



# 中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 360—2011

---

## 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

2011-12-14 发布

2012-06-01 实施

---

中华人民共和国卫生部 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准主要起草单位：中国医学科学院北京协和医院。

本标准主要起草人：崔巍、黄春梅、王斐、杨卓、陈倩。

## 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细胞、B细胞、NK细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞)的技术要点,包括标本采集和运输、免疫荧光染色技术、流式细胞仪检测和分析、结果报告和审核等方面。

### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 2.1

**分化抗原 cluster of differentiation, CD**

不同谱系细胞在分化、成熟、活化过程中,出现或消失的细胞表面标志。细胞表面标志通常用单克隆抗体来识别。每个抗体都有指定的CD编号,能被特定抗体识别的特定抗原通常具有相同的编号,例如,被“CD1抗体”识别的抗原称为“CD1抗原”。

#### 2.2

**前向散射光 forward angle light scatter FALS, FSC, FS**

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

#### 2.3

**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和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。

#### 2.4

**荧光强度 fluorescence intensity**

结合到细胞或颗粒上的荧光素的量。荧光信号的通道数越大提示荧光强度越强。在恰当的条件下,荧光强度与一个细胞和特定荧光素相结合的位点数相关。

#### 2.5

**自发荧光 autofluorescence**

未染色细胞自身发出的荧光。通常由嘧啶和黄素核苷酸所产生,自发荧光的强度取决于激发光的波长,且随所分析细胞的类型和(或)细胞活化状态而改变。通过特殊的标本处理方法可以降低自发荧光的强度(如用结晶紫孵育)。

#### 2.6

**颜色补偿 color 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。

#### 2.7

**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/SSC等)来确定的所要分析的目

的细胞群,对限定区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。

## 2.8

### 双平台方法 dual-platform method, DP

用于流式细胞术测定细胞绝对计数的一种方法,结果来源于流式细胞仪和第二种仪器的检测。第二种仪器通常是血细胞分析仪。流式细胞仪用于获取出现于较多量靶细胞群中的目的细胞亚群的比例,靶细胞群通常是淋巴细胞群或白细胞群。用第二种仪器分析同一标本靶细胞群的绝对浓度。这两个测定结果相乘所得即为目的细胞群的绝对浓度。该方法的缺点是包含两种体系的系统误差。

## 2.9

### 单平台方法 single-platform method, SP

用于流式细胞术测定细胞绝对浓度的一种方法,所有结果均来自流式细胞仪一台仪器的测定。浓度的测定可以直接通过测定体积的方法或间接的通过加入已知浓度的荧光微球来计算。单平台方法免去了第二台仪器的所产生的系统误差。

## 3 试剂

### 3.1 荧光素标记的单克隆抗体

采用荧光素直接标记的单克隆抗体(单抗),称直标抗体。选择直标抗体是淋巴细胞亚群分析的关键步骤,要考虑所选抗体对细胞的反应性。

#### 3.1.1 单抗

CD45、CD3、CD4、CD8、CD19、CD16、CD56。

#### 3.1.2 单抗对细胞的反应性

CD45 表达于所有白细胞;CD3 表达于 T 淋巴细胞;CD4 表达于 T 辅助/诱导淋巴细胞(CD4<sup>+</sup> T 细胞)和单核细胞;CD8 表达于细胞毒 T 细胞(CD8<sup>+</sup> T)和 NK 细胞;CD19 表达于 B 淋巴细胞;CD16 表达于 NK 细胞、单核巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞等;CD56 表达于 NK 细胞和细胞毒 T 细胞。

#### 3.1.3 单抗对淋巴细胞亚群的鉴定

CD4、CD8、CD16 和 CD56 单抗均不能特异性标记淋巴细胞某一亚群。采用 CD45 和(或)CD3 作为设门抗体,同时兼做质控试剂。CD3<sup>+</sup> T 细胞标记为 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T 细胞标记为 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 细胞标记为 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, B 细胞标记为 CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>, NK 细胞标记为 CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> 或 CD3<sup>-</sup> CD(16+56)<sup>+</sup>。

#### 3.1.4 直标抗体常用荧光染料

异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE/RD1)、藻红蛋白偶联物(PECY5)、多甲藻叶绿素蛋白(PerCP)、藻红蛋白-德州红偶联物(ECD)和别藻青蛋白(APC)。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。

## 3.2 溶血素

使用与仪器相匹配的溶血素(内含固定液),并严格按照使用说明和注意事项进行操作。如果使用没有固定作用的溶血剂(如氯化铵和低渗缓冲液等),染色后标本需要保存在 4℃,并在 1 h 内完成上机

检测。

### 3.3 定量微球

用于淋巴细胞亚群绝对计数。常用的商品化荧光微球包括 Flow-Count™ (Beckman-Coulter)、FCSC Count Standard™ (Flow Cytometry Standards Corporation) 和 TruCount™ (Becton Dickinson) 等。

## 4 标本采集和处理

### 4.1 生物安全

血液和体液标本中可能存在致病性甚至致死性的活体病原微生物,所有标本都应当作潜在传染源来处理。

#### 4.1.1 标本采集

避免被针头刺伤,针头丢弃入利器盒中,严禁复帽、弯曲、折断针头或者从注射器上取下针头。

#### 4.1.2 安全着装

所有接触血液标本的人员都应戴手套、穿实验室工作服。当标本处理过程中有飞溅的可能性,应带好口罩和防护眼罩,避免眼、口、鼻等部位接触标本。在所有工作结束后和离开实验室前,应脱掉手套并洗手。

