CYTO-STAT® triCHROME™ CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5

REF **6607015 -50 тестов**

Ч.№ 4238013-HA

CE

BECKMAN COULTER®

	CD45-FITC	CD4-RD1	CD3-PC5
Специфичность	CD45	CD4	CD3
Клон	B3821F4A	SFCI12T4D11	UCHT1
Гибридома	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c
Иммуноген	Агент трансфекции, содержащий кДНК CD45 человека	Периферические Т-лимфоциты человека	Тимоциты человека и лимфоциты периферической крови от человека с лейкемией Сезари
Подкласс иммуноглобулина	IgG2b	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость	Специальная среда	Специальная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждается светом длиной волны 468-509 nm/светоизлучает на длине волны 504-541 nm	Возбуждается светом длиной волны 486-580 nm/светоизлучает на длине волны 568-590 nm	Возбуждается светом длиной волны 486-580 nm/светоизлучает на длине волны 660-680 nm
Конъюгат	FITC (Изотиоцианат флуоросцеина)	RD1 (Фикоэритрин)	PC5 (Фикоэритрин-Cy5)
Молярная концентрация	FITC/Белок: 3-10	RD1/Белок: 0,5-1,5	PC5/Белок: 0,5-1,5

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

РЕАГЕНТ ДЛЯ ПОДСЧЁТА КЛЕТОК ДЛЯ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОМЕТРОВ COULTER® EPICS™

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент с моноклональными антителами CYTO-STAT® triCHROME™ CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 является трёхцветным реагентом, содержащим три мышиных моноклональных антитела. Все три антитела помечены флуорохромами разных цветов. Этот реагент позволяет одновременно провести идентификацию и подсчёт общего количества CD3+ и CD4+ и соотношения CD3+/CD4+ лимфоцитов при проточной цитометрии цельной крови.[1-3] CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 в качестве изотипического контроля используется для отслеживания неспецифического связывания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов периферической крови состоит из клеток трёх типов: Т (происходящие из тимуса), В (происходящие из костного мозга) и нулевые клетки.[4] Эти типы клеток при изучении микроскопией морфологически неотличимы, но могут быть идентифицированы по специфическим антигенным отличиям клеточных мембран.

Т и В лимфоциты играют главную роль в работе иммунной системы. Различные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, функционировать как клетки-эффекторы и/или контролировать как тип, так и интенсивность клеточного и/или гуморального иммунного ответа. При активации антигеном или макрофагом посредством Т-лимфоцита, отдельные В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые синтезируют и выделяют специфические иммуноглобулины (Ig).

В прошлом Т и В лимфоциты идентифицировались и подсчитывались с исользованием таких клеточных маркеров, как рецептор к эритроцитам барана на Т-лимфоцитах (Е-розеток) и поверхностный мембранный иммуноглобулин (Sm) Ig на В-лимфоцитах.[5,6] Хотя методика Е-розеток специфична для Т-лимфоцитов, её применение ограничивает то, что визуальная идентификация и самостоятельный подсчёт комплексов Т-лимфоцитов с овечьими эритроцитами возможны только через оптический микроскоп. Измерение SmIg для идентификации и посчёта В-лимфоцитов же ограничено тем, что другие клеточные популяции могут экспрессировать SmIg и/или связывать иммуноглобулин за счёт рецепторов к его Fc-фрагменту, что приведёт к ложнопозитивному результату.

Позднее были созданы моноклональные антитела для идентификации и подсчёта Т и В лимфоцитов.[6,7] В отличие от относительно неспецифичных поликлональных антител (гетероантисыворотки) к этим клеточным популяциям, моноклональные антитела связывают отдельные специфические поверхностные антигены Т и В клеток. Это позволяет не только более точно и аккуратно подсчитать лимфоциты, но и, используя другие клеточные маркеры (TdT, антиген, относящийся к HLA-D, SmIg), идентифицировать различные стадии дифференцировки Т и В клеток.

Различные поверхностные антигены экспрессируются и исчезают на Т и В лимфоцитах в зависимости от стадии их созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния клеток. Начав экспрессировать антиген, клетка может коэкспрессировать один или несколько из этих антигенов в течение различных периодов времени.

Экспрессия Т-лимфоцитами общих для Т-клеток поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD7 (ранние протимоциты); CD2 (промежуточные протимоциты); CD5 (незрелые тимоциты), цитоплазматический CD3 (незрелые и обыкновенные тимоциты) и CD3 (зрелые тимоциты).[3,7] Затем начинается коэкспрессия (обыкновенными тимоцитами) и специализированная экспрессия (зрелыми тимоцитами) CD4 (индукторы) и CD8 (супрессоры/цитотоксические клетки).[3,7] CD7, CD2, CD5 и CD3 продолжают коэкспрессироваться с CD4 или CD8 в течение всего процесса дифференцировки Т-лимфоцитов, в том числе на покоящихся и активированных зрелых Т-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани.

