

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

WS

中华人民共和国卫生行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

代替 WS/T 360

流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南

Guidelines for peripheral lymphocyte subsets by flow cytometry

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准代替WS/T360-2011《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》，与WS/T360-2011相比，主要技术内容变化如下：

- a) 增加了流式细胞术检测淋巴细胞亚群的6色分析方案；
- b) 增加了流式细胞仪性能评估内容；
- c) 完善了仪器质量控制，仪器性能评估和项目性能评估的指标和质量目标；
- d) 梳理了分析前、分析中、分析后的内容及要求；
- e) 增加了自动样本制备内容；
- f) 补充了结果审核内容。

本标准起草单位：中国医学科学院肿瘤医院、北京医院/国家卫生健康委临床检验中心、北京大学第一医院、中国医学科学院北京协和医院、上海市第一人民医院、上海交通大学医学院附属新华医院、上海长征医院、苏州大学附属第一医院/江苏省血液研究所。

本标准主要起草人：崔巍、彭明婷、屈晨雪、黄春梅、李莉、沈立松、周琳、朱明清、崔婵娟、李臣宾。

流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南

1 范围

本标准规定了流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群（T淋巴细胞、B淋巴细胞、NK淋巴细胞、CD4+T淋巴细胞和CD8+T淋巴细胞）的技术要求。

本标准适用于开展流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群的机构。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞分化抗原 cluster of differentiation, CD

不同谱系白细胞在分化、发育、活化过程中，出现或消失的细胞表面标志。细胞表面标志通常采用对应的单克隆抗体来识别。被命名的抗体有指定的CD编号，被特定抗体识别的特定抗原通常具有相同的编号。例如，被“抗CD1抗体”识别的抗原称为“CD1抗原”。

3.2

前向散射光 forward scatter, FSC

光学检测器在入射光的正前方所收集的低角度散射光信号，与细胞或颗粒的大小和体积有关。

3.3

侧向散射光 side scatter, SSC

光学检测器在入射光的直角处所收集的细胞散射的光信号，与细胞或颗粒的内部及表面结构复杂程度有关，如细胞质颗粒性、膜不规则性及核形等。

3.4

光电倍增管 photomultiplier tube, PMT

一种将检测到的光信号转化为电信号及电信号倍增的装置。PMT的电压设置越低，光信号转化时电子信号增强的倍数越小，得到的电子信号就越弱；反之，PMT的电压设置越高，增强的倍数就越大，得到的电子信号就越强。

3.5

设门 gate

在流式细胞仪显示的象限图上基于一组参数（如荧光对SSC，FSC对SSC等）来确定的所要分析的目的细胞群，对限定区域内的目的细胞群通过其他参数（如荧光参数）进一步分析其表达情况。

3.6

荧光强度 fluorescence intensity

结合到细胞或颗粒上的荧光素多与少的量化指标。在恰当的条件下，荧光强度与一个细胞或颗粒和特定荧光素相结合的位点数相关。即细胞或颗粒结合的荧光素越强意味着目标标记分子的数量越多，反之越少。荧光强度越强则荧光信号的通道数也越大，反之越小。荧光强度常通过平均荧光强度（mean fluorescence intensity, MFI）值的大小来表示。MFI有算术平均值（Arithmetic mean）、几何平均（Geometric Mean）和中位数（Median）3种计算方式。一般情况下，宜首选中位数评价平均荧光强度。

3.7

染色指数 staining index, SI

量化评估阳性与阴性细胞群的分离程度的指标。通过阳性细胞群平均荧光强度（MFI）与阴性细胞群MFI的差，除以阴性细胞群MFI测定数据的2倍标准差数值计算而来 $[SI = (MFI_{阳性群} - MFI_{阴性群}) / 2 \times SD_{阴性细胞群MFI}]$ ，用于比较不同荧光染料在流式细胞术应用中荧光强度的差异。染色指数越大，荧光强度越高。进行抗体滴度时需根据染色指数来确定最适合的抗体用量。

3.8

荧光补偿 fluorescence compensation

由于一种荧光素发射的荧光叠加到其他荧光素发射的波长范围内而造成荧光信号重叠，通过在其他荧光信号中扣除已测定荧光信号的一部分而纠正颜色重叠造成的计数错误。扣除的荧光量是用恰当的单染对照来确定的，被校正的信号反映了单荧光信号的发射情况。

3.9

荧光微球 fluorescent beads

一种表面结合特定荧光染料或内部包含一种或多种荧光染料用于流式细胞检测的人造微球颗粒。常用的荧光微球包括以下3种：1) 校准微球：分为2种，第一种为与染色细胞大小和荧光强度相似的微球，用于检查每个荧光通道的线性、灵敏度和检测水平。第二种为大小一致，荧光强度与染色细胞相似且荧光强度稳定的微球，用于检测通道（如PMT）电压设置。2) 标准微球/荧光补偿微球：大小一致，荧光强度与染色细胞相似的微球，用于荧光补偿设置。3) 细胞定量绝对计数微球：已知数量的荧光微球，与单细胞悬液在同一管中进行检测，以准确获得细胞绝对计数。

