

淋巴瘤基因重排检测技术及解读中国专家共识(2023 版)

中国医师协会医学技师委员会病理技术专家组 中国医学装备协会病理装备分会标准化部 中国研究型医院学会病理学专业委员会病理技术学组 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会病理技术学组

执笔人:杨鑫鑫(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科精准医学中心,哈尔滨 150081);郭蕾(中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科,北京 100029);师艺(新疆医科大学第一附属医院病理科,乌鲁木齐 830011);张静(复旦大学附属肿瘤医院病理科,上海 200032);徐志杰(中南大学湘雅医院病理科,长沙 410008)

通信作者:孟宏学(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科,哈尔滨 150081), Email: menghongxue@hrbmu.edu.cn; 丁伟(浙江大学医学院附属第一医院病理科,杭州 310003), Email: 181010@zju.edu.cn

【摘要】 淋巴瘤是我国常见的恶性肿瘤之一,诊断难度较大。目前淋巴瘤的诊断主要基于细胞形态学(cell morphology)、细胞免疫学(cellular immunology)、细胞遗传学(cytogenetics)和分子生物学(molecular biology)4 大类检查。其中,分子检测是诊断淋巴瘤尤其是疑难病例的重要手段。基于肿瘤组织的所有细胞均来源于同一个癌变细胞这一理论基础,我们可以利用细胞克隆性分析来辅助进行淋巴细胞恶性肿瘤的诊断。由于 99%B 细胞淋巴瘤和 94%T 细胞淋巴瘤分别伴有免疫球蛋白基因和 T 细胞受体基因的克隆性重排,因此免疫球蛋白基因或 T 细胞受体基因克隆性重排的分子检测可作为克隆性分析的方法之一。淋巴瘤基因重排检测技术及解读中国专家共识(2023 版)编写组结合临床实践经验,主要基于临床常用的聚合酶链反应技术对淋巴瘤基因重排相关工作原理、方法及手段进行了相关阐述,以进一步指导与规范我国淋巴瘤基因重排检测工作的进行。

Chinese expert consensus on detection techniques and interpretation of lymphoma gene rearrangement (2023 version)

Pathological Technology Expert Group of Medical Technician Committee of Chinese Medical Doctor Association, Standardization Department of Pathological Equipment Branch of China Medical Equipment Association, Pathological Technology Group, Pathology Professional Committee, China Research Hospital Association, Pathological Technology Group of the Professional Committee of Tumor Pathology, China Anti-Cancer Association

Corresponding author: Meng Hongxue (Department of Pathology, Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081, China), Email: menghongxue@hrbmu.edu.cn; Ding Wei (Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Zhejiang University Medical College, Hangzhou 310003, China), Email: 181010@zju.edu.cn

淋巴瘤主要发生在淋巴器官和淋巴组织,可分为霍奇金淋巴瘤(HL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)两

类,临床表现为恶性程度高,发展迅速,预后差^[1-2]。我国 2020 年 HL 新增病例 6 829 例,死亡 2 807 例;

DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20230106-00010

收稿日期 2023-01-06 本文编辑 王世贤

引用本文:中国医师协会医学技师委员会病理技术专家组,中国医学装备协会病理装备分会标准化部,中国研究型医院学会病理学专业委员会病理技术学组,等.淋巴瘤基因重排检测技术及解读中国专家共识(2023 版)[J].中华病理学杂志,2023,52(6):558-565. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20230106-00010.



NHL 新增 92 834 例,死亡 54 351 例。NHL 依据细胞类型不同分为 T 细胞 NHL(占 10%~20%)和 B 细胞 NHL(占 80% 以上)^[3]。既往我国的多中心数据研究中指出:HL 患者占有淋巴瘤病例的构成比为 8.54%, NHL 在所有淋巴瘤病例的构成比为 87.69%, B 细胞 NHL 与 T/NK 细胞淋巴瘤的构成比例约为 3:1^[4]。淋巴瘤诊疗规范(2018 年版)指出,免疫球蛋白(Ig)/T 细胞受体(TCR)基因重排分别是 B、T 淋巴细胞的主要特征,可用于协助鉴别淋巴细胞增殖的单克隆性与多克隆性,以及鉴别无法通过免疫组织化学(IHC)诊断的淋巴瘤,是对形态学和 IHC 检查的重要补充^[5]。2021 年中国淋巴瘤治疗指南也明确指出淋巴瘤中抗原受体基因的克隆性重排对于精确诊断疾病、指导规范治疗必不可少^[3]。

一、淋巴瘤病理诊断中的重排检测原理

淋巴细胞的 Ig 和 TCR 的基因结构是由可变区(V)、连接区(J)、多变区(D)及恒定区(C)组成,基因重排在淋巴细胞发育过程中发挥着重要作用^[6]。在淋巴细胞早期发育时,B 细胞中的 Ig 基因和 T 细胞中的 TCR 基因发生特定顺序的重排,形成 V-(D)-J 片段,使每个淋巴细胞都有独特的重排形式,这保证了正常免疫反应中抗原受体的多样性。但当淋巴瘤发生时,人体就会失去对某个基因重排细胞的控制,该细胞就会出现不可控制性、单克隆性的增生^[7-8]。恶性肿瘤的所有细胞都具有共同的克隆起源,因此淋巴细胞克隆性的评估可以支持淋巴系统恶性肿瘤的诊断结果。同时有 5%~10% 的淋巴恶性肿瘤病例诊断较为复杂,需要通过 Ig 和 TCR 基因克隆性重排检测来辅助诊断^[7]。