#### 4.1.3 生物安全柜(BSC)

所有的操作都应该在生物安全柜中进行(I类或II类BSC);即使条件不允许,对于可能产生微粒或气溶胶的操作(如涡旋、打开真空管等)仍需要在BSC中进行。

#### 4.1.4 离心

标本离心时需要放在封闭的容器中,避免气溶胶形成。

#### 4.1.5 吸量

应用手工或电动移液器,严禁用嘴吸量。

#### 4.1.6 利器

避免使用利器,如针头、玻璃巴斯德移液管、玻璃容器等。

#### 4.1.7 血液溢洒

血液溢洒时,立即用合适的试剂擦拭干净,如1:10稀释的新鲜配制的0.71 mol/L次氯酸钠(未稀释的家用漂白剂)或适当稀释的医用消毒剂。

#### 4.1.8 废弃物处理和标本灭活

实验室废弃物处置的管理应符合国家、地方的相关要求,所有不再需要的标本和其他生物材料应弃置于套有生物危险标志的黄色密封且防漏的塑料袋的容器内,用过的针头等利器应放入利器盒中。

实验室标本需要事先灭活处理,将标本与广谱碘伏和漂白剂混合作用24 h后再进行适当处理。由于漂白剂与氯化铵作用可产生有毒的氯气,故漂白剂不能用于处理含有氯化铵的溶液。

#### 4.1.9 固定液

0.1%~2.0%多聚甲醛或甲醛缓冲液是常用的固定液,用于对感染的标本在分析前进行灭活,能够灭活 HIV 等病毒的 3 个~5 个对数级的病毒载量。在染色过程中的最后一次离心后,用含有多聚甲醛或甲醛缓冲液(pH7.0~7.4)处理,4℃保存待测。建议每周配置新鲜的多聚甲醛或甲醛缓冲液。使用含有固定液成分的商品化裂解液时,无需再重复使用多聚甲醛或甲醛缓冲液。

#### 4.1.10 非固定标本

对于非固定标本,实验室应制定合适的生物安全规则以将感染病原体的暴露降到最小。由于暴露在空气中的流式细胞仪液流系统产生的气溶胶具有潜在的危险,所以应提高警惕,严格按照制造商的生物安全建议进行操作。

#### 4.1.11 设备消毒

流式细胞仪的废液桶中需要装有占其体积 1/10 的 0.71 mol/L 次氯酸钠(未稀释的家用漂白剂)。实验室设备应该用具有灭活传染源作用的溶液或新配制的 10%家用漂白剂消毒,尤其在设备维修和保养前给予严格消毒。

#### 4.2 标本标识

所有检测用标本应及时贴上标签,标签上应注有患者的姓名、患者唯一的识别码、检测项目、标本采集的日期和时间,必要时标注检测实验室。如果使用检查申请单,申请单应和标本粘贴在一起送检,申请单上应标明患者的姓名、检测项目、年龄、性别、标本采集日期和时间、申请医生的姓名和标本类型(如:全血),必要时标注检测实验室。

#### 4.3 抗凝剂和采集容器

首选乙二胺四乙酸盐(EDTA-K2/EDTA-K3)抗凝真空管进行标本采集,亦可采用肝素钠抗凝或枸橼酸钠抗凝(ACD)的真空管进行采集,EDTA 盐抗凝标本在室温下稳定保存 12 h~24 h,超过 30 h 的 EDTA 盐抗凝标本中粒细胞可能会减少,肝素钠或枸橼酸钠抗凝标本可稳定保存至 48 h。如果标本用血细胞分析仪同时进行白细胞计数和分类,则应该选择 EDTA 盐作为抗凝剂。

#### 4.4 标本质量

##### 4.4.1 标本目视观察

可观察到的标本问题常见有两种类型:一是变性或损坏的标本,这需要立即弃之。二是在标本处理过程中出现错误操作,这需要进行进一步评价。错误操作问题需要记录下来,这对标本的处理、分析以及结果的解释都很有帮助。

##### 4.4.2 溶血

严重溶血的标本应该放弃检测,所有可能破坏标本完整性的异常情况均应密切观察,并且记录下来,以利于后续的处理、分析和结果解释。

##### 4.4.3 凝血

即使是很小的血凝块也会引起血液中某些成分的选择性丢失或改变,凝血的标本尽可能弃用。

##### 4.4.4 温度极限

如果标本是通过长距离的路程送到实验室的,标本就有可能暴露在非允许储存温度的环境中,所以

接到标本后应确认标本是否过热或过冷。即使其他所有的鉴定标准都正常,也应记录下来以利于后续的处理、分析和结果解释。

#### 4.4.5 错误标本标签

如果标本没有唯一标识或标本标签与患者信息不符(患者姓名与标识不符),应该拒收标本,并及时与相关医护人员沟通。

#### 4.4.6 标本保存时间及储存条件

可接受的标本最长保存时间取决于抗凝剂的种类、溶血剂、储存条件及细胞浓度。实验室应该根据使用的抗凝剂和溶血剂确定可接受的标本最长保存时间。实验室应选择适当的保存环境以及溶血方法,使保存标本的检测结果与新鲜标本之间没有明显差别。原则上标本采集后应该立即检测,但是实际操作中往往无法做到。不能立即检测的标本应该保存于室温( $18^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ )环境中。后续的标本处理和免疫染色应严格按照试剂说明书进行。

