

## 循环上皮细胞检测试剂盒（免疫磁颗粒细胞捕获+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（免疫磁颗粒细胞捕获+荧光染色法）  
英文名称：CellSearch Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial)

### [ 包装规格 ]

循环上皮细胞检测试剂盒（免疫磁颗粒细胞捕获+荧光染色法）：16测试/包装

### [ 预期用途 ]

用于体外诊断

CellSearch® 循环上皮细胞检测试剂盒（免疫磁颗粒细胞捕获+荧光染色法）用于全血中的上皮源性（CD45-、EpCAM+、以及细胞角蛋白8、18+、及/或19+）的循环肿瘤细胞（CTC）的计数检测。由 CellSearch® 循环肿瘤细胞检测试剂盒检测到外周血液中的 CTC 与接受治疗的转移性乳腺癌患者的无进展生存期及总生存期降低相关。本检测是对转移性乳腺癌患者进行监测的一项工具。CTC 的系列检测应当与监测转移性乳腺癌的其它临床方法联合使用。在病程期间任何时间对 CTC 计数都可评价患者的预后，对已经其它检测方法（组织学或影像学等）确诊的转移性乳腺癌患者的无进展生存期与总生存期进行预测。

### [ 检验原理 ]

在 CellSearch® 循环肿瘤细胞检测试剂盒中，含有一种基于铁磁流体的捕获试剂和免疫荧光试剂：这种铁磁流体试剂含有带磁芯的纳米微粒。在磁芯周围的聚合物层上涂覆有针对 EpCAM 抗原的抗体，以捕获 CTC。在免疫磁体完成了捕获并富集之后，添加荧光试剂以识别并计数 CTC。荧光试剂中包含以下成分：专用于细胞角蛋白（上皮细胞的特性）的抗-CK-藻红素（PE），对细胞核染色的 DAPI，以及专用于白细胞的抗-CD45-藻蓝蛋白（APC）。

CellTracks® AutoPrep® 系统将试剂/样本混合液配入 MagNest 磁孵育装置内的样本盒之中。利用 MagNest 装置所具有的强力磁场，能够将磁颗粒标记的上皮细胞吸附到插管的表面。CellTracks Analyzer II® 分析仪或 CellSpotter® 分析仪自动扫描样本盒的整个表面，获取图像并将系统内任何 CK-PE 与 DAPI 荧光共同出现的部位的发光事件供用户查看。系统能以图库的方式将图片呈现给用户，以便进行最后的分类。如果它的形态特征与肿瘤细胞的相一致，并且免疫分型 EpCAM+、CK+、DAPI+ 和 CD45-，则将它归类为肿瘤细胞。

### [ 主要组成成分 ]

提供的材料

- 使用说明书
- 3.0 毫升上皮细胞粘附分子抗体（抗-EpCAM）铁磁流体：含有与小鼠单克隆抗体结合的 0.022% 磁性纳米微粒悬浮液，为上皮细胞的表面标志物 EpCAM 所专用；保存的缓冲液中，含有 0.03% 牛血清白蛋白（BSA）和 0.05% ProClin™ 300 防腐剂。（棕色盖子）
- 3.0 毫升着色试剂：含有 0.0006% 结合藻红素（PE）的细胞角蛋白特异性鼠单克隆抗体；0.0012% 结合异藻蓝蛋白（APC）的鼠抗-CD45 单克隆抗体溶于缓冲液含有 0.5% BSA 和 0.1% 叠氮钠的缓冲液中。（白色盖子）
- 3.0 毫升核酸染料：含有 0.005% 4', 6-二脒基-2-苯咪唑，二盐酸盐（DAPI）和 0.05% ProClin™ 300。（蓝色盖子）
- 3.0 毫升捕获增强剂：含有 0.02% 专有试剂（用于控制铁磁流体的聚集），0.5% BSA，以及 0.1% 叠氮钠的缓冲液中。（透明盖子）
- 3.0 毫升透化剂：含有 0.011% 的专有透化剂，以及含 0.1% 叠氮钠的缓冲液。（绿色盖子）
- 3.0 毫升细胞固定剂：含有 25% 的专有固定剂成分，0.1% BSA，以及含 0.1% 叠氮钠的缓冲液。（红色盖子）
- 2 x 110 毫升瓶装稀释缓冲液：缓冲液中含有 0.1% 的叠氮钠。
- 16 只锥形试管（15 毫升吊篮式离心机）和锥形试管盖
- 16 只样本盒与样本盒塞子

需要但未提供的材料

- CellSave 血样本储存管（产品编号：7900005）
- CellTracks® AutoPrep® 系统（产品编号：9541）
- CellTracks Analyzer II® 分析仪（产品编号：9555）或 CellSpotter® 分析仪（产品编号：9525）
- CellSearch® 循环肿瘤细胞质控品试剂盒（产品编号：7900003）

- CellTracks® AutoPrep® 仪器用缓冲液（产品编号：7901003）
- 吊篮式离心机，离心力：800 x g
- 试管架
- 经过标定的微型移液管和枪头
- 涡旋混匀器

### [ 警告与注意事项 ]

1. 用于体外诊断。
2. 在开始样本测试之前，请将这些使用说明书的内容完整地阅读一遍。
3. 提醒：采集的血液只能储存在CellSave血样本储存管之中。CTC的保存条件要求极其严格，需作防腐处理才能得到准确的分析结果。
4. 提醒：所有的人员都必须遵循通用安全事项，并佩戴实验室安全装备（即防护眼镜、实验室工作服和手套）。
5. 提醒：试剂一旦受到微生物污染，就会导致错误的结果；因此，应当避免出现污染。
6. 提醒：有些试剂中含有叠氮钠作为防腐剂。如果吞食，则应立即求医。严禁将试剂放置在儿童可触摸到的地方，并且应当与食物和饮料相隔绝。操作人员务必穿好合适的防护衣。一旦与酸性物质相接触，这些试剂就会释放出毒性非常强的气体。对于叠氮化合物，处理过程中必须采用大量的水加以冲刷，以防铅管或铜管中的沉淀物形成爆炸条件。
7. 警告：所有的生物样本、样本盒以及与样本接触的其他材料，都存在着生物危害性。应当按照预防传染的规程要求进行操作。试验废弃物的处置应当采用合适的方法，并符合所有相关法规的要求。严禁用嘴吸取试液。
8. 警告：有些试剂中含有 ProClin™ 300 作为防腐剂。
9. 参与此项检测程序的操作人员，都必须接受相关的培训。

以下是关于警告和预防的声明：

H317 可能导致皮肤过敏反应。

预防：

P261 避免吸入粉尘/烟/气体/雾/蒸汽/喷雾。

P272 弄脏的工作服不能离开工作间。

P280 戴保护手套。

责任：

P333+P313 如果皮肤受到刺激或者出现皮疹，应需求医疗帮助。

P362+P364 脱下弄脏的工作服，并在下次使用前清洗干净。

清理：

P501 废物集中处理到一个经批准的废物处理间。

更多信息请参考网站[www.cellsearch.com](http://www.cellsearch.com)中的安全信息栏。

### [ 储存条件及有效期 ]

	储存条件	稳定性
未开封	冷藏 2-8°C	12 个月

- 供应的试剂随时可启封使用；必须加盖储存，温度为 2°C 至 8°C。
- 试剂包内的试剂一旦被启封之后，在 2°C 至 8°C 温度条件下的保存时间不得超过 30 天；用于储存，打开试剂必须重新盖上用它独特颜色盖子依照试剂托盘上的颜色作为导向，这是确保试剂不发生交叉污染。
- 注意事项：稀释缓冲液的瓶子并不在试剂架上；一旦被启封之后，稀释缓冲液只能在室温下保存，且时间不得超过 30 天。
- 应避免试剂温度超过 35°C，并切勿将其冷冻。
- 使用试剂之前，应当将其放置在 15°C 至 30°C 的室温下。
- 目视检测试剂包装中试剂是否位于适当的位置。确认每一个试剂在适当的位置，瓶盖的颜色与标志颜色相匹配。参见位置图片。如果发现位置不对或者有重复的瓶子，不要使用此试剂包并通知客户技术服务部安排更换。
- 应当避免试剂受到阳光直射。
- 只要储存方法得当，试剂的稳定性将一直保持到试剂容器或试剂盒上所标识的有效期为止。切勿使用已过期的试剂。
- 试剂盒的成套组件，是按一个主批次的方式制造并接受测试的。切勿混合及配来自不同试剂盒的试剂。



## [ 适用仪器 ]

CellTracks AutoPrep System & CellTracks Analyzer II

## [ 检验方法 ]

### 样本的采集与准备

将采集到的全血注入CellSave 血样本储存管

1. 在开始某种疗法之前，抽取初始血样。而一旦开始进行治疗之后，则可按照3-4周的时间间隔进行后续样本的采集，以跟踪调查血液中的CTC水平。如果患者正在接受阿霉素治疗，那么至少应当在阿霉素注射7天之后才能进行抽血。
2. 通过静脉穿刺或静脉留置针，以无菌方式采集到的全血，只能存放于CellSave血样本储存管之中。
3. 全血自动注入一根CellSave中，直至血流停止；这样可确保样本与抗凝血剂及防腐剂之间达到正确的比例。然后将试管上下倒置，使其缓慢地混合。试管上下倒置也有助于防止样本出现凝结。混合不够充分、或混合操作太晚，都有可能造成试验结果的不准确。
4. 可以将血液样本保存在或移入CellSave血样本储存管之中。参见CellSave的使用说明书，以了解血样本储存管的处理、储存和取用操作规程。切勿将样本冷藏。

提醒：目视检查CellTracks® AutoPrep® 系统的每一个样本是否产生凝结；请务必丢弃已经凝结的样本。

### 用CellTracks® AutoPrep® 系统进行处理

1. 将 7.5 毫升血样从CellSave 血样本储存管移入带标记的相应15 毫升锥形试管（随CellSearch® 试剂盒一同提供）中。
2. 加入 6.5 毫升的稀释缓冲液。
3. 盖上锥形试管的盖子，上下颠倒5次混合均匀。
4. 在吊篮式离心机中，以800xg的相对离心力离心样本10分钟，离心过程关闭制动器。
5. 将上述制备好的样本放入CellTracks® AutoPrep® 系统中，在1小时内进行处理。参见CellTracks® AutoPrep® 系统的用户指南，以了解详细的操作规程。

### 用CellTracks Analyzer II®分析仪 或 CellSpotter® 分析仪进行分析

1. 将 7.5 毫升血样从CellSave 血样本储存管移入带标记的相应15 毫升锥形试管（随CellSearch® 试剂盒一同提供）中。
2. 加入 6.5 毫升的稀释缓冲液。
3. 盖上锥形试管的盖子，上下颠倒5次混合均匀。
4. 在吊篮式离心机中，以800xg的相对离心力离心样本10分钟，离心过程关闭制动器。
5. 将上述制备好的样本放入CellTracks® AutoPrep® 系统中，在1小时内进行处理。参见CellTracks® AutoPrep® 系统的用户指南，以了解详细的操作规程。

### CellTracks Analyzer II®分析仪 或 CellSpotter® 分析仪进行分析

CellTracks® AutoPrep® 系统将处理后的样本转移到样本盒中，以备后续用CellTracks Analyzer II®分析仪 或 CellSpotter® 分析仪进行分析。对于MagNest装置内已注有样本的样本盒而言，应当在暗室中至少孵育20分钟，并在24小时以内完成分析。关于样本分析与数据检查方面的具体操作规程，请参见CellTracks Analyzer II®分析仪或 CellSpotter® 分析仪的用户指南。

## [ 参考值 (范围) ]

### 样本的采集与准备

判断转移性乳腺癌患者预后的CTC计数检测的临界值为5 CTC/7.5 mL外周全血。如检测结果  $\geq$  5 CTC/7.5 mL，认为该患者预后不良；如检测结果  $<$  5 CTC/7.5 mL，认为该患者预后良好。

在中国的临床试验中，对包括 99 位女性健康志愿者，101位女性良性乳腺肿瘤患者的对照组进行了单个时点的CTC检测。总共200 个来自健康志愿者和良性乳腺肿瘤患者的样本中，没有大于 5 CTC/7.5 mL的结果。检测结果如表1所示。

表1: 中国健康志愿者和良性乳腺肿瘤患者的CTC检测结果

类别	N	平均 CTC 数	SD	CTC计数 $\geq$ 5的患者数	最小值*	最大值*
健康	99	0.05	0.26	0	0	2
良性乳腺肿瘤	101	0.09	0.35	0	0	2

## [ 质量控制 ]

使用CellSearch® 循环肿瘤细胞质控品试剂盒（产品编号：7900003），可以检查整套系统的总体性能，包括仪器、试剂和操作人员的技术。无论是每天所进行的患者样本试验，还是使用新批次的CellSearch® 试剂盒，都需要使用一次CellSearch® 循环肿瘤细胞质控品检验。请参考CellSearch® 循环肿瘤细胞质控品试剂盒的操作规程，以了解具体的使用方法和预期值。

### [ 检测结果的解释 ]

报告的检测结果，是<CTC的数目> /7.5 毫升的血液。

转移性乳腺癌 (MBC)

在患病期间的任何时候，如果每7.5 毫升的血液中所出现的 CTC 为 5 或更多，则属于一种较差的预后，预计会有较短的无进展生存期与总生存期。

注意事项：在我们的临床研究中，每7.5 毫升血液中含有5,000 以上CTC的样本占总样本数的比例小于0.03%。如果在如此高的CTC样本之后立即进行另一个样本试验，并在每7.5 毫升血样中产生CTC为3至15的结果数据，就必须考虑CellTracks® AutoPrep® 系统样本携带污染的可能。对于这种情况，我们建议对于低 CTC的这位患者重新采血，并进行一次验证性CTC 分析。为了正确识别后续的血样，必须参考CellTracks® AutoPrep® 用户指南中“查看数据”章节的相关规定，以了解如何获得批次的详细数据（包括该批次每一根试管样本和患者的识别号）。

### [ 检验方法的局限性 ]

- 对于 CellSearch® 的检测结果，应当依据患者相关的治疗方案，与诊断检查所产生的各种临床信息（即影像资料，实验室检测结果）、体检结果和完整的病史结合起来使用。
- 这种预后性研究并非证明：当前所采取的任何疗法比其它任何疗法或不治疗都更为高效或低效。
- 在评估患者在非进展性疾病与进展性疾病之间的转换方面，CellSearch® 检测结果与影像学评价的结果并不等同。
- 如果患者正在接受阿霉素治疗，应当在阿霉素注射至少7 天之后才能进行抽血。如果在阿霉素给药后7天内抽取血样，对CellSearch® 检测结果的解释必须相当谨慎。
- CellSearch®测试检测不到不表达EpCAM 的CTC。
- CellSearch®测试检测不到表达EpCAM 但不表达细胞角蛋白 8、18以及19的CTC。
- 干扰性物质：

将加入血液样本的SK-BR-3细胞暴露于潜在的干扰性物质，和未经处理的对照细胞进行了比较。测试了以下这些毒性剂量水平（治疗指数的5倍）的抗癌药、非处方药以及其它外源性物质：环磷酰胺，丝裂霉素C®，阿法依泊汀（Procrit）®，生物素，5-氟尿嘧啶，甲氨蝶呤，枸橼酸他莫昔芬，紫杉醇（Paclitaxel），阿那曲唑（Arimidex）®，对乙酰氨基酚，乙酰水杨酸，咖啡因，右美沙芬（dextromethorphan），阿可达（Aredia）®，人抗鼠抗体（HAMA）1型，HAMA 2型，赫赛汀（Herceptin）®，以及布洛芬。SK-BR-3细胞数没有出现显著的差异，表明这些物质不会对 CellSearch® 试剂产生干扰。

血样中加入毒性水平的阿霉素会造成白细胞异常染色，显示为细胞角蛋白和CD45 双阳性细胞，因为阿霉素是一种荧光化合物，并进入了有核细胞内部。如果遇到这种情况，这种所有细胞呈现 CD45 阳性且细胞角蛋白阳性的染色模式是很明显的，作为一种已知的干扰染色特征是很容易被操作人员所识别的。如果抽血是在病人接受阿霉素输液后经过推荐的7天药物洗脱期之后进行的，在正常治疗水平和药物快速清除的情况下，临床中就不太会观察到这种干扰。

在研究血脂所产生的潜在干扰时，将脂肪乳剂加入血样并形成2.6%的浓度，这相当于甘油三酯大于1000 mg/dl。溶解血样，以模拟完全溶血。研究了浓度为7.4mg/dL的胆红素、HAMA 1/HAMA 2、以及18-60%的血球压积。脂血、溶血、黄疸、以及广泛范围内的血球压积值不会干扰CellSearch®检测。HAMA 1 和 HAMA 2 也不会引起干扰，表明通过注射途径接受鼠免疫球蛋白的个体可用CellSearch®成功地进行检测。

### [ 预期结果 ]

健康志愿者，非恶性乳腺疾病患者，其它非恶性疾病患者

健康志愿者，非恶性乳腺疾病患者，其它非恶性疾病患者<sup>†</sup>，以及99 位其它非恶性疾病女性患者的对照组进行了单个时点的CTC检测。在健康个体的外周血液中，预计不会出现上皮细胞。总共345 个来自健康志愿者和女性非恶性疾病患者的样本中，只有一个大于 5 CTC/7.5 mL。检测结果如表2所示。

表2. 对照受试者

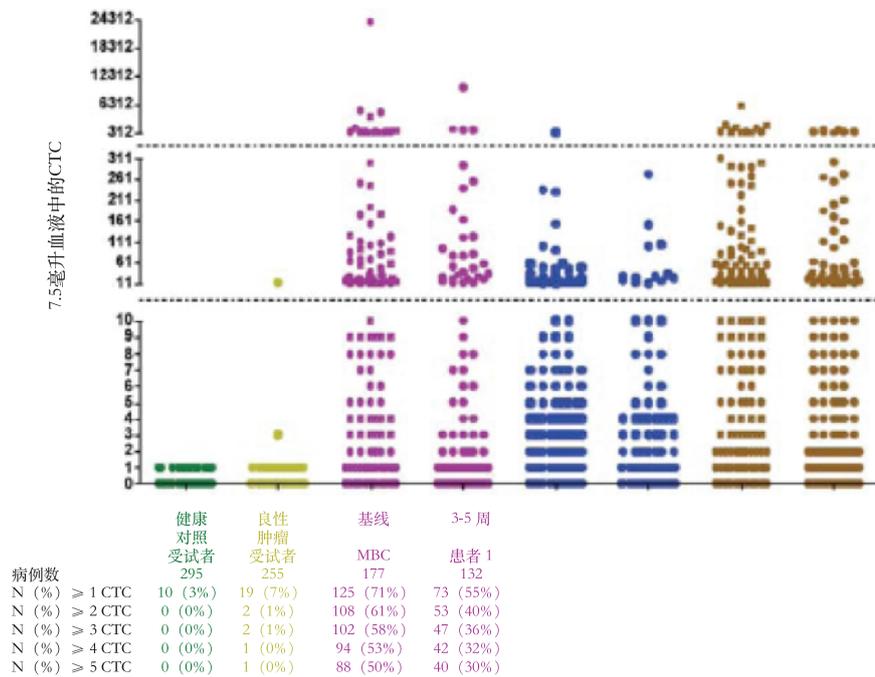
类别	N	平均 CTC 数	SD	CTC计数 ≥ 5的患者数	最小值*	最大值*
健康	145	0.1	0.2	0	0	1
非恶性乳腺疾病	101	0.2	1.2	1	0	12
非恶性其它疾病	99	0.1	0.4	0	0	3

\* NCCLS 指南C28-A2<sup>3</sup>

图1 显示对于包括健康受试者和良性肿瘤受试者的组合（对照受试者），以及转移性乳腺癌（MBC）患者在开始治疗之前和开始治疗之后大约一个月进行CTC检测的结果频数。

81100154.1

图1. 对于对照受试者（没有患恶性肿瘤的受试者）、转移性乳腺癌1（MBC）患者在开始新的治疗线之前（基线）、以及开始治疗之后的3-5周，进行CTC检测的结果频数。



1. 关于MBC人群信息，请参见表2

### [ 产品性能指标 ]

#### 回收率

把一位健康捐献者的血液样本分别注入六根试管，以形成六份 7.5 mL 的血样；然后在其中的五份中分别加入大约为1300、325、81、20以及5 个乳腺癌细胞（SK-BR-3）。第六根试管则没有添加细胞用作对照。在AutoPrep® 系统中，使用CellSearch® 循环肿瘤细胞检测试剂盒处理这些样本，并通过CellTracks Analyzer II®分析仪确定各自的 CTC 数目。对于另外的四名新增捐血者，重复进行了此项实验。将观察到的肿瘤细胞数对应预期肿瘤细胞数绘制图表。实验结果的汇总请参见表3。

表3.回收百分率的估计值

预期的肿瘤细胞数	观察到的肿瘤细胞平均数	回收百分率的范围
1300	1215	91 至95%
325	308	82 至101%
81	85	80 至136%
20	22	95 至140%
5	7	120 至200%

为了比较观察到的肿瘤细胞数和预期数，对实验结果进行了线性回归分析以确定整体拟合或最小平方拟合的结果。对于这30个样本的回归方程式为： $Y=0.93x + 3.87$ ，并且 $R^2=0.999$  ( $R=0.999$ )。本次实验的结果表明：在检测的CTC数值范围内，由回归分析法所得出的平均回收率为93%。

由于肿瘤细胞计数的线性关系，可预期观察值与预期值关系曲线的斜率为1.0；然而在该次实验中得到的斜率为0.93，其原因在于：使用CellSearch® CTC 试剂盒的CellTracks® AutoPrep® 系统中包含有捕获剂和荧光标记试剂，以便通过CellTracks Analyzer II®分析仪进行肿瘤细胞的探测和计数。因此，漏计肿瘤细胞可以归结为以下这些可能之一：1) CellTracks® AutoPrep® 系统对于7.5 毫升血液中加入的肿瘤细胞，回收率仅为93%；2) CellTracks 分析仪II® 只能探测样本盒内肿瘤细胞的93%；或者3) 这两种误差源综合作用的结果。

81100154.1

### 线性及可报告范围

评价前面数据还有一种方法，就是将其作为一系列的稀释液来加以分析，以评估实验的线性度。通过将稀释系列的初始样本（也即第一根试管）中所观察到细胞数除以稀释因子，以便确定每一个患者样本稀释系列的预期值，从而消除了回收百分率的混杂变量。通过对所有这些观察到的肿瘤细胞数及预期产生的肿瘤细胞进行回归分析，得到直线的斜率为1.007，截距为3.0，并且  $R^2 = 0.990$  ( $R = 0.995$ )。当回收百分率（细胞丢失）的影响因素从每一个初始样本的CTC 值中排除，数据分析的结果证明：在0至1238个肿瘤细胞的可报告范围内，CTC 的检测值呈现线性关系。

### 检出限

CellTracks 分析仪II<sup>®</sup> 可以检出每7.5 毫升中含有一个 CTC，因而一个样本盒就得到CTC 为1 的检出限。线性回归分析表明：平均而言，7.5 毫升血液样本中所出现的93% 的 CTC 都能使用CellTracks<sup>®</sup> AutoPrep<sup>®</sup> 系统而得到回收（参见“回收率”一节）。而血样中所损失的大约7% 的 CTC，则不足以减少1 CTC 的检出限。

### 重复性

a. 采用CellSearch<sup>®</sup> 循环肿瘤细胞质控品的系统再现性

每天准备并处理三个单独的CellSearch<sup>®</sup> 循环肿瘤细胞质控品样本，试验时间总共持续 30 天以上；试验依据的是NCCLS 指南EP5-A2长期试验方法。每一个一次性使用的质控品样本都包含预固定的低浓度和高浓度细胞系细胞，两种浓度的细胞分别染上了不同的荧光染料。高浓度和低浓度质控细胞的统计概述，如下表所示。

表4. 精度分析概述

	低浓度	高浓度
N	99	99
细胞平均数	48	969
总体精度% CV和标准偏差 (ST)	18%	5%

b. 使用患者样本的系统再现性

转移性乳腺癌 (MBC)

在进行临床研究的过程中，从47 位转移性乳腺癌患者身上总共采集了163 次的双份血液样本。在多个地点对这些样本进行了处理，以便确定CTC 测量值的重复性。用于比较这163 次双份血液样本的回归方程式是： $Y = 0.98x + 0.67$ ,  $R^2 = 0.99$ 。图2 表示来自 MBC 患者血样双份CTC结果的一张散点图，坐标采用对数刻度，其阈值为5 CTC，用虚线表示。

图2. 双份MBC样本 (n=163) CTC 数的重复性，每7.5 毫升血液所含CTC 的平均值小于 5 或大于等于5。

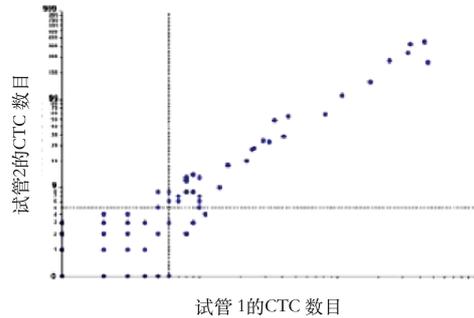


图2 注意事项：可能会有一个以上的数值点相互叠加在一起。比如在左图中，就出现了50 次（31%）两根管的CTC都为0 的情形，18 次（11%）出现了试管1 的CTC为0 而试管2 的CTC却为1；另有18 次（11%）试管1 的CTC为1 而试管2 的CTC却为0。

对于来自转移性乳腺癌患者的血液样本，试管-试管的CTC 数变化如图2所示。在一个给定的容积内，不常见事件（比如肿瘤细胞）的分布具有随机性。这种特征用泊桑分布（Poisson）来描述是最为恰当的——对于某种事件发生的概率非常低而出现此类事件的机会又非常大的情况，可以利用这种数学方法进行建模。

注：由于目前检测技术局限性，根据统计学方法计算得出，CTC检测5个细胞时，%CV值为45%。采用添加实验的方法，5个细胞时，%CV值为29%。

### [ 国内临床实验结果 ]

在中国进行了一项多中心、前瞻性的临床试验以评价CTC 的检测值能否预测疾病进展和生存期。研究纳入了具有可测量病灶、开始新一线全身治疗的转移性乳腺癌患者 (N=300)。按照意向处理 (intent-to-treat) 的原则进行临床数据的分析。患者的人口学信息如表1所示。

表1: 中国MBC患者的人口学信息

类别		患者人数N=300
基线的年龄 <sup>4</sup>	平均值 ± 标准差 中位值	49.37 ± 9.43 50.00
	类别描述	受试者人数 (占总数的百分比, %)
种族	汉族	293 (97.7%)
	其他	7 (2.3%)
基线的 ECOG 评分	0	192 (64.0%)
	1	104 (34.7%)
	2	4 (1.3%)
病灶部位	内脏	212 (71.1%)
	骨	89 (29.9%)
ER/PR	+	169 (56.3%)
	-	157 (52.3%)
HER2	阳性	105 (35.0%)
	阴性	157 (52.3%)
	未知	38 (12.7%)
治疗线	一线	122 (40.9%)
	二线	83 (27.9%)
	三线	66 (22.1%)
	四线	27 (9.1%)
治疗类型	化疗 (Ch)	275 (93.2%)
	内分泌 (En)	58 (19.7%)
	靶向 (Ta)	93 (31.5%)

在开始新一线治疗之前, 先确定基线的CTC数目; 而在开始治疗之后, 则在第一次随访(3-4周)和第二次随访(6-8周)时检测随访的CTC数目。无进展生存期(PFS)的度量始于抽血日期, 而止于疾病进展或死亡(如果之前未观察到疾病进展)的日期, 或直到最后一次与受试者取得联系之日(如果疾病进展/死亡尚未发生)。

#### 1.1 CTC 的频数

在基线和开始治疗之后第一次随访和第二次随访时通过随访抽血获得CTC检测结果数据, 并分为预后良好 (< 5 CTC) 或预后不良 (≥ 5 CTC) 两种类别。

总共300名MBC患者中, 6 位的基线CTC无法得到评估, 原因均为检测无效。第一次随访时有73位未获得CTC检测结果, 其中5 (1.7%) 位检测无效, 11 (3.7%) 位在随访之前已死亡, 57 (19.0%) 位检测缺失。第二次随访时有67位未获得CTC检测结果, 其中4 (1.3%) 位检测无效, 13 (4.3%) 位在随访之前已死亡, 50 (16.7%) 位检测缺失。

表2 总结了临床试验无进展生存期分析的预后不良 CTC 的患者人数和百分比。表格中的患者人数之所以存在差异, 是因为在每一个时间点接受抽血并获得可评估的CTC 结果数据的患者人数各不相同所造成的。

表2: 各时间点CTC计数 小于5 或大于等于 5的MBC 患者的无进展生存期 (PFS)

1	2	3	4	5	6
取样时间	N	≥ 5CTC	PFS 的中位值, 周		时序检验 p 值
			<5CTC	≥ 5CTC	
基线	294	115(39.1%)	42.0	24.9	0.0009
第一次随访	227	49(21.6%)	35.6	24.0	0.0024
第二次随访	233	39(16.7%)	31.0	2.9	<0.0001

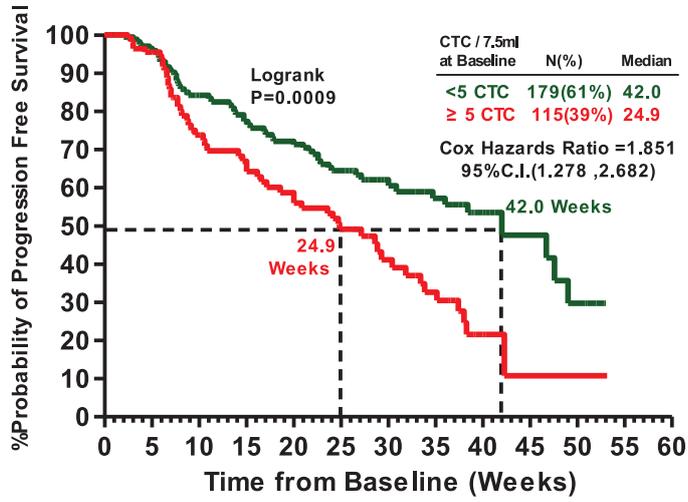
#### 1.2 MBC 患者的无进展生存期 (PFS) 分析

##### 1.2.1 基线CTC结果的PFS分析

294个MBC 患者获得了基线CTC检测结果。按照基线的CTC数值将患者分为两个组别进行卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 生存分析:

- 预后良好的组别 (N=179), 表示为绿色, 包括CTC计数小于5的患者。
  - 预后不良的组别 (N=115), 表示为红色, 包括CTC计数大于等于5的患者。
- 预后良好组的中位PFS比预后不良组长 (分别为42.0周与 24.9 周), 如图3所示。

图1: MBC受试者基线<5CTC和≥5CTC的PFS的Kaplan-Meier曲线

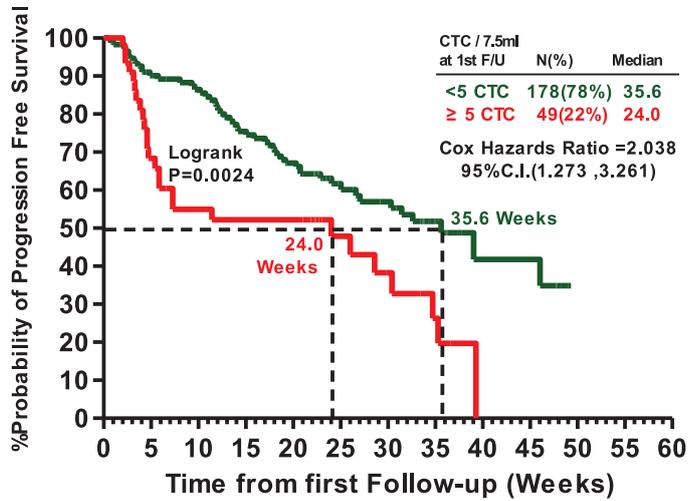


1.2.2 第一次随访CTC结果的PFS分析

227个MBC患者获得了第一次随访CTC检测结果。按照CTC数值将患者分为两个组别进行卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)生存分析:

- 预后良好的组别 (N=178), 表示为绿色, 包括CTC计数小于5的患者。
  - 预后不良的组别 (N=49), 表示为红色, 包括CTC计数大于等于5的患者。
- 预后良好组的中位PFS比预后不良组长 (分别为35.6周与 24.0周), 如图4所示。

图2: MBC受试者第一次随访时<5CTC和≥5CTC的PFS的Kaplan-Meier曲线

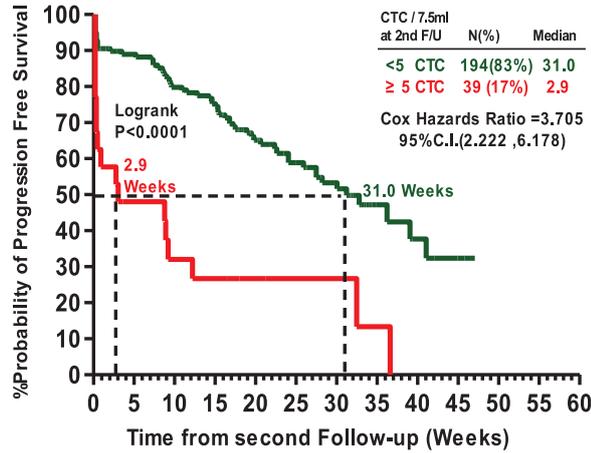


### 1.2.3 第二次随访CTC结果的PFS分析

233个MBC患者获得了第二次随访CTC检测结果。按照CTC数值将患者分为两个组别进行卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)生存分析:

- 预后良好的组别 (N=194), 表示为绿色, 包括CTC计数小于5的患者。
  - 预后不良的组别 (N=39), 表示为红色, 包括CTC计数大于等于5的患者。
- 预后良好组的中位PFS比预后不良组长 (分别为31.0周与2.9周), 如图3所示。

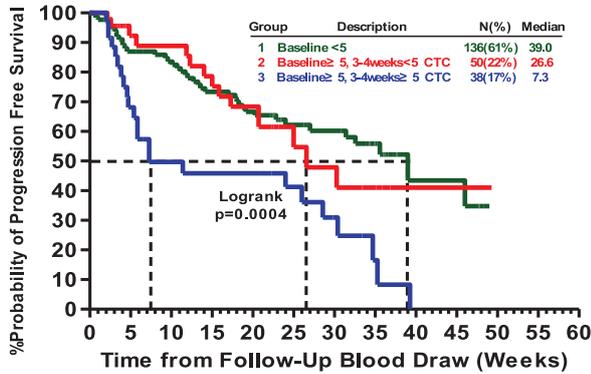
图3: MBC受试者第二次随访时<5CTC和≥5CTC的PFS的Kaplan-Meier曲线



### 1.2.4 通过CTC的升降预测PFS的缩短或延长

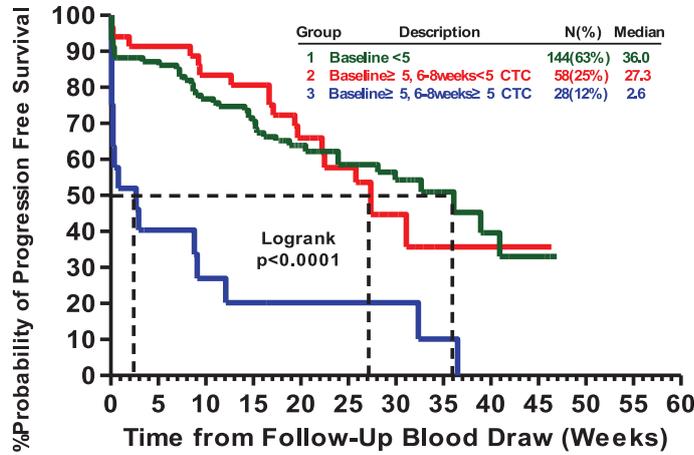
对基线CTC检测结果为≥5CTC的受试者进一步分析, 根据第一次随访的CTC检测结果再分成<5CTC (第2组, 红色) 和≥5CTC (第3组, 蓝色) 的两组, 其中位PFS分别为26.6周和7.3周, 两组的生存曲线经logrank检验具有统计学差异 (P<0.0001)。将基线CTC检测结果为<5CTC的受试者 (第1组, 绿色) 的PFS生存曲线分别和这两组比较, 经logrank检验发现第1组和第2组之间无统计差异 (P=0.9453), 而第1组和第3组之间有差异 (P<0.0001)。三组之间logrank检验有差异。

图4: 基线<5CTC的MBC受试者、基线≥5CTC的MBC受试者在第一次随访时<5CTC和≥5CTC的PFS的Kaplan-Meier曲线



对基线CTC检测结果为≥5CTC的受试者根据第二次随访的CTC检测结果再分成<5CTC (第2组, 红色) 和≥5CTC (第3组, 蓝色) 的两组, 其中位PFS分别为27.3周和2.6周, 两组的生存曲线经logrank检验具有统计学差异 (P<0.0001)。将基线CTC检测结果为<5CTC的受试者 (第1组, 绿色) 的PFS生存曲线分别和这两组比较, 经logrank检验发现第1组和第2组之间无统计差异 (P=0.9453), 而第1组和第3组之间有差异 (P<0.0001)。三组之间logrank检验有差异。

图5: 基线<5CTC的MBC受试者、基线≥5CTC的MBC受试者在第二次随访时<5CTC和≥5CTC的PFS的Kaplan-Meier曲线



### 1.2.5 MBC 患者的Cox单因素回归分析

用单因素Cox回归方法分析其它因素对MBC受试者PFS预后的预测能力, 如表7所示。结果显示治疗线数对MBC受试者的PFS具有影响能力。在这些因素中, CTC对PFS是最强的预后预测因子, 且基线、第一次随访和第二次随访的CTC都具有预后作用。

表3: MBC受试者单变量Cox回归分析

	分级	MBC 患者数	PFS	
			HR	95% CI
	年	300	0.992	0.973, 1.011
ER/PR	+	292	0.830	0.562, 1.225
HER2	+ -	262	1.212	0.822, 1.786
ECOG	2 vs. 1/0	300	1.057	0.260, 4.288
治疗线	≥2 vs. 1	298	1.592	1.066, 2.378
无病生存期	年	254	0.944	0.884, 1.008
基线 CTC	≥5 <5	294	1.851	1.278, 2.682
第一次随访 CTC	≥5 <5	227	2.038	1.273, 3.261
第二次随访 CTC	≥5 <5	233	3.705	2.222, 6.178

在多因素Cox回归分析的模型中同时纳入了一些可能影响受试者预后的重要临床因素后, 无病生存期和CTC仍显示为PFS的独立预后因子, 且CTC的预后能力比无病生存期更强。基线、第一次随访和第二次随访的CTC都对PFS具有预后作用。详情参见表4。

表4: MBC受试者PFS终点多变量COX回归分析

分级	MBC 患者数	患	PFS	
			HR	95% CI
年龄	年		0.997	0.975, 1.020
ER/PR	+ -		0.943	0.571, 1.558
HER2	+ -		1.040	0.651, 1.662
ECOG	2 vs. 1/0	219	0.352	0.047, 2.626
治疗线	≥2 vs. 1		1.173	0.737, 1.869
无病生存期	年		0.890	0.811, 0.977
基线CTC	≥5 <5		1.943	1.255, 3.008
年龄	年		0.997	0.969, 1.026
ER/PR	+ -		1.091	0.561, 2.120
HER2	+ -		1.079	0.603, 1.932
ECOG	2 vs.1/0	166	0.000	0.000, NA
治疗线	≥2 vs. 1		0.814	0.461, 1.438
无病生存期	年		0.880	0.781, 0.992
第一次随访CTC	≥5 <5		2.377	1.301, 4.342
年龄	年		1.006	0.977, 1.036
ER/PR	+ -		1.249	0.649, 2.405
HER2	+ -		1.133	0.658, 1.951
ECOG	2 vs. 1/0	171	0.000	0.000, NA
治疗线	≥2 vs. 1		1.010	0.579, 1.765
无病生存期	年		0.891	0.799, 0.993
第二次随访CTC	≥5 <5		3.713	1.957, 7.043

1.3 CTC结果和影像学评价的比较

有233个MBC受试者获得有效的治疗后第二次随访的CTC结果和影像学评价结果，见下表5。

表5: MBC受试者治疗后第二次随访的CTC结果和影像学疗效评价的比较

影像学疗效判断	CTC 结果	
	预后良好 (<5 CTC)	预后不良 (<5 CTC)
非进展性疾病 (S/PR/CR)	178	25
进展性疾病 (PD)	16	14

阳性符合率: 0.47, 95%CI [0.29, 0.65]

阴性符合率: 0.88, 95%CI [0.83, 0.93]

总体符合率: 0.83, 95%CI [0.78, 0.88]

OR:6.23, 95%CI [2.72, 14.3]

有227个MBC受试者获得有效的治疗后第一次随访CTC结果和影像学评价结果，见下表6。  
表6：MBC受试者治疗后第一次随访的CTC结果和影像学疗效评价的比较

影像学疗效判断	CTC 结果	
	预后良好 ( $< 5$ CTC)	预后不良 ( $< 5$ CTC)
非进展性疾病 (S/PR/CR)	164	34
进展性疾病 (PD)	14	15

阳性符合率：0.47，95%CI [0.34, 0.70]  
阴性符合率：0.83，95%CI [0.78, 0.88]  
总体符合率：0.79，95%CI [0.74, 0.84]  
OR:5.17，95%CI [2.28, 11.7]

治疗后第二次随访和第一次随访的CTC结果和现有的治疗监测工具，即影像学疗效评价，都具有较高的总体符合率。目前临床实际通常都在治疗后第二次随访时进行影像学疗效评价，第一次随访时还很难看到肿瘤影像学变化，因此第一次随访时CTC的检测可能更早地给临床提供疗效信息。其中阳性符合率较阴性符合率较低，是否是CTC的变化比影像学变化更早出现，还需对更多的此类病人进一步研究才能明确。CTC应和影像学及其它监测方法联合应用以评估病人。

### [ 国外临床实验结果 ]

#### 转移性乳腺癌 (MBC) 患者

进行了一项多中心、前瞻性的临床试验以评价CTC 的检测值能否预测疾病进展和生存期。研究纳入了具有可测量病灶、开始新一线治疗的转移性乳腺癌患者 (N=177)。按照意向处理 (intent-to-treat) 的原则进行临床数据的分析。患者的人口学信息如表1所示。

表1：MBC患者的人口学信息

类别	平均值 $\pm$ 标准差 中位值	患者人数N=177
基线的年龄		58 $\pm$ 13 58
	类别描述	受试者人数(占总数的百分比,%)
疾病分期	1	26 (15%)
	2	92 (52%)
	3	26 (15%)
	4	20 (11%)
	未知	13 (7%)
种族	白人	153 (86%)
	黑人	14 (8%)
	西班牙人	7 (4%)
	未知	3 (2%)
基线的 ECOG 评分	0	82 (46%)
	1	72 (41%)
	2	18 (10%)
	未知	5 (3%)
- 病灶部位	内脏	152 (86%)
	骨	153 (86%)
ER/PR	+	121 (68%)
	-	54 (31%)
	未知	2 (1%)
HER2	0	91 (51%)
	1+	12 (7%)
	2+	18 (10%)
	3+	27 (15%)
	未知	29 (17%)

治疗线	一线	82 (46%)
	二线	26 (15%)
	≥三线	67 (38%)
	未知	2 (1%)
治疗类型	化疗 (Ch)	74 (42%)
	内分泌 (En)	45 (25%)
	靶向 (Ta)	9 (5%)
	Ch/En	10 (6%)
	Ch/Ta	23 (13%)
	En/Ta	7 (4%)
	Ch/En/Ta	2 (1%)
	其它	2 (1%)
	未知	5 (3%)

在开始新一线治疗之前，先确定基线的CTC数目；而在开始治疗之后，则大致以3至4周的间隔时间检测随访的CTC数目。在进行基线分析时，无进展生存期（PFS）的度量始于基线抽血的日期，而止于根据CT扫描及/或临床体征与症状确诊的进展；总生存期（OS）的度量则从基线抽血日到死亡的日期为止。在进行随访分析时，PFS的度量始于随访抽血的日期，止于进展的诊断或死亡的日期；而OS的度量则从随访抽血日到死亡的日期为止。

#### 1.4 CTC 的频数

开始治疗之后3-5周、6-8周、9-12周和13-20周通过随访抽血获得CTC检测结果数据，并分为预后良好（< 5 CTC）或预后不良（≥5 CTC）两种类别。在任何指定的随访时间内，如果获得了一个以上的CTC值，则采用与基线抽血间隔时间最长的那次抽血的CTC值。

总共177名MBC患者中，23位的首次随访无法得到评估；这23患者中的10位在获得随访血样之前就已死亡，9位患者在随访抽血之前就已发生疾病进展，另有4位失访。值得注意的是，10位死亡患者的基线CTC计数都 ≥ 5 甚至极高（CTC数分别为9、11、15、24、111、126、301、1143、4648和23618）。另外154名接受随访的患者，在开始治疗之后的3-5周、6-8周、9-14周以及15-20周，分别有132、99、129、85名患者进行了一次抽血。

表3总结了临床试验总生存期分析的预后不良CTC的患者人数和百分比，这与无进展生存期分析的患者人数与百分比（如表10所示）并不相同。这两张表格之所以在每一个时间点的患者人数上存在差异，是因为有些患者的病情在抽血之前就已经进展或死亡。

这些表格中的患者人数之所以存在差异，是因为在每一个时间点接受抽血并获得可评估的CTC结果数据的患者人数各不相同所造成的。

#### 1.5 MBC 患者的无进展生存期（PFS）分析

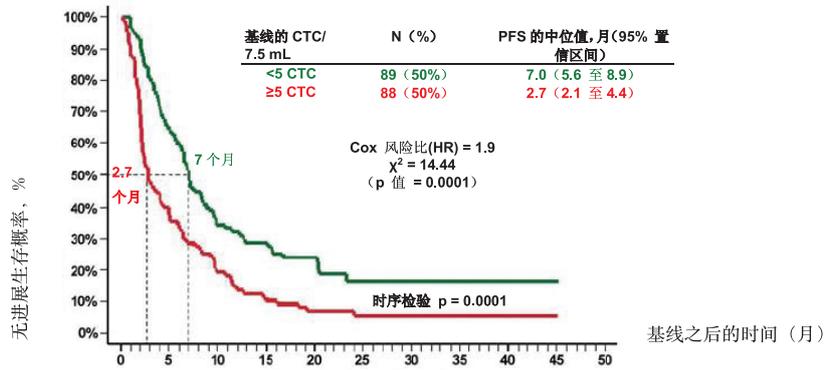
##### 1.5.1 基线CTC结果的PFS分析

177个MBC患者都进行了基线CTC检测。按照基线的CTC数值将患者分为两个组别进行卡普兰-迈耶（Kaplan-Meier）生存分析：

- 预后良好的组别（N=89），表示为绿色，包括CTC计数小于5的患者。
- 预后不良的组别（N=88），表示为红色，包括CTC计数大于等于5的患者。

预后良好组的中位PFS比预后不良组长（分别为7.0个月与2.7个月），如图1所示。

- 图1: 基线CTC计数 小于5 或大于等于 5的MBC 患者的PFS (N=177)。



1.5.2 随访CTC 结果的PFS分析

根据各次随访抽血所测得的CTC 数将MBC 患者分为两个组别进行卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 生存分析。这两组在开始治疗后各次随访抽血点对应的 PFS如图2所示。PFS 的时间是从每一次抽血开始的; 对于在某一次特定的抽血之前病情就发生进展的患者, 已将其数据从本次分析及全部后续随访抽血点的分析中排除。图2显示了CTC对177位MBC患者开始治疗之后3-5 周、6-8 周、9-14 周、以及15-20 周时 <math>CTC < 5</math> 和  $\ge 5$  CTC 的患者的临床进展时间的预测能力。

- 预后良好的组别, 分别表示为橄榄绿色、蓝色、紫色、以及蓝绿色, 包括CTC计数小于5的患者。
- 预后不良的组别, 分别表示为棕色、黑色、灰色、以及橙色, 包括CTC计数大于等于5的患者。

- 图2: 各随访中CTC计数 小于5 或大于等于 5的MBC 患者的PFS

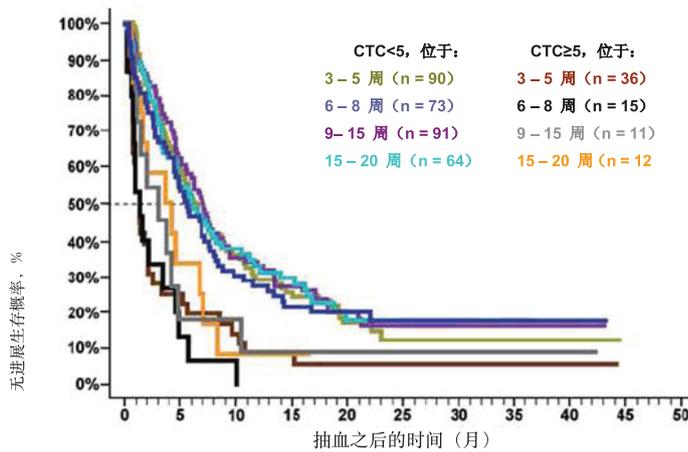


表2总结了在各个不同的抽血时间点, 采用CTC水平和  $\ge 5$  CTC/7.5 毫升的阈值进行PFS 分析的结果。

表2: 各时间点CTC计数 小于5 或大于等于5的MBC 患者的无进展生存期 (PFS)

1 开始治疗之后的 取样时间	2 N	3 $\ge 5$ CTC	4 PFS 的中位值, 月 (95% 置信区间)		6 时序检验 p 值
			<5CTC	$\ge 5$ CTC	
基线	117	88(50%)	7.0(5.6至8.9)	2.7(2.1至4.4)	0.0001
3-5 周	126	36(29%)	6.1(4.7至8.6)	1.3(0.7至2.1)	<0.0001
6-8 周	88	15(17%)	5.6(4.5至7.6)	1.4(0.6至3.4)	0.0001
9-14 周	102	11(11%)	7.0(5.1至8.8)	3.0(0.9至4.8)	0.0251
15-20 周	76	12(16%)	5.9(3.8至8.7)	3.6(0.7至7.0)	0.0610

正如图2和表2所示的那样，在任何时间点较高CTC ( $\geq 5$  CTC /7.5 毫升全血) 的患者都比 $<5$ CTC的患者发生快速进展的可能性更大。表10的第4列表示 $<5$ CTC患者的PFS中位数，其数值范围是5.6至7.0个月，明显长于 $\geq 5$ CTC患者的PFS中位数，时间范围为1.3至3.6个月（第5列）。

### 1.5.3 通过CTC的升降预测PFS的缩短或延长

PFS的总时间从基线抽血开始计算。根据MBC患者在基线、开始治疗之后3-5周、6-8周、9-14周、以及15-20周的CTC数目将其分为四个组别，进行卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 生存分析 (图3)：

- 组1 (绿色曲线)，83 (47%) 名患者在所有的抽血时间点 $<5$ CTC；其中5 (6%) 名患者只进行了一次基线抽血，2 (2%) 名患者在第一次和最后一次抽血之间有一次血样 $\geq 5$ CTC；
- 组2 (蓝色曲线)，38 (21%) 名患者在开始治疗之前 $\geq 5$ CTC，而在最后一次抽血时则降低为 $<5$ CTC；
- 组3 (橙色曲线)，17 (10%) 名患者在早期抽血 (基线、3-5周、及/或6-8周) 时检测到 $<5$ CTC，而在最后一次抽血时则升高到 $\geq 5$ CTC；
- 组4 (红色曲线)，39 (22%) 名患者在所有的抽血时间点都 $\geq 5$ CTC。10 (26%) 名患者只进行了一次基线抽血；

- 图3：开始治疗之后CTC计数降至低于5预示MBC患者具有较长的PFS。

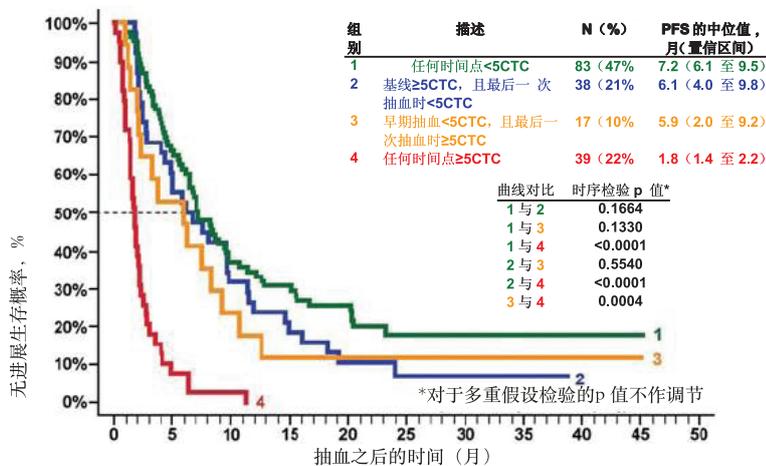


图3表明：在任何时间点 $\geq 5$  CTC的MBC患者 (组4)，其PFS的中位数最短，明显不同于组3、组2以及组1的PFS中位数。在这张图中，其它组间的曲线差异没有统计意义。

## 1.6 MBC患者的总生存期 (OS) 分析

### 1.6.1 采用基线CTC结果数据的OS分析

在177名MBC患者中共计死亡109 (62%) 名，而68 (38%) 位依然生存的患者平均随访时间为22.7  $\pm$  9.4个月 (中位数 = 21.1, 范围 = 4.4-48.6)。在进行这些分析时，预后良好组别 (基线值 $<5$ CTC) 的89位患者中有44 (49%) 位已经死亡，而预后不良组别 (基线值 $\geq 5$ CTC) 的88位患者中有65 (74%) 位已经死亡。

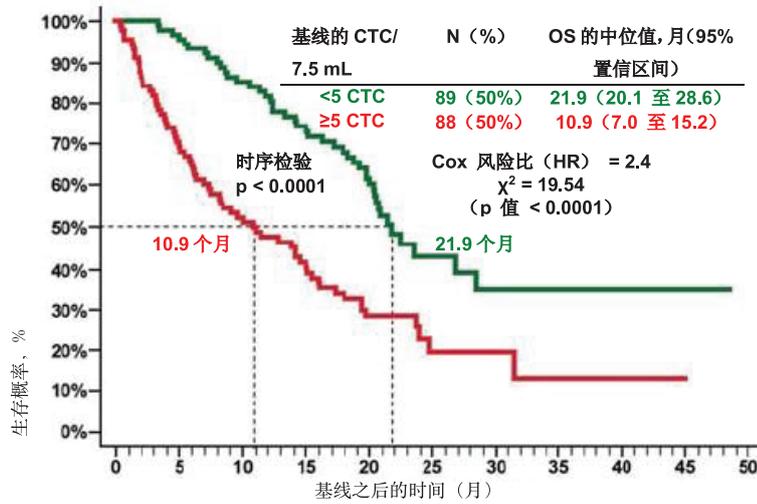
为了进行卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 生存分析，根据患者在基线时的CTC数值将其分为两个组别：

预后良好的组别 (N=89)，表示为绿色，包括CTC计数小于5的患者。

- 预后不良的组别 (N=88)，表示为红色，包括CTC计数大于等于5的患者。

预后良好组OS的中位数明显长于预后不良组 (分别为21.9个月与10.9个月)。结果如图4所示。

- 图4: 基线CTC计数小于5或大于等于5的MBC患者的OS (N=177)。



#### 1.6.2 采用随访CTC结果数据的OS分析

对开始治疗之后各随访抽血时间点的两个患者组别都采用卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 生存分析法, 结果如图5所示。图5 表示CTC对177位MBC患者开始治疗之后3-5 周、6-8 周、9-14 周、以及15-20 周时 <5CTC 和 ≥ 5 CTC 的患者自采血点到死亡的时间的预测能力。OS的计算从各采血时间点开始。

- 预后良好的组别, 分别表示为橄榄绿色、蓝色、紫色、以及蓝绿色, 包括CTC计数小于5的患者,
- 预后不良的组别, 分别表示为棕色、黑色、灰色、以及橙色, 包括CTC计数大于等于5的患者。

- 图5: 不同随访时CTC计数小于5或大于等于5的MBC患者的OS。

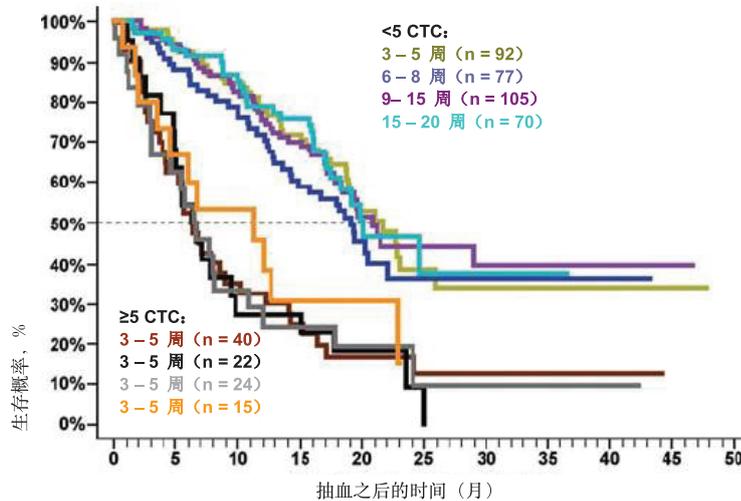


表3总结了在各个不同的抽血时间点, 采用CTC水平和 ≥ 5CTC/7.5 毫升的阈值进行OS分析的结果。

表3: 各时间点CTC计数小于5或大于等于5的MBC患者的总生存期 (OS)

1	2	3	4	5	6
开始治疗之后的采血时间	N	≥5 CTC	OS的中位值, 月 (95%置信区间)		时序检验 p 值
			<5CTC	≥5 CTC	
基线	177	88 (50%)	21.9 (20.1 至 28.6)	10.9 (7.0 至 15.2)	<0.0001
3-5 周	132	40 (30%)	21.7 (18.8 至 25.9)	6.2 (4.1 至 8.9)	<0.0001
6-8 周	99	22 (22%)	19.1 (14.2 至 22.1)	6.3 (4.8 至 9.8)	0.0001
9-14 周	129	24 (19%)	20.8 (17.8 至 24.5)	6.4 (3.0 至 10.9)	<0.0001
15-20 周	85	15 (18%)	20.1 (17.1 至 35)	11.3 (2.0 至 22.9)	0.0021

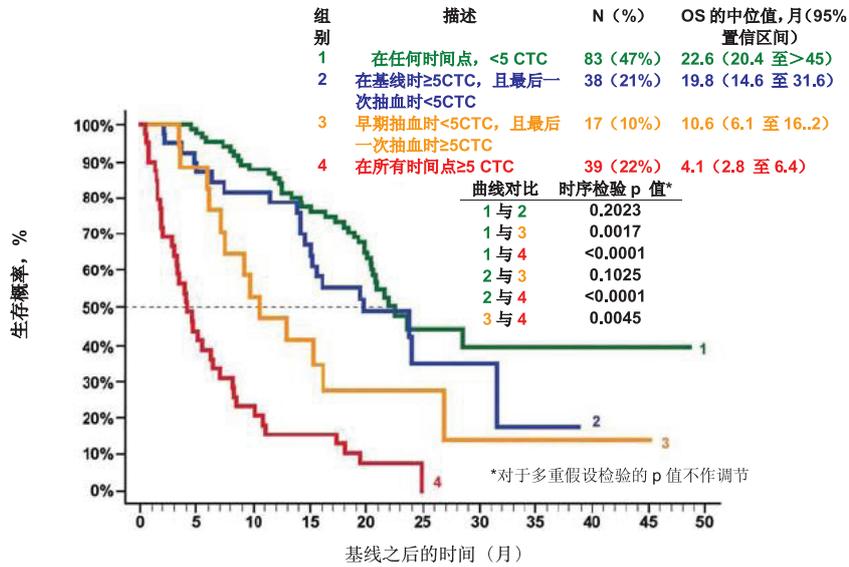
### 1.6.3 通过CTC 的升降预测OS 的缩短或延长

OS的时间从基线抽血开始计算。根据基线、开始治疗之后3-5周、6-8周、9-14周、以及15-20周的检测结果将患者分成四组进行卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 生存分析 (图6) :

- 组别 1 (绿色曲线), 83 (47%) 名患者在所有的抽血时间点 < 5 CTC; 5 (6%) 名患者只进行了一次基线抽血, 2 (2%) 名患者在第一次和最后一次抽血之间有一次 ≥ 5 CTC;
- 组别 2 (蓝色曲线), 38 (21%) 名患者在开始治疗之前 ≥ 5 CTC, 而在最后一次抽血时则降低为 < 5 CTC;
- 组别 3 (橙色曲线), 17 (10%) 名患者在早期抽血 (基线、3-5 周、及/或6-8 周) 时检测到 < 5 CTC, 而在最后一次抽血时则升高到 ≥ 5 CTC;
- 组别 4 (红色曲线), 39 (22%) 名患者在所有的抽血时间点都 ≥ 5 CTC。其中 10 (26%) 名患者只进行了一次基线抽血。

图6 表明: 在开始治疗之后任何时间点的CTC都超出阈值5的 MBC 患者, 其总生存期缩短的可能性更高。在所有时间点 ≥ 5 CTC 的患者 (组别 4) 具有最短的 OS 中位值, 与组别 3、组别 2、以及组别 1 的 OS 中位值有统计差异。组别 3 和组别 1 的中位生存时间也存在统计差异; 尽管组别 3 的 OS 中位值小于组别 2, 但这种差别没有统计学意义。图6 也表明: 对于基线时 ≥ 5 CTC 但治疗之后最终降低为 < 5 CTC 的患者而言, 其死亡风险与从未超出 5 CTC 阈值的那些患者大致相等。

图6: 开始治疗之后CTC计数降低至5, 则预期MBC患者具有较长的OS; 如果CTC计数大于或等于5, 则预期MBC患者的OS较短。



正如图6和表3中第4列和第5列所示的那样, 在任何时间点时≥5CTC的MBC患者比那些<5CTC的患者具有更高的短期死亡概率。<5CTC的患者, 其OS的中位值范围是19.1至21.9个月, 显著长于≥5CTC的患者的OS中位值, 其范围是6.2至11.3个月。

#### 1.6.4 MBC 患者的Cox单因素回归分析

对于以下参数, 采用Cox单因素回归分析评估其与PFS及OS之间的相关性: 患者的年龄(连续变量), 诊断时的疾病分期(1-4), 到转移的时间(连续变量), 开始新的治疗线前的ECOG的状态(0-2), ER/PR的状态(+/-), HER2/neu的状态(0-3+), 治疗线(≥二线或一线), 治疗类型(单用化疗或内分泌/联合), 基线的CTC数值(≥5或<5CTC/7.5mL), 以及开始治疗之后3-5周、6-8周、9-14周、以及15-20周随访的CTC数(≥5或<5CTC/7.5mL)。表4表示此次分析的结果, 并给出了Cox风险比(HR)和相关的p值(Z统计量的Wald检验), 还有每一项评估的患者人数。

表4: MBC 患者的Cox单因素回归分析

参数	类别		MBC 患者的人 数	基线的 PFS 风险		基线的 OS 风险	
	阳性	阴性		HR	p 值	HR	p 值
基线抽血时的年龄	年龄(岁)		175	0.99	0.173	0.99	0.375
初诊时分期	4与3与2与1		164	0.97	0.723	1.00	0.969
ER/PR	阳性	阴性	175	0.84	0.327	0.53	0.002
Her-2/neu	3+与2+与1+与0		148	0.91	0.207	0.93	0.422
基线的 ECOG 状态	2与1与0		172	1.14	0.307	1.64	0.001
到转移的时间	时间(年)		175	0.97	0.048	0.95	0.018
治疗线	≥2线	1线	175	1.55	0.007	1.91	0.001
治疗类型	单纯化疗	H/C/及/或I	172	1.97	<0.001	2.22	<0.001
基线的 CTC 数	≥5	<5	177	1.85	<0.001	2.36	<0.001
3-5 周的 CTC 数	≥5	<5	132	2.52	<0.001	3.30	<0.001
6-8 周的 CTC 数	≥5	<5	99	3.57	<0.001	2.87	<0.001
9-14 周的 CTC 数	≥5	<5	129	2.89	<0.001	3.64	<0.001
15-20 周的 CTC 数	≥5	<5	85	1.86	0.041	2.85	0.004

81100154.1

H/C/及/或I – 单纯的内分泌或靶向治疗，或者联合运用内分泌及/或化疗及/或靶向治疗。

#### 1.6.5 MBC 患者的Cox多因素回归分析

对于MBC 患者的上述这些参数，采用Cox多因素回归分析法进行分析，通过调节单因素分析中一些具有统计意义的已知重要临床因素所产生的影响，以评估CTC 值的独立预测能力。结果表明CTC 值对PFS (表5) 和OS (表6) 是一个强预测因子。

表5: MBC 患者无进展生存期的 Cox多因素回归分析

变量	N	HR	P 值
基线的 CTC (<5 vs ≥5)	172	1.69	0.001
到转移的时间 (年)		0.98	0.154
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		1.52	0.013
治疗类型 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.74	0.001
3-5 周随访的 CTC (<5 vs ≥5)	132	2.32	<0.001
到转移的时间 (年)		0.97	0.166
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		1.68	0.008
治疗类型 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.50	0.060
6-8 周随访的 CTC (<5 vs ≥5)	99	2.92	<0.001
到转移的时间 (年)		0.93	0.023
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		1.36	0.175
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.90	0.005
9-14 周随访的 CTC (<5 vs ≥5)	129	2.23	0.002
到转移的时间 (年)		0.97	0.170
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		1.48	0.061
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.73	0.007
15-20 周随访的 CTC (<5 vs ≥5)	85	1.58	0.140
到转移的时间 (年)		0.96	0.064
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		1.80	0.018
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.66	0.049

表6: MBC患者总生存期的Cox多因素回归分析

变量	N	HR	P 值
基线的 CTC (<5 vs ≥5)	170	2.62	<0.001
ER/PR (阴性 vs 阳性)		0.57	0.016
基线时 ECOG 的状态 (2 vs1 vs0)		1.58	0.001
到转移的时间 (年)		0.97	0.078
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		2.33	<0.001
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.78	0.006
3-5 周的 CTC 随访 (<5 vs ≥5)	130	3.78	<0.001
ER/PR (阴性 vs 阳性)		0.51	0.020
基线时 ECOG 的状态 (2 vs1 vs0)		1.69	0.001
到转移的时间 (年)		0.96	0.142
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		2.30	0.001
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.72	0.026
6-8 周的 CTC 随访 (<5 vs ≥5)	99	2.88	0.001
ER/PR (阴性 vs 阳性)		0.58	0.062
基线时 ECOG 的状态 (2 vs1 vs0)		1.32	0.173
到转移的时间 (年)		0.94	0.135
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		2.51	0.001
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		2.33	0.003
9-14 周的 CTC 随访 (<5 vs ≥5)	129	4.14	<0.001
ER/PR (阴性 vs 阳性)		0.39	0.002
基线时 ECOG 的状态 (2 vs1 vs0)		1.57	0.016
到转移的时间 (年)		0.98	0.388
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		2.21	0.003
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		2.28	0.003
15-20 周的 CTC 随访 (<5 vs ≥5)	85	3.44	0.006
ER/PR (阴性 vs 阳性)		0.38	0.024
基线时 ECOG 的状态 (2 vs1 vs0)		1.33	0.321
到转移的时间 (年)		0.94	0.150
治疗线 (1 线 vs ≥2 线)		3.43	0.001
治疗类别 (内分泌/其它 vs 单纯的化疗)		1.67	0.166

## 1.7 使用CTC 监测转移性乳腺癌的临床状态

### 1.7.1 生存期与CTC及疾病影像学评估之间的关系

放射影像学分析是确定转移性乳腺癌患者疾病状态和治疗反应的主要手段之一。为了在影像学分析所确定的临床状态与CTC值之间建立起相互关系，将两个时间点检测的CTC值和影像学分析的结果与实际的临床终点总生存期进行比较；以及两者相互比较。

### 1.7.2 CTC

先前的数据已经表明：在开始治疗之后任何一次后续随访，相比 $<5\text{CTC}/7.5$ 毫升血液的患者， $\geq 5\text{CTC}/7.5$ 毫升血液的MBC患者，其疾病进展和总生存期缩短的可能性都更大。将开始治疗之后第一次随访所获得的CTC结果、以及在影像学随访前后一个月所获得的CTC结果，分成 $<5$  CTC和 $\geq 5$  CTC两类。如果在影像学检查前后一个月获得了多个CTC值，就采用与影像学随访日期相隔最近的那天所获得CTC的结果。

### 1.7.3 影像学检查

影像学检查的所有部位都符合医疗数字影像学检查与交流 (DICOM) 标准。根据世界卫生组织 (WHO) 的二维标准，检查采用标准化的数字影像，由两名放射学专家 (读片人员) 单独进行操作，并且事先不知晓任何临床信息；对具有可测量病灶的138名患者的每一次随访进行评估 (总共进行231次影像学检查)，分成以下几类：不确定 (I)，病情稳定 (S)，部分缓解 (PR)，或进展性疾病 (PD)。可测量病灶的定义是：至少出现一个最长径大于或等于2厘米的病灶。

读片人员通过描述最长径和最长的正交径，在每一个时间点对每一位患者识别最多八个病灶。将双径数值相乘，报告的是“乘积”值。将这些乘积值求和，即可确定其相对于前一个时间点的变化百分比。尽管所有的患者都有可测量的病灶，但确定患者的状态时仍包含不可测量的病灶 (影像检查仍可探测)，如 WHO 指南所述。进展性疾病的定义是：所有病灶值总和的增加大于25%，或者出现了新的可测量或不可测量的病灶。部分缓解 (PR) 的定义是：所有病变值总和的降低  $\geq 50\%$ ，且没有出现新的病灶。两位放射学专家对于影像的解释可分为以下几种类别：

- S和PR都被认为是非进展性疾病 (NPD)
- PD被认为是进展性疾病
- 如果一位读片员认为属于不确定 (I) 类，而另一位则认为应当归属于 S 类、PR类或PD类，则用后者的分类与CTC进行比较 (n=11)
- 如果两位读片员同时认为属于不确定 (I) 类，就不将这些数据与 CTC作比较 (n=3)
- 两位读片员关于PD和NPD的意见不一致时，由第三位独立的读片员判定 (n=27)
- 如果第三位独立的读片员认为属于不确定 (I) 类，就不使用这组影像数据和CTC比较 (n=2)
- 在进行一系列影像学检查中，距离前一次分析的观察数据不足一个月的影像检查结果未被使用 (n=1)。

### 1.7.4 生存期与影像学检查及CTC之间的关系

独立进行的卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 生存分析法研究，分别采用两个不同的时间点和第一次影像学随访中的CTC结果数据，比较预后良好 ( $< 5$  CTC) 和预后不良 ( $\geq 5$  CTC) 组别MBC患者的总生存期。对于开始治疗 (也即基线时抽血) 后 $10.1 \pm 5.1$ 周 (中位值 = 9.0周) 所进行的第一次影像学随访，96 (70%) 名经影像检查属于NPD的患者，其平均生存时间为 23.8 个月 (95% 的置信区间为：20.4至28.6) (图14, 表 15)。对于被影像学检查确定为PD的 42 (30%) 名患者，其平均生存时间为 12.9 个月 (95% 的置信区间为：7.1 至 19.3)。

对于开始治疗后 $4.3 \pm 2.5$ 周 (中位值 = 4.0周) 所进行的第一次随访抽血，经 CTC 评估分析，104 (75%) 名具有预后良好 CTC 结果数据 ( $< 5$  CTC) 患者的平均生存时间为 21.9 个月 (95% 置信区间为：20.4至26.9) (图15, 表 15)；34位患者 (25%) 具有预后不良的 CTC 结果数据 ( $\geq 5$  CTC)，其平均生存时间为8.3个月 (95% 置信区间为：5.9 至 15.1)。

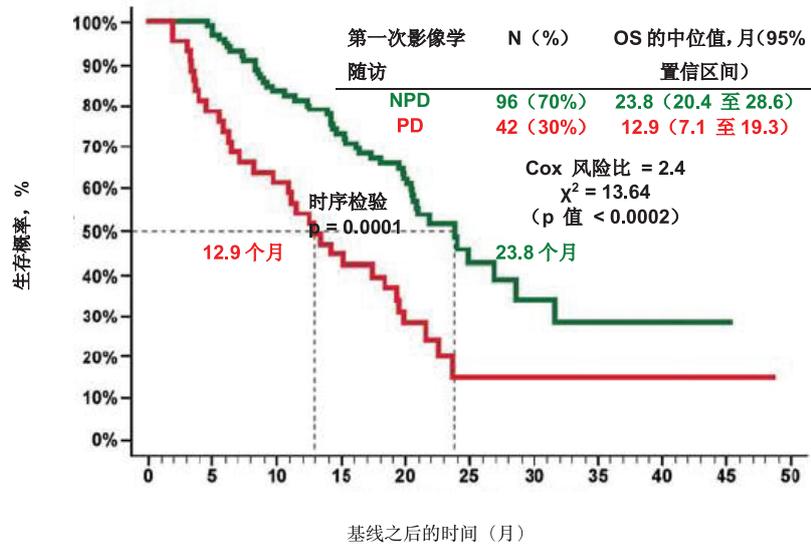
为了确定影像学检查前后时间所进行的CTC评估和治疗后大约4周所进行的CTC评估对生存的预测是否类似，分析了第一次影像学随访 (治疗后 $9.9 \pm 5.1$ 周，中位值 = 8.8周) 前后一个月范围内患者的CTC评估值 (图16, 表15)。138名患者中的134名 (97%) 在第一次影像学随访的一个月内进行了 CTC 评估。105 (78%) 位具有预后良好 CTC 结果数据的患者，其平均生存时间为21.9个月 (95% 的置信区间为：19.9 至 31.6)。29 (22%) 位具有预后不良 CTC 结果数据的患者，其平均生存时间为8.5个月 (95% 的置信区间为：5.5至15.1)。这些数据表明：在两个时间点所进行的CTC评估，都给出了与治疗后大约9周影像学检查相类似的分析结果 (Clin. Cancer Res. Vol 12: 6403-6409, November 2006)。

表7: 治疗后约一个月以及影像学检查一个月内进行CTC 评估的MBC 患者的OS,

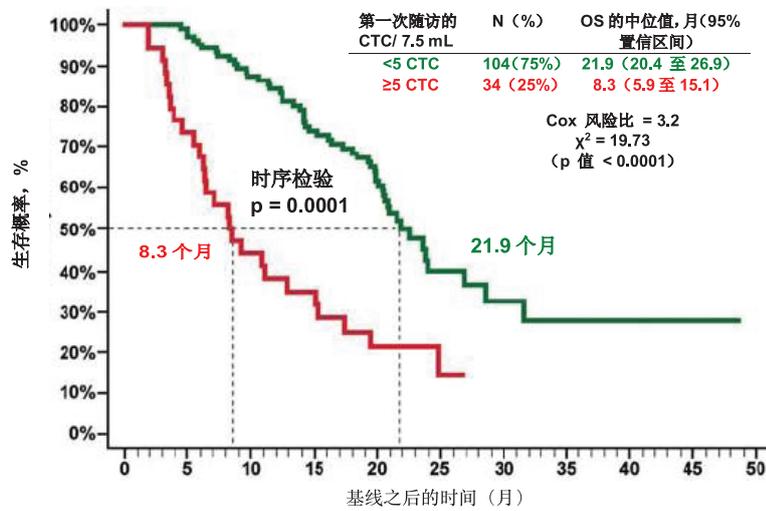
	N	中位生存时间 (95% 置信区间), 月
影像学检查	138	
预后良好 (NPD)	96 (70%)	23.8 (20.4 - 28.6)
预后不良 (PD)	42 (30%)	12.9 (7.1 -19.3)
第一次随访的 CTC	138	
预后良好 (<5)	104 (75%)	21.9 (20.4-26.9)
预后不良 (≥5)	34 (25%)	8.3 (5.9-15.1)
CTC (影像学检查前后 1 个月)	134*	
预后良好 (<5)	105 (78%)	21.9 (19.9-31.6)
预后不良 (≥5)	29 (22%)	8.5 (5.5-15.1)

\*134/138 患者的 CTC 评估是在影像学检查前后1个月内进行的。

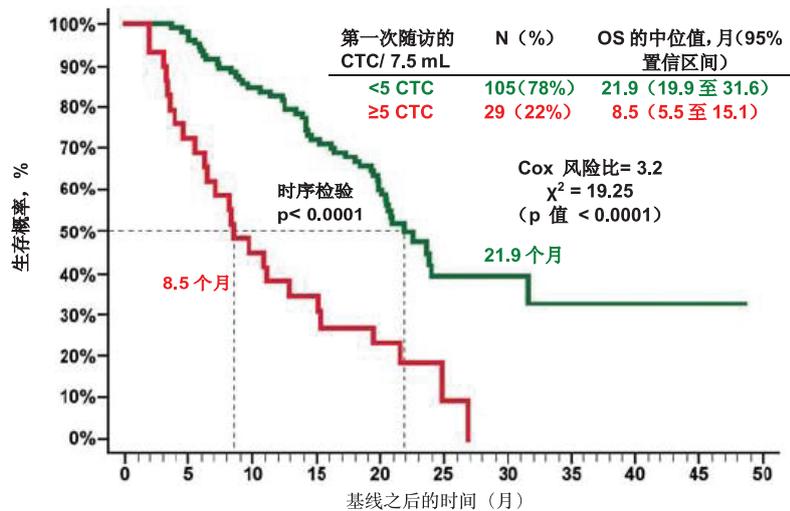
- 图7: 影像学及CTC 评估与OS之间的关联性: 第一次影像学随访结果为NPD 或 PD 的MBC 患者的OS (N=138)



- 图8: 影像学及CTC评估与OS之间的关联性: 治疗后第一次随访时CTC计数小于5或大于等于5的MBC患者的OS (N=138)



- 图9: 影像学及CTC评估与OS之间的关联性: 第一次影像学随访前后一个月内CTC计数小于5或大于等于5的MBC患者的OS (N=134)



### 1.7.5 CTC与影像学监测之间的一致性

正如上文所指出, 影像学检查是目前确定转移性乳腺癌的疾病进展和治疗反应的一种主要手段。为进一步支持CTC在这些临床评估中的有效性 (Clin. Cancer Res. Vol 12:6403-6409, November 2006), 采用前文所述的准则, 将CTC与放射影像学的一致数据与不一致数据建立2x2表格。仅使用第一次影像学随访, 将该次随访中的影像学治疗反应与影像学检查前后一个月内获得的CTC数据进行了比较。在全部138名MBC患者中, 有134位 (97%) 的CTC结果数据符合这一准则。这项基于病人的CTC与影像学检查的比较结果, 如表8所示。

表8: MBC 患者的CTC 与影像学检查的比较

第一次影像学随访时的治疗反应	影像学检查前后一个月的 CTC		总数
	<5CTC/7.5mL	≥5CTC/7.5mL	
非进展性疾病	85	9	94
进展性疾病	20	20	40
<b>总数</b>	<b>105</b>	<b>29</b>	<b>134</b>

测量参数	估计值	95%	95%
		置信区间下限	置信区间上限
阳性符合率%	50%	34%	66%
阴性符合率%	90%	83%	96%
阳性预测值	69%	49%	85%
阴性预测值	81%	72%	88%
总体符合率%	78%	70%	85%
比值比 (OR)	9.4	3.4	26.8

利用138 名MBC 患者开始治疗之后所进行的全部影像学随访资料中有用的影像学治疗反应结果 (n=225) 与影像学检查前后一个月所获得的CTC 结果数据进行比较。在全部225次影像学检查中, 有219次 (97%) 的 CTC 结果数据符合这一准则。这项基于所有观察值的CTC 与影像学检查的比较结果, 如表9所示。

表9: MBC 所有观察值的CTC 与影像学检查的比较

全部影像学随访时的治疗反应	影像学检查前后一个月的 CTC		总数
	<5 CTC/7.5mL	≥5 CTC/7.5 mL	
非进展性疾病	151	16	167
进展性疾病	30	22	52
<b>总数</b>	<b>181</b>	<b>38</b>	<b>219</b>

测量参数	估计值	95%	95%
		置信区间下限	置信区间上限
阳性符合率%	42%	29%	57%
阴性符合率%	90%	85%	94%
阳性预测值	58%	41%	74%
阴性预测值	83%	77%	89%
总体符合率%	79%	73%	84%
比值比 (OR)	6.9	3.0	15.8

在系列观察中, 只有少量影像学治疗反应的非进展性疾病与进展性疾病之间的转换与CTC 数的 <5 与 ≥ 5/7.5 mL之间的转换相符合。

由于某一较早时间点的CTC预后价值与影像学分析时的CTC 结果相等 (图8和 图9), 因而将患者的第一次影像学随访 (大约在开始治疗之后9 周进行) 所获得的结果, 与开始治疗后约4 周的第一次CTC随访的结果数据进行比较。全部 138 位 MBC 患者都有符合此项准则的CTC 结果数据。这项基于患者的某一较早时间点的CTC 与影像学检查的比较结果, 如表10所示。

表10: MBC 患者的CTC 与影像学检查的比较

第一次影像学随访时的治疗反应	第一次随访时的 CTC		总数
	<5CTC/7.5mL	≥5CTC/7.5mL	
非进展性疾病	84	12	96
进展性疾病	20	22	42
<b>总数</b>	<b>104</b>	<b>34</b>	<b>138</b>

测量参数	估计值	95% 置信区间下限	95% 置信区间上限
阳性符合率%	52%	36%	68%
阴性符合率%	88%	79%	93%
阳性预测值	65%	46%	80%
阴性预测值	81%	72%	88%
总体符合率%	77%	69%	84%
比值比 (OR)	7.7	3.0	19.9

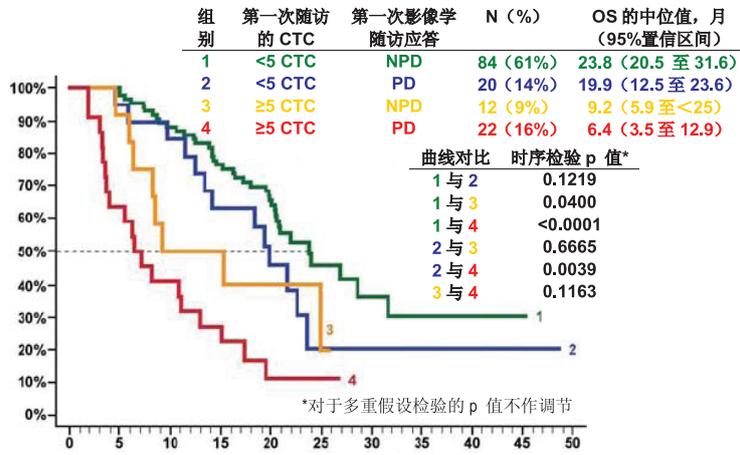
#### 1.7.6 CTC 作为影像学检查的一种辅助

尽管CTC 与影像学检查之间的总体符合率较好（大约为78%），但仍有大约22%的MBC 患者不相符。由于需要将 CTC 评估信息与其它诊断形式结合起来使用以作出治疗决策，因而必须把第一次随访时的CTC 评估（大约为开始治疗之后4 周）及以下组别影像学检查的结果与OS 进行对比，以确定不一致结果中的哪一个检测更好地反映了患者的预后（图10）：

- 组别1（绿色曲线），84（61%）名患者第一次随访时 < 5 CTC且NPD；
- 组别2（蓝色曲线），20（14%）名患者第一次随访时 < 5 CTC且PD；
- 组别3（橙色曲线），12（9%）名患者第一次随访时 ≥ 5 CTC且NPD；
- 组别4（红色曲线），22（16%）名患者第一次随访时 ≥ 5 CTC且PD。

在本次研究中，CTC检测值是总生存期的强独立预测因子。研究的结果表明：联合运用CTC与影像学评估可提供最准确的预后评价。

图10: 用治疗后第一次随访的 CTC 值 (n=138) 以及第一次影像学随访的疾病状况分组的组 1、2、3 和 4 的MBC患者的OS



### 1.8 CTC 与影像学评估的变异

#### 1.8.1 CTC

计算第一次随访抽血的CTC读片人间变异的方法是: 研究机构的操作人员与中心实验室对样本的 ≥5 CTC及 < 5CTC的分类产生不一致例数的计数。对一亚组的71 名患者抽取两试管血液并加以处理; 由研究机构和中心实验室各对其中一管检测进行 ≥5 CTC及 < 5CTC的分类, 比较分类结果。

#### 1.8.2 影像学检查

通过比较两位放射学专家对于NPD 与 PD 的分类, 可以确定读片人间变异; 读片人自身变异的计算, 则需要比较两位放射学专家对于一批患者的治疗反应所作出的三次判断, 每一次判断与前一次至少间隔一星期。还研究了这138 名MBC 患者后来的影像学评估, 以及开始治疗以前和后来随访的CTC 评价。

表11: MBC 患者影像学 with CTC 评估的变异

	n	影像学 NPD, PD 不一致	n	CTC/7.5 mL <5vs≥5 不一致
<i>读片人之间</i>				
第一次随访	132	11.4%	138	0.7%
任何一次随访	217	13.4%	695	1.0%
<i>读片人自身</i>				
第一次随访				
读片人 1 (影像学)	24	25.0%	-	-
读片人 2 (影像学)	22	9.1%	-	-
任何一次随访				
读片人 1 (影像学)	30	20.0%	-	-
读片人 2 (影像学)	28	10.7%	-	-
<i>CTC 值, 试管-试管</i>				
第一次随访	-	-	71	5.6%
任何一次随访	-	-	403	5.5%

表11表明: 在对同一组病人第一次疾病随访的评估中、以及在全部后续随访的评估中, 影像学读片人之间的变异都比CTC读片人之间的变异高 (Fisher's  $P < 0.001$ )。

在 CTC 与影像学评估不一致时, CTC 提供的是最为准确的预后评估。

#### [ 参考文献 ]

1. Cancer Biology, 3rd edition, Ray Ruddon 1995
2. NCCLS Approved Guideline EP5-A, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices".
3. NCCLS Approved Guideline C28-A2, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory".
4. Tibbe A.G.J, Miller C.M and Terstappen LWMM "Statistical Considerations for Enumeration of Circulating Tumor Cells", Cytometry Part A 71a:154-162 (2007).

---

### [ 基本信息 ]

注册人名称: Menarini Silicon Biosystems Inc. 美纳里尼硅生物系统有限公司  
注册人住所: 3401 Masons Mill Road, Suite 100, Huntingdon Valley, PA 19006, USA  
生产企业生产地址: 3401 Masons Mill Road Huntingdon Valley, PA 19006 USA;  
545 South Ewing Avenue, St. Louis, Missouri, USA  
代理人及售后服务单位名称: 美纳里尼 (中国) 投资有限公司  
代理人及售后服务单位住所: 武汉市东湖高新开发区高新大道666号B13栋4-5层  
客服热线: 021-5297 0001  
生产日期: 参见产品包装  
失效日期: 参见产品包装

---

### [ 医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号 ]

国械注进20153403566

---

### [ 说明书核准及修改日期 ]

2018年10月16日

### [ 标识的解释 ]

在本产品的标签中, 可能会用到以下这些符号。

---

### [ 标识的解释 ]

在本产品的标签中, 可能会用到以下这些符号。

	生产日期		体外诊断 医疗器械		注意: 参见 使用说明
	使用期限或有效期限 (年-月-日)		含量足以进行“n”次试验		生产商
	批号		温度限制		欧共体授权代表
	序列号		参考使用说明		警告
	货号或产品代码		生物风险		