1. 基因重排的模式:(1)在 B 淋巴细胞中,Ig 基因由 2 条相同的重链(IgH)和 2 条相同的轻链(Igκ/Igλ)构成。重链的 V 区由 V、D、J 片段编码,而轻链的 V 区由 V 和 J 片段编码^[9]。每个 B 淋巴细胞可以表达多种类型的重链,但只能表达 1 种轻链即 Igκ 或 Igλ。在基因重排的过程中,首先是 IgH 基因中 D 和 J 基因片段重排形成 D-J 基因片段,接下来 V 基因片段与 D-J 基因片段重排形成 V-D-J 基因片段;随后 Igκ 中的 V 和 J 基因片段开始重排形成功能性的 Igκ 链;若这一步未构建出功能性的 Igκ 链,B 细胞则启动下一步程序:Igλ 基因的 V 和 J 基因片段重排,形成 Igλ 链^[10-11]。(2)在 T 淋巴细胞中,存在 4 种 TCR 蛋白单体分别为 α(TCRA)、β(TCRB)、γ(TCRG)和 δ(TCRD)蛋白,它们可以形成 2 种亚型

的 TCR 即 TCRγδ 和 TCRαβ^[9]。每条 TCR 链也经历了类似 Ig 的重排方式。TCR 的重排过程从 TCRD 基因中的 D-J 和 V-DJ 重排开始,然后是 TCRG 基因中的 V-J 重排,其目的是构建合适的 TCRγδ 受体;当无法构建时,T 细胞中的 TCRB 基因将继续进行 D-J 和 V-DJ 重排,最后是 TCRA(V-J 重组)重排,从而构建出 TCRαβ 受体^[12-13]。

2. 重排检测的体系建立:目前主流的克隆性重排检测方法是采用聚合酶链反应(PCR)法,它是利用合适的引物与基因片段结合,通过扩增以及对产物的分析,检测出 Ig/TCR 基因的重排状态;其优点是速度快、所需 DNA 质量低、灵敏度高。当前淋巴瘤基因重排检测技术是基于 BIOMED-2 体系建立起来的。该体系目前已被临床广泛接受和认可,成为淋巴瘤重排检测的金标准^[1, 14-15]。BIOMED-2 体系设计包括 VH-JH、DH-JH、Igκ、Igλ、TCRβ、TCRγ、TCRδ、bcl-1-Ig 和 bcl-2-IgH 等多组引物,同时利用异源双链分析或基因扫描分析对 PCR 产物进行分析,检测其是否存在克隆性重排。利用基因扫描法可达到 0.5%~1.0% 克隆淋巴细胞的灵敏度,快速且简单,比异源双链分析更加灵敏^[14, 16]。BIOMED-2 体系基本可以覆盖所有 B 细胞和 T 细胞克隆性重排状态,对于微小残留病变的检测也适用。

二、病理应用与临床意义

1. 鉴别增生淋巴细胞的良恶性:基因重排结果呈多克隆性通常提示为淋巴细胞反应性增生,而单克隆性则通常提示为肿瘤性增生。这一特性可以用于辅助鉴别淋巴细胞增生的良恶性,同时也可以用于检测治疗后的微小残留病灶。需要注意的是,检测结果显示单克隆性,并不代表一定是肿瘤,一些良性或病毒感染性病变也可以表现出单克隆性增生,因此,病理诊断需要结合形态和免疫表型综合评判。

2. 鉴别肿瘤 T/B 谱系:对于确诊为淋巴瘤的样本,可以利用淋巴瘤基因重排来明确肿瘤细胞的谱系来源;检测到 Ig 基因重排通常提示为 B 细胞淋巴瘤,检测到 TCR 基因重排则通常提示为 T 细胞淋巴瘤。但需要注意的是,Ig 和 TCR 基因重排并不是 B 细胞和 T 细胞所特有的,部分肿瘤仍有跨谱系重排的发生^[13, 17]。

3. 辅助鉴别淋巴细胞的克隆性关系:Ig/TCR 基因重排检测能够辅助明确复发肿瘤与原发肿瘤的克隆性关系;如果两者重排模式相同,则考虑复发

肿瘤与原发肿瘤存在克隆性相关性;如果重排模式不同,则认为复发肿瘤为第二原发。

三、样本类型及处理

1. 样本的前处理:针对送检的样本病理科需进行准确有效的前处理如固定、脱水等,方能保证后续检测的精准进行。针对整体前处理流程需注意以下几个问题:(1)针对临床送检的经手术切除的淋巴结组织病理科接收标本后需在剖开后进行固定。常规淋巴结最大径不超过 1.5 cm 时对半分开即可,如出现肿大或体积较大的淋巴结时应保证切开后的淋巴结厚度不超过 0.3 cm,同时尽量剔除周围脂肪组织。(2)送检的待测组织整体固定时间(取材前固定+脱水机固定)不得超过 30 h。(3)组织进入脱水机后,脱水机的固定温度不得超过 37 °C,时间不得超过 3 h。同时脱水机内相应的脱水液温度不得超过 37 °C,石蜡温度不得超过 62 °C。(4)在节假日等非工作日,脱水组织可分别停留在 95% II、100% I、100% II 乙醇中。

2. 不同类型样本的处理方式:(1)石蜡包埋组织样本:建议样本离体 30 min 内及时取材固定,采用 3.7% 中性甲醛溶液固定,通常固定液是组织体积的 10 倍。一般室温下活检样本固定 6~12 h,手术样本固定 12~48 h,大样本应切开充分固定。由于保存环境及保存时间会导致 DNA 片段化,建议石蜡组织 18~25 °C 保存,原则上使用 3 年以内的石蜡组织进行检测,以保证提取样本 DNA 的质量。(2)新鲜组织样本:新鲜样本可提取高质量的核酸,建议离体 30 min 内提取 DNA,防止核酸降解。(3)骨髓穿刺及活检样本:骨髓和骨髓液均可以进行 Ig/TCR 基因检测,骨髓液采集量以 3~5 mL 为宜,可在采集后室温下 2 h 内直接提取 DNA,如不能及时提取 DNA,可制成蜡块以待后续检测。骨髓组织一般穿刺长度为 1.5~2.0 cm,直径约 2 mm,不建议使用强酸脱钙,且脱钙时间不宜过长,以免破坏样本 DNA。(4)体液样本:外周血采集量 3~5 mL 为宜,首选 EDTA 抗凝剂,禁止使用肝素抗凝,推荐 72 h 内 4 °C 保存运输,如不能在此时间内提取 DNA,建议 -80 °C 保存,避免反复冻融;其他常见的体液样本,如脑脊液、胸腔积液、腹腔积液、玻璃体液等,可在采集后室温下 2 h 内离心取沉淀细胞,直接提取 DNA,或 4 °C 保存运输,24 h 内提取 DNA。如不能及时提取 DNA,应 -80 °C 保存,也可制成细胞蜡块以备后续检测。相应样本保存和操作条件也可参考其他共识^[18-20]。

四、DNA 制备与质控

1. DNA 的制备:所有待检测组织学和细胞学标本需制备 HE 切片,外周血及其他体液标本有条件可制作细胞涂片染色,经病理医师质控,评估肿瘤类型、细胞含量、坏死率等,筛选适合淋巴瘤重排检测的组织学类型,样本的肿瘤细胞比例应 ≥20%,并确保有足量的肿瘤细胞提取 DNA,必要时可根据 HE 切片或涂片标记肿瘤细胞区域进行富集。对于石蜡组织样本如切片厚度按 3~4 μm 计算,手术大标本(一般组织大小 >1 cm×1 cm) ≥5 张白片,活检穿刺小标本 ≥15 张白片,如提供白片较厚可相应减少白片数量,或 2~3 个 5~7 μm 的蜡膜(取自无明显组织坏死,出血,纤维结缔组织的组织样本);血液等体液标本应采集足够量的体积,以满足 DNA 提取的需要。根据样本类型的不同,选取对应的 DNA 提取试剂,外周血样本及蜡块采用针对各自 DNA 的专用提取试剂。提取的 DNA 可 4 °C 保存一周, -80 °C 长期保存,避免反复冻融。

2. DNA 质量控制:DNA 的质量对检测结果的准确性有重要影响,需要从 DNA 纯度、DNA 浓度以及 DNA 片段化程度进行充分评估。一般采用紫外分光光度法测定 DNA 的纯度和浓度, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间的 DNA 纯度最佳。DNA 提取后应及时进行浓度测定,浓度过高或过低的标本,建议适当稀释或浓缩 DNA 溶液。同时可通过琼脂糖电泳或毛细管电泳检测所提取 DNA 的片段大小情况,检测所需的重排目的片段 200~400 bp 最佳。对于不符合检测要求的样本,易出现假阳性(假克隆或寡克隆)或假阴性结果,建议根据具体情况,更换不同蜡块组织或重新送检其他类型的待测样本,必要时需重新采集样本。

五、检测及 PCR 标准化流程

1. 淋巴瘤基因重排检测有以下几种方法:(1) Southern blot 印迹杂交法:将待测 DNA 样本固定在固相载体上,与标记的核酸探针进行杂交,洗涤游离探针后用发射自显影等技术,显示待测的片段及相对大小。步骤繁琐,费时,需要大量新鲜或冷冻组织,同时有放射性同位素污染,灵敏度较低,制约了该方法在临床中的应用。(2) PCR 加聚丙烯酰胺凝胶电泳法:设计多重引物对待测样本进行 PCR 扩增反应,扩增出待测样本的 PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳,显示出待测片段及相对大小。PCR 操作步骤简便,快速,对样本量要求降低,但需要每次配制凝胶,染色剂溴化乙锭等对人体有害,结果需紫外光



