



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 分子体外诊断检测 静脉全血中循环肿瘤细胞（CTC）的前处理过程规范 第 1 部分： 分离 RNA

Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for circulating tumour cells (CTCs) in venous whole blood — Part 1:  
Isolated RNA

草案版次选择

（本草案完成时间：）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 前 言

本文件按照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》的规定起草。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

## 引 言

实体肿瘤会向血液和其他体液中释放细胞和生物分析物。这为利用这些体液（液体活检）进行肿瘤检测、诊断和特征分析提供了一种微创方法。液体活检能够更早地检测和诊断癌症，并推进个性化患者治疗。这些应用已成为整个诊断市场中增长最快的领域之一。静脉全血中的循环肿瘤细胞（CTCs）可以反映肿瘤进展过程中演变的疾病复杂性，具有独特的遗传、表观遗传和基因表达生物标志物。除了 CTC 识别和计数在癌症进展中的预后作用外，CTC 的分子特征分析可以改善疾病结果预测、治疗指导和患者治疗后监测。CTCs 现在被认为是癌症早期发展、进展和转移阶段的肿瘤组织替代物。

CTC 的分子特征分析可以为在系统治疗期间监测癌症基因型提供策略，识别疾病进展机制、识别生物治疗的新靶点和选择靶向治疗。此外，CTC 单细胞测序作为一种分析肿瘤基因组异质性的重要工具正在兴起。CTCs 非常脆弱，当收集在传统采血管中（例如含有 EDTA 的管）时，如果没有专用的 CTC 稳定剂，它们会在几小时内降解。CTCs 极为罕见，尤其是在疾病早期，例如每 10 毫升血液中少于 10 个细胞，代表大约  $1:10^7$  的 CTCs 与白细胞（WBCs）的比例。这种低比例对 CTC 富集所需的检验构成了重大挑战。CTC 的 RNA 特征类似于肿瘤的基因表达特征。对于 RNA 特征分析，需要采取措施去除 WBCs，以获得足够富集的 CTC 特异性 RNA。

CTC 的 RNA 和 DNA 以及 CTC 本身在血液采集后、CTC 富集和分离过程中可能会发生显著变化。因此，需要采取特别措施以获得足够质量的 CTC 样本和适当质量的分离 RNA 和 DNA，以确保规定的 RNA、DNA 和染色检验性能。2024 年，ISO 发布了 ISO/TS 7552 系列标准，本标委会拟等同翻译转化该标准，对国内 CTC 应用起到指导作用。

第 1 部分：分子体外诊断检测 静脉全血中循环肿瘤细胞（CTC）的前处理过程规范 第 1 部分：  
分离 RNA

第 2 部分：分子体外诊断检测 静脉全血中循环肿瘤细胞（CTC）的前处理过程规范 第 2 部分：  
分离 DNA

第 3 部分：分子体外诊断检测 静脉全血中循环肿瘤细胞（CTC）的前处理过程规范 第 3 部分：  
用于 CTC 染色的准备工作。

# 分子体外诊断检测 静脉全血中循环肿瘤细胞（CTC）的前处理过程 规范 第1部分：分离 RNA

## 1 范围

本文件规定了对静脉全血样本在分子检验前阶段进行处理、储存、CTC 富集和分离、RNA 分离和储存以及文档记录的要求，并提出了建议。这些样本旨在检验从循环肿瘤细胞（CTCs）中分离的 RNA。

本文件适用于包括由医疗机构进行的实验室开发检验在内的分子体外诊断检验。它还旨在供实验室客户、体外诊断开发人员和制造商、生物银行、进行生物医学研究的机构和商业组织以及监管机构使用。

本文件不涵盖直接从含有 CTCs 的静脉全血中分离细胞 RNA。这在 ISO 20186-1 中有所涵盖。

本文件不涵盖从特定白细胞中分离细胞 RNA 以及随后从其中分离细胞 RNA。本文件不涵盖用于活 CTC 冷冻保存和培养的前分析工作流程要求。

注1：本文件中给出的要求也可适用于其他循环稀有细胞（例如胎儿细胞）。

注2：国际、国家或地区法规或要求也可适用于本文件涵盖的特定主题。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

ISO 15189, 《医疗实验室 — 质量和能力的要求》

ISO 15190, 《医疗实验室 — 安全要求》

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

ISO 15189 中给出的术语和定义以及以下内容适用。ISO 和 IEC 在以下地址维护标准化术语数据库：

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

- IEC Electropedia：可在 <https://www.electropedia.org> 访问

### 3.1

#### 分装 allquot

从较大的均质材料中取出的一部分，假设取样误差可以忽略不计。

注：该术语通常适用于液体。组织由于是异质的，因此不能进行分装。

[来源：ISO 20166-3:2018,3.1]

## 3.2

**分析物 analyte**

以可测量名称表示的分量

[来源：ISO 17511:2020, 3.1, 修改—删除了示例]

## 3.3

**回流 backflow**

液体反向于通常或期望的方向流动

## 3.4

**血液采集套装 blood collection set**

用于静脉穿刺的专用静脉内装置，由带斜面的不锈钢针和带有连接器的管（管道）组成，连接器上附有塑料翼

注：连接器连接到额外的血液采集装置，例如血液采集管（3.5）。

## 3.5

**血液采集管 blood collection tube**

用于血液采集的管，通常利用真空将血液从静脉通过针头吸入管中

## 3.6

**循环肿瘤细胞 circulating tumour cells CTCs**

源于肿瘤原发或转移部位的血液中的细胞

## 3.7

**封闭系统 closed system**

供应商提供的不可修改系统，包括分析所需的所有必要组件（即硬件、软件、程序和试剂）

[来源：ISO 20186-2: 2019, 3.6]

## 3.8

**CTC 富集 CTC enrichment**

能够增加样本（3.24）中CTCs（3.6）与其他细胞（包括白细胞）比例的方法

## 3.9

**CTC 分离 CTC isolation**

导致样本（3.24）中仅包含CTCs（3.6）而无其他细胞类型的方法

## 3.10

**脱氧核糖核酸酶 deoxyribonuclease DNase**

催化DNA降解为较小成分的酶

[来源：ISO 20186-1: 2019, 3.11]

## 3.11

**诊断 diagnosis**

根据其迹象和症状识别健康或疾病状态，诊断过程可以涉及检验（3.12）和测试，以将个体的状况分类为不同的类别或子类别，从而可以就治疗和预后做出医疗决策

[来源：ISO 20184-1: 2018, 3.6]

## 3.12

**检验 examination**

分析测试 analytical test

一组操作，目的是确定一个属性的数值、文本值或特征

注：检验包括从分离的分析物（3.2）开始的所有过程，包括所有类型的参数测试或化学操作，以进行定量或定性检

验。

[来源：ISO 15189: 2022, 3.8,]

### 3.13

**检验性能** examination performance

**分析测试性能** analytical test performance

**分析性能** analytical performance

检验（3.12）程序测量或检测特定分析物（3.2）的能力

注1：分析性能由分析性能研究确定，用于评估体外诊断检验程序测量或检测特定分析物的能力。

注2：分析性能包括分析灵敏度、检测限、分析特异性（干扰和交叉反应性）、真实性、精密度和线性等特征。

[来源：ISO 20186-3: 2019, 3.11]

### 3.14

**制造商** manufacturer

对制造特定\*工作流程\*（3.29）组件负有法律责任的实体

注：为本文件目的，制造商可以是检验（3.12）制造商、采集装置制造商、CTC富集（3.8）和分离制造商、核酸分离制造商。

### 3.15

**针头支架** needle holder

在日常静脉穿刺程序中用于固定血液采集管（3.5）并保护采血人员免于直接接触血液的筒

[来源：ISO 20186-1: 2019, 3.16]

### 3.16

**前检验过程** pre-examination process

**前分析阶段** pre-analytical phase

**前分析工作流程** pre-analytical workflow

根据临床医生的请求，按时间顺序包括检验（3.12）请求、患者准备和识别、原始样本（3.17）的采集、样本在实验室内外的运输和储存（3.26）、细胞富集和分析物（3.2）的分离，直到分析检验开始为止。

注：前检验阶段包括影响预期检验结果的预备过程。

[来源：ISO 15189: 2022, 3.24]

### 3.17

**原始样本** primary sample

**样本** specimen

与人体相关的体液或组织或其他\*样本\*（3.24）的离散部分，取自\*检验\*（3.12）、研究或分析一个或多个数量或特征，以确定整体的特征

[来源：ISO 15189: 2022, 3.25]

### 3.18

**能力验证** proficiency testing

PT PT

通过实验室间比对，根据预先确定的标准对参与者表现进行评估

[来源：ISO/IEC 17043: 2023, 3.7]

### 3.19

**核糖核酸** ribonucleic acid RNA

聚合核糖核苷酸，以双链或单链形式存在

[来源：ISO 22174:2024,3.1.9]

### 3.20

**核糖核酸能力验证计划 ribonucleic acid proficiency testing program RNA PT program**

基于RNA的\*检验\*（3.12）的能力验证

### 3.21

**RNA 特征 RNA profile**

样本（3.17）或样本（3.24）中不同RNA（3.19）分子的数量，可以在没有任何损失、抑制和干扰的情况下测量

### 3.22

**核糖核酸酶 ribonuclease RNase**

催化RNA（3.19）降解为较小成分的酶

[来源：ISO 20186-1:2019/3.24]

### 3.23

**室温 room temperature**

温度范围在18°C至25°C之间

注：本地或国家法规可能有不同的定义。

### 3.24

**样本 sample**

从一个原始样本（3.17）中取出的一个或多个部分

[来源：ISO 15189:2022,3.28]

### 3.25

**稳定性 stability**

当样本（3.24）材料在规定的条件下储存时，在规定的时间内保持规定属性值在规定范围内的能力

[来源：ISO 指南 30: 2015, 2.1.15]

### 3.26

**储存 storage**

在适当条件下，中断样本（3.24）或分析物（3.2）或其衍生物（如染色切片或组织块）的前检验工作流程（3.29），以保存其属性

注：长期储存通常发生在实验室档案或生物银行中。

[来源：ISO 20166-3: 2018, 3.21]

### 3.27

**验证 validation**

通过提供客观证据确认特定预期用途或应用的要求已得到满足

注：术语"已验证"用于指定相应状态。

[来源：ISO 9000: 2015, 3.8.13]

### 3.28

**确认 verification**

通过提供客观证据确认规定的要求已得到满足

注1：术语"已确认"用于指定相应状态

注2：确认可以包括以下活动：

- 执行替代计算；
- 将新设计规范与类似已验证设计规范进行比较；

- 进行测试和演示；
- 在文件发布前进行审查。

[来源：ISO 9000: 2015, 3.8.12]

### 3.29

#### 工作流程 workflow

完成任务所需的一系列活动

[来源：ISO 20166-3: 2018, 3.25]

## 4 一般考虑

有关医疗实验室质量管理体系的一般声明，请参考 ISO 15189、ISO/IEC 17020 或 ISO/IEC 17025。体外诊断（IVD）制造商应遵循 ISO 13485。质量管理体系的一般要求可在 ISO 9001 中找到。有关前检验过程的其他一般要求，包括采集前活动、采集、运输、接收和处理样本，请参见 ISO 20658 和 ISO 15189:2022, 7.2。

诊断工作流程的所有步骤都可能影响最终的分析测试结果。因此，在检验开发过程中，包括体外诊断医疗器械的开发过程中，应规定、确认和验证整个工作流程，包括生物分子的稳定性以及样本和样本储存条件。应对相关工作流程步骤进行风险评估，评估其可能对分析测试性能的潜在影响，并建立缓解措施，以实现所需的分析测试性能。ISO 14971 和 ISO 35001 提供了指导。

在设计检验之前或期间，应调查并确保预期分析的特定 RNA 特征不会受到影响。

CTC 分析通常涉及一个 CTC 富集步骤（例如，基于大小、免疫磁性或微流体的富集方法），然后进行 RNA 分离。根据预期 RNA 检验的要求，富集的 CTCs 可能需要额外的步骤，如染色和计数以进一步表征。此外，检验可能需要从含有未知数量 CTCs 的富集样本中分离 CTCs。

由于前检验工作流程的复杂性，应采取适当措施，以获得从富集 CTCs 中获得的 RNA 的适当数量和质量。

在整个前检验过程中，应采取措施避免不同样本或样本之间的交叉污染，例如尽可能使用一次性材料，或在处理不同样本或样本之间使用适当的清洁程序。

应制定并遵循整个前检验过程的安全说明。这些说明应符合 ISO 15189 和 ISO 15190 中规定的要求。用户应了解有关样本和样本运输和处理的安全法规。ISO 15189、ISO 15190 和 ISO 20658 提供了指导。如果需要在公共区域运输，可能适用相应的包装和运输法规或法律（例如，国际航空运输协会（IATA）的航空运输法规）。

在首次使用任何潜在危险材料（例如稳定剂中的化学品）之前，应考虑制造商的材料安全数据表。

对于所有前检验步骤，应遵循检验制造商的说明（如果提供）。

如果出于合理原因（例如，未满足的患者需求），未按照制造商的说明使用商业产品，则验证、验证、使用和性能的责任由实验室承担。

## 5 实验外活动

## 5.1 样本采集

### 5.1.1 一般要求

对于血液样本的采集，应遵循第6条中规定的分子检验要求（例如，血液采集管类型、采集程序）。

### 5.1.2 样本供者/患者的信息

文档应包括样本供者/患者的ID，可以以代码形式提供。

文档应包括但不限于：

- a) 本供者/患者的相关健康状况（例如，健康、疾病类型、伴随疾病、人口统计信息如年龄、性别和性别认同）；
- b) 血样采集前的医疗治疗和特殊治疗信息（例如，麻醉剂和药物）；
- c) 所请求的检验类型和目的；
- d) 样本供者/患者的适当同意（另见 ISO 15189）；
- e) 采血时间点，如果相关（例如，患者休息或活动时段）。

注：最近的一项研究表明，在乳腺癌患者的休息阶段，血液中CTC浓度较高。

### 5.1.3 实验室选择静脉全血采集管

CTC RNA 特征可能受到不适当的静脉全血采集程序和不当储存/运输条件以及富集和分离程序的影响。

由于 CTC 数量较少，富集期间需要高回收效率。这可能受到 CTCs 在运输和储存过程中潜在的不稳定性影响，导致样本中 CTC 数量减少或与富集系统兼容性降低。此外，RNA 特征可能在血液采集后几分钟内发生变化。

因此，应使用适当的采集管采集静脉全血，管中含有稳定剂，以保持 CTCs 和 CTC RNA 特征的完整性（CTC/RNA 稳定剂）。

检验制造商的说明应包含有关要使用的血液采集管的规格。如果检验制造商指定使用专用血液采集管，则应使用这些管。

如果检验制造商未提供此类规格，但 CTC 富集或分离制造商指定了专用血液采集管，则可以作为实验室检验特定验证的基础。如果此类指定的血液采集管不符合检验要求，或者没有制造商指定血液采集管，则血液采集管应由实验室规定、验证和记录。

由于 CTC（数量和形态）和 CTC RNA 特征在采集后存在变异性，应使用含有 CTC 或 RNA 稳定剂的商业化静脉全血采集管采集静脉全血，以实现预期检验的足够 RNA 产量。

血液采集管的目录和批号应被记录。

不含 CTC/RNA 稳定剂的血液采集管应仅在检验制造商的说明中指定时使用。在这些情况下，应使用常规血液采集管，例如含有 EDTA 的管，尽管 EDTA 不能防止 CTCs 和 RNA 特征的变化，但它可以防止血液凝固，从而最大程度地减少血凝块对 CTC 和 RNA 特征的潜在影响。血液微凝块可能会影响某些 CTC 富集程序，从而改变 CTC 亚群，甚至严重阻碍整个 CTC 富集程序。检验制造商的规格应作为进一步细节的考虑因素。

在不使用任何 CTC/RNA 稳定剂的血液采集管的情况下，应确定 CTC RNA 特征的稳定性。这应通过进行时间过程实验来实现，分析 RNA 特征随时间推移的潜在变化，例如在储存 30 分钟、60 分钟、90 分钟和 120 分钟后进行分析。此类研究规定了处理样本或样本前的可接受延迟时间。

注：还有一些传统血液采集CTC富集的替代方案。这些系统允许从更大血量中进行体内和体外CTC采样。

#### 5.1.4 从患者/供者采集静脉全血样本

采集样本的人的身份应被记录。这可以以姓名或代码形式记录。采血日期和时间应被记录。

对于血液采集管上的标签(包括样本和样本识别)，应使用常规程序(例如，医疗实验室的 ISO 15189 或生物银行的 ISO 20387) 或类似的程序，可选附加信息(例如，二维条形码)。

如果血液采集管制造商未另行规定，可以使用标准静脉穿刺技术。为避免在采血过程中 CTC 群体发生显著变化(例如，由于剪切力导致 CTCs 裂解)，应规定并验证适合采集血液中 CTCs 的血液采集管，并使用足够大直径的针头。

可能需要采取措施防止回流到供者/患者体内。

血液采集管制造商应提供规定并验证的血液采集程序说明。这些说明应被遵循。当使用含有 CTC/RNA 特征稳定剂的管时，可能需要使用血液采集套装和针头支架。在这种情况下，应遵循采集套装和针头支架制造商的说明，除非血液采集管制造商另行规定并验证。

血液采集管应根据制造商的说明进行填充，并注意采集管在采血期间的正确位置以及所需的血液量。血液采集管开发人员和制造商应规定并验证管填充不足的限制。检验制造商应验证专用检验的规格。

注1：CTC的完整性可能会受到不适当的静脉全血采集程序的影响。

注2：含有CTC/RNA特征稳定剂的血液采集管填充不足可能会由于血液与稳定剂比例不当而影响稳定剂的功能。这本身可能会影响CTC和RNA特征，从而影响检验结果的有效性和可靠性。血液采集管制造商关于采血后立即混合或倒置管的说明应被遵循。如果制造商的说明中没有关于混合或倒置的信息，每个管应轻轻倒置8至10次。

不正确的或不足的混合可能是最常见的前检验变量之一。除非血液采集管中的添加剂与样本均匀混合，否则 CTCs 和 RNA 特征可能会受到影响，从而影响检验结果的有效性和可靠性。因此，正确的混合应成为所有参与采血人员的教育和定期培训的重点。

血液采集程序应根据医疗实验室的要求进行记录。对样本的任何篡改或添加都应被记录。

## 5.2 样本储存和运输

### 5.2.1 一般要求

在选择和使用运输包装(例如，用于储存和运输的盒子)时，可能适用运输法规。应有一个规定并验证的样本储存和运输程序以及书面说明。规定的储存和运输条件(例如，温度和持续时间)应被遵循和记录，包括任何偏差。

如果指定的储存和运输条件无法通过指定的运输包装确保，应以适当的方式应用温度监测。

血液采集设施中的临时储存持续时间和运输至实验室的持续时间构成了储存和运输的总持续时间。

应特别注意避免 CTC 裂解，因为这会改变 CTC 群体。因此，样本不应被冷冻或剧烈摇晃。

### 5.2.2 使用含有稳定剂的血液采集管进行储存和运输

检验制造商应提供规定并验证的采集血液样本储存和运输的说明（例如，持续时间、温度），这些说明应被遵循。

如果检验制造商未提供此类规格（例如，由于法律框架不够严格），程序应由实验室规定、验证和记录。

应向用户编写相应的说明，并遵循这些说明。血液采集管制造商关于储存和运输条件的规格可以作为实验室检验特定验证的基础/框架。

### 5.2.3 使用不含稳定剂的血液采集管进行储存和运输

如果检验制造商指定使用不含稳定剂的血液采集管，他们应提供规定并验证的采集血液样本储存和运输的说明（例如，持续时间、温度），这些说明应被遵循。

如果检验制造商未提供此类规格（例如，由于法律框架不够严格），程序应由实验室规定、验证和记录。这应通过时间过程研究来完成，分析血液采集后目标检验分析物的稳定性。

注1：时间过程研究涉及在相关时间段内（例如，0小时、2小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时）对相关变量进行重复观察。这反映了对所关注分析物稳定性的任何了解。通常，这涉及来自同一供者的多个分装，从同一血液采集中重复多个供者。

根据时间过程研究的结果，可能需要立即处理样本或仅在短暂储存后处理，以最大程度地减少 RNA 特征变化并最大程度地提高 CTC 回收率。

注2：在这些条件下，如果不使用RNA特征稳定剂，RNA特征可能会发生变化。

应向用户编写相应的说明，并遵循这些说明。应规定并验证储存的最大持续时间和温度，以用于预期检验。

## 6 实验室内的活动

### 6.1 样本接收

接收样本或样本的人的身份应被记录。这可以以姓名或代码形式记录。应检查样本或样本的正确身份。这应包括临床信息（参见 5.1.1 和 5.1.2）、入院号、患者或供者姓名、患者或供者出生日期。在某些情况下，例如在研究中，可能只需要使用代码。到达日期、时间和标签、储存和运输条件（例如，温度、持续时间）的差异以及血液体积差异、泄漏/破损管等应被记录。应有一个处理不符合项的程序。

如果存在不符合项，例如使用非指定血液采集管、运输条件、总体储存和运输持续时间或血液体积或意外冷冻，可能会影响检验结果的有效性和可靠性，应获得新的样本。

### 6.2 运输和接收后的样本储存

如果需要进一步储存在实验室中，应记录储存温度以及开始样本或样本储存的日期和时间。储存温

度和总储存持续时间不得超过 5.2 中确定的规格。

样本总储存持续时间包括血液采集设施中的储存持续时间(5.1.4)、运输至实验室的持续时间(5.2)以及实验室或其他机构的进一步储存持续时间。检验制造商或实验室(参见 5.2)规定的最大储存持续时间不得超过。

## 6.3 CTC 富集

### 6.3.1 一般要求

CTC 检验通常需要将 CTCs 从其他细胞类型(通常是白细胞)中富集。CTC 富集是基于这些细胞的物理(例如,细胞大小、细胞变形性)或生物学特性(例如,特定表位的存在)实现的。有关 CTC 富集程序的更多细节可在附录 A 中找到。不同的 CTC 富集方法可能导致不同的产量(恢复的 CTC 数量)和不同的 CTC 与白细胞比例。此外,不同的富集方法可以选择不同的 CTC 亚群(例如,上皮、间充质)。富集程序还可能影响 CTC RNA 特征(例如,通过改变活 CTCs 中的基因表达)。在检验的设计、验证和验证过程中应考虑这些方面(例如,通过规定所需 CTC 的最小数量、可接受的最大污染白细胞百分比)。这可以通过分析表达检验 RNA 靶标特征的已建立细胞系的掺入癌细胞的 RNA 特征,在富集程序前后进行。如果发生不可接受的 RNA 特征变化,应采取措施最小化变化,例如在富集开始前添加 RNA 稳定剂。

血液采集管中的 CTC/RNA 稳定剂也可能在 CTC 富集期间有效,具体取决于稳定剂的化学特性。如果血液采集管中使用的 CTC/RNA 稳定剂在 CTC 富集期间不再有效,应为 CTC 富集程序添加额外的稳定剂。

为了避免与扩增的核酸发生交叉污染,CTC 富集不应在检验过程的核酸扩增步骤的同一区域进行,除非使用经验证可避免预期应用交叉污染的封闭系统。

### 6.3.2 使用用于诊断目的的商业 CTC 富集系统

检验制造商应提供规定并验证的 CTC 富集说明,这些说明应被遵循。

如果检验制造商未提供此类规格(例如,由于法律框架不够严格),但血液采集管制造商和/或 CTC 分离制造商和/或 RNA 分离试剂盒制造商已指定并验证了一个或多个专用商业 CTC 富集系统,这些可以作为实验室检验特定验证的基础/框架。这可以通过将这些 CTC 富集系统应用于预期检验来实现。

注:商业 CTC 富集系统有时可以集成到商业可用的前检验工作流程的部分中,与 CTC-DNA、CTC RNA 和 CTC 蛋白分离试剂盒一起,而其他商业解决方案是独立程序,以 CTC 富集结束。

如果没有这些制造商指定并验证特定的 CTC 富集系统,实验室应选择、规定、验证并记录一个经批准用于诊断目的(如果可用)的适当 CTC 富集系统。应相应地编写使用说明,并遵循这些说明。

如果所选的 CTC 富集程序不足以支持规定的检验性能特征,实验室应相应地修改它(例如,通过增加血液样本或样本的体积,通过修改过滤所施加的压力,通过调整捕获抗体的数量或使用额外的抗体进行 CTC 富集)。

### 6.3.3 使用实验室开发的 CTC 富集程序

如果没有商业可用的CTC富集程序(用于诊断目的)可以成功验证与预期检验的兼容性(参见6.3.2),实验室应通过以下方式开发自己的程序:

- 修改现有的 CTC 富集程序以用于诊断目的;
- 使用仅限研究使用的商业可用系统,并按要求进行修改;或
- 开发自己的 CTC 富集系统。

从上述列表中选择的方法应基于风险评估的结果(参见第4条)进行规定、验证,最终验证其预期用途。应相应地编写使用说明,并遵循这些说明。

### 6.4 富集 CTC 的质量

如果预期检验需要对CTC质量评估,检验制造商应提供规定并验证的说明,这些说明应被遵循。

如果没有这些提供(例如,由于法律框架不够严格),但 CTC 分离制造商和/或 CTC RNA 分离试剂盒制造商提供了此类说明,这些可以作为实验室检验特定验证的基础/框架。如果此验证不成功,实验室应修改 CTC 富集质量评估程序或开发自己的程序。

如果实验室开发自己的 CTC 富集质量评估程序,一般接受的富集 CTC 的图像分析,例如通过苏木精和伊红染色确定典型肿瘤细胞特异性形态特征,如细胞尺寸和核质比(参见 ISO/TS 7552-3 和参考文献[38]),或通过荧光标记抗体进行更特异性的表面蛋白染色,可以使用。

染色可能会通过引起 RNA 降解或干扰检验而影响 CTC RNA 特征检验。通过应用 RNA 稳定剂和/或使用无 RNase 染色试剂,可以降低此风险。因此,在检验开发过程中,应验证 CTC 染色程序与 RNA 特征检验的兼容性。

### 6.5 富集 CTC 的储存

检验制造商应提供规定并验证的富集CTC储存说明,这些说明应被遵循。

如果没有检验制造商的说明提供(例如,由于法律框架不够严格),但 CTC 富集试剂盒制造商和/或血液采集管制造商和/或分离试剂盒制造商和/或 CTC RNA 分离试剂盒制造商已指定储存条件,这些可以作为实验室检验特定验证的基础/框架。

如果这些说明无法与检验成功验证,或者没有提供此类说明,则储存条件应由实验室规定、验证和记录。应相应地编写使用说明,并遵循这些说明。

应确定富集 CTC 在规定温度(例如,室温或 2°C 至 8°C)下的最大储存持续时间,以确保对检验性能特征没有负面影响。这应通过进行时间过程实验来实现,分析富集 CTC 数量随时间推移的潜在变化,例如在储存 30 分钟、60 分钟、90 分钟和 120 分钟后进行分析。

### 6.6 CTC 分离

#### 6.6.1 一般要求

CTC分离意味着将CTCs与其他血液成分分离,通常在CTC富集后进行。CTC分离主要基于物理原理,例如通过介电泳或微操作实现。

有关这些示例的更多细节可在附录 A 中找到。

根据检验要求，可能需要分离定义的 CTC 亚群。

CTC 分离系统的选择取决于与所用 CTC 富集系统的兼容性以及检验要求。

CTCs 中的 RNA 特征变化可能会在 CTC 分离过程中继续或新启动。因此，应为 CTC 分离应用适当的 CTC 和 RNA 特征稳定剂。

### 6.6.2 使用用于诊断目的的商业 CTC 分离系统

检验制造商应提供规定并验证的 CTC 分离说明，这些说明应被遵循。如果没有检验制造商的说明提供（例如，由于法律框架不够严格），但血液采集管制造商和/或 CTC 富集制造商和/或 RNA 分离试剂盒制造商已验证了一个或多个专用商业 CTC 分离系统，这些可以作为实验室检验特定验证的基础/框架。

注：商业 CTC 分离系统有时可以集成到商业可用的前检验工作流程的部分中，与 CTC DNA、RNA 和蛋白分离试剂盒一起，而其他商业解决方案是独立程序，以分离的 CTC 结束。

如果没有这些制造商指定和/或验证特定的 CTC 分离系统，实验室应选择、规定、验证并记录一个经批准用于诊断目的（如果可用）的适当 CTC 分离系统。应相应地编写使用说明，并遵循这些说明。

如果所选的 CTC 分离程序不足以支持规定的检验性能特征，实验室应相应地修改它（例如，通过成像分离的细胞以作为 CTC 存在的质量控制，通过减少分离装置的试剂死体积）。

### 6.6.3 使用实验室开发的 CTC 分离程序

如果没有商业可用的 CTC 分离程序（用于诊断目的）可以成功验证与预期检验的兼容性，实验室应通过以下方式开发自己的程序：

- 修改现有的 CTC 分离程序以用于诊断目的；
- 使用仅限研究使用的商业可用系统，并按要求进行修改；或
- 开发自己的 CTC 分离系统。

从上述列表中选择的方法应基于风险评估的结果（参见第 4 条）与预期检验进行验证，最终验证其预期用途。应相应地编写使用说明，并遵循这些说明。

## 6.7 从富集 CTC 样本中分离 RNA

### 6.7.1 一般要求

分离单个 CTC 和混合分离的 CTC 通常不用于 RNA 分离，因为 RNA 量非常低。相反，分离的 CTC 被直接引入检验，或者仅在检验前进行裂解步骤，具体取决于检验设计。在这种情况下，前检验过程在第 6.6 条结束。

可以对含有高细胞数的分离 CTC 池进行 RNA 分离。

为避免与扩增材料发生交叉污染，RNA 分离不应在检验过程的扩增步骤的同一区域进行，除非使用经设计避免交叉污染的封闭系统。在检验开发过程中，应验证交叉污染不会影响检验。应使用适当的无模板对照来监测交叉污染风险。

### 6.7.2 使用用于诊断目的的商业 RNA 分离试剂盒

检验制造商应提供规定并验证的 CTC DNA 分离说明，这些说明应被遵循。

如果没有检验制造商的说明提供（例如，由于法律框架不够严格），但CTC富集试剂盒制造商和/或CTC分离试剂盒制造商和/或血液采集管制造商已指定RNA分离试剂盒，这些可以作为实验室检验特定验证的基础/框架。

如果没有这些制造商指定和/或验证专用的CTC RNA分离试剂盒，实验室应选择、规定、验证并记录一个经批准用于诊断目的（如果可用）的适当CTC RNA分离试剂盒。应相应地编写使用说明，并遵循这些说明。

如果所选的RNA分离程序不足以支持规定的检验性能特征，实验室应相应地修改它（参见6.8.3）。有关分离RNA的储存信息，请参见6.9.2。

### 6.7.3 使用实验室开发的 CTC RNA 分离程序

如果没有商业可用的CTC RNA分离试剂盒（用于诊断目的）可以成功验证与预期检验的兼容性，实验室应通过以下方式开发自己的程序：

- 修改现有的 CTC RNA 分离试剂盒以用于诊断目的；
- 使用仅限研究使用的商业可用试剂盒；或
- 开发自己的程序。

从上述列表中选择的方法应基于风险评估的结果（参见第4条）针对检验的预期用途进行规定、验证，最终验证。应相应地编写使用说明，并遵循这些说明。

如果检验对 CTC RNA 洗脱液中的 DNA 污染敏感，应将 DNA 去除步骤（如 DNase 处理）纳入 RNA 分离程序。DNase、其他试剂和与 CTC RNA 接触的耗材应为无 RNase。

注：使用修改的RNA分离试剂盒或实验室自己开发的程序时，可能需要专门的措施和技术，以避免在使用带有血液 CTC/RNA特征稳定剂的管时，将CTC/RNA稳定化分子携带到最终RNA洗脱液中。稳定化分子的携带可能会影响检验的性能。

分离的 CTC RNA 应保持在 2°C 至 8°C（例如，冷却块）或湿冰上，并应立即进行检验，除非另行规定并验证。

有关分离 CTC RNA 的储存的更多信息，请参见 6.9.3。

## 6.8 从富集或分离的 CTC 中分离 RNA 的数量和质量评估

### 6.8.1 一般要求

在前检验和/或检验工作流程的设计和开发过程中，应规定、开发和验证适当的方法，以评估从CTCs中分离的RNA的数量和质量，以确保检验性能。由于通常从CTC样本中获得的RNA产量较低，因此在适当的情况下，可以使用构建的样本支持评估。在适当的情况下，可以使用一般接受的方法/技术（参见6.8.2和6.8.3）。CTC RNA分离试剂盒制造商关于确定CTC RNA数量和质量说明也可以作为基础/框架（如果可用）。

注：注：一些稳定剂，如交联试剂，可能对RNA数量和质量测量的可靠性产生负面影响，特别是如果这些测量是基于扩增的。

### 6.8.2 CTC RNA 的数量评估

从CTCs中分离的核酸通常浓度较低，这可能使使用UV吸光度读数器（如分光光度计）不可靠，因此可能不适当。从富集或分离的CTCs中进行RNA分离的程序可能涉及使用载体核酸（例如，中性序列的载体RNA，如Poly(A)或Poly(C)）；此载体将进一步干扰UV吸光度读数。

因此，可能需要其他适用于定量或半定量CTC RNA的方法，这些方法针对已知RNA序列，如定量逆转录聚合酶链反应（RT-qPCR）、逆转录数字PCR（RT-dPCR）或荧光或芯片方法。

所规定和实施的方法应针对预期检验进行验证。

### 6.8.3 CTC RNA 的质量评估

由于CTC RNA特征的浓度低和异质性，没有通用的质量评估方法。根据检验要求，可能需要开发、规定和验证专用的质量测试。

在检验的开发和验证过程中，应确保分离的CTC RNA不包含干扰规定检验性能的物质。应规定、开发和验证分离CTC RNA中干扰物质的测试。这可以通过以下方式完成：

- 使用内源性 RNA 或 DNA；
- 使用外源对照（掺入 RNA）进行 RT-qPCR 抑制测试，通过将增加的分离物体积引入检验；或
- 检查 RT-qPCR 响应曲线中的异常

开发人员/制造商和医疗实验室应在 CTC RNA 能力验证(PT)计划中定期测试 CTC 富集/分离 RNA 分离性能（如果可用）。有关 PT 的更多信息可在 ISO 15189 中找到。

## 6.9 从富集 CTC 中分离 RNA 的储存

### 6.9.1 一般要求

CTC RNA检验制造商应提供规定并验证的分离CTC RNA储存说明，只要分离的RNA不需要立即处理供检验。这些说明应被遵循。

如果没有提供此类说明（例如，由于法律框架不够严格），RNA分离试剂盒制造商的说明可以作为实验室规定和验证RNA储存说明的基础/框架，以用于预期检验。应相应地编写说明，并遵循这些说明。

如果没有提供这些说明，RNA检验实验室应规定、验证和记录分离RNA的储存条件，例如温度、持续时间和其他所需条件。应相应地编写说明，并遵循这些说明。

对于长期储存，实验室应验证储存分离RNA的协议。通常，RNA被冷冻。然而，对于RNA保存，也可以使用其他验证的归档方法（参见参考文献[40]和[41]中的示例）。

对于长期储存，应生成分离分析物的分装，以避免重复冷冻和解冻，或从其他归档系统中重复恢复。由于分离的RNA量通常较小，应使用减少RNA吸附到管壁的储存容器。

由于水蒸发导致的分离RNA在长期储存期间意外冻干应避免，因为RNA可能会降解，这对于某些检验可能是关键的。此外，从储存容器中恢复可能困难，甚至由于水蒸发而无法实现。因此，应使用适当的储存容器，如避免水蒸发的螺旋盖冷冻管，并进行记录。

对于长期储存，应有一个验证的系统和流程，以组织和唯一标记储存分离RNA或由其衍生的分装物的储存容器，使其易于检索和识别。

应确保样本身份的可追溯性，避免丢失或混淆，例如通过使用可读的RFID标签、1D条形码或2D条形码，这些条形码应印在标签上或预先印制在储存容器上，并由制造商提供唯一代码，适用于低温储存。

冷冻箱的温度应通过适当的报警系统进行连续监测，冷冻箱的温度应通过经过验证的仪器进行记录，例如圆形温度记录仪或电子温度计。

不应将样本储存在“无霜”冷冻箱中，因为温度可能会一天内多次循环，这可能导致RNA降解。

### 6.9.2 使用商业试剂盒分离的 RNA 的储存

用于诊断的试剂盒制造商应提供经过验证的DNA储存说明，并应遵循这些说明。

如果试剂盒制造商未提供说明，实验室应制定并验证储存分离的CTC RNA直至检测的程序。除非另有经过验证的不同说明，短期储存时，分离的RNA应保持在2°C至8°C（例如冷却块）或在湿冰上，并应尽快检测。

注：根据RNA分离程序和所得RNA洗脱液的质量，在某些情况下，湿冰上短时间（例如30分钟）储存可能是合适的。

长期储存时，分离的RNA应储存在-70°C。也可以使用其他经过验证的存档方法和系统（参见参考文献[38]和[39]中的示例）。

### 6.9.3 使用实验室开发程序分离的RNA的储存

如果使用实验室开发程序（见6.8.3），实验室应有经过验证的储存分离RNA直至检测的程序。

如果实验室打算储存分离的RNA，分离的RNA应使用无RNase的去离子水洗脱，以便短期储存或长期储存。

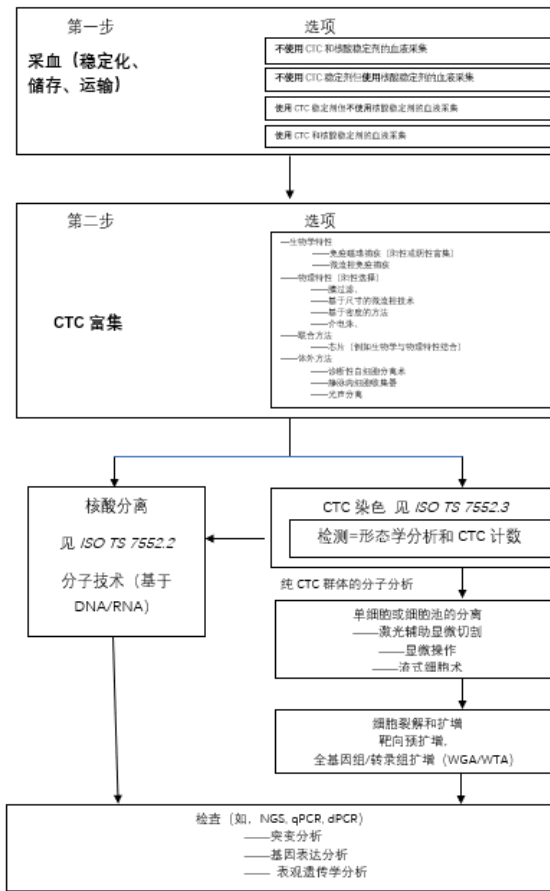
除非另有经过验证的不同说明，短期储存时，分离的RNA应保持在2°C至8°C（例如冷却块）或在湿冰上，并应尽快检测。

注：根据RNA分离程序和所得RNA洗脱液的质量，在某些情况下，湿冰上短时间（例如30分钟）储存可能是合适的。

长期储存时，分离的RNA应储存在-70°C。也可以使用其他经过验证的存档方法和系统（参见参考文献[38]和[39]中的示例）。

附录 A  
(资料性)

CTC预分析工作流程关键步骤的决策指南



图A.1 CTC预分析工作流程关键步骤的决策指南

## 参 考 文 献

- [1] ISO Guide 30:2015, Reference materials - Selected terms and definitions
- [2] ISO/TS 7552-3, Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination processes for circulating tumour cells (CTCs) in venous whole blood - Part 3: Preparations for analytical CTC staining
- [3] ISO 9000:2015, Quality management systems-Fundamentals and vocabulary
- [4] ISO 9001, Quality management systems- Requirements
- [5] ISO 13485, Medical devices-Quality management systems- Requirements for regulatory purposes
- [6] ISO 14971, Medical devices - Application of risk management to medical devices;
- [7] ISO/IEC 17020, Conformity assessment - Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection
- [8] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [9] ISO/IEC 17043:2023, Conformity assessment - General requirements for the competence of proficiency testing providers
- [10] ISO 17511:2020, In vitro diagnostic medical devices -Requirements for establishing metrological
- [11] ISO 20166-3:2018, Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue - Part 3: Isolated DNA
- [12] ISO 20184-1:2018, Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination processes for frozen tissue - Part 1: Isolated RNA
- [13] ISO 20186-1, Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination processes for venous whole blood-Part Isolated cellular RNA
- [14] ISO 20186-2:2019, Molecular in vitro diagnostic examinations -Specifications for pre-examination processes for venous whole blood - Part 2: Isolated genomic DNA
- [15] ISO 20186-3:2019, Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination processes for venous whole blood-Part 3: Isolated circulating cell free DNA from plasma
- [16] ISO 20387, Biotechnology-Biobanking- General requirements for biobanking
- [17] ISO 20658, Requirements for the collection and transport of samples for medical laboratory examinations
- [18] ISO 22174:2024, Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms - General requirements and definitions
- [19] ISO 35001, Biorisk management for laboratories and other related organisations
- [20] Lone S.N., Nisar S., Masoodi T., Singh M., Rizwan A., Hashem S. et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. Mol Cancer. 2022 Mar 18, 21(1):79

- [21] Chemi F., Mohan S., Guevara T., Clipson A., Rothwell D.G., Dive C. Early Dissemination of Circulating Tumor Cells: Biological and Clinical Insights. *Front Oncol.* 2021 May 7, 11: 672195
- [22] Zavridou M., Strati A., Bournakis E., Smilkou S., Tserpeli V., Lianidou E. Prognostic Significance of Gene Expression and DNA Methylation Markers in Circulating Tumor Cells and Paired Plasma Derived Exosomes in Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*.
- [23] Lin D., Shen L., Luo M., Zhang K., Li J., Yang Q. et al., Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Nov 22, 22;6(1):404
- [24] Joosse S .A., G orges T .M., Pantel K., Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2015 Jan, 7(1):1
- [25] Lianidou E.S., Markou A., Molecular assays for the detection and characterization of CTCs. *Recent Results Cancer Res.* 2012, 195:111-123
- [26] de Bourcy C .F., D e Vlaminck I ., K anbar J .N., Wang J ., G awad C ., Q uake S.R., A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PlosOne.* 2014 Aug 19, 9(8):e105585
- [27] Salvianti F., Pazzagli M., Pinzani P., Single circulating tumor cell sequencing as an advanced tool in cancer management. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016, 16(1):51-63
- [28] De Luca F., R otunno G., S alvianti F., G alardi F., P estrin M., G abellini S. et al., Mutational analysis of single circulating tumor cells by next generation sequencing in metastatic breast cancer. *Oncotarget.* 2016 May 3, 7(18):26107-19
- [29] Lianidou E.S., Gene expression profiling and DNA methylation analyses of CTCs. *Mol. Oncol.* 2016 Mar, 10(3):431-432
- [30] Alix-Panabieres C., Pantel K., Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov.* 2021 Apr, 11(4):858-873
- [31] IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, Gold Book Version 2.3.3. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2014
- [32] Horwitz W., Nomenclature for sampling in analytical chemistry (Recommendations 1990). *Pure Appl. Chem.* 1990; 62(6):1193-1208. [https:// doi .org/ 10 .1351/ pac199062061193](https://doi.org/10.1351/pac199062061193)
- [33] Calvert J., Glossary of atmospheric chemistry terms (Recommendations 1990). *Pure Appl. Chem.* 1990, 62(11):2167-2219. [https:// doi .org/ 10 .1351/ pac199062112167](https://doi.org/10.1351/pac199062112167)
- [34] Diamantopoulou Z., Castro-Giner F., Schwab F.D., Foerster C., Saini M., Budinjas S. et al., The metastatic spread of breast cancer accelerates during sleep. *Nature.* 2022 Jul, 607(7917):156-162
- [35] Qin J., Alt J.R., Hunsley B.A., Williams T.L., Fernando M.R., Stabilization of circulating tumor cells in blood using a collection device with a preservative reagent. *Cancer Cell Int.* 2014 Mar 7, 14(1):23
- [36] Fischer J.C., Niederacher D., Topp S.A., Honisch E., Schumacher S., Schmitz N. et al., Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Oct 8, 110(41): 16580-16585
- [37] El-Heliebi A., Hille C., Laxman N., Svedlund J., Haudum C., Ercan E. et al., In Situ Detection and Quantification of AR-V7, AR-FL, PSA, and *KRAS* Point Mutations in Circulating Tumor Cells. *Clin Chem.* 2018 Mar, 64(3):536-546

[38] Jesenko T., Modic Z., Kuhar C.G., Cemazar M., Matkovic U., Miceska S. et al., Morphological features of breast cancer circulating tumor cells in blood after physical and biological type of isolation. *Radiol Oncol.* 2012 Aug 10, **55**(3):292-304

[39] A., T., L., R.R., M., M.W. Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. *Methods.* 2010 Apr, **50**(4): 308-312

[40] Seelenfreund E., Robinson W.A., Amato C.M., Tan A.C., Kim J., Robinson S.E., Long term storage of dry versus frozen RNA for next generation molecular studies. *PLoS One.* 2014 Nov 7, **9**(11): e111827

[41] Fabre A.L., Colotte M., Luis A., Tuffet S., Bonnet J., An efficient