3.10

相对细胞计数 relative cell counts

计算靶细胞群中目的细胞亚群数量的一种方法，计数结果以目的细胞亚群数量占靶细胞群细胞数量的百分比（%）来表示。

3.11

绝对细胞计数 absolute cell counts

计算靶细胞群中目的细胞亚群数量的一种方法，计数结果以每微升样品中目的细胞亚群的实际个数（个/ μL ）来表示。

3.12

单平台方法 single-platform method

用于流式细胞术测定细胞绝对数量的一种方法，结果由流式细胞仪直接测定完成，无须使用第二种仪器测定。

单平台法可通过流式细胞仪检测的目的细胞数和绝对计数微球的定量粒子数直接获得细胞群的绝对计数，也可通过测定进样体积进行绝对计数。

3.13

双平台方法 dual-platform method

用于测定细胞绝对数量的一种方法。结果来源于流式细胞仪和另一种仪器的检测，另一种仪器通常是血细胞分析仪。采用流式细胞仪获取靶细胞群中目的细胞亚群的比例（如淋巴细胞中 CD4^+ T细胞的比例），靶细胞群通常是淋巴细胞群或白细胞群。采用血细胞分析仪测定同一样品中靶细胞群的绝对浓度（如淋巴细胞绝对值）。这两个检测结果相乘所得即为目的细胞群的绝对数量（如 CD4^+ T细胞绝对计数）。该方法包含两个检测体系，误差偏大。

4 试剂和检测系统的选择

4.1 荧光素标记的单克隆抗体

宜选择荧光素直接标记的单克隆抗体，同时考虑所选抗体对细胞的反应性。单克隆抗体宜选择CD45、CD3、CD4、CD8、CD19、CD16、CD56。淋巴细胞亚群临床检测试剂，应是符合医疗器械注册要求的产品。

4.1.1 单克隆抗体的细胞抗原识别

CD45为白细胞共同抗原，主要表达于成熟白细胞；CD3为T淋巴细胞共同抗原，主要表达于成熟T淋巴细胞；CD4表达于T辅助性/诱导性淋巴细胞(CD4⁺T细胞)和单核细胞等；CD8表达于细胞毒性T细胞(CD8⁺T细胞)和NK细胞等；CD19通常表达于B淋巴细胞；CD16表达于NK细胞、粒细胞、单核/树突状细胞等；CD56表达于NK细胞和细胞毒性T细胞等。

4.1.2 淋巴细胞亚群的鉴定抗体

CD4、CD8、CD16和CD56单克隆抗体均不能专一标记淋巴细胞某一亚群，应采用联合CD45、CD3和多种抗体组合共同标记来鉴定淋巴细胞亚群。采用CD45作为设门抗体，兼做质控试剂。CD45联合SSC设门圈取淋巴细胞，尽可能排除其他细胞或颗粒干扰，门内淋巴细胞的纯度应 $\geq 95\%$ 。CD3⁺T细胞标记为CD3⁺，CD4⁺T细胞标记为CD3⁺CD4⁺，CD8⁺T细胞标记为CD3⁺CD8⁺，B细胞标记为CD3⁻CD19⁺，NK细胞标记为CD3⁻CD56⁺或CD3⁻CD(16 + 56)⁺。

4.1.3 组合抗体常用荧光染料

联合CD45的四色方案常用荧光染料包括但不限于：异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE/RD1)、藻红蛋白-花青素5(PE-Cy5)或多甲藻叶绿素蛋白(PerCP)、藻红蛋白-德州红偶联物(ECD)或别藻青蛋白(APC)等。除别藻青蛋白(APC)外，其他荧光染料均采用488 nm的激发光源激发，最大发射波长分别为525 nm、575 nm、670 nm、675 nm和613 nm。别藻青蛋白(APC)的激发光源为630 nm，最大发射波长为660 nm。选择联合CD45的四色方案进行淋巴细胞亚群检测时，宜使用但不限于配置有488 nm、可兼具633 nm/640 nm激光器的流式细胞仪。

联合CD45的六色方案常用荧光染料包括但不限于：异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE/RD1)、多甲藻叶绿素蛋白-花青素5.5(PerCP-Cy5.5)、藻红蛋白-花青素7(PE-Cy7)、别藻青蛋白(APC)和别藻青蛋白-花青素7(APC-Cy7)等。FITC、PE/RD1、PerCP-Cy5.5和PE-Cy7采用488 nm的激发光源激发，最大发射波长分别为525 nm、575 nm、695 nm、785 nm。APC和APC-Cy7采用633 nm /635 nm /640 nm的激发光源激发，最大发射波长分别为660 nm、785 nm。选择联合CD45的六色方案进行淋巴细胞亚群检测时，宜使用但不限于配置有488 nm和633 nm/640 nm激光器的流式细胞仪。

4.2 溶血素

宜使用与仪器相匹配的内含固定液的溶血素。使用没有固定作用的溶血剂，染色后样品应保存在4℃环境下，并在1 h内完成检测。

4.3 绝对计数定量微球

用于单平台法淋巴细胞亚群绝对计数。将已知数量的微球与样本单细胞悬液放置在同一管中检测，根据获取的目的细胞数和绝对计数定量微球的粒子数，得出目的细胞的绝对计数。

4.4 固定液

如溶血素中含有固定成分，无需另外单独使用固定液。否则，宜使用含有0.1%~2.0%新鲜配制的多聚甲醛缓冲液(pH7.0~7.4)作为固定液，固定免疫荧光标记后的标本，4℃避光保存待上机测定。

5 性能评估

5.1 流式细胞仪性能评估

5.1.1 评估时机

当新仪器启用前、仪器发生重大维修(如更换激光或光电倍增管或流动室等)后、仪器软件系统更新后或仪器性能出现问题时，需对流式细胞仪进行性能评估。评估参数应包括灵敏度、分辨率、荧光通道线性、仪器稳定性和携带污染率。另外，荧光通道线性应在流式细胞仪常规使用过程中每年进行1次验证。

