



BD Leucocount Kit

Для подсчета количества остаточных лейкоцитов в продуктах крови после лейкоредукции.

50 анализов — кат. № 340523

10/2010

23-13690-06



BD, логотип BD и другие товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD



**Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences**

San Jose, CA 95131
Тел.: 877-232-8995
Факс: 408-954-2347
ClinicalApplications@bd.com



BENEX Limited

Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ирландия
Тел.: 353-61-472920
Факс: 353-61-472907

BD Biosciences

Поддержка клиентов в Европе

Тел.: 322-400-9895
Факс: 322-401-7094
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

BD Leucocount™ Kit предназначен для подсчета количества остаточных лейкоцитов (оБКТ) в продуктах крови после лейкоредукции.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Присутствие лейкоцитов (белых кровяных телец — БКТ) в продуктах крови и концентратах тромбоцитов ассоциировано с повышенной частотой возникновения лихорадочных трансфузионных реакций, передачи цитомегаловируса и аллоиммунизации к антигенам системы HLA у реципиентов трансфузии.^{1–3} Лейкоредукция, сбор тромбоцитов методом афереза или обработка с помощью специальных фильтров после сбора могут уменьшить количество БКТ до 5×10^6 на единицу и ниже, минимизируя таким образом осложнения, связанные с трансфузиями.^{4,5} BD Leucocount Kit обеспечивает эффективный и чувствительный метод подсчета количества оБКТ с применением проточной цитометрии без ограничений, связанных с другими методами.^{6,7} Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Правительства США (FDA) рекомендует применение проточной цитометрии как метода подсчета при оценке качества продуктов крови после лейкоредукции.⁸

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Реагент BD Leucocount содержит пропидиум иодид (ПИ). ПИ представляет собой краситель нуклеиновых кислот, который при использовании с рибонуклеазой окрашивает только клеточную ДНК. Лейкоциты являются ядросодержащими клетками, имеющими ДНК, и поэтому окрашиваются этим

красителем. Безъядерные элементы (включая тромбоциты и эритроциты) не окрашиваются данным реагентом. Пробирки BD Trucount™* содержат частицы, которые используются как внутренний контроль для точного определения абсолютного количества остаточных лейкоцитов. Таким образом, перед окрашиванием соответствующие образцы добавляются в лиофилизированный осадок в пробирках BD Trucount. После окрашивания ОБКТ образцы анализируются в проточном цитометре. Абсолютное количество ОБКТ определяется с помощью простого расчета на основе количества частиц и объема образца.

4. РЕАГЕНТЫ

BD Leucoscount Kit включает в себя реагент BD Leucoscount в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов, и пробирки BD Trucount. Реагент BD Leucoscount содержит:

- ПИ (краситель нуклеиновых кислот);
- 0,1 % азида натрия;
- рибонуклеазу для ферментативного расщепления РНК тромбоцитов и ретикулоцитов;
- поверхностно-активное вещество, которое изменяет проницаемость клеточной мембраны и обеспечивает проникновение ПИ;
- буферы для стабилизации окрашенного образца.

Пробирки BD Trucount содержат лиофилизированный осадок флуоресцентных частиц размером 4,2 мкм, которые используются как внутренний контроль для расчета абсолютного количества.

Меры предосторожности

- Для диагностики *in vitro*. Не предназначено для терапевтических процедур.
- Пробирки BD Trucount следует хранить в пакете предприятия-изготовителя из полимерной пленки при температуре от 2 до 25 °С. Во избежание конденсации пакет следует открывать только после достижения им комнатной температуры и тщательно запечатывать его сразу после извлечения пробирки. Проверяйте влагопоглотитель при каждом открывании пакета. Если влагопоглотитель изменил цвет с голубого на бледно-лиловый, утилизируйте оставшиеся пробирки. Использовать пробирки необходимо не позднее чем через 1 час после извлечения из пленочного пакета. Не используйте пробирки после даты истечения срока годности, которая указана на упаковке. Срок годности вскрытого пакета указан на его этикетке.
- Следует принимать меры во избежание микробного загрязнения реагента.
- Перед использованием пробирок следует проверять наличие в них осадка и удерживателя. Осадок должен находиться под удерживателем и интактным.

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{8,9} и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки.

* Патенты США №№ 5 723 218; 5 187 288.

