

# **Standard Operation Procedure (SOP) for 5-Part Leukocyte Differential Count Using Flow Cytometry (JSLH-Diff)**

Provided by the JSLH SSC subcommittee  
on Standardization of Blood Cell Count (JSLH-SBCC)

Date of issue: 29 Nov. 2023 (Rev1.42), 7 April 2023 (Rev1.42 English)

**International harmonization protocol (RMP, reference measurement procedure)** for value assignment applied to fresh blood calibrator : Japanese Society for Laboratory Hematology flow cytometric reference method of determining the differential leukocyte count: external quality assurance using fresh blood sample, Y KAWAI ,Y.NAGAI ,E.OGAWA, H. KONDO on behalf of the Standardization Subcommittee for Blood Cell Counting of the Japanese Society for Laboratory Hematology (JSLH), *International Journal of Laboratory Hematology* 39: 202–222, 2017.

**International harmonization method** : Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, H20-A2 Vol.27 No.4. 2007

**International harmonization method** : Toward a Reference Method for Leukocyte Differential Counts in Blood: Comparison of Three Flow Cytometric Candidate Methods, Mikael Roussel,<sup>1\*</sup> Bruce H. Davis,<sup>2</sup> Thierry Fest,<sup>1,3,4</sup> Brent L. Wood,<sup>5\*</sup> on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), *Cytometry Part A* 81A: 973-982, 2012

**Evaluation method (CLSI)**: Validation, Verification, and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, H26-A2 Vol.30 No.14, 2010.

**Evaluation method (ICSH)**: ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analyzers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting, INTERNATIONAL COUNCIL FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY, WRITING GROUP: C BRIGGS, N CULP, B DAVIS, G.D'ONOFRIO, G ZINI, S.J MACHIN, on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), *International Journal of Laboratory Hematology* 36: 613–627, 2014

## **Intended use**

This reference measurement procedure (RMP) is based on a flow cytometric immunophenotyping reference method for leukocyte differential provided the Japanese Society for Laboratory Hematology (JSLH-Diff™).<sup>1</sup> The RMP is not intended for routine laboratory use, it can be used by the manufacturers to evaluate prototype and preproduction models. The intent is to use more accurate value assignments of primary fresh blood calibrator, calibrator, and trueness control materials (calibration verification control) for verification purposes at select sites performing a full regulatory evaluation. Table 1 shows Immunophenotype panel utilized for five-part leukocyte identification for healthy donors. Figure 1 Shows an example 2-dimensional plot of five normal leukocyte classifications by JSLH-Diff™.

## **Alternative reference method:**

This method is an alternative reference method defined by CLSI H20-A2<sup>2</sup>, which has been applied to the ICSH requirement that at least one positive antigen should be used to define each normal leukocyte differentiation population. This method can be validated for accurate performance within individual laboratories.

## **Validation of the international harmonization protocol**

This method has been validated by the visual observation method by CLSI H20-A2<sup>2</sup> and the extended flow cytometric method by ICSH<sup>3,4</sup>. The intent of use of the extended method is to screening blood samples, including patients with hematological malignancies, but not to assign value for fresh blood calibrators from healthy donors. Therefore, these are out of the scope of CLSI H20-A2<sup>2</sup>.

**Table 1. Immunophenotype panel utilized for five-part leukocyte identification for healthy donors.**

Marking Target Cell	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils	Fluor dyes	Clone
CD16	+	NK cell	-,+,++	-	-	FITC	3G8
CD3/CD56	-	T cell, NK cell	-	-	-	FITC/B545 <sup>b</sup>	SK7/MY31
CD19	-	B cell	-	-	-	APC	SJ25C1
CD14	-	-	+	-	-	PC7	RMO52
CD33	+	-	+	+	+	PC7	D3HL60.251
CD294	-	Th2	-	+	+	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 <sup>a</sup>	BM16
HLA-DR	-	B cell	+	-	-	PerCP-Cy5.5	L243
CD123	-	-	-	-	+	PE	9F5
CD45	+ (Dim)	+ (Bright)	+(Medium)	+ (Dim)	+ (Dim)	APC-Alexa Fluor <sup>®</sup> 750 <sup>a</sup>	J.33

Abbreviation: APC, allophycocyanin; FITC, fluorescein isothiocyanate; fluor, fluorescent; PC7, R Phycoerythrin-Cyanine; PerCP-Cy5.5, peridinin-chlorophyll protein – Cyanin5.5; PE, phycoerythrin; RB545, BD Horizon RealBlue™ 545.

Alexa Fluor<sup>®</sup> is a registered trademark of Life Technologies Corporation.

BD Horizon RealBlue™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

### Core populations:

Core populations are neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils. Antigens for identification are leukocytes (CD45 positive), neutrophils (CD16 positive), lymphocytes (T cells: CD3 positive; NK cells: CD3 negative, CD16 and/or CD56 positive; B cells: CD19 positive), monocytes (CD14 and CD33 positive), eosinophils (CD294 positive), basophils (CD123 positive, HLA-DR negative). In this method, events within the CD45-positive leukocyte gate that are not identified as leukocytes are primarily dead cells and debris.

**Note:** In recent years, subclassification of monocytes into three groups has been proposed, dividing them into classical, non-classical, and intermediate monocytes. Each monocyte is characterized by expression as classical monocytes (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>), intermediate monocytes (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>+</sup>), and nonclassical monocytes (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup>). The “+” denotes an expression level that is ~10-fold above the isotype control and “++” is ~100-fold above the isotype control. In medical laboratory practice, utilizing CD14 to identify monocytes might be sufficient, but identification of different subtypes of monocytes can be important for a reference method. An example of an immunophenotype panel for five-part leukocyte identification is shown in Table 1.

