
	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	1 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

1. Объект экспертизы	Молекулярно-генетическое исследование мутаций гена KRAS по ДНК из опухолевых клеток, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE)
2. Заявитель	КазНИИ онкологии и радиологии (КазНИИиОР)
3. Заявленные показания	Согласно Международной классификации болезней Десятого емотра МКБ-10: <ul style="list-style-type: none"> • Злокачественное новообразование ободочной кишки (C18) • Злокачественное новообразование ректосигмоидного соединения (C19) • Злокачественное новообразование прямой кишки (C20)
4. Альтернативные методы /Компараторы, применяемые в мире и в РК	Секвенирование нового поколения NGS (пиросеквенирование)
5. Краткое описание, предварительная стоимость	Метод молекулярно-генетического исследования мутаций гена KRAS включает в себя выделение ДНК из опухолевых клеток, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE) с депарафинизацией и последующую амплификацию необходимых участков ДНК в режиме ПЦР реального времени с использованием комплементарных пар праймеров и олигонуклеотидных зондов, помеченных флюоресцентными красителями. Стоимость 119 679,4 тг.
6. Специалисты/ Персонал/ Условия для проведения вмешательства	Врачи-генетики, специалисты лабораторий, лаборанты центра молекулярно-генетических исследований.
7. Результаты ОМТ	Cobas®KRAS Mutation test является высокочувствительным и высокоспецифичным, высокоточным и безопасным методом, позволяющим получить результаты течение 3-7 дней. Метод имеет клиническую значимость при принятии решения об анти-EGFR терапии, и прогнозирует эффективность терапии при отрицательном результате KRAS Mutation теста.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	2 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Список сокращений

1. 95% (ДИ) - 95% Доверительный Интервал
2. ИМТ - индекс массы тела
3. Combined Odds Ratio (OR) - суммарное соотношение шансов
4. Hazard Ratio (HR) - отношение рисков
5. ОШ - отношение шансов
6. EGFR (epidermal growth factor receptor) - рецептор эпидермального фактора роста

1. Описание заболевания

Согласно American Cancer Society (2019), **колоректальный рак** - это рак, который берет свое развитие в толстой или прямой кишке. Рак толстой кишки и рак прямой кишки часто группируются вместе по причине наличия между собой общих черт. В большинстве случаев, колоректальный рак начинается с роста наростов на внутренней оболочке толстой или прямой кишки. Данные наросты называются полипами.

Некоторые типы полипов могут со временем дать начало развитию рака (обычно в течение нескольких лет), однако не все полипы малигнизируются. Вероятность превращения полипа в рак зависит от типа полипа. Выделяют 2 основных типа полипов:


- **Аденоматозные полипы (аденомы):** эти полипы иногда превращаются в рак, поэтому аденомы называют предраковым состоянием.
- **Гиперпластические полипы и воспалительные полипы:** эти полипы встречаются чаще, но в целом они не являются предраковыми.¹

Обращая внимание на симптомы, выделяют следующие общие симптомы

кровотечение из прямой кишки, диарея или запор ("изменение привычной работы кишечника") потеря веса, боль в животе и анемия.²

¹ Cancer.org. (2019). What Is Colorectal Cancer?. [online] Available at: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html> [Accessed 27 Jun. 2019].

² Astin, M., Griffin, T., Neal, R., Rose, P. and Hamilton, W. (2011). The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *British Journal of General Practice*, 61(586), pp.e231-e243.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий		
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	3 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Причины и факторы риска

Согласно BMJ Practice, колоректальный рак может быть вызван воздействием следующих факторов: социодемографических факторов, факторов образа жизни, медицинских факторов.³

Социодемографические факторы:

❖ Пожилой возраст

В Великобритании с 2009 по 2011, 43% случаев колоректального рака были диагностированы у пожилых пациентов (≥ 75 лет) и 95% у пациентов в возрасте 50 лет и старше. Возрастные показатели заболеваемости резко возрастают после 50 лет. Самые высокие показатели заболеваемости наблюдаются в возрастной группе старше 85 лет (Thrumurthy et al., 2016).

❖ Мужской пол

Мета-анализ 17 исследований прогрессирующего рака прямой кишки во всех возрастных группах (n = 924 932 пациента) показал, что у мужчин риск рака значительно выше, чем у женщин (относительный риск 1,83 (95% Доверительный интервал 1,69 до 1,97) (Thrumurthy et al., 2016).


Факторы образа жизни

❖ Потребление красного мяса

В ходе мета - анализа 24 проспективных исследований было выявлено, что относительный риск развития колоректального рака для самого значительного потребления красного мяса и самого минимального составил 1,22 (95% Доверительный интервал от 1,11 до 1,34).

Относительный риск на каждые 100 г / день увеличения потребления составил 1,14 (от 1,04 до 1,24). Риск рака увеличивается линейно с увеличением потребления мяса до 140 г / день (Thrumurthy et al., 2016).

³ Thrumurthy, S., Thrumurthy, S., Gilbert, C., Ross, P. and Haji, A. (2016). Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. BMJ, p.i3590.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий		
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	4 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

❖ **Ожирение**

13% случаев рака кишечника в Великобритании были связаны с ожирением.

Мета-анализ 43 исследований (n= 9 000 000 человек) выявил относительный риск 1,33 (1,25-1,42) для людей с ожирением (индекс массы тела (ИМТ) > 30) по сравнению с людьми с нормальным ИМТ. Была обнаружена сильная ассоциативная связь ИМТ у мужского пола по сравнению с женским полом. У женщин она способна варьировать в зависимости от менопаузы и от применения гормонозаместительной терапии (Thrumurthy et al., 2016)

❖ **Алкоголь**

11% рака кишечника в Великобритании были связаны с чрезмерным потреблением алкоголя. Мета-анализ 61 когортного исследования и исследований «случай-контроль» показал, что по сравнению с людьми, редко употреблявшими алкоголь или вообще не употреблявшими, лица, употреблявшие от 1,6 до 6,2 алкогольных напитков ежедневно имели на 21% выше риск (95% Доверительный Интервал (ДИ) от 1,13 до 1,28) рака кишечника.


52% риск рака наблюдался у употреблявших 6,2 алкогольных продуктов в день. В общем, риск развития рака кишечника увеличился к 7% на единицу алкоголя, потребляемого ежедневно (Thrumurthy et al., 2016).

❖ **Табакокурение**

8% рака кишечника в Великобритании связано с табакокурением.

Мета-анализ 28 проспективных исследований и 1 463 796 субъектов показывает, что у нынешних курильщиков риск заболевания раком кишечника на 20 % выше (95% ДИ от 1,10 до 1,30) по сравнению с некурильщиками.

Мета-анализ 106 обсервационных исследований выявил, что бывшие курильщики имеют на 18% более высокий риск развития рака кишечника (95% ДИ 1,11 до 1,25), чем лица, которые никогда не курили табачные изделия. Риск развития рака кишечника увеличивается на 7-11% на каждые 10 выкуренных сигарет (Thrumurthy et al., 2016).

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	5 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Медицинские факторы

❖ Семейный анамнез

20% рака кишечника связано с наследственными факторами, за исключением семейного аденоматозного полипоза и наследственного неполипозного колоректального рака. Мета-анализ 59 исследований показал, что риск развития рака кишечника был на 80% выше у людей с больным близким родственником. Популяционный риск населения 1,8% для 50-летнего возраста увеличился до 3,4% (95% ДИ от 2,8 до 4,0%) по крайней мере с одним пострадавшим родственником или 6,9% (от 4,5 до 10,4%) с двумя и более родственниками. Мета-анализ 27 исследований показал, что относительный риск 3,87 (2.40 до 6.22) для пациентов с больных родственником, который был диагностирован до достижения им 45 лет (Thrumurthy et al., 2016).


❖ Наличие колоректальных аденом и полипов

❖ Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)

Мета-анализ когортных исследований показал, что пациенты с ВЗК (язвенный колит или колит Крона) на 70% больше подвержены риску развития колоректального рака по сравнению с общей популяцией. Риск увеличивается с увеличением течения и степени болезни. Лица у которых наблюдалось ВЗК в течение 20 лет имеют 5%-ый риск развития рака кишечника (Thrumurthy et al., 2016).

❖ Диабет

В мета-анализе 15 исследований (n = 2 593 935 пациентов) было обнаружено, что наблюдалась связь диабета с 30% риском развития колоректального рака, относительный риск 1,30 (1,20 до 1,40). Пациенты с диабетом также имели значительные показатели смертности от рака кишечника (относительный риск 1,26 (от 1,05 до 1,50). Однако наблюдалась неоднородность между исследованиями (P=0.04) (Thrumurthy et al., 2016).

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	6 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

❖ Мутация гена KRAS


Ген KRAS принадлежит к классу генов - онкогенов. При возникновении мутации, онкогены способны вызвать превращение нормальных клеток в раковые. Ген KRAS – это семейство Ras онкогенов, которое также включает 2 других гена: HRAS и NRAS. Данные протеины играют важную роль в делении клеток, в клеточной дифференциации и в само-разрушении клеток (апоптоз).⁴

Наличие мутации KRAS в основном сопровождается клинической агрессивностью опухоли и низкой выживаемостью пациента. В мета-анализе Huang et al. (2018) было установлено, что есть связь между мутациями KRAS (Суммарное соотношение шансов или combined Odds Ratio (OR) 1,18, 95% ДИ 1,05–1,33) и метастазами КР, включая лимфатические и отдаленные метастазы. В дополнение к этому, пациенты с колоректальным раком более подвержены риску отдаленного метастазирования (combined OR 2,04, 95% ДИ 1,41–2,95).⁵ В систематическом обзоре и мета - анализе Passiglia et al. (2016), молекулярное тестирование мутации KRAS применяется для диагностических целей (для диагностики карциномы поджелудочной железы) и для прогнозирования наличия ответной реакции у пациента на таргетную терапию (ответ на анти-EGFR терапию при метастатическом раке толстой кишки). Частота мутации KRAS при раке толстой кишки колеблется в пределах от 35 до 40% с 155 другими различными зарегистрированными мутациями. Большинство мутаций было обнаружено в 12 и 13 кодонах.⁶ 40% - ая частота мутации KRAS сопоставима с результатами других исследований, которые также свидетельствуют, что данная мутация присутствует примерно в 40-65% случаев КР в 12 и 13 кодонах в экзоне 2 в частности и в меньшей степени в 61 и 64 кодонах (Dinu et al., 2014). Наблюдаются значительные различия в частоте выявляемости мутации KRAS у пациентов с

⁴ Genetics Home Reference. KRAS gene. [online] Genetics Home Reference. Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS> [Accessed 15 Jul. 2019].

⁵ Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y. and Zhang, H. (2018). Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), pp.173-187.

⁶ Sudhir Perincheri & Pei Hui (2015) KRAS mutation testing in clinical practice, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15:3, 375-384, DOI: 10.1586/14737159.2015.986102

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	Номер экспертизы и дата	Страница
	№ 293 от 7.08. 2019г.	7 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

колоректальным раком в разных географических точках: в Азии-24%, в Европе - 36% и в Латинской Америке - 40%. Частота мутации KRAS у больных с КР составила 33% в Китае, хотя мутация реже встречается в Азии.⁷

Объединенный анализ показал, что мутации KRAS спрогнозировали значительно худшую безрецидивную выживаемость (Отношение рисков или Hazard Ratio (HR): 1,65; 95% ДИ: 1,23-2,21) и общую выживаемость (HR: 1,86; 95% ДИ: 1,51-2,30).⁸

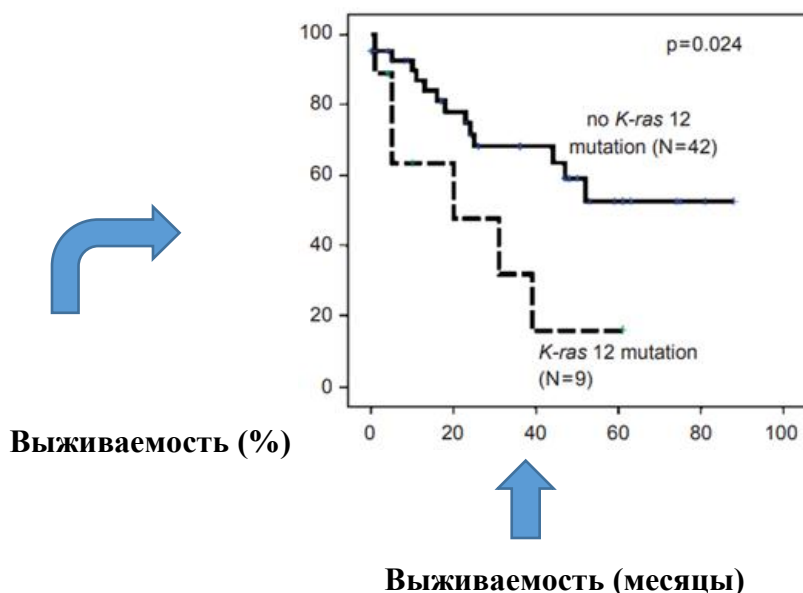



Рисунок 1 - Кривые Каплана–Мейера для пациентов с колоректальной карциномой с и без мутации KRAS 12-го кодона

При исследовании выживаемости пациентов с мутацией KRAS и пациентов без мутации KRAS, Poehlmann et al. (2007) обнаружили, что у пациентов с опухолью без мутации KRAS 12 кодона (no KRAS 12 mutation) наблюдался положительный прогноз выживаемости, чем у пациентов с мутацией (KRAS 12 mutation), $p = 0,024$ (Рисунок 1)

⁷ Dinu, D., Dobre, M., Panaitescu, E., Bîrlă, R., Iosif, C., Hoara, P,Ardeleanu, C. (2014). Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study. Journal of medicine and life, 7(4), 581–587.

⁸ Passiglia, F., Bronte, G., Bazan, V., Galvano, A., Vincenzi, B. and Russo, A. (2016). Can KRAS and BRAF mutations limit the benefit of liver resection in metastatic colorectal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 99, pp.150-157.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий		
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	8 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

1.2. Популяция (характеристика, количество)

Пациенты с колоректальным раком

По данным Информ бюро (2019), в Казахстане в 2006 году количество больных с колоректальным раком составило 2328 случаев, то в 2017-2018 годах заболевших уже более 3000 человек. За 12 лет прирост составляет 30%.⁹

Распространённость/заболеваемость

Рак ободочной кишки, заболеваемость в абсолютных числах в 2015 г - 1724, в 2016 г - 1706, распространённость на 100 тыс. населения в 2015 г - 9,8, в 2016 г - 9,6, смертность в 2015 г- 747, в 2016 г- 767. Распространённость на 100 тыс. населения в 2015 г - 4,3, в 2016 г- 4,3. Заболеваемость раком прямой кишки в абсолютных числах в 2015 г - 1424, в 2016 г - 1452, распространённость на 100 тыс. населения в 2015 г - 8,1, в 2016 г - 8,2, смертность в 2015 г - 782, в 2016 г - 717.