观察,分辨率低,约 20 bp,容易误判。(3)PCR 加毛细管电泳基因扫描法:在多重引物上标记荧光基团,使 PCR 扩增的产物引入荧光信号,经毛细管电泳仪时激发荧光,仪器收集荧光信号,通过计算机软件自动处理和计算分析数据。操作简单,检测速度快,检测结果直观易懂,分辨率高达 1 bp,诊断准确率高,在临床实际工作中广泛应用。

2. 淋巴瘤基因重排检测的 PCR 标准化流程:淋巴瘤基因重排 PCR 标准化流程主要包括以下步骤:(1)样本采集和 DNA 提取:具体要求前文已述,注意避免样本间交叉污染。(2)扩增体系配制:试剂配制应在试剂准备区进行,优先使用国家药品监督管理局认证的试剂,视各实验室具体情况采用经性能确认的实验室自建方法(laboratory-developed test, LDT)的试剂。无论哪种试剂耗材,在使用前都应进行质检和验证,并保存相应记录。(3)加待测样本 DNA:此步骤应在样本制备区进行,根据不同的 PCR 反应体系的要求,在配制好的 PCR 扩增体系中加入适量的待测样本 DNA,同批次实验中应设立阳性对照、阴性对照及空白对照,对检测体系、操作过程及待测样本检测有效性等进行监测。(4)PCR 扩增:此步骤应在扩增区进行,对 PCR 扩增要使用的仪器设备应定期维护和校准,保证仪器正常运行。(5)产物电泳:PCR 扩增产物应在产物分析区进行电泳,上样时注意防污染,对电泳结果有疑问时应及时重复电泳或重新检测。实验室在日常检测中应进行室内质量控制和室内质量评价或能力验证。室内质控包括:DNA 质量评价、阴阳性对照设立、新试剂验证、检测人员比对、定期重复性检测等。实验室还应定期参加室内质量评价、能力验证、实验室间比对,来评估本实验室检测能力,一旦发现问题,应及时采取措施加以改进,并保存质控相关记录。

六、检测结果分析及判读标准

1. 检测结果分析:待测样本的基因重排结果判读时,对每个产物进行分析均需要参照对应 PCR 反应的阳性对照样本、阴性对照样本,同时忽略待测样本在有效检测范围外出现的信号峰。尽管 PCR

反应出现阳性时提示待测样本有淋巴瘤可能,但具体的意义仍需要结合临床以及其他实验室检测结果,进行综合判断。检测结果要及时反馈给病理诊断医师与临床医师,综合其他指标进行血液系统肿瘤明确诊断。

2. 判读标准:(1)判读审核:在对基因重排的结果进行判读之前,需先对质控样本的检测进行审核。如若出现以下任一情况的异常数据,表明实验是无效的(表 1)。^①空白对照收集到 PCR 反应扩增的荧光信号;^②阳性对照样本在有效检测范围内未能收集到不连续且表现明显的单克隆峰荧光信号;^③阴性对照样本在有效检测范围内收集到不连续且表现明显的单克隆峰荧光信号;^④质控品反应液在 100、200、300、400、600 bp 等片段大小位置上,均未收集到明显波峰荧光信号。以上问题的出现,表明检测体系可能存在污染或体系尚不稳定,此时不能对待测样本进行结果判断,需排查原因至上述情况消除,经过重复检测后,方可进入下一步结果判读。(2)判读类型:^①重排单克隆(monoclonal)的定义及判别准则:除质控 PCR 反应液外的任意 1 管反应液在有效范围(参考 BIOMED-2 方案)内收集到单一大小的 1 个或 2 个明显扩增峰,则判定该样本:“基因克隆性重排检测结果为阳性,也称重排单克隆,提示存在克隆细胞群”。对于明显扩增峰的判断,目前应用较为广泛的标准是:在有效的大小范围内,当第一高峰的峰高达到区域内第三高峰的 3 倍及以上时,第一高峰被认定为扩增峰,也叫单克隆峰。需注意的是,单克隆性并不完全等于恶性,以下情况可能检测到克隆性增生的淋巴细胞群,结果解释需结合临床、形态学及 IHC 综合判定:a. 当穿刺活检或高负荷的 B-NHL 样本中含有少量的反应性 T 细胞时,由于 T 细胞成分过少无法形成多克隆背景,检测出 Ig 基因重排的同时还会检测出 T 细胞的克隆性重排,导致类似克隆/寡克隆的 PCR 产物,尤其将 TCRG 基因作为 PCR 目标时,TCRD 克隆性重排可能与恶性淋巴瘤增殖无关。b. 当 EB 病毒阳性淋巴组织增生早期阶段时。c. 当发生良性皮肤 T 细胞增生性病

