



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

生物技术 细胞计数 第2部分：细胞计数方法质量控制的实验设计 和统计分析

Biotechnology — Cell Counting —
Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method
performance

(ISO/DIS 20391-2:2018(E))

(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

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

1 范围 2

2 规范性引用文件 2

3 术语和定义 2

4 原则 9

5 实验设计 11

6 统计方法 15

7 报告 19

附录 A（规范性） 附件 A(参考资料) 21

附录 B（规范） 25

附录 C（信息） 26

附录 D（信息） 28

附录 E（信息） 34

参考书目 46

生物技术 细胞计数

第 2 部分：细胞计数方法质量控制的实验设计和统计分析

1 范围

本文件提供了一种通过源自稀释系列实验设计和统计分析的质量指标来评估特定细胞制备物的细胞计数测量过程质量方面的方法。这些质量指标基于测量的重复性以及结果与理想稀释比例响应的符合程度。该方法适用于总细胞计数、差异细胞计数、直接细胞计数和间接细胞计数测量过程，前提是测量过程符合实验设计标准（如细胞悬浮于溶液中）。

本方法在细胞计数方法的开发、优化、验证、评估和/或细胞计数测量过程的确认期间最为适用。

本方法特别适用于没有适当的参考材料来评估准确性的情况。本方法不直接提供细胞计数的准确性。

本方法主要适用于真核细胞。

注：存在若干针对特定行业/应用的国际和国家标准用于细胞计数。因此，在适用范围内，参考现有标准的操作会非常有帮助。

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文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

ISO/WD 20391-1，生物技术-细胞计数-第1部分：细胞计数方法通则

VIM JCGM 200：2012，国际计量词汇

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

术语和定义

ISO 和 IEC 维护术语数据库，以供在以下地址进行标准化使用：

— ISO 在线浏览平台：<https://www.iso.org/obp>

— IEC 电子百科：<http://www.electropedia.org/>

3.1.1

精度 accuracy

<测量值>

测量的量值与测量的真实量值之间的一致度

[来源：VIM JCGM 200：2012]

3.1.2

偏差 Bias

<测量值>

系统测量误差的估计

注1: 系统测量误差是测量误差的一个组成部分,它在重复测量中保持恒定或以可预测的方式变化。

系统测量误差的参考量值是真实的量值,或测量不确定度可忽略的测量标准的测量量值,或常规量值。

注2: 也定义为测试结果的期望与可接受的参考值(ISO 3534-1)之间的差值。

3.1.3

细胞浓度 cell concentration

单位体积细胞数

注1: 通常用于悬液中的细胞(如每毫升细胞数)。

注2: 细胞浓度可指细胞总数或体积内特定细胞子集的计数(如每毫升活细胞数)。

3.1.4

细胞计数 cell count

被测细胞的离散数

注1: 悬浮细胞的细胞计数通常用细胞浓度表示。

3.1.5

细胞计数过程 cell counting

测定细胞计数的测量过程

3.1.6

细胞悬液 cell suspension

分散在液体基质中的单个细胞或细胞聚集体

3.1.7

碎片 Debris

<细胞悬液>

生物或非生物来源的细胞片段和/或颗粒

3.1.8

细胞差异计数 differential cell count

细胞亚群的细胞计数,通过测量中确定的至少一个不同的细胞属性将其与其他细胞亚群区分开来

注1: 由差异细胞计数得出的浓度可以用绝对浓度表示,也可以用相对于总细胞数或另一个预定义群体的相对度量(即百分比)表示。

3.1.9

稀释比例 dilution fraction

溶液中溶质浓度从原始浓度降低的比率

注1: 稀释分数的取值范围为0到1。

注2: 稀释分数有时也被称为“稀释比”或“稀释系数”。

例1: 细胞悬液(溶液)中细胞(溶质)的浓度从悬液中细胞的起始浓度降低的比率。

3.1.10

稀释系列 dilution series

同一物质浓度增加或减少的一组溶液

注1: 稀释系列可通过连续稀释或独立稀释生成。

注2: 对于细胞悬液,稀释系列是一组细胞浓度增加或减少的悬浮液。

3.1.11

实验设计 experimental design

计划一项研究以达到特定目标的过程

注1：为参与者分配实验条件的计划以及与该计划相关的统计分析。通常，这包括对自变量、因变量、参与者人数和抽样策略、将参与者分配到实验条件的程序以及给出测试任务的顺序的说明。

[参考：ISO/IEC 25062：2006]

3.1.12

独立稀释 independent dilution

每次稀释都独立于其他稀释进行的稀释系列

条目1注：通常独立稀释系列是直接从普通原液中以预先指定的(或目标)稀释分数生成的。

3.1.13

中间精密度 intermediate precision

<测量条件>

一组条件中的测量条件，包括相同的测量程序、相同的位置和在一段较长时间内对相同或类似的物体进行重复测量，但可能包括涉及变化的其他条件

注1：这些变化可能包括新的校准、校准器、操作人员和测量。

注2：操作人员偏差特指由人为操作人员经验引起的误差。[来源：VIM JCGM 2002：2012]

3.1.14

定量限 limit of quantitation

(LOQ)

<用于细胞计数>

可使用特定分析方法以适当的精密度和准确度定量测定样品中的最低细胞计数

注1：定量限描述了样品基质中低水平细胞的定量测定。

3.1.15

线性 linearity

在给定范围内，分析方法获得与样品中分析物的浓度(量)成正比的测试结果的能力

[来源：ICH分析方法验证：文本和方法学Q2(R1)，修改。]

注1：在细胞计数中，分析物浓度是指样品中细胞(总细胞或差细胞)的浓度

注2：当一组测量值在给定输入的范围内呈线性时(同时所有其他输入和测量条件保持恒定)，测量值的期望值可以表示为恒定偏置项和输入参数乘以固定常数的总和。

3.1.16

被测变量 measurand

拟测量的数量

[来源：VIM JCGM 200：2012，2.3，修改-注释和示例未被接管。]

3.1.17

测定稀释分数 measured dilution fraction

通过可追溯测量验证的稀释分数

注1：例如，液体的体积可以通过使用具有适当灵敏度的校准和可追溯的刻度测量液体的质量(考虑密度)来验证。

3.1.18

测量模型 measurement model

在一次测量中已知的所有量之间的数学关系

注1：测量模型的一般形式为方程 $h(Y, X_1, \dots, X_n) = 0$ ，其中测量模型的输出量Y为被测量，其量值由测量模型 X_1, \dots, X_n 的输入量信息推断出来。

注2：灵活模型是一种测量模型，旨在捕捉与理想模型所描绘的行为的系统偏差。

3.1.19

测量过程 measurement process

〈用于细胞计数测量〉

获得细胞计数的整个过程

注1：测量过程可包括样品制备程序、测量系统、其设置(如孔径选择、细胞尺寸选通、放大倍率、光照时间等)和 数据分析。

3.1.20

测量精度 measurement precision

在规定条件下对相同或类似物体进行重复测量而获得的指示或测量量值之间的一致性

注1：在规定的测量条件下，测量精度通常用不精确的测量值，如标准差、方差或变异系数(CV)来表示。

注2：“规定条件”可以是，例如，测量的重复性条件，测量的中间精度条件，或测量的再现性条件(见ISO 5725-1: 20 94)。

[来源：VIM JCGM 200: 2012, 2.15, 修改-注释未被接管。]

3.1.21

比例 proportionality

无论范围如何，分析程序获得与样品中的分析物浓度（量）直接成比例的测试结果的能力

注1：在细胞计数中，分析物的浓度指的是样品中细胞（总数或差异数）的浓度。

注2：当一组测量结果与给定的输入参数成比例时，即在输入参数的值变化时，测量值的期望值与测量所采取的输入参数值之比保持恒定（同时保持所有其他输入和测量条件不变）。

注3：当一组测量值在给定的输入范围内呈现比例性时，则：

$$Y=cX$$

其中Y，测量值的期望值表示为输入参数(X) 乘以固定常数(c)，没有偏差项。

3.1.22

比例常数 proportionality constant

将测量值与输入参数直接联系起来的常数乘法因子

3.1.23

比例指数 proportionality index

〈细胞计数〉

对于稀释系列实验设计的比例关系偏离的度量指标

注1：比例指数(PI)是特定于被评估的细胞制备和细胞计数测量过程的。

3.1.24

p值 p-value

统计假设检验的输出

注1：p值的获取方式如下：在原假设成立的假设下，检验统计量的分布被确定，称为零分布。p值是从零分布中计算出来的，作为观察到与从实际数据中获得的检验统计量相同或更极端的检验统计量的概率。

注2：根据所考虑的假设集的不同，极值可以有不同含义。当没有指定备选假设时，“更极端”通常意味着在零分布下发生的可能性更小。当给定一个特定的备择假设时，在备择假设为真的假设下，检验统计量的分布被确定，称为备择分布。在这种情况下，“更极端”通常意味着更小的似然比(即在零分布下分配给给定检验统计量的密度除以在备用分布下分配给该检验统计量的密度)。

注3：产生低于预选阈值（通常为0.05）的p值的数据通常被解释为提供了足够的证据来拒绝零假设（如果指定，则支持备选假设）。虽然产生的p值大于预选阈值的数据不能提供足够的证据证明零假设为假，但它们也不能证明零假设为真。

3.1.25

数量 quantity

一种现象、物体或物质的性质，该性质有一个大小，可以用数字和参考来表示

[来源：VIM JCGM 200：2012]

3.1.26

量的值 quantity value

数和参考值一起表示量的大小

[来源：VIM JCGM 200：2012]

3.1.27

范围/适用性范围 range/applicability range

分析方法已被证明具有适当的精密度、准确度和线性水平的数量区间

3.1.28

参考物质 reference material**参考标准 reference standard**

被确定为适合用于测量或检查名义属性的特定物质，具有与指定属性相关的足够均匀且稳定的特性

[来源：VIM JCGM 200：2012]

3.1.29

参考方法 reference method**参考测量程序 reference measurement procedure**

被认可的测量程序，其测量结果适用于评估通过其他测量程序获得的同类量值的测量准确度，用于校准或表征参考物质

[来源：VIM JCGM 200：2012]

3.1.30

测量的重复性条件 repeatability condition of measurement

一组条件中的测量条件，包括相同的测量程序、相同的操作人员、相同的测量系统、相同的操作条件和相同的位置，并在短时间内对相同或类似的物体进行重复测量

注1：测量条件仅是相对于一组指定的重复性条件而言的重复性条件。

[来源：VIM JCGM 200：2012]

3.1.31

可重复性 repeatability**<测量结果>**

在规定的测量条件下的测量精度

注1：重复性也可以被认为是在相同的测量条件下进行的同一测量的连续测量结果之间的一致性的密切程度[3]

[来源：VIM JCGM 200：2012， 2.21，修改-添加了新术语，并将“一组可重复性”替换为“定义的”。]

3.1.32

再现性 reproducibility**<测量结果>**

同一测量的测量结果与在改变的测量条件下进行的测量结果之间的一致性

[来源: CLSI (2007).]H20-A2参考白细胞(WBC)差异计数(比例)和仪器方法评估, 第2版。

3.1.33

残差 residual

〈在数值分析中〉

因变量的观测值与预测值之间的数值差异

3.1.34

样本 sample

从系统中取出的一个或多个部分, 旨在提供该系统的信息

注1: 通常样本用作对系统或其生产进行决策的依据

注2: 例如, 从较大体积的细胞悬液中提取较小体积或等比的细胞悬液[3]。

[来源: ISO 15198: 2004, 修改-“总体”替换为“系统”]

3.1.35

选择性 selectivity

测量系统的性质是指在使用特定测量程序时, 该系统能够提供一个或多个可测量的量值, 使得每个被测量量的数值与其他被测量量或现象、物体或被研究物质中的其他数量无关。

[来源: VIM JCGM 200: 2012, 4.13, 修改-删除了一个术语, 并没有保留所有注释和示例。]

3.1.36

连续稀释法 serial dilution

一种物质在溶液中的逐步稀释, 其中浓度的降低是累积的, 随着每次稀释而减少

注1: 在连续稀释系列中, 除第一次稀释外的所有稀释都依赖于前一次稀释。

3.1.37

细胞原液 stock cell solution

足够高的浓度和足够稳定(随时间推移)的细胞悬液, 以便在实验期间稀释成工作浓度

3.1.38

系统误差 systematic error

〈测量〉

在重复测量中保持恒定或以可预测的方式变化的测量误差的组成部分

注1: 系统测量误差的参考量值是真实量值, 或测量不确定度可忽略的测量标准的测量量值, 或常规量值。

注2: 系统测量误差及其原因可以是已知的, 也可以是未知的。修正可用于补偿已知的系统测量误差。

注3: 系统测量误差等于测量误差减去随机测量误差。

[来源: VIM JCGM 200: 2012]

3.1.39

目标稀释分数 target dilution fraction

用一定体积的溶液稀释得到的稀释分数

3.1.40

检测样本 test sample

为所关注的测量方法而准备的样品的小份试样

注1: 一般来说, 测试样品具有其制备样品的代表性, 有时被称为“代表性测试样品”。

3.1.41

细胞总数 total cell count

所有细胞的细胞计数, 与细胞的属性无关

3.1.42

真实计数 true count

<或真量值>

与一个量的定义相一致的量值

注1：在描述测量的误差法中，真实的量值被认为是唯一的，并且在实践中是不可知的。不确定性方法要认识到

，由于数量定义中固有的不完整的细节量，不存在单一的真量值，而是一组与定义一致的真量值。然而，这组值在原则上和实践中都是不可知的。其他方法完全抛弃了真量值的概念，而依靠测量结果的计量相容性的概念 来评估其有效性。

注2：在基本常数的特殊情况下，该量被认为只有一个真量值。

注3：当与被测量量相关的定义不确定性被认为相对于其他测量不确定性成为可以忽略的因素时，被测量量可以被视为具有“基本上唯一”的真实数量值。这是GUM（Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement，测量不确定度表达指南）及相关文件所采用的方法，其中认为“真实”这个词是多余的。。

[来源：VIM JCGM 2002：2012]

3.1.43

验证 validation

通过提供客观证据的方式，确认特定预期使用或应用的要求已经被实现

[来源：ISO 9000：2015，修改-注释未被采纳。]

