

SEED Hematologia



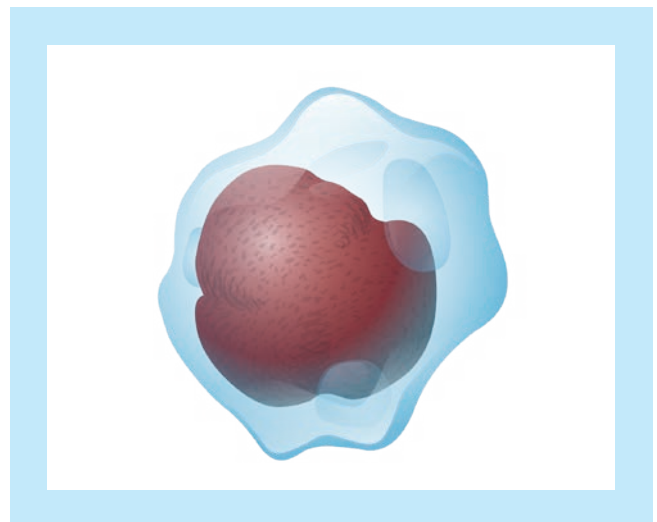
Wyzwania zliczania monocytów

Wprowadzenie

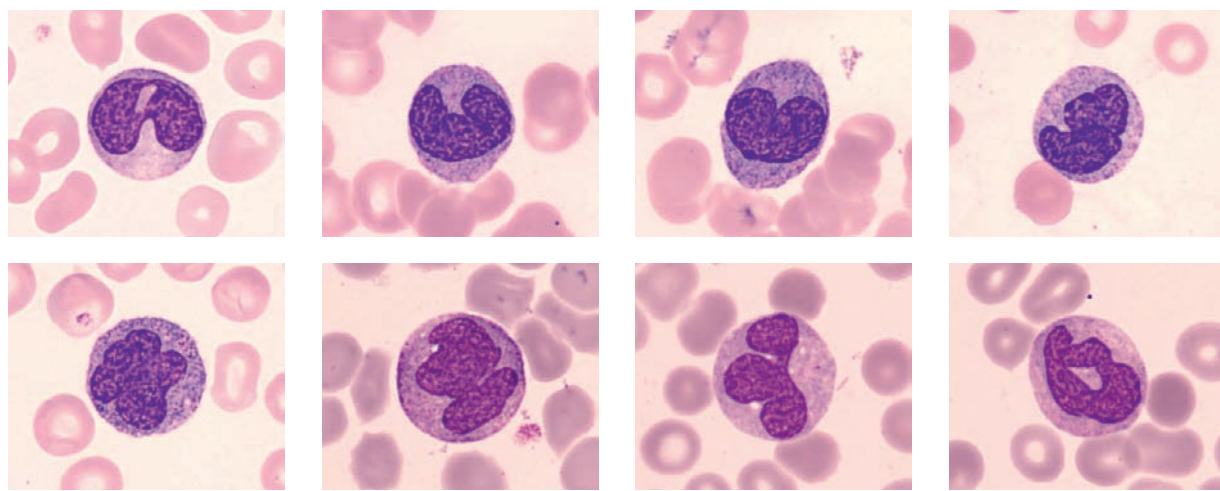
Monocyty są jedną z populacji leukocytów (białych krwinek – WBC) i pełnią ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Jedną z ich funkcji jest niszczenie bakterii w procesie fagocytozy, z tego powodu w ich cytoplazmie często widoczne są wakuole.

Monocyty produkowane są w szpiku kostnym z komórek prekursorowych zwanych monoblastami, które z kolei wywodzą się z hematopoetycznych komórek macierzystych. Monocyty krążą w krwioobiegach od około jednego do trzech dni, po czym zazwyczaj wnikają do tkanek w całym organizmie. W tkankach całego ciała następuje proces dojrzewania monocytów do różnych typów makrofagów. Makrofagi poprzez proces fagocytozy odpowiadają za ochronę tkanek przed obcymi ciałami (mikrobami, komórkami nowotworowymi, szczątkami komórek). Morfologicznie monocyty są największymi leukocytami o wielkości od 10 do 20 μm . Zazwyczaj posiadają duże jądro i umiarkowaną ilość cytoplazmy, która w barwieniu Maya-Grunwalda-Giemsy przyjmuje kolor szaroniebieski. Ich cytoplazma może zawierać małe, równomiernie rozłożone ziarnistości i czasami wakuole (ryc. 1 i 2). Zakres referencyjny dla monocytów wynosi u mężczyzn: 5,2 – 15,2% lub $0,29 - 0,95 \times 10^9/\text{l}$, a u kobiet: 4,2 – 11,8% lub $0,25 - 0,84 \times 10^9/\text{l}$ [1]. Wartości wykraczające poza opisany zakres niekoniecznie są wyznacznikiem stanu chorobowego. Zaleca się zawsze sprawdzać

zakresy referencyjne pod względem dopasowania w danej populacji pacjentów według metody zalecanej przez Międzynarodową Organizację Biochemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) [2].



