

非小细胞肺癌细胞学标本上清液驱动基因规范化检测指南(2023年版)

中华医学会病理学分会工作组 北京病理学会工作组

通信作者: 刘东戈, 国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院 北京医院病理科, 北京 100730, Email: 13661275182@163.com; 石远凯, 国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院内科 抗肿瘤分子靶向药物临床研究北京市重点实验室, 北京 100021, Email: syuankai@cicams.ac.cn; 梁智勇, 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院病理科, 北京 100730, Email: liangzhiyong1220@yahoo.com

【摘要】非小细胞肺癌(NSCLC)靶向治疗药物的选择依据驱动基因检测结果,细胞学标本是NSCLC驱动基因检测的重要标本类型,而建立在病理评估基础上的细胞学标本上清液游离核酸检测,其准确性与肿瘤组织标本接近,但实验室内及实验室间检测标本的制备方法、检测方法和质量控制措施等均需要进一步统一和规范,故此制定NSCLC细胞学标本上清液驱动基因规范化检测指南,并在驱动基因检测的适用范围、标本类型、细胞学标本上清液制备流程和检测方法推荐等方面达成共识,规范并推动细胞学标本上清液驱动基因检测工作,完善NSCLC驱动基因检测临床实践。

【关键词】非小细胞肺癌;指南;细胞学标本上清液;驱动基因;液体活检

基金项目:中央高水平医院临床科研业务费资助(BJ-2022-077)

DOI: 10.13455/j.cnki.cjcor.113494-20231022-0157

Guideline for standardized driver genes detection of cytology specimen supernatants in non-small cell lung cancer (version 2023)

Working Group of Chinese Society of Pathology, Working Group of Beijing Society of Pathology

Corresponding author: Liu Dongge, Department of Pathology, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Beijing, 100730, China, Email: 13661275182@163.com; Shi Yuankai, Department of Medical Oncology, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing Key Laboratory of Clinical Study on Anticancer Molecular Targeted Drugs, Beijing 100021, China, Email: syuankai@cicams.ac.cn; Liang Zhiyong, Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China, Email: liangzhiyong1220@yahoo.com

【Abstract】 Targeted therapeutic strategy options are depended on the driver genes detection, and cytology is one of important specimen for genomic profiling in non-small cell lung cancer (NSCLC). Accumulating evidence suggests, based on pathological evaluation, that the accuracy of detecting cell-free nucleic acid from cytology specimen supernatants is similar to that of tumor tissue specimen. However, preparation of specimen, method of detection and quality control, etc. are inconsistent and need to be further unified and standardized. Therefore, guideline for standardized driver genes detection of cytology specimen supernatants in NSCLC is developed, and consensuses including clinical applications, specimen types, preparation procedures for cytology specimen supernatants, detection method choices, etc. have been reached in driver genes detecting for NSCLC. The purpose

of this guideline is to standardize and promote driver genes detecting in cytology specimen supernatants and improve the clinical practice in genotyping for NSCLC.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; Guideline; Cytology specimen supernatants; Driver gene; Liquid biopsy

Fund program: National High Level Hospital Clinical Research Funding (BJ-2022-077)

DOI: 10.13455/j.cnki.cjcor.113494-20231022-0157

肺癌在世界范围内死亡率居第1位,发病率居第2位,中国调查数据显示肺癌发病率和死亡率均居第1位^[1-2]。肺癌根据组织学类型可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),其中NSCLC占比为85%。国内外肿瘤临床诊疗指南均推荐,在诊断NSCLC后需进行驱动基因检测。

中国NSCLC患者携带驱动基因变异比例超过70%,进行驱动基因检测的临床需求大^[3]。传统驱动基因检测所需的标本类型包括手术切除、活检和细胞学标本,“液体活检”技术建立后,外周血也成为可进行驱动基因检测的标本之一,但因针对外周血进行游离DNA(cell free DNA, cfDNA)检测灵敏度低(70%)等问题,仅被认为是补充检测标本^[4]。

细胞学标本是NSCLC进行病理诊断及分子检测的重要标本类型,随着“液体活检”技术的进一步成熟,已有一定数量研究的结果证实,应用细胞学标本的无细胞上清液(以下统称细胞学标本上清液)可进行NSCLC驱动基因检测,并且经过病理评估,细胞学标本上清液cfDNA检测的灵敏度与肿瘤组织标本接近^[5-8]。NSCLC细胞学标本上清液类型多样,基本为无创或微创操作可获得的标本,标本获取容易,且检测准确率和灵敏度远高于外周血标本,具有良好的临床应用价值,是一种值得推广的临床检测标本。但由于针对NSCLC细胞学标本上清液的驱动基因检测,目前在临床开展尚不广泛且缺乏规范,实验室内及实验室间检测标本的制备方法、检测方法和质量控制措施均需要进一步统一和规范,故制定本指南,为规范并推动细胞学标本上清液分子检测工作,更好地完成NSCLC驱动基因检测临床实践提供参考。

