



CD45

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD45.

Форма	Номер по каталогу
FITC	345808
PerCP	345809
PerCP-Cy5.5	332784
APC	340910
APC-Cy7	348815
APC-H7	641417
V500-C	655873

10/2012

23-13678-04



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2012



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Dr.
San Jose, CA 95131 USA
Тел.: 877-232-8995
Факс: 408-954-2347
ClinicalApplications@bd.com



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

BD Biosciences
Служба поддержки пользователей в Европе
Тел.: 32-2-400-98-95
Факс: 32-2-401-70-94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD45 предназначен для диагностической идентификации in vitro (IVD) клеток, экспрессирующих антиген CD45, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым ПО (таким как клиническое ПО BD CellQuest™, BD CellQuest™ Pro, BD FACSDiva™ или BD FACSCanto™) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя цитометра.

Приложения

Экспрессия антигена CD45 в исследовании гематологической неоплазии.¹⁻⁶

2. СОСТАВ

CD45, клон 2D1, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных одноядерными клетками периферической крови человека (PBMC). CD45 состоит из тяжелых цепей мышиного IgG₁ и легких каппа-цепей.

Все ниже перечисленные реагенты поставляются в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS), рецептура которого описана в табл. 1.

Табл. 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	100 мкг в 2,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	50
PerCP	50 мкг в 2,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	25
PerCP-Cy™5.5 ^b	6 мкг в 1,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	6

Табл. 1 Концентрации во флаконах (Продолжение)

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
APC	12,5 мкг в 0,5 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	25
APC-Cy7 ^{™c}	50 мкг в 0,5 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	100
APC-H7	50 мкг в 0,5 мл PBS с BSA и ProClin ^{®d}	100
BD Horizon [™] V500-C	50 мкг в 0,5 мл PBS с BSA и ProClin	100

a. Конц. = концентрация

b. Cy[™] — это товарный знак компании Amersham Biosciences Corp. Этот продукт является предметом проприетарных прав Amersham Biosciences Corp. и Университета Carnegie Mellon и изготавливается и продается по лицензии Amersham Biosciences Corp. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

c. Патенты — APC-Cy7: US 5 714 386

d. ProClin является зарегистрированным товарным знаком компании Rohm and Haas Company.

Полный список химических предупреждений см. в Паспорте безопасности (SDS).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Азид натрия представляет опасность при проглатывании (R22). Не вдыхайте газы, дым, испарения или брызги (S23). Пользуйтесь соответствующей защитной спецодеждой (S36). Этот материал и соответствующий контейнер следует утилизировать как опасные отходы (S60).

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤ 5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

- PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, APC-Cy7, APC-H7, V500-C: ≤ 20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите флаконы с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые полистироловые пробирки 12 x 75 мм с крышками
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Центрифуга
- BD FACST[™] лизирующий раствор (10X) (Номер по каталогу 349202).
Инструкции по разбавлению и технике безопасности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Раствор BD CellWASH[™] (Номер по каталогу 349524) или промывочный буфер (PBS), содержащий 0,1 % азида натрия
- Буферный раствор для окрашивания, состоящий из PBS с 0,2 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0,1 % азида натрия

- Раствор BD CellFIX™ (Номер по каталогу 340181) или 1 %-ный раствор параформальдегида (PFA) в PBS с 0,1 % азида натрия

Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.

- Стабилизирующий фиксатив BD™ Stabilizing Fixative (3-кратно концентрированный) (Номер по каталогу BD 339860)

Инструкции по разбавлению и технике безопасности см. в руководстве по использованию реагентов

- Гранулы BD Calibrite™ Beads

Подробные сведения см. на сайте bdbiosciences.com.

- 7-цветные настроечные гранулы BD FACSTM Beads (Номер по каталогу 335775)

- Гранулы BD™ Multicolor CompBeads (Номер по каталогу 644204)

- Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads (Номера по каталогу 656046 и 656047)

- Проточный цитометр BD FACS

Подробности см. в руководстве пользователя цитометра.