3.1.44

可变性 variability

变量、参数或条件的概率分布函数的量化

[来源：ISO 16732-1：2012]

3.2 缩略语列表

按出现顺序排列的缩写词列表：

CV	变异系数
true count _i	样本 <i>I</i> 的理论/真实计数
DF	稀释比例
ture DF	理论/真实稀释分数
<i>c_{ideal}</i>	理想比例常数
<i>E(</i> observed counts <i>)_i</i>	观察计数的期望值
<i>B</i>	可能不同于 _{<i>kideal</i>} 的比例常数
Eq.	方程
PI	比例指数
<i>E</i>	数据与模型拟合之间的残差
<i>e^{smoothed}</i>	处理后的细胞计数与比例模型拟合之间的残差平滑
<i>Y_{ijk}</i>	代在目标稀释系数 <i>i</i> 下，代表性测试样本 <i>j</i> 的第 <i>k</i> 次测量中观察到的值。
<i>I</i>	目标稀释分数指标
<i>J</i>	重复代表性试验样品指标
<i>K</i>	对有代表性的测试样品进行重复测量的指标

I	目标稀释系数的数量
n_i	在目标稀释分数下重复代表性测试样品的数量
K_{ij}	代表性测试样本的重复测量次数
df_i	目标稀释分数
df_{ij}	测定稀释分数
DF	一组独特的目标稀释分数
$DF_{measured}$	一组测量的稀释分数
Y_{dfi}	一组 <i>c</i> 代表性测试样本的平均细胞计数, 目标稀释分数(df_i)
Y_{ij}	对于代表性测试样本 j 的 df_i , 对 K_{ij} 次重复观察结果的平均值。
CV_{ij}	在目标稀释系数 df_i 下, 对代表性测试样本 j 的 K_{ij} 次重复观察结果的变异系数
%CV $_{dfi}$	在目标稀释系数 df_i 下, 对于一组 n_i 个代表性测试样本的平均百分比变异系数
$\lambda_{ij}^{proportional}$	比例模型拟合 Y_{ij} 与 df_{ij}
β_1	比例模型拟合估计的标量系数
R^2	决定系数
$Y \dots$	对于一组 n_i 个独立的重复代表性测试样本, 对代表性测试样本 j 的 Y_{ij} 取平均值
$\lambda_{DFk}^{proportional}$	估计细胞计数 DD 使用 β_i 获得比例模型适合 $\lambda_{pspspsispi i}$
$e_i^{smoothed}$	在比例性分析中使用目标稀释分数时的平滑残差 (每个目标 DF 处的平滑残差)
$e_{ij}^{smoothed}$	测量稀释分数时的平滑残差用于比例性分析 (每个代表性测试样本的平滑残差)

4 原则

确保细胞计数具有高置信度意味着该测量既准确又精确 [1]。对于一个良好控制的稀释系列, 比例性概念可用作内部参考, 而与比例偏离可以作为评估准确度的直接评价的替代方法[2]。具体而言, 通过实验设计和统计分析, 可以评估描述与比例偏离和变异系数 (CV) 相关的质量指标, 以评估细胞计数测量过程的质量方面。

这些质量指标评估细胞计数测量过程的整体质量, 其中测量过程包括样品制备和处理、数据采集以及数据处理/校正。

理想情况下, 可以使用已知“真实”值的参考方法和/或参考材料来评估准确度 (详见 ISO 5725-1: 1994 和 ISO 5725-2: 1994)。在没有适当的参考物质或参考方法的情况下, 可以通过其遵循或偏离比例性的基本原则间接评估细胞计数测量的质量。比例性暗示在理想实验条件下, 所测得的细胞计数必须

与稀释系数成比例。比例性偏离将表明系统的测量误差发生，降低了整体测量置信度。然而，这种方法并不能直接提供细胞计数的准确度信息。

细胞计数测量的精确度表示在指定条件下，通过对相同或类似细胞制备进行重复测量所得到的细胞计数之间的一致程度。虽然平均细胞计数与比例性很好地吻合，但具有较低精确度的实验数据会降低测量过程的质量。重要的是，较低的测量精确度（即较大的随机测量误差）可能掩盖了与比例性偏离相关的情况。

4.1 比例

从共同的、理想均质的原液中提取的样品的理论真计数与它们各自的稀释分数按照以下表达式相关：

$$\text{Ture count}_i = c_{\text{ideal}} * \text{ture DF}_i \quad [1]$$

其中

Ture count_i 为样品*i*的理论真计数；

c_{ideal} 为一个未知的比例常数，等于未稀释样品的理论真计数；

ture DF_i 为样品*i*的真实稀释分数。

通过严格控制稀释分数，理论 ture DF_i 可近似为 DF_i ：

$$\text{ture DF}_i = \text{DF}_i \quad [2]$$

其中

DF_i 是由测量过程控制或实验确定的样品*i*的稀释分数。

在没有进行校准的情况下，但其他方面是理想的测量过程将展示预期观察计数的期望值 $E(\text{observed counts}_i)$ 与稀释比例之间的比例关系。换句话说，在没有系统性测量误差的情况下，这种测量过程将满足比例关系：

$$E(\text{observed counts}_i) = \beta * \text{DF}_i \quad [3]$$

其中

β 是一个比例常数，可能与 c_{ideal} 。

将Eq. 1和Eq. 3结合起来，可以通过一个常数直接联系真实计数和 $E(\text{observed counts}_i)$ 。

$$\text{ture count}_i = c_{\text{ideal}} * E(\text{observed counts}_i) \quad [4]$$

β

如果 β 已知（例如通过参考材料的使用），并且 $\beta = c_{\text{ideal}}$ ，则 $E(\text{observed counts}_i) = \text{真实计数}_i$ （即，可以确定观察计数的准确度）。

如果 β 未知，预期的比例关系（Eq. 3）与测量关系之间的接近程度可以用来评估细胞计数测量过程的质量，因为任何偏离比例性的情况都表明存在测量误差。通过比较预期关系和测量关系之间的一致性，我们可以判断测量过程的质量，并且可以检测出任何偏离比例性的误差。

注：与稀释成比例的测量误差不会导致比例的显著变化，因此不会在比例偏差分析中检测到。

4.2 偏离比例

通过汇总处理后的细胞计数数据与比例模型拟合的偏差来评估偏离比例性的情况。（图1）。

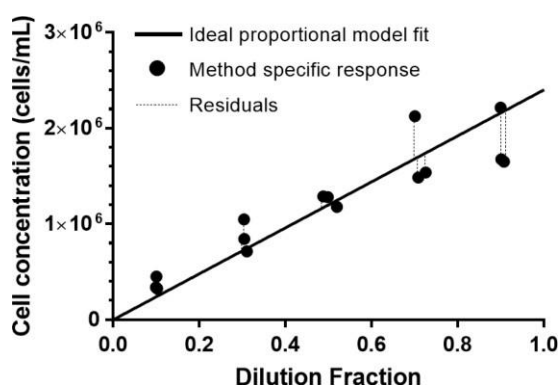


图1：稀释系列实验设计的假设细胞计数结果示意图，该实验设计有5个目标稀释分数，每个目标稀释分数有3个测试样品。点表示重复观察的平均细胞计数数据；线表示与数据拟合的比例模型；而虚线表示细胞计数数据与比例拟合之间的偏差或残差(e)。

残差(e)可能是测量过程中系统误差、随机误差或其组合的结果。因此，残差函数对偏差和精度的变化都很敏感。

比例指数将基于对比例模型拟合的平滑残差(e_{smoothed})的分析来计算(参见第6.4节)。

注：通过假设检验(产生P值)评估比例偏差，其中零假设假定预期计数的行为与稀释分数成正比，替代假设是更灵活的(例如，线性或二次)模型P值评估，不推荐，因为高随机测量误差会降低检测比例偏差的统计显著性的能力。

残差(e)可能是测量过程中系统误差、随机误差或其组合的结果。因此，残差函数对偏差和精度的变化都很敏感。

比例指数将基于对比例模型拟合的平滑残差(e_{smoothed})的分析来计算(参见第6.4节)。

注：通过假设检验(得出 p 值)来评估偏离比例性，其中零假设假定预期计数的行为与稀释分数成比例，而备择假设是更灵活的(例如线性或二次)模型，这种 p 值评估方法不被推荐，因为高随机测量误差会降低检测到偏离比例性的统计显著性的能力。

5 实验设计

细胞计数方法的选择，进行细胞计数测量的考虑因素，可能的不确定度来源，以及仪器鉴定和方法验证在ISO 20391-1中有描述。

5.1 细胞计数测量过程的注意事项

本文档中描述的实验设计和统计分析方法可用于评估测试样品处于悬液形式的细胞计数测量过程的质量。

这种方法可以应用于总计数、差异计数、直接计数和间接计数的细胞计数测量过程。

注：如果在计数之前需要进行重要的细胞处理，例如在细胞聚集体中生长的细胞需在计数之前进行个性化处理，那么将细胞个性化的处理步骤可以视为细胞计数测量过程的一部分。在这种情况下，原始细胞溶液中将包含细胞聚集体，然后将其稀释成独立的测试样本。每个独立的测试样本在测量之前都可以经历个性化的处理步骤。在这种情况下的挑战包括在样本中包含聚集体时如何保持稀释的完整性。

注：对于本文档的目的，如果细胞嵌入到基质中或粘附在表面上，将细胞转化为悬液的过程不被认为是细胞计数测量过程的一部分。

在稀有细胞事件或细胞数量相对较少的情况下，与本文档中描述的实验设计和统计分析相比，可能需要考虑其他因素。这些因素是针对在大量背景细胞群体中进行细胞计数的特殊情况而制定的。

5.2 为实验设计准备样品

实验设计的试验材料应为悬浮细胞。细胞可能处于反映细胞行为的条件下(即单个细胞、细胞聚集体或细胞凝聚体)。

用于生成用于细胞计数测量过程的代表性测试样品的样品制备和处理程序应进行优化,以保持用于计数的测试样品的性质。

样品制备程序应避免以改变细胞计数能力的方式破坏细胞,或以引入/减少可能干扰或人为改善细胞计数测量过程的碎片的方式破坏细胞。

注1: 参考文献[4-7]可对特定细胞类型和细胞样品的样品制备程序提供进一步的指导。

样品制备程序应在一定的时间和条件下进行,以保持细胞样品相对于可能影响细胞计数测量过程的性质的稳定性。更多信息请参见ISO 20391-1: 2018。

注2: 含有活细胞的样品是动态的,因此在可能影响细胞计数的特性方面可能不稳定。诸如细胞-细胞相互作用和细胞-物质相互作用等相互作用可引起细胞样品的变化,从而影响细胞计数。

进行细胞计数测量的样品,例如活细胞浓度等差异细胞计数过程中,会存在一定程度的异质性,而这种异质性可能会受到稀释过程的影响。样品制备程序应旨在产生能够代表原始细胞溶液异质性的测试样品。

注3: 对于异质细胞样品,某些细胞受培养/样品环境条件的影响比影响测试样品代表性的其他细胞更大。

5.2.1 细胞原液

应使用单一的细胞悬液生成所有具有代表性的测试样品。如果细胞原液的浓度和组成在名义上相等,则可以使用额外的细胞原液。

应使用与评估中相同的测量过程对细胞原液的细胞浓度进行估计。

在评估多个测量过程的用例中(见附件D),应选择单个测量过程来估计细胞原液中的起始细胞浓度,并应注意使用的测量工艺。

应选择适当的细胞原液浓度,以便在细胞计数测量过程的预期使用浓度范围内生成具有代表性的重复测试样本。

按照本文件中描述的方法评估的质量指标,是针对实验设计中研究的细胞制备(即细胞原液)的特定质量指标。因此,细胞原液和有代表性的测试样品应与用于测量过程的测试样品相似。

对于可能影响细胞计数测量过程的细胞制备的属性,应保持相似性。为了评估细胞计数测量过程的质量,本实验设计的代表性测试样本与用于测量过程的测试样本之间应该相似的属性可以包括悬浮培养基的组成、是否存在碎片、细胞聚集程度、细胞群体的异质性、细胞的光学性质、细胞的形态等(相关参考书目参见参考文献)。

5.2.2 稀释分数实验设计

广义稀释分数(DF)实验设计如图2所示。有关DF实验设计的更具体示例,请参见附录C和附录D。

设 Y_{ijk} 表示在普通细胞液中第 i 个目标稀释分数的第 j 个重复代表性测试样品的第 k 次重复观察中观察到的值。也就是说,设 I 表示唯一目标稀释分数的个数($I=1, \dots, I$; 每个指标引用一个唯一的目标DF值(0~1之间)); 设 c 表示为目标稀释分数 i 制备的具有代表性的重复测试样品的个数 i ; 令 K_{ij} 表示为第 i 个目标稀释分数制备的第 j th个重复 i th代表性测试样品的重复测量次数。

应生成一组代表性测试样品,这些样品基于一组唯一的目标稀释系数,表示为 $DF = \{df_i\}_{i=1}^I$, 例如 $DF = \{0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9\}$, 这些稀释系数是从原始细胞溶液中获得的,以使代表性测试样品中的细胞浓度落在细胞计数测量过程的预期使用浓度范围内。一般来说,应生成至少四个唯一的

df_i 。这些 df_i 应在线性尺度上均匀分布,并代表预期使用范围。如果选择了其他稀释系数间距的尺度,则需要考虑额外的统计因素。

应生成重复的代表性测试样品。一般来说,应在每个 df_i (即 $n_i \geq 3$)处生成至少三个重复的代表性测试样品。

应进行重复测量。一般来说,应对每个代表性测试样品进行至少三次重复测量 (即 $K_{ij} \geq 3$) ,使用测量的重复性条件 (即在同一实验室中,由同一操作员使用相同的设备,在短时间间隔内进行相同的测量过程) 。

选择适当的设计(如 df 的数量,重复代表性测试样品的数量,测量的次数)应根据所述的目的,并考虑样品的可用性和代表性测试样品在实验时间内的稳定性。功率分析(或功率分析)(即研究在替代假设为真时检测替代假设的能力)可以促进适当设计的选择[8]。对测量不确定度的分析也有助于选择合适的实验设计(参考文献: JCGM 100: 2008)。

如果样品可用性和/或稳定性是一个限制因素,则实验设计应尽可能地首先保持稀释分数的数量,然后是重复代表性测试样品的数量,最后是重复观察的数量。

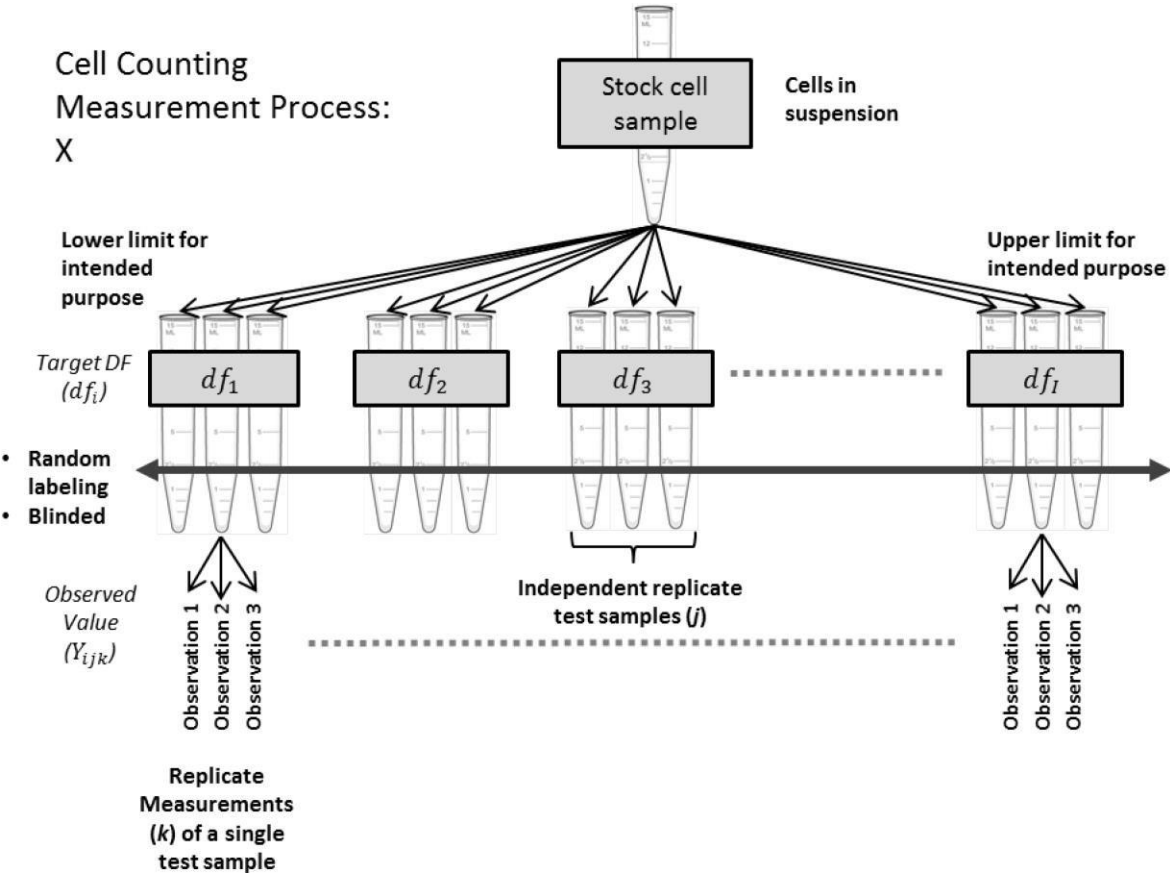


图2: 示意图描述了一个稀释分数实验设计的示例。从一个单一的原始溶液开始,通过独立的稀释制备了一组I个目标稀释分数 ($df_1, df_2, \dots, to df_I$)。每个代表性测试样品 ($n_i=3$) 都需要制备三个复制的试样,并对每个代表性测试样品进行三次复制的观察 ($K_{ij}=3$)。

5.2.3 产生稀释分数的注意事项

在稀释系列研究过程中,稀释剂的选择应保持代表性测试样品在可能影响细胞计数测量过程的特性方面的稳定性。

应采取预防措施,以确保通过可重复的过程产生稀释分数。

在准备后续稀释液之前，应充分混合细胞原液以产生均匀的细胞悬液。细胞的稀释应尽量减少因稀释过程而产生的变异性。

注1：减少稀释操作的次数可以最大限度地减少由于稀释过程引起的可变性。稀释过程应避免产生碎片和/或损坏细胞。

每个稀释分数应独立于原液生成，以避免与连续稀释相关的混合错误。如果对串联稀释过程有很好的了解，并且稀释分数在预先确定的规格范围内，或者可以通过适当的建模来纠正，则可以使用串联稀释。

理想情况下，稀释分数应当是已知的，且等于 df_i 。然而在实际操作中，真实的稀释分数可能会以随机或系统性的方式偏离目标稀释分数，从而损害稀释的准确性。稀释的准确性可能受到多种因素的影响，包括移液误差、细胞悬液的不均匀性、细胞流失到容器/移液管尖端、细胞随时间的不稳定性，以及连续稀释中的复合误差等。生成稀释分数的过程应考虑对稀释准确性的影响。

注2：移液器使用的进一步通用指南可从文献中获得，参见参考文献[9]和ISO 8655-1：2002、ISO 8655-2：2002和ISO 8655-6：2002

移液误差对稀释完整性的影响应予以说明。

注3：在本文件中，移液误差特指在制备代表性测试样品时对移液悬浮液体积的不准确假设所引起的误差。由于混合或样品处理不当引起的误差不包括在移液误差中。

移液误差对稀释完整性的影响可以在实验设计之前通过独立研究进行评估(预评估)。预评估移液误差对稀释完整性贡献的示例程序见附录A.1。

如果通过预评价评估移液误差对稀释完整性的贡献，用户应定义移液误差对稀释完整性贡献的接受标准，并证明已满足接受标准(见附录A.1)。

如果用户选择不预评价移液误差对稀释完整性的贡献，或者无法达到用户定义的移液误差对稀释完整性贡献的接受标准，则在生成代表性测试样品时，可以通过获得每个独立代表性测试样品的测量 DF 来解释移液误差对稀释完整性的贡献(见附件A.2.)。在这种情况下，测量的稀释分数的集合，记为 $DF_{\text{measured}} = \{df_{ij}\}$ (如 $DF_{\text{measured}} = \{0.104, 0.995, 0.102, 0.310, 0.294, 0.301\}$)用于PI的计算，采用改进的统计分析方法。(见附件B、附件C)。

5.3 测试样品标签

代表性的测试样品应标注足够的信息，以确保对原液和测试样品的稀释分数的可追溯性。

如果细胞计数测量过程涉及手动获取细胞计数的方法(例如，使用血细胞计进行手动细胞计数)和/或手动识别细胞/细胞群的方法(例如，流式细胞术方法中的手动门控)，则应标记代表性测试样品，以确保操作人员在测量和/或分析过程中对样品稀释和浓度不知情，以减少操作人员偏差的影响。

5.4 测试样品的测量

代表性测试样品的测量应在一定的时间和条件下进行，以保持代表性测试样品在稀释系列研究过程中可能影响细胞计数测量过程的性质的稳定性。

应根据为评估中的细胞计数测量过程建立的程序，从每个代表性测试样品中制备测量样品。参见ISO 20391-1：2018，了解准备测量样品的注意事项。

在制备每个测量样品之前，应将具有代表性的测试样品充分混合。

测量应按照为所评价的细胞计数测量过程建立的程序进行。细胞计数测量过程包括样品制备(如染色、裂解、分解)、样品处理(如移液、混合)、数据采集(如仪器设置、样品装载)和数据处理/校正(如重合校正、门控、图像分析参数设置)。参见ISO 20391-1：2018了解更多信息。

测量应以减少系统时间效应的方式进行。

注：随机测量样品的顺序可以降低PI和细胞计数测量过程质量的其他指标对系统时间效应的敏感性。

应记录从制备最终代表性测试样品到进行每次观察的时间间隔,以监测稀释系列研究过程中意外的时间效应。

6 统计方法

一个广义的数据分析流程图如图3所示。

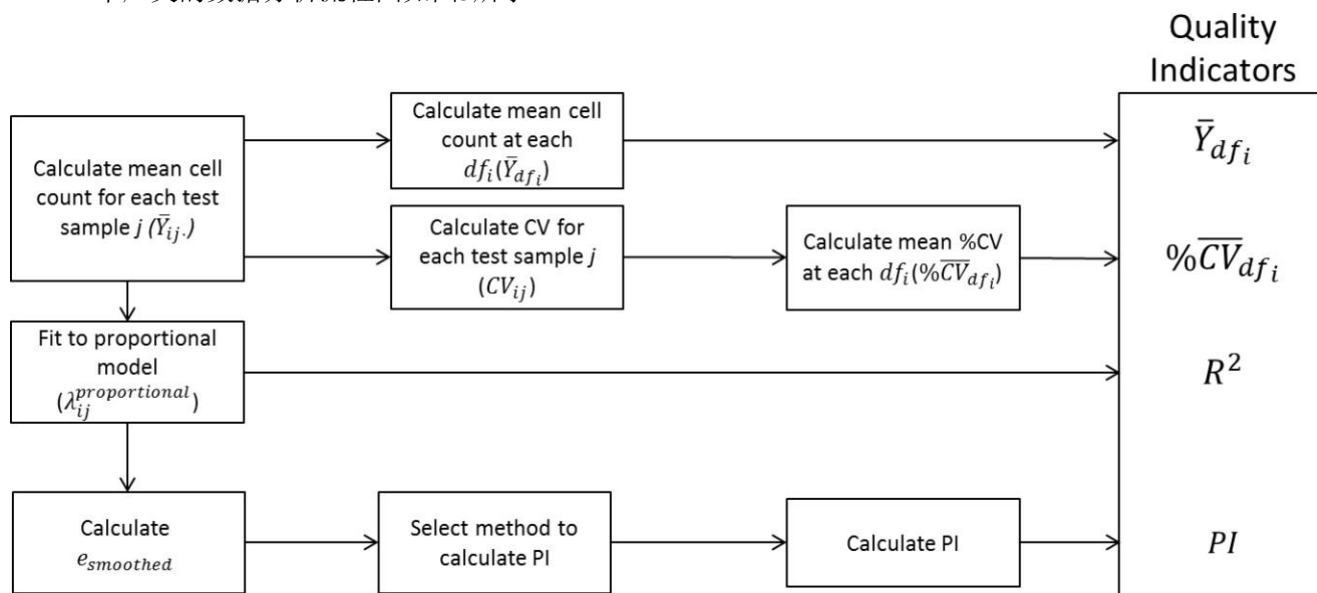


图3：基于稀释系列实验设计计算质量指标的分析过程示意图。

6.1 平均细胞计数

一组代表性测试样品的平均细胞计数 (Y_{dfi})，其目标稀释分数为 dfi ，可以用以下公式表示，其中测试样本的索引为 $j=1, 2, \dots, n_i$ ：

$$\bar{Y}_{dfi} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} \bar{Y}_{ij.}}{n_i} \quad [5]$$

$\bar{Y}_{ij.}$ 表示对于第 j 个代表性测试样品的一组 K_{ij} 次重复观察的平均值，其目标稀释分数为 dfi ，公式为

$$\bar{Y}_{ij.} = \frac{\sum_{k=1}^{K_{ij}} Y_{ijk}}{K_{ij}} \quad [6]$$

6.2 测量精度

测量精度应使用重复观测值的可重复性变异系数(CV)来评估，以百分比(%CV)表示。

对于代表性测试样品 j 的一组重复观察 K_{ij} ，在目标稀释分数为 dfi 的情况下，变异系数 (CV) 的计算公式为：

$$CV_{ij} = \frac{\text{standard deviation}}{\text{mean}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{K_{ij}-1} \sum_{k=1}^{K_{ij}} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{ij.})^2}}{\bar{Y}_{ij.}} \quad [7]$$

Y_{ij} 表示从对样本 j 的 K_{ij} 次测量中观察到的平均细胞浓度，其计算公式为Eq.6

一组代表性测试样品的平均变异系数百分比（%CV_{dfi}），其目标稀释分数为 df_i ，可以用以下公式表示，其中代表性测试样品的数量为 n_i ：

$$\%CV_{df_i} = 100 \times \frac{\sum_{j=1}^{n_i} CV_{ij}}{n_i} \quad [8]$$

CV_{ij}的计算公式为Eq.7，表示具有目标稀释分数 df_i 的代表性测试样品 j 的变异系数。

6.3 比例模型拟合

将 Y_{ij} 与 df_{ij} 拟合成比例模型，可以使用以下公式：

$$\bar{Y}_{ij} = \beta_1 * df_{ij} + \epsilon_{ij} \quad [9a]$$

其中

β_1 是模型拟合估计的标量系数；

ϵ_{ij} 表示 Y_{ij} 与比例趋势的偏差。

如果稀释完整性经过预评估，并且符合用户定义的稀释完整性规格（请参见附录A.1），则假定稀释分数 df_{ij} 为目标稀释分数 df_i 。否则，在比例模型拟合中，使用每个代表性测试样品 j 在每个目标稀释分数 i 下测得的实际稀释分数（ df_{ij} ）。

应选择一个适当的假设来对比例模型拟合的均值-方差关系进行建模。

观察到的计数与稀释分数的比例性应使用加权最小二乘建模方法与假设的均值-方差关系进行评估。

注：理想情况下，使用泊松假设对细胞计数进行建模。对于所有稀释分数的恒定体积的测量，这给出了与平均值成比例的方差。对于所有稀释分数的固定细胞数的测量，均值-方差关系将是一个常数。然而，在生物科学研究中，计数数据往往“过度分散”。在这些情况下，泊松分布的假设可以产生低估数据中存在的可变性的模型。可以考虑期望平均计数和计数的期望方差之间的其他关系。可以使用拟合优度检验来支持选择特定的均值与方差关系。

对于每个样本，比例模型预测的细胞计数应计算为

$$\lambda_{ij}^{proportional} = \beta_1 * df_{ij} \quad [9]$$

6.4 决定系数

决定系数(R^2)是一个广泛用于数据分析和实验设计领域的数字，作为描述模型与一组观察结果拟合程度的指标。

比例模型拟合需要计算 R^2 值。

比例模型拟合的 R^2 为：

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i \sum_j (\bar{Y}_{ij} - \lambda_{ij}^{proportional})^2}{\sum_i \sum_j (\bar{Y}_{ij} - \bar{Y}_{...})^2} \quad [10]$$

其中

\bar{Y}_{ij} 是单个代表性测试样品的重复观察中的平均细胞浓度，其计算公式为Eq.6。 $\bar{Y}_{...}$ 是独立的代表性测试样品 j 对于一组DF目标稀释分数下的 Y_{ij} 的均值，对于一组 n_i 个重复的代表性测试样品进行测量。

$$\bar{Y}_{...} = \frac{\sum_i \sum_j \bar{Y}_{ij}}{\sum_i n_i} \quad [11]$$

6.5 比例指数 (PI)

比例指数(PI)应基于对比例模型拟合的平滑残差($e_{smoothed}$)的分析来计算。

注1：基于非平滑残差的评价可作为单个细胞计数测量值与其各自理想值的接近程度的适当指标，而不是偏离比例性的系统误差。即使采用“平滑”步骤，与理想测量行为的偏差也是由随机变异性性和系统误差的未知混合引起的；然而，对平滑残差的评估，不是对单个残差的评估，减少了随机误差的影响，可以更清晰地看到偏离比例性的系统误差。

注2：PI是与所讨论的细胞计数测量过程有关的特定值，包括细胞制备、测量系统和所选的设置和数据校正、数据处理参数以及采样和测量程序，以及在派生PI时使用的实验设计和统计分析方法（例如，观察次数和所研究的稀释分数）。

注3：PI的计算严重依赖于精确的稀释分数（假设见式2）。稀释分数中未考虑的随机或系统误差将增加PI的可变性。

6.5.1 平滑残差的计算（ e_{smoothed} ）

当满足用户定义的稀释完整性标准时，在具有目标稀释分数 df_i 的一组 n_i 个代表性测试样品中，使用细胞数量的平均值（ \bar{Y}_{df_i} ）来计算每个 df_i 下的 e_{smoothed} ，公式如下：

$$e_i^{\text{smoothed}} = \bar{Y}_{df_i} - \lambda_{df_i}^{\text{proportional}} \quad [12]$$

其中

$\lambda_{df_i}^{\text{proportional}}$ 是在 df_i 处的估计细胞数量，使用方程式9中的 β_1 进行计算，公式如下：

$$\lambda_{df_i}^{\text{proportional}} = \beta_1 * df_i \quad [13]$$

在无法通过改善移液技术来满足用户定义的稀释完整性标准的情况下，可以在独立重复样品制备时获取测量的稀释分数 df_{ij} 。然后，根据附录B，可使用测量的稀释分数 df_{ij} 来计算每个代表性测试样品的平滑残差（ e_{smoothed} ）。

6.5.2 比例指数（PI）的计算

用户应根据平滑残差（ e_i^{smoothed} 或 e_{ij}^{smoothed} ）计算PI。

用户应根据细胞计数测量的预期用途选择计算PI的方法。表1提供了计算PI的可能方法示例。

注：PI可以采用多种方法计算，每种方法对每个平滑残差的影响的侧重点不同。

表1：使用基于平滑残差的方法评估比例指数(PI)的方法。（这不是一个详尽的列表；其他基于平滑残差的PI计算方法也适用）。

PI的计算方法	对比例指数(PI)的影响描述
R^2	R^2 (或决定系数)是一种基于残差的方法，用于评估统计模型的预测值与观测值的接近程度，当各测量值的方差相等时，它可能是计算PI的合适方法。（基于 R^2 的PI取值范围为0 ~ 1）。

缩放	按百分比而不是绝对比例进行分配。这种方法将在稀释分数中均匀地权衡对PI的贡献
未缩放	以绝对比例而不是百分比进行分配。在这种方法中，PI将受到大(即高浓度)稀释分数的观察结果的最大影响。
绝对值	总体绝对差异的长度（无论是缩放还是未缩放）在比例和灵活模型之间。在进行缩放后，残差片段计算平等。
平方和	比例模型和灵活模型之间的平方差(缩放或未缩放)的总和。对模型残差的平方赋予较大残差更大的影响

可以采用多种方法组合来选择适合预期应用的PI计算。

注： 作为一个例子，可以使用每个平滑残差的绝对值乘以比例模型相应预测计数的总和（即，缩放平滑残差的绝对值之和（ PI_{SAbsSR} ）），来更均衡地权衡残差汇总统计量在稀释分数上的贡献。否则，在接近未稀释样本的行为可能会主导PI的特征描述。此外，与“残差的平方值”相比，使用“残差的绝对值”可以减少离群值的影响，并且在汇总统计量中同等地权衡每个残差片段（即，如果一个缩放残差是另一个的两倍，它对PI的贡献将是两倍）。

有关可用于计算PI的方程式示例，请参阅附件C。

6.6 附加的统计分析和质量指标

适合预期目的的其他统计分析方法可以应用于从实验设计中收集的细胞计数数据，并用于生成用于评估细胞计数测量过程质量的额外度量(例如线性，中间精度，重复代表性测试样本的%CV等)。用于生成附加指标和方法的附加指标应明确定义并报告。

6.7 资料解释

本文件中描述的实验设计和统计分析所得出的质量指标评估整个细胞计数测量过程，包括样品制备、样品处理、数据采集和数据处理/校正过程中使用的方法。质量指标是针对测量过程和所研究的细胞样品而特定的。

6.7.1 %CV 的解释

较低的变异系数（%CV）值表示细胞计数测量更精确。
p值或置信区间可用于比较不同细胞计数测量过程之间的CV。

6.7.2 R² 的解释

R²的取值范围为0到1，R²越大意味着模型与观测值的拟合越好。R²越大，表明模型的预测值捕获了观测 数据中更大比例的变化。R²的评估依赖于数据的随机变异性。因此，R²值不能区分比例模型偏差的来源是由随机变异性(数据不精确)还是系统歧化引起的。对原始残差(即未平滑)的R²的评估基于单个测量值与其各自理想值的接近程度来表征性能，而不是基于偏离比例性的系统误差。

用户应根据测量的预期用途指定对R²的要求。
注：R²>0.95是有意义要求的一般解释与本分析无关。

6.7.3 PI 值的解释

PI值表示细胞计数测量过程的比例偏差。PI可用于部分评估细胞计数测量过程的质量，因为任何偏离比例的情况都表明存在随机和/或系统性的测量误差。例如，细胞计数测量过程的灵敏度差或使用超出定量限制的细胞计数测量过程可能导致测量误差，从而降低PI。

用户应根据测量的预期用途指定PI要求。

注1：PI对不随稀释度成比例的比例测量误差最敏感。与稀释成比例的比例测量误差不会导致PI的显著变化，应单独评估。

根据根据计算PI的方法，较高的PI值可以表示与比例关系的偏差更大或更小。例如，在使用基于平滑残差的 R^2 的PI（即 PIR^2SR ）的情况下，更接近0的值表示与比例关系的偏差更大，测量质量较差。

注2：PI值不适用于评价细胞计数装置的一般性能。

6.7.4 PI 值的比较

在使用相同稀释系列实验设计(包括名义上相似的原液细胞浓度)和相同统计分析方法的情况下，PI值的比较是有效的。

可以比较PI值来评估细胞计数测量过程之间、细胞类型之间和随时间的比例偏差的差异。

在相似的稀释系列实验条件下，可以对PI进行三次或三次以上的评估，以产生具有置信区间的平均PI，以便于在计数测量过程中比较PI值。

或者，当执行单个PI评估时，为了评估跨细胞计数测量过程中PI值之间差异的显著性，可以应用非参数自举分析方法来生成PI值的置信区间。

如果执行非参数自举分析，用户应在执行分析之前澄清分析的先决条件，包括例如自举迭代的次数和置信水平，并应报告非参数自举模拟的条件(例如自举迭代的次数和置信水平)。

注1：非参数自举分析适用于仿真的前提条件与执行的分析相一致的情况。

注2：从重复PI测量中确定的大量PI值可用于识别细胞计数测量过程的趋势和/或异常值。

7 报告

7.1 质量指标报告

细胞计数以细胞浓度表示，单位为细胞/ml。

根据细胞计数测量的预期用途，可以报告细胞计数的其他表达(例如细胞/cm²或细胞/mg微载体)。报告应包含以下质量指标：

- a) Y每个dfi的Ydfi (见6.1)
- b) 每个dfi的%CVdfi (见6.2)
- c) R^2 为比例模型拟合(见6.4)
- d) PI(见6.5)

7.2 实验设计参数及统计分析方法文件

报告应包括关于实验设计和统计分析的信息，包括以下内容，以使审查数据但未参与实验设计和/或统计分析的实体能够进行独立评估：

- a) 稀释分数实验设计要素包括(见5.1.2)
 - 1. 唯一目标稀释分数集($DF=\{df_i\}$) $i=1$
 - 2. 重复代表性测试样品个数(ni)
 - 3. 重复观察数(K_{ij})

b) 评价移液误差对稀释完整性影响的方法(如附录A.1所述的预评价),或在评估PI时用重量法测得的稀释分数,如附件A.2所述。如果进行移液误差对稀释完整性贡献的预评价,则应报告移液误差对稀释完整性贡献的用户定义接受标准。

c) 比例模型拟合中使用的假设均值-方差关系(见6.3)。

d) 比例模型拟合方程(见6.3, Eq. 9)

e) PI的计算方法(见6.5.2)

关于实验设计和统计分析的附加报告要素还可能包括以下项目的信息:

a) 细胞原液-细胞原浓度和估计储存细胞浓度的方法。

b) 实验设计-用于获得稀释的过程(即混合步骤,独立或连续稀释),包括代表性测试样品制备过程中所花费的时间。

c) 每次细胞计数测量的时间和/或样品制备和测量之间的时间。

d) 统计分析程序-附加指标,附加指标的定义,建模选择的理由,引导模拟参数。

e) 在实验设计和统计分析执行过程中产生的意外观察结果。

7.3 细胞计数测量过程的附加报告要素

细胞计数测量过程的附加报告要素可能包括以下项目的信息:

a) 细胞类型,代数或数量倍增,批号,来源

b) 试剂-名称,来源,批号,原产国,动物或人类来源

c) 测量过程-包括仪器、仪器设置、样品制备、数据操作

评价细胞计数测量过程质量和相关报告要素的用例示例见附件D和附件E。

附 录 A
(规范性)
附件 A(参考资料)

A.1 一般性

在本附录中，稀释的完整性特指移液误差对稀释完整性的贡献，并不涉及稀释完整性的其他方面。本附录的这一部分提供了针对本标准具体评估稀释完整性（与移液误差有关）的示例程序。

A.2 使用校准刻度预评估移液误差对稀释完整性贡献的示例程序，以在移液时获得准确的体积估计

为预评估稀释完整性概述的示例程序可以用作提高稀释完整性的工具，以便为执行细胞计数第2部分 实验设计选择的最终移液程序符合用户定义的规范。此外，预评估稀释完整性的程序大纲也可以用作操作人员在执行细胞计数第2部分之前的培训工具。

下面是预评估移液误差对稀释完整性贡献的示例程序：

A.2.1 按照实验设计中将用于生成独立的代表性测试样本的稀释方案（对于计算PI，包括重复）来进行操作。

在每个目标DF（ df_i ）下，请按照相应的稀释方案进行稀释，并生成相应的测试样本。。

稀释应由相同的操作人员进行，使用相同的移液器/类型的移液头，并使用将在评估PI时使用的类似的移液程序

待稀释的样品可以是以下几种之一：

- i. 一种类似于用于评估PI的细胞悬液的细胞悬液。
- ii. 一种悬浮介质，类似于用于评估PI的细胞悬液。

不建议用水来稀释样品，因为与水相关的移液误差通常低于与移液细胞悬液相关的移液误差。

稀释剂应与评估PI时使用的稀释剂相似

在稀释过程中，测量将进行移液的悬浮液的质量，即 m_{1ij} 和 m_{2ij} ，其中 m_{1ij} 是待稀释样本的质量， m_{2ij} 是移液生成目标稀释因子为 df_i 的测试样本时移液的稀释溶液的质量。

应选择具有足够灵敏度的校准刻度来测量移液悬浮液的质量。如果没有合适的刻度，可采用另一种方法来获得已验证的样品体积。

例如，灵敏度为0.0001 g的校准刻度可用于精确测量低至0.01 mL的样品体积的质量测量(参见ISO 8655-2: 2002了解更多信息)。

假设待稀释样品的密度和稀释介质近似相等，则每个代表性测试样本的预估DF($df_{ijpre-evaluated}$)可计

算为：

$$df_{ij}^{pre-evaluated} = \frac{m_{1ij}}{m_{1ij} + m_{2ij}} \quad [A1]$$

在某些情况下，假设待稀释样品和稀释介质具有大致相等的密度可能是不合理的。在这种情况下，在计算 $df_{ijpre-evaluated}$ 时应考虑每个溶液的密度。

A.2.2 计算预先评估的稀释完整性

绘制 $df_{ij}^{pre-evaluated}$ vs df_i 拟合一条被约束在(0, 0)处通过的直线，即比例模型拟合：

$$df_{ij}^{pre-evaluated} = \beta^{pipetting} df_i + \epsilon_i \quad [A2]$$

其中
 $\beta^{pipetting}$ 是一个常数;
 ϵ_i 表示 $df_{ij}^{pre-evaluated}$ 与比例趋势的偏离程度。

在理想情况下 $\beta^{pipetting}$ 将等于1
计算用于稀释完整性的移液误差贡献的决定系数 ($R_{dilution}^2$)。

如果 $R_{dilution}^2$ 大于或等于预先指定的用户定义标准（基于预期用途），则认为稀释完整性足够，可以在PI评估中使用 df_i 。

一般而言，对于稀释完整性可接受的移液误差贡献的标准应至少为 $R_{dilution}^2 \geq 0.98$ 。

为了在低稀释分数下保持稀释完整性，可采用多步稀释工艺。例如，可以从储存细胞溶液中获得更大体积的样品，然后连续稀释以达到所需的目标稀释分数。在计算稀释完整性时，应考虑每个稀释步骤引入的误差。

R^2 的规格取决于细胞计数测量的预期用途。允许稀释完整性的 R^2 较低将导致在细胞计数测量过程中检测偏离比例的灵敏度降低。

如果 $R_{dilution}^2$ 小于预先指定的用户定义标准，则认为稀释完整性不足。在这种情况下，应该改进并重新评估液体处理程序。如果液体处理程序无法进一步改进，且用户定义的标准仍未达到，则在PI评估期间可以获得测量的DF (df_{ij})，并用于PI计算，以满足稀释完整性的要求（见附录A.2）。

表A.1： 稀释完整性的数据收集和评估示例数据表

目标DF	靶细胞悬浮体 积(mL)	目标稀释剂 体积e (mL)	复制 样品	移液质量 (g) (m ₁)	移液稀释剂 的质量 (g) (m ₂)	$df_i^{pre-evaluated}$	$\beta^{pipetting}$	稀释的完整性 $R_{dilution}^2$
0.3	0.6	1.4	1	0.586	1.444	0.289	0.9754	0.9994
0.3	0.6	1.4	2	0.589	1.444	0.290		
0.3	0.6	1.4	3	0.586	1.452	0.287		
0.5	1	1	1	0.966	1.029	0.484		
0.5	1	1	2	0.985	1.035	0.488		
0.5	1	1	3	0.963	1.037	0.482		
0.7	1.4	0.6	1	1.351	0.613	0.688		
0.7	1.4	0.6	2	1.356	0.615	0.688		
0.7	1.4	0.6	3	1.335	0.616	0.684		

A.3 在PI评估过程中获得测量的DF的示例程序，使用校准的秤来获得准确的体积估计。

可以测量移液细胞悬液的质量和用于获得目标稀释分数的稀释介质的质量。当可以合理地假设这些溶液的密度在名义上相等时，溶液的质量之比提供了测量的稀释分数(df_{ij})。

A.3.1 按照实验设计中描述的稀释方案，在每个目标DF(df_i)处生成独立的代表性 i 测试样品，用于计算PI

在稀释过程中获得每个独立的代表性测试样本 j ，在目标稀释分数 i 处测量被移液的细胞悬液(m_{1ij})的质量和被移液的稀释液(m_{2ij})的质量。

应使用具有适当灵敏度的校准刻度来测量被移液的细胞悬液和稀释液的质量。如果没有合适的刻度，则应使用替代方法来获得已验证的样品体积。

例如，灵敏度至少为0.0001 g的校准刻度可用于精确测量低至0.01 mL的样品体积的质量测量(参见ISO 8655-2: 2002了解更多信息)。

假设细胞悬液和稀释介质的密度近似相等，则每个代表性测试样品(df_{ij})的实测DF可计算为：

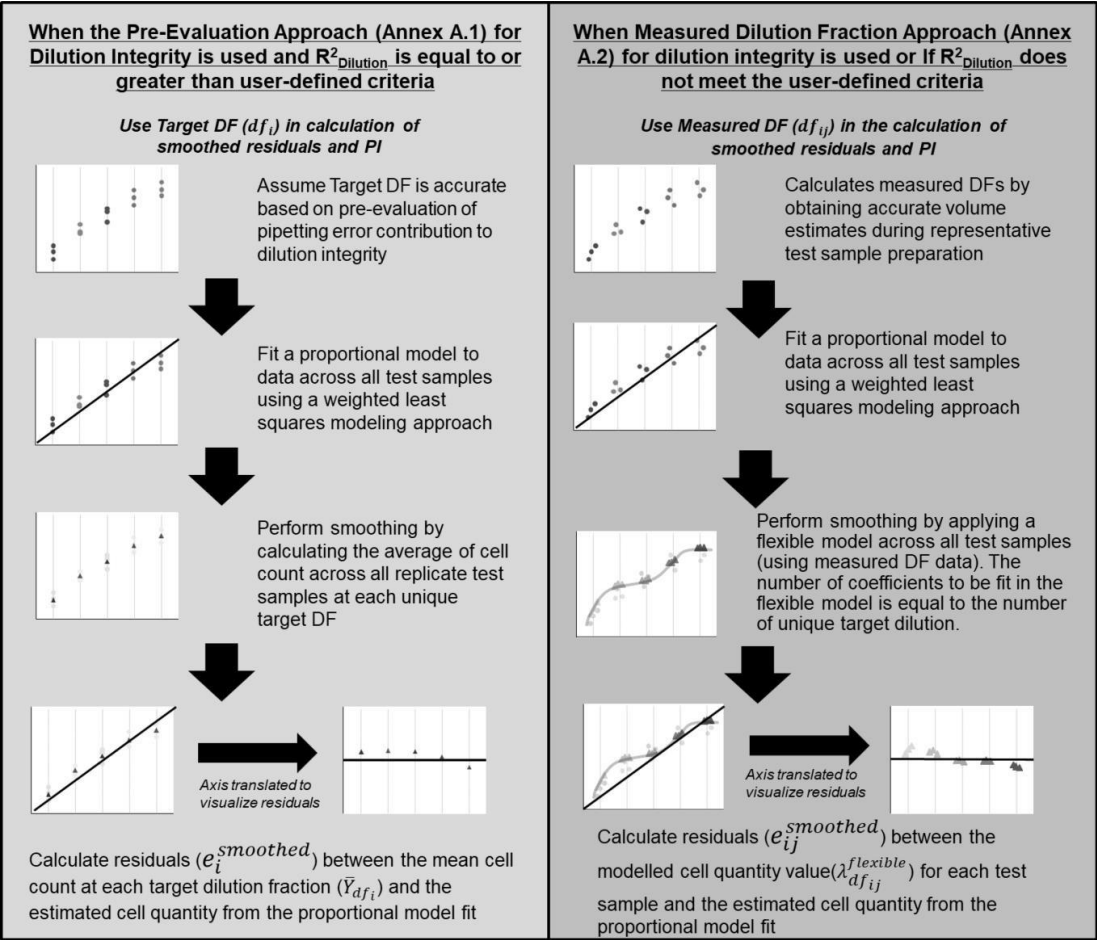
$$df_{ij} = \frac{m_{1ij}}{m_{1ij} + m_{2ij}} \quad [A3]$$

在某些情况下，假设细胞悬液和稀释介质具有近似相等的密度是不合理的。在这些情况下，在计算 df_{ij} 时应考虑每种溶液的各自密度

表A.2：每个代表性测试样本的数据收集和测量DF评估示例数据表

目标DF	靶细胞悬浮体积(mL)	目标稀释剂体积(mL)	重复测试样品	移液细胞的质量悬浮(g) (m_{1ij})	移液稀释液质量(g) (m_{2ij})	df_{ij}
0.3	0.6	1.4	1	0.582	1.407	0.293
0.3	0.6	1.4	2	0.599	1.415	0.298
0.3	0.6	1.4	3	0.597	1.426	0.295
0.5	1	1	1	1.013	1.012	0.500
0.5	1	1	2	1.009	1.019	0.498
0.5	1	1	3	0.959	1.021	0.484
0.7	1.4	0.6	1	1.397	0.604	0.698
0.7	1.4	0.6	2	1.399	0.604	0.698
0.7	1.4	0.6	3	1.395	0.596	0.701

A. 4 基于获得稀释分数的方法计算平滑残差的不同方法的图形表示。



图A1： 基于目标和测量DF的平滑残差计算的不同方法的图形表示

附录 B (规范)

当获得一组测量稀释分数 (DF_{measured}) 时, 计算平滑残差 (e_{smoothed}) 的方法

在细胞计数测量过程的评估中获得测量稀释分数 (df_{ij}) 时, 根据每个代表性测试样品的建模细胞计数 ($\lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}}$), 应按照本附录中所述的方法计算 e_{smoothed} 。

为了计算当获得测量的稀释因子 ($e_{\text{smoothed},ij}$) 时的平滑残差, 通过对 Y_{ij} 与 df_{ij} 之间的关系进行加权最小二乘模型建模, 根据柔性模型约束估计每个代表性测试样本的建模细胞数量值 ($\lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}}$)。

在灵活模型中拟合的系数总数, 包括截距, 等于唯一目标稀释分数 I 的数量。

例如, 在具有 3 个目标稀释分数 ($I = 3$) 的实验设计中, 采用准泊松分布假设的二次模型:

$$\lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}} = \gamma_0 + (\gamma_1 df_{ij}) + (\gamma_2 df_{ij}^2) \quad [B1]$$

其中

$\gamma_0, \gamma_1, \gamma_2$ 是模型拟合时估计的标量系数。

e_{ij}^{smoothed} 为具有代表性的测试样本 j , 目标稀释分数 i 计算为:

$$e_{ij}^{\text{smoothed}} = \lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}} - \lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}} \quad [B2]$$

其中

$\lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}}$ 为 df 处 ii 估计的细胞数量, 使用 Eq.9 中的 β_1 计算为:

$$\lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}} = \beta_1 * df_{ij} \quad [B3]$$

附录 C

(信息)

计算PI的示例方程

C.1 详细的例子计算 PI 的基础上的绝对值的总和的比例平滑残差

按比例平滑残差绝对值之和计算的PI值(PI_{AbsSSR})

当使用Eq.12计算 $e_i^{smoothed}$ 时, PI_{AbsSSR} 表达式如下:

$$PI_{AbsSSR} = \sum_i \left| \frac{e_i^{smoothed}}{\lambda_{df_i}^{proportional}} \right| \quad [C1]$$

$\lambda_{df_i}^{proportional}$ 是根据Eq.13估计的在 df_i 处的细胞数量

当使用 $e_{ij}^{smoothed}$ (Eq.B2) 时, PI_{AbsSSR} 的表达式如下:

$$PI_{AbsSSR} = \sum_i \sum_j \left| \frac{e_{ij}^{smoothed}}{\lambda_{df_{ij}}^{proportional}} \right| \quad [C2]$$

其中

$\lambda_{df_{ij}}^{proportional}$ 是在 df_{ij} 处估计的细胞数量, 其表达式由Eq.B3给出

C.2 基于平滑残差 R^2 计算 PI 的详细示例

基于平滑残差 R^2 的PI (PI_{R^2SR}):

当使用 $e_i^{smoothed}$ (Eq.12) 时, PI_{R^2SR} 的计算公式为:

$$PI_{R^2SR} = 1 - \frac{\sum_i (e_i^{smoothed})^2}{\sum_i (\bar{Y}_{df_i} - \bar{Y}_{...})^2} \quad [C3]$$

其中

\bar{Y}_{df_i} 由Eq.5给出;

$\bar{Y}_{...}$ 是在一组给定的目标稀释分数中, 每个 df_i 处细胞计数的平均值得出:

$$\bar{Y}_{...} = \frac{\sum_i \bar{Y}_{df_i}}{I} \quad [C4]$$

当使用 $e_{ij}^{smoothed}$ (Eq.11) 时, PI_{R^2SR} 的计算公式为:

$$PI_{R^2SR} = 1 - \frac{\sum_i \sum_j e_{ij}^{smoothed^2}}{\sum_i \sum_j (\lambda_{df_{ij}}^{flexible} - \bar{\lambda}^{flexible})^2} \quad [C5]$$

其中

$\lambda_{df_{ij}}^{flexible}$ 是由Eq.B1给出的, 对于每个重复的代表性测试样本 j , 在目标稀释分数 df_i 处

$\lambda^{flexible}$ 是在所有重复的代表性测试样本以及所有目标稀释分数中, 灵活建模的细胞数量值 ($\lambda_{dfiflexible}$) 的平均值。

$$\bar{\lambda}^{flexible} = \frac{\sum_i \sum_j \lambda_{dfij}^{flexible}}{\sum_i n_i} \quad [C6]$$

PI_{R^2SR} 通常范围在0到1之间。 PI_{R^2SR} 越接近1，表示测量过程具有更高的比例关系。

C.3 使用测量的稀释分数计算 PI 的其他示例：

基于平滑残差平方和的 $PI(PI_{SqSR})$ ：

$$PI_{SqSR} = \sum_i \sum_j (e_{ij}^{smoothed})^2 \quad [C7]$$

基于绝对平滑残差之和的 $PI(PI_{AbsSR})$ ：

$$PI_{AbsSR} = \sum_i \sum_j |e_{ij}^{smoothed}| \quad [C8]$$

基于缩放后的平滑残差平方和的 $PI(PI_{SqSSR})$ ：

$$PI_{SqSSR} = \sum_i \sum_j \left(\frac{e_{ij}^{smoothed}}{\lambda_{dfij}^{proportional}} \right)^2 \quad [C9]$$

在这些情况下，接近于0的PI描述了具有更大比例性的测量过程。

附录 D
(信息)

用例1-评估单细胞计数测量过程的质量

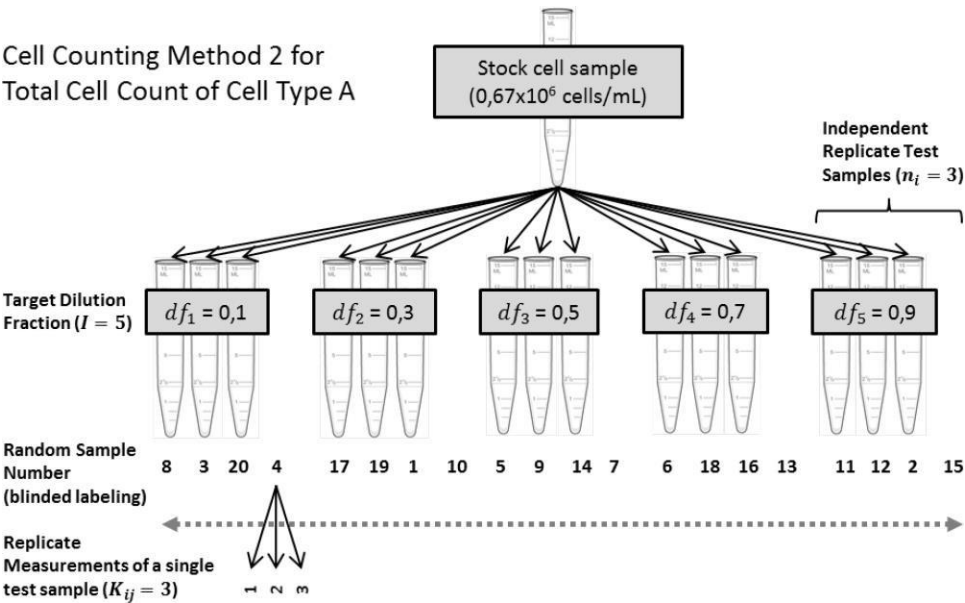
D.1 一般性

细胞计数第2部分实验设计与统计分析的最简单案例是对单细胞计数方法的质量评价。在这个用例中，评估方法的标准中描述的参数(%CV， R2和PI)并评估该方法的质量是否满足预定义的规格是有用的。

D.2 用例 1 的实验设计和系统分析描述

在本案例研究中，共研究了5个目标稀释分数，每个稀释分数有3个独立的重复代表性测试样本。使用方法2对A型细胞对每个重复代表性测试样本进行三次总细胞计数测量。随机分配样本标签，并按其数字样本标签的顺序测量代表性测试样本。样本身份对进行总细胞计数测量的分析人员是不知情的。在制备独立重复代表性测试样品时，获得测量的稀释分数。然后将测量的稀释分数用于分析PI，如附件A.2和附件B所述。

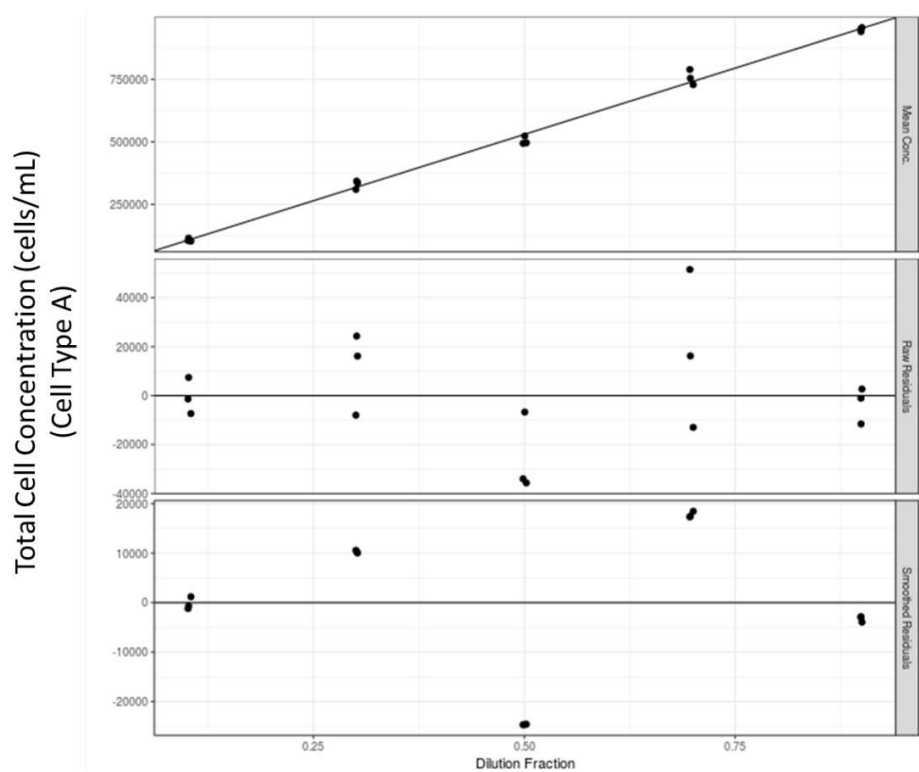
总细胞计数数据采用准泊松假设（均值与方差成比例）对均值-方差关系进行建模。使用非参数自举法进行200次迭代，估计了95%的置信区间。



图D1：用例1的实验设计示意图。

D.3 用例 1 的原始数据和数据分析

表D1：用例1的原始数据表可在网上找到：www.iso.com(有待更新)
比例模型拟合的数据和残差概述见图D2。



图D.2: 比例模型使用测量的稀释分数拟合稀释系列数据。上行: 比例模型与重复观测值平均后的数据拟合。(单位: 细胞/mL)。中行: 比例模型拟合的原始残差。(单位: 细胞/mL)。下行: 平滑残差(e_{ij}^{smoothed})来自比例模型拟合。(单位: 细胞/mL)

D. 4 用例 1 的示例报告

D. 4. 1 质量指标（报告7.1中的元素）

每个 df_i (7.1a)的平均细胞浓度（ Ydf_i ）可在表D.1中找到
表D.1 Ydf_i 对于每个目标稀释分数 df_i ，浓度以细胞数/mL表示（7.1a）

计数法	目标稀释分数 (df_i)	Ydf_i (细胞/mL)	Ydf_i 标准偏差(细胞/mL)
方法2	0.1	108333	6300
方法2	0.3	329983	17536
方法2	0.5	504705	16297
方法2	0.7	757462	30249
方法2	0.9	949571	7874

每个 df_i 的平均百分比变异系数（ $\%CVdf_i$ ）可以在表格D2中找到（7.1b）。

表格D.2: 每个 df_i 的 $\%CVdf_i$ （7.1b）。

计数法	目标稀释分数 (df_i)	$\%CVdf_i$	$\%CVdf_i$ 标准差
方法2	0.1	5.6%	4.6%
方法2	0.3	7.7%	5.2%
方法2	0.5	4.9%	3.9%
方法2	0.7	3.8%	1.0%
方法2	0.9	3.9%	0.5%

R^2 为比例模型拟合(7.1c)见表D.3。

表D.3: R^2 为比例模型拟合(7.1c)

计数法	R^2	基于非参数自举法的 下限95%置信区 间(细胞/mL)	基于非参数自举法分 析的上限95%置信区 间(细胞/mL)
方法2	0.9984	0.9967	0.9989

比例性指数(PI) (7.1d)表示与比例模型拟合的系统偏差, 见表D.4。

表D.4: 比例性指数(PI) (7.1d)

计数法	PI_{AbsSSR}	下限95% CI(基 于非参数自举 分析)	上限95%CI (基 于非参数自举 法分析)
方法2	0.3465	0.2100	0.6875

D. 4. 2 实验设计参数及统计分析方法文档(7.2报告要素)

稀释分数实验设计(7.2a):

- i. 独特目标稀释比的数量 (I) : 5
- ii. 独特目标稀释比集合 ($DF = \{d_{fi}\} | i=1$) : $DF = \{0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9\}$
- iii. 每个 d_{fi} 上的重复测试样本 (j) 数量 (n_i) (表D5)
- iv. 每个 d_{fi} 上的每个重复测试样本 (j) 的重复观测 (k) 数量 (K_{ij}) (表D6)

表 D.5: 每个 d_{fi} 上重复测试样本(j)的数量(n_i)

n_i	方法2
n_1	3
n_2	3
n_3	3
n_4	3
n_5	3

表D.6: 每个重复测试样本(j)在每个 K_{ij} 上的重复观察数(k)

K_{ij}	方法2
K_{11}	3

K_{12}	3
K_{13}	3
K_{21}	3
K_{22}	3
K_{23}	3
K_{31}	3
K_{32}	3
K_{33}	3
K_{41}	3
K_{42}	3
K_{43}	3
K_{51}	3
K_{52}	3
K_{53}	3

- 评价移液误差对稀释完整性贡献的方法(7.2b):
- i. 对于每个生成的测试样本，根据附录 A.2获得了测量的稀释比 (df_{ij}) (表D7)。
 - ii. 使用灵敏度为0.0001g的校准天平进行质量测量。
 - iii. 根据附录 B和附录 C.1计算了基于 df_{ij} 和 $e_{ij}^{smoothed}$ 的PI值。

表D.7：每个测试样品的测量DF。

重复测试 样本	目标DF	测量DF
1	0.1	0.1020
2	0.1	0.1013
3	0.1	0.1047
1	0.3	0.3013
2	0.3	0.3022
3.	0.3	0.3003
1	0.5	0.5024
2	0.5	0.4986
3	0.5	0.5005
1	0.7	0.7003
2	0.7	0.6963
3	0.7	0.6969
1	0.9	0.9004
2	0.9	0.8991
3	0.9	0.8993

- 在比例模型拟合(7.2c)中用于建模均方差关系的假设:
- i. 均值-方差关系的假设：方差与均值成正比。比例模型拟合方程(7.2d):

i. ($\lambda_{dfi}^{proportional} = \beta_1 * df_{ij}$), 系数如表D8所示

表D.8: 比例模型拟合方程($\lambda_{dfi}^{proportional} = \beta_1 * df_{ij}$)

计数法	细胞类型	浓度类型	比例常数 β_1 (细胞/mL)	基于非参数自 举的较低95% CI(细胞/mL) 分析	基于非参数自 举的95% CI(细胞/mL) 分析
方法2	A型细胞	细胞总浓度	1059214	1040052	1080296

PI的计算方法(7.2e):

- i. 计算PI的主要方法: 将经过缩放的平滑残差的绝对值求和(PI_{AbsSSR})。
- ii. 平滑方法: 基于测量的稀释系数进行平滑处理($e_{ij}^{smoothed}$)。
- iii. PI_{AbsSSR} 的计算公式:

$$PI_{AbsSSR}: PI_{AbsSSR} = \sum_i \sum_j \left| \frac{e_{ij}^{smoothed}}{\lambda_{dfij}^{proportional}} \right|$$

D. 4. 3 7.2和7.3中关于实验设计、统计分析和细胞计数测量过程的附加报告要素

细胞原液:

- i. 储备溶液: 储备溶液1
- ii. 悬浮培养基: 含有10% FBS的完整MEM培养基
- iii. 储备溶液浓度 (细胞/mL): 约923700
- iv. 用于估计储备细胞浓度的方法: 方法2

稀释方法:

- i. 稀释剂: 含有10% FBS的MEM完全培养基
- ii. 按随机提取顺序进行独立稀释
- iii. 样品制备时得到的测定稀释比例。

细胞类型和浓度类型:

- i. 细胞类型: A型细胞
- ii. 浓度类型: 总细胞浓度

测试样品生成及测量顺序:

- i. 原液提取顺序(生成顺序): 2; 1; 3; 6; 4; 5; 8; 9; 7; 11; 12; 10; 14; 15; 13
- ii. 随机样本数(测量顺序): 3; 6; 15; 1; 12; 14; 7; 10; 4; 13; 11; 5; 9; 2; 8

非参数自举法分析设置:

- i. 进行的自举迭代次数: 200
- ii. 引导带分析的置信水平: 0.95 评估比例的附加指标

表D.9: 评估相称性的附加指标

PI的方法	PI(对于方法2, 细胞类型A)	下限95% CI(基于非 参数自举分析)	上限95% CI(基于非 参数自举分析)
PI_{R^2SR}	0.9993	0.9977	0.9998
PI_{AbsSSR}	1.5921	0.7722	3.1779
PI_{SqSSR}	0.0116	0.0041	0.0419

D.5 解释

在浓度范围约为108,000个细胞/mL至950,000个细胞/mL的情况下,针对A型细胞的方法2具有基于平滑残差比例值的PI值(绝对值的标度平滑残差之和)为0.3465,置信区间为[0.2100, 0.06875]。预计通过对该方法和细胞类型在此浓度范围内进行重复测量,PI值的CI应与此CI有重叠。如果PI值随时间变化或在不同仪器、操作人员、位置等方面偏离此范围,则说明整体测量过程的系统行为发生了变化,需要进行调查。 R^2 和%CVdfi的解释类似。

附录 E
(信息)

用例2-比较几个细胞计数测量过程的质量

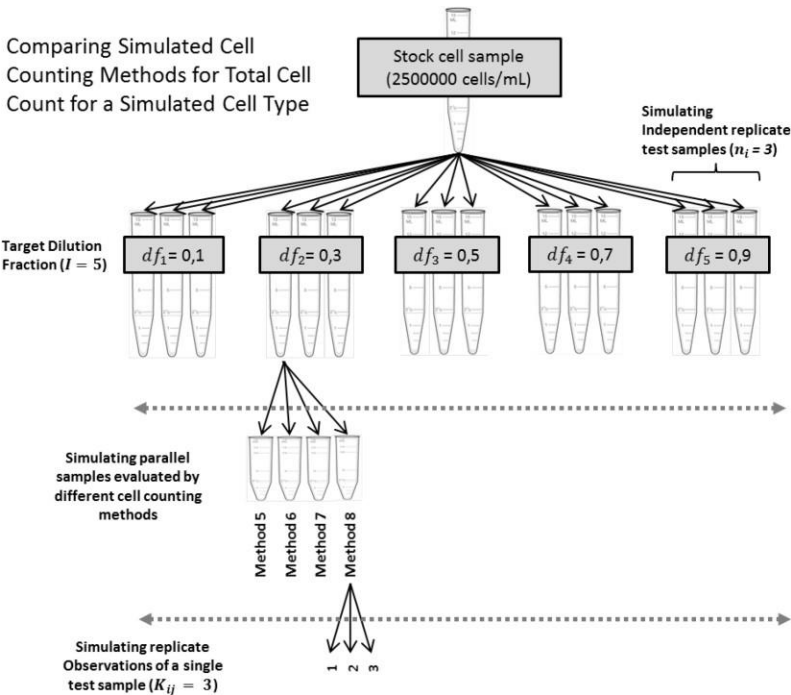
E.1 一般性

在此使用案例中，将同时比较四个细胞计数测量过程。在实验设计中，来自每个代表性测试样品的细胞悬液通过四个不同的细胞计数测量过程进行三重评估。在这种使用情况下，比较标准描述的参数（%CV_{dfi}，Y_{dfi}，R²和PI）之间的差异是有用的。这些比较可以帮助选择适合特定目的的细胞计数测量过程。

E.2 用例 2 的实验设计和统计分析描述

在这个案例研究中，使用计算模拟了四种细胞计数测量过程，并建立了模型来展示比例/非比例响应以及精确/非精确响应。总共模拟了5个目标稀释分数，每个稀释分数有3个独立重复的代表性测试样品。使用模拟方法，包括方法5、方法6、方法7和方法8对每个重复的代表性测试样品的模拟细胞类型进行了三次观察。模拟了移液误差和预评估稀释分数。预评估稀释分数符合用户指定的标准，并且在质量指标的计算中使用了目标稀释分数。

总细胞计数数据使用准泊松假设(均值与方差成正比)对均值-方差关系进行建模。使用200次迭代的非参数自举法估计95%的置信区间。



图E.1：用例2实验设计示意图。

E.3 用例 2 的原始数据和数据分析

表E.1：用例2的原始数据表可以在网上找到：www.iso.com(有待更新)

按照附录A.1（表E1），进行了移液误差对稀释完整性的预评估。用户定义的稀释完整性标准设定为 $R^2_{\text{dilution}} \geq 0.980$ 。

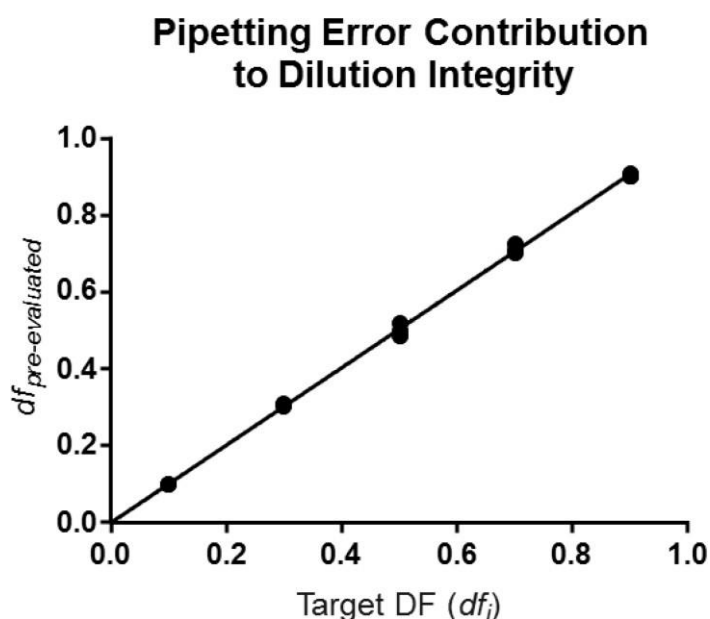
表E.1： 预评估移液误差对稀释完整性的原始数据，包括采用比例模型拟合和稀释完整性的判定系数。

目标DF df_i	Pre-evaluated DF $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$
0.1	0.1004
0.1	0.0989
0.1	0.1018
0.3	0.3036
0.3	0.31
0.3	0.3042
0.5	0.4874
0.5	0.4979
0.5	0.5193
0.7	0.7253
0.7	0.708
0.7	0.7002
0.9	0.9069
0.9	0.8992
0.9	0.9006

生成了一个图表，展示了 $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$ 之间的关系，并使用通过原点（0，0）的线条（即比例模型拟合）对数据进行了拟合（图 E2）：

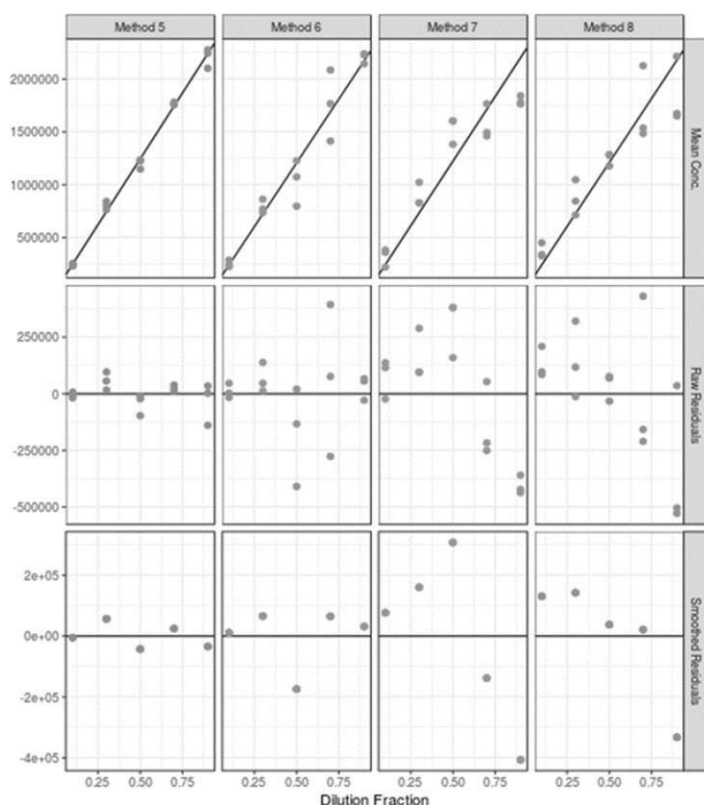
$$df_{ij}^{\text{pre-evaluated}} = \beta^{\text{pipetting}} df_i + \epsilon_i$$

其中，
 $\beta^{\text{pipetting}}=1.008$
 $R^2_{\text{dilution}}=0.9991$



图E.2: 以比例模型拟合的方式绘制的 $df_{pre-evaluated}$ 相对于目标稀释比例 (df_i) 的图表, 用于评估移液误差对稀释完整性的贡献。

比例模型拟合的数据和残差概述见图E.3。



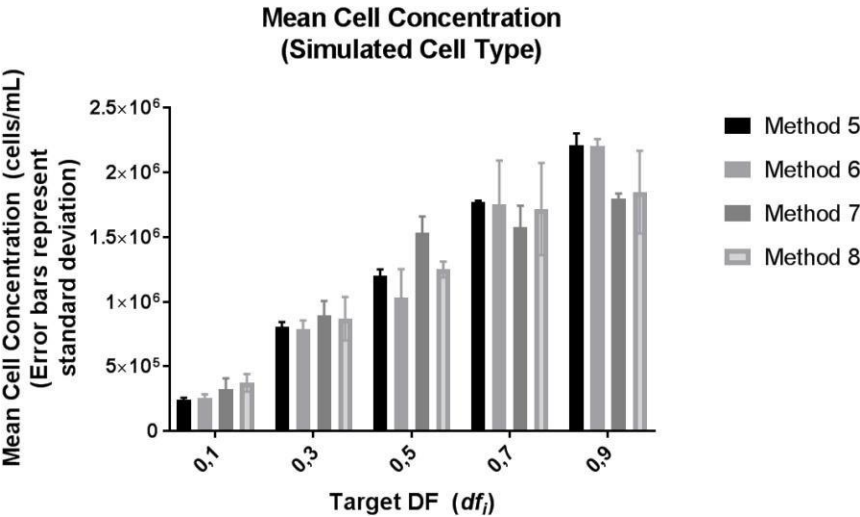
图E.3: 每种方法的稀释系列数据采用比例模型进行拟合。顶行: 在重复观测数据取平均后, 对数据进行比例模型拟合 (单位: 细胞/mL)。中间行: 比例模型拟合的原始残差 (单位: 细胞/mL)。底行: 比例模型拟合的平滑残差 (单位: 细胞/mL)。

E. 4 用例 2 的示例报告

E. 4. 1 质量指标（报告元素来自7.1节）

每个 df_i 对应的平均细胞浓度 (Y_{dfi})。 (7.1a):

i. 图形表示(图E4):



图E4： 每种计数方法中，在每个目标稀释比例 (df_i) 下，跨多个重复代表性测试样本的平均细胞浓度 (Y_{dfi})。误差线表示标准偏差。细胞浓度的单位为细胞/mL。

ii. 数据表格表示(表E2):

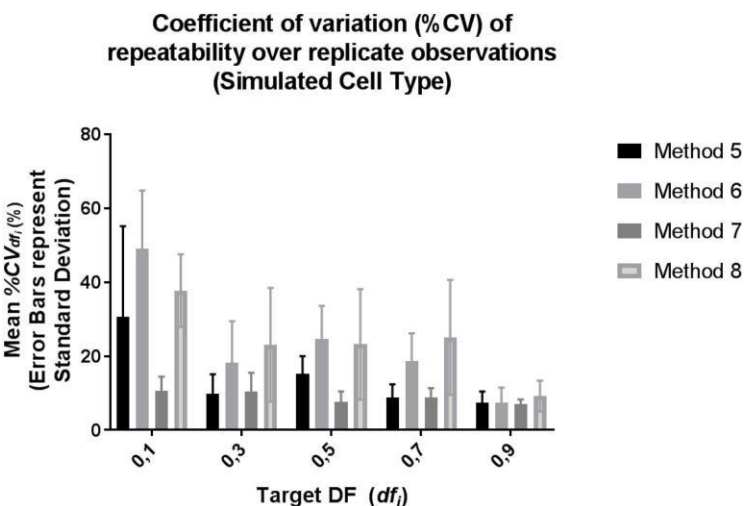
表E.2： 每种方法在每个目标稀释比例 df_i 下的 Y_{dfi} 。浓度以细胞/mL为单位。

计数法	目标稀释分数 (df_i)	Y_{dfi} (细胞/mL)	Y_{dfi} 标准差 (细胞/mL)
方法5	0.1	244498	12612
方法5	0.3	804353	39527
方法5	0.5	1203474	46994
方法5	0.7	1769138	13062
方法5	0.9	2209022	92759
方法6	0.1	252670	32013
方法6	0.3	790678	65099
方法6	0.5	1033595	217992
方法6	0.7	1755531	335989
方法6	0.9	2205380	52234
方法7	0.1	321385	87008
方法7	0.3	894437	111825
方法7	0.5	1531075	127905
方法7	0.7	1574980	166916
方法7	0.9	1796086	40930
方法8	0.1	372990	68611

方法8	0.3	869230	167854
方法8	0.5	1248944	60959
方法8	0.7	1716857	356504
方法8	0.9	1847770	319374

每个 dfi 下的平均百分比CV（%CV dfi ），(7.1b):

i. 图形表示(图E5)



图E.5: 绘制图表, 描述每种计数方法在每个目标稀释比例 (dfi) 下, 重复观测的细胞浓度的%CV (%CV dfi)。误差线表示标准偏差。

ii. 数据表格表示(表E3)

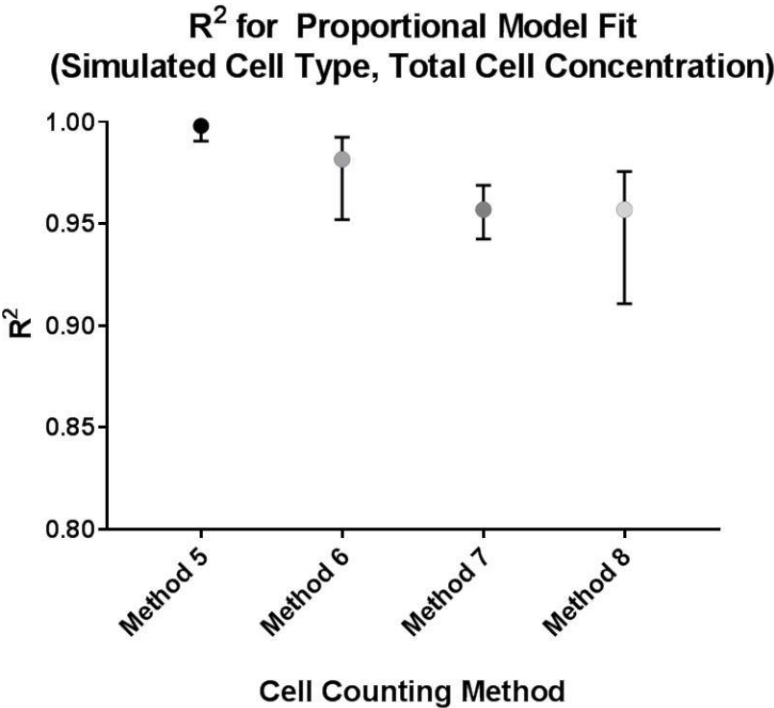
表E3: 每个 dfi 下的CV dfi

计数法	目标稀释分数 (dfi)	%CV dfi	%CV dfi 标准差
方法5	0.1	30.7%	24.5%
方法5	0.3	9.9%	5.3%
方法5	0.5	15.2%	4.9%
方法5	0.7	8.9%	3.5%
方法5	0.9	7.5%	3.0%
方法6	0.1	49.0%	15.7%
方法6	0.3	18.1%	11.3%
方法6	0.5	24.7%	9.0%
方法6	0.7	18.7%	7.4%
方法6	0.9	7.3%	4.2%
方法7	0.1	10.6%	3.9%
方法7	0.3	10.4%	5.2%
方法7	0.5	7.7%	2.8%
方法7	0.7	8.8%	2.6%
方法7	0.9	6.9%	1.4%
方法8	0.1	37.7%	9.8%

方法8	0.3	23.1%	15.4%
方法8	0.5	23.2%	14.9%
方法8	0.7	25.1%	15.5%
方法8	0.9	9.2%	4.2%

R^2 为比例模型拟合(7.1c):

i. 图形表示(图E6):



ii.

图E6: 使用非参数自助法进行模拟细胞计数方法的分析, 得出的 R^2 值并带有表示95% 置信区间的误差线。

iii. 数据表格表示(表E4)

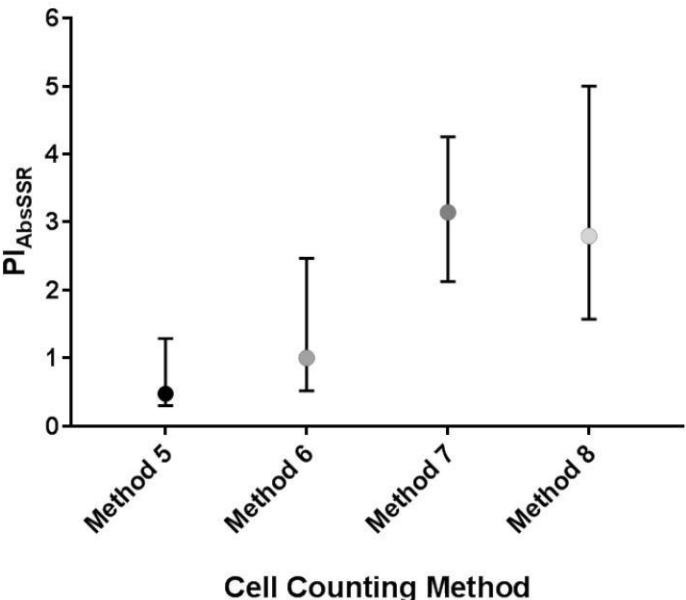
表E.4: 比例模型拟合的 R^2 值 (7.1c)

计数法	R^2	基于非参数自举分析的下限95% CI(细胞/mL)	基于非参数自举分析的上限95% CI(细胞/mL)
方法5	0.9980	0.9906	0.9977
方法6	0.9816	0.9521	0.9924
方法7	0.9570	0.9426	0.9688
方法8	0.9569	0.9107	0.9756

比例指数(PI) (7.1d)表示与比例模型拟合的系统偏差:

i. 图形表示(图E7)

Proportionality Index (PI)
(Simulated Cell Type, Total Cell Concentration)



图E.7: 基于缩放平滑残差的绝对值之和 (AbsSSR) 计算的比例指数 (PI), 误差棒表示由非参数自举法分析得出的 95% 置信区间, 用于模拟的细胞计数方法。

ii. 数据表格表示(表E4)

表E.5: 比例性指数(PI) (7.1d)

计数法	PI (PI _{AbsSSR})	基于非参数 自举分析下 限的95% CI(细胞/mL)	基于非参数自 举分析的上限 95% CI(细胞 /mL)
方法5	0.4747	0.2986	1.2894
方法6	1.0037	0.5175	2.4683
方法7	3.1440	2.1267	4.2539
方法8	2.7963	1.5734	5.0022

E. 4. 2 实验设计参数和统计分析方法的文档化(第7.2节的报告要素)

稀释分数实验设计(7.2a):

- i. 探究的方法数量: 4 (方法5, 方法6, 方法7, 方法8)
 - ii. 唯一目标稀释比例 (*dfi*) 的数量 (I): 5
 - iii. 唯一目标稀释比例集合 $DF = \{dfi\}_{i=1}^I$: $DF = \{0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9\}$
 - iv. 每个 *dfi* 下的重复测试样本数量 (*ni*) (表 E6)
 - v. 每个 *dfi* 下每个重复测试样本 (*j*) 的重复观测数量 (*Kij*) (表 E7)
- 表E.6: 每个 *dfi* 下的重复测试样本(*j*)数量 (*ni*)。

n_i	方法5	方法6	方法7	方法8
n_1	3	3	3	3
n_2	3	3	3	3
n_3	3	3	3	3
n_4	3	3	3	3
n_5	3	3	3	3

表E.7：每个重复测试样本(j)在每个dfi上的重复观察值(k)的数量(Kij)

K_{ij}	方法5	方法6	方法7	方法8
K_{11}	3	3	3	3
K_{12}	3	3	3	3
K_{13}	3	3	3	3
K_{21}	3	3	3	3
K_{22}	3	3	3	3
K_{23}	3	3	3	3
K_{31}	3	3	3	3
K_{32}	3	3	3	3
K_{33}	3	3	3	3
K_{41}	3	3	3	3
K_{42}	3	3	3	3
K_{43}	3	3	3	3
K_{51}	3	3	3	3
K_{52}	3	3	3	3
K_{53}	3	3	3	3

评价移液误差对稀释完整性贡献的方法(7.2b)(模拟)：

根据附录A.1预评估移液误差对稀释完整性的贡献。

- 用于表示细胞样本的悬浮液：不适用（模拟）
- 用于表示稀释剂的悬浮液：不适用（模拟）
- 使用灵敏度为0.0001g的校准天平进行质量测量，以生成 $df_{ijpre-evaluated}$ 测试样本（模拟）
- 基于与 $df_{ijpre-evaluated}$ 对 df_i 进行比例模型拟合，计算得出 $R^2_{Dilution}$ （根据A1.2）
- 用户定义的稀释完整性标准设定为 $R^2_{Dilution} \geq 0.980$ 。
- 稀释完整性预评估研究结果见表E8。

表E.8：移液误差对稀释完整性贡献的用户定义接受标准(7.2b)。

稀释完整性验收标准	预评估稀释完整性	选择计算平滑残差的方法
$R^2_{Dilution} \geq 0.980$	$R^2_{Dilution} \geq 0.990$	$e_i^{smoothed}$

用于对比例模型拟合(7.2c)中均方差关系建模的假设：

- 均值-方差关系的假设：方差与均值成正比。

比例模型拟合方程(7.2d):

ii. $(\lambda_{ij}^{proportional}=\beta_1*df_{ij})$, 系数如表E9所示

表E.9: 比例模型拟合方程($\lambda_{ij}^{proportional}=\beta_1*df_{ij}$)

计数法	细胞类型	浓度类型	比例常数 β_1 (细胞/mL)	基于非参数自 举的下限95% CI(细胞/mL) 分析	基于非参数自 举的上限95% CI(细胞/mL) 分析
方法5	模拟细胞 类型	细胞总浓度	2492194	2413060	2566922
方法6	模拟细胞 类型	细胞总浓度	2415142	2231756	2598597
方法7	模拟细胞 类型	细胞总浓度	2447185	2340644	2558819
方法8	模拟细胞 类型	细胞总浓度	2422316	2203090	2625971

PI的计算方法(7.2e):

iv. 计算 PI 的主要方法: 按比例平滑残差的绝对值之和 (PI_{AbsSSR})

v. 平滑方法: 基于测量稀释比例进行平滑处理 ($e_{ij}^{smoothed}$)

vi. 计算的方程式:

$$PI_{AbsSSR}: PI_{AbsSSR} = \sum_i \sum_j \left| \frac{e_{ij}^{smoothed}}{\lambda_{df_{ij}}^{proportional}} \right|$$

E. 4. 3 关于实验设计、统计分析和细胞计数测量过程的7.2和7.3节的附加报告要素

细胞原液:

v.储备溶液: 不适用 (模拟)

vi. 悬浮介质: 不适用 (模拟)

vii.储备溶液浓度 (细胞数/毫升): 约为2500000

viii. 估算储备细胞浓度的方法: 方法5

稀释方法:

iv. 稀释剂: 不适用(模拟)

v. 独立稀释(模拟) 细胞类型和浓度类型:

iii. 细胞类型: 模拟细胞类型

iv. 浓度类型: 总细胞浓度测试样品生成及测量顺序:

iii. 原液提取顺序(生成顺序): 不适用(模拟)

iv. 随机样本数(测量顺序): 不适用(模拟) 非参数自举分析设置:

iii. 引导迭代次数: 200次

iv. 引导带分析的置信水平: 0.95

E. 5 用例 2 中评估的细胞计数方法的比较

E.5.1 比较细胞计数方法之间的质量指标

当使用相似的稀释系列实验设计来评价一种以上的细胞计数方法时,可以比较不同方法之间的质量指标(即PI和R²)。通过评估两种方法之间质量指标值的比率来比较方法。例如,通过计算两种方法的PI值之比来比较PI:

$$Ratio_{PI_{AbsSR}} = \frac{PI_{AbsSR}^{Method A}}{PI_{AbsSR}^{Method B}} \quad [E1]$$

其中,

$PI_{AbsSR}^{Method A}$ 和 $PI_{AbsSR}^{Method B}$ 是PI值基于AbsSR(方程式 C1)计算的两种计数方法。

在这种情况下,当两种计数方法具有相同的PI值RatioPIAbsSR等于1时,表示两种方法之间没有差异。比值超过1表示方法A的PIAbsSR较高(比例较低)而方法B较低,而比值低于1则表示方法A的PIAbsSR较低(比例较高)而方法B较高。类似的比较可以应用于其他PI值和质量指标之间。

为了评估不同细胞计数方法计算的质量指标之间差异的显著性,运行非参数自举分析(200次迭代),为每种方法的质量指标生成95%置信区间(ci)。当质量指标值之间的比值的95% CI(例如:RatioPIAbsSR)排除1的值(即,比值的值为1表明两种方法之间的质量指标没有差异)(表E10)。R²采用了类似的方法(表E11)。

表E.10: 评估细胞计数方法R²之间的显著差异。

1级	2级	$Ratio_{R^2}$	基于非参数自举分析下限95% CI $Ratio_{R^2}$	基于非参数自举分析上限95% CI $Ratio_{R^2}$	方法间观察到显著差异? (95% CI是否包括1)
方法5	方法6	1.017	1.005	1.043	是
方法5	方法7	1.043	1.027	1.055	是
方法5	方法8	1.043	1.022	1.085	是
方法6	方法7	1.026	0.994	1.045	否
方法6	方法8	1.026	0.994	1.073	否
方法7	方法8	1.000	0.981	1.043	否

表E.11: 细胞计数方法间PIAbsSR的显著性差异评价。

1级	2级	$Ratio_{PI_{AbsSR}}$	基于非参数自举分析下限95% CI $Ratio_{PI_{AbsSR}}$	基于非参数自举分析上限95% CI $Ratio_{PI_{AbsSR}}$	方法间观察到显著差异? (95% CI是否包括1)
方法5	方法6	0.473	0.216	1.246	否
方法5	方法7	0.151	0.089	0.451	是
方法5	方法8	0.170	0.098	0.483	是
方法6	方法7	0.319	0.193	0.831	是

方法6	方法8	0.359	0.197	0.957	是
方法7	方法8	1.124	0.624	1.815	否

E.6 解释

用例2的每个方法都可以单独评估，如D.4所述。

根据 R^2 值，比较细胞计数方法5和方法6在与比例模型的一致性方面存在显著差异。然而，通过 PI_{AbsSSR} 表明， R^2 值上的差异可能不是由于比例性的实质性差异。相反，通过 $\%CVdfi$ 的评估表明，方法5和方法6之间的差异可能更多受到两种方法精度的影响。

方法7和方法8与比例性的偏差显著大于方法5和方法6。

虽然方法6和方法8的单个观测值在与比例模型拟合的一致性方面似乎相似（基于 R^2 ），但通过使用PI指标和非参数自助法分析进一步评估比例性，表明方法6和方法8之间存在显著的系统偏差差异。这两种方法的不精确性（基于 $\%CVdfi$ ）可能掩盖了在 R^2 分析中两种方法之间的比例性差异。

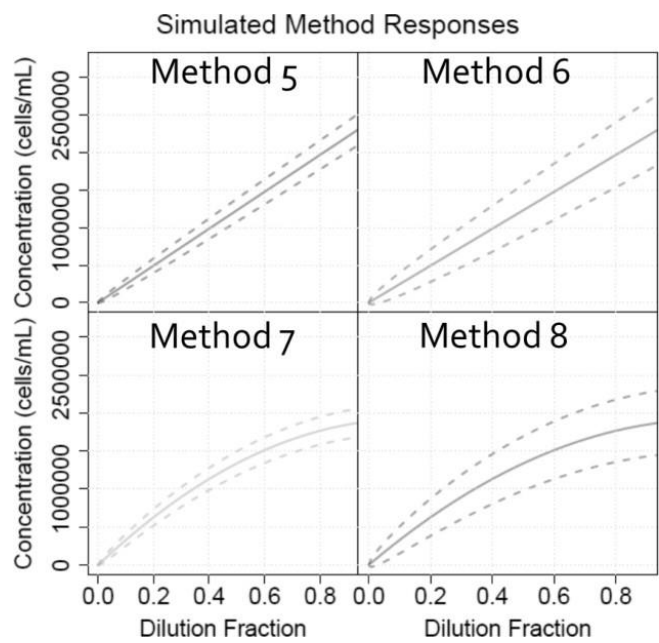
E.7 结果与底层模拟模型的一致性

在使用案例2中模拟的细胞计数方法具有如表E.12和图E.8所述的基本模型参数。

从表E.12中描述的计数方法中模拟了一个细胞计数实验设计。对于模拟数据集的比例性分析通常与模拟计数方法的预期响应一致。方法6和方法8都被模拟为不精确的。在每种方法的额外观测中， $\%CVdfi$ 的明显差异可能是随机的人为因素，这在额外的观测中会逐渐消失。

表E.12：用例2中模拟单元格类型的模拟单元格计数方法的模型参数。“+”表示高比例性或精度；“-”表示比例或精度低。

模拟细胞计数方法的模型参数	方法5	方法6	方法7	方法8
成比例的	+	+	-	-
精确的	+	-	+	-
真实截距	0	0	0	0
真实斜率 (β_1)	2460669	2460669	3448563	3448563
真实二次系数	0	0	-1550000	-1550000
真实方差/均值比率	4900	24806	4900	24806



图E.8：用例2的模拟细胞计数方法的底层模型的图形表示。虚线表示95%置信区间。

参 考 文 献

1. Lin-Gibson, S., S. Sarkar, and J.T.J.C. Elliott, Summary of the National Institute of Standards and Technology and US Food And Drug Administration cell counting workshop: Sharing practices in cell counting measurements. 2018.
2. Sarkar, S., et al., Evaluating the quality of a cell counting measurement process via a dilution series experimental design. *Cytotherapy*, 2017. 19(12): p. 1509-1521.
3. CLSI, H20-A2 Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods, 2nd Edition. 2007.
4. DIN 58932-1; Haematology - Determination of the concentration of blood corpuscles in blood - Part 1: Blood collection, sample preparation, biological influence factors, interference factors.
5. Roussel, M., et al., Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: comparison of three flow cytometric candidate methods. *Cytometry A*, 2012. 81(11): p. 973-82.
6. Briggs, C., et al., ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol*, 2014. 36(6): p. 613-27.
7. Bourner, G., et al., ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. *Int J Lab Hematol*, 2014. 36(6): p. 598-612.
8. Berndtson, W.E., A simple, rapid and reliable method for selecting or assessing the number of replicates for animal experiments. *Journal of animal science* 1991. 69(1): p. 67-76.
9. Blues, J., Bayliss, DJ, Buckley, M, The calibration and use of piston pipettes. *Measurement Good Practice Guide No. 69* 2004, NPL.

List of Referenced ISO documents and other Standards

- ISO 8655-1, Piston-operated volumetric apparatus -- Part 1: Terminology, general requirements and user recommendations
- ISO 8655-2, Piston-operated volumetric apparatus -- Part 2: Piston pipettes
- ISO 8655-6, Piston-operated volumetric apparatus -- Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error
- ISO 5725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
- ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
- ISO/IEC 25062, Software engineering — Software product Quality Requirements and Evaluation (SQuaRE) — Common Industry Format (CIF) for usability test reports
- ISO 9000, Quality management systems — Fundamentals and vocabulary
- ISO 15198, Clinical laboratory medicine — In vitro diagnostic medical devices — Validation of user quality control procedures by the manufacturer
- ISO 16732-1, Fire safety engineering — Fire risk assessment — Part 1: General
- ISO 20391-1, Biotechnology -- Cell counting -- Part 1: General guidance on cell counting methods
- VIM JCGM 200, International vocabulary of metrology
- JCGM 100 (GUM 1995 with minor corrections), Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement
- ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (1994)