Экспрессия В-лимфоцитами общих для В-клеток поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD19 (коммитированные предшественники В-клеток/про-В клетки); CD20 (ранние пре-В клетки).[3,7,8] CD19 и CD20 продолжают коэкспрессироваться в течение всего процесса дифференцировки В-лимфоцитов, в том числе и на покоящихся и активированных зрелых В-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани. Оба антигена изчезают на последней стадии дифференцировки В-лимфоцитов, стадии плазматической клетки.

CD21 (покоящиеся зрелые В-лифоциты периферической крови или лимфоидной ткани) и CD22 (пре-В клетки) являются поверхностными антигенами В-клеток, изчезающими при активации зрелых В-лифоцитов периферической крови или лимфоидной ткани[3,8] Поверхностной экспрессия CD22 предшествует цитоплазматическая экспрессия CD22 (про-В клетки).

Реагенты со специфическими моноклональными антителами, связывающими поверхностные антигены, общие для Т или В клеток, могут быть использованы для идентификации или подсчёта зрелых Т или В лимфоцитов, соответственно. Реагенты со специфическими моноклональными антителами к определённым поверхностным антигенам также могут быть использованы для определения стадии созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния клеток. Данный тест использует моноклональные антитела CD3, CD4, и CD45 для идентификации или подсчёта зрелых Т-лимфоцитов и Т-супрессоров/цитотоксических Т-лимфоцитов за счёт специфического связывания поверхностных антител, общих для Т-лимфоцитов и Т-супрессоров/цитотоксических Т-лимфоцитов, CD3 и CD4, соответственно. Кроме того, тест позволяет одновременно исследовать различные популяции лимфоцитов в одной пробе цельной крови, используя только один реагент.

CD45

Антитело CD45 распознаёт представителей семьи общих лейкоцитарных антигенов CD45 с молекулярной масой в 180, 190, 210 и 220 kd.[3,9,10] Он известен также как общий лейкоцитарный антиген (LCA). CD45 экспрессируется на всех гемопоэтических клетках, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.[11,12] Он не был обнаружен в дифференцированных негемопоэтических тканях.[11-14]

CD4

Антиген CD4 имеет молекулярную массу в 62 kd.[3,15] Он экспрессируется на популяции Т-индукторов периферической крови.[15,16] Кроме того, в небольших количествах, он экспрессируется на моноцитах.[17] CD4+ лимфоциты играют важную роль в регуляции иммунного ответа.[18,19] В периферической крови CD4+ лимфоциты выполняют функцию индукторов для вздаимодействий Т клеток между собой, с В-клетками и с макрофагами.[20] CD4 связывается с антигеном главного комплекса гистосовместимости II класса (MHC) на клетках-мишенях.[15,20]

CD3

Антитело к CD3 антигену спефически связывается с эпсилон-цепью CD3 компонента комплекса Т-клеточного рецептора (TCR).[3,21] Молекулярная масса этой цепи составляет 20 kd.[21] Это специфический для клеточной линии общий для Т-клеток антиген, в норме экспрессирующийся на поверхности зрелых тимоцитов и на покоящихся и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови (как в популяциях индукторов, так и супрессоров и цитотоксических клеток).[22-24]

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

CD3+ и/или CD4+ лимфоциты

Процент CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов и их абсолютное количество могут быть использованы при оценке иммунного статуса, связанного с известными или неизвестными заболеваниями, и для контроля уровня лимфоцитов после трансплантации органов.[25-32]

К примеру, выявление аномальных уровней CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов может помочь при диагностировании и/или прогнозировании различных аутоиммунных заболеваний, связанных с изменением количества белых клеток крови. Изменение процента CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов, замеченное после трансплантации органа (к примеру, почки), указывает на то, что измерение количества CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов может оказаться полезным для отслеживания изменений в этих клеточных популяциях.

Идентификация аномальных уровней CD4+ лимфоцитов может также помочь при диагностировании и/или прогнозировании иммунодефицитных состояний. Например, при заражении вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), этиологический фактор синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД) приводит к глубокой иммунносупрессии, в основном за счёт выборочного истощения популяции CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к вирусу (антиген CD4).[17,33] Прогрессирующее клиническое и иммунологическое ухудшение обычно коррелирует с падением числа CD4+ лимфоцитов.[17]

Соотношение Т4/Т8

Изменения уровней CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов, связанное с заболеваниями, может изменить Т4/Т8 соотношение числа индукторов: супрессоров/цитотоксических клеток. Поэтому соотношение Т4/Т8 может оказаться полезным при диагностировании и/или прогнозировании в качестве индикатора состояния иммунного ответа организма.

Соотношение Т4/Т8 вместе с числом CD4+ лимфоцитов широко использовались в качестве лабораторных параметров для оценки комплекса, связанного со СПИДом и собственно СПИДом.[17,34] У пациентов на продвинутой стадии СПИДа соотношение Т4/Т8 стремится к нулю, а наличие CD4+ лимфоцитов не регистрируется.[17] При этом уровень CD8+ лимфоцитов может быть нормальным, повышенным или пониженным.

