

# 流式细胞术的临床应用专家共识

国家医学检验临床医学研究中心(中国医科大学附属第一医院) 中华医学会检验医学分会 国家卫生健康委临床检验中心 中华检验医学杂志编委会  
通信作者:尚红, Email: hongshang100@hotmail.com

**【摘要】** 流式细胞术在临床血液及免疫相关疾病的精准诊治中具有重要作用。随着流式细胞仪普及程度的不断提高,临床实验室开展流式细胞术检测,服务临床诊疗的能力和水平也逐渐提升。为适应流式细胞术临床应用的进展和需求,加强质量控制,结合近年来国内外相关领域研究进展,对 2013 年发表的《流式细胞术的临床应用共识》进行更新,制定此共识。

**【关键词】** 流式细胞术; 临床应用; 质量控制; 共识

## Consensus on the Clinical Application of Flow Cytometry

National Clinical Research Center for Laboratory Medicine (the First Hospital of China Medical University), Chinese Society of Laboratory Medicine, National Center for Clinical Laboratories, Editorial Board of Chinese Society of Laboratory Medicine

Corresponding author: Shang Hong, Email: hongshang100@hotmail.com

**【 Abstract 】** Flow cytometry plays important roles in the precise diagnosis and treatment of hematological and immune-related diseases. With the increasing popularity of flow cytometry in clinical laboratories, the ability and level of carrying out flow cytometry-based detection has also been gradually improving. To adapt to the progress and demand of the clinical application of flow cytometry and to enhance quality control, the consensus on the clinical application of flow cytometry was updated based on the research progress in related fields domestic and abroad in recent years.

**【 Key words 】** Flow cytometry; Clinical application; Quality control; Consensus

随着医学的进步及疾病精准化诊治需求的增加,我国临床实验室流式细胞仪的普及水平得到提高,开展流式细胞术检测服务临床诊疗的能力和水平亦不断提升。为适应流式细胞术临床应用的进展和临床检验需求的更新,我们延续 2013 年《流式细胞术临床应用的建议》<sup>[1]</sup>的编写初衷,并在此前版本的基础上,经专家组讨论,适时对相应内容进行修订和扩增。本共识由国家医学检验临床医学研究中心、中华医学会检验医学分会、国家卫生健康委临床检验中心及中华检验医学杂志编委会组织专家进行讨论撰写并发布。

## 一、流式细胞仪及器材的准备

### (一)流式细胞仪的选择

2017 年 12 月,我国颁布《流式细胞仪》国家行业标准<sup>[2]</sup>,规定了流式细胞仪的产品分类、技术要求、试验方法及使用方法等。在临床检验工作中,应选择有临床注册证的流式细胞仪,满足检测灵敏度和收集速率等的要求;根据检测项目所需参数,确定适宜激光器和检测器,使其检测参数与临床使用的荧光抗体匹配;考虑操作的简便性和兼容性,以及未来可升级满足新检测需求的空间;兼顾临床实验室场地、仪器维护、人员培训、试剂和耗材供应

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20230308-00143

收稿日期 2023-03-08 本文编辑 唐栋

引用本文:国家医学检验临床医学研究中心(中国医科大学附属第一医院),中华医学会检验医学分会 国家卫生健康委临床检验中心,中华检验医学杂志编委会. 流式细胞术的临床应用专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(8): 792-801. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20230308-00143.



稳定性、售后服务等因素。

## (二)流式细胞仪的设置

1. 仪器质控:流式细胞仪的仪器性能与检测结果准确与否密切相关。为保证仪器运转正常,每日开机流程后应运行仪器的质控微球等,保证仪器处于最佳性能状态,变异系数小于仪器软件中的可接受范围。如有可接受范围外的偏离,应及时进行校准和维修。

2. 仪器维护:(1)环境温湿度可影响激光器、光纤和棱镜等光学元件,使用时可参考仪器说明书推荐的温湿度,推荐室温 18~25℃;(2)灰尘可损伤激光器和光学元件,降低检测的灵敏度,日常工作中注意仪器的整洁,清洁频率依据环境而定;(3)使用 1% 的次氯酸或 75% 医用乙醇每日清洁进样针,宜定期(或按需)清洁流动室,避免黏性大和聚集成团的细胞堵塞进样针;(4)过滤器影响荧光信号的稳定性和压缩空气的供应,在需要时排除气泡并定期更换;(5)鞘液桶、废液桶需维持密闭性,定期清洁和更换;(6)电脑数据定期备份,存储数据不超过硬盘的一定容量,避免损坏和拖慢系统性能;(7)定期对仪器性能进行全面评估、校准和保养,并应出具书面报告。

3. 补偿设置:传统的多色流式细胞仪存在荧光溢漏,合适的补偿是获得可靠数据的关键<sup>[3-5]</sup>。(1)补偿对照可以使用新鲜血细胞制品(更贴近待检测细胞)和商品化的荧光微球(操作简便)。使用荧光微球建立的补偿,宜用待检细胞进行优化;(2)如流式细胞仪具备“自动补偿”功能,可采用自动补偿进行条件设置并进一步手动优化;(3)同一通道检测的相似荧光,建立补偿时不能互相替代,如 PE-Cy5、PerCP、PerCP-Cy5.5 等,应分别建立补偿;(4)补偿设置的染色处理过程宜与待测项目一致,细胞膜染色和经过固定、破膜的胞浆(或胞核)染色会有不同,建议分别设置补偿;(5)补偿矩阵并非永久适用,当建立新的实验或仪器性能出现允许范围外的变化,应重新建立补偿。

(三)移液器、离心机、标本前处理系统等的维护及定期校准

上述仪器除日常清洁维护,应按照实验室认可标准(例如 ISO15189)的相关要求,定期对不同量程的移液器、离心机和标本前处理系统的性能进行全面评估和校准,并出具书面报告。

