Méréshez a vérmintát gondosan szűrt fiziológiás sóoldatban kell hígítani: ez egyrészt épségben tartja az alakoselemeket, másrészt a méréshez szükséges elektromos vezetőképességet is biztosítja. Vörösvértest számlálásához előírt hígítási arány: 1:63 000. A mérőtérfogat (lásd a 2. ábrát) egyedi pontatlansága miatt a mért koncentráció eltérhet a ténylegestől. Ezért a gyártó cég a vérejt-számláló automaták működésének ellenőrzésére, ill. hitelesítésére redcal néven hitelesítő szuszpenziót hoz forgalomba. Ez a szuszpenzió speciálisan stabilizált emberi vörösvértesteket tartalmaz, melyeknek koncentrációját a gyártó megadja.

A hematológiai automatákban alkalmazott impulzusamplitúdó-analizátor az ún. **differenciál diszkriminátor (DD)** elvére épül. A DD-alapáramkörben nem egy diszkriminátor szint van (mint az ID-nél), hanem kettő. Az áramkör akkor engedi a jeleket megszámolni, amikor a jel amplitúdója a két DD-szint közé, az ún. **csatornába** esik (a csatorna alsó szintje alatt, ill. felső szintje felett nem veszi figyelembe a jeleket) (5. felső ábra).



5. ábra. A differenciál diszkriminátor (felül), és a sokcsatornás analizátor (alul) működése.

A csatorna helyzete (közepes diszkriminációs szint, U_d), és szélessége változtatható. Sorozatos mérésekkel, a csatorna helyzetét változtatva feltérképezhető a részecskék méreteloszlása, és hisztogramban ábrázolható.

Ha sok DD-áramkört úgy működtetünk egymás mellett, hogy azok csatornái egymáshoz illeszkednek, az ún. **sokcsatornás analizátorhoz** jutunk (5. alsó ábra). A bemutató mérésben használt **LABORSCALE** analizátora 64 db, egyidőben működő, lépcsőzetesen eltolts csatornában gyűjti az egyes amplitúdótartományokba eső impulzusokat, így az impulzusok amplitúdó szerinti gyakorisági eloszlása hisztogram formájában egyidőben kijelvezhető (6. ábra).

A MÉRÉS MENETE




BEMUTATÁS




1. Egy, a PICOSCALE-hez hasonló Coulter-számlálót, az ún. **LABORSCALE-t** és a hozzákapcsolt 64 csatornás impulzusamplitúdó-analizátort mutatunk be (6. ábra). A műszerrel felvesszük a *redcal* szuszpenzió alakoselemeinek nagyság szerinti gyakorisági eloszlását; az eloszlás az analizátor katódsugárcső ernyőjén jelenik meg. Ezt a gyakorisági eloszlást (hisztogramot) XY-íróval papíron regisztráljuk is.
2. **Hematológiai automatával** analizálunk egy vérmintát. A hematológiai automaták mérési elve ugyanaz, mint ami a Coulter-számlálóké, de az impulzusok amplitúdó-analízise számos egyéb paraméter meghatározását is lehetővé teszi. A különböző alakoselemek mérése a gyakorlatban a következőképpen történik:




- **Vörösvértest** számláláshoz a diszkriminátor szintet oly módon állítják be, hogy a kisebb méretű vérlemezkék ne kerüljenek megszámolásra (4. ábra). A fehérvérsejtek mérete ugyan közel azonos, vagy nagyobb, mint a vörösvértesteké, ez azonban nem okoz jelentős hibát, mivel a fehérvérsejtek koncentrációja csak 1-2 ezredrésze a vörösvértestekének. (A mérési pontatlanság ennél sokkal nagyobb mértékű.)
- A **fehérvérsejtszám** meghatározásához a két mérettartomány közötti átfedés, valamint a vörösvértestek nagy száma miatt a vörösvértesteket előzetesen hemolizálni kell.
- A **vérlemezkék** kis méretük miatt jól elválasztódnak a nagyobb alakoselemektől, így külön kezelés a vérlemezkék számlálásához nem szükséges.



6. ábra. A LABORSCALE és a 64 csatornás impulzusamplitúdó-analizátor lehetővé teszi az alakoselemek méret szerinti eloszlásának vizsgálatát.

 vörösvértest, vvt
 red blood cell, RBC
 rotes Blutkörperchen, Erythrozyt

 fehérvérsejt, fvs
 white blood cell, WBC
 weisse Blutzelle

 vérlemezke, trombocita
 platelets, PLT
 Blutplättchen, Thrombozyt

A gyakorlatunkon használt automata (Sysmex F-800) számára 20 μl vért hígítunk első lépésben 1:500 arányban, majd ennek egy kis részét 100-szoros térfogatra tovább hígítjuk (hígítása tehát 1:50000).

