

Одобен
Объединенной комиссией
по качеству медицинских услуг
Министерства здравоохранения
Республики Казахстан
от «21» декабря 2023 года
Протокол №200

**КЛИНИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ МЕДИЦИНСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ,
ХИМЕРНЫХ ТРАНСКРИПТОВ И ВАРИАНТОВ КОПИЙНОСТИ В
КЛЮЧЕВЫХ 52 ГЕНАХ СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКОВЫХ
ОПУХОЛЕЙ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

1. Вводная часть

1.1 Код(ы) МКБ-10:

МКБ-10	
Код	Название
C67	Рак мочевого пузыря
C50	Рак молочной железы
C18-C20	Колоректальный рак
C15,C16	Рак пищевода и желудка
C54	Рак эндометрия
C71	Глиобластома
C64	Рак почек
C22	Рак печени
C76	Рак головы и шеи
C43-C44	Меланома
C45	Мезотелиома
C34	Немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого
C41	Остеосаркома
C56	Рак яичников
C25	Рак поджелудочной железы
C61	Рак простаты
C73	Рак щитовидной железы

1.2 Дата разработки протокола: 2022 год.

1.3 Сокращения, используемые в протоколе:

NGS – next generation sequencing
SBS – секвенирование методом синтеза
НИОКР – Научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы
WES – секвенирование всего экзона
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

FISH – Флуоресцентная гибридизация in situ
RT-PCR – ПЦР в реальном времени
CNV - Гены вариаций количества копий

1.4 Пользователи протокола: медицинские генетики, онкологи, гематологи, терапевты, педиатры, участковые врачи, врачи общей практики.

1.5 Категория пациентов: взрослые, дети.

1.6 Определение: Молекулярно-генетический анализ мутаций, химерных транскриптов и вариантов копийности в ключевых 52 генах связанных с развитием раковых опухолей с использованием NGS технологии (таргетное секвенирование) позволяет одновременное обнаружение сотен вариантов по 52 генам, относящимся к солидным опухолям различной локализации. Это целенаправленный мульти-биомаркерный анализ, который позволяет обнаруживать горячие точки, SNV, инделлы, CNV и слияния генов из ДНК и РНК в одном рабочем процессе [1, 4].

1.7 Клиническая классификация:

Классификация генов [2,3]

Гены, анализируемые для выявления вариантов последовательности ДНК (Горячие точки)		Гены вариаций количества копий (CNVs)	Гибридные гены (fusion genes)
35 генов		19 генов	23 генов
ДНК			РНК
AKT1	JAK1	ALK	ABL1
ALK	JAK2	AR	ALK
AR	JAK3	BRAF	AKT3
BRAF	KIT	CCND1	AXL
CDK4	KRAS	CDK4	BRAF
CTNNB1	MAP2K1	CDK6	EGFR
DDR2	MAP2K2	EGFR	ERBB2
EGFR	MET	ERBB2	ERG
ERBB2	MTOR	FGFR1	ETV1
ERBB3	NRAS	FGFR2	ETV4
ERBB4	PDGFRA	FGFR3	ETV5
ESR1	PIK3CA	FGFR4	FGFR1
FGFR1	RAF1	KIT	FGFR2
FGFR2	RET	KRAS	FGFR3
FGFR3	ROS1	MET	MET
GNA11	SMO	MYC	NTRK1
GNAQ		MYCN	NTRK2
HRAS		PDGFRA	NTRK3
IDH1		PIK3CA	PDGFRA
IDH2			PPARG
			RAF1
			RET
			ROS1

2. Методы, подходы и процедуры диагностики и лечения.

2.1 Цель проведения процедуры и вмешательства:

Метод применяется для идентификации новых мутаций для поиска новых генетических aberrаций и связанных с ними потенциальных терапевтических мишеней для различных локализаций опухоли, а также для тестирования соматических мутаций [5].

2.2 Показания и противопоказания к процедуре/ вмешательству.

2.3 Показания к процедуре/ вмешательству:

- Пациенты, имеющие злокачественные новообразования (солидные опухоли).