ОСТОРОЖНО! Реагент BD Leucocount содержит ПИ, потенциальный мутаген, и стабилизатор ДНК, который обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. Обращаться с ним следует в перчатках и защитных очках. Избегайте контакта с глазами, кожей или одеждой. Избегайте вдыхания паров. После использования реагента тщательно промойте рабочие поверхности. В случае контакта следует немедленно промыть водой. При попадании в глаза следует обратиться к врачу.

ОСТОРОЖНО! Реагент BD Leucocount содержит азид натрия. Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). Беречь от детей (S2). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо смывать большим объемом воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно возникновение взрывоопасных условий.

Хранение и обращение

1. Реагент BD Leucocount следует хранить при температуре от 2 до 8 °С. Не использовать после даты истечения срока годности, которая указана на этикетке.
2. Не подвергайте реагент BD Leucocount воздействию прямого солнечного света.

5. ПРИБОР

BD Leucocount Kit предназначен для использования с проточным цитометром, оснащенным лазером с длиной волны 488 нм для возбуждения флуоресценции, а также соответствующим аппаратным и программным обеспечением компьютера. Проточный цитометр должен определять как минимум двухцветную флуоресценцию, прямое рассеяние (FSC) и боковое рассеяние (SSC), а также устанавливать порог канала FL2. Мы рекомендуем использовать программное обеспечение BD CellQuest™ Pro для получения и анализа данных с помощью прибора марки BD FACSTM, такого как проточный цитометр BD FACSCalibur™ с дополнительным BD FACSTM Loader.

Конкретные настройки, представленные в п. «Настройка прибора» раздела 7 «Процедура», были определены на основе результатов исследований, выполненных с помощью прибора и программного обеспечения BD.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Подготовку и циклы обработки образцов эритроцитов (красных кровяных телец — ККТ) и тромбоцитов следует выполнять не позднее чем через 48 часов после лейкоредукции.

Мешающие факторы

Присутствие EDTA в образце может влиять на результаты.

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемые реагенты

Реагент BD Leucocount в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов, и пробирки BD Trucount.

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

1. Калибровочные частицы BD CaliBRITETM Beads (номер в каталоге BD: 349502 или 340486).
2. Контрольные образцы BD Leucoscount (номер в каталоге: 341001, 341002, 341003) или эквивалентные. Могут использоваться и другие контрольные материалы, но они должны быть проверены пользователем.
3. Полипропиленовые 5 мл пробирки BD FalconTM с крышками, 12 x 75 мм, с круглым дном (номер в каталоге BD: 352063), или эквивалентные.
4. Вихревая мешалка «вортекс».
5. Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette; номер в каталоге BD: 646539 или эквивалентные).

Процедура окрашивания

1. Аккуратно внесите от 200 до 400 мкл тщательно перемешанных образцов ККТ или тромбоцитов в чистые полипропиленовые пробирки 12 x 75 мм не позднее чем через 48 часов после лейкоредукции.
2. Извлеките пробирки BD Trucount из пленочного пакета (сразу же запечатайте его) и пометьте их соответствующим образом. Образцы необходимо подготовить не позднее чем через 1 час после извлечения из пакета.

NOTE: Перед использованием следует удостовериться в том, что осадок частиц BD Trucount интактен и находится под металлическим удерживателем на дне пробирки. В противном случае утилизируйте пробирку BD Trucount и используйте новую.

3. Добавьте 100 мкл тщательно перемешанного образца (тромбоциты, ККТ, контроль) в помеченную соответствующим образом пробирку BD Trucount.
4. Добавьте 400 мкл реагента BD Leucoscount в каждую пробирку.
5. Закройте пробирки и осторожно перемешайте их содержимое на вортексе. Избегайте избыточного перемешивания. Не перемешивайте на вортексе дольше 15 секунд.
6. Инкубируйте пробирки в течение 5 минут в темноте при комнатной температуре.
7. Храните в темноте до готовности к выполнению анализа. Свежие образцы, хранившиеся до 24 часов, можно анализировать не позднее чем через 24 часа после окрашивания. Образцы, которые хранились в течение 48 часов, а затем окрашивались, стабильны в течение как минимум 60 минут.

Настройка прибора

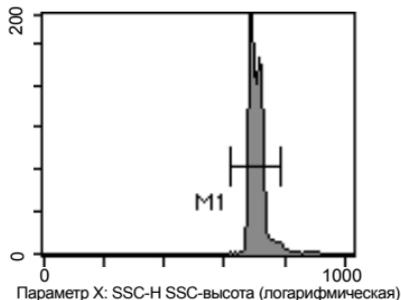
В этом разделе представлены инструкции по настройке прибора. По вопросам относительно настройки прибора и процедур обращайтесь к представителю компании BD в вашем регионе или в региональный офис. На территории США можно обращаться в центр поддержки клиентов компании BD по телефону (877) 232-8995.