Заболеваемость колоректальным раком вариабельна по возрастному, половому и географическим признакам в мире.

⁹ Малакшинова, А. (2019). Около 15 тысяч казахстанцев умерло от рака в 2018 году. [online] Informburo.kz. Available at: <https://informburo.kz/novosti/okolo-15-tysyach-kazahstancsev-umerli-ot-raka-v-2018-godu.html> [Accessed 27 Jun. 2019].



**РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения»
Министерства здравоохранения Республики Казахстан**

Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий

Отдел оценки медицинских технологий

Номер экспертизы и дата

Страница

№ 293 от 7.08. 2019г.

9 из 30

Отчет оценки медицинской технологии

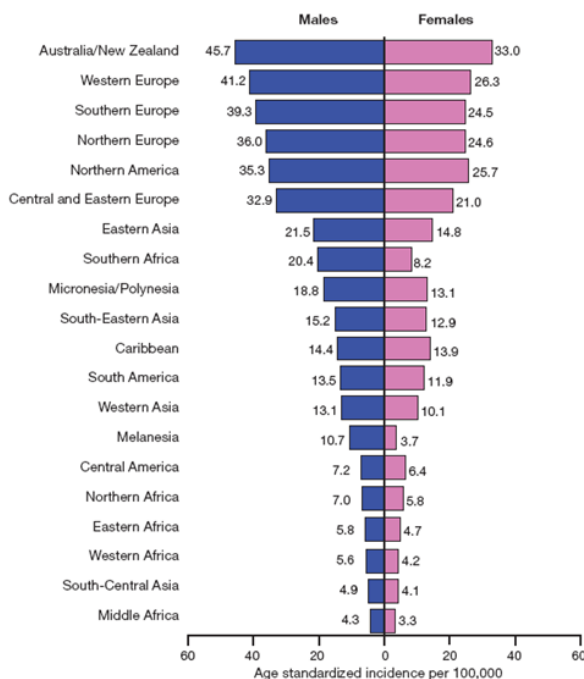


Рисунок 2 - стандартизированная повозрастная заболеваемость КР на 100 000¹⁰


Самые высокие показатели заболеваемости КР были обнаружены в у мужчин (males) старше 40 лет в Австралии / Новой Зеландии и под 40 лет в Западной Европе-45,7 и 41,2. У представителей женского пола (females) максимальные показатели заболеваемости также пришлось на Австралию и Новую Зеландию (33,0).

Самые минимальные показатели заболеваемости наблюдались в Центральной Африке у женщин -3,3 и 4,3 у мужчин (Рисунок 2).

1.3. Последствия для общества, нагрузка на бюджет

Систематический обзор и мета - анализ Therkildsen et al. (2014) выявил, что по всему миру, колоректальный рак ежегодно поражает 1 миллион человек и является причиной более чем 600 000 смертей. Примерно у 20% пациентов была болезнь с метастазами на момент постановки диагноза и у еще 20% пациентов метастазы появились

¹⁰ Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61(2), pp.69-90.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий		
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	10 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		


в течение периода наблюдения.¹¹ В другом исследовании Sharp et al. (2018), 41% пациентов сообщил о том, что испытывали финансовый стресс на фоне рака. 39% утверждали, что испытывали финансовые трудности. 32% сообщали о наличии финансового стресса и финансовых трудностей одновременно. После учета социально-демографических и клинических факторов пациентов было установлено, что шансы низкого качества жизни, связанного со здоровьем, были значительно выше у пациентов, которые испытывали нервное напряжение об их финансовом состоянии после диагностики рака по сравнению с пациентами, которые не наблюдали наличие финансового стресса (ОШ = 2,54 (95% ДИ, 1,62–3,99)). Шансы на низкое качество жизни также были значительно выше у больных с финансовыми трудностями после постановки диагноза (ОШ = 1,73 (95% ДИ, 1,09–2,72)). Отношение шансов для лиц, которые испытывали как финансовый стресс, так и финансовые трудности составили 2,59 (95% ДИ, 1,59–4,22). Другими словами, финансовый стресс и финансовые трудности имеют прямую связь с наступлением исхода (низкое качество жизни).¹²

2. Существующие методы диагностики КР в Казахстане

С 50-ти летнего возраста, мужчины и женщины должны каждые 5 лет проходить ректороманоскопию. При наличии положительного результата — рекомендуется проходить колоноскопию и ирригоскопию с двойным контрастированием. Данные исследования позволяют обнаружить доброкачественные полипы и злокачественные новообразования.

¹¹ Therkildsen, C., Bergmann, T., Henrichsen-Schnack, T., Ladelund, S. and Nilbert, M. (2014). The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Acta Oncologica, 53(7), pp.852-864

¹² Sharp, L., O’Leary, E., O’Ceilleachair, A., Skally, M. and Hanly, P. (2018). Financial Impact of Colorectal Cancer and Its Consequences. Diseases of the Colon & Rectum, 61(1), pp.27-35.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	11 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Дополнительные методы диагностики: анализ кала на скрытую кровь, определение в крови онкомаркеров РЭА (раковоэмбриональный антиген) и СА19.9 (углеводный антиген 19-9)¹³

3. Вмешательство

cobas® KRAS Mutation Test


Метод молекулярно-генетического исследования мутаций гена KRAS включает в себя выделение ДНК из опухолевых клеток, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE) с депарафинизацией и последующую амплификацию необходимых участков ДНК в режиме ПЦР реального времени с использованием комплементарных пар праймеров и олигонуклеотидных зондов, помеченных флюоресцентными красителями.

Процедура тестирования

Процесс анализа. 2 среза по 5 микрометров готовятся из каждого образца парафинового блока - один срез используется для окраски гематоксилином и эозином с целью анализа содержания опухоли; другой срез используется для изоляции ДНК. Если содержание опухоли больше 10%, тогда макродиссекция не требуется. Геномную ДНК выделяют с использованием набора для подготовки образца cobas® ДНК и двух аликвот по 25 мкл (одна аликвота для 12 и 13 кодонов 2 –го экзона и другая аликвота для 61-го кодона 3-го экзона) полученного экстракта. Экстракт доводится до 2 нг / мкл ДНК и амплифицируется с использованием анализатора cobas z480. Изменения во флюоресценции в течение этапов плавления автоматически анализируются с целью определения мутационного статуса каждого образца (Рисунок 3).

Извлечение ДНК. ДНК извлекается из единственного депарафинизированного 5 мкм среза парафинового блока. Депарафинизированный образец лизируют инкубацией при повышенной температуре с протеазой и в ходе хаотропного лизиса / связующим


¹³ КазНИИОиР. (2019). Колоректальный рак - КазНИИОиР. [online] Available at: <https://onco.kz/obshhie-tipy-raka/kolorektalnyj-rak/> [Accessed 1 Jul. 2019].

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий		
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	12 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

буфером. Они высвобождают нуклеиновую кислоту и защищают высвобожденную геномную ДНК от ДНКаз. Впоследствии, добавляют изопропанол к лизисной смеси, которая затем центрифугируется через колонку с фильтром из стекловолокна. Несвязанные вещества, такие как соли, белки и другие клеточные примеси, удаляются центрифугированием. Адсорбированные нуклеиновые кислоты промывают и затем элюируют (вымывают) водным раствором. Количество геномной ДНК определяют спектрометрически и доводят до фиксированной концентрации 2 нг / мкл.