2.4 Противопоказания к процедуре/вмешательству: нет.

2.5 Перечень основных и дополнительных диагностических мероприятий: нет.

2.6 Требования к проведению процедуры и вмешательства:

- Кратность применения: исследование проводится однократно, повторяется при клинической необходимости.
- Техника проведения: применение секвенирования нового поколения (NGS технологии).
- Критерии диагностики: наличие злокачественного новообразования.
- Чувствительность: высокочувствительный метод, который включает от 100 до 130 млн прочтений пар нуклеотидов.

Требования к соблюдению мер безопасности, санитарно-эпидемиологическому режиму:

- Меры безопасности и противоэпидемический режим согласно Санитарным правилам «Санитарно-эпидемиологические требования к объектам здравоохранения», утвержденным постановлением Правительства Республики Казахстан от 11 августа 2020 года № ҚР ДСМ-96/2020.

Требования к оснащению лаборатории.

Процедурные кабинеты по проведению молекулярно-генетического анализа мутаций должны быть оснащены следующим оборудованием:

- Автоматическая станция для выделения ДНК;
- Флуориметр;
- Центрифуга;
- Ламинарный шкаф;
- Проточный бактерицидный рециркулятор воздуха;
- Холодильник;
- Система количественной и цифровой ПЦР-РТ в комплекте с роботом для подготовки чипов;
- Термоциклер;
- Вортекс плащечный;

- Универсальный вортекс;
- Бокс для стерильных работ;
- Секвенатор;
- Термоциклер;
- Морозильная камера;
- Система для автоматизированной подготовки микросфер с ДНК.

Требования к расходным материалам, медикаментам:

- Материал для исследования: ткани опухоли, заключенные в парафиновый блок, фиксированный формалином (FFPE).
- Расходные материалы представлены в Таблице 1.

Требования к подготовке пациента:

- Не применимо, так как в лабораторию поступают ткани опухоли, заключенные в парафиновый блок, фиксированный формалином (FFPE).

Методика проведения процедуры:

- Данная процедура проводится в соответствии с утвержденными стандартными операционными процедурами организации и руководством по протоколу NGS используемой технологии.

I этап: Подготовка библиотеки*:

Подготовка библиотеки состоит из следующих шагов:

- выделение образца ДНК;
- ПЦР-амплификация ДНК;
- очистка библиотеки.

*«Библиотека» - для параллельного высокопроизводительного секвенирования ДНК должна быть специальным образом подготовлена. Её нужно «нарезать» на фрагменты определённой длины и прикрепить к каждому фрагменту особую метку, которая нужна для нескольких этапов непосредственного секвенирования в приборе и последующей обработки «сырых» данных.

II этап: Секвенирование:

Чтение каждой нуклеотидной последовательности ДНК в зависимости от характеристик генетического анализатора (секвенатора нового поколения – NGS).

III этап: Биоинформационный анализ:

Производится биоинформационный анализ полученных данных и лабораторная интерпретация полученных результатов.

Общая длительность проведения процедуры составляет 183 часа и проводится в несколько этапов.

Таблица 1. Этапы проведения процедуры NGS.

Наименование этапа	Краткое описание	Количество задействованного персонала	Длительность	Расходный материал
1. Преаналитический	Выделение ДНК, РНК из парафиновых блоков, измерение концентрации полученных данных	Лаборант/врач-генетик	6 часов	1.Набор для выделения ДНК,РНК 2.Пробирка типа -10 шт 3.Наконечники: 1000 мкл – 5 шт. 0-200 мкл – 10 шт. 0-10 мкл – 5 шт. 4.Наборы для измерения концентрации ДНК и РНК.
	Приготовление библиотеки (работа с образцами) для панельного секвенирования	Врач-генетик	48 часов	1.Набор для приготовления библиотеки 2.Пробирки с низкой адгезивностью - 10 шт 3.Пробирки 0-200 мкл – 40 шт. 500 мкл - 20 шт. 2 мл – 40 шт. 3.Наконечники: 1000 мкл – 96 шт. 0-200 мкл –96 шт. 0-10 мкл – 96 шт.
	Перенос готовых библиотек на биочипы Процесс	Врач-генетик	20 часов	1.Набор для приготовления библиотеки с помощью автоматической системы.