一、NSCLC细胞学标本上清液驱动基因检测的意义

既往已经发表的NSCLC诊疗指南及不同驱动基因检测的共识,均对推动NSCLC分子检测规范化起到了不可或缺的作用。2023年第2版美国国立

综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南^[9]把推荐检测基因的数量增加至9种,包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR, I类)、间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK, I类)、Kirsten鼠肉瘤病毒基因同系物(Kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS)、v-ROS鸟类UR2肉瘤病毒致癌基因同源物1(v-ROS avian UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1, ROS1)、快速加速纤维肉瘤同源体B(rapidly accelerated fibrosarcoma homolog B, BRAF)、神经营养性原肌球蛋白相关激酶1/2/3(neurotrophic tropomyosin-related kinase 1/2/3, NTRK1/2/3)、间质上皮转换因子(mesenchymal epithelial transition factor, MET)、转染重排(rearranged during transfection, RET)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)基因,在推荐用于检测的标本类型中,除了肿瘤组织和细胞学标本外,由于外周血检测的灵敏度问题(假阴性率约30%),外周血检测cfDNA仍然强调仅在特定的临床情况下应用,包括患者不适合进行有创组织活检和获取组织量不足以进行分子检测或所有推荐分子靶标的检测等^[10]。

中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)NSCLC指南^[11]推荐检测基因根据患者的临床分期而有所不同,可手术切除II~III期非鳞NSCLC术后检测EGFR基因突变以指导辅助治疗;不可手术切除III~IV期非鳞NSCLC, I级推荐进行EGFR和BRAF基因突变, ALK、ROS1、RET和NTRK融合基因及MET基因14外显子跳跃突变检测,而KRAS突变、HER-2扩增/突变和MET扩增或过表达为II级推荐检测。CSCO指南针对外周血循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)检测的意见与NCCN指南相同。

2018年美国病理医师学会(College of American Pathologists, CAP)、国际肺癌研究会

(International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC)和分子病理学会(Association for Molecular Pathology, AMP)^[12]发表的指南中,关于NSCLC患者驱动基因检测标本选择的专家意见与NCCN及CSCO指南一致。

综上所述,国内外重要NSCLC临床诊疗指南均规定,在明确病理诊断的前提下,NSCLC患者应使用手术切除、活检组织学或细胞学标本完成驱动基因检测,并且对外周血标本的临床应用场景进行了限定。近年来,国内外相关研究及NSCLC驱动基因检测的专家共识中,将细胞学标本上清液和外周血共同归属于“液体活检”标本,并提出细胞学标本上清液的检测效能可能优于外周血标本,但目前尚缺乏阐述细胞学标本上清液驱动基因检测意义和流程的临床共识及指南^[13]。

二、细胞学标本上清液驱动基因检测的适用范围

主要问题:NSCLC细胞学标本上清液驱动基因检测的临床应用场景?

专家共识:获取细胞学标本后,首先需进行病理评估。在制备细胞学涂片和细胞学蜡块的同时留取细胞学标本上清液。细胞病理学诊断为NSCLC后,应对细胞学标本中的肿瘤细胞比例进行评估,当肿瘤细胞比例 $\geq 10\%$ 时,选择细胞学涂片或细胞学蜡块进行驱动基因检测;当肿瘤细胞比例 $< 10\%$ 时,建议应用细胞学标本上清液进行驱动基因检测。

强烈推荐:在病理评估前提下,低肿瘤细胞比例标本(肿瘤细胞比例 $< 10\%$),包括胸腔积液(胸腔积液、心包积液和腹腔积液)和肺泡灌洗液等,强烈推荐应用无细胞标本上清液进行驱动基因检测。

推荐:在病理评估前提下,(1)标本中找到肿瘤细胞的痰液和脑脊液推荐应用细胞学标本上清液进行驱动基因检测;(2)低肿瘤细胞比例细针穿刺及粗针穿刺标本(肿瘤细胞比例 $< 10\%$)推荐应用穿刺细胞学悬液标本上清液进行驱动基因检测。

证据列举:基于既往发表相关研究的结果,本指南推荐获取细胞学标本后,首先进行病理评估,确定病理诊断及肿瘤来源,细胞病理学诊断名称需参照第5版世界卫生组织胸部肿瘤分类,