У пациентов со стабильной функцией почечного аллотрансплантата после трансплантации наблюдается пониженный процент CD4+ и повышенный процент CD8+ лимфоцитов без значимого изменения соотношения Т4/Т8.[6] Кроме того, низкое соотношение Т4/Т8 и пониженный процент CD4+ лимфоцитов наблюдался у пациентов во время фенотипического восстановления после аутологичной трансплантации очищенного костного мозга.[30,31]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Этот тест основан на способности моноклонального антитела связываться с поверхностью клеток, экспрессирующих определённые антигенные детерминанты. CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 является комбинацией трёх мышиных моноклональных антител, специфичных к разным поверхностым антигенам. Специфическая окраска клеток достигается за счёт инкубации цельной крови с трёхцветным реагентом CYTO-STAT triCHROME. Вторая идентичная проба крови метится изотипическим контролем CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 для оценки неспецифической фоновой флуоресценции. Красные клетки крови подвергаются лизису, а оставшиеся белые клетки крови анализируются с помощью проточной цитометрии с использованием селекторов лимфоцитов. На первой гистограмме селектор лимфоцитов определяется как содержащий яркую CD45+ FITC флуоресценцию и низкое боковое рассеяние (SS). На второй гистограмме процент положительно-окрашенных клеток определяется для четырёх квадрантов: CD3-/CD4+ (только положительная RD1 флуоресценция), CD3+/CD4+ (положительная PC5/RD1 флуоресценция), CD3-/CD4- (отрицательная PC5/RD1 флуоресценция) и CD3+/CD4- (только положительная PC5 флуоресценция).

РЕАГЕНТ

Смотрите таблицу странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Кроме антител, в состав реагентов входят 0,2% БСА, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

1. Этот реагент содержит 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдение этих предосторожностей для избежания образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, тщательно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта проб с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте антитело после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
5. Минимизируйте воздействие света на реагент при хранении или инкубации.
6. Избегайте бактериального загрязнения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
7. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этим реагентом.
8. При попадании в организм существует опасность отравления.
9. При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Открытый реагент сохраняет стабильность в течение 90 дней после вскрытия при хранении при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагент к 2-8°C. Не замораживайте. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение реагента (в норме это прозрачная розовая жидкость) или значительные колебания значений контрольных показателей могут указывать на разрушение реагента, и в таком случае его не следует использовать.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Моноклональное антитело CYTO-STAT triCHROME используется прямо из флакона.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

ВНИМАНИЕ: Стабильность проб крови очень изменчива. Для оптимальных результатов начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. Непомеченная, предохраняемая от свёртывания кровь до начала процедуры должна храниться при температуре 20-25°C. Не охлаждайте.

Заберите венепункцией в асептических условиях пробу венозной крови в пробирку для забора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется ЭДТА).[38] Для каждого теста требуется 100 µL цельной крови. Заберите достаточно крови (от 1 до 2 mL на пробирку) для проведения тестов и постановки контроля, и храните аутологичную плазму на случай необходимости разведения пробы. Подсчёт белых кровяных клеток и проверка жизнеспособности клеток должны быть проведены, следуя установленной лабораторной процедуре, для каждого образца венозной крови. Рекомендуемая жизнеспособность клеток – ≥90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.

ПРОЦЕДУРА ИММУННОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT triCHROME

ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 Ч.№ 6607015 - 50 тестов (0,5 mL)

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Агент лизиса эритроцитов (по требованию).

Система реагентов COULTER® IMMUNOPREP™ для рабочей станции COULTER Q-PREP™

Ч.№ 7546946 – 100 тестов

Разбавитель (при необходимости)
аутологичная плазма

ИЛИ

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для:

рабочей станции COULTER MULTI-Q-PREP™ или TQ-Prep™,

Ч.№ 7546999 -300 тестов

Разбавитель (при необходимости)
аутологичная плазма

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5, Ч.№ 6607019 – 50 тестов (0,5 mL)

Комплект реагентов CYTO-COMP™ Ч.№ 6607021 (4 x 0,5 mL)

Комплект клеток CYTO-COMP Ч.№ 6607023 (5 x 1 mL)

COULTER CYTO-TROL Control Cells, Ч.№ 6604248 - 50 тестов

Флуоросферы Flow-Count™, Ч.№ 7547053 (20 мл) (дополнительный реагент)

тест-пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для забора цельной крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Пипетки для переноса

Пастеровские пипетки

Микропипетки

Вихревой смеситель

Проточный цитометр

Счётчик клеток или гемацитометр

Фильтр (для COULTER EPICS XL™/XL-MCL™только с 3 сенсорами флуоресценции), Ч.№ 6915056

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное мечение достигается при количестве белых клеток крови в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL. Если количество белых клеток крови превышает 10 x 10^3 клеток/µL необходимо разбавление, а при количестве белых клеток крови меньше 3 x 10^3 клеток/µL необходимы центрифугирование и ресуспензирование для получения значений в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL. При использовании систем реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, COULTER MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или COULTER TQ-Prep/IMMUNOPREP в качестве разбавителя рекомендуется использовать аутологичную плазму.