	секвенирования - считывания полученной информации с биочипа и перенос данных в программное обеспечение			2.Набор для панельного секвенирования – 2 набора. 3.Наконечники: 0-200 мкл – 12 шт. 0-10 мкл – 12 шт.
2. Аналитический	Биоинформационный анализ полученных данных, работа с базами данных, лабораторная интерпретация полученных результатов*	Врач-генетик	4-5 дней	Облачный сервис
3. Постаналитический	Оформление и выдача результатов	Врач-генетик	1 час	-
*Клиническая интерпретация полученных данных производится отдельно врачом-генетиком на консультативном приеме				

2.7 Индикаторы эффективности процедуры: Определение мутации для назначения таргетной терапии, соответствующей мутационному статусу опухоли.

3. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОТОКОЛА.

3.1 Список разработчиков протокола с указанием квалификационных данных:

- 1) Абильдинова Гульшара Жусуповна – доктор медицинских наук, профессор, врач-генетик высшей категории, руководитель лаборатории персонализированной геномной диагностики РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 2) Жабаква Жанна Маратовна – врач-генетик второй категории лаборатории персонализированной геномной диагностики РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 3) Боровикова Анна Викторовна – врач-генетик первой категории лаборатории персонализированной геномной диагностики РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 4) Шинтемирова Асель Асылбековна – врач-генетик второй категории лаборатории персонализированной геномной диагностики РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 5) Нурпеисова Алтын Алданышовна – клинический фармаколог, заведующая клинико-фармакологическим отделом РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 6) Авдеев Андрей Владиславович – доктор философии (PhD), руководитель отдела оценки технологий здравоохранения и стратегического развития РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 7) Ахметова Макпал Жапаровна – МРН, специалист отдела оценки технологий здравоохранения и стратегического развития РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ.

3.2 Указание на отсутствие конфликта интересов: нет.

3.3 Рецензент: Кайдарова Диляра Радиковна – доктор медицинских наук, профессор, академик Национальной академии наук Республики Казахстан, врач онколог высшей категории, главный внештатный онколог Министерства здравоохранения Республики Казахстан, президент Ассоциации онкологов Республики Казахстан, директор Казахского научно-исследовательского института онкологии и радиологии.

3.4 Указание условий пересмотра протокола: Пересмотр протокола через 5 лет после его опубликования и с даты его вступления в действие или при наличии новых методов с уровнем доказательности.

3.5 Список использованной литературы:

- 1) Luthra, R., Chen, H., Roy-Chowdhuri, S., & Singh, R. R. (2015). Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: advantages and challenges. *Cancers*, 7(4), 2023-2036.
- 2) Oncomine Focus Assay. Retrieved December 7, 2021. <https://www.thermofisher.com/kz/en/home/clinical/preclinical-companion-diagnostic-development/oncomine-oncology/oncomine-focus-assay.html>.
- 3) Lee, A., Lee, S., Jung, C., Park, G., Lee, K., & Choi, H. et al. (2018). Use of the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel in clinical molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours: With emphasis on validation with relevant single molecular pathology tests and the Oncomine Focus Assay. *Pathology - Research And Practice*, 214(5), 713-719. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.03.009>.
- 4) de Biase, D., Acquaviva, G., Visani, M., Sanza, V., Argento, C. M., De Leo, A., & Tallini, G. (2020). Molecular diagnostic of solid tumor using a next generation sequencing custom-designed multi-gene panel. *Diagnostics*, 10(4), 250.
- 5) Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., & Gastier-Foster, J. et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics In Medicine*, 17(5), 405-423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- 6) User Guide: Oncomine™ Comprehensive Assay v3. (2021). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A35805>.
- 7) Williams, H., Walsh, K., Diamond, A., Oniscu, A., & Deans, Z. (2018). Validation of the Oncomine™ focus panel for next-generation sequencing of clinical tumour samples. *Virchows Archiv*, 473(4), 489-503. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2411-4>.