Перед выполнением настройки прибора необходимо проверить его рабочие характеристики при использовании программного обеспечения BD и BD Calibrte Beads или эквивалентных. При использовании проточных цитометров других производителей необходимо следовать рекомендациям производителя относительно проверки рабочих характеристик.

Инструкции по автоматической настройке BD Leucoscount с помощью программного обеспечения BD FACSComp™ (версии 4.1 или более поздней) см. в *Руководстве пользователя программного обеспечения BD FACSComp*.

Порядок выполнения настройки вручную.

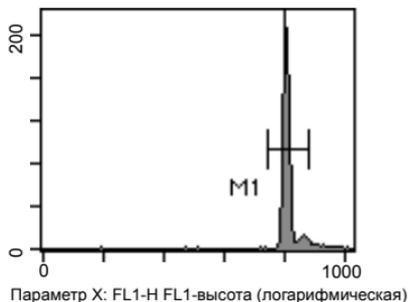
1. Подготовьте пробирку для настройки прибора, добавив 500 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в помеченную соответствующим образом пробирку BD Trucount.
2. В режиме Setup («Настройка») выполните цикл обработки пробирки для настройки прибора и настройте его следующим образом.
 - Установите все настройки компенсации на 0,0 %.
 - Установите для FSC («Прямое рассеяние») значение усиления LINEAR («Линейное»).
 - Установите для FL1 («Канал 1»), FL2 («Канал 2») и SSC («Боковое рассеяние») значение усиления LOG («Логарифмическое»). Используйте значения каналов.
 - Установите порог FL2 приблизительно на 300 для устранения влияния дебриса.
 - При выполнении анализа и хранении разрешение прибора должно составлять 1024.
3. Настройте напряжения фотоумножителей (ФЭУ) каналов SSC, FL1 и FL2 так, чтобы частицы BD Trucount попадали в соответствующий диапазон средних значений канала, следующим образом.
 - Просматривая гистограмму SSC (рис. 1), настройте напряжение ФЭУ канала SSC так, чтобы частицы попадали в диапазон 700 ± 20 .



Маркер	Результат подсчета	Среднее значение
Все	8340	696,54
M1	8249	695,38

Рис. 1 Гистограмма SSC

- Просматривая гистограмму FL1 (рис. 2), настройте напряжение ФЭУ канала FL1 так, чтобы частицы попадали в диапазон 800 ± 20 .



Маркер	Результат подсчета	Среднее значение
Все	8340	799,46
M1	8203	797,95

Рис. 2 Гистограмма FL1

- Просматривая гистограмму FL2 (рис. 3), настройте напряжение ФЭУ канала FL2 так, чтобы частицы попадали в диапазон 700 ± 20 .

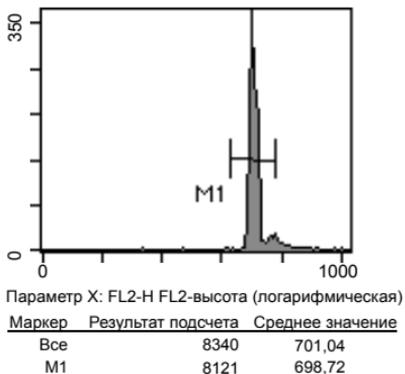


Рис. 3 Гистограмма FL2

4. Сохраните настройки прибора.

Забор образца

1. Создайте точечный график FL1 относительно FL2.
2. Начните забор подготовленного образца. Если используется BD FACS Loader, рекомендуется 10-секундное перемешивание при запуске штатива и 3-секундное промежуточное перемешивание после каждой пробирки. Перемешивайте содержимое пробирок на вортексе непосредственно перед их установкой в штативы BD FACS Loader. Для получения подробных инструкций по работе с BD FACS Loader см. в *Руководство по эксплуатации BD FACS Loader*.
3. Без сохранения данных создайте области R1 и R2, которые содержат частицы BD Truocount и ОБКТ, соответственно (рис. 4).