表 1 每个对照类型的正确分析、异常分析

类型	预期数据	异常数据
空白对照	未收集到聚合酶链反应扩增的荧光信号	收集到聚合酶链反应扩增的荧光信号
阳性对照	在有效检测范围内,收集到单克隆峰的荧光信号	在有效检测范围内,未能收集到单克隆峰的荧光信号
阴性对照	在有效检测范围内,未能收集到单克隆峰的荧光信号	在有效检测范围内,收集到单克隆峰的荧光信号
质控品	在分子标志物位置上,收集到波峰荧光信号	在分子标志物位置上,未收集到波峰荧光信号



变如淋巴瘤样丘疹病时。d. 当 CD8 阳性(有时 CD4 阳性)T 淋巴细胞增多时。e. 当发生良性单克隆 γ 病时。②重排寡克隆(oligoclonal)的定义及判别准则:除质控 PCR 反应液外的任意 1 管反应液在有效范围(参考 BIOMED-2 方案)内收集到单一大小的 2~3 个明显扩增峰,则判定该样本:“基因克隆性重排寡克隆”。当出现以下情况时需对样本结果进行谨慎判读:a. 炎症(EB 病毒、巨细胞病毒感染)及自身免疫引起的免疫反应过度,出现免疫相关的多个淋巴细胞群(克隆性)增殖扩张的结果时为优势免疫反应,此时可能出现寡克隆的情况。b. 当免疫系统不完善,如样本为老年人的外周血、免疫缺陷患者和器官移植患者时可检测到 T 细胞的寡克隆性。③重排多克隆(polyclonal)的定义及判别准则:除质控 PCR 反应液外的任意 1 管反应液在有效范围(参考 BIOMED-2 方案)内收集到单一大小的 3 个以上明显扩增峰,呈现峰高的正态分布(高斯分布),则判定该样本:“基因克隆性重排检测结果为阴性,也称重排多克隆,提示不存在克隆细胞群”。当出现类似反应性增生的多克隆性细胞群时,需注意结果的判别。(3)判读注意事项:当待测样本出现污染或组织中淋巴细胞过少时,可能出现优势 PCR 扩增产物,此时的样本检测结果与克隆性重排的结果相似(假克隆性)。当待测样本 DNA 质量过差,肿瘤细胞过少并超过检测范围(肿瘤细胞少于 5%~10%),或体细胞超突变、染色体区域的缺失、易位或倒位使引物结合失败时均可导致假阴性的发生。所以我们在对重排克隆性检测结果判读时需谨慎,组织病理结果与分子病理结果需有效结合,同时需及时与临床医师沟通,综合患者临床情况进行最终判读。①重排克隆性检测为阴性结果时:A. 结果为真阴性:此时病理镜下观察可出现疑似淋巴瘤细胞,且背景细胞较为单一,患者临床表现未出现明显的感染和免疫缺陷状态,克隆性重排此时为阴性可作为排除淋巴瘤的诊断的指标之一。B. 结果为假阴性:a. 病理镜下观察出大量的疑似淋巴瘤细胞,背景细胞较为单一,且有较为明确的淋巴瘤的诊断依据,患者未出现明显的感染和免疫缺陷状态,但部分淋巴瘤(弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤)因受体基因区域序列发生超突变、易位等变异,可能导致重排检测假阴性。b. 病理镜下观察出现大量的疑似淋巴瘤,细胞及背景细胞复杂、混乱。临床上患者出现了明显的感染或免疫缺陷状态,这时由于部分淋巴瘤合并严

重的感染或免疫缺陷时可出现大量的多克隆/寡克隆重排信号,可致重排检测假阴性,严重影响淋巴瘤单克隆结果的判断。c. 病理镜下观察出现大量的疑似淋巴瘤细胞,同时临床上患者未出现明显的感染和免疫缺陷状态时也要考虑特定类型的淋巴瘤(如 NK/T 细胞淋巴瘤)。由于部分淋巴瘤不表达受体基因,如 NK 细胞来源的 NK/T 细胞淋巴瘤,因此此时 TCR 克隆性重排阴性不能作为排除 NK/T 淋巴瘤的依据。当结果出现假阴性时可结合流式细胞术观察轻链抗体的限制性表达情况(κ/λ),结合 FISH 观察 IgH 区域的易位是否发生,结合基因突变的检测等方法综合排查假阴性,辅助淋巴瘤的诊断。②重排克隆性检测为阳性结果时:TCR 或 Ig 单一检测阳性:a. 病理镜下观察出现疑似淋巴瘤细胞,且背景细胞较为单一,临床上患者未出现明显的感染和免疫缺陷状态,此时克隆性重排阳性可辅助诊断对应系别的淋巴瘤。b. 病理镜下观察出现疑似淋巴瘤细胞,但重排克隆性系别属性与病理诊断明显相反,临床上患者未出现明显的感染和免疫缺陷状态,此时出现了克隆性重排“表达不忠诚”,不可直接辅助诊断淋巴瘤及系别判断,需结合临床和其他检测综合判断淋巴瘤系别。TCR 或 Ig 检测均阳性:a. 病理镜下观察出现疑似淋巴瘤细胞,且背景细胞较为单一,临床上患者未出现明显的感染和免疫缺陷状态。此时若克隆性重排双阳性,不可直接辅助诊断淋巴瘤及系别判断,需结合临床考虑未成熟(pre)的淋巴瘤类型。系别需结合其他检测综合判断。b. 当病理结果考虑为特定组织学类型(如血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤、EB 病毒阳性 B 细胞增殖等),且镜下背景细胞复杂(存在两系以上的异常细胞),同时临床上患者合并一定程度的感染、免疫缺陷或与治疗相关的免疫状态改变时,克隆性重排双阳性结果不可直接辅助诊断淋巴瘤及系别判断,需结合临床鉴别肿瘤细胞的重排属性。

