



中华人民共和国国家标准化指导性技术文件

GB/Z XXXXX—XXXX

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

Molecular in vitro diagnostic examinations-specifications for pre-examination processes for circulating tumour cells (CTCs) in venous whole blood-Part 2:Isolated DNA

(ISO/TS 7552-2: 2024; IDT)

(工作组讨论稿)

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

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

1 范围

本文件规定了在进行分子检查前的检查阶段期间，用于检测循环肿瘤细胞（CTCS）DNA分离的静脉全血标本的处理、储存、CTC富集和分离、DNA分离和储存以及文件记录的要求和建议。

本文件适用于分子体外诊断检查，包括医学实验室进行的实验室自建检测，也适用于实验室客户、体外诊断开发商和制造商、生物样本库、开展生物医学研究的机构和商业组织以及监管机构。

本文件不涉及直接从含有CTC的静脉全血中分离基因组DNA，相关要求见ISO 20186-2。

本文件不涉及特定白细胞的分离及其后续基因组DNA提取，也不涵盖活性循环肿瘤细胞（CTC）冷冻保存与培养所需的预分析工作流程要求。

注1：本文件所述要求亦适用于其他循环罕见细胞（e. g. foetal细胞）。

注2：国际、国家或地区法规及要求可能对本文件涉及的具体主题具有约束力。

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—质量与能力要求

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

等分

假设取样误差可忽略不计时，将大量均质材料中的一部分进行分装。

注：该术语通常用于液体。组织具有异质性，因此无法进行分装。

[来源：ISO 20166-3：2018,3.1]

3.2

分析物

由可测量量的名称所表征的组成部分

[来源：ISO 17511：2020,3.1，修改——已删除示例。]

3.3

逆流

液体的流动方向与通常或期望的方向相反

3.4

采血装置

静脉穿刺专用的静脉内装置，由不锈钢斜面针头和管（导管）组成，带有连接的塑料翼片和接头

注：连接器连接到额外的血液采集装置e. 8. a血液采集管（3.5）。

3.5

采血管

用于血液采集的试管通常处于真空状态，该真空环境所产生的负压可有效驱动血液自静脉经由采血针流入试管内。

3.6

循环肿瘤细胞**CTC**

血液中存在的细胞，来源于肿瘤的一个或多个主要转移部位

3.7

封闭系统

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

[来源：ISO 20186-2: 201936]

3.8

CTC 富集

一种能够降低样本中CTCS（3.6）与其他细胞（包括白细胞）比例（3.21）的方法

3.9

CTC 分离

使得到的样品（3.21）含有CTC（3.6），同时不含任何其他细胞类型的方法

3.10

脱氧核糖核酸

脱氧核糖核苷酸的聚合物，以双链（dsDNA）或单链（ssDNA）形式存在

[来源：ISO 22174: 2024,3.1.6]

3.11

脱氧核糖核酸能力验证计划**DNA PT程序**

基于 DNA 的检测的能力验证（3.19）（3.13）

3.12

诊断

根据体征和症状来确定健康或疾病状态，其中诊断过程可以包括检查（3.13）和测试，将其划分成不同的独立类别或子类别，从而做出关于治疗和预后的医疗决策

[来源：ISO 20184-1: 2018,3.6]

3.13

检查**分析测试**

一组旨在确定某项属性的数值、文本值或特征的操作集合。

注：此类过程始于已分离的分析物（3.2），并包括各类参数检测或化学操作，用于定量或定性分析。

[来源：ISO 15189:2022, 3.8, 修改——删除了原始注释，新增注 1：“分析测试”已被列为首选术语。]

3.14

检验性能**分析测试性能****分析性能**

测量或检测特定分析物（3.2）的检测程序（3.13）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验（3.13）程序测量或检测特定分析物（3.2）的能力。

注2：分析性能包括诸如分析灵敏度、检测限、分析特异性（干扰和交叉反应）、准确性、精密度和线性等特性。

[来源：ISO 20186-3:2019, 3.11]

3.15

制造商

对特定工作流程（3.26）组件的制造负有法律责任的实体

注：就本文件而言，制造商可以是检测（3.13）制造商、收集装置制造商、CTC 富集（3.8）和分离制造商、核酸分离制造商。

3.16

采血针持针器

在常规静脉穿刺过程中使用的管筒，用于固定采血管（3.5），并保护采血人员免受血液直接接触
[来源：ISO 20186-1:2019, 3.16]