5. КЛИНИЧЕСКИЙ ОБРАЗЕЦ

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты, биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа.^{6,7}

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Было предложено вводить поправки при, по меньшей мере, 80 % жизнеспособных клеток.⁶

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{8,9} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, перчатки, средства защиты лица или глаз.

6. МЕТОДИКА

Окрашивание образцов

1. К 100 мкл цельной крови в полистироловой пробирке 12 x 75 мм с крышкой добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD45.

Относительно объема см. соответствующую маркировку флакона.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).

3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS в каждую пробирку.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте пробирки при 300g в течение 5 минут.
6. Отделите супернатант аспирацией.
7. Добавьте 2 мл буфера в каждую пробирку в соответствии с используемым флуорохромом (табл. 2). «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой буфер.

Табл. 2 Рекомендуемый буфер

Флуорохром	Буфер окрашивания	BD CellWASH
FITC	Да	Да
PerCP	Не проверялось	Да
PerCP-Cy5.5	Да	Да
APC	Да	Да
APC-Cy7	Не проверялось	Да
APC-H7	Да	Да
V500-C	Не проверялось	Да

8. Центрифугируйте пробирки при 300g в течение 5 минут.
9. Отделите супернатант аспирацией.
10. Добавьте 0,5 мл буфера в каждую пробирку согласно табл. 2 и немедленно проанализируйте образцы или добавьте фиксатив согласно табл. 3.

Добавление фиксатива

1. Добавьте 0,5 мл фиксатива согласно табл. 3. «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой фиксатив.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Для многоцветного анализа с применением PE-конъюгата используйте BD CellFIX или 1 %-ный раствор PFA.

Табл. 3 Совместимый фиксатив

Флуорохром	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентрированный стабилизирующий фиксатив BD Stabilizing Fixative
FITC	Да	Нет
PerCP	Да	Нет
PerCP-Cy5.5	Да	Нет
APC	Да	Нет
APC-Cy7	Да	Да
APC-H7	Да	Да
V500-C	Да	Нет

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе».
3. Инкубируйте пробирки при 2–8 °C в темноте согласно табл. 4.

Табл. 4 Рекомендуемая процедура инкубации

	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентрированный стабилизирующий фиксатив BD Stabilizing Fixative
Период инкубации	60 минут	30 минут
Дополнительные этапы	<ol style="list-style-type: none"> 1. Центрифугируйте пробирки при 300g в течение 5 минут. 2. Отделите супернатант аспирацией. 3. В каждую пробирку добавьте 0,5 мл буфера окрашивания и аккуратно перемешайте на «вортексе». 	Нет

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ Некоторые конъюгаты APC-Cy7 и в меньшей степени — конъюгаты APC-H7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии PFA.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ Не храните PE-конъюгаты в стабилизирующем фиксативе BD, так как это может вызвать уменьшение интенсивности окрашивания.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ Длительно е воздействие PFA на клетки может привести к повышенной автофлуоресценции в фиолетовых каналах. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без PFA после 1-часовой фиксации.

4. Тщательно перемешайте содержимое пробирок перед анализом.

До анализа храните пробирки при 2–8 °С. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

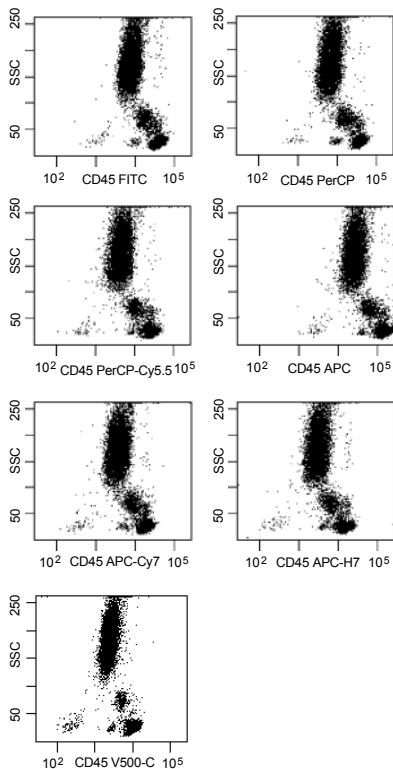
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр¹⁰. Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Перед сбором образцов отрегулируйте пороговое значение для максимального исключения клеточных обломков и убедитесь, что интересующие вас популяции включены. На Рис. 1 отображены репрезентативные данные, полученные на лейкоцитах периферической крови. Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 405 нм, 488 нм и 635 нм.

