

《外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法》团体标准编制说明

1 工作简况

1.1 任务来源

《外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法》团体标准，由致慧医疗科技（上海）有限公司牵头起草，中国生物材料学会标准工作委员会归口。2023年1月11日，中国生物材料学会发布了《创面修复材料有效性评价 第1部分：体外...材料评价法》等11项团体标准项目立项公示的通知，《外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法》被列入中国生物材料学会2023年团体标准批准立项清单。

1.2 起草工作组单位和团体标准主要起草人及其所做工作

本标准起草单位：致慧医疗科技（上海）有限公司、福建省致慧医疗科技有限公司、同济大学、同济大学附属东方医院、上海市第十人民医院、吉林大学第一附属医院、北京麦斯达夫科技股份有限公司。

本标准主要起草人：陈炳地、刘中民、乐文俊、高金莉、孙奋勇、董春燕、许建成、姜珂、张惠棋、郑波。具体工作任务见表1。

表1 标准起草人及工作任务

姓名	单位	职称/职务	职责
陈炳地	致慧医疗/同济大学	董事长/副教授	项目负责人
刘中民	同济大学附属东方医院	院长/教授/主任医师	标准起草
乐文俊	致慧医疗/同济大学	技术总监/副研究员	标准起草
高金莉	同济大学附属东方医院	病理科室主任/主任医师	标准起草
孙奋勇	上海市第十人民医院	检验科主任/主任医师	标准起草
董春燕	同济大学附属东方医院	肿瘤科主任/主任医师/教授	标准起草
许建成	吉林大学第一附属医院	检验科主任/主任医师/教授	标准起草
姜珂	福建省致慧医疗科技有限公司	检验实验室主任	标准起草
郑波	北京麦斯达夫科技股份有限公司	CEO/高工	标准起草
张惠棋	北京麦斯达夫科技股份有限公司	标准化工程师	标准起草

1.3 主要工作过程

在确定标准制定任务后，标准起草工作组依照国家有关规定及中国生物材料学会团体标准管理办法，根据团体标准进度计划安排组织实施。在标准草案编制工作过程中，标准起草工作组通过大量文献检索与查阅，分析循环肿瘤细胞检测方法团体标准立项可能性，参考了相关国

家标准、行业标准，以对循环肿瘤细胞检测方法进行各项主要技术指标检测和试验方法验证为依据，并在与本团体标准有关的科研、生产、使用、管理单位进行充分沟通的基础上，起草制定了本团体标准。

（一）预研阶段

2022年12月，致慧医疗科技（上海）有限公司、福建省致慧医疗科技有限公司、同济大学、同济大学附属东方医院、上海市第十人民医院、吉林大学第一附属医院、北京麦斯达夫科技股份有限公司等围绕外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法召开标准研制研讨会，共同研究和探讨外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测技术标准化工作。项目组对相关技术及标准情况进行了查新和分析，结合前期研究及验证数据，就如何进一步规范 CTC 检测技术、如何保证 CTC 检测结果准确、可靠，为开展 CTC 计数、CTC 监测，CTC 分子分型研究分析等进行了研讨，拟定了团体标准的名称，确定团体标准的适用范围。2022年3月，标准编制组针对外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测技术要求，开始搜集、查阅相关国家政策、科研文献、资料及标准查新工作，并结合 CTC 检测行业内现状，论证标准立项的可行性，形成标准框架。

（二）立项阶段

2022年4月，标准编制工作组向中国生物材料学会提交立项申请。根据《中国生物材料学会团体标准管理办法》的相关要求，2023年1月7日召开立项评审会，对《外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测》团体标准进行了立项审查，经技术专家认真研究与审核，标准符合立项条件，于2023年1月11日正式立项。

（三）起草阶段

2022年12月-2023年2月，标准编制工作组通过专家访谈方式，对标准内技术内容进行研讨，采纳专家提出的宝贵意见和建议，并在原有的基础上调整了标准框架，对标准中的评价指标进行了下一步讨论，商讨了 CTC 检测的科学性和适用性。对各种 CTC 检测技术方法进行了解，结合资料分析和调研情况，对标准框架进行内部讨论，就标准的编制背景、标准框架、主要技术内容进行研讨，并从不同角度提出了具备科学性、实用性和可操作性的修改意见，形成标准草案。

标准起草工作组根据前期的工作情况，共同研究确定了标准征求意见稿，并形成标准编制说明，计划于3月起通过网络平台、实验室检验机构、医疗机构等产业链相关方开展广泛征集意见。

2 确定学会团体标准主要技术内容（如技术指标、参数等）

2.1 本标准编制原则

2.1.1 适用性原则

标准中规定的要素立足当前 CTC 检测技术，通过规范 CTC 技术，有效改善当前外周血中循环肿瘤细胞应用中所遇到 CTC 捕获率低、不稳定、捕获的 CTC 活性也较低产业问题，所规定的技术内容既符合国家政策及规范性文件要求，又满足实际，发挥标准能效。

