

Serie di Ematologia di Laboratorio - a cura del GdS-E SIMeL

# Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione.

## Parte II: il metodo ottico

M. Buttarello

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera - Azienda USL 16, Padova  
Segretariato del Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi Ematologici e di Laboratorio (CISMEL)

### Riassunto

In citometria a flusso il metodo ottico precedette il metodo ad impedenza e la prima applicazione viene fatta risalire al 1934 per opera di A. Moldavan.

L'utilizzazione dell'analisi in campo scuro (dark field) e l'introduzione dello "sheath flow" da parte di P.Crosland-Taylor nel 1953 rappresentarono due tappe fondamentali per poter ottenere conteggi cellulari sufficientemente accurati. A partire da queste esperienze vennero prodotti i primi strumenti commerciali per l'esecuzione dei conteggi delle cellule ematiche basati sul metodo ottico. In particolare la Technicon (oggi Bayer) introdusse nel 1965 gli SMA 4A/7A

Il decennio successivo è stato caratterizzato dal susseguirsi di studi teorici e sperimentali sugli effetti dell'interazione fra un fascio di luce di piccolo diametro (100 – 300  $\mu$ ) e le singole cellule mentre attraversano una cella a flusso. L'obiettivo era quello di ottenere il maggior numero possibile di informazioni sulle caratteristiche cellulari.

L'intensità della luce dispersa ad angoli sufficientemente piccoli (forward scatter) si dimostrò correlata al volume della cellula, mentre ad angoli maggiori diventano più rilevanti gli effetti dell'indice di rifrazione (correlato al contenuto), e della complessità strutturale della cellula.

L.Kamentsky nei primi anni '60 costruì il "Rapid

Cell Spectrophotometer", il primo citometro a flusso che associava una misura dimensionale basata sullo scattering con una misura di assorbanza.

L'uso combinato di questi due metodi di misura venne applicato commercialmente dalla Technicon nel 1974 con l'Hemalog D che eseguiva la differenziazione leucocitaria completa.

La misura del volume dei globuli rossi con il metodo ottico risentiva sia della loro forma a disco biconcavo sia del diverso indice di rifrazione delle singole cellule (dipendente dalla concentrazione emoglobinica). La sfericizzazione isovolumetrica e la misura multiangolo introdotte nel 1985 con l'analizzatore Technicon H1 risolsero definitivamente queste problematiche.

Gli ultimi 2 decenni sono stati caratterizzati dall'applicazione ai citometri per uso ematologico delle misure in fluorescenza con l'utilizzo di coloranti specifici per alcuni componenti cellulari (gli acidi nucleici in particolare) o più di rado associati ad anticorpi monoclonali. Attualmente le misure fluorescenti sono soltanto qualitative o semiquantitative e vengono utilizzate da alcune Aziende (Abbott, ABX-Horiba, Sysmex) per ottenere il conteggio dei reticolociti e degli eritroblasti, o in taluni casi, la differenziazione leucocitaria o il conteggio delle piastrine.

**Parole chiave:** analizzatori ematologici, metodo ottico, light scattering, fluorescenza

### Summary

**Hematology flow analyzers: history of continuously evolving technology.**

#### Part 2: the optical method

In flow cytometry the optical method was developed before the impedance method and the first application dates back to 1934 by A.Moldavan.

The use of dark field analysis and the introduction of

sheath flow by P.Crosland-Taylor in 1953 represent two fundamental steps toward obtaining relatively accurate cell counts.

Following these developments the first commercial instruments based on optical method to perform the blood cell counts were produced. Specifically Technicon (now Bayer) introduced the SMA4A/7A in 1965. The next decade was characterized by theoretical and

experimental research on the effects of interaction between narrow light beams (diameters 100–300  $\mu$ ) and individual cells while they pass through a flow cell. The goal was to obtain the greatest amount of information on cell characteristics. The amplitude of scattered light collected at narrow angle (forward scatter) was found to be correlated to cell volume while at greater angles refraction index and the structural complexity became more important.

L.Kamentsky in early '60 built the "Rapid Cell Spectrophotometer", the first flow cytometer to associate a cell volume measurement based on scattering, and absorbance measure. The combined use of these two methods was applied commercially by Technicon in 1974 with Hemalog D which performed the complete differential leukocyte count.

The red blood cell volume measurement using optical method was influenced both by the biconcave disk

shape and the different refraction index of each cell (depending on hemoglobin concentration). The isovolumetric sphering and the multiangle measurement introduced in 1985 with the Technicon H1 definitively resolved these problems.

The last two decades have been characterized by the application of fluorescence measurements using dyes for specific cell components (i.e. the nucleic acids), or, less frequently dyes bound to monoclonal antibodies. Currently the fluorescence measurements are only qualitative or semiquantitative and are utilized by some Manufacturers (Abbott, ABX-Horiba, Sysmex) to obtain the reticulocyte and erythroblast counts or in some cases the differential leukocytes or platelet counts.

*Key words:* hematology analyzers, optical method, light scattering, fluorescence.

## Introduzione

Le applicazioni del metodo ottico in citometria a flusso precedettero il metodo ad impedenza e analogamente a quest'ultimo avevano come fine prevalente il conteggio delle cellule del sangue. Mentre per il metodo ad impedenza le applicazioni e gli approfondimenti sono rimasti inizialmente confinati all'ambito ematologico e solo in seguito sono stati estesi all'industria e ad altri campi della biologia, per il metodo ottico gli sviluppi si ebbero fin dall'inizio in settori diversificati quali la citologia oncologica, l'ematologia, l'immunologia, la batteriologia, (in particolare con l'utilizzo di misure quantitative e di coloranti che rendevano possibili misure di assorbanza o di fluorescenza), e il trasferimento delle applicazioni da un settore all'altro fu rapido e continuo.

Molte di queste scoperte vennero poi utilizzate sugli analizzatori ematologici commerciali con la possibilità di eseguire conteggi cellulari accurati, misure volumetriche, differenziazione dei leucociti e, più recentemente, grazie alla disponibilità di coloranti dotati di affinità per gli acidi nucleici, il conteggio dei reticulociti e degli eritroblasti.

Gli strumenti ematologici (anche i più completi) utilizzano soltanto in parte le potenzialità offerte dal metodo ottico. Infatti, delle possibili misure quantitative sulle singole cellule, sono utilizzate soltanto quelle relative alla determinazione del volume o della concentrazione emoglobinica degli eritrociti. Più diffuse sono invece le misure qualitative o semiquantitative, utilizzate per differenziare le varie cellule o per la suddivisione in livelli maturativi (in base al contenuto in RNA) dei reticulociti e delle piastrine.

La Tabella I riassume le misure spettroscopiche utilizzate in citometria a flusso distinguendo quelle in cui la luce reirradiata ha la stessa lunghezza d'onda della radiazione incidente (dispersione elastica), da quelle ca-

ratterizzate da uno shift nella lunghezza d'onda (dispersione anelastica)<sup>1</sup>.

## Scattering e assorbanza

### *Conteggi cellulari: dagli esperimenti alle applicazioni pratiche*

La prima proposta per il conteggio automatizzato di cellule sospese in un fluido di trasporto viene fatta risalire a A. Moldavan<sup>2</sup> che nel 1934 a Montreal (Canada) descrisse un metodo per il conteggio degli eritrociti introdotti attraverso un tubo capillare collegato ad un microscopio e rilevati con un sistema fotoelettrico. Un principio analogo fu proposto da J.Kielland<sup>3</sup> di Bergen (Norway) nel 1941. I problemi principali di questo metodo consistevano nella facile ostruzione del capillare utilizzato e nella scarsa sensibilità dell'apparato fotoelettrico di rilevazione basato sull'analisi in campo chiaro.

