

## CHẨN ĐOÁN ĐỘT BIẾN GEN EGFR TRONG UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ VỚI CÁC MẪU BỆNH PHẨM DỊCH KHOANG CƠ THỂ

Nguyễn Sơn Lam<sup>1\*</sup>

DOI: 10.38103/jcmhch.2021.74.12

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Dựa vào tính chất các mẫu dịch khoang cơ thể có hiện diện các mảnh DNA lơ lửng giúp thực hiện chẩn đoán đột biến EGFR. Từ nguyên lý này, chúng tôi thực hiện nghiên cứu với các mục tiêu sau: Khảo sát tỉ lệ dương tính đột biến EGFR trong các mẫu dịch khoang cơ thể; và khảo sát tỉ lệ chẩn đoán đột biến gen EGFR trong mẫu bệnh phẩm mô học đúc khối paraffin với mẫu dịch khoang cơ thể trên cùng một bệnh nhân.

**Phương pháp nghiên cứu:** Hồi cứu, thống kê mô tả cắt ngang. Các trường hợp ung thư phổi không tế bào nhỏ được chẩn đoán đột biến EGFR bằng mẫu bệnh phẩm đúc khối paraffine với Test EGFR Version 1 và mẫu bệnh phẩm dịch các khoang cơ thể (Dịch màng phổi, dịch màng tim, dịch màng bụng, dịch não tủy) với Test EGFR Version 2.

**Kết quả:** Có 117 ca bệnh trong nghiên cứu: Kết quả chẩn đoán đột biến gen EGFR trên mẫu mô học đúc khối paraffine: (+) 49 ca # 41,88%, tương đương với các thống kê ở trong nước và thế giới (Châu Á). Đa số vẫn là hai loại đột biến nhạy thuốc TKIs Exon 19 Deletion và Exon 21 L858R (53% và 23%). Kết quả chẩn đoán đột biến EGFR trên các mẫu dịch khoang cơ thể: Đa số mẫu dịch khoang cơ thể thực hiện chẩn đoán đột biến EGFR là dịch màng phổi (91 ca # 77,77%). Tỉ lệ phát hiện đột biến trong mẫu dịch màng phổi và dịch não tủy cao nhất (29,67% & 83,33%). So sánh tỉ lệ phát hiện đột biến EGFR trên mẫu dịch khoang cơ thể (35 /117 ca # 29,91%) với tỉ lệ phát hiện trên mẫu mô học thấp hơn có ý nghĩa thống kê (29,91% ↔ 41,88% với  $P = 0,0125$ ). So sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới cho thấy đa số các nghiên cứu cho kết quả cao hơn so với nghiên cứu tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch.

**Kết luận:** Khảo sát chẩn đoán đột biến EGFR trong dịch các khoang cơ thể, đặc biệt trong các mẫu dịch có quá ít tế bào ác tính, kết quả dương tính 29,91%. Tỉ lệ cao nhất trong dịch màng phổi và dịch não tủy. Tuy nhiên, khả năng phát hiện đột biến EGFR trong các dịch khoang cơ thể thấp hơn so với trên các bệnh phẩm mô học (29.91% < 41,88%). Và đồng tương đồng giữa hai loại bệnh phẩm này là 71,42%. Cần nâng cao kỹ thuật thực hiện chẩn đoán đột biến EGFR trong mẫu dịch khoang cơ thể với các phương pháp có độ nhạy cao hơn: ddPCR, NGS...

**Từ khóa:** Đột biến EGFR, dịch các khoang cơ thể, ung thư phổi, không tế bào nhỏ.

### ABSTRACT

#### DIAGNOSTIC EGFR GENE MUTATIONS IN NON SMALL CELL LUNG CANCER WITH SPECIMENS OF BODY CAVITY FLUIDS

Nguyen Son Lam<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Giải Phẫu Bệnh,  
BV. Phạm Ngọc Thạch, TP.HCM

- Ngày nhận bài (Received): 25/10/2021; Ngày phản biện (Revised): 14/11/2021;  
- Ngày đăng bài (Accepted): 28/11/2021  
- Người phản hồi (Corresponding author): Nguyễn Sơn Lam  
- Email: drnsl1963@gmail.com; SĐT: 0913148308

**Introduction:** Based on the nature of the body cavity fluid samples, there is the presence of suspended DNA fragments that help to make an EGFR mutation diagnosis. From this principle, we have conducted this research with the following objectives: Investigate the positive rate of EGFR mutations in body cavity fluid samples, and explore the diagnosis rate of EGFR gene mutations in paraffin block histology samples with body cavity fluid samples in the same patients.