七、报告的内容

基于 PCR 扩增技术,临床实验室比较容易获取满足质量要求的临床样本检测数据,但考虑到基因重排检测技术的局限性,扩增产物的多样性,不可避免地会检测到临床意义不确定的结果。因此,基因重排的检测报告建议包含以下内容:(1)检测名称;(2)患者的基本信息;(3)样本相关信息;(4)病理信息;(5)实验技术;(6)实验结果;(7)检测信息;(8)备注;(9)基因重排的最终报告签发(操作人、审

核人、报告人签字)。

八、性能验证

根据《CNAS-GL039 分子诊断检验程序性能验证指南》《CNAS-CL02-A009 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》等指南要求,结合淋巴瘤重排试剂实验方法及结果判读的特点,在开展淋巴瘤重排检测前,应对淋巴瘤重排试剂的符合率、检出限、精密度、抗干扰性等性能进行验证^[21-22]。以下出现的参考品需为经过多种方法检测,室内室间质控后确认最终结果后所认定。

1. 准确度:(1)参考品准备:选择克隆性重排为阴性和弱阳性(信号峰高为第三大峰高的 3~4 倍)的淋巴瘤病例石蜡组织样本各 10 例,作为阴性参考品和弱阳性参考品。(2)检测方法:使用待测重排检测试剂,分别对阴性参考品,弱阳性参考品进行检测。必须同时检测阴性、阳性质控品,结果合格认为检测结果有效。(3)评价标准:经重排试剂检测阴性参考品及弱阳性参考品,弱阳性参考品均为阳性,阴性参考品均为阴性。阳性符合率= $\frac{\text{真阳性}}{\text{真阳性}+\text{假阴性}}\times 100\%$;阴性符合率= $\frac{\text{真阴性}}{\text{假阳性}+\text{真阴性}}\times 100\%$;总符合率= $\frac{\text{真阳性}+\text{真阴性}}{\text{样本总数}}\times 100\%$ 。

2. 检出限:(1)参考品准备:分别选择临床检测为克隆性重排阳性和阴性的样本各 1 例,作为阳性质控品和阴性质控品,提取 DNA 后稀释到 100 $\mu\text{g/L}$,制备阳性比例为 10% 的参考品作为检出限参考品。(2)检测方法:使用待测重排检测试剂,对检出限参考品进行检测,重复检测 5 次,必须同时检测阴性、阳性质控品,结果合格方认为检测结果有效。(3)评价标准:经重排试剂检测检出限参考品,重复检测 5 次,按照说明书标准判读,结果均为阳性,即阳性率为 100%。

3. 精密度:(1)参考品准备:选择临床检测为克隆性重排为强阳性和弱阳性的样本各 1 例,作为强阳性和弱阳性精密度参考品。(2)检测方法:使用待测重排检测试剂,分别对强阳性精密度参考品及弱阳性精密度参考品进行检测,重复检测 10 次,对所检测参考品进行阴阳性判读。必须同时检测阴性、阳性质控品,结果合格方认为检测结果有效。(3)评价标准:经重排试剂检测各精密度参考品,重复检测 10 次,按照标准判读,结果均为阳性,即阳性率为 100%,且变异系数 $\leq 5\%$ 。

4. 抗干扰能力:(1)参考品准备:选择临床检测克隆性重排为阴性和弱阳性的样本各 1 例,作为阴

性抗干扰能力参考品和弱阳性抗干扰能力参考品。组织样本脱蜡后,分别在样品中加入甲醛(终浓度 20%、4%)、EDTA(终浓度 100 mmol/L、20 mmol/L)、长春新碱(终浓度 10 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$)、顺铂(终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$)等干扰物质。(2)检测方法:使用待测重排检测试剂,分别对加入各干扰物质的阴性抗干扰能力参考品及弱阳性抗干扰能力参考品进行检测,分别重复检测 3 次,必须同时检测阴性、阳性质控品,结果合格方认为检测结果有效。(3)评价标准:经重排试剂检测各抗干扰能力参考品,重复检测 5 次,加入不同干扰物质的阴性抗干扰能力参考品检测结果均为阴性,即阴性符合率 100%,加入不同干扰物质的弱阳性抗干扰能力参考品检测结果均为阳性,即阳性符合率 100%。