#### 4.4.7 标本处理方法

采用全血溶血法,以便尽可能地回收所有的白细胞。但对于慢性肝病或高脂血症等患者的标本,由于脂质代谢异常导致红细胞脆性下降,溶血素常常无法完全裂解红细胞,需要采用密度梯度离心法;但需要注意的是密度梯度离心法使用密度梯度或冗长的离心步骤,容易导致特殊亚群的不均匀丢失。

标本处理的步骤越多,细胞丢失就越多。而这种丢失在白细胞分类中的比例是不均等的。对于全血标本,溶血后不能洗涤,这可以使标本处理的步骤减到最少。

### 4.5 标本运送

#### 4.5.1 内部送检

同一实验室内转移血液标本,盛放血液标本管的容器应标有生物危险标志,并且在血液标本管有破损的情况下,仍能够容纳标本,可用具有防漏密封层的塑料袋或带有安全盖的塑料容器等。

#### 4.5.2 外部送检

危险物品运送规定和国际航空运输协会(IATA)危险品规则对含有致病原血液标本的运送均有相关规定。HIV 已被列为 UN2814 类危险物质,感染级别为 6.2。包装应符合 UN6.2 级别高致病性病原体的安全运输包装标准,标准包装要求含有三层体系:

- a) 防水内容器;
- b) 防水并含有吸附材料的第二层内容器;
- c) 坚固的外包装。

采集标本应在室温( $18^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ )环境下尽快送检。

### 5 细胞绝对计数方法

#### 5.1 单平台方法

##### 5.1.1 白细胞浓度和抗体用量

通过计数板计数或使用血细胞分析仪预先计算标本中的白细胞浓度,并严格按照操作说明书调整标本和抗体的最佳比例。淋巴细胞过少的标本应减少单抗用量。淋巴细胞过多的标本应使用含 1% 白蛋白或其他蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释到适当浓度。

### 5.1.2 移液量

标本和荧光微球的移液量应精确,确保准确计数加入的定量微球的浓度和标本体积。

### 5.1.3 移液次数

使用包被有已知数量的荧光微球的标本处理管,只需移液一次;而直接在标本中加入已知浓度的荧光微球悬液,需要移液两次。

### 5.1.4 离心

为避免荧光微球的丢失,在裂解细胞后不要离心洗涤。

## 5.2 双平台方法

淋巴细胞亚群绝对计数由全血细胞分析仪测定的白细胞计数计算得到,不能使用淋巴细胞计数进行计算。

单平台方法是首选方法,它减轻了室间变异并避免了多台仪器间的系统误差。

## 6 免疫荧光染色

### 6.1 抗体组合方案

#### 6.1.1 联合 CD45 的四色方案

##### 6.1.1.1 CD45/CD3/CD4/CD8

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞。

##### 6.1.1.2 CD45/CD3/CD19/CD16 和(或)CD56

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。

#### 6.1.2 联合 CD45 的三色方案

##### 6.1.2.1 CD45/CD3/CD4

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>T 细胞。

##### 6.1.2.2 CD45/CD3/CD8

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞。

##### 6.1.2.3 CD45/CD3/CD19

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 B 细胞。

##### 6.1.2.4 CD45/CD3/CD16 和(或)CD56

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞。

### 6.1.3 双色方案

#### 6.1.3.1 CD3/CD4

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>T 细胞。

### 6.1.3.2 CD3/CD8

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞。

### 6.1.3.3 CD3/CD19

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 B 细胞。

### 6.1.3.4 CD3/CD16 和(或)CD56

检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞。

当检测条件不允许时,也至少要采用 CD3 与其他直标抗体进行双免疫荧光染色的方案,简称双色方案。不能使用单色方案进行淋巴细胞亚群分析。

### 6.1.4 7-氨基放线菌素 D(7-AAD)联合 CD45 方案

对于超过 24 h 的标本或肉眼观察发现已经变质的标本,使用 7-氨基放线菌素 D 结合 CD45(评估淋巴细胞、单核细胞和粒细胞死亡)复染进行细胞活力的评估。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。对于不可替代的或活力较低的标本,应采用 7-AAD 结合 6.1.1 或 6.1.2 或 6.1.3 的组合方案。

## 6.2 免疫荧光染色

### 6.2.1 标本与抗体孵育

适量体积(50  $\mu$ L~200  $\mu$ L)全血标本加入适量直标抗体(10  $\mu$ L~20  $\mu$ L),室温孵育时间 20 min~30 min。

### 6.2.2 裂解红细胞

裂解红细胞的方法与使用的溶血素有关,裂解时间和方法按照所用溶血素说明书进行操作。

### 6.2.3 离心

离心洗涤方法与溶血素有关,按照所用溶血素说明书进行操作。单平台绝对计数法在裂解红细胞后,不要离心洗涤,并在上机检测前向待测标本中加入定量荧光微球。

### 6.2.4 染色后标本保存

制备好的标本在上机分析前在 40  $^{\circ}$ C~10  $^{\circ}$ C 下避光保存,并在 24 h 内上机检测,检测前混匀细胞。

推荐使用商品化组合抗体的体外诊断试剂。如实验室自己准备组合单抗,要求在每次试验前新鲜配制。组合抗体中每一种抗体都需要分别滴定以明确其噪音与阳性信号的最佳分离滴度,并检测作为组合抗体使用和作为组合抗体的成分之一单独使用的平均荧光强度和阳性率,其可比性需在均值  $\pm 2SD$  之内。

