

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 360—2024

代替 WS/T 360—2011

流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南

Guideline for enumeration of peripheral blood lymphocyte subsets by flow cytometry

2024 - 04 - 02 发布

2024 - 09 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准为你推荐性标准。

本标准代替WS/T 360—2011《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》，与WS/T 360—2011相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术内容变化如下：

- 增加了流式细胞仪性能验证内容(见5.1)；
- 完善了仪器质量控制和项目性能验证内容(见5.2、7.2.2)；
- 梳理和保留了检验前、检验中、检验后过程的内容及要求(见第6、7、8章)；
- 删减了标本采集和处理及临床意义内容(见2011年版的第4、10章)；
- 增加了淋巴细胞亚群六色分析方案(见4.1.3、附录C)。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

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、上海市交通大学医学院附属第一人民医院、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。

本标准于2011年首次发布，本次为第一次修订。

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（包括CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞）、B淋巴细胞和NK细胞的技术要求。

本标准适用于医疗机构临床实验室开展流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

WS/T 806 临床血液与体液检验基本技术标准。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

细胞分化抗原 cluster of differentiation; CD

不同谱系细胞在分化、发育、活化过程中，出现或消失的细胞表面标志。

注1：细胞表面标志通常采用对应的单克隆抗体来识别。

注2：已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。

注：FSC与细胞或颗粒的大小和折射指数有关。

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。

注：SSC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、膜不规则性及核型等。

3.4

设门 gating

在流式细胞图上基于一组参数来确定所要分析的目的细胞群，对该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的过程。

3.5

荧光强度 fluorescence intensity

结合到细胞或颗粒上的单克隆抗体荧光素多与少的量化指标。

注1：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值也越大，反之越小。

注2: 荧光强度常通过相对荧光强度值的大小来表示, 有算术平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)、几何平均 (Geometric Mean) 和中位荧光强度 (Median fluorescence intensity, MdFI) 3种计算方式。

3.6

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。

注1: SI通过阳性细胞群平均荧光强度 (MFI) 与阴性细胞群MFI的差, 除以阴性细胞群荧光强度的2倍标准差计算而来 $[SI = (MFI_{\text{阳性群}} - MFI_{\text{阴性群}}) / 2 \times rSD_{\text{阴性细胞群}}]$, 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。

注2: SI越大, 荧光强度越高。进行抗体滴度测定时需根据SI来确定最适合的抗体用量。

3.7

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荧光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从而纠正发射波长重叠造成的计数错误的过程。

注: 扣除的荧光量是用同型抗体来确定的, 被校正的信号反映了单荧光信号的发射情况。

3.8

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。

注: 常用的荧光微球包括以下3种: 1) 校准微球: 与染色细胞大小和荧光强度相似的微球, 用于检测每个荧光通道的线性、灵敏度和检测水平, 也可用来检测抗体结合量或抗原密度。2) 标准微球: 大小一致、荧光强度与染色细胞相似的微球, 用于检测通道的电压设置和荧光补偿设置。3) 绝对计数微球: 已知数量或浓度的荧光微球, 与待测单细胞悬液在同一管中进行检测, 以准确获得待测细胞的绝对计数。

3.9

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。

注: 相对细胞计数单位: %

3.10

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来表示。

注: 绝对细胞计数单位: 个/ μ L

3.11

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。

注: 单平台方法可通过流式细胞仪结合绝对计数微球或精确进样体积等方法对目的细胞亚群进行绝对细胞计数。

3.12

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。

注: 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细胞绝对细胞计数)。

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。单克隆抗体宜选择细胞分化抗原CD45、CD3、CD4、CD8、CD19、CD16、CD56。淋巴细胞亚群临床检测试剂应符合国家医疗器械注册要求。

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主要表达于辅助/诱导T淋巴细胞（CD4⁺T细胞），也少量表达于单核/树突状细胞等；CD8表达于细胞毒T淋巴细胞（CD8⁺T细胞）和少部分NK细胞等；CD19通常表达于B淋巴细胞和少量浆细胞；CD16表达于NK细胞、粒细胞、部分单核/树突状细胞等；CD56表达于NK细胞和细胞毒T细胞等。

4.1.2 淋巴细胞亚群的鉴定抗体

宜至少使用联合CD45的四色抗体组合方案。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 $\geq 95\%$ 。如果样品中的淋巴细胞数量较少或者单核细胞对淋巴细胞分群有干扰，推荐同时加入CD14作为设门抗体，圈取CD14⁻细胞群。CD3⁺T细胞标记为CD3⁺，CD4⁺T细胞标记为CD3⁺CD4⁺CD8⁻，CD8⁺T细胞标记为CD3⁺CD4⁻CD8⁺，B细胞标记为CD3⁻CD19⁺，NK细胞标记为CD3⁻CD16⁺CD56⁺或CD3⁻CD56⁺。

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。目前常用各种荧光素的激发波长和最大发射波长见下表1。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/635 nm/640 nm激光器且有可接收四色荧光信号检测通道的流式细胞仪。

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。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/635 nm/640 nm激光器且有可接收六色荧光信号检测通道的流式细胞仪。