5. 日常质控:根据《CNAS-GL039 分子诊断检验程序性能验证指南》《CNAS-CL02-A009 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》等指南要求^[21-22],除项目开展前需对相应试剂进行充分的性能验证外,在日常工作中仍需对不同批次试剂、实验人员、室间质评、异常结果处理等方面进行质控^[17]。(1)不同批次试剂日常质控:更换试剂批次时需对不同批次试剂性能进行验证,选取经旧批号检测确认的阴性样品 1 例、弱阳性样品 3 例、阳性样品 1 例,采用新批号试剂进行检测,5 例样品检测结果均应与原检测结果相符。(2)室间质控:应参加相应的能力验证/室间质评,并保留参加能力验证/室间质评的结果和证书。(3)实验人员质控:应定期进行检验人员的结果比对考核并记录,至少每年 1 次,每次选择经检测确认的阴性样品 1 例、弱阳性样品 3 例、阳性样品 1 例,5 例样品检测结果均应与原检测结果相符。(4)仪器质控:应定期进行仪器质控,至少每年 1 次,并出具相应的仪器质控报告。(5)异常结果:当分子诊断结果与临床和其他实验结果不符时,应记录并分析原因,适当时采取纠正措施。特别是发生严重影响检测系统分析性能的情况(仪器搬迁,设施、环境的严重失控等)受影响的性能进行部分性能验证。设备故障修复后,对阴性样品 1 例、弱阳性样品 3 例、阳性样品 1 例进行检测,5 例样品检测结果均应与原检测结果相符。

九、问题与展望

目前精准医疗发展迅速,临床医师也越来越依赖分子标志物对肿瘤进行分类并制定相应的治疗策略,针对患者的诊疗日趋个体化和精准化。在如今的分子标志物时代,了解用于分类和监测淋巴瘤

的临床诊疗手段对于准确诊断、分类和选择治疗策略至关重要。但许多淋巴瘤亚型表现出复杂的分子遗传改变,超出了既往凭借单一标志易位或突变即可对特定淋巴瘤实体特征进行诊断的认知。鉴于淋巴瘤相关的众多且复杂的复发性结构重排、拷贝数变化和体细胞突变,除我们所阐述的基因重排手段外,可能在临床和研究环境中还需要结合使用多种技术来对淋巴瘤进行更加准确的评估,例如流式细胞术、二代测序技术等。我们期待有更多的临床试验、技术手段与药物开发用于淋巴瘤患者靶向治疗的获益。

《淋巴瘤基因重排检测技术及解读中国专家共识(2023版)》

编写专家组成员(按单位名称汉语拼音字母顺序排序):安徽医科大学第一附属医院(潘美华);北京大学医学部病理学系/北京大学第三医院(张燕);北京大学肿瘤医院(周立新);重庆市人民医院(刘瑾);福建省立医院(陈昕);福建省肿瘤医院(师怡、吴在增);福建医科大学附属第一医院(李国平);复旦大学附属华山医院(高名士);复旦大学附属中山医院(宿杰、阿克苏、黄洁);复旦大学附属肿瘤医院(张静、周学科);广东省人民医院(骆新兰、许洁);广西中医药大学第一附属医院(崔锦珠);哈尔滨医科大学附属肿瘤医院(孟宏学、杨鑫鑫);海军军医大学东方肝胆外科医院(冼志红);海军军医大学附属长海医院(倪灿荣);航天中心医院(侯芳);河南省人民医院(孙廷谊);湖北省肿瘤医院(王明伟);华中科技大学同济医学院附属协和医院(罗丹菊、翁霞霞);江南大学附属中心医院(汤鸿);江苏省人民医院(张炜明);空军军医大学西京医院(胡沛臻、钱守斌);辽宁省肿瘤医院(何莲);陆军军医大学大坪医院(毛成毅);南京大学医学院附属鼓楼医院(吴鸿雁、杨军);宁波病理诊断中心(陈洁);宁夏医科大学总医院(秦璟、李国富);青岛大学口腔医学院(赵洁);陕西省宝鸡市中心医院(徐燕);陕西省肿瘤医院(王晓敏);上海交通大学附属新华医院(虞文伟);上海交通大学附属瑞金医院(许海敏);上海中医药大学附属岳阳医院(冼志红);首都医科大学附属北京世纪坛医院(高颖);四川大学华西医院(雷松、陈敏);苏州大学附属第一医院(朱卫东);天津中心妇产科医院(宋剑婵);温州医科大学附属第一医院(黄卡特);西安交通大学第二附属医院(靳耀锋);新疆石河子大学第一附属医院(郑玉琴);新疆医科大学第一附属医院(师艺、苗娜);云南省第三人民医院(徐开军);云南省肿瘤医院(陈芸);浙江大学医学院附属第二医院(王海军);浙江大学医学院附属第一医院(丁伟、姚洪田、邹尹影、徐黎明);浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院(王炜);浙江省肿瘤医院(胡锦涛、张谷);郑州大学第一附属医院(高冬玲、黄培、王芸姣);中国人民解放军北部战区总医院(秦海明);中国人民解放军东部战区总医院(马恒辉、王璇);中国人民解放军总医院第四医学中心(康佳蕊);中国人民解放军总医院第一医学中心(宋欣);中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院(王德田、薛晓伟、鹿钧译);中国医学科学院血液病医院(梁霖);中国医学科学院肿瘤医院(郭蕾、郑波);中南大学湘雅医院(徐志杰、傅春燕);中日友好医院(张红雷);中山大学附属第一医院(梁英杰、董愉);中山大学附属肿瘤医院(肖永波、卢佳斌)