包括来源于肺的腺癌、鳞癌、含腺癌成分的癌及非小细胞癌-非特指型(non-small cell cancer-not otherwise specified, NSCC-NOS)等。细胞病理学评估的内容除病理学诊断外,需包括肿瘤细胞比例评价,并根据肿瘤细胞比例选择应用细胞学蜡块或细胞学标本上清液进行驱动基因检测。

研究显示,采用肿瘤标本进行驱动基因检测时,肿瘤细胞比例对于检测结果有较大影响,已发表的驱动基因检测共识指出,二代测序(next generation sequencing, NGS)方法对肿瘤细胞比例的要求为 $\geq 20\%$,而非NGS方法,包括多基因联合检测的扩增阻滞突变系统聚合酶链式反应(amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction, ARMS-PCR)和液滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)等要求肿瘤细胞比例 $\geq 10\%$ ^[13-16]。但采用细胞学标本上清液检测,肿瘤细胞比例对检测结果的影响不大^[17]。本指南推荐细胞学标本中找到肿瘤细胞,且比例 $< 10\%$,选择细胞学标本上清液进行驱动基因检测。

需要指出的是通过病理评估确定病理诊断,进而应用细胞学标本上清液进行分子检测,是细胞学标本上清液区别于外周血标本分子检测的优势所在,即为“具有可检测前评估性”。研究显示,经病理评估后,找到肿瘤细胞的细胞学标本上清液驱动基因检测的灵敏度远高外周血标本,接近肿瘤组织标本^[18-20]。

三、适合应用细胞学标本上清液进行驱动基因检测的标本类型

主要问题:可以应用细胞学标本上清液进行分子检测的细胞学标本类型?

专家共识:在病理评估前提下,进行细胞学标本上清液分子检测的合适的细胞学标本类型包括胸腔积液(胸腔积液、心包积液和腹腔积液)、脑脊液、肺泡灌洗液、痰液和穿刺细胞学悬液,按照标准化流程制备细胞学标本上清液,在保护上清液中游离核酸质量的基础之上,进行驱动基因检测。

强烈推荐:胸腔积液标本(胸腔积液、心包积液和腹腔积液)细胞学标本上清液中游离核酸质量较好,强烈推荐在确定的临床应用场景下(肿瘤细胞比例 $< 10\%$),选择细胞学标本上清液进行多基因驱动基因检测。

推荐:在病理评估后,脑脊液、肺泡灌洗液、痰液和穿刺细胞学标本中找到癌细胞,推荐应用细胞学标本上清液游离核酸进行驱动基因检测。

证据列举:既往报道应用细胞学标本上清液进行驱动基因检测的标本类型包括胸腔积液(胸腔积液、心包积液和腹腔积液)、脑脊液、肺泡灌洗液、痰液和穿刺细胞学悬液等,研究结果以胸腔积液类最为丰富,标本类型以恶性胸腔积液证据积累最多。在早期的文献中多数是针对EGFR单基因检测,随着驱动基因检测数量的不断增加,基于NGS的检测方法被更多地应用于细胞学标本上清液检测^[20-26]。将细胞学标本上清液与细胞沉淀和外周血检测的结果进行比较,结果显示,细胞学标本上清液在检测cfDNA方面的灵敏度和准确率均存在显著优势^[27-31]。有研究结果显示,其他类型标本包括脑脊液、肺泡灌洗液、痰液和穿刺细胞学悬液标本在检测cfDNA(无论是EGFR单基因,还是多基因)方面的可质控性、可行性和准确性方面均可满足临床检测要求^[6-8, 32-33]。

尽管细胞学标本上清液中cfDNA在NSCLC驱动基因检测中有较好表现,但对于融合类结构变异(structure variation, SV)仍然存在检测灵敏度低的缺点,所以有研究者提取恶性胸腔积液上清液中cfRNA,在RNA水平上进行融合类SV检测,该类研究目前主要针对恶性胸腔积液标本上清液进行,并可能进一步扩展到其他细胞学标本类型,成为未来细胞学标本上清液检测发展的方向^[5, 34]。

四、不同类型的细胞学标本上清液制备流程

主要问题:不同类型的细胞学标本上清液制备流程?

专家共识:细胞学标本上清液制备需在满足病理诊断的前提下进行,应在制备细胞学涂片和细胞学蜡块的同时留取细胞学标本上清液。针对不同细胞学标本上清液的制备,需以稳定获得足够量游离核酸应用于驱动基因检测为目的,需尽可能避免使用甲醛、乙酸等可能破坏游离核酸的溶液,以免降低细胞学标本上清液中游离核酸溶解度及质量。痰液标本上清液制备过程中化痰处理,需采用无甲醛的试剂。裂解红细胞处理过程需在留取细胞学标本上清液后进行。