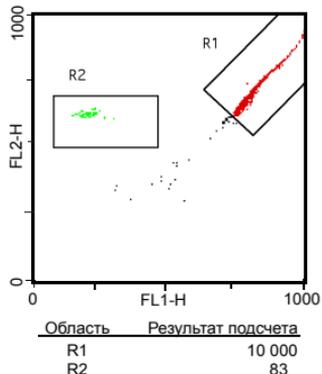


Рис. 4 Точечный график FL1 относительно FL2 с данными, полученными для единицы тромбоцитов после лейкоредукции

4. Удостоверьтесь в том, что порог FL2 установлен надлежащим образом.
5. Получите и сохраните все результаты подсчета. Остановите подсчет, когда результат для R1 (области частиц) достигнет значения 10 000.

Анализ данных

1. Для того чтобы начать анализ данных, создайте точечный график FL1 относительно FL2 со статистикой и областями R1 и R2 (рис. 4).
2. Получите статистику для областей данных образца.
3. Выполните расчеты в соответствии с описанием в разделе 8 «Результаты».

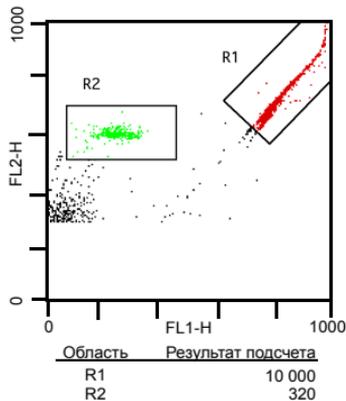
Контроль качества

Для поддержания абсолютного количества остаточных лейкоцитов в рамках допустимых пределов лаборатории рекомендуется ежедневно проводить анализ контрольных образцов BD Leucoscount.

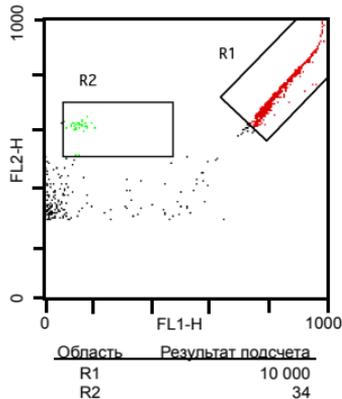
1. Выполните окрашивание контрольных образцов как обычных.
2. Выполните анализ контрольных образцов в соответствии со стандартной процедурой, которая описана в п. «Анализ образца» раздела «Процедура». Компания BD рекомендует выполнять анализ контрольных образцов как минимум один раз в день. Кроме того, целесообразно анализировать контрольные образцы при каждом отклонении.

Интенсивность флуоресценции контрольных клеток BD Leucoscount может незначительно отличаться от интенсивности нефиксированных БКТ. См. рис. 4 и 5. Если необходимо, создайте и сохраните шаблон для получения/анализа данных контрольных образцов с надлежащим образом настроенной областью R2. Образец для настройки гейтирования может быть полезен для определения ожидаемой интенсивности флуоресценции БКТ, присутствующих в продуктах крови. Более подробную информацию см. в следующем разделе «Настройка гейтирования».

При проведении процедуры контроля качества должны быть получены результаты, эквивалентные ожидаемым значениям.



Контрольный образец для высокого уровня BD Leucoscount



Контрольный образец для низкого уровня BD Leucoscount

Рис. 5. Контрольные образцы для высокого и низкого уровней

Настройка гейтирования (необязательно)

Образец для настройки гейтирования можно подготовить путем разбавления ККТ без лейкоредукции, совпадающих по группе ABO, фильтрованными эритроцитами или BD FACSCFlow™ в пропорции 1:100 (совпадение по группе ABO рекомендуется во избежание агглютинации эритроцитов).

1. Подготовьте образец для настройки гейтирования в соответствии с процедурой окрашивания BD Leucoscount.
2. Установите образец для настройки гейтирования в порт ввода образцов.
3. В режиме настройки выполните забор образца для настройки гейтирования.
4. Когда отобразятся результаты подсчета, надлежащим образом настройте области R1 и R2.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Абсолютное количество ОБКТ в образце определяется путем деления количества подсчитанных БКТ на количество подсчитанных флуоресцентных частиц и умножения этого результата на концентрацию частиц.

Формула:

$$\frac{\text{Кол-во лейкоцитарных событий (R2)}}{\text{Кол-во событий частиц (R1)}} \times \frac{\text{Кол-во частиц на пробирку*}}{\text{Объем окрашенного образца (мкл)}}$$

= Абсолютное количество БКТ / (мкл)

* Специфическое для партии содержание частиц указано на пленочном пакете BD Trucount (из фольги).