Nel 1947 FT. Gucker e Coll.<sup>4</sup> presso la Northwestern University (IL) misero a punto quello che è ritenuto il primo sistema di focalizzazione. Si trattava di un metodo per la focalizzazione di particelle colloidali sospese in aria per mezzo dell'iniezione della sospensione al centro di un più ampio flusso aereo fluente a velocità differente. L'obiettivo era la rilevazione di batteri e spore negli aerosol. Nel 1953 P.J. Crosland-Taylor<sup>5</sup>, che lavorava al Middlesex Hospital di Londra, applicò il principio del flusso laminare e propose l'uso dello "sheath flow", un metodo in cui la sospensione contenente le cellule viene iniettata al centro di un secondo flusso liquido coassiale avente lo stesso indice di rifrazione, fluente a velocità maggiore, e tale da costringere le cellule ad allinearsi nella zona centrale. Questa soluzione anticipò dunque la focalizzazione idrodinamica più tardi proposta anche per alcuni analizzatori con principio resistivo<sup>6</sup>. Ciò ha consentito di usare percorsi fluidi di diametro maggiore prevenendo le ostruzioni

**Tabella I.** Misure spettroscopiche utilizzate in citometria.

## Metodi elastici

- scattering a piccolo angolo (forward scatter)
- scattering ad angolo elevato (side scatter)
- depolarizzazione
- assorbanza
- estinzione

## Metodi anelastici

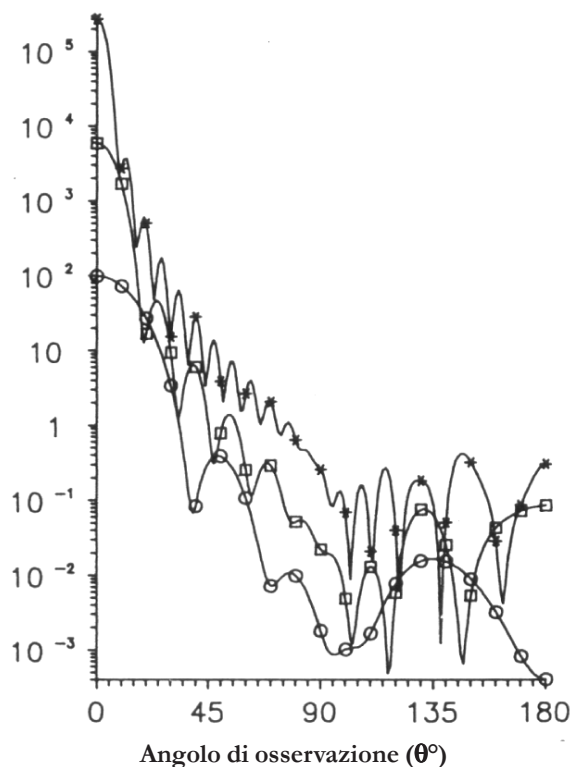
- fluorescenza
- depolarizzazione in fluorescenza

con l'ulteriore vantaggio di allineare le cellule al centro del percorso dove avviene la miglior interazione fra luce incidente e particella.

Nel 1954 T. Bierne e JM. Hutcheon<sup>7</sup> utilizzando un apparato simile a quello di Moldavan cercarono di misurare la dimensione delle cellule dalla durata dell'impulso ma ciò ebbe poco successo per la difficoltà a mantenere uniforme la velocità del flusso in cui erano sospese le cellule. Nel 1958 Crosland-Taylor e Coll.<sup>8</sup> descrissero un analizzatore basato sul principio dello sheath flow, che utilizzava l'analisi in campo scuro, messo a punto presso il Bland-Sutton Institute of Pathology di Londra in collaborazione con la Evans Electro Selenium Ltd (denominato EEL Counter). Nel 1965 anche la Vickers Instruments propose uno strumento basato sulla proposta originale di Crosland - Taylor: il J12 cell counter.

Questo principio è stato ulteriormente sviluppato negli anni successivi e alcune delle sue caratteristiche sono state riprese da molti analizzatori commercializzati nel decennio successivo, come gli SMA 4A e 7A prodotti dalla Technicon di Tarrytown (NY) (oggi Bayer Diagnostics), ed il Fisher Hem-Alyzer.

Gli SMA 4A introdotti nel 1965 erano in grado di fornire con una cadenza di 30 campioni all'ora i conteggi eritrocitario e leucocitario e la determinazione della concentrazione emoglobinica con il metodo alla cianmetaemoglobina. L'ematocrito veniva determinato misurando la conduttività elettrica del sangue in toto. Questo analizzatore poteva essere convertito nel modello 7A aggiungendo un elaboratore per il calcolo dei tre indici derivati (MCV, MCH, MCHC). Il metodo per la misura dell'ematocrito era però lontano dall'ideale sia per la facilità di occlusione del sottile canale di flusso, sia perchè la diluizione basata sul metodo Technicon a flusso continuo (sistema di separazione fra campione e reagente per mezzo di una bolla d'aria, messo a punto da LT. Skeggs nel 1957)<sup>9</sup> era instabile e richiedeva calibrizioni frequenti. Nel successivo modello, l'Hemalog 8, commercializzato nel 1970, vennero migliorati alcuni aspetti inserendo una microcentrifuga per la determinazione dell'ematocrito e potenziando il conteggio a 60 campioni all'ora con l'uso di un campionatore automatico. Con questo analizzatore era anche possibile contare le piastrine in un canale dedicato nel



**Figura 1.** Intensità del segnale di scattering (in unità arbitrarie) in funzione dell'angolo di osservazione. Le tre curve sono riferite a sfere con indice di rifrazione simile a quello di una cellula e con diametro di 0.5 (O), 1.0 (□) e 2(\*) micron.

quale erano preliminarmente emolizzati i globuli rossi e l'interferenza dei loro stromi era annullata utilizzando un mezzo di sospensione avente lo stesso indice di rifrazione.

#### Luce dispersa e angoli di rilevazione

L'interazione tra un fascio di luce di piccolo diametro (100-300 μ) e una cellula provoca la dispersione della luce in tutte le direzioni, evento noto come "light scattering". La dispersione dipende da diversi fenomeni<sup>10</sup>: 1) la diffrazione della luce ai bordi della cellula; 2) la rifrazione dovuta al diverso valore dell'indice di rifrazione del citoplasma, del nucleo, e del mezzo di sospensione; 3) la riflessione causata da tutte le superfici riflettenti all'interno e alla superficie della cellula; 4) l'assorbanza dei vari costituenti cellulari alla lunghezza d'onda del raggio incidente.

Anche la distribuzione spaziale dell'intensità della luce dispersa (Fig. 1) è influenzata da molte variabili, alcune proprie della cellula: dimensione, forma, orientazione, indice di rifrazione, granularità, eventuale colorazione; altre dipendenti dalla sorgente luminosa: lunghezza d'onda e stato di polarizzazione.

