

团 体 标 准

T/ZSA 320-2025

CD31 阳性及阴性循环异倍体肿瘤细胞检测方法

Detection method for circulating aneuploid tumor cells with either positive or negative CD31 expression

2025-12-10 发布

2025-12-11 实施

中关村标准化协会

发布

目 次

前 言	III
引 言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 试剂及存储要求	2
5.1 差相富集检测	2
5.2 i•FISH 肿瘤细胞检测	3
6 仪器设备及材料	3
7 差相富集检测方法	5
7.1 检测原理	5
7.2 检测前准备工作	5
7.3 差相富集检测样本采集	6
7.4 差相富集检测的总体要求	7
7.5 差相富集检测步骤	8
8 i•FISH 肿瘤细胞检测方法	10
8.1 检测原理	10
8.2 检测前准备工作	10
8.3 i•FISH 肿瘤细胞检测的总体要求	11
8.4 i•FISH 肿瘤细胞检测步骤	12
9 识别指标及判断标准	14
9.1 识别指标	14
9.2 CTC 判断标准	15
9.3 CTEC 判断标准	15
9.4 数字病理扫描仪识别标准	15
10 检测报告	15
11 质量控制与安全要求	15
11.1 质量控制	15
11.2 安全要求	16
附 录 A (资料性) 检测原理	18
附 录 B (规范性) 人外周血 CTC 差相富集检测流程	19
附 录 C (规范性) i•FISH 肿瘤细胞检测流程	21

附录 D（规范性） 数字病理扫描仪识别标准..... 23

参考文献..... 28

全国团体标准信息平台

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中关村标准化协会技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：北京大学人民医院、北京大学肿瘤医院、中国医学科学院北京协和医院、复旦大学附属肿瘤医院、四川大学华西医院、北京医院、泰州赛特生物医药科技有限公司、国家卫生健康委科学技术研究所、中国医科大学附属第一医院、中国医学科学院基础医学研究所、清华大学附属北京清华长庚医院、首都医科大学附属北京胸科医院、首都医科大学附属北京天坛医院、首都医科大学附属北京佑安医院、首都医科大学附属北京安贞医院、首都医科大学附属北京潞河医院、北京大学首钢医院、北京大学肿瘤医院内蒙古医院、中日友好医院、中国中医科学院广安门医院、中国中医科学院望京医院、海军军医大学第一附属医院、中国人民解放军北部战区总医院、上海市第一人民医院、浙江省肿瘤医院、江苏省人民医院、南方医科大学皮肤病医院、天津市第一中心医院、山东第一医科大学第一附属医院、西安国际医学中心医院、上海复旦临床病理诊断中心有限公司、宁波市临床病理诊断中心、江苏省苏北人民医院、宜昌市中心人民医院、宁波市医疗中心李惠利医院、杭州市第三人民医院、温州医科大学附属第一医院、江苏苏州明基医院、宁波江丰生物信息技术有限公司、中关村标准化协会。

本文件主要起草人：王建六、昌晓红、沈琳、巴一、王红霞、陈念永、苟启桁、何金兰、邢骋、林平、果吉尔梯、刘京曦、岳山、李凯、高梓茗、郑直、尹洪芳、杨明、王良、张同梅、车南颖、韩毅、崔勇、周光德、张宁、张学舟、严冬、王云帆、郭志娟、吉茹、李铭孝、安成、张平、贾音、杜成、黄倩、程进、王晓稼、夏添松、马喆、何仁亮、朱冠男、辛涛、韩敏、于军、夏成青、潘登、任传利、王政禄、邢亚楠、季晓春、彭建中、余志杰、徐兴祥、王克惠、王钧、宫贺军。

本文件于 2025 年 12 月首次发布。

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到 3 条相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。专利权人或专利申请人同意在公平、合理、无歧视基础上，有偿许可任何组织或者个人在实施该中关村标准时实施专利。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：见表 1。

专利 1 和专利 2 地址：北京东城区东单新开路 80 号。

专利 3 地址：北京市西城区西直门南大街 11 号。

表 1 本文件相关专利

序号	专利名称	专利持有人	专利涉及条款
1	一种从外周血中快速提取循环的非血缘性有核细胞的组合物和试剂盒及其应用	林平	5.1/7
2	鉴别从人或动物生物体液中富集的非血源性有核细胞的方法	林平	5.2/8/9
3	用于诊断体内恶性实体肿瘤的方法和试剂盒	北京大学人民医院、北京昂科未来医疗器械有限公司	7/8/9

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

CD31 阳性及阴性循环异倍体肿瘤细胞检测方法

1 范围

本文件规定了利用试剂盒进行体内CD31阳性异倍体循环肿瘤血管内皮细胞及CD31阴性异倍体循环肿瘤细胞检测试剂及存储要求、仪器设备及材料、差相富集检测方法、免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交(i•FISH)肿瘤细胞检测方法、识别指标及判断标准、检测报告、质量控制与安全要求。

本文件适用于罹患实体肿瘤或肿瘤高危人群外周血或其他生物体液样本(胸腹水、骨髓、尿液、脑脊液、淋巴穿刺标本等)中非血源性循环异倍体肿瘤细胞的CD31及肿瘤标志物表达、8号染色体倍体数目、细胞大小、团聚等的检测。

本文件适用于实体肿瘤的辅助诊断及有肿瘤转移或转移倾向患者手术或治疗疗效评估、耐药监测、预后判断、复发监测等。

具备循环肿瘤细胞及循环肿瘤血管内皮细胞检测资质和条件的医院或第三方检验机构可参照使用。

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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 26124 临床化学体外诊断试剂(盒)

GB/T 29791.2 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标示) 第2部分:专业用体外诊断试剂

GB/T 29791.3 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标示) 第3部分:专业用体外诊断仪器

3 术语和定义

GB/T 26124界定的及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

循环肿瘤细胞 circulating tumor cell; CTC

从原发肿瘤或转移瘤中脱落入血的肿瘤细胞。

注:循环肿瘤细胞与肿瘤转移、耐药、预后及复发等有着极大的相关性。

3.2

循环肿瘤血管内皮细胞 circulating tumor endothelial cell; CTEC

从肿瘤血管脱落并进入血液循环系统的肿瘤血管内皮细胞。

注:循环肿瘤血管内皮细胞既具有肿瘤细胞特征,又具有内皮细胞的特征,能够形成新的血管结构,并且同样与肿瘤耐药、转移、复发等密切相关。

3.3

标本背景 specimen background

血液样本制成染色玻片后出现的蛋白背景(非特异性染色或背景染色)。

3.4

异倍体 aneuploidy

细胞中染色体数目的非整倍性变化。

注：正常人体细胞的染色体数目是固定的二倍体，而当细胞发生异常变化时，可能会出现染色体数目的增多或减少。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- ACD: 酸性枸橼酸盐-葡萄糖溶液 (acid-citrate dextrose)
 CD31: 血小板-内皮细胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1)
 CD45: 白细胞共同抗原 (leukocyte common antigen)
 CEP: 免疫显色试剂染色体计数探针 (chromosome enumeration probe)
 CK: 细胞角蛋白 (cytokeratin)
 CK18: 细胞角蛋白 18 (cytokeratin 18)
 CRC: 循环稀有细胞 (circulating rare cell)
 CTC: 循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell)
 CTEC: 循环肿瘤血管内皮细胞 (circulating tumor endothelial cell)
 CTM: 循环肿瘤细胞团 (circulating tumor microemboli)
 DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole)
 EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)
 FR1: 固定剂 1 (fixative reagent 1)
 FR2: 固定剂 2 (fixative reagent 2)
 FR3: 固定剂 3 (fixative reagent 3)
 FISH: 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization)
 i•FISH: 免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交 (immunostaining-FISH)
 NCS: 坏死细胞荧光染色液 (necrotic cell staining)
 PD-L1: 细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death ligand 1)

5 试剂及存储要求

5.1 差相富集检测

差相富集检测试剂 (单人份) 及存储条件应符合表 1 要求。

表 1 差相富集检测试剂及存储条件要求

序号	试剂		数量	存储条件
	中文名称	英文名称		
1	清洗液 10×CRC	10x Concentrated CRC Buffer	8 mL	2℃~8℃
2	样本密度分离液	Cytelligen CTC Separation Matrix	3 mL	2℃~8℃
3	缓冲液 Magnetic Beads Buffer	Cytelligen Immuno-magnetic Beads	0.25 mL	2℃~8℃
4	组织固定液 Cytelligen Fixative	Cytelligen Fixative	0.2 mL	室温

差相富集检测试剂应符合 GB/T 29791.2, 具体要求如下:

- a) 实验结束后应将试剂盒内各组分按表 1 中相应储存条件保存;
- b) 不应使用过期试剂, 试剂有效期要求如下:
 - 1) 未开封试剂自生产日期起一年内有效;