**Methods:** In a retrospective study, cases of NSCLC were diagnosed with EGFR mutations by paraffin block histological specimens with Test EGFR Version 1 and body cavity fluid samples (pleural fluid, pericardial fluid, peritoneal fluid, cerebrospinal fluid) with Test EGFR Version 2.

**Results:** There are 117 cases in the research: Results of EGFR mutation diagnosis on paraffin block histology: (+) 49 cases # 41.88%, equivalent to statistics in Vietnam and the World (Asia). The majority are still two types of drug - sensitive mutants TKIs: Exon 19 Deletion and Exon 21 L858R (53% and 23%). Results of diagnosis of EGFR mutation in samples of body cavity fluids: Most samples of body cavity performing diagnosis of EGFR mutation were pleural fluid (91 cases # 77.77%). The highest rate of detection of mutations in pleural and cerebrospinal fluid samples (29.67% & 83.33%). Comparing the rate of detection of EGFR mutation in body fluid samples (35/117 cases # 29.91%) with the statistically lower rate of detection in histological samples (29.91% ↔ 41, 88% with  $P = 0.0125$ ). Compared with other studies in the world, most studies have higher results than those at Pham Ngoc Thach Hospital.

**Conclusion:** Survey on the diagnosis of EGFR mutations in body cavity fluid samples, especially in fluid samples with too few malignant cells, showed positive results of 29.91%. The highest percentage is in pleural fluid and cerebrospinal fluid. However, the ability to detect EGFR mutations in body cavity fluid samples was lower than in histological specimens (29.91% < 41.88%). And the similarity between these two samples is 71.42%. Therefore, it is necessary to improve the technique of performing EGFR mutation diagnosis in body cavity fluid samples with more sensitive methods: ddPCR, NGS...

**Key Words:** Non small cell lung cancer (NSCLC), Formalin - Fixed Paraffin - Embedded Tissue (FFPET), Body cavity fluids, Cell Free DNA, Cellular DNA.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ năm 2013 đến nay, Khoa Giải Phẫu Bệnh, bệnh viện Phạm Ngọc Thạch đã thực hiện được kỹ thuật chẩn đoán đột biến EGFR trong ung thư phổi không tế bào nhỏ bằng hệ thống cobas z 480 của Roche Ventana. Hằng năm, khoa thực hiện trên 1000 ca chẩn đoán đột biến EGFR với đủ các loại bệnh phẩm của phổi: mẫu mô học đúc khối parafin, mẫu tế bào và mẫu huyết tương (sinh thiết lỏng: Liquid Biopsy). Tuy nhiên, đôi với mẫu dịch các khoang cơ thể (Body Fluid: dịch màng phổi, dịch màng tim, dịch màng bụng, dịch não tủy) đôi khi số lượng tế bào ác tính quá ít < 100 tế bào. Điều này đưa đến tình huống không tách chiết được đủ lượng DNA để chạy phản ứng RealTime (Hệ thống sẽ báo lỗi "Invalid") [1, 2, 4].

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng mẫu dịch khoang cơ thể không có tế bào ác tính nhưng có các mảnh DNA lơ lửng trong các mẫu dịch để tách chiết và thực hiện phản ứng chẩn đoán đột biến EGFR. Từ nguyên lý này, chúng tôi thực hiện nghiên cứu với các mục tiêu sau: Khảo sát tỉ lệ dương tính

đột biến EGFR trong các mẫu dịch khoang cơ thể; và khảo sát tỉ lệ chẩn đoán đột biến gen EGFR trong mẫu bệnh phẩm mô học đúc khối parafin với mẫu dịch khoang cơ thể trên cùng một bệnh nhân.

