ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСТ Р ИСО 20391-1— 2023**

# Биотехнология

# ПОДСЧЕТ КЛЕТОК

## Часть 1

## Общее руководство по методам подсчета клеток

**(ISO 20391-1:2018, IDT)**

**Издание официальное**

**Москва**
**Российский институт стандартизации**
**2023**

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский институт стандартизации» (ФГБУ «Институт стандартизации») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 августа 2023 г. № 631-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 20391-1:2018 «Биотехнология. Подсчет клеток. Часть 1. Общее руководство по методам подсчета клеток» (ISO 20391-1:2018 «Biotechnology — Cell counting — Part 1: General guidance on cell counting methods», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ТК 276 «Биотехнология» Международной организации по стандартизации (ИСО).

Дополнительные сноски в тексте стандарта, выделенные курсивом, приведены для пояснения текста оригинала

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 Некоторые элементы настоящего стандарта могут являться объектами патентных прав

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2018
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения . . . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . . . 1
3 Термины и определения . . . . . 1
4 Общие принципы подсчета клеток . . . . . 4
4.1 Общие положения . . . . . 4
4.2 Общий подсчет клеток . . . . . 4
4.3 Дифференцированный подсчет клеток . . . . . 4
4.4 Прямой подсчет клеток . . . . . 4
4.5 Косвенный подсчет клеток . . . . . 4
5 Ключевые аспекты измерения количества клеток . . . . . 4
5.1 Выбор метода подсчета клеток . . . . . 4
5.2 Аспекты выбора метода подсчета клеток . . . . . 5
5.3 Отбор клеток для подсчета . . . . . 6
5.4 Подготовка проб клеток к подсчету . . . . . 6
5.5 Выполнение измерения . . . . . 7
6 Квалификация, валидация и верификация . . . . . 8
6.1 Квалификация оборудования . . . . . 8
6.2 Валидация и верификация метода . . . . . 8
6.3 Стандартные образцы . . . . . 8
7 Обработка и анализ данных, отчетность . . . . . 9
7.1 Обработка и анализ данных . . . . . 9
7.2 Отчетность . . . . . 9
Приложение А (справочное) Описание обычных методов подсчета клеток . . . . . 10
Приложение В (справочное) Обычные методы подсчета клеток для различных задач измерения . . . . 12
Библиография . . . . . 13

## Введение

Подсчет клеток (определение количества клеток) является фундаментальным измерением, которое напрямую влияет на многие аспекты биотехнологии, от биопроизводства до передовой терапии. Количество клеток (или дискретное число клеток) часто представляют как концентрацию клеток (то есть число клеток относительно объема) в суспензии или как поверхностную плотность клеток (то есть число клеток на единицу площади поверхности), если клетки удерживаются на поверхности. Подсчитанное количество клеток имеет решающее значение при оценке потенциала и эффективности клеточной терапии. Концентрация клеток в биореакторе может служить критерием обеспечения качества в клеточных производственных процессах. Большинство клеточных анализов требует приведения к соответствующему количеству клеток для получения возможности взаимного сравнения данных. Настоящий стандарт (являющийся первой из нескольких частей стандарта на подсчет клеток) определяет терминологию и представляет общее руководство по процессу измерения количества клеток, включая выбор метода, подготовку пробы, измерение, квалификацию и валидацию, анализ данных и отчетность.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Биотехнология**

# ПОДСЧЕТ КЛЕТОК

**Часть 1**

**Общее руководство по методам подсчета клеток**

Biotechnology.
Cell counting.
Part 1. General guidance on cell counting methods

**Дата введения — 2024—03—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт определяет терминологию, относящуюся к подсчету клеток в биотехнологии. Он описывает подсчет клеток в суспензии (как правило, концентрация клеток) и клеток, удерживаемых на некой поверхности (как правило, поверхностная плотность клеток). В настоящем стандарте рассмотрены ключевые вопросы по общим методам подсчета (включая общий и дифференцированный подсчет, прямой и косвенный подсчет), а также по выбору метода, процессу измерения, анализу данных и отчетности.

Настоящий стандарт применим к подсчету клеток любого типа — клеток млекопитающих и немлекопитающих (например, бактерии, дрожжи).

Настоящий стандарт не предназначен для подсчета клеток в срезе тканей или матрице биоматериала.

В настоящее время существует ряд международных и национальных стандартов на подсчет клеток в конкретной области/для конкретного применения. При необходимости пользователь может обратиться к существующим стандартам при работе в данной области (специализированные техники измерения и/или информационные системы).

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте нормативные ссылки отсутствуют.

## 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

ИСО и МЭК ведут терминологические базы данных для использования в области стандартизации по следующим адресам:

- Электропедия МЭК: доступна по адресу: gost.e-ecolog.ru ;
- платформа онлайн-просмотра ИСО: доступна по адресу: gost.e-ecolog.ru .

3.1 **точность** (accuracy): Близость измеренного значения величины к истинному значению измеряемой величины.

**Издание официальное**

Примечание 1 — Понятие «точность измерения» не является количественным, и ему не присваивают численного значения. Считают, что измерение является более точным, если оно сопровождается меньшей погрешностью измерения.

Примечание 2 — Под «точностью измерения» иногда понимают близость между измеренными значениями, которые приписываются измеряемой величине.