3.17

检测前程序**预分析阶段****预分析工作流程**

从临床医生提出请求开始，按时间顺序排列，包括检查（3.13）请求、患者准备和身份确认、采集原始样本（3.18）、运输至实验室及在实验室内的运输、细胞富集以及分析物（3.2）的分离，直至分析检查开始为止的这一过程。

注：进入项：预检查阶段包括影响预期结果的准备过程。考试。

[来源：ISO 15189:2022, 3.24, 修改——增加了“分析前阶段”和“分析前工作流程”作为首选术语；在定义中，“用户请求”已改为“临床医生请求”；在定义中增加了“储存、细胞富集、分析物分离”；增加了条目注释 1。]

3.18

原始样本**标本**

从人体采集的用于检查（3.13）、研究或分析一个或多个量或特征以确定整体特征的体液、组织或其他样本（3.21）的离散部分

[来源：ISO 15189:2022, 3.25, 修改 - 条目注释 1 已删除。]

3.19

能力测试**PT**

通过实验室间比较，根据预先确定的标准对参与者的表现进行评估

[来源：ISO/IEC 17043: 2023,3.7, 修改——条目中的注释1已删除。]

3.20

室温

温度在18℃到25℃范围内

注释1：地方或国家法规可以有不同的定义。

3.21

样品

一个或多个从主样品中取出的部分（3.18）

[来源：ISO 15189: 2022,3.28]

3.22

稳定性

样品（3.21）材料在规定条件下储存时，在规定时间内保持规定的性能值在规定限度内的能力

[来源：ISO 指南 30:2015, 2.1.15, 修改了“参考材料”一词，将其替换为“样品材料”；“指定的”替换为“在所述属性值之前已陈述的”。删除了注 1。]

3.23

储藏

在适当条件下，对样本（3.21）或分析物（3.21）的预检验工作流程（3.26）进行长时间中断，或对其衍生物（如染色切片、组织块等）实施长期保存，以维持其原有特性。

注：此类长期保存通常在实验室档案库或生物样本库中进行。

[来源：ISO 20166-3:2018, 3.21]

3.24

验证

通过提供客观证据，证实已满足特定预期用途或应用的要求

注：“已验证”一词用于指定相应状态。

[来源：ISO 9000: 2015,3.8.13, 修改——条目中原来的注释1至3已被删除。]

3.25

证明

通过提供客观证据确认特定要求已得到满足

注1：术语“已验证”用于指定相应状态。

注2：确认可包括以下活动：

- 执行替代计算；
- 将新设计规范与类似已验证的设计规范进行比较；
- 承担试验和演示；
- 在发布前审查文件。

[来源：ISO 9000：2015,3.8.12，修改——删除了条目中的原始注释1和2，并添加了条目的注释2。]

3.26

工作流程

完成任务所需的系列活动

[来源：ISO 20166 - 3：2018，3.25]

4 一般性考虑

关于医学实验室质量的一般声明，请参见ISO 15189、ISO/IEC 17020或ISO/IEC 17025管理体系。体外诊断（IVD）制造商应遵循ISO 13485。一般质量管理体系要求可参见ISO 9001。关于检查前过程的其他一般要求，包括样本的采集前活动、采集、运输、接收和处理，参见ISO 20658和ISO 15189：2022，7.2。

诊断流程的每个步骤都可能影响最终检测结果。因此，在体外诊断医疗器械的研发过程中，必须对整个工作流程进行规范、验证和确认，包括生物分子稳定性以及样本与样品的储存条件。需要针对相关工作步骤开展风险评估，分析其对检测性能的潜在影响，并制定相应的改进措施以确保达到预期检测效果。ISO 14971和ISO 35001标准对此提供了具体指导。

循环肿瘤细胞（CTC）分析通常在提取DNA之前包含CTC富集步骤（例如通过大小、免疫磁性或微流控方法）（见附录A）。根据检查要求，在CTC富集之后，富集的CTC可以在提取DNA之前进行进一步的表征和选择（见6.4、6.6和附录A）。由于样本的性质以及可能影响DNA产量、纯度和完整性的复杂程序，应在检查前的工作流程中采取适当措施，以获得适合检查的CTC来源的DNA的数量和质量。