Аномальные пробы

a. Большое число белых клеток крови (>10 x 10^3 клеток/µL)
   10-20 x 10^3: Разбавьте кровь 1:2.
   20-30 x 10^3: Разбавьте кровь 1:3.
   30-40 x 10^3: Разбавьте кровь 1:5.
   40-60 x 10^3: Разбавьте кровь 1:6.
   60-100 x 10^3: Разбавьте кровь 1:10.
   100-200 x 10^3: Разбавьте кровь 1:20.
b. Малое количество белых клеток (<3 x 10^3 клеток/µL) – Используйте метод лейкоцитных плёнок
   1) Центрифугируйте кровь при 20-25°C на 500 x g в течение 5 минут.
   2) Отберите лейкоцитную плёнку пастеровской пипеткой, забрав частично красные клетки крови и немного плазмы, чтобы быть уверенным, что все белые клетки крови извлечены.
   3) Полностью ресуспензируйте клетки, несколько раз перемешав пастеровской пипеткой.
   4) Определите концентрацию клеток, используя счётчик клеток или гемацитометр.
   5) Доведите разбавителем концентрацию клеток до 10 x 10^3 клеток/µL.

2. Для каждой пробы промаркируйте тест-пробирки 12 x 75 mm, одну под моноклональные антитела и другую под изотипический контроль. Добавьте в соответственно промаркированную тест-пробирку 10 µL of CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 или CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5.
3. Добавьте в каждую тест-пробирку по 100 µL пробы венозной крови. Следует избегать загрязнения края или стенок тест-пробирок кровью, потому что это может привести к неполному лизису.
4. Аккуратно смешайте, пользуясь вихревым смесителем. Инкубируйте реакционные смеси при 20-25°C в течение 10-12 минут.

ВАЖНО: Если капли реагента остаются у края тест-пробирки, их следует удалить, иначе нелизированные красные кровяные клетки могут загрязнить образец и исказить результаты. Для их удаления можно использовать ватную палочку.

5. Лизируйте красные кровяные клетки в каждой из тест-пробирок, следуя рекомендуемой для выбранного метода лизиса процедуре (система реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, система реагентов COULTER MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или система реагентов COULTER TQ-Prep/IMMUNOPREP).
6. Анализируйте клетки на проточном цитометре, приспособленном для анализа многоцветной флуоресценции, правильно выровненном и использующем селектор лимфоцитов в соответствии с приведённой ниже ПРОЦЕДУРОЙ АНАЛИЗА ПРОБ. Для минимизации вероятности получения неоптимальных результатов анализировать меченые клетки следует быстро.
   a. Результаты флуоресцентной проточной цитометрии должны быть нанесены на логарифмическую шкалу.
   b. Значения бокового рассеяния должны быть нанесены на линейную шкалу.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДЛЯ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизирован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции в соответствии с рекомендациями производителя (за ними обратитесь к руководствам по приборам).

Флуорохромы изотиоцианат флуоросцеина (FITC), фикоэритрин (RD1) и фикоэритрин-Cy5 (PC5) излучают на разных длинах волн, но всё же частично их спектральные диапазоны перекрывают друг друга, что следует откорректировать с помощью электронной компенсации. Оптимальные уровни компенсации можно установить, проанализировав на двухпараметрической диаграмме донорские клетки, по отдельности помеченные каждым флуорохромом. В качестве альтернативы можно пометить клетки CYTO-COMP соответствующими комбинациями флуорохромов из комплекта реагентов CYTO-COMP. В обоих случаях проводится регулировка для того, чтобы гарантировать отсутствие мечения в двухцветном квадранте (квадрант 2) для каждого из флуорохромов. Помеченные CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 COULTER CYTO-TROL Control Cells могут быть использованы для проверки установок компенсации.

Перед тем, как проводить анализ проб, следует пометить контрольные пробы (например, COULTER CYTO-TROL Control Cells) для проверки реактивности антител.

Специфическое и/или неспецифическое связывание Fc-фрагмента антител с моноцитами и гранулоцитами пробы можно исключить с помощью правильной настройки селектора лимфоцитов на проточном цитометре.[39] Лимфоциты определяются как обладающие яркой CD45+ флуоресценцией и низким боковым рассеянием.[40]

Изотипический контроль CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 используется для определения положения курсора для учёта неспецифического связывания Fc–фрагмента с лимфоцитами пробы. Курсоры располагаются так, чтобы включить 98% (номинально) неспецифической флуоресценции в 3 квадрант. Неспецифическая флуоресценция в квадрантах 1, 2 и 4 для любой контрольной пробы обычно ограничивается 2 или менее процентами у здоровых представителей (если это значение казывается выше 2%, результаты теста могут быть ошибочными). В случае неопластических заболеваний могут быть получены более высокие значения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ПРОБ

ВНИМАНИЕ: Если лазер на проточном цитометре неверно выровнен или вставлены несоответствующие фильтры или неправильно настроены селекторы, результаты могут оказаться ошибочными.

