

XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN GEN EGFR BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN TRÊN MẪU MÔ UNG THƯ BIỂU MÔ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

Nguyễn Văn Duy¹ và Trần Văn Khánh^{2,✉}

¹Bệnh viện Phổi Trung ương

²Trường Đại học Y Hà Nội

Ứng dụng kỹ thuật y sinh học phân tử trong xác định đột biến gen *EGFR* đã đem lại những lợi ích nổi bật trong điều trị đích bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN), trong đó kỹ thuật giải trình tự gen và Realtime PCR đang được sử dụng phổ biến ở Việt Nam, cả 2 kỹ thuật đều có những ưu, nhược điểm riêng, có thể phối hợp, hỗ trợ cho nhau. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu: 1) Xác định đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật giải trình tự gen trên mẫu mô UTPKTBN; 2) So sánh kết quả xác định đột biến gen *EGFR* giữa kỹ thuật giải trình tự gen và Realtime PCR. Thu thập 78 mẫu DNA của bệnh nhân UTPKTBN đã được xác định có đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật Realtime PCR. Kỹ thuật giải trình tự gen đã được áp dụng để xác định đột biến gen *EGFR*, so sánh kết quả đột biến gen *EGFR* giữa 2 kỹ thuật Realtime PCR và giải trình tự gen. Kết quả cho thấy 68/78 mẫu bệnh nhân phát hiện đột biến tương đồng với kỹ thuật Realtime PCR (87,18%), 10 mẫu âm tính giả đều có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp ($\leq 35\%$). Tỷ lệ âm tính giả của kỹ thuật giải trình tự gen trong nghiên cứu là 12,82%, chủ yếu nằm trong nhóm có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp ($\leq 35\%$). Vì vậy, nên sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen tìm đột biến *EGFR* cho những mẫu mô có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư cao, với những mẫu có nồng độ thấp nên sử dụng kỹ thuật Realtime PCR.

Từ khóa: đột biến gen *EGFR*, ung thư phổi không tế bào nhỏ, kỹ thuật giải trình tự gen.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi có tỷ lệ mắc đứng thứ 2 (sau ung thư vú) và chiếm tỷ lệ tử vong cao nhất (18%) trong những bệnh ung thư thường gặp, trong đó chiếm 85% trường hợp ung thư phổi là UTPKTBN.¹ Việc xác định đột biến gen *EGFR* có ý nghĩa to lớn trong điều trị đích bệnh nhân UTPKTBN. Tháng 6/2009, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chính thức đưa ra khuyến cáo: bệnh nhân trước khi được chỉ định dùng thuốc ức chế *EGFR* cần phải được làm xét nghiệm tình trạng gen.² Tại Việt Nam, hiện nay có 2 phương pháp được sử

dụng phổ biến để xác định đột biến gen *EGFR*, đó là giải trình tự gen và realtime PCR. Trong đó, kỹ thuật realtime PCR có độ nhạy cao, có thể phát hiện các mẫu có tỷ lệ tế bào ung thư ở mức rất thấp, nhưng có giá thành cao, là một trở ngại lớn trong việc áp dụng thường quy.^{3,4} Kỹ thuật giải trình tự gen có thời gian trả kết quả chậm hơn (1 - 2 ngày) và yêu cầu tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư ở mức cao hơn so với kỹ thuật realtime PCR, tuy nhiên ta có thể phát hiện cả những đột biến đã biết và đột biến “mới” với giá thành khá rẻ, đây là một trong những lợi thế rất lớn khi số lượng mẫu nhiều, đặc biệt tại các nước đang phát triển như Việt Nam.⁵ Hiện tại, nhu cầu về tính chính xác của xét nghiệm xác định đột biến gen *EGFR* bệnh nhân UTPKTBN ngày càng cao nhưng tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá về tỷ lệ phát hiện mẫu

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 17/10/2022

Ngày được chấp nhận: 25/10/2022

dương tính của kỹ thuật giải trình tự gen so với những kỹ thuật khác, và sự ảnh hưởng của tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư đến tỷ lệ phát hiện đột biến của kỹ thuật này. Từ thực tế đó, đề tài tiến hành với mục tiêu: 1) *Xác định đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen trên các mẫu mô UTPKTBN*; 2) *So sánh kết quả xác định đột biến gen EGFR giữa kỹ thuật giải trình tự gen và Realtime PCR*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là các mẫu DNA được tách chiết từ khối u ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Nhóm nghiên cứu đã áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen để xác định các đột biến gen *EGFR*: 78 mẫu DNA của bệnh nhân UTPKTBN đã được xác định có đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật realtime PCR tại Bệnh viện Phổi Trung ương (kit ROCHE *EGFR* MUTATION v2).

