

# 基于微流控芯片的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测\*

雷相阳<sup>1</sup> 邱宪波<sup>1\*\*</sup> 葛胜祥<sup>2</sup> 夏宁邵<sup>2</sup> 陈兴<sup>3</sup> 崔大付<sup>3</sup>

(1. 北京化工大学信息科学与技术学院 北京 100029; 2. 厦门大学公共卫生学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 厦门 361101; 3. 中国科学院电子学研究所 传感技术国家重点实验室(北方基地) 北京 100190)

**摘要** CD4+ T 淋巴细胞是人体免疫缺陷病毒(HIV)的主要感染细胞,慢性 HIV 感染者逐渐耗尽 CD4+ T 淋巴细胞,使免疫系统变弱,导致获得性免疫缺陷综合征(AIDS),因此,CD4+ T 淋巴细胞的数量对 HIV/AIDS 的诊断和治疗至关重要。全球范围内 HIV/AIDS 正处于快速增长期,现有的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法由于仪器昂贵、操作复杂、检测成本高,不利于疾病诊疗的普及与推广。为实现低成本、方便、快捷的临床检测,基于微流控芯片的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法与技术的研究正日益受到人们的重视。本文在回顾传统 CD4+ T 淋巴细胞检测方法的基础上,综述、归纳了基于微流控芯片的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法,在全面分析其技术特点的基础上,进一步评述了其综合性能、适用范围、及典型优缺点。最后,本文针对基于微流控芯片的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测技术的发展趋势及商业化应用前景进行了讨论和展望。

**关键词** CD4+ T 淋巴细胞 HIV/AIDS 细胞计数 微流控芯片 检测

中图分类号: O657; TN492 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2015)07-0870-12

## CD4+ T Lymphocyte Counting Technologies Based on Microfluidic Chip\*

Lei Xiangyang<sup>1</sup> Qiu Xianbo<sup>1\*\*</sup> Ge Shengxiang<sup>2</sup> Xia Ningshao<sup>2</sup> Chen Xing<sup>3</sup> Cui Dafu<sup>3</sup>

(1. College of Information Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361101, China; 3. North Base of State Key Laboratory of Transduce Technology, Institute of Electronics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

**Abstract** CD4+ T lymphocytes are the main infected targets of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) in bodies. CD4 level will gradually decrease in HIV hosts when their immune systems are becoming more and more weak, which finally causes Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Therefore, the number of CD4+ T lymphocytes for HIV hosts at different stages is critical to the diagnosis and therapy of HIV/AIDS. For example, Antiretroviral therapy (ART) normally requires four periodical CD4+ T tests in one year for clinical diagnosis and treatment. Population with HIV/AIDS is increasing significantly all over the world in the past ten years. The existing methods for CD4+ T lymphocyte counting are unavailable to developing countries or undeveloped areas because of expensive devices, complicated procedures and high cost. To solve this problem, based on microfluidic technology, new CD4+ T lymphocyte counting methods are being intensively studied for low cost, rapid and convenient CD4+ T lymphocyte detection in the point-of-care test (POCT). After a brief introduction

收稿: 2014 年 12 月,收修改稿: 2015 年 3 月,网络出版: 2015 年 7 月 1 日

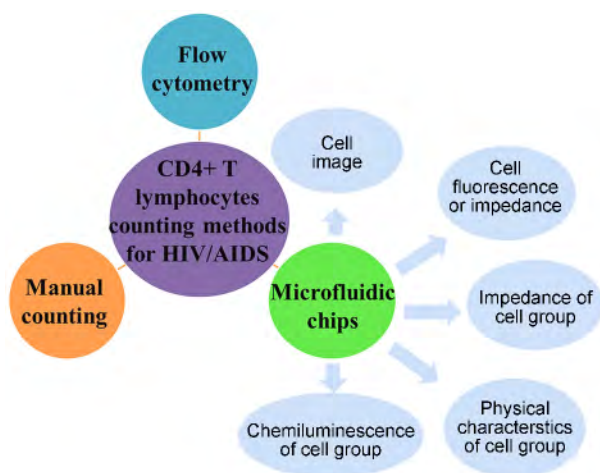
\* 国家自然科学基金项目(No. 81371711)和中央高校基本科研业务费专项资金(No. ZZ1329,YS1404)

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81371711), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. ZZ1329,YS1404)

\*\* Corresponding author e-mail: [xbqiu@mail.buct.edu.cn](mailto:xbqiu@mail.buct.edu.cn)

on traditional methods, this paper reviews and summarizes CD4+ T lymphocyte counting methods based on microfluidic chips. The typical technical characteristics of chip-based CD4+ T lymphocyte counting methods are identified and grouped, and furthermore, their general performance, application area, and major advantages with disadvantages are discussed and evaluated in details. Finally, an outlook and conclusion for research, development and commercialization of CD4+ T lymphocyte counting based on microfluidic chip are given after a detailed discussion.

**Key words** CD4+ T lymphocyte; HIV/AIDS; cell counting; microfluidic chip; detection



CD4+ T lymphocyte counting for HIV/AIDS diagnosis and therapy based on microfluidic chip

## Contents

- 1 Introduction
- 2 Clinical value and classification of CD4+ T counting
  - 2.1 Clinical value of CD4+ T counting
  - 2.2 CD4+ T counting with flow cytometry
  - 2.3 CD4+ T counting with manual operation
  - 2.4 CD4+ T counting with microfluidic chip
- 3 CD4+ T counting based on single cell detection with microfluidic chip
  - 3.1 CD4+ T counting based on cell image
  - 3.2 CD4+ T counting based on optical or electrical signal of single cell
- 4 CD4+ T counting based on the macro-characteristics of cell group with microfluidic chip
  - 4.1 CD4+ T counting based on chemiluminescence of cell group
  - 4.2 CD4+ T counting based on impedance of cell group
  - 4.3 CD4+ T counting based on the macro-physical characteristics of cell group
- 5 Conclusion and outlook

## 1 引言

人类免疫缺陷病毒(HIV)感染导致的艾滋病在全世界所面临的态势十分严峻(全球3340万感染者2009年),已经进入快速增长期,这不仅仅是一大公共卫生问题,更是一大社会问题<sup>[1]</sup>。据我国卫生部数据,截至2011年底,全国已确认HIV感染者和艾滋病人数达到了78万人<sup>[2]</sup>。人体感染了HIV后,涉及的主要病理过程就是免疫系统的损害。由于CD4+ T淋巴细胞是HIV感染的主要靶细胞,CD8+ T淋巴细胞是免疫反应的效应细胞,HIV感染者主要表现为:CD4+ T淋巴细胞丢失,绝对数量减少,同时CD8+ T淋巴细胞数量增加,CD4和CD8的比例失调。慢性HIV感染者耗尽CD4+ T淋巴细胞,自身免疫系统虚弱,导致获得性免疫缺陷综合症(AIDS),患者可能会死于癌症、机会性感染等疾病。CD4+ T淋巴细胞计数作为直接测定免疫功能的方法,能够提供HIV感染病人免疫系统损害状况的临床信息。因此,CD4+ T淋巴细胞计数在HIV进展监测、机会性感染的风险评估、抗逆转录病毒治疗适应症选择及疗效评价等方面具有重要临床意义<sup>[3]</sup>。