1. Составьте двухпараметрическую гистограмму CD45-FITC (FL1 LOG) к SS(боковому рассеянию) (90°наименее значимого значения). Может быть получен трёхчастный перепад. Нарисуйте селектор вокруг лимфоцитов, обладающих яркой CD45+ FITC флуоресценцией и низким боковым рассеянием (SS) (см. Рисунок 1).
2. Для изотипического контроля составьте двухпараметрическую гистограмму с использованием селектора лимфоцитов MsIgG1-RD1 (FL2 LOG) и MsIgG1-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) (см. Рисунок 2). Выставьте Quad Stats для определения 98% (номинально) неспецифического мечения, используя изотипический контроль.
3. Для анализа проб, используйте установленные на изотипическом контроле Quad Stats и составьте, используя CD4-RD1 (FL2 LOG) и CD3-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG), двухпараметрическую гистограмму с использованием селектора лимфоцитов (см. Рисунок 3).

Следующие гистограммы являются примерами нормальных проб цельной крови, окрашенных CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 и CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5, лизированных с помощью системы реагентов MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP и проанализированных на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL (4 сенсора флуоресценции) с использованием селектора лимфоцитов. Quad Stats были выставлены для определения 98% (номинально) неспецифического мечения с использованием изотипического контроля.

На Рисунке 3 общий процент CD3 положительных клеток вычислен суммированием значений 2 и 4 квадрантов. Общий процент CD4 положительных клеток вычислен суммированием значений 1 и 2 квадрантов. Процент CD3+/CD4+ положительных клеток получен прямо из квадранта 2.

Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма CD45-FITC (FL1 LOG) к SS для идентификации лимфоцитов (Селектор A).

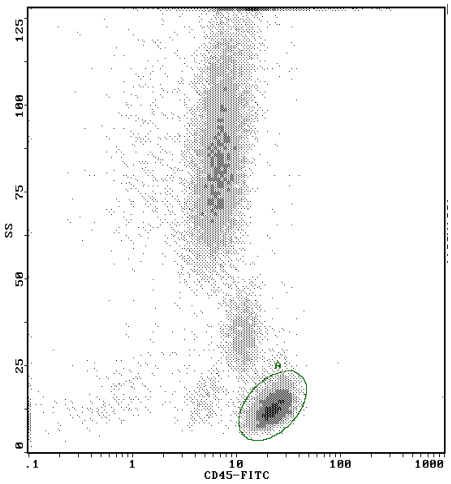


Рисунок 2. Двухпараметрическая гистограмма MsIgG1-PC5 (FL4 LOG) к MsIgG1-RD1 (FL2 LOG) с использованием селектора лимфоцитов (Селектор A) для установления Quad Stats.

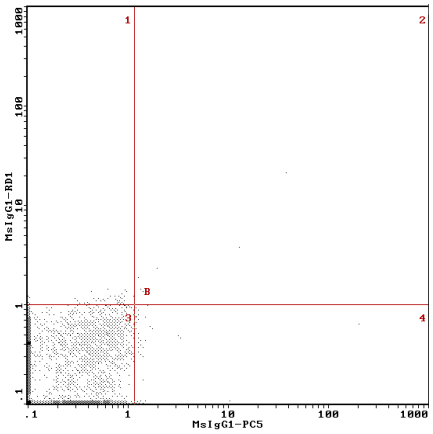
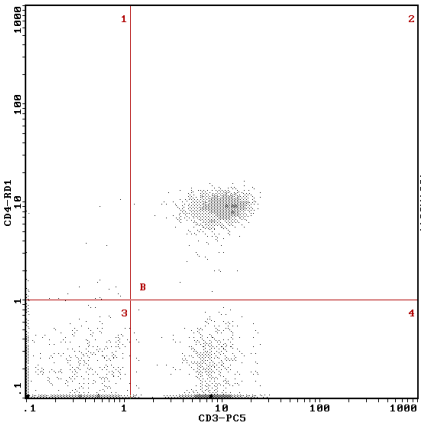


Рисунок 3. Двухпараметрическая гистограмма CD3-PC5 (FL4 LOG) к CD4-RD1 (FL2 LOG) с использованием селектора лимфоцитов (Селектор A).



АБСОЛЮТНОЕ КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК

Абсолютное количество клеток может быть установлено двумя способами. Стандартный (непрямой) метод для вычисления абсолютного количества клеток сочетает результаты гематологии и проточной цитометрии и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/мкл) = Общее число белых клеток крови (клеток/мкл) x % лимфоцитов x % положительно-окрашенных клеток ÷ 10^4

Прямой метод Flow-Count использует флуоросферы Flow-Count для прямого определения абсолютного количества и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/мкл) = (Общее число клеток-мишеней ÷ общее число подсчитанных флуоросфер Flow-Count) x аналитическая концентрация флуоросфер Flow-Count