循环肿瘤细胞（CTCs）与白细胞或其他细胞的污染程度至关重要。在富集CTC的样本中存在白细胞是不可避免的，且可能严重影响检测性能（例如体细胞突变检测的灵敏度）。为解决这一问题，可能需要通过分离步骤获取纯净的GTC样本以进行DNA分离。

在整个预检验过程中，应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，或者在处理不同标本或样本之间采用适当的清洁程序。整个预检验过程的安全说明应到位并遵循，且应符合ISO 15189和ISO 15190中规定的要求。

在首次使用任何潜在危险材料（例如稳定剂中的化学物质）之前，应考虑制造商的材料安全数据表。对于所有预检验步骤，应遵循检验制造商的说明。

如果出于正当理由（例如未满足患者需求）未按照制造商的说明使用商业产品，其验证、确认、使用和性能的责任在于实验室。

5 实验室外的活动

5.1 标本采集

5.1.1 对于血液样本的采集，应遵循第6条中针对预期分子检测所规定的各项要求（例如：采血管类型、采集程序）。

5.1.2 患者/标本供体信息

关于患者/标本捐赠者的资料

文件应包含标本捐赠者/患者的标识，其形式可以是代码。

文件应包括但不限于：

- a) 标本捐赠者/患者的相关健康状况（例如健康状况、疾病类型、伴随疾病、年龄、性别和性取向等人口统计信息）；
- b) 采血前的医疗和特殊治疗信息；
- c) 所要求的检查类型和目的；
- d) 标本捐赠者/患者的适当同意书（见 ISO15189）；
- e) 采血时间点（如患者休息或活动时间）。

注：最近的一项研究表明，乳腺癌患者在休息阶段血液中的循环肿瘤细胞（CTC）浓度较高。[33]

5.1.3 实验室对于静脉全血采集管的选择

由于循环肿瘤细胞（CTC）数量较少，在富集过程中需要较高的回收效率。这可能会受到 CTC 在运输和储存过程中潜在不稳定性的阻碍，导致样本中的 CTC 数量减少或与富集系统兼容性降低。[34] 因此，静脉全血应收集在含有稳定剂的适当采集管中，以保持 CTC 的完整性，从而能够进行灵敏的 DNA 检测。

检测制造商的说明应包含所使用的血液采集管的规格。如果检测制造商指定了专用的血液采集管，则应使用这些采集管。

如果检测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的血液采集管，这可以作为实验室检测用管验证的依据。如果指定的血液采集管不符合检测要求，或者没有制造商指定血液采集管，则应使用符合检测要求的血液采集管。实验室应指定、验证并记录采血管。由于采集后循环肿瘤细胞（CTC）的数量和形态存在变异性，静脉全血应采集于市售的含 CTC 稳定剂的静脉全血采集管中，以确保获得足够的 DNA 产量（CTC/DNA 稳定剂），满足预期检测要求。

应记录采血管的目录和批次号。

除非检测制造商的说明中另有规定，否则不得使用不含任何 CTC/DNA 稳定剂的采血管。在这种情况下，应使用常规采血管，例如含 EDTA 的管子，尽管 EDTA 不能防止 CTC 发生变化，但能防止血液凝固，从而最大程度减少血凝块对 CTC 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 富集过程。应考虑检查制造商的规范以获得进一步的详细信息。

注1：研究表明，对于不同肿瘤类型的患者，从抽血后4小时内采集的EDTA全血中可检测到循环肿瘤细胞。[35-40]

注2：除传统基于血液采集的循环肿瘤细胞富集方法外，还存在其他替代方案。这些系统能够从更大体积分量的血液中进行体内和体外循环肿瘤细胞采样。[41-42]

5.1.4 从患者/供体采集静脉全血标本

采集样本人员的身份应予以记录。这可以通过姓名或代码的形式进行记录。血液采集的日期和时间也应予以记录。

对于血液采集管的标签（包括样本和样本标识），应采用常规程序（例如医学实验室的 ISO 15189 或生物样本库的 ISO 20387）或类似程序，并可选择添加额外信息（例如二维条形码）。

若血液采集管制造商未作特别规定，可使用标准静脉穿刺技术。为避免在血液采集过程中 CTC 群体发生显著变化（例如 CTC 因剪切力而破裂），在开发用于采集血液中 CTC 的血液采集管时，应指定并验证合适规格的针头。