目前,CD4+ T淋巴细胞计数检测主要由流式细胞仪完成,在发达国家或发展中国家的发达地区已较普及。但因其配套仪器价格高昂( $\geq \$50\,000$ )、操作复杂、检测成本高( $\geq \$80/\text{test}$ )、操作环境要求高等因素,难以在发展中国家、或欠发达及偏远地区进行普及检测。这不利于与CD4+ T淋巴细胞计数相关的HIV病程周期监测(4次/年)与抗逆转录病毒治疗效果的评估<sup>[4,5]</sup>。为了缓解“看病难、看病贵”的问题,全世界范围内,人们正在积极研究、寻找新型、易操作、低成本、全自动CD4+ T淋巴细胞计数检测方法与技术。作为体外诊断(in-vitro diagnostics, IVD)的一个重要组成部分,(point-of-care testing, POCT)现场检测以其成本低、方便、快捷等特点,正成为改善人们医疗条件,尤其是基层医疗环境的重要手段之一。

自上世纪 90 年代开始,微流控芯片(microfluidic chip)或芯片实验室(lab-on-a-chip)技术研究在西方发达国家尤其美国得到密切重视并不断深入。其研究目标是通过高度集成的功能模块设计实现生命医学领域内微反应器上样品处理、检测、分析或诊断过程的快速化、自动化与微型化<sup>[6]</sup>。微流控芯片系统具有:样品/试剂用量少、无结转/交叉污染、检测灵敏度高、反应时间短、易于实现高通量检测,检测成本低、操作安全,及方便携带等优点<sup>[7]</sup>。尤其在 POCT 现场检测领域,微流控芯片技术展示出了一系列传统方法所不具有的优点<sup>[8]</sup>。

由于 CD4+ T 淋巴细胞在单位体积全血样品中的数量范围相对稳定且显著,因此,利用细胞表面表达的特异性抗原,以及 CD4+ T 淋巴细胞与红细胞、单核细胞之间的尺寸、形状、形态、及表面可变形性之间的差异,在微流控芯片平台上来实现 CD4+ T 淋巴细胞的计数与检测,具有显著的技术可行性,且与流式细胞技术相比,其性价比更高,更加适合现场快速检测(point-of-care test)的应用与推广。

依靠与细胞尺度相匹配的功能化模块,借助微通道、微反应器形成的微流体网络,微流控芯片技术为新型、全自动 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法、技术,以及 POCT 检测系统的研究,提供了一个优势平台<sup>[9]</sup>。这对于改善全世界范围内 HIV/AIDS 诊疗条件具有显著意义和重要价值。

除了具有重要的临床应用价值外,从技术层面来看,基于微流控芯片的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的主要特色在于:(1)技术手段的多样性,(2)适应对象的通用性。其技术手段的多样性表现为包括多种不同的细胞计数检测方法,如基于单个细胞的计数检测,基于细胞群整体物化特性的检测,基于细胞图像信号的检测,基于细胞光电信号的检测,以及基于去装置化的手工检测方法等。其适应对象的通用性表现为 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法可以被推广应用于其它类型细胞检测。如应用于其它淋巴细胞,如 CD8+ T、CD3+ T 淋巴细胞的计数检测。

## 2 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的临床价值与分类

### 2.1 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的临床价值

在临床 HIV/AIDS 诊断中,血液中 CD4+ T 淋巴细胞的绝对数值是预测免疫系统被损害程度的关键指标。正常成年人血液中含有的 CD4+ T 淋巴细胞大约为 1200 个/ $\mu\text{L}$ ,当 HIV 感染者每  $\mu\text{L}$  血液中的

CD4+ T 淋巴细胞的个数小于 200 时,可以认为其患有 AIDS<sup>[10]</sup>。在 CD4+ T 淋巴细胞还没消耗完时采取抗逆转录病毒疗法,即 antiretroviral therapy (ART),可减少病毒血症、减缓变为 AIDS 的速率<sup>[11]</sup>。如果建立 CD4+ T 淋巴细胞计数方法,采用 ART 预防法可以降低怀孕母亲向孩子传播的危险。世界卫生组织建议 CD4 < 350 个/ $\mu\text{L}$  可使用 ART<sup>[12]</sup>。CD4+ T 淋巴细胞水平可以由固定体积的绝对计数、占总淋巴细胞的百分比、占特定淋巴细胞的百分比来表示。绝对计数适用于成人,总淋巴百分比或 CD4/CD8 比率适用于小于 5 岁的儿童。表 1 给出了对于不同年龄段的人群开始 ART 治疗的参考阈值<sup>[13]</sup>。

表 1 不同年龄段人群开始 ART 治疗的参考阈值<sup>[13]</sup>

Table 1 Recommended thresholds for ART initiation<sup>[13]</sup>

	<24 months	24 ~ 59 months	5 years ~ adult
absolute CD4 (CD4 per $\mu\text{L}$ blood)	all	<750	<350
% CD4 (% of total leukocytes)	all	<25	N/A

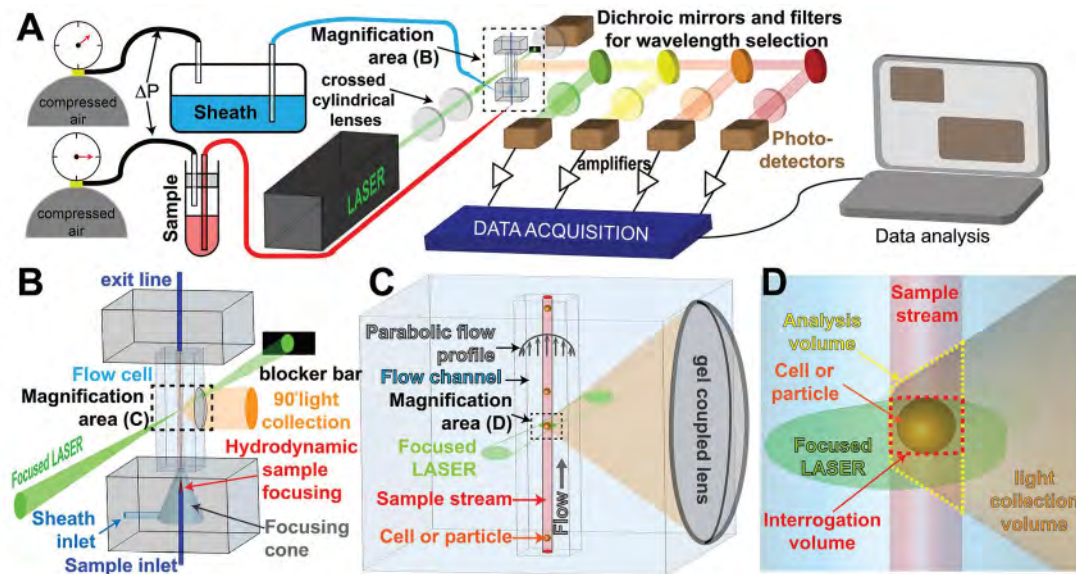
### 2.2 流式细胞仪 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法

传统的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测,往往在流式细胞仪上进行。流式细胞仪核心模块包括:液路单元、光路单元、检测单元、及数据分析单元等。图 1(A)展示了流式细胞仪的工作原理,图 1(B~D)则展示了其光学检测原理<sup>[14]</sup>。

由于流式细胞仪需要依靠复杂的液路单元、精巧灵敏的光路单元,及处理能力强大的数据分析单元来实现单细胞计数检测,因此,其价格昂贵、操作复杂。另外,由于检测试剂种类多、消耗量大,导致单人份检测的成本较高。正因为设备和试剂的价格高、操作及使用条件苛刻等原因,流式细胞仪仅限于大型医院或实验室,难以广泛推广,更不适于偏远地区<sup>[15]</sup>。

### 2.3 人工 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法

为了降低 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的成本,Anthony 等提出了一种基于血细胞计数仪和光学显微镜的 CD4+ T 淋巴细胞手动计数方法<sup>[16]</sup>。为了克服单核细胞和巨噬细胞的影响,先把标记 CD14 单克隆抗体的磁珠与全血样品混合,随后,加入标记有抗 CD4 和抗 CD8 抗体的磁珠。标记完成后,加入红细胞裂解液。最后使用 40 $\times$  光学显微镜,在血细胞计数仪中实现肉眼计数。为了提高计数效率,有人研究使用 Sysmex pocH-100i 血液分析仪,基于染色原理实现细胞计数,与流式细胞仪的相

图1 流式细胞仪工作原理<sup>[14]</sup>Fig.1 Principle of flow cytometer<sup>[14]</sup>

关性达到了 93%<sup>[17]</sup>。

Thorslund 等为了简化手动细胞计数方法,利用毛细管原理实现自动进样,当血液流经微柱时,CD4+ T淋巴细胞被微柱上的抗 CD4 抗体捕获,最后由荧光显微镜检测 CD4+ T 淋巴细胞。当 CD4+ T 淋巴细胞的浓度大于 500 个/ $\mu\text{L}$  时,该方法与流式细胞仪的相关性达到了 79%<sup>[18-20]</sup>。

#### 2.4 微流控芯片 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法

在偏远或者欠发达地区,实现低成本、便捷的 CD4+ T 淋巴细胞计数,无论是技术实现手段,还是经济和社会因素,都面临着巨大的机遇与挑战<sup>[15]</sup>。流式细胞技术需在设备先进的中心实验室或者大型医院由专业的操作人员完成,这些条件在欠发达或偏远地区难以提供。

微流控芯片由于能够实现样品处理、检测、分析或诊断过程快速化、自动化与微型化,尤其在床边诊断 POCT 应用方面,已经开始展示其独特的优势。因此,基于新型平台技术,如微流控芯片,研究适合欠发达或偏远地区的 POCT 型 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法对于改善 HIV/AIDS 的医疗环境与条件具有重要意义<sup>[21]</sup>。

到目前为止,人们研究提出了各种不同的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测微流控芯片。本文拟从细胞计数检测原理的角度,将其分为两大类,一类是细胞单个计数芯片,另外一类是细胞整体计数芯片。其中,细胞单个计数芯片基于化整为零的思想,通过对单个细胞进行逐个识别与检测来达到细胞计数的

目的;而细胞整体计数芯片则基于化零为整的思想,通过对细胞群体的宏观、整体物化特征进行定量检测来达到细胞计数的目的。

与传统流式细胞技术相比,现有微流控芯片分选检测技术的不足在于其检测对象的针对性与局限性。作为一个完整的细胞分析检测平台,流式细胞技术具有完备而强大的功能,而当前的微流控芯片细胞分选检测技术往往是针对某一类、或者某几类相关的细胞进行分析与计数检测,因此,其功能与应用范围具有显著针对性,往往受到一定的限制。

### 3 基于单细胞检测的 CD4+ T 淋巴细胞计数微流控芯片

基于单细胞检测的方法实现细胞计数,其核心思想是需要利用微流控芯片提供的反应与检测环境,实现空间维度上,或者时间维度上,单个细胞的物理独立。如利用经化学修饰过的微流控芯片表面,或多孔结构的过滤介质,把 CD4+ T 淋巴细胞捕获、截留下来,并使其均匀、分散分布在某个平面上<sup>[22-24]</sup>,或者利用微流控芯片的微尺度通道,使得 CD4+ T 淋巴细胞逐个经过特定的检测区域<sup>[25]</sup>。在此基础上,通过获取细胞的显微图像<sup>[26-28]</sup>,或者直接检测单个细胞的光、或者电信号,则能够在检测、识别单个细胞的基础上,实现累加计数<sup>[29,30]</sup>。国内,高丹等利用磁珠特异性捕获 CD4+ T 淋巴细胞,并使其均匀分散在光学检测区域,利用光学显微镜实现了人眼手工计数<sup>[31]</sup>。人眼手工计数方法的效

率较低,且计数检测的准确性容易受到操作者个体因素的影响。

单细胞检测计数方法的优点在于其准确性、灵敏度、分辨率较高,其不足之处在于需要复杂、精巧的显微成像系统,或者高灵敏度的光电检测系统。而且,为了实现单细胞在时间维度或空间维度上的均匀分布,微流控芯片的结构比较复杂,反应过程所需的复杂流体驱动系统难以简化。

### 3.1 基于细胞显微图像的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法

#### 3.1.1 基于复杂光学检测平台的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法

为了提高细胞计数检测的特异性与准确性,可以采用免疫荧光标记 CD4+ T 淋巴细胞,再采用图像识别的方法进行细胞计数<sup>[32]</sup>。为了提高细胞计数检测的灵敏度,可以在微流控芯片反应腔中引入主动混合,改善 CD4+ T 淋巴细胞与荧光标记物的混合效率<sup>[33]</sup>。为了区分 CD4+ T 淋巴细胞与单核细胞,可以同时使用抗 CD4 抗体与抗 CD3 抗体,其中抗 CD4 抗体用于荧光标记,而抗 CD3 抗体则用于捕获固定细胞,由此,可以有效克服单核细胞的影响<sup>[34, 35]</sup>。用荧光标记 CD4+ T 淋巴细胞后,再借助磁珠与外磁场实现特异性捕获与分离。然后,由 CCD( charge-coupled device) 相机与光学显微镜构成

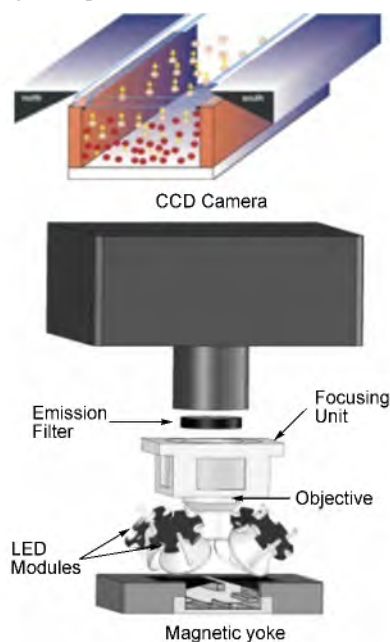


图2 基于磁珠原理的 CD4+ T 淋巴细胞计数芯片与装置<sup>[38]</sup>

Fig. 2 CD4 counting device based on microscope image with magnetic beads<sup>[38]</sup>

的显微成像系统,获取芯片上均匀、分散分布细胞的数字图像,由专用的图像处理算法实现 CD4+ T 淋巴细胞的自动识别与计数<sup>[36-38]</sup>。

Li 等提出了一种基于磁珠的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测装置,使标记荧光的细胞与磁珠特异性结合,通过外磁场将其移动、固定在芯片表面,由荧光显微成像实现细胞计数<sup>[38]</sup>。如图 2 所示,上半部分为与 CD4+ T 淋巴细胞相结合的磁珠,在磁场作用下,均匀、分散分布在芯片反应腔上表面。图 2 下半部分为计数检测装置的结构图。将微流控芯片放置在检测装置的正下方,在 LED 灯的照射下,CD4+ T 淋巴细胞上标记的荧光通过物镜、聚焦透镜以及滤光片进入到上方的 CCD 相机,得到细胞的荧光显微图像。经图像处理算法,推算出 CD4+ T 淋巴细胞个数。通过微流控芯片与图像检测装置的相互配合,该方法实现了 CD4+ T 淋巴细胞的自动计数,其不足之处在于需要一套复杂、精巧且体积较大的光学显微成像系统。

