

# 《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》

## 国家标准编制说明

（征求意见稿）

《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》

标准起草组

2025 年 3 月

# 目录

- 一、工作简况 ..... 3
- 二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据..... 4
- 三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益 ..... 9
- 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况..... 18
- 五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因 ..... 19
- 六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系..... 19
- 七、重大分歧意见的处理经过和依据 ..... 19
- 八、涉及专利的有关说明 ..... 19
- 十、其他应予说明的事项 ..... 20

## 一、工作简况

### （一）任务来源

本项目是根据国家标准化管理委员会于 2024 年 03 月 25 日下达的 2024 年第一批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知（国标委发[2024] 16 号文），计划项目编号：20240061-T-469，项目名称“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”，本文件等同采用 ISO 20391-2:2019, Biotechnology—Cell Counting—Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance。项目完成周期是 16 个月，计划完成时间是 2025 年 07 月。

### （二）制定背景

随着生物技术、生物制药及医学研究的快速发展，细胞计数作为基础技术手段在干细胞治疗、免疫细胞疗法、单抗生产、基因编辑等领域的应用日益广泛，其准确性直接影响治疗效果与产品质量。传统方法如血细胞计数板依赖人工操作，主观性强且重复性差；流式细胞术、图像分析仪等自动化设备虽提升了效率，但不同仪器和方法间的结果可比性不足，导致跨实验室数据难以互认。现有国际及国内标准多聚焦于方法通则（如 ISO 20391-1）或临床检验特定领域（如血细胞计数），对实验设计、统计分析 & 质量指标量化的系统性规范仍存在空白。尤其在原代细胞、特殊培养细胞等缺乏高准确性参考物质的场景下，传统基于参考方法的验证方式难以实施。国际标准化组织（ISO）于 2018 年发布的 ISO/DIS 20391-2 提出了通过稀释系列实验设计、比例性分析及变异系数（CV）量化质量指标的方法，为解决缺乏参考物质时的质量评估问题提供了技术路径。我国结合国情转化该国际标准，制定《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》，旨在通过规范稀释系列实验参数（如 5 个目标稀释分数、每个分数 3 次重复样本）、统计分析方法（如加权最小二乘法拟合比例模型、非参数自举法计算置信区间）及质量指标（如比例指数 PI、决定系数  $R^2$ ），统一质量评估体系，提升数据可靠性。该标准的实施将有效解决生物制药生产中细胞浓度控制的技术瓶颈，促进实验室间结果可比性，为细胞治疗产品的安全性评价提供科学工具，同时推动我国生物技术领域与国际标准接轨，增强在全球生物经济中的竞争力。

### （三）起草过程

**预研和起草阶段：**标准起草单位根据国家标准化管理委员会于2024年03月25日下达的2024年第一批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知（国标委发[2024] 16

号文)的要求,成立了以中国测试技术研究院为牵头单位的标准起草工作组(以下简称“工作组”)。2024年3月~2024年12月间,起草组按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分:标准化文件的结构和起草规则》、GB/T 1.2—2020《标准化工作导则 第2部分:以ISO/IEC标准化文件为基础的标准化文件起草规则》的要求,依据ISO 20391-2:2019标准完成《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》翻译校对,并针对国内细胞及相关领域使用细胞计数标准情况进行了调研, 2025 年3月,起草组在充分讨论交流的基础上完成标准征求意见稿及编制说明的起草工作,形成标准征求意见稿及编制说明初稿。

**征求意见阶段:**2024 年 11 月起草组在全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387) 2024 年度年会上对标准征求意见稿及编制说明初稿向全体委员和观察员进行了征求意见,与会代表提出了一些编辑性和翻译校对用词的意见,工作组根据专家的意见进行了修改和完善。工作组在预研的基础上进一步对 ISO 20391-2:2019 的技术内容进行了评估,走访了成都世联康健生物科技有限公司等标准应用单位,并与相关标准应用单位进行了深入交流和研讨,研究了 ISO 20391-2:2019 标准的正文、附录,以及涉及的所有相关资料,与我国现行法律法规或强制性标准不冲突,可配套使用。名称为《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》,英文名称为 Biotechnology—Cell Counting —Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance。

### 3 主要参加单位和工作组成员及其所做的工作

本文件起草单位:

本文件主要起草人:

工作组成员及其所做的工作:

## 二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

### (一) 标准编制原则

本标准依据 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分:标准化文件的结构和起草规则》和 GB/T 1.2—2020《标准化工作导则 第2部分:以 ISO/IEC 标准化文件为基础的标准化文件起草规则》,使标准规范化。

本标准等同采用 ISO 20391-2:2019 的基础上,制定本标准时遵循以下原则:

1) 结合我国生物制药、医学研究等领域的实际需求,在等同采用的框架下,充分

考虑符合国内应用场景的示例及实施指南，增强标准的可操作性。同时，在标准制定过程中，预留了适应未来技术发展的空间，确保其具备一定的前瞻性，能够持续引领行业发展。

2) 本标准严格遵循现行相关法律法规和其他标准，确保在各个层面上与现有规范协调一致，形成有机统一的整体，避免出现任何冲突或矛盾。

3) 以 ISO 20391-2:2019 的核心技术要求（如比例性分析、变异系数计算）为基础，通过严格的实验设计（如 5 个目标稀释分数、每个分数 3 次重复样本）和统计方法（如加权最小二乘法、非参数自举法），确保细胞计数质量控制的科学性与可靠性。