Ryc. 1 Ilustracja przedstawiająca monocyt



Ryc. 2 Obrazy mikroskopowe monocytów w wybarwionym rozmazie krwi obwodowej

Funkcja monocytów

Monocyty a także makrofagi i komórki dendrytyczne, w które się różnicują, pełnią trzy główne funkcje w systemie odpornościowym.

a) Fagocytoza

Drobnoustroje i ciała obce są pochłaniane przez komórkę i niszczone poprzez proces trawienia.

b) Prezentacja antygenów

Fragmety białek drobnoustrojów, które pozostały po procesie trawienia mogą służyć jako antygeny. Prezentowane są na powierzchni monocytów co aktywuje limfocyty T, które wytwarzają swoistą odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciw zaprezentowanemu antygenowi.

c) Produkcja cytokin

Wiele czynników wytwarzanych przez inne komórki może regulować chemotaksję i inne funkcje monocytów. Dla przykładu niektóre drobnoustroje mogą bezpośrednio stymulować monocyty do produkcji prozapalnych i przeciwzapalnych cytokin i wspomagać odpowiedź immunologiczną.

Zliczanie monocytów

Liczba monocytów stanowi część wyniku rozdziału populacji leukocytów i może być wyrażona jako procent względem całkowitej liczby białych krwinek lub jako wartość bezwzględna. Obydwie wymienione wartości są użyteczne w przypadku stawiania diagnozy. Wyróżniamy dwa stany nieprawidłowe odnoszące się do liczby monocytów: monocytozę i monocytopenię.

1) Monocytoza

Jest to wzrost liczby monocytów w krwioobiegu, a doprowadzić do niej może szeroka gama różnych schorzeń. Niektóre z nich to różne choroby infekcyjne (np. gruźlica, trąd czy salmonelloza), choroby krwi i układu odpornościowego (przewlekła neutropenia i choroby mieloproliferacyjne), choroby autoimmunologiczne i zapalenie naczyń, białaczki (np. przewlekła białaczka mielomonocytowa – CMML), stan rekonwalescencji po neutropenii lub ostra infekcja.

2) Monocytopenia

Jest to zmniejszenie liczby monocytów w krwioobiegu. Izolowana monocytopenia jest rzadko spotykanym zjawiskiem. Wśród jej przyczyn możemy odnaleźć: ostre infekcje, stres, stosowanie glikokortykosteroidów, anemię aplastyczną, białaczkę włochatokomórkową, ostrą białaczkę szpikową, terapię lekami mielotoksycznymi i zespoły genetyczne.

Wyzwania w zliczaniu monocytów

Gdy porównamy manualną i automatyczną metodę zliczania monocytów nasuwają się następujące pytania odnośnie liczby monocytów:

- Dlaczego wyniki otrzymane z manualnego zliczania są zwykle niższe od metody automatycznej?
- Dlaczego stosowane są różne zakresy referencyjne dla metody manualnej i automatycznej?

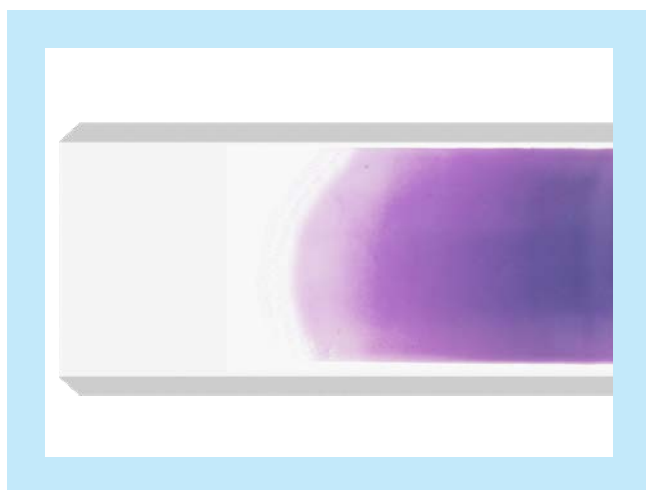
Powód różnicy w liczbie monocytów może zostać zidentyfikowany, gdy przyjrzymy się uważniej używanej metodzie, regułom statystyki, a także sposobowi, w jaki monocyty układają się na szkiełku rozmazowym.