可能需要采取措施防止血液回流到供血者/患者体内。

血液采集管制造商应提供经过指定和验证的血液采集程序说明。应遵循这些说明。可能需要使用血液采集套装和针头固定器。使用含有 CTC/DNA 稳定剂的采血管。在这种情况下，应遵循采血管套装和持针器制造商的说明，除非有不同且经过验证的说明（例如由采血管制造商提供）。

应按照制造商的说明填充采血管，并注意在采血过程中正确放置 CTC 管以及所需的血量。采血管制造商应指定并验证管子未充满的限度。检验制造商应验证专用检验的规格。

注1：静脉全血采集程序不当会影响 CTC 的完整性。

注2：含有 CTC/DNA 稳定剂的采血管未充满会影响稳定剂的功能，因为血液与稳定剂的比例不理想。这本身可能会损害 CTC，从而影响检验结果的有效性和可靠性。

应遵循采血管制造商关于采血后立即混合或倒置管子的说明。如果制造商的说明中未给出关于混合或倒置的信息，每个采血管应轻轻倒置 8 到 10 次。混合不正确或混合不充分可能是最常见的检验前变量之一。

除非血液采集管中的添加剂与样本均匀混合，否则循环肿瘤细胞（CTCs）和 DNA 可能会受到损害，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血液采集人员教育和定期培训的重点。

应按照医学实验室的要求记录血液采集程序。任何对样本的篡改和添加都应予以记录。

5.2 标本的保存和运输

5.2.1 概要

在选择和使用运输包装（例如用于储存和运输的箱子）时，运输规定可能适用。应制定并验证用于样本储存和运输的特定程序，并提供书面说明。应遵循并记录指定的储存和运输条件（例如温度和持续时间），包括任何偏离这些条件的情况。

如果指定的储存和运输条件（例如通过指定的运输包装）无法得到保证，应以适当的方式进行温度监测。在采血设施中的临时储存时间和运输到实验室的时间共同构成了储存和运输的总时长。应特别注意避免 CTC 裂解，因为这会改变 CTC 细胞群。因此，样本不得冷冻或剧烈摇晃。

5.2.2 使用含稳定剂的采血管进行储存和运输

检验制造商应提供所采集血液样本的储存和运输的明确且经过验证的说明（例如持续时间、温度），并应遵循这些说明。

若检验制造商未提供此类说明（例如由于法律框架不那么严格），实验室应自行明确、验证并记录储存和运输程序。

应为用户提供相应的说明，并予以遵循。血液采血管制造商关于储存和运输条件的说明可作为实验室针对预期检验进行自身具体验证的基础/框架。

5.2.3 使用不含稳定剂的采血管进行储存和运输

若检验制造商指定使用不含稳定剂的采血管，应提供所采集血液样本的储存和运输的明确且经过验证的说明（例如持续时间、温度），并应遵循这些说明。

若检验制造商未提供此类说明（例如由于法律框架不那么严格），实验室应自行明确、验证并记录储存和运输程序。这应通过时间进程研究来完成，即分析血液采集后目标检测分析物的稳定性。

注：时间进程研究涉及在相关时间段内（例如，时间 0、2 小时、6 小时、12 小时、24 小时、36 小时、48 小时）对相同变量进行重复观察。这体现了对目标分析物稳定性的系统性认知。通常，需从同一供体的单次血液采集样本中获取多个等分试样，并在多名供体中重复进行，以确保数据的可靠性和代表性。

根据时间进程研究的结果，可能需要尽快处理样本或仅在短时间储存后处理样本，以尽量减少 DNA 变化并最大限度地提高 CTC 回收率。

应相应地为用户编写说明并遵循。

应规定并验证用于预期检查的储存库的最大储存期限和温度。

6 实验室内的活动

6.1 标本接收

接收标本或样本人员的身份应予以记录。这可以通过姓名或代码的形式进行记录。应检查标本或样本的正确身份。这应包括临床信息[见 5.1.1 和 5.1.2]、住院号、患者或供体姓名以及患者或供体的出生日期。在某些情况下，例如在研究中，可能只需要使用代码。应记录到达日期、时间以及标签、储存和运输条件（例如温度、持续时间）的不符合项，以及与规格不符的血量差异、管子泄漏/破裂等情况。应制定处理不符合项的程序。