4) 严格按照 GB/T 1.2-2020 要求，在技术内容、文本结构、术语定义等方面与 ISO 20391-2:2019 保持完全一致，确保国际标准的技术性条款无修改地转化为我国标准，实现国内外技术要求的无缝衔接。

5) 在标准的编制过程中，严格按照 GB/T 1.1-2020 等系列标准的规定，对标准的结构编排、编写格式和内容表达方法等进行统一规范，确保标准具备高度的规范性，便于各方理解和执行。

## **（二）标准主要内容及确定依据**

### **1 范围**

在等同采用 ISO 20391-2:2019 的基础上，结合我国生物制药、医学研究等领域的实际需求，明确标准适用于悬浮状态真核细胞的总计数、差异计数、直接计数及间接计数方法的质量控制，涵盖方法开发、优化、验证及日常测量过程评估；针对缺乏参考物质的场景，通过比例性分析间接评估系统误差，排除贴壁细胞预处理等非计数环节，限定不适用于稀有细胞事件或极低浓度样本的特殊处理；强调实验设计需满足稀释完整性控制等前提条件，且不直接提供准确性评估，需结合参考方法或物质使用，确保技术内容与国际标准一致且符合国内行业需求，保持标准的科学性与可操作性。

### **2 规范性引用文件**

旨在明确本文件在编制过程中参考和引用的相关标准与规范。这些文件不仅为本标准提供了必要的条款和技术要求，还确保了文件内容的科学性、规范性和可操作性。在编制过程中，我们严格遵循了这些引用文件的要求，以确保本文件的质量与可靠性。同时，我们也注意到，随着科学技术的不断进步和相关标准的不断更新，我们将持续关注并适时更新本文件，以适应新的要求。

### **3 术语和定义**

等同采用 ISO 20391-2:2019 的术语体系，确保与国际标准技术内容一致；结合我国生物制药、医学研究等领域的实际需求，翻译为“细胞原液”本土常用术语，完善术语体系；引用 VIM JCGM 200 等权威文件，确保计量学基础的规范性；针对关键技术概念（如“比例指数”“变异系数”），通过定义明确实验设计与统计分析的核心参数；遵循 GB/T 1.1-2020 的结构要求，规范术语编号、排列顺序及编写格式；与国内其他相关标准（如 GB/T 42076.1-2022）协调统一，避免术语冲突；通过示例和注释（如“细胞悬液”的定义）增强术语的可理解性，确保标准的可操作性。该部分既保持与国际标准的一致性，又适应国内行业实践需求，为实验设计、统计分析 & 质量指标的科学表述提供支撑。

## 4 原则

细胞治疗产品的关键质量属性（如活细胞浓度、纯度）直接依赖计数结果的准确性。若计数方法存在比例性偏差，可能导致剂量计算错误，影响疗效或安全性。因此，不同机构采用的方法（如流式细胞术与自动计数仪）需通过统一的偏离比例性指标进行校准。ISO 20391-2:2019 通过标准化实验设计（如至少 4 个梯度稀释、每个梯度 3 次重复），确保不同数据集可横向比较，支持多中心研究的可靠性。ISO 20391-2:2019 本质上是通过统计学建模将复杂的细胞计数误差分解为可量化的指标，从而建立了方法性能评估的客观基准、确保了跨方法和跨实验室数据的互操作性、支持了生物制药和再生医学领域的产品质量控制与合规性。识别并分类误差来源以指导技术改进。这一规定不仅提升了细胞计数的科学严谨性，也为行业创新提供了可验证的技术基础。因此，在标准中保留了 ISO 20391-2:2019 的原则部分。

## 5 实验设计

### 5.1 细胞计数测量过程的注意事项

依据：将直接影响计数结果的关键步骤（如分散细胞聚集体）纳入测量过程评估，而排除与细胞预处理（如从基质中分离）相关的不可控因素，从而保证实验设计的统计效力；同时，通过区分常规悬液与特殊情况（如稀有细胞或低样本量），强调方法适用范围与局限性，避免因样本复杂性导致统计模型失效，最终实现误差来源的精准识别与跨场景数据的可比性。确保了评估方法聚焦于可控的标准化流程，明确界定测量边界以排除外部变量干扰。

### 5.2 为实验设计准备样品

#### 5.2.1 细胞原液

依据：标准基于 NIST 开发的实验设计与统计分析方法，通过稀释实验和比例性指数（PI）等指标量化系统性误差，从而在缺乏参考材料的情况下评估测量过程的质量。为确保不同测量工艺或实验室间的数据可比性，需统一原液的制备和储存条件，避免因细胞悬浮介质差异、碎片干扰或聚集状态变化引入额外误差。

### 5.2.2 稀释分数实验设计

依据：为了系统评估细胞计数方法的性能，确保测量结果的统计稳健性和可重复性。该设计要求选择至少四个线性均匀分布的目标稀释分数（如  $DF = \{0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9\}$ ），以覆盖细胞计数测量过程的预期使用浓度范围，并通过独立稀释制备重复测试样品（每个稀释梯度 $\geq 3$  个重复样本，每个样本 $\geq 3$  次重复测量），从而量化方法的稀释完整性、变异系数（CV%）和比例指数（PI）等质量指标。设计优先保证稀释分数数量以覆盖浓度梯度，其次保留重复样本和测量次数，以平衡统计效力与样品可用性/稳定性限制。此外，功率分析用于优化样本量和检测效能，测量不确定度分析（参考 JCGM 100:2008）则确保实验误差可控，最终支持细胞计数方法的开发、验证和标准化。

### 5.2.3 产生稀释分数的注意事项

依据：应确保稀释过程的稳定性和可重复性，避免因稀释操作导致的细胞损伤或变异性增加；减少稀释过程中的系统误差和随机误差，例如移液误差、细胞悬浮液不均匀性、细胞损失以及连续稀释中的累积误差等；同时强调稀释分数的独立性，避免连续稀释带来的复合误差，确保稀释分数的准确性。此外，还考虑了稀释剂的选择、样品的均匀性以及稀释操作对细胞完整性的影响，以保证细胞计数测量过程的质量和可靠性。

## 5.3 测试样品标签

依据：通过标准化标签规范，保障不同实验室或方法间的横向可比性，尤其在细胞治疗等对数据完整性要求极高的领域，避免因标签缺失或错误导致实验结论偏差。例如，稀释分数（DF）的准确记录需通过标签关联称量验证数据（如中通过质量计算 DF），而样品来源、处理时间等标签信息则是评估移液误差或细胞状态变化的关键依据（如中需关联样品类型与计数方法性能）。此外，标签规范也呼应了标准附录对测试报告标识的要求（如中要求样品标识包含批号、规模等），确保从实验操作到结果报告的全流程可追溯。

## 5.4 测试样品的测量

依据：通过标准化实验流程和统计分析，确保细胞计数数据的可靠性、可重复性及

跨实验室可比性，以解决生物技术领域因缺乏统一参考物质而难以验证方法准确性的问题。该章节要求对每个稀释梯度进行至少三次重复测量，并通过计算变异系数（CV%）和比例指数（PI）等统计指标，量化计数方法的重复性、线性响应性和系统性误差。其制定背景源于细胞治疗产业对精确计量的需求，尤其是产品质量属性（如活细胞比例）高度依赖可追溯的计数数据，而传统方法易受操作误差（如移液偏差）和细胞状态变化的影响。标准要求测量过程需记录样本标识、稀释分数（DF）的称量验证数据（如质量法计算 DF）以及实验条件（如储存溶液、细胞悬浮状态），以消除混淆并建立可追溯的数据链。此外，该章节整合了统计学原理（如残差分析、 $R^2$ 拟合优度）和实验规范，确保从数据采集到结果报告的全流程科学严谨性，为方法开发、验证和优化提供统一框架。最终目标是通过标准化操作和量化指标，支持不同实验室或仪器间横向性能比较，缩短监管审查周期并提升细胞治疗产品的质量控制水平。

## 6 统计方法

依据：主要基于稀释实验设计的系统性分析框架，旨在通过量化细胞计数方法的重复性、线性响应和偏差等关键指标来评估其性能。本标准的统计学核心是通过梯度稀释实验（至少四个稀释梯度，每个梯度三次重复）生成数据，结合比例指数（PI）、残差分析和变异系数（CV%）等指标，验证测量结果与理论稀释比例的符合程度，从而排除移液误差或方法偏差的干扰。制定还参考了美国国家标准与技术研究院（NIST）的研究成果，特别是在缺乏标准参考物质时，利用实验设计与统计建模解决细胞计数准确性问题的方法。此外，标准整合了行业对统一评估工具的需求，确保不同计数方法（如直接/间接计数）的横向可比性，并为细胞治疗产品的质量属性（如纯度、效力）提供数据支持。

## 7 报告

依据：其一报告通过规范实验设计参数（如样品制备、稀释梯度、重复测量次数）和统计分析方法（如比例指数、变异系数、拟合优度计算）的记录要求，保证不同实验室或方法的计数结果可比性，确保了实验数据的透明性和可重复性；其二报告基于 NIST 开发的实验框架，在缺乏统一参考物质的情况下，通过标准化报告内容（如移液误差分析、残差计算、质量指标）实现计数方法精密度和适用性的客观评价，支持了方法性能的量化评估；其三报告结合 FDA 等监管机构的要求，通过报告章节明确数据完整性、分析逻辑和结果解释的标准化格式，以加速细胞治疗产品的审批流程，从而满足监管合规需求；同时，针对细胞治疗产业对高精度活细胞计数的依赖，通过报告模板统



一关键指标（如细胞活力、浓度梯度响应），减少因方法差异导致的制造过程偏差，满足了技术发展的实际需求；最后，还整合了 SCB 协调的行业专家共识（包括 NIST、FDA 及设备制造商），并通过 COMET 工具验证了报告结构的可操作性。