Metody

Manualne różnicowanie krwinek białych

Otrzymywane jest poprzez wykonanie rozmazu krwi obwodowej: cienka warstwa krwi jest rozciągana na szkiełku mikroskopowym, a następnie wybarwiana w sposób umożliwiający ocenę poszczególnych komórek krwi. W tym celu należy odnaleźć obszar, w którym krwinki tworzą pojedynczą warstwę komórek co pozwoli na ich dalsze zliczenie i ocenę. Poszukiwany obszar jest zlokalizowany w tzw. „wąsach” rozmazu, które powstają w wyniku rozmazywania krwi przez szkiełko rozmazujące (ryc. 3). Po wybarwieniu, pojedyncza warstwa komórek jest oglądana pod mikroskopem, poszczególne krwinki są oceniane, a ich morfologia opisywana i zapisywana.

Na jakość rozmazów (wybarwionych według metody Maya-Grunwalda-Giemsy lub Wrighta) wpływa wiele znanych czynników, takich jak odtłuszczenie szkiełka, jakość szkiełka rozmazującego, kąt rozmazywania i protokół barwienia. Ponadto monocyty są szczególnie przylegającymi komórkami. Zarówno powierzchnia szkiełka rozmazującego, jak i szkiełka, na którym wykonywany jest rozmaz, stanowią doskonałe obszary adhezyjne dla tej populacji krwinek białych. W rezultacie monocyty wykazują tendencję do zbierania się na brzegach rozmazu [3]. Z tego powodu pewną trudność może przysparzać próba odnalezienia ich w pojedynczej warstwie komórkowej, która zazwyczaj jest oglądana, co zwiększa trudność uzyskania wiarygodnego wyniku.

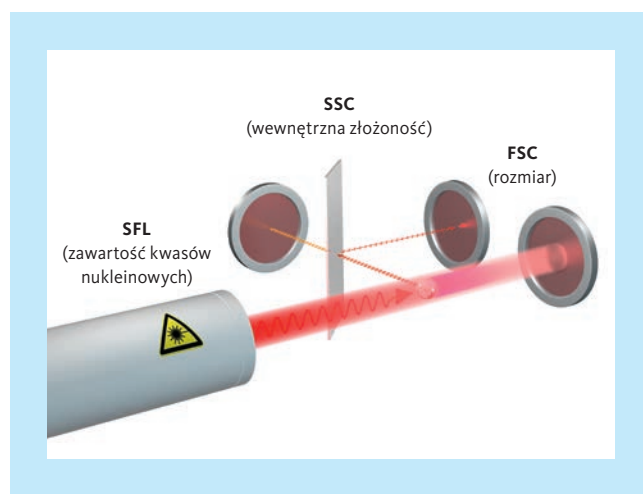


Ryc. 3 Tzw. „wąsy” widoczne na końcu rozmazu krwi obwodowej wybarwionej metodą Wrighta-Giemsy

Automatyczny pomiar komórek

Przy pomocy cytometrii przepływowej komórki są znakowane fluorescencyjnie i mierzone przy użyciu lasera półprzewodnikowego. Cytometr przepływowy liczy i klasyfikuje komórki poprzez naświetlanie ich monochromatyczną wiązką światła lasera i analizę otrzymanych sygnałów. Są to sygnały światła: rozproszonego czołowo (FFS), rozproszonego bocznie (SSC) i bocznego fluorescencyjnego

(SFL). Intensywność dwóch pierwszych (FSC i SSC) obrazuje strukturę powierzchni, wielkość i kształt cząsteczki, kształt jądra, indeks refrakcji i odbłask komórki. Generalnie sygnał FSC rośnie wraz ze wzrostem rozmiaru komórki, a sygnał SSC jest silniejszy im bardziej skomplikowane są struktury wewnętrzne. Z kolei intensywność światła fluorescencyjnego odzwierciedla głównie rodzaj i ilość kwasów nukleinowych oraz wewnętrzne organelle komórkowe. To właśnie przy użyciu wspomnianych wcześniej technik następuje różnicowanie i zliczanie subpopulacji leukocytów. Pozwala to także na wykrywanie komórek nieprawidłowych i niedojrzałych (ryc. 4).