表1. 常用荧光素的激发波长和最大发射波长

荧光素	激发波长	最大发射波长
异硫氰酸荧光素（FITC）	488 nm	525 nm
藻红蛋白（PE/RD1）	488 nm	575 nm
藻红蛋白-花青素 5（PE-Cy5）	488 nm	670 nm
多甲藻叶绿素蛋白（PerCP）	488 nm	675 nm
藻红蛋白-德州红偶联物（ECD）	488 nm	613 nm
多甲藻叶绿素蛋白-花青素 5.5（PerCP-Cy5.5）	488 nm	695 nm
藻红蛋白-花青素 7（PE-Cy7）	488 nm	785 nm
别藻青蛋白（APC）	633 nm/635 nm /640 nm	660 nm
别藻青蛋白-花青素 7（APC-Cy7）	633 nm/635 nm /640 nm	785 nm

4.2 溶血素

宜使用制造商推荐使用的配套溶血素，使用方法应遵循产品说明书的要求；如使用非配套溶血素或者自行配制的溶血素（氯化铵和低渗缓冲液等）时，应在使用前与配套溶血素进行同步检测并比对结果，以验证其性能。比对结果时以配套溶血素检测结果为参考，计算相对偏差或绝对偏差。检测结果符合实验室制定的评估要求，才可使用非配套溶血素或自配的溶血素。

4.3 绝对计数微球

用于单平台法淋巴细胞亚群的绝对细胞计数。将已知数量的微球与样品单细胞悬液放置在同一管中检测，根据获取的目的细胞的相对细胞计数和绝对计数微球的粒子数，得出目的细胞的绝对细胞计数。

4.4 固定液

如溶血素中含有固定成分，无需再单独使用固定液。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，固定免疫荧光标记并使用溶血素裂解红细胞后的样品，4℃（2℃~8℃）避光保存，保存时间参考本标准第5.2.2.2条处理后标本稳定性的验证结果。

5 性能验证

5.1 流式细胞仪的性能验证

5.1.1 验证时机

当新仪器启用前、搬移后、仪器发生重大维修（如更换激光、光纤、光电倍增管或流动室等）后、仪器软件系统更新后、仪器性能出现问题或环境严重失控时，需对流式细胞仪进行性能验证，所用流式细胞仪应符合医疗器械注册要求。

荧光通道线性应在流式细胞仪常规使用过程中每年至少进行1次验证。

5.1.2 验证参数

验证参数应包括灵敏度、分辨率、荧光通道线性、仪器稳定性和携带污染率等。

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和SSC。在散射光FSC/SSC散点图上，应检测出直径0.5 μm或更小的微球，或满足制造商声明的要求。

5.1.2.1.2 荧光灵敏度

即流式细胞仪能检测到标准荧光微球上的最少荧光分子数，可用等量可溶性荧光分子（Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome, MESF）表示。可采用2~4种不同荧光素校准微球针对所用激发光源进行检测，其中FITC、PE及APC等通道的平均荧光强度（ $\bar{x}$ ）与其荧光分子数（ y ）分别进行双对数线性回归，得公式 $y=a+b\bar{x}$ ，其截距 a 的对数值即为流式细胞仪的荧光灵敏度。FITC的荧光灵敏度应≤200 MESF、PE的荧光灵敏度应≤100 MESF、APC≤200 MESF，或满足制造商声明的要求。

5.1.2.2 分辨率

5.1.2.2.1 散射光分辨率

采用EDTA盐或肝素抗凝全血，取适量样品稀释后直接上机测定，标本在FSC/SSC散点图可将红细胞和血小板清晰地区分开；取适量样品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。示意图参见附录A。

5.1.2.2.2 荧光通道分辨率

采用校准微球上机测定，各荧光通道的分辨率CV值应符合制造商声明的要求。

5.1.2.3 荧光通道线性

可采用含有不同荧光强度的校准微球（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与已知理论值的相关系数 r 应 ≥ 0.98 ，此方法适用于校准微球上的荧光素可被定量检测的荧光通道。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，通过改变光电检测器的电压，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，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

连续开机条件下，采用荧光微球在开机稳定后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

使用浓度为5000个/ μL ~10000个/ μL 的校准微球上机进行测定，获取至少100000个颗粒，连续测定3次，计算检测通道内设定区域的颗粒数，分别记为H1、H2、H3；再使用空白溶液上机测定，获取颗粒30 s，连续测试3次，计算该检测通道内设定区域的颗粒数，分别记为L1、L2、L3。按照此步骤重复循环3次。按携带污染率公式 $[(L1-L3)/(H3-L3)] \times 100\%$ 进行计算，取最大值。携带污染率应 $\leq 0.5\%$ 。

5.2 外周血淋巴细胞亚群检测系统的性能验证

5.2.1 验证时机及验证内容

淋巴细胞亚群检测项目临床开展初期、更换试剂品牌、更换检测系统或仪器的重大部件维修后，应对检测项目的精密度、稳定性、线性范围、可比性和正确度等参数进行验证。

5.2.2 验证方法

建议使用配套试剂盒时开展性能验证，使用自选试剂时实施性能确认；需要分别描述性能验证和性能确认的方法和评价标准。

5.2.2.1 精密度

5.2.2.1.1 批内精密度

选取至少5个新鲜全血样品，样品的淋巴细胞亚群细胞计数应覆盖低中高水平。每个样品从荧光染色到上机检测重复3次，并确保所有测试都在同一台仪器的同一批内测定，整个操作过程由同一个操作人员完成。先计算每个样品重复3次后检测结果的CV，然后计算所有样品的平均CV，所有样品的平均CV宜 $< 10\%$ ，最大不超过20%。实验室可根据不同水平的淋巴细胞亚群细胞计数设定不同程度的可接受CV标准。