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 2.13, изменено]

3.2 **агломерат (клеток)** (agglomerate <cells>): Две или более клеток, слабо образующие вместе кластер и обнаруживаемые как более крупный объект.

Примечание 1 — Агломераты клеток возможно разделить на условно единичные клетки, не нанеся при этом значительного повреждения клетке.

3.3 **агрегат** (клеток) (aggregate <cells>): Две или более клеток, образующие вместе кластер (плотный или неплотный) и обнаруживаемые как более крупный объект.

Примечание 1 — Агрегаты клеток, как правило, труднее разделить на единичные клетки.

3.4 **поверхностная плотность (клеток)** (area density <cells>): Количество удерживающихся на поверхности клеток, выражаемое, как правило, в виде числа клеток на единицу площади.

3.5 **признак** (attribute): Физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристика.

3.6 **концентрация клеток** (cell concentration): Количество клеток на объем.

Примечание 1 — Как правило, применяют для клеток в суспензии.

3.7 **количество клеток** (cell count): Дискретное число клеток.

Примечание 1 — Количество клеток, как правило, выражают в виде *концентрации клеток* (3.6) или *поверхностной плотности* (3.4).

3.8 **подсчет клеток** (cell counting): Измерительный процесс определения количества клеток.

3.9 **клеточная суспензия** (cell suspension): Клетки, диспергированные в жидкой среде.

3.10 **дебрис (в клеточных суспензиях)** (debris <in cell suspensions>): Фрагменты клеток и/или частиц биологического и небиологического происхождения.

3.11 **дифференцированное количество клеток** (differential cell count): Количество подмножества клеток, которые отличаются от других субпопуляций клеток по крайней мере одним отличительным признаком, идентифицированным в процессе измерения.

Примечание 1 — Концентрации, выведенные из дифференцированного количества клеток, могут быть выражены в виде абсолютной концентрации или относительной величины (то есть в процентах) по отношению к общей численности клеток или другой предварительно определенной популяции.

3.12 **прямой подсчет клеток** (direct cell counting): Метод подсчета, в котором от каждого отдельного события фиксируют один сигнал (или несколько сигналов).

Примечание 1 — Каждое отдельное событие следует представлять, как одну клетку в идеальном процессе измерения.

3.13 **косвенный подсчет клеток** (indirect cell counting): Метод подсчета, в процессе которого один сигнал (или набор сигналов) измеряют от популяции клеток, а затем соотносят этот сигнал с количеством клеток на основе математической модели, специфичной для измерения (например, калибровочной кривой).

3.14 **предел количественного определения;** LoQ (limit of quantitation, LoQ): Наименьшее количество аналита в пробе, которое можно определить количественно конкретным аналитическим методом с требуемой прецизионностью и точностью.

Примечание 1 — Предел количественного определения описывает количественный анализ низких уровней клеток в матрицах пробы.

3.15 **линейность** (linearity): Способность получать результаты измерений, которые прямо или косвенно посредством конкретных математических преобразований будут пропорциональны количеству клеток в пределах заданного диапазона.

3.16 **измеряемая величина** (measurand): Величина, подлежащая измерению.

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 2.3, изменено]

3.17 **прецизионность (измерений)** (precision, measurement precision): Близость между показаниями или измеренными значениями величины, полученными при повторных измерениях для одного и того же или аналогичных объектов при заданных условиях.

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 2.15, изменено]

3.18 **пропорциональность** (proportionality): Характеристика, демонстрируемая совокупностью измерений, в которой при изменении значения входного параметра (и неизменности всех других вводных и условий измерения) отношение ожидаемого значения измерения к значению этого входного параметра, при котором были произведены измерения, остается постоянным.

Примечание 1 — Если ряд измерений показывает пропорциональность на некотором диапазоне данного входного параметра, то ожидаемое значение измерений можно выразить как произведение входного параметра на фиксированную константу, в отсутствие систематической погрешности.

3.19 **реактив** (reagent): Вещество, используемое в химических/биохимических анализах или других реакциях.

3.20 **стандартный образец** (reference material): Материал, достаточно однородный и стабильный в отношении определенных свойств для того, чтобы использовать его при измерении или при оценивании качественных свойств в соответствии с предполагаемым назначением.

Примечание 1 — Стандартные образцы с приписанными значениями величины или без них допускается использовать для контроля прецизионности измерений, тогда как для калибровки или контроля правильности измерений рекомендуется использовать только стандартные образцы с приписанными значениями величины.

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 5.13, изменено]

3.21 **референтный метод** (reference method): Тщательно изученная методика измерений, предоставляющая значения с неопределенностью измерения, соответствующей предполагаемому применению, особенно при оценке правильности других методик измерения для той же величины и при определении характеристик стандартного образца.

[ИСО 17511:2003, 3.29, изменено]

3.22 **повторяемость (результатов измерений)** (repeatability <results of measurement>): Прецизионность измерений в заданных условиях измерения.

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 2.21, изменено]

3.23 **выносливость** (ruggedness): Мера способности метода не подвергаться влиянию небольших, но преднамеренных изменений параметров метода, обеспечивая показатель своей надежности при нормальном использовании.

[ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1994]

3.24 **избирательность** (selectivity): Свойство измерительной системы, используемой согласно установленной методике измерений для получения измеренных значений одной или нескольких измеряемых величин, заключающееся в независимости значений каждой измеряемой величины от других измеряемых величин или других величин в исследуемом явлении, теле или веществе.