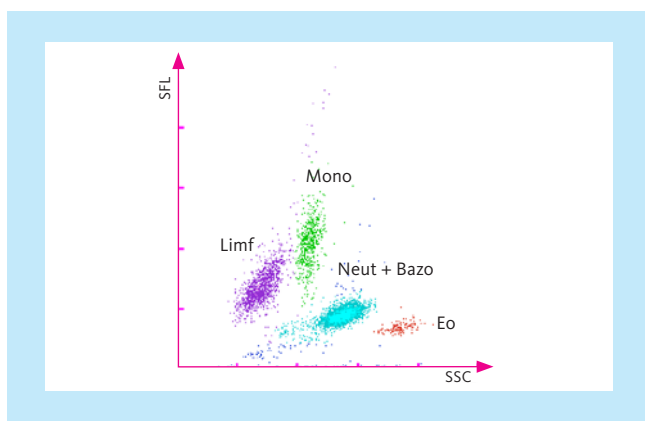


Ryc. 4 Zasada pomiaru fluorescencyjnej cytometrii przepływowej

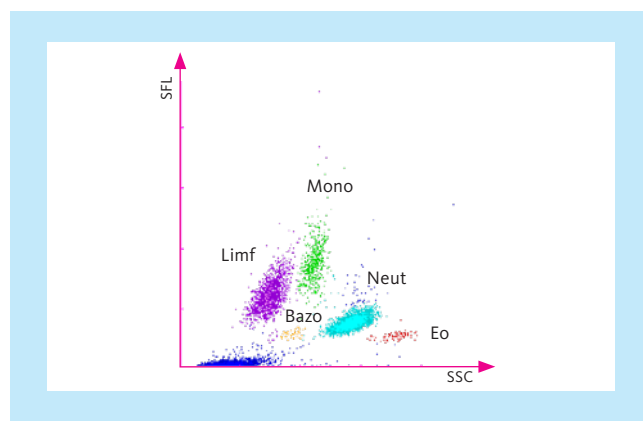
Technologia analizatorów XN

Portfolio analizatorów XN składa się z serii XN i XN-L. Przy użyciu kanału WDF seria XN bada cztery populacje komórek (neutrofile, eozynofile, limfocyty, monocyty (ryc. 5a)), a seria XN-L pięć populacji (cztery wcześniej wymienione plus bazofile (ryc. 5b)).

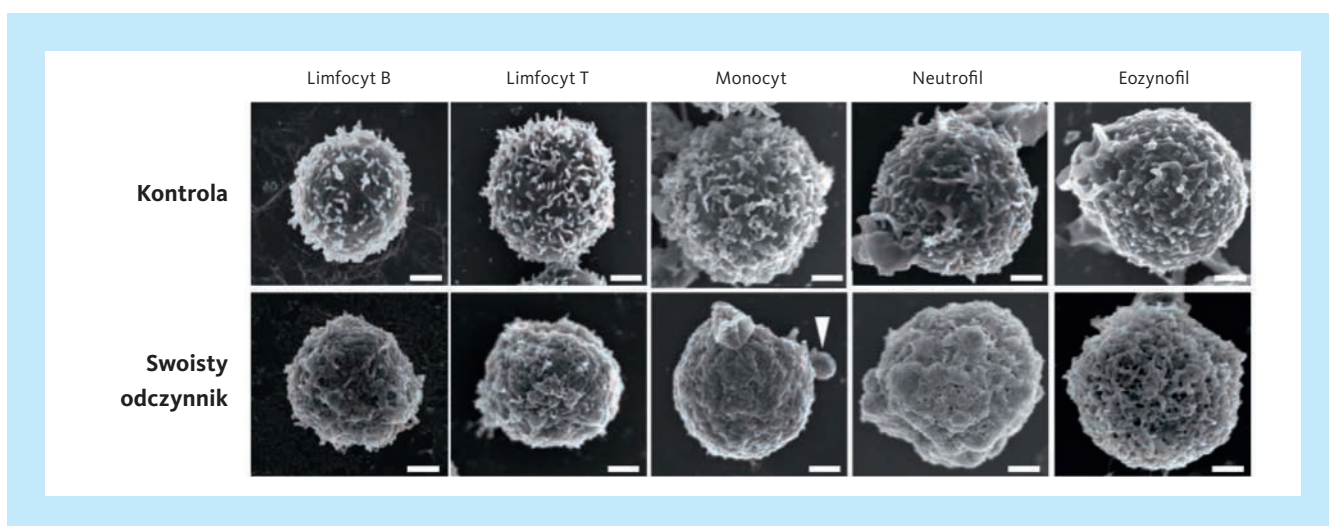
W obydwu seriach analizatorów zasada pomiaru bazuje na wyjątkowym układzie odczynników składającym się z roztworu lizującego i markera fluorescencyjnego, które dodawane są do próbki krwi. Podczas tego procesu pierwszy składnik, Lysercell WDF, powoduje hemolizę i rozpad czerwonych krwinek i płytek krwi, natomiast w krwinkach białych przyczynia się jedynie do perforacji błony komórkowej. Białe krwinki w większości pozostają w stanie nienaruszonym, co czyni ten odczynnik tak niezwykłym. Potencjalne zmiany, wpływ na morfologię komórek, a także stopień permeabilizacji błony zależy od cech poszczególnych typów białych krwinek. Różnice te są widoczne przy użyciu światła rozproszonego bocznie. Opisane zmiany mogą być zaobserwowane w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) (ryc. 6) i przy użyciu innych technik [4]. W kolejnym kroku znacznik fluorescencyjny penetruje do komórek i znakuje ich kwasy nukleinowe oraz organelle komórkowe.