Рис. 1 Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Настройка цитометра зависит от используемого флуорохрома и типа цитометра. Данные о методах настройки, пригодных для цитометра и специфически меченого флуорохрома, см. в табл. 5. Методы настройки приведены после табл. 5.

Табл. 5 Метод настройки, рекомендуемый для сочетаний цитометра и флуорохрома

Флуорохром	BD FACS Canto II	BD FACS Canto	BD FACS Calibur
FITC	1, 2, 4	2	3
PerCP	2	2	3
PerCP-Cy5.5	1, 2, 4	2	3
APC	1, 2, 4	2	3
APC-Cy7	2, 4	2	Н/Д
APC-H7	1, 4	2	Н/Д
V500-C	4	Н/Д	Н/Д

Метод настройки 1

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-H7:

1. Используйте 7-цветные гранулы BD FACS Beads для настройки и клиническое программное обеспечение BD FACSCanto для установки значений напряжения трубки фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) и для проверки чувствительности цитометра.
2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva версии 7.0.
 Подробнее см. *Справочное руководство по программному обеспечению BD FACSDiva™ версии 7.0.*
3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ.

При этом название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**. Несовпадающие параметры будут удалены.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ Если выбрать **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), напряжение ФЭУ для APC-Cy7 не будет связано с параметрами приложения лизирования с отмывкой и текущие настройки напряжения ФЭУ и название параметра не изменятся.

4. Запишите значение напряжения ФЭУ для параметра APC-Cy7, отмените связь с параметрами приложения лизирования с отмывкой и измените метку параметра APC-Cy7 на APC-H7.
5. Введите значение напряжения ФЭУ для APC-Cy7, записанное для параметра APC-H7.
6. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и программное обеспечение BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство по эксплуатации *BD™ Multicolor CompBeads*.

Метод настройки 2

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-Cy7:

1. Используйте 7-цветные гранулы BD FACS Beads для настройки и клиническое программное обеспечение BD FACSCanto для установки напряжения и компенсации флуоресценции ФЭУ, а также для проверки чувствительности цитометра.
2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva.

3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для всех параметров. Несовпадающие параметры будут удалены.

ПРИМЕЧАНИЕ В случае использования лазерной конфигурации 4-2H-2V (конфигурации BD по умолчанию), при выборе **Overwrite** (Перезаписать) название параметра изменится с APC-H7 на APC-Cy7.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ При выборе **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра) связаны будут только настройки для параметров, совпадающие с приложением лизирования с отмывкой. При использовании лазерной конфигурации 4-2H-2V и выборе **Apply** (Применить), значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для APC-Cy7 связаны не будут. Название параметра останется **APC-H7**.

Метод настройки 3

Используйте гранулы BD Calibrite Beads и программное обеспечение BD FACSComp™ для установки значений напряжения и компенсации флуоресценции ФЭУ, а также для проверки чувствительности цитометра.

Метод настройки 4

Рекомендуется при использовании 8-цветного сочетания реактивов, которое включает фиолетовые флуорохромы:

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads и программное обеспечение BD FACSDiva версии 7.0 для настройки значений напряжения ФЭУ. Подробнее см. руководство по эксплуатации BD FACSDiva CS&T IVD Beads.
2. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и программное обеспечение BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство пользователя цитометра и руководства по эксплуатации.

Мы рекомендуем ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек цитометра и для проверки системы управления качеством.¹¹

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Реагент CD45 распознает антиген лейкоцитов человека с молекулярной массой от 180 до 220 килодальтон (кДа), являющийся представителем семейства T200.¹²

Антиген CD45 присутствует на всех человеческих лейкоцитах, в т. ч. на лимфоцитах, моноцитах, гранулоцитах, эозинофилах и базофилах периферической крови, и играет роль в сигнальной трансдукции, изменяя сигналы молекул с других поверхностей¹². Антитело CD45 обладает низкой способностью к реакции со зрелыми циркулирующими эритроцитами и тромбоцитами^{12,13}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как максимальная интенсивность окрашивания популяции CD45⁺. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Медианная интенсивность флуоресценции (MFI) CD45⁺ определялась для каждого образца и усреднялась по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при обнаружении клеток CD45⁺. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD45 был представлен на рассмотрение на Четвертом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека. Участвовавшие лаборатории оценивали клон 2D1 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся результаты.¹²

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. Разные образцы, использованные при оценке, дали среднее значение медианной интенсивности флуоресценции (MFI), как показано в табл. 6. Для каждого образца две разных партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Табл. 6 Повторяемость средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD45⁺ лейкоцитов по различным лотам и по многим донорам^a (N)

Флуорохром	N ^b	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный % CV
FITC	20	786,4	95,88	12,19
PerCP ^c	58	606,9	59,00	9,72
PerCP ^d	58	348,9	34,31	9,83
PerCP ^e	57	109,2	10,26	9,39
PerCP-Cy5.5	3	2 900,5	182,93	6,31
APC	3	6 171,8	96,13	1,56
APC-Cy7 ^c	3	1 508,33	122,18	8,10
APC-Cy7 ^d	3	729,83	65,38	8,96
APC-Cy7 ^e	3	238,83	21,20	8,88
APC-H7 ^f	64	12 211,5	91,091	0,89
V500-C ^f	64	10 070,52	46,6	0,5

- a. За исключением APC-H7 и V500-C, которые тестировались с одиночной партией BD™ Multi-Check.
 b. N = количество образцов
 c. Лимфоциты
 d. Моноциты
 e. Гранулоциты
 f. Данные собраны как медианная интенсивность флуоресценции.

Погрешность

Данные погрешности собирали на проточных цитометрах BD FACScan™ и BD FACSCalibur™, используя ПО BD CellQuest версии v3.1 или старше для определения лимфоцитов CD45⁺, моноцитов CD45⁺ и гранулоцитов CD45⁺. Результаты по реактиву CD45 PerCP сравнивали с результатами по реактиву CD45 FITC. См. табл. 7.

Табл. 7 Регрессионный анализ по реактиву CD45 PerCP относительно реактива CD45 FITC

Fluor ^a	N ^b	r	Козфициент	Свободный член	Диапазон (%)
CD45 ^c	64	0,99	1,02	-0,51	14,9–61,3
CD45 ^d	64	0,98	0,96	0,19	3,2–23,2
CD45 ^e	64	0,98	0,99	0,77	13,9–78,2

- a. Fluor = Флуорохром
 b. N = количество образцов
 c. Лимфоциты
 d. Моноциты
 e. Гранулоциты

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP и V500-C). Когда популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.
- Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.
- Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Очень рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реактивов.⁷

- Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.
- Данные по эффективности реагентов в основном были собраны с использованием крови, обработанной EDTA. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии патентной чистоты. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки прибора, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность цитометра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krasinskas AM, Wasik MA, Kamoun M, Schretzenmair R, Moore J, Salhany K. The usefulness of CD64, other monocyte-associated antigens, and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation. *Am J Clin Pathol*. 1998;110:797-805.
2. Borowitz MJ, Shuster J, Carroll AJ, et al. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1997;89:3960-3966.
3. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*. 1993;100:534-540.
4. Lacombe F, Durrieu F, Briais A, et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997;11:1878-1886.
5. Stewart CC, Behm FG, Carey JL, et al. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: selection of antibody combinations. *Cytometry*. 1997;30:231-235.
6. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
7. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
8. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections—Third Edition; Approved Guideline*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. M29-A3.
9. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
10. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
11. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes: Approved Guideline*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. H42-A2.
12. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
13. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:43-55.