E' stato affermato<sup>11,12</sup> che il pattern della luce dispersa da una singola particella (scattering spatial profile) rappresenti una unica descrizione fisica della morfologia dell'oggetto. In teoria quindi una appropriata

raccolta del segnale a ben definiti intervalli angolari dovrebbe permettere una descrizione univoca delle proprietà spaziali dell'oggetto. Questa possibilità di risalire alle caratteristiche di una particella ignota partendo dai dati del profilo di scattering (noto anche in citometria come "processo inverso") consentirebbe di differenziare vari tipi di cellule, o diversi stati funzionali della stessa cellula, ed è l'argomento che sta attirando maggiormente l'attenzione dei ricercatori. Le difficoltà costruttive degli apparati di misura sono tuttavia notevoli, da un lato per la necessità di raccogliere il segnale su numerosi intervalli angolari, dall'altro per la grande differenza nell'intensità del segnale ai diversi angoli (fino a 5-8 ordini di grandezza)<sup>13</sup>, e infine perché le cellule dotate di asimmetria (che sono la maggioranza) potendo disporsi con differenti orientazioni nel flusso vanificherebbero tutti gli sforzi interpretativi.

Una tipica grandezza utilizzata in light scattering è il parametro dimensionale  $a = \pi d/\lambda$ , cioè il rapporto fra la circonferenza dell'oggetto e la lunghezza d'onda del raggio incidente. Per la gran parte delle cellule, utilizzando sorgenti luminose con  $\lambda$  fra 488 nm (laser ad Argon) e 633 nm (laser He-Ne), a risulta compreso fra 20 e 100.

Per piccoli angoli di rilevazione rispetto alla direzione del raggio incidente ( $\theta_m < 220/a$ ) predomina l'effetto della diffrazione. Il segnale luminoso dovuto alla diffrazione si presenta, quando osservato su una superficie piana posta di fronte all'oggetto, sottoforma di anelli concentrici alternati di luce ed ombra. Se l'intensità del segnale viene riportata in funzione dell'angolo di osservazione si caratterizza con una serie di oscillazioni centrate sull'asse ottico la cui ampiezza decresce all'aumentare dell'angolo (Fig. 1). Con l'aumentare della dimensione della particella aumentano sia l'ampiezza che la frequenza delle oscillazioni. La diffrazione è indipendente dall'indice di rifrazione ma dipende dal profilo che la cellula espone al raggio incidente. Nel caso di particelle sferiche della dimensione di una cellula, approssimativamente l'85% della luce dispersa è contenuta in un piccolo intervallo angolare che va da  $0^\circ$  (corrispondente alla direzione del raggio incidente) a  $\theta_m$  e denominato "forward angle"<sup>14</sup>.

Nel 1969 P. Mullaney applicò il "coated spheroid model" per studiare il comportamento di una singola cellula. Questo modello prevedeva l'analisi teorica dei fenomeni di scattering con successiva verifica sperimentale. Assieme ad F. Dean, a Los Alamos, dimostrò che per sfere omogenee di diametro compreso tra 6 e 14  $\mu$ , la quantità di luce raccolta tra  $0.5^\circ$  e  $2^\circ$  a seguito dell'interazione con un raggio prodotto da un laser He-Ne, era con buona approssimazione, linearmente correlata al volume delle particelle<sup>15</sup>. Da questi primi esperimenti iniziò a diffondersi l'idea di utilizzare il "forward light scattering" per eseguire misure di volume.

All'aumentare dell'angolo di lettura gli effetti della rifrazione diventano più importanti e poiché i raggi rifratti attraversano la cellula, la luce rifratta risulta in

qualche modo dipendere dalla struttura interna<sup>16</sup>. Le misure di scattering ad angolo elevato risentono pertanto della struttura complessiva della cellula: indice di rifrazione, granularità, corpuscoli, presenza e forma del nucleo.

Verso la metà degli anni 70 la Bio/physics Systems fondata da L. Kamensky produsse l'analizzatore ematologico Hemac, dotato di una sorgente laser He-Ne, che utilizzava misure di forward scatter per il dimensionamento dei globuli rossi. Nel 1976 questa Azienda venne acquisita dalla Ortho Diagnostics che continuò la produzione con gli strumenti della serie ELT basati sullo stesso principio analitico.

Nel 1981 la Technicon Corp. commercializzò l'analizzatore H-6000 che pure eseguiva una misura diretta del volume eritrocitario utilizzando rilevazioni a piccolo angolo ma con l'utilizzo di una lampada alogena come sorgente luminosa.

A seguito dei risultati ottenuti con le misure in forward scatter numerosi ricercatori svilupparono metodi per eseguire misure contemporanee a più angoli.

I primi lavori risalgono all'inizio degli anni '70 quando A. Brunsting e P. Mullaney<sup>17</sup>, con l'uso di un modello costituito da sfere concentriche simulanti una cellula dotata di nucleo, utilizzando un laser He-Ne, e un intervallo angolare di rilevazione fra  $2^\circ$  e  $25^\circ$ , osservarono che ad angoli ampi il profilo di scattering è più strutturato e sensibile alla dimensione della sfera interna, suggerendo la possibilità di distinguere fra cellule simili per dimensione ma diverse nella struttura interna. Con questo metodo fu anche possibile misurare l'indice di rifrazione di cellule di origine animale.

IK. Ludlow e PH. Kaye<sup>18</sup> nel 1979 svilupparono uno strumento che con l'uso di fibre ottiche poteva misurare la luce raccolta fra  $3^\circ$  e  $177^\circ$  con intervalli di  $1^\circ$ . Con questo apparato e utilizzando la teoria sullo scattering proposta da G. Mie<sup>19</sup> nel 1908, fondata sulla soluzione delle equazioni di Maxwell del campo elettrico (ma completamente sviluppata soltanto per poche figure geometriche elementari come la sfera), questi Autori determinarono dimensione ed indice di rifrazione di vari tipi di spore batteriche.

L'intensità della luce dispersa, anche a piccoli angoli, non dipende solo dal volume ma è influenzata anche da altre variabili come la forma, l'orientazione, l'indice di rifrazione e l'assorbanza. Ciò complica l'interpretazione delle misure di volume ottenute con l'uso del forward scatter quando riferite a cellule dotate di asimmetria assiale e indice di rifrazione variabile come gli eritrociti piuttosto che a sfere omogenee ad indice di rifrazione costante (che rappresentano il modello più studiato), e ne limita l'accuratezza di misura<sup>20</sup>.

Nel 1948 E. Ponder<sup>21</sup> pubblicò degli studi che dimostravano la possibilità di sfericizzare i globuli rossi in soluzione isotonica senza modificarne il volume originario. Il risultato ottenuto era tuttavia instabile con emolisi progressiva. L. Ornstein e YR. Kim scegliendo accuratamente il tipo e la concentrazione dei detergenti



migliorarono il metodo e, nel 1981, depositarono per conto della Technicon Instr. Corp. una richiesta di brevetto dal titolo "Method for treating red blood cells to effect spherizing and reagent therefor"<sup>22</sup> che descrive la metodologia tutt'ora in uso per la sfericizzazione isovolumetrica degli eritrociti. Questo ha permesso di eliminare l'influenza della forma e dell'orientazione nel flusso. Gli eritrociti così modificati sono essenzialmente delle sfere dielettriche omogenee alle quali è possibile adattare perfettamente la teoria di Mie.

