

团 体 标 准

T/CEAC XXXX—2024

外周血中循环肿瘤细胞检测通用要求

General requirements for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood

2024 - XX - XX 发布

2024 - XX - XX 实施

中国商业经济学会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 方法原理 1

5 试剂材料和仪器设备 1

6 样本采集与处理 2

7 测定结果 2

8 质量控制 3

9 安全管理 3

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××××提出。

本文件由中国商业经济学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

外周血中循环肿瘤细胞检测通用要求

1 范围

本文件规定了外周血中循环肿瘤细胞检测的方法原理、试剂材料和仪器设备、样本采集与处理、测定结果、质量控制与安全管理。

本文件适用于外周血中循环肿瘤细胞的检测。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外周血 peripheral blood

在体内循环系统中的血液，包括动脉血和静脉血，是进行循环肿瘤细胞检测的主要样本来源。

3.2

循环肿瘤细胞 circulating tumor cells, CTC

从原发灶或转移灶脱落进入外周血中的肿瘤细胞，在肿瘤的转移和复发过程，发挥着重要作用，是液体活检技术中的重要检测对象。

4 方法原理

基于免疫学和形态学相结合的方法，采用微孔滤膜芯片，将CTC分离或分离富集后染色成像，根据癌细胞形态学的传统认知，如细胞体积大、畸形、染色质异常、核仁体积大和核仁数目多等特点，在数字荧光显微镜下进行肿瘤细胞特征性病理形态学检测。

5 试剂材料和仪器设备

5.1 试剂材料

检测所需的试剂材料包括但不限于：

——CTC 富集滤膜芯片：

- 1) 微孔滤膜，直径 25 mm 聚碳酸酯膜，随机分布 9000 个直径 8 μm 微孔；
- 2) 定量滤纸，剪成长宽各 2.5 cm 方块状；
- 3) 滤膜芯片盒：制作长宽各 5 cm，深 1.5 cm 方形塑料材质盒子，分盒底和盒盖；盒盖和盒底接触部分四周有卡槽，使盒底和盒盖能结合紧密；盒盖中央制作直径 1.5 cm 孔，孔周边结构平整，孔内侧周边向内微凸起，以便粘贴滤膜；在滤膜芯片盒内填充定量滤纸达到盒上沿，在盒盖孔内侧凸起处放置密封圈，再在密封圈上放置微孔滤膜，然后把盒盖扣在盒底座上，完成滤膜芯片盒的制作；

- 红细胞裂解液，pH 为 7.2~7.4；
- 1%甲醛溶液；
- 磷酸缓冲液（PBS）：浓度为 1×PBS（0.01mol/L），pH 为 7.2~7.4；
- 细胞固定液：甲醇、丙酮、多聚甲醛；
- 细胞封闭液：PBS（含 0.5%~10%BSA 或小牛血清），pH 为 7.2~7.4；
- 细胞膜与细胞核膜通透液：曲拉通 X-100；
- 细胞洗涤液：PBS（含吐温-20），pH 为 7.2~7.4；
- 染色液 1：标记绿色荧光的 CK8、18、19 和 Vimentin 单克隆抗体以及标记红色荧光的核仁蛋白单克隆抗体的 PBS 稀释液，稀释倍数根据各实验室探索的条件；
- 染色液 2：DAIP 染液，稀释倍数根据各实验室探索的条件；
- 载玻片：规格为 25mm×75mm，厚度为 1mm~1.2mm；
- 盖玻片：规格为 22mm×22mm，厚度为 0.13mm~0.16mm；
- 封片胶。

5.2 仪器设备

检测所需的仪器设备包括但不限于：

- 水浴锅：RT+5℃~99℃；
- 数字荧光显微镜。

6 样本采集与处理

6.1 样本采集

- 6.1.1 血样采集前应向患者解释清楚检测的目的和方法，消除其顾虑。
- 6.1.2 血样采集前一天，患者应保持清淡饮食，避免饮酒，以免影响检测结果。
- 6.1.3 血样采集时应避免患者情绪紧张，以减少应激反应对样本的影响。
- 6.1.4 血样采集环境应保持清洁，采血器具应无菌，以避免样本污染。
- 6.1.5 采样对象应为已确诊的肿瘤患者，或疑似存在肿瘤转移的患者。
- 6.1.6 采用静脉采血的方式，使用无菌技术采集患者外周静脉血，常规采集静脉 EDTA 抗凝血 5~10mL。为避免针头穿刺带入上皮细胞污染，一般采集两管血液，一管用于 CTC 检测，另一管用于其他实验。
- 6.1.7 血液样本应在 4℃~8℃环境下保存，72h 内进行 CTC 检测。

6.2 样本处理

样本处理按如下步骤进行：

- b) 在 CTC 富集滤膜芯片上加入 1.5mL 血液，等待血液过滤完毕；
- c) 加入 1mL 红细胞裂解液，等待过滤完毕；
- d) 加入 1mL 1%甲醛溶液，等待过滤完毕；
- e) 加入 1mL PBS，过滤完毕后，拆开盒子，取出微孔滤膜放入六孔板中，在孔中加入 1mL 细胞固定液，室温固定 10min。吸出废液；
- f) 加入 1mL 封闭通透液，37℃ 10min，吸出废液；
- g) 加入 500 μL 染色液 1，37℃ 40min，吸出废液；
- h) 加入 500 μL 染色液 2，37℃ 10min，吸出废液；
- i) 加入 2mL 细胞洗涤液冲洗 3 次，每次 3min。
- j) 染色完毕后把滤膜转移到载玻片上，滴加封片胶，将盖玻片放置其上。
- k) 将封片后的玻片移到数字荧光显微镜，按常规方法寻找非血源脱落细胞。

7 测定结果

- 7.1 在血样中检出单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇即为阳性。

7.2 在血样中进行检测，未检测到单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇即为阴性，提示检测样本无 CTC。

7.3 结果应按照合适的病人管理程序与来自诊断测试（即影像学、实验室检查）、体检和完整病史等信息结合使用。

8 质量控制

8.1 质量控制方法

8.1.1 实验室应建立一套完整的质量控制体系，确保检测结果的准确性和可靠性。

8.1.2 实验室应定期进行内部质量控制检测，包括使用已知浓度的质控样本或标准品进行测试。

8.1.3 应定期对检测人员进行培训和技能评估，确保其熟练掌握检测技术。

8.1.4 实验室可参与外部质量控制计划，如实验室间比对测试。

8.2 仪器与试剂

8.2.1 使用的仪器应定期进行校准和维护，确保其性能稳定可靠。

8.2.2 应定期对仪器进行性能测试，如精确度、灵敏度、特异性等。

8.2.3 使用的试剂应符合相关标准和规定，确保其质量和稳定性。

8.2.4 应定期对试剂进行质量检查，包括有效期、保存条件等。

8.3 样本处理与保存

8.3.1 样本处理过程应遵循标准化操作程序，确保处理的一致性和准确性。

8.3.2 样本应在适当的条件下保存，以确保其稳定性和可靠性。

8.3.3 应定期对保存的样本进行质量检查，评估其保存状态和可用性。

8.4 数据处理

8.4.1 检测数据应进行严格的统计分析和处理，确保结果的准确性和可靠性。

8.4.2 对异常数据进行复核和验证，避免误判和错误结果。

8.5 质量控制记录与报告

8.5.1 实验室应建立完善的质量控制记录和报告制度，详细记录检测过程中的各项数据和信息。

8.5.2 应定期对质量控制记录和报告进行审核和分析，以便及时发现问题并采取改进措施。

9 安全管理

9.1 实验室安全管理及工作人员行为符合 GB 19489 的规定。

9.2 实验室应设置明显的安全警示标识，标明危险区域和注意事项。

9.3 实验室工作人员应穿戴适当的防护装备，如实验服、一次性手套、口罩和实验帽等，以防止样本污染和自身感染。

9.4 在处理样本和试剂时，应遵循标准的操作程序，避免直接接触有害物质。

9.5 实验室应定期进行安全检查，及时发现并排除安全隐患。

9.6 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。

9.7 操作区应有专门的固体和液体废弃物收集容器，废弃物应进行无害化处理。

9.8 实验室应具备相应的生物安全设备和措施，如生物安全柜、高压灭菌器等。

9.9 实验室应制定应急预案，明确应急处理流程 and 责任人。定期对实验室工作人员进行应急处理培训，确保其能够熟练掌握应急设备和措施的使用方法。

参 考 文 献

- [1] 兰峰, 刘永萍. 循环肿瘤细胞检测的临床进展[J]. 现代肿瘤医学, 2015(15):2219-2222. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2015.15.043.
- [2] 中华医学会检验医学分会分子诊断学组. 循环肿瘤细胞临床应用与实验室检测专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(11):1008-1020. DOI:10.3760/cma.j.cn114452-20210721-00445.
-