5.1.2 评估参数

5.1.2.1 灵敏度

5.1.2.1.1 散射光灵敏度

采用已知大小的校准微球检测仪器的FSC，FSC和SSC。在散射光FSC/SSC散点图上，可以检测出直径0.5 μm或更小的微球，或满足制造商声明。

5.1.2.1.2 荧光灵敏度

可采用2种不同荧光素校准微球检测FITC、PE的平均荧光强度（x），与荧光分子数（y）进行双对数线性回归，得公式 $y=a+bx$ ，其截距a的反对数值即为流式细胞仪的荧光灵敏度。FITC的荧光灵敏度应 $<100\text{MESF}$ 、PE的荧光灵敏度应 $<50\text{MESF}$ ，或满足制造商声明。

5.1.2.2 分辨率

5.1.2.2.1 散射光分辨率

采用稀释后的EDTA盐或枸橼酸钠抗凝全血上机测定，标本在FSC/SSC散点图可将红细胞和血小板清晰地区分开；采用稀释后的EDTA抗凝全血，裂解红细胞后上机测定，标本在FSC/SSC散点图可将淋巴细胞、单核细胞、粒细胞清晰地区分开，即认为散射光分辨率符合要求。见附录A。

5.1.2.2.2 荧光通道分辨率

采用校准微球上机测定，各荧光通道的峰宽CV值应符合要求。FITC通道的CV应 $<3.0\%$ 、PE通道的CV应 $<3.0\%$ ，其他各通道的峰宽CV值应符合制造商声明。

5.1.2.3 荧光通道线性

可采用含有不同荧光强度的标准微球（已知其相应荧光素的可溶性荧光分子数）进行检测，计算每一种荧光微球的MFI，MFI与理论值（可溶性荧光分子数）的相关系数 r 应 ≥ 0.975 ，此方法适用于有已知可溶性荧光分子数的标准微球的荧光通道。亦可同时使用两种荧光强度不同的微球，在待测荧光通道下，通过改变PMT，使两种荧光微球的实际MFI检测值由低到高分布，两种荧光微球的荧光强度比值应保持不变，两种荧光微球MFI比值的平均值变化应在 $\pm 2\%$ 范围内，此方法适用于流式细胞仪所有荧光通道。

5.1.2.4 仪器稳定性

开机稳定后，采用荧光微球在0 h和8 h各检测一次FSC及各荧光通道的MFI，以第一次检测时间点测定的各通道MFI值作为基线值，荧光微球8 h上机测定的的每一通道的MFI变化范围均应在基线值 $\pm 10\%$ 范围内。

5.1.2.5 携带污染率

采用含未标记荧光素的微球和FITC荧光微球的混合悬液（浓度高于5000个/ μL ）上机进行测定，获取至少100000个粒子，连续测定3次，计算设定区域的颗粒数分别记为H1、H2、H3；再使用鞘液上机测定，获取粒子30 s，连续测试3次，计算FITC标准微球百分含量，分别记为L1、L2、L3。按携带污染率公式 $(|L3-L1|/H3-L3)\%$ 进行计算，携带污染率不应超过1%。

5.2 外周血淋巴细胞亚群检测性能评估

5.2.1 评估时机

淋巴细胞亚群检测项目临床开展初期、更换试剂品牌、更换检测系统或有重大部件维修后，应对检测项目的精密度、稳定性、线性范围、可比性和准确度等参数进行评估，并对参考区间进行验证。

5.2.2 评估参数

5.2.2.1 精密度

5.2.2.1.1 批内精密度

包括样品检测全过程的可重复性和样品荧光染色的可重复性。宜使用正常和异常两个浓度水平的新鲜血或全血质控品。针对样品检测全过程的可重复性评估，可对样品荧光染色后上机测定，重复操作至少10次，计算检测结果的变异系数（CV），CV值应符合下表要求。针对样品荧光染色的可重复性评估，可对同一份荧光染色后的标本上机重复测定至少10次，计算检测结果的变异系数（CV），CV值应实验室建立的质量目标。

5.2.2.1.2 日间精密度

宜使用正常和异常两个浓度水平的全血质控品，进行荧光染色并上机测定，重复操作至少5天，每天4次，计算检测结果的变异系数（CV），CV值应实验室建立的质量目标。

表1 质量指标

项目结果		百分偏差
阳性百分率	>30%	≤8.0%
	<30%	≤15%
平均荧光强度		≤10%

5.2.2.2 稳定性

5.2.2.2.1 样品稳定性

对样品在确定的抗凝及处置条件下的稳定性进行评估。采集健康人或患者的样品至少5份，即刻染色-裂解-固定并上机测定，以此结果作为基线参考水平，再按实验室预期的样品待检时间，在抗凝剂保存时间内，设置不同的时间点对上述样品进行重复处理和上机测定，获取检测结果，并与基线水平结果进行比较，以相对偏倚或绝对偏倚表示。实验室应根据不同水平的检测结果分别建立质量目标评估样品稳定性。亦可参考试剂说明书进行操作。

5.2.2.2.2 处理后标本稳定性

旨在明确处理后标本的最长待检时间。采集健康人或患者的样品至少5份，对完成染色-裂解-固定后的标本即刻上机检测结果作为基线水平。按实验室获得检测结果的最长可接受时间为期限，设置不同的时间点对固定后标本进行上机检测。结果判断同样品稳定性。

5.2.2.3 线性范围

适用于CD4⁺T细胞绝对计数。取一份CD4⁺T细胞计数正常的样品，按照比例稀释为5个不同浓度的标本，染色-裂解-固定后，上机测定，每个标本重复测定4次，计算理论阳性细胞百分比和实际测定的阳性细胞百分比的相关性，相关系数R值应≥0.975。

5.2.2.4 可比性

5.2.2.4.1 不同仪器间的可比性验证

宜使用至少10份新鲜全血样品和2份不同浓度水平的全血质控品，完成染色-裂解-固定后，在检测仪器和参比仪器上分别进行检测，以参比仪器的测定结果为参考，计算百分偏差。100%标本的检测结果显示满足实验室建立的质量目标。

5.2.2.4.2 单抗试剂批次变更前后的可比性验证

宜使用至少3份健康人的新鲜全血样品和2份不同浓度质控品，采用新批号试剂和当前批号单抗进行荧光染色、上机检测，计算新旧试剂检测结果的百分偏差。100%标本的检测结果显示满足实验室建立的质量目标。

表2 质量指标

项目结果		百分偏差
阳性百分率	>30%	≤8.0%
	<30%	≤15%
平均荧光强度		≤10%

5.2.2.5 其他

可使用室间质评回报结果评估淋巴细胞亚群项目的准确度。选择至少20份表观健康人样品按照常规方法进行淋巴细胞亚群参考区间验证。

6 分析前

血液样品中可能存在致病性病原微生物，应按照生物安全防护要求进行操作和废弃物处置。

可选择含有乙二胺四乙酸盐（EDTA）、肝素钠或枸橼酸钠抗凝的抗凝管采集静脉血样品。样品采集后应即刻检测，不能立即检测的样品应保存于室温（18℃~25℃）环境中。当同时进行白细胞分类和计数时，宜使用EDTA盐抗凝管采集样品，采集后的样品应在24h内检测。使用肝素钠或枸橼酸钠抗凝管采集的样品，应在48 h内检测。

对于超过抗凝剂保存时限的样品或肉眼观察发现已经变质的样品，应弃之。对于不可替代的样品，应采用7-氨基放线菌素D（7-AAD）结合CD45（评估淋巴细胞、单核细胞和粒细胞死亡）复染评估细胞活力。7-AAD阴性者为活细胞群，7-AAD阳性者为细胞膜不完整的死细胞群。

7 分析中

7.1 免疫荧光染色

应选用组合标记抗体与全血样品进行淋巴细胞亚群的免疫荧光染色。抗体组合方案宜采用联合CD45的四色方案或六色方案。四色方案中，CD45/CD3/CD4/CD8组合抗体用于同时检测CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞；CD45/CD3/CD19/CD16和CD56组合抗体用于同时检测CD3⁺T细胞、B细胞和NK细胞。六色方案中，CD45/CD3/CD4/CD8/CD19/CD16和CD56组合抗体用于同时检测CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、B细胞和NK细胞。具体操作宜参考如下步骤：

7.1.1 样品与抗体孵育

取含适量细胞（通常为 1×10^6 白细胞/管）的全血样品（体积通常为100 μL），加入适量荧光标记抗体，室温避光孵育15 min~30 min。样品与抗体的总体积不宜超过200 μL。样品和抗体的比例应参考试剂说明书进行操作。若实验室对试剂厂商建议的反应条件（时间、体积、温度、细胞数）进行修改，则需要依据染色指数等进行滴定，选择适宜的抗体浓度。

如进行淋巴细胞亚群单平台绝对计数，应预先准确计数样品中的白细胞浓度，当样品中的白细胞浓度 $>20 \times 10^9/L$ 时，用含有1%白蛋白或其他蛋白的磷酸盐缓冲液（PBS）稀释至适当范围内。亦可使用反向加样法进行计数。

7.1.2 裂解红细胞

推荐采用全血溶血法裂解红细胞，绝对计数宜采用全血染色+溶血+免洗方法。应使用与检测仪器同厂配套的溶血素裂解红细胞，裂解时间和方法按照所用溶血素说明书进行操作，注意避光。对于溶血效果欠佳的样品（如来自某些慢性肝病或高脂血症等患者），可采用密度梯度离心法分离单个核细胞（但不适用于淋巴细胞亚群绝对计数）。

7.1.3 离心

根据溶血素说明书推荐的条件进行离心洗涤操作，如300 g~500 g的离心力离心5分钟。单平台绝对计数时应避免离心洗涤。

7.1.4 自动样本制备

样品量较大时，可使用样本前处理系统自动进行样本制备，包括自动加样、加抗体，混匀、裂解、震荡等。

7.1.5 处理后标本保存

制备好的标本上机分析前应在4℃下避光保存，充分混匀后上机检测。未固定的标本应在1 h内完成上机测定。固定的标本（采用含有固定成分的溶血素或含0.1%~2.0%多聚甲醛固定液）上机前可在4℃下避光保存24 h。

7.2 流式细胞仪检测

7.2.1 操作顺序

每次开机后，应先进行仪器光路/液路稳定性及检测通道电压稳定性的验证和调整；验证通过后，再进行室内质控检测；质控在可接受范围内后再进行标本检测；需定期进行荧光补偿的验证和调整。所有验证结果和室内质控结果均需详细记录。

7.2.2 仪器稳定性验证

7.2.2.1 光路/液路稳定性验证

应使用校准微球进行光路/液路稳定性验证，记录每个检测通道的峰宽变异系数（CV）和MFI，FSC、FITC及PE的CV应≤3%，其他参数的CV应符合制造商声明；各通道的MFI浮动应在±10%内。

7.2.2.2 检测通道电压稳定性验证和调整

应使用校准微球进行各检测通道电压验证。通过调整检测通道电压，使校准微球每个荧光通道最亮峰的MFI与微球目标靶值一致。检测通道电压的调整应该在仪器允许的范围之内。无法获取校准微球时，可暂时使用未染色样品，但不作为首选推荐。

7.2.3 室内质控（Internal quality control, IQC）

应首选商品化全血质控品进行室内质控。质控品应和患者样品同时进行免疫荧光染色，并在患者标本检测前进行上机测定和数据分析。如暂时无法获取商品化质控品，可采用接近医学决定水平的留样复查样品进行质控。

检测当日至少做一次质控，并至少包括两个浓度水平的质控，CD4⁺T细胞绝对计数应包括低值浓度水平质控，并做好相应质控记录。

实验室应建立每一批次质控品的靶值和可接受范围，不可直接引用说明书提供的参考范围。更换新批号质控品前，可通过每日检测4次质控品（不同时间点），连续5天收集20次数据，计算均值。均值作为新批次靶值，结合既往CV推算SD。应至少选择1_{3S}和2_{2S}作为失控判断标准，应有相应的失控纠正措施。全血质控品使用时，应按照按照说明书进行操作。

7.2.4 荧光补偿（适用时）

每次改变通道电压设置后均需重新调整补偿设置。宜选择与检测抗体组合相同荧光素标记的单荧光素标准微球或均一表达模式的荧光单抗染色细胞，通过仪器或软件测量各通道的荧光溢漏，调节每个通道的电压和建立荧光补偿矩阵；再使用已知抗原分布模式的样品进行验证。

7.2.5 数据获取和分析

7.2.5.1 联合 CD45 和 SSC 设门确定淋巴细胞群

根据CD45是否表达设定阈值，排除CD45阴性信号（细胞碎片）。在CD45/SSC散点图中，调整SSC，使所有白细胞群均可见。

7.2.5.2 采集细胞数

在非设门荧光散点图中，每一管样本至少收集10000个白细胞及5000个淋巴细胞，确保对数量较少的淋巴细胞亚群（如占总淋巴细胞数的10%）提供足够多的细胞用于计数。

7.2.5.3 根据 CD45 强阳性细胞群设门或划定区域（见附录 B/C）

淋巴细胞群呈现为CD45强阳性和小SSC，设门时尽可能包括所有淋巴细胞，门内淋巴细胞数不应低于95%，并排除单核细胞和嗜碱性粒细胞的干扰。相对于淋巴细胞群，单核细胞群呈现为CD45弱表达和中等SSC；嗜碱性粒细胞群呈现为CD45弱表达和小SSC。

7.2.5.4 数据分析（见附录 B/C）

7.2.5.4.1 CD3⁺T 细胞计数

在CD3/SSC散点图中，CD3⁺细胞群占CD45/SSC散点图中选定的淋巴细胞群的百分比为CD3⁺T细胞相对计数。可通过单平台或双平台方法得出CD3⁺T细胞绝对计数。

7.2.5.4.2 CD4⁺T 细胞计数

在CD3/CD4散点图中，CD3⁺CD4⁺双阳性细胞群占CD45/SSC散点图中选定的淋巴细胞群的百分比为CD4⁺T细胞相对计数。可通过单平台或双平台方法得出CD4⁺T细胞绝对计数。

7.2.5.4.3 CD8⁺T 细胞计数

在CD3/CD8散点图中，CD3⁺CD8⁺双阳性细胞群占CD45/SSC散点图中选定的淋巴细胞群的百分比为CD8⁺T细胞相对计数。可通过单平台或双平台方法得出CD8⁺T细胞绝对计数。

7.2.5.4.4 CD19⁺B 细胞计数

在CD3/CD19散点图中，CD3⁻CD19⁺细胞群占CD45/SSC散点图中选定的淋巴细胞群的百分比为CD19⁺B细胞相对计数。可通过单平台或双平台方法得出CD19⁺B细胞绝对计数。

7.2.5.4.5 NK 细胞计数

在CD3/CD56或（CD16+56）散点图中，CD3⁻CD56⁺细胞群或 CD3⁻CD（16+56）⁺占CD45/SSC散点图中选定的淋巴细胞群的百分比为CD56⁺或CD（16+56）⁺NK细胞相对计数。可通过单平台或双平台方法得出CD56⁺或CD（16+56）⁺NK细胞绝对计数。

7.2.6 数据分析可靠性验证

7.2.6.1 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞在 CD45/SSC 散点图中的分布和确认

在CD3/CD4、CD3/CD8、CD3/CD19、CD3/CD56（或CD16+56）散点图中，设置十字门，将图中的阴性和阳性细胞群区分开。B细胞的CD45表达较T细胞稍弱，NK细胞的CD45表达强度与T细胞相似，但SSC信号较T细胞强。

将CD3/SSC，CD19/SSC，以及CD56或CD（16+56）/SSC中T细胞、B细胞和NK细胞的分布特征筛选出来，并在CD45/SSC散点图中显示，以检测设门的准确性。

7.2.6.2 T、B 和 NK 细胞相对计数的一致性

T、B和NK细胞相对计数的总和应占淋巴细胞总数的100%±5%范围内。某些血液病可能T、B和NK总值异常。

CD4⁺T（CD3⁺CD4⁺）细胞和CD8⁺T（CD3⁺CD8⁺）细胞百分比的总和宜在CD3⁺T（CD3⁺）细胞的百分比±5%之间。如样品中含有一定数量的非常见T细胞亚群，如TCR- γ δ ⁺T细胞，CD3⁺CD4⁻CD8⁻或CD3⁺CD4⁻CD8^{dim}T细胞，这类样品的结果超出以上限制。

同一样品两管实验的CD3⁺T细胞计数的重复结果间的差异应 \leq 3%。当两管间的CD3⁺T细胞计数差值 $>$ 3%时，应重做该样品，包括重新染色、裂解红细胞和固定等。

7.3 室间质评（external quality assessment, EQA）

外周血淋巴细胞亚群检测项目应参加室间质量评价活动。

8 分析后

8.1 结果报告和审核

8.1.1 报告内容

CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、B细胞和NK细胞的相对计数、绝对计数、CD4⁺T/CD8⁺T比值、参考区间及必要的解释性注释。