### II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Phương pháp nghiên cứu:** Hồi cứu, thống kê mô tả cắt ngang.

**2.2. Đối tượng nghiên cứu:** Các trường hợp ung thư phổi không tế bào nhỏ tiến triển có chẩn đoán đột biến EGFR bằng mẫu bệnh phẩm đúc khối parafin và có mẫu bệnh phẩm dịch các khoang cơ thể (Dịch màng phổi, dịch màng tim, dịch màng bụng, dịch não tủy) trong năm 2019. Với các mẫu dịch không có tế bào ác tính hoặc có rất ít tế bào ác tính (< 10 tế bào ác tính/ 10 quang trường x 40)

**2.3. Kỹ thuật thực hiện chẩn đoán trong nghiên cứu**

Chẩn đoán đột biến EGFR trên mẫu bệnh phẩm mô học đúc khối parafin: dùng kỹ thuật RealTime

## Chẩn đoán đột biến gen EGFR trong ung thư phổi không tế bào nhỏ...

PCR trên hệ thống cobas z 480 Roche Ventana với Test Kit chẩn đoán Version 1 [5, 6, 10].

Đối với các loại bệnh phẩm dịch các khoang cơ thể, sẽ có hai phương án để thực hiện tách chiết DNA nhằm chẩn đoán đột biến EGFR như sau:

**Phương án 1:** Số lượng tế bào trong các dịch bệnh phẩm này nếu đủ nhiều (Khoảng > 100 tế bào) sau khi đã được xử trí bằng các kỹ thuật như: Ly tâm, Cytospin, Liquid Base, Cell Block... Các tế bào ác tính sẽ được tách ra và đưa vào tách chiết DNA để chẩn đoán, với Test Kit Version 1 như trên mẫu bệnh phẩm mô học [11, 14]. Đây là phương pháp thường được thực hiện chẩn đoán đột biến EGFR tại khoa Giải Phẫu Bệnh, bệnh viện Phạm Ngọc Thạch (Phương pháp xử lý mẫu bệnh phẩm tế bào học vừa kể không được sử dụng trong nghiên cứu này của chúng tôi).

**Phương án 2:** Khi trong các mẫu bệnh phẩm dịch các khoang cơ thể không có hiện diện của các tế bào ác tính hoặc quá ít tế bào ác tính (Chỉ có vài tế bào ác tính trong mẫu dịch). Khi đó, dựa trên nguyên lý các DNA tự do sẽ lơ lửng trong các mẫu dịch khoang cơ thể [1, 3, 4]. Từ những mảnh DNA tự do này sẽ được thu nhặt lại để chạy phản ứng RealTime PCR chẩn đoán đột biến EGFR. Mẫu dịch sẽ được lấy khoảng 10 ml, quay ly tâm để loại bỏ hết các tế bào viêm, chất cặn hay hồng cầu... và lấy lại 5ml dịch trong để tách chiết DNA [7]. Trên mẫu dịch trong này sẽ thực hiện quy trình chẩn đoán giống như thực hiện với mẫu huyết tương (Hình 3) [1, 6, 7, 8, 13, 14]. Đây là phương pháp xử lý mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này của

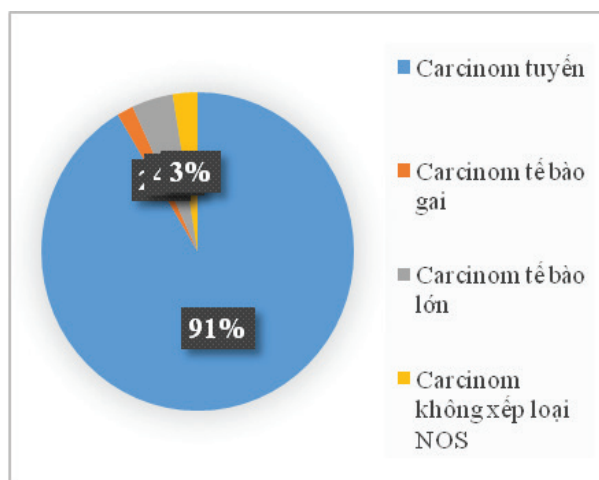
chúng tôi, với kỹ thuật RealTime PCR cũng trên hệ thống cobas z 480 Roche Ventana với Test Kit chẩn đoán Version 2.