如果存在不符合项，例如使用了非指定的采血管、运输条件、总体储存和运输时间或血量不符合要求，或者意外冷冻可能影响检测结果的有效性和可靠性，则应重新采集标本。

6.2 运输和接收后的样本储存

若在实验室需要进一步储存，应记录储存温度以及开始样本或样品储存的日期和时间。

储存温度和总储存时长不得超过 5.2 中规定的规格。

样本的总储存时长包括在采血机构的储存时长（5.1.4）、运输至实验室的时长（5.2.2）以及在实验室或其他机构的进一步储存时长。

不得超过检验制造商规定的最大储存时长；若制造商未规定，则不得超过实验室规定的最大储存时长（见 5.2.2）。

6.3 循环肿瘤细胞的富集

6.3.1 总则

循环肿瘤细胞（CTC）的检测通常需要从其他细胞类型（通常是白细胞）中富集出循环肿瘤细胞。循环肿瘤细胞的富集是基于这些细胞的物理特性（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）来实现的。[24]有关循环肿瘤细胞富集程序的更多详细信息，请参见附录 A。不同的循环肿瘤细胞富集方法可能在回收的循环肿瘤细胞数量（即富集效率）和循环肿瘤细胞与白细胞的比例方面存在差异。此外，不同的富集方法可能会选择不同的循环肿瘤细胞亚群（例如上皮细胞、间质细胞）。[23]在设计、验证和确认检测方法时，应考虑这些方面，例如通过指定所需的循环肿瘤细胞最小数量和可接受的白细胞污染最大百分比。这可以通过在富集程序之前和之后分析来自自己建立细胞系的掺入癌细胞的 DNA 来完成。如果富集效果不理想，应采取措施减少变化，例如在开始富集前添加循环肿瘤细胞稳定剂。

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

为将与扩增核酸的交叉污染降至最低，CTC富集不应在检查过程中的核酸扩增步骤所在的同一区域进行，除非使用了经过验证可避免交叉污染的封闭系统，且该系统适用于预期用途。

6.3.2 使用用于诊断用途的商业 CTC 富集系统

检测产品制造商应提供有关循环肿瘤细胞（CTC）富集的确切且经过验证的说明，并应予以遵循。

如果检测产品制造商未提供此类说明（例如由于法律框架不那么严格），但血液采集管制造商和/或CTC分离制造商和/或 DNA 分离试剂盒制造商已指定并验证了一种或多种专用的市售CTC富集系统，则这些可以作为实验室检测特定验证的基础/框架。

注：市售的CTC富集系统有时可以与CTC DNA、CTC RNA和CTC蛋白质分离试剂盒一起整合到市售的检测前工作流程的部分环节中，而其他市售解决方案则是独立的程序，最终以CTC 富集结束。

如果这些制造商均未指定并验证特定的CTC富集系统，实验室应选择、指定、验证并记录适用于诊断用途的适当CTC富集系统（如有）。应编写并遵循相应的使用说明。

如果所选的循环肿瘤细胞（CTC）富集程序不能充分支持指定的检测性能特征，实验室应相应地对其进行修改（例如，通过增加血液样本或样本的体积、调整过滤时施加的压力、调整捕获抗体的量或使用额外的抗体进行CTC富集）。

6.3.3 使用实验室开发的循环肿瘤细胞富集程序

若无法成功验证任何适用于诊断用途的市售循环肿瘤细胞富集程序（见 6.3.2），实验室应自行开发程序，方法如下：

- 对现有的诊断用途循环肿瘤细胞富集程序进行修改；
- 使用仅供研究用途的市售系统，并根据需要进行修改；或
- 开发自己的循环肿瘤细胞富集系统。

从上述列表中选择程序应根据风险评估（见第 4 条）的结果进行指定、验证和最终确认，以满足预期检查用途。应相应编写使用说明并严格遵循。

6.4 质量评估富集的循环肿瘤细胞

若预期检测需要对循环肿瘤细胞（CTC）的质量进行评估，检测制造商应提供明确且经过验证的说明，并应遵循这些说明。

若未提供此类说明（例如由于法律框架不那么严格），但循环肿瘤细胞分离制造商和/或循环肿瘤细胞DNA分离试剂盒制造商提供了此类说明，这些说明可作为实验室检测特定验证的基础/框架。若此验证不成功，实验室应修改循环肿瘤细胞富集质量评估程序或自行开发。