#### 3.1.2 基于简化光学检测系统、手机平台的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法

为了简化基于显微成像原理的微流控 CD4+ T 淋巴细胞计数,除了需要解决: 1) 从全血中分离、捕获 CD4+ T 淋巴细胞; 2) 快速识别捕获的细胞并实现计数外,还需要应用简单、小巧的光学组件,在简化细胞成像装置的基础上,实现大视野光学成像<sup>[39]</sup>。针对这些问题,研究者提出了基于无透镜成

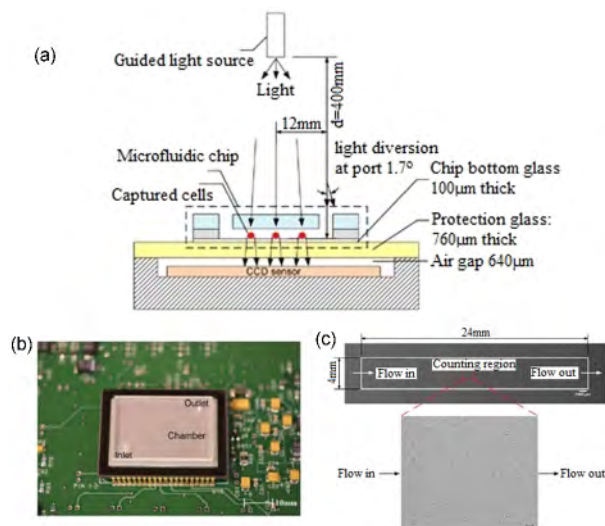


图3 基于 CCD 传感器阵列的无透镜式阴影成像计数方法<sup>[39]</sup>

Fig. 3 CD4 counting based on cell shadow-image with lensless CCD<sup>[39]</sup>

像原理的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法<sup>[39~42]</sup>。Moon 等应用一套光学传感器阵列( CCD 传感器) 通过检测细胞阴影实现计数, 如图 3 所示<sup>[39]</sup>。图 3( a) 为检测装置工作原理图。微流控芯片中固定的抗 CD4 抗体捕获 CD4+ T 淋巴细胞后, 检测光进入芯片, 经细胞衍射后的光信号最终到达芯片下方的 CCD 传感器阵列。图 3( b) 为微流控芯片、CCD 传感器阵列及信号处理电路模块的实物图。图 3( c) 为微流控芯片实物图, 在细胞计数检测区域, 可以看到被捕获后均匀分布的 CD4+ T 淋巴细胞。

该方法利用细胞的阴影成像原理进行计数, 实现了无荧光标记的检测。其优点在于装置简单, 不足之处在于细胞在芯片计数检测区域可能会出现上下层叠现象, 由此会降低细胞计数准确性。

由于人机界面友好、数据传输能力强、体积小、功能整合方便等优势, 手机在医疗健康领域已经开始引起人们的广泛关注。基于手机的医疗诊断平台具有检测成本低、方便、快捷、实时、自带地理位置信息, 可与云医疗平台无缝对接等显著特点。Zhu 等将手机与光学组件结合, 设计了一种新型 CD4+ T 淋巴细胞计数装置, 如图 4 所示<sup>[43]</sup>。图 4( a) 展示的检测平台尺寸为 55 mm × 35 mm × 27.9 mm。如图 4( b) 所示, 光学组件总重量为 18 g, 结构简单, 主要包括一个透镜、一个滤光片、两个 LED 以及一块电池, 而检测器即为手机自带的 CMOS( complementary metal oxide semiconductor, 互补金属氧化物半导体) 照相机。图 4( c) 描述了检测原理, 被标记的 CD4+ T 淋巴细胞在 LED 的照射下产生荧光, 经滤光片和聚焦透镜, 成像到手机自带的 CMOS 照相机上。手机获取细胞图像后,

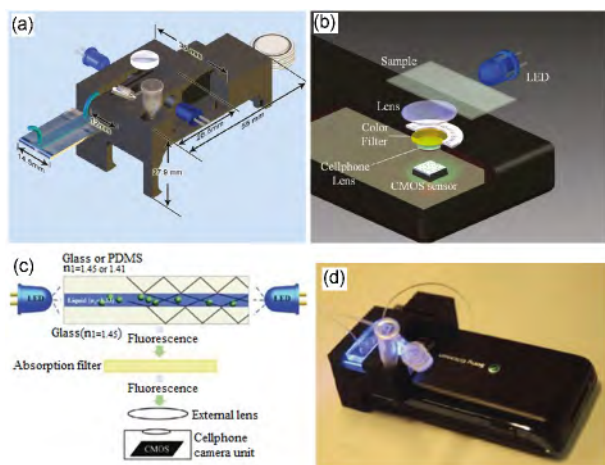


图 4 基于手机的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法<sup>[43]</sup>

Fig. 4 CD4 counting with cellphone platform<sup>[43]</sup>

通过定制的图像处理算法, 辨识细胞, 并自动给出计数结果。图 4( d) 是整个检测装置的实物图, 包括芯片、手机与光学检测接口三个部分, 三者相互配合实现了一种简单便捷的细胞计数检测。该检测方法的优点在于装置简单, 检测成本低, 且充分利用了智能手机, 符合 POCT 检测的发展趋势, 其不足之处在于, 流体操作的简便性与检测的稳定性还需要进一步改善。

随着人们对 CD4+ T 淋巴细胞计数检测研究的不断突破, 迄今为止, 世界上已经有为数不多的公司推出了商品化 CD4+ T 淋巴细胞计数检测装置。其中, 一个典型代表是由 Alere Inc. 推出的 Alere Pima, 它是世界上第一个通过 SFDA 认证的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测装置, 如图 5 所示<sup>[44]</sup>。整套装置包括一个基于微流控技术的一次性检测卡, 及一个便携式检测仪。一定体积的全血样品, 如 25  $\mu\text{L}$ , 经检测卡前端的毛细管导入后, 自动实现体积定量, 去除红细胞后, 全血样品中的 CD4+ T 淋巴细胞分别被抗 CD4 抗体、抗 CD3 抗体上的双色荧光所标记, 由此可以克服其它类型细胞, 尤其是单核细胞对 CD4+ T 淋巴计数的影响。如图 5( a) 所示, 便携式检测仪通过双色 LED 灯分时激发 CD4+ T 淋巴细胞上标记的双色荧光, 并由 CCD 照相机获取实时荧光图片, 经图像处理算法, 最终得到 CD4+ T 淋巴细胞的个数。图 5( b) 为 CD4+ T 淋巴细胞计数微流控检测卡及配套检测仪的实物图。

### 3.2 基于单细胞光、电信号的 CD4+ T 淋巴细胞计

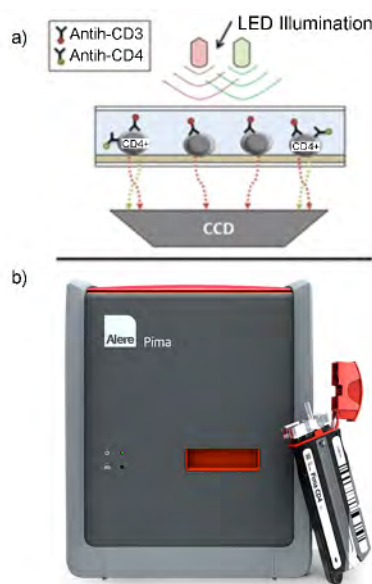


图 5 Alere Pima CD4+ T 淋巴细胞计数检测装置<sup>[44]</sup>

Fig. 5 Commercial CD4 counting device: Alere Pima<sup>[44]</sup>

## 数方法

除了利用图像处理的方法对单个细胞进行识别,实现细胞累加计数外,还可以利用与细胞尺度相仿的微流控芯片结构,实现单个细胞的物理分离。在此基础上,利用单个细胞的光电信号实现检测与计数。这种方法不需要大体积的显微成像检测系统,而是依靠高灵敏度的光电信号传感器实现原始信号的采集,再依靠信号放大电路进行处理,最终由软硬件系统实现 CD4+ T 淋巴细胞的自动计数和结果显示<sup>[45]</sup>。