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang.

Đánh giá tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư trên tiêu bản H&E và HMMD của những mẫu mô đã được thu thập DNA tách chiết.

Xác định đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật giải trình tự gen tại Trung tâm nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Kỹ thuật PCR

Các exon 18, 19, 20 và 21 gen *EGFR* lần lượt được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu cho từng exon theo chu trình nhiệt sau: *exon 18*: 94°C 15 giây, 58°C 45 giây, 72°C 30 giây, 35 chu kỳ - *exon 19*: 94°C 15 giây, 59°C 45 giây, 72°C 30 giây, 37 chu kỳ - *exon 20*: 94°C 15 giây, 59°C 45 giây, 72°C 30 giây, 36 chu kỳ - *exon 21*: 94°C 15 giây, 60°C 45 giây, 72°C 30 giây, 36 chu kỳ.

Kỹ thuật giải trình tự gen Sanger

Thành phần phản ứng PCR giải trình tự gen gồm: Buffer Big dye 5X, Big dye Terminator v3.1, mồi xuôi hoặc mồi ngược (10 pmol/μl), sản phẩm PCR các exon gen *GBA*. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng cho bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI - Mỹ).

Sản phẩm PCR giải trình tự sau khi tinh sạch được giải trình tự gen Sanger bằng máy ABI-3500 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện từ 1/2021 đến 8/2022 tại Trung tâm nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

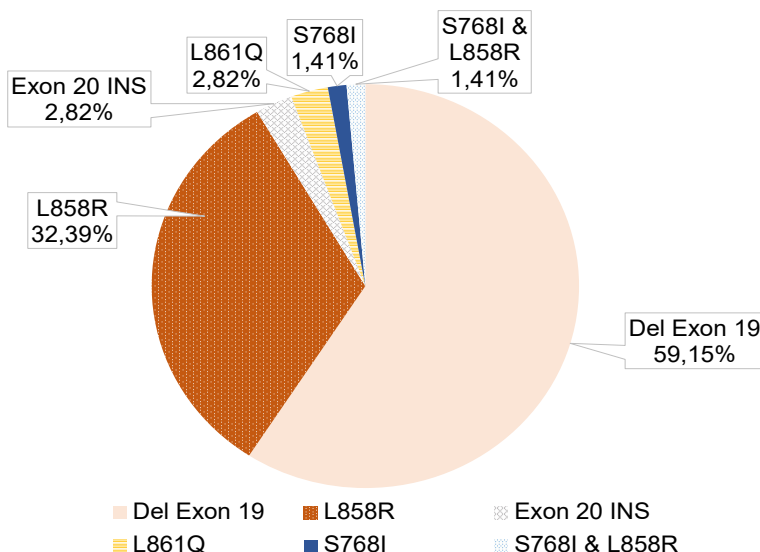
3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện vì mục đích khoa học. Nghiên cứu tiến hành theo nguyên tắc đạo đức trong Tuyên bố Helsinki. Xét nghiệm trên mẫu mô đã sử dụng trong chẩn đoán ban đầu UTPKTBN. Trong quá trình thực hiện nghiên cứu, hoàn toàn không can thiệp vào quyết định chẩn đoán và điều trị. Các thông tin của bệnh nhân cung cấp cho nghiên cứu sẽ được giữ bí mật.

