**УСТАНОВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ, ХИМЕРНЫХ ТРАНСКРИПТОВ И ВАРИАНТОВ КОПИЙНОСТИ В 161 ГЕНЕ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОПУХОЛЕЙ**

1. **ВВОДНАЯ ЧАСТЬ**
   1. **Код(ы) МКБ-10 и 11:**

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

|  |  |
| --- | --- |
| **МКБ-11** | |
| **Код** | **Название** |
| 2C60-2C6Z | Злокачественные новообразования молочной железы |
| 2C73 | Злокачественное новообразование яичников |
| 2B90-2B9Y | Злокачественные новообразования толстой кишки |
| 2С82 | Рак простаты |
| 2C25 | Злокачественные новообразования бронхов и легких |
| 2A00-2A0Z | Рак головы и шеи |
| 2B70-72 | Рак пищевода и желудка |
| 2С7Y | Рак эндометрия |
| 2A00.00- 2A02.00 | Глиобластома |
| 2С90 | Рак почек |
| XH0XV0 | Мезотелиома |
| 2B51 | Остеосаркома |
| 2С94 | Рак мочевого пузыря |
| 2C10 | Рак поджелудочной железы |
| 2D10 | Рак щитовидной железы |
| 2C30 | Меланома |
| 2C12 | Рак печени |

* 1. **Дата разработки/пересмотра протокола:** разработка 2025 год, пересмотр2029 год.
  2. **Сокращения, используемые в протоколе:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| NGS | - | next generation sequencing |
| SBS | - | секвенирование методом синтеза |
| WES | - | секвенирование всего экзома |
| ДНК | - | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| РНК | - | рибонуклеиновая кислота |
| ПЦР | - | полимеразная цепная реакция |
| FISH | - | флуоресцентная гибридизация |
| FFPE | - | парафинизированные образцы фиксированные в формалине |

* 1. **Пользователи протокола:** медицинские генетики, онкологи, гематологи, терапевты, педиатры, участковые врачи, врачи общей практики.
  2. **Категория пациентов:** пациенты, имеющие злокачественные новообразования (солидные опухоли).
  3. **Определение**:

Данная технология представляет собой молекулярно-генетический анализ, основанный на секвенировании следующего поколения (Next-Generation Sequencing, NGS), с использованием панели Oncomine Comprehensive Assay. Она позволяет одновременно выявлять соматические мутации, химерные транскрипты, варианты копийности генов. Комплексный анализ охватывает 161 ген, ассоциированный с раком, что позволяет обнаруживать релевантные SNV, CNV, MNV, небольшие вставки/делеции (indel), слияния генов и вставки из 161 уникального гена, ассоциированного с раком, в рамках одного оптимизированного рабочего процесса. Знание мутационного профиля может помочь онкологам при принятия клинических решений в разработке оптимального персонализированного лечения [1].

* 1. **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 |

1. **МЕТОДЫ, ПОДХОДЫ И ПРОЦЕДУРЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ**
2. **Цель проведения процедуры/вмешательства [4]:**

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

1. **Показания и противопоказания к проведению процедуры/ вмешательства [5-6]:**

**Показания к проведению процедуры/вмешательства:**

Пациенты, имеющие злокачественные новообразования (солидные опухоли).

**Противопоказания к проведению:** нет

1. **Перечень основных и дополнительных диагностических мероприятий:** нет
2. **Требования к проведению процедуры/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.