ПЦР-амплификация и детекция: ДНК-мишень амплифицируется и подвергается детекции в системе cobas® 4800, которая измеряет флуоресценцию, генерируемую конкретными продуктами ПЦР с использованием реагентов для амплификации и детекции. Обнаружение мутации достигается с помощью анализа кривой плавления с использованием пакета программного обеспечения для автоматической интерпретации результатов KRAS Assay Specific Analysis Package v1.0. Учитывая температуру плавления и высоту температурных пиков мутаций и «диких» типов мутаций, определяется мутационный статус каждого образца. Мутационный контроль, отрицательный контроль и калибратор включаются при каждом запуске с целью подтверждения валидности запуска. Амплификация, детекция, анализ контроля качества и интерпретация результата — автоматизированы. Необработанные данные и кривые плавления не включаются в отчет. Изоляция ДНК, амплификация/ детекция, и предоставление результата могут быть осуществлены менее 8 часов. До 45 образцов могут быть обработаны за один запуск.¹⁴

¹⁴ Lee, S., Brophy, V., Cao, J., Velez, M., Hoepfner, C., Soviero, S. and Lawrence, H. (2011). Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. Virchows Archiv, 460(2), pp.141-149.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	Номер экспертизы и дата	Страница
	№ 293 от 7.08. 2019г.	13 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

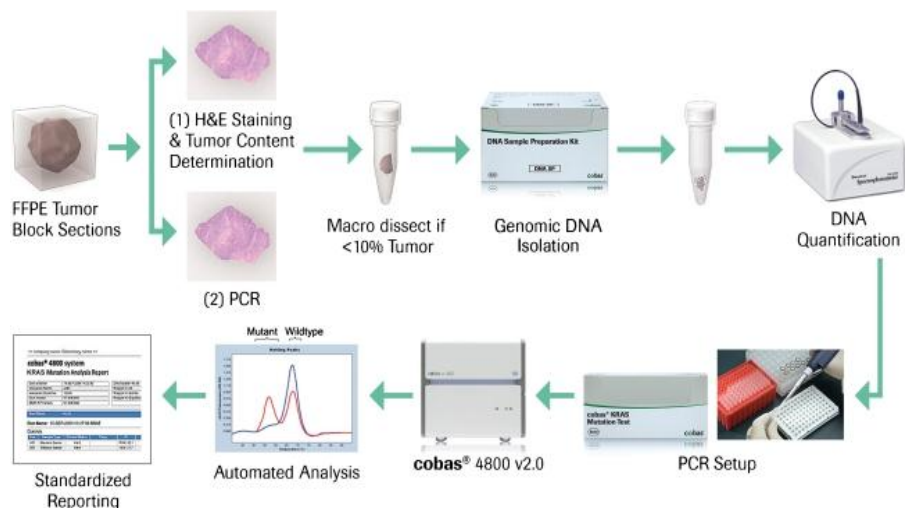



Рисунок 3 – Последовательность этапов процесса тестирования cobas® KRAS Mutation Test

Расшифровка английских словосочетаний Рисунок 3
➤ FFPE Tumor Block Sections —срезы парафиновых блоков опухоли
➤ H&E Staining & Tumor Content Determination — окраска гематоксилином и эозином и определение содержания опухоли
➤ Macro dissect if <10% Tumor — макродиссекция если содержание опухоли <10
➤ Genomic DNA Isolation —изоляция геномного ДНК
➤ DNA Quantification — количественная оценка ДНК
➤ PCR Setup —установка ПЦР
➤ Automated Analysis —автоматический анализ
➤ Standardized Reporting —стандартизированный отчет

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	14 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Интерпретация выявления мутации KRAS и значимость таргетной терапии


В систематическом обзоре и мета-анализе Therikildsen et al. (2014) отмечают, что при метастатическом колоректальном раке широко применяется мутационное тестирование гена KRAS экзона 2 для отбора пациентов с целью дальнейшего применения анти – EGFR терапии. Анти – EGFR (epidermal growth factor receptor) терапия включает применение ингибиторов тирозинкиназы и моноклональных антител.¹⁵ Если тканевой образец опухоли содержит мутацию гена KRAS, назначение анти – EGFR терапии будет неэффективным. Тогда как наличие отрицательного результата может свидетельствовать о том, что опухоль будет реагировать на анти – EGFR терапию. Другими словами, проведение таргетной терапии будет иметь положительный, клинический эффект. Во-вторых, затраты здравоохранения будут снижаться благодаря таргетной терапии, потому что только в отношении чувствительных к таргетной терапии пациентов будет назначаться лечение.¹⁶

В рандомизированном контролируемом исследовании Primrose et al. (2014), авторы установили, что цетуксимаб (моноклональное антитело) в комбинации с химиотерапией не может быть рекомендован пациентам с операбельными колоректальными метастазами в печени и с немутированным типом KRAS экзона 2. Добавление цетуксимаба к химиотерапии и в ходе хирургических вмешательств в отношении лечения пациентов с немутированным типом KRAS экзона 2 приводит к более короткой выживаемости без прогрессирования болезни.¹⁷ В связи с наличием противоречивых данных, есть необходимость проведения дополнительных исследований в отношении изучения

¹⁵ Vokes, E. and Chu, E. (2006). Anti-EGFR Therapies: Clinical Experience in Colorectal, Lung, and Head and Neck Cancers. *Oncology Journal*, [online] 20(5). Available at: <https://www.cancernetwork.com/oncology-journal/anti-egfr-therapies-clinical-experience-colorectal-lung-and-head-and-neck-cancers> [Accessed 30 Jul. 2019].

¹⁶ http://pharmnews.kz/news/rosh_vybiraet_strategiju_personalizirovannoj_mediciny/2010-12-01-2041

¹⁷ Primrose, J. (2014). Cetuximab for resectable colorectal liver metastasis: New EPOC trial – Author's reply. *The Lancet Oncology*, 15(8), p.e306.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	15 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

положительного влияния анти – EGFR на пациентов с немутированным типом KRAS экзон 2.

Отрицательный тест также может быть получен, если имеется недостаток образцов опухолевой ткани или когда некоторые раковые клетки содержат мутацию, а другие – нет.

3.2. Необходимость внедрения. Ожидаемый эффект от внедрения, побочные явления

- Возможность определить 7 мутаций в 2 кодонах гена KRAS
- Возможность определения мутаций в малом количестве исходного материала-от 10% содержания опухолевых клеток в образце из парафинового блока
- Высокая специфичность и чувствительность метода
- Автоматическая детекция результата в режиме ПЦР реального времени

3.3. Стоимость/Затраты 119 679,4 тг на одного пациента

3.4. Кадровый потенциал, материально-техническое обеспечение для внедрения


Врачи - генетики, специалисты лабораторий, лаборанты центра молекулярно-генетических исследований. По данным Заявки КазНИИОиР, учреждение обладает всеми необходимыми условиями и оборудованием для проведения молекулярно-генетического исследования мутаций KRAS по ДНК из опухолевых клеток, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE).

3.5. Опыт использования в мире (какие производители) и в Казахстане

Первоначально метод ПЦР в режиме реального времени был внедрен в практику в 1996 году. ¹⁹ cobas®KRAS Mutation test имеет маркировку Conformité Européenne (CE), что обеспечивает коммерческую доступность теста на территории Европейского Союза, а

¹⁸ <https://labtestsonline.org/tests/kras-mutation>

¹⁹ <https://www.thermofisher.com/kz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/history-pcr.html>

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий		
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	16 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

также в других странах, где признается данная маркировка.²⁰²¹ Cobas (Roche) Mutation test также был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food Drug Administration, FDA) в США.²²

cobas®KRAS Mutation test в настоящее время продается в Европе, Австралии, Бразилии, Венесуэле, Индонезии, Китае, Колумбии, Корее, Перу, Сингапуре, Тайланде и Эквадоре. Тест одобрен в Канаде.²³

Производителем диагностических наборов теста является компания ТОО «Рош Казахстан».