### （三）标准解决的主要问题

在细胞和基因治疗、再生医学等前沿生物技术领域，细胞计数的准确性是确保产品质量和安全性的基础。然而，由于不同细胞计数方法的性能存在显著差异，导致测量结果的可靠性难以保证，进而影响了研究人员和制造商在选择适用方法时的决策。本标准的制定正是为了解决这一问题。

本标准通过规范化的实验设计和统计分析方法，为细胞计数测量过程的质量评估提供了一套科学的框架。具体而言，它要求在稀释梯度实验中进行重复测量，以确保数据的可靠性和可重复性。通过这些实验设计，可以量化评估细胞计数方法的关键性能指标，如精密度（通过变异系数衡量）和线性度（通过趋势线拟合程度和比例指数衡量）。这些指标能够帮助研究人员和制造商全面了解不同细胞计数方法的优劣，从而选择最适合特定应用场景的方法。

此外，本标准特别适用于难以获得合适参考物质的情况，这在细胞治疗产品的开发和生产中尤为常见。通过本标准提供的方法，即使在缺乏参考物质的情况下，也能对细胞计数方法的性能进行间接评估，从而为细胞治疗产品的质量控制提供有力支持。例如，在活细胞数量和纯度评估等关键质量属性的检测中，该标准能够确保细胞计数结果的可比性和准确性，为细胞治疗产品的质量保障奠定基础。

总之，本标准的核心目标是通过科学的实验设计和统计分析方法，量化评估细胞计数方法的性能，从而提升细胞计数结果的可靠性和可比性，为细胞治疗产品的质量控制和其他依赖细胞计量的质量属性标准提供坚实的技术支撑。

## 三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

### （一）试验验证的分析报告

#### 1. 线性和范围

##### 1.1. 样本制备

标准溶液 1：将供试品进行梯度稀释，稀释至  $1 \times 10^6$  个/mL、 $5 \times 10^6$  个/mL、 $1 \times 10^7$  个/mL、 $2 \times 10^7$  个/mL、 $5 \times 10^7$  个/mL 等 5 个浓度的细胞密度线性标准溶液。

标准溶液 2：取待测供试品将其中 8mL 用反复冻融方式使细胞死亡，经计数仪检测

细胞活率小于 10%。按照活细胞和死细胞体积比 1:0、3:1、1:1、1:3、0:1 进行配液，充分混匀，作为细胞活率线性标准溶液，具体配制方式见下表。

活率理论值	配液方法
1:0	300μL 新鲜细胞悬液
3:1	240μL 新鲜细胞悬液+80μL 死细胞悬液
1:1	150μL 新鲜细胞悬液+150μL 死细胞悬液
1:3	80μL 新鲜细胞悬液+240μL 死细胞悬液
0:1	300μL 死细胞悬液

1.2. 验证方法

取上述两种线性标准溶液进行检测，每份标准溶液重复测定 5 次。记录细胞密度和细胞活率。计算检测结果的 CV 值，依据检测结果分别建立细胞密度和细胞活率的线性回归方程，并计算每个线性标准溶液的 RE 值。

1.3. 可接受标准

细胞密度：各线性标准溶液的 RE 应介于-20~20%之间，CV 应≤15%，线性方程的  $R^2$  应>0.99。

细胞活率：各线性标准溶液的 RE 应介于-20~20%之间，CV 应≤15%，线性方程的  $R^2$  应>0.99。

1.4. 验证结果

结果显示，细胞密度在  $1\times10^6\sim5\times10^7$  个/mL 的范围内呈线性，线性方程为： $y=1.1349x-85849$ ， $R^2$  为 1.0000，各线性标准溶液的 CV 在 0.20%~8.80%之间，RE 介于 7.64%~15.12%之间。

细胞活率在 0%~100%的范围内呈线性，线性方程为： $y=0.9433x+0.904$ ， $R^2$  为 0.9996，各线性标准溶液的 CV 在 0.72%~1.42%之间，RE 介于-5.24%~1.92%之间。详细结果见下表及下图。

表 2 细胞密度线性范围验证结果

理论密度	$1\times10^6$	$5\times10^6$	$1\times10^7$	$2\times10^7$	$5\times10^7$
重复-1	$1.15\times10^6$	$5.55\times10^6$	$1.12\times10^7$	$2.24\times10^7$	$5.68\times10^7$
重复-2	$9.76\times10^5$	$5.36\times10^6$	$1.21\times10^7$	$2.43\times10^7$	$5.67\times10^7$
重复-3	$1.21\times10^6$	$5.26\times10^6$	$1.17\times10^7$	$2.35\times10^7$	$5.66\times10^7$
重复-4	$1.21\times10^6$	$5.37\times10^6$	$1.08\times10^7$	$2.15\times10^7$	$5.65\times10^7$
重复-5	$1.21\times10^6$	$5.37\times10^6$	$1.08\times10^7$	$2.17\times10^7$	$5.66\times10^7$

均值	$1.15 \times 10^6$	$5.38 \times 10^6$	$1.13 \times 10^7$	$2.27 \times 10^7$	$5.66 \times 10^7$
SD	$1.01 \times 10^5$	$1.05 \times 10^5$	$5.72 \times 10^5$	$1.20 \times 10^6$	$1.14 \times 10^5$
CV(%)	8.80	1.95	5.05	5.28	0.20
RE(%)	15.12	7.64	13.20	13.40	13.28

图 1 细胞密度线性图谱

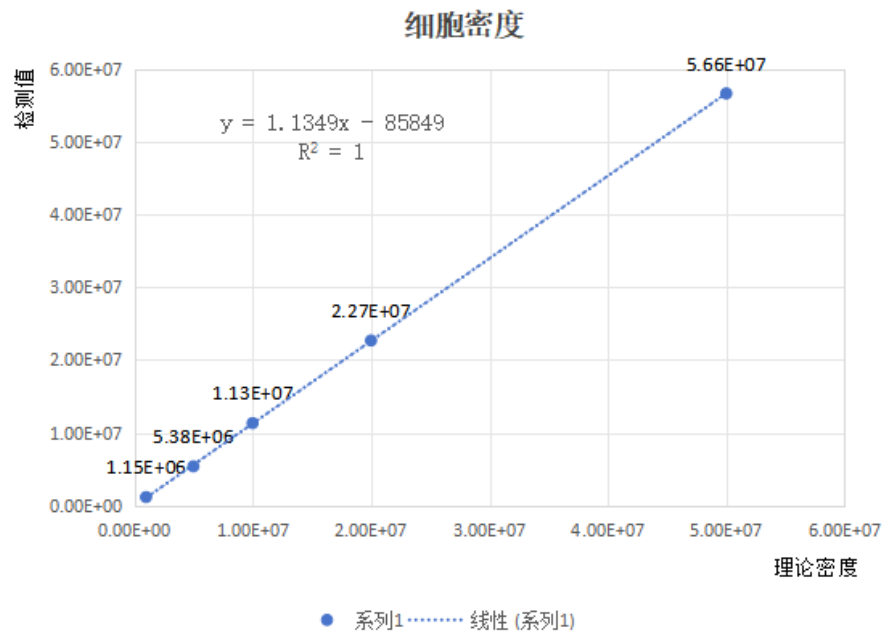
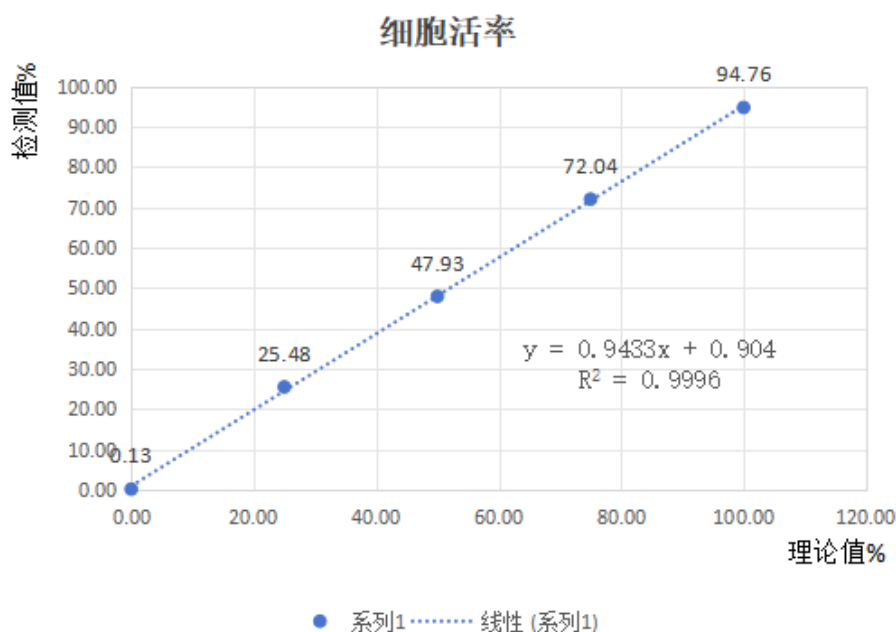


表 3 细胞活率线性范围验证结果

理论比例	活细胞：死细胞（体积比）				
	1:0	3:1	1:1	1:3	0:1
重复-1	94.60	72.43	49.01	24.94	0.23
重复-2	95.70	72.41	48.03	25.88	0.00
重复-3	95.14	71.58	47.71	25.73	0.00
重复-4	94.46	70.60	47.48	25.45	0.44
重复-5	93.90	73.19	47.41	25.40	0.00
均值	94.76	72.04	47.93	25.48	0.13
SD	0.69	0.99	0.65	0.36	0.20
CV(%)	0.72	1.37	1.36	1.42	/
RE(%)	-5.24	-3.94	-4.14	1.92	/

图 2 细胞活率线性图谱



### 1.5. 验证结论

上述验证结果符合可接受标准。本方法细胞密度线性范围为  $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$  个/mL, 细胞活率线性范围为 0%~100%。

## 2. 准确度

### 2.1. 样本制备

密度验证准备: 3 个浓度的细胞悬液分别 3 支, 高浓度范围  $4 \sim 6 \times 10^7$ /mL, 中浓度范围  $0.8 \sim 1.2 \times 10^7$ /mL, 低浓度范围  $0.8 \sim 1.2 \times 10^6$ /mL。

活率验证准备: 高中低 3 个活率的细胞悬液, 高活率范围 90~100%, 中浓度活率 80~90%, 低活率范围 70~80%。

### 2.2. 验证方法

每支细胞计数 3 组。

### 2.3. 可接受标准

细胞密度和活率的 RE 均应介于 -20~20% 之间, CV 应  $\leq 15\%$ 。

### 2.4. 验证结果

结果显示, 高、中、低细胞密度样本的 RE 分别为 2.60%, 0.61%, 4.79%, CV 为 2.59%; 高、中、低活率样本的 RE 分别为 1.05%, 1.29%, 0.52%, CV 为 0.54%。具体见下表。

表 3 细胞密度准确度验证结果

密度:  $5.12 \times 10^7$  个/mL、 $1.09 \times 10^7$  个/mL、 $1.09 \times 10^6$  个/mL

个/mL	1	2	3	均值	SD	RE%	平 均
高密度 1	5.18×10 <sup>7</sup>	5.20×10 <sup>7</sup>	5.42×10 <sup>7</sup>	5.27×10 <sup>7</sup>	1.76×10 <sup>5</sup>	2.60	RE%: 2.67
高密度 2	5.19×10 <sup>7</sup>	5.23×10 <sup>7</sup>	5.36×10 <sup>7</sup>	5.26×10 <sup>7</sup>			
高密度 3	5.20×10 <sup>7</sup>	5.26×10 <sup>7</sup>	5.24×10 <sup>7</sup>	5.23×10 <sup>7</sup>			
中密度 1	1.09×10 <sup>7</sup>	1.09×10 <sup>7</sup>	1.07×10 <sup>7</sup>	1.08×10 <sup>7</sup>	3.33×10 <sup>5</sup>	0.61	CV%: 2.59
中密度 2	1.12×10 <sup>7</sup>	1.12×10 <sup>7</sup>	1.11×10 <sup>7</sup>	1.12×10 <sup>7</sup>			
中密度 3	1.05×10 <sup>7</sup>	1.05×10 <sup>7</sup>	1.05×10 <sup>7</sup>	1.05×10 <sup>7</sup>			
低密度 1	1.08×10 <sup>6</sup>	1.08×10 <sup>6</sup>	9.70×10 <sup>5</sup>	1.04×10 <sup>6</sup>	4.53×10 <sup>4</sup>	4.79	
低密度 2	1.06×10 <sup>6</sup>	1.06×10 <sup>6</sup>	1.12×10 <sup>6</sup>	1.08×10 <sup>6</sup>			
低密度 3	1.01×10 <sup>6</sup>	1.00×10 <sup>6</sup>	9.60×10 <sup>5</sup>	9.90×10 <sup>5</sup>			

表 4 细胞活率准确度验证结果

活率: 91.93 %、活率: 87.34 %、活率: 78.16 %

%	1	2	3	均值	SD	RE%	平 均
高活率 1	91.82	91.05	91.15	91.34	0.33	1.05	RE%: 0.95
高活率 2	91.29	90.84	90.13	90.75			
高活率 3	91.11	90.32	90.98	90.80			
中活率 1	88.88	88.90	88.92	88.90	0.38	1.29	CV%: 0.54
中活率 2	89.44	87.38	87.72	88.18			
中活率 3	88.63	88.17	88.15	88.32			
低活率 1	78.42	78.58	78.28	78.43	0.64	0.52	
低活率 2	77.09	77.26	77.14	77.16			
低密度 3	77.57	77.78	77.69	77.68			