**Условия для проведения (соблюдение мер безопасности, санитарно-противоэпидемический режим):**

* 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.
* К выполнению анализа допускаются врачи-лаборанты, молекулярные биологи или генетики, прошедшие специализированное обучение по работе с методами молекулярно-генетического анализа (включая NGS, ПЦР, FISH и др.) и имеющие подтверждённый опыт работы с онкологическим материалом.
* Рекомендуется, чтобы специалист, интерпретирующий результаты, имел опыт не менее 3 лет в области молекулярной онкологии или клинической генетики, а также навыки клинико-лабораторной корреляции генетических данных с клинической картиной заболевания.
* Забор и транспортировка биологического материала (опухолевая ткань, кровь, костный мозг и пр.) должны выполняться с соблюдением строгого противоэпидемического и биобезопасного режима, в соответствии с установленными нормативами по обращению с потенциально опасным биоматериалом.
* При работе с фиксированными тканями (FFPE-блоки) необходимо соблюдать условия хранения, исключающие деградацию нуклеиновых кислот, а при использовании свежего материала – контролировать температурный режим и время доставки до лаборатории.
* Все помещения и оборудование, используемые для молекулярно-генетического тестирования, должны регулярно проходить контроль чистоты, калибровку и техническое обслуживание, исключающее возможность контаминации и получения недостоверных результатов.
* Перед выполнением анализа необходимо провести идентификацию пациента, двойную верификацию пробы и сопроводительных документов, а также задокументированное подтверждение информированного согласия на проведение молекулярно-генетического тестирования и обработку биоматериала.

**Требование к оснащению**:

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 плашечный;
* 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:**

**Основные:**

* Направление профильного специалиста (онколога, гематолога, хирурга и др.) с указанием диагноза и целей исследования. Рекомендуется наличие амбулаторной карты или выписки из истории болезни с клинико-инструментальными данными, подтверждающими опухолевый процесс;
* Информирование пациента или его официального представителя о диагностической цели исследования, его объёме, возможных последствиях и о порядке хранения и использования биологического материала, с обязательным подписанием информированного добровольного согласия на проведение молекулярно-генетического тестирования;
* Предоставление данных о предшествующем лечении, особенно о проведённой химиотерапии, таргетной или лучевой терапии, так как это может повлиять на качество и интерпретацию результатов исследования;
* Предварительная оценка общего анализа крови, включая показатели гемостаза (особенно при заборе материала инвазивным методом: пункцией, биопсией и т.п.), с учётом риска кровотечения у пациентов, принимающих антикоагулянты или антиагреганты;
* Наличие образца опухолевой ткани или крови, пригодного для молекулярного анализа. Материал должен быть собран в соответствии с протоколами (ПЦР, секвенирование, FISH и т.д.) и согласован с лабораторией, проводящей исследование.

**Дополнительные:**

* Результаты гистологического/цитологического заключения, подтверждающие злокачественный характер новообразования и указывающие на пригодность биологического материала для генетического анализа;
* Предоставление информации о сопутствующих заболеваниях, в том числе генетических или наследственных, которые могут повлиять на интерпретацию результатов;
* Предоставление данных об уже проведённых молекулярно-генетических исследованиях (если проводились ранее), включая результаты NGS, FISH, ПЦР и др.;
* Консультация врача-генетика (при необходимости), особенно при подозрении на наследственные формы рака или при выявлении клинически значимых мутаций, требующих разъяснения и последующего наблюдения;
* Согласование с лабораторией условий транспортировки и хранения биоматериала, включая сроки доставки, тип фиксации (например, FFPE или свежезамороженная ткань) и объём пробы.

**Методика проведения процедуры/вмешательства [7]:**

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 задействованнoго 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 секвенирования - считывания полученной информации с биочипа и перенос данных в программное обеспечение | Врач-генетик | 20 часов | 1.Набор для приготовления библиотеки с помощью автоматической системы.  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 | | | | |

**Возможные осложнения [8]:**

Молекулярно-генетическое исследование само по себе является **неинвазивным и безопасным методом**, однако осложнения могут быть связаны с **процедурами забора биоматериала**, особенно если материал получают инвазивными методами (пункционная или хирургическая биопсия, костномозговая аспирация и др.).

Процент осложнений зависит от метода получения образца, но в целом остаётся **низким (менее 1–2%)** при соблюдении стандартов безопасности и правил асептики.

#### ****Возможные осложнения при заборе биоматериала:****

• локальное кровотечение в месте пункции;

• гематома или отёк мягких тканей;

• инфицирование зоны биопсии;

• пневмоторакс (при пункции грудной клетки);

• болезненность или дискомфорт в месте инвазивного вмешательства;

• аллергические реакции на анестетики (при необходимости местного обезболивания).