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для достижения оптимальных результатов следует окрашивать образцы в течение 6 часов после их отбора. Отберите образцы при комнатной температуре в пробирки для забора крови перед мечением и анализированием. Не охлаждайте. Охлаждённые образцы могут дать аномальные результаты.
2. Для минимизации вероятности получения неоптимальных результатов анализировать меченые клетки следует быстро.
3. Рекомендуемая жизнеспособность клеток – ≥90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.
4. Продолжительное воздействие агентов лизиса на клетки может привести к разрушению белых клеток крови и потери клеток популяции-мишени.
5. Часть красных клеткок крови может не пройти лизис в следующих случаях: наличие ядросодержащих красных клеток крови, аномальных концентраций белков или при гемоглобинопатиях. Это может привести к ошибочно заниженным результатам из-за учёта нелизированных красных клеток крови как лейкоцитов.
6. Этот реагент создан для использования с препаратами цельной крови. Он может быть использован с лиофилизированным препаратом лимфоцитов COULTER CYTO-TROL Control Cells. Не рекомендуется использовать со свежими или замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
7. Этот реагент не следует разбавлять, разводить на аликвоты или замораживать. Использовать в соответствии с упаковкой.
8. Этот реагент предназначен только для использования в проточной цитометрии.
9. Аномальные состояния здоровья не всегда представлены аномальными процентами отдельных популяций лейкоцитов. Анализ крови пациента в таком состоянии может давать такое же процентное содержание лейкоцитов, как и у здорового человека. Пользуйтесь результатами теста совместно с клиническими и иными диагностическими данными.
10. Особые проблемы могут возникнуть с отдельными пациентами из-за изменённых или очень низких значений отдельных клеточных популяций.
11. Оценка некоторых пациентов, пролеченных OKT3, с использованием реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 может дать неадекватные результаты.[41-43]
12. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, могут быть ошибочными, если лазер не верно выровнен или неправильно установлены селекторы.
13. Из-за недопустимой вариабельности, выявляемой при сравнении методик различных лабораторий для определения абсолютного количества лимфоцитов, необходимо провести оценку точности используемого метода.[44]

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Пробы цельной крови были собраны у практически здоровых мужчин и женщин. Набранная популяция происходит из разнообразных мест и включает представителей восточных и центрально-западных штатов США, без учёта расы, по возрасту попадающих в пределы 18-85 лет (n = 197: 18-85; n = 3: возраст неизвестен). Клетки были окрашены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5. Значения, полученные с помощью проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов) представляют CD3+, CD4+ и CD3+/CD4+ клетки и даны в последующей таблице. Для каждой пробы были получены подсчёт белых клеток крови и трёхчастный перепад. Абсолютное количество клеток было определено с использованием стандартного (непрямого) метода. Значения, даны в виде % от общего числа лимфоцитов и абсолютного числа (клеток/мкл).

Эти значения предлагаются только в качестве примера. В каждой лаборатории следует установить собственные ожидаемые значения на основе проб от здоровых доноров из местного населения.

	НОРМАЛЬНАЯ ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ			
	n	Мини-мальное	Макси-мальное	Среднее ±1SD
% + Лимфоцитов				
CD3+	200	54	94	74,9 ±6,7
CD4+	200	15	72	48,7 ±9,0
CD3+/CD4+	200	14	72	47,3 ±9,0
Абсолютное количество				
CD3+	200	443	3577	1512 ±523
CD4+	200	145	2644	987 ±385
CD3+/CD4+	200	140	2639	961 ±383

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ:

CD45 экспрессируется на всех гемопоэтических клетках, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.[11,12] Он не был обнаружен в дифференцированных негемопоэтических тканях.[11-14]

CD4 экспрессируется на популяции Т-индукторов периферической крови.[15,16] В небольших количествах он также экспрессируется на некоторых моноцитах.[17]

CD3 в норме экспрессируется на поверхности зрелых тимоцитов и на покоящихся и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови (как в популяциях индукторов, так и супрессоров и цитотоксических клеток).[22-24]

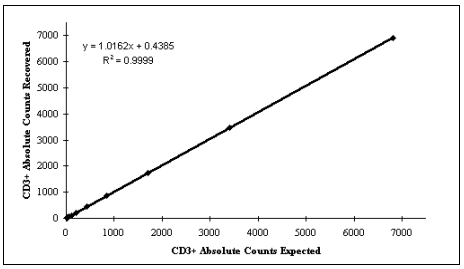
Для оценки перекрестной клеточной реактивности моноклональные антитела CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 были проверены на пробах человеческой крови здоровых взрослых доноров. Результаты единообразно показали, что CD3 и CD4 моноклональные антитела реагируют специфическим образом с соответсвующими популяциями лимфоцитов. Моноциты тускло окрашиваются CD4 моноклональным антителом, содержащимся в реагенте.

За описанием способов контроля специфического и неспецифического мечения моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 обратитесь к ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.

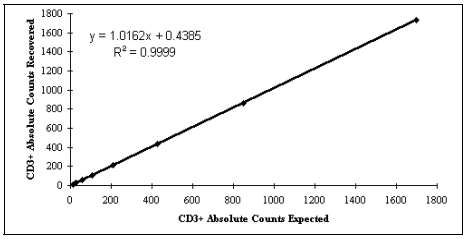
ЛИНЕЙНОСТЬ

Было проведено по три повторных измерения для каждого из десяти разведений концентрированных проб COULTER CYTO-TROL Control Cells (Ч.№ 6604248 - 50 тестов) для установления диапазона концентраций CD3+ и CD4+ лимфоцитов. Клетки были помечены с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 и проанализированы при помощи проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов).
См. приведённые ниже графики.

