受理号：CSZ2400041

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：循环上皮细胞检测试剂盒

（微流控芯片免疫荧光染色法）

产品管理类别：第三类

申 请 人 名 称：杭州华得森生物技术有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目　录

基本信息.....3
一、申请人名称.....3
二、申请人住所.....3
三、生产地址.....3
技术审评概述.....4
一、产品概述.....4
二、临床前研究概述 6
三、临床评价概述.....12
四、产品受益风险判定.....14
综合评价意见.....15

基本信息

一、申请人名称

杭州华得森生物技术有限公司

二、申请人住所

浙江省杭州市富阳区银湖街道富闲路 9 号银湖创新中心 15 号 3 层 316 室

三、生产地址

浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号 4 幢 3 楼

技术审评概述

一、产品概述

（一）产品主要组成成分

试剂盒提供的材料详见表 1:

表 1 产品主要组成成分

序号	组分名称	主要组成成分	规格	数量
1	细胞分离液	Histopaque®-1077	33mL/瓶	1 瓶/盒
2	洗涤缓冲液	10 × PBS 溶液	10mL/瓶	1 瓶/盒
3	抗体稀释液	驴血清、1 × PBS 溶液	1.4mL/支	2 支/盒
4	细胞捕获剂	EpCAM 捕获抗体冻干粉	10 人份	10 人份/盒
5	染色剂 A	鼠抗-PanCK 检测抗体（FITC）	95μL/支	1 支/盒
6	染色剂 B	鼠抗-CD45 检测抗体（PE）	140μL/支	1 支/盒
7	捕获增强剂	10× SuperBlocker	110μL/支	1 支/盒
8	细胞通透剂	Triton X-100、驴血清、1 × PBS 溶液	1.1mL/支	2 支/盒
9	核酸染色剂	DAPI、1 × PBS 溶液	1.1mL/支	2 支/盒
10	细胞清洗液	RPMI 1640、胎牛血清、碳酸氢钠	14mL/瓶	10 瓶/盒
11	细胞固定液	8%多聚甲醛(PFA)	2.8mL/瓶	1 瓶/盒
12	染色阻断剂 A	FcR Blocking Reagent	495μL/支	1 支/盒
13	染色阻断剂 B	Staining Blocker	385μL/支	1 支/盒
14	芯片	链霉亲和素、PDMS 芯片	1 个/包	10 包/盒
15	螺旋样品室	/	1 个/包	10 包/盒

具体内容详见说明书。

（二）产品预期用途

本产品用于体外定性检测人外周血上皮源性循环肿瘤细胞（EpCAM+、CD45-以及细胞角蛋白 PanCK+），用于手术治疗

后的原发性乳腺癌的预后评价，不能作为恶性肿瘤早期诊断或确诊的依据，不能用于普通人群的肿瘤筛查。

（三）产品包装规格

10 人份/盒。

（四）产品检验原理

本产品应用微流控芯片免疫捕获结合免疫荧光染色鉴定的原理，即采用生物素化的鼠抗人上皮细胞黏附分子（EpCAM）抗体包被的微流控芯片进行上皮源性循环肿瘤细胞免疫捕获。采用鼠抗人细胞角蛋白 PanCK-FITC 抗体和鼠抗人白细胞抗原 CD45-PE 抗体进行上皮源性循环肿瘤细胞免疫荧光染色。采用荧光显微镜进行上皮源性循环肿瘤细胞观察与鉴定（EpCAM+、CD45-、以及细胞角蛋白 PanCK+）。

微流控芯片是基底层结合了链霉亲和素的纳米芯片，可偶联生物素化 EpCAM 捕获抗体；芯片中层为聚二甲基硅氧烷（PDMS）人字型微结构管道，通过产生微涡流实现外周血单个核细胞（PBMC）充分混合，从而显著增加上皮源性循环肿瘤细胞与 EpCAM 捕获抗体包被的芯片之间相互作用，进而通过纳米微流控芯片的链霉亲和素与生物素化 EpCAM 捕获抗体偶联的级联信号放大效应，并结合循环上皮细胞分离仪（WY-C3000），实现上皮源性循环肿瘤细胞检测。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

本产品主要原材料包括鼠抗人 EpCAM 捕获抗体、鼠抗人 PanCK 检测抗体（FITC）、鼠抗人 CD45 检测抗体（PE）、芯片、螺旋样品室、人淋巴细胞分离液（Histopaque®-1077）、阻断剂（10 × SuperBlocker）、驴血清、4',6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）、曲拉通 X-100（Triton X-100）、链霉亲和素、FcR 阻断剂（FcR Blocking Reagent）、染色阻断剂（Staining Blocker）、RPMI 1640 培养基、胎牛血清等。鼠抗人 EpCAM 捕获抗体、鼠抗人 PanCK 检测抗体（FITC）、鼠抗人 CD45 检测抗体（PE）均为单克隆抗体。

主要原材料均为外购。申请人制定了各主要原材料质量要求并经检验合格。

申请人设计的企业参考品包括浓度梯度参考品、特异性参考品。参考品均采用国家标准细胞株制备而成，浓度梯度参考品来源于 SKBR3 人乳腺腺癌细胞，特异性参考品来源于人白血病 T 淋巴细胞（Jurkat，Clone E6-1）和人单核细胞（THP-1）。申请人设计了精密度研究样品和检出限研究样品，精密度研究样品来源于 MCF7 人乳腺腺癌细胞，检出限研究样品来源于 SKBR3 人乳腺腺癌细胞。各项企业参考品和研究样品综合用于

产品的质控细胞检出量、特异性、捕获率、精密度、最低检出限、干扰物和可报告范围评价。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过企业参考品检验等功能性试验确定最佳的生产工艺及反应体系。

生产工艺包括芯片链霉亲和素的包被干燥、细胞捕获剂的冻干等。

反应体系包括：反应时间（细胞捕获剂包被时间、细胞捕获增强剂封闭时间、细胞固定液固定时间、细胞通透剂处理时间、染色阻断剂混合物反应时间、检测抗体混合物染色时间、DAPI 染色时间）、检测样本（采集及处理方式、样本用量、样本保存稳定性、样本密度梯度离心转速、样本密度梯度离心时间、样本密度梯度离心温度）、反应温度（细胞捕获剂包被温度、细胞捕获增强剂封闭温度、细胞固定温度、细胞通透剂处理温度、检测抗体混合物染色孵育温度、染色阻断剂混合物反应温度）、CTC 检测结果荧光显微观察研究。

（三）分析性能评估

本产品分析性能包括样本保存稳定性、适用的样本类型、企业参考品、质控细胞检出量、捕获率、精密度、最低检出限、特异性、干扰物、可报告范围。申请人提交了三批产品在适用

机型上的性能评估资料。

样本保存稳定性研究中，分别采用 EDTA 抗凝管、肝素抗凝管、长效保存管（cellsave）对不同浓度的模拟样本及真实样本在室温（18～30℃）和冷藏（2～8℃）条件下进行研究。最终确定 EDTA/肝素抗凝管采集样本的保存温度为 18～30℃，保存 6 小时，长效保存管采集样本的保存温度为 18～30℃，保存 4 天。

针对适用的样本类型，对检测样本采集及处理方式及样本用量进行研究。最终确定采血操作需要弃除最初采集的 2mL 血样，随后采集 4mL 外周血作为 CTC 检测用血。

企业参考品的制备为将固定细胞数量的质控细胞加入到经过密度梯度分离液分离获得的 PBMC 细胞悬液中，制备出含有固定数量参考品的样本。

在质控细胞检出量评估中，根据企业参考品，分别采用质控细胞加入 PBMC 和全血进行实验研究，对试剂盒的质控细胞检出量进行评估。加入 PBMC 中和全血中的检测结果一致，均符合要求。

在捕获率研究中，根据企业参考品，分别采用质控细胞加入 PBMC 和全血进行实验研究，对试剂盒的捕获率进行评估。

用循环上皮细胞检测试剂盒检测，分别将浓度梯度参考品加入到 4mL 健康人血样处理后获得的 PBMC 中和全血中。对样本进行捕获率检测各 2 次。加入 PBMC 中和全血中的检测结果一致。均满足要求。

在精密度研究中，我们进行了重复性、中间精密度和再现性研究。在重复性研究中，采用同一日、同一操作人员、同一地点及同一批次试剂，对同一浓度水平的同一种样本，进行 9 次检测。分别计算 2 个、5 个、低浓度（5～10 个）及高浓度（160～180 个）样本组的捕获率 CV，进行重复性分析，结果均满足要求。在中间精密度和再现性研究中，采用不同日、同一操作人员、同一地点及同一批次试剂，对四个浓度水平的样本进行检测，连续 20 日。在 3 个地点，各使用不同批次试剂进行中间精密度实验。分别计算 2 个、5 个、低浓度（5～10 个）及高浓度（160～180 个）样本组的捕获率 CV，进行中间精密度分析。对检测结果中的捕获率 CV 合并计算，包括计算低浓度（5～10 个）及高浓度（160～180 个）样本组的捕获率 CV，进行再现性分析，结果均满足要求。

在最低检出限研究中，采用 30 个最低检出限样本，用三批试剂盒进行检测，每批试剂盒检测分别检测 10 个样本，记录芯片中的捕获细胞数量。在固定含有 2 个的最低检出限研究样品

制备的模拟样本中，三批试剂均检出大于等于 1 个 CTC，满足捕获率要求。

在特异性研究中，根据设置的企业参考品，对试剂盒的特异性进行评估。分别将特异性参考品加入到 4mL 健康人血样处理后获得 PBMC 及全血中，每例检测 1 次。三批次对不同样本的检测结果均为 0 个。

在干扰物实验中，通过对添加不同数量质控物的样本进行干扰物研究。分别对模拟样本和临床真实样本中添加干扰物与未添加干扰物进行对比试验，检测捕获率是否受干扰物影响。通过分别将加入 PBMC 样本和血液样本的高中低值不同数量质控细胞暴露于潜在的干扰性物质中，与未经处理的对照组进行了比较，发现外源性干扰物中抗凝剂（EDTA、肝素、柠檬酸钠）、阿司匹林 2.5mg/mL、阿可达（Aredia）0.6mg/mL、布洛芬 2.5mg/mL、对乙酰氨基酚 750μg/mL，内源性干扰物中胆红素 300mg/L、血红蛋白 10mg/mL、甘油三酯 7.5mg/mL、胆固醇 3 mg/mL、RF 因子 100IU/mL，在检测过程中对捕获到的质控细胞数没有显著的影响，捕获率均满足相应的性能标准，表明这些物质不会对本试剂产生干扰。

在可报告范围实验中，取线性范围最高值（约 1280 个）SKBR3 质控细胞样本，用稀释液按 2、4、8、16、32、64 倍稀

释，并将每个浓度梯度平行测定 2 次，计算捕获率。稀释倍数为 2，4，8，16，32 倍时，产品捕获率均值分别为 89.13%、87.10%、84.85%、79.91%、76.39%，均符合可接受标准；稀释倍数为 64 倍时，产品的捕获率为 70.72%，不符合可接受标准，则产品最大可稀释倍数为 32 倍，本产品线性范围为 0～1280 个，故本产品的可报告范围上限为 1280*32=40960 个，可报告范围为 0～40960 个。

（四）阳性判断值研究

阳性判断值基于一项评价术前 CTC 能否预测疾病复发的回顾性乳腺癌临床研究。研究纳入了 40 例在浙江大学医学院附属邵逸夫医院以手术治疗且有术前 CTC 检测数据的原发性乳腺癌患者，Cox 单因素分析显示，CTC 与 2 年无复发生存率(RFS)相关(P=0.013)。CTC≥5 个/4mL 和＜5 个/4mL 患者的 2 年 RFS 分别为 44.4%和 85.2%。在 Cox 多因素分析中，只有 CTC 与两年 RFS (HR: 0.219, 95% CI: [0.058-0.82]，P=0.024)相关。术前 CTC 可用于识别早期复发风险较高的乳腺癌患者。

判断乳腺癌患者治疗预后的循环上皮细胞计数检测结果的临界值为 5 个/4mL 外周血。当循环上皮细胞计数检测数量≥5 个/4mL 外周血时，认为该患者预后不良；当循环上皮细胞计数检测数量＜5 个/4mL 外周血时，认为该患者预后良好。

（五）稳定性研究

通过对连续 3 批考核试剂 37℃加速稳定性、实时稳定性（2～8℃）、开封稳定性，及其随机抽取的一批试剂模拟运输稳定性的方式综合考核产品稳定性及有效期。检测结果得出产品有效期为 12 个月，开盖后可稳定 30 天，稳定性研究结果均达到企业内控标准。

三、临床评价概述

申请人在浙江大学医学院附属第二医院、中山大学孙逸仙纪念医院以及浙江大学医学院附属邵逸夫医院 3 家临床试验机构进行了临床试验。临床试验共纳入 303 例原发性乳腺癌病例（包括 0 期、I、II 期和 III 期），所有 303 例病例均进行手术治疗。采用试验体外诊断试剂对手术治疗前采集的病例外周血样本进行检测，并对手术治疗后的所有病例进行至少 3 年的跟踪随访，观察病例是否发生疾病进展（复发或死亡），并以无病生存期（DFS）作为主要评价指标，评价试验体外诊断试剂的检测结果与受试病例无病生存期（DFS）的关系，确认试验体外诊断试剂用于手术治疗后的原发性乳腺癌的无病生存期（DFS）的预后评价的临床性能。