#### ****Редкие, но возможные осложнения:****

• воспалительные реакции (например, медиастенит или перитонит — при несоблюдении техники);

• рефлекторные реакции (бронхоспазм, вазовагальный обморок);

• гипертермия или лихорадка на фоне постбиопсийного воспаления;

• ошибки в идентификации биоматериала, влияющие на достоверность результатов (необходим строгий контроль этапов транспортировки и маркировки).

Пациенты с признаками **сильной боли, кровотечения, лихорадки или дыхательных расстройств** после процедуры забора материала подлежат немедленному медицинскому осмотру и дообследованию.

**Методы предотвращения:**

В целях недопущения ложноположительных или ложноотрицательных результатов при выявлении мутаций, химерных транскриптов и изменений числа копий генов, необходимо строго соблюдать протоколы преаналитического, аналитического и постаналитического этапов.

Во избежание деградации нуклеиновых кислот и артефактов амплификации, крайне важно использовать свежие или корректно зафиксированные образцы тканей (например, FFPE-блоки с контролем качества фиксации) и соблюдать температурный режим хранения. При выделении РНК и ДНК должны применяться реагенты, находящиеся при температуре, рекомендованной производителем (t = 4–8 ˚C для большинства буферов и ферментов, t = −20–−80 ˚C для долгосрочного хранения образцов и экстрагированных нуклеиновых кислот). Работа с РНК требует строгой РНКазы-безопасной среды.

При секвенировании возможно возникновение технических артефактов, включая псевдохимерные транскрипты, особенно при использовании методов, основанных на амплификации (например, PCR). Для предотвращения подобных осложнений рекомендуется использовать высокоспецифичные праймеры и валидированные панели. В случаях подозрения на артефакт следует провести подтверждающий анализ другим методом (например, FISH, qPCR или альтернативным NGS-подходом).

В случае обнаружения потенциально клинически значимых мутаций в сомнительных зонах или при низкой аллельной частоте (<5%) следует пересмотреть качество исходных данных, провести повторный анализ и, при необходимости, верифицировать результат на дублированном образце. При критических ошибках анализа (например, контаминация, деградация образца, ошибки в биоинформатике) требуется полное повторение процедуры с новым биологическим материалом.

Кроме того, важно защищать образцы от перекрёстной контаминации. Это включает физическое разделение зон экстракции, амплификации и пост-ПЦР-анализа, а также регулярное проведение контроля чистоты (negative controls, no-template controls).

В ряде случаев могут потребоваться повторные биопсии или использование альтернативного биологического материала (жидкостная биопсия), особенно при неудовлетворительном качестве исходного образца.

1. **Индикаторы эффективности процедуры/вмешательства:**

Определение мутации для назначения таргетной терапии, соответствующей мутационному статусу опухоли. Анализ NGS на основе OCAv3 показал высокую чувствительность и продемонстрировал обнаружение большого спектра мутаций: коделеция 1p/19q, TERT, TP53 и ATRX, IDH, CCNE1, SMARCA4, ARID1A, MED12, MTOR, MYCL1, NRAS, AKT2, NOTCH1, ARID1A и др гены, которые могут помочь установить точный диагноз [9].