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 4.13, изменено]

3.25 **общее количество клеток** (total cell count): Количество всех клеток, независимо от присущих клеткам признаков.

3.26 **неопределенность (измерений)** (uncertainty <measurement>): Неотрицательный параметр, характеризующий разброс значений, приписываемых измеряемой величине на основании используемой информации.

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 2.26, изменено]

3.27 **валидация** (validation): Подтверждение посредством представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены.

[ИСО 9000:2015, 3.8.13, изменено]

3.28 **верификация** (verification): Подтверждение посредством представления объективных свидетельств того, что установленные требования были выполнены.

[ИСО 9000:2015, 3.8.12, изменено]

3.29 **жизнеспособные клетки** (viable cells): Клетки в пробе, обладающие признаком жизни (например, метаболически активны, способны к размножению, обладают неповрежденной клеточной мембраной или способны к возобновлению этих функций), определенным на основе предполагаемого использования.

## 4 Общие принципы подсчета клеток

### 4.1 Общие положения

Различные методы подсчета клеток (как описано в приложении А) разделяют на общий или дифференцированный подсчет клеток, а также на прямой или косвенный подсчет клеток.

### 4.2 Общий подсчет клеток

Общий подсчет клеток включает в себя измерение всех клеток, независимо от признака(ов) клетки.

Следует применять критерии отличия клеток от дебриса (клеточного и неклеточного происхождения).

### 4.3 Дифференцированный подсчет клеток

Дифференцированный подсчет клеток включает в себя измерение подмножества клеток, отличающихся от других клеток, по крайней мере одним отличительным признаком.

***Пример — Дифференцированный подсчет клеток включает в себя подсчет жизнеспособных клеток, подсчет клеток, отражаемых специальным маркером, или подсчет клеток, имеющих особую морфологию.***

### 4.4 Прямой подсчет клеток

Прямой подсчет клеток заключается в регистрации сигнала или набора сигналов, поступающих от каждой клетки (см. 3.12). В этом контексте сигнал(ы) может (могут) быть электрическим(и) (как импеданс), оптическим(и) (как флуоресцентный или колориметрический) или механическим(и). Сигнал может быть зарегистрирован пользователем вручную или автоматически прибором. Из-за большого количества клеток в типичной пробе определенные методы прямого подсчета клеток требуют разведения пробы. Количество клеток затем экстраполируют на основании коэффициента разбавления.

### 4.5 Косвенный подсчет клеток

Косвенный подсчет клеток заключается в регистрации сигнала или набора сигналов от всех клеток или от множества клеток в пробе, а затем соотносят этот сигнал с количеством клеток на основе математической модели (моделей), специфичной для измерения (например, калибровочной кривой) (см. 3.13).

***Пример — Косвенный подсчет клеток включает в себя измерение общей массы клеток, общей ДНК и метаболической активности.***

Примечание — Неопределенность в результатах определения количества клеток, полученных при косвенном подсчете клеток, может быть обусловлена математической моделью (моделями) (например, калибровочной кривой), в дополнение к другим источникам погрешностей измерения.

## 5 Ключевые аспекты измерения количества клеток

### 5.1 Выбор метода подсчета клеток

Существует множество методов подсчета клеток (см. приложение А); данные методы рекомендуется использовать для получения общего или дифференцированного количества клеток посредством прямого или косвенного подсчета клеток (см. рисунок 1 и приложение В).




Рисунок 1 — Категории подсчета клеток

Ряд методов допускается применять к нескольким категориям на основе предполагаемой измеряемой величины для поставленной задачи.

***Пример 1 — Автоматический подсчет на микроскопе допускается использовать для прямого/общего подсчета клеток, если измеряемая величина представляет собой общее число объектов/клеток; его также допускается использовать для прямого/дифференцированного подсчета клеток, если измеряемая величина представляет собой число помеченных объектов/клеток; его также допускается использовать для косвенного/общего подсчета клеток, если измеряемая величина представляет относительное слияние.***

Некоторое оборудование и/или методы могут обеспечить подсчет клеток одновременно для нескольких категорий подсчета путем нахождения разных измеряемых величин.

***Пример 2 — Общее количество клеток и количество жизнеспособных клеток возможно определить одновременно на основе разности оптических свойств, меток, морфологии и т. п.***

Каждому методу присущи помехи и погрешность, которые могут повлиять на его точность и прецизионность. Пользователь должен обладать определенными знаниями, чтобы выбрать метод или методы, подходящие для предполагаемого типа клеток, применения и/или метода подготовки проб (соответствующий назначению).

Примечание — Требования к подсчету клеток зависят от предполагаемого применения. Предполагаемым применением может, например, оказаться выпуск продукции или подсчет клеток по ходу процесса.

Для оптимального выполнения прямого подсчета клеток (как общего, так и дифференцированного) требуются хорошо диспергированные клетки. Присутствие дебриса и агрегированных или агломерированных клеток может привести к завышенным или заниженным результатам подсчета. По возможности следует установить процесс подготовки хорошо диспергированных проб, содержащих минимальное количество дебриса, агрегатов и агломератов.