2.1.2 先进性原则

在总结评价 CTC 检测技术所取得的经验和存在问题的基础上，进行充分的研究、调研和论证，确定标准的主要内容，使得此项工作在行业中领先，并值得借鉴和推广。

2.1.3 统一性原则

一方面符合国家及行业出台的法律法规、政策文件要求，另一方面充分借鉴工作经验，在此基础上对原有工作不断改进提升，使标准更加规范。

2.1.4 规范性原则

召开标准编写研讨会，专家及相关人员就标准的框架、结构、内容广泛讨论，发表意见。标准的格式和语言表述符合 GB/T 1.1—2020 的要求，确保标准内容的规范。

坚持适用性和有效性为准则，标准的编制不低于目前国内相关行业标准规定的限量指标，严格遵循 GB/T 1.1—2020 的要求进行编制，并且结合当前行业发展现状与特点，提高标准贯彻实施的实用性和可操作性。

2.2 本标准主要内容

1. 范围

本文件规定了外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法的原理、检测流程、检测条件、试剂和材料、仪器设备、样品制备、样本检测、灵敏度、精密度和特异性、安全保障与质量控制等内容。

本文件适用于对外周血液循环中肿瘤细胞的非抗体依赖磁分离检测。

2. 规范性引用文件

本文件引用了 GB 19489 实验室 生物安全通用要求。

3. 术语和定义

外周血、循环肿瘤细胞、循环肿瘤细胞捕获探针、活化、分散性、细胞离心涂片、重悬、磁吸附、细胞染色、有核细胞、读片，审片、核质比等术语的定义，对本标准的正确解读和理解提供了指引。

4. 方法原理

基于循环肿瘤细胞和血球细胞之间的特性差异，利用非抗体依赖的方法捕获循环肿瘤细胞并通过细胞染色、免疫组化、原位荧光杂或聚合酶链式技术对捕获细胞进行分析鉴定。非抗体依赖的方法包括无标记捕获探针、多肽捕获探针、滤膜法和微流控法。

无标记捕获探针法：循环肿瘤细胞在一定密度梯度介质中通过离心力下进行分层分离后，利用无标记的顺磁性纳米磁性微粒捕获循环肿瘤细胞，并在外磁场的作用下实现 CTC 与其他血液成分有效分离和富集。

多肽捕获探针法：利用多肽修饰的磁性微粒捕获外周全血中的循环肿瘤细胞，多肽捕获探针与外周血中的循环肿瘤细胞稳定结合，并在外磁场的作用下实现 CTC 与其他血液成分有效分离和富集。

5. 检测流程

包括流程图和操作示例。

6. 检测条件

检测条件主要包括：温度：25 °C ± 5 °C；相对湿度：30%~65%；压强：标准大气压。

7. 试剂和材料

本文件的检测方法主要使用到的试剂和材料有：细胞密度梯度分离液、巴斯德吸管、循环肿瘤细胞捕获探针、粘附载玻片、盖玻片、离心管、单道移液器枪头、磷酸缓冲盐溶液（PBS）、细胞固定液、细胞核染色液、细胞质染色液、封片剂等。

8. 仪器设备

本文件的检测方法主要使用到的仪器设备有：离心涂片机（甩片机）、显微镜、迷你旋转培养器、水浴锅、超声波清洗仪、离心机、单道移液器、多功能磁分离器等。

9. 样品制备

样品的制备主要包括血液样本采集和血液样品的处理两方面。

10. 样本检测

样品进行检测前的准备主要包括：循环肿瘤细胞捕获探针准备和吊片放置。其中，循环肿瘤细胞捕获探针准备需要先进行活化，再进行分散性评估，检查循环肿瘤细胞捕获探针的质量是否合格。

循环肿瘤细胞磁分离捕获有两种检测方法，分别是无标记捕获探针法和多肽纳米探针法，对循环肿瘤细胞进行有效的捕获。

循环肿瘤细胞非磁分离捕获提供了膜滤法和微流控芯片法。

细胞制片中说明了将捕获的循环肿瘤细胞制作玻片。

循环肿瘤细胞染色鉴定中有 5 种方法，分别是：细胞病理鉴定法、免疫组化和免疫荧光法、荧光原位杂交法、反转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）、基因测序法。

11. 测定结果有效性判定

针对细胞病理鉴定法、免疫组化和免疫荧光法、荧光原位杂交法、反转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）、基因测序法等 5 种染色鉴定进行判断。

12. 测定结果表述

针对细胞病理鉴定法、免疫组化和免疫荧光法、荧光原位杂交法、反转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）、基因测序法等 5 种染色鉴定提供表述方式。

非抗体依赖的外周血中循环肿瘤细胞检测操作示例可参考附录 A。

13. 灵敏度、精密度和特异性

本方法的灵敏度一般应为 ≥ 1 个/mL，精密度应为对同一份血液样品进行检测 ≥ 3 次，循环肿瘤细胞数量应在同一结果评价范围内，其检测特异性 $\geq 95\%$ 。

14. 安全注意事项

操作人员在进行试验时应注意人工操作安全，并防止试剂材料的污染。

2.3 本标准制定参考的主要依据

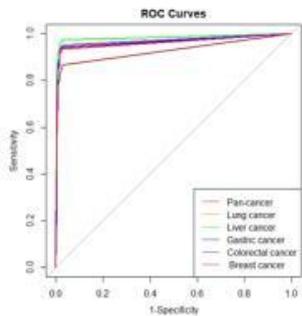
标准制定中参考引用了 GB 19489 实验室 生物安全通用要求。

3 主要实验（验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期经济效果

3.1 主要结果分析

3.1.1 试验分析

本标准所提出《外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法》已在同济大学、上海市东方医院、南京医科大学附属无锡人民医院、福建医科大学附属泉州第一医院等医院开展验证和临床应用，已检测样本近 3000 例，检测结果灵敏度、再现性均高，灵敏度不低于 1 个 CTC/mL，检测特异性达到 95%以上。检测技术涉及相关的设备及试剂耗材也均有商业化量产的产品，满足检测技术的广泛开展。



Cancer	Cutoff	Specificity	Sensitivity	AUC
Pan-cancer	0.5	0.971	0.935	0.962
Lung cancer	0.5	0.971	0.949	0.968
Liver cancer	0.5	0.971	0.974	0.983
Gastric cancer	1.5	0.983	0.936	0.966
Colorectal cancer	0.5	0.974	0.951	0.971
Breast cancer	0.5	0.971	0.867	0.926

图 1 各类肿瘤细胞验证情况



图 2 检测方法技术比对

3.2. 综述报告

随着生物医学技术的发展，CTC 检测的内涵不断丰富，针对 CTC 数量、分子分型、下游应用及单细胞特征的分析，在肿瘤精准诊疗中的应用受到越来越多关注。但是 CTC 具有数量稀少，每 10mL 血液中可能仅含有几个到几十个循环肿瘤细胞，而 10mL 血液中含有的白细胞约有 1 亿个，红细胞有 500 亿个，同时 CTC 的半衰期短只有 1-2.4 h 并、存在多种亚型，为此给 CTC

实验室提取富集带来了挑战。

文献报道及目前国内外检测公司提供的检测平台中，分离富集 CTC 的技术原理主要分为依赖特定标志物的生物分选法和不依赖特定标志物的物理分离法两大类。

1. 生物学分选将特定标志物抗体或核酸适配体等附着至微柱、微孔或磁性设备，通过抗原抗体结合原理实现 CTC 分离与富集。生物特性主要用于免疫抗体与肿瘤相关抗原（阳性富集）或白细胞抗原 CD45（阴性富集）。

1) 免疫磁珠技术（IMB），免疫磁珠靶向抗原的抗体耦合磁珠，随后抗体抗原混合物通过磁场分离。阳性选择通常是进行抗体的上皮细胞粘附分子（EpCAM），以及随后 CTC 的免疫荧光检测。IMB 最具代表性的就是唯一被 FDA 批准上市的 CellSearch™ System（Veridex），针对上皮抗原 EpCAM，利用免疫纳米磁颗粒包被抗 EpCAM（上皮细胞粘附因子）的特异性抗体，通过抗原抗体反应形成“细胞—抗原—抗体—磁珠”复合体。尽管 CellSearch 具有较高的富集效率和回收率，但是有些非恶性来源的上皮细胞也会表达 EpCAM，并且有些肿瘤细胞的 EpCAM 表达缺失，其结果有一定的假阳性和假阴性。

2) 微珠技术，基于 MACS 微珠、MACS 分选柱和 MACS 分选器。MACS 微珠是直径约为 50nm 的超顺化磁性颗粒，均由可降解生物材质构成，因而分选后无需解离也不会改变标记细胞的结构功能，不会影响后续实验结果。其优势在于①微珠作载体偶联特定抗原，与细胞表面抗原结合，识别目的细胞；②微珠具有磁性，在外在磁场作用下具有磁性吸附，而失去外加磁力后磁性消失，从而将目的细胞分离出来：具有敏感性高，特异性高，效率高的优点。