- 2) 开封试剂按照表 1 中相应的储存条件应于 90d 内用完。
- c) 不应将不同批号的试剂混用；
- d) 不应拆除组织固定液瓶口密封金属圈，每次使用时，应用注射器扎入瓶中抽取。

5.2 i•FISH 肿瘤细胞检测

i•FISH 肿瘤细胞检测试剂（单人份）及存储条件应符合表 2 要求。

表 2 i•FISH 肿瘤细胞检测试剂及存储条件要求

序号	试剂		数量	存储条件
	中文名称	英文名称		
1	抗原修复缓冲液	Antigen Repair Buffer	2 μL	室温避光
2	组织固定液 FR1	FR1 Cell Fixative	20 μL	室温避光
3	样本稀释液 FR2	FR2 Sample Diluent	0.2 mL	2℃~8℃
4	缓冲液 10×FR3	10× Concentrated FR3 Buffer	4.5 mL	2℃~8℃
5	免疫显色试剂 8 号染色体计数探针 (CEP8)	CEP8 Probe, orange	8 μL	-20℃避光
6	免疫显色试剂 7 号染色体计数探针 (CEP7)	CEP7 Probe, green	2 μL	-20℃避光
7	清洗液 Ab Washing	Ab Washing Solution	0.6 mL	2℃~8℃
8	血细胞分析用稀释液	Antibody Preparation Solution	0.25 mL	2℃~8℃
9	血细胞分析用染色液 DAPI	DAPI i•FISH Mounting Medium	10 μL	2℃~8℃ 避光
10	血细胞分析用染色液（如 B13: PD-L1(488)，或者其他肿瘤标志物）	Ab Stain. Sol. (anti-PD-L1, AF488), such as B13 or other tumor-related biomarkers	1 μL	2℃~8℃ 避光
11	血细胞分析用染色液 A01	Ab Stain. Sol. A01 (anti-CD45, AF594)	1 μL	2℃~8℃ 避光
12	血细胞分析用染色液 C06	Ab Stain. Sol. C06 (anti-CD31, Cy5)	1 μL	2℃~8℃ 避光
13	坏死细胞荧光染色液	NCS. Sol. (Cy7)	3 μL	-20℃避光

i•FISH 肿瘤细胞检测试剂应符合 GB/T 29791.2，要求如下：

- a) 实验结束后应将试剂盒内各组分按表 2 中相应储存条件保存；
- b) 不应使用过期试剂，试剂有效期要求如下：
- 1) 未开封试剂自生产日期起一年内有效；
 - 2) 开封试剂按照表 1 中相应的储存条件应于 90d 内用完。
- c) 不应将不同批号的试剂混用；
- d) 每次实验前应观察血细胞分析用稀释液，如液体中漂浮絮状物，应使用离心机 (950g) 高速离心 5 min，取上清可继续使用。

注：液体中漂浮絮状物属正常现象，不影响染色效果。

6 仪器设备及材料

差相富集及 i•FISH 肿瘤细胞检测所需的仪器设备应符合 GB/T 29791.3，具体仪器设备

及材料要求如表 3 所示。

表 3 仪器设备及材料要求

	名称	要求	推荐规格
仪器设备	数字病理扫描仪	可高通量	KF-PF-040
	低速大容量离心机	配水平转头（50mL、15mL）	LD5-2
	微型台式真空泵	/	GL-802B
	微型水平脱色摇床	应是水平摇床，实验所需 转速为 120r/min~ 130r/min	TS-1
	配平天平	普通药物天平	/
	50 mL 大磁力架	/	MS-502
	电热干燥箱（不需鼓风或鼓风可关闭）	不应使用恒温培养箱	DHG-9031A
	恒温水浴锅	双孔双控温	SHJ-2D
	手动单道可调式移液器	1 把	0.2 μL~2.0μL
		2 把	0.5 μL~10μL
		2 把	20 μL~200 μL
		2 把	100 μL~1000 μL
		2 把	1000 μL~5000 μL
	微型吹风管	普通家用吹风机	/
	大容量手动移液器	/	5 mL~10mL
	微型（1.5 mL 管）离心机不可调速	/	D1008
	可调速旋涡混合仪	/	vortex-genie 2
原位杂交仪	/	TDH-500	
超低温冰箱（-80 ℃）	/	/	
低温医用冰箱（4 ℃）	/	/	
材料	枪头	/	1000 μL~5000 μL
		/	100 μL~1000 μL
		/	20 μL~200 μL
		/	2 μL~20 μL
	移液管	/	5 mL
	离心管	/	0.5 mL
	离心管	/	1.5 mL
	离心管	/	50 mL
	离心管	/	15 mL
	封口膜	/	PM-996
	蓝盖广口瓶	/	1000 mL
	蓝盖广口瓶	/	500 mL
	塑料量筒	/	1000 mL
	塑料量筒	/	100 mL
	小镊子	/	/
	离心管架	/	50 mL
	离心管架	/	15 mL
离心管架	/	1.5 mL	
晾片板	/	100 片装	

表3 仪器设备及材料要求（续）

	名称	要求	推荐型号规格
材料	注射器	/	1 mL
	小剪刀	/	/
	马克笔	/	双头
	玻片盒	/	5片装
	Coplin 染色缸（2个）	/	45 mL，每个缸插5张标本
	Cytelligen CTC 格式化载玻片	/	50张/盒、1张玻片/人份
	20×20 cm 盖玻片	/	100张/盒
	Rubber Cement 封片胶	/	118 mL/瓶
	ACD 抗凝采血管	应使用 ACD 抗凝采血管，不应使用临床上其他抗凝管，如 EDTA、肝素等	6mL 黄帽
	体液脱落细胞检测试剂盒	/	20人份/盒
	荧光染色-荧光原位杂交样品处理试剂盒	/	20人份/盒
	荧光标记的各种瘤标抗体	/	PD-L1、HER2、Vimentin、CD44v6、EpCAM、Ki67、HE4、CA125、CA19-9、CEA、AFP、PSA 等
	无水乙醇	分析纯	500 mL

7 差相富集检测方法

7.1 检测原理

差相富集检测原理参考附录A。

7.2 检测前准备工作

7.2.1 设备准备

7.2.1.1 按照表3准备好相应品牌型号或符合检测要求的仪器设备，并通过设备检测验证要求。

7.2.1.2 实验前应在真空泵试剂瓶、废液缸中倒入少量84消毒液，及时对吸弃的废液进行消毒。

7.2.2 材料准备

按照表3及下列要求准备好相应耗材：

- 所有与细胞接触的离心管、各个规格的枪头、10 mL 移液管，无需灭菌，一次性使用，不应重复利用；
- 用于制片的载玻片应使用 Cytelligen 格式化 CTC 包被载玻片；
- 将 20 μ L~200 μ L、0.2mL~1mL 和 1mL~5mL 等规格加样器及相应规格枪头、1.5 mL 离心管、15 mL 离心管、50 mL 离心管整齐摆放于台面，并分别标记 4 个 50 mL 离心管为 A、B、C、D。

7.2.3 试剂准备

- 7.2.3.1 打开体液脱落细胞检测试剂盒，取出清洗液 10×CRC、样本密度分离液。
- 7.2.3.2 配制清洗液 1×CRC：
- 将清洗液 10×CRC 置于 37 ℃ 水浴中 1.5h~2h 溶解所有结晶，充分颠倒混匀后再稀释；
- 注：如结晶未溶解充分均匀，可能会造成稀释液 pH 值、渗透压偏差，造成细胞破裂。
- 用 100 mL 量筒量取 100 mL 清洗液 10×CRC；
 - 用 1000 mL 量筒加入 800 mL 纯化水，并将上述 100 mL 清洗液 10×CRC 全部倒入其中；
 - 加入纯化水定容至 1000 mL ；
 - 剪一正方形大块封口膜，用封口膜将量筒口密封，轻柔头尾颠倒 10 次以混匀试剂，过程中避免起泡；
 - 将配制后的清洗液 1×CRC 装在干净的 1000 mL 试剂瓶中，2℃~8℃ 保存，每次分装使用。
- 7.2.3.3 根据当天血样人份，按照表 1 分装适量清洗液 1×CRC、适量样本密度分离液置于水浴锅中预热至 27 ℃，预热后混匀。
- 注 1：如预热温度不足，可能会影响细胞保存、分离效果。
- 注 2：预热后的试剂如未混匀，可能会造成瓶中试剂温度分布不均匀。
- 7.2.3.4 每次实验后的多余试剂应置于 2℃~8℃ 环境中单独保存以供下次实验使用。如试剂量不够，应开启下一个试剂盒按照 7.2.3 进行试剂准备，不同批次的试剂不应混合使用。

7.3 差相富集检测样本采集

7.3.1 采集前准备

- 7.3.1.1 应使用 ACD 抗凝采血管（6mL，黄帽），不应使用临床上其他抗凝管，如 EDTA、肝素等，否则影响细胞形态、抗体染色、标本背景等鉴别指标。
- 7.3.1.2 准备一次性采血针及消毒、止血用具。
- 7.3.1.3 根据辅助诊断、手术、治疗等情况，及时通知安排病人采血，相关要求如下：
- 辅助诊断患者：病理诊断确诊前采集外周血；
 - 接受治疗的患者：每一程治疗前 1d~2d（即上一程治疗结束）采血检测，用药期间不应采血；
 - 接受手术的患者：手术前及术后一周采血；
 - 采血前一天患者尽量避免油腻饮食，晚上 10 点以后避免大量喝水以免稀释血液，抽血当日，宜饿血采血。

7.3.2 采血量及要求

警告：采血管黄帽中央薄，四周厚，如果采血针插入四周，血液可能不能流出或流速特别慢。一旦不小心插到四周，血流不出来，应拔出针头重新插入黄帽正中央。

- 7.3.2.1 血液静脉采血 6 mL，应待采血管负压消耗尽再拔针，立即头尾颠倒 8 次，充分混匀以防凝血。如因受检者个体差异未能抽 6 mL 时，可按不低于 4 mL 进行采血。
- 7.3.2.2 采血时，可在受检者抽血常规样本后抽取本检测血样。采血开始抽取避免皮肤穿刺时上皮细胞污染。
- 7.3.2.3 受检者抽血处消毒处理，一次性采血针一头插入静脉，另一头插入采血管黄色橡皮塞正中央。
- 7.3.2.4 由于采血管内有负压，血液会自动流进采血管，一般液面到达采血管标签上沿时即为满管，如图 1 所示，从静脉拔出采血针。

注：由于每个采血管负压会有所差异，血液液面超过附图红线也不影响抗凝效果。但有时极个别患者因治疗可能采集不到满管，此时以实际出血量为准。

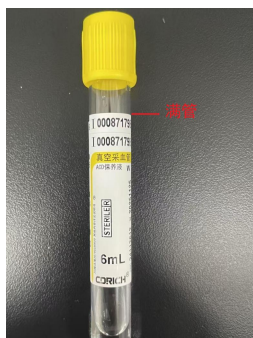


图 1 6 mL ACD 抗凝采血管满管示意图

7.3.2.5 在 ACD 抗凝采血管贴条形码，室温避光保存。

7.3.3 样本配送及保存

7.3.3.1 采样后应室温避光放置，不应放置在冰箱中，并立即或尽快送至实验室。

7.3.3.2 室外气温低于 5 °C 时，应将样本用保温材料（如保温袋）包裹后置于保温箱中，应避免露天运输。平稳运送，减少或尽量避血样运输过程中振荡，以免细胞破裂。防止血样溶血。

7.3.3.3 血液样本采集完至标本开始处理最长不应超过 72 h，宜在 24 h 内进行处理。

7.3.3.4 实验室应由专人接收样本，对样本进行检测编号，严格对应标记所用载玻片和试管，室温放置，宜尽快进行样本处理及检测。

7.4 差相富集检测的总体要求

7.4.1 实验全程实验人员应穿戴白大衣、口罩、帽子及无粉手套，保障安全，并防止唾液、头屑等上皮细胞污染血样本。

7.4.2 整个富集实验加上抗体液染大约耗时 1.5 h，在细胞涂到玻片上干燥前，人不可因故中途离开，实验前应计算好时间。

7.4.3 应检查采血管血量，采血量一般为 6 mL，实际血量不应低于 4 mL，记录实际处理血量，缓冲液 Magnetic Beads Buffer 用量根据实际血量调整。

7.4.4 检查样本有无凝块，如有凝块应评估其体积大小，凝块大于 1 mL（花生米大小）时应重新采血。

7.4.5 离心前应将血标本置于配平天平上精确配平，不应肉眼观察离心管刻度估测配平。

注：未精确配平易造成离心时不稳定而影响肿瘤细胞回收。

7.4.6 整个实验中，所有离心前的头尾颠倒混匀、细胞吹打混匀、转移细胞液等过程应轻柔，注意避免起泡。

注：气泡会影响肿瘤细胞回收。

7.4.7 使用移液枪吸取液体或细胞时，枪头应从液面处先吸取，慢慢随液面的下降而下降；将液体或细胞打入离心管等容器中时，枪头应沿管壁注入，以避免起泡。

7.4.8 实验过程中使用真空泵吸弃废液时，吸弃速度不应过大、过快，越接近底部细胞沉淀时，吸弃速度则应越慢。

7.4.9 使用移液枪吹打细胞或缓冲液沉淀时，为避免起泡并充分混匀沉淀，应将枪调节成与液体相近但略小的体积，多次反复轻柔混匀沉淀。

示例：如沉淀体积为 1 mL，则将移液枪调节至 800 μ L。

7.4.10 使用可调速漩涡混合仪震荡混匀细胞时，震荡速度不应过快，应采用低速、多次点震混匀细胞，震荡速度过大易伤害细胞。推荐使用 SI 旋涡混合仪（vortex-genie 2），速度调节至 3 时混匀细胞。

7.4.11 清洗细胞时，操作过程轻柔，避免细胞在清洗过程中被检细胞的丢失或/和细胞破裂。

7.5 差相富集检测步骤

7.5.1 制备离心管 A

采血管配平颠倒混匀后，室温 400 g 离心 10 min，弃上清至棕红色沉淀上方 5 mm 处，加入清洗液 1 \times CRC 至采血管 6 mL 标签处，盖上黄色管帽，头尾颠倒混匀后将全部血液倒入 50 mL 离心管 A 中，在采血管中加入 3 mL 清洗液 1 \times CRC 洗涤采血管，将洗涤液全部倒入离心管 A 中。

7.5.2 制备离心管 B

在 50 mL 离心管 B 中加入 3 mL 样本密度分离液，将离心管 A 中的血液竖直摇匀、充分混合，使用大容量手动移液器将离心管 A 中的血细胞沿离心管 B 管壁液面处缓慢加到分离液顶层，叠加后可见清晰的分界面，少量红细胞慢慢沉降于管底，如图 2 所示。具体要求如下：

- 在将离心管 A 中的血细胞叠加到管 B 分离液顶层时，离心管 A 中的血细胞应充分混匀，混匀后立即叠加；
- 将血细胞叠加至 3 mL 分离液时，将移液管管尖置于分离液液面处，缓慢叠加血细胞，尤其是打入液体的第一下。整个叠加过程应缓慢，避免将血细胞混入分离液中；
- 将管 A 中的血细胞全部叠加到分离液上后，距离离心的时间最长不应超过 5 min，如果血样本较多，可分批叠加、离心。



(a) 操作中



(b) 加注后

图 2 血细胞加入分离液示意图

7.5.3 制备离心管 C

将离心管 B 配平后，在室温下 350 g 离心 6 min，离心后可见三层液体，上层为黄色液体（1 层），中间层为透明或淡红色液体（2 层），底层为深棕红色沉积红细胞（3 层），如图 3 所示。

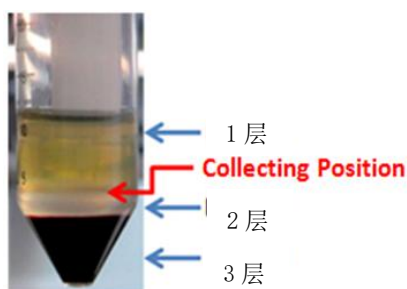


图3 离心管B离心后状态示意图

按照如下步骤制备离心管C:

- a) 首先从1层最上方取出4 mL液体弃去;
- b) 将剩余1层、2层所有液体转移至50 mL离心管C中, 不应吸取到3层红细胞;
- c) 沿管壁加入清洗液1×CRC至6 mL, 竖直摇匀液体。

制备离心管C的注意事项及相关要求如下:

- a) 离心管B叠加后离心如遇溶血应加离处理, 微红无需加离, 加离条件为350 g/3 min;
- b) 加离后微红可正常处理, 如依然溶血严重或只有两层则取1层和2层, 应尽量避免取到3层的红色部分, 如不小心取到, 不应超过50 μ L;
- c) 在弃4 mL 1层黄色液体时应从1层液面最上方取, 应远离2层, 且避免取到细胞;
- d) 取剩余1层、2层液体时, 如不小心取到底部红细胞, 应将枪尖处的红细胞打掉。

注: 红细胞会影响后续缓冲液 Magnetic Beads Buffer与白细胞的结合, 从而影响白细胞去除。

7.5.4 离心管C混合缓冲液

将表1中的缓冲液 Magnetic Beads Buffer充分混匀, 按照如下步骤将缓冲液加入离心管C中:

- a) 按照每管250 μ L的比例将缓冲液缓慢加入离心管C中, 边加边摇动离心管C以混匀缓冲液;
- b) 将离心管C以35°~40°角倾斜固定于水平摇床上;
- c) 室温下以125 r/min的速度摇动20 min, 注意液面摇晃的最高处应在刻度30mL~35mL之间。

7.5.5 制备离心管D

按照如下步骤制备离心管D:

- a) 将离心管C置于磁力架上;
- b) 1 min时使用5 mL枪头伸入管底中央轻柔敲打2下;
- c) 2 min后使用同样枪头沿离心管C正中央将液体小心转移至50 mL离心管D中, 不应取到吸附的缓冲液 Magnetic Beads Buffer;
- d) 在离心管D中加入清洗液1×CRC至45 mL, 配平, 颠倒混匀;

注: 配平后液体密度不均会影响离心后肿瘤细胞回收率。

- e) 在室温中将离心管D以450 g离心5 min;
- f) 弃上清至100 μ L, 立即按照第8章进行后续操作。

7.5.6 差相富集检测操作的流程见附录B。

7.5.7 实验结束

差相富集检测结束后, 进行如下操作:

- a) 将分装未用完的清洗液 $1\times$ CRC、样本密度分离液放入冰箱 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,以供下次使用,同时检查剩余试剂是否足够备份,如不足,应提前稀释准备;
- b) 检查、关闭仪器设备,并进行表面清洁,75%酒精消毒处理;
- c) 擦洗实验台面,75%酒精表面消毒;
- d) 将实验台面上的耗材、枪头盒等码放整齐;
- e) 进行实验记录。

8 i•FISH 肿瘤细胞检测方法

8.1 检测原理

i•FISH肿瘤细胞检测原理参考附录A。

8.2 检测前准备工作

8.2.1 设备准备

8.2.1.1 按照表3准备好相应品牌型号或符合检测要求的仪器设备,并通过设备检测验证要求。

8.2.1.2 实验前应在真空泵试剂瓶、废液缸中倒入少量84消毒液,及时对吸弃的废液进行消毒。

8.2.2 材料准备

8.2.2.1 用于制片的载玻片应使用Cytelligen格式化CTC包被载玻片。

注:自行购买的载玻片防细胞脱落效果差,镜下可见荧光杂质。制片时,避免玻片背景杂质或碎片过多,而致背景不清或被染色,被误读误扫。

8.2.2.2 FISH封片胶宜采用美国Rubber Cement封片胶。

注:国产封片胶有可能渗入盖玻片下的细胞框内,影响实验结果。

8.2.2.3 将实验用到的2个Coplin染色缸, $0.2\mu\text{L}\sim 2.0\mu\text{L}$ 、 $2.0\mu\text{L}\sim 20\mu\text{L}$ 、 $20\mu\text{L}\sim 200\mu\text{L}$ 和 $0.2\text{mL}\sim 1\text{mL}$ 规格移液器和相应规格枪头、Cytelligen格式化CTC包被载玻片、 $20\text{mm}\times 20\text{mm}$ 盖玻片、封片胶整齐摆放于实验台备用。

8.2.3 试剂准备

8.2.3.1 打开荧光染色-荧光原位杂交样品处理试剂盒,取出缓冲液 $10\times$ FR3、血细胞分析用稀释液、清洗液Ab Washing、免疫显色试剂FISH(CEP7、CEP8探针)。

8.2.3.2 配制缓冲液 $1\times$ FR3:

- a) 用100 mL量筒中精确量取91 mL缓冲液 $10\times$ FR3;
- b) 用1000 mL量筒加入750 mL纯化水,并将上述91 mL缓冲液 $10\times$ FR3全部倒入其中;
- c) 加入纯化水定容至910 mL;
- d) 剪一正方形大块封口膜,用封口膜将量筒口密封,轻柔头尾颠倒10次以混匀试剂;
- e) 将配制后的 $1\times$ FR3洗涤液装于干净的1000 mL试剂瓶中, $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,每次分装使用。

注:缓冲液 $10\times$ FR3组分一瓶规格一般是90 mL,实际试剂瓶中的量可能超过90 mL,每次以实际测量体积为准,一般建议1瓶缓冲液 $10\times$ FR3一次稀释完。

8.2.3.3 分装染色缸中的试剂:

- a) 准备2个Coplin染色缸,分别标记为I、II;

- b) 按下列顺序向每个染色缸中加入 40mL 相应液体：
- 1) 染色缸 I：缓冲液 1×FR3，使用前于恒温水浴锅中预热至 37℃；
 - 2) 染色缸 II：无水乙醇，室温保存。

每次实验前，应更换 2 个染色缸中的溶液，一个染色缸一次最多处理 5 张标本。如果样本较多，建议根据样本量再准备染色缸，缸中分装的试剂同上。

8.2.3.4 根据当天样本数量，做好各类试剂分装准备：

- a) 每次实验前取出富集预热至 27℃ 的适量清洗液 1×CRC (30 mL/样本)；
- b) 分装适量缓冲液 1×FR3 (0.8 mL/样本) 于离心管中，恒温水浴锅中预热 27℃；
- c) 分装适量样本稀释液 FR2 (180 μL 样本稀释液 FR2/样本) 于恒温水浴锅中预热至 37℃；

注：样本稀释液 FR2 用于稀释组织固定液 FR1，如不预热至 37℃，会影响 FR1 的固定效果，导致细胞脱片。

- d) 分装适量血细胞分析用稀释液 (200 μL/玻片)、清洗液 Ab Washing (600 μL/玻片) 并预热至 27℃。

8.2.3.5 探针混合液配置：

- a) 室温融化-20℃ 环境中保存的 CEP8 探针和 CEP7 探针；
- b) 将探针管分别于振荡器上头尾分别充分振荡，每次振荡不少于 5 s；
- c) 高速离心 5 s 后，再次头尾振荡并高速离心 5 s；

注：少于两次震荡、离心的免疫显色试剂 FISH 会导致 FISH 结果信号弱或无信号。

- d) 按照每张标本 8 μL CEP8 探针和 2 μL CEP7 探针的比例加到 0.5 mL 离心管中，使用枪头混匀并离心；
- e) 2℃~8℃ 避光保存备用，原探针管放回-20℃ 环境中保存。

8.2.3.6 收到坏死细胞荧光染色液后应提前将坏死细胞荧光染色液按 3 μL/管分装到 0.5 mL 离心管中，摁紧管盖，封口膜封口，置于-20℃ 环境中保存。每次按标本量取用坏死细胞荧光染色液，并进行预热：

- a) 水浴锅或手心融化-20℃ 环境中保存的坏死细胞荧光染色液；
- b) 将坏死细胞荧光染色液置于 1.5 mL 离心管台式离心机中高速离心 5 s；
- c) 室温避光放置备用。

8.3 i•FISH 肿瘤细胞检测的总体要求

8.3.1 实验全程实验人员应穿戴白大衣、口罩、帽子及无粉手套，保障安全，并防止唾液、头屑等上皮细胞污染标本。

8.3.2 差相富集检测后的细胞液应立即执行 i•FISH 肿瘤细胞检测前半部分液染操作，整个富集检测加上液染操作的时间约 1.5 h，液染后应将细胞涂到玻片上干燥，在这之前，实验人员不应中途离开，实验前应计算好时间。

8.3.3 离心前应将标本置于配平天平上精确配平，不应肉眼观察离心管刻度估测配平。

注：估测配平易造成离心时不稳定，影响肿瘤细胞回收。

8.3.4 整个实验中，所有离心前的头尾颠倒混匀、细胞吹打混匀、转移细胞液等过程应轻柔，注意避免起泡。

注：起泡会影响细胞回收。

8.3.5 使用移液枪吸取液体或细胞时，枪头应从液面处先吸取，慢慢随着液面的下降而下降；将液体或细胞打入离心管等容器中时，枪头应沿管壁注入，以避免起泡。

8.3.6 实验过程中使用真空泵吸弃玻片上的液体时，应将真空泵吸头套上 200 μL 的枪头。吸弃时，枪头不应伸入标本框内，应将玻片倾斜，枪头在玻片框外吸掉流下的液体。

8.3.7 使用移液枪吹打细胞沉淀时，应将枪调节成与液体相近但略小的体积，多次反复轻柔混匀沉淀。

示例：如沉淀体积为 1 mL，将移液枪调节至 800 μ L。

8.3.8 使用可调速漩涡混合仪来震荡混匀细胞时，震荡速度不应过快，应采用低速、多次点震来混匀细胞。推荐使用 SI 漩涡混合仪 vortex-genie 2，速度调节至 3 时震荡混匀细胞。

注：震荡速度过大易伤害细胞。

8.3.9 差相富集检测后的细胞加入血细胞分析用染色液混合液孵育，FISH 杂交，直到最后一步，均应避光。

8.3.10 整个 FISH 实验过程中，除乙醇脱水，吹干标本，其他任何步骤不应使标本干燥，加液洗涤应及时。

注：i•FISH 实验的三要素是时间、温度、pH 值。某一个条件如果没有按照规定的范围可能会影响实验结果。

8.4 i•FISH 肿瘤细胞检测步骤

8.4.1 取按照 7.5.5 制备的含有弃上清后 100 μ L 细胞液的离心管 D，在液面加入按 8.2.3.6 提前分装好的 3 μ L 坏死细胞荧光染色液，使用振荡混合仪轻柔振荡混匀沉淀细胞，室温避光孵育 30 min，15 min 时使用振荡混合仪轻柔振荡混匀沉淀细胞。于管中加入 1 mL 清洗液 1 \times CRC，使用 1 mL 移液枪混匀，转移至新的 15 mL 离心管中，补加清洗液 1 \times CRC 至 14 mL。配平，颠倒混匀，室温 550 g 离心 5 min，弃上清至 100 μ L。

8.4.2 在上述液面加入 2 μ L 抗原修复缓冲液，使用可调节速度振荡混合仪轻柔振荡混匀沉淀细胞，室温静置 10 min。

8.4.3 静置过程中由双人配制血细胞分析用染色液混合液（时间不够可在实验前配好）：

- 在配制血细胞分析用染色液混合液前，取来碎冰，将血细胞分析用染色液离心后插到碎冰上取用。取用完后立即放回冰箱 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存，以避免反复室温取用可能引起抗体失活；
- 从冰箱取出染色液保存管于 1.5 mL 离心管台式离心机中高速离心 5 s；
- 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 条件下吸取染色液，按每张玻片计算，200 μ L 血细胞分析用稀释液+1 μ L 血细胞分析用染色液 A01 (CD45)+1 μ L 血细胞分析用染色液 C06 (CD31)+1 μ L 血细胞分析用染色液 B13 (PD-L1)；
- 使用加样器轻柔吹打 10 次以充分混匀抗体，不应起泡；
- 将配制后的血细胞分析用染色液混合液室温避光放置。

8.4.4 在避光环境中在细胞液中加入全部 200 μ L 上述血细胞分析用染色液混合液，使用振荡混合仪轻柔振荡混匀沉淀细胞（避免起泡），室温避光孵育 20 min。

8.4.5 于管中加入清洗液 1 \times CRC 至 14 mL。配平，颠倒混匀，室温 500 g 离心 5 min，弃上清至 100 μ L。

8.4.6 使用 1 mL 注射器扎入固定液试剂瓶，抽取适量组织固定液 Cytelligen Fixative 100 μ L/玻片/人份置于 1.5 mL 离心管中，立即盖上管盖。相关要求如下：

- 由于注射器抽取液体不精确，为避免反复抽取，每张玻片可取出 100 μ L~150 μ L 固定液；
- 如因瓶内真空而抽不出液体，使用注射器打入少量空气。使用完毕后，将剩余固定液弃去，不应打回至原包装瓶内；
- 1 mL 注射器用纯化水反复洗涤并晾干后可反复使用。

8.4.7 将上述 100 μ L 细胞液轻轻吹打混匀（保留加样器枪头）后加入 100 μ L 组织固定液 Cytelligen Fixative，并使用保留的加样器枪头轻柔吹打混匀。将每管标本液体分别涂

于 Cytelligen 载玻片标本框内（1 人份/玻片），小心轻轻放于干燥箱中，按照步骤 8.4.8 进行标本避光干燥。具体操作要求如下：

- a) 加组织固定液之前应先充分吹打混匀细胞，估算沉淀体积，再加入等量组织固定液，组织固定液的量可比细胞液多 $10\ \mu\text{L} \sim 20\ \mu\text{L}$ ，不应少于细胞液；

示例：如最终沉淀体积约 $120\ \mu\text{L}$ ，则加入 $120\ \mu\text{L}$ 组织固定液，再充分吹打混匀。

- b) 不应将细胞液涂于框外，建议细胞液加组织固定液不超过 $250\ \mu\text{L}$ ；
- c) 标本干燥时应将标本放于干燥箱的铁架上，铁架置于干燥箱中央，不应将标本置于底部加热板上。

8.4.8 标本干燥与保存：将标本放置 $30^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$ 干燥箱避光过夜。全程不开鼓风，打开顶置通风口，第二天关闭干燥箱温度后将标本继续静置于干燥箱中 $30\ \text{min}$ 凉至室温，立即进行后续 FISH 检测。相关要求如下：

- a) 标本放于干燥箱干燥的时间不应短于 $10\ \text{h}$ ，否则影响干燥效果，造成细胞脱落；最长不应超过 $25\ \text{h}$ ，否则易造成标本背景增高；
- b) 当夏天环境温度高于干燥箱设定的 $30^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$ 时，干燥箱会停止运转，建议将室内空调温度调节至 25°C 。如室内没有空调设施，可将标本放置 35°C 干燥箱中；
- c) 如果干燥箱过夜干燥后，因各种原因无法进行后续 FISH 检测，应将干燥后的标本放于冰箱 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光保存，保存时间不应超过 $48\ \text{h}$ 。 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的标本取出后按照以上干燥条件重新干燥后进行 FISH 操作；
- d) 做 FISH 检测前应观察细胞干燥效果：
 - 1) 正常的干燥效果：标本区干燥、泛白，边缘有时存在颗粒状的现象；
 - 2) 干燥不完全：标本区湿润，甚至出现明显的油状或液滴状，应检查干燥箱内实际温度是否达到设置温度，如干燥箱正常，则适当提高 $1^{\circ}\text{C} \sim 2^{\circ}\text{C}$ 。对于未干燥的标本用调整后的温度干燥至少 $3\ \text{h}$ 或过夜干燥。

8.4.9 标本干燥后，先进行上述实验前准备（试剂、分装、预热等），然后将干燥箱关闭，将标本继续静置于干燥箱中 $30\ \text{min}$ 凉至室温（最长不超过 $1\ \text{h}$ ），进行以下操作：

- a) 使用 $1.5\ \text{mL}$ 离心管离心机室温高速离心组织固定液 FR1 管 $10\ \text{s}$ ；
- b) 按每张玻片计算取液： $20\ \mu\text{L}$ 组织固定液 FR1+ $180\ \mu\text{L}$ 样本稀释液 FR2（取用前从 37°C 水浴中取出，确保已预热至 37°C ），置于振荡器上充分振荡混匀；
- c) 混合液配制好后立即加入标本上：沿 Cytelligen CTC 载玻片标本框内侧边角轻柔滴加 $200\ \mu\text{L}$ 混合液覆盖标本框，不应将液体滴于标本框外，如液体不能覆盖整个标本框，使用枪头平推液体，枪头不应触碰玻片上的细胞；
- d) 室温避光静置 $10\ \text{min}$ ，吸弃混合液。

8.4.10 沿标本框内侧边角轻柔滴加 $200\ \mu\text{L}$ 缓冲液 $1 \times \text{FR3}$ 后，立即吸弃溶液，共重复 2 次。

8.4.11 沿标本框内侧边角轻柔滴加 $200\ \mu\text{L}$ 缓冲液 $1 \times \text{FR3}$ ，室温静置 $2\ \text{min}$ ，吸弃溶液，共重复 2 次。沿标本框内侧边角轻柔滴加 $200\ \mu\text{L}$ 无水乙醇后，立即吸弃，共重复 2 次。

8.4.12 将玻片插入染色缸 II（无水乙醇）中静置 $2\ \text{min}$ 。取出玻片，竖立在滤纸上完全吸干玻片流下的残留液，并使用微型吹风机将玻片轻柔吹至完全干燥后，立即按 8.4.13 滴加探针。多张玻片操作时可先取出 2 张玻片，剩余玻片应一直保存在染色缸 II（无水乙醇）中，直至先取出的 2 张玻片干燥、加上探针并置放好盖玻片。

8.4.13 在避光环境中从 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 存储环境中取出分装好的探针混合液，在标本框中央滴加 $10\ \mu\text{L}$ 探针后（不应起泡），立即使用镊子将盖玻片平放在探针液上，使液体向四周蔓延至整个标本框（不应起泡）。如果需要，可轻按盖玻片以使探针液覆盖整个标本框。

8.4.14 封片：剪去 1 mL 加样器尖头，每张玻片使用 250 μL （或更多）封片胶封住盖玻片四边边缘后，直接放入杂交仪，不需等待封片胶干燥。使用封片胶封片时，应将盖玻片与载玻片的缝隙处全部封好，以防杂交过程中探针干涸。

8.4.15 将玻片平放于杂交仪中，放入湿条，设置杂交条件：

- a) 变性 76 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min；
- b) 杂交 37 $^{\circ}\text{C}$ ，3 h。

8.4.16 杂交完毕取出玻片，并进行如下操作：

- a) 用手轻按盖玻片一角，使用镊子撕去封片胶，不应掀动盖玻片；
- b) 将玻片置于预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的染色缸 I（缓冲液 1 \times FR3）中，静置 1 min 后轻柔晃动缸 I，直至盖玻片脱落。如盖玻片不易脱落，使用镊子轻推至盖玻片松动，继续晃动染色缸 I；
- c) 盖玻片脱落后，将玻片继续在染色缸 I 中静置 5 min 后再轻轻晃动染色缸 I 5 s；
- d) 取出玻片，使用滤纸吸干玻片流下的残留液，并擦干标本框外围液体。

注：杂交完毕后，玻片可继续放于杂交仪中，不应超过 1 h。

8.4.17 沿标本框内侧边角轻柔滴加 200 μL 清洗液后，立即吸弃溶液，共重复 2 次；沿标本框内侧边角轻柔滴加 200 μL 清洗液，室温静置 2 min，吸干溶液，使用吹风机将玻片标本框吹干。

8.4.18 将血细胞分析用染色液 DAPI 分装管瞬时高速离心，取 10 μL 血细胞分析用染色液 DAPI 滴加于标本框中央，置放盖玻片后，一手固定盖玻片防止其滑动，另一手用真空泵吸头或滤纸挤压并吸干溢出的多余液体，封干标本，不应出现气泡。封干后使用封片胶将盖玻片的四个边角封住，以防玻片滑落。操作过程中应注意如下事项：

- a) 血细胞分析用染色液 DAPI 比较粘稠，应慢慢取出；
- b) 如果观察到枪头外壁沾有血细胞分析用染色液 DAPI，应将保存液沾到血细胞分析用染色液 DAPI 分装管管壁上，以免造成试剂损失，不够量。

8.4.19 立即将玻片置于数字病理扫描仪中，并设置全自动扫描，为避免 FISH 信号及抗体染色荧光减弱，标本应在一周内完成检测。在荧光显微镜上反复观察标本会使荧光淬灭，人工读片应在第一次读片时储存细胞图片。

8.4.20 i•FISH 肿瘤细胞检测流程按附录 C 操作。

8.4.21 实验结束后，应进行如下操作：

- a) 将分装未用完的试剂放入冰箱 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，以供下次使用，同时检查剩余试剂是否足够备份，如不足，则提前稀释准备；
- b) 检查、关闭仪器设备，并进行表面清洁，75%酒精消毒处理；
- c) 擦洗实验台面，75%酒精表面消毒；
- d) 将实验台面上的耗材、枪头盒等码放整齐；
- e) 进行实验记录。

9 识别指标及判断标准

9.1 识别指标

完成 i•FISH 检测的细胞包含 7 项识别指标。

- a) CD45：红色通道。大多呈现围绕细胞核的完整的或部分的环状染色，白细胞阳性，CTC、CTEC 均阴性；
- b) CEP8：橙色通道。点状着色，每个点代表一条 8 号染色体，白细胞绝大多数染色体二倍体，CTC、CTEC 绝大多数染色体呈现 1 体、3 体、4 体、 ≥ 5 体；

- c) CEP7: 绿色通道。点状着色, 每个点代表一条 7 号染色体, 内参对照探针, 细胞大多数有 2 个及以上染色体信号;
- d) PD-L1: 绿色通道。可呈现细胞整体染色或围绕细胞核的环状染色, 白细胞、CTC、CTEC 均可能有阳性;
- e) CD31: Cy5 通道。大多呈现围绕细胞核的完整的或部分的环状染色, CTC 阳性, CTC 阴性, 白细胞绝大多数阴性。同时 CD31 与血小板结合, 黄光下有成簇点状背景染色;
- f) DAPI: 蓝色通道。大多呈现圆或椭圆形整体染色, 所有细胞均阳性;
- g) NCS: Cy7 通道。可呈现各种类型的染色: 如细胞核内点状或块状染色、围绕细胞核的完整的或部分的环状染色, 白细胞、CTC、CTEC 均可能有阳性。

9.2 CTC 判断标准

CTC 判断标准为: $\text{DAPI}^+/\text{CD45}^-/\text{CD31}^-/\text{PD-L1}^{\text{或}^-}/\text{CEP8}^+$ (1 体/3 体/4 体/ ≥ 5 体)。如果 Cy7 通道下坏死细胞染色阳性, 即为死细胞 CTC; 如果 Cy7 通道下坏死细胞染色阴性, 即为活细胞 CTC。

9.3 CTEC 判断标准

CTEC 判断标准为: $\text{DAPI}^+/\text{CD45}^-/\text{CD31}^+/\text{PD-L1}^{\text{或}^-}/\text{CEP8}^+$ (1 体/3 体/4 体/ ≥ 5 体)。如果 Cy7 通道下坏死细胞染料阳性, 即为死细胞 CTEC; 如果 Cy7 通道下坏死细胞染料阴性, 即为活细胞 CTEC。

9.4 数字病理扫描仪识别标准

数字病理扫描仪识别标准按照附录 D。

10 检测报告

检测后应详细记录检验结果并输出检测报告, 检测报告应至少包含如下内容:

- a) 标本信息;
- b) 检测项目;
- c) 判定标准;
- d) 检测结果;
- e) 肿瘤患者检测结果提示;
- f) 健康人群检测结果建议。

11 质量控制与安全要求

11.1 质量控制

11.1.1 差相富集检测

应严格按照第 7 章的要求进行检测。

11.1.2 i-FISH 肿瘤细胞检测

应严格按照第 8 章要求进行检测。

11.1.3 读片

11.1.3.1 细胞数目异常

如玻片中间区域20x镜下绝大部分视野小于5个细胞（如图4（a））或存在大片区域的细胞团聚或叠层（如图4（b）），则检测结果不准确，在排除操作失误的前提下，应考虑治疗因素及个体差异，决定是否重新检测。

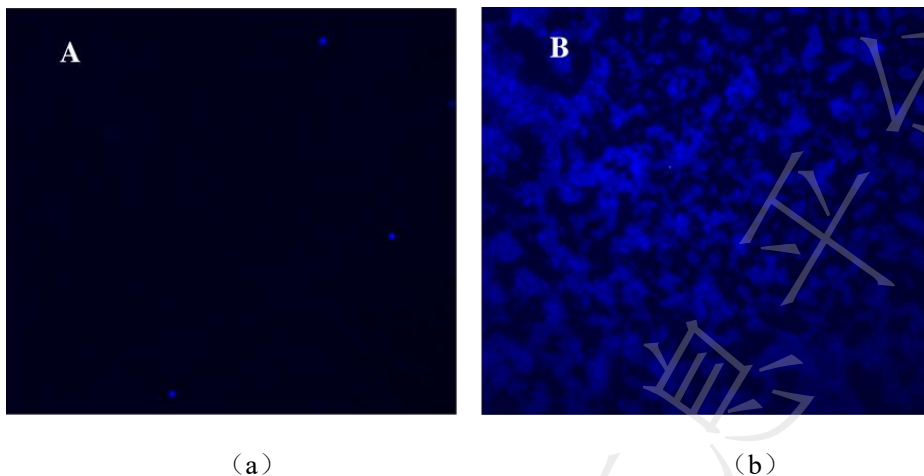


图4 读片细胞数目异常示意图

11.1.3.2 探针异常

如样本出现探针异常，大部分区域应无探针或探针信号弱，影响细胞识别。产生的原因如下：

- a) 人工因素：未2次充分震荡、混匀探针或加错试剂；
- b) 血样个体差异因素：细胞剩余过多导致探针杂交效果不佳。

11.1.3.3 免疫荧光染色异常

红色、绿色等通道无相关细胞染色或背景，应考虑未加或加错相关抗体。

11.2 安全要求

11.2.1 通则

实验室安全管理及工作人员行为应符合 GB 19489 的规定。

11.2.2 个人安全防护

实验室工作人员在工作期间基本采用一级生物安全防护措施，穿工作服，戴医用外科口罩、乳胶手套，为防止标本离心后产生的气溶胶，应戴防护帽及护目镜。工作完毕后脱手套，帽子，口罩及护目镜，进行手卫生。

11.2.3 试剂材料防污染

应对实验室进行功能分区，各区的工作服实验用具和实验记录本应区分标记，不应混用。注意因交谈或其他活动造成的飞沫、落尘带入的污染，必要的情况下在超净工作台中进行操作。

11.2.4 标本离心处理

为防止离心开盖后可能的的气溶胶，标本离心结束后打开试管盖时动作应轻柔缓慢，和操作者面部应保持距离。尽可能缩短打开的持续时间。尽可能避免产生气溶胶。

标本按检测项目和工作分工，将标本送抵相应实验区操作台进行待检或处理。

标本如若离心后管破损或碎裂造成离心机适配器及内腔污染，则立即使用消毒液或75%酒精进行消毒（消毒液应现用现配，24 h内使用）。

11.2.5 标本检验及后处理

待检标本应严格按照操作规程执行，操作人员应全程穿工作服，戴口罩（根据防护要求佩戴帽子，护目镜）。

检测完毕的空采血管置于2℃~8℃环境中保存14天。

11.2.6 废弃物处理

操作区应有专门的固体和液体废弃物收集容器，所有医用废弃物品应放在专用密闭防漏的容器内储存，等待专人收集运输及处理。

11.2.7 实验室清洁与消毒

实验室的清洁与消毒应满足下列要求：

- a) 实验室保持每日通风；
- b) 每天工作完毕后使用 500mg/L 有效氯的消毒液或 75%乙醇进行桌面、台面及地面消毒。消毒液新鲜配置，不超过 24 h；
- c) 每天离心机用毕后需用酒精擦拭内腔；
- d) 对于溅洒的标本，局部污染区进行消毒。
 - 1) 先用面巾纸吸附溅洒物；
 - 2) 然后用 75%酒精或有效氯含量为 3000 mg/L 的含氯消毒剂进行覆盖；
 - 3) 停留污染区至少 5 min 进行消毒。

附录 A (资料性) 检测原理

A.1 检测原理

A.1.1 概述

CD31 阳性及阴性循环异倍体肿瘤细胞检测主要分为循环肿瘤细胞 CTC 及循环肿瘤血管内皮细胞 CTEC 的分离和鉴别两个方面。本方法采用差相富集分离技术将外周血或其他生物体液（胸腹水、骨髓、尿液、脑脊液、淋巴穿刺标本等）中的肿瘤细胞分离出来，采用 i•FISH 肿瘤细胞鉴定技术鉴别 CTC 及 CTEC。

A.1.2 差相富集分离技术

应用非血源性细胞的特殊离心介质及偶联抗人白细胞表面抗原的特殊单克隆抗体组合群的免疫磁微粒快速高效去除外周血中的红细胞、白细胞，富集病人外周血标本中的循环稀有细胞，包括来源于所有不同组织实体瘤的 CTC、肿瘤血管的 CTEC 及干细胞等。

A.1.3 i•FISH 肿瘤细胞鉴定技术

用于检测人或肿瘤动物模型（鼠）外周血中富集的循环稀有细胞 CTC 和 CTEC。将免疫荧光染色 CD45/CD31/肿瘤标志物与人 8 号染色体荧光原位杂交技术整合为同步实施的 i•FISH 平台，在 CD45 区分血源性与非血源性细胞的基础上，CD31 进一步区分非血源性细胞是否是内皮来源，同时根据肿瘤标志物和 8 号染色体倍体进一步判断该细胞是否为肿瘤细胞：

- a) 非血源性非内皮来源肿瘤细胞即为 CTC；
- b) 非血源性内皮来源肿瘤细胞即为 CTEC。

附录 B
(规范性)
人外周血 CTC 差相富集检测流程

人外周血CTC差相富集检测流程见表A.1。

表A.1 人外周血CTC差相富集检测流程

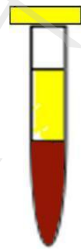
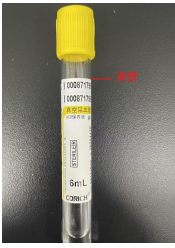
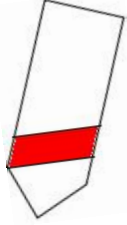
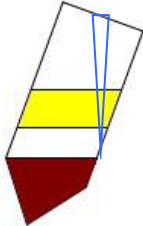
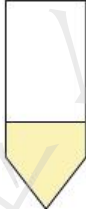
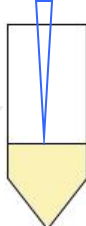
步骤		图例
1	采血管头尾颠倒混匀，配平离心(400 g /10 min)，弃上清至棕红色沉淀上方 5 mm 处	
2	加入 1×CRC 清洗液至标签上沿满管处，盖上黄色管帽，头尾颠倒混匀 10 次后倒入 50 mL 离心管 A 中，在采血管中加入 3 mL 清洗液 1×CRC 洗涤采血管，将洗涤液全部倒入离心管 A 中	
3	离心 B 管中加入 3 mL 样本密度分离液，离心管 A 中的血细胞叠加到分离液上，配平，室温离心 6 min (350 g)	
4	使用 1 mL 加样器从 1 层最上方取出 4 mL 液体弃去，后将剩余 1 层、2 层所有液体转移至 50 mL 离心管 C 中（不应吸取红细胞），补加清洗液 1×CRC 至 6 mL	
5	竖直摇匀离心管 C 中液体，边摇边滴加混匀后的缓冲液 Magnetic Beads Buffer (250 μL/人份)，将离心管 B 以 35° ~40° 倾角固定于摇床上，125r /min 孵育 20 min，液体摇晃到管壁 30mL~35 mL 处	

表 A.1 人外周血 CTC 差相富集检测流程 (续)

	步骤	图例
6	<p>将离心管 C 置于磁力架上 3 min 以彻底吸附缓冲液 Magnetic Beads Buffer (1 min 时使用枪头沿中央底部吹打), 3 min 后将离心管 C 内液体小心转移至 50 mL 离心管 D 中</p>	
7	<p>50 mL 离心管 D 中加入清洗液 1×CRC 至 45 mL, 配平, 颠倒混匀, 室温离心 5 min (450 g)。弃上清至 100 μL, 当天立即执行 i•FISH 肿瘤细胞检测中的液染操作</p>	

附录 C
(规范性)
i•FISH 肿瘤细胞检测流程

i•FISH 肿瘤细胞检测流程见表B.1。

表B.1 i•FISH 肿瘤细胞检测流程





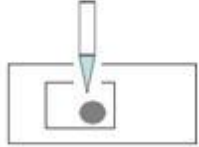
步骤		图例
1	取差相富集后的 100 μL 细胞液，加入提前分装好的 3 μL 坏死细胞荧光染色液，使用振荡混合仪轻柔振荡混匀沉淀细胞，室温避光孵育 30 min，15 min 时使用振荡混合仪轻柔振荡混匀沉淀细胞	
2	于管中加入 1 mL 清洗液 1×CRC，使用 1 mL 移液枪混匀，转移至新的 15 mL 离心管中，补加清洗液 1×CRC 至 14 mL。配平，颠倒混匀，室温 550 g 离心 5 min，弃上清至 100 μL	
3	加入 2 μL 抗原修复缓冲液，振荡混合仪轻柔振荡混匀，室温静置 10 min (过程中配制抗体)；加入配制后的 200 μL 血细胞分析用染色液混合液，振荡混合仪混匀，室温避光孵育 20 min	
4	于管中加入清洗液 1×CRC 至 14 mL。配平，颠倒混匀，室温 500 g 离心 5 min，弃上清至 100 μL	
5	涂片、固定，过夜干燥，第二天进行后续 FISH	

表 B.1 i•FISH 肿瘤细胞检测流程 (续)

	步骤	图例
6	20 μL 组织固定液 FR1+180 μL 样本稀释液 FR2 混合液, 静置 10 min	
7	缓冲液 1xFR3 润 2 洗 2 (2 min)	
8	无水乙醇润 2 次, 插入缸中 2 min, (期间振荡、分装探针) 用吹风机将载玻片吹干	
9	将已分装好的 10 μL 探针滴加到载玻片的中央, 立即盖上盖玻片, 盖正	
10	用封面胶将盖玻片的四周封住, 放入杂交仪: 变性: 76 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 杂交 37 $^{\circ}\text{C}$, 3 h	
11	杂交结束后, 用镊子将胶撕去, 放入缓冲液 FR3 缸中, 浸泡 1 min 后, 将盖玻片晃去后, 再静置 5 min 后轻柔晃动 5 s, 用滤纸将四周擦干(及时加液, 勿使载玻片干燥)	
12	清洗液润 2 洗 1(2 min), 吹干, 加 10 μL 血细胞分析用染色液 DAPI, 封片	

附录 D
(规范性)
数字病理扫描仪识别标准

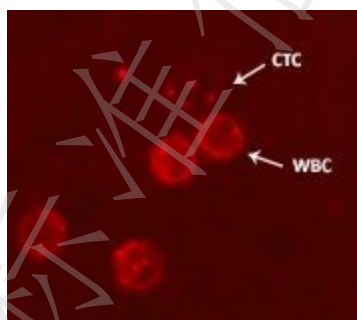
D.1 CTC读片及识别标准

D.1.1 概述

CTC 标本读片所用荧光显微镜有 6 个颜色通道，分别为红、绿、蓝、橙、黄、粉。

D.1.2 红色通道red

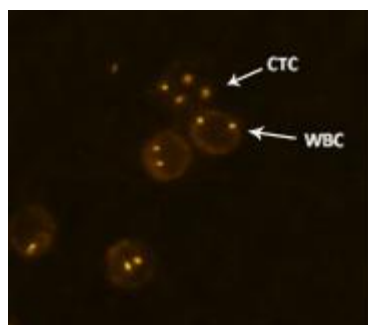
使用宽带滤光片Alexa Fluor 549。红色通道下CD45和8号染色体橙色探针信号均可见，白细胞的8号染色体大都为2倍体，CD45阳性；CTC的8号染色体为非2倍体（1体、3体、4体、 ≥ 5 体），CD45阴性，如图C.1所示。



图C.1 红色通道识别结果示意图

D.1.3 橙色通道Orange

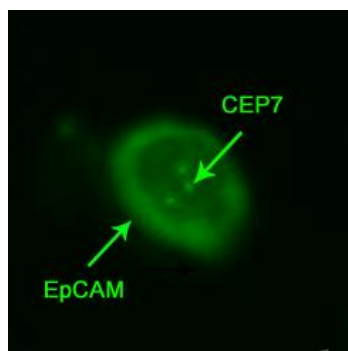
使用窄带滤光片。橙色通道下可见8号染色体探针信号，白细胞、CTC的8号染色体都可见。有个别细胞红光、橙光下8号染色体数目不一致，红光下有时杂点很像FISH信号，所以判定8号染色体数目应在橙光下进一步确认。如图C.2所示。



图C.2 橙色通道识别结果示意图

D.1.4 绿色通道Green

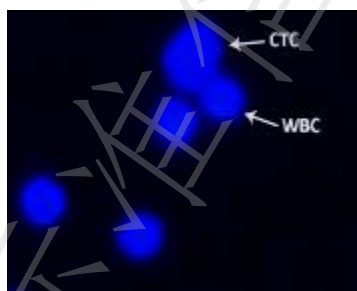
使用窄带滤光片Alexa Fluor 488。绿色通道下可见瘤标染色和7号染色体荧光信号。其中7号染色体作为内参，只要有荧光信号点即可。如图C.3所示。



图C.3 绿色通道识别结果示意图

D.1.5 蓝色通道 DAPI

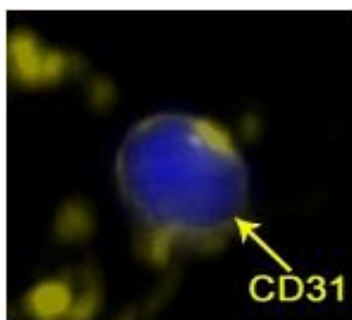
蓝色通道下可见细胞核DAPI染色，白细胞、CTC均是阳性。如图C.4所示。



图C.4 蓝色通道识别结果示意图

D.1.6 黄色通道 cy5

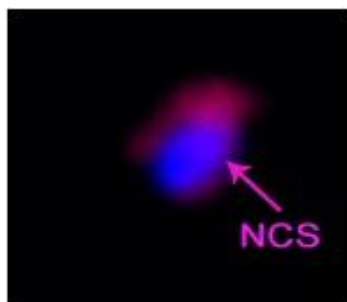
黄色通道下可见CD31染色，内皮细胞CD31为阳性。如图C.5所示。



图C.5 黄色通道识别结果示意图

D.1.7 粉色通道 cy7

粉色通道下可见坏死NCS染色，坏死细胞NCS阳性。如图C.6所示。

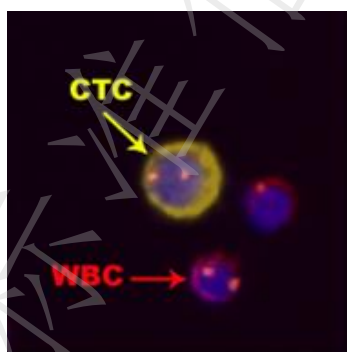
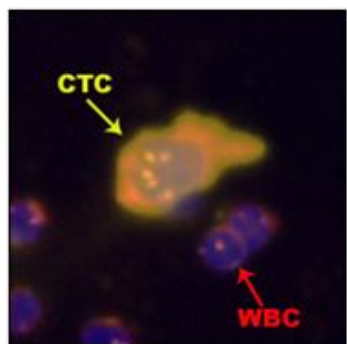


图C.6 粉色通道识别结果示意图

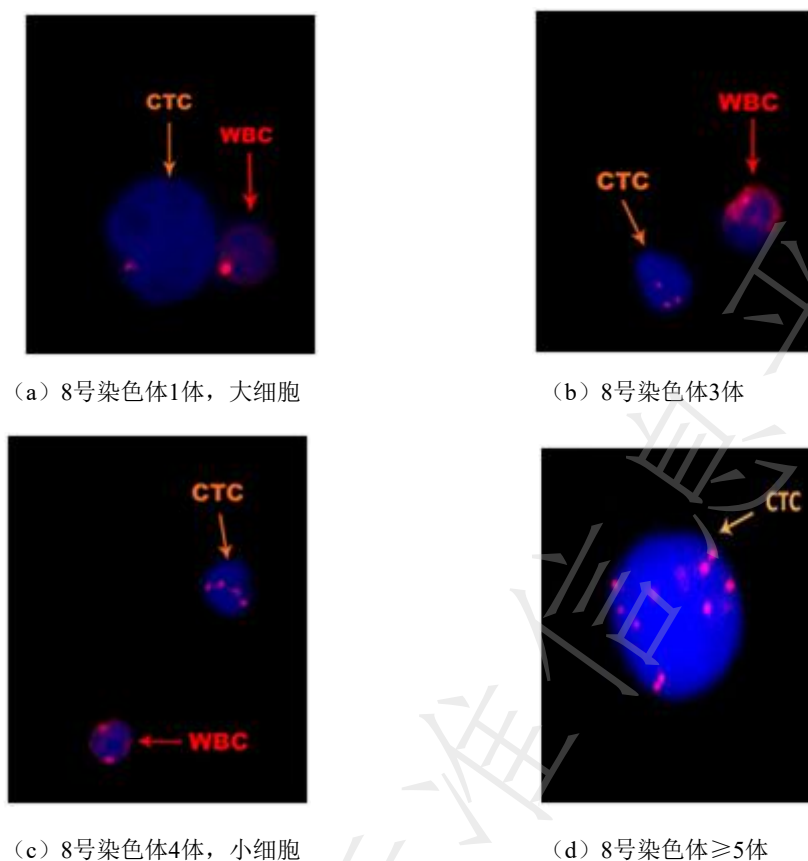
D.2 CTC类型

使用i•FISH检测方法后识别出的CTC主要分两种，前提是 $DAPI^+/CD45^-/CD31^-$ 。

- a) 一种是 $DAPI^+/CD45^-/CD31^-$ /任一瘤标（如CK18） $^+/8$ 号染色体 $^+$ （任意数目染色体），如图C.7、图C.8；

图C.7 ($DAPI^+/CD45^-/CD31^-/CK18$ (黄色) $^+/8$ 号染色体2体) 示意图图C.8 ($DAPI^+/CD45^-/CD31^-/CK18$ (黄色) $^+/EpCAM$ (绿色) $^+/8$ 号染色体4体) 示意图

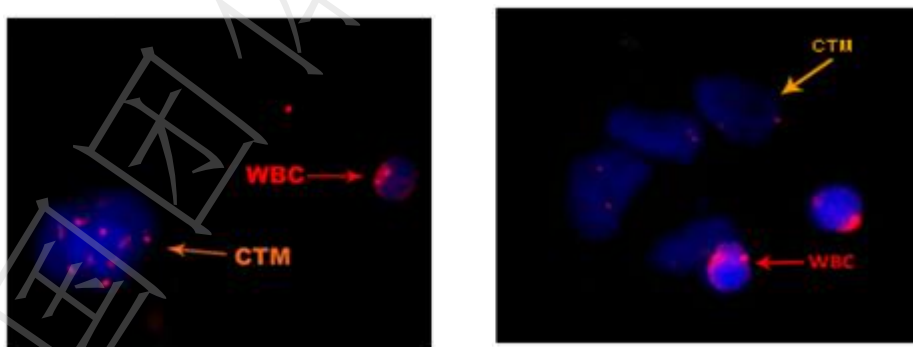
- b) 一种是 $DAPI^+/CD45^-/CD31^-/CK18^-/8$ 号染色体 $^+$ （1体、3体、4体、 ≥ 5 体），由于CTC间质化过程中，CK降解，所以这种CTC较为常见，且大小差异较大。如图C.9；



图C.9 (DAPI⁺/CD45⁻/CD31⁻/CK18⁻/8号染色体⁺(1体、3体、4体、 ≥ 5 体))示意图

c) 对于DAPI⁺/CD45⁻/CD31⁻/8号染色体1体的细胞, 如果核型与白细胞一样, 则不计为CTC。

外周血中的CTC除了单个的, 还有癌栓, 即CTC细胞团 (CTM, ≥ 2 个癌细胞), 癌栓细胞有的核重叠、有的分开, 8号染色体可能为任意染色体数目。如图C.10所示。



图C.10 癌栓示意图

D.3 异常情况

D.3.1 细胞数目异常

如玻片中间区域绝大部分视野小于5个细胞 (20 \times 镜下) 或存在大片区域的细胞团聚或叠层, 则检测结果不准确, 在排除操作失误的前提下, 考虑治疗因素及个体差异, 决定是否重新检测。

D.3.2 免疫荧光染色异常

红色、绿色等通道无相关细胞染色或背景，考虑未加或加错相关抗体。

D.3.3 探针异常

大部分区域无探针或探针信号弱，影响细胞识别。

- a) 人工因素：未混匀探针或加错试剂；
- b) 样本因素：细胞剩余过多导致探针杂交效果不佳。

全国团体标准信息平台

参考文献

- [1] YY/T 1965 体外诊断试剂用质控物通用技术要求



全国团体标准信息平台