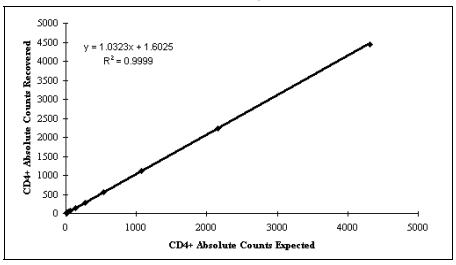
Полный диапазон CD3+ лимфоцитов



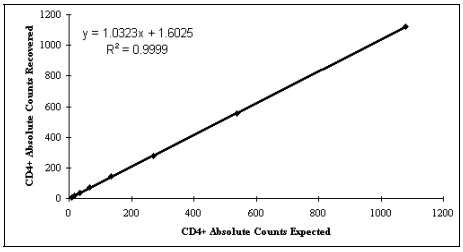
Нижняя граница диапазона CD3+ лимфоцитов, увеличение



Полный диапазон CD4+ лимфоцитов



Нижняя граница диапазона CD4+ лимфоцитов, увеличение



НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

Степень совпадения между CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 и компаративным CYTO-STAT/COULTER CLONE® CD3 (IgG1)-FITC/T4-RD1 была измерена на нормальных и аномальных лизированных пробах цельной крови при помощи проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов). Данные приведены в последующих таблице и рисунках, и подтверждают предположение о том, что реагенты эквивалентны по уровню реактивности зрелым Т-лимфоцитами и Т-индукторами периферической крови. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов. Значения для CD3 (IgG1)-FITC/T4-RD1 были откорректированы для чистоты селектора лимфоцитов (Пределы селектора лимфоцитов: восстановление ≥90% и чистота ≥85%).

CD3+ лимфоциты

		% CD3+ клеток		
Реагенты	**n**	**Мини-мальное**	**Макси-мальное**	**Среднее ±1SD**
CD3 (IgG1)-FITC/T4-RD1	305	6	98	76,2 ±10,0
CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5	305	6	96	75,7 ±9,7

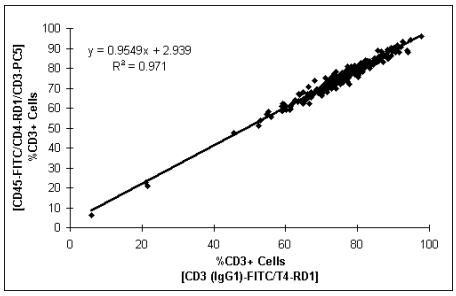
CD4+ лимфоциты

		% CD4+ клеток		
Реагенты	**n**	**Мини-мальное**	**Макси-мальное**	**Среднее ±1SD**
CD3 (IgG1)-FITC/T4-RD1	305	1	74	40,3 ±16,2
CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5	305	1	72	39,6 ±16,2

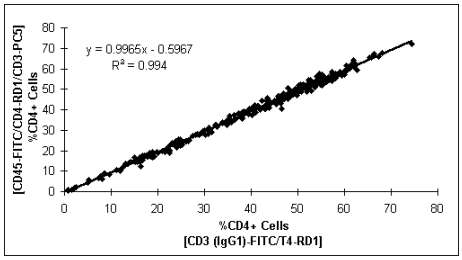
CD3+/CD4+ лимфоциты

		% CD3+/CD4+ клеток		
Реагенты	**n**	**Мини мальное**	**Макси-мальное**	**Среднее ±1 SD**
CD3 (IgG1)-FITC/T4-RD1	305	0	74	38,8 ±16,3
CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5	305	0	72	38,2 ±16,1

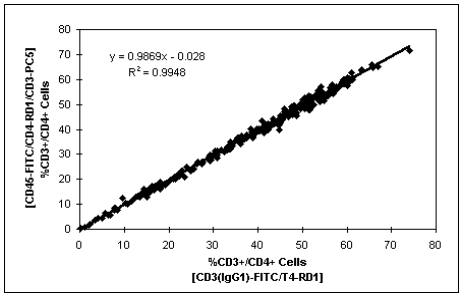
Анализ регрессии: CD3+ лимфоциты



Анализ регрессии: CD4+ лимфоциты



Анализ регрессии: CD3+/CD4+ лимфоциты



ТОЧНОСТЬ

Сходимость (внутрилабораторная)

Было проведено по десять повторных измерений для каждого из трёх уровней концентраций CD3+ и CD4+ лимфоцитов на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL. Были проведены снижения числа клеток образцов нормальной цельной крови с помощью ферромагнитных частиц, связанных с моноклональными антителами для создания различных уровней значений. Клетки были помечены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов.