强烈推荐:根据细胞学标本类型,强烈推荐

采用不同的细胞学标本上清液制备流程,分为3类。(1)胸腔积液(胸腔积液、心包积液和腹腔积液)和脑脊液标本;(2)痰液和肺泡灌洗液标本;(3)穿刺细胞学悬液标本(细针穿刺和粗针穿刺)。具体制备流程见附件1及图1。

推荐:在细胞学标本上清液制备过程中,推荐应对cfRNA进行保护,实现“cfDNA & cfRNA双检”的分子检测策略。

证据列举:传统细胞学标本前期处理的目的是为制备细胞学涂片或细胞学蜡块,以便进行细胞学病理形态学诊断。前期处理过程包括标本固定、黏液去除和裂解红细胞等过程,而应用细胞学标本上清液进行分子检测时,应在细胞学制片和蜡块制备之前,收集细胞学标本上清液,用于驱动基因检测。

既往研究结果显示,含有甲醛的细胞固定液以及乙酸等裂解红细胞试剂可能使细胞学标本上清液中游离核酸质量受到影响,从而降低细胞学标本上清液驱动基因检测灵敏度^[8],而标本中含有的红细胞并不影响cfDNA的质量及检测准确性^[17]。细胞学标本上清液制备需在满足病理诊断前提下进行,因此本指南推荐应在制备细胞学涂片和细胞学蜡块的同时留取细胞学标本上清液,痰细胞学标本上清液制备过程中需化痰处理,应采用无甲醛的试剂^[8],其他类型的细胞学标本制片时如需裂解红细胞应在留取细胞学标本上清液后进行。

五、细胞学标本上清液驱动基因检测技术推荐

主要问题:检测细胞学标本上清液驱动基因的技术?

专家共识:适用于外周血cfDNA驱动基因检测的方法均可用于细胞学标本上清液驱动基因检测。需强调,实验室采用的检测技术须经验证,确定其检测效能,并通过检测准确性评估后方可应用于临床标本检测。

强烈推荐:具有开展NGS技术能力的实验室,强烈推荐应用NGS技术进行细胞学标本上清液cfDNA驱动基因检测,检测过程须进行严格检测前、检测中和检测后质量控制。NGS下机数据质控需达到样本测序数据Q30 \geq 80%,覆盖度 \geq 95%,样本热点测序数据覆盖深度 \geq 1550 \times 的比例 \geq 90%。

推荐:在不具有开展NGS技术的实验室,推

荐采用灵敏度高的PCR技术进行细胞学标本上清液cfDNA单基因或多基因驱动基因检测,如ARMS-PCR、SuperARMS-PCR和ddPCR,检测灵敏度要求最低检测限(limit of detection, LOD) \leq 0.2%。推荐在有效保护cfRNA基础之上,进行cfDNA和cfRNA双提,应用多基因联检试剂盒,同时进行cfDNA水平单核苷酸变异/插入缺失(single nucleotide variant / insertion-deletion, SNV/Indel),和cfRNA水平融合类SV检测,注意检测前须对cfRNA浓度和质量进行控制。

证据列举:既往发表的相关文章中,多数选择NGS方法在cfDNA水平上进行多基因驱动基因检测,采用的NGS检测所包含的基因数量从数个到数百个不等^[17,21,35-36]。从检测结果分析上,SNV/Indel类基因变异检测的灵敏度和特异度均较高,与配对肿瘤组织标本接近,但融合类SV的检测灵敏度存在一定局限性。一项检测痰液的研究结果显示,融合类SV的检测灵敏度为50%左右^[7]。未来探索cfDNA和cfRNA双提取,同时进行NGS方法“cfDNA & cfRNA双检”是提高细胞学标本上清液融合类SV检测灵敏度的方向。

除NGS外,仍有研究应用ARMS-PCR和ddPCR多基因联检方法进行细胞学标本上清液多基因联合检测,研究均基于cfDNA和cfRNA双提取。SNV/Indel基因变异应用cfDNA检测,而融合类SV应用cfRNA检测,采用此种检测策略,ALK融合基因检测的灵敏度可达100%^[5,29,34]。

cfRNA的浓度和完整性对后续检测成功率和检测方法选择至关重要,提取游离核酸前,需对细胞学标本上清液的cfRNA进行保护,cfRNA保护剂已有相应市场化产品。获得cfRNA后常规进行逆转录,驱动基因检测前需对所提取的cfRNA进行质控。研究结果显示,推荐实时定量PCR(real time quantitative PCR, RT-qPCR)方法检测内参基因,循环阈值(cycle threshold, CT) \leq 23.5为保护成功,或应用Agilent 2100生物分析仪对cfRNA完整性进行测定。