## 7 对照标本

### 7.1 同型对照

淋巴细胞亚群分析不需要同型对照,这是因为 CD3、CD4 和 CD8 阳性细胞独立成群,与阴性细胞群容易区分。

## 7.2 针对方法学的阳性对照

### 7.2.1 目的

监测流式细胞仪上机分析前的环节是否出现问题。由于某种疾病导致方法学阳性对照的结果在参考范围之外,不会造成同时处理的其他标本的检测结果出现错误。由于裂解红细胞不完全或染色效果差,包括阳性对照在内的所有标本都会出现结果偏差。

### 7.2.2 种类

全血标本、商品化荧光微球试剂。

### 7.2.3 使用频率

每次上机时都需要使用。

## 7.3 评价试剂的阳性对照

### 7.3.1 目的

检测新批号试剂和当前批号试剂的染色效率是否出现问题。当怀疑试剂出现问题时,采用该试剂与已知可接受性能批号的试剂同时操作进行验证。

### 7.3.2 种类

全血标本、冻干淋巴细胞。

### 7.3.3 使用频率

更换试剂前后。

## 8 流式细胞仪的质量控制

### 8.1 验证和调整光路及规范光路设置

#### 8.1.1 电压和增益

在每次开机时,首先采用荧光微球光路质控品设置和调整仪器光学检测通道的电压和增益,确保其处于厂家或实验室根据特定的实验状态所设定的可接受范围内,并且保持每次开机时仪器性能稳定,对荧光抗体或全血标本最适合。

#### 8.1.2 峰值及变异系数

调整散射光峰和荧光峰,使之置于相应通道的同一狭小范围内,要求所有光学检测通道所使用的光学参数和荧光参数均为均质峰,其变异系数应符合所用流式细胞仪的技术要求。

#### 8.1.3 仪器设置的标准化

连续 5 d 上机测定荧光微球在每个光学检测通道的平均通道数和变异系数(CV%),每天共测定 4 次,然后计算出这些参数的均数( $\bar{x}$ )及标准差(SD),以  $\bar{x} \pm 2SD$  为可接受范围。当出现偏差时,应查找和解决问题,再进行光路的重新调整。维持上述的仪器设置条件,用于后续的仪器敏感性和荧光补偿设置的监测。

## 8.2 调整荧光分辨率

### 8.2.1 光路电压

采用未加直标抗体但经溶血素裂解的新鲜全血标本调整光电倍增管(PMT)电压。未染色淋巴细胞的自发荧光应完全在阴性区域,所使用的检测通道内荧光直方图的淋巴细胞阳性率 $<2\%$ ,双荧光散点图内的未染色细胞位于散点图的左下象限内。

保持与检测临床标本时相同的 PMT 电压设置,用已知相对荧光强度的荧光微球上机测定,如仪器厂商提供的标准品。通过连续 5 d、共 20 次的重复测定得到每一种荧光微球的可接受平均荧光强度范围。要求每一种荧光微球的平均荧光强度检测值,其相关系数应 $\geq 0.98$ 。在仪器 PMT 电压不变的情况下,各种荧光微球的荧光线性、平均荧光强度差异应保持不变。荧光线性图的绘制遵从制造商的建议。

### 8.2.2 弱表达和自发荧光

评价标准品或校准品或细胞对弱表达荧光与自发荧光的区分能力。

### 8.2.3 峰间变异系数

确定峰间最小的可接受数据,监测此差异并校正任何日常偏差。

流式细胞仪应使每个荧光检测通道都能将弱表达峰和自发荧光峰区分开,每月进行一次或按照仪器制造商的推荐周期执行。

## 8.3 调整荧光补偿

### 8.3.1 目的

当采用两种及以上抗体组合方案进行淋巴细胞亚群分析时,或当光学检测通道的电压及增益发生变动时,或当仪器维修保养后,都需要进行荧光补偿调整。

### 8.3.2 方法

#### 8.3.2.1 荧光补偿试剂

选择与最强荧光信号相匹配的补偿试剂。三色抗体组合分析时,通过含有荧光微球或细胞补偿颗粒的 4 个单标记标本管调整补偿,包括无直标抗体标本管、仅含 FITC 直标抗体阳性标本管、仅含 PE 直标抗体阳性标本管、仅含第三种直标抗体阳性标本管。四色抗体组合分析时,需要在三色抗体组合分析的基础上,增加仅含第四种直标抗体阳性标本管。

#### 8.3.2.2 三色组合方案的荧光补偿

三色抗体组合分析时,补偿应按适当的顺序进行,依次为 FITC、PE 和第三种荧光。将不应该是两种荧光抗体双阳性的细胞群调整到相应的直角荧光象限中,使双阳象限中无荧光重叠。避免过度补偿,以防将双阳性细胞错误地识别为单阳性细胞。

#### 8.3.2.3 四色组合方案的荧光补偿

按照操作说明书执行,避免过度补偿。可以采用手工方式,也可以采用软件自动补偿方式。

## 8.4 性能评估

### 8.4.1 准确度

通过将自己实验室的检测结果与参考实验室的检测结果进行比对获得。

#### 8.4.2 特异度

每个实验室需要就流式细胞术检验结果与参考方法(如免疫荧光染色法)检验结果的偏差,建立实验室内部可接受的偏差率。推荐可接受偏差率为5%,每3个月进行一次特异性检测。

#### 8.4.3 灵敏度

依赖于单抗滴度、仪器最佳性能状态的建立与仪器校准、检测细胞数量和细胞进样速率等。抗体滴定的测试、新使用抗体的平行测定都是需要的,并要求做好相应文件记录。

#### 8.4.4 精密度

用于衡量单份标本荧光染色的可重复性和仪器的可重复性。推荐使用正常外周血。荧光染色的可重复性要求对同一份标本测定 $\geq 10$ 次,并以均数( $\bar{x}$ )及标准差( $SD$ )表示,以 $\bar{x} \pm 2SD$ 作为允许波动范围。仪器可重复性的检测要求对同一份染色标本进行 $\geq 3$ 次的测定,要求检测结果在 $\bar{x} \pm 2SD$ 范围内。

每个实验室需要建立评价准确度、特异度、灵敏度和精确度的办法和标准。

### 8.5 比对

#### 8.5.1 目的

实验室有多台流式细胞仪都进行外周血淋巴细胞亚群检测时,要求每半年进行一次仪器性能间比对。

#### 8.5.2 方法

选择5个~10个临床标本,按照实验室标准操作规程(SOPs)对标本进行染色处理和上机测定,不同仪器间的检测结果应达到实验室制定的可接受区间。如结果超出可接受区间,需要分析原因,按照实验室制定的校正程序对结果进行纠正。

### 8.6 仪器质控日志

保存仪器质量控制日志,持续监测所有参数的变化。在日志中记录仪器设置、峰值通道、监测仪器状态的变异系数(CV)、标准化、荧光分辨率和荧光补偿等数据。绘制成Levy-Jennings图,每月打印进行保存。当这些数据出现偏倚或仪器被维修保养后,需要重新建立散色光和荧光参数的靶值。

### 8.7 仪器维护

仪器整体保养半年一次,由厂家工程师协助完成。光电倍增管(PMT)每月检测一次,由厂家工程师协助完成。

## 9 标本和数据分析

### 9.1 验证可接受的标本活力

#### 9.1.1 目的

染色过程中产生假阳性的主要原因是没有活力的细胞的干扰,因此每个实验室都应该建立一套方法来评估经过处理和染色后的标本活力。当标本放置超过24 h后或出现肉眼可见的细胞坏死征象(如细胞碎片增多、标本浑浊等)时,需要检测染色后的标本活力。

### 9.1.2 方法

见 6.1.4。

### 9.1.3 判定标准

将 7-AAD 阴性细胞群计数为 75% 时称为最低细胞活力。对于低于 75% 的细胞活力的标本,采用 6.1.4 方案。

## 9.2 取样代表性

### 9.2.1 标本混匀

为了避免不同血细胞沉降速率引起的人为误差,标本在上机前应充分混匀。

### 9.2.2 取样代表性判断

当染色标本的光散射特征出现异常时,考虑与取样的代表性有关,因为反应染色细胞大小和密度差异的光散射特性会影响相对细胞沉降速率。

### 9.2.3 取样代表性验证

通过比较同一标本充分混合后的分析结果与放置一段时间后(相当于标本分析的最长预期时间)的分析结果,来验证取样是否均一,以充分混匀的标本的分析结果为准。

## 9.3 联合 CD45 和 SSC 设门确定淋巴细胞群

### 9.3.1 设定阈值或分辨值

根据仪器操作说明书进行设定。

### 9.3.2 调整细胞群分布

在 CD45/SSC 散点图中,调整 SSC,使所有白细胞群均可见。

### 9.3.3 根据 CD45 强阳性细胞群设门或划定区域(见附录 A)

淋巴细胞群呈现 CD45 强阳性和 SSC 弱表达,设门时尽可能包括所有淋巴细胞,门内淋巴细胞数不低于 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,单核细胞的 CD45 呈弱表达,而 SSC 呈中等强度表达;嗜碱性粒细胞的 CD45 和 SSC 均为低表达。

### 9.3.4 采集细胞数

在非设门荧光散点图中,每一荧光通道至少收集 5 000 个淋巴细胞,以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。

### 9.3.5 T、B 和 NK 细胞相对计数的总和

占淋巴细胞总数的 100%±5% 范围内。

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

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 双参数散点图中显示, 以监测设门的准确性。

定位淋巴细胞群是淋巴细胞亚群分析的第一步, 并排除标本中非淋巴细胞或细胞碎片对淋巴细胞群的干扰。

#### 9.4 淋巴细胞亚群分析和计数(见附录 A)

##### 9.4.1 双参数荧光散点图的设置

设置 CD3/CD4 散点图、CD3/CD8 散点图、CD3/CD19 散点图、CD3/CD56 或 CD(16+56)散点图。

##### 9.4.2 四象限门的设置

在每一荧光散点图中, 设置四象限门, 将 CD45/SSC 散点图中选定的淋巴细胞群中的表达该抗原的阴性细胞群和阳性细胞群区分开来。

##### 9.4.3 淋巴细胞亚群相对计数

###### 9.4.3.1 CD4<sup>+</sup> T 细胞相对计数(百分比, %)

CD3/CD4 散点图中 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 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。

###### 9.4.3.2 CD8<sup>+</sup> T 细胞相对计数(百分比, %)

CD3/CD8 散点图中 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 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。

