



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

Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	1 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

1. Название отчета	«Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с использованием NGS технологий (поиск мутаций наследственных заболеваний, определение мутаций при задержке психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройствах)»
2. Авторы (должность, специальность, научное звание)	Разбекова М.К., Master of Public Health - главный специалист отдела оценки технологий здравоохранения Центра экономики и оценки технологий здравоохранения
3. Заявитель	РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ
4. Заявление по конфликту интересов	Конфликты интересов отсутствуют
5. Заявленные показания	<ul style="list-style-type: none">• Наследственное генетическое заболевание;• Мутации при задержке психомоторного развития;• Мутации при расстройствах аутистического спектра, неврологических расстройствах;
6. Альтернативные методы /Компараторы, применяемые в РК/	Секвенирование по Сангеру, MLPA метод

Краткая информация о технологии (структурированная)

Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с использованием NGS технологий – метод, который одновременно считывает сотни и тысячи генов за один эксперимент в сравнении с традиционным секвенированием по Сангеру, который покрывает ограниченное количество генетической информации. Метод анализирует транскрибуемые участки ДНК, где предположительно находятся около 85% всех мутаций, ассоциированных с тем или иным генетическим заболеванием.

Резюме (результат экспертизы)

В ходе проведенного исследования по клинической и экономической эффективности было обнаружено, что метод полноэкзомного секвенирования ДНК показал эффективность в поиске мутаций при редких генетических заболеваниях, задержке психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройствах в целях постановки молекулярного диагноза,



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	2 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

корректировки лечения пациента и планирования беременности. Заявленная стоимость полноэкзомного секвенирования превышает существующие тесты в десятки раз, но сопоставима с международными показателями. Ограничено введение в клиническую практику для диагностирования редких трудновыявляемых существующими методами заболеваний может быть рекомендовано для более эффективного менеджмента данной категории пациентов.

Список аббревиатур и сокращений

CADTH – Canadian Agency for Drug and Technologies in Health

XIAP - X-linked inhibitor of apoptosis gene

RFLP - Restriction fragment length polymorphism (Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)

MLPA - Multiplex ligation-dependent probe amplification (Метод мультиплексной амплификации лигированных зондов)

NGS – New generation sequencing (секвенирование нового поколения)

WES – whole exome sequencing (полноэкзомное секвенирование)

1. Цель отчета

Изучить клиническую и экономическую эффективность полноэкзомного секвенирования ДНК человека с использованием NGS технологий для поиска мутаций наследственных заболеваний, определения мутаций при задержке психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройствах для оценки целесообразности включения в клиническую практику и перечень возмещения.

2. Описание проблемы

Генетические заболевания обусловлены нарушениями в строении генома человека. Подразделяют мутации в одном гене (моногенные) и мутации во множественных генах (National Human Genome Research Institute, 2018). Наиболее изученными считаются моногенные заболевания в силу своей локализации, включающие талассемию, серповидноклеточную анемию, гемофилию, муковисцидоз, болезнь Тя-Сакса, синдром ломкой X-хромосомы, болезнь Хантингтона и другие (WHO, n.d.). Кроме того, большая часть моногенных заболеваний являются наследственными и их проще выявить уже традиционными генетическими методами (секвенирование по Сангеру). Что же касается менее изученных мутаций во множественных генах, то их зачастую связывают с



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	3 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

нарушениями в развитии нервной системы, этиология которых остается неоднозначной.

Нарушения в развитии нервной системы включают целый спектр заболеваний: задержка психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологические расстройства. Расстройства аутистического спектра, в свою очередь, охватывают широкий ряд нарушений, которые влияют на качество социального взаимодействия, ограниченное количество интересов и наличие повторяющихся действий у ребенка. Молекулярное диагностирование пациентов (обнаружение ассоциации мутации в гене с симптомами) стандартными методами (секвенирование по Сангеру, хромосомные исследования) остается низким, не более 10% всех пациентов (Du et al., 2018).

Задержка в психомоторном развитии характеризуется нарушениями в одной и более категориях, включая моторные навыки, речевые навыки, социальное поведение, а также когнитивное восприятие (Tong et al., 2018). Отставание в данных областях может негативно влиять на образование, поведение и выполнение повседневных функций человека.

Неврологические расстройства обусловлены нарушениями в развитии центральной и периферической нервных систем. К ним относятся эпилепсия, деменция, спиноцеребральная атрофия, болезнь Паркинсона и другие (Faghhihi et al., 2004). Симптомы могут проявляться в самых разных формах: нарушения в моторных навыках, произвольные и непроизвольные движения, пониженные чувствительность, когнитивные навыки, память и абстрактное мышление.

2.1.Описание заболевания (причины, факторы риска)

Выяснение причин этих заболеваний имеет комплексный характер с использованием самых различных методов от стандартных биохимических тестов, электроэнцефалограмм, инвазивных методов до генетических исследований (поиск однонуклеотидных полиморфизмов, хромосомные исследования и т.д.). Однако, даже с использованием этих методов существуют значительные затруднения с постановкой диагноза в целом.

Генетические причины заболеваний делятся на 3 категории: хромосомные, моногенные и множественные влияния (Lobo, Zhaurova, 2008). К примеру, среди наследуемых моногенных отмечают фенилкетонурию, которая объясняется мутацией в гене *PAH*, отвечающем за расщепление незаменимой аминокислоты фенилаланин. Наследуемые моногенные мутации могут наблюдаться у людей одной этнической или расовой группы. Например, серповидноклеточная анемия встречается у жителей с Африканскими, Индийскими корнями, а также людей,



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	4 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

проживающих на территории Средиземноморья. Тем временем, болезнь Тея-Сакса можно часто встретить у евреев Ашкеназы. Хромосомные аномалии, значительно влияющие на развитие нервной системы ребенка и иногда длительность жизни, включают в себя Синдром Дауна (трисомия 21 хромосомы), Синдром Патау (трисомия 13 хромосомы), и Синдром Эдвардса (трисомия 18 хромосомы). Множественные причины генетических заболеваний охватывают целый ряд факторов, таких как мутации в нескольких генах и влияние тератогенов (радиация, опасные вещества). Именно эта категория является наименее изученной даже после первой секвенирования всего генома человека в 2003 году, которая потребовала около 13 лет для завершения методом секвенирования по Сангеру («золотой стандарт»).

2.2. Эпидемиологические данные (заболеваемость, распространенность и т.д.)

Серьезные врожденные пороки развития встречаются у около 6% (7,9 миллиона) новорожденных ежегодно (Lobo, Zhaurova, 2008). Даже учитывая то, что такие пациенты проходят обследование, лечение и мониторируются специалистами, 40% пациентов (3,2 миллиона) остаются инвалидами на всю жