

DIN CEN/TS 17390-2

ICS 11.100.10

**Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren –
Spezifikationen für präanalytische Prozesse für zirkulierende
Tumorzellen (CTC) in venösen Vollblutproben –
Teil 2: Isolierte DNA;
Deutsche Fassung CEN/TS 17390-2:2020**

Molecular in vitro diagnostic examinations –
Specifications for pre-examination processes for circulating tumor cells (CTCs) in venous
whole blood –
Part 2: Isolated DNA;
German version CEN/TS 17390-2:2020

Analyses de diagnostic moléculaire in vitro –
Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour les cellules tumorales
circulantes (CTCs) dans le sang total veineux –
Partie 2: ADN extrait;
Version allemande CEN/TS 17390-2:2020

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17390-2:2020) wurde vom CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-03-03 AA „Qualitätsmanagement in medizinischen Laboratorien“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Technische Spezifikationen sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Eine Technische Spezifikation ist das Ergebnis einer Normungsarbeit, das wegen bestimmter Vorbehalte zum Inhalt oder wegen des gegenüber einer Norm abweichenden Aufstellungsverfahrens von DIN noch nicht als Norm herausgegeben wird.

Zur vorliegenden Technischen Spezifikation wurde kein Entwurf veröffentlicht.

Erfahrungen mit dieser Technischen Spezifikation sind erbeten:

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an NAMed@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Medizin (NAMed), 10772 Berlin.

Deutsche Fassung

Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren —
Spezifikationen für präanalytische Prozesse für zirkulierende
Tumorzellen (CTC) in venösen Vollblutproben —
Teil 2: Isolierte DNA

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

Analyses de diagnostic moléculaire in vitro —
Spécifications relatives aux processus préanalytiques
pour les cellules tumorales circulantes (CTCs)
dans le sang total veineux —
Partie 2: ADN extrait

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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, 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	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Allgemeine Betrachtungen	12
5 Außerhalb des Labors	13
5.1 Entnahme von Untersuchungsmaterial	13
5.1.1 Informationen über den Spender/Patienten	13
5.1.2 Wahl des Entnahmeröhrchens für venöses Vollblut durch das Labor	13
5.1.3 Entnahme von venösen Vollblutproben bei Spendern/Patienten und Stabilisierungsverfahren	14
5.1.4 Informationen zum Untersuchungsmaterial und Anforderungen an die Lagerung in der Blutentnahmeeinrichtung	14
5.2 Anforderungen an den Transport	15
5.2.1 Allgemeines	15
5.2.2 Verwendung von Blutentnahmeröhrchen mit Stabilisatoren	15
5.2.3 Verwendung von Blutentnahmeröhrchen ohne Stabilisatoren	15
6 Im Labor	16
6.1 Eingang des Untersuchungsmaterials	16
6.2 Anforderungen an die Lagerung von venösem Vollblut-Untersuchungsmaterial	16
6.3 Anreicherung der CTCs	16
6.3.1 Allgemeines	16
6.3.2 Verwendung eines handelsüblichen CTC-Anreicherungssystems	17
6.3.3 Verwendung laboreigener Protokolle zur CTC-Anreicherung	17
6.4 Qualität der angereicherten CTCs	17
6.5 Lagerung der angereicherten CTCs	18
6.6 Isolierung der CTCs	18
6.6.1 Allgemeines	18
6.6.2 Verwendung eines handelsüblichen CTC-Isolierungssystems	19
6.6.3 Verwendung eines laboreigenen CTC-Isolierungsverfahrens	19
6.7 Verarbeitung der isolierten CTCs	19
6.8 Isolierung der DNA aus der angereicherten CTC-Probe	20
6.8.1 Allgemeines	20
6.8.2 Verwendung eines handelsüblichen Kits für die DNA-Isolierung	20
6.8.3 Verwendung eines laboreigenen DNA-Isolierungsverfahrens	20
6.9 Quantitäts- und Qualitätsbewertung der aus angereicherten oder isolierten CTCs isolierten DNA	21
6.10 Lagerung der aus angereicherten CTCs isolierten DNA	21
6.10.1 Allgemeines	21
6.10.2 Mit handelsüblichen Kits isolierte DNA	22
6.10.3 Nach laboreigenen Protokollen isolierte DNA	22
Anhang A (informativ) Beispiel eines kompletten Arbeitsablaufs für die molekulare Charakterisierung einzelner CTCs	23

A.1	Allgemeine Informationen zu durchgeführten Experimenten in Anhang A.....	23
A.2	Präanalytischer Arbeitsablauf.....	23
A.2.1	Zellkultur- und Aufstockungsexperimente.....	23
A.2.2	Anreicherung und Auszählung der Zellen.....	24
A.2.3	Einzelzellsortierung.....	24
A.3	Analytische Untersuchung	24
A.3.1	Genomamplifikation (WGA).....	24
A.3.2	Kontrolle der Qualität der WGA.....	24
A.3.3	Sequenzierung der nächsten Generation	25
Anhang B (informativ) Entscheidungsleitfaden für die kritischen Schritte des präanalytischen Arbeitsablaufs für die DNA-Isolierung aus CTCs.....		27
Literaturhinweise.....		31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17390-2:2020) 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 Diagnostik-Marktes 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 Tumورprogression entwickelt. Neben der prognostischen Funktion der Identifizierung und/oder Auszählung der CTCs in der Tumورprogression 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 ein Surrogat für das Tumorgewebe in der frühen Entwicklungs-, Progressions- und 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 stellt die CTC-Einzelzellsequenzierung ein wichtiges Werkzeug für die Analyse der genomischen Heterogenität eines Tumors dar [3], [4], [5]. Molekulare Untersuchungstechniken wie qPCR und dPCR sowie Sequenzierungsverfahren, einschließlich der Sequenzierung der nächsten Generation (en: next generation sequencing, NGS), ermöglichen die Charakterisierung CTC-spezifischer DNA-Merkmale.

CTCs sind empfindliche Strukturen und werden innerhalb weniger Stunden abgebaut, wenn sie in herkömmlichen Blutentnahmeröhrchen, z. B. EDTA-enthaltenden 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 (en: white blood cells, WBCs). Dieses niedrige Verhältnis stellt eine erhebliche Herausforderung bei der erforderlichen CTC-Anreicherung für die Untersuchung dar. Darüber hinaus verursacht die gleichzeitige Anreicherung normaler Blutzellen eine Verdünnung der CTCs. Die Herausforderung liegt darin, die Menge gleichzeitig angereicherter WBCs zu senken, um CTC-spezifische genetische und epigenetische Veränderungen anschließend genau und sensitiv nachweisen zu können, insbesondere, wenn es sich um kleinere Tumorzellklone handelt.

Es müssen spezielle Maßnahmen ergriffen werden, um die WBCs zu beseitigen und hochwertige DNA-Proben zu erhalten, die von großer Reinheit geprägt sind und somit für Mutationsmuster des Tumors repräsentativ sind.

Es ist eine Standardisierung aller Schritte des präanalytischen Arbeitsablaufs erforderlich. Dies umfasst die Blutentnahme und -stabilisierung, den Transport, die Lagerung, CTC-Anreicherung, CTC-Isolierung (falls erforderlich) und die DNA-Isolierung. Das Beispiel eines kompletten Arbeitsablaufs für die molekulare Charakterisierung einzelner CTCs ist in Anhang A beschrieben. Ein Entscheidungsleitfaden für die kritischen Schritte des präanalytischen Arbeitsablaufs für die DNA-Isolierung aus CTCs ist in Anhang B enthalten.

In diesem Dokument werden spezielle Maßnahmen beschrieben, die ergriffen werden müssen, um aus CTC-haltigen Blutproben die DNA in geeigneter Qualität und ausreichender Menge für die anschließende Untersuchung 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 gibt Empfehlungen zur Handhabung, Lagerung, Verarbeitung und Dokumentation von Proben venösen Vollbluts, die für die Untersuchung der aus zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) isolierten menschlichen DNA 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 direkte Isolierung von genomischer DNA aus venösen Vollblutproben, die CTCs enthalten. Dies wird in EN ISO 20186-2, *Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren — Spezifikationen für präanalytische Prozesse für venöse Vollblutproben — Teil 2: Isolierte genomische DNA*, behandelt.

Dieses Dokument behandelt nicht die Isolierung von bestimmten weißen Blutzellen (Leukozyten) und die anschließende Isolierung von genomischer DNA aus diesen Zellen.

Dieses Dokument behandelt auch 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 Begriffe nach EN ISO 15189 und 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: Die Benennung wird üblicherweise für Flüssigkeiten verwendet. Gewebe sind heterogen und können daher nicht aliquotiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Diese Definition beruht auf den Literaturhinweisen [6], [7] und [8].

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

3.2

Umgebungstemperatur

ungeregelte Temperatur der Umgebungsluft

[QUELLE: EN ISO 20166-3:2019, 3.2]

3.3

Analyt

Komponente, die im Namen einer messbaren Größe dargestellt wird

[QUELLE: EN ISO 17511:2003, 3.2, modifiziert — Das BEISPIEL wurde nicht übernommen.]

3.4

Leistung einer analytischen Prüfung

Genauigkeit, Präzision, Spezifität und Sensibilität zum Messen des im Interesse stehenden Analyten

Anmerkung 1 zum Begriff: Andere Prüfleistungsmerkmale wie Robustheit oder Wiederholpräzision können auch angewendet werden.

[QUELLE: EN ISO 20184-1:2018, 3.4, modifiziert — „Spezifität“ wurde hinzugefügt.]

3.5

Blutentnahmesystem

intravenöse Vorrichtung zur Punktion einer Vene, die aus einer abgeschrägten Kanüle aus nichtrostendem Stahl und einem Schlauch mit befestigten Kunststoffflügeln und einem Verbindungsstück besteht

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Verbindungsstück wird an einer zusätzlichen Blutentnahmevorrichtung, z. B. einem Blutentnahmeröhrchen, befestigt.

3.6

Blutentnahmeröhrchen

Röhrchen, das zur Abnahme von Blut verwendet wird, in der Regel unter Anlegen von Unterdruck, der das Blut aus der Vene durch die Nadel in das Röhrchen zieht

3.7

Rückfließen

Fluss einer Flüssigkeit entgegen der üblichen oder gewünschten Richtung

3.8

zirkulierende Tumorzellen

CTCs

im Blut vorhandene Zellen, die einer primären und/oder metastasierten Lokalisation eines Tumors entstammen

3.9

CTC-Anreicherung

Verfahren, mit dem das Verhältnis von CTCs zu anderen Zellen erhöht werden kann

3.10

CTC-Isolierung

Verfahren, das eine Probe ergibt, die nur CTCs und keine anderen Zelltypen enthält

3.11

DNA

Desoxyribonukleinsäure

Polymer von Desoxyribonukleotiden, das in Doppelstrangform (dsDNA) oder in Einzelstrangform (ssDNA) vorkommt

[QUELLE: EN ISO 22174:2005, 3.1.2]

3.12

Diagnose

Identifizierung einer Erkrankung anhand der Anzeichen und Symptome

Anmerkung 1 zum Begriff: Wobei das Diagnoseverfahren Untersuchungen und Prüfungen für die Klassifikation des Zustands einer Einzelperson in verschiedene und eindeutige Kategorien oder Unterklassen umfassen kann, die medizinische Entscheidungen bezüglich der einzuleitenden Behandlung und Prognose ermöglichen.

[QUELLE: EN ISO 20184-1:2018, 3.6]

3.13

Untersuchung

analytische Prüfung

Folge von Handlungen, deren Ziel die Bestimmung des numerischen Wertes oder der Merkmale einer Eigenschaft ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Prozesse, die mit dem isolierten Analyten beginnen und jegliche Art von Parameterprüfung oder chemischer Bearbeitung für die quantitative oder qualitative Untersuchung umfassen.

[QUELLE: EN ISO 15189:2012, 3.7, modifiziert — Anmerkungen 1 bis 3 zum Begriff wurden gestrichen, Anmerkung 1 zum Begriff wurde hinzugefügt und „analytische Prüfung“ wurde als Vorzugsbenennung hinzugefügt.]

3.14

Leistung einer Untersuchung

Leistung einer analytischen Prüfung

analytische Leistung

Fähigkeit eines Untersuchungsverfahrens zur Messung oder zum Nachweis eines bestimmten Analyten

Anmerkung 1 zum Begriff: Die analytische Leistung wird mithilfe von analytischen Leistungsprüfungen festgestellt, in denen die Fähigkeit eines in-vitro-diagnostischen Untersuchungsverfahrens zur Messung oder zum Nachweis eines bestimmten Analyten beurteilt wird.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die analytische Leistung betrifft Charakteristika wie analytische Empfindlichkeit, Nachweisgrenze, analytische Spezifität (Interferenz und Kreuzreaktivität), Richtigkeit, Präzision und Linearität.

[QUELLE: ISO/TS 17822-1:2014, 3.2, modifiziert — „Leistung einer analytischen Prüfung“ und „analytische Leistung“ wurden als Vorzugsbenennungen hinzugefügt.]