- Az első hígításból történik a fehérvérsejt számlálás (ezért ehhez mérés előtt hemolizáló anyagot adunk), és a hemoglobin koncentráció fotometriás meghatározása;
- A második hígításból vörösvértesteket és vérlemezkéket számol az automata.

A két hígítást két külön detektor (mérőkapilláris és elektródok) méri, a mikroprocesszor másodpercek alatt elvégzi a teljes adatfeldolgozást, katódsugárcsővön megjeleníti a kiszámolt paramétereket, végül az egész jegyzőkönyv kinyomtatható. Egy ilyen jegyzőkönyv felnagyítva az automata fölé függesztve látható.

EGYÉNI FELADATOK

A HITELESÍTÉSI ÉRTÉK MEGHATÁROZÁSA

A mérőcsövek eltérő méretéből, ill. a mérő- és segédelektroda függőleges távolságából adódó térfogat készülékenként más-más értékű, ezért minden műszert először hitelesíteni kell. A **hitelesítési érték** megadja, hogy a **tényleges és a mért részecske-koncentráció** milyen arányban áll egymással. Evégből a **hitelesítő redcal szuszpenzió** ismert, **tényleges koncentrációját** ($c_{\text{tényl}} (1/\mu\text{l})$) elosztjuk a szuszpenzió megmérésekor kapott koncentrációval ($c_{\text{mért}} = n \cdot 10^4 (1/\mu\text{l})$), ahol n a kijelzőről leolvasott szám. Így a hitelesítési érték (h):

$$h = \frac{c_{\text{tényl}}}{c_{\text{mért}}} = \frac{c_{\text{tényl}}}{n \cdot 10^4 / \mu\text{l}} \quad (1)$$

Az így kapott h hitelesítési értékkel kell megszorozni a továbbiakban ugyanezen készülékkel mért vörösvértest koncentrációt ($c_{\text{mért}} = n \cdot 10^4 / \mu\text{l}$) azért, hogy annak **tényleges értékét** ($c_{\text{tényl}}$) megkapjuk.

$$c_{\text{tényl}} = h \cdot c_{\text{mért}} = h \cdot n \cdot 10^4 / \mu\text{l} \quad (2)$$

A MÉRÉS LEÍRÁSA

Valamennyi mérésünket 70 μm -es mérőkapillárisal és 400 μA -es mérőárammal végezzük (mérőáram gomb benyomva, lásd a címlap ábráját). A mérésekhez **redcal** szuszpenziót használunk, amely a gyakorlaton az előírt hígításban áll rendelkezésre. A mérőcső a mérésen kívüli időben tisztító oldatot tartalmazó üvegcsőbe merül (7. ábra, **JELZETLEN**). A mérés a START gomb lenyomásával indítható.

1. Ellenőrizzük a minta hígításához használt **fiziológiás sóoldat** (7. ábra, **SÁRGA**) tisztaságát 10-szeres érzékenyséű kijelzéssel ($\times 10$ szorzógomb benyomva)! Az ellenőrző mérést a vörösvértesteknek megfelelő ID-szint (RBC-gomb benyomva) mellett végezzük (az együttható a 10-szeres érzékenység miatt most csak 10^3)! Az észlelt részecskeszám a mintabeli részecskeszám mérésekor is jelentkezik, mint háttér. (Ha a háttér nem több, mint $10\text{-}20 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$, akkor figyelmen kívül hagyhatjuk. A magas háttér oka általában gombás szennyeződés: ez esetben új oldatokat és mintát kell készíteni.)
2. Mérések **ismert koncentrációjú** redcal szuszpenziót ($c_{\text{tényl}} = 4,61 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$) tartalmazó mintán (7. ábra, **FEKETE**, a $\times 10$ szorzógomb kiengedve).
 - a) Mérjük az ismert koncentrációjú mintán impulzusszámot (n , a kijelzőről leolvasott szám) gyárilag előre beállított ID-szint (RBC-gomb benyomva) mellett!
 - b) Határozzuk meg a műszer h hitelesítési értékét (lásd (1) képlet)!

Az alábbi példában legyen a hitelesítő **redcal** szuszpenzió **tényleges koncentrációja**:

$$c_{\text{tényl}} = 4,61 \cdot 10^6 / \mu\text{l}.$$

Egy adott készülékkel az alábbi **redcal** koncentrációt mértük:

$$c_{\text{mért}} = n \cdot 10^4 / \mu\text{l} = 589 \cdot 10^4 / \mu\text{l}.$$

A hitelesítési érték (1) alapján:

$$h = \frac{4,61 \cdot 10^6 / \mu\text{l}}{589 \cdot 10^4 / \mu\text{l}} = 0,78.$$

Ha az ismeretlen vörösvértest minta mérésekor pl. $n = 661$ impulzust kapunk, a **tényleges vvt koncentráció** (2) alapján:

$$c = 0,78 \cdot 661 \cdot 10^4 / \mu\text{l} = 515 \cdot 10^4 / \mu\text{l} = 5\,150\,000\,1/\mu\text{l}$$



JELZETLEN:
tisztító oldat



SÁRGA:
 $c = 0$
fiziológiás
NaCl oldat



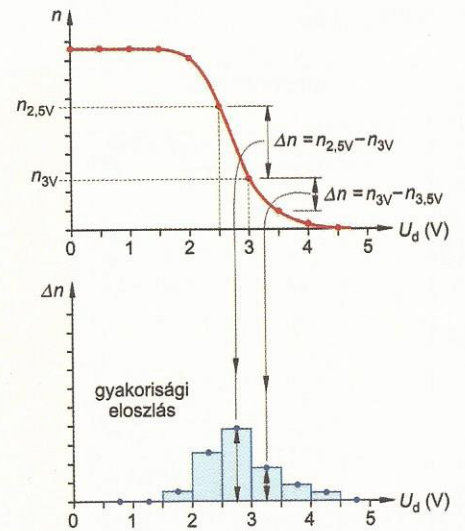
FEKETE:
 $c_{\text{tényl}} = 4,61 \cdot 10^6\,1/\mu\text{l}$
ismert redcal
koncentráció



PIROS:
 $c_x = ?$
ismeretlen
koncentráció

7. ábra. A méréshez szükséges oldatok jelzései.

- c) MÉRJÜNK a mintán impulzusszámot változtatható ID üzemmódban (ID 0-100 gomb benyomva)! A tolópotenciométerrel növeljük az ID-szintet (U_d) 0-tól kezdve 0,5 V-onként (5 osztásonként), amíg az impulzusszám a háttér néhányszorosáig csökken!
- d) Ábrázoljuk a (c) pontbeli mérések eredményét (az n impulzusszámot az ID-szint (U_d) függvényében, lásd 8. felső ábra) milliméterpapíron!
- e) Keressük meg a grafikonon, hol lehet az RBC álláshoz tartozó, gyárilag beállított diszkriminációs szint ($U_{d,RBC}$)!
- f) Számoljuk ki a (c)-pontbeli impulzus-számokból a 0,5 V szélességű amplitúdó osztályokhoz tartozó impulzus gyakoriságokat (pl. a 2,5 V - 3 V intervallumhoz tartozó impulzus gyakoriságot úgy kapjuk meg, hogy a 2,5 V-nál mért impulzus számból kivonjuk a 3 V-nál kapottat $\Delta n = n_{2,5V} - n_{3V}$)!
- g) Rajzoljunk hisztogramot az (f) pont adataiból (a Δn impulzusszám az U_d ID-szint függvényében, 8. alsó ábra); majd hasonlítsuk össze ezt a hisztogramot azzal, amit ugyanilyen mintából a LABORSCALE készített, valamint azzal, amit a Sysmex F-800 automata nyomtatott!



8. ábra. A részecskék méretének gyakorisági eloszlásának származtatása az integrál diszkriminátoros (ID) mérésekből.

3. Mérések ismeretlen koncentrációjú mintán (7. ábra, **PIROS**).
- a) MÉRJÜNK meg az ismeretlen koncentrációjú (c_x) minta impulzusszámát (n) gyárilag előre beállított ID-szint (RBC gomb benyomva) mellett!
- b) A hitelesítési érték figyelembevételével határozzuk meg a minta valódi koncentrációját ($c_x = h \cdot n \cdot 10^4 / \mu\text{l}$)!

Ügyeljünk a következőkre:

- A mérendő szuszpenziót mérés előtt alaposan fel kell rázni.
- Ne hagyjuk fedetlenül a mérendő oldatok üvegeit, hogy elkerüljük a porszenyeződést!
- Minden impulzusszámot 3 mérésből átlagolással határozzunk meg (n_{atl})! A három mérésből az esetleges „nagyon kiugró” eredmény részleges dugulás következménye lehet, figyelembe venni nem szabad, újra kell mérni.
- A mérőkapilláris eldugulása esetén:
 - a) ha beáramlás akadt meg: nyomjuk meg a duguláselhárító gombot (AEC);
 - b) ha kiáramlás akadt meg: nyomjuk meg a START gombot!

Ha néhány próbálkozás sem vezet eredményre, szóljunk a gyakorlatvezetőnek!