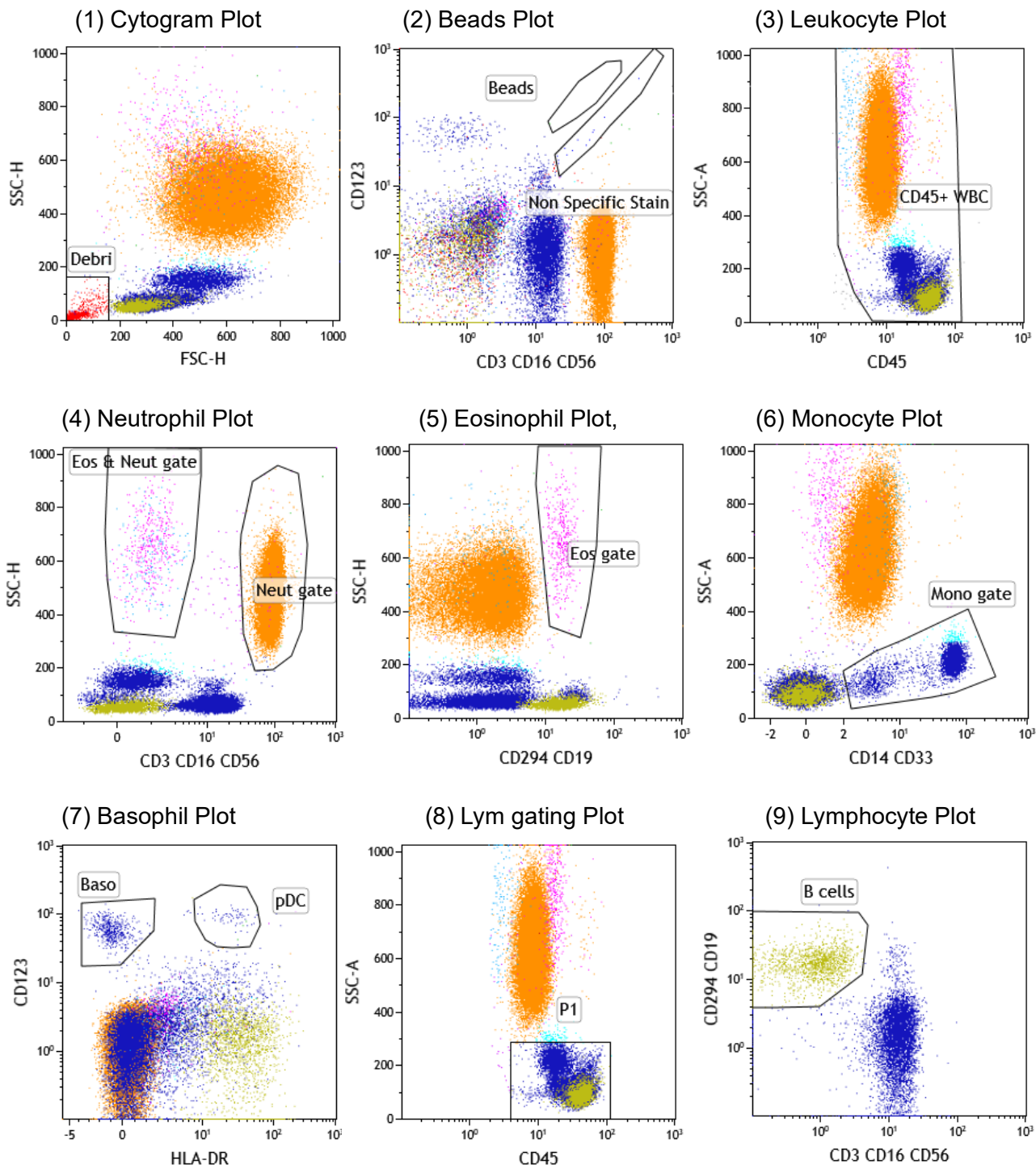


Figure 1. Example 2-dimensional plot of five normal leukocyte classifications by JSLH-Diff™

## Calculation of percentages, absolute counts, and identification ratio.

### 1) Percentage

The number of CD45-positive events in (3)-Leukocyte-Plot is used to calculate the percentage of each leukocyte: neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, T/NK lymphocyte, B lymphocyte and plasmacytoid dendritic cells (pDC). Their percentages are calculated in the following formula.

Percentage of each leukocyte (%)

$$= \text{Number of each leukocyte events} / \text{Number of CD45-positive leukocyte events} \times 100$$

### 2) Absolute counts

Leukocyte absolute count (WBC) obtained from a calibrated and verified automated hematology analyzer or calculation using BD Trucount™ Tubes may be used. The number of Beads-events in (2)-Beads-Plot is used to calculate. The WBCs are calculated in the following formula.

$$\text{WBC} = (\text{CD45-positive events} / \text{the number of bead events}) \times (N^*/V),$$

where N = number of beads per test\* and V = test-volume 50μL

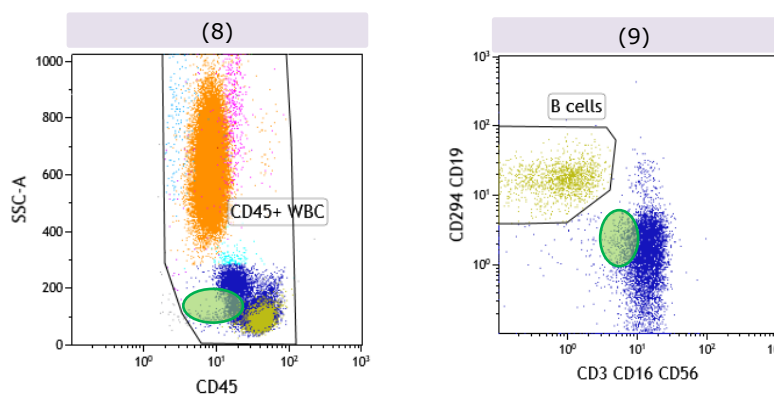
Note\*: This value is found on the BD Trucount™ Tubes foil pouch label and might vary from lot to lot.

### 3) Identification ratio (normal five-part leukocyte identification of CD45-positive cells)

The identification ratio is defined as the sum of each leukocyte (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils) divided by the number of CD45-positive events. The identification ratio should be confirmed 99% or more.

Note 1: No need to add pDCs to the identification ratio due to the cells are identified as lymphocytes in this method.

Note 2: Hematopoietic stem cells (CD34-positive cells) are identified as lymphocytes in the green circle areas on (8)-Lym-gating-Plot and in the T/NK gate on (9)-Lymphocyte-Plot.



Note 3: Events that are not identified as leukocytes are primarily dead cells and debris. In case of the identification ratio less than 99%, poor gating, reagents problem, specimen problem, or the like are possible.

## Considerations

### Minimum detection sensitivity and significant digits:

The lowest percentage value for 200 cell counts using the traditional method is 0.5%. On the other hand, the lowest percent value for 50,000-cell counts using the flow cytometric method is less than 0.005%. The number of cells counted by the flow cytometric method is over two orders of magnitude higher than the traditional method.

### Slight affects cells on leukocyte differential:

The five traditionally classified normal types of leukocytes present in the peripheral blood of healthy adults, other cells such as dendritic cells (pDCs and mDCs) and CD34-positive cells are also present in trace amounts. The proportion of each of these other cells in peripheral blood is very few; nevertheless, they could have a slight affect on leukocyte differential:

- Rate of occurrence of dendritic cells in the peripheral blood of healthy adults: 0.16 to 0.68%.<sup>5</sup>
- Rate of occurrence of pDCs in the peripheral blood of healthy adults: 0.2 to 0.4%.<sup>6,7</sup>
- Rate of occurrence of CD34-positive cells in peripheral blood of healthy adults: 0.0 to 0.2%.<sup>8-12</sup>

An awareness of how the gating strategy categorizes dendritic cells and CD34-positive cells is necessary to rule out potential error factors.

### Identification ratio:

It is recommended that the sum of all normal leukocyte five-part differential percentages is at least 99.0% of the CD45-positive events. If the identification ratio is low, large numbers of dead cells or debris, gating errors, reagent defects, suboptimal specimens, etc., could generate spurious results.

### Error on blood film using a manual wedge technique:

The accurate performance of hematology analyzers is evaluated using the manual leukocyte differential on blood films prepared using a manual wedge film technique as the traditional reference method. However, this method suffers from several disadvantages, including statistical error, slide distribution error, and morphological interpretation error.<sup>13</sup> The wedge smearing process can cause a non-uniform cell distribution on the blood film, especially for large, nucleated cells.

## **Comparing flow cytometric methods with the traditional visual identification method:**

Some bias can be detected when comparing the leukocyte differential results (between the flow cytometric method [FCM] and the manual morphologic counting method [eg, FCM monocytes can be higher than the manual count]).<sup>2</sup> Therefore, these errors should be minimized when evaluating the accuracy of performance.

Note1: The wedge smearing process can cause a non-uniform cell distribution on the blood film,<sup>13</sup> especially for large nucleated cells. The visual classification method's monocyte ratio is 10-20% lower than the flow cytometry because the wedge method tends to distribute large cells at the end of the specimen's draw.<sup>1,2</sup> Distribution error is unlikely to occur with leukocyte classification by an immunophenotyping reference method or flow cytometry-based hematology analyzers.<sup>14</sup>

Note 2: In the visual classification method, smudge cells may be counted without being included in the percentages. This should be considered when comparing the results.<sup>14</sup>

### **Estimates Absolute Values:**

The accuracy of using absolute count beads depends largely on the examiner skill in the pre-examination procedure. It has been reported that the use of commercially available beads, tubes, or suspensions for determining absolute counts has the following limitations related to sample preparation error: Mixing errors for both the original sample and the bead suspension, and high sensitivity to proper pipetting technique in terms of reverse pipetting. The use of the beads that tube type not to need dilution procedure avoids dependence on examiner skill.