Концен-трация	n	CD3+	Средний %±1 SD	%CV	CD4+	Средний %±1 SD	%CV
1	10	47,9	0,46	0,97	18,6	1,07	5,78
2	10	72,0	0,85	1,18	50,0	0,69	1,39
3	10	83,4	0,66	0,79	67,4	0,67	0,99

Межлабораторная сходимость

Исследования были проведены в один день тремя различными лабораториями Coulter Corporation на трёх разных проточных цитометрах. На каждом приборе было проведено по десять повторных измерений. Во всех измерениях использовался один образец от одного здорового донора. Образец крови был разделён на три и в каждой лаборатории свой образец был окрашен реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ CD4-RD1/CD3-PC5. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов.

Лаборатория/ Прибор	n	Средний % CD3+	±1 SD	%CV	Средний % CD4+	±1 SD	%CV
1 EPICS XL-MCL	10	69,8	0,90	1,29	52,2	0,62	1,18
2 EPICS XL-MCL	10	71,5	0,73	1,02	52,5	0,41	0,78
3 EPICS XL-MCL	10	70,9	0,29	0,40	52,8	0,42	0,90

ИЗБРАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. Leukocyte Typing V. 1995. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 262, 263, 268, 270.
2. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. Leukocyte Typing. 1984. Springer-Verlag, New York; pp. 28, 41-42, 44, 196.
3. McMichael AJ, ed. 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 202, 206, 302-308, 315, 475, 796-801.
4. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
5. Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland S, Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J. 1975. Identification, enumeration and isolation of Band T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3:584-597
6. Foon KA and Todd RF. 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68:1-31.
7. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J. 1988. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut 57: 327-339.
8. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID. 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag Vol 2: pp. 8, 15-25, 37.
9. Newman W, Targan SR and Fast LD. 1984. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. Mol Imm 21:1113-1121.
10. Fabre JW and Williams AF. 1977. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterisation of the major antigen recognised. Transplantation 23:349-359.
11. Coffman RL and Weissman IL. 1981. B220: A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. Nature 289:681-683.
12. Dalchau R and Fabre JW. 1980. Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen. J Exp Med 153:753-765.
13. Omary MB, Trowbridge IS and Battifora HA. 1980. Human homologue of murine T200 glycoprotein. J Exp Med 152:842-852.
14. Dalchau R, Kirkley J and Fabre JW. 1981. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. Eur J Immunol 10:737-744.
15. Reinherz EL, Meuer SC and Schlossman SF. 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunol Today 4:5-8.
16. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA, Hussey RE, Daley JF and Schlossman SF. 1982. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol 128:463-468.
17. de Martini RM and Parker JW. 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3:56-70.
18. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR and Schlossman SF. 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 134:1508-1515.
19. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Brown HM and Schlossman SF. 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunol 16:198-204.

20. Meuer SC, Schlossman SF and Reinherz EL. 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. Proc Natl Acad Sci USA 79:4395-4399.
21. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Somoza C, Williams AF eds. 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book. Academic Press: London, pp.106-109.
22. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
23. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30:735-743.
24. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature 303:808-810.
25. Benjamini E and Leskowitz S. Immunology: A Short Course. Second Edition. 1991. New York: Wiley-Liss, pp. 211-244.
26. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125:1269-1274.
27. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS. 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152:198-203.
28. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40:472-477.
29. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. 1982. New York, NY: Academic Press, pp. 39-70.
30. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74:2203-2211.
31. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 74:1152-1158.
32. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47:465-471.
33. Fauci AS. 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239:617-622.
34. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV. 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2:114-124.
35. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, and Berstein ID. eds. 1986. Leukocyte Typing II, Volume I. New York, NY: Springer-Verlag, p. 8.
36. Reinherz EL, Kung, PC, Goldstein G and Schlossman SF.1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 123:1312-1317.
37. Beverley PCL and Callard RE. 1981. Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. Eur J Immunol 11:329-334.
38. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard. 1991. NCCLS Document H3-A3.
39. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 11:453-459.
40. Nicholson JKA, Hubbard M and Jones BM. 1996. Use of CD45 fluorescence and side scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 26:16-21.
41. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA. 1989. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. Transplantation Proceedings 1:1745-1746.
42. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissensen GW, Karjalainen K and De Le Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In Leukocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H and Kr. von dem Borne AEG, eds. 1989. Oxford: Oxford University Press, pp. 295-296.
43. Schroeder TI and Chatenoud L: Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons.
44. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
REF 6607015 - 50 тестов (0,5 mL)

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Логотип BECKMAN COULTER, COULTER, COULTER CLONE, CYTO-COMP, CYTO-STAT, CYTO-TROL, EPICS, Flow-Count, IMMUNOPREP, MULTI-Q-PREP, Q-PREP, TQ-Prep, triCHROME, XL, и XL-MCL являются товарными знаками Beckman Coulter, Inc.

RD1 продаётся по патентной лицензии 4,520,110.
PC5 продаётся по патентным лицензиям 4,520,110 и 4,542,104.
Cy5 продаётся по патентным лицензиям 4,981,977 и 5,268,486.

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-526-7694 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821
www.beckmancoulter.com

EC REP

Beckman Coulter Ireland Inc.
Mervue Business Park,
Mervue, Galway,
Ireland (353 91 774068)

Printed in USA
Made in USA

© 2010 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.