六、“cfDNA & cfRNA双检”在细胞学标本上清液驱动基因检测中存在的一些问题

由于NSCLC驱动基因检测涉及的基因数量和基因变异的类型均较多,包括了SNV、SV、剪切点变异和拷贝数变异(copy number variation, CNV)等,所以不同检测方法可能均有不可回避

的局限性,比如DNA水平的NGS方法可能对SV类及CNV类变异检测的准确性在一定程度上存在缺陷,而“cfDNA & cfRNA双检”是目前认为比较理想的检测策略。

基于既往研究和临床检测的结果,尽管恶性胸腔积液标本中存在质量较好的cfRNA,可以实现应用cfDNA进行SNV/indel类检测,而同时应用cfRNA进行SV类检测,所谓“cfDNA & cfRNA双检”的检测方案。但细胞学标本上清液中cfRNA提取的量、稳定性和完整性,仍限制着该项技术应用于常规临床检测。检测前针对细胞学标本上清液cfRNA保护液配方的研发,可能是解决该问题的关键。

有研究结果显示,应用检测灵敏度高的多基因联合检测(RT-qPCR)和ddPCR技术,可以较好完成“cfDNA & cfRNA双检”工作,而“cfDNA & cfRNA双检”的NGS技术仍需进一步充分验证。

尽管基因变异在细胞学标本上清液检测的灵敏度和准确率均较高,但针对CNV和其他相关指标[如肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)和微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)等]的检测方法和判读标准还需进一步研究。

七、不同类型细胞学标本上清液驱动基因检测的流程推荐

将细胞学标本上清液分为3类:(1)胸腔积液(胸腔积液、心包积液和腹腔积液)和脑脊液;(2)痰液和肺泡灌洗液;(3)穿刺细胞学悬液(细针穿刺和粗针穿刺)。3种标本均需制备细胞学标本上清液、细胞学涂片或细胞学蜡块进行病理质控,确定为NSCLC细胞病理诊断后,评估肿瘤细胞比例,对肿瘤细胞比例 $<$ 10%的细胞学标本,取10 ml制备的细胞学标本上清液,5 ml用于提取cfDNA,可采用DNA水平的NGS方法进行多基因检测,或采用ARMS-PCR和SuperARMS-PCR进行单基因检测。另5 ml加入cfRNA保护液后,用于提取cfRNA,进而采用“cfDNA & cfRNA双检”方案,选择ARMS-PCR或ddPCR进行多基因联检方法进行驱动基因检测(图1)。

八、报告内容

专家共识:应使用经过有关权威机构认证后的试剂进行的驱动基因检测,应出具分子病理检测报告。细胞学标本上清液驱动基因检测的分子病理报告的内容包括:(1)患者基本信息;(2)病理诊断;(3)检测标本情况。其中病理质控信息须明确标注,

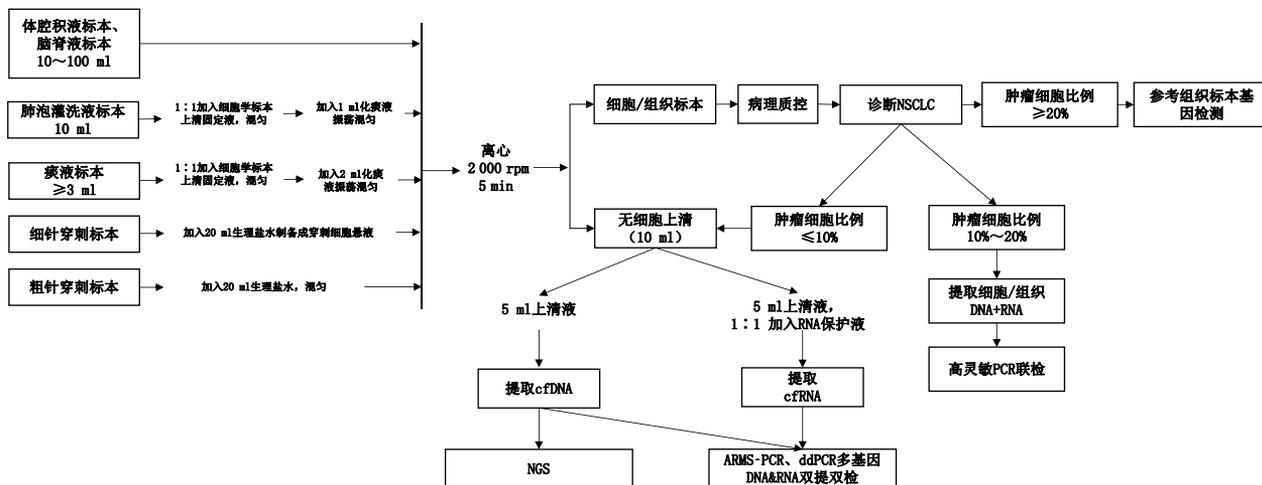


图1 NSCLC细胞学标本上清液驱动基因检测流程

注: NSCLC: 非小细胞肺癌; cfDNA: 细胞游离DNA; cfRNA: 细胞游离RNA; NGS: 二代测序; ARMS-PCR: 扩增阻滞突变系统聚合酶链式反应; ddPCR: 液滴数字聚合酶链式反应

包括细胞病理诊断、肿瘤细胞比例;(4)检测方法选择、核酸提取及检测试剂盒、简单介绍检测方法和试剂盒所涵盖的检测基因;(5)检测结果。准确报告检测基因变异情况,包括变异形式;(6)对检测结果的简单解读;(7)免责声明。

九、细胞学标本上清液驱动基因检测目前存在的问题与未来展望

细胞学标本上清液驱动基因检测需要基于病理评估前提完成,适用于低肿瘤细胞比例细胞学标本(肿瘤细胞比例<math>< 10\%</math>)。国内外研究结果均显示,应用该类标本检测驱动基因的灵敏度显著优于外周血标本,与肿瘤组织标本接近,同时也避免了外周血标本检测前无法进行病理质控的缺陷,具有良好的临床应用前景。

尽管有诸多优势,但应用细胞学标本上清液进行驱动基因检测仍然存在一定的问题,首先目前检测的开展尚不广泛,操作过程无标准化流程;其次经权威机构认证可应用于开展该技术的检测试剂并不多,开展该技术需要做严格的实验室自建技术验证工作。

未来应进一步提高对开展细胞学标本上清液驱动基因检测意义的认识,逐步建立并完善相关的规范化操作流程与质量控制标准,不断研发经相关机构认证的可应用于细胞学标本上清液分子检测的高质量试剂,推动细胞学标本上清液分子检测更多、更广泛地开展,为广大肿瘤患者的精准治疗提供更大的支持。

免责声明 本指南依据现有医学证据及实践经验由专家组成员共同讨论形成,目的是推动细胞学标本上清液分子检测工作。未来在新的临床证据补充指南内容的前提下,可对指南内容进行修改和更新。进行实验室自建检测(laboratory developed test, LDT),应本着政策许可、自愿和对检测效能充分验证原则,对检测结果负责并具有完全解释权。本指南发表属医学领域专家意见,不涉及任何商业目的及行为。

参加本指南制定的专家(按姓氏汉语拼音排序):车南颖(首都医科大学附属北京胸科医院病理科);陈东(首都医科大学附属北京安贞医院病理科);陈光勇(首都医科大学附属北京友谊医院病理科);陈岚(国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院 北京医院病理科);韩昱晨(上海市胸科医院病理科);何磊(国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院 北京医院病理科);何淑蓉(国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院 北京医院病理科);金木兰(首都医科大学附属北京朝阳医院病理科);李琳(国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院 北京医院肿瘤内科);李晓光(国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院 北京医院肿瘤微创治疗中心);梁智勇(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院病理科);林冬梅(北京大学肿瘤医院病理科);刘东戈(国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院 北京医院病理科);刘志艳(上海市第六人民医院病

理科);师晓华(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科);石怀银(中国人民解放军总医院第一医学中心病理科);石远凯(国家癌症中心国家肿瘤临床医学研究中心中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院内科);滕梁红(首都医科大学附属宣武医院病理科);王征(国家老年医学中心中国医学科学院老年医学研究院北京医院病理科);吴焕文(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科);武春燕(上海市肺科医院病理科);武莎斐(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科);许小毛(国家老年医学中心中国医学科学院老年医学研究院北京医院呼吸与危重症医学科);应建明(国家癌症中心国家肿瘤临床医学研究中心中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科);曾瑄(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科);钟定荣(中日友好医院病理科);周晓燕(复旦大学附属肿瘤医院病理科)

执笔人:王征(国家老年医学中心中国医学科学院老年医学研究院北京医院病理科)、应建明(国家癌症中心国家肿瘤临床医学研究中心中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科)、周晓燕(复旦大学附属肿瘤医院病理科)、何淑蓉(国家老年医学中心中国医学科学院老年医学研究院北京医院病理科)、何磊(国家老年医学中心中国医学科学院老年医学研究院北京医院病理科)、刘东戈(国家老年医学中心中国医学科学院老年医学研究院北京医院病理科)