在微流控芯片中,让细胞依次通过特定尺寸微通道,由此可以通过检测单个细胞的光、或者电信号来实现计数。为了提高单细胞检测的灵敏度,有人研究提出了一种基于差分放大原理的检测方法,通过对微流控芯片中单个细胞的荧光信号进行差分放大,实现细胞计数<sup>[46]</sup>。除荧光检测外,还有一种阻抗计数法,即通过检测细胞流经微通道时的阻抗变化,由 MOSFET (metal-oxide-semiconductor field-effect transistor, 金属氧化物半导体场效应晶体管) 信号处理模块来记录单个细胞对应的信号脉冲,由此实现 CD4+ T 淋巴细胞计数<sup>[47]</sup>。为了进一步提高阻抗法的检测灵敏度,还可以用标记抗体的微球与 CD4+ T 淋巴细胞相结合来放大 AC 阻抗信号,通过记录细胞经过检测区域时的脉冲信号,实现 CD4+ T 淋巴细胞计数<sup>[48]</sup>。另外,还可以将阻抗法与免疫亲和色谱法<sup>[45]</sup>、荧光检测法<sup>[46]</sup>等其它方法相结合,通过多参数联合检测,提高 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的灵敏度和准确性。

Watkins 等结合阻抗测量和免疫亲和性色谱分析法,设计了一种新型的微流控 CD4+ T 淋巴细胞电差分计数芯片<sup>[45]</sup>。如图 6(a) 所示,该芯片包括三个部分:进样腔、捕获腔和终端腔。为了实现差分检测,分别在进样腔和捕获腔之间设置入口传感器,在捕获腔和终端腔之间设置出口传感器。如图 6(b) 所示,当全血中的细胞(包括 CD4+ T 淋巴细胞及其它细胞)由进样腔逐个进入捕获腔时,入口传感器会监测到阻抗的变化,并记录单个细胞对应的信号脉冲。在捕获腔中,CD4+ T 淋巴细胞被固定在上下腔壁的抗 CD4 抗体所捕获,因此,只有其它类细胞会经出口传感器到达终端腔,由此产生的信号脉冲会被出口传感器所记录。随后,如图 6(c) 所示,改变进样方向,除 CD4+ T 淋巴细胞外,其它未被捕获的细胞会由捕获腔进入进样腔,并再次通过入口传感器,由此产生的信号脉

冲也会被记录下来。通过分析比较入口传感器前后两次信号脉冲个数,同时参考出口传感器的信号脉冲个数,可以推算出样品中 CD4+ T 淋巴细胞的个数。

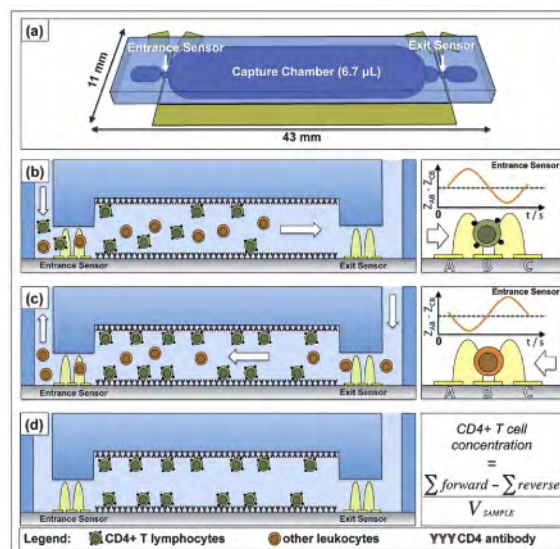


图 6 基于电差分的 CD4+ T 淋巴计数方法<sup>[45]</sup>

Fig. 6 CD4 counting based on electrical differential signal<sup>[45]</sup>

#### 4 基于多细胞整体检测的 CD4+ T 淋巴细胞计数微流控芯片

与单细胞检测方法不同,基于多细胞整体检测的方法实现细胞计数,其核心思想是利用微流控芯片提供的反应与检测环境,实现处于同一反应区域内,CD4+ T 淋巴细胞群的反应同步与检测同步。在此基础上,通过定量检测细胞群的整体、宏观化学/物理特征量(例如:荧光强度、阻抗大小、形状体积、近表面折射率)来推算对应的细胞个数<sup>[49,50]</sup>。

理论上讲,由于避开了复杂结构芯片与精巧光学模块的设计,基于细胞整体物化特性检测原理的细胞计数检测方法具有成本、体积、操作上的优势。在此基础上研制得到的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测系统与装置更容易适应 POCT 现场检测。其不足之处在于,某些基于多细胞整体检测的计数方法,其定量检测的范围有限,细胞计数检测的分辨率偏低。

##### 4.1 基于化学发光的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法

基于化学发光的检测方法通过检测化学反应过程产生的光强来实现定量检测。其优点在于无荧光标记及荧光激发模块,检测灵敏度高,检测装置相对简单。Wang 等研究了基于化学发光原理的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测微流控芯片<sup>[51]</sup>。全血样品流经微

流控芯片时,微流控芯片内固定的抗 CD4 抗体会捕获 CD4+ T 淋巴细胞。为了克服单核细胞的影响,在 CD4+ T 淋巴细胞表面,通过 CD3 抗体固定了辣根过氧化物酶,与化学发光底物进行反应,产生化学发光信号。由于光信号强度与所捕获的 CD4+ T 淋巴细胞个数成正比,由此可以推算出 CD4+ T 淋巴细胞的个数<sup>[51,52]</sup>。针对 3  $\mu\text{L}$  全血样品,检测结果表明该方法的细胞捕获效率较高,且与流式细胞仪有较好的相关性。由于省去了外部光源和图像检测装置,该方法降低了系统复杂度,适合 POCT 现场检测,其不足之处在于检测下限还需要进一步改善。

#### 4.2 基于阻抗的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法

另外,有人研究了利用电化学阻抗原理进行 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的方法,例如, Mishra 等研究了一种基于电化学阻抗谱法的细胞计数生物传感器<sup>[53]</sup>。该生物传感器具有三个经过化学改造的电极,其中一个工作电极上固定有抗 CD4 抗体,用于捕获样品中的 CD4+ T 淋巴细胞。捕获 CD4+ T 淋巴细胞后,工作电极的阻抗会增大,由此引起工作电极和计数电极之间的电化学阻抗变化,在低频信号区域尤为显著。因此,通过检测电化学阻抗,即可实现 CD4+ T 淋巴细胞计数。其不足之处在于,当 CD4+ T 淋巴细胞浓度较低时,该方法的计数准确性较低。为了提高细胞计数的准确性, Jiang 等在硅基片上设计了电极阵列。如图 7 所示,阵列上的每个电

极都固定有抗 CD4 抗体,均能捕获 CD4+ T 淋巴细胞<sup>[54]</sup>。其工作原理为:当工作电极捕获到 CD4+ T 淋巴细胞后,工作电极与计数电极之间产生阻抗差,由此实现 CD4+ T 淋巴细胞计数。图 7(A)、(B) 分别是芯片原理图与实物图。芯片中央区域包括 200 个工作电极(W. E.),其与 4 个边角的信号导通片连接。参考电极(R. E.)位于工作电极附近,而计数电极(C. E.)处于远离工作电极的位置。图 7(C)中的(1)、(2)、(3)分别是工作电极在强光、暗光、混合光下的光学成像图。