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，每天从荧光染色到上机测定重复操作3次，至少重复4天，整个操作过程可由不同操作人员完成。先计算每天每个全血质控品重复3次检测结果的CV值，然后据此计算每个全血质控品4天的平均CV，最后得出两个全血质控品检测结果的平均CV。结果判定同本标准第5.2.2.1.1条。

5.2.2.2 稳定性

5.2.2.2.1 样品稳定性

验证样品在确定的抗凝及处置条件下的稳定性。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，按照实验室的具体环境温度控制条件和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，以相对偏差或绝对偏差表示，检测结果应符合实验室制定的验证要求。

验证要求的制定应考虑不同水平的淋巴细胞亚群计数设定不同程度的偏差值，淋巴细胞亚群计数过低者，宜以绝对偏差进行验证；亦可对试剂说明书声明的稳定性条件进行验证。

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。结果判定同本标准第5.2.2.2.1条。亦可对试剂说明书声明的稳定性条件进行验证。

5.2.2.3 线性范围

适用于淋巴细胞亚群绝对细胞计数。根据试剂说明书声明的线性范围，取一份淋巴细胞计数或亚群计数接近线性范围上限的临床样品，采用样品稀释液按照比例制备 5~9 个不同浓度的标本（如 0、25%、50%、75%、100%等），浓度范围应覆盖临床医学决定水平；通过染色-裂解-固定后，上机测定，每个标本重复测定 4 次，取均值。分析实际测定的亚群细胞数量均值与理论值之间的相关性，相关系数 r 应 ≥ 0.975 。

5.2.2.4 可比性

5.2.2.4.1 不同检测系统间的可比性验证

宜使用至少 5 份新鲜全血样品（样品的淋巴细胞亚群细胞计数应覆盖低中高水平）和 2 份不同浓度水平的全血质控品，完成染色-裂解-固定后，分别采用待评价检测系统和比对检测系统进行检测。比对检测系统应为仪器性能良好、规范开展室内质量控制、室间质量评价成绩合格的淋巴细胞亚群常规检测系统，以比对检测系统的测定结果为参考，计算相对偏差或绝对偏差。检测结果应符合实验室制定的验证要求。验证要求的制定应考虑不同水平的淋巴细胞亚群计数设定不同程度的偏差值，淋巴细胞亚群计数过低者，宜以绝对偏差进行验证。

5.2.2.4.2 抗体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，采用新批号抗体试剂和当前批号抗体试剂进行荧光染色、上机检测，以当前批号试剂检测结果为参考，计算相对偏差或绝对偏差。检测结果应符合实验室制定的验证要求。验证要求的制定应考虑不同水平的淋巴细胞亚群计数设定不同程度的偏差值，淋巴细胞亚群计数过低者，宜以绝对偏差进行验证。

5.2.2.4.3 不同检测人员间的可比性验证

宜使用至少5份新鲜全血样品和2份不同浓度水平的全血质控品，分别由实验室内淋巴细胞亚群检测培训合格的不同检测人员完成染色-裂解-固定、上机检测和数据分析，计算不同检测人员间检测结果的相对偏差或绝对偏差。验证结果应符合实验室制定的验证要求。

5.2.2.5 其他

可使用室间质评回报结果验证淋巴细胞亚群项目的准确度；亦可采用包含正常和异常浓度水平的具有溯源链的定值样品验证准确度，每一样品重复测定3次，每次测量值均在给定范围内且3次测量值的均值与标准值的偏倚在允许范围内为通过。

选择至少20份外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 检验前过程

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）、肝素或枸橼酸葡萄糖溶液（ACD）抗凝剂的抗凝管采集静脉血样品，如流式分析与白细胞计数使用同一管标本（即采用双平台方法进行淋巴细胞亚群计数），则应使用EDTA抗凝管采集样品，并用同一管样品完成检测。

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，样品保存时长应根据本标准第5.2.2.1条样品稳定性检测数据而设定，EDTA抗凝管采集的样品可稳定12 h～24 h，肝素钠和ACD抗凝管采集的样品可稳定48 h～72 h。标本在保存和运输中宜尽量减少震动。使用双平台方法进行检测时，宜在6 h内获得白细胞计数和分类结果。

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，建议采用7-氨基放线菌素D（7-AAD）结合CD45复染评估细胞（淋巴细胞、单核细胞和粒细胞）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 检验中过程

7.1 免疫荧光染色

7.1.1 样品与抗体孵育

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。

取含适量细胞（通常用于淋巴细胞亚群计数的白细胞浓度宜 $\leq 20 \times 10^9/L$ ）的全血样品（单平台绝对计数法宜采用反向加样法），加入适量荧光标记抗体，室温避光孵育10 min～30 min。样品和抗体的比例应参考试剂说明书进行操作。

如进行淋巴细胞亚群单平台绝对细胞计数，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，使用含有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。