共识 1 临床检测选用的流式细胞仪应有国家有关机构核发的注册证。建议根据临床实验室

及流式细胞术检测项目的特点,选择技术性能符合使用要求的流式细胞仪,宜同时考虑相关技术培训及售后服务等。流式细胞仪的使用应注意每次检测过程中的仪器质量控制,应按要求进行维护保养和校准评估。流式细胞术检测相关的器材也应注意日常清洁维护和定期校准评估。推荐强度:强烈推荐。

## 二、流式细胞术检测试剂

### (一)荧光抗体的选择和搭配

流式细胞术使用的抗体应符合国家相关标准<sup>[6]</sup>。在搭配多色抗体组合时需要考虑<sup>[5]</sup>:(1)流式细胞仪的检测通道特性:根据流式细胞仪的配置,选择可使用的荧光抗体;(2)荧光染料本身的强弱、荧光标记物的稳定性、荧光素分子大小、荧光抗体克隆号等,例如同一种荧光标记物,不同克隆号抗体对某些抗原的检测效果也会出现差异<sup>[7-8]</sup>;(3)待测抗原表达强弱:弱表达抗原选择强荧光标记,强表达抗原可选择弱荧光标记;(4)尽量避免光谱重叠多的荧光染料搭配如 PE-Cy5 和 APC 等,对细胞共表达的抗原进行染色时,尽量避免选用串色和荧光溢漏大的通道<sup>[5]</sup>。

### (二)抗体的滴定设置

通过抗体滴定计算染色指数(stain index, SI),判断荧光染色后阴性群和阳性群的分离效果,是确定最佳抗体使用浓度的重要方法。SI 计算公式为:
$$[ \text{中位荧光强度}(\text{median fluorescent intensity, MdFI})_{\text{阳性群}} - \text{MdFI}_{\text{阴性群}} ] / (2 \times \text{rSD}_{\text{阴性群}})$$
<sup>[5]</sup>。SI 受荧光强度、抗原表达强度、抗体结合力及流式细胞仪设置等影响<sup>[5]</sup>。在更换抗体或抗体批号之前,宜进行抗体滴定以确定最佳浓度,避免因抗体浓度不合适,导致弱表达抗原检测不到或强抗原超出检测限。

### (三)对照的设置和选择

选择适宜的对照是流式细胞术检测中正确获取和分析数据的基础<sup>[5]</sup>。“荧光减一”(fully stained minus one fluorochrome 或 fluorescence minus one, FMO)对照是目前确定阴性和阳性细胞群 cutoff 值的最佳对照,对于弱阳性或阳性细胞比较少少的情况尤为适用,可排除交叉干扰等;同型对照可评估 Fc 受体或蛋白的交叉反应,排除非特异性染色。生物制品对照如血液制品质控,可根据制品的 cutoff 值来确定检测样品的阴阳性。

### (四)其他试剂

红细胞裂解是流式细胞术检测血液白细胞或

骨髓有核细胞时不可或缺的过程<sup>[9-10]</sup>,宜选择相应品牌的裂解液或自行配制。由于裂解液可对粒细胞和单核细胞等造成不同的影响,也会影响染色的效果<sup>[9-10]</sup>,建议根据检测目的不同进行比对,择优选用。细胞的稀释、洗涤和重悬需使用缓冲液或稀释液<sup>[11-13]</sup>,宜依据反应的最适 pH 值(如中性)、副作用(如磷酸盐缓冲液会导致一些激酶反应的抑制)、可能的络合作用、对光谱的吸收以及成本等进行选择<sup>[13]</sup>。日常工作中可选用商品化的缓冲液或 PBS,依据检测目的确定是否添加胎牛血清/牛血清白蛋白,以及是否加入叠氮化钠用于保存。此外,细胞培养基和医用生理盐水等也可用作稀释液和缓冲液。

不同于细胞表面(细胞膜)的染色,对细胞内(细胞浆或细胞核)的分子进行染色,需要经过“固定”(如甲醛等),保持目标抗原的位点和结构,再通过“破膜”(如 Triton-X)使抗体进入细胞。不同品牌破膜剂对细胞内染色有不同程度的影响,建议根据检测效果进行比对,择优选用<sup>[14]</sup>。

**共识 2 流式细胞术检测中,建议合理选择和搭配所需荧光抗体,通过滴定确定抗体使用的最佳浓度,并合理选择和设置对照;染色过程中,选择适宜的红细胞裂解液、缓冲液以及固定破膜剂。推荐强度:强烈建议。**

### 三、标本的采集、存储、运输及制备

#### (一)外周血标本

(1)患者准备:流式细胞术检测同其他项目外周血采集无异,因脂血等会对检测结果造成影响,采血前尽量清淡饮食;(2)抗凝剂选择:同时进行白细胞分类和流式细胞术检测时,建议使用乙二胺四乙酸盐(EDTA)抗凝真空管进行标本采集,室温保存,尽快送检<sup>[15]</sup>。如进行 T 细胞功能的检测如 IFN- $\gamma$  分泌时,因 EDTA 可螯合钙离子,影响 T 细胞激活效果,建议采用肝素钠等抗凝。

#### (二)其他标本

骨髓标本、造血干细胞采集物的抗凝剂选择可以参照外周血。脑脊液标本一般不需要抗凝剂,渗出液性质的浆膜腔积液常有凝块,建议抗凝处理。因体液标本久置会导致细胞破裂,影响细胞计数、分类等检测结果,所以需要尽快送检。一般要求在采集后立即送检<sup>[16]</sup>,如使用特殊保存剂,可以适当延长送检时间<sup>[17]</sup>。样品应离心浓缩调整细胞浓度后进行染色。

对于淋巴结等组织标本,一般不需要抗凝剂,

活检取材后应尽快送检。标本可经过物理研磨法和酶消化法获得单细胞悬液,调整细胞浓度后进行细胞染色。体外培养的细胞(如胞内细胞因子染色时,需刺激后加入蛋白转运抑制剂),根据细胞储存状态(冻存与否)、细胞特性(贴壁或悬浮),进行复苏或消化、洗涤,调整细胞浓度后染色。