### 2.5. 验证结论

以上结果均满足准确度验证要求，表明该方法可以在规定范围内对细胞密度和活率进行准确定量。

### 3. 重复性

#### 3.1. 样本制备

取一批供试品，在同一分析批内，由一位分析人员将供试品稀释至  $4 \sim 6 \times 10^7$ ，得到

重复性样品溶液，按相同操作配制 6 份。

3.2. 验证方法

取上述重复性样品溶液进行计数，每个样本计数 3 次。

3.3. 可接受标准

6 份重复性样品的细胞密度及活率检测的 CV 均应≤15%。

3.4. 验证结果

结果显示，供试品细胞密度、细胞活率 CV 分别为 4.63%，0.90%。详细结果见下表。

表 5 重复性验证结果

样本	密度(个/mL)	均值(个/mL)	活率(%)	均值(%)
样本 1	5.10×10 <sup>7</sup>	5.30×10 <sup>7</sup>	87.85	88.58
	5.64×10 <sup>7</sup>		89.22	
	5.17×10 <sup>7</sup>		88.67	
样本 2	5.07×10 <sup>7</sup>	5.42×10 <sup>7</sup>	87.48	87.89
	5.60×10 <sup>7</sup>		88.56	
	5.58×10 <sup>7</sup>		87.63	
样本 3	5.65×10 <sup>7</sup>	5.47×10 <sup>7</sup>	86.65	87.85
	5.59×10 <sup>7</sup>		87.81	
	5.17×10 <sup>7</sup>		89.08	
样本 4	5.66×10 <sup>7</sup>	5.45×10 <sup>7</sup>	85.74	86.91
	5.56×10 <sup>7</sup>		86.80	
	5.13×10 <sup>7</sup>		88.20	
样本 5	4.91×10 <sup>7</sup>	4.87×10 <sup>7</sup>	89.15	89.03
	4.83×10 <sup>7</sup>		89.58	
	4.86×10 <sup>7</sup>		88.37	
样本 6	5.57×10 <sup>7</sup>	5.55×10 <sup>7</sup>	87.61	87.27
	5.55×10 <sup>7</sup>		86.99	
	5.54×10 <sup>7</sup>		87.22	
均值	/	5.34×10 <sup>7</sup>	/	87.72
CV%	/	4.63	/	0.90

3.5. 验证结论

上述结果符合重复性验证要求，表明该方法重复性较好。

4. 中间精密度

4.1. 样本制备

取和重复性实验相同批次供试品,于不同天,由另一分析人员将供试品稀释至  $4\sim6\times10^7$ ,得到中间精密度样品溶液,按相同操作配制 6 份。

4.2. 验证方法

取上述重复性样品溶液进行计数,每个样本计数 3 次。

4.3. 可接受标准

6 份中间精密度样品的细胞密度及活率检测的 CV 均应 $\leq 15\%$ 。重复性和中间精密度共 12 份样品的细胞密度及活率检测的 CV 均应 $\leq 15\%$ 。

4.4. 验证结果

结果显示,6 份中间精密度样品的细胞密度和活率 CV 分别为 3.06%, 0.88%; 重复性和中间精密度共 12 份样品的供试品细胞密度和活率检测值 CV 分别为 4.68%, 0.89%。详细结果见下表。

表 6 中间精密度验证结果

样本	密度(个/mL)	均值(个/mL)	活率(%)	均值(%)
样本 1	$5.10\times10^7$	$5.47\times10^7$	87.03	86.71
	$5.39\times10^7$		86.71	
	$5.91\times10^7$		86.38	
样本 2	$5.08\times10^7$	$5.47\times10^7$	87.00	86.55
	$5.39\times10^7$		86.48	
	$5.93\times10^7$		86.18	
样本 3	$5.0\times10^7$	$5.54\times10^7$	88.71	88.01
	$5.87\times10^7$		86.75	
	$5.74\times10^7$		88.58	
样本 4	$5.71\times10^7$	$5.76\times10^7$	87.66	87.37
	$5.86\times10^7$		86.46	
	$5.72\times10^7$		87.99	
样本 5	$5.71\times10^7$	$5.78\times10^7$	88.36	88.26
	$5.70\times10^7$		87.48	
	$5.93\times10^7$		88.95	
样本 6	$5.71\times10^7$	$5.85\times10^7$	87.80	88.26
	$5.93\times10^7$		88.31	

	5.91×10 <sup>7</sup>		88.66	
均值	/	5.64×10 <sup>7</sup>	/	87.53
CV%	/	3.06	/	0.88

表 7 重复性与中间精密度结果比对



细胞 密度	1	2	3	4	5	6	平均	CV%
重复 性	5.30×10 <sup>7</sup>	5.42×10 <sup>7</sup>	5.47×10 <sup>7</sup>	5.45×10 <sup>7</sup>	4.87×10 <sup>7</sup>	5.55×10 <sup>7</sup>	5.49×10 <sup>7</sup>	4.68
中间 精密 度	5.47×10 <sup>7</sup>	5.47×10 <sup>7</sup>	5.54×10 <sup>7</sup>	5.76×10 <sup>7</sup>	5.78×10 <sup>7</sup>	5.85×10 <sup>7</sup>		
细胞 活率	1	2	3	4	5	6	平均	CV%
重复 性	88.58	87.89	87.85	86.91	89.03	87.27	87.73	0.89
中间 精密 度	86.71	86.55	88.01	87.37	88.36	88.26		

4.5. 验证结论

上述结果符合中间精密度验证要求，表明该方法中间精密度良好。

（二）技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益；

本标准通过规范细胞计数的实验设计、统计分析 & 质量指标量化方法，将显著提升我国生物制药、医学研究等领域的技术水平与产业竞争力，产生多维度效益：

（1）经济效益：标准实施后，生物制药企业可通过标准化的质量控制体系减少因细胞计数偏差导致的批次报废，降低生产成本。以单抗生产为例，精确的细胞浓度控制可提升下游纯化效率，预计单位产品成本降低 10%-15%。同时，跨实验室数据可比性增强将加速药物研发进程，缩短临床前研究周期，减少重复性实验投入。据测算，我国生物制药行业每年因计数误差造成的直接经济损失超过 5 亿元，标准的推广应用可有效挽回这一损失。

（2）社会效益：标准为细胞治疗、免疫疗法等新兴领域提供科学工具，确保细胞剂量精准可控，降低治疗风险。例如，干细胞移植中细胞计数偏差可能导致治疗失败或副作用，标准化后可显著提升临床疗效。此外，标准与国际接轨将