Per gli analizzatori H-6000 ed ELT che utilizzavano misure di forward scattering per la determinazione del volume eritrocitario si poneva un ulteriore problema, infatti l'accuratezza delle misure sulle singole cellule dipende dalla loro concentrazione emoglobinica (HC) che può variare da un eritrocita all'altro. E' noto infatti che per i globuli rossi è la concentrazione emoglobinica a determinare l'indice di rifrazione e questo a propria volta influenza l'intensità del segnale rilevato all'angolo scelto per le misure di volume.

L'indice di rifrazione di un globulo rosso è rappresentabile con un numero complesso<sup>23</sup>:

$n_c = n_r - in_i$ , dove  $i = \sqrt{-1}$ ;  $n_r$  che costituisce la "parte reale" dell'indice di rifrazione è correlato ad HC secondo l'equazione:  $n_r = n_0 + (\alpha \cdot HC)$ , dove  $n_0$  è l'indice di rifrazione del fluido cellulare in assenza di emoglobina ed  $\alpha$  è l'incremento specifico della rifrazione dovuto all'emoglobina;  $n_i$  è invece la "parte immaginaria" dell'indice di rifrazione e dipende dall'assorbimento della cellula, anch'essa correlata alla concentrazione di emoglobina per mezzo dell'equazione:

$n_i = \ln 10 / \pi M \cdot \lambda \cdot \epsilon \cdot HC$ , dove M è il peso molecolare dell'emoglobina,  $\lambda$  è la lunghezza d'onda del raggio incidente ed  $\epsilon$  è il coefficiente di estinzione micromolare dell'emoglobina alla lunghezza d'onda prescelta. Si nota pertanto come entrambe le componenti siano funzione di HC. L'effetto dell'indice di rifrazione venne risolto da DH.Tycho nel 1983 che, ancora per conto della Technicon Instrument, presentò un brevetto dal titolo "Method and apparatus for determining the volume & index of refraction of particles"<sup>24</sup>. Il metodo venne applicato sull'analizzatore H1, prodotto nel 1985, che utilizzava sia la sfericizzazione isovolumetrica che una misura multiangolo (2 intervalli angolari compresi rispettivamente fra 0-5 e 10-15 gradi). Ciò permetteva di ottenere per ciascuna cellula misure accurate sia del volume (V) che dell'indice di rifrazione correlato alla concentrazione emoglobinica (HC). In questo caso infatti l'intensità della luce raccolta a ciascuno dei due intervalli angolari scelti ( $\theta + \Delta\theta$ ) è una funzione (f) di ( $\lambda, \theta, \Delta\theta, n, V, HC$ ), dove n è l'indice di rifrazione del mezzo di sospensione. Per i 2 intervalli angolari avremo pertanto 2 equazioni (non lineari) che possono essere risolte nelle 2 incognite: il volume V e la concentrazione HC.

Se nel caso dei globuli rossi i problemi sembrano sostanzialmente risolti, debbono essere tenuti presenti altri fattori limitanti nell'uso del forward scatter come

metodo per la misura dei volumi cellulari: 1) la presenza all'interno della cellula di materiale fortemente assorbente alla lunghezza d'onda di eccitazione, ad esempio sostanze coloranti, riduce il segnale di scattering<sup>25</sup>; 2) se le membrane cellulari sono danneggiate la cellula avrà un indice di rifrazione inferiore e produrrà di conseguenza un segnale di minor intensità che peraltro permette, a parità di altre condizioni, di avere informazioni sulla vitalità cellulare.

Nel 1975 G. Salzmann e Coll.<sup>26</sup>, a Los Alamos, analizzando leucociti umani allo stato nativo evidenziarono che l'uso combinato del forward scattering ( $1^\circ \pm 0.1^\circ$ ) e di misure ad ampio angolo (side scatter:  $90^\circ \pm 12.5^\circ$ ) permetteva di differenziare tre sottopopolazioni (granulociti, monociti e linfociti). Sebbene non siano mai state formulate soddisfacenti spiegazioni, anche in questo caso si ipotizza che le misure ad angolo ampio siano molto più sensibili alle differenze nell'indice di rifrazione ed alla struttura interna rispetto a quelle in forward scatter. Nel 1983 RJ. Gersham e Coll. presentarono per conto della Ortho Diagnostics di Raritan (NJ) un brevetto basato sulla misura a doppio angolo per la differenziazione leucocitaria a tre popolazioni<sup>27</sup>, successivamente applicato sugli analizzatori commerciali della serie ELT 800/WS (wbc screen).

#### Misure di assorbanza e di estinzione

Parallelamente alle misure di scattering venne introdotta la misura dell'assorbimento, utilizzata per differenziare tra loro diversi tipi cellulari. Nel 1950 JB. Cornwall e RM. Davison<sup>28</sup> colorarono le cellule in sospensione con Tripa-Blue e la prima applicazione tendente a distinguere i globuli bianchi dagli eritrociti si ebbe nel 1953 ad opera di JC. Parker e WR. Horst<sup>29</sup> di Dayton (OH) che utilizzarono coloranti diversi e un'opportuna associazione di filtri per differenziare il segnale luminoso prodotto dai due diversi tipi di cellule.

Nei primi anni 60 L. Kamensky mentre lavorava presso i laboratori di ricerca della IBM sviluppò il Rapid Cell Spectrophotometer (RCS)<sup>30</sup>, un citometro a flusso di alta qualità con una fonte luminosa costituita da una lampada ad arco in grado di misurare contemporaneamente due parametri: scattering e assorbimento. L'interesse di questo ricercatore era rivolto essenzialmente a differenziare le cellule tumorali dalle corrispondenti cellule normali in base al contenuto in DNA (misurabile in assorbimento) e alla dimensione (misurabile con il segnale di scattering). A questo citometro vennero successivamente adattate, con l'apporto di R. O'Brien (che aveva lavorato con L. Ornstein), delle colorazioni citochimiche-enzimatiche su cellule in sospensione<sup>31</sup>. Nel 1969 la IBM decise di liberarsi della divisione di elettronica medica e vi fu un tentativo della Technicon Corp. ad opera di H. Mansberg e L. Ornstein di reclutare Kamensky che tuttavia preferì fondare una propria Azienda<sup>31</sup>. Nel frattempo le colorazioni citochimiche-enzimatiche su sangue intero vennero perfezionate e applicate alla citometria a flusso, e nel 1970,

H. Ansley e L. Ornstein depositarono per conto della Mount Sinai Research Foundation un brevetto dal titolo "Process and apparatus for obtaining a differential white blood cell count"<sup>32</sup>. Il brevetto venne concesso nel 1973 e la licenza venne data alla Technicon che commercializzò nel 1974 l'Hemalog D, un citometro a flusso dedicato alla differenziazione leucocitaria completa. Il metodo si basava sulla colorazione citochimica - enzimatica e su rilevazioni contemporanee di assorbanza e scattering e quindi con informazioni sulla intensità di colorazione e sulle dimensioni. Questo analizzatore utilizzava in 3 distinti canali analitici, alimentati da un'unica fonte luminosa costituita da una lampada alogena, l'Alcian Blue per identificare i basofili, l'anaftol butirato a pH 6.1 come substrato per l'esterasi monocitaria, e l'attività perossidasi e l'analisi dimensionale per differenziare neutrofilo, eosinofili e linfociti. Nel 1981 la Technicon introdusse il già citato H6000 che combinava i parametri forniti dall'Hemalog 8 (nel frattempo potenziato a 90 campioni all'ora) con quelli dell'Hemalog D. In questo nuovo analizzatore era stato eliminato il canale per l'analisi dell'esterasi divenuto ormai superfluo data la possibilità di differenziare i monociti utilizzando le informazioni ottenute nel canale della perossidasi. Questo fu il primo analizzatore commerciale in grado di fornire l'esame emocromocitometrico (CBC) e la formula leucocitaria completa (LDC).