###### 9.4.3.3 B 细胞相对计数(百分比, %)

CD3/CD19 散点图中 CD3<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> 细胞群占 CD45/SSC 散点图中选定的淋巴细胞群的百分比。

###### 9.4.3.4 NK 细胞相对计数(百分比, %)

CD3/CD56 或 CD(16+56)散点图中 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 细胞群或 CD3<sup>+</sup> CD(16+56)<sup>+</sup> 占 CD45/SSC 散点图中选定的淋巴细胞群的百分比。

###### 9.4.3.5 CD3<sup>+</sup> T 细胞相对计数(百分比, %)

在上述任意散点图中均可计数, 在 CD3/CD4 散点图中计数为 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> 单阳性细胞群百分比和 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 双阳性细胞群百分比的总和, 在 CD3/CD8 散点图中计数为 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 单阳性细胞群百分比和 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 双阳性细胞群百分比的总和, 在 CD3/CD19 散点图中计数为 CD3<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> 细胞群百分比, 在 CD3/CD56 或 CD3/CD(16+56)散点图中计数为 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> 或 CD3<sup>+</sup> CD(16+56)<sup>-</sup> 百分比和 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 或 CD3<sup>+</sup> CD(16+56)<sup>+</sup> 百分比的总和。

##### 9.4.4 淋巴细胞亚群绝对计数

###### 9.4.4.1 双平台方法

根据 9.4.3 方法检测的淋巴细胞亚群相对计数, 通过双平台方法计算出绝对计数(绝对值,  $\times 10^6/L$ )。白细胞计数需要与亚群分析使用同一标本进行测试, 并在 6 h 内完成。当白细胞计数不能准确获得时,

不能用双平台方法进行淋巴细胞绝对计数,只能采用单平台方法。不能采用淋巴细胞计数来计算淋巴细胞亚群绝对计数,因为淋巴细胞计数在血细胞分析仪上表现出更大的变异度,白细胞计数作为分母比淋巴细胞计数更为稳定。

$$\text{淋巴细胞亚群绝对计数(绝对值)} = \frac{\text{CD45 高表达区细胞数}}{\text{荧光微球区粒子数}} \times \frac{\text{所加入的总的荧光微球数}}{\text{所加入的血量}}$$

#### 9.4.4.2 单平台方法

淋巴细胞亚群绝对计数直接来源于流式细胞仪数据,由专用软件直接计算生成,详见试剂操作说明书。

### 9.5 数据分析可靠性的验证

#### 9.5.1 CD45

在三色和四色抗体组合方案的每一检测标本管中均存在,在对淋巴细胞群进行设门的同时,也具有监测和评估标本管间变异性的作用。

#### 9.5.2 CD3

在四色抗体组合方案和双色方案的每一检测标本管中均存在,标本管间 CD3<sup>+</sup>T 细胞计数的重复结果间的差异应≤3%。当 CD3 在某一标本管中的计数与其他标本管之间的差值>3%时,应重做该管标本,包括重新染色、裂解红细胞和固定等。

#### 9.5.3 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞相对计数的总和

CD4<sup>+</sup>T(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)细胞和 CD8<sup>+</sup>T(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)细胞百分比的总和应该等同于 CD3<sup>+</sup>T(CD3<sup>+</sup>)细胞的百分比,变化范围在 5%~10%。

当结果超过上述控制范围时,考虑标本中可能包含大量异常 T 细胞亚群,如 TCR-γ δ<sup>+</sup>T 细胞, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>或 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>T 细胞。

#### 9.5.4 定量微球采集时间的稳定性

用于单平台方法评估绝对计数的准确性。采集时间恒定,提示流式细胞仪的液流系统通畅,定量微球的加入量准确。采集时间不恒定,提示标本制备过程中出现问题,需要重新制备标本。

## 10 临床意义

### 10.1 CD4<sup>+</sup>T 细胞

减少常见于恶性肿瘤、遗传性免疫缺陷症、艾滋病、应用免疫抑制剂等。

### 10.2 CD8<sup>+</sup>T 细胞

#### 10.2.1 增多

见于系统性红斑狼疮、慢性活动性肝炎、传染性单核细胞增多症、恶性肿瘤及其他病毒感染等。

#### 10.2.2 减低

见于类风湿性关节炎、糖尿病等。

### 10.3 CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T 比值

#### 10.3.1 降低

见于传染性单核细胞增多症、急性巨细胞病毒感染、再生障碍性贫血、骨髓移植恢复期、肾病等，艾滋病患者的 CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T 比值多在 0.5 以下。

#### 10.3.2 增高

见于移植后发生排异反应、类风湿性关节炎、糖尿病等。

外周血淋巴细胞亚群是监测机体免疫功能的重要指标，主要用于免疫系统疾病及免疫相关疾病诊断和治疗的临床监测。T 细胞亚群与细胞免疫功能有关，B 细胞与体液免疫功能有关，NK 细胞与非特异免疫功能有关。

## 11 结果报告和审核

### 11.1 报告内容

CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T 比值、参考范围及必要的解释和分析。

### 11.2 审核内容

包括数据采集阈值的设置、采集细胞数和微粒数、散射光模式、抗体组合方案、与试验结果相关的所有设门等。这些数据均应由实验室专业人员在解释数据时进行审核。

### 11.3 参考范围

每个实验室针对每一型号仪器都应确定本实验室淋巴细胞亚群分析的参考范围，成人和儿童应分别建立参考范围。并每年进行验证和调整，每次验证不少于 20 例健康人标本。

## 12 数据储存

### 12.1 储存内容

数据储存和检测数据的方法都应该详细记录，以便于检测者或医师对数据进行复核。对所有要分析的标本数据采用列表模式储存起来，以确保对原始数据进行全面分析。对每个标本的 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应保留纸质文件。数据也可以保存为电子版，但应该做好备份以免硬件或软件出现故障导致患者数据丢失。室间质评和室内质控数据应该包括评估检验系统(仪器和方法)性能的所有参数、分析区域和分析结果。

### 12.2 储存类型

数据储存方式多种多样，这主要取决于实验室所用的信息系统，包括软盘、移动硬盘、光盘和磁带。如果数据以纸质文件的形式储存，那么得出报告结果的所有图形和分析区域(例如淋巴细胞设门、分析界限等)都应记录在相应的数据表中，而且每个标本的数据表都应该有唯一标识。

### 12.3 储存期限

至少保留 2 年，或根据实验室要求保留较长时间。储存期过后，实验室监督人员有权利决定继续保

留或删除数据。

### 13 室内质量控制

实验室应开展室内质量控制工作,考虑到中国国情和质控品的成本较高,建议每月至少进行室内质控检测一次。对于特殊实验,如艾滋病 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数,建议至少每周进行一次室内质控的检测。进行室内质控品检测前,首先采用健康志愿者的新鲜外周血标本作为质控物上机测定,一般需要重复测定。

### 14 室间质量评价

实验室应参加国内或国外质评机构组织的室间质量评价和能力验证(PT),用于能力验证的样本必需与病人标本同等对待,要求检验人员和检验流程完全一致。能力验证的检测结果不能与其他参加能力验证的实验室进行讨论。用于能力验证的样品在任何情况下都不允许转送其他实验室检测或赠与其他实验室。如发生任何失控问题,应积极采取纠正措施预防其再次发生,并记录所有质量保证活动。实验室需要对能力验证时样本的接收、检测前处理、检测、检测后分析与解释、及检测报告等相关资料进行保存。

### 15 人员培训要求

流式细胞分析室应具有监督人员和操作人员岗位,并制定用于培训的标准化操作规程(SOP)。实验室监督人员对每一位操作人员的培训效果、流式细胞术检验能力进行考核并决定是否授权上岗。监督人员和操作人员应完成流式细胞仪厂家的基本培训以及专业操作培训班的定期培训,并跟进政府或地区对培训和教育的政策措施。

## 附录 A

(资料性附录)