增强我国生物制品的国际认可度，突破贸易技术壁垒，推动产品出口。预计 5 年内，我国生物制药产品出口额将因标准实施增长 20%-30%，创造就业岗位超 10 万个。

（3）生态效益：标准化实验设计（如稀释系列优化）可减少实验动物使用量，推动 3R 原则（替代、减少、优化）在生物医学研究中的应用。据估算，采用标准方法后，细胞实验中动物使用量可降低 30%，同时减少因方法差异导致的重复实验资源浪费，助力绿色实验室建设。

综上，本标准通过技术创新与国际接轨，将有力支撑我国生物经济高质量发展，实现经济、社会与生态效益的协同提升，推动细胞计数向规范化、规模化、专业化方向发展。

#### 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

本标准依据中国国家标准《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1—2020）规则，等同采用 ISO 20391-2:2019 《Biotechnology — Cell Counting —Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance》。

在结构上，本标准严格遵循 ISO 20391-2 的章节设置，包括范围、术语定义、实验设计、统计方法、报告等核心部分，核心技术框架（如稀释系列实验设计、比例性分析、变异系数计算）与国际标准完全一致。在适用范围上，两者均适用于悬浮状态真核细胞的总计数、差异计数等方法的质量控制，通过稀释系列实验评估测量过程的重复性与系统误差。统计方法方面，本标准采用与 ISO 20391-2 相同的加权最小二乘法拟合比例模型，计算比例指数（PI）、决定系数（ $R^2$ ）等质量指标，并引用 VIM JCGM 200 等国际计量标准，确保数据分析方法的国际通用性。术语定义直接采用 ISO 20391-2 的术语体系，与国内行业标准协调统一。差异方面，本标准在附录中增加了国内典型应用案例（如生物制药、医学研究场景），细化了移液误差预评估、盲法测量等操作步骤，并针对国内实验室常见的细胞类型（如原代细胞）强化了样本稳定性评估要求，但未改变国际标准的核心技术要求。等同采用国际标准的原因在于快速提升我国细胞计数技术的国际认可度，促进生物制药产品的国际贸易，同时通过本土化翻译确保标准在国内的适用性，解决缺乏参考物质场景下的质量控制难题，支撑我国生物经济发

展。

本标准制定过程中未测试国外的样品、样机。

本标准水平为国际先进水平。

## 五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

本文件在起草过程中严格遵循 GB/T 1.2—2020《标准化工作导则 第 2 部分：以 ISO/IEC 标准化文件为基础的标准化文件起草规则》，等同采用 ISO 20391-2:2019《Biotechnology — Cell Counting —Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance》，确保技术内容与国际标准完全一致。在结构上，本标准保留了 ISO 20391-2 的章节框架（如范围、术语定义、实验设计、统计方法等），核心技术条款（如稀释系列实验参数、比例性分析模型、变异系数计算）均未修改，确保国际标准的技术性条款无保留转化为我国标准。术语定义直接采用 ISO 20391-2 的术语体系，并引用 VIM JCGM 200 等国际计量标准，将术语进行“细胞原液”本土化翻译，与国内标准（如 GB/T 42076.1-2022）协调统一。合规性方面，本标准在引言中明确标注“本标准等同采用 ISO 20391-2:2019”，并在参考文献中完整列出国际标准编号，符合 GB/T 1.2-2020 关于国际标准引用的要求。

## 六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本文件与有关的现行法律、法规和强制性国家标准不冲突。符合现有法律法规要求。

本文件等同采用 ISO 20391-2:2019《Biotechnology — Cell Counting —Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance》。

本标准与现行有效的标准没有冲突，可配套使用。

## 七、重大分歧意见的处理经过和依据

标准制定过程中无重大分歧意见。

## 八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利问题。

## 九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建

## 议等措施建议

鉴于本标准规定的细胞计数方法质量控制的通用要求，从标准的目的上，属于技术标准，在通用程度上属于领域内通用标准，因此建议本标准的性质为推荐性国家标准。

1) 由国家标准化管理委员会统筹，通过国家标准平台、行业协会及重点企业渠道，确保生物制药企业、医学研究机构、临床实验室等相关方及时获取标准文本。建立动态更新机制，保障文本准确性与权威性。

2) 在标准使用过程中，起草单位（如中国测试技术研究院）有责任组建专家团队，通过官方网站、技术咨询热线等渠道，针对实验设计（如稀释分数选择）、统计方法（如比例指数计算）及质量指标（如变异系数阈值）等关键问题提供权威解读，避免执行偏差。

3) 鉴于采用标准的单位包括生物制药企业、科研机构和临床实验室等不同对象在标准应用中的需求与侧重点各异，应开展有针对性的标准培训和宣贯活动。依据各单位的业务特点和实际需求，定制培训内容与宣贯方式，以提升相关人员对标准的理解深度与执行能力，切实保障标准有效贯彻执行。

4) 本标准作为细胞计数领域的基础性标准，对规范行业行为、保障细胞计数准确性意义重大。为尽快发挥标准的规范引领作用，建议自批准发布之日起即刻实施，促使行业各方迅速依据标准开展相关工作，推动细胞计数的标准化进程。

## 十、其他应予说明的事项

无。