Il segnale raccolto a 0° (estinzione) è inversamente correlato sia alla quantità di luce dispersa che a quella assorbita. Il fenomeno dell'estinzione ("axial light loss") rappresenta quindi la risultante degli effetti di assorbanza e scattering.

JA. Steinkamp<sup>33</sup> nel 1983 utilizzò la misura dell'estinzione come metodo indiretto per il dimensionamento cellulare in citometria a flusso. Il segnale negativo prodotto dall'interazione fra una sorgente laser ed una particella risultò proporzionale al quadrato del diametro (cioè alla sezione trasversa), per diametri compresi fra 5 e 20  $\mu$  e scarsamente influenzato dall'indice di rifrazione. Il principale limite di questo metodo consiste nella necessità di disporre di sorgenti luminose a basso rumore di fondo. Questo metodo è attualmente utilizzato sugli analizzatori ematologici Abbott CD 4000 e Sapphire per ottenere indicazioni dimensionali atte a differenziare le diverse popolazioni leucocitarie.

Una problematica connessa alle misure di assorbanza è legata alla scarsa attitudine delle cellule ad assorbire la luce che le attraversa. Ciò fa sì che anche piccole fluttuazioni nell'intensità della luce incidente abbiano importanti effetti sulle misure di assorbanza o estinzione, rispetto ad analoghe misure di scattering o fluorescenza e ciò vale in particolare quando si eseguono valutazioni quantitative<sup>34</sup>. Le sorgenti luminose comunemente impiegate nei citometri a flusso pur avendo oscillazioni modeste nell'intensità rendono eccessivamente imprecise le misure in assorbanza. Nelle applicazioni correnti in citometria il problema è meno sentito sia perché si fa uso di misure semiquantitative o

più semplicemente comparative (ad esempio per la leucocitometria differenziale o per il conteggio dei reticolociti), sia perché si utilizzano sostanze che colorano intensamente le cellule, sia perché viene eseguito costantemente il controllo dell'intensità della luce incidente.

Altre applicazioni commerciali delle misure di assorbanza sono state messe a punto nel 1992 per differenziare e contare i reticolociti (positivamente colorati con sostanze che si legano all'RNA citoplasmatico come l'Oxazina 750) negli analizzatori Bayer delle serie H3 e ADVIA. Anche il Costruttore francese ABX ha utilizzato l'analisi in assorbanza fin dal suo primo analizzatore in grado di fornire la differenziazione leucocitaria completa: l'Argos 5 diff, prodotto nel 1990. I leucociti potevano essere differenziati grazie ad una analisi biparametrica: una misura dimensionale basata sul principio resistivo seguita da una misura di assorbanza che sfrutta la diversa affinità tintoriale delle varie popolazioni leucocitarie per il Chlorazol Black E. La necessità di mantenere allineate le cellule nel tratto compreso fra i due sistemi di rilevazione era garantita da un doppia focalizzazione idrodinamica sequenziale.

#### *Misure di luce polarizzata*

Con una sorgente luminosa costituita da un laser la luce incidente sulla particella ha un campo elettrico che oscilla in un'unica direzione, solitamente quella verticale (luce verticalmente polarizzata). Se questo raggio colpisce una particella simmetrica, omogenea e dimensionalmente piccola rispetto alla lunghezza d'onda, viene preservato l'alto grado di polarizzazione della luce incidente qualunque sia la direzione di osservazione. Se tuttavia l'interazione avviene con una particella complessa come una cellula che contiene vari tipi di organelli con funzione di strutture riflettenti, l'effetto delle riflessioni multiple sarà quello di ridurre il grado totale di polarizzazione. Questo principio è stato sfruttato da BG. De Grooth e Coll. di Enschede (The Netherlands)<sup>35,36</sup>, che nel 1987, misurando contemporaneamente la quantità totale di luce dispersa e la quota depolarizzata, entrambe in side scatter, videro che era possibile distinguere varie popolazioni leucocitarie, in particolare era possibile separare i granulociti eosinofili che esercitano un effetto depolarizzante più marcato, dai neutrofilo. Questo metodo è stato applicato a partire dagli analizzatori Cell Dyn della serie 3000 prodotti inizialmente dalla Sequoia-Turner, (divenuta poi Uniphat) e successivamente dalla Abbott.

### **Analisi in fluorescenza**

#### *Analisi quantitative*

I fattori che limitano la risoluzione delle misure quantitative in fluorescenza sono l'uniformità dell'illuminazione e l'ampiezza del segnale. La prima dipende dalla stabilità della sorgente luminosa e dal profilo spaziale di distribuzione. Le sorgenti luminose presenti negli ana-

lizzatori ematologici con misure in fluorescenza sono costituite da laser ad Argon con lunghezze d'onda di emissione di 488 nm. Il profilo dell'intensità del segnale prodotto da queste sorgenti è solitamente gaussiano (esiste cioè una maggiore intensità al centro del raggio rispetto alla sua periferia). Di recente sono entrati nell'uso i meno dispendiosi diodi-laser (con emissione a 488 nm utilizzato sull'Abbott Sapphire o a 633 nm come sul Sysmex XE 2100) che presentano un profilo d'intensità più complesso dei precedenti. In ogni caso, con l'uso di lenti, il fascio luminoso viene concentrato in uno spot di piccole dimensioni e di forma ellittica con l'asse maggiore perpendicolare alla direzione del flusso in modo che ogni cellula in transito sia investita dalla stessa quantità di luce anche qualora subisca piccoli spostamenti trasversali. L'ampiezza del segnale fluorescente dipende dalle caratteristiche strumentali e dai fluorocromi utilizzati (intensità della luce incidente, velocità del campione nel flusso, spettro di eccitazione e resa quantica del colorante, efficienza delle ottiche nella raccolta e trasmissione del segnale)<sup>37</sup>.

Altri fattori da considerare sono la sensibilità del fotomoltiplicatore, la saturazione in fluorescenza, e il rumore di fondo (dovuto allo scattering, al colorante non legato, all'autofluorescenza di alcuni componenti cellulari).

La luce fluorescente, reirradiata in tutte le direzioni, viene di regola raccolta, previo uso di filtri selettivi, ad angoli ampi (intorno ai 90°) in modo da rendere minima l'interferenza dovuta al raggio incidente.

L'analisi in fluorescenza non consente misure volumetriche ma ha una sensibilità molto elevata, pari a circa 0.01 fL (circa 10 volte superiore al metodo light scattering e 100 volte quella del metodo ad impedenza<sup>38</sup>).