2. 物理学分离方法是指通过 CTC 区别于其他细胞的物理学特征如大小、密度、力学及电学特征等进行 CTC 分离和富集。物理性能的优势在于不使用标记物来分离 CTC。基于物理特性的方法包括密度梯度离心分离；特殊滤器筛选，ISET，立体微孔过滤器；不同大小带标签的生物芯片；微流体结合多孔流分离（MOFF）和介电泳细胞分离（DEP）技术等。

1) 密度梯度离心法，利用配制的分离液密度将不同密度的细胞区分在不同区域。将外周血平铺于分离介质上层，离心作用加速密度大于分离液的细胞沉降，而密度小于分离液的细胞则聚集于分离液面上层，从而达到分离效果。但是，这样得到的循环肿瘤细胞同大量白细胞和单核细胞混在一起，降低了后期鉴别 CTC 的效率。

2) 膜滤过分离肿瘤细胞技术（ISET），是基于细胞大小，使用 8um 孔径滤过膜过滤，使较小的淋巴细胞和中性粒细胞通过，将体积较大的 CTC 细胞阻留在膜上，从而保持了细胞的活性和完整性，以利于后续的检测技术。该方法经济简便、敏感度高，可有效避免多步骤操作引

起的细胞损伤和丢失，但是直径小于 8um 或者有溶解的细胞会被滤过而无法收集。

3. CTC 芯片，近年有一个专注于微流体（芯片）设备的开发，可以处理非常少血液量。微流体平台称为 CTC 芯片，是由数组 EpCAM 抗体所覆盖，但缺点是价格昂贵，不适用于临床推广。

本标准首次提出外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法，本方法不依赖于特定的上皮标志物，可高效、全面分离所有类型 CTC，适用于绝大多数实体瘤。方法基于 CTC 密度等特性，使得 CTC 从血液中分离出来，最大化地去除外周血中的红细胞和白细胞，提高收集液中循环肿瘤细胞的纯度，然后利用顺磁性纳米磁性微粒对循环肿瘤细胞的特异性吸附进行富集，本方法能克服传统物理或生物方法的不足，能对外周血中非抗体依赖的循环肿瘤细胞进行高效地捕获，并保留其生物活性。可以作为肿瘤液体活检行业的技术基础，为人类的健康检测、肿瘤检测及预后评估提供了更快速、便捷、高效、无副作用的方法。

4 经济效果

本标准的制定，将填补国内外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法的空白，有助于产业在CTC检测方面作出科学、严格、规范的依据，相关检验机构开展CTC检测工作提供技术参考。通过规范检测技术，可科学、稳定、高效CTC，有效提高了CTC的捕获率和活性，提升了CTC的检测质量水平，为支撑CTC检测等下游技术提供基础保障，有助于推动CTC检测技术在肿瘤的体外早期诊断、耐药性监测，判断预后及生存分析，检测肿瘤复发、评价药物疗效以辅助治疗决策及调整治疗方案等领域的临床普及与发展。促进该创新检测方法在临床诊疗中的推广应用和个体化医疗的发展进程，为人类的健康检测、肿瘤检测及预后评估提供支撑。

5 采用国际标准的程度及水平的简要说明

经查新，暂未见有关于 CTC 检测技术相关的推荐性国家标准、推荐性行业标准。相关的团体标准有：T/SDHCST 004—2019 CTCs 检测会诊中心规章制度；T/SDHCST 003—2019 CTCs 检测制备中心实验室规章制度；T/SDHCST 001—2018 CTCs 免疫检测技术规程。

国际标准和国外先进标准：经查新未见有同类国际及国外先进标准。目前，美国强生公司针对的 Cell Search 系统（循环肿瘤细胞检测系统），提出了一套针对该系统产品（检测试剂盒）CTC 提出说明书，该方法的捕获约为 5 个/7.5ml，且只能检测 CTC 15 个分型中的一种。

中国临床肿瘤学会（CSCO）乳腺癌诊疗指南（2019 年版）、原发性肝癌诊疗规范（2019 年版）、肝细胞癌生物标志物检测及应用专家共识、循环肿瘤细胞检测在结直肠癌中的应用专家共识（2018）、液体活检在临床肿瘤诊疗应用和医学检验实践中的专家共识等多项肿瘤诊疗指南和专家共识也纳入了 CTC 在肿瘤疗效评价和预后评估中的应用。

本标准将研究建立我国第一份“外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法”，标

准将填补我国外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测技术的空白,为 CTC 检测产业及下游产业提供技术支撑和质量保证。

本标准制定过程中将参考 Cell Search 系统提出的检测方法,并结合标准提出单位及业界的先进检测技术,研究制定本标准过程还将计划参考和规范性引用参考了《GB 19489 实验室生物安全通用要求国家标准》。

6 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

本标准没有采用国际标准和国外先进标准。

本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

7 重大分歧意见的处理经过及依据

无。

8 其他给予说明的事项

无。

致慧医疗科技（上海）有限公司

2023年03月10日