Методы косвенного подсчета используют замещающие меры для оценки количества клеток. Точность этих методов зависит от точности измерения, а также от точности калибровочной кривой. Например, если для оценки количества клеток используют общее количество ДНК, важно точно измерить это общее количество ДНК в пробе и установить точную взаимосвязь между ДНК и числом клеток. По возможности калибровку следует выполнять с использованием соответствующего(их) стандартного(ых) образца(ов).

### 5.2 Аспекты выбора метода подсчета клеток

Выбор метода подсчета клеток зависит от предполагаемой цели, а также от пробы и технологических факторов. Данная методика включает в себя:

- предполагаемую цель подсчета клеток;
- категорию(и) подсчета;

- соответствующую(ие) измеряемую(ые) величину(ы);
- соответствие приборов для оценки определенной(ых) измеряемой(ых) величины (величин), включая предел количественного определения (LoQ);
- характеристики пробы, включая признаки клеток и потенциальное влияние гетерогенности пробы;
- потенциальное воздействие на измерение в связи с присутствием дебриса, агрегатов и/или агломератов;
- потенциальное воздействие на измерение биопроцессов и процессов обработки перед измерениями: включая хранение, перенос, криоконсервирование [включая процессы замораживания и размораживания (оттаивания)];
- потенциальное воздействие на измерение вспомогательных материалов и других компонентов клеточной пробы (например, среды, микросферы).

### 5.3 Отбор клеток для подсчета

Количество клеток, как правило, определяют в одной или нескольких пробах, отобранных от большего целого.

Следует использовать надлежащие методы отбора проб, чтобы свести к минимуму погрешности отбора проб, связанные с измерением клеточной пробы, а не измерением целой серии или партии (например, главный банк клеток, целая популяция клеток).

Измерения пробы/фракции небольшого размера может иметь бóльшую погрешность отбора проб. В некоторых случаях погрешности отбора проб можно снизить, взяв больший размер произвольной пробы/фракции или несколько проб, особенно для измерения количества клеток на единицу площади.

Для того чтобы взятая от суспензии клеток аликвота была для нее представительной, эта суспензия должна быть достаточно гомогенной. Гетерогенность клеточной суспензии может привести к тому, что аликвоты не будут представительными для большего целого.

### 5.4 Подготовка проб клеток к подсчету

Процессы подсчета клеток могут потребовать подготовки клеточной пробы перед подсчетом (например, перемешивания, лизиса, окрашивания).

Вариабельность подсчета клеток может быть обусловлена такими аспектами процесса подготовки пробы, как факторы окружающей среды, методики и реактивы.

Процесс подготовки пробы может изменять клеточную пробу систематическим или случайным образом, снижая представительность большего целого или изменяя признаки клеток, связанные с измеряемой величиной при подсчете, что ведет к неправильной интерпретации результатов измерения.

Присутствие дебриса может привести к завышенной оценке числа клеток. Следует учитывать влияние дебриса на измерения количества клеток; по возможности дебрис следует удалять* и/или учитывать до или во время подсчета.

Присутствие агрегатов или агломератов может привести к заниженной оценке числа клеток. Следует установить методы подготовки проб, обеспечивающие подготовку хорошо диспергированных проб перед забором аликвоты.

#### 5.4.1 Факторы окружающей среды

Следует свести к минимуму факторы окружающей среды, которые могут изменить пробу таким образом, что это повлияет на подсчет клеток. Эти факторы могут включать температуру, влажность, воздействие света, условия стерильности и воздушные потоки.

Примечание — Температура, при которой выдерживают клеточную пробу, может изменить ее признак, поэтому она должна быть выбрана с учетом этого.

#### 5.4.2 Методики

Следует учесть влияние оборудования и расходных материалов на подсчет клеток. Необходимо подобрать соответствующие контейнеры и оборудование для переноса, чтобы свести к минимуму потерю клеток, связанную с переносом пробы. Способы переноса (например, пипеткой) должны соответствовать приемлемому уровню потерь пробы.

Методики перемешивания (например, режим, скорость, продолжительность), а также время ожидания/выдержки между процессами могут изменить признак клеток, связанный с измеряемой вели-

* *Например, при помощи фильтрации или центрифугирования.*

чиной при подсчете. Методики перемешивания клеток следует разрабатывать таким образом, чтобы минимизировать влияние на измеряемую при подсчете величину.

Погрешности измерения объема клеточной суспензии или разбавителя следует свести к минимуму при разбавлении клеток.

Методики окрашивания, лизиса, разрушения агрегатов, диспергирования или других манипуляций с клетками следует оценивать по их влиянию на измеряемую при подсчете клеток величину. Следует минимизировать потенциальное влияние на подсчет клеток.

***Пример — Избыточный сдвиг может разорвать некоторые клетки.***

**5.4.3 Качество и стабильность реактивов**

По возможности следует верифицировать качество и стабильность используемых при подготовке проб реактивов. Качество реактива следует верифицировать доступными методами или с помощью стандартных образцов.

Некоторые реактивы (например, флуоресцентный краситель, буфер) могут потерять стабильность со временем или в определенных условиях окружающей среды. Измерения подсчета клеток следует проводить в пределах диапазона приемлемой стабильности реактивов.

Погрешности состава некоторых реактивов могут привести к завышенным или заниженным результатам подсчета клеток. Должны быть определены приемлемые диапазоны концентраций реактивов.