若实验室自行开发循环肿瘤细胞富集质量评估程序，通常可采用对富集的循环肿瘤细胞进行图像分析的方法，例如通过苏木精和伊红染色来确定典型的肿瘤细胞特定形态特征，如细胞尺寸和核质比（参见ISO/TS 7552-3和参考文献 [43]），或者使用荧光标记抗体进行更具体的表面蛋白染色。

染色可能会影响循环肿瘤细胞 DNA 图谱检测，导致 DNA 降解或干扰检测。这种风险可以通过使用DNA稳定剂和/或采用不含DNA酶的染色试剂来降低。因此，在开发检测方法期间，应验证CTC染色程序与DNA图谱检测的兼容性。

6.5 富集到的循环肿瘤细胞的储存

检测制造商应提供明确且经过验证的肿瘤细胞富集物储存说明，并应予以遵循。

若检测制造商未提供相关说明（例如由于法律框架不够严格），但肿瘤细胞富集试剂盒制造商和/或采血管制造商和/或分离试剂盒制造商和/或肿瘤细胞DNA分离试剂盒制造商已指定了储存条件，则这些条件可作为实验室检测特定验证的基础/框架。

若无法成功验证这些说明与检测的适用性，或未提供此类说明，则实验室应确定、验证并记录肿瘤细胞富集物在规定温度（例如室温或2℃至8℃）下的最大储存期限，以确保不会对检测性能特征产生负面影响。使用说明应据此编写并遵循。这应通过开展时间进程实验来完成，分析富集的循环肿瘤细胞（CTC）数量随时间可能发生的潜在变化，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 循环肿瘤细胞（CTC）的分离

6.6.1 总则

CTC 分离是指将 CTC 从所有其他血液成分中分离出来，通常是在 CTC 富集之后进行。

CTC 分离主要基于物理原理，例如通过双向电泳或显微操作实现。44

CTC 分离系统的选择取决于其与所使用的CTC富集系统以及检测要求的兼容性。

在 CTC 分离过程中，回收的 CTC 数量可能会发生变化。因此，应采用适当的控制程序来验证 CTC 分离效率，例如通过可视化分离出的 CTC 的存在情况。

6.6.2 使用用于诊断用途的商业 CTC 分离系统

检验制造商应提供经指定和验证的CTC分离说明，并应遵循这些说明。

若未提供检验制造商的说明（例如：由于法律框架不那么严格），但血液采集管制造商和/或CTC富集制造商和/或 DNA 分离试剂盒制造商已验证了一种或多种专用的商业 CTC 分离系统，则这些可作为实验室检验特定验证的基础/框架。

注：商业CTC分离系统有时可整合到商业可用的预分析工作流程的一部分中，与CTC DNA、RNA和蛋白质分离试剂盒一起使用，而其他商业解决方案则是独立程序，最终得到分离的CTC。

若这些制造商均未指定和/或验证特定的 CTC 分离系统，实验室应选择、指定、验证并记录经批准用于诊断用途的适当CTC分离系统（如有）。应相应编写使用说明并遵循。

如果所选的循环肿瘤细胞（CTC）分离程序不能充分满足规定的检测性能特征，实验室应相应地对其进行修改[例如，通过成像分离出的细胞作为循环肿瘤细胞存在的质量控制，通过减少分离装置的试剂死腔体积]。

6.6.3 使用实验室开发的循环肿瘤细胞（CTC）分离程序

若无法成功验证任何适用于诊断用途的市售 CTC 分离程序，则实验室应通过以下方式开发自己的程序：

- 对现有的诊断用途 CTC 分离程序进行修改；
- 使用仅供研究用途的市售系统，并根据需要进行修改；或
- 开发自己的 CTC 分离系统。

从上述列表中选择程序应根据风险评估的结果（见第 4 条）与预期的检测一起进行验证和最终确认。应相应编写使用说明并遵循。

6.7 从富集的 CTC 样本中分离 DNA

6.7.1 一般规定

由于DNA量极低，通常不对单个分离的CTC或汇集的分离CTC进行DNA分离处理。相反，分离的CTC直接用于检测，或者仅在检测前进行裂解步骤，具体取决于检测设计。在这种情况下，预检测过程在6.6中结束。