临床试验结果显示：试验体外诊断试剂检测结果为阳性的病例为 21 例，检测结果为阴性的病例为 282 例。试验体外诊断

试剂检测结果阳性组和阴性组的无病生存期（DFS）的生存曲线如下图所示，阳性组和阴性组均未达到中位无病生存期（DFS）时间，阳性组的平均无病生存期（DFS）为 51.3 月，阴性组的平均无病生存期（DFS）为 63.4 月，阳性组和阴性组无病生存期（DFS）的生存曲线存在差异（log-rank 分析 p=0.002）；单因素 Cox 分析显示，阳性组病例出现疾病进展的风险是阴性组的 3.524 倍（95%CI: 1.537，8.077）；多因素 Cox 分析显示，阳性组病例出现疾病进展的风险是阴性组的 3.766 倍（95%CI: 1.5711，9.0249）。上述试验结果显示，试验体外诊断试剂可用于手术治疗后的原发性乳腺癌的无病生存期（DFS）的预后评价。

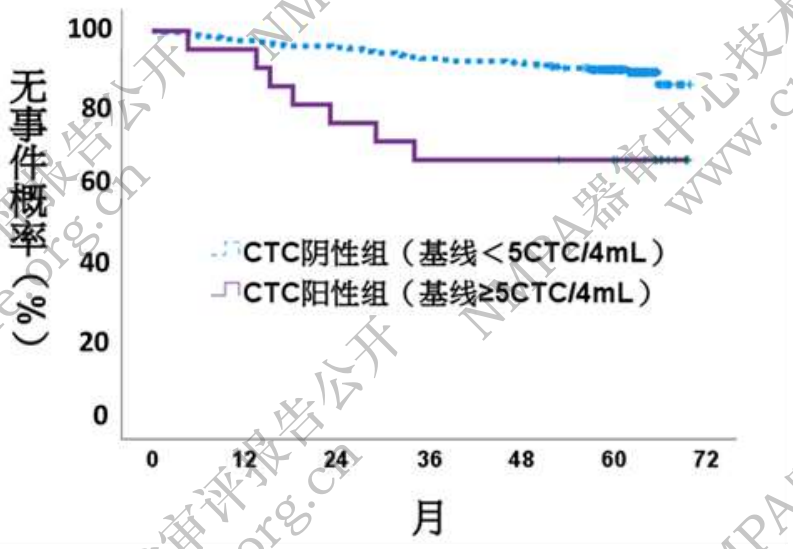


图　CTC 阳性组和 CTC 阴性组的 Kaplan-Meier 法 DFS（月）生存曲线图

综上所述，临床试验结果显示试验体外诊断试剂的临床性能满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

申请人对已知危险（源）进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险（源）的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险、不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。

本产品检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊治的唯一依据，对患者的临床管理应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查、治疗反应等信息综合考虑。本产品通过产品说明书明确了本产品的局限性，降低产品临床应用风险。产品风险可接受。

警示及注意事项：产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

依据《医疗器械监督管理条例》(国务院令第 739 号)《体外诊断试剂注册与备案管理办法》(国家市场监督管理总局令第 48 号)等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，经系统评价后，建议准予注册。

2025 年 4 月 23 日

附件：产品说明书

循环上皮细胞检测试剂盒
（微流控芯片免疫荧光染色法）
使用说明书

【产品名称】

通用名称：循环上皮细胞检测试剂盒（微流控芯片免疫荧光染色法）

【包装规格】

10 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人外周血上皮源性循环肿瘤细胞（EpCAM+、CD45-以及细胞角蛋白 PanCK+），用于手术治疗后的原发性乳腺癌的预后评价，不能作为恶性肿瘤早期诊断或确诊的依据，不能用于普通人群的肿瘤筛查。

【检验原理】

本产品应用微流控芯片免疫捕获结合免疫荧光染色鉴定的原理，即采用生物素化的鼠抗人上皮细胞黏附分子（EpCAM）抗体包被的微流控芯片进行上皮源性循环肿瘤细胞免疫捕获。采用鼠抗人细胞角蛋白 PanCK-FITC 抗体和鼠抗人白细胞抗原 CD45-PE 抗体进行上皮源性循环肿瘤细胞免疫荧光染色。采用荧光显微镜进行上皮源性循环肿瘤细胞观察与鉴定（EpCAM+、CD45-、以及细胞角蛋白 PanCK+）。

微流控芯片是基底层结合了链霉亲和素的纳米芯片，可偶联生物素化 EpCAM 捕获抗体。芯片中层为 PDMS 人字型微结构管道，通过产生微涡流实现外周血单个核细胞（PBMC）充分混合，从而显著增加上皮源性循环肿瘤细胞与 EpCAM 捕获抗体包被的芯片之间相互作用，进而通过纳米微流控芯片的链霉亲和素与生物素化 EpCAM 捕获抗体偶联的级联信号放大效应，并结合循环上皮细胞分离仪（WY-C3000），实现上皮源性循环肿瘤细胞检测。

【主要组成成分】

试剂盒提供的材料：

序号	组分名称	主要组成成分	规格	数量
1	细胞分离液	Histopaque®-1077	33mL/瓶	1 瓶/盒

2	洗涤缓冲液	10×PBS 溶液	10mL/瓶	1 瓶/盒
3	抗体稀释液	驴血清、1×PBS 溶液	1.4mL/支	2 支/盒
4	细胞捕获剂	EpCAM 捕获抗体冻干粉	10 人份	10 人份/盒
5	染色剂 A	鼠抗-PanCK 检测抗体（FITC）	95μL/支	1 支/盒
6	染色剂 B	鼠抗-CD45 检测抗体（PE）	140μL/支	1 支/盒
7	捕获增强剂	10× SuperBlocker	110μL/支	1 支/盒
8	细胞通透剂	Triton X-100、驴血清、1×PBS 溶液	1.1mL/支	2 支/盒
9	核酸染色剂	DAPI、1×PBS 溶液	1.1mL/支	2 支/盒
10	细胞清洗液	RPMI 1640、胎牛血清、碳酸氢钠	14mL/瓶	10 瓶/盒
11	细胞固定液	8%多聚甲醛(PFA)	2.8mL/瓶	1 瓶/盒
12	染色阻断剂 A	FcR Blocking Reagent	495μL/支	1 支/盒
13	染色阻断剂 B	Staining Blocker	385μL/支	1 支/盒
14	芯片	链霉亲和素、PDMS 芯片	1 个/包	10 包/盒
15	螺旋样品室	/	1 个/包	10 包/盒

注：不要混用不同批号试剂盒中的试剂

需客户自己准备的仪器设备、试剂和耗材：

仪　　器：普通离心机(水平转子，转速 1000×g)、冷冻离心机(水平转子，转速 300×g)、显微镜（带 FITC、TRITC、DAPI 荧光滤片，推荐使用尼康 Ti-E 电动倒置荧光显微镜）。

加样设备：大容量电动移液器；微量移液器（可以吸取的液体体积容量至少包括 20μL、200μL、1000μL）。

试　　剂：纯化水、70%乙醇、无水乙醇。

耗　　材：Leucosep®离心管、15mL 离心管、1.5mL 离心管、5mL 移液管、湿盒。

【储存条件及有效期】

储存条件：试剂盒应在 2~8℃下保存，防止冷冻。且试剂盒中细胞捕获剂、染色剂 A、染色剂 B 以及核酸染色剂需避光保存。

有 效 期：12 个月，生产日期和使用期限见标签。运输过程不影响试剂盒的稳定性，运输稳定性是采用“模拟运输的方式进行”。

运输条件：2~8℃冷链运输。

【适用仪器】

与循环上皮细胞分离仪(WY-C3000)配套使用。

【样本要求】

检测对象为人外周血。可采用 EDTA/肝素抗凝管进行血样采集。具体的离子类型如下：EDTA 抗凝管为 EDTA 和钾离子，肝素抗凝管为肝素和钠离子。

检测人群：乳腺癌患者。

采用普通采血管的情况下，血液样本可在 18~30℃保存 6h，切勿冷藏或者冷冻。如需长期保存须采用特定采血管（cellsave®采血管）进行采集，并于 4 天内进行样本处理。

【检验方法】

在使用前应当完全理解本包装试剂盒内产品说明书的内容及含义，以确保正确使用本试剂盒。

实验前准备

- 洗涤缓冲液的稀释（10 人份）

  将 10mL 洗涤缓冲液中加入 90mL 的纯化水中，制备成 1×PBS 洗涤缓冲液。

1. 血液样本采集

   1.1 采血

   应用 23G 的采血针插入外围静脉进行外周血采集。先收集 2mL 的血液样本，该 2mL 血液不可用于本次检测，再收集至少 4mL 血液样本置于每个抗凝管内用于本次检测。立即轻轻旋转抗凝管五次。在使用前，将收集的血液样本室温放置。

   1.2 样本保存及运输

   采用普通采血管的情况下，全血样本在 18~30℃下保存 6h，切勿冷藏或者冷冻。运输过程中正向放置于血液保存箱中，避免强烈的振动。

2. 样本前处理

   2.1 将 Leucosep®离心管和细胞分离液平衡至室温。

   2.2 将 3mL 细胞分离液加入到 Leucosep®离心管中。

   2.3 将含有 3mL 细胞分离液的 Leucosep®离心管置于离心机中，1000×g 室温离心 30s，将细胞分离液离心到该离心管多孔屏障下方。

   2.4 用 1×PBS 洗涤缓冲液以 1:1 的比例稀释 4mL 全血样本。

2.5 小心将 8mL 稀释后的全血样本倾注入离心好的 Leucosep®离心管(含细胞分离液)中。

2.6 将装有全血稀释样本的 Leucosep®离心管(含细胞分离液)置于离心机的水平转子中，平衡后室温 1000×g 离心 10min。

2.7 移除上层血浆至 PBMC 层上方 5 至 10mm。

2.8 小心转移 PBMC 至一个新的 15mL 灭菌离心管中。

2.9 用 10mL 细胞清洗液洗涤 PBMC。

2.10 4℃300×g 离心 10min，小心吸弃上清液，不要触及底层沉淀。

2.11 将底部沉淀转移到 1.5mL 离心管，用 1mL 细胞清洗液洗涤 PBMC，同样 4℃300×g 离心 10min，小心吸弃上清液，不要触及底层沉淀。

2.12 为了进行循环上皮细胞富集，用 190μL 细胞清洗液重悬细胞沉淀，然后按照“循环上皮细胞捕获”的程序进行后续的操作。

3. 捕获抗体包被

3.1 用 200μL 无水乙醇清洗芯片一次，然后再用 200μL 1×PBS 洗涤缓冲液清洗两次。确保芯片通道中没有气泡残留。

3.2 制备细胞捕获剂工作液，将细胞捕获剂从 2~8℃拿出，划开 1 个孔，加入 80μL 纯化水，静置 1min，用移液器吹打混匀。

3.3 用移液器将孔中全部细胞捕获剂工作液吸出，注入到芯片中，然后将芯片置于湿盒中，室温孵育 1h。确保在整个孵育过程中，芯片的入口和出口都始终覆盖细胞捕获剂工作液。

3.4 用 200μL 1×PBS 洗涤缓冲液清洗包被了细胞捕获剂的芯片 3 次，除去残留在芯片中的细胞捕获剂工作液。

3.5 制备捕获增强剂工作液，将 10μL 捕获增强剂溶液添加到 90μL 1×PBS 洗涤缓冲液中，混匀。

3.6 用移液器吸取 100μL 捕获增强剂工作液，注入芯片中，然后将芯片置于湿盒中，室温孵育 1h。确保在整个孵育期间，芯片的入口和出口都始终覆盖的捕获增强剂工作液。

3.7 用 200μL 1×PBS 洗涤缓冲液，清洗捕获增强剂处理过的芯片 3 次，除去残留在芯片中的捕获增强剂工作液。

3.8 至此，芯片便完成了捕获抗体的包被，并且随时可以使用。若包被好捕获抗体的芯片没有马上使用，可置于湿盒 2~8℃下保存最多 24h。

4. 循环上皮细胞捕获

4.1 参数设置以及仪器自检清洗

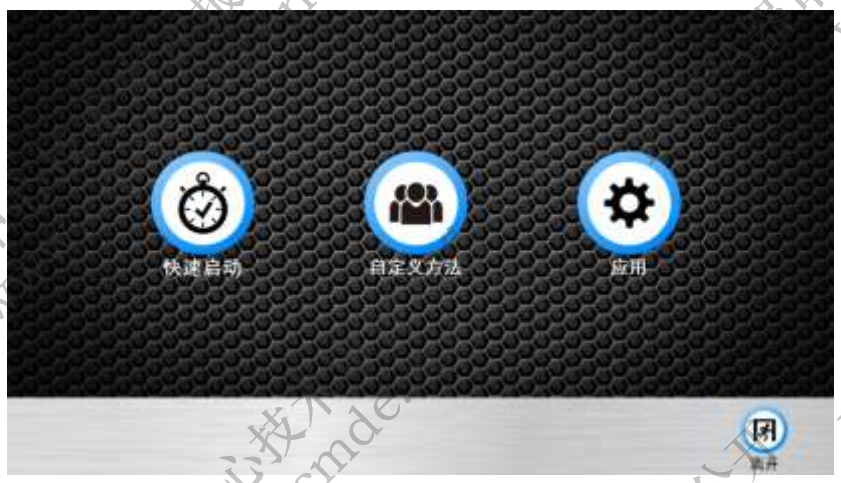
配合循环上皮细胞分离仪(WY-C3000)及其相关软件进行循环上皮细胞的捕获过程。

4.1.1 打开仪器的电源开关。

4.1.2 打开电脑，然后按“CytoSorter”图标。

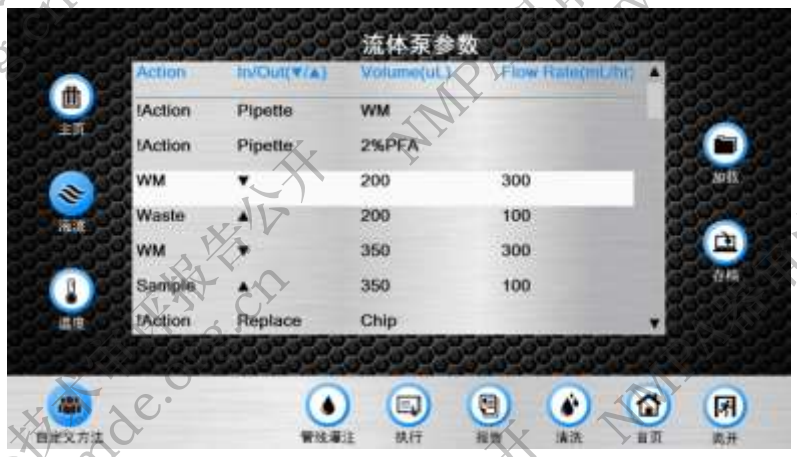
4.1.3 输入或者扫描使用者识别码。

4.1.4 用手指轻按“自定义方法”图标。



4.1.5　输入或者扫描材料上的条码。

4.1.6　用手指轻按屏幕左侧的“液流”图标，



4.1.7　设置微流控泵参数。

4.1.8 热控的默认温度设定在 22℃。如果你想改变默认设置，请联系本公司技术代表。

4.1.9 在仪器运行完好的情况下，按电脑屏幕底部工具栏上的“管线灌注”图标，打开“管线灌注”页面。

4.1.10 在仪器试剂缓冲管中从右到左依次加入 10mL 70%酒精(绿)、5mL 纯化水(黄)、10mL 洗涤缓冲液(蓝)。

4.1.11 将清洗芯片置于芯片接受器上，关闭芯片接受器。将螺旋样品室的端口插入到样品室的接口上，然后将“样品管线”的细管插入到螺旋样品室中。

4.1.12 按“启动”图标，开启清洗程序，直至程序运行完成。

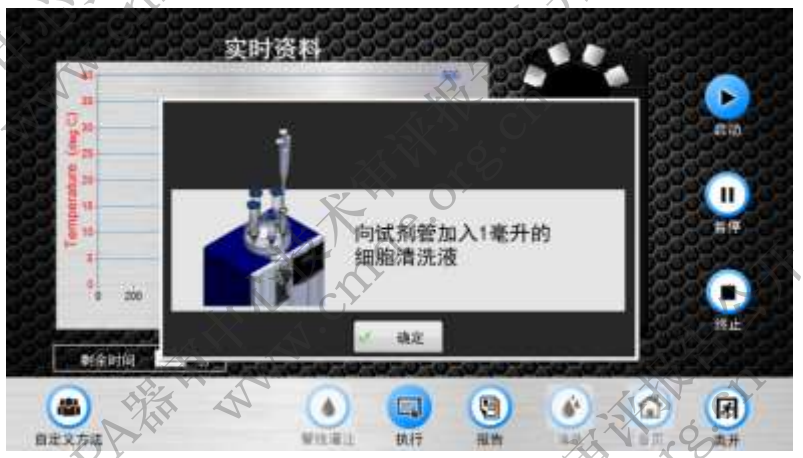
4.1.13 然后进行 4.2 的程序。

4.2 细胞清洗液和细胞固定液填充

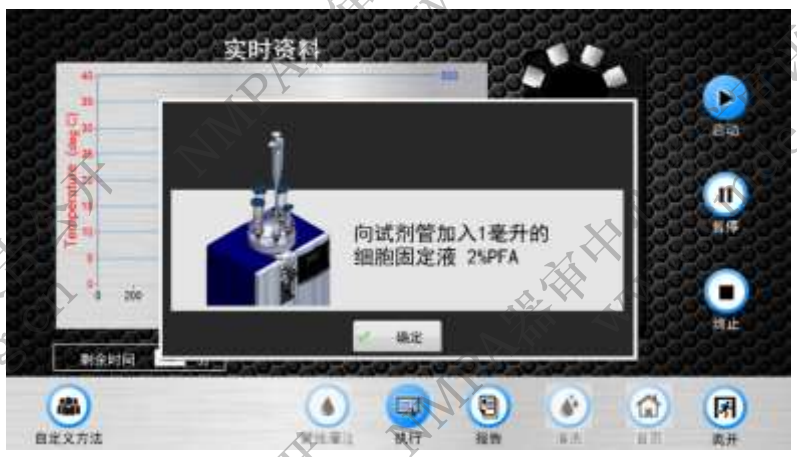
4.2.1 按电脑屏幕底部工具栏上的“执行”图标，打开“执行”页面。

4.2.2 按“启动”图标，启动捕获程序。

4.2.3 按照弹出菜单中的指令：“向试剂管中加入 1 毫升的细胞清洗液”，然后按“确定”按钮。



4.2.4 将 250μL 的细胞固定液加入 750μL 的 1×PBS 洗涤缓冲液中，制备成 1×细胞固定液（2%PFA）。按照弹出菜单中的指令：“向试剂管中加入 1 毫升的细胞固定液 2%PFA”，然后按“确定”按钮。

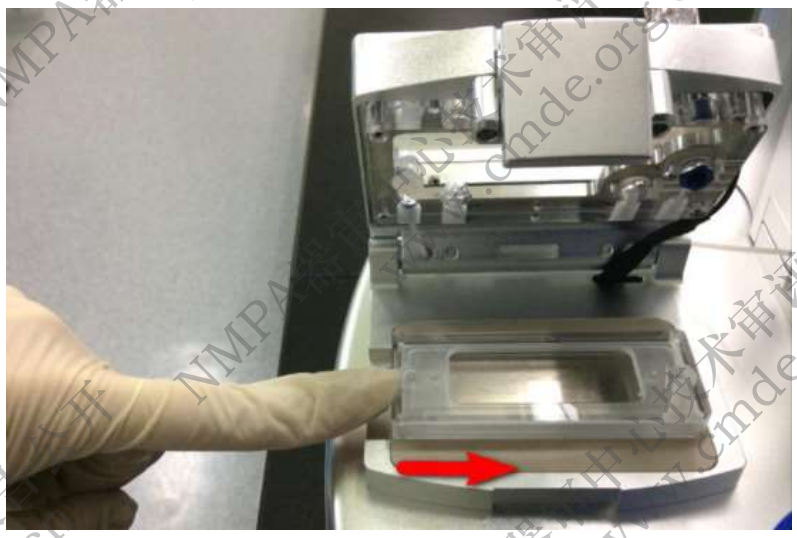


4.2.5 根据软件控制流泵以一定的速度进行溶液的吸取和排出。

4.2.6 按照软件弹出菜单中的图标说明：“打开芯片接受器，取下清洗芯片，换上包被完全的芯片”，然后按“确定”按钮。

⚠不要关闭芯片接受器。

放置并推动芯片前进直到接触芯片接受器的对边。



4.2.7　软件控制流泵以一定的速度进行溶液的吸取和排出。

4.2.8　按照弹出菜单指令：关闭芯片接受器，然后按“确定”图标。

4.3 样本上机和细胞捕获

4.3.1 按照弹出菜单的图标指示：“由端口取下螺旋样品室。”分离连接座，按住线圈架，然后按“确定”图标。

⚠不要分离螺旋样品室和样品管线。

请勿将螺旋样品室端管末端插入样品管内。

4.3.2 软件控制流泵以一定的速度进行溶液的吸取和排出。

4.3.3 按照弹出菜单指令：将螺旋样品室插入到样本管中，然后按“确定”图标。

⚠如下图画面所示，将螺旋样品室及样品管道线置于**螺旋样品室支架**上。通过调节红色圆圈标注的旋钮来调节支架的高度，以确保管线的端部到达的样品瓶的底部。

4.3.4 软件控制流泵以一定的速度进行溶液的吸取和排出。

4.3.5 按照弹出菜单的图标指示：“组装螺旋样品室，并轻轻连接到端口”，然后按“确定”按钮。

4.3.6 注射泵从细胞清洗液瓶吸取一定量的细胞清洗液。

4.3.7 螺旋样品室上的微型振动器自动开启。

4.3.8 软件控制流泵以一定的速度进行溶液的吸取和排出，进行 4 个循环。

4.3.9 螺旋样品室上的微型振动器自动关闭。

4.4 细胞固定

4.4.1 注射泵从固定液瓶吸取 200μL 1×细胞固定液。

4.4.2 注射泵通过废液管线排出 200μL 1×细胞固定液到废液瓶。

4.4.3 注射泵从固定液瓶吸取 400μL 1×细胞固定液。

4.4.4 注射泵通过样品管线将 400μL 1×细胞固定液排入螺旋样品室。

4.4.5 按照弹出菜单的图标指示：“用清洗芯片更换芯片”，然后按“确定”按钮。

4.4.6 让芯片静置 15min，以完成细胞的固定程序。

4.4.7 捕获过程已经结束。请进行“循环上皮细胞免疫染色”程序。

5. 循环上皮细胞免疫染色

5.1 用移液器吸取 200μL 1×PBS 洗涤缓冲液注入芯片中，以除去残余的细胞固定液，重复三次。

5.2 用移液器吸取 200μL 细胞通透剂，注入芯片，室温静置 20min。

5.3 用移液器吸取 200μL 1×PBS 洗涤缓冲液注入芯片，重复三次，以去除细胞通透剂。

5.4 制备染色阻断剂混合液，用移液器分别吸取 20μL 染色阻断剂 A 和 10μL 染色阻断剂 B，再吸取 70μL 抗体稀释液补充体积到 100μL，至于 1.5mL 离心管，混匀。

5.5 用移液器吸取 100μL 染色阻断剂混合液，注入芯片孵育 20min。

5.6 制备染色混合液，用移液器吸取 8.75μL 染色剂 A，12.5μL 染色剂 B，25μL 染色阻断剂 A，25μL 染色阻断剂 B，最后用抗体稀释液补充体积到 250μL，置于 1.5mL 离心管，混匀。

5.7 用移液器吸取 250μL 染色混合液，注入芯片，湿盒中室温避光孵育 1h。

5.8 用移液器吸取 200μL 1×PBS 洗涤缓冲液注入芯片，重复三次，以去除残留的染色混合液。

5.9 用移液器吸取 200μL 核酸染色剂，注入芯片，湿盒中室温避光静置 10min。

5.10 用移液器吸取 200μL 1×PBS 洗涤缓冲液溶液注入芯片，以除去残余的核酸染色剂。

6. 结果观察

利用荧光显微镜先在 10×物镜下通过 FITC、TRITC、DAPI 滤光片进行短时间曝光后观察，再调到 20×物镜下观察，配合相关荧光显微镜软件进行多图片叠加，然后用计数器记录有无捕获到的循环上皮细胞。

未检出：通过荧光显微镜观察，确定芯片上捕获到的细胞性质或状态呈：CD45+，PanCK-，DAPI+，则判断该细胞为非循环上皮细胞。

检出：通过荧光显微镜观察，确定芯片上捕获到的细胞性质或状态呈：CD45-，PanCK+，DAPI+，则判断该细胞为循环上皮细胞。

无效结果：通过荧光显微镜观察，发现芯片上捕获到的细胞无 DAPI 染色，则判断此次结果无效；通过荧光显微镜观察，发现芯片上捕获到的细胞即表现为 CD45+又表现为 PanCK+，则判断此细胞为无效结果；通过荧光显微镜观察，无三种荧光素信号，则判断此细胞为无效结果。

滤光片	EX（nm）	EM（nm）
DAPI	359	461
FITC	490	525
TRITC	555	580

7. 质量控制

阳性质控品（医疗器械注册证编号：　　）：

浓度梯度参考品 S1：（2 个），细胞来源于 SKBR3 人乳腺腺癌细胞。

浓度梯度参考品 S2：（5-10 个），细胞来源于 SKBR3 人乳腺腺癌细胞。

浓度梯度参考品 S3：（160-180 个），细胞来源于 SKBR3 人乳腺腺癌细胞。

浓度梯度参考品 S4：（1000-1300 个），细胞来源于 SKBR3 人乳腺腺癌细胞。

阴性质控品（医疗器械注册证编号：　　）：

特异性参考品 N1：（10^6 数量级），细胞来源于人白血病 T 淋巴细胞（Jurkat，Clone E6-1）。

特异性参考品 N2：（10^6 数量级），细胞来源于人单核细胞（THP-1）。

质控细胞现配现用，试剂盒提供给用户后，企业会按照用户要求提供阴阳性质控品，以保证整个试剂盒在使用过程中的质量控制。检测单位引入本检测系统需进行一次阴阳性质控品的检验，后续每半年进行质控检验，检验结果应符合性能指标中质控细胞检出量、检测特异性和捕获率的要求。

【阳性判断值】

阳性判断值基于一项评价术前 CTC 能否预测疾病复发的回顾性乳腺癌临床研究。结果显示，判断乳腺癌患者治疗预后的循环上皮细胞计数检测结果的临界值为 5 个/4mL 外周血。当循环上皮细胞计数检测数量≥5 个/4mL 外周血时，认为该患者预后不良；当循环上皮细胞计数检测数量＜5 个/4mL 外周血时，认为该患者预后良好。

该阳性判断值“循环上皮细胞计数检测数量≥5 个/4mL 外周血”经一项以无病生存期（DFS）作为主要评价指标临床评价进行了验证。

【检验结果的解释】

根据荧光显微镜观察结果判断：

- 检出非循环上皮细胞：通过荧光显微镜观察，确定芯片上捕获到的细胞性质或状态呈：CD45+，PanCK-，DAPI+，则判断该细胞为非循环上皮细胞（白细胞）。如图 1 白色箭头所示。
- 检出循环上皮细胞：通过荧光显微镜观察，确定芯片上捕获到的细胞性质或状态呈：CD45-，PanCK+，DAPI+，则判断该细胞为循环上皮细胞。如图 1 黄色箭头所示。
- 无效结果 1：通过荧光显微镜观察，发现芯片上捕获到的细胞无 DAPI 染色，则判断此次结果无效；如图 1 红色箭头所示。
- 无效结果 2：通过荧光显微镜观察，发现芯片上捕获到的细胞即表现为 CD45+又表现为 PanCK+，则判断此细胞为无效结果；如图 1 蓝色箭头所示。
- 无效结果 3：通过荧光显微镜观察，无三种荧光素信号，则判断此细胞为无效结果。如图 2 所示。

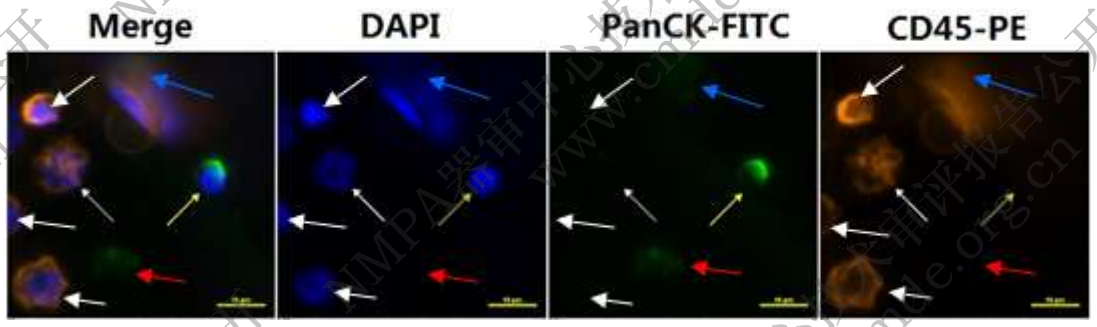


图 1 结果示意图

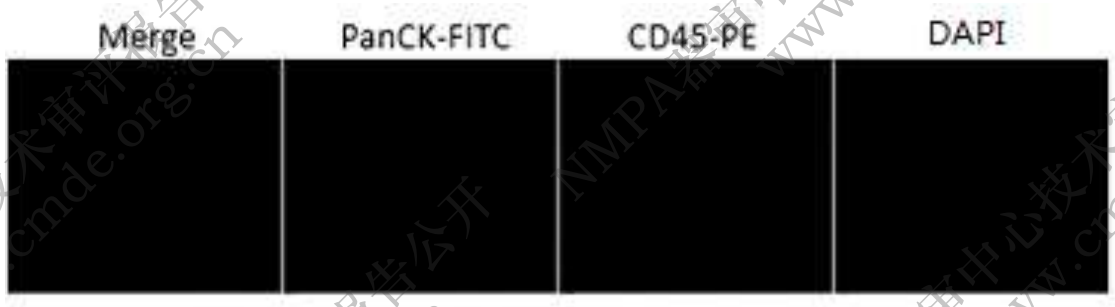


图 2 无效结果示意图

【检验方法的局限性】

本产品只适用于人外周血样本的检测。

本产品只针对上皮源细胞具有反应，对其它类型细胞无反应。

本产品不适用于伴随有乳腺癌以外的其它恶性肿瘤疾病或 5 年内确诊有其他恶性肿瘤疾病的患者。

本产品不能替代目前已经建立的任何临床检查方法，仅作为常规诊断的补充检测，对任何结果的解读，应由医生结合病理诊断、临床表征及其他检测方法进行，不作为单独的诊断指标。

【产品性能指标】

1. 质控细胞检出量

取由循环上皮细胞的特征性细胞人乳腺腺癌细胞（SKBR3）制备的浓度梯度参考品 S1、S2、S3、S4，采用循环上皮细胞检测试剂盒检测，按说明书操作，模拟实际临床情况，分别将浓度梯度参考品加入到 4mL 健康人血样处理后获得的 PBMC 层中，且 PBMC 层体积不少于 90μL，每例检测 1 次，S1≥1 个，S2、S3、S4≥2 个。

2. 检测特异性

取由外周血中非循环上皮细胞的代表性细胞人白血病 T 淋巴细胞（Jurkat，Clone E6-1）及人单核细胞（THP-1）制备的企业特异性参考品 N1 和 N2，采用循环上皮细胞检测试剂盒检测，按说明书操作，模拟实际临床情况，分别将特异性参考品加入到 4mL 健康人血样处理后获得的单个核细胞（PBMC）层中，且单个核细胞体积不少于 90μL，每例检测 1 次，检测结果均为 0 个。

3. 捕获率

取浓度梯度参考品 S1、S2、S3、S4，采用循环上皮细胞检测试剂盒检测，按说明书操作，模拟实际临床情况，分别将参考品加入到 4mL 健康人血样处理后获得的 PBMC 层中，且 PBMC 层体积不少于 90μL 中，每例检测 2 次，采用荧光显微镜计数法统计细胞数量，计算捕获率。捕获率=A/（A+B）×100%，A=芯片上细胞的数目，B=废液中细胞的数目。S1 的捕获率均≥50.0%、S2 的捕获率均≥75.0%、S3 的捕获率均≥85.0%、S4 的捕获率均≥90.0%。

4. 重复性

采集健康人静脉血液样本，分装为 4mL/管，经密度梯度离心分离出 PBMC。精密度分析用研究样本由 4mL 人外周血的 PBMC 加上 MCF7 质控细胞构成。质控细胞浓度为 2 个、5 个、5~10 个和 160~180 个。同一日、同一操作人员、同一地点及同一批次试剂，对同一

浓度水平的同一种临床样本，进行 9 次检测。高低浓度样本各做一次重复性实验。结果显示：2 个时，三批次捕获率均值为 85.19%；5 个时，三批次捕获率均值为 95.56%；5~10 个低浓度水平时，三批次重复性 CV 分别为 5.17%，6.57%，5.44%；160~180 个高浓度水平时，三批次重复性 CV 分别为 1.8%，1.26%，1.25%。

5. 中间精密度和再现性

采集健康人静脉血液样本，经密度梯度离心分离出 PBMC，分别投入 2 个、5 个、5~10 个和 160~180 个 MCF7 质控细胞各 60 份。同一操作人员在同一地点用同一批次试剂，在不同日期对四个浓度水平的两种临床样本，连续 20 天进行检测。在 3 个不同地点，用不同批次试剂进行中间精密度实验。分别计算 2 个、5 个、低浓度（5~10 个）及高浓度（160~180 个）样本组的捕获率 CV 来分析中间精密度，还合并计算捕获率 CV 做再现性分析。结果显示：投入 2 个时，3 个实验人员在不同地点、用不同批次试剂盒，连续 20 天的捕获率均值为 90.00%；投入 5 个时，捕获率均值为 90.33%；在 5~10 个低浓度水平，3 个实验人员的捕获率 CV 分别是 8.03%、7.12%、7.04%；160~180 个高浓度水平时，捕获率 CV 分别是 0.87%、1.01%、0.96%。合并计算低浓度（5~10 个）和高浓度（160~180 个）样本组的捕获率 CV 均值，低浓度是 7.40%，高浓度是 0.95%。

6. 最低检出限

采集样本为 4mL 人外周血的 PBMC 加上质控细胞及 4mL 人外周血加上质控细胞各 30 份。使用的质控细胞株为 SKBR3 细胞。质控细胞为 2 个/样本。采用 30 个最低检出限样本，用三批试剂盒进行检测，每批试剂盒检测分别检测 10 个样本，记录芯片中的捕获细胞数量。在固定含有 2 个的最低检出限质控品制备的模拟样本中，三批试剂盒均检出大于等于 1 个 CTC，满足捕获率要求。

7. 干扰物

在人外周血的 PBMC 层中分别加入 0 个、2 个、5 个、5~10 个和约 300 个 SKBR3 细胞各 240 份。对模拟样本中添加干扰物与未添加干扰物进行对比试验，检测捕获率是否受干扰物影响。通过将加入 PBMC 样本的高中低值不同数量质控细胞暴露于潜在的干扰性物质中，与未经处理的对照组进行了比较，发现外源性干扰物中抗凝剂（EDTA、肝素、柠檬酸钠）、阿司匹林 2.5mg/mL、阿可达（Aredia）0.6mg/mL、布洛芬 2.5mg/mL、对乙酰氨基酚 750μg/mL，

内源性干扰物中胆红素 300mg/L、血红蛋白 10mg/mL、甘油三酯 7.5mg/mL、胆固醇 3mg/mL、RF 因子 100IU/mL，在检测过程中对捕获到的质控细胞数没有显著的影响，捕获率均满足相应的性能标准，表明这些物质不会对本试剂产生干扰。

8. 可报告范围实验

将约 1280 个 SKBR3 质控细胞样本，用稀释液按 2、4、8、16、32、64 倍稀释，并将每个浓度梯度平行测定 2 次，计算捕获率。稀释倍数为 2，4，8，16，32 倍时，产品捕获率均值分别为 89.13%、87.10%、84.85%、79.91%、76.39%，均符合可接受标准；稀释倍数为 64 倍时，产品的捕获率为 70.72%，不符合可接受标准，则产品最大可稀释倍数为 32 倍，本产品线性范围为 0~1280 个，故本产品的可报告范围上限为 1280*32=40960 个，可报告范围为 0~40960 个。

9. 临床试验结果：

申请人在 3 家临床试验机构进行了临床试验。临床试验共纳入 303 例原发性乳腺癌病例（包括 0 期、I、II 期和 III 期），所有 303 例病例均进行手术治疗。采用试验体外诊断试剂对手术治疗前采集的病例外周血样本进行检测，并对手术治疗后的所有病例进行至少 3 年的跟踪随访，观察病例是否发生疾病进展（复发或死亡），并以无病生存期（DFS）作为主要评价指标，评价试验体外诊断试剂的检测结果与受试病例无病生存期（DFS）的关系，确认试验体外诊断试剂用于手术治疗后的原发性乳腺癌的无病生存期（DFS）的预后评价的临床性能。

临床试验结果显示：试验体外诊断试剂检测结果为阳性的病例为 21 例，检测结果为阴性的病例为 282 例。试验体外诊断试剂检测结果阳性组和阴性组的无病生存期（DFS）的生存曲线如下图 1 所示，阳性组和阴性组均未达到中位无病生存期（DFS）时间，阳性组的平均无病生存期（DFS）为 51.3 月，阴性组的平均无病生存期（DFS）为 63.4 月，阳性组和阴性组无病生存期（DFS）的生存曲线存在差异（log-rank 分析 p=0.002）；单因素 Cox 分析显示，阳性组病例出现疾病进展的风险是阴性组的 3.524 倍（95%CI：1.537，8.077）；多因素 Cox 分析显示，阳性组病例出现疾病进展的风险是阴性组的 3.766 倍（95%CI：1.5711，9.0249）。上述试验结果显示，试验体外诊断试剂可用于手术治疗后的原发性乳腺癌的无病生存期（DFS）的预后评价。

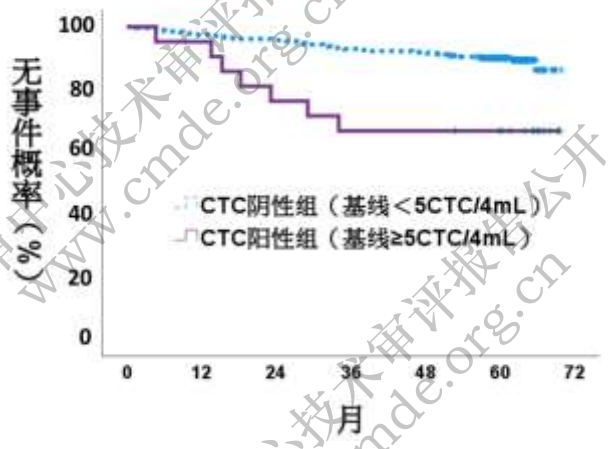


图 1　CTC 阳性组和 CTC 阴性组的 Kaplan-Meier 法 DFS（月）生存曲线图

【注意事项】

本产品仅用于体外诊断。

本产品不适用于肿瘤筛查。

本产品的检测结果仅供临床参考。

由于方法学或抗体特异性等原因，使用不同生产商的试剂对同一份样本的检测可能会得到不同的结果，因此用不同试剂检测所得的结果不应直接相互比较，以免造成错误的医学解释；建议实验室在发给临床医生的检验报告注明所用试剂特征。

警告：患者的所有样本均应当作潜在的感染源处理。

警告：细胞固定液中有多聚甲醛(PFA)成分，操作过程中应注意防护，操作完成后废液需经过处理后排放。

【参考文献】

1. Marx V. Tracking metastasis and tricking cancer. Nature, 2013,494(7): 131-136
2. 白林灵，杨延莲，王琛. 循环肿瘤细胞富集和检测的纳米技术. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(10): 955-962
3. 闫继慈，郑新宇. 乳腺癌患者循环肿瘤细胞检测及其临床意义. 中华乳腺病杂志(电子版), 2013, 7(6):436-441
4. Weissenstein U，Schumann A，Reif M，et al. Detection of circulating tumor cells in blood

of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. BMC Cancer 2012, 12:206

5. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature, 2007, 450(7173) : 1235-1239
6. Hartkopf AD, Wagner P, Wallwiener D, et al. Changing levels of circulating tumor cells in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. Anticancer Res, 2011, 31(3) : 979-984.
7. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. Breast Cancer Res, 2012, 14(3) : R71
8. Matthew G. Krebs, Robert L. Metcalf, Louise Carter, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. Nature Reviews Clinical Oncology 11, 129–144 (2014)

【基本信息】

注册人/生产企业名称： 杭州华得森生物技术有限公司

住　　所：浙江省杭州市富阳区银湖街道富闲路 9 号银湖创新中心 15 号 3 层 316 室（自主申报）

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址： 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号 4 幢 3 楼

医疗器械生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】