Некоторые реактивы (например, антитела) могут иметь отличия от партии к партии или в зависимости от поставщиков. Перед применением таких реактивов пользователь должен определить приемлемые технические требования.

Следует учитывать эффективность связывания реактивов (например, абсорбция красителей), используемых при подсчете клеток, и, где необходимо, устанавливать технические требования.

**5.5 Выполнение измерения**

Подсчет клеток должен выполняться с помощью технически исправных, готовых к работе приборов.

Прибор необходимо калибровать или верифицировать через соответствующие промежутки времени.

Подсчет клеток должен осуществляться с помощью валидированных методик. Для предполагаемого подсчета клеток следует установить надлежащие параметры прибора.

Примечание 1 — Параметры одного прибора не обязательно должны быть напрямую перенесены на другой прибор.

Примечание 2 — Может потребоваться оптимизация параметров прибора для каждого измерительного процесса при подсчете клеток (при изменении цели или пробы).

Измеряемая величина для предполагаемой цели должна попадать в пределы оговоренного диапазона используемого метода. Нижняя граница этого валидированного диапазона должна быть выше предела количественного определения.

Если детектируются сигналы нескольких измеряемых величин одновременно, следует минимизировать и/или компенсировать помехи и/или совпадение (например, введение поправки в измерения многоканальной проточной цитометрии).

Измерения при подсчете клеток следует выполнять в рамках установленного временного интервала, на котором стабильность клеточной пробы подтверждена верификацией. Следует учитывать стабильность пробы в ходе процесса измерения. Потеря интенсивности сигнала или изменение признака клеток могут повлиять на измеряемую величину.

Следует минимизировать погрешности, связанные с систематической погрешностью и расхождением результатов у оператора. Влияние систематической погрешности и расхождения результатов у оператора на неопределенность подсчета клеток могут снизить протоколы обучения, подтверждение квалификации, внедрение автоматизированных систем и случайное распределение проб.

# 6 Квалификация, валидация и верификация

## 6.1 Квалификация оборудования

Измерительное оборудование подлежит квалификации в соответствии с предварительно установленными техническими требованиями. Протоколы по квалификации должны быть задокументированы до проведения квалификации приборов, результаты также документируют.

Следует провести квалификацию монтажа (IQ) и квалификацию функционирования (OQ).

Допускается ссылаться на квалификацию монтажа (IQ) и квалификацию функционирования (OQ), осуществленную изготовителем прибора.

Плановую квалификацию эксплуатации (PQ) проводят в соответствии с документированными процедурами через заранее определенные интервалы.

Примечание — Квалификация оборудования может быть частью валидации.

## 6.2 Валидация и верификация метода

Метод измерения для подсчета клеток необходимо валидировать. Рабочие параметры метода должны обеспечить получение результатов, подходящих для предполагаемой цели. Рабочие параметры метода могут включать показатели точности, прецизионности, рабочего диапазона (LoQ, линейность и т. д.), избирательности/специфичности, выносливости и промежуточной прецизионности, например вариабельности для различных операторов, приборов и в разные дни.

Валидацию точности в идеале осуществляют посредством оценки разности между средним значением аналитических результатов и опорным значением, полученным с использованием аттестованного(ых) стандартного(ых) образца(ов). Допускается также использовать стандартный метод, множество планов эксперимента со статистическим анализом или другой установленный метод.

Примечание — Для оценки повторяемости и воспроизводимости допускается использовать межлабораторные исследования и/или другие сравнительные исследования.

Дополнительная информация по плану эксперимента и статистическому анализу приведена в [14].

План валидации должен быть задокументирован и поддерживаться в рабочем состоянии. План валидации должен включать рабочие параметры метода для предполагаемой задачи. Результаты валидации должны быть задокументированы.

Верификация метода может быть проведена для подтверждения работоспособности валидированного метода с учетом установленных технических требований. Для этой цели может быть определен сокращенный набор рабочих параметров метода. Планы и результаты верификации должны быть задокументированы и поддерживаться в рабочем состоянии.

## 6.3 Стандартные образцы

Для обеспечения прослеживаемости измерений, возможности проверки и/или верификации процесса измерения следует использовать стандартные образцы. При наличии соответствующего клеточного стандартного образца его следует использовать по назначению.

### 6.3.1 Аттестованные стандартные образцы

Следует использовать аттестованные стандартные образцы при их наличии. Стандартный образец следует использовать по назначению на основании его аттестованного или опорного значения (см. [1]).

### 6.3.2 Собственные стандартные образцы

Собственные стандартные образцы следует оценивать согласно их назначению в процессе подсчета. По возможности опорные значения для собственных стандартных образцов следует устанавливать с соответствующими неопределенностями.

### 6.3.3 Применение стандартных образцов

В целях квалификации, валидации и верификации оборудования для подсчета клеток следует использовать соответствующие стандартные образцы.

***Пример 1 — Микросферы могут служить подходящими стандартными образцами для квалификации приборов или квалификации монтажа и функционирования оборудования прямого подсчета.***

Примечание — Микросферы, как правило, не обладают свойствами клеток; результаты, полученные на микросферах, могут оказаться нерепрезентативными для ожидаемых результатов от клеточной пробы.