8.1.2 审核内容

包括数据采集阈值的设置、采集细胞数和微球数、散点图模式、抗体组合方案、与试验结果相关的所有设门等。关注参考范围的适用性，必要是对参考范围进行验证或生物变异度评估。

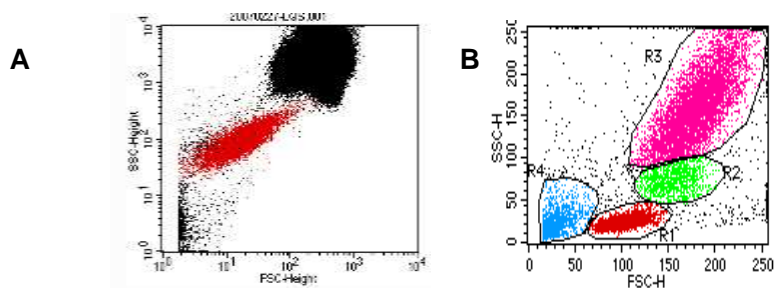
8.2 数据储存

淋巴细胞亚群检测的标准操作程序、质量控制和质量评价数据及设备维护日志均应详细记录，每个样品的CD45/SSC淋巴细胞群设门图和显示淋巴细胞亚群的荧光散点图的分析结果均应保留。建议将待保留的分析数据和文件以流式细胞数据格式存储至安全的服务器或永久存储介质，储存期限至少2年。数据储存期间应保证记录的真实性、完整性和机密性。

9 人员要求

流式细胞术操作人员应接受流式相关检测理论知识、淋巴细胞亚群检测标准化操作培训，培训合格后方可上岗。

附录 A
(资料性)
流式细胞仪的散射光分辨率验证图



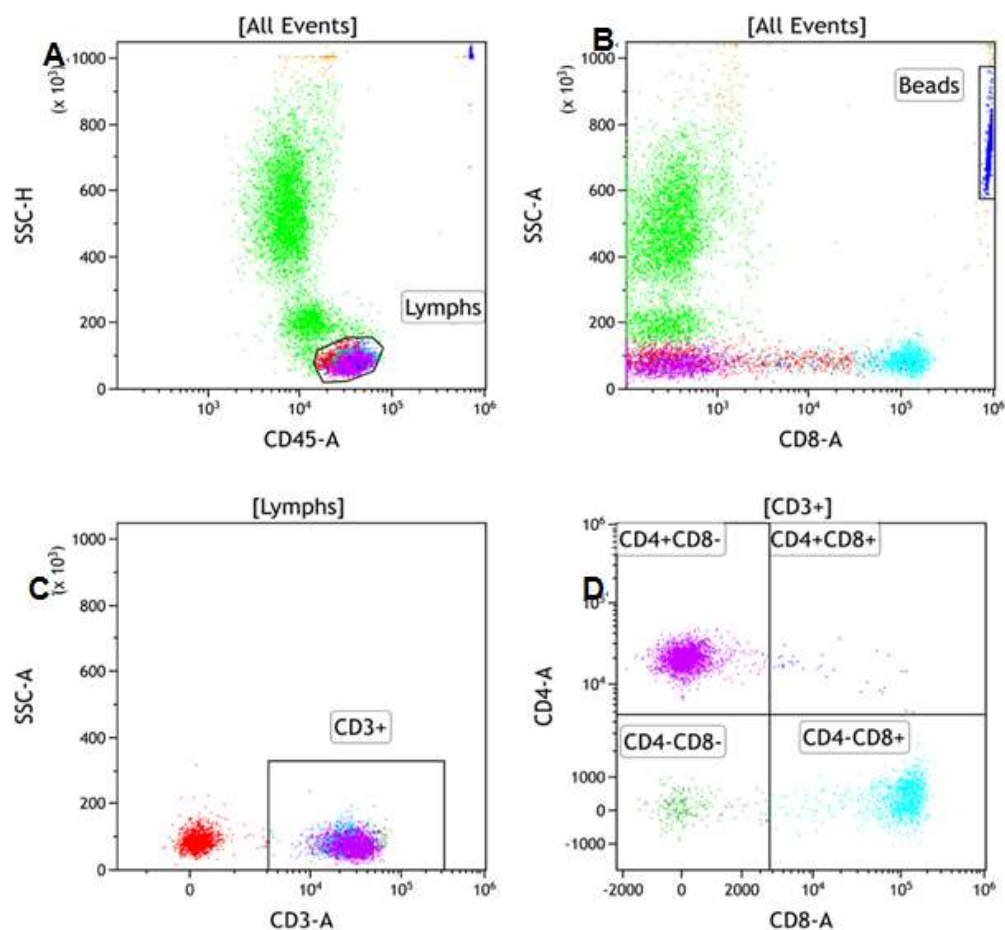
图A 流式细胞仪的散射光分辨率验证图

A采用稀释后的EDTA/枸橼酸钠抗凝全血上机测定，标本在FSC/SSC散点图可将红细胞（黑色）和血小板（红色）清晰地区分开

B采用稀释后的EDTA抗凝全血，裂解红细胞后上机测定，标本在FSC/SSC散点图可将淋巴细胞（R1，红色）、单核细胞（R2，绿色）、粒细胞（R3，紫色）清晰地区分开

附录 B
(资料性)