对于细胞数量较多的已分离循环肿瘤细胞（CTC）集合，可以开展 DNA 提取工作。

为避免与扩增材料发生交叉污染，DNA 的分离不应在与检测流程中扩增步骤相同的区域进行，除非使用了专门设计以避免交叉污染的封闭系统。在检测方法开发过程中，应验证交叉污染不会影响检测结果。应使用适当的无模板对照来监测交叉污染风险。

6.7.2 使用用于诊断用途的商业 DNA 提取试剂盒

检验制造商应提供有关CTC DNA提取的明确且经过验证的说明，并应遵循这些说明。

若检验制造商未提供相关说明（例如由于法律框架不那么严格），但CTC富集试剂盒制造商和/或CTC提取试剂盒制造商和/或采血管制造商已指定用于DNA提取的试剂盒，则这些试剂盒可作为实验室检验特定验证的基础/框架。

若这些制造商均未指定和/或验证专门用于CTC DNA提取的试剂盒，实验室应选择、指定、验证并记录适用于诊断用途的适当试剂盒（如有）。应编写并遵循相应的使用指南。

若所选的DNA提取程序不能充分支持指定的检验性能特征，实验室应相应地对其进行修改（见6.8.3）。

有关提取 DNA 的储存信息，请参见 6.9.2。

6.7.3 使用实验室自行开发的循环肿瘤细胞（CTC）DNA 提取程序

若无法成功验证任何适用于诊断用途的市售循环肿瘤细胞（CTC）DNA 提取试剂盒，实验室应自行开发提取程序，具体可通过以下方式之一实现：

- 对现有的适用于诊断用途的循环肿瘤细胞（CTC）DNA 提取试剂盒进行改良；
- 使用仅适用于研究用途的市售试剂盒。或者
- 开发其自己的程序

应根据风险评估（见第4条）的结果，对从上述列表中选择的程序进行指定、验证，并最终确认其适用于预期的检测用途。

应据此编写使用说明并严格遵循。

如果检测对CTC DNA洗脱液中的 RNA 污染敏感，则应将RNA去除步骤（如RNase处理）纳入DNA分离程序。与CTC DNA接触的RNase、其他试剂和消耗品应无DNase。

注：若使用改良的DNA分离试剂盒或实验室自行开发的程序，在使用带有血液CTC/DNA稳定剂的管子时，可能需要专门的措施和技术，以避免CTC/DNA稳定分子带入最终的 DNA 洗脱液中。稳定分子的带入可能会影响检测性能。

分离出的CTC DNA应保存在2℃至 8℃（例如冷却块）或湿冰上，并应尽快进行检测，除非另有规定并经过验证。

有关分离CTC DNA储存的更多信息，请参见 6.9.3。

6.8 从富集或分离的循环肿瘤细胞（CTC）中提取的 DNA 的量 and 质的评估

6.8.1 总则

在设计和开发预检和/或检验工作流程期间，应指定、开发和验证评估从CTC中提取的 DNA 的量和质的适当方法，以确保检验性能。由于从CTC样本中通常获得的DNA产量较低，在适当情况下，可使用合成样本支持评估。在适当情况下，可使用普遍接受的方法/技术（见 6.8.2 和 6.8.3）。如果可用，CTC DNA提取试剂盒制造商关于确定CTC DNA量和质的说明也可作为依据/框架。

注：某些稳定剂，如交联试剂，可能会对DNA量和质测量的可靠性产生负面影响，尤其是基于扩增的方法。

6.8.2 循环肿瘤细胞（CTC）DNA 的量评估

从循环肿瘤细胞中分离出的核酸通常浓度较低，这会使诸如分光光度计之类的紫外吸光度读数仪不可靠，因此可能不适用。从富集或分离的循环肿瘤细胞中分离DNA的过程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)）；这种载体还会干扰紫外吸光度读数。