Le misure quantitative in fluorescenza si basano sull'assunto che l'intensità del segnale fluorescente, a parità di altre condizioni, sia proporzionale al numero di molecole di colorante nella cellula. Questa affermazione (riferita da M. Kerker come "dogma centrale della citofluorimetria"<sup>39</sup>) non è affatto scontata in quanto considerazioni teoriche indicherebbero che anche la forma della cellula (in particolare se caratterizzata da importanti asimmetrie), l'indice di rifrazione, la distribuzione più o meno omogenea del colorante al suo interno, le caratteristiche di polarizzazione della radiazione incidente e di quella emessa, e l'angolo scelto per la rilevazione possono influenzare il risultato. Nella prima metà degli anni '80 furono condotti vari esperimenti per verificare questa proporzionalità e si concluse che nelle usuali configurazioni strumentali la proporzionalità era in genere rispettata<sup>1,39</sup>. Tuttavia lavori più recenti rimetterebbero nuovamente in discussione queste conclusioni<sup>40</sup>. Per cellule altamente asimmetriche e ad alto indice di rifrazione è accertato che l'intensità del segnale dipende anche dalla forma e orientazione nel flusso<sup>41</sup>. La perdita della linearità può essere causata anche da un'eccessiva assorbanza (> 2% della radia-

zione incidente), evento conosciuto come "effetto filtro interno".

Con sorgenti luminose polarizzate le molecole fluorescenti emettono a loro volta luce polarizzata la cui entità può tuttavia essere ridotta se queste ruotano in modo apprezzabile. Poiché sia la fluorescenza che il tempo di rotazione sono dell'ordine dei nanosecondi, la depolarizzazione rotazionale dipenderà dalla dimensione e forma delle molecole fluorescenti e dalla durata dell'emissione fluorescente, ma anche dalle proprietà del mezzo in cui tali molecole sono immerse (o legate). Ciò consente misure sulla fluidità cellulare spesso correlata a stati funzionali<sup>42</sup>. L'entità della depolarizzazione può essere espressa come anisotropia di emissione  $EA = (I_v - I_h) / (I_v + 2I_h)$  dove  $I_v$  e  $I_h$  sono le intensità delle componenti verticalmente e orizzontalmente polarizzate. Nonostante fin dalla seconda metà degli anni '70 sia in Europa<sup>43,44</sup> che nel Nord-America<sup>45,46</sup> siano stati messi a punto degli strumenti sperimentali per questo tipo di analisi, la polarizzazione in fluorescenza non ha ancora trovato applicazione su analizzatori ematologici commerciali.

#### *Prototipi e realizzazioni commerciali*

Nel 1964 L.Hallermann, R.Thom, e H.Gerhartz, in collaborazione con la Leitz di Wetzlar (Germany), proposero un analizzatore ematologico che abbinava misure di fluorescenza a misure di scattering e utilizzava come colorante l'arancio di acridina con possibilità di differenziare globuli rossi e bianchi e fra questi i granulociti dalle cellule mononucleate<sup>47</sup>.

L. Wheelless e Coll. di Rochester (NY), depositarono nel 1967, per conto della Bausch & Lomb, un brevetto che descriveva la possibilità di identificare vari tipi cellulari associando l'uso di coloranti fluorescenti a misure dimensionali basate sul light scattering o sul metodo resistivo<sup>48</sup>.

Nel 1967 MA.Van Dilla e Coll. dei Los Alamos Scientific Laboratory descrissero un metodo che utilizzava coloranti fluorescenti, una celletta di conteggio basata sul principio di focalizzazione di Crosland-Taylor, e una lampada a mercurio come fonte di eccitazione. La fluorescenza veniva misurata ortogonalmente agli assi rappresentati dal raggio di eccitazione e dalla direzione del flusso.

Un ulteriore perfezionamento si ebbe nel 1969 con lo sviluppo del primo metodo dotato di rilevazione in fluorescenza, focalizzazione idrodinamica, sorgente laser (ad argon) e disposizione ortogonale delle 3 direzioni: flusso, eccitazione, rilevazione<sup>49</sup>. Questa elegante soluzione costruttiva (geometria ortogonale) è stata applicata nei decenni successivi sulla maggior parte dei citometri che eseguono misure in fluorescenza.

La prima commercializzazione di un citometro a flusso basato su misure in fluorescenza risale al 1969 con l'ICP-11 Impulscytometer<sup>50</sup> costruito a partire da un'idea di W. Gohde<sup>51,52</sup> e distribuito dalla Phywe di Gottingen (Germany). Questo citometro utilizzava



bromuro di etidio per colorare il DNA, una lampada alogena come fonte di eccitazione e applicava il "microscope based flow" (un metodo in cui le cellule fluiscono allineate lungo l'asse di un obiettivo da microscopio utilizzato come condensatore e lente di raccolta). Ulteriori proposte di trasduttori in grado di eseguire simultaneamente o sequenzialmente misure in fluorescenza, resistive, di scattering o di estinzione si ebbero negli anni successivi. Nel 1971 LR.Adams e L.Kamentsky utilizzando l'arancio di acridina come colorante fluorescente poterono differenziare tre popolazioni leucocitarie (linfociti, monociti e granulociti)<sup>53</sup>. JA. Steinkamp et al. a Los Alamos descrissero nel 1973 un trasduttore in grado di eseguire in sequenza misure resistive e di fluorescenza<sup>54</sup>.

V. Kachel e Coll. misero a punto nel 1977 presso il Max-Planck Institut di Monaco il Fluvometricell<sup>55</sup>. Questo analizzatore combinava inizialmente un orifizio Coulter, dotato di focalizzazione idrodinamica, con la parte ottica di un ICP-11. Da questo derivò l'omonimo analizzatore prodotto fra il 1985 e il 1990 dalla HEKA Elektronik (Germany)<sup>50</sup>. Fra il 1975 e il 1977 vennero descritte varie versioni del Cytomat, un prototipo di analizzatore ematologico costruito dalla Block Engineering di Cambridge (MA). Questo analizzatore, nella prima versione utilizzava una miscela di tre fluorocromi (sviluppati da M.Kleiner mann)<sup>56</sup>, misure di fluorescenza, di scattering multiangolo e di estinzione. Ciò consentiva di ottenere la differenziazione leucocitaria completa, il conteggio degli eritrociti e delle piastrine e la determinazione dell'emoglobina cellula per cellula<sup>57</sup>. RC.Leif e T.Thomas fra il 1970 e il 1977 proposero una serie di trasduttori denominati "Automated Multiparameter Analyzer for Cells" (AMAC) caratterizzati dalla possibilità di eseguire simultaneamente misure ottiche e di impedenza. La versione più completa (AMAC III) utilizzava la focalizzazione idrodinamica su un orifizio a sezione quadrata e consentiva misure ortogonali di fluorescenza, misure resistive e in radiofrequenza. Secondo i Costruttori sarebbero state possibili anche contemporanee misure di scattering<sup>58</sup>. Nel 1999 CM.Rodriguez e Coll. depositarono per conto della Coulter Int. Corp., il brevetto di un trasduttore che accanto alle misure di volume, conduttività, e scattering, consente di eseguire simultanee misure di fluorescenza (anche a più colori), estendendo le potenzialità del noto VCS<sup>59</sup>.

Nonostante la grande mole di informazioni acquisite e la costruzione di alcuni prototipi, la produzione su larga scala di citometri a flusso dedicati alle indagini ematologiche tradizionali basati su misure di fluorescenza è del tutto recente ed ha seguito una diversa strada costruttiva. Infatti, piuttosto che utilizzare soluzioni in grado di combinare misure di impedenza con misure di scattering e/o di fluorescenza (come il Coulter VCS o il modulo per il conteggio e dimensionamento dei reticolociti degli analizzatori ABX) che comportano una certa complessità del trasduttore, due altri

Costruttori (Abbott e Sysmex) hanno preferito utilizzare vie analitiche distinte, dotando quella dedicata alla differenziazione dei leucociti e al conteggio dei reticolociti e degli eritroblasti, di una cella a flusso per esclusive misure ottiche.