#### (三)标本制备

流式细胞术标本的制备,需考虑新鲜度和检测项目的要求。(1)细胞浓度:一般不建议超过  $1 \times 10^6$  cells/ml(参照试剂说明书);(2)全血体积:一般建议 50~400  $\mu$ l<sup>[18]</sup>;(3)活细胞染料:常规新鲜外周血可以不使用活细胞染料,但造血干细胞计数、白血病微小残留病(minimal residual disease, MRD)筛选与监测等,建议添加活细胞染料如 7-AAD 等,以去除死细胞的干扰;(4)细胞染色、固定与破膜:需考虑细胞膜染色、细胞浆染色和细胞核染色的区别,选择相应适宜的固定破膜剂;(5)染色温度:一般室温染色即可<sup>[18]</sup>,但造血干细胞染色、使用某些固定破膜剂时,要求在融冰或 4  $^{\circ}$ C 完成;一些特殊项目(如中性粒细胞吞噬二氢罗丹明辅助诊断慢性肉芽肿)需经过 37  $^{\circ}$ C 孵育;(6)染色时间:受荧光抗体和染色体积影响,一般建议 10~30 min<sup>[18]</sup>。根据目的抗原的位置分布不同(细胞膜、细胞浆和细胞核),染色时间不同,可依据说明书及检测需求,探索最优染色时间。另外,如染色体积在 200  $\mu$ l 以上,可适当延长抗体孵育时间<sup>[18]</sup>。

**共识 3 建议根据检测标本的种类及实验需求的差异,选择适宜的抗凝剂,采样后应尽快送检;样品制备时确保细胞浓度在合理的范围内,根据检测项目的特性,选择最优的染色方法和染色条件。推荐强度:建议执行。**

### 四、流式细胞术的临床应用

#### (一)淋巴细胞亚群分析

淋巴细胞亚群分析是目前流式细胞术临床应用范围最广泛的项目,可获得淋巴细胞亚群,包括 CD3<sup>+</sup> 总 T 细胞、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 辅助 T 细胞(Th)、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞(Tc)、CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>B 淋巴细胞和 CD3<sup>-</sup>(CD16+CD56)<sup>+</sup>NK 细胞的相对百分比(%)和细胞绝对值(cells/ $\mu$ l),在临床诊治中发挥了重要作用。国家卫生健康委员会发布的《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》<sup>[19]</sup>(该行标处于修订过程中),以及《流式细胞术分析外周血淋巴细胞亚群在儿科的临床应用共识(2019 版)》<sup>[20]</sup>和《TBNK 淋巴细胞检测在健康管理中的应用专家共

识》<sup>[21]</sup>等,对此项目的开展及应用具有重要的指导意义。

(二)免疫细胞精细分型

1. 淋巴细胞:(1)T 细胞:对 T 细胞的精细分型,根据细胞表面标记区分 T 细胞,如调节性 T 细胞(Treg)、滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)、Th1、Th2、Th9、Th17 和 Th22<sup>[22]</sup>,初始(naive)、效应(effector)、效应记忆型(effector memory)和中央记忆型(central memory)亚群、活化细胞亚群等<sup>[22-25]</sup>。(2)B 细胞:根据 CD27、IgD、CD24、CD38、CD5 等表达,可以将 B 细胞分为不同亚群<sup>[23, 26-29]</sup>。(3)NK 细胞:根据 CD16 和 CD56 表达的不同,可以将 NK 细胞细分为不同亚群<sup>[23, 30-31]</sup>。目前精细分型的方案并未统一,表 1 汇总了文献报道的常见淋巴细胞精细分型方案,可供参考。

2. 髓系细胞:(1)粒细胞:根据 CD45 和 SSC,

CD13 和 CD16 以及 CD66、CD123、CD203c、HLA-DR 等的表达不同,可以将粒细胞分为中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞<sup>[23, 30]</sup>。(2)单核细胞:根据 CD45 和 SSC,CD13、CD14 和 CD16 的表达不同,可以将单核细胞分为不同亚群<sup>[23, 30]</sup>。(3)树突状细胞(dendritic cell, DC):使用系列抗原(lineage: CD3、CD14、CD16、CD19 和 CD56)排除 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核、粒细胞等,再根据 CD123、HLA-DR、CD11c、CD1e、CD141 等的不同表达,可以将 DC 细胞分为不同亚群<sup>[23, 30, 32]</sup>。(4)髓源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC):根据 CD14、CD15、CD11b、HLA-DR、CD33 等指标的表达,可以将 MDSC 分为 3 个不同亚群<sup>[33-34]</sup>。表 1 汇总了文献报道的常见髓系细胞精细分型方案,可供参考。

表 1 免疫细胞精细分型亚群分类定义及表面标志

细胞亚群的分类	细胞亚群的表面标志	参考文献
T 细胞	CD3 <sup>+</sup>	
Th 细胞	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	
Th1 细胞	CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup> CCR10 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	[22]
Th2 细胞	CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup> CXCR3 <sup>-</sup>	
Th9 细胞	CCR4 <sup>-</sup> CCR6 <sup>+</sup>	
Th17 细胞	CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup> CXCR3 <sup>-</sup>	
Th22 细胞	CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup>	
Tfh 细胞	CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup>	
Treg 细胞	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>low/-</sup>	[23]
初始 Th 细胞	CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>	
效应 Th 细胞	CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup>	
效应记忆型 Th 细胞	CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup>	
中央记忆型 Th 细胞	CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup>	
Tc 细胞	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	
初始 Tc 细胞	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>	
效应 Tc 细胞	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup>	
效应记忆型 Tc 细胞	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup>	
中央记忆型 Tc 细胞	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup>	
TCRαβ 细胞	CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>+</sup> TCRγδ <sup>-</sup>	[24-25]
TCRγδ 细胞	CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>-</sup> TCRγδ <sup>+</sup>	
B 细胞	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	[23, 26-29]
B1a 细胞	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup>	
初始 B 细胞	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	
CD27 <sup>+</sup> 记忆型 B 细胞	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	
非转换记忆型 B 细胞	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	
转换记忆型 B 细胞	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	
过渡型 B 细胞	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>++</sup> CD38 <sup>++</sup>	
浆母细胞	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup> CD38 <sup>++</sup>	
浆细胞	CD38 <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup>	

续表 1

细胞亚群的分类	细胞亚群的表面标志	参考文献
NK 细胞	CD3 <sup>-</sup> (CD16+CD56) <sup>+</sup>	[23, 30-31]
NK1 细胞	CD56 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup>	
NK2 细胞	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	
NK3 细胞	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	
NK4 细胞	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>low/-</sup>	
NKT 细胞	CD3 <sup>+</sup> (CD16+CD56) <sup>+</sup>	
髓系细胞		[23, 30]
粒细胞		
中性粒细胞	CD66 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	
嗜酸性粒细胞	CD66 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	
嗜碱性粒细胞	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup> (或 CD203c <sup>+</sup> )	
单核细胞		
Mo1 细胞	CD14 <sup>hi</sup> CD16 <sup>-</sup>	
Mo2 细胞	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup>	
Mo3 细胞	CD14 <sup>hi</sup> CD16 <sup>+</sup>	
Mo4 细胞	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>-</sup>	
DC 细胞		[23, 30, 32]
浆样 DC 细胞	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD123 <sup>hi</sup> CD11c <sup>-</sup>	
髓样 DC 细胞或传统样 DC 细胞	髓样 DC 细胞 1: Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD123 <sup>low/-</sup> CD11c <sup>hi</sup> CD1e <sup>-</sup> CD141 <sup>+</sup> 髓样 DC 细胞 2: Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD123 <sup>low/-</sup> CD11c <sup>hi</sup> CD1c <sup>+</sup>	
MDSC 细胞		[33-34]
粒细胞或多形核白细胞来源的 MDSC	CD14 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup> (或 CD66b <sup>+</sup> )	
单核细胞来源的 MDSC	CD11b <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>low/-</sup> CD15 <sup>-</sup>	
早期阶段的 MDSC	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD33 <sup>+</sup>	

注:Th 为辅助 T 细胞, T<sub>H</sub> 为滤泡辅助性 T 细胞, T<sub>reg</sub> 为调节性 T 细胞, T<sub>c</sub> 为细胞毒性 T 细胞, NK 为自然杀伤细胞, DC 为树突状细胞, MDSC 为髓源抑制细胞

(三)白血病免疫表型分析及微小残留病监测

1. 白血病免疫表型分析:(1)急性白血病:对于急性白血病免疫分型,2013 版《流式细胞术临床应用的建议》<sup>[1]</sup>及《四色流式细胞术用于急性白血病免疫分型的中国专家共识(2015 年版)》<sup>[35]</sup>均有详细介绍。在上述《建议》和《共识》中,对白血病免疫表型分析均主要推荐采取“2 步法”,但对于某些跨系别表达的抗原或是混合表型的白血病,可能会因为检测抗原不足导致漏检的现象。国家卫生健康委发布的《儿童急性淋巴细胞白血病诊疗规范(2018 年版)》<sup>[36]</sup>和《儿童急性早幼粒细胞白血病诊疗规范(2018 年版)》<sup>[37]</sup>,对于急性白血病免疫分型,建议使用多色流式细胞仪,至少检测上述《诊疗规范》提及的 35 个 CD 分子,视情况增加更多抗原检测,同时检测的 CD 分子越多,准确性相对越高。(2)慢性淋巴细胞白血病(Chronic lymphocytic leukemia, CLL)/非霍奇金淋巴瘤:流式细胞术检测的抗原可以参考《流式细胞术在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用专家共识(2017 版)》<sup>[38]</sup>。但是对于 B 淋

巴细胞,由于慢淋/非霍奇金淋巴瘤的细胞可能来源于淋巴结的多个结构部位[如 DLBCL 分为生发中心型 GCB 型、非生发中心 non-GCB 型和活化 B 细胞样(ABC)型],需注意其免疫表型的多样性<sup>[39]</sup>;对于 T 细胞,如出现异常免疫表型或 TCRVβ 的单克隆,需要与病毒感染等鉴别。(3)霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL):对于 HL,因背景含有大量表型相对正常的淋巴细胞,寻找低比例的 Reed-Sternberg 细胞存在一定困难。Reed-Sternberg 细胞在免疫表型上可以表现为 CD45<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>等免疫学特征,需要与其他一些表达 CD30<sup>+</sup>的肿瘤细胞进行鉴别<sup>[40]</sup>,多色流式细胞术在 HL 中具有一定的辅助诊断价值,HL 最终诊断需要结合组织病理学。

2. 白血病微小残留病(MRD)监测:(1)急性白血病 MRD 监测:基于白血病相关免疫表型(leukemia-associated immunophenotype, LAIP, 根据非白血病细胞的表达背景来定义)和/或细胞“异于正常(different from normal, DFN)”的表型,可以鉴

定出异常的细胞群,进行MRD细胞监测<sup>[41]</sup>。急性白血病MRD监测可以参考已发表的中国专家共识<sup>[42-43]</sup>。(2)慢性淋巴细胞白血病/淋巴瘤MRD监测:典型的CLL免疫表型为CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD22<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD79b<sup>low/-</sup>且CD10<sup>-</sup>FMC7<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup>CD20<sup>low</sup>sIgM<sup>low</sup><sup>[44]</sup>,可用于CLL诊断和MRD监测。上述表型可以通过固定的MRD组合进行监测,推荐方案包括CD5/CD19/CD20/CD38/CD81/CD22/CD79b/CD43等<sup>[44-45]</sup>,需注意美罗华(Rituximab,利妥昔单抗)治疗会使CD20出现假阴性,鉴于CD200在CLL和其他CD5<sup>+</sup>淋巴瘤如套细胞淋巴瘤中的作用,也可推荐CD200<sup>[46]</sup>和CD160<sup>[47]</sup>作为CLL的MRD监测指标。对于免疫表型不典型的淋巴瘤等进行MRD监测,需结合其初发时的免疫表型特征。淋巴瘤的分布具有异质性(如可能涉及外周血、骨髓、淋巴结、肝脏、脾脏等),当采样不同时,MRD监测结果可能也不一致。目前,骨髓是使用最广泛的MRD监测标本,但脾脏、肝脏和淋巴结中的MRD监测亦可在疾病复发中起重要作用<sup>[45]</sup>。(3)多发性骨髓瘤MRD监测:可参考已经发表的相关共识进行检测<sup>[42]</sup>。MRD监测需要获取足够的细胞数,确定检测的最低检出限(limit of detection, LOD)和最低定量限(lower limit of quantification, LLOQ),推荐固定和规律的取样时间进行MRD监测<sup>[45]</sup>。

#### (四)细胞因子检测

通过流式细胞术检测细胞因子,主要包括2类方法:(1)基于流式微球阵列技术(Cytometric beads array, CBA),可检测血清、血浆或体液等标本中细胞因子水平。其原理为样品中细胞因子与细胞因子抗体预包被的微球及荧光标记检测抗体结合,形成“双抗体夹心”复合物。此方法使用标本量少,2个荧光检测通道可以同时检测多种细胞因子。(2)可检测激活后胞内细胞因子如IFN- $\gamma$ 等表达,用于评估免疫细胞的功能等。此方法需要新鲜肝素抗凝外周血或分离获得的外周血单个核细胞,使用刺激剂激活细胞,并用阻断剂阻断胞内蛋白质转运,使得刺激产生的细胞因子聚集在胞内。细胞膜抗原染色后,再使用固定破膜剂固定及破膜对胞内细胞因子如IFN- $\gamma$ 等进行染色。

#### (五)其他临床应用项目

流式细胞术临床应用的部分项目如红细胞和血小板检测、HLA-B27检测、DNA倍体、凋亡、细胞周期和细胞增殖等已经在2013版<sup>[1]</sup>做过详尽介绍,

CD34<sup>+</sup>造血干细胞计数、PNH筛选等临床项目,可以参照已经发布的应用指南或专家共识<sup>[48-49]</sup>。

**共识4** 对于淋巴细胞亚群检测等项目,建议参照我国已经发布应用指南或专家共识执行;免疫细胞精细分型项目,建议实验室根据自己的仪器配置等,优化方案,依据临床需求有序开展;对于白血病/淋巴瘤免疫表型分析及MRD筛查等项目,建议依据细胞分化谱系、分化阶段的免疫表型特征和白血病相关免疫表型(LAIP)等进行检测和分析。推荐强度:建议执行。

### 五、数据和报告

#### (一)数据获取、分析和存储

1.数据获取和分析:流式细胞术获取的文件数据量大,数据获取分析需要足够的软件和硬件支持(建议高于8GB的RAM或更高配置)<sup>[4]</sup>。细胞(或颗粒)获取需设置合理的阈值,去除碎片及粘连等,再通过散射光及荧光信号的结合,识别不同的细胞群,基于合理的对照,并结合各系别细胞不同的特异性CD分子,手动(或自动)设门,展示出细胞的特性<sup>[4, 50-51]</sup>。随着多参数流式细胞仪和新型流式细胞仪等的出现,产生大量和高维空间数据,手工分析费时、具有一定的主观性且容易遗漏一些新的细胞参数,所以需要使用高维数据分析技术,如t分布随机邻位嵌入(t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding, t-SNE)等<sup>[4, 50]</sup>,以及借助人工智能分析的帮助,补充人工分析的不足。但上述高维分析方法不能取代人工分析,人工检验仍然是一种作为质量控制的良好方法<sup>[4]</sup>。

2.数据存储:原始数据的保存对数据回顾分析、备查、可溯源再分析以及临床科研等具有重要意义。数据常以包含补偿矩阵(或列表)以及检测通道特征(如荧光标记)的FCS和/或LMD格式存储<sup>[4]</sup>,分析后的数据或报告以PDF或word方式存储。数据至少保存2年,或根据相关规定尽可能保存更久<sup>[18]</sup>。

#### (二)报告书写及发放

报告中应包括实验室名称、患者的姓名和门诊或住院号(唯一识别号)、年龄、性别、标本采集的日期和时间、标本类型、检测项目、参考区间等。报告和结果的发布,应准确无误,包含标本接收时间、发布者(检验者和审核者)信息、报告发布时间及适当的解释说明;标本质量不适于检验或可能影响检验结果时(如凝血、溶血、脂血等)应在报告中说明,应该遵循相应规章制度,联系医生并作相应

记录<sup>[52-53]</sup>。

**共识 5 流式细胞术数据的获取和分析, 建议依据获取数据的类型及体量, 合理选择人工和/或数字化技术进行分析, 做好原始数据的储存; 实验室发放的报告应信息完整, 建议合理发布审核信息及结果解释说明等。推荐强度: 建议执行。**

## 六、流式细胞术临床应用的质量控制要点

### (一) 实验室质控

实验室须通过内部质量保证 (internal quality assurance, IQA) 和外部质量保证 (external quality assurance, EQA) 程序进行认证。标本检测宜由具备质量保证 (quality assurance, QA)、验证 (verification)、能力测试 (proficiency testing)、标准化技术培训以及适当基础设施的实验室来进行<sup>[45]</sup>。

质量控制 (quality control, QC) 程序, 旨在建立和监测仪器性能、试剂、方法和结果, 以确保检测系统在使用当天和一段时间内正常工作。如果质量控制程序结果超出可接受范围, 所采取的纠正措施应记录在案。质量保证则是从检测的三个阶段, 即遵循检验前、检验中和检验后相应程序, 制定相应的质量控制和质量保证程序, 保证结果的可靠<sup>[54]</sup>。

### (二) 仪器质控

流式细胞仪的性能与检测结果准确与否密切相关<sup>[54]</sup>。仪器的质量控制, 应使用仪器厂商等提供的质控微球, 如线性/性能验证微球、补偿微球等按照相应说明完成<sup>[54]</sup>。为保证仪器运转正常, 每日开机流程后, 运行仪器的日常质控。仪器质控项目还包括系统和检测的灵敏度、特异性、基线评估、检测线性、校准和优化等, 完成不同仪器比对, 并需关注仪器光学配件的性能优化、电压和补偿设置、激光功率和电流等, 并做好维护保养记录等<sup>[54-55]</sup>。仪器质控的运行, 可确保仪器处于最佳性能状态, 变异系数小于仪器软件中的可接受范围, 如超出可接受范围的偏离, 应及时进行校准和维修。

### (三) 项目质控

1. 项目论证: 需要完成对检测试剂 (抗体)、用量和染色能力 (染色指数) 的验证; 检测平台 (单、双平台) 的验证; 方法或仪器的比对、项目相关的电压和补偿设置; 参考区间的设置和验证等<sup>[54-55]</sup>。

2. 项目开展: (1) 标本: 标本的正确采集和及时处理是项目检测质量控制的关键步骤。外周血和骨髓等需要选择合适的抗凝剂, 最常使用的有 EDTA、肝素、ACD 等<sup>[54]</sup>。对于组织 (如淋巴结) 和穿刺标本, 建议加入培养基如 RPMI 转运, 不建议使

用 PBS (可导致标本细胞的快速退化), 不建议使用固定剂 (可对组织细胞造成毒性, 抑制细胞的活性, 影响检测结果)。对于脑脊液等体液标本, 采集后尽快转运, 也可加入培养基转运。(2) 试剂: 项目检测过程中涉及到的所有试剂如缓冲液、红细胞裂解液等均应事先进行验证; 单克隆抗体相较其他试剂需要更严格的验证, 如抗体的特异性、反应性、鉴别阴阳性细胞的能力等, 可使用商品化质控品 (如室内质控血)、实验室标本 (如外周血) 和室间质控品等进行染色, 评估抗体的浓度及染色指数。为节省时间、减少加样错误、抗体量标准化等使用混合抗体 (多个抗体混合在一起) 时, 抗体的保存时间需要实验室自行探索建立, 做好初始质控和使用过程中 (每几天或每周) 的验证, 确保检测结果无误, 做好相应记录<sup>[54]</sup>。(3) 项目质控: 有商品化质控品 (有阴阳性之分、正常异常之分或有检测值高低之分) 的检测项目, 应完成质控品可接受范围的测试或验证, 以及质控月度回顾; 无商品化质控品的项目, 宜按照相关要求进行比较<sup>[52, 55]</sup>, 比对分为 3 个级别: 有室间质控品的项目、与其他实验室比对项目、与临床诊断符合性 (回顾性的质控) 项目<sup>[55]</sup>。(4) 项目标准化: 一些国际协作组推荐部分检测项目的标准化方案, 理想情况是检测项目可以实现标准化, 质量有保证, 实验室间可比, 结果具有重复性<sup>[56]</sup>, 但由于实验室选择的流式细胞仪配置差异大, 检测方案不同, 且项目越复杂实验室自建比例越高, 目前标准化存在一定难度<sup>[57]</sup>。

### (四) 人员质控

流式细胞术样品的检测过程, 目前主要以人员手工操作为主, 由检测人员分析数据、出具报告并解释说明相关结果。因此流式细胞术从业人员应进行规范化培训, 获得相应的资格证书, 在工作中需接受继续教育并不断学习, 应至少每年一次进行人员的能力评估和人员间的比对, 还需综合考虑人员的工作量, 以保证检测分析质量<sup>[57]</sup>。检测结果宜由具备丰富的临床经验和知识背景的人员对结果进行解释。

由于流式细胞术可受到多种因素的影响, 其质量控制也应从以下方面重点考虑和执行: (1) 样品和试剂处理: 严格遵照 SOP 进行样品处理、核查试剂完整性、建立 QC 流程、应用滴度良好的抗体、选择合适的对照作为每一个测试的参考。(2) 流式细胞仪: 包括仪器维护和日常 QC 测试、使用相应质控微球进行校准等。(3) 数据分析: 建议数据分析由合

格的人员执行<sup>[58]</sup>。

**共识 6 流式细胞术检测的质量控制应贯穿始终,包括检验前的标本、试剂和仪器,检验中的染色、数据获取和数据分析,检验后的报告发放和结果解释,重视人员质控。推荐强度:强烈建议。**

### 七、生物安全

1. 检验前生物安全:用于流式细胞术检测的实验室应达到生物安全二级实验室的标准,配备相应的必需设施,注意实验室生物安全。因采集的标本具有潜在传染性,应将所有样品放入有盖的采样管,放置到安全、密封的容器用于转运<sup>[18]</sup>。

2. 检验中生物安全:流式细胞术操作过程中可能有液滴飞溅和喷洒(涡旋气溶胶、离心等),所有人员应做好生物安全防护,正确佩戴手套、穿着工作服等,离开实验室宜换手套和洗手<sup>[18]</sup>。建议所有工作都在生物安全柜(BSC I或II级)中完成。如果条件不允许,建议可能产生液滴或气溶胶的程序(如涡旋、打开真空管等)应在生物安全柜中执行。标本离心时宜将标本置于密闭容器内,避免产生气溶胶,如出现离心意外,应遵循生物安全管理规定处理<sup>[18]</sup>。建议尽量使用仪器配置的转盘上样,使用密封罩隔绝标本和人员,如使用手动上样,应做好人员的安全防护。

3. 检验后生物安全:检测后标本应依据相关规定或是标本稳定性确定保存时间<sup>[52]</sup>,之后按照当地规定进行高压灭菌或焚化<sup>[18]</sup>。按照仪器维护要求,执行清洁程序,关机后废液及其他耗材按当地要求和实验室规定规范处理。

**共识 7 流式细胞术检测的生物安全应从检验前的环境和标本运输,检验中的人员、标本染色处理、上机检测和检验后的标本保存、医疗耗材的处理等全过程考虑。推荐强度:建议执行。**

流式细胞术的临床应用越来越广泛,除经典的免疫功能及白血病免疫表型等相关检测外,其在生殖、移植配型、微生物等领域亦有广泛应用,限于篇幅不展开介绍。流式细胞技术的飞速发展,高端流式细胞仪的普及应用及流式细胞仪自动化程度的不断提升,使得我们能够基于流式细胞术获得多参数、多维度的数据,为临床疾病的诊治提供更多的信息和支撑。

最后,专家组讨论起草的本共识,侧重于流式细胞术在临床的应用,从仪器和试剂选择、标本采集、主要项目的临床应用、数据和报告、质量控制和生物安全等7方面阐述,虽已经尽可能涵盖检测的

全流程,但由于流式细胞术的应用广泛,仍不可避免存在一些疏漏和不足,请同行专家提出宝贵意见,本共识也会适时增补修订。

执笔人:王维维(上海交通大学医学院附属新华医院),沈立松(上海交通大学医学院附属新华医院)

专家组成员(按姓氏汉语拼音排序):崔巍(中国医学科学院肿瘤医院),潘柏申(复旦大学附属中山医院),彭明婷(国家卫生健康委临床检验中心),尚红(国家医学检验临床医学研究中心,中国医科大学附属第一医院),沈立松(上海交通大学医学院附属新华医院),王蓓丽(复旦大学附属中山医院),王建中(北京大学第一医院),王维维(上海交通大学医学院附属新华医院),张子宁(国家医学检验临床医学研究中心,中国医科大学附属第一医院)

利益冲突 作者声明无利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] 中华医学会检验医学分会,卫生部临床检验中心,中华检验医学杂志编辑委员会.流式细胞术临床应用的建议[J].中华检验医学杂志,2013,36(12):1064-1073. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2013.12.003
- [2] 国家食品药品监督管理总局公布YY/T 0588-2017《流式细胞仪》等6项医疗器械行业标准[J].生物医学工程与临床,2018,(1):93.
- [3] Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry [J]. Mol Biotechnol, 1999, 11(1): 37-53. DOI: 10.1007/BF02789175.
- [4] Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition) [J]. Eur J Immunol, 2019, 49(10): 1457-1973. DOI: 10.1002/eji.201970107.
- [5] Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry[J]. Curr Protoc Immunol, 2017, 117: 5.4.1-5.4.38. DOI: 10.1002/cpim.26.
- [6] 国家食品药品监督管理总局. YYT 1184-2010. 流式细胞仪用单克隆抗体试剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [7] Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(3): 191-200. DOI: 10.1038/nri3158.
- [8] Schuh E, Berer K, Mulazzani M, et al. Features of Human CD3+CD20+T Cells[J]. J Immunol, 2016, 197(4): 1111-1117. DOI: 10.4049/jimmunol.1600089.
- [9] Pan Q, Ye L, Deng Z, et al. Effects of red blood cell lysing solutions on the detection of peripheral basophils of healthy normals and SLE patients by flow cytometry[J]. J Immunoassay Immunochem, 2014, 35(4): 368-377. DOI: 10.1080/15321819.2014.899010.
- [10] Tiirikainen MI. Evaluation of red blood cell lysing solutions for the detection of intracellular antigens by flow cytometry[J]. Cytometry, 1995, 20(4): 341-348. DOI: 10.1002/cyto.990200410.
- [11] Green MR, Sambrook J. Buffers[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2018, 2018(2). DOI: 10.1101/pdb.top098210.
- [12] Ríos-Lugo MJ, Martín C, Alarcón JA, et al. Optimization of



- buffer solutions to analyze inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid by multiplex flow cytometry[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2015, 20(1):e13-16. DOI: 10.4317/medoral.19852.
- [13] Stoll VS, Blanchard JS. Buffers: principles and practice[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 182: 24-38. DOI: 10.1016/0076-6879(90)82006-n.
- [14] Kappelmayer J, Gratama JW, Karászi E, et al. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a. Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols[J]. *J Immunol Methods*, 2000, 242(1-2): 53-65. DOI: 10.1016/s0022-1759(00)00220-9.
- [15] Nicholson JK, Green TA. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping. Effect of specimen age on results[J]. *J Immunol Methods*, 1993, 165(1): 31-35. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90103-e.
- [16] Gong X, Lin D, Wang H, et al. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid in adult patients with acute lymphoblastic leukemia during follow-up[J]. *Eur J Haematol*, 2018, 100(3): 279-285. DOI: 10.1111/ejh.13011.
- [17] 中国中西医结合学会检验医学专业委员会. 流式细胞术检测脑脊液肿瘤细胞的专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(8): 679-689. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200927-00747.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. H42-A2 Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2007.
- [19] 卫生部临床检验标准专业委员会. WS/T 360-2011. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部发布, 2011.
- [20] 中国儿童免疫与健康联盟免疫评估工作组, 中国医师协会儿科医师分会风湿免疫专委会, 中国医师协会儿科医师分会儿童过敏专委会, 等. 流式细胞术分析外周血淋巴细胞亚群在儿科的临床应用专家共识(2019年版)[J]. *中华儿科杂志*, 2019, 57(6):424-428. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2019.06.005.
- [21] 中华医学会健康管理学分会. TBNK淋巴细胞检测在健康管理中的应用专家共识[J]. *中华健康管理学杂志*, 2023, 17(2): 85-95. DOI: 10.3760/cma.j.cn115624-20221126-00861.
- [22] Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M. OMIP-017: human CD4(+) helper T-cell subsets including follicular helper cells[J]. *Cytometry A*, 2013, 83(5):439-440. DOI: 10.1002/cyto.a.22269.
- [23] Rühle PF, Fietkau R, Gaipl US, et al. Development of a Modular Assay for Detailed Immunophenotyping of Peripheral Human Whole Blood Samples by Multicolor Flow Cytometry[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8). DOI: 10.3390/ijms17081316.
- [24] Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M. OMIP-019: quantification of human  $\gamma\delta$ T-cells, iNKT-cells, and hematopoietic precursors[J]. *Cytometry A*, 2013, 83(8): 676-678. DOI: 10.1002/cyto.a.22326.
- [25] Wistuba-Hamprecht K, Pawelec G, Derhovanessian E. OMIP-020: phenotypic characterization of human  $\gamma\delta$  T-cells by multicolor flow cytometry[J]. *Cytometry A*, 2014, 85(6):522-524. DOI: 10.1002/cyto.a.22470.
- [26] Mathew D, Giles JR, Baxter AE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications[J]. *Science*, 2020, 369(6508).DOI: 10.1126/science.abc8511.
- [27] Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, et al. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 162(2):271-279. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04206.x.
- [28] Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30:221-241. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934.
- [29] Bae MH, Park CJ, Kim BH, et al. Increased circulating plasma cells detected by flow cytometry predicts poor prognosis in patients with plasma cell myeloma[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018, 94(3): 493-499. DOI: 10.1002/cyto.b.21606.
- [30] Wang W, Li H, Zhang L, et al. Clinical applications of monitoring immune status with 90 immune cell subsets in human whole blood by 10-color flow cytometry[J]. *Int J Lab Hematol*, 2021, 43(5): 1132-1144. DOI: 10.1111/ijlh.13541.
- [31] Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M. OMIP-029: Human NK-cell phenotypization[J]. *Cytometry A*, 2015, 87(11): 986-988. DOI: 10.1002/cyto.a.22728.
- [32] Mair F, Prlic M. OMIP-044: 28-color immunophenotyping of the human dendritic cell compartment[J]. *Cytometry A*, 2018, 93(4):402-405. DOI: 10.1002/cyto.a.23331.
- [33] Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12150. DOI: 10.1038/ncomms12150.
- [34] Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(2):108-119. DOI: 10.1038/s41590-017-0022-x.
- [35] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 四色流式细胞术用于急性白血病免疫分型的中国专家共识(2015年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(4):265-271. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.04.001.
- [36] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗规范[S]. 北京: 国家卫生健康委办公厅, 2018.
- [37] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 儿童急性早幼粒细胞白血病诊疗规范[S]. 北京: 国家卫生健康委办公厅, 2018.
- [38] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会. 流式细胞学在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用专家共识[J]. *中华病理学杂志*, 2017, 46(4):217-222. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.04.001.
- [39] Seifert M, Scholtysik R, Küppers R. Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1956:1-33. DOI: 10.1007/978-1-4939-9151-8\_1.
- [40] Grewal RK, Chetty M, Abayomi EA, et al. Use of flow cytometry in the phenotypic diagnosis of hodgkin's lymphoma[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2019, 96(2): 116-127. DOI: 10.1002/cyto.b.21724.
- [41] Galera PK, Jiang C, Braylan R. Immunophenotyping of Acute Myeloid Leukemia[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2032:281-296. DOI: 10.1007/978-1-4939-9650-6\_15.
- [42] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 多参数流式细胞术检测急性白血病及浆细胞肿瘤微小残留病中国专家共识(2017年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(12): 1001-1011. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.001.

- [43] 中华医学会血液学分会实验诊断学组. 急性髓系白血病微小残留病检测与临床解读中国专家共识(2021年版)[J]. 中华血液学杂志, 2021, 42(11):889-897. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.11.002.
- [44] Tomuleasa C, Selicean C, Cismas S, et al. Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia: A consensus paper that presents the clinical impact of the presently available laboratory approaches[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2018, 55(5): 329-345. DOI: 10.1080/10408363.2018.1463508.
- [45] Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F, et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations[J]. Leukemia, 2021, 35(11): 3059-3072. DOI: 10.1038/s41375-021-01241-1.
- [46] Falay M, Afacan Öztürk B, Güneş K, et al. The Role of CD200 and CD43 Expression in Differential Diagnosis between Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma[J]. Turk J Haematol, 2018, 35(2):94-98. DOI: 10.4274/tjh.2017.0085.
- [47] Farren TW, Giustiniani J, Fanous M, et al. Minimal residual disease detection with tumor-specific CD160 correlates with event-free survival in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood Cancer J, 2015, 5(1): e273. DOI: 10.1038/bcj.2014.92.
- [48] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. CD34阳性细胞绝对计数的流式细胞术测定指南[J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(7): 539-546. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.002
- [49] 中国生物工程学会细胞分析专业委员会, 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组, 中华医学会血液学分会红细胞学组. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症流式细胞术检测中国专家共识(2021年版)[J]. 中华血液学杂志, 2021, 42(4):281-287. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.04.003.
- [50] McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview[J]. Curr Protoc Immunol, 2018, 120: 5.1.1-5.1.11. DOI: 10.1002/cpim.40.
- [51] Staats J, Divekar A, McCoy JP Jr, et al. Guidelines for Gating Flow Cytometry Data for Immunological Assays[J]. Methods Mol Biol, 2019, 2032: 81-104. DOI: 10.1007/978-1-4939-9650-6\_5.
- [52] 上海市临床检验中心等. 上海市医疗机构临床实验室管理规范[S]. 上海: 上海科技出版社, 2022.
- [53] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 医疗机构临床实验室管理办法[S]. 北京: 国家卫生健康委办公厅, 2020.
- [54] Greig B. Quality Control of Immunophenotyping[J]. Methods Mol Biol, 2019, 2032: 227-279. DOI: 10.1007/978-1-4939-9650-6\_14.
- [55] College of American Pathologists. Flow cytometry CAP Checklist 2022. USA: CAP Accreditation Program, 2022.
- [56] Kalina T. Reproducibility of Flow Cytometry Through Standardization: Opportunities and Challenges[J]. Cytometry A, 2020, 97(2): 137-147. DOI: 10.1002/cyto.a.23901.
- [57] Wolniak K, Goolsby C, Choi S, et al. Report of the results of the International Clinical Cytometry Society and American Society for Clinical Pathology workload survey of clinical flow cytometry laboratories[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2017, 92(6): 525-533. DOI: 10.1002/cyto.b.21398.
- [58] Mizrahi O, Ish Shalom E, Baniyash M, et al. Quantitative Flow Cytometry: Concerns and Recommendations in Clinic and Research[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2018, 94(2):211-218. DOI: 10.1002/cyto.b.21515.