7.1.2 裂解红细胞

推荐采用全血溶血法裂解红细胞，绝对细胞计数宜采用全血染色结合溶血和免洗方法。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（如来自某些黄疸或高脂血症等患者），可采用密度梯度离心法分离单个核细胞（使用此方法时需要在检验报告中注明，因为该法影响淋巴细胞亚群绝对细胞计数和各亚群占有核细胞比例的检测结果）。

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 min，倒弃上清时应注意避免细胞流失。单平台方法进行绝对细胞计数时不能洗涤，双平台方法宜避免洗涤。

7.1.4 自动样品制备

检测样品数量较大时，可使用样品前处理系统自动进行样品制备，包括自动加样、加抗体，混匀、裂解、震荡等。需要注意的是，使用自动样品前处理系统前需要评估其携带污染率。对于采用单平台方法进行绝对细胞计数，还需评估其加样准确度和精密度。

7.1.5 处理后待测标本保存

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。未固定的标本宜尽快完成检测。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）上机前应避光保存，宜在24 h内或在产品说明书规定时限内或参考本标准第5.2.2.2条处理后标本稳定性验证结果的允许时限内完成检测。

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；质控通过后再进行标本检测；每次开机和关机应做好仪器保养维护。需定期进行荧光补偿的验证和调整。所有验证结果、室内质控结果和保养维护日志均应详细记录。

7.2.2 仪器稳定性验证

7.2.2.1 光路/液路稳定性验证

检测当天宜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分辨率的变异系数（CV），CV值应满足本标准第5.1.2.2条荧光通道分辨率要求。

7.2.2.2 检测通道电压稳定性验证和调整

应使用标准微球进行各检测通道电压验证。检测通道电压的浮动应在标准微球的说明书允许范围或者实验室自建的可接受范围内。自建方法如下：在相同的电压设置下，10~20个工作日内检测标准微球20次，使用Levy-Jennings图建立每个参数的可接受范围（均值 $\pm$ 2SD和均值 $\pm$ 3SD）。

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（如HIV+患者CD4⁺淋巴细胞计数低至200个/ μ L）的复查样品（建议选取采样后24小时内的样品）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，CD4⁺T细胞的绝对细胞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质控范围。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，结合既往累计CV值推算SD。应至少选择1_{3S}和2_{3S}作为失控判断标准，应有相应的失控纠正措施。使用全血质控品时，应按照说明书操作。

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。宜选择与检测一致的荧光素标记抗体和相同细胞或者微球做为荧光单染色对照。确定电压之后建立荧光补偿矩阵，通过仪器或软件将单阳性细胞群体调整到相应荧光点图的直角坐标系象限中，应避免补偿不足出现假阳性细胞群，同时避免补偿过度将双阳性细胞错误识别为单阳性细胞。最后使用全血质控品或正常样品全抗体染色标记、裂解红细胞和上机检测，以验证荧光补偿方案的准确性。

7.2.5 数据获取和分析

7.2.5.1 通过 CD45/SSC 散点图确定白细胞群

在CD45/SSC散点图中，调整各参数检测条件，使淋巴细胞群、粒细胞群和单核细胞群等白细胞群均可见。可通过设定阈值（如根据CD45是否表达设定）排除细胞碎片、血小板及噪音信号等干扰，亦可在CD45/SSC散点图设门前，通过FSC/SSC散点图做第一步设门。

7.2.5.2 采集细胞数

在非设门荧光散点图中，每一管标本至少收集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分析。

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

淋巴细胞群呈现为CD45强阳性和低度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%，并尽可能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弱表达和中度SSC；嗜碱性粒细胞群呈现为CD45弱表达和低度SSC。

7.2.5.4 数据分析（参见附录 B/C）

7.2.5.4.1 CD3⁺T 细胞计数

在CD3/SSC散点图中, CD3⁺细胞群占淋巴细胞群的百分比为CD3⁺T细胞的相对细胞计数。可通过单平台或双平台方法得出CD3⁺T细胞的绝对细胞计数。

7.2.5.4.2 CD4⁺T 细胞计数

在 CD4/CD8 荧光散点图中, CD3⁺CD4⁺CD8⁻细胞群占淋巴细胞群百分比为 CD4⁺T 细胞的相对细胞计数。可通过单平台或双平台方法得出 CD4⁺T 细胞的绝对细胞计数。

7.2.5.4.3 CD8⁺T 细胞计数

在CD4/CD8荧光散点图中, CD3⁺CD4⁻CD8⁺细胞群占淋巴细胞群百分比为CD8⁺T细胞的相对细胞计数。可通过单平台或双平台方法得出CD8⁺T细胞的绝对细胞计数。

7.2.5.4.4 CD19⁺B 细胞计数

在CD3/SSC散点图中对CD3⁺细胞群设门, 在CD16&56/CD19或CD56/CD19荧光散点图中, CD3⁺CD19⁺细胞群占淋巴细胞群的百分比为CD19⁺B细胞的相对细胞计数。可通过单平台或双平台方法得出CD19⁺B细胞的绝对细胞计数。