四色抗体组合方案进行淋巴细胞亚群分析的示意散点图



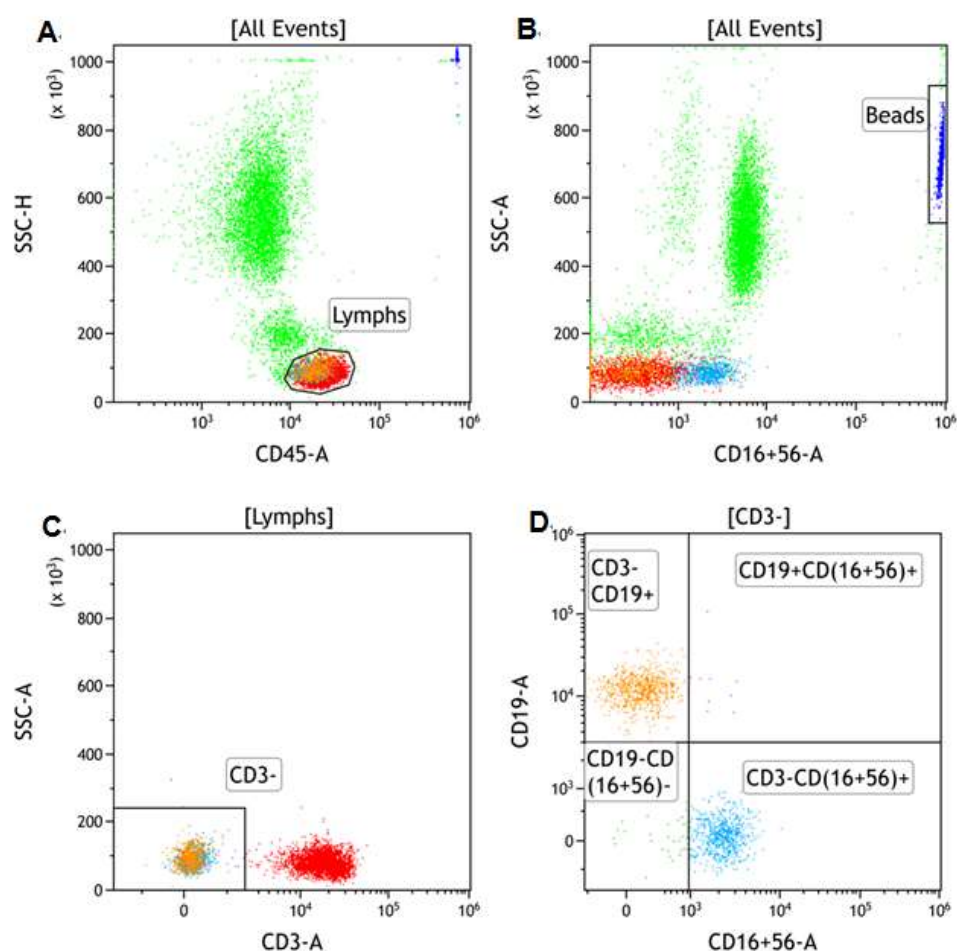
图B-1. 流式细胞四色方案检测CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞，含绝对计数微球，四色方案第一管分析结果示意图。

A) CD45/SSC散点图。根据SSC小/CD45强表达特征，对淋巴细胞群进行设门，使门内淋巴细胞数不低于95%。

B) CD8/SSC散点图。在CD8/SSC散点图中，对绝对计数微球群进行设门并采集微粒数目。

C) CD3/SSC散点图。在CD3/SSC散点图中，采集A图中的淋巴细胞群，并对CD3⁺T淋巴细胞群设门。

D) CD4/CD8散点图。在CD4/CD8散点图中，采集C图中CD3⁺T淋巴细胞群，根据B图中绝对计数微球的计数数目，对CD4⁺CD8⁻T淋巴细胞和CD4⁻CD8⁺T淋巴细胞进行计数。



图B-2. 流式细胞四色方案检测CD3⁺T细胞、B细胞和NK细胞, 含绝对计数微球, 四色方案第二管分析结果示意图。

A) CD45/SSC散点图。根据SSC小/CD45强表达特征, 对淋巴细胞群进行设门, 使门内淋巴细胞数不低于95%。

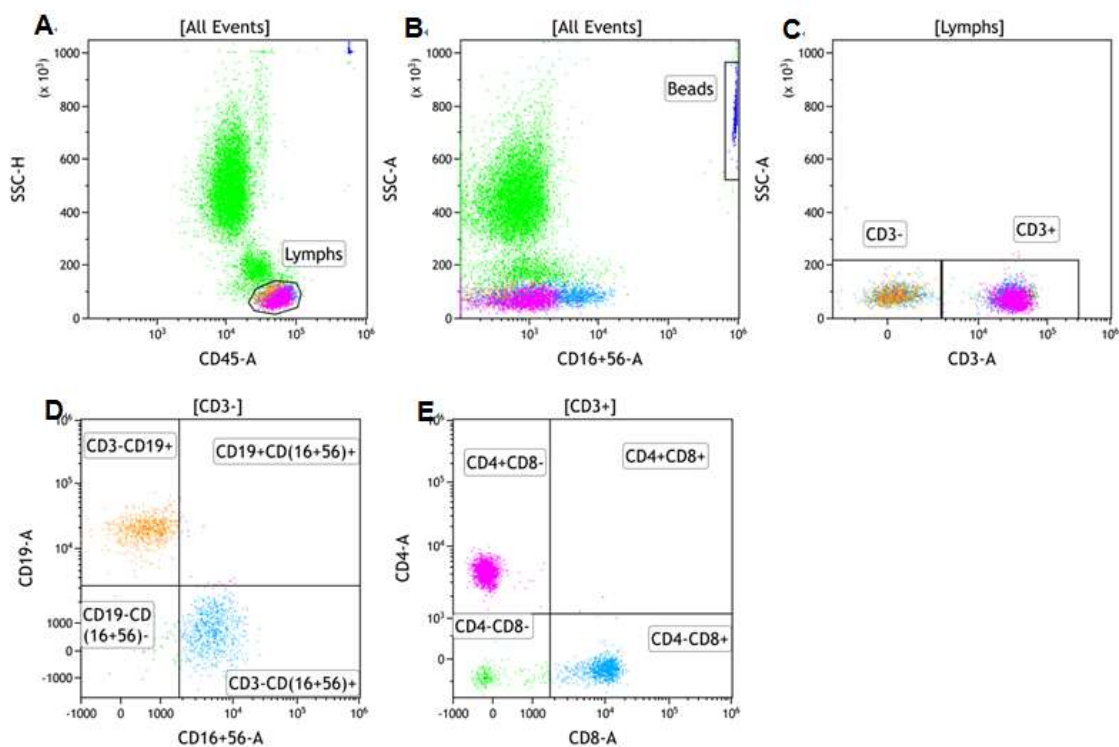
B) CD16+56/SSC散点图。在CD16+56/SSC散点图中, 对绝对计数微球群进行设门并采集微粒数目。