另外,还可以通过其它形式实现基于阻抗原理的细胞计数检测。例如, Cheng 等在分离、捕获 CD4+ T 淋巴细胞后,用反应试剂裂解细胞。由于细胞裂解后会释放出其中的盐离子,引起溶液阻抗变化,由此通过阻抗谱的变化来实现细胞计数检测<sup>[55]</sup>。其优势在于,由于本底信号很低,该细胞计数检测方法的分辨率与灵敏度均较高,达到 20 个细胞/ $\mu\text{L}$ 。该计数芯片还通过特殊流场的设计,使得单核细胞在剪切力作用下不能被捕获,由此提高了 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的特异性与准确性。

Daktari 推出了一款基于阻抗检测原理的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测装置,包括一个存储反应试剂的微流控检测卡及配套分析仪<sup>[56]</sup>。微流控检测卡上集成了弹性薄膜来存储液态的反应试剂,并通过微通道与反应腔相连。反应过程中,分析仪通过分时挤压弹性薄膜来逐步释放反应试剂。依靠芯片的特殊结构与流场有效分离了单核细胞,提高了 CD4+ T 淋巴计数检测的准确度。与传统荧光标记检测方法不同,该细胞计数装置通过检测 CD4+ T 淋巴细胞裂解后引起的溶液阻抗变化来实现细胞计数,具有背景信号低、检测灵敏度高的特点。国内,王珊珊等实现了基于阻抗测量原理的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测微流控芯片<sup>[57]</sup>。

#### 4.3 基于细胞群整体物理特征的 CD4+ T 淋巴细胞计数方法

除了利用细胞的光电信号实现计数检测外,基于细胞群体的整体物理特征,如形状、颜色、面积、或者体积则可以实现更为简洁的细胞计数检测。

Macdara 等研究了一种由细胞-磁珠结合体的堆积高度来实现 CD4+ T 淋巴细胞计数的芯片<sup>[58]</sup>。该芯片利用磁珠捕获 CD4+ T 淋巴细胞,在外界磁场和流场的共同作用下,细胞-磁珠的结合体逐渐堆积在规则的微通道中。通过观察微通道中,细胞-磁珠结合体的堆积高度,根据参考刻度,可以知道 CD4+ T 淋

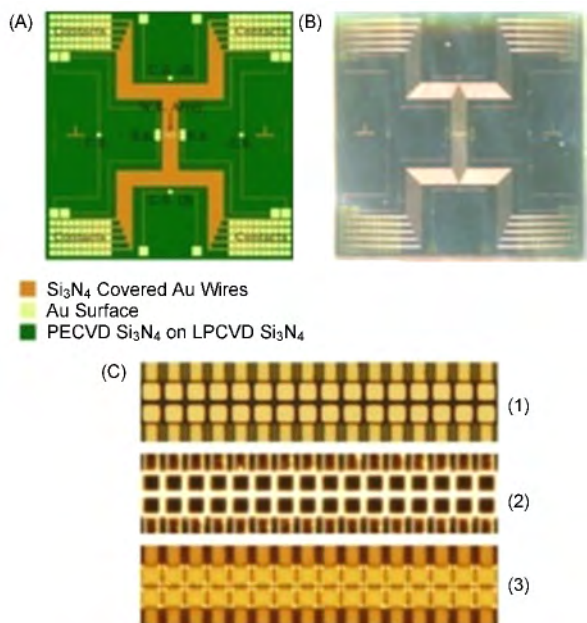


图 7 电极阵列设计图<sup>[54]</sup>

Fig.7 Layout of electrode for CD4 capturing and counting<sup>[54]</sup>



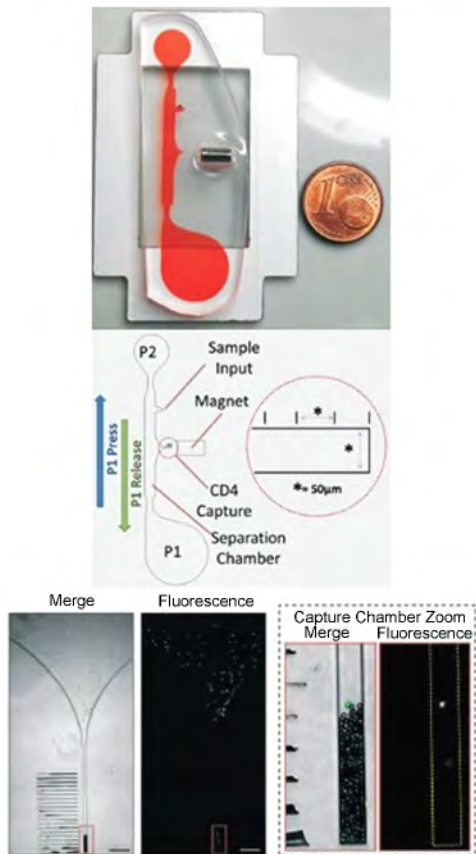


图8 基于体积计数法的 CD4+ T 淋巴细胞检测微流控芯片<sup>[58]</sup>

Fig. 8 CD4 counting based on volume size<sup>[58]</sup>

巴细胞的个数。同时,由于磁珠标记了荧光,也可以通过检测细胞整体的荧光信号强度来计数。如图8所示,该芯片包含两个腔,P1和P2,样品入口在P2腔下方。在P1与P2之间通道的中间位置,有一个用于堆积CD4+T淋巴细胞的微通道,并在下方放置永磁体。进样前,用手指按下P1上面的弹性膜,随后松开,即可将样品吸入流动通道。据此,轮流挤压P1和P2上面的弹性膜,重复多次。最终,使得CD4+T淋巴细胞一方面可以与磁珠充分结合,另一方面,结合后的细胞-磁珠由于受到永磁体的外界磁场作用,会逐渐堆积到微通道中,由此实现CD4+T淋巴细胞的计数。除了体积计数外,还可以通过检测磁珠上标记的荧光进行辅助计数,由此,通过多参数联合检测,进一步提高CD4+T淋巴细胞计数的准确性。

Zyomyx Inc 正研究一种基于细胞整体物化特性,通过目测细胞-微球结合体的长度来确定细胞个数的计数技术<sup>[59]</sup>。如图9所示,检测试管包括两个腔,上反应腔用于样品进样,去除全血样品中的红细



图9 基于高度计数法的 CD4+ T 淋巴细胞检测微流控芯片<sup>[59]</sup>

Fig. 9 CD4 counting based on the height value<sup>[59]</sup>

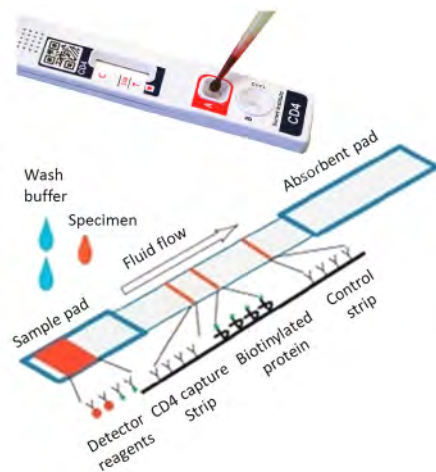


图10 基于侧向流纸条的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测<sup>[60-61]</sup>