Nel 1987 la giapponese Toa Medical Electronics commercializzò l'analizzatore R-1000, suo primo strumento a flusso per ematologia ad utilizzare misure in fluorescenza (associate a misure di forward scattering) e dedicato al conteggio dei reticolociti. Nel 1998 anche il costruttore francese ABX mise a punto un modulo per analisi in fluorescenza dedicato al conteggio dei reticolociti da inserire nell'analizzatore Vega 120. La prima vera integrazione delle misure in fluorescenza su un analizzatore ematologico completo si deve alla Abbott con il Cell Dyn 4000 commercializzato nel 1998 che, accanto a un tradizionale canale impedenziometrico dotato di focalizzazione e dedicato al conteggio di eritrociti e piastrine, utilizza una cella a flusso per misure di scattering multiangolo e di fluorescenza a più colori, con possibilità di differenziare i leucociti e di contare anche i reticolociti e gli eritroblasti. Nel 2000 la Sysmex ha commercializzato l'XE 2100 dotato di un trasduttore impedenziometrico con focalizzazione per l'analisi dei globuli rossi e delle piastrine e di un banco ottico integrato per misure di scattering a 2 diversi angoli e di fluorescenza. Quest'ultimo è utilizzato per la differenziazione leucocitaria e per il conteggio e la valutazione del grado di maturazione dei reticolociti e degli eritroblasti.

## Conclusioni e prospettive

È necessario riflettere su come le applicazioni attuali derivino da studi ed esperimenti conclusi da almeno un ventennio. Risulta arduo ipotizzare qualche nuovo principio tecnologico utilizzabile in citometria a flusso. Sicuramente avremo un'espansione dei metodi in fluorescenza con l'uso contemporaneo di fluorocromi a più colori. Si può anche prevedere un più massiccio impiego delle misure di luce polarizzata (i fenomeni di polarizzazione sono completamente descritti dalla cosiddetta "matrice di Mueller"<sup>60,61</sup> che tuttavia impone particolari modulazioni della luce incidente e sofisticati sistemi di raccolta del segnale, oltre ad una notevole complessità di calcolo per particelle diverse dalla sfera). Notevoli potenzialità sembra offrire l'analisi multiangolo che con l'utilizzo del pattern angolare del segnale misurato (scattering spatial profile o indicatrix) potrebbe fornire informazioni sullo stato funzionale oltre che sul contenuto delle cellule<sup>11,12</sup>. Ciò richiede peraltro dei banchi ottici in grado di raccogliere il segnale contemporaneamente su numerosi intervalli angolari, e dunque più complessi di quelli attualmente in uso. Non va neppure dimenticata la possibilità di utilizzare l'analisi d'immagine applicata alla citometria a flusso, che mediante appropriate colorazioni, fluorescenti o meno, permetterebbe l'identificazione di cellule immature o atipiche<sup>62-64</sup>. Infine si dovrà pensare ad



una estensione delle misure quantitative come ad esempio la possibilità, con l'uso di probes specifici, di risalire al contenuto in acidi nucleici delle cellule (RNA o DNA) e non solo con indagini in fluorescenza. Ci sono infatti segnalazioni che indicano come l'uso di correnti ad elevata frequenza su sistemi miniaturizzati offra la possibilità di ottenere rilevanti informazioni sul contenuto delle singole cellule, ad esempio misure capacitivie, che sfruttano la polarizzabilità delle molecole di DNA consentono di ottenere informazioni sul ciclo cellulare<sup>65</sup>. Anche gli studi sulla funzionalità cellulare (pH, concentrazione del calcio, potenziale di membrana...) eseguibili attualmente soltanto con i citofluorimetri "multipurpose" potrebbero essere condotti su analizzatori ematologici per le più svariate finalità: identificazione, studio dello stato funzionale, verifica dell'effetto dei farmaci.

La storia dunque continua!

## Bibliografia

1. Kerker M. Elastic and inelastic light scattering in flow cytometry. *Cytometry* 1983; 4:1-10.
2. Moldavan A. Photo-Electric Technique for the counting of microscopical cells. *Science* 1934; 80:188-9.
3. Kielland J. 1941 Method and apparatus for counting blood corpuscles U.S. Patent n. 2369577, filed May 1941.
4. Gucker FT, O'Konski CT, Pickard HB, Pitts JN. A photo-electronic counter for colloidal particles. *J Am Chem Soc* 1947; 69:2422-31.
5. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* 1953; 171:36-8.
6. Buttarello M. Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione. Parte I: il metodo ad impedenza. *RiMeL/IJLaM* 2006; 2:199-205.
7. Bierne T, Hutcheon JM. A photoelectric particle counter for use in the sieve range. *J Sci Instrum* 1957; 34:196-200.
8. Crosland-Taylor PJ, Stewart JW, Haggis G. An electronic blood-cell counting machine. *Blood* 1958; 13:398-409.
9. Skeggs LT jr. An automatic method for colorimetric analysis. *Am J Clin Pathol* 1957; 28: 311-22.
10. Meyer RA, Brunsting A. Light scattering from nucleated biological cells. *Biophys J* 1975; 15:191-203.
11. Chernyshev AV, Prots VI, Doroshkin AA, Maltsev VP. Measurement of scattering properties of individual particles with a scanning flow cytometer. *Appl Optics* 1995; 34:6301-5.
12. Kaye PH. Spatial light-scattering analysis as a means of characterizing and classifying non-spherical particles. *Meas Sci Technol* 1998; 9:141-9.
13. Watson D, Hagen N, Diver J, Marchand P, Chachisvilis M. Elastic light scattering from single cells: orientation dynamics in optical trap. *Biophys J* 2004; 87:1298-306.
14. Steinkamp JA. Flow cytometry. *Rev Sci Instrum* 1984; 55:1375-400.
15. Mullaney PF, Dean PN. Cell sizing: a small-angle light scattering method for sizing particles of low relative refractive index. *Appl Optics* 1969; 8:2361-2.
16. Brunsting A, Mullaney PF. Light scattering from coated spheres: model for biological cells. *Appl Optics* 1972; 11:675-80.
17. Brunsting A, Mullaney PF. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J* 1974; 14:439-53.
18. Ludlow IK, Kaye PH. A scanning diffractometer for rapid analysis of microparticles and biological cells. *J Colloid Interface Sci* 1979; 69: 571-89.
19. Mie G. Beitrage zur optik truber Medien, speziell kolloidaler Metallosungen. *Ann Phys* 1908; 25:377-445.
20. Loken MR, Parks DR, Herzemberg LA. Identification of cell asymmetry and orientation by light scattering. *J Histochem Cytochem* 1977; 25:790-5.
21. Ponder E. Hemolysis and related phenomena. Grune and Stratton, New York 1948.
22. Ornstein L, Kim YR. Method for treating red blood cells to effect sphering and reagent therefore. U.S. Patent n. 4412004, filed Jun 26, 1981.
23. Tycho DH, Metz MH, Epstein EA, Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. *Appl. optics* 1985; 24:1355-65.
24. Tycho DH. Method and apparatus for determining the volume & index of refraction of particles. U.S. Patent n. 4735504, filed Oct 31, 1983.
25. Hoffman RA, Ip SHC. Method for discriminating between unstained and absorbing dye stained cells. U.S. Patent n. 4492752, filed Sep 3, 1982.
26. Salzman GC, Crowell JM, Martin JC, Trujillo TT, Romero A, Mullaney PF, Labauve PM. Cell classification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes. *Acta Cytol.* 1975; 19:374-7.
27. Gershman RJ, Weiner IL, Daniels AC. Methods for enumerating 3-part white cell differential clusters. U.S. Patent n. 4596035, filed Jun 27, 1983.
28. Cornwall JB, Davison RM. Rapid counter for small particles in suspension. *J Sci Instr.* 1950; 37:414-7.
29. Parker JC, Horst WR. Method of simultaneously counting red and white blood cells. U.S. Patent n. 2875666, filed July 1953.
30. Kamentsky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 1965; 150:630-61.
31. Ornstein L. Tenuous but contingent connections. *Electrophoresis* 1987; 8: 3-13.
32. Ansley HR, Ornstein L. Process and apparatus for obtaining a differential white blood cell Count. U.S. Patent n. 3741875, filed Oct 30, 1970.
33. Steinkamp JA. A differential amplifier circuit for reducing noise in axial light loss measurements. *Cytometry* 1983; 4:83-7.
34. Shapiro H. Practical flow cytometry 3<sup>rd</sup> ed. West Newton, Ma. Wiley-Liss 1995.
35. De Groot BG, Terstappen LWMM, Puppels GJ, Greve J. Light scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry. *Cytometry* 1987; 8:539-44.
36. Terstappen LWMM, De Groot BG, Wisscher K, Van Konterik FA, Greve J. Four-Parameter white blood cell differential counting based on light scattering measurements. *Cytometry* 1988; 9:39-43.
37. Steen HB. Characteristics of flow cytometers. In: Melamed, Lindmo, Mendelshon Ed. Flow cytometry and sorting. 2<sup>o</sup> Ed. Wiley-Liss, 1990.
38. Groner W. Cell counting technologies. *Lab Hematol* 1997;