III. KẾT QUẢ

1. Xác định đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen trên các mẫu mô UTPKTBN

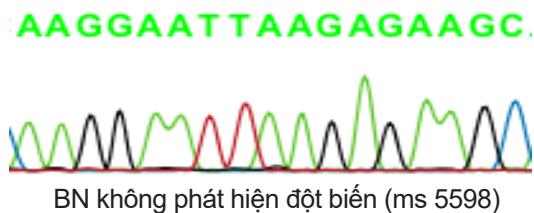
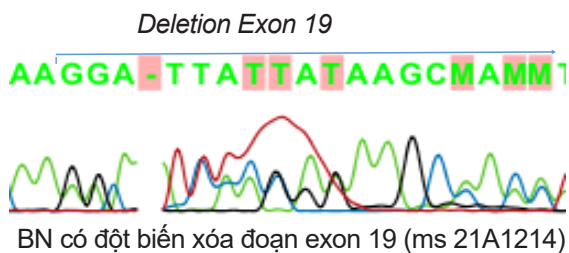
Thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen trên 78 mẫu nghiên cứu đã thu được 71/78 mẫu phát hiện đột biến gen *EGFR*, chiếm tỉ lệ 91%, trong đó đột biến xóa đoạn exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 chiếm tỉ lệ cao nhất, chiếm tỉ lệ thấp hơn là đột biến thêm đoạn exon 20, đột biến L861Q trên exon 21 với 2 trường hợp mỗi loại, đột biến S768I trên exon 20 và đột biến đôi S768I trên exon 20 & L858R trên exon 21 mỗi loại 1 trường hợp.



Biểu đồ 1. Tỷ lệ các loại đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen

Hai loại đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất là đột biến xóa đoạn exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 (tổng 2 loại chiếm 91,54%), các loại

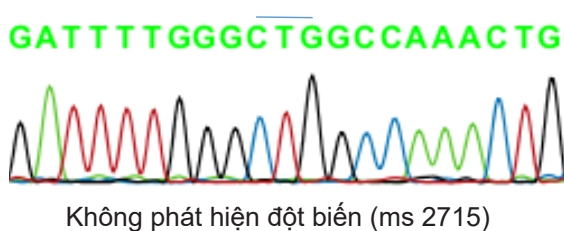
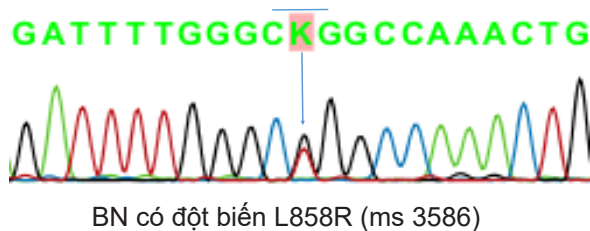
đột biến còn lại chiếm tỷ lệ thấp với số lượng chỉ 1 - 2 mẫu.



Hình 1. Kết quả xác định đột biến xóa đoạn exon 19 của gen EGFR

Hình 1 là hình ảnh đại diện cho kết quả xác định đột biến xóa đoạn exon 19 gen EGFR của bệnh nhân UTPKTBN bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, mẫu có

ms 5598 có trình tự nucleotid tương đồng, mẫu bệnh nhân có phát hiện đột biến (ms 21A1214) có hiện tượng xóa đoạn nucleotide, mũi tên chỉ vị trí bắt đầu có đột biến xóa đoạn.



Hình 2. Kết quả xác định đột biến L858R trên exon 21

Hình 2 là hình ảnh đại diện cho kết quả xác định đột biến L858R trên exon 21 gen *EGFR* của bệnh nhân UTPKTBN bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, mẫu có ms 2715 có trình tự nucleotide tương đồng, mẫu có phát hiện đột biến (ms 3586) phát hiện sự thay thế 1 nucleotide tại vị trí nucleotid 2537 trên exon 21, xuất hiện thêm một đỉnh T bị biến đổi thành G, làm cho acid amin Leucin (L) tại codon 858 biến đổi thành Arginine (R), gây nên đột biến L858R.

2. So sánh kết quả xác định đột biến gen *EGFR* giữa kỹ thuật giải trình tự gen và Realtime PCR

Thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen trên 78

mẫu nghiên cứu đã thu được 71/78 mẫu phát hiện đột biến gen *EGFR*, chiếm 91%, trong đó 68/78 trường hợp kết quả tương đồng với kỹ thuật Realtime PCR, 10/78 trường hợp âm tính giả (12,82%), hầu như nằm trong nhóm những mẫu có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp ($\leq 35\%$). Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã được công bố trên thế giới.