四色抗体组合方案进行淋巴细胞亚群分析的示意散点图

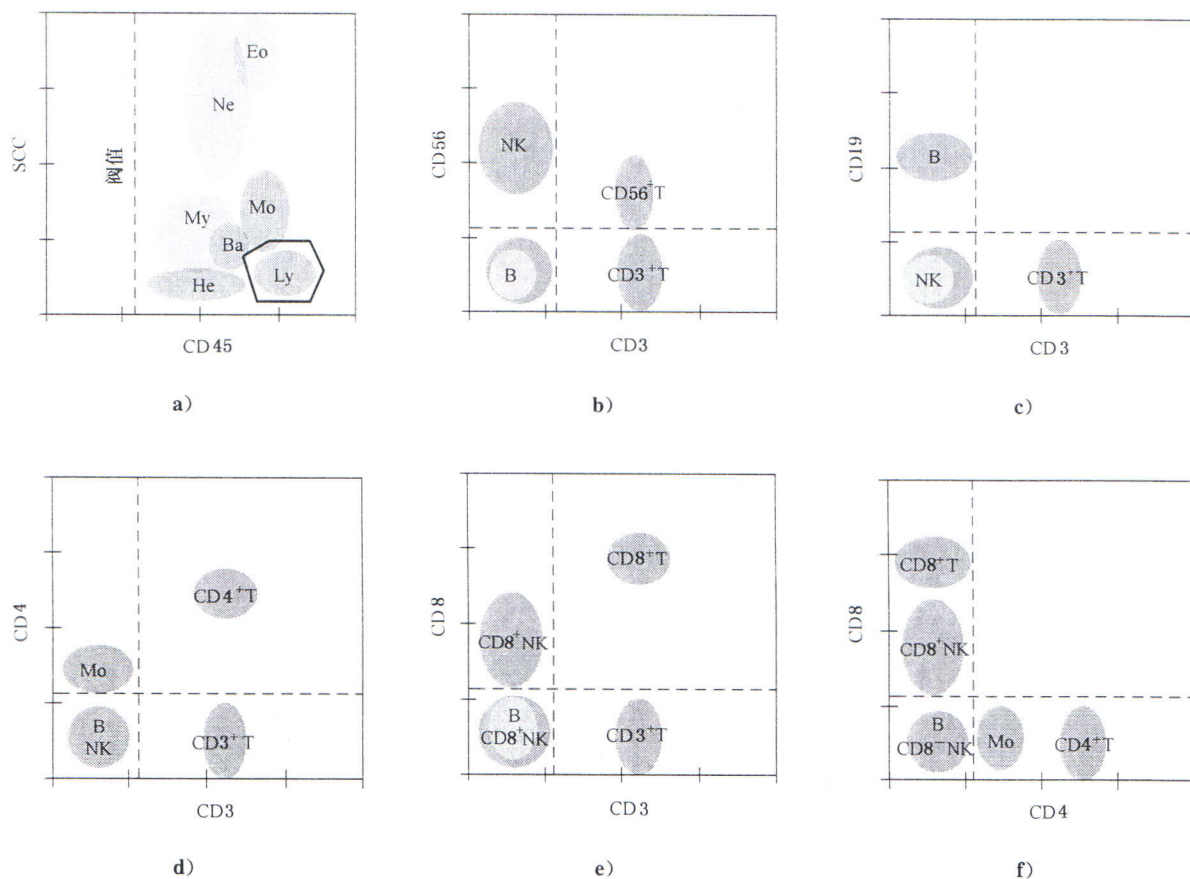


图 A. 1

第 1 管(A,B,C)由 CD3,CD19,CD45 和 CD56 单抗组合染色,第 2 管(D,E,F)由 CD3,CD4,CD8 和 CD45 单抗组合染色。

图 A. 1a):CD45 和 SSC 非设门的白细胞散点图。在此散点图中设定阈值以排除 CD45 阴性的细胞碎片,其中 Ly 代表淋巴细胞,Mo 为单核细胞,Eo 为嗜酸性粒细胞,Ne 为中性粒细胞,Ba 为嗜碱性粒细胞,He 为前 B 细胞,My 为髓系早期造血细胞。

图 A. 1b)~f):双荧光散点图。在此散点图中,对图 A. 1a)门内的淋巴细胞亚群分析,其中也包含少量的单核细胞。主要识别以下淋巴细胞亚群:CD3<sup>+</sup>T 细胞亚群(CD3<sup>+</sup>T),CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群(CD4<sup>+</sup>T),CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群(CD8<sup>+</sup>T),CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>B 细胞(B),CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>NK 细胞(NK),CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>T 细胞(CD56<sup>+</sup>T),CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK 细胞(CD8<sup>+</sup>NK),CD3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>NK 细胞(CD8<sup>-</sup>NK)。

## 参 考 文 献

- [1] CDC, National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Fourth edition. Washington DC: US Government Printing Office, 1999
- [2] Calvelli T, Denny TN, Paxton H, et al. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the national institute of allergy and infectious diseases, division of AIDS. *Cytometry*. 1993, 14:702-714
- [3] Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS, CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4<sup>+</sup> T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR Recomm Rep*. 2003, 52(RR-2):1-13
- [4] Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann N Y Acad Sci*. 1993, 677:440-443
- [5] Shield CF, III, Manlett P, Smith A, et al. Stability of human lymphocyte differentiation antigens when stored at room temperature. *J Immunol Methods*. 1983, 62:347-352
- [6] Ekong T, Kupek E, Hill H, et al. Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry. The effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. *J Immunol Methods*. 1993, 164:263-273
- [7] Whitby L, Granger V, Storie I, et al. Quality control CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte enumeration: results from the last 9 years of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for immune monitoring (1993-2001). *Cytometry*. 2002, 50(2):102-110
- [8] Schnizlein-Bick CT, Spritzler J, Wilkening CL, et al. Evaluation of TruCount absolute-count tubes for determining CD4 and CD8 cell numbers in human immunodeficiency virus-positive adults. Site investigators and the NIAID DAIDS new technologies evaluation group. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000, 7(3):336-343
- [9] Storie I, Sawle A, Goodfellow K, et al. Perfect count: a novel approach for the single platform enumeration of absolute CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004, 57(1):47-52
- [10] CDC. 1997 Revised guidelines for performing CD4<sup>+</sup> T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). 46(RR-2). 1997, Atlanta GA
- [11] Gelman R, Wilkening C. Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3(+)4(+)%. *Cytometry*. 2000, 42(1):1-4
- [12] Nicholson JK, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry*. 1996, 26(1):16-21
- [13] Nicholson JK, Jones BM, Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry*. 1993, 14(6):685-689
- [14] Schenker EL, Hultin LE, Bauer KD, et al. Evaluation of a dual-color flow cytometry immunophenotyping panel in a multicenter quality assurance program. *Cytometry*. 1993, 14(3):307-317
- [15] Stewart CC. Clinical application of flow cytometry. *Immunologic methods for measuring cell membrane and cytoplasmic antigens*. *Cancer*. 1992, 69(6 suppl):1543-1552
- [16] Mandy F, Bergeron M, Houle G, et al. Impact of the international program for quality assessment and standardization for immunological measures relevant to HIV/AIDS: QASI. *Cytometry (Clinical Cytometry)* 2002, 50:111-116

[17] Wayne PA. Clinical applications of flow cytometry: quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (H42-A). National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998, 18(21)

[18] McCoy JP, Jr., Carey JL, Krause JR. Quality control in flow cytometry for diagnostic pathology. I. Cell surface phenotyping and general laboratory procedures. Am J Clin Pathol. 1999, 93: S27-S37

[19] Gelman R, Wilkening C. Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3+4+%. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 2000, 42: 1-4

[20] Gratama JW, Kraan J, Keeney M, et al. Enumeration of immunologically defined cell populations by flow cytometry; Approved Guideline-Second Edition (H42-A2). Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007, 27(16): 18-23

[21] Badley A, Baxter Robinson J, Bergeron M, et al. Canadian guidelines for flow cytometric immunophenotyping-2001 Edition. National Laboratory for HIV Immunology

---