- 3:202-8.
39. Kerker M, Van Dilla MA, Brunsting A, Kratochvil JP, Hsu P, Wang DS, et al. Is the central dogma of flow cytometry true: that fluorescence intensity is proportional to cellular dye content? *Cytometry* 1982; 3:71-8.
  40. Asbury CL, Uy JL, Van Den Engh G. Polarization of scatter and fluorescence signals in flow cytometry. *Cytometry* 2000; 40:88-101.
  41. Pinkel D, Dean P, Lake S, Peters D, Mendelsohn M, Gray JW, et al. Flow cytometry of mammalian sperm: progress in DNA and morphology measurements. *J Histochem Cytochem* 1979; 27:353-8.
  42. Arndt-Jovin DJ, Ostertag W, Eisen H, Klimek F, Jovin TM. Studies of cellular differentiation by automated cell separation. *J Histochem Cytochem* 1976; 24:332-47.
  43. Lindmo T, Steen HB. Flow cytometry measurement of the polarization of fluorescence from intracellular fluorescence in mammalian cells. *Biophys J* 1977; 18:173-87.
  44. Eisert WG, Beisker W. Epi-illumination optical design for fluorescence polarization measurements in flow system. *Biophys J* 1980; 31:97-112.
  45. Price GB, McCutcheon MJ, Taylor WB, Miller RG. Measurement of cytoplasmic fluorescence depolarization of single cells in a flow system. *J Histochem Cytochem* 1977; 25:597-600.
  46. Epstein M, Norman A, Pinkel D, Udokoff R. Flow system fluorescence polarization measurements on fluorescein diacetate-stained EL4 cells. *J Histochem Cytochem* 1977; 25: 821-6.
  47. Hallermann L, Thom R, Gerhartz H. Elektronische Differentialzählung von Granulozyten und Lymphozyten nach intravitaler Fluochromierung mit Acridinorange. *Verh Deutsch Ges Inn Med* 1964; 70:217-9.
  48. Wheelless LL, Wied GL, Patten SF, Bahr GF. Method and apparatus for classifying biological cells by measuring the size and fluorescent response thereof. U.S. Patent n. 3497690, filed Sep 21, 1967.
  49. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1969; 163:1213-4.
  50. Valet G. Past and present concepts in flow cytometry. A european perspective. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17:213-22.
  51. Gohde W. Automatisches Meß und zählgerät für die Teilchen einer Dispersion. DE Patent n. 1815352 Dec 18, 1968.
  52. Dittrich W, Gohde W. Impulsfluorometrie bei einzelzellen in Suspensionen. *Z Naturforsch* 24b; 1969:221-8.
  53. Adams LR, Kametsky L. Machine characterization of human leukocytes by acridine orange fluorescence. *Acta Cytol* 1971; 15: 289-91.
  54. Steinkamp MJ, Fulwyler MJ, Coulter JR, Hiebert RD, Horney JL, Mullaney PF. A new multiparameter separator for microscopic particles and biological cells. *Rev Sci Instrum* 1973; 44:1301-10.
  55. Kachel V, Glossner E, Kordwing E, Ruhstroth-Bauer G. Fluvo-metricell, a combined cell volume and cell fluorescence analyzer. *J Histochem Cytochem* 1977; 25:804-12.
  56. Kleinerman M. Differential counting of leukocytes and other cells. U.S. Patent n. 3916205, filed Oct 28, 1975.
  57. Shapiro HM, Schildkraut RE, Curbelo R, Laird CW, Turner B, Hirschfeld T. Combined blood cell counting and classification with fluorochrome stains and flow instrumentation. *J Histochem Cytochem* 1976; 24:396-411.
  58. Leif R, Thomas T, Yopp TA, Watson BD, Guarino VR, Hindmann DHK, et al. Development of instrumentation and fluorochromes for automated multiparameter analysis of cells. *Clin Chem* 1977; 23:1492-8.
  59. Rodriguez CM, Cano JM, Carrillo B, Gordon KM, Horton AF, Paul RD, Wells MA, Wyatt JL. Method and apparatus for analyzing cells in a whole blood sample. U.S. Patent n. 6228652, filed Feb 16, 1999.
  60. Mueller H. The foundations of optics. *J Opt Soc Am* 1948; 38:661.
  61. Slood PMA, Hoekstra AG, Van Der Liet H, Figdor CG. Scattering matrix elements of biological particles measured in a flow through system: theory and practice. *Appl Optics* 1989; 28:1752-63.
  62. Kachel V, Benker G, Lichtnau K, Valet G, Glossner E. Fast imaging in flow: a means of Combining flow cytometry and image analysis. *J Histochem Cytochem* 1979; 27:335-41.
  63. Kasdan, JP, Pelmulder, L, Spolter, GB, Levitt, MR, Lincir, GN, Coward, et al. The white IRIS leukocyte differential analyzer for rapid high-precision differentials based on images of cytoprobe-reacted cells. *Clin Chem* 1994; 40:1850-61.
  64. Kubota F. Analysis of red cell and platelet morphology using an imaging-combined flow cytometry. *Clin Lab Haem* 2003; 25:71-6.
  65. Sohn LL, Saleh OA, Facer GR, Beavis AJ, Allan RS, Notterman DA. Capacitance cytometry: measuring biological cell one by one. *PNAS* 2000; 97: 10687-90.