Метод cobas® KRAS Mutation Test впервые внедряется на территории Республики Казахстан (согласно заявке КазНИИОиР).

4 Поиск доказательств

4.1. Поиск (Ключевые слова)


При проведении поиска литературы была использована база данных PubMed. В ходе поиска литературы были применены фильтры поиска: тип исследования - рандомизированные клинические испытания, мета - анализы, систематический обзор; временной интервал - 10 лет; объект исследования - люди.

²⁰ Roche.ru. (2019). Тест-система для выявления мутаций рецептора эпидермального фактора роста (cobasEGFRMutationTest) компании Рош, обеспечивающая персонализированный подход к терапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), получает маркировку CE. [online] Available at: <https://www.roche.ru/ru/prjess-zjentr/news/news-2011-12-05.html> [Accessed 19 Jun. 2019].

²¹ Ahn, S., Lee, J., Sung, J., Kang, S., Ha, S., Jang, K., Choi, Y., Kim, J., Oh, Y. and Kim, K. (2013). Comparison of ThreeBRAFMutation Tests in Formalin-Fixed Paraffin Embedded Clinical Samples. Korean Journal of Pathology, 47(4), p.348.

²² Barbara Angulo, Fernando Lopez-Rios & David Gonzalez (2014) A new generation of companion diagnostics: cobas BRAF, KRAS and EGFR mutation detection tests, Expert Review of Molecular Diagnostics, 14:5, 517-524, DOI: 10.1586/14737159.2014.910120

²³ PMA P140023: FDA Summary of Safety and Effectiveness Data https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/P140023b.pdf

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	17 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

При использовании ключевых слов поиска и фильтров PubMed:

- ❖ «KRAS mutation» AND «Colorectal cancer»: получено 175 результатов, использовано 3.
- ❖ «Diagnostic value of symptoms for colorectal cancer»: получено 205 результатов, использовано 2.
- ❖ «KRAS and BRAF mutations» AND «metastatic colorectal cancer patients»: получено 11 результатов, использован 1 источник.
- ❖ «Predictive value of KRAS»: получено 8, использован 1 источник.
- ❖ «KRAS mutation testing of tumours in adults» AND «metastatic colorectal cancer» получено 174, использован 1 источник.


При использовании ключевых слов поиска, но без применения фильтров PubMed

- ❖ «Colorectal adenocarcinoma» AND «risks»: получено 3518, использован 1 источник.
- ❖ «Mutations» AND «colorectal cancer progression» AND «metastasis»: получено 961, использован 1 источник.
- ❖ «KRAS mutation testing in clinical practice»: получено 173, использован 1 источник.
- ❖ «Global cancer statistics»: получено 7143, использован 1 источник.
- ❖ «Financial Impact of Colorectal Cancer»: получено 734, использован 1 источник.
- ❖ «Analytical performance of PCR» AND «detection of KRAS»: получено 29, использован 1 источник.
- ❖ «Pyrosequencing as a tool for better understanding»: получено 74, использован 1 источник.
- ❖ «454 next generation - sequencing»: получено 16, использован 1 источник.

Найдено через Google Scholar: 11 публикаций

Количество веб-сайтов: 19

Всего было использовано источников: 46

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	18 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Формулировка PICO (Patient, Population, or Problem), Intervention, Comparison, Outcome

Популяция, пациенты	<ul style="list-style-type: none"> ❖ пациенты с колоректальным раком ❖ взрослые с метастатическим колоректальным раком ❖ пациенты с колоректальным раком стадии III и IV
Вмешательство	Метод молекулярно-генетического исследования мутаций гена KRAS включает в себя выделение ДНК из опухолевых клеток, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE)
Альтернативное вмешательство	Секвенирование нового поколения NGS (пироксенирование)
Исходы-клинической эффективности и безопасности-экономической эффективности	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Влияние на течение и терапию колоректального рака ❖ Предсказать отсутствие ответа на целевую терапию в зависимости от статуса мутации KRAS ❖ Выживаемость
Источники	Базы данных Pubmed, Google Scholar, National Institute for Health Research


4.2. Описание технологии, преимущества, недостатки

Описание технологии cobas® KRAS Mutation test. Преимущества

- cobas® KRAS test перекрестно не реагирует ни с молчащими мутациями в 12/ 13 кодонах, ни с высоко гомологичными генами RAS.²⁴
- Выделение ДНК выполняется с использованием только одного 5 - мкм среза FFPE ткани, сводя к минимуму потерю драгоценного материала.²⁵

²⁴ Lee, S., Brophy, V., Cao, J., Velez, M., Hoepfner, C., Soviero, S. and Lawrence, H. (2011). Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. Virchows Archiv, 460(2), pp.141-149.

²⁵ Angulo, B., Lopez-Rios, F. and Gonzalez, D. (2014). A new generation of companion diagnostics: cobasBRAF, KRASandEGFRmutation detection tests. Expert Review of Molecular Diagnostics, 14(5), pp.517-524.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий		
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	19 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

- Возможность определения мутаций в малом количестве исходного материала от 10%.
- Пропускная способность - до 45 образцов.²⁶
- Наборы мутаций cobas являются высоко воспроизводимыми (> 98%) в различных клинических лабораториях.²⁷
- Тест может быть выполнен в течение <8 часов, поэтому результаты могут быть сообщены лечащему врачу в течение нескольких дней с момента получения образца в лаборатории.²⁸
- Высокая специфичность и чувствительность метода.²⁹
- Автоматическая детекция результата в режиме ПЦР реального времени (по материалам заявки КазНИИОиР).
- ПЦР в режиме реального времени не требует обработки пробы после ПЦР, что предотвращает потенциальное загрязнение при переносе продукта ПЦР и приводит к гораздо более быстрому и более высокопроизводительному анализу.³⁰

Недостатки cobas® KRAS Mutation test

- Фиксирующие вещества, отличные от формалина или длительное время фиксации, могут привести к искаженным результатам.³¹
- На подготовку парафиновых блоков уходит примерно 4 дня.³²

²⁶ <https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/molekulare-diagnostik/cobas-kras-mutation-test.html#Vorteile>

²⁷ <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14737159.2014.910120?src=recsys&journalCode=iero20>


²⁸ Cobas.be. (2019). cobas® KRAS Mutation Test. [online] Available at: <http://www.cobas.be/home/product/molecular-diagnostics/cobas--kras-mutation-test.html> [Accessed 15 Jul. 2019].

²⁹ <https://www.histogenex.com/kras-mutation-testing>

³⁰ Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.

³¹ Thiele, E. (2019). EGFR Mutation Testing (Lung Cancer) - histogenex.com. [online] Histogenex.com. Available at: <https://www.histogenex.com/egfr-mutation-testing> [Accessed 13 Jun. 2019].