Fig. 10 CD4 counting based on gold colloid lateral flow strip<sup>[60-61]</sup>

胞与单核细胞。下反应腔用于CD4+T淋巴细胞计数。加入100 μL全血后,反应试剂中的高密度微球由于标记有抗CD4抗体,会与血液中的CD4+T淋巴细胞相结合,而标记了抗CD14抗体的磁珠则会捕获单核细胞。将反应试剂与样品充分混合数分钟后,CD4+T淋巴细胞-微球结合体与单核细胞-磁珠结合体相互分离,并进入下反应腔。在手动离心的作用下,CD4+T淋巴细胞-微球结合体会逐渐沉积到下反应腔底部的规则形状毛细管中。由于细胞-微球沉积的高度与细胞个数直接相关,因此,通过毛

细管上的参考刻度,可以知道 CD4+ T 淋巴细胞的个数。

Burnet 研究院正研究一种基于整体物化特性,利用侧向流纸条的细胞计数技术。通过比较测试线与其参考线的胶体金显色强度,实现半定量细胞计数<sup>[60]</sup>。如图 10 所示,借助侧向流纸条的样品垫去除全血样品中的红细胞与单核细胞,再利用测试线上包被的抗 CD4 抗体捕获 CD4+ T 淋巴细胞。最终通过比较测试线与对照参考线的胶体金显色强度实现了一种半定量的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测。

基于细胞群整体物理特征的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法,其优点在于检测方法的简单性、检测装置的简便性、及检测过程的便捷性,有利于 POCT 现场检测。其不足之处在于,其检测下限与检测灵敏度还需要进一步改善和提高。

## 5 总结和展望

随着人们对于 POCT 型检测诊断装置的需求不断提高,基于微流控芯片的检测装置正日益引起人们的关注。由于艾滋病患者具有分布区域广的特点,且患者人数正不断增加,因此,研究设计低成本、小体积、使用方便快捷的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测装置,对于改善 HIV/AIDS 的诊疗条件具有极其重要的社会意义与经济价值。

微流控芯片依靠其自身的结构与功能优势,为实现生物医学诊断的自动化、微型化、及批量化提供了有力支撑。尤其是,基于聚合物基,如聚碳酸酯(PC, polycarbonate)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA, polymethyl methacrylate)的微流控芯片能够通过注射模的方法实现快速、批量的生产与制作,这为实现低成本的医疗诊断提供了有力保障。为了实现 POCT 现场检测,研究聚合物基的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测微流控芯片,有利于推动细胞计数检测装置的实际应用,为 HIV/AIDS 提供更加经济、可靠、方便的周期性诊疗环境。因此,可以预计,基于微流控芯片的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测技术的研究会更加受到人们的关注与重视。

从检测原理分,基于微流控芯片的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测方法可以分为两大类:基于单细胞检测的 CD4+ T 淋巴细胞计数微流控芯片、基于多细胞整体检测的 CD4+ T 淋巴细胞计数微流控芯片。其中,基于单细胞检测原理的芯片具有检测灵敏度高、计数分辨率高等优点,其不足之处在于:芯片结构及检测过程较复杂,检测装置难以简化。基

于多细胞整体检测原理的芯片具有检测装置简单、操作便捷等优点,其不足之处在于:检测灵敏度及细胞计数分辨率仍需进一步提高。

因此,为了实现简单、方便、快捷、且低成本的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测,这两类方法都需要作进一步的改进和优化。特别是,基于单细胞检测原理的微流控芯片需要进一步简化其检测反应过程,降低检测装置的复杂度;而基于多细胞整体检测原理的微流控芯片则需要通过改善其细胞检测方法进一步提高灵敏度和分辨率。因此,将两种方法相互结合,取长补短,有利于提升 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的整体性能。

与传统流式细胞技术相比,某些基于微流控芯片的细胞分选检测技术,尤其是基于多细胞整体物化特性检测的微流控芯片,无法对单个细胞进行识别与检测,因此,其检测下限与分辨率比流式细胞技术要差一些。因此,需要针对细胞分选检测的不同应用需求,分别研究高低分辨率的细胞分选检测微流控芯片,其中,高分辨率微流控芯片能够达到与流式细胞技术相当的检测下限与分辨率,而低分辨率微流控芯片则应用于某些对灵敏度与分辨率要求较低の場合。

尤其值得指出的是,由于容易实现功能整合、移植与升级、不受地域和环境限制,基于智能手机的医疗诊断平台正日益受到人们的关注。因此,研究可与智能手机平台实现无缝对接的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测微流控芯片及装置,对于进一步降低检测成本,简化检测过程,构建云医疗平台,具有重要的现实意义。而且,利用手机平台提供的地理信息,可以方便国家医疗机构对 HIV/AIDS 患者的区域分布信息及其变化趋势进行有效的记录与跟踪,对艾滋病的流行与传播实施更加有效的监控。

## 参考文献

- [1] UNAIDS and World Health Organization. AIDS epidemic update, December 2009: 99.
- [2] 中华人民共和国卫生部( Ministry of Health of the People's Republic of China). 2011 年中国艾滋病疫情估计( China 2011 AIDS Epidemic Estimation Report) 2011.
- [3] Douek D C, Brenchley J M, Betts M R, Ambrozak D R, Hill B J, Okamoto Y, Casazza J P, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price D A, Connors M, Koup R A. Nature, 2002, 417( 6884): 95.
- [4] O' Gorman M, Zijenah L S. Cytometry Part B: Clin. Cytom., 2008, 74: S19.
- [5] Boyle D S, Hawkins K R, Steele M S, Singhal M, Cheng X.