1. **ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОТОКОЛА:**
   1. **Список разработчиков:**
2. Абильдинова Гульшара Жусуповна – д.м.н., профессор, главный генетик Министерства здравоохранения Республики Казахстан, врач высшей категории, руководитель лаборатории персонализированной геномной диагностики Больницы;
3. Есентаева Сурия Ертугыровна – Врач онколог высшей квалификационной категории, заведующая кафедрой онкологии с курсом радиологии НУО «Казахстанско-Российский медицинский университет»;
4. Жабагин Куанткан Талгатович – MD, PhD, врач онколог высшей квалификационной категории, врач ядерной медицины Центра ядерной медицины Больницы;
5. Абдрешева Гульнара Курманжановна – Магистр делового администрирования в здравоохранении «ЕМВА», главный внештатный генетик г.Алматы, врач высшей категории, руководитель центра «Охраны плода» ГЦП; Центр перинатологии и детской кардиохирургии г.Алматы;
6. Суйндикова Нурбиби Мыктыбековна – Магистр делового администрирования в здравоохранении «ЕМВА», главный внештатный генетик г.Шымкент, врач высшей категории, руководитель центра «Охраны плода» городской перинатальный центр;
7. Шпеков Азат Салимович – заместитель директора по хирургии Больницы;
8. Жетписбаев Берик Барлыбаевич – МВА, профессор, заведующий патологоанатомическим отделением АО «Национальный центр нейрохирургии»;
9. Бариева Гульзада Жумабаевна – MPH, ведущий специалист отдела науки и инновации Больницы;
10. Нурпеисова Алтын Алданышовна – Клинический фармаколог, заведующий Клинико-фармакологического отдела Больницы;
11. Салов Роман Владимирович – Магистр делового администрирования, заместитель руководителя отдела науки и инновации Больницы;
12. Алчимбаева Макпал Аскаровна – MJs, PhD, ведущий специалист отдела науки и инновации Больницы, секретарь.
    1. **Конфликт интересов**: нет.
    2. **Рецензенты:**
13. 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;
14. Джаксыбаева Алтыншаш Хайруллаевна – доктор медицинских наук, врач-невролог высшей категории, главный внештатный детский невролог МЗ РК заведующий кафедрой неврологии НАО «Медицинский университет Астана».
    1. **Условия 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. M F Mosele, C B Westphalen, A Stenzinger, F Barlesi, A Bayle, I Bièche, J Bonastre, E Castro, R Dienstmann, A Krämer, A M Czarnecka, F Meric-Bernstam, S Michiels, R Miller, N Normanno, J Reis-Filho, J Remon, M Robson, E Rouleau, A Scarpa, C Serrano, J Mateo, F André. Practice Guideline Ann Oncol. 2024 Jul;35(7):588-606. doi: 10.1016/j.annonc.2024.04.005. Epub 2024 May 27. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group.

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. Nima Ghoreyshi, Reza Heidari, Arezoo Farhadi, Mohsen Chamanara, Nastaran Farahani, Mahmood Vahidi, Javad Behroozi. Next-generation sequencing in cancer diagnosis and treatment: clinical applications and future directions. Discov Oncol. 2025 Apr 20;16(1):578. doi: 10.1007/s12672-025-01816-9.

5. Ricella Souza da Silva, Fernando Schmitt. Next step of molecular pathology: next-generation sequencing in cytology. J Pathol Transl Med. 2024 Nov 7;58(6):291–298. doi: 10.4132/jptm.2024.10.22

6. Liya Popova, Valerie J Carabetta. The Use of Next-Generation Sequencing in Personalized Medicine. Methods Mol Biol. 2025:2866:287-315. doi: 10.1007/978-1-0716-4192-7\_16.

7. Vestergaard, Lau K., Douglas N. P. Oliveira, Tim S. Poulsen, Claus K. Høgdall, and Estrid V. Høgdall. 2021. "Oncomine™ Comprehensive Assay v3 vs. Oncomine™ Comprehensive Assay Plus" Cancers 13, no. 20: 5230. <https://doi.org/10.3390/cancers13205230>

8. Kim SW, Park BJ, Kim HS, Na K. Diagnostic Utility of Oncomine Comprehensive Assay v3 in Differentiating Between Isocitrate Dehydrogenase (IDH)-mutated Grade II-III Astrocytoma and Oligodendroglioma. In Vivo. 2021 Mar-Apr;35(2):921-927. doi: 10.21873/invivo.12332. PMID: 33622884; PMCID: PMC8045052.

9. Tan O, Shrestha R, Cunich M, Schofield DJ. Application of next-generation sequencing to improve cancer management: A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness. Clin Genet. 2018 Mar;93(3):533-544. doi: 10.1111/cge.13199. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29265354.