

Fluorescencyjna cytometria przepływowa w hematologii

Pierwsze komercyjne wykorzystanie fluorescencyjnych cytometrów przepływowych w obszarze hematologii sięga lat 70-tych ubiegłego wieku^[1]. Od tamtego czasu, pokonano długą drogę, by wypracować obecne, zaawansowane systemy. Jednym z motywujących czynników była wysoka niedokładność mikroskopii, gdzie w małej objętości i nieidealnych warunkach zliczana jest niewielka ilość cząsteczek^[2].

Po tym jak Sysmex zyskał doświadczenie w dziedzinie cytometrii przepływowej, w tym w pomiarze intensywności fluorescencji, nastąpił znaczny rozwój w obrębie najnowszych analizatorów hematologicznych. Obejmował on postęp w technologiach pomiarowych, gdzie dużą rolę odegrał laser półprzewodnikowy i pomiar intensywności fluorescencji.

Termin „cytometria” definiowany jest jako pomiar właściwości fizykochemicznych komórki. Natomiast „cytometria przepływowa” to pomiar komórek i innych cząstek w trakcie ich przepływu.

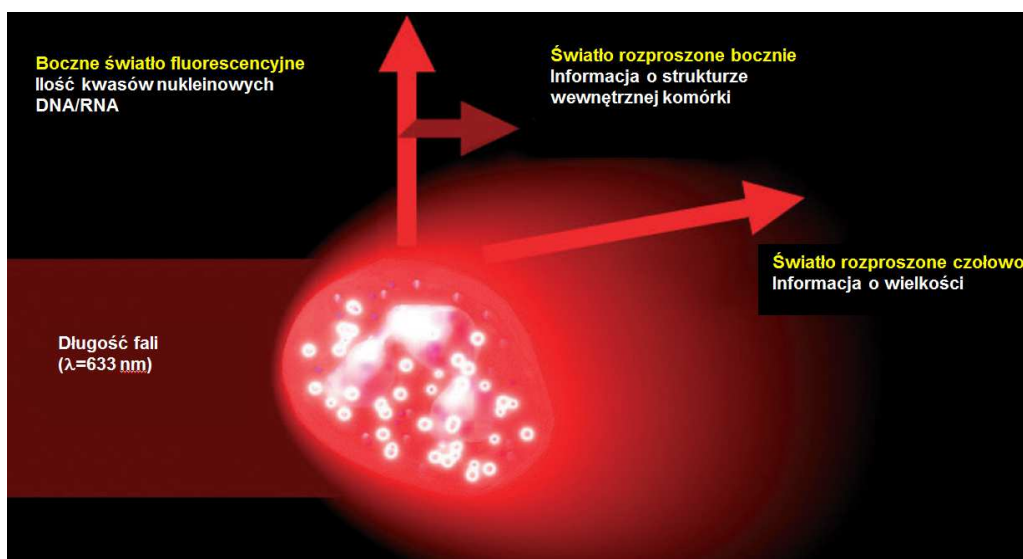
W trakcie uporządkowanego przepływu cząstek przez wiązkę lasera, rejestrowane są informacje optyczne o komórkach i innych cząstkach. Wiązki laserowe są bardzo spójne i posiadają zdolność skupiania się na bardzo małym obszarze. Dlatego umożliwiają one odebranie wystarczających sygnałów, np. od krwinek, przy czym unikane jest jednoczesne naświetlanie kilku cząstek. W prosty sposób można dostosować pożądaną długość monochromatycznej fali światła lasera^[1,2]. Otrzymane w ten sposób informacje optyczne mogą być wyrażone jako sygnały rozproszenia światła i/lub sygnały fluorescencji^[3,1].

O zdecydowanej przewadze cytometrii przepływowej nad metodami mikroskopowymi, świadczy większa precyzja, czułość i swoistość, a w konsekwencji większa wiarygodność wyników^[4,5], szybkość pomiaru (>1 000 lub odpowiednio 10 000 komórek/sekundę)^[6,1], a także brak konieczności przygotowania próbki. Metoda cechuje się doskonałą precyzją zliczania komórek, ze względu na dużą liczbę klasyfikowanych cząsteczek^[6,2].