7.2.5.4.5 NK 细胞计数

在CD3/SSC散点图中对CD3⁺细胞群设门, 在CD16&56/CD19或CD56/CD19荧光散点图中, CD3⁺CD16&56⁺或CD3⁺CD56⁺细胞群占淋巴细胞群的百分比为CD16&56⁺或CD56⁺ NK细胞的相对细胞计数。可通过单平台或双平台方法得出CD16&56⁺或CD56⁺NK细胞的绝对细胞计数。

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

分别在 CD3/CD56 (或CD3/CD16&56), CD3/CD19, CD3/CD4 和 CD3/CD8 散点图上设置十字门或矩形门等, 以便明确区分这些散点图中的阴性和阳性细胞群, 必要时使用同型对照协助设门。

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和CD19/SSC散点图中T细胞和B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 细胞相对细胞计数的一致性

T、B和NK细胞相对细胞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总和值异常。

CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞相对细胞计数的总和宜在CD3⁺T细胞相对细胞计数±5%之间, 最大变异范围不超过±10%。如样品中含有数量较多的不常见T细胞亚群 (如TCR- γ δ +T细胞, CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁺CD8dim T细胞或CD3⁺CD4⁺CD8⁺T细胞) 时, 样品的检测结果可能会超出以上变异范围。

对于四色抗体组合方案, 同一样品两管CD3⁺T细胞计数检测结果差异应≤5%。当两管间的CD3⁺T细胞计数差值>5%时, 应重做该样品, 包括重新染色、裂解红细胞和固定等。

7.2.7 仪器保养维护

7.2.7.1 日常保养

实验室应按照操作规程或制造商推荐的要求进行每次开关机前的仪器保养维护和日常清洗程序, 开机前应添加鞘液和清洗液, 及时清空废液; 关机前应清洗管路和上样装置; 及时排除流动室气泡。当仪器长时间停机后第一次开机、仪器稳定性验证不通过、数据获取时散点图中的碎片或计数明显增加而无法去除、或进行淋巴细胞亚群分析前该仪器使用了碘化丙啶 (PI)、溴化乙锭 (EB)、吖啶橙 (AO)、噻唑橙 (TO)、柯里麟 O (Coriphosphine-O)、钙离子荧光探针 (Fura 3)、二乙酸荧光素 (FDA) 等染料, 也应执行日常清洗程序。

7.2.7.2 周保养

实验室应每周清洗流动室。

7.2.7.3 月保养

实验室应每月对仪器液路系统进行深度清洗，清洗空气过滤膜、清洗鞘液和废液容器等。

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 检验后过程

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（百分比）、绝对计数（绝对值）、CD4⁺T/CD8⁺T细胞比值、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。参考区间可参考产品说明书或文献资料，在参考区间验证的基础上应用。必要时进行生物变异度评估。

8.2 数据储存

淋巴细胞亚群检测的标准操作程序、室内质控和室间质评数据及设备保养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细胞术相关理论知识、淋巴细胞亚群检测标准化操作和临床意义等培训，培训考核通过后方可上岗。

附 录 A
(资料性)
流式细胞仪的散射光分辨率验证示意图

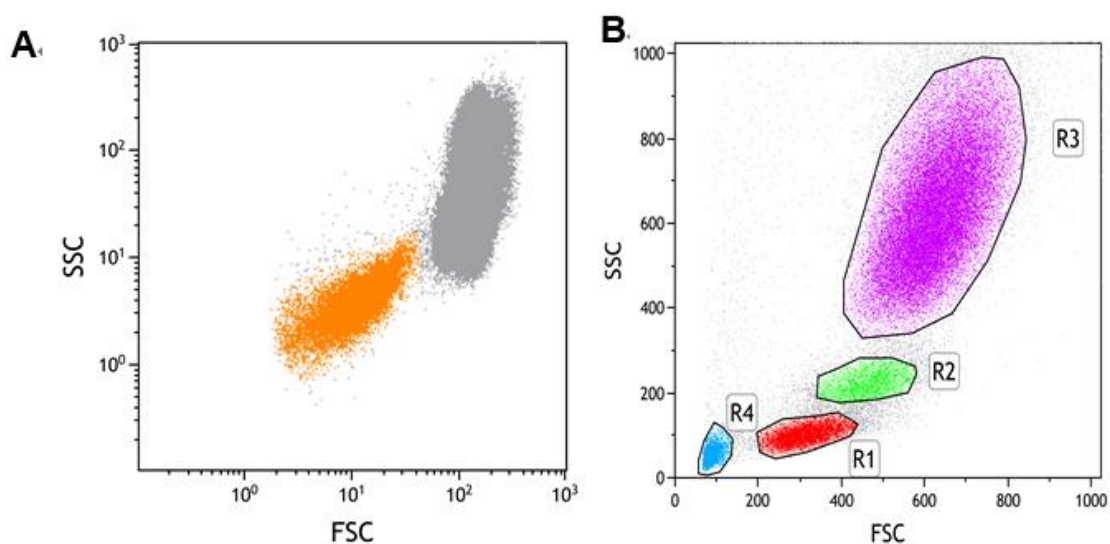


图 A.1 FSC/SSC 散点图区分抗凝全血细胞群

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 散点图可将红细胞和部分白细胞（灰色）和血小板（橙色）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群（R1，红色）、单核细胞群（R2，绿色）、粒细胞群（R3，紫色）、非白细胞群（R4，蓝色）清晰地区分开。