Пример:

$$\frac{17}{10\,003} \times \frac{52\,957}{100\text{ мкл}} = \frac{0,9\text{ БКТ}}{\text{мкл}}$$

Умножив этот результат на объем упаковки (в мкл) можно получить значение общего количества БКТ во всей упаковке.

Пример:

$$0,9\text{ БКТ/мкл} \times \frac{(300\,000\text{ мкл})}{\text{объем упаковки}} \\ = 2,7 \times \frac{10^5}{\text{объем упаковки}}$$

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости от окрашивания к окрашиванию было проведено исследование в двух центрах. Были проведены подготовка и анализ образцов эритроцитов и тромбоцитов. Результаты представлены в таблице 1.

Табл.1. Воспроизводимость от окрашивания к окрашиванию при использовании набора BD Leucoscount для единиц ККТ и тромбоцитов

Тип образца	Диапазон БКТ/мкл	Количество образцов	Среднее значение	SD ^a	%CV ^b
ККТ	0—1	15	0,4	0,17	43
	1—5	22	2,2	0,4	19
	5—25	13	9,5	1,1	11
	25—300	19	97,0	5,6	6
Тромбоциты	0—1	21	0,4	0,13	34
	1—5	13	2,4	0,35	14
	5—25	13	11,0	0,87	8
	25—300	16	96,0	4,96	5

a. SD — стандартное отклонение.
b. CV — коэффициент вариации.

Стабильность

Для оценки стабильности образцов и окрашенных образцов было проведено одноцентровое исследование. Стабильность образца оценивалась путем сравнения образцов в исходном состоянии (окрашенных и проанализированных в течение 1 часа после лейкоредукции) с аликвотными образцами, хранившимися в течение 24 и 48 часов (окрашенными и проанализированными в течение 5 минут). Результаты представлены в таблице 2.

Табл.2. Отклонение относительно исходного состояния для образцов, окрашенных в течение 48 часов после лейкоредукции

Тип образца	n	Среднее значение БКТ/мкл в исходном состоянии	Отклонение среднего значения БКТ/мкл; 24 часов хранения	Отклонение среднего значения БКТ/мкл; 48 часов хранения
ККТ	7	15,5	-0,45	-0,8
Тромбоциты	7	14,8	0,71	0,53

Стабильность окрашенного образца оценивалась путем сравнения образцов в исходном состоянии (окрашенных и проанализированных в течение 1 часа после лейкоредукции) с образцами, окрашенными через 24 часа, а затем хранившимися в течение 24 часов перед выполнением анализа (таблица 3).

Табл.3. Отклонение относительно исходного состояния для образцов, окрашенных в течение 48 часов после лейкоредукции

Тип образца	n	Среднее значение БКТ/мкл в исходном состоянии	Отклонение среднего значения БКТ/мкл; 24 часа после окрашивания
ККТ	7	15,5	-0,25

Табл.3. Отклонение относительно исходного состояния для образцов, окрашенных в течение 48 часов после лейкоредукции

Тип образца	n	Среднее значение БКТ/мкл в исходном состоянии	Отклонение среднего значения БКТ/мкл; 24 часа после окрашивания
Тромбоциты	7	14,8	0,53

Можно выполнять анализ образцов как тромбоцитов, так и ККТ в рамках 48 часов после лейкоредукции. Тромбоциты следует хранить при комнатной температуре; ККТ необходимо охлаждать. Свежие образцы, хранившиеся до 24 часов, можно анализировать не позднее, чем через 24 часа после окрашивания. Образцы, которые хранились в течение 48 часов, а затем окрашивались, стабильны в течение как минимум 60 минут.

Точность

Было проведено сравнение метода анализа BD Leucoscount с методом Нажотта на предмет точности подсчета количества остаточных лейкоцитов. Для этого сравнения были использованы образцы ККТ и тромбоцитов из трех банков крови. Результаты представлены на рис. 6, где n = 226 для ККТ и n = 217 для тромбоцитов.