Kết quả thu được 10 mẫu âm tính giả gồm: 4 đột biến xóa đoạn exon 19, 3 đột biến L858R, 1 đột biến T790M trong đột biến đôi xóa đoạn exon 19 & T790M, 1 đột biến T790M trong đột biến đôi L858R & T790M, 1 đột biến G719X trong đột biến đôi S768I & G719X.

Bảng 1. So sánh đột biến gen *EGFR* giữa 2 kỹ thuật giải trình tự gen và Realtime PCR

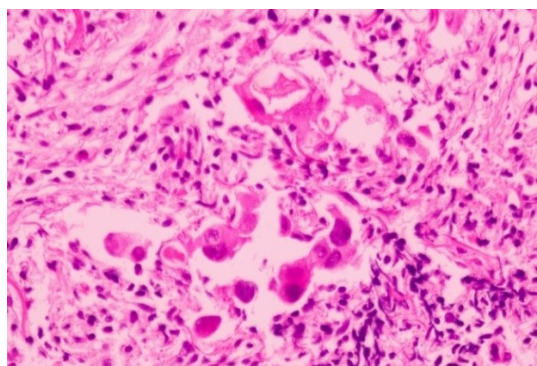
Loại đột biến	Kỹ thuật giải trình tự	Kỹ thuật Realtime PCR	Loại đột biến	Kỹ thuật giải trình tự	Kỹ thuật Realtime PCR
Del exon 19	42	45	S768I & L858R	1	1
L858R	23	25	Del exon 19 & T790M	0	1
Exon 20 Ins	2	2	L858R & T790M	0	1
L861Q	2	2	S768I & G719X	0	1
S768I	1	0			

Bảng 2. Tỷ lệ các mẫu âm tính giả theo loại đột biến

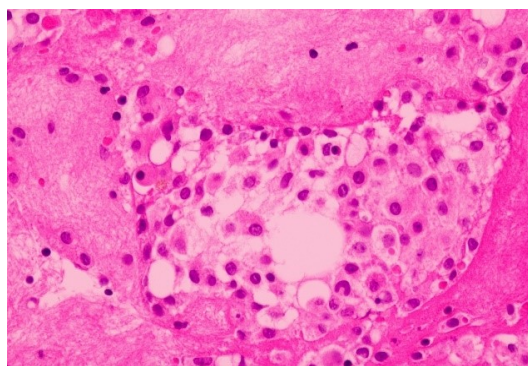
Các loại đột biến	Kết quả tương đồng	KQ âm tính giả
Del exon 19	41	4 (9%)
L858R	22	3 (12%)
Exon 20 Ins	2	0 (0%)
L861Q	2	0 (0%)
S768I & L858R	1	0 (0%)
Del exon 19 & T790M	0	1 (100%)
L858R & T790M	0	1 (100%)
S768I & G719X	0	1 (100%)

Kết hợp kết quả xác định tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư với kết quả giải trình tự gen, các mẫu có kết quả âm tính giả đều là những mẫu có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp ($\leq 35\%$), tuy nhiên vẫn có những mẫu có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư rất thấp (thấp nhất 7%) nhưng vẫn phát hiện đột biến (do tỷ lệ tế bào ung thư mang

gen đột biến cao). Hình 3 là hình ảnh đại diện cho kết quả xác định tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư ở quần thể mẫu nghiên cứu, cả hai mẫu đều có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp nhưng kết quả xác định đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật giải trình tự gen khác nhau dù đều đã được xác định có đột biến bằng kỹ thuật Realtime PCR.