***Пример 2 — Растворы с известной концентрацией флуорофоров допускается использовать для квалификации методов подсчета клеток на основе флуоресценции.***

Подходящий стандартный образец допускается использовать для калибровки методов косвенного подсчета клеток.

Стандартные образцы допускается также использовать для обучения или проверки квалификации персонала.

## 7 Обработка и анализ данных, отчетность

### 7.1 Обработка и анализ данных

#### 7.1.1 Общие положения

Для выбранного метода подсчета клеток следует использовать надежные методы обработки и анализа данных. Аспекты обработки данных могут включать описанные в 7.1.2—7.1.4, но не ограничиваться этим.

#### 7.1.2 Обработка и анализ изображений

Техники обработки цифровых изображений, как правило, используют для обработки, анализа и представления изображений, полученных с помощью микроскопа. При подсчете клеток анализ изображений допускается использовать для идентификации клеточных объектов и исключения дебриса из анализа. Анализ изображений можно также использовать для идентификации конкретных подмножеств клеток в пробе. Базовая обработка изображений может включать коррекцию яркости и контрастности изображения, а также коррекцию неравномерности освещения. Анализ изображений используют для определения количества клеток. Параметры и алгоритмы анализа изображений подлежат валидации.

#### 7.1.3 Гейтирование (гейтинг)

Гейт — это набор предельных значений (границ), которые служат для выделения подмножества клеток из большей совокупности или всей популяции клеток, как правило, визуализированной в форме графика плотности распределения или гистограммы. Гейты определяют с помощью анализа распознавания или просто очертив вручную заданный набор точек данных. Гейты допускается выделять поэтапно (например, в измерениях проточной цитометрии клетки рекомендуется сначала гейтировать на основе прямого светорассеяния, чтобы отличить клетки от дебриса по относительному размеру, а затем гейтировать на основе интенсивности флуоресценции по специальным поверхностным маркерам).

#### 7.1.4 Корректировка совпадения

Совпадение в измерениях для подсчета клеток является временным перекрытием сигналов от клеток в проточном измерении или пространственным перекрытием в изображениях, полученных с помощью микроскопа, что в результате дает пропуски в счете. Следует использовать подходящие методы корректировки совпадений, чтобы избежать заниженных результатов подсчета клеток. В проточных измерениях особое влияние оказывает план эксперимента серии разведений и экстраполяция на нулевую объемную долю клеток в измеряемой пробе. Некоторые проточные приборы обеспечивают варианты анализа данных с учетом потерь на совпадение.

### 7.2 Отчетность

Отчет об обработке данных должен включать достаточно деталей для независимой оценки результатов подсчета клеток. Элементы отчетности могут включать:

a) для пробы — ID, дескрипторы клетки (тип, номер партии, источник);

b) для реактивов — наименование, источник, номер партии;

c) методы и условия подготовки пробы;

d) использованное оборудование — включая установочные параметры;

e) планы квалификации, валидации и верификации;

f) результаты измерений с соответствующими единицами и неопределенностью;

g) метод анализа данных;

h) неожиданные наблюдения.

## Приложение А
## (справочное)

## Описание обычных методов подсчета клеток

### А.1 Общие положения

В данном приложении описаны, как правило, использующиеся методы подсчета клеток.

### А.2 Объем осажденных клеток

Объем осажденных клеток, также известный как высота осажденных клеток, представляет собой процент по объему клеток в данной пробе. Типовая процедура включает в себя центрифугирование капиллярной трубки с пробой; высота клеток, собравшихся на дне, используется для оценки процента по объему. Данный метод наиболее пригоден для проб, которые не содержат компонентов или дебриса, осаждающихся вместе с частицами. Данный метод не пригоден для агрегатов клеток, когда объем осажденных клеток будет зависеть от размера, структуры агрегатов, пустот и т. п.

### А.3 Масса клеток

Число клеток можно оценить измерением массы сухих или влажных клеток на объем. Клетки выделяют из бульона/среды и взвешивают во влажном состоянии либо клетки тщательно высушивают перед взвешиванием. Сухая масса, как правило, дает более достоверный результат. При подсчете бактерий следует учитывать вклад от внеклеточного матрикса.

### А.4 Камера для подсчета клеток вручную

Счетная камера, также известная как гемоцитометр, — это предметное стекло микроскопа, сконструированное специально для прямого подсчета клеток под микроскопом. Предметное стекло имеет углубление (лунку) посередине и специальное покровное стекло, укладывающееся на это место; углубление размечено сеткой. Каплю клеточной суспензии помещают в углубление, таким образом, чтобы она заполнила пространство между покровным и предметным стеклом. Глубина лунки определена заранее; таким образом, можно рассчитать объем и концентрацию измеряемой клеточной суспензии. Пробы, как правило, разбавляют для подсчета вручную; каждый этап разбавления может внести свой вклад в неточность измерения, поэтому необходимо довести концентрацию клеток до практического уровня с целью облегчения счета, но не разбавлять пробу слишком, чтобы не повлиять на точность данных. Обычные источники погрешности включают несоответствия заполнения объема (лунки) и систематическую погрешность оператора. Неприкрепленные клетки (включая подвижные бактериальные клетки) или клетки, расположенные в разных фокальных плоскостях, приводят к сомнительным результатам.