### III. KẾT QUẢ

#### 3.1. Các số liệu chung

Tổng số ca thu nhận vào nghiên cứu: 117 ca ung thư phổi không tế bào nhỏ tiến triển có đủ tiêu chí thu nhận vào nghiên cứu trong năm 2019. Giới tính: Nam 47 ca # 40,17% - Nữ 70 ca # 59,83%. Tuổi trung bình:  $59,8 \pm 8,43$  tuổi

Phân phối loại mô học:

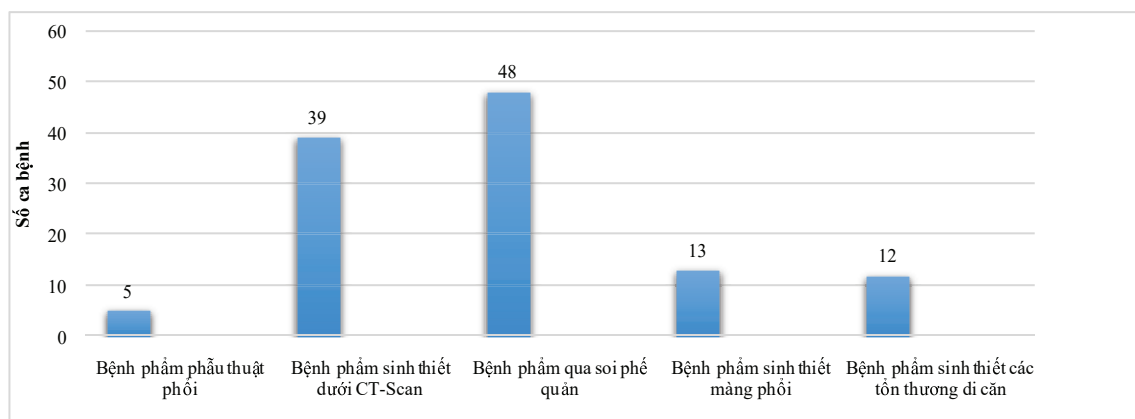


**Biểu đồ 1:** Phân phối các loại mô học ung thư phổi không tế bào nhỏ tiến triển trong năm 2019

Đa số loại mô học thực hiện chẩn đoán đột biến gen EGFR là loại carcinôm tuyến (107 ca # 91,45%), các loại khác chiếm tỉ lệ ít (10 ca # 8,55%).

#### 3.2. Chẩn đoán đột biến gen EGFR trên mẫu bệnh phẩm mô học

Các loại bệnh phẩm dùng trong chẩn đoán

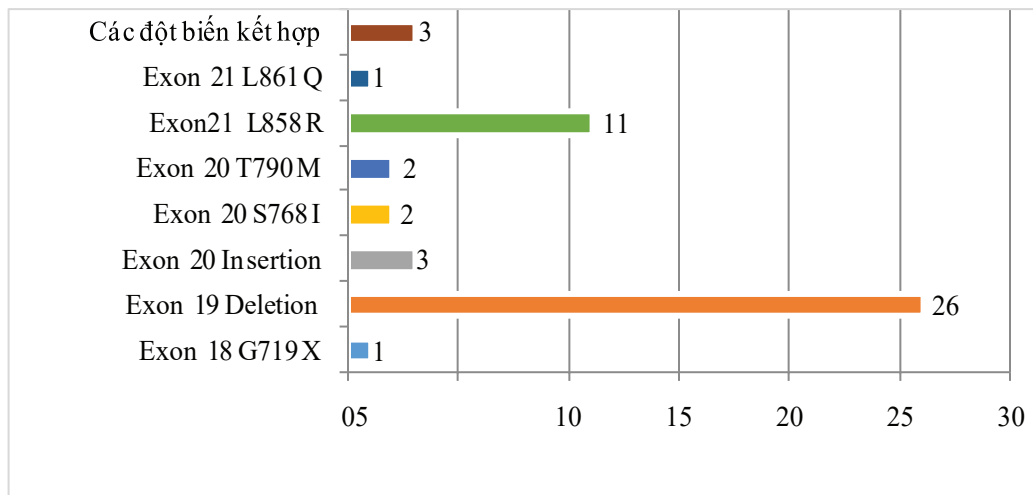


**Biểu đồ 2:** Phân phối các loại bệnh phẩm mô học chẩn đoán đột biến EGFR

## Bệnh viện Trung ương Huế

Đa số các loại ệnh phẩm mô học là loại sinh thiết qua soi phế quản (48 ca # 41,03%) và sinh thiết dưới hướng dẫn CT-Scan (39 ca # 33,33%)

Kết quả chẩn đoán đột biến gen EGFR trên mẫu bệnh phẩm mô học:

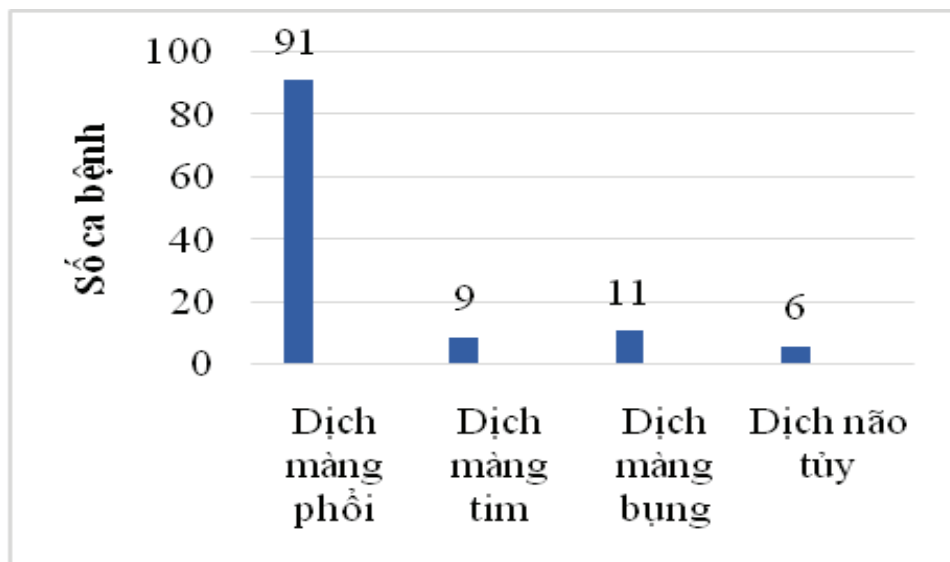


**Biểu đồ 3:** Phân phối các loại đột biến EGFR được chẩn đoán bằng mẫu bệnh phẩm mô học

Tỉ lệ phát hiện đột biến EGFR trong các bệnh phẩm mô học là 41,88% (49 ca). Hai loại đột biến gen EGFR nhạy thuốc nhắm trúng đích TKI đều chiếm đa số: Exon 19 Deletion (53%) và Exon 21 L858R (23%). Không có trường hợp nào không tách chiết đủ lượng DNA trên các bệnh phẩm mô học để thực hiện chẩn đoán đột biến EGFR.

### 3.3. Chẩn đoán đột biến EGFR với các mẫu dịch khoang cơ thể

Các loại dịch khoang cơ thể sử dụng để chẩn đoán:

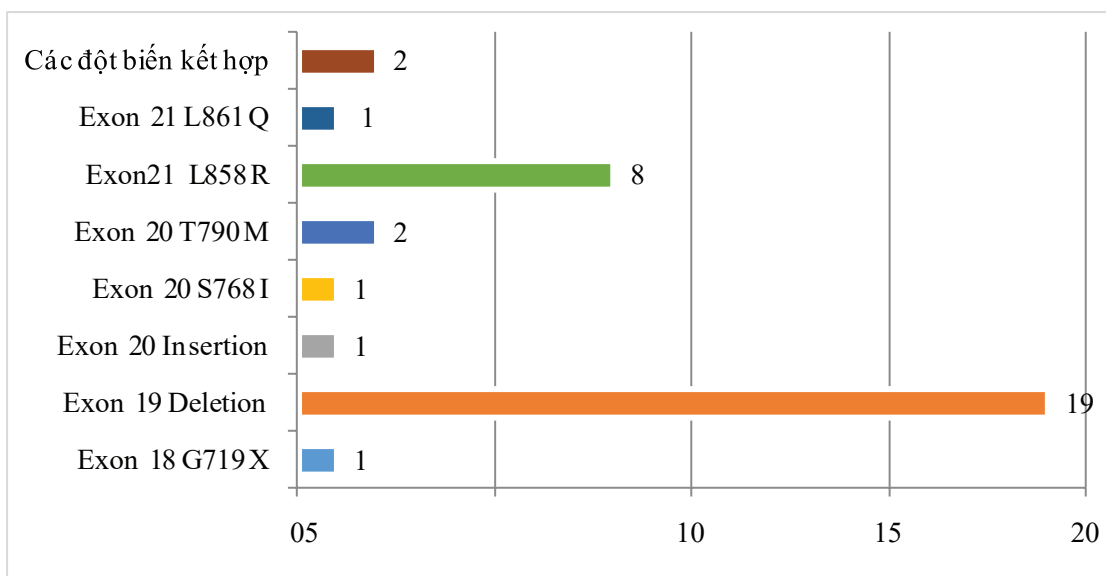


**Biểu đồ 4:** Phân phối các loại dịch khoang cơ thể chẩn đoán đột biến EGFR

Đa số loại dịch khoang cơ thể dùng trong nghiên cứu là dịch màng phổi (91 ca # 77,78%), còn lại là các loại khác (26 ca # 22,22%).