³² <https://captodayonline.com/productguides/instruments/ap-automation-august-2017/sakura-finetek-usa-tissue-tek-autotec-a120-automated-embedding-system-ap-automation-tissue-embedding-instruments-2017.html>

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	20 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

4.3. Альтернативное вмешательство

«Золотым стандартом» диагностики KRAS считается секвенирование по Сэнгеру.³³ Однако, метод характеризуется низкой пропускной способностью и высокой стоимостью при исследовании большого объема данных. Именно данные недостатки стали основой для разработки и внедрения более современной технологии — секвенирования нового поколения (NGS).³⁴

4.3.1. Общее описание метода

Секвенирование нового поколения (пиросеквенирование) - это тип генетического исследования в ходе которого определяются сотни тысяч последовательностей генов за один запуск.³⁵ Метод пиросеквенирования основан на детекции активности фермента ДНК-полимеразы с хемилюминесцентным ферментом. Последовательность подачи реагентов в реакционную смесь, которые дают хемилюминесцентный сигнал, позволяет определить последовательность анализируемого участка ДНК.³⁶

4.3.2. Области применения пиросеквенирования

Генетическое тестирование


- ✓ Генетическая паспортизация и выявление генетических полиморфизмов, ассоциированных с развитием мультифакториальных заболеваний.
- ✓ Генетический анализ «сложных» областей генома (транслокации, повторы, делеции).
- ✓ Верификация и валидация результатов полногеномного анализа.

³³ Shackelford, R., Whitling, N., McNab, P., Japa, S. and Coppola, D. (2012). KRAS Testing: A Tool for the Implementation of Personalized Medicine. *Genes & Cancer*, 3(7-8), pp.459-466.

³⁴ <https://genomed.ru/ngs/>

³⁵ Siqueira, J. F., Jr, Fouad, A. F., & Rôças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of oral microbiology*, 4, 10.3402/jom.v4i0.10743. doi:10.3402/jom.v4i0.10743

³⁶ <http://www.interlabservice.ru/consulting/articles/piro.php>

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	21 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Онкология

- ✓ Выявление активирующих соматических мутаций в генах EGFR, RAS, BRAF, PI3K и др.
- ✓ Анализ метилирования генов - супрессоров опухолевого роста: MGMT, MLH1, p16 и др.
- ✓ Поиск новых генетических маркеров злокачественных новообразований.

Микробиология и геновая инженерия (например, разработка уникальных ПЦР тест-систем)³⁷


4.4. Диагностическая эффективность пиросеквенирования и cobas®KRAS Mutation test

Чувствительность и специфичность пиросеквенирования составляют 93% и 100%.³⁸ При сравнении с пиросеквенированием, у cobas®KRAS Mutation test не было выявлено существенных различий в показателе специфичности, 99% и 100%, соответственно. Оба метода являются высокоспецифичными. Однако, чувствительность cobas®KRAS Mutation test относительно больше, чем у пиросеквенирования, 95% и 93%, соответственно (Таблица 1).

Для получения положительного результата пиросеквенирование требует наличие 5% исследуемого материала, в то время как для cobas®KRAS Mutation test – от 10% (Shackelford et al., 2012). Между тем, также имеются альтернативные мнения по поводу пределов обнаружения мутации KRAS. Например, Westhood et al. (2014) обнаружили, что минимальное количество материала, необходимое для запуска тестирования – 1-5% для cobas®KRAS Mutation test и 6-10% для пиросеквенирования. Наличие данной вариабельности в пороге обнаружения мутации можно объяснить типом исследуемой

³⁷ <http://www.interlabservice.ru/consulting/articles/piro.php>

³⁸ Fiorentino, M., Altamari, A., De Maglio, G., Gruppioni, E., Capizzi, E., de Biase, D., Degiovanni, A., D'Errico, A., Pession, A., Pizzolitto, S. and Tallini, G. (2013). 454 next generation-sequencing outperforms allele-specific PCR, Sanger sequencing, and pyrosequencing for routine KRAS mutation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *OncoTargets and Therapy*, [online] p.1057. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950653> [Accessed 23 Jul. 2019].

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	22 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

мутации. Для мутации p.G12C (Замена - миссенс мутация, позиция 12, G→C) самый низкий предел обнаружения будет на уровне 10%, в то время как для мутации p. Q61H на 10% и 20% в 50 и 100 образцах (Sherwood et al., 2017).

При анализе корреляционной связи между содержанием опухолевых клеток и способностью пиросеквенирования обнаруживать мутации, корреляция не была обнаружена. Мутации KRAS были обнаружены во многих образцах с очень низким количеством опухолевых клеток (Рисунок 4). Частота мутаций 12/13 кодона KRAS в тканях с низким содержанием опухолевых клеток <10% была сходной с таковой в тканях с содержанием опухолевых клеток ≥10%, 36% мутаций и 37% мутаций, соответственно.³⁹

При анализе пропускной способности cobas®KRAS Mutation test и пиросеквенирования, на первый взгляд, может показаться, что пропускная способность cobas®KRAS Mutation test уступает пропускной способности пиросеквенирования, 45 против 48 и 96 образцов за запуск. С другой стороны, на сегодняшний день существуют различные виды пиросеквенаторов, некоторые из них имеют относительно низкую пропускную способность по сравнению с cobas®KRAS Mutation test, до 24 образцов за запуск. Например, пиросеквенаторы марки PyroMark Q24 и PyroMark Q24 Advanced.⁴⁰ Angulo et al. (2014) утверждают, что пропускная способность пиросеквенирования составляет 10-30 образцов. В связи с этим, утверждать о преимуществе пропускной способности cobas®KRAS Mutation test над пиросеквенированием и наоборот будет можно только при наличии данных о модели используемого пиросеквенатора в учреждении.


Оба метода не требуют дополнительной стадии – электрофореза, что способствует ускоренной работе данных лабораторных методов (Heid et al., 1996).^{41,42} Кроме того, в

³⁹ Sundström, M., Edlund, K., Lindell, M., Glimelius, B., Birgisson, H., Micke, P., & Botling, J. (2010). KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. BMC cancer, 10, 660. doi:10.1186/1471-2407-10-660

⁴⁰ <http://www.interlabservice.ru/consulting/articles/piro.php>

⁴¹ Brown, T. (2011). Gene cloning and DNA analysis. 6th ed. Wiley, John & Sons, Incorporated, p.171.

⁴² Pohlmann, A., Kuester, D., Meyer, F., Lippert, H., Roessner, A. and Schneider-Stock, R. (2007). K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. Pathology - Research and Practice, 203(7), pp.489-497.

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	23 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

обоих методах может быть применена микродиссекция. Микродиссекция – это процесс разделения мелких структур при их микроскопическом изучении. Каждый метод имеет соответствующий порог ниже которого может быть использована микродиссекция.

Пиросеквенирование не способно безошибочно секвенировать протяжённые участки, состоящие из одного и того же нуклеотида и характеризуется трудоемким биоинформатическим анализом данных, что снижает приоритетность его использования.^{43,48} Кроме того, пиросеквенирование незначительно, но все же уступает cobas®KRAS Mutation test в точности результата, 95% против 100%, соответственно.⁴⁴

С момента получения образца опухоли в лаборатории, результаты пиросеквенирования могут быть получены в течение 3-5 дней или 6 - 7 дней в зависимости от количества образцов, а при тестировании cobas®KRAS Mutation test – 3 - 7 дней.⁴⁵ cobas®KRAS Mutation test может быть выполнен в течение менее 8 часов, например, в течение 2-4 часов.⁴⁶

Следует отметить, что cobas®KRAS Mutation test является безопасным. Тестирование осуществляется на срезах ткани человека в парафиновых блоках. Тканевые срезы извлекаются патологоанатомом для диагностических целей как часть медицинской практики, поэтому тест не представляет опасности тестируемому человеку⁴⁷

Исследуемые методы также имеют свои специфические недостатки. Например, пиросеквенирование не может считывать гомополимерные пробеги, превышающие 5 нуклеотидов.