因此，可能需要针对已知DNA序列的循环肿瘤细胞DNA的定量或半定量的其他方法，例如定量聚合酶链反应（qPCR）、数字PCR（dPCR）或荧光或基于芯片方法。

指定和实施的方法应针对预期的检测进行验证。

6.8.3 循环肿瘤细胞（CTC）DNA 的质评估

由于DNA浓度低，没有通用的质量评估方法。根据检测要求，可能需要开发、指定和验证专门的质量测试。

在检测的开发和验证过程中，应确保分离出的循环肿瘤细胞DNA不包含影响指定检测性能的物质。应明确、开发并验证检测分离出的循环肿瘤细胞（CTC）DNA中是否存在干扰物质的方法。例如，可以通过扩增内源性DNA和/或检查qPCR响应曲线是否存在异常来进行检测。[45]开发者/制造商和医学实验室应定期在循环肿瘤细胞 DNA 能力验证（PT）计划中测试 CTC富集/分离和DNA分离性能，如果有的话。有关PT的更多信息，请参阅ISO 15189。

6.9 来自富集 CTC 分离出的 DNA 的储存

6.9.1 一般规定

CTC DNA检测制造商应提供经指定和验证的分离CTC DNA储存说明，只要分离出的DNA不需要立即进行检测处理。应遵循这些说明。

如果未提供此类说明（例如由于法律框架不那么严格），则DNA分离试剂盒制造商的说明可作为实验室指定和验证用于预期检测的DNA储存说明的基础/框架。应编写并遵循相应的指南。

如果未提供上述任何说明，DNA检验实验室应明确、核实并记录分离 DNA 的储存条件，例如温度、期限及其他所需条件。应编写并遵照执行相应的指南。

对于长期储存，实验室应制定经过验证的规程，说明如何储存分离出的DNA。

通常，DNA会被冷冻储存。然而，对于DNA的保存，也可以使用其他经过验证的存储方法（参见参考文献 [46] 和 [47] 以获取示例）。

为避免反复冻融或多次从存档系统中回收导致样品损耗或降解，建议对分离的分析物进行分装保存。鉴于CTC来源的DNA样本量通常较少，应选用具有低DNA吸附特性的储存容器，以最大限度减少样品损失。

在长期储存过程中，须防止因水分蒸发引起的非预期冻干现象，以免造成DNA降解，进而影响对敏感检测方法的准确性。同时，水分流失可能导致后续DNA回收困难甚至失败。因此，推荐使用密封性能良好的储存容器（如螺口式低温冻存管），并记录所用容器类型及其适用性，以确保储存期间的完整性。

实验室应建立经过验证的样本管理系统，对储存DNA的容器进行有序组织，并通过唯一性标识实现精准标记，确保样品易于检索与识别。

必须保障样品身份的全程可追溯性，防止混淆或遗失。可采用射频识别（RFID）、一维条形码或二维条形码等技术手段，标签应具备耐低温性能，可直接附着于容器表面或使用制造商预印唯一编码的专用冻存管。

冷冻设备的温度应通过配备报警功能的监控系统进行连续监测，并使用经验证的测量仪器（如电子温度记录仪或圆形温度图记录仪）定期记录温度数据。

严禁将DNA样本存放于“无霜”型冰箱，因其自动除霜循环会导致温度频繁波动，可能引发DNA断裂或降解，从而影响检测结果的可靠性。

6.9.2 使用商业诊断试剂盒提取的 DNA 储存

检验项目制造商应提供明确且经过验证的DNA储存指导说明，实验室须严格遵循。

若检验制造商或 CTC DNA 提取试剂盒供应商未提供相关储存指南，实验室应自行制定、验证并记录适用于该检测项目的 DNA 储存程序。

除非另有经验证的特殊规定，短期储存时，提取的CTC DNA应置于2℃至8℃环境（如冷却块或湿冰）中，并于当日完成检测。

6.9.3 实验室自建程序提取的DNA储存

当采用实验室自建程序（见6.8.3）进行DNA提取时，实验室应建立并验证相应的储存流程，确保从样本制备到检测全过程的稳定性。

若计划长期保存，应将提取的CTC DNA洗脱至适宜缓冲液中，以支持短期或长期储存的稳定性需求。

在无特定验证方案的情况下，短期储存建议维持在2℃至8℃（如冷却块或湿冰），并在同日完成检测；长期储存则应置于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 条件下。其他经验证的存档方法亦可采纳（参见参考文献[46]和[47]示例）。

附录 A
(资料性)

循环肿瘤细胞 (CTC) 预分析流程关键步骤决策指南