Metoda pomiarowa

Jeśli w obszarze padania wiązki światła pojawi się obiekt, światło ulega rozproszeniu i zmienia swój kierunek. Pomiar rozproszenia światła dostarcza informacji dotyczących wielkości i jakości cząsteczki. Szczególnie światło rozproszone czołowo (na wprost), pozwala na uzyskanie informacji o wielkości obiektu. Na światło rozproszone czołowo decydujący wpływ (oprócz wielkości komórki) ma kształt obiektu i indeks załamania światła.

Światło rozproszone bocznie (sygnał światła rozproszony na boki) dostarcza informacji o wewnętrznych właściwościach cząsteczki. W ten sposób krwinki mogą być analizowane w odniesieniu do ich wielkości i wewnątrzkomórkowej złożoności strukturalnej (forma, wielkość i gęstość jądra, ziarnistości cytoplazmy)^[3,2]. Na światło rozproszone bocznie, decydujący wpływ ma obecność ziarnistości^[1]. Do wykrywania światła rozproszonego bocznie wymagany jest szczególny detektor – pełniący rolę fotopowielacza, ponieważ w porównaniu do światła rozproszonego czołowo, intensywność tego sygnału jest słabsza o kilka rzędów wielkości^[1].



Rysunek 1 Zasada działania cytometrii przepływowej z użyciem lasera diodowego

Barwnik fluorescencyjny pochłania światło o określonej długości fali ze źródła emitującego światło. Ze względu na zaabsorbowaną energię świetlną, elektrony cząsteczek barwnika osiągają wyższy poziom energetyczny (pobudzenie). Elektrony przechodząc na ich podstawowy poziom energetyczny (krótco po ich pobudzeniu) oddają energię, która jest emitowana jako światło fluorescencyjne. Światło to posiada większą długości fali, a więc niższą energię niż światło wzbudzające^[8], ponieważ część energii wzbudzenia jest oddawana w postaci energii cieplnej^[4]. Ilość zaabsorbowanego światła (a także ilość re-emitowanego światła) jest proporcjonalna do stężenia analizowanej substancji^[4]. Pomiar intensywności fluorescencji dostarcza informacji na temat barwności obiektu^[3].

Wybarwienie komórek krwi, świadczy o zawartości kwasów nukleinowych^[7], zależy jednak od użytego barwnika. W oparciu o tę zasadę można przeprowadzić różnicowanie komórek, wyodrębniając te elementy, które nie emitują lub emitują słabe bądź silne światło fluorescencyjne^[1]. Tutaj ponownie, wrażliwy fotopowielacz jest niezbędny do detekcji sygnału. Interferencja ze strony padającego bezpośrednio światła laserowego nie występuje, gdyż światło fluorescencyjne emitowane we wszystkich kierunkach będzie wykrywane pod większym kątem (np. 90°)^[4].

Pomimo takiego samego kąta padania światła, detekcja światła rozproszonego bocznie jak również bocznego światła fluorescencyjnego jest niezależna, gdyż światło fluorescencyjne ma większą długość fali od światła rozproszonego, które nie jest zmienione w odniesieniu do długości fali lasera i lustra dichroicznego. W ten sposób zapewnione jest rozdzielenie sygnału^[1]. Im bardziej wyraźne są różnice w długości fali (nazywane „przemieszczeniem Stocka”), tym bardziej czułą i wrażliwą metodą będzie mierzona aktywność fluorescencyjna^[4].

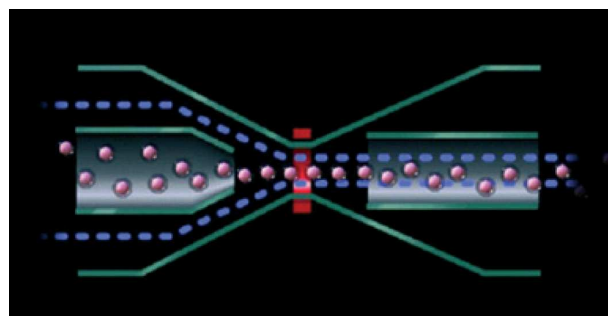
Do dalszej analizy komórek, opisane wyżej, równoległe rejestrowane od każdej komórki sygnały, wprowadzane są na tak zwane skatergramy, czyli wykresy rozproszenia. Poszczególne punkty skatergramu reprezentują dane z pomiarów odpowiednich komórek. Punkty te mogą być następnie łączone lub odpowiednio przypisane do populacji, dzięki czemu możliwe jest ustalenie liczby komórek w każdej populacji. Wykresy rozproszenia przedstawiają informacje w odniesieniu do rozmiaru komórek, ziarnistości i intensywności fluorescencji, przetwarzają informacje analityczne tak, by jako wynik przedstawić szczegółowy profil badanych komórek. Zrozumiałe jest, że ilość danych pochodząca od

tysięcy komórek jest bardzo obszerna i złożona, co implikuje obsługę tych danych przez komputer^[2], dzięki czemu procesy te są wykonywane w pełni automatycznie. W "klasycznych" cytometrach przepływowych analizowanie i grupowanie komórek (bramkowanie) wykonywane jest manualnie przez użytkownika^[1].

Systemy hematologiczne stosują stałą objętość rozcieńczonej próbki krwi. Toteż stężenie zawiesiny komórek krwi można łatwo obliczyć. W dziedzinie hematologii, cytometry przepływowe liczą i rozpoznają – oprócz rozdziału 5-DIFF – komórki nieprawidłowe, które mogą pojawić się w najróżniejszych obrazach klinicznych. Rozwój metod oparty jest w dużej mierze na rozwoju w obszarze odczynników (zwłaszcza fluorochromów), jak również komputerów i oprogramowania^[1, 2].

Rozwój w Sysmex

Sysmex posiadał systemy przepływowe już w 1980 roku. Wtedy to wprowadzono na rynek serię analizatorów E, stanowiącą cykl pierwszych na świecie, w pełni automatycznych liczników hematologicznych, wykorzystujących ogniskowanie hydrodynamiczne i impedancję. Po raz pierwszy ogniskowanie hydrodynamiczne (HDF) pozwoliło znacznie podnieść wiarygodność pomiarów, gdyż efektywnie zapobiegało wzajemnym oddziaływaniom cząstek i pozwoliło na osiągnięcie właściwego pozycjonowania cząsteczek w centralnym obszarze przetwornika pomiarowego. Płyn opłaszczający otacza cylindrycznie próbkę, dbając o to, by żadna z cząstek przepływając przez aperturę pomiarową nie znalazła się zbyt blisko ścianki lub nie dotarła do otworu wlotowego ustawiona pod niekorzystnym kątem, co może zmienić, a tym samym zafałszować sygnał pomiarowy. Wystarczające rozcieńczenie próbki zapewnia^[7, 5], niezależne rejestrowanie wszystkich komórek i, z dokładnością do kilku mikrometrów, ich stały i stabilny przepływ przez środek apertury pomiarowej (2-10 m/s)^[1, 5].



Rysunek 2 Ogniskowanie hydrodynamiczne

Pierwszym komercyjnym, w pełni automatycznym aparatem zliczającym retikulocyty był aparat R-1000, który został wprowadzony na rynek

w Japonii w 1987 roku^[1]. Ten i następujące po nim systemy z serii R to cytometry przepływowe, które bazowały na technologii przepływu z płynem opłaszczającym i laserem argonowym^[1]. Używano wówczas fluorochromem był kationowy barwnik difenylometanowy, Auramina-O, który stosowany jest do dziś. Barwnik ten fluoryzuje w zależności od gęstości otaczającego roztworu. W roztworze wodnym nie emituje fluorescencji; lecz jedynie po związaniu z polianionami, takimi jak DNA^[9]. Ówczesnie tylko laser argonowy miał wystarczającą energię i odpowiednią długość fali, aby móc oznaczyć bardzo niskie stężenia RNA w retikulocytach^[8,3,7]. Wtedy, po raz pierwszy stało się możliwe dokładne, ilościowe oznaczenie retikulocytów, przy rozsądnych kosztach^[6]. W rezultacie, w pełni automatyczna analiza retikulocytów stała się powszechna^[7].

SF-3000, wprowadzony w 1995 roku, jako pierwszy analizator hematologiczny 5-DIFF, bazował na laserze półprzewodnikowym. Ciągłe nie mierzył on jednak światła fluorescencyjnego. Używał tylko barwnika, który reagował specyficznie z eozynofilami, by zmienić ich sygnał światła rozproszonego, w celu skutecznego oddzielenia ich od pozostałych granulocytów^[7]. SF-3000 wykorzystywał wyłącznie pomiary światła rozproszonego^[8], a detekcja odbywała się pod różnymi kątami. W SF-3000 zasada detekcji, bazowała na rozdziale 4-DIFF (limfocyty, monocyty, neutrofile i eozynofile). Piąta populacja białych krwinek – granulocyty zasadochłonne, jak również całkowita liczba leukocytów mierzone były w osobnym kanale. Do dziś niektóre analizatory serii X korzystają z dobrze sprawdzającego się kanału WBC/BASO, którego zasada działania została jedynie nieznacznie zmodyfikowana.

Źródła światła

Źródłem światła stosowanym w analizatorach serii X jest laser półprzewodnikowy, emitujący światło czerwone ($\lambda = 633$ nm). Jest to światło mające niską wartość energetyczną. Stosowanie laserów półprzewodnikowych emitujących światło o dłuższej fali zyskało akceptację, ze względu na: znacznie dłuższą żywotność, mniejsze zużycie energii i jednocześnie małe wymiary źródła światła – wszystko to stanowi idealne warunki do produkcji kompaktowych i przyjaznych dla środowiska urządzeń z długą żywotnością.

Barwniki polimetynowe

Gdy światło pada na obiekt, skutkuje to nie tylko rozproszeniem światła, ale także absorpcją przez dany obiekt części światła o określonej długości fali. W celu zwiększenia zjawiska absorpcji, komórki są często barwione, tzw. barwnikami fluorescencyjnymi, które emitują część

zaabsorbowanego światła, jako falę o niższej długości^[6]. W wyborze odpowiedniego fluorochromu, pod uwagę brane są dwie zmienne: wydajność kwantowa (jak skuteczne jest wzbudzenie elektronów i jak duży jest udział elektronów, które nie emitują energii w postaci ciepła, ale jako światło fluorescencyjne), a także przedział czasowy pomiędzy absorpcją a emisją^[4].

Stosowane fluorochromy muszą mieć pewne charakterystyczne właściwości, aby pomiar aktywności fluorescencyjnej przy użyciu lasera półprzewodnikowego był możliwy:

- muszą absorbować pochodzące z lasera światło o długiej fali i niskiej energii,
- muszą przenikać przez błony komórkowe, aby dostać się do wnętrza komórek, gdzie łączą się z pożądanymi organellami komórkowymi i/lub komponentami (np. kwasami nukleinowymi).
- powinny fluoryzować dopiero po utworzeniu związku z odpowiednimi komponentami
- powinny być stabilne chemicznie przy jednocześnie najniższej toksyczności^[10].

Dopiero barwniki polimetynowe były w stanie sprostać tym wysokim wymaganiom.

Barwniki polimetynowe są używane w przemyśle głównie jako odczynniki do nowoczesnych technologii, tj. barwniki absorbujące w zakresie podczerwieni, w kolorowych drukarkach laserowych, monomolekularnych membranach do produkcji CD. Doskonale nadają się również do przyżyciowego barwienia komórek^[10,8].

Zaletą barwników polimetynowych jest łatwość dopasowania ich do potrzeb użytkownika. Można modyfikować nie tylko długość absorbowanej fali, ale także przepuszczalność błon komórkowych i jądrowych oraz powinowactwo do specyficznych elementów komórkowych. Związki polimetynowe z powodu ich dodatniego ładunku łatwo wiążą się z kwasami nukleinowymi. Posiadają wymaganą cechę nie emitowania fluorescencji w postaci wolnej w roztworach wodnych (takich jak np. odczynniki Sysmex), a absorbowane światło lasera emitowane jest tylko w postaci energii cieplnej na drodze dyfuzji. Nie wywołują tym samym żadnych fałszywych sygnałów lub innych zakłóceń. Po związaniu barwnika polimetynowego np. z kwasami nukleinowymi, zwiększa się absorpcja światła i emitowane jest silne fluorescencyjne światło czerwone ($\lambda \geq 660$ nm), dopóki wewnątrzcząsteczkowe ruchy dyfuzyjne nie zostaną zahamowane poprzez wiązania cząsteczkowe. Otrzymano tym samym doskonały stosunek sygnału do zakłóceń. Związki polimetynowe są niestabilne chemicznie i muszą być stabilizowane w odczynnikach barwiących.

Z drugiej strony, dzięki temu są bardzo łatwo degradowane w ciekłych odpadach. Jeśli chodzi o działanie mutagenne, związki polimetynowe opisane są jako bezpieczne, w porównaniu z innymi barwnikami fluorescencyjnymi wiążącymi kwasy nukleinowe^[10,8].

Zasada różnicowania

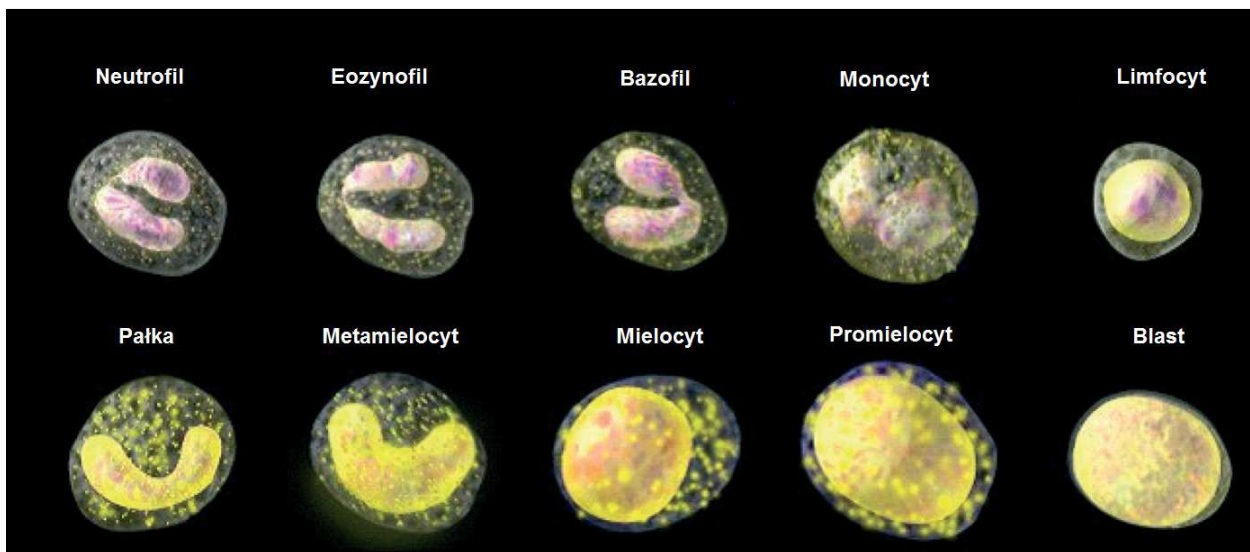
Zastosowanie metod optycznych do różnicowania i zliczania białych krwinek po raz pierwszy miało miejsce ponad 100 lat temu, kiedy to Paul Ehrlich wykazał, że jądrowe i cytoplazmatyczne struktury komórkowe możliwe są do wybarwienia. Użył do tego barwnika – aniliny, stosowanej w przemyśle włókienniczym^[6].

Fluorescencyjna cytometria przepływowa stosowana w analizatorach Sysmex umożliwia pomiar i różnicowanie krwinek białych, retikulocytów i płytek krwi, jak również analizę erytoblastów^[8,3]. Analityczny rdzeń dopełniany jest przez kanał RBC/PLT do oznaczania krwinek czerwonych i płytek krwi, bazujący na metodzie

impedancyjnej (DC ang. direct current) z ogniskowaniem hydrodynamicznym^[11].

Różnicowanie WBC

Barwnik polimetynowy penetruje do wnętrza krwinek białych, barwiąc jądro komórkowe jak również inne organelle cytoplazmatyczne^[8]. Im wyższa zawartość wewnątrzkomórkowego RNA, który może świadczyć o nieprawidłowościach w komórkach w porównaniu z prawidłowymi komórkami – tym wyższa wartość sygnału z pomiaru bocznego światła fluorescencyjnego^[3]. Taka zależność ma miejsce nie tylko w odniesieniu do niedojrzałych granulocytów (IG), ale także do atypowych limfocytów prezentowanych w obszarach o znacząco podwyższonej intensywności fluorescencji, w porównaniu do neutrofilii lub odpowiednio do limfocytów i monocytów^[8]. Tak więc, poza rozdziałem WBC, fluorescencyjna cytometria przepływowa umożliwia wykrywanie i zliczanie niedojrzałych granulocytów jak również komórek pobudzonych, np. atypowych limfocytów^[8].



Rysunek 3 Dojrzałe i niedojrzałe krwinki białe wybarwione fluorochromem używanym w analizatorach serii X

Retikulocyty, płytki krwi i kanał RET

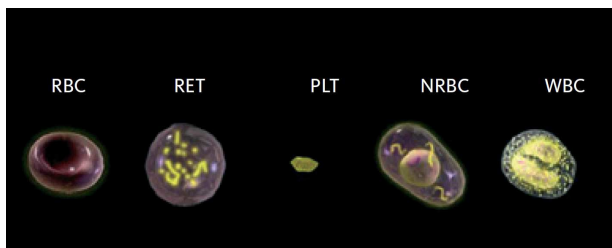
Analiza retikulocytów stosowana jest w diagnostyce i monitorowaniu niedokrwistości^[6]. Zasadniczą zaletą analizy retikulocytów za pomocą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej, w porównaniu ze zliczaniem mikroskopowym, jest znacznie wyższa czułość i doskonała precyzja. To oznacza np., że po leczeniu cytostatycznym wzrost retikulocytów będzie wykrywany znacznie szybciej^[12].

Kanał RET oprócz zliczania retikulocytów, różnicuje je w zależności od stopnia dojrzałości, zlicza również płytki krwi (PLT-I), opierając się na pomiarze fluorescencyjnym. Barwnik polimetynowy

barwi DNA i RNA zawarte w komórkach. Ze względu na zawartość RNA, retikulocyty różnicowane są z erytrocytami i z krwinkami białymi, na podstawie dysproporcji w zawartości RNA/DNA obu typów komórek. WBC zawierają DNA w związku z tym dają silniejszy sygnał fluorescencyjny aniżeli retikulocyty, które nie zawierają DNA.

W tym kanale mierzone są sygnały bocznego światła fluorescencyjnego oraz światła rozproszonego czołowo, co pozwala na jednoznaczne rozdzielanie płytek krwi i erytrocytów, dzięki czemu nie dochodzi do interferencji ze strony płytek olbrzymich, mikrocytów czy fragmentocytów. W przypadku

trombocytopenii, ze względu na większą czułość metody, uzyskiwane są bardziej precyzyjne wyniki. Różnicowanie retikulocytów na trzy frakcje o różnej aktywności fluorescencyjnej oraz frakcję niedojrzałych retikulocytów (IRF), pozwala na ocenę aktywności erytropoetycznej szpiku kostnego^[8,7]. Parametr RET-He, dostępny w tym kanale, jest miarą wydajności produkcji hemoglobiny i jej zawartości w retikulocytach, dostarcza dodatkowo cennych wskazówek w zakresie diagnostyki niedokrwistości.



Rysunek 4 Dojrzałe i niedojrzałe erytrocyty i inne komórki, wybarwione fluorochromem używanym w analizatorach serii X

Standardy analizy retikulocytów metodą cytometrii przepływowej zostały opublikowane przez Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute), jak również Międzynarodowy Komitet Standaryzacyjny w Hematologii (ang. ICSH - International Council for Standardization in Haematology).

Erytroblasty (NRBC) i kanał NRBC

Pomiar NRBC ma duże znaczenie kliniczne: dostarcza ważnych informacji o rezultatach terapii – nie tylko w przypadku talasemii itp. Wyniki istotnie klinicznie uzyskuje się również w diagnostyce przewlekłych chorób mieloproliferacyjnych, takich jak mielofibroza czy białaczka szpikowa^[10,7].

Podczas gdy metody manualne, ze względu na niską liczbę zliczeń, dostarczają nieprecyzyjnych wyników, analiza instrumentalna niweluje te ograniczenia. Użycie fluorescencyjnej cytometrii przepływowej bazującej na półprzewodnikowym laserze i specjalnym odczynnikiem, umożliwia dokładne i szybkie zliczanie NRBC, a tym samym także WBC.

Po wybarwieniu jąder (kwasów nukleinowych i błon jądrowych) oraz organelli komórkowych krwinek białych przez barwnik polimetynowy, następuje pomiar bocznego światła fluorescencyjnego i światła rozproszonego czołowo^[11,10]. Odślonięte jądra NRBC słabo się wybarwiają, ze względu na bardzo duże zagęszczenie chromatyny. NRBC i WBC mogą być oddzielone od siebie poprzez różnice w intensywności światła rozproszonego czołowo, a także na podstawie sygnału fluorescencyjnego^[10,7]. Ze względu na specyfikę

barwienia, erytroblasty zasadochłonne pojawiają się w obszarach o silniejszej fluorescencji, aniżeli erytroblasty kwasochłonne^[8].

Niedawno, oficjalnie uznana metoda referencyjna zliczania NRBC, została dostosowana do nowych warunków technologicznych. Automatyczna ocena liczby NRBC metodą cytometrii przepływowej (CD45) zajęła miejsce metod manualnych, które były obarczone statystyczną niedokładnością oraz wpływem subiektywnych czynników zewnętrznych. Potwierdza to, że metoda cytometrii przepływowej dostarcza doskonałe wyniki.

Podsumowanie

W obszarze diagnostyki na poziomie komórkowym, cytometria przepływowa oferuje wszechstronny potencjał zastosowań do rutynowej pracy laboratoryjnej. Obecny rozwój technologii pozwala na stosowanie technik pomiarowych, jak również automatyzację analizy danych, pochodzących z rutynowej pracy.

Łatwość użycia i wiarygodność cytometrów przepływowych były ciągle ulepszone i rozwijane. Poczyniono postępy w zakresie źródeł światła laserowego, fluorochromów, a także właściwości odczynników. W ten sposób coraz więcej populacji komórek może być różnicowanych w pełni automatycznie. Taka różnorodność dostępnych wyników analitycznych, powoduje, że wzrasta ich zastosowanie w diagnostyce specjalistycznej oraz badaniach naukowych^[6]. Szczególnie interesującym faktem jest coraz większa zdolność do wykrycia małej liczby komórek patologicznych w dużej populacji komórek. Klinicznie istotna jest możliwość wykrywania w ten sposób chorób resztkowych lub wczesnych etapów nawrotu, co daje możliwość natychmiastowego podejmowania działań terapeutycznych. W porównaniu z odpowiednimi metodami cytogenetycznymi, cytometria przepływowa ma tę zaletę, że jest szybsza i tańsza^[2].

Wiele parametrów, uzyskanych metodą cytometrii przepływowej ma duże znaczenie w badaniach naukowych. Ich znaczenie kliniczne w rutynowej diagnostyce stale się zwiększa^[6]. W tym obszarze Sysmex bierze aktywny udział, by wyraźnie łączyć wydajność analityczną z diagnostyczną, a tym samym z kliniczną wartością wyników. Tylko wtedy korzyści dla użytkownika będą satysfakcjonujące. Analiza retikulocytów stanowi doskonały przykład, iż jest to parametr predestynowany do zastosowania cytometrii przepływowej, ponieważ RNA wewnątrzkomórkowe wykrywane jest poprzez fluorochrom. Pomiar krwinek czerwonych i ich prekursorów jedynie przez sygnał rozproszenia światła dostarcza niepewnych

i nieprzewidywalnych wyników, ze względu na dwuwklęśły kształt krwinek czerwonych^[6,2].

Obiecującymi kandydatami w dziedzinie hematologii są pomiary funkcji granulocytów obojętnochłonnych^[6]. Innym kierunkiem jest badanie niedojrzałych płytek krwi, przeprowadzane w oparciu o oznaczanie zawartości RNA w tych komórkach, pomocne do różnicowania zaburzeń w budowie i funkcji płytek krwi^[12].

Możliwości technologiczne analizatorów hematologicznych stale wzrastają, dlatego jesteśmy przekonani, że nasze systemy analityczne zapewniają nie tylko doskonałą wydajność analityczną, ale także, że w przyszłości będziemy analizować komórki, które dziś ciągle uważane są za trudno wykrywalne w sposób automatyczny^[10].

Źródła:

- [1] Kaoru Takarada: 'Flow Cytometers – History and Measurement Principle'; *Sysmex J Int* 6:83–90, 1996
- [2] G T Roberts, M.B., FRCPC: 'Current Applications of Flow Cytometry'; *Lab Medica Vol. VIII*, No. 1/1–2, 1991
- [3] Hiroyuki Inoue: 'Overview of Automated Hematology Analyzer XE-2100'; *Sysmex J Int* 9:58–64, 1999
- [4] E M Cadoff, MD: 'Fluorescence Assays: Fluorescence Polarization and Time-Resolved Pulse'; *Laboratory Medicine* 21:347–352; 1990
- [5] W Tauscher: 'Lasertechnologie in der Methodik der Partikelgrößenuntersuchung'; *GIT Lab. Med.* 6, pp 394–401, 1983
- [6] W Groner and R Kanter: 'Optical Technology in Blood Cell Counting'; *Sysmex J Int* 9:21–30, 1999
- [7] Keiji Fujimoto: 'Principles of Measurement in Hematology Analyzers Manufactured by Sysmex Corporation'; *Sysmex J Int* 9:31–44, 1999
- [8] Hideaki Matsumoto: 'The Technology of Reagents in the Automated Hematology Analyzer Sysmex XE-2100 – Red Fluorescence Reaction'; *Sysmex J Int* 9:179–184, 1999
- [9] L Brandt and J R Gohlke: 'Fluorescence Probes for Structure'; *Ann Rev Biochem*, 41; pp 843–864, 1972
- [10] Takashi Sakata: 'Reagent Characteristics in the XE-2100 NRBC Channel'; *Sysmex J Int* 10:41–46, 2000
- [11] Masanori Imazu: 'General Description of the Automated Hematology Analyzer, XT-2000i'; *Sysmex J Int* 12:13–17, 2002
- [12] G Schmitz: 'Anwendungsmöglichkeiten der Durchflusszytometrie in der Laboratoriumsmedizin'; *Journal of Lab Med* 12 (10) BDL 114–115, 1988.