⁴³ <https://www.wikiwand.com/ru>

⁴⁴ Lee, S., Brophy, V., Cao, J., Velez, M., Hoepfner, C., Soviero, S. and Lawrence, H. (2011). Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. *Virchows Archiv*, 460(2), pp.141-149.

⁴⁵ Westwood, M., van Asselt, T., Ramaekers, B., Whiting, P., Joore, M., Armstrong, N., Noake, C., Ross, J., Severens, J. and Kleijnen, J. (2014). KRAS mutation testing of tumours in adults with metastatic colorectal cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technology Assessment*, 18(62), pp.1-132.

⁴⁶ Sherwood, J. L., Brown, H., Rettino, A., Schrieck, A., Clark, G., Claes, B., ... Kohlmann, A. (2017). Key differences between 13 KRAS mutation detection technologies and their relevance for clinical practice. *ESMO open*, 2(4), e000235. doi:10.1136/esmoopen-2017-000235

⁴⁷ www.accessdata.fda.gov

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	Номер экспертизы и дата	Страница
	№ 293 от 7.08. 2019г.	24 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

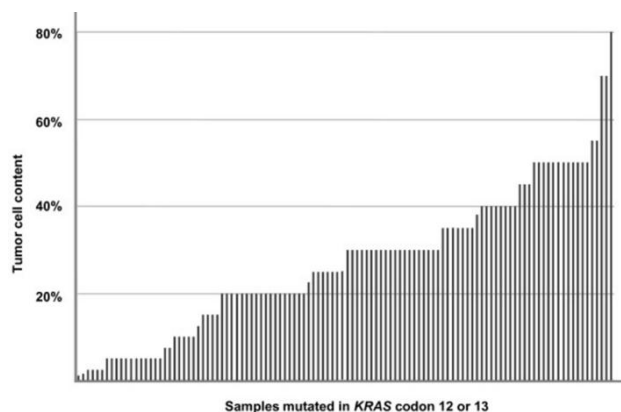



Рисунок 4 - Взаимосвязь аналитической чувствительности пиросеквенирования с содержанием опухолевых клеток в образце (Tumor cell content, %)


Таблица 1-Сравнительная характеристика cobas®KRAS Mutation test и секвенирования нового поколения (пиросеквенирование)

Параметры	cobas ®KRAS Mutation test	Секвенирование нового поколения (пиросеквенирование)
Чувствительность	95%	93%
Специфичность	99%	100%
Продолжительность	Менее 8 часов (2-4 часа) Общее время с момента получения образца лабораторией до получения результатов клиницистом: 3 - 7 дней	3-4 часа ⁴⁸ Общее время с момента получения образца лабораторией до получения результатов клиницистом: 3-5 дней или 6 - 7 дней в зависимости от количества образцов
Стоимость	119 679,4 тг	£50 - 273
Количество необходимого материала/Предел обнаружения мутации	от 10% (по Roche Diagnostics) 1-5% (по Westwood et al., 2014)	<10% (5%) (по Shackelford et al., 2012) 6-10% (по Westwood et al., 2014)

⁴⁸ Wong, S. Q., Scott, R., & Fox, S. B. (2016). KRAS mutation testing in colorectal cancer: the model for molecular pathology testing in the future. *Colorectal Cancer*, 5(2), 73–80. doi:10.2217/crc-2015-0009

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	Номер экспертизы и дата	Страница
	№ 293 от 7.08. 2019г.	25 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Использование микродиссекции	да, используется	да, используется
Порог ниже которого используется микродиссекция	10–15% (по Westwood et al., 2014)	20-50% (по Westwood et al., 2014)
Преимущества и Недостатки	<p style="text-align: center;"><u>Преимущества:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Пропускная способность до 45 образцов ➤ Не требует электрофореза – автоматическая детекция в режиме ПЦР реального времени ➤ Безопасен ➤ Снижение риска контаминации образца ➤ Для полного анализа необходим только участок ткани FFPE толщиной 5 мкм ➤ Точность метода - 100% <p style="text-align: center;"><u>Недостатки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Фиксирующие вещества, отличные от формалина или длительное время фиксации, могут привести к 	<p style="text-align: center;"><u>Преимущества:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Пропускная способность в пределах от 24 до 96 образцов или от 10 до 30 образцов. ➤ Не требует электрофореза, что ускоряет тестирование ➤ Сигналы последовательностей нуклеотидов генерируются немедленно по потоку праймера Точность метода - 95% (по Fiorentino et al, 2013) <p style="text-align: center;"><u>Недостатки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Не может считывать гомополимерные пробеги, превышающие 5 нуклеотидов; невозможно безошибочно секвенировать протяжённые участки,

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	26 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

	искаженным результатам ⁴⁹ ➤ На подготовку парафиновых блоков уходит примерно 4 дня.	состоящие из одного и того же нуклеотида (по Shackelford et al., 2012) ➤ Трудоемкая биоинформатика ➤ Влияние человеческого фактора (ошибки) ⁵⁰
--	---	---

4.5. Экономическая эффективность

Стоимость cobas®KRAS Mutation test, заявляемая КазНИИиОР составляет 119 679,4 тг. на 1 пациента, на 1 образец.


В систематическом обзоре Westwood et al. (2014) была исследована стоимость cobas®KRAS Mutation Test Kit и пиросеквенирования в 31 лаборатории в Великобритании. Стоимость cobas®KRAS Mutation test составила £100–125 в 2014 году, что значительно экономически выгоднее по сравнению со стоимостью того же теста в исследовании Hamblin и со - авторов в 2017 году. Согласно Hamblin et al. (2017) стоимость cobas®KRAS Mutation test – £141 (\$187) за один образец, а тестирование cobas комбинаций генов BRAF, NRAS, KRAS, и PIK3CA составляет £477 (\$632).⁵¹ Стоимость cobas®KRAS Mutation test, заявленная КазНИИОиР, намного выше (в 2 раза) по сравнению со стоимостью cobas®KRAS Mutation test в исследовании Hamblin et al. (2017) за счет цены набора для определения мутаций KRAS, составляющей 64% от общих затрат (Таблица 2).

Также была отмечена вариабельность стоимости пиросеквенирования в различных лабораториях Великобритании, в пределах от £50 до £273, соответственно.

⁴⁹ Thiele, E. (2019). EGFR Mutation Testing (Lung Cancer) - histogenex.com. [online] Histogenex.com. Available at: <https://www.histogenex.com/egfr-mutation-testing> [Accessed 13 Jun. 2019].

⁵⁰ Shen, S., & Qin, D. (2012). Pyrosequencing data analysis software: a useful tool for EGFR, KRAS, and BRAF mutation analysis. *Diagnostic pathology*, 7, 56. doi:10.1186/1746-1596-7-56

⁵¹ Hamblin, A., Wordsworth, S., Fermont, J. M., Page, S., Kaur, K., Camps, C., ... Schuh, A. (2017). Clinical applicability and cost of a 46-gene panel for genomic analysis of solid tumours: Retrospective validation and prospective audit in the UK National Health Service. *PLoS medicine*, 14(2), e1002230. doi:10.1371/journal.pmed.1002230


	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	Номер экспертизы и дата	Страница
	№ 293 от 7.08. 2019г.	27 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

Несмотря на высокоточность методов секвенирования, применять данные методы в повседневной клинической практике обычно не целесообразно из-за их относительной высокой стоимости.⁵²

Таблица 2 - Расходные материалы, медикаменты, химические реактивы, перевязочные материалы, одноразовые принадлежности для исследования KRAS