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] Zheng R, Zhang S, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. Journal of the National Cancer Center, 2022, 2(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.jncc.2022.02.002.
- [3] Tan AC, Tan DSW. Targeted therapies for lung cancer patients with oncogenic driver molecular alterations[J]. J Clin Oncol, 2022, 40(6): 611-625. DOI: 10.1200/JCO.21.01626.
- [4] 中华医学会病理学分会, 国家病理质控中心, 中华医学会肿瘤学分会肺癌学组, 等. 非小细胞肺癌分子病理检测临床实践指南(2021版)[J]. 中华病理学杂志, 2021, 50(4): 323-332. DOI: 10.3760/ema.j.cn112151-20201220-00945.
- [5] Chen X, Li K, Liu Z, et al. Multigene PCR using both cfDNA and cfRNA in the supernatant of pleural effusion achieves accurate and rapid detection of mutations and fusions of driver genes in patients with advanced NSCLC[J]. Cancer Med, 2021, 10(7): 2286-2292. DOI: 10.1002/cam4.3769.
- [6] Wang Z, Li X, Zhang L, et al. Sputum cell-free DNA: valued surrogate sample for the detection of EGFR exon 20 p.T790M mutation in patients with advanced lung adenocarcinoma and acquired resistance to EGFR-TKIs[J]. Cancer Med, 2021, 10(10): 3323-3331. DOI: 10.1002/cam4.3817.
- [7] Wang Z, Li L, Wang Y, et al. Sputum cell-free DNA for detection of alterations of multiple driver genes in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Cytopathol, 2023, 131(2): 110-116. DOI: 10.1002/ncy.22644.
- [8] Wang Z, Zhang L, Li L, et al. Sputum cell-free DNA: valued surrogate sample for detection of EGFR mutation in patients with advanced lung adenocarcinoma[J]. J Mol Diagn, 2020, 22(7): 934-942. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.04.208.
- [9] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Non-Small Cell Lung Cancer. Version 2.2023. [2023-02-17]. <https://www.nccn.org>.
- [10] Sugimoto A, Matsumoto S, Udagawa H, et al. A large-scale prospective concordance study of plasma- and tissue-based next-generation targeted sequencing for advanced non-small cell lung cancer (LC-SCRUM-Liquid)[J]. Clin Cancer Res, 2023, 29(8): 1506-1514. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1749.
- [11] 中国临床肿瘤学指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)非小细胞肺癌诊疗指南2023. 北京: 人民卫生出版社, 2023.
- [12] Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(9): 911-919. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.7293.
- [13] 中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌专业委员会. 二代测序技术在NSCLC中的临床应用中国专家共识(2020版)[J]. 中国肺癌杂志, 2020, 23(9): 741-761. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.101.45.
- [14] Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology

- panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists[J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(3): 341-365. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.01.011.
- [15] Malapelle U, de Luca C, Vigliar E, et al. EGFR mutation detection on routine cytological smears of non-small cell lung cancer by digital PCR: a validation study[J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(5): 454-457. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203429.
- [16] Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Non-small cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: number 2 in the series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza[J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26(144): 170007. DOI: 10.1183/16000617.0007-2017.
- [17] Xiang C, Huo M, Ma S, et al. Molecular profiling for supernatants and matched cell pellets of pleural effusions in non-small-cell lung cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(4): 513-522. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.01.011.
- [18] Liu X, Lu Y, Zhu G, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(12): 1065-1069. DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201728.
- [19] Son SM, Woo CG, Han HS, et al. Analysis of EGFR mutation status in malignant pleural effusion and plasma from patients with advanced lung adenocarcinoma[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 58(9): 1547-1555. DOI: 10.1515/cclm-2019-1139.
- [20] Tong L, Ding N, Tong X, et al. Tumor-derived DNA from pleural effusion supernatant as a promising alternative to tumor tissue in genomic profiling of advanced lung cancer[J]. *Theranostics*, 2019, 9(19): 5532-5541. DOI: 10.7150/thno.34070.
- [21] Yu Y, Qian J, Shen L, et al. Distinct profile of cell-free DNA in malignant pleural effusion of non-small cell lung cancer and its impact on clinical genetic testing[J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(6): 1510-1518. DOI: 10.7150/ijms.52306.
- [22] Patel A, Hissong E, Rosado L, et al. Next-generation sequencing of cell-free DNA extracted from pleural effusion supernatant: applications and challenges [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 662312. DOI: 10.3389/fmed.2021.662312.
- [23] de Kock R, Knoops C, Baselmans M, et al. Sensitive cell-free tumor DNA analysis in supernatant pleural effusions supports therapy selection and disease monitoring of lung cancer patients[J]. *Cancer Treat Res Commun*, 2021, 29: 100449. DOI: 10.1016/j.ctarc.2021.100449.
- [24] Zhang P, Wu X, Tang M, et al. Detection of EGFR gene mutation status from pleural effusions and other body fluid specimens in patients with lung adenocarcinoma [J]. *Thorac Cancer*, 2019, 10(12): 2218-2224. DOI: 10.1111/1759-7714.13201.
- [25] Lee KWC, Li MSC, Gai W, et al. Testing for EGFR variants in pleural and pericardial effusion cell-free DNA in patients with non-small cell lung cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2023, 9(2): 261-265. DOI: 10.1001/jamaoncol.2022.6109.
- [26] Yang SR, Mooney KL, Libiran P, et al. Targeted deep sequencing of cell-free DNA in serous body cavity fluids with malignant, suspicious, and benign cytology [J]. *Cancer Cytopathol*, 2020, 128(1): 43-56. DOI: 10.1002/cncy.22205.
- [27] Kawahara A, Fukumitsu C, Azuma K, et al. A combined test using both cell sediment and supernatant cell-free DNA in pleural effusion shows increased sensitivity in detecting activating EGFR mutation in lung cancer patients [J]. *Cytopathology*, 2018, 29(2): 150-155. DOI: 10.1111/cyt.12517.
- [28] Yang H, Cai L, Zhang Y, et al. Sensitive detection of EGFR mutations in cerebrospinal fluid from lung adenocarcinoma patients with brain metastases [J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(5): 558-563. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.04.008.
- [29] Suryavanshi M, Jaipuria J, Panigrahi MK, et al. CSF cell-free DNA EGFR testing using ddPCR holds promise over conventional modalities for diagnosing leptomeningeal involvement in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2020, 148: 33-39. DOI: 10.1016/j.lungcan.2020.07.034.
- [30] Hummelink K, Muller M, Linders TC, et al. Cell-free DNA in the supernatant of pleural effusion can be used to detect driver and resistance mutations, and can guide tyrosine kinase inhibitor treatment decisions[J]. *ERJ Open Res*, 2019, 5(1): 00016-02019. DOI: 10.1183/23120541.00016-2019.
- [31] Lee JS, Hur JY, Kim IA, et al. Liquid biopsy using the supernatant of a pleural effusion for EGFR genotyping in pulmonary adenocarcinoma patients: a comparison between cell-free DNA and extracellular vesicle-derived DNA[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1236. DOI: 10.1186/s12885-018-5138-3.
- [32] Guibert N, Tsukada H, Hwang DH, et al. Liquid biopsy of fine-needle aspiration supernatant for lung cancer genotyping [J]. *Lung Cancer*, 2018, 122: 72-75. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.05.024.