### А.5 Разлив по чашкам и подсчет КОЕ

Клетки, разлитые по чашкам с питательной средой, культивируют для образования колоний для облегчения счета. Если клеточная суспензия разбавлена, а клетки разделены и редко распределены по чашке, можно предположить, что каждая клетка порождает одну колонию, то есть является колониеобразующей единицей (КОЕ). Колонии подсчитывают, и на основе известного объема культуры, распределенной по чашке, можно вычислить концентрацию клеток. Чтобы обеспечить хорошее диспергирование в чашке, пробы, как правило, разбавляют; каждый этап разбавления может внести свой вклад в неточность измерения. Точность и целесообразность этой процедуры будут зависеть от типа клеток, представляющих интерес. Размер и разрастание колоний меняются и могут внести вклад в неточность.

### А.6 Спектрофотометрия

Спектрофотометры измеряют интенсивность света, проходящего через пробу. Мутные клеточные суспензии поглощают или рассеивают свет и уменьшают количество пропускаемого света. Чем выше концентрация клеток, тем выше мутность. Оптическая плотность (OD) пропорциональна биомассе клеточной суспензии. Культуру помещают в прозрачную кювету, кювету помещают в спектрофотометр и сразу измеряют оптическую плотность. Это метод косвенного подсчета, требующий построения стандартной кривой с использованием такого же типа клеток, как измеряемый.

### А.7 Импедансный счетчик

Импедансный счетчик, также известный как счетчик, работающий на принципе Коултера, является прибором для подсчета и гранулометрического анализа клеток в суспензии. Принцип основан на том факте, что клетки функционируют как дискретные изоляторы при суспендировании в проводящей ток жидкости; в счетчике Коултера клетки, взвешенные в растворе, который проводит электрический ток, пропускают по одной через микроотверстие, по бокам которого расположены два электрода, проводящие электричество. Если в микроотверстии клетка отсутствует, электричество течет с неизменной интенсивностью, а в момент прохождения клетки через микроотверстие ток тормозится на короткий промежуток времени. Проход через отверстие, в котором обнаруживается клетка, изве-

стен как «электрочувствительная зона». Кондуктометрический счетчик вычисляет число таких событий и измеряет ток (и импеданс), который непосредственно коррелирует с объемом проходящей клетки. Число клеток гейтируется заданием диапазона размеров представляющих интерес клеток. Общие источники погрешности включают в себя совпадение (когда случайно более одной клетки одновременно проходят через микроотверстие) и выбор гейтинга. Консенсусным стандартом, описывающим такой прямой метод подсчета, считается [15].

### А.8 Проточная цитометрия

Отдельные клетки в суспензии протекают в струе перед лазерным или LED лучом. Луч обнаруживает каждую клетку по очереди, а импульсный фотодатчик собирает свет, который отражается или испускается клетками. Проточные цитометры имеют множество возможностей, например, анализ формы клеток, их внутренней и внешней структуры, а также измерение количества специфических белков и других биохимических веществ в клетках. Существует множество потенциальных источников погрешности, включая качество и специфичность реактивов, установочные параметры приборов (например, параметры гейтинга) и методы анализа данных. Точность можно улучшить при наличии клеточных стандартных образцов (например, CD4+ клетки).

### А.9 Автоматический анализ изображений

Современные методы включают использование высококачественных микроскопических изображений и алгоритм статистической классификации для выполнения автоматического обнаружения клеток и их счета. Для этой цели можно задействовать ряд приемов классификации изображений. Обычные источники погрешности включают использование неправильной операции визуализации, например, фокусирования, и неправильного подсчета клеточных агрегатов, который может быть сложным для соответствующего разбиения на сегменты с помощью алгоритмов анализа изображений. Другим основным источником погрешности является установление параметров подсчета в анализе изображений, избегая подсчета дебриса и правильного захвата всех клеток.

### А.10 Определение числа клеток посредством общего количественного определения ДНК

Общее количество ДНК, как правило, определяемое по интенсивности неселективной флуоресцентной метки ДНК, иногда используют взамен определения общего числа клеток. На точность количественного определения ДНК может повлиять селективность маркера и эффективность мечения, а также эффективность выделения ДНК из лизата клеток в препарате.

### А.11 Анализ метаболической активности и другие тесты

Ряд биологических методов количественного определения ставит задачу оценить биологическую активность и используется взамен измерения количества клеток. Данный анализ может включать производство лактозы/глюкозы, выделение лактатдегидрогеназы, и уровни содержания АТФ. Следует отметить, что только метаболически активные клетки будут включены в подобные измерения.

Другие менее широко используемые методы подсчета клеток включают фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA) и иммуноферментный спот-анализ (ELISpot). Эти методы используют для подсчета клеток, производящих цитокины или специфические клеточные маркеры на поверхности клетки, они пригодны и для косвенного подсчета. Для идентификации цитокинов и специфических клеточных маркеров также, как правило, используют мультиплексные системы микросфер, которые могут сосчитать различные маркеры в отдельных лунках микроразведений.