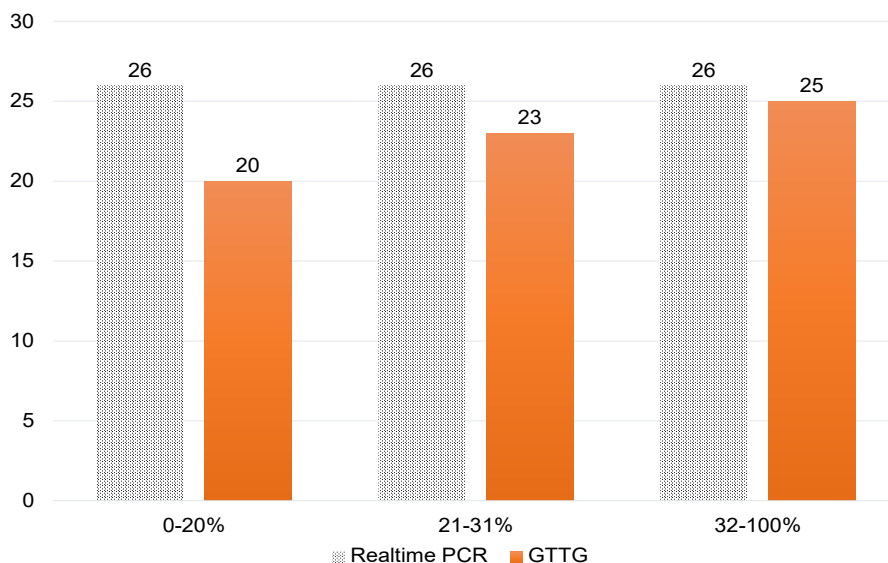
A. Mẫu âm tính giả
(Ms 5924 - 10% tế bào ung thư)



B. Mẫu dương tính
(CB 1301 - 7% tế bào ung thư)

Hình 3. Kết quả xác định tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư trên tiêu bản H&E

Chia các nhóm mẫu nghiên cứu thành 3 nhóm theo tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư lần lượt là 1 - 20%, 21 - 31%, 32 - 100%.



Biểu đồ 2. Tỷ lệ phát hiện đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen theo phần trăm tế bào ung thư

Ta có thể thấy tỷ lệ phát hiện đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen tăng dần ở các nhóm có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư cao hơn cũng như tỷ lệ âm tính giả giảm dần từ 23,08% - 11,54% - 3,85%.

IV. BÀN LUẬN

Để gia tăng độ chính xác của kỹ thuật giải trình tự gen, 78 mẫu DNA trước khi chạy đều được đo nồng độ và độ tinh sạch (A260/280) bằng phương pháp đo mật độ quang. Kết quả cho thấy các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280nm nằm trong khoảng $1,7 \div 2,0$. Kết quả này chứng tỏ các mẫu DNA có độ tinh sạch cao, đảm bảo chất lượng để thực hiện các kỹ thuật tiếp theo.

Kết quả giải trình tự gen trong quần thể nghiên cứu phát hiện 71 mẫu đột biến với tỷ lệ 2 loại đột biến cao nhất là đột biến xóa đoạn exon 19 (59,15%) và đột biến L858R (32,39%). Tỷ lệ này khá tương đồng với nhiều nghiên cứu tại Việt Nam, như nghiên cứu của Nguyễn Minh Hà (2014), Lê Kiều Minh (2016).^{2,6} Tỷ lệ mẫu có kết quả giải trình tự gen tương đồng với kỹ thuật Realtime PCR là 68/78 (87,18%), tỷ lệ mẫu âm tính giả là 12,78%, các mẫu âm tính giả đều có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp ($\leq 35\%$). Các mẫu có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp đồng nghĩa với việc tỷ lệ alen đột biến còn thấp hơn, vì không phải tế bào ung thư nào cũng mang gen đột biến, dẫn đến chiều cao các đỉnh tín hiệu trình tự nucleotid của hai quần thể alen này quá chênh lệch nhau, gây nhầm lẫn hoặc nghi ngờ không có đột biến mà chỉ là hiện tượng nhiễu của tín hiệu nền (nếu các giai đoạn kỹ thuật trước chưa được tối ưu hóa).⁷ Dựa vào kết quả xác định phần trăm tế bào ung thư, quần thể nghiên cứu được chia thành 3 nhóm có lượng mẫu bằng nhau: 0 - 20%, 21 - 31%, 32 - 100%. Biểu đồ 2 cho thấy tỷ lệ âm tính giả giảm rõ rệt ở các nhóm có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư cao. Theo khuyến

cáo của Bell, mẫu mô ung thư có tỷ lệ phần trăm cần đạt khoảng 40% để thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen, nhưng ở đây chúng tôi nhận thấy tỷ lệ âm tính giả ở nhóm có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư 32 - 100% là khá thấp (3,85%), có thể chấp nhận được nếu có kỹ thuật có độ nhạy cao hơn để đối chứng trong trường hợp đỉnh tín hiệu không rõ ràng và cân nhắc về một số ưu điểm khác của kỹ thuật giải trình tự gen.⁸