- [33] Nair VS, Hui AB, Chabon JJ, et al. Genomic profiling of bronchoalveolar lavage fluid in lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 (16) : 2838-2847. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-0554.
- [34] Chu M, Zhu Y, Hu J, et al. Detection of ALK gene rearrangement in cell-free RNA from lung cancer malignant pleural effusion [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 6124106. DOI: 10.1155/2020/6124106.
- [35] Wu Z, Yang Z, Li CS, et al. Differences in the genomic profiles of cell-free DNA between plasma, sputum, urine, and tumor tissue in advanced NSCLC [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(3): 910-919. DOI: 10.1002/cam4.1935.
- [36] Xie X, Wu J, Guo B, et al. Comprehensive characterization reveals sputum supernatant as a valuable alternative liquid biopsy for genome profiling in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 175. DOI: 10.1186/s12931-022-02097-4.
- (收稿日期:2023-10-22)

附件 1: 细胞学标本上清液制备流程

分为 3 类

(1) 体腔积液(包括胸腔积液、心包积液和腹腔积液)和脑脊液标本:取 10~100 ml 标本离心,离心条件为 2 000 rpm, 5 min, 留取上清液, -20℃ 冻存。如为血性标本, 裂解红细胞过程需在留取细胞学标本上清液后进行。

(2) 肺泡灌洗液和痰液标本:取肺泡灌洗液标本 10 ml, 1:1 加入细胞学标本固定液(要求无甲醛成分), 混匀, 再加入 1 ml 化痰液(0.5 mol/L 二硫苏糖醇), 化痰处理, 振荡混匀, 离心条件为 2 000 rpm, 5 min, 留取

上清液, -20℃ 冻存; 收集痰液标本 ≥ 3 ml, 1:1 加入细胞学标本固定液, 加入 2 ml 化痰液, 化痰处理, 振荡混匀, 观察化痰效果至充分化痰, 离心条件为 2 000 rpm, 5 min, 留取上清液, -20℃ 冻存。

(3) 穿刺细胞学悬液标本:将细针穿刺标本加入 20 ml 生理盐水中, 制备成穿刺细胞悬液, 离心条件为 2 000 rpm, 5 min, 留取上清液, -20℃ 冻存; 将粗针穿刺标本组织条加入 20 ml 生理盐水中, 混匀, 离心条件为 2 000 rpm, 5 min, 留取上清液, -20℃ 冻存。