C) CD3/SSC散点图。在CD3/SSC散点图中, 采集A图中的淋巴细胞群, 并对CD3⁺T淋巴细胞群设门。

D) CD16+56/CD19散点图。在CD16+56 / CD19散点图中, 采集C图中CD3⁺T淋巴细胞群, 根据B图中绝对计数微球的计数数目, 对(CD3⁻CD19⁺)B淋巴细胞和(CD3⁻CD16⁺CD56⁺)NK细胞群进行计数。

附录 C (资料性)

六色抗体组合方案进行淋巴细胞亚群分析的示意散点图



图C：流式细胞术六色方案检测CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞，B细胞和NK细胞，含绝对计数微球，结果分析示意图。

A) CD45/SSC散点图。根据SSC小/CD45强表达特征，对淋巴细胞群进行设门，使门内淋巴细胞数不低于95%。

B) CD16+56/SSC散点图。在CD16+56/SSC散点图中，对绝对计数微球群进行设门并采集微粒数目。

C) CD3/SSC散点图。在CD3/SSC散点图中，采集A图中的淋巴细胞群，分别对CD3⁺T淋巴细胞群CD3⁻T淋巴细胞群设门。

D) CD16+56/CD19散点图。在CD16+56 / CD19散点图中，采集C图中CD3⁻T淋巴细胞群，根据B图中绝对计数微球的计数数目，对(CD3⁻CD19⁺)B淋巴细胞和(CD3⁻CD16⁺CD56⁺)NK细胞群进行计数。

E) CD4/CD8散点图。在CD4/CD8散点图中，采集C图中CD3⁺T淋巴细胞群，根据B图中绝对计数微球的计数数目，对CD4⁺CD8⁻T淋巴细胞和CD4⁻CD8⁺T淋巴细胞进行计数。

参 考 文 献

- [1] Hulspas R, O'gorman M R, Wood B L, et al. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry[J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2009, 76(6): 355-364.
- [2] CLSI. Enumeration of immunologically defined cell populations by flow cytometry; Approved guideline—Second Edition. CLSI document H42-A2: Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA, 2007.
- [3] Australasian Cytometry Society. ACS guideline for lymphocyte subset immunophenotyping, 2017.
- [4] Chunmei Huang, Wei Li, Wei Wu, et al. Intra-day and inter-day biological variations of peripheral blood lymphocytes[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 438(1): 166-170.
- [5] Levering W H, Van Wieringen W N, Kraan J, et al. Flow cytometric lymphocyte subset enumeration: 10 years of external quality assessment in the Benelux countries[J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2008, 74(2): 79-90.
- [6] 黄春梅, 郭野, 陈倩等. 不同流式细胞分析系统对外周血淋巴细胞亚群分析结果的影响[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(5): 403-408.
- [7] Huang CM, Yu LH, Pu CW, et al. Assessment of a five-color flow cytometric assay for verifying automated white blood cell differentials[J]. *Chin Med J (Engl)*. 2013, 126(4): 716-721.
- [8] Li C, Peng M, Xu D, et al. Commutability assessment of reference materials for the enumeration of lymphocyte subsets[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2019, 57(5): 697-706.
- [9] 国家食品药品监督管理总局. YY/T 0588-2017 流式细胞仪.
- [10] Perfetto S P, Chattopadhyay P K, Wood J, et al. Q and B values are critical measurements required for inter-instrument standardization and development of multicolor flow cytometry staining panels[J]. *Cytometry Part A*, 2014, 85(12): 1037-1048
- [11] Lee H, Sun Y, Patti-Diaz L, et al. High-Throughput Analysis of Clinical Flow Cytometry Data by Automated Gating[J]. *Bioinformatics and biology insights*, 2019, 13:1177932219838851.
- [12] Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2017;117:5.4.1-5.4.38.
- [13] Ozarda Y, Higgins V, Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2019, 57(1): 30-37.
- [14] 中华人民共和国卫生部. WS/T 402-2012 临床实验室检验项目参考区间的制定, 2012.
- [15] 张诗诗, 王薇, 何法霖等. 全国流式细胞术淋巴细胞亚群项目健康成人参考区间现状分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(005): 356-360.
- [16] Tangri S, Vall H, Kaplan D, et al. Validation of cell - based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS - part III - analytical issues[J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2013, 84(5): 291-308.
- [24] Goetz C, Hammerbeck C, Bonnevier J. *Flow cytometry basics for the non-expert*[M]. Switzerland AG: Springer International Publishing, 2018.