Kể từ khi được khám phá biểu hiện mức độ cao ở các khối u phổi, thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (epidermal growth factor receptor, EGFR) đã trở thành đích nhắm cho liệu pháp điều trị đích cho nhóm bệnh UTPKTBN (sự biểu hiện quá mức của gen *EGFR* hay đột biến gen *EGFR* nội bào đã được phát hiện ở 43 - 89% trường hợp).⁹ Nhiều nghiên cứu đã báo cáo nhóm UTPKTBN có đột biến gen *EGFR* đáp ứng rất tốt với thuốc ức chế hoạt tính tyrosine kinase của *EGFR*, được gọi là liệu pháp điều trị trúng đích (LPĐTTĐ).^{2,10} Có khoảng 30 loại đột biến khác nhau ở exon 18, 19, 20 và 21 của gen *EGFR* đã được công bố là có liên quan đến đáp ứng tốt của người bệnh với LPĐTTĐ, trong đó hai loại đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất ở mô UTPKTBN (90%) là đột biến xóa đoạn LREA exon 19 và đột biến điểm L858R exon 21.¹¹ Hiện nay, với sự phát triển của các kỹ thuật điện di, PCR, sự giúp đỡ của tin y sinh, ngày càng nhiều các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đáp ứng được các yêu cầu cao trong việc xác định các loại đột biến gen ở bệnh nhân ung thư nói chung và nhóm bệnh nhân ung thư phổi nói riêng. Nhưng ở các nước phát triển như Việt Nam, để đưa xét nghiệm đột biến gen *EGFR* trở nên thường quy cần có kỹ thuật với độ chính xác và giá thành xét nghiệm phải chấp nhận được.

Kỹ thuật Realtime PCR với ưu thế là độ nhạy cao, thời gian trả kết quả nhanh, hiện được coi là một trong những xét nghiệm hiệu quả nhất

trong nhóm “kỹ thuật phát hiện trúng đích”, tuy nhiên với giá thành còn khá cao, xét nghiệm này gây tốn kém cho bệnh nhân.¹² Được xem là một trong những kỹ thuật có giá thành phù hợp, giải trình tự gen là phương pháp cổ điển nhưng vẫn được ứng dụng trong thực tiễn lâm sàng, kỹ thuật giải trình tự gen với ưu điểm là kỹ thuật không phức tạp, có thể tiến hành cùng lúc nhiều mẫu, phát hiện được những đột biến đã biết và đột biến “mới” với giá thành rẻ, hiện vẫn được coi là “tiêu chuẩn vàng”, tuy nhiên kỹ thuật này có độ nhạy thấp hơn so với kỹ thuật Realtime PCR, theo đánh giá của Bell, mẫu mô ung thư phải có lớn hơn 40% tế bào ung thư để có đủ điều kiện xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen.⁸ Với những mẫu có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp, đặc biệt với những bệnh nhân ung thư phổi giai đoạn muộn lấy bệnh phẩm chủ yếu bằng phương pháp sinh thiết xuyên thành ngực (bệnh phẩm nhỏ, số lượng tế bào ung thư thấp) thì kỹ thuật giải trình tự gen có nhiều hạn chế. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ âm tính giả là 12,82%, trong nghiên cứu của Nguyễn Minh Hà (2014), tỷ lệ âm tính giả là 24,75%.^{2,6}

Vì vậy, trong xét nghiệm tìm đột biến gen *EGFR* ở bệnh nhân UTPKTBN cần xem xét ưu nhược điểm của 2 kỹ thuật trên, đưa ra sự lựa chọn phù hợp để đem lại lợi ích hài hòa cho bệnh nhân về mặt kinh phí, thời gian chờ đợi nhưng vẫn đảm bảo được tính chính xác.