附录 B (资料性)

流式细胞术四色抗体组合方案检测淋巴细胞亚群的示意图

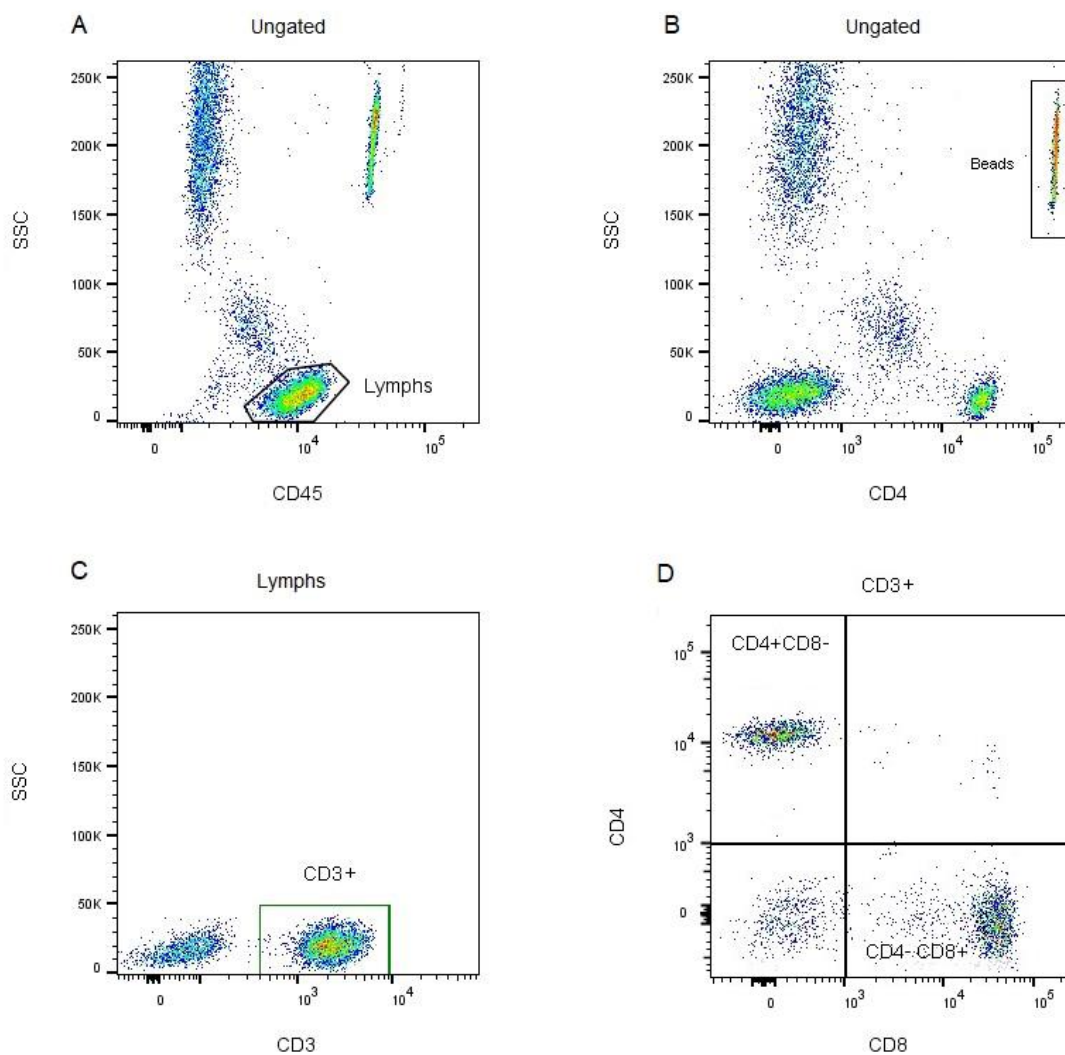


图 B.1 四色抗体组合方案 CD45/CD3/CD4/CD8 的检测示意图

四色抗体组合方案第一管荧光单抗组合 CD45/CD3/CD4/CD8，含绝对计数微球，用于检测 T 淋巴细胞、CD4⁺辅助/诱导 T 细胞和 CD8⁺抑制/细胞毒 T 细胞。Ungated: 未设门，Lymphs: 对淋巴细胞群设门，Beads: 绝对计数微球。图 B.1A): 在 CD45/SSC 散点图中，对 CD45⁺淋巴细胞群设门。图 B.1B): 在 CD4/SSC 散点图中，圈取绝对计数微球数目。图 B.1C): 在 CD45⁺淋巴细胞的 CD3/SSC 散点图中，对 CD3⁺T 淋巴细胞设门。图 B.1D): 在 CD3⁺T 淋巴细胞的 CD8/CD4 荧光散点图中，分别对 CD4⁺CD8⁻T 辅助/诱导淋巴细胞和 CD4⁻CD8⁺细胞 T 抑制/细胞毒淋巴细胞进行计数。