Kết quả chẩn đoán đột biến EGFR trên mẫu dịch khoang cơ thể:

## Chẩn đoán đột biến gen EGFR trong ung thư phổi không tế bào nhỏ...



**Biểu đồ 5:** Phân phối các loại đột biến EGFR chẩn đoán trên các mẫu dịch khoang cơ thể

Tỉ lệ phát hiện đột biến EGFR trong các dịch khoang cơ thể là 29,91% (35 ca). Hai loại đột biến gen EGFR nhạy thuốc nhắm trúng đích TKI đều chiếm đa số: Exon 19 Deletion (19 ca # 16,24%) và Exon 21 L858R (8 ca # 6,84%). Có 2 trường hợp không đủ lượng DNA tách chiết để chẩn đoán đột biến EGFR (1 mẫu dịch màng phổi & 1 mẫu dịch màng tim) (2ca # 1,71%) (Máy báo lỗi “Invalid”).

Tỉ lệ phát hiện được đột biến EGFR trên các mẫu dịch:

**Bảng 1:** Tỉ lệ phát hiện đột biến EGFR tùy theo loại mẫu dịch khoang cơ thể

	Dịch màng phổi	Dịch màng tim	Dịch màng bụng	Dịch não tủy
Số ca & tỉ lệ % EGFR (+)	27/35 ca # 77,14%	2/35 ca # 5,71%	1/35 ca # 2,86%	5/35 ca # 14,29%
Tỉ lệ phát hiện	27/91 ca # 29,67%	2/9 ca # 22,22%	1/11 # 9,09%	5/6 ca # 83,33%

Tỉ lệ phát hiện được đột biến gen EGFR trong dịch màng phổi và dịch não tủy cao nhất (29,67% và 83,33%). Dịch màng tim và dịch màng bụng có tỉ lệ phát hiện đột biến EGFR thấp hơn (22,22% và 9,09%).

**Bảng 2:** So sánh kết quả các nghiên cứu khác trên thế giới

Nghiên cứu & Kỹ thuật	Loại dịch	Kết quả	Trị số P-Value
Kiyooki Nomoto (7/2006) ARMs	Dịch màng phổi	11%	0,00137 < 0,05 (Thấp hơn NC tại BVPNT)
Junichi Soh (2006) PNA - LNA PCR	Dịch màng phổi	47,54%	0,00159 < 0,05 (Cao hơn NC tại BVPNT)
H Kimura (2006) ddPCR	Dịch màng phổi	25,58%	0,0683 > 0,05 (# NC tại BVPNT)
Fiamma Buttitta (10/2012) NGS	Các loại dịch khoang cơ thể	42%	0,0251 < 0,05 (Cao hơn NC tại BVPNT)

## Bệnh viện Trung ương Huế

Fang Wei (2013) EFIRM	Các loại dịch khoang cơ thể	14,2%	0,0264 < 0,05 (Thấp hơn NC tại BVPNT)
Geoffrey R. Oxnard (1/2014) ddPCR	Các loại dịch khoang cơ thể	33,7%	0,059 > 0,05 (# NC tại BVPNT)
Haihong Yang (9/2014) NGS	Dịch não tủy	43,33%	0,0059 < 0,05 (Cao hơn NC tại BVPNT)
Muyun Peng (2017) NGS	Dịch màng phổi	58,5%	0,00248 < 0,05 (Cao hơn NC tại BVPNT)
Jiang Rong (2016) NGS	Dịch não tủy	60%	0,00173 < 0,05 (Cao hơn NC tại BVPNT)
Ping Zhang và cs. (8/2019) NGS	Các loại dịch khoang cơ thể	# 40% (# trên mẫu mô)	0,0157 < 0,05 (Cao hơn NC tại BVPNT)
NC tại BV.PNT (2019) RealTime PCR	Các loại dịch khoang cơ thể	29,91%	

Tỉ lệ phát hiện được đột biến EGFR trong nghiên cứu tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch thấp hơn đa số các nghiên cứu khác trên thế giới. Tuy nhiên, các nghiên cứu khác trên thế giới sử dụng các kỹ thuật có độ nhạy cao hơn kỹ thuật RealTime PCR tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch.