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2007, 21(2):201-206. DOI: 10.1038/sj.leu.2404467.
- [2] Kline J, Godfrey J, Ansell SM. The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma[J]. *Blood*, 2020, 135(8): 523-533. DOI: 10.1182/blood.2019000847.
- [3] 中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会, 中国医师协会肿瘤医师分会, 中国医疗保健国际交流促进会肿瘤内科分会. 中国淋巴瘤治疗指南(2021年版)[J]. *中华肿瘤杂志*, 2021, 43(7):707-735. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20210516-00382.
- [4] 李小秋, 李甘地, 高子芬, 等. 中国淋巴瘤亚型分布: 国内多中心性病例 10002 例分析[J]. *诊断学理论与实践*, 2012, 11(2): 111-115. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-2870.2012.02.006.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 淋巴瘤诊疗规范(2018年版)[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2019, 5(4):50-71. DOI: 10.12151/JMCM.2019.04-11.
- [7] 周晓燕. 克隆性基因重排在淋巴瘤诊断中的应用[J]. *中华病理学杂志*, 2010, 39(5): 347-349. DOI: 10.3760/cma. j. issn.0529-5807.2010.05.014.
- [8] van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2003, 17(12): 2257-2317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
- [9] Gazzola A, Mannu C, Rossi M, et al. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies[J]. *Ther Adv Hematol*, 2014, 5(2):35-47. DOI: 10.1177/2040620713519729.
- [10] Mahe E, Pugh T, Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(3): 195-200. DOI: 10.1136/jclinpath-2017-204761.
- [11] Chi X, Li Y, Qiu X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation[J]. *Immunology*, 2020, 160(3): 233-247. DOI: 10.1111/imm.13176.
- [12] Mahe E, Pugh T, Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(3): 195-200. DOI: 10.1136/jclinpath-2017-204761.
- [13] Mendoza H, Tormey CA, Rinder HM, et al. The utility and limitations of B- and T-cell gene rearrangement studies in evaluating lymphoproliferative disorders[J]. *Pathology*, 2021, 53(2):157-165. DOI: 10.1016/j.pathol.2020.09.024.

- [14] Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations[J]. *Leukemia*, 2012, 26(10): 2159-2171. DOI: 10.1038/leu.2012.246.
- [15] Scheijen B, Meijers R, Rijntjes J, et al. Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS[J]. *Leukemia*, 2019, 33(9): 2227-2240. DOI: 10.1038/s41375-019-0508-7.
- [16] Evans PA, Ch P, Groenen PJ, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2007, 21(2): 207-214. DOI: 10.1038/sj.leu.2404479.
- [17] Brüggemann M, White H, Gaulard P, et al. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2007, 21(2): 215-221. DOI: 10.1038/sj.leu.2404481.
- [18] 中华医学会病理学分会, 国家病理质控中心. BRCA1/2 数据解读中国专家共识(2021版)[J]. *中华病理学杂志*, 2021, 50(6): 565-571. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20201027-00809.
- [19] 中华医学会病理学分会, 中华医学会泌尿外科学分会, 国家病理质控中心. 前列腺癌同源重组修复基因检测及变异解读专家共识[J]. *中华病理学杂志*, 2022, 51(10): 941-949. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20220310-00162.
- [20] 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/cma.j.cn112151-20201220-00945.
- [21] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南[S]. 2019.
- [22] 中华人民共和国卫生部. 肿瘤个性化治疗检测技术指南(试行)[S]. 2019-04-18.

非小细胞肺癌融合基因检测临床实践 中国专家共识(2023版)

中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会 中华医学会肿瘤学分会肺癌专家委员会 国家病理质控中心

执笔人: 李卫华(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, 北京 100021); 李子明(上海市胸科医院 上海交通大学附属胸科医院肿瘤科, 上海 200030)

通信作者: 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, 北京 100021), Email: jmying@cicams.ac.cn; 陆舜(上海市胸科医院 上海交通大学附属胸科医院肿瘤科, 上海 200030), Email: shunlu@sjtu.edu.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】 基因融合是非小细胞肺癌中一类重要的分子变异。近十余年来, 针对融合基因的靶向治疗进展迅速, 为特定融合基因阳性患者带来显著临床获益。然而, 基因融合形成机制多样, 检测方法众多, 不同方法各有优缺点, 在临床分子检测中相对复杂。本文旨在从融合基因检测的临床意义、适用人群、常见融合基因的共性和特性、常用检测方法优缺点和检测策略优化等多个角度出发, 基于

DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20221111-00946

收稿日期 2022-11-11 本文编辑 常秀青

引用本文: 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会, 中华医学会肿瘤学分会肺癌专家委员会, 国家病理质控中心. 非小细胞肺癌融合基因检测临床实践中国专家共识(2023版)[J]. *中华病理学杂志*, 2023, 52(6): 565-573. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20221111-00946.

