

Deutsche Fassung

Molekularanalytische in vitro diagnostische Verfahren - Spezifikationen für präanalytische Prozesse für zirkulierende Tumorzellen (CTC) in venösen Vollblutproben - Teil 3: Vorbereitungen für die analytische CTC Färbung

Molecular in vitro diagnostic examinations -
Specifications for pre-examination processes for
circulating tumor cells (CTCs) in venous whole blood -
Part 3: Preparations for analytical CTC staining

Analyses de diagnostic moléculaire in vitro -
Spécifications relatives aux processus préanalytiques
pour les cellules tumorales circulantes (CTC) du sang
total veineux - Partie 3 : Préparations pour l'analyse par
coloration des CTC

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 27. Oktober 2019 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Allgemeine Betrachtungen.....	11
5 Außerhalb des Labors.....	11
5.1 Entnahme von Untersuchungsmaterial.....	11
5.1.1 Informationen über den Probenspender/Patienten.....	11
5.1.2 Wahl des Entnahmeröhrchens für venöses Vollblut durch das Labor.....	12
5.1.3 Entnahme von venösen Vollblutproben bei Spendern/Patienten und Stabilisierungsverfahren.....	12
5.1.4 Informationen zum Untersuchungsmaterial und Anforderungen an die Lagerung in der Blutentnahmeeinrichtung.....	13
5.2 Anforderungen an den Transport	14
5.2.1 Allgemeines	14
5.2.2 Verwendung von Blutentnahmeröhrchen mit Stabilisatoren	14
5.2.3 Verwendung von Blutentnahmeröhrchen ohne Stabilisatoren	14
6 Im Labor.....	14
6.1 Eingang des Untersuchungsmaterials.....	14
6.2 Anforderungen an die Lagerung von venösen Vollblut-Primärproben.....	15
6.3 Anreicherung der CTCs.....	15
6.3.1 Allgemeines	15
6.3.2 Verwendung eines handelsüblichen CTC-Anreicherungs-systems	15
6.3.3 Verwendung laboreigener Protokolle zur CTC-Anreicherung	16
6.4 Lagerung der angereicherten CTCs.....	16
6.5 Vorbereitung für die CTC-Färbung.....	16
6.5.1 Allgemeines	16
6.5.2 Vorbehandlung für verschiedene Färbetechniken (Antikörper-, Farbstoff-Färbung, In-situ-Techniken).....	17
Anhang A (informativ) Entscheidungsleitfaden für die kritischen Schritte des präanalytischen Arbeitsablaufs für die Färbung von CTCs	18
Literaturhinweise.....	20

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17390-3:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

CEN/TS 17390 besteht unter dem allgemeinen Titel *Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren — Spezifikationen für präanalytische Prozesse für zirkulierende Tumorzellen (CTC) in venösen Vollblutproben* aus den folgenden Teilen:

- Teil 1: *Isolierte RNA*
- Teil 2: *Isolierte DNA*
- Teil 3: *Vorbereitungen für die analytische CTC-Färbung*

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Technische Spezifikation anzukündigen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Solide Tumoren geben Zellen und biologische Analyte an das Blut und andere Körperflüssigkeiten ab. Dies eröffnet die Möglichkeit eines minimalinvasiven Nachweises, der Diagnose und Charakterisierung eines Tumors anhand venöser Vollblutproben (Flüssigbiopsien). Es ist zu erwarten, dass Flüssigbiopsien den frühzeitigeren Nachweis und die Diagnose einer Krebserkrankung ermöglichen und zu Fortschritten in der personalisierten Behandlung der Patienten führen. Diese Anwendungen sind zu einem der am schnellsten wachsenden Segmente des gesamten Diagnostikmarktes geworden.

Zirkulierende Tumorzellen (en: circulating tumour cells, CTCs) im venösen Vollblut spiegeln mit individuell ausgeprägten genetischen, epigenetischen und die Expression betreffenden Merkmalen die Komplexität der Erkrankung wider, die sich im Verlauf der Tumorprogression entwickelt. Neben der prognostischen Funktion der Identifizierung und/oder Auszählung der CTCs in der Tumorprogression kann die molekulare Charakterisierung der CTCs, z. B. die Vorhersage des Krankheitsverlaufs bzw. Therapieergebnisses, die therapeutischen Handlungsempfehlungen und die Überwachung des Patienten bei der Nachsorge verbessern.

CTCs werden derzeit als eine Surrogat-Probe für das Tumorgewebe sowohl in der frühen Entwicklungs- als auch in der Metastasierungsphase angesehen.

Aus der molekularen Charakterisierung der CTCs kann zum Beispiel eine Strategie für das Monitoring der Tumorgenotypen im Verlauf systemischer Therapien [1], die Erkennung von Mechanismen der Krankheitsprogression, die Identifikation neuer Zielstrukturen (Targets) für die Behandlung [2] und die Auswahl zielgerichteter Therapien abgeleitet werden. Darüber hinaus befindet sich mit der CTC-Einzelzellsequenzierung ein wichtiges Werkzeug für die Analyse der genomischen Heterogenität eines Tumors in der Entwicklung [3], [4], [5].

CTCs sind empfindliche Strukturen und werden innerhalb weniger Stunden abgebaut, wenn sie in herkömmlichen Blutentnahmeröhrchen, z. B. EDTA-enhaltenden Röhrchen ohne spezielle CTC-Stabilisatoren, entnommen werden. CTCs sind insbesondere in den Frühstadien der Erkrankung extrem selten, z. B. weniger als 10 Zellen je 10 ml Blut, entsprechend einem Verhältnis von etwa $1 : 10^7$ CTCs zu Leukozyten (WBCs, en: white blood cells). Dieses niedrige Verhältnis stellt eine erhebliche Herausforderung bei der erforderlichen CTC-Anreicherung für die Identifizierung und die Untersuchung als Zellen, die von einem Tumor abstammen, dar.

Darüber hinaus können sich die Morphologie der CTCs und die Biomoleküle im Verlauf des präanalytischen Prozesses verändern. So kann es Veränderungen in der Menge an Protein, der Integrität, Modifikation, Konformation und Lokalisation innerhalb der Zelle kommen. Dies wiederum kann sich auf die Gültigkeit und Zuverlässigkeit der Untersuchungsergebnisse auswirken.

Die CTC-Analyse beinhaltet üblicherweise einen CTC-Anreicherungsschritt (z. B. basierend auf biologischen Eigenschaften wie der Expression von Oberflächenmolekülen oder auf physikalischen Eigenschaften wie Größe und Dichte der CTCs oder einer Kombination davon), der vor der zytomorphologischen Untersuchung oder der Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt wird. CTC-Anreicherungstechniken können CTCs liefern, die — immobilisiert auf einer festen Oberfläche — bereit sind für die zytologische Untersuchung, oder in Suspension befindliche CTCs, für die weitere Verarbeitungsschritte vor der Untersuchung erforderlich sind. Diese können zu einem möglichen Zellverlust führen [6].

Im Anschluss an die Anreicherung der CTCs erfolgt normalerweise ihre Identifizierung mittels konventioneller zytochemischer oder auf Proteinen als Zielstrukturen basierenden Färbemethoden, die den Nachweis der Zellmerkmale erlauben.

Die Standardisierung aller Schritte des präanalytischen Arbeitsablaufs ist erforderlich. Dies umfasst die Blutentnahme und -stabilisierung, den Transport, die Lagerung, CTC-Anreicherung und CTC-Isolierung (falls erforderlich). Ein Entscheidungsleitfaden für die kritischen Schritte des präanalytischen Arbeitsablaufs für die CTC-Färbung wird in Anhang A bereitgestellt.

Dieses Dokument beschreibt Maßnahmen zur Standardisierung des präanalytischen Prozesses, um eine zweckdienliche CTC Färbung zu erhalten.

In diesem Dokument werden die folgenden Verbformen verwendet:

- „muss“ bezeichnet eine Anforderung;
- „sollte“ bezeichnet eine Empfehlung;
- „darf“ gibt eine Zulässigkeit an;
- „kann“ gibt eine Möglichkeit oder ein Vermögen an.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument spezifiziert Empfehlungen zur Handhabung, Lagerung, Verarbeitung und Dokumentation von Proben venösen Vollbluts, die für die Färbung der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) vorgesehen sind, während der präanalytischen Phase vor der Durchführung einer molekularen Analyse.

Dieses Dokument ist anwendbar auf molekulare *in-vitro*-diagnostische Untersuchungen, die in medizinischen Laboratorien durchgeführt werden, einschließlich vom Laboratorium selbst entwickelter Verfahren. Es ist darüber hinaus für die Verwendung durch Kunden von Laboratorien, Entwickler und Hersteller von *In-vitro*-Diagnostika, durch Biobanken, Institutionen und kommerzielle Organisationen, die biomedizinische Forschungen durchführen, sowie durch Arzneimittelagenturen bestimmt.

Dieses Dokument behandelt nicht die Anforderungen an den präanalytischen Arbeitsablauf zur Kryokonservierung und Kultivierung lebensfähiger CTCs.

ANMERKUNG 1 Die in diesem Dokument dargelegten Anforderungen können auch auf andere zirkulierende Zellen (z. B. fetale Zellen) angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Internationale, nationale oder regionale Regelungen bzw. Anforderungen können ebenfalls für bestimmte Themen in diesem Dokument gelten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 15189:2012, *Medizinische Laboratorien — Anforderungen an die Qualität und Kompetenz (ISO 15189:2012, korrigierte Fassung 2014-08-15)*

ISO 15190, *Medical laboratories — Requirements for safety*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

3.1 Aliquot
Anteil einer größeren Menge homogenen Materials, der unter Annahme eines vernachlässigbaren Probenahmefehlers entnommen wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Begriff wird üblicherweise für Flüssigkeiten verwendet. Gewebe sind heterogen und können daher nicht aliquotiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Diese Definition beruht auf den Literaturhinweisen [7], [8] und [9].

[QUELLE: EN ISO 20166-3:2019, 3.1]