Note 1: Care must be taken when using the BD TruCount™ Tube on the other manufacturer's flow cytometers as it would be likely to clog. The clogging cause can be found by checking the time-histogram of measured cell events.

Note 2: Although it is possible to estimate absolute values for leukocytes with flow cytometry by using the enumeration of beads for determining absolute counts, it is not an internationally standardized measuring procedure. Currently, using the enumeration of beads for determining absolute counts is unacceptable for standardizing a hematology analyzer's absolute leukocyte differential counts.

Note 3: The JSLH has provided the SOP concerning the reference measurement procedure (RMP) for the enumeration of erythrocytes and leukocytes.<sup>15</sup> The manufacturer should be applied the RMP as an international harmonization procedure at the top of the calibration hierarchy of the ISO17511:2020 model 5.

## 1. Preparation of reagent

### 1.1 JSLH Antibody (6-color panel)

Use JSLH 5Diff panel antibody reagents (Table 2).

### 1.2 Hemolysis Fixing Solution (stored at room temperature, prepared on demand)

Prepare a lysing solution. For each 1 mL of BD FACS Lysing Solution (BD catalog no. 349202) or VersaLyse diluted 10 with distilled water, add 25  $\mu$ L of fixative Solution to 1 mL of lysing agent (Table 3).

### 1.3 BD Trucount™ tubes (BD Biosciences, Cat. 340334)

When opened during sample preparation, remove the tubes immediately and carefully close the seal. Sample preparation should be performed within 1 h. Trucount™ tubes should be used within 1 month after opening. Check the bead pellets in the tube for damage or size reduction.

**Table 2. JSLH 5Diff Panel Antibody Reagent (Updated 2023)**

Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue Number	( $\mu$ L/test)	Remarks
CD16	FITC	3G8	Beckman coulter	877449	5.00	
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences	349201	2.50	
CD56	RB545	MY31	BD Biosciences	756268	2.50	
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences	340437	5.00	30x dilution *
CD14	PC7	RM052	Beckman coulter	A22331	0.50	
CD33	PC7	D3HL60.251	Beckman coulter	A54824	0.50	
CD294	Alexa Fluor 647	BM16	BD Biosciences	558042	2.50	2x dilution *
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	L243	BD Biosciences	339194	5.00	
CD123	PE	9F5	BD Biosciences	340545	5.00	
CD45	APC-Alexa Fluor 750	J.33	Beckman coulter	A71119	1.25	
D-PBS(-)			WAKO	045-29795	20.25	
All					50.00	

Note 1\*: Dilution rate may vary depending on lot.

Note 2: Confirm the performance of the antibody reagents to be used before the assay in accordance with the model-specific data.

**Table 3. Hemolysis Fixation Solution (Updated 2019)**

Function	Product Name	Source	Catalogue Number	( $\mu$ L/test)
Hemolysis agent	VersaLyse	Beckman coulter	A09777	1000.00
Fication	IOTest3 Fixative Solution	Beckman coulter	A07800	25.00



## 2. Preparation of the assay samples

- 1) A blood sample containing EDTA-2K is used. Sample preparation should be started within 4 h after collection.
- 2) For warming to room temperature, the JSLH antibody is let stand at room temperature for at least 15 minutes.
- 3) Visually check that the small reagent (bead pellet) under the stainless-steel retainer in the Trucount tube is spherical. The complete sample preparation within 1 h after removal from the bag.
- 4) A tip is installed on a micropipette and the inner wall of a tip is wetted by JSLH antibody 3 times. Then, 20  $\mu\text{L}$  of the antibody solution is collected and is added to the Trucount tube by the Forward method. To avoid contact of the antibody with the beads at the bottom of Trucount tube, it is dispensed through the wall from the upper part of the stainless-steel retainer by the Forward method. and visually check if the beads pellet has dissolved.
- 5) A tip is installed on a micropipette and 50  $\mu\text{L}$  of whole blood is collected by the Reverse method. Then, a tip is then cleaned with a Kim wipe and is placed into the Trucount tube containing JSLH antibody. Please ensure that the micropipette tip does not come into contact with the antibody solution in the tube.
- 6) The sample is mixed 3 times for 1 second each by using a Vortex mixer.
- 7) It is let stand for 15 minutes at room temperature (18-22°C) with protection from light.
- 8) A tip is installed on a micropipette and the inner wall of the tip is wetted with hemolysis fixation solution 3 times. Then, 450  $\mu\text{L}$  of this solution is collected and is added to the staining sample by the Forward method.
- 9) The sample is mixed 3 times for 1 second each by using a Vortex mixer.
- 10) It is let stand for 30 minutes at room temperature (18-22°C) with protection from light.

Note 1: When using an autologous antibody cocktail, be careful about the amount of the cocktail antibody to be added.

Note 2: When using VersaLyse hemolysate, it is recommended to use 100 $\mu\text{L}$ -blood and 1 mL of hemolytic agent.

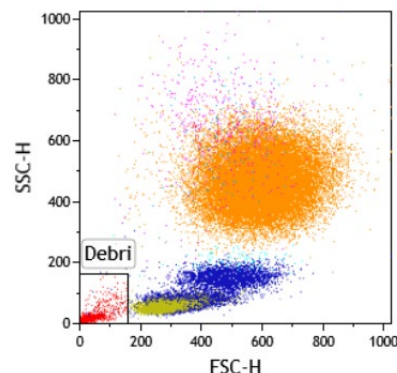
## 3. measurement

Perform measurements according to the model-specific documentation.

## 4. Analysis (Gating strategy)

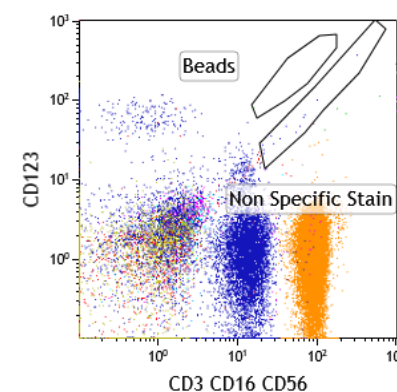
### (1) Cytogram Plot: FSC-H versus SSC-A (Gate: all events)

- a) Set a gate for the debris population (Debri, red dots).
- b) Set a gate for the exclusion of a debris population to use in leukocyte identification. The discrimination of the debris gate in FSC-H may be set at approximately the same intensity as the upper limit of the 4  $\mu\text{m}$  bead population of the Trucount Beads.



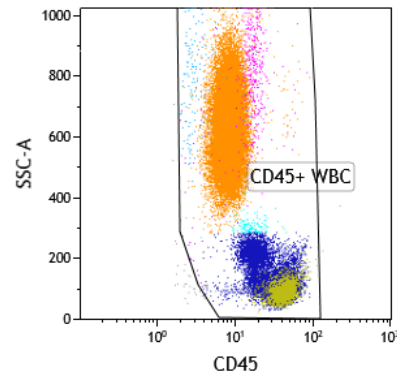
### (2) Beads Plot: CD3/16/56-FITC versus CD123-PE (Gate : all events)

- a) Set absolute count bead gate (Beads).
- b) Set a gate for a non-specific reaction population (NonSpec, brown dots).
- c) Set a gate for the exclusion of debris/beads/non-specific population to use in leukocyte identification (Not Beads AND Not Debri AND Not NonSpec).



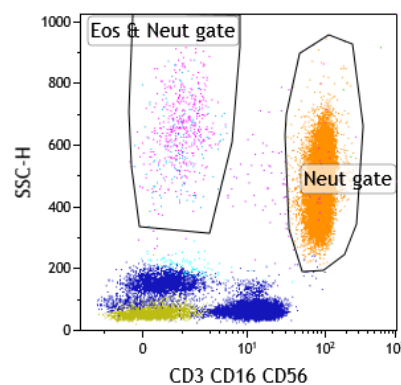
### (3) Leukocyte Plot: CD45-APC\_H7 versus SSC-A (Gate : Not Beads AND Not Debri AND Not NonSpec)

Set a gate for the leukocyte population (CD45+WBC) based on an FCS/SSC/CD45 gating strategy. In plot (4)~(8) hereafter, set up a two-dimensional plot at the leukocyte population (CD45+WBC).



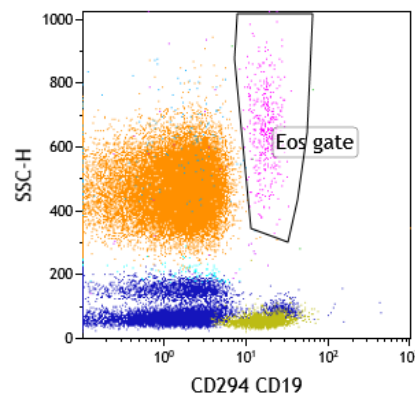
### (4) Neutrophil Plot: CD3/CD16/CD56-FITC versus SSC-H (Gate : CD45+WBC)

- a) Set a gate for the neutrophil population with expression of CD16 and high SSC-H (Neut gate).
- b) Set a gate for the eosinophil detection population with negative~dim expression of CD16 and high SSC-H (Eos & Neut gate). The upper limit of the "Eos & Neut" gate on SSC-H is gated to extend beyond the upper plot limit due to eosinophil populations also present beyond the upper limit of the SSC axis.



(5) Eosinophil Plot: CD19/CD294 versus APC-SSC-H (Gate : CD45+WBC)

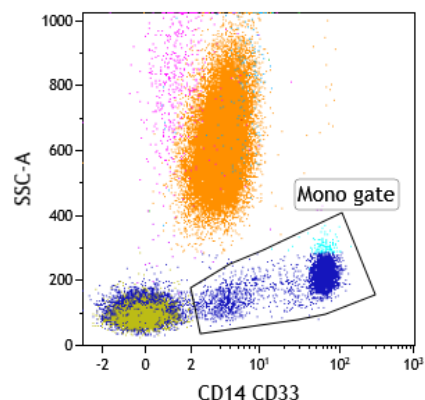
- a) Set a gate for eosinophil population with high expression of CD294 and very high SSC-H (Eos gate). The upper limit of the “Eos & Neut” gate on SSC-H is gated to extend beyond the upper plot limit due to eosinophil populations also present beyond the upper limit of the SSC axis.
- b) Set a gate for the eosinophil population (EOS) using the following formula: [Eos & Neut gate] AND [Eos gate].
- c) Set a gate for the exclusion of the eosinophil population in Neut gate (not EOS).
- d) Set a gate for the neutrophil population using the following formula: Neut AND not EOS).
- e) Set a gate for the exclusion of the neutrophil population in the monocyte population (not Neut).



(6) Monocyte Plot: CD14/CD33-PECy7 versus SSC-A (Gate : CD45+WBC)

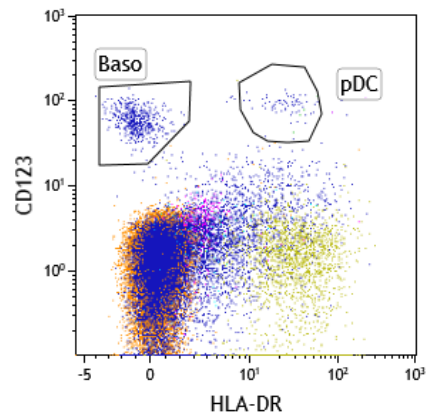
- a) Set a gate for the monocyte population with high expression of CD14/CD33 and low SSC-A (Mono gate). to the events of higher expression than lymphocyte population (Mono gate).
- b) Set a gate for the exclusion of the basophil population in the monocyte population (not Baso).

Note: Dendritic cells other than DC are identified as monocytes



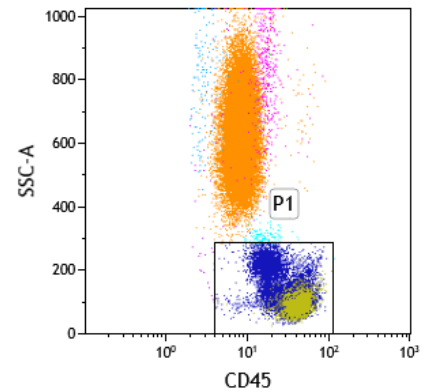
(7) Basophil Plot: HLA\_DR-PerCP\_Cy5.5 versus CD123-PE (Gate : CD45+WBC)

- a) Set a gate for the basophil population with negative expression of HLA\_DR-PerCP\_Cy5.5 and positive expression of CD123 (Baso). The lower limit of the BASO gate on HLA\_DR-PerCP\_Cy5.5 is gated to extend beyond the lower plot limit due to basophil population is also present beyond the lower limit of the HLA\_DR-PerCP\_Cy5.5 axis.
- b) Set a gate for exclusion of basophil populations in monocyte and lymphocyte populations (not Baso).
- c) Set a gate for plasmacytoid dendritic cell population with positive expression of HLA\_DR-PerCP\_Cy5.5 and CD123 (pDC).
- d) Set a gate for monocyte population using the following formula: Mono gate AND not Neut AND not Baso.
- e) Set a gate for exclusion of monocyte populations in lymphocyte populations (not Mono).



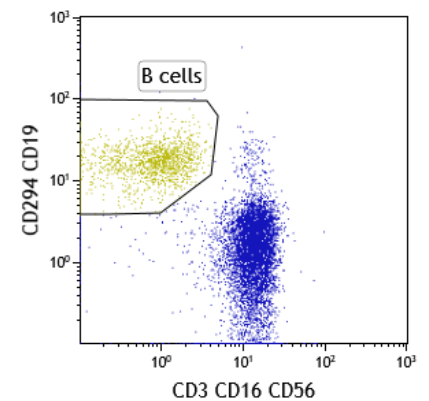
(8) Lym gating Plot: CD45-APC\_H7 versus SSC-A (Gate : CD45+WBC)

- a) Set a gate for the first lymphocyte population (P1) based on an FCS/SSC/CD45 gating strategy. The upper limit of the P1 gate is gated to extend at approximately half expression level of the monocyte population on SSC-A and approximately half expression level of the monocyte population on CD45-APC\_H7.
- b) Set a gate for the second lymphocyte population (Lympho gate) using the following formula: P1 AND not Mono AND not Baso.



(9) Lymphocyte Plot: CD3/CD16/CD56-FITC versus CD19/CD294-APC (Gate : Lympho gate)

- a) Set a gate for the B lymphocyte population (B cells) with positive expression of CD19 and negative CD3/CD16/CD56.
- b) Set a gate for the T/NK lymphocyte population (T/NK cells) using the following formula: Lympho gate AND not B cells.



Note: Confirm or fine-tune the gate settings for all plots for each sample due to the population of each sample on the two-dimensional plot changes slightly for each sample. The check points are as follows.

- a) Leukocyte Plot: The leukocyte gate (CD45+WBC) is set to "not Debris," but some events that can clearly be judged as debris should be removed from the CD45+WBC gate.
- b) Neutrophil Plot: When neutrophil and eosinophil populations overlap, set each gate so that all events are entered in the gates. It does not matter if the two gates overlap. The populations of neutrophil and eosinophil are discriminated against even if two gates overlap because "and" and "not" are set in (5)-b) and (5)-d).
- c) Lym gating Plot: Set the gate to be larger than the lymphocyte population so that all lymphocyte populations are entered in the gates. It does not matter if the gates overlap. The populations of monocyte and basophil on the lymphocyte population are discriminated against even if the gates overlap because "and" and "not" are set in (8)-b).

## References

1. Y KAWAI ,Y.NAGAI ,E.OGAWA, H. KONDO on behalf of the Standardization Subcommittee for Blood Cell Counting of the Japanese Society for Laboratory Hematology, Japanese Society for Laboratory Hematology flow cytometric reference method of determining the differential leukocyte count: external quality assurance using fresh blood sample, *International Journal of Laboratory Hematology* 39: 202–222, 2017
2. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, H20-A2 Vol.27 No.4. 2007
3. Roussel, M., Davis, B.H., Fest, T., Wood, B.L. and (2012), Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: Comparison of three flow cytometric candidate methods. *Cytometry*, 81A: 973-982. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22092>
4. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting: C BRIGGS, N CULP, B DAVIS, G.D'ONOFRIO, G ZINI, S.J MACHIN, on behalf of the International Council for Standardization in Hematology, *Int J Lab Hematol* 36: 613–627, 2014
5. Haller Hasskamp J, Zapas JL, Elias EG. Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults. *Am J Hematol* 2005;78:314–5.
6. Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S et al. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*. 151(1):61-70, 2008
7. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A et al. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*, 122(6): 932-42, 2013 Aug 8
8. Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow cytometry (JCCLS H3-A V2.0); Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards ; JCCLS, Area Committee on Hematology, Subcommittee on Flow Cytometry, *Journal of Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards* 32(1):51-74, 2017
9. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al.: Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*. 34: 61-70, 1998
10. CLSI. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline-2nd Edition. H42-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007
11. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*. *J Hematother*. 1996 Jun;5(3):213-26. doi: 10.1089/scd.1.1996.5.213. PMID: 8817388.
12. Haussmann K, Streitz M, Takvorian A, Grund J, Skenderi Z, Tietze-Bürger C, Movassaghi K, Künkele A, Blum A, Bullinger L. Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products. *Sci Rep*. 2022 Oct 26;12(1):17995. doi: 10.1038/s41598-022-22339-1. PMID: 36289245; PMCID: PMC9605971.
13. Vis JY, Huisman A. Verification and quality control of routine hematology analyzers. *Int J Lab Hematol*. 2016 May;38 Suppl 1:100-9. doi: 10.1111/ijlh.12503. Epub 2016 May 9. PMID: 27161194. "
14. Yamade K, Yamaguchi T, Nagai Y, Kamisako T. Performance evaluation of leukocyte differential on the hematology analyzer Celltac G compared with two hematology analyzers, reference flow cytometry method, and two manual methods. *J Clin Lab Anal*. 2021 Aug;35(8):e23827. doi: 10.1002/jcla.23827. Epub 2021 Jun 12. PMID: 34117659; PMCID: PMC8373333.
15. Blood Cell Counting Standardization Subcommittee, The Japanese Society for Laboratory Hematology, Reference measurement procedure for the enumeration of erythrocytes and leukocytes (Revision 01-03 2022-05-19), <http://jslh.kenkyuukai.jp/images/sys/information/20220824172627-D6A0BCDFE6DE0FAE1F0C331A9789B2CA91C8C59684B27DA7A392BF96AF4DA69E.pdf>

# フローサイトメトリー法による 白血球 5 分類算定法 (JSLH-Diff 法) 手順書 (Standard Operation Procedure, SOP)

## 整合規格

CLSI 評価法 : *Validation, Verification, and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, H26-A2 Vol.30 No.14, 2010.*

ICSH 評価法 : *ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analyzers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting, INTERNATIONAL COUNCIL FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY, WRITING GROUP: C BRIGGS, N CULP, B DAVIS, G.D'ONOFRIO, G ZINI, S.J MACHIN, on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), International Journal of Laboratory Hematology 36: 613–627, 2014*

JSLH 白血球分類参照法 : *Japanese Society for Laboratory Hematology flow cytometric reference method of determining the differential leukocyte count: external quality assurance using fresh blood sample, Y KAWAI, Y.NAGAI, E.OGAWA, H. KONDO on behalf of the Standardization Subcommittee for Blood Cell Counting of the Japanese Society for Laboratory Hematology (JSLH), International Journal of Laboratory Hematology 39: 202–222, 2017*

## 関連文献

CLSI 白血球分類参照法 : *Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, H20-A2 Vol.27 No.4. 2007*

ICSH 白血球分類参照法 : *Toward a Reference Method for Leukocyte Differential Counts in Blood: Comparison of Three Flow Cytometric Candidate Methods, Mikael Roussel,1\* Bruce H. Davis,2 Thierry Fest,1,3,4 Brent L. Wood,5\* on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), Cytometry Part A 81A: 973-982, 2012*

## 改訂記録

版数	作成日	作成者	変更内容	変更理由等
第 1.0 版	2017/10/17	近藤 弘	新規作成	
第 1.1 版	2018/1/16	近藤 弘	SOP 検証結果による追記修正	委員会の決定事項による不足事項の追記修正 開催日 : 2017/12/05
第 1.2 版	2018/ 6/20	近藤 弘	SOP 検証結果による追記修正	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.3 版	2018/ 9/26	近藤 弘	プロット 4/5 のゲーティング方法の追記	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.4 版	2019/ 7/22	鶴田 一人	パネルの改善	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.41 版	2019/10/16	鶴田 一人	誤記訂正 : 図 8 の染色時間 追記 : 2019 年サーベイの抗体パネル	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.42 版	2022/9/22	鶴田 一人	追記 : mDC の影響、絶対数ビーズ未 使用の条件、サーベイ実施記録	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.42e 版	2023/4/7	鶴田 一人	英語版の追加、それに伴う和文構成変 更および一部追記訂正	国際的な情報発信

概要：2～7ページを参照

## 1. 試薬の準備＜共通＞

### 1.1 JSLH 抗体（6color パネル）

JSLH 5Diff パネル抗体試薬（以下の内容）を使用する。

※使用する抗体試薬の性能確認については、機種別資料に従って測定前に行う。

※JSLH 抗体（BD Biosciences カクテルカスタム抗体品 最低 200 テストより受注）

Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue Number	( $\mu$ L/test)	Remarks
CD16	FITC	NKP15	BD Biosciences	347523	5.00	
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences	349201	2.50	
CD56	FITC	NCAM16.2	BD Biosciences	340410	5.00	
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences	340437	5.00	原液 30 倍希釈※
CD14	PE-Cy7	M5E2	BD Biosciences	557742	5.00	原液 40 倍希釈※
	PC7	RM052	Beckman coulter	A22331	0.50	
CD33	PE-Cy7	P67.6	BD Biosciences	333946	2.50	原液 15 倍希釈※
	PC7	D3HL60.251	Beckman coulter	A54824	0.50	
CD294	Alexa Fluor 647	BM16	BD Biosciences	558042	2.50	原液 3 倍希釈※
HLA-DR	PerCP	L243	BD Biosciences	347364	10.00	
CD123	PE	9F5	BD Biosciences	340545	5.00	
CD45	APC-H7	2D1	BD Biosciences	641399	1.25	
	APC-Alexa Fluor 750	J.33	Beckman coulter	A71119	1.25	

※ロットにより希釈率が変動する可能性あり。

### 1.2 溶血固定液（室温保存、用時調製）

蒸留水で 10 希釈した BD FACS™ Lysing Solution（BD 社 カタログ番号：349202）または、VersaLyse（BC 社 カタログ番号 A09777）溶血液 1mL に対し、25 $\mu$ L の IOtest 3 Fixative Solution（カタログ番号：A07800）固定液を加えた混和液を用いる。

### 1.3 BD Trucount™ tubes（BD バイオサイエンス社,Cat.340334）

サンプル調製時に開封したら、速やかにチューブを取り出し、封を注意深く閉じる。

1 時間以内にサンプル調製を行う。

※Trucount™ tubes は開封後 1 か月以内のものを使用すること。チューブ内のビーズペレットに破損やサイズの縮小がないか確認すること。

※測定時、使用機種により Trucount™ tubes を用いての測定に注意が必要であるため、機種別測定法を参照のこと。

## 2. 測定試料の調製＜共通＞

### 2.1 使用する器具

- ・マイクロピペット A (エッペンドルフ) 10-100 $\mu$ L
- ・マイクロピペット B (エッペンドルフ) 100-1,000 $\mu$ L
- ・マイクロピペット用チップ (200 $\mu$ L 用、1mL 用)
- ・試験管立て
- ・キムワイブ
- ・ボルテックスミキサ
- ・タイマ
- ・汎用フローサイトメータ (FCM)

### 2.2 操作 (BD Biosciences カクテルカスタム抗体、BD FACS™ Lysing Solution の使用例)

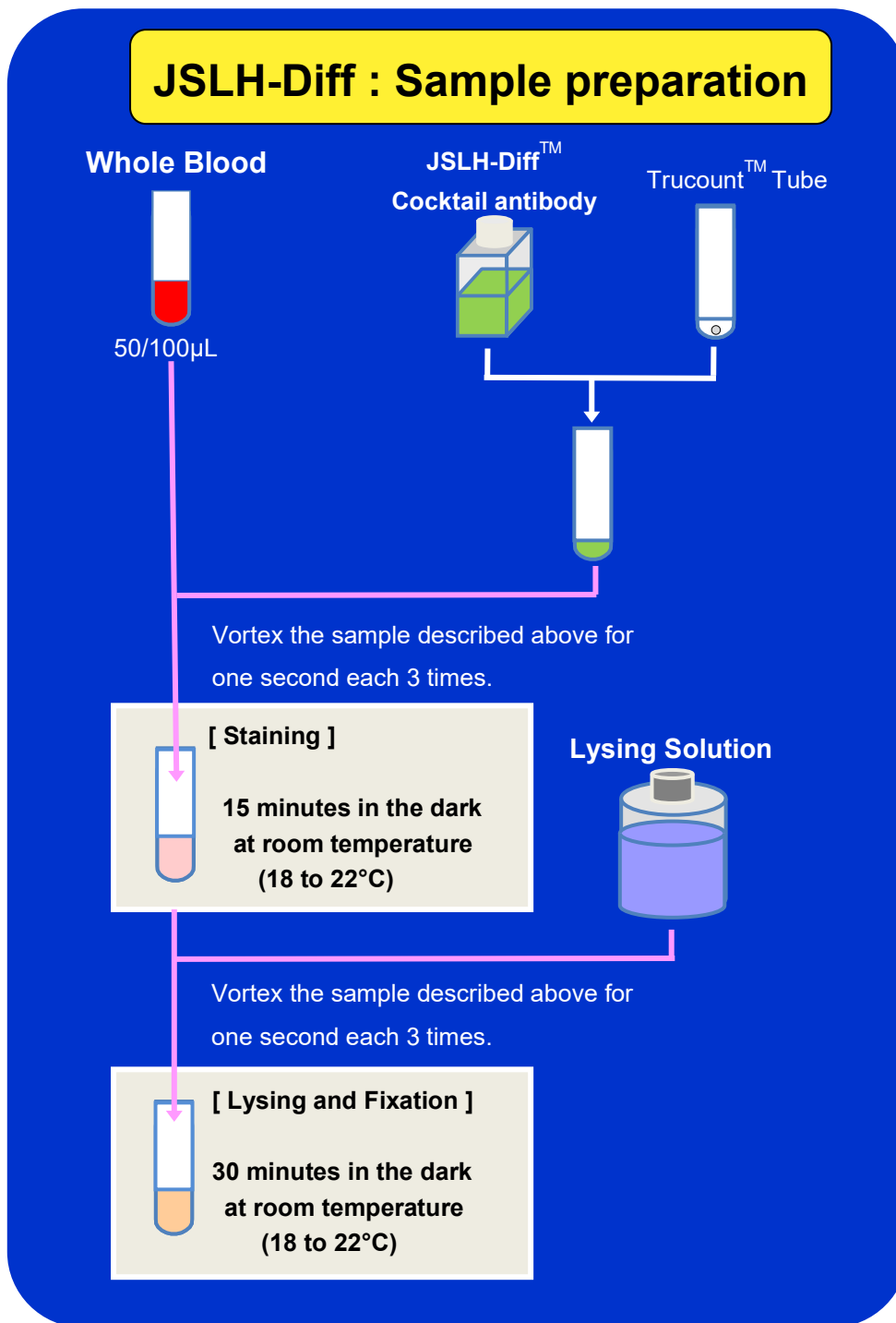
※自家調製抗体カクテルを使用の場合は、カクテル抗体の添加量に注意すること。

※VersaLyse 溶血液を使用の場合は、血液 100 $\mu$ L、溶血剤 1mL 使用を推奨する。

- 1) EDTA-2K 加血液を使用し、採血後、4 時間以内に試料調製を開始する。
- 2) 使用する JSLH 抗体を室温に 15 分以上放置し、室温に戻す。
- 3) Trucount チューブ内のステンレススチールリテーナ下にある小さな試薬 (ビーズペレット) が球状になっていることを目視により確認する。袋から取り出してから 1 時間以内に試料調製を終える。
- 4) マイクロピペット A にチップを装着し、チップ内壁を JSLH 抗体で 3 回馴染ませた後、20 $\mu$ L 採取し、フォワード法で Trucount チューブに入れる。この時、Trucount チューブの底にあるビーズに抗体が触れないように、ステンレススチールリテーナ上部の管壁からフォワード法で入れ<sup>\*2)</sup>、ビーズペレットが溶けていることを目視により確認する。
- 5) マイクロピペット A にチップを装着し、リバース法<sup>\*3)</sup>で全血液を 50 $\mu$ L 採取し、チップの表面をキムワイブで綺麗に拭き取り、JSLH 抗体の入った Trucount チューブに入れる。チップの先がチューブに入っている抗体に触れないように注意する。
- 6) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 7) 室温 (18-22℃)、暗所にて 15 分間静置する。
- 8) マイクロピペット B チップを装着し、チップ内壁を溶血固定液で 3 回馴染ませた後、450 $\mu$ L 採取し、フォワード法で染色試料に加える。
- 9) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 10) 室温 (18-22℃)、暗所にて 30 分間静置する。



## [試料調製の手順]

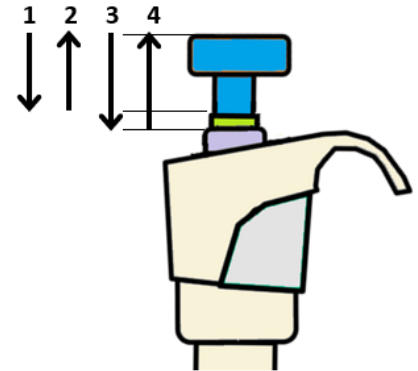


## <補足説明>

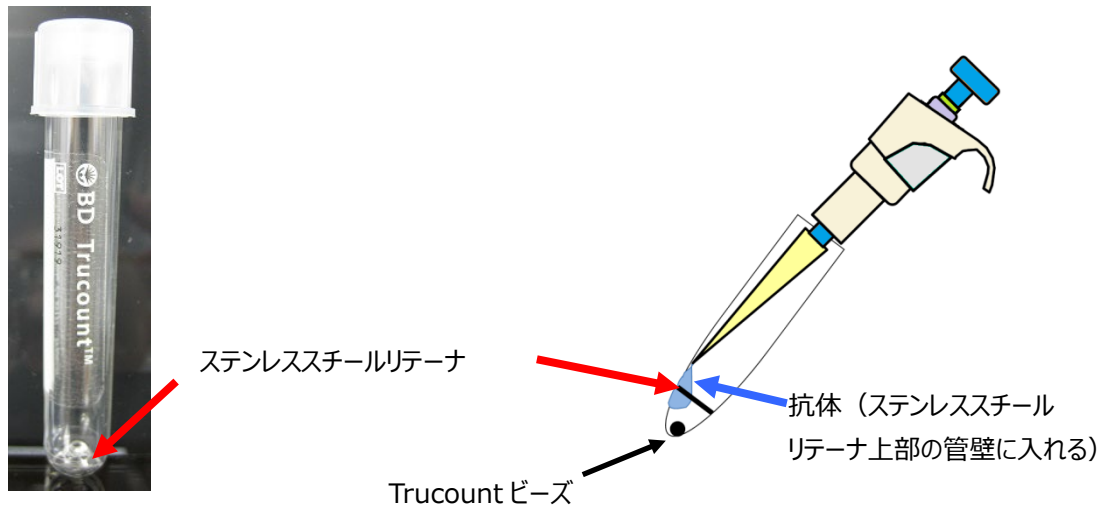
### \*1) フォワード法

試薬の分注に使用します。

1. プッシュボタンを 1 段目まで押し下げます。
2. チップを分注液の液面から約 1cm 下まで浸し、プッシュボタンをゆっくり離します。チップを溶液から引き上げ、容器の縁に先端を軽く触れて外側についた余分な溶液を除きます。
3. プッシュボタンを 1 段目まで静かに押し上げ、溶液を分注します。約 1 秒後にプッシュボタンをさらに 2 段目まで押し下げ、チップの中を空にします。



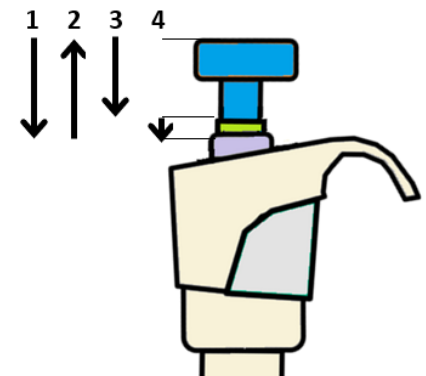
### \*2) Trucount チューブへの分注での注意点



### \*3) リバーズ法

血液の分注 (Trucount チューブ) に使用します。粘性の高い液体や泡立ちやすい液体、微量の分注に適しています。

1. プッシュボタンを 2 段目まで押し下げます。
2. チップを分注液の液面から約 1cm 下まで浸し、プッシュボタンをゆっくりと離します、チップが溶液で満たされます。チップを溶液から引き上げ、容器の縁に先端を軽く触れて外側についた余分な溶液を除きます。
3. プッシュボタンを 1 段目まで静かに押し下げ、設定した容量の溶液を分注します。プッシュボタンは、必ず 1 段目までで止めてください。チップの中に少量の溶液が残りますが、これは分注しません。
4. チップ内の残った溶液を、廃棄するか元の容器に戻します。



## 2. 測定

機種別の資料に従って測定を行う。

## 3. 解析

### 【解析プロットおよび設定ゲート】

- ① **【1】サイトグラムプロット** : FSC\_H-SSC\_A (Gate : All Events)  
デブリゲート (Debri) を設定する。デブリゲートの FSC は、4 $\mu$ m ビーズ分布 (Trucount Beads 相当) の上限を目安とする。さらに、白血球分類に使用するための『not』デブリゲートを設定する。
- ② **【2】ビーズプロット** : CD3/16/56 FITC-CD123 PE (Gate : All Events)  
ビーズゲート (Beads) を設定し、ビーズイベントとする。  
非特異反応ゲート (NonSpec) を設定する。  
さらに白血球分類に使用するための『not』ビーズ/非特異反応を設定し、①の『not』デブリゲート (Debri) との『and』ゲート (Not Beads AND Not Debri AND Not NonSpec) を次の白血球プロットに設定する。
- ③ **【3】白血球プロット** : CD45 APC H7-SSC\_A (Gate : Not Beads AND Not Debri)  
白血球ゲート (CD45+ WBC) を設定する。  
以降、白血球ゲート (CD45+ WBC) にて二次元プロットを設定する【4】～【8】。
- ④ **【4】好中球プロット** : CD3/CD16/CD56 FITC-SSC-H (Gate : CD45+ WBC)  
CD16 陽性/SSC high の集団に好中球ゲート (Neut)、CD16dim/SSC high の集団に好酸球検出用ゲート (Eos & Neut gate) を設定する。SSC 軸を “SSC-H”にして設定する。Eos & Neut gate の上限は、プロット上限を越えてはみ出るようにゲートをかける。
- ⑤ **【5】好酸球プロット** : CD19/CD294 APC-SSC-H (Gate : CD45+ WBC)  
CD294 陽性/SSC Very high の集団に好酸球ゲート (Eos gate) を設定する。  
④と同様、SSC 軸を “SSC-H”にして設定し、Eos gate の上限は、プロット上限を越えてはみ出るようにゲートをかける。
- ⑥ **【4】**の Eos & Neut gate と**【5】**の Eos gate の『and』ゲートを、好酸球イベントとする。さらに、好中球イベント設定に使用するための『not』好酸球ゲートを設定する。
- ⑦ **【4】**好中球ゲート (Neut) と『not』好酸球イベント (⑥) の『and』で、好中球イベントとする。さらに、単球イベント設定に使用するための『not』好中球ゲートを設定する。
- ⑧ **【6】単球プロット** : CD14/CD33 PE Cy7-SSC\_A (Gate : CD45+ WBC)  
CD14 陽性 CD33 陽性/SSC low の集団に単球ゲート (Mono gate) を設定する。弱陽性集団があった場合は、陰性である好中球集団よりも強度が高いイベントもゲートする。
- ⑨ **【7】好塩基球プロット** : HLA\_DR PerCP Cy5.5-CD123 PE (Gate : CD45+ WBC)  
HLA-DR 陰性/CD123 陽性の集団に好塩基球ゲート (Baso) を設定し、好塩基球イベントとする。好塩基球ゲートラインの下限 (X 軸) は、プロット下限を越えてはみ出るようにゲートをかける。単球イベント設定、リンパ球ゲート設定に使用するため、『not』好塩基球ゲートを設定する。

⑩ **【6】**の Mono gate と『not』好中球ゲート (⑦) および『not』好塩基球ゲート (⑨) の『and』で、単球イベントとする。リンパ球ゲート設定に使用するため、『not』単球ゲートを設定する。

⑪ **【8】リンパ球ゲートプロット** : CD45 APC H7-SSC\_A (Gate : CD45+ WBC)

リンパ球ゲート (P1) を設定する。SSC は単球の半分ぐらいまで拡張し、CD45 APC H7 は好塩基球 1/3 ぐらいまで拡張してゲート設定をする。P1 と『not』単球ゲート、『not』好塩基球ゲート、の『and』で、Lymphoゲートを設定する。

⑫ **【9】リンパ球プロット** : CD3/CD16/CD56 FITC-CD19/CD294 APC (Gate : Lympho gate)

CD19 陽性で CD3/CD16/CD56 陰性の集団に B リンパ球ゲート (B cells) を設定し、B リンパ球イベントとする。

『not』B リンパ球ゲート (B cells) を設定し、T/NK リンパ球イベントとする。

※ゲーティング終了後の各分画の識別確認と検体ごとにゲート設定の微調整を行うときの注意

検体ごとに二次元プロット上の各血球の分布状況が多少変化するので、検体ごとに全プロットのゲート設定の微調整を行う。微調整の詳細は以下のとおり。

### 【3】白血球プロット

白血球ゲートは、not Debris になっているが、明らかにデブリスと判断できるイベントは CD45+WBC ゲートから外す。

### 【4】好中球プロット

好中球イベントおよび好酸球イベントが重なる時は、【4】を参考にして 2 つのゲートが重なっても構わないので、取りこぼしがないようにゲートを設定する。⑥、⑦で「and」および「not」の設定をしているため、2 つのゲートが重なってもそれぞれのイベント数は重複せずに表示される。

### 【8】リンパ球ゲートプロット

リンパ球集団より大きめに取るようにして、単球集団および好塩基球集団にいるリンパ球などの取りこぼしがないようにゲートを設定する。⑪で「and」および「not」の設定をしているため、単球および好塩基球に該当するイベントは重複せずにイベント数に表示される。

## 4. 新鮮血液を用いた国際常用標準測定操作法の外部精度管理調査

## 4.1 実施方法 (2020 年 11 月 7 日)

## 4.1.1

・JSLH 5Diff パネル抗体試薬：下表のように調製する。

Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue Number	( $\mu\text{L}/\text{test}$ )	Remarks
CD16	FITC	NKP15	BD Biosciences	347523	5.00	
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences	349201	2.50	
CD56	FITC	NCAM16.2	BD Biosciences	340410	5.00	
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences	340437	5.00	30x dilution *
CD14	PC7	RM052	Beckman coulter	A22331	0.50	
CD33	PC7	D3HL60.251	Beckman coulter	A54824	0.50	
CD294	Alexa Fluor 647	BM16	BD Biosciences	558042	2.50	2x dilution *
HLA-DR	PerCP	L243	BD Biosciences	347364	10.00	
CD123	PE	9F5	BD Biosciences	340545	5.00	
CD45	APC-Alexa Fluor 750	J.33	Beckman coulter	A71119	1.25	
D-PBS(-)			WAKO	045-29795	12.75	
All					50.00	

※ロットにより希釈率が変動する可能性あり。

## ・溶血固定液

VersaLyse (BC 社 カタログ番号 A09777) 溶血液 1mL に対し、25 $\mu\text{L}$  の IOTest 3 Fixative Solution (カタログ番号：A07800) 固定液を加えて混和液を溶血固定液とする。

## 4.1.2 操作

- 1) EDTA-2K 加血液を使用し、採血後、4 時間以内に試料調製を開始する。
- 2) 使用する JSLH 抗体を室温に 15 分以上放置し、室温に戻す。
- 3) Trucount チューブ内のステンレススチールリテーナ下にある小さな試薬 (ビーズペレット) が球状になっていることを目視により確認する。袋から取り出してから 1 時間以内に試料調製を終える。
- 4) マイクロピペット A にチップを装着し、チップ内壁を JSLH 抗体で 3 回馴染ませた後、50 $\mu\text{L}$  採取し、フォワード法で Trucount チューブに入れる。この時、Trucount チューブの底にあるビーズに抗体が触れないように、ステンレススチールリテーナ上部の管壁からフォワード法で入れ<sup>\*2)</sup>、ビーズペレットが溶けていることを目視により確認する。
- 5) マイクロピペット A にチップを装着し、リバーズ法<sup>\*3)</sup> で全血液を 100 $\mu\text{L}$  採取し、チップの表面をキムワイプで綺麗に拭き取り、JSLH 抗体の入った Trucount チューブに入れる。チップの先がチューブに入っている抗体に触れないように注意する。
- 6) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 7) 室温 (18-22 $^{\circ}\text{C}$ )、暗所にて 15 分間静置する。
- 8) マイクロピペット B チップを装着し、チップ内壁を溶血固定液で 3 回馴染ませた後、1000 $\mu\text{L}$  採取し、フォワード法で染色試料に加える。
- 9) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 10) 室温 (18-22 $^{\circ}\text{C}$ )、暗所にて 30 分間静置する。

## 4.2 実施方法 (2021年10月5日、2022年9月13日)

## 4.1

・JSLH 5Diff パネル抗体試薬：下表のように調製する。

Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue Number	( $\mu\text{L}/\text{test}$ )	Remarks
CD16	FITC	NKP15	BD Biosciences	347523	5.00	
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences	349201	2.50	
CD56	FITC	NCAM16.2	BD Biosciences	340410	5.00	
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences	340437	5.00	30x dilution *
CD14	PC7	RM052	Beckman coulter	A22331	0.50	
CD33	PC7	D3HL60.251	Beckman coulter	A54824	0.50	
CD294	Alexa Fluor 647	BM16	BD Biosciences	558042	2.50	2x dilution *
HLA-DR	PerCP	L243	BD Biosciences	347364	10.00	
CD123	PE	9F5	BD Biosciences	340545	5.00	
CD45	APC-Alexa Fluor 750	J.33	Beckman coulter	A71119	1.25	
D-PBS(-)			WAKO	045-29795	12.75	
All					50.00	

※ロットにより希釈率が変動する可能性あり。

## ・溶血固定液

VersaLyse (BC 社 カタログ番号 A09777) 溶血液 1mL に対し、25 $\mu\text{L}$  の IOTest 3 Fixative Solution (カタログ番号：A07800) 固定液を加えて混和液を溶血固定液とする。

## 5.2.2 操作

- 1) EDTA-2K 加血液を使用し、採血後、4 時間以内に試料調製を開始する。
- 2) 使用する JSLH 抗体を室温に 15 分以上放置し、室温に戻す。
- 3) マイクロピペット A にチップを装着し、チップ内壁を JSLH 抗体で 3 回馴染ませた後、50 $\mu\text{L}$  採取し、フォワード法<sup>\*2)</sup>で測定用チューブに入れる。
- 4) マイクロピペット A にチップを装着し、リバーズ法<sup>\*3)</sup>で全血液を 100 $\mu\text{L}$  採取し、チップの表面をキムワイプで綺麗に拭き取り、JSLH 抗体の入った 測定用チューブに入れる。チップの先がチューブに入っている抗体に触れないように注意する。
- 5) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 6) 室温 (18-22 $^{\circ}\text{C}$ )、暗所にて 15 分間静置する。
- 7) マイクロピペット B チップを装着し、チップ内壁を溶血固定液で 3 回馴染ませた後、1000 $\mu\text{L}$  採取し、フォワード法で染色試料に加える。
- 8) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 9) 室温 (18-22 $^{\circ}\text{C}$ )、暗所にて 30 分間静置する。