Наименование по приказу	форма выпуска	ед.изм.	дозировка	кол-во в упаковке	норма расхода	Цена по приказу	сумма, тенге	Полное наименование согласно договора	Закупочная цена, тенге
KIT C4800 KRAS AMP/DET 24T CEIVD/Набор для определения мутаций KRAS, 24 исследований	набор	шт	мкл	24	1,2	2 017 467	100873	KIT C4800 KRAS AMP/DET 24T CEIVD/Набор для определения мутаций KRAS, 24 исследований	2 017 467
KIT DNA ISOLATION 24T IVD/Набор для выделения ДНК, 24 исследований	набор	шт	мкл	24	1,2	259 974	12998,7	KIT DNA ISOLATION 24T IVD/Набор для выделения ДНК, 24 исследований	259 974
Cobas 4800 Microwell plate (AD-Plate)/ПЦР- плашки для системы Cobas 4800	уп	шт	мкл	50	0,125	792 000	1980	Cobas 4800 Microwell plate (AD-Plate)/ПЦР- плашки для системы Cobas 4800	792 000
Микропробирки 1,5мл типа Eppendorf, PP с плоской крышкой, с маркировочной панелью, градуированные, цвет-желтый (Италия)	уп	шт	500	500	3	3668	22,008	Микропробирки 1,5мл типа Eppendorf, PP с плоской крышкой, с маркировочной панелью, градуированные, цвет-желтый (Италия)	3668
Микропробирки 0,2 мл для ПЦР с выпуклой крышкой, автоклавируемые, свободные от ДНК- аз, РНК-аз и пирогенов (Германия)	уп	шт	1000	1000	5	38837	194,185	Микропробирки 0,2 мл для ПЦР с выпуклой крышкой, автоклавируемые, свободные от ДНК- аз, РНК-аз и пирогенов (Германия)	38837
Наконечник 10мкл, бесцветные, универсальные (Китай) (уп=1000шт)	уп	шт	1000	1000	2	5676	11,352	Наконечник 10мкл, бесцветные, универсальные (Китай) (уп=1000шт)	5676
Наконечники 0-200мкл, желтые тип Gilson (Италия) (уп=1000шт)	уп	шт	1000	1000	15	2 664	39,96	Наконечники 0-200мкл, желтые тип Gilson (Италия) (уп=1000шт)	2 664
Наконечники 200-1000мкл для пипеток Eppendorf, Gilson, Brand, Socorex, Thermo Fisher Scientific (Италия) (уп=500шт)	уп	шт	500	500	10	2 200	44	Наконечники 200-1000мкл для пипеток Eppendorf, Gilson, Brand, Socorex, Thermo Fisher Scientific (Италия) (уп=500шт)	2 200
Перчатки Nitril Tex нитриловые, без талька, с текстурированной поверхностью на кончиках пальцев.	уп	пара	50	50	2	2600	104	Перчатки Nitril Tex нитриловые, без талька, с текстурированной поверхностью на кончиках пальцев.	2600

⁵² Chan, K. H., To, K. K., Chan, B. W., Li, C. P., Chiu, S. S., Yuen, K. Y., & Ho, P. L. (2013). Comparison of pyrosequencing, Sanger sequencing, and melting curve analysis for detection of low-frequency macrolide-resistant mycoplasma pneumoniae quasispecies in respiratory specimens. Journal of clinical microbiology, 51(8), 2592–2598. doi:10.1128/JCM.00785-13

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	28 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

В исследовании на японских пациентах с метастатическим колоректальным раком, в отношении которых предыдущая химиотерапия (включая фторпиримидин, иринотекан и оксалиплатин) была неэффективна или у пациентов имелись противопоказания к применению данных препаратов, стоимость лечения пациентов с цетуксимабом (моноклональное антитело) без проведения мутационного тестирования KRAS составила US\$35,000 и привела к 0,48 QALYs. Между тем, лечение пациентов с применением генетического исследования KRAS обходится в US\$29,000 и приводит к 0,49 QALYs. Таким образом, применение тестирования KRAS на наличие мутаций считается предпочтительным по сравнению с отсутствием данного тестирования.⁵³


4.6. Другие аспекты (социальные/правовые/этические аспекты)

Рекомендуемый уровень внедрения. Медицинские организации республиканского и областного уровня. Метод выносится на обсуждение о применении на территории Республики Казахстан в рамках гарантированного объема бесплатной медицинской помощи (ГОВМП) в качестве высокотехнологичной медицинской услуги (ВТМУ).

Критерии отбора пациентов. Пациенты, имеющие колоректальный рак и лица, соответствующие следующим критериям, могут быть допущены к генетическому тестированию:

- Если у пациента был диагностирован рак толстой кишки
- Если у пациента имелся другой первичный синдром Линча, ассоциированный раком
- Иммуногистохимия опухоли толстой кишки указывает на потерю окрашивания несоответствующего репаративного белка (ов) [то пациента следует направить на генетическое тестирование мутаций зародышевой линии]

⁵³ Shiroiwa T, Motoo Y, Tsutani K. Cost-effectiveness analysis of KRAS testing and cetuximab as last-line therapy for colorectal cancer. Mol Diagn Ther 2010;14:375–84. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03256395>

	РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан	
	Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий	
Отдел оценки медицинских технологий	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№ 293 от 7.08. 2019г.	29 из 30
Отчет оценки медицинской технологии		

- Если у пациента имеется отягощенный семейный анамнез: наличие рака кишечника или синдрома Линча.⁵⁴
- Наличие факторов риска: пожилой возраст, мужской пол, наличие воспалительных заболеваний кишечника, диабет.

Выводы

- Метод cobas®KRAS Mutation test является высокочувствительным (95%) и высокоспецифичным (99%) и высокоточным (100%). Чувствительность cobas®KRAS Mutation test и пиросеквенирования сопоставимы (95 и 93%, соответственно).
- Метод cobas®KRAS Mutation test автоматически регистрирует и интерпретирует полученные результаты, что позволяет минимизировать временные затраты (3-7 дней), влияние человеческого фактора и обеспечивает высокую производительность.
- Из-за отсутствия стадии электрофореза в процессе тестирования, в cobas®KRAS Mutation test минимизируется риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшается вероятность получения ложноположительных результатов и сокращаются расходы для проведения теста.
- Cobas®KRAS Mutation test получил широкое применение в мире. Одобрен FDA и имеет маркировку Conformité Européenne (CE, «европейское соответствие»), клиническая значимость теста заключается в прогнозировании эффективности анти-EGFR терапии при отрицательном результате KRAS Mutation test.
- Заявленная стоимость cobas®KRAS Mutation test, намного выше (в 2 раза) по сравнению с cobas® KRAS Mutation test в исследовании Hamblin et al. (2017), за

⁵⁴ Services.nhslothian.scot. (2019). Patients with a personal or family history of colon cancer. [online] Available at: <https://services.nhslothian.scot/clinicalgeneticsservice/Referrals/Pages/Patients-with-a-personal-or-family-history-of-colon-cancer.aspx> [Accessed 27 Jun. 2019].



*РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения»
Министерства здравоохранения Республики Казахстан*

Центр рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий

Отдел оценки медицинских технологий

Номер экспертизы и дата

Страница

№ 293 от 7.08. 2019г.

30 из 30

Отчет оценки медицинской технологии

счет цены набора для определения мутаций KRAS, составляющей 64% от общих затрат.

**Ведущий специалист
Отдела ОМТ ЦРИЛСиМТ**

Ж. Салпынов

Начальник отдела ОМТ ЦРИЛСиМТ

З. Жолдасов

Руководитель ЦРИЛСиМТ

А. Табаров