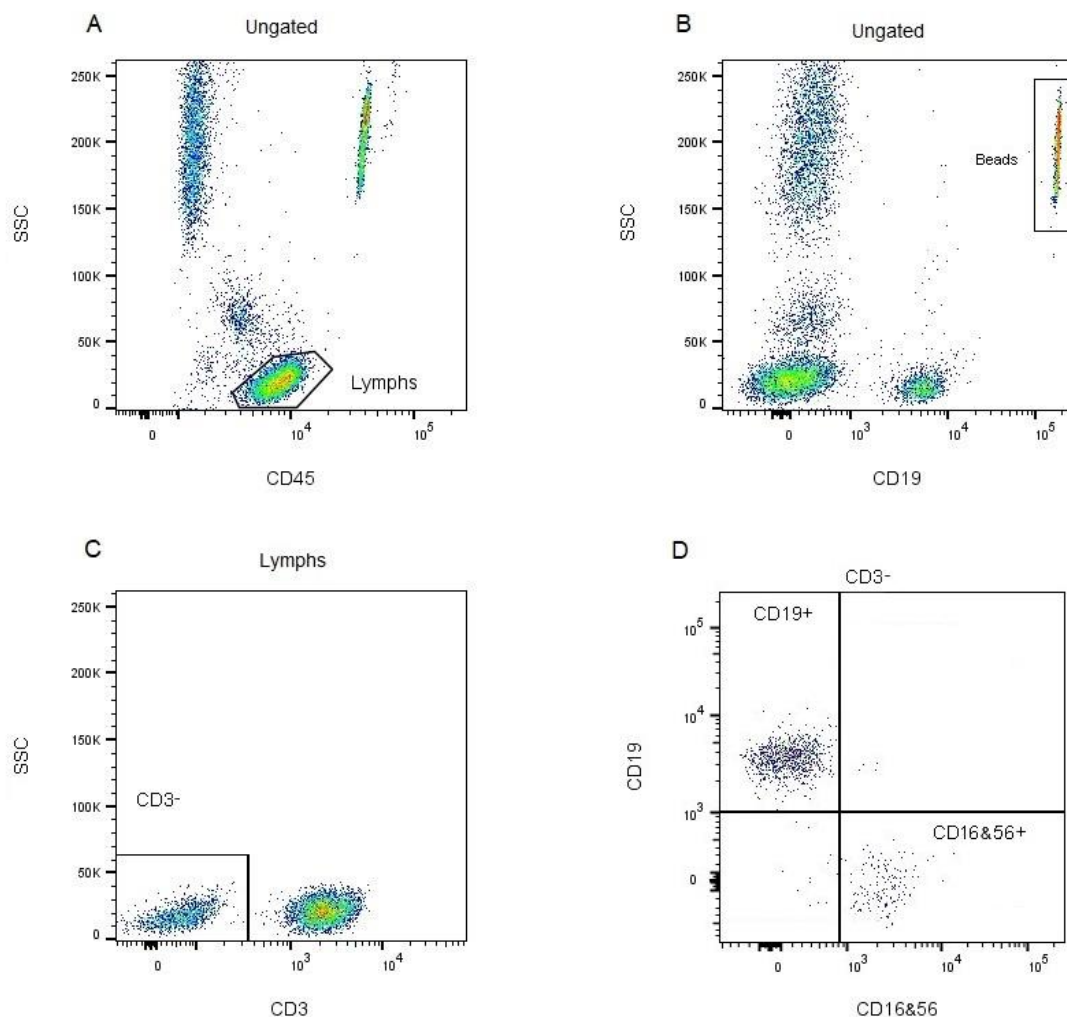


图 B.2 四色抗体组合方案 CD45/CD3/CD16&CD56/CD19 的检测示意图

四色抗体组合方案第二管荧光单抗组合CD45/CD3/CD16&CD56/CD19，含绝对计数微球，用于检测T淋巴细胞、B淋巴细胞和NK细胞。Ungated: 未设门, Lymphs: 对淋巴细胞群设门, Beads: 绝对计数微球。图 B. 2A): 在CD45 /SSC散点图中, 对CD45⁺淋巴细胞群设门。图 B. 2B): 在CD19/SSC散点图中, 圈取绝对计数微球数目。图 B. 2C): 在CD45⁺淋巴细胞的CD3/SSC散点图, 对CD3⁻淋巴细胞(B细胞和NK细胞)群设门。图 B. 2D): 在CD3⁻淋巴细胞的CD16&56/CD19荧光散点图中, 分别对CD19⁺B淋巴细胞和CD16&56⁺NK细胞进行计数。

附录 C (资料性)