## Приложение В
## (справочное)

## Обычные методы подсчета клеток для различных задач измерения

Таблица В.1 — Категории обычных методов подсчета клеток[a, b, c]

| | Прямой подсчет клеток | Косвенный подсчет клеток |
|---|---|---|
| Общий подсчет клеток | Автоматическая микроскопия.<br>Кондуктометрический счетчик.<br>Проточная цитометрия.<br>Ручной подсчет | Автоматическая микроскопия.<br>Масса/вес сухих клеток.<br>NIR (в ближней ИК-области).<br>Высота центрифугированных клеток.<br>Спектрофотометрия.<br>Количественное определение общей ДНК.<br>Турбидиметр |
| Дифференцированный подсчет клеток | Автоматическая микроскопия.<br>Колониеобразующие единицы (КОЕ).<br>ELISpot.<br>Проточная цитометрия.<br>Ручной подсчет | Иммуноферментный анализ ELISA.<br>Кондуктометрический монитор биомассы.<br>Анализ метаболической активности.<br>NIR (в ближней ИК-области) |

[a] Перечень, представленный в настоящей таблице, не полностью охватывает методы подсчета.

[b] Некоторые из приведенных методов допускается поместить в другие категории на основании плана эксперимента. В некоторых случаях представлено только первичное использование.

[c] Методы, которые допускается использовать для подсчета клеток в процессе производства, то есть измерения *in situ*, в которых применяют датчик внутри биореактора и/или измерения *ex situ*, в которых используют датчик вне биореактора для измерения циркулирующей пробы из биореактора.

## Библиография


| | | |
|---|---|---|
| [1] | ISO Guide 33 | Reference materials — Good practice in using reference materials |
| [2] | ISO Guide 98-3 | Uncertainty of measurement, Guide to the expression of uncertainty measurement (GUM:1995) |
| [3] | ISO/IEC Guide 99:2007 | International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM) |
| [4] | ISO 5725-1:1994 | Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions |
| [5] | ISO 5725-2:1994 | 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 |
| [6] | ISO 5725-3:1994 | Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method |
| [7] | ISO 5725-6:1994 | Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values |
| [8] | ISO 8196-3:2009[1)] | Milk — Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis — Part 3: Protocol for the evaluation and validation of alternative quantitative methods of milk analysis |
| [9] | ISO 10718:2002 | Cork stoppers — Enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds and bacteria capable of growth in an alcoholic medium |
| [10] | ISO 11843-1:1997 | Capability of detection — Part 1: Terms and definitions |
| [11] | ISO 13366-1:2008 | Milk — Enumeration of somatic cells — Part 1: Microscopic method (Reference method) |
| [12] | ISO 13528:2015 | Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison |
| [13] | ISO 17511:2003 | *In vitro* diagnostic medical devices — Measurement of quantities in biological samples — Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials |
| [14] | ISO 20391-2:2019 | Biotechnology — Cell counting — Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance |
| [15] | ASTM F2149-01 (Reapproved 2007) | Standard Test Method for Automated Analyses of Cells — The Electrical Sensing Zone Method of Enumerating and Sizing Single Cell Suspensions |
| [16] | ASTM F2944-12 | Standard Test Method for Automated Colony Forming Unit (CFU) Assays — Image Acquisition and Analysis Method for Enumerating and Characterizing Cells and Colonies in Culture |
| [17] | ASTM D4455-85 (2014) | Standard Test Method for Enumeration of Aquatic Bacteria by Epifluorescence Microscopy Counting Procedure |
| [18] | ASTM F2739-08 | Standard Guide for Quantitating Cell Viability within Biomaterial Scaffolds |
| [19] | H20-A2 | Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard — Second Edition |
| [20] | DIN 58932-1 | Haematology — Determination of the concentration of blood corpuscles in blood — Part 1: Blood collection, sample preparation, biological influence factors, interference factors |
| [21] | DIN 58932-2 | Haematology — Determination of the concentration of blood corpuscles in blood — Part 2: Characteristic quantities for erythrocytes (erythrocyte indices) |


[1)] Эквивалентен IDF 128-3:2009.

[22] DIN 58932-3 Haematology — Determination of the concentration of blood corpuscles in blood — Part 3: Reference method for the determination of the concentration of erythrozytes; Text in German and English

[23] DIN 58932-4 Haematology — Determination of the concentration of blood corpuscles in blood — Part 4: Reference procedure for the determination of the concentration of leucocytes

[24] DIN 58932-5 Haematology — Determination of the concentration of blood corpuscles in blood — Part 5: Reference method for the determination of the concentration of thrombocytes; Text in German and English

[25] Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes, International Council for Standardization in Haematology; Prepared by the Expert Panel on Cytometry. Clin. Lab. Haematol. 1994, 16 pp. 131—138

[26] Platelet Counting by the RBC/Platelet Ratio Method — A Reference Method, International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting — American Journal Clinical Pathologists 115:460—464 (2001)

[27] CLSI H44-A2 Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guidance — Second Edition

УДК 615.07:006.354 ОКС 07.080

Ключевые слова: биотехнологии, подсчет клеток, точность, агломерат, агрегат, поверхностная плотность, признак, концентрация клеток, количество клеток, клеточная суспензия, дебрис, дифференцированное количество клеток, прямой подсчет клеток, косвенный подсчет клеток, предел количественного определения, линейность, измеряемая величина, прецизионность, пропорциональность, реактив, стандартный образец, референтный метод, повторяемость, выносливость, избирательность, общее количество клеток, неопределенность, валидация, верификация, жизнеспособные клетки

Редактор *Е.В. Якубова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 14.08.2023. Подписано в печать 16.08.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru