



# 中华人民共和国国家标准化指导性技术文件

GB/Z XXXXX—XXXX

## 分子体外诊断检验 静脉全血循环肿瘤细胞 (CTC) 检验前处理过程规范 第 3 部分： CTC 染色分析准备

点击此处添加标准名称的英文译名

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

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  
国家标准化管理委员会 发布

## 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

实体肿瘤会将细胞和生物分析物释放到血液和其他体液中。这为使用这些体液（液体活检）提供了一个最小侵入性肿瘤检测、诊断和表征的方案。液体活检可以实现癌症的早期检测和诊断，并推动个性化患者治疗的进展。

这些应用已成为整个诊断市场中增长最快的领域之一。

循环肿瘤细胞（CTC）在静脉全血中能够反映肿瘤进展过程中的疾病复杂性，包括不同的基因、表观基因和表达特征。

除了CTC在癌症进展中的预后作用，CTC的识别和计数还能改善疾病预后预测、治疗指导以及患者治疗后的监测。

CTC被认为是癌症早期发现、进展和转移阶段肿瘤组织的替代指标。

CTC的分子特征可以为监控癌症提供策略，在全身治疗过程中识别疾病进展机制，发现新的治疗靶点，并选择靶向治疗。

CTC在常规血液采集管（如含有EDTA的管）中采集后容易破坏，尤其是在没有专门的CTC稳定剂的情况下。CTC在早期疾病中极为稀少，例如每10毫升血液中不到10个细胞，相当于CTC与白细胞（WBCs）约1:107的比例。这个低比例给CTC富集提出了重大挑战，这对于CTC的识别和肿瘤来源细胞的检查至关重要。

此外，CTC的形态和生物分子在预处理过程中可能发生变化。这可能导致蛋白质数量、完整性、修饰、构象和细胞内定位的变化，从而影响检查结果的有效性和可靠性。

CTC检查通常需要进行CTC富集步骤（例如，基于CTC的生物学特性，如表面分子或物理特性，如大小和密度，或两者的组合），然后进行细胞形态学检查或免疫荧光染色。

通过CTC富集，CTC可以附着在固体表面以备后续细胞学检查，或呈现悬浮状态，并进行下一步的检查。但这些操作均可能导致潜在的细胞丢失。

CTC富集后通常通过常规的细胞化学或蛋白靶向染色程序进行识别，以便检测细胞特征。

标准化包括预处理过程中的所有步骤，包括血液采集和稳定、运输、存储、CTC富集或分离。这种预处理标准化对于确保当前临床使用中的可靠检查结果至关重要，同时也对于开发新的CTC诊断检查并将其确立于临床医疗中至关重要。

附录A提供了CTC染色预分析工作流的关键步骤的决策指南。

本文档描述了标准化预处理过程以获得适当的CTC染色。

# 分子体外诊断检验 静脉全血循环肿瘤细胞（CTC）检验前处理过程 规范 第3部分：CTC染色分析准备

## 1 范围

本文件规定了静脉全血标本的处理、存储、CTC富集、CTC染色准备以及在预处理阶段对CTC染色的文档要求。该阶段发生在检查之前。

本文件适用于由医学实验室执行的体外分子诊断检查，包括实验室开发的测试。它还适用于实验室客户、体外诊断开发者、制造商、生物库、机构和从事生物医学研究的商业组织及监管机构。

本文件不涵盖适用于CTC冷冻保存和培养的预分析工作流程要求。

对于CTC基因组DNA和RNA的稳定化采取了不同的专门措施，这些内容未在本文件中描述，而是涵盖在ISO 7552-1和ISO 7552-2中。

注1：本文件中给出的要求也可适用于其他循环稀有细胞（如胎儿细胞）。

注2：国际、国家或区域的法规或要求也可适用于本文件中涉及的特定主题。

## 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，医学实验室 — 质量和能力要求

ISO 15190，医学实验室 — 安全要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 分样 allquot

从较大数量的均质物质中取出的一部分，假设取样误差可忽略。

注：该术语通常适用于液体。组织是异质的，因此不能进行分样。

[来源：ISO 20166-3:2018, 3.1]

### 3.2

#### 分析物 analyte

在可测量量中表示的成分。

[来源：ISO 17511:2020, 3.1, 修改—删除了示例]

### 3.3

#### 回流 backflow

液体流动方向与常规或期望方向相反。

### 3.4

#### 血液采集装置 blood collection set

专为静脉穿刺设计的静脉注射设备，包括不锈钢斜面针和带有塑料翼和连接器的管子（管道）。

注：连接器连接到另一个血液采集设备，例如血液采集管（3.5）

### 3.5

**血液采集管 blood collection tube**

用于血液采集的管子，通常在真空状态下工作，强迫血液通过针头从静脉流入管中。

## 3.6

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

存在于血液中的细胞，来源于肿瘤的原发或转移部位。

## 3.7

**封闭系统 closed system**

由供应商提供的不可修改系统，包含所有进行分析所需的组件（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**

一种方法，能够减少样本（3.21）中CTC（3.6）与其他细胞（包括白细胞）的比例。

## 3.9

**CTC分离 CTC isolation**

一种方法，结果是样本（3.21）中含有CTC（3.6）而不含其他细胞类型。

## 3.10

**诊断 diagnosis**

根据健康或疾病状态的标志和症状进行识别，诊断过程可以涉及检查（3.11）和测试，用于将个人的病情分类为不同的类别或子类别，从而为治疗和预后提供医学决策依据。

[来源：ISO 20184-1: 2018, 3.6]

## 3.11

**检验 examination****分析测试 analytical test**

一组操作，目的是确定属性的数值、文本值或特征。

注：检验包括从CTC染色开始的过程，并包括所有种类的参数测试或化学操作，用于定量或定性检查。

[来源：ISO 15189:2022, 3.8, 修改版——已删除原条目说明，并添加了新的条目说明：“分析性测试”作为首选术语已被添加]

## 3.12

**检验性能 examination performance****分析测试性能 analytical test performance****分析性能 analytical performance**

检验（3.11）过程检测或测量特定分析物的能力。

注1：分析性能是通过分析性能研究确定的，用于评估体外诊断检查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）、准确性、精密度和线性等特征。

[来源：ISO 20186-3:2019, 3.11]

## 3.13

**免疫细胞化学 immunocytochemistry**

一种原位检测技术，利用抗体特异性结合抗原（如蛋白质）来检测细胞内或细胞表面的抗原，使用明场显微镜进行观察。

## 3.14

**制造商 manufacturer**

法律上负责制造特定工作流程（3.26）组件的实体。

注：为了本文件的目的，制造商可以是检查（3.11）制造商、采集设备制造商、CTC富集（3.8）和分离制造商、核酸分离制造商。

## 3.15

**针头架 needle holder**

在常规静脉穿刺程序中使用的筒形器械，用于固定血液采集管（3.5）并保护静脉穿刺人员避免直接接触血液。

[来源：ISO 20186-2:2019, 3.16]

## 3.17

**预检过程 pre-examination process****预分析阶段 pre-analytical phase****预分析 workflow pre-analytical workflow**

从临床医生的要求开始，按时间顺序进行的过程，包括检查（3.11）要求、患者准备和身份确认、主要样本（3.18）的采集、样本的运输、实验室内的细胞富集和分析物（3.2）分离，直到分析性检查开始为止。

注：预检阶段包括影响预期检查结果的准备过程。

[来源：ISO 15189:2022, 3.24, 修改版——已将“预分析阶段”和“预分析 workflow”作为首选术语添加；在定义中，“用户请求”已改为“临床医生请求”；“细胞富集，分析物分离”已被添加到定义中；添加了条目1说明。]

## 3.18

**原始样本 primary sample****样本 specimen**

从人体体液或组织中取出的离散部分，或其他样本（3.21），用于检验（3.11）、研究或分析一个或多个量或特征，以确定整体的特征。

[来源：ISO 15189:2022, 3.25, 修改版——已删除条目1说明]

## 3.19

**能力验证 proficiency testing****PT**

通过跨实验室比较评估参与者的表现与预设标准的符合度。

[来源：ISO/IEC 17043:2023, 3.7, 修改版——已删除条目1说明]

## 3.20

**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。

## 3.21

**样本 sample**

从主要样本（3.18）中取出的一个或多个部分。

[来源：ISO 15189:2022, 3.28]

## 3.22

**稳定性 stability**

在指定条件下存储的样本（3.21）材料，维持在指定时间内的属性值在规定的范围内的能力。

[来源：ISO Guide 30:2015, 2.1.15, 修改版——“参考材料”被替换为“样本材料”；“指定”在“属性值”前被替换为“声明”；已删除条目1说明]

## 3.23

**储存 storage**

样本（3.21）或分析物（3.2）预分析 workflow（3.26）中长时间中断，或其衍生物，如染色切片或组织块，在适当的条件下存储，以保持其属性。

[来源：ISO Guide 30:2015, 2.1.15, 修改版——“参考材料”被替换为“样本材料”；“指定”在“属性值”前被替换为“声明”]

**3.24 验证 validation**

通过提供客观证据确认已满足特定使用或应用的要求。

注：术语“已验证”用于表示对应的状态。

[来源：ISO 9000:2015, 3.8.13, 修改版——已删除原始条目1至3的说明]

**3.25****确认 verification**

通过提供客观证据确认已满足指定的要求。

注1：术语“已确认”用于表示对应的状态。

注2：确认可以包括以下活动：

- 执行替代计算；
- 将新的设计规范与类似的已验证设计规范进行比较；
- 进行测试和演示；
- 审核发布前的文件。

[来源：ISO 9000:2015, 第3.8.12条, 修改版——已删除原注1和2, 并添加了条目2说明]

**3.26****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 一般要求**

参照ISO 15189、ISO/IEC 17020或ISO/IEC 17025有关医学实验室质量管理体系的一般声明。体外诊断（IVD）制造商应遵循ISO 13485。一般质量管理体系要求可在ISO 9001中找到。有关预检过程的其他一般要求，包括预采集活动、采集、运输、接收和标本处理，请参见ISO 20658和ISO 15189:2022, 第7.2条。

诊断工作流程的所有步骤都会影响最终的分析测试结果。因此，整个工作流程，包括生物分子稳定性以及标本和样本存储条件，必须在开发检查和体外诊断医疗设备开发过程中进行规范、验证和确认。在相关工作流程步骤中，必须进行风险评估，并制定减缓措施，以确保所需的分析测试性能。指导意见可参见ISO 14971和ISO 35001。

CTC分析通常涉及CTC富集（例如通过大小、免疫磁性或微流控方法）后进行CTC染色。由于标本/样本的性质以及程序的复杂性可能会影响CTC的形态和完整性，因此在预检工作流程中应采取适当的措施以保持CTC所需的特征。

CTC富集样本中WBCs或其他细胞的污染程度至关重要。CTC富集样本中WBCs的存在是不可避免的，且可能会影响检查的性能，例如由于非特异性结合的检测组分导致WBC计数的变化。为克服这一问题，可能需要进行CTC样本的分离步骤。

整个预检过程中，必须确保安全指令到位并得到遵循。应符合ISO 15189和ISO 15190中规定的要求。

在整个预检过程中，必须采取预防措施，避免不同标本或样本之间的交叉污染，例如在可行的情况下使用一次性材料，或在处理不同标本或样本之间使用适当的清洁程序。

在首次使用任何潜在危险物质（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。

对于所有预检步骤，若提供，应遵循检查制造商的指示。

如果由于正当原因（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 实验室外活动

### 5.1 标本采集

#### 5.1.1 一般要求

为了采集血液标本，应遵循第6条中列出的针对预定分子检查（如血液采集管类型、采集程序）的要求。

#### 5.1.2 关于标本供体/患者的信息

文档中应包括标本供体/患者的ID，可以以代码的形式提供。

文档应包括但不限于：

- a) 标本供体/患者的健康状态（例如健康、疾病类型、共病情况、人口统计学信息如年龄、性别等）；
- b) 标本采集前的医疗治疗和特殊治疗信息；
- c) 请求的检查类型和目的；
- d) 标本供体/患者的适当同意（参见 ISO 15189）；
- e) 血液采集的时间点（如患者休息或活跃时）。

注：一项近期研究表明，在乳腺癌患者的静止期，血液中的CTC浓度较高。

#### 5.1.3 实验室选择静脉全血采集管

CTC染色可能受到不当的静脉全血采集程序和不适当的存储/运输条件的影响，也可能受到富集和分离程序的影响。

由于CTC数量较少，富集过程中需要较高的回收效率。这可能受到CTC在运输和存储过程中的潜在不稳定性的影响，导致标本中CTC数量的减少或与富集系统的兼容性降低。

因此，应将静脉全血采集在具有稳定剂的适当采集管中，以保持CTC的完整性（CTC稳定剂）。

检查制造商的说明书应包含关于使用的血液采集管（或多种管）规格的要求。如果检查制造商指定了使用专用血液采集管，则应使用这些管。

如果检查制造商没有提供这些规格，但CTC富集或分离制造商指定了专用血液采集管，则可以作为实验室验证使用的管的依据。如果指定的血液采集管不符合检查要求，或没有制造商指定血液采集管，则实验室应指定、验证并记录血液采集管。由于采集后的CTC（数量和形态）的变化，静脉全血应采集在商业化的、含有CTC稳定剂的静脉全血采集管中，以保持CTC的形态和完整性。

应记录血液采集管的目录和批号。

如果检查制造商的说明没有要求使用任何CTC稳定剂，则应仅在检查制造商说明指定的情况下使用这些血液采集管。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不防止CTC的变化，但它可以防止血液凝块，从而最小化血液凝块对CTC的潜在影响。血液微凝块可能影响某些CTC富集过程。

因此，改变CTC亚群，或甚至严重阻碍整个CTC富集程序的程序。应考虑检查制造商的规格以获取更多细节。

注1：研究表明，在从不同肿瘤类型的患者中采集的EDTA静脉全血中，4小时内可以进行CTC检测。

注2：还有一些替代传统血液采集管基于CTC富集的方法。这些系统允许从更大的血量中进行体内和体外的CTC采样。

#### 5.1.4 从患者/供体采集静脉全血标本

应记录采集标本的人员身份。可以以姓名或代码的形式记录。应记录血液采集的日期和时间。

对于血液采集管（标本和样本标识）的标签，应该使用常规程序（例如，ISO 15189针对医疗实验室，或ISO 20387针对生物库），或类似的程序，带有可选的附加信息（例如2D条形码）。

可以使用标准的静脉穿刺技术，除非血液采集管制造商有不同的规定。为了避免在血液采集过程中（例如通过剪切作用使CTC溶解）CTC群体发生显著变化，应指定并验证在血液采集管的开发过程中使用足够大口径的适当针头，并要求防止可能的回流进入供体/患者体内。

血液采集管制造商应提供明确且验证的血液采集程序说明，并应遵循。在使用含CTC稳定剂的血液采集管时，可能需要使用血液采集套件和针头架。在这种情况下，应遵循采集套件和针头架制造商的说明，只要血液采集管制造商没有另行规定。

血液采集管应按照制造商的说明填写，并应注意确保采集管在血液采集过程中正确定位，以及所需的血液量。血液采集管开发商和制造商应指定并验证管子充填不足的极限。检查制造商应验证专用检查的规格。

注1：CTC的完整性可能会受到不当静脉全血采集程序的影响。

注2：含CTC稳定剂的血液采集管的充填不足可能会由于不利的稳定剂与CTC比例，影响稳定剂的功能。这样可能会妥协CTC，从而影响检查结果的有效性和可靠性。

血液采集管制造商的混合或倒转说明应立即在血液采集后执行。如果制造商没有提供关于混合或倒转的信息，应轻轻倒转每个采集管8至10次。

混合不当或不足是最常见的预检变量之一。除非血液采集管中的添加剂与标本充分混合，否则CTC可能会受到影响，这会影响检查结果的有效性和可靠性。因此，正确的混合方法应作为教育和定期培训所有血液采集人员的重点。

血液采集程序应根据医疗实验室的要求进行记录。任何篡改标本或向标本添加物质的行为都应进行记录。

## 5.2 标本存储和运输

### 5.2.1 一般要求

在选择和使用运输包装（例如存储和运输箱）时，可能需要遵守运输规定。必须制定并验证标本存储和运输的程序，并提供书面说明。应遵循并记录指定的存储和运输条件（例如温度和持续时间），包括任何偏差。

在指定的运输包装无法确保指定的存储和运输条件时，应以合适的方式进行温度监测。血液采集设施中的临时存储时间和运输到实验室的时间将共同构成存储和运输的总时长。应特别小心避免CTC溶解，因为这会改变CTC的群体。因此，标本不得冻结或剧烈摇晃。

### 5.2.2 使用含稳定剂的血液采集管的存储和运输

检查制造商应提供已指定并验证的指示，用于采集血液标本的存储和运输（例如，持续时间、温度），并且应遵循这些指示。

如果检查制造商未提供此类规格（例如，由于法律框架较宽松），则应由实验室指定、验证并记录该程序。

应根据用户编写相应的指示并遵循。血液采集管制造商关于存储和运输条件的规格可以作为实验室自己验证预定检查的基础/框架。

### 5.2.3 使用不含稳定剂的血液采集管的存储和运输

如果检查制造商指定使用不含稳定剂的血液采集管，则应提供已指定并验证的指示，用于采集血液标本的存储和运输（例如，持续时间、温度），并且应遵循这些指示。

如果检查制造商未提供此类规格（例如，由于法律框架较宽松），则应由实验室指定、验证并记录该程序。应通过时间过程研究分析目标分析物在血液采集后稳定性。

注：时间过程研究涉及在特定间隔内对相同变量进行反复观察，涉及的时间段（例如，时间0、2小时、6小时、12小时、24小时、36小时等）。这反映了对目标分析物稳定性的任何了解。通常，这涉及从同一供体采集的多个样本，重复数个供体。

根据时间过程研究的结果，可能需要立即处理标本，或者仅在短时间存储后进行处理，以优化CTC的恢复。

应根据用户编写相应的指示并遵循。

应指定并验证存储的最大持续时间和温度，以确保用于预定检查。

## 6 实验室内活动

### 6.1 标本接收

应记录接收标本或样本的人员身份。这可以以姓名或代码的形式记录。应检查标本或样本的正确身份。应包括临床信息（参见5.1.1和5.1.2）、住院号、患者或供体的姓名以及患者或供体的出生日期。在某些情况下，例如在研究研究中，可能只需要使用代码。在某些情况下，应记录标签、存储和运输条件（例如温度、持续时间）与规格的非一致性以及血液量差异、破损管等。应有处理非一致性情况的程序。

如果出现非一致性情况，例如使用未指定的血液采集管、运输条件、整体存储和运输持续时间或血液量或意外冻结，这些都可能影响检查结果的有效性和可靠性，则应获取新的标本。

## 6.2 标本存储后的运输与接收

如果需要在实验室进一步存储标本，应记录存储温度以及开始存储标本或样本的日期和时间。存储温度和总存储时长不得超过5.2中规定的规格。

标本的总存储时间包括在血液采集设施（5.1.4）中的存储时间、运输到实验室（5.2）以及在实验室或其他机构中的进一步存储时间。检查制造商规定的最大存储时间，或者如果没有规定，由实验室（参见5.2）规定的最大存储时间不得超过。

## 6.3 CTC 的富集

### 6.3.1 一般要求

CTC检查通常需要从其他细胞类型中富集CTC，通常是白细胞。CTC富集是通过基于物理（例如，细胞大小、细胞变形能力）或生物学特性（例如，特定表位的存在）来实现的。有关CTC富集程序的更多细节，请参见附录A。不同的CTC富集方法可以得到不同的产量（回收的CTC数量）和不同的CTC与白细胞的比例。此外，不同的富集方法可以选择不同的CTC亚群（例如，上皮细胞、间充质细胞）。这些方面应在设计、验证和验证检查时考虑（例如，指定所需CTC的最小数量、可接受的白细胞污染最大百分比）。这可以通过分析从已建立的细胞系中在富集程序前后插入的癌细胞的回收率来完成。如果发生不可接受的CTC产量，则应采取措施最小化变化，例如在开始富集前添加CTC稳定剂。

血液采集管中的CTC稳定剂在CTC富集过程中也可能有效，这取决于稳定剂的化学特性。如果在CTC富集过程中使用的稳定剂不再有效，则应为CTC富集过程添加额外的稳定剂。

为了最小化与扩增核酸的交叉污染，CTC的富集不应在与核酸扩增步骤相同的区域内进行，除非使用封闭系统，这些系统已验证可避免目标应用的交叉污染。

### 6.3.2 使用商用 CTC 富集系统进行诊断使用

检查制造商应提供指定并验证的CTC富集指示，并应遵循这些指示。

如果检查制造商没有提供此类规格（例如，由于法律框架较宽松），则血液采集管制造商和/或CTC染色预处理系统的制造商已指定并验证一个或多个专用的商用CTC富集系统，这些可以作为实验室检查特定验证的基础/框架。

如果这些制造商没有提供规格（例如，由于法律框架较宽松），则实验室应选择、指定、验证并记录一个适合诊断使用的CTC富集系统（如果可用）。使用说明应相应编写并遵循。

如果所选的CTC富集程序不能充分支持指定的检查性能特征，则实验室应相应地修改程序（例如，通过增加血液标本或样本的体积，通过修改施加的过滤压力，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

如果没有可用于诊断的商业化CTC富集程序可以成功验证预定的检查（见6.3.2），则实验室应通过以下方式之一开发自己的程序：

- 修改现有的 CTC 富集程序以供诊断使用；
- 使用仅供研究使用并可以根据需要修改的商业化系统；或
- 开发自己的 CTC 富集系统。

从上述选项中选择程序应指定、验证，并最终根据风险评估（见第4条）对预定检查用途进行验证。使用说明应根据验证结果编写并遵循。

## 6.4 富集 CTC 的质量

如果预定的检查要求CTC质量评估，检查制造商应提供指定并验证的指示，并应遵循这些指示。开发者/制造商和医学实验室应定期测试CTC富集/隔离，在CTC分析能力验证测试（PT）程序中进行，如果该程序可用。有关PT的更多信息，请参见ISO 15189。

## 6.5 富集 CTC 的存储

检查制造商应提供指定并验证的富集CTC存储指示，并应遵循这些指示。

如果没有提供检查制造商的指示（例如，由于法律框架较宽松），但CTC富集试剂盒制造商和/或血液采集管制造商已指定存储条件，这些可以作为实验室检查特定验证的基础/框架。

如果这些指示无法通过检查成功验证，或如果没有提供这些指示，则存储条件应由实验室指定、验证并记录。使用说明应根据验证结果编写并遵循。

富集CTC的最大存储时间应在定义的温度（例如室温或2° C至8° C）下确定，以确保不会对检查性能特征产生负面影响。应通过运行时间过程实验来分析富集CTC数量随时间变化的潜在变化，例如，通过分析30分钟、60分钟、90分钟和120分钟后的变化。

## 6.6 CTC 染色的准备

### 6.6.1 一般要求

在CTC富集后，CTC被染色并通过免疫细胞化学或其他技术进一步表征。CTC具有与其来源肿瘤类型一致的形态学特征。

CTC在细胞外观上表现出高度的患者间和患者内异质性，这与原发性和转移性肿瘤中常见的细胞形态学异质性一致。

尽管CTC在形态学上与正常的白细胞（WBC）不同，并且可以根据标准的诊断细胞病理学标准（即细胞尺寸、核质比）来识别，但应考虑肿瘤特异性蛋白的免疫化学染色用于CTC的识别。

### 6.6.2 不同染色技术的预处理（抗体、染色、原位技术）

#### 6.6.2.1 总则

当染色技术需要预处理步骤时，应对这些步骤进行规定和验证（例如孵育时间、缓冲液/酶浓度和温度）。这应针对预期检查所使用的每种 CTC（循环肿瘤细胞）稳定和富集方法进行规定和验证（例如特定抗原/表位和抗体，或核酸靶标和探针）。

在血液采集管中使用的 CTC 稳定剂和/或在 CTC 富集过程中或其他任何预检步骤中施加的稳定剂，可能含有可改变 CTC 细胞内及表面标记的化学物质（例如甲醛或类似化合物形成的交联物）。根据检测要求，可能需要去除这些修饰，或通过专门的 CTC 染色预处理步骤使其与检测相容。特别是，对于基于抗体或其他亲和结合剂（如免疫细胞化学、免疫荧光染色）的染色技术，应确定是否需要抗原修复（AR，也称为表位修复 ER）。

如果在预检步骤中未使用稳定剂处理 CTC，则通常不需要特定的预处理。然而，在某些情况下，可能需要对 CTC 进行富集后的固定，因为所使用的染色抗体仅识别已修饰的表面标记。

对于经典染色（如苏木精-伊红染色），通常不需要预处理步骤。相比之下，检测细胞内靶标的实验通常需要 CTC 的透化预处理。特别是，对于基于核酸杂交的技术，应确定是否需要包含细胞透化的杂交前处理步骤。

#### 6.6.2.2 使用用于诊断的 CTC 染色商业化预处理系统

检测方法的生产商应提供已规定并验证的 CTC 染色预处理说明，并应遵循。

当检测方法的生产商未提供此类说明（例如由于法律框架要求较宽松），但血液采集管生产商和/或 CTC 富集方法生产商已规定并验证了一种或多种专门的、可商业获得的 CTC 染色预处理系统时，这些系统可作为实验室进行特定检测验证的依据/框架。

当上述生产商均未规定和/或验证特定的 CTC 染色预处理时，实验室应选择、规定、验证并记录一种适当的 CTC 染色预处理方法，该方法应在可能情况下经批准用于诊断。使用说明应相应编写并遵循。

当所选的 CTC 染色预处理程序不足以支持规定的检测性能特征时，实验室应相应修改该方法（例如修改预处理温度或改变透化试剂浓度）。

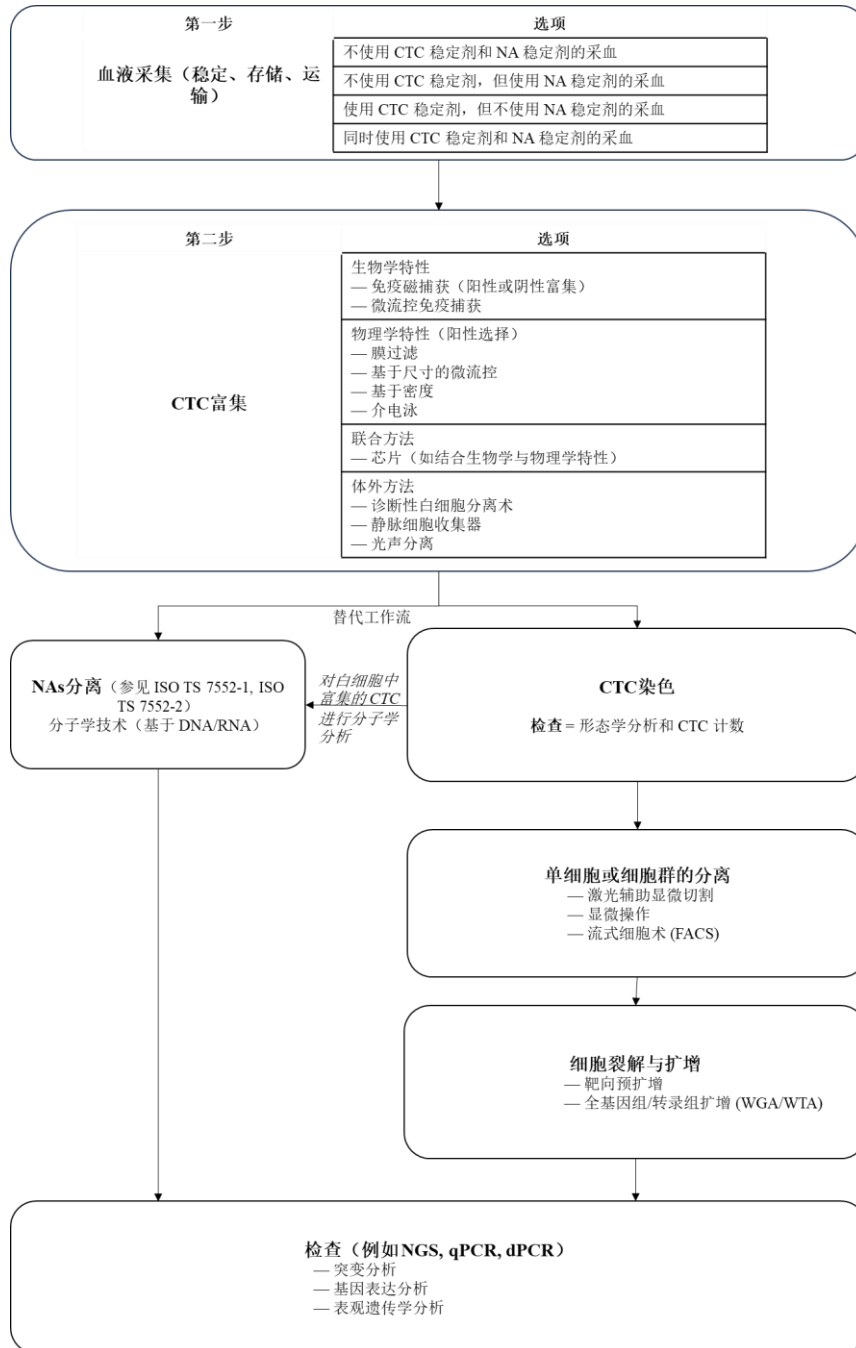
### 6.6.2.3 使用实验室自研的 CTC 染色预处理方法

当没有可商业获得的、用于诊断的 CTC 染色预处理方法能够与预期检查（见 6.6.2.2）成功验证时，实验室应开发自己的方法，可以通过以下方式之一实现：

- 修改现有的 CTC 染色预处理方法以用于诊断；
- 使用仅限科研用途的商业化系统，并根据需要进行修改；
- 开发实验室自有的 CTC 染色预处理方法。

从以上选项中选择程序必须被规定、验证，并最终基于风险评估（见第 4 条）的结果加以确认，以确保其适用于预期的检测用途。使用说明应相应编写并遵循。

附录 A  
(资料性)  
CTC 分析前流程关键步骤决策指南



图A.1 CTC 分析前流程关键步骤决策指南

## 参 考 文 献

- [1] ISO Guide 30:2015, *Reference materials — Selected terms and definitions*
- [2] ISO/TS 7552-1, *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for circulating tumour cells (CTCs) in venous whole blood — Part 1: Isolated RNA*
- [3] ISO/TS 7552-2, *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for circulating tumour cells (CTCs) in venous whole blood — Part 2: Isolated DNA*
- [4] ISO 9000:2015, *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*
- [5] ISO 9001, *Quality management systems — Requirements*
- [6] ISO 13485, *Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes*
- [7] ISO 14971, *Medical devices — Application of risk management to medical devices*
- [8] ISO 17020, *Conformity assessment — Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection*
- [9] ISO 17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*
- [10] ISO 17511:2020, *In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples*
- [11] ISO 20166-3:2018, *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination 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 20186-1:2019, *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Part 1: 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 35001, *Biorisk management for laboratories and other related organisations*
- [19] 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. *Molecular Cancer*. 2022, 21:79
- [20] Chemi F., Mohan S., Guevara T., Clipson A., Rothwell D.G., Dive C. Early Dissemination of Circulating Tumor Cells: Biological and Clinical Insights. *Frontiers in Oncology*. 2021, 11, 672195
- [21] Zaviridou M., Strati A., Bournakis E., Smilkou S., Tserpeli V., Liandlou 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*. 2021, 13:780
- [22] 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, 22;6(1):404
- [23] Josse S.A., Georges T.M., Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol.Med*. 2015, 7(1):1
- [24] Lianidou E.S., Markou A. Molecular assays for the detection and characterization of CTCs. *Recent Results. Cancer Res*. 2012, 195:111
- [25] Dhar M., Pao E., Renier C., Go D.E., Che J., Montoya R. et al. Label-free enumeration, collection and downstream cytological and cytogenetic analysis of circulating tumor cells. *Sci. Rep*. 2016, 35474
- [26] Panabieres C.A. and Pantel K. Liquid Biopsy: from discovery to clinical application. *Cancer Discov*. 2021, 11(4):858
- [27] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology, Gold Book Version 2.3.3*. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2014
- [28] Horwitz W. Nomenclature for sampling in analytical chemistry (Recommendations 1990). *Pure Appl. Chem*. 2009; 62:1193-1208
- [29] Calvert J. *Glossary of atmospheric chemistry terms (Recommendations 1990)*. Pure Appl. Chem. 2009
- [30] Diamantopoulou Z., Castro-Giner F., Dominique Schwab F., Foerster C., Saini M., Budinjas S., et al. The metastatic spread of breast cancer accelerates during sleep. *Nature*. 2022; 607(7917):156
- [31] 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, 14:23
- [32] Pinzani P., Scatena C., Salvianit F., Corsini E., Canu L., Poli G., et al. Detection of circulating tumor cells in patients with adrenocortical carcinoma: a monocentric preliminary study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013, 98(9):3731
- [33] Mascalchi M., Maddau C., Sali L., Bertelli E., Salvianit C., Zuccherelli S. et al. Circulating tumor cells and microemboli can differentiate malignant and benign pulmonary lesions. *J. Cancer.* 2017, 8(12):2223
- [34] Mazzini C., Pinzani P., Salvianit F., Scatena C., Paglierani M., Ucci E., et al. Circulating tumor cells detection and counting in uveal melanomas by a filtration-based method. *Cancers (Basel).* 2014, 6(1):323
- [35] De Giorgi V., Pinzani P., Salvianit F., Camelos J., Paglierani M., Janowska A. et al. Application of a filtration- and isolation-by-size technique for the detection of circulating tumor cells in cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2010; 130(10):2440
- [36] Broncy L., Njima B.B., Mège A., Bérout C., Romdhane K.B., Ilie M. et al. Single-cell genetic analysis validates cytopathological identification of circulating cancer cells in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2018, 9(28):20058
- [37] 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, 110(41):16580
- [38] 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, 64(3):536
- [39] Marrinucci D., Bethel K., Lutgen M., Bruce R.H., Nieva J., Kuhn P. Circulating tumor cells from well differentiated lung adenocarcinoma retain cytomorphologic features of primary tumor type. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2009, 133(9):1468
- [40] De Luca F., Rotunno G., Salvianit F., Galardi F., Pestrin M., Gabellini S. et al. Single circulating tumor cell sequencing as an advanced tool in cancer management. *Oncotarget.* 2016, 7(18):26107
- [41] Marrinucci D., Bethel K., Lazar D., Fisher J., Huynh E., Clark P., et al. Cytomorphology of Circulating Colorectal Tumor Cells: a small case series. *J Oncol.* 2010, 2010:861341
- [42] Marrinucci D., Bethel K., Bruce R.H., Curry D.N., Hsieh B., Humphrey M. et al. Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells. *Hum. Pathol.* 2007, 38(3):514