Ryc. 5a Skatergram WDF serii XN (TTP)



Ryc. 5b Skatergram WDF serii XN-L



Ryc. 6 Obrazy SEM wyizolowanych subpopulacji leukocytów przed i po zastosowaniu na nich odczynnika Lysercell WDF. Dla porównania odcinek długości 1 μ m.

Po okresie inkubacji następuje analiza SFL, FSC i SSC próbki poprzez cytometrię przepływową, przy użyciu lasera półprzewodnikowego. W dalszym toku analizy zmierzone sygnały każdej pojedynczej komórki są zapisywane w czasie rzeczywistym i przedstawiane na skatergramach (ryc. 5a i 5b). Dzięki szczególnej analizie identyfikacji każdej populacji oraz elastycznemu bramkowaniu pomiar zapewnia doskonałą dokładność zliczania i wysoką czułość flag. Adhezja monocytów nie jest więc istotna, ze względu na brak szkiełka rozmazowego w procedurze zliczania.

Jak uzyskać najdokładniejsze wyniki zliczania?

Wpływ liczby komórek na wiarygodność wyników jest wyjaśniony poprzez poniższy przykład, w którym założona liczba leukocytów wynosi 8 000/ μ l, a populacja monocytów stanowi 5%.

- **Różnicowanie manualne:** Zazwyczaj w rutynowej ocenie rozmazu mikroskopowego zliczanych i ocenianych jest 100 pierwszych napotkanych leukocytów (n = 100 komórek).

- **Różnicowanie automatyczne:** Dla przykładu analiza leukocytów w aparacie serii XN odbywa się poprzez rozcieńczenie próbki odczynnikiem w stosunku 1 : 61. Analizowana objętość to 58,2 μ l, a suma zliczonych komórek wynosi wtedy:

$$\frac{8000 \text{ komórek}/\mu\text{l}}{61 \text{ (rozcieńczenie)}} \times 58,2 \mu\text{l (analizowana objętość)} = 7\,633 \text{ WBC}$$

Powyższy przykład pokazuje, że jeśli wyświetlona liczba leukocytów wynosi 8 000/ μ l to analizie poddano 7 633 komórki na aparacie serii XN (n = 7 633).

Tabela Rümke [5] pokazuje predykcję statystyczną dokładności parametrów zliczania (zobacz tabela 1).

Tabela 1 95% przedział ufności dla rzeczywistej liczby komórek na 100 leukocytów. A = policzone komórki na 100 leukocytów

| Rzeczywista liczba komórek na 100 WBC | | | | | |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| A | n = 100 | n = 200 | n = 500 | n = 1,000 | n = 10,000 |
| 0 | 0 – 3.6 | 0 – 1.8 | 0 – 0.7 | 0 – 0.4 | 0 – 0.1 |
| 1 | 0.0 – 5.4 | 0.1 – 3.6 | 0.3 – 2.3 | 0.5 – 1.8 | 0.8 – 1.3 |
| 5 | 1.6 – 11.3 | 2.4 – 9.0 | 3.3 – 7.3 | 3.7 – 6.5 | 4.5 – 5.5 |
| 10 | 4.9 – 17.6 | 6.2 – 15.0 | 7.5 – 13.0 | 8.2 – 12.0 | 9.4 – 10.7 |
| 15 | 8.6 – 23.5 | 10.4 – 20.7 | 12.0 – 18.4 | 12.8 – 17.4 | 14.3 – 15.8 |
| 20 | 12.7 – 29.2 | 14.7 – 26.2 | 16.6 – 23.8 | 17.6 – 22.6 | 19.2 – 20.8 |
| 30 | 21.2 – 40.0 | 23.7 – 36.9 | 26.0 – 34.2 | 27.2 – 32.9 | 29.1 – 31.0 |
| 40 | 30.3 – 50.3 | 33.2 – 47.1 | 35.7 – 44.4 | 36.9 – 43.1 | 39.0 – 41.0 |
| 50 | 39.8 – 60.2 | 42.9 – 57.1 | 45.5 – 54.5 | 46.9 – 53.1 | 49.0 – 51.0 |
| 70 | 60.0 – 78.8 | 63.1 – 76.3 | 65.8 – 74.0 | 67.1 – 72.8 | 69.0 – 70.9 |
| 80 | 70.8 – 87.3 | 73.8 – 85.3 | 76.2 – 83.4 | 77.4 – 82.4 | 79.2 – 80.8 |
| 90 | 82.4 – 95.1 | 85.0 – 93.8 | 87.0 – 92.5 | 88.0 – 91.8 | 89.3 – 90.6 |
| 100 | 96.4 – 100 | 98.2 – 100 | 99.3 – 100 | 99.6 – 100 | 99.9 – 100 |

Jeśli w rozmazie widzimy 5% monocytów przy zliczeniu n = 100 komórek oznacza to, że prawdziwa wartość znajduje się pomiędzy 1,6 a 11,3. Przedział ufności jest bardzo szeroki ponieważ liczba różnicowanych komórek jest bardzo niska. Dla porównania analizatory XN różnicują tysiące komórek z tej samej próbki (wyliczenia pokazane w powyższym równaniu). Przy takiej liczbie różnicowanych komórek wynik monocytów zawierałby się maksymalnie między 3,7 a 6,5. Dlatego też w ujęciu statystycznym większa liczba ocenianych komórek prowadzi do bardziej dokładnych wyników.

Publikacje

Badania, które porównują ze sobą różne metody (zliczanie manualne, fluorescencyjną cytometrię przepływową i/lub automatyczne różnicowanie przy użyciu aparatów serii X i XN) pokazują wyniki doskonałej dokładności w przypadku automatycznego zliczania dokonanego przez analizatory.

- Seo JY et al. (2015): ‘Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-Series’ [6].

Poniższa tabela (tabela 2) zaczerpnięta z wyżej wymienionej publikacji pokazuje współczynniki korelacji, porównujące różnicowanie leukocytów w trybie ‘Low WBC’ serii XN i automatyczne zliczanie (serii X) z różnicowaniem manualnym.

- Briggs C et al. (2012): ‘Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system’ [7].

Poniższa tabela (tabela 3) pokazuje korelację pomiędzy wynikami różnicowania serii XN i XE-2100; dane pokazane na przykładzie WBC.

- Kawauchi S et al. (2014): ‘Comparison of the Leukocyte differentiation Scattergrams between the XN-Series and the XE-Series of Hematology Analyzers’ [3].

Tabela 2 Porównanie różnicowania leukocytów w trybie ‘Low WBC’ serii XN i automatycznego zliczania (serii X) z różnicowaniem manualnym, przeprowadzone na oryginalnych próbkach

| | Różnicowanie automatyczne R ² | Różnicowanie manualne R ² |
|--------------|--|--------------------------------------|
| Neutrofile % | 0.98 | 0.87 |
| Lymfocyty % | 0.97 | 0.86 |
| Monocyty % | 0.92 | 0.84 |
| Eozynofile % | 0.84 | 0.67 |
| Bazofile % | 0.10 | 0.00 |

Tabela 3 Korelacja wyników morfologii krwi otrzymanych z aparatów serii XN i XE-2100

| | Wartość R ² | Nachylenie | Miejsce zerowe |
|------------|------------------------|------------|----------------|
| WBC | 0.99 | 1.07 | - 0.76 |
| Neutrofile | 0.99 | 1.00 | - 0.02 |
| Limfocyty | 0.99 | 1.14 | - 0.3 |
| Monocyty | 0.91 | 0.90 | + 0.09 |
| Eozynofile | 0.99 | 0.98 | 0.00 |
| Bazofile | 0.76 | 1.15 | + 0.01 |
| IG | 0.94 | 1.14 | + 0.02 |

Artykuł wyjaśnia różnice w działaniu odczynników WDF i DIFF na leukocyty. Dodatkowo tłumaczy dlaczego skatergram WDF serii XN pokazuje lepsze rozdzielanie różnych populacji komórek, szczególnie jeśli chodzi o limfocyty i monocyty.

Podsumowując, wyniki cytowanych publikacji pokazują precyzję wyników automatycznego różnicowania XN w porównaniu do serii X i manualnego zliczania. Wspomniane porównania oraz tabela Rümke pozwalają na wyciągnięcie wniosków, że automatyczne zliczanie powinno być metodą z wyboru dla ustalenia komórkowości próbki. Jednakże w przypadku wystąpienia patologicznych wyników rozdziału automatycznego, wraz z flagami 'Blasts/Abn Lympho?' ocena różnicowania komórek powinna być oparta o zliczanie w rozmarze mikroskopowym. Analizator pomimo zdolności do wykrycia nieprawidłowych komórek i zaraportowania tego faktu, nie jest w stanie „zobaczyć” szczegółowej morfologii komórek w ten sam sposób co ludzkie oko. Z tego powodu weryfikacja obrazu komórek (np. mikroskopowo) przez wykwalifikowany personel laboratorium jest niezbędna w opisanych sytuacjach.

Współcześnie weryfikacja mikroskopowa może być znacząco ułatwiona dzięki systemom obrazowania automatycznego takim jak DI-60* (ryc. 7).

Automatyczne różnicowanie mikroskopowe

DI-60 firmy Sysmex to system automatycznej lokalizacji i analizy obrazu komórek, który może być zintegrowany z linią hematologiczną.

Samo urządzenie składa się z ruchomych obiektywów, wysokiej jakości kamery i systemu komputerowego, który gromadzi i wstępnie analizuje komórki z rozmazu krwi obwodowej. Odbywa się to poprzez automatyczną lokalizację komórek na szkiełku mikroskopowym, które zostają uchwycone na zdjęciu przez zaawansowany układ optyczny kamery, które następnie są analizowane i poddawane wstępnej klasyfikacji przez czolowy system analizy obrazu. Analizator jest wyposażony w system sztucznej sieci neuronalnej, który zaprogramowano do rozpoznawania i różnicowania cech komórek krwi. Układ ten analizuje około 300 cech każdej komórki i porównuje je z posiadaną bazą danych.

Liczba leukocytów, która będzie poddana analizie jest możliwa do ustalenia przez użytkownika. Po znalezieniu i wstępnej klasyfikacji komórek przez DI-60 następuje weryfikacja danych przez operatora. W razie potrzeby możliwa jest modyfikacja klasyfikacji każdej pojedynczej komórki. Operator posiada także możliwość wpisania dodatkowych uwag i komentarzy. Tabę Y i wsp. [8] wykazali bardzo dobrą dokładność i zgodność pomiędzy wynikami otrzymanymi z DI-60 a manualnym różnicowaniem komórek. Ogólna dokładność analityczna wstępnej klasyfikacji dokonywanej przez DI-60, wliczając w to patologiczne populacje krwinek białych, wynosi 88,4%. Dodatkowo blasty były klasyfikowane z 95% czułością i 99% swoistością.

Wstępna klasyfikacja komórek przez DI-60 pozwala na zaklasyfikowanie ich do następujących grup:

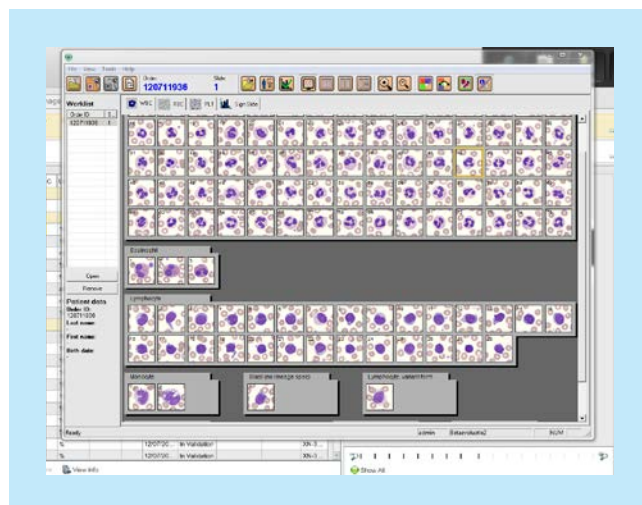
- WBC: neutrofile segmentowane, pałki, eozynofile, bazofile, monocyty, limfocyty, limfocyty atypowe, komórki plazmatyczne, promielocyty, mielocyty, metamielocyty, blasty.
- Inne komórki: cienie komórkowe, artefakty, płytki olbrzymie, agregaty płytek, erythroblasty.

Urządzenie w toku analizy wyniku prezentuje także obraz układu czerwonokrwinkowego, na podstawie którego można opisać morfologię komórek i oszacować liczbę płytek krwi.

Wyniki analizy, a także obrazy komórek z automatycznej oceny rozmazu krwi są wyświetlane na ekranie (ryc. 8), tak aby możliwa była końcowa ocena wyniku przez operatora. Po dokonaniu akceptacji, w kolejnym kroku, wyniki rozdziału komórek są przesyłane do laboratoryjnego systemu informatycznego (LIS).



Ryc. 7 System cyfrowej analizy obrazu DI-60* firmy Sysmex



Ryc. 8 Obrazy komórek otrzymane w toku analizy DI-60*, zaprezentowane w widoku wyniku

*DI-60 jest produkowane przez CellaVision AB · www.cellavision.com

Wnioski

Monocyty pomimo tego, że są największymi spośród WBC mogą przysporzyć problemów w zliczaniu z powodu ich silnej adhezji do szkiełka mikroskopowego. Jednak nawet w takich przypadkach należy ustalić ich wiarygodną liczbę, aby móc ocenić stan pacjenta, na przykład ze względu na monocytosę, która może być wskaźnikiem różnych chorób.

Technologia fluorescencyjnej cytometrii przepływowej pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników liczby monocytów. Automatyczne analizatory hematologiczne, które wykorzystują tę technologię podczas pomiaru, zliczają bardzo duże ilości komórek, co sprawia, że wynik statystycznie jest bardziej dokładny. Co więcej jeśli morfologia monocytów wymaga weryfikacji mikroskopowej możliwe jest wykonanie jej poprzez zintegrowany, automatyczny analizator, który pozwoli także na ocenę i wstępną klasyfikację pozostałych komórek. Takie zastosowanie pozwoli na zmniejszenie czasu potrzebnego na wydanie wyniku i zwiększy stopień standaryzacji wykonywanego badania, a także dokładność wyników.

Powyższy materiał pokazuje, że automatyczne i manualne różnicowanie komórek różnią się pod kilkoma względami. Dla prawidłowej interpretacji wyniku zakresy referencyjne, szczególnie dla liczby monocytów otrzymanej z automatycznego i ręcznego rozdziału, powinny być dostosowane indywidualnie w każdym laboratorium.

Źródła

- [1] **Pekelharing JM et al. (2010):** Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. *Sysmex Journal International*. Vol. 20 No. 1.
- [2] **Solberg HE. (2004):** The IFCC recommendation on the estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med*. 42 : 710 – 714.
- [3] **Flandrin G et al. (1993):** The progresses in the determination of blood monocytosis and its perspectives of clinical application in pathology. *Ann Biol Clin (Paris)*. 51 : 787 – 91. [Article in French]
- [4] **Kawauchi S et al. (2014):** Comparison of the Leukocyte differentiation Scattergrams between the XN-Series and the XE-Series of Hematology Analyzers. *Sysmex Journal International*. Vol. 24 No. 1.
- [5] **Ruemke CL. (1979):** The statistically expected variability in differential counting. In: Koepke JA: *Differential leukocyte counting*. College of American Pathologists, Skokie, Illinois.
- [6] **Seo JY et al. (2015):** Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series. *Int J Lab Hematol*. 37(2) : 155.
- [7] **Briggs C et al. (2012):** Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol* 2012. 65(11) : 1024 – 30.
- [8] **Tabe Y et al. (2015):** Performance evaluation of the digital cell imaging analyzer DI-60 integrated into the fully automated Sysmex XN hematology analyzer system. *Clin Chem Lab Med*. 53(2) : 281