



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0588—2005

流 式 细 胞 仪

Flow cytometer

2005-12-07 发布

2006-12-01 实施

国家食品药品监督管理局 发 布

前 言

本标准由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会提出。

本标准由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会归口。

本标准主要起草单位：美国贝克曼库尔特有限公司、美国 BD 公司、北京市医疗器械检验所。

本标准主要起草人：薛向军、张少敏、吴煦、胡冬梅。

流 式 细 胞 仪

1 范围

本标准规定了流式细胞仪(Flow Cytometer, FCM)的术语和定义、要求、试验方法、标志、标签和说明书、包装、运输和贮存。

本标准适用于临床使用的对单细胞或其他非生物颗粒膜表面以及内部的生物化学及生物物理特性成分进行定量分析和分选(只限于有分选功能的流式细胞仪)的流式细胞仪。

2 规范性引用文件

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 191—2000 包装储运图示标志

GB 4793.1—1995 测量、控制和试验室用电气设备的安全要求 第1部分:通用要求

GB/T 14710—1993 医用电气设备 环境要求及试验方法

YY 0466—2003 医疗器械 医疗器械标签、标记和提供信息的符号(ISO 15223:2000, IDT)

3 术语和定义

下列术语和定义适用本标准。

3.1

分辨率 resolution

流式细胞仪在测量时所能达到的最大精度。

3.2

荧光灵敏度 sensitivity of fluorescence

流式细胞仪能检测到的最少荧光分子数。流式细胞仪荧光灵敏度用 MESF(molecules of equivalent soluble fluorochrome)表示,即等量可溶性荧光分子。

3.3

散射光 scatter

细胞在液流中与激光交会时,向空间 360°立体角的所有方向散射光线,称为散射光。

3.4

前向角散射光 forward scatter, FSC

在入射光正前方检测到的散射光称为前向角散射光,前向角散射光的强弱与细胞的大小有关。

3.5

侧向角散射光 side scatter, SSC

也称 90°散射光。侧向角散射光对细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感,对胞质内较大的颗粒也会有反应,可获得有关细胞内部精细结构和颗粒性质的信息。

3.6

前向角散射光检测灵敏度 FSC sensitivity

流式细胞仪能够检测到的最小颗粒大小,以前向角散射光最小能检测到的颗粒直径表示。

3.7

倍体 ploidy

生物体细胞(包括动物细胞、植物细胞、细菌、病毒)的遗传物质含量。

3.8

携带污染率 carry-over

分析物被仪器由一个检测样品到下一个样品的携带量,从而错误地引起第二个检测样品分析物浓度的增加。

3.9

标准微球 standard particle

大小一致和(或)标有强度一致、恒定不变荧光素的微球,用于流式细胞仪的校准。

4 要求

4.1 正常工作条件

流式细胞仪的正常工作条件应符合如下要求:

- 环境温度:按照流式细胞仪说明书的规定;
- 相对湿度:按照流式细胞仪说明书的规定;
- 电源电压:交流 $220\text{ V} \pm 22\text{ V}$, $50\text{ Hz} \pm 1\text{ Hz}$;
- 大气压力:按照流式细胞仪说明书的规定;
- 防止阳光直射,避免热源。

4.2 荧光灵敏度

流式细胞仪的荧光灵敏度应符合下列要求:

- 流式细胞仪对异硫氰酸荧光素(FITC)的荧光灵敏度以等量可溶性荧光分子(MESF)表示,应不大于 200;
- 流式细胞仪对藻红蛋白(PE)的荧光灵敏度以等量可溶性荧光分子(MESF)表示,应不大于 100 MESF。

4.3 荧光线性

流式细胞仪荧光强度的线性相关系数(r)应不低于 0.98。

4.4 前向角散射光检测灵敏度

流式细胞仪前向角散射光检测灵敏度应不大于 $1\text{ }\mu\text{m}$ 。

4.5 仪器分辨率

流式细胞仪前向角散射光和荧光信号的荧光通道全峰宽或半峰宽 CV 值应不大于 2%。

4.6 前向角散射光和侧向角散射光分辨率

4.6.1 应可以将外周血中红细胞和血小板分开。

4.6.2 应可以将外周血白细胞三群(淋巴细胞、单核细胞、粒细胞)分开。

4.7 倍体分析线性

流式细胞仪进行二倍体细胞周期分析时, G_2/M 与 G_0/G_1 的平均荧光强度比值应在 1.95~2.05 范围内。

4.8 表面标志物检测准确性

流式细胞仪检测质控血时,淋巴细胞表面表达的 CD_3 、 CD_4 和 CD_8 阳性百分比结果应在给定范围内。

4.9 表面标记物检测的重复性

重复检测样品 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 阳性百分比结果的变异系数应不大于 10%。

4.10 携带污染率

流式细胞仪的携带污染率应不大于1%。

4.11 仪器稳定性

环境温度变化不超过设定温度的5%时,在8 h内检测前向角散射光(FSC)及所有荧光通道(FL_1 、 FL_2 、 FL_3 及 FL_4)峰值荧光道数的波动范围应不超过 $\pm 10\%$ 。

4.12 仪器功能

流式细胞仪应具有如下基本功能:

- 数据采集、分析、存储、输出功能;
- 三色以上(含三色)荧光分析能力;
- 进行DNA分析试验;
- 分选功能(只适用于有分选功能的流式细胞仪)。

4.13 外观

外观应符合下列要求:

- 仪器外观应整洁,无划痕,文字和标识清晰;
- 紧固件连接应牢固可靠,不得有松动。

4.14 环境试验

应符合 GB/T 14710 中气候环境 I 组,机械环境 I 组的要求。

4.15 安全

应符合 GB 4793.1 中适用条款的要求。

5 试验方法

5.1 试验条件

按照 4.1 的试验条件进行,使用与流式细胞仪适配的试剂、质控品及标准微球,并在试验之前按照制造商的使用说明对流式细胞仪进行正确的操作和校准。

5.2 荧光灵敏度

在装有 1 mL 鞘液的试管中加入适量标准微球,充分混匀后上机进行试验,可对电压设置值进行调节,确保所有的峰值都可以在直方图上识别和分布。对试验结果进行直方图分析,得到各个峰的平均荧光强度;根据标准微球说明书提供的各个峰的等量可溶性荧光分子(MESF)数,以及分析得到的各个峰的平均荧光强度,按照随试剂附带的标准软件进行统计计算。

5.3 荧光线性

在装有 1 mL 鞘液的试管中加入适量标准微球,充分混匀后上机进行试验,流式细胞仪运用直方图对试验结果分析,得到各个峰的平均荧光强度;根据标准微球说明书提供的各个峰的等量可溶性荧光分子(MESF)数,以及分析得到的各个峰的平均荧光强度,以 MEFL 数(y)和平均荧光强度(x)的线性回归,计算相关系数(r)。

5.4 前向角散射光检测灵敏度

在装有 1 mL 鞘液的试管中加入适量直径不大于 $1\ \mu\text{m}$ 标准微球,充分混匀后上机进行检测,检查直方图上显示的峰值信号,及显示峰值信号的标准微球直径。

5.5 仪器分辨率

在装有 1 mL 经过 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤的磷酸盐缓冲液的试管中加入厂家提供的标准微球,充分混匀后上机进行试验。重复测试 10 次,利用直方图分析试验结果,按式(1)计算各荧光通道标准微球全峰宽

的 CV 值,或按式(2)计算各荧光通道标准微球半峰宽的 CV 值, HPCV。

$$CV = \delta/\mu \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$HPCV = FWHM/\mu \times 0.423 \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

δ ——颗粒分布的标准差;

μ ——颗粒分布的平均值;

FWHM——半峰宽。

5.6 前向角散射光和侧向角散射光分辨率

5.6.1 在装有 1 mL 鞘液的试管中加入 5 μ L 柠檬酸钠抗凝全血,混匀后,上机检测,检查前向角散射光和侧向角散射光点图是否可以将血小板和红细胞分开。

5.6.2 取 100 μ L EDTA 抗凝全血,溶解红细胞后上机检测,检查前向角散射光和侧向角散射光点图是否可以将白细胞三群(淋巴细胞、单核细胞、粒细胞)分开。

5.7 倍体分析线性

使用经过荧光染色的标准细胞株或标准细胞核,上机检测 G_0/G_1 期及 G_2/M 期的平均荧光强度,计算两个平均荧光强度的比值。

5.8 表面标志物检测准确性

使用已标记好 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 的质控细胞上机测试,重复测定 5 次,依次记录每次检测的 CD_4 和 CD_8 、 CD_3 阳性值的百分比,并分别计算平均值。

5.9 表面标志物检测的重复性

按照 5.8 的方法进行试验,重复测试 20 次,分别计算 CD_4 、 CD_8 、 CD_3 阳性百分比结果的变异系数(CV)。

5.10 携带污染率

先使用标准微球上机进行测试,连续测试 3 次,计算标定区域的颗粒数,分别记为 H_{1-1} 、 H_{1-2} 、 H_{1-3} ;进行一次样品管返冲循环后,再进行空白数量测试,连续测试 3 次,计算标定区域的颗粒数,分别记为 L_{1-1} 、 L_{1-2} 、 L_{1-3} ;按照此程序循环 3 次,再按式(3)计算携带污染率值(C_i),取最大值。

$$C_i = \frac{(L_{i-1} - L_{i-3})}{(H_{i-3} - L_{i-3})} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

C_i ——第 i 次循环的携带污染率值;

$i=1\sim 3$ 。

5.11 仪器稳定性

将周围环境温度控制在允许范围内,取一支试管加入 1 mL 经过 0.2 μ m 滤膜过滤的磷酸盐缓冲液和适量经过振荡混匀的标准微球,充分混匀后上机进行试验,测试完成后,利用直方图分析试验结果,计算标准微球的平均荧光强度值(FL_1);连续开机 8 h 后,在相同流式细胞仪设置和荧光道数的条件下重复前述试验步骤,得到标准微球的平均荧光强度值(FL_2);按式(4)计算 FL_1 、 FL_2 的偏差值(B)。

$$B = \frac{(FL_n - FL_n)}{FL_n} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

5.12 仪器功能

开机后逐项验证。

5.13 外观

通过目视检查进行验证。

5.14 环境试验

按照 GB/T 14710 中适用条款的试验方法进行。

5.15 安全

按照 GB 4793.1 中适用条款的试验方法进行。

6 标志、标签和说明书

6.1 标志、标签

6.1.1 仪器标签、标记及说明书所用的符号应符合 YY 0466 的要求。

6.1.2 仪器标签至少应包括如下内容：

- a) 仪器名称、型号/商标；
- b) 制造商名称、地址；
- c) 制造日期或出厂编号；
- d) 电源电压、电源频率及功率。

6.1.3 仪器外包装(箱)上的标志至少应有下列内容：

- a) 产品名称、商标/型号；
- b) 制造商名称、地址、售后服务电话；
- c) 执行标准号；
- d) 产品注册号；
- e) 生产日期或序列号；
- f) 质量、体积；
- g) GB/T 191—2000 中规定的标志。

6.2 说明书

说明书包括使用说明和技术说明，至少应有如下内容：

- a) 产品名称、商标/型号；
- b) 制造商名称、地址、联系电话；
- c) 仪器组成；
- d) 检测原理、方法；
- e) 工作环境条件；
- f) 主要技术指标；
- g) 贮存条件；
- h) 注意事项；
- i) 日常维护；
- j) 故障的解决；
- k) 废弃物处理；
- l) 说明书的出版及修订日期。

7 包装、运输和贮存

7.1 包装

包装应符合下列：

- a) 外包装箱应能保证产品不受自然损坏；

- b) 随机文件应有产品说明书、装箱清单；
- c) 包装箱外部标示 GB/T 191 规定的标志。

7.2 运输

按订货合同规定的要求进行运输。

7.3 贮存

按制造商规定的条件进行贮存。