### IV. BÀN LUẬN

Đa số các loại bệnh phẩm mô học chẩn đoán đột biến EGFR là qua soi phế quản (48 ca # 41,03%) và sinh thiết phổi dưới hướng dẫn CT-Scan (39 ca # 33,33%). Điều này cũng phù hợp với thực tế lâm sàng, đa số các ca bệnh trong nghiên cứu là ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn tiến triển [3, 7].

Kết quả đột biến gen EGFR (+) 49 ca # 41,88%, tương đương với các thống kê ở trong nước và thế giới (Châu Á) khoảng 40 - 45% [7 - 11, 14]. Đa số vẫn là hai loại đột biến nhạy thuốc TKIs Exon 19 Deletion và Exon 21 L858R (53% và 23%) [9, 12, 14, 15].

Đa số mẫu dịch khoang cơ thể thực hiện chẩn đoán đột biến EGFR là dịch màng phổi (91 ca # 77,77%). Điều này cũng phù hợp với thực tế lâm sàng, màng phổi là nơi các ung thư phổi không tế bào nhỏ di căn tới sớm nhất. Bảng 1 cũng cho thấy tỉ lệ phát hiện đột biến trong mẫu dịch màng phổi và dịch não tủy cao nhất (29,67% & 83,33%) [3, 13, 15].

So sánh tỉ lệ phát hiện đột biến EGFR trên mẫu dịch khoang cơ thể (35/117 ca # 29,91%) với tỉ lệ phát hiện trên mẫu mô học thấp hơn có ý nghĩa

thống kê (29,91% ↔ 41,88% với P = 0,0125). So sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới ở bảng 2, cho thấy đa số các nghiên cứu cho kết quả cao hơn so với nghiên cứu tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch [10 - 12]. Điều này có thể lý giải, nghiên cứu của chúng tôi thực hiện với kỹ thuật RealTime PCR có độ nhạy thấp hơn các kỹ thuật khác: ddPCR (PCR kỹ thuật số), NGS (Giải trình tự gen thế hệ mới), PNA-LNA PCR (Kỹ thuật phát hiện chuỗi acid nucleic bằng gắn kết protein: Peptide nucleic acid - locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp - based detection) [7, 8]. Và có sự khác biệt của loại bệnh phẩm dịch các khoang cơ thể: có các nghiên cứu chỉ khảo sát trên dịch màng phổi hoặc chỉ khảo sát trên dịch não tủy [9, 13 - 15].

Có hai trường hợp không đủ lượng DNA trong mẫu dịch khoang cơ thể, chiếm tỉ lệ 1,71%. Điều này được lý giải do nồng độ DNA trong các dịch khoang cơ thể không ổn định, chúng ta không biết được các mảnh DNA có nhiều hay ít và thời điểm nào có nhiều nhất trong ngày. Giống như biểu hiện này trong mẫu huyết tương khi thực hiện sinh thiết lỏng (Liquid biopsy) [6, 9, 11, 13].

Độ tương đồng tỉ lệ chẩn đoán đột biến EGFR giữa hai nhóm bệnh phẩm mô học sinh thiết (Mẫu mô đúc khối parafin) và dịch các khoang cơ thể là: 71,42% (29,91% so với 41,88%).

#### **V. KẾT LUẬN**

Khảo sát chẩn đoán đột biến EGFR trong dịch các khoang cơ thể, đặc biệt trong các mẫu dịch có quá ít tế bào ác tính, kết quả dương tính 29,91% cho thấy đây là một bước ứng dụng mới giúp chẩn đoán đột biến EGFR ở các trường hợp khó lấy được mẫu bệnh phẩm mô học.

Tuy nhiên, khả năng phát hiện đột biến EGFR trong các dịch khoang cơ thể thấp hơn so với trên các bệnh phẩm mô học (29,91% < 41,88%). Và độ tương đồng giữa hai loại bệnh phẩm này là 71,42%.

Khả năng phát hiện đột biến EGFR cao nhất ở dịch màng phổi (29,67%) và dịch não tủy (83,33%). Cần nâng cao kỹ thuật thực hiện chẩn đoán đột biến EGFR trong mẫu dịch khoang cơ thể với các phương pháp có độ nhạy cao hơn: ddPCR, NGS...

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Clayton JS, Nichole TT, Rolando SS, Julie AW, Gerard AS. EGFR mutations in malignant pleural effusions from lung cancer. *Current Respiratory Care Rep* 2013, 2:79-87.
2. Fang W, Chien CL, Szu CY, Aron J, Ziding F, Gabriel T, Maruja EL, David C, Mao M, Chung LH, Wu CS, and David TWW. ElectricField Induced Release and Measurement (EFIRM) can detect EGFR mutations directly from body fluids of lung cancer patients. *California University Press* 2017, 3:15:131-138.
3. Fiamma B, Lara F, Maela DG, Giampaolo F, Alessia DL, Sara M, Patrizia V, Irene C, Tommaso D'A, Roberta Z, Sandra R, Franco C, and Antonio M (2019). Effective Assessment of EGFR Mutation Status in Bronchoalveolar Lavage and Pleural Fluids by Next - Generation Sequencing. *American Association for Cancer Research*, October 16, 2019, 13: 691-699.
4. Haihong Y, Linbo C, Yalei Z, Hongyu T, Qihua D, Meiling Z, and Xin X. Sensitive Detection of EGFR Mutations in Cerebrospinal Fluid from Lung Adenocarcinoma Patients with Brain Metastases. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2014, Vol. 16, No. 5, 23-31.
5. H Kimura, Y Fujiwara, T Sone, H Kunitoh, T Tamura, K Kasahara and K Nishio. EGFR mutation status in tumour - derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *British Journal of Cancer*, 2006, 95, 1390-1395.
6. Jiang R, Ma C, Lv Y, Mu N, Li J, Wang B, Sun L. Detected EGFR mutation in cerebrospinal fluid of lung adenocarcinoma patients with meningeal metastasis. *Open Medecine*, 2016, 11:93-96.
7. Yang J, Lee OJ, Son SM, Woo CG, Jeong Y, Yang Y, Kwon J, Lee KH, Han HS. EGFR Mutation Status in Lung Adenocarcinoma - Associated Malignant Pleural Effusion and Efficacy of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors; *Cancer Respiratory Treatments*, 2008; 50(3): 908-916.
8. Kiyooki N, Koji T, Toshimi T, Tomoya F, Karin Y, Hiromi S, Teruhiko Y, Akiko MM, Tatsuhiro S, Koh F, Yuichiro O, and Yoshihiro M. Detection of EGFR Mutations in Archived Cytologic Specimens of Non - Small Cell Lung Cancer Using High - Resolution Melting Analysis; *American Journal of Clinical Pathology*, 2006, 126:608-615.
9. Maria MB, Ann RH, Steinar S, Lars J, Tommaso AD, Antonella G, Francesca C, Marco A, Ugo P, Elin K, Anne - Lise BD, Odd TB and Aslaug H. Unique microRNA - profiles in EGFR - mutated lung adenocarcinomas; *International Journal Cancer*, 2014, 135, 1812-1821.

10. Muyun P, Chen C, Alicia H, Malcolm VB and Fenglei Y. Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 40), 69162-69173.
11. Olivier C, Anne P, Elvire P, Julien M and Nicolas G. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma; *European Respiratory Journal*, 2017, 49: 160-734.
12. Ping Z, Xiaonan W, Min T, Xin N & Lin L (2019). Detection of EGFR gene mutation status from pleural effusions and other body fluid specimens in patients with lung adenocarcinoma. *Thoracic Cancer*, 2019,9, 1-11.
13. Roshni AM, Ryali VSV, B. Shrikar R, Levin T, Karthik U, Jill K and Mahadev R. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. *Journal Clinical Medecine*, 2019, 8, 373-382..
14. Shuanzeng W, David L, Jennifer JDM, Zubair WB, David BR, and Cindy MG. Using “Residual” FNA Rinse and Body Fluid Specimens for Next-Generation Sequencing: An Institutional Experience. *Cancer Cytopathology*, May 2016, 234-241.
15. Yi L, Bing L, Xiao - Yan L, Jian - Jie L, Hai - Feng Q, Chuan - Hao T, Wan - Feng G, Hai - Xu H, Sha L, Cui - Jing C, Bing L, Hong - Jun G and Xiao - Qing L. A comparison of ARMS and direct sequencing for EGFR mutation analysis and Tyrosine Kinase Inhibitors treatment prediction in body fluid samples of Non - Small - Cell Lung Cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011, 30:111-119.