V. KẾT LUẬN

Thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen trên 78 mẫu nghiên cứu đã thu được 71/78 mẫu phát hiện đột biến gen *EGFR*, chiếm tỉ lệ 91%, trong đó đột biến xóa đoạn exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 chiếm tỉ lệ cao nhất.

Phát hiện 68/78 trường hợp kết quả tương đồng với kỹ thuật Realtime PCR, 10/78 trường hợp âm tính giả (12,82%), hầu hết nằm trong nhóm những mẫu có tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư thấp ($\leq 35\%$).

Lời cảm ơn

Xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ từ tập thể khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Phổi Trung ương và Trung tâm nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107.
2. Nguyễn Minh Hà. *Xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS quyết định tính đáp ứng thuốc trong điều trị bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ*. Trường Đại học Y Hà Nội; 2014.
3. Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, Gainor JF, Heist RS. Lung cancer. *Lancet Lond Engl*. 2021;398(10299):535-554. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00312-3.
4. Matsubara T, Nakajima E, Namikawa H, et al. Investigation of EGFR mutations in non-small cell lung cancer usually undetectable by PCR methods. *Mol Clin Oncol*. 2022;16(1):15. doi: 10.3892/mco.2021.2447.
5. Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(10):1742-1751. doi: 10.1200/JCO.2007.12.1178.
6. Minh LK, Ngọc TV, Braeuer RR. Xác định đột biến EGFR ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Published online 2016:8.
7. Khuất Hữu Thanh. *Kỹ Thuật Gen - Nguyên Lý và Ứng Dụng*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2006.
8. Asano H, Toyooka S, Tokumo M, et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006;12(1):43-48. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0934.

9. Colling R, Bancroft H, Langman G, Soilleux E. Fully automated real-time PCR for EGFR testing in non-small cell lung carcinoma. *Virchows Arch.* 2019;474(2):187-192. doi: 10.1007/s00428-018-2486-y.
10. Yukari Tsubata, Ryosuke Tanino, Takeshi Isobe. Current Therapeutic Strategies and Prospects for EGFR Mutation-Positive Lung Cancer Based on the Mechanisms Underlying Drug Resistance. *Cells.* 2021 Nov;10(11):3192. PMC. Accessed October 21, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8619018/>.
11. Chan BA, Hughes BGM. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(1):36-54. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01.
12. Tạ Thành Văn. *PCR và Một Số Kỹ Thuật y Sinh Học Phân Tử.* Vol 122. Nhà xuất bản Y học; 2010.

Summary

DETECTION OF EGFR MUTATIONS BY GENE SEQUENCING TECHNIQUE FROM FFPE NON-SMALL CELL LUNG CANCER

The application of molecular biomedical techniques in identifying mutations in *EGFR* gene has greatly facilitated targeted therapy for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Gene sequencing techniques and Realtime PCR are commonly used in Vietnam to develop targeted therapy, and both techniques have their own advantages and disadvantages and can be combined to complement each other. This study was conducted to 1) determine the rate of *EGFR* mutation by gene sequencing technique from FFPE NSCLC and 2) compare the results of *EGFR* mutations identified by gene sequencing and Realtime PCR. A total of 78 DNA samples were collected from NSCLC patients with *EGFR* gene mutations as identified by Real-time PCR. Sequencing technique was applied to identify *EGFR* gene mutations, and the result was compared to the results of Realtime PCR. Most samples (68/78, 87.18%) had similar mutations as those found by Realtime PCR. All 10 false negative samples had low percentages of cancer cells ($\leq 35\%$). The false-negative rate of the sequenced samples in the study was 12.82%, mainly in the group with a low percentage of cancer cells ($\leq 35\%$). The results suggest that, to find *EGFR* mutations for tissue samples with a high percentage of cancer cells, sequencing technique should be used, and for samples with low concentrations of cancer cells, Realtime PCR should be used.

Keywords: EGFR mutations, Non small cell lung cancer, sequencing technique.