- Trends in Biotechnology ,2012 ,30(1) : 45.
- [ 6 ] Chen Z , Abrams W R , Geva E , De Dood C J , González J M , Tanke H J , Niedbala R S , Zhou P , Malamud D , Corstjens P L A M . *BioMed Research International* ,2014 ,8(7) : e2944.
- [ 7 ] Qiu X ,Thompson J A , Chen Z , Liu C , Chen D , Ramprasad S , Mauk M G , Ongagna S , Barber C , Abrams W R , Malamud D , Corstjens P L A M , Bau H H . *Biomedical Microdevices* ,2009 ,11(6) : 1175.
- [ 8 ] Desai D , Wu G , Zaman M H . *Lab Chip* ,2011 ,11: 194.
- [ 9 ] Wang J H , Wang C H , Lin C C , Lei H Y , Lee G B . *Microfluidics and Nanofluidics* ,2011 ,10(3) : 531.
- [10] When To Start Consortium. *Lancet* ,2009 ,373(9672) : 1352.
- [11] Autran B , Carcelain G , Li T S , Blanc C , Mathez D , Tubiana R , Katlama C , Debre P , Leibowitch J . *Science* ,1997 ,277: 112.
- [12] Aina O , Dadik J , Charurat M , Amangaman P , Gurumdi S , Mang E , Guyit R , Lar N , Datong P , Daniyam C , Kanki P , Abimiku A . *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* ,2005 ,12(4) : 525.
- [13] Glynn M T , Kinahan D J , Ducrée J . *Lab on a Chip* ,2013 ,13(14) : 2731.
- [14] Piyasena M E , Graves S W . *Lab on a Chip* ,2014 ,14(6) : 1044.
- [15] Nichols J H . *Clinics in Laboratory Medicine* ,2007 ,27(4) : 893.
- [16] Carella A V , Moss M W , Provost V , Quinn T C . *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* ,1995 ,2(5) : 623.
- [17] Briggs C , Machin S , Müller M , Haase W , Hofmann K , Forstreuter F , Hinzmann R . *International Journal of Laboratory Hematology* ,2009 ,31(2) : 169.
- [18] Thorslund S , Larsson R , Bergquist J , Nikolajeff F , Sanchez J . *Biomedical Microdevices* ,2008 ,10(6) : 851.
- [19] Thorslund S , Sanchez J , Larsson R , Nikolajeff F , Sanchez J . *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* ,2005 ,46(4) : 240.
- [20] Thorslund S , Larsson R , Nikolajeff F , Bergquist J , Sanchez J . *Sensors and Actuators B: Chemical* ,2007 ,123(2) : 847.
- [21] Zachariah R , Reid S D , Chaillet P , Massaquoi M , Schouten E J , Harries A D . *Tropical Medicine & International Health* ,2011 ,16(1) : 37.
- [22] Beck M , Brockhuis S , van der Velde N , Breukers C , Greve J , Terstappen L W . *Lab on a Chip* ,2012 ,12(1) : 167.
- [23] Jani I V , Siteo N E , Chongo P L , Alfai E R , Quevedo J I , Tobaiwa O , Lehe J D , Peter T F . *AIDS* ,2011 ,25(6) : 807.
- [24] Masahito H , Marie A , Seita N , Tomoko Y , Noriyuki T , Masayuki T , Satoshi N , Tsuyoshi T , Tadashi M . *Biotechnology and Bioengineering* ,2012 ,109(8) : 2017.
- [25] Yun H , Bang H , Min J , Chung C , Chang J K , Han D C . *Lab on a Chip* ,2010 ,10(23) : 3243.
- [26] Zhu H , Serhan O I , Onur M , Alon G , Aydogan O . *Lab on a Chip* ,2013 ,13(1) : 51.
- [27] Bae S Y , Park H C , Oh J S , Yoon S Y , Park D W , Choi I K , Oh J H , Hur D S , Chung C , Chang J K , Robinson P , Lim C S . *Cytometry Part B ( Clinical Cytometry)* ,2009 ,76(5) : 345.
- [28] Gurkan U A , Anand T , Tas H , Elkan D , Akay A , Keles H O , Demirci U . *Lab on a Chip* ,2011 ,11(23) : 3979.
- [29] Thangawng A L , Kim J S , Golden J P , Anderson G P , Robertson K L , Low V , Ligler F S . *Anal Bioanal Chem.* 2010 ,398(5) : 1871.
- [30] Joerg M , Michael I R , Malte H , Marshall W B , Noble M J , Peter K . *Lab on a Chip* ,2012 ,12(23) : 5057.
- [31] Gao D , Li H F , Guo G S , Lin J M . *Talanta* ,2010 ,82: 528.
- [32] 邢婉丽( Xing W L ) ,程京( Cheng J ) . *生物芯片技术实验教程( Experiments in Biochip Technology)* . 北京: 清华大学出版社( Beijing: Tsinghua University Press ) ,2006.
- [33] Wang J H , Wang C H , Lin C C , Lee G B . In *Micro Electro Mechanical Systems ( MEMS)* ,2010 IEEE 23rd International Conference. 2010. 955.
- [34] Wang Y N , Kang Y , Xu D , Chon C H , Barnett L , Kalams S A , Li D . *Lab on a Chip* ,2008 ,8(2) : 309.
- [35] Bae S Y , Park H C , Oh J S , Yoon S Y , Park D W , Choi I K , Lim C S . *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* ,2009 ,76(5) : 345.
- [36] Li X , Tibbe A G , Droog E , Terstappen L W , Greve J . *Clinical and Vaccine Immunology* ,2007 ,14(4) : 412.
- [37] Ymeti A , Li X , Lunter B , Breukers C , Tibbe A G , Terstappen L W , Greve J . *Cytometry Part A* ,2007 ,71(3) : 132.
- [38] Li X , Breukers C , Ymeti A , Pattanapanyasat K , Sukapirom K , Terstappen L W , Greve J . *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* ,2010 ,78(1) : 31.
- [39] Moon S , Keles H O , Ozcan A , Khademhosseini A , Hæggsstrom E , Kuritzkes D , Demirci U . *Biosensors and Bioelectronics* ,2009 ,24(11) : 3208.
- [40] Ozcan A , Demirci U . *Lab on a Chip* ,2008 ,8(1) : 98.
- [41] Moon S , Keles H O , Kim Y G , Kuritzkes D , Demirci U . *Engineering in Medicine and Biology Society. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE. IEEE* ,2009. 6376.
- [42] Stybayeva G , Mudanyali O , Seo S , Silangeruz J , Macal M , Ramanculov E , Dandekar S , Erlinger A , Ozcan A , Revzin A . *Analytical Chemistry* ,2010 ,82(9) : 3736.
- [43] Zhu H , Mavandadi S , Coskun A F , Yaglidere O , Ozcan A . *Analytical Chemistry* ,2011 ,83(17) : 6641.
- [44] Alere , *PimaTMAlyser User Guide* , Alere , Jena ,2010.
- [45] Watkins N N , Sridhar S , Cheng X , Chen G D , Toner M , Rodriguez W , Bashir R . *Lab on a Chip* ,2011 ,11(8) : 1437.
- [46] Wu X , Chon C H , Wang Y N , Kang Y , Li D . *Lab on a Chip* ,2008 ,8(11) : 1943.
- [47] Wang Y N , Kang Y , Xu D , Chon C H , Barnett L , Kalams S A , Li D , Li D . *Lab on a Chip* ,2008 ,8(2) : 309.
- [48] Holmes D , Morgan H . *Analytical Chemistry* ,2010 ,82(4) : 1455.
- [49] Kiesel P , Beck M , Johnson N . *Cytometry Part A* ,2011 ,79(4) : 317.
- [50] Gohring J T , Fan X . *Sensors* ,2010 ,10(6) : 5798.

- [51] Wang Z , Chin S Y , Chin C D , Sarik J , Harper M , Justman J , Sia S K. *Analytical Chemistry* ,2009 ,82( 1) : 36.
- [52] Rodriguez W R , Christodoulides N , Floriano P N , Graham S , Mohanty S , Dixon M , Hsiang M , Peter T , Ahabnam Z , Thior I , Romanovicz D , Bernard B , Goodey A P , Walker B D , McDevitt J T. *PLoS medicine* ,2005 ,2( 7) : e182.
- [53] Mishra N N , Retterer S , Zieziulewicz T J , Isaacson M , Szarowski D , Mousseau D E , Lawrence D A , Turner J N. *Biosensors and Bioelectronics* ,2005 ,21( 5) : 696.
- [54] Jiang X , Spencer M G. *Biosensors and Bioelectronics* ,2010 ,25( 7) : 1622.
- [55] Cheng X , Liu Y S , Irimia D , Demirci U , Yang L , Zamir L , Rodriguez W R , Toner M , Bashir R. *Lab on a Chip* ,2007 ,7( 6) : 746
- [56] Cheng X , Irimia D , Dixon M , Ziperstein J C , Demirci U , Zamir L , Tompkins R G , Toner M , Rodriguez W R. *JAIDS* ,2007 ,45: 257.
- [57] Wang S , Wei Q , Zhu T , Huang J , Yu M , Sha Y , Xiong C , Fang J. *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation* ,2012 ,13( 5) : 311
- [58] Glynn M T , Kinahan D , Ducree J. *Lab on a Chip* ,2014 ,14: 2844.
- [59] Zachariah R , Reid S D , Chaillet P , Massaquoi M , Schouten E J , Harries A D. *Tropical Medicine and International Health* ,2011 ,16( 1) : 37.
- [60] Boyle D S , Hawkins K R , Steele M S , Singhal M , Cheng X. *Trends in Biotechnology* ,2012 ,30( 1) : 45.
- [61] Parish T. ( 2012-07-18) [ 2015-12-01 ]. [http://www. burnet. edu. au/news/140\\_project\\_nominated\\_for\\_saving\\_lives\\_at\\_birth\\_ award](http://www.burnet.edu.au/news/140_project_nominated_for_saving_lives_at_birth_award).