Табл.4. Сравнение результатов применения BD Leucoscount в проточном цитометре BD FACSCalibur и другом коммерчески доступном проточном цитометре

Тип образца	n	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Корреляция
ККТ	30	1,06	-5,65	0,998
Тромбоциты	30	0,99	-0,28	0,999

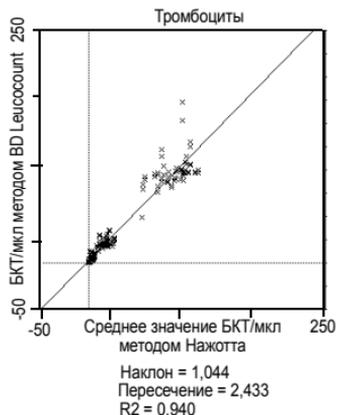
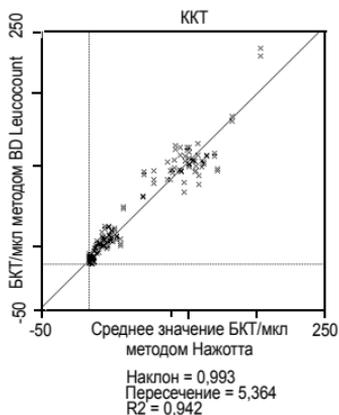


Рис. 6. Точность метода BD Leucoscount в сравнении с методом Нажотта

Сравнение проточных цитометров

Было проведено одноцентровое исследование, посвященное сравнению рабочих характеристик проточных цитометров от двух разных производителей при использовании набора BD Leucoscount. По тридцать образцов ККТ и тромбоцитов оценивались методами регрессионного анализа. Результаты анализа представлены в таблице 4.

Линейность

BD Leucoscount Kit обеспечивает получение линейных результатов в диапазоне 1—350 БКТ/мкл.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ

При использовании пробирок BD Trucount критически важным является внесение точного объема крови. Используемая пипетка должна быть откалибрована для дозирования 100 мкл образца.

Для того чтобы обеспечить полное ресуспендирование клеток и частиц, следует мягко перемешать образцы на вортексе непосредственно перед анализом в проточном цитометре.

Содержание частиц в пробирках BD Trucount разное для каждой партии. Критически важным является использование значения содержания частиц, которое указано на пленочном пакете текущей партии пробирок BD Trucount. Не используйте более одной партии частиц в одно и то же время.

Ядросодержащие эритроциты содержат нуклеиновые кислоты и могут определяться в данном методе анализа как ОБКТ. Однако ядросодержащие эритроциты не присутствуют в крови нормальных индивидов в определяемых количествах.¹⁰

С реагентом BD Leucocount не рекомендуется использование EDTA.

ГАРАНТИЯ

Если иное не оговорено в каких-либо действующих общих условиях продаж компании BD для клиентов за пределами США, на приобретение данных продуктов распространяются следующие гарантийные обязательства.

Для продаваемых согласно данным условиям продуктов гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке или маркировке продукта на момент доставки заказчику. Компания BD настоящим отвергает любые другие гарантии, явные или подразумеваемые, включая гарантии коммерческой выгоды, пригодности для конкретных целей и ненарушения прав третьих сторон. Вся ответственность компании BD ограничивается либо заменой продуктов, либо возмещением цены покупки. Компания BD не несет ответственности за повреждение имущества и любой сопутствующий или косвенный ущерб, включая травмы и экономические убытки, вызванные данным продуктом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wenz B, Gurtlinger K, O'Toole A, Dugan E. Preparation of granulocyte-poor red blood cells by microaggregate filtration. A simplified method to minimize febrile transfusion reactions. *Fox Sang*. 1980;39:282-287.
2. de Graan-Hentzen YCE, Gratama JW, Mudde GC, et al. Prevention of primary cytomegalovirus infection in patients with hematologic malignancies by intensive white cell depletion of blood products. *Transfusion*. 1989;29:757-760.
3. Snieciski I, O'Donnell M, Nowicki B, Hill L. Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products. *Blood*. 1988;71:1402-1407.
4. Venglen-Tyler V, ed. Leukoreduction of RBC and platelet units. *American Association of Blood Banks*; 1996:722-725.
5. Dumont IJ, Dzik WH, Rebullá P, Brandwein H. Practical guidelines for process validation and process control of white cell-reduced blood components: report of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion (ISBT). *Transfusion*. 1996;36:11-20.
6. Rebullá P, Porretti L, Bertolini F, et al. White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white blood cells. *Transfusion*. 1993;33:128-133.
7. Vanhula M, Simpson SJ, Martinson JA, et al. A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components. *Transfusion*. 1993;33:262-267.

8. Center for Biologics Evaluation and Research. *Recommendations and Licensure Requirements for Leukocyte-Reduced Blood Products*. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 1996.
9. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Tentative Guideline*. Villanova, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1991. M29-T2.
10. Bull BS, Breton-Corius J. Morphology of the erythron. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kripps TJ, eds. *Williams Hematology*. 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill, Inc; 1995:349.