流式细胞术六色抗体组合方案检测淋巴细胞亚群的示意图

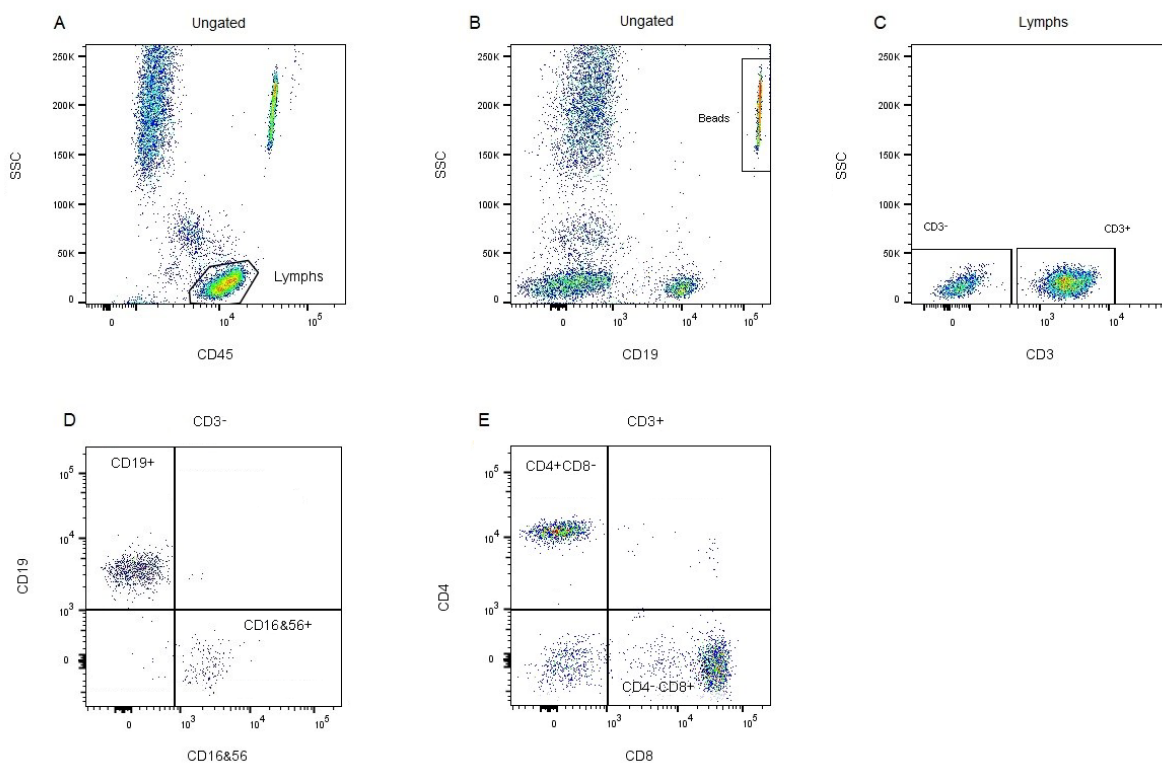


图 C.1 六色抗体组合方案 CD45/CD3/CD4/CD8/CD19/CD16&CD56 的检测示意图

单管六色方案荧光抗体组合 CD45/CD3/CD4/CD8/CD19/CD16&CD56, 含绝对计数微球, 用于检测 T 淋巴细胞、CD4⁺辅助/诱导 T 细胞、CD8⁺抑制/细胞毒 T 细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞。Ungated: 未设门, Lymphs: 对淋巴细胞群设门, Beads: 绝对计数微球。图 C.1A): 在 CD45/SSC 散点图中, 对 CD45⁺淋巴细胞设门。图 C.1B): 在 CD19/SSC 散点图中, 圈取绝对计数微球数目。图 C.1C): 在 CD45⁺淋巴细胞的 CD3/SSC 散点图中, 分别对 CD3⁺T 淋巴细胞以及 CD3⁻淋巴细胞 (B 淋巴细胞和 NK 细胞) 设门。图 C.1D): 在 CD3⁻T 淋巴细胞的 CD16&56/CD19 荧光散点图中, 分别对 CD19⁺B 淋巴细胞以及 CD16&56⁺NK 细胞进行计数。图 C.1E): 在 CD3⁺T 淋巴细胞的 CD8/CD4 散点图中, 分别对 CD4⁺CD8⁻辅助/诱导 T 淋巴细胞和 CD4⁻CD8⁺抑制/细胞毒 T 淋巴细胞进行计数。

参 考 文 献

- [1] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved guideline, 2nd Edition, H42-A2, 2007.
- [2] Australasian Cytometry Society: ACS guideline for lymphocyte subset immunophenotyping, 2017.
- [3] 国家食品药品监督管理总局. 流式细胞仪:YY/T 0588—2017. 2017.
- [4] Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic multicolor flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*, 2017, 117:5.4.1–5.4.38.
- [5] 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. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(5): 291–308.
- [6] Wood B, Jevremovic D, Béné MC, Yan M, et al. ICSH/ICCS Working Group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part V - assay performance criteria. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(5):315–323.
- [7] Selliah N, Eck S, Green C, Oldaker T, Stewart J, Vitaliti A, Litwin V. Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Curr Protoc Cytom*, 2019, 87(1):e53.
- [8] Degandt S, Peeters B, Jughmans S, Boeckx N, Bossuyt X. Analytical performance of an automated volumetric flow cytometer for quantitation of T, B and natural killer lymphocytes. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(8):1277–1288.
- [9] 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. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, 74(2): 79–90.
- [10] Li C, Peng M, Xu D, et al. Commutability assessment of reference materials for the enumeration of lymphocyte subsets. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(5): 697–706.
- [11] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, 3rd Edition, EPC28-A3c, 2010.
- [12] Ozarda Y, Higgins V, Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(1): 30–37.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 临床实验室检验项目参考区间的制定:WS/T 402—2012. 2012.
- [14] 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. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(005):356–360.
- [15] 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. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(5): 403–408.
- [16] Huang C, Li W, Wu W, et al. Intra-day and inter-day biological variations of peripheral blood lymphocytes. *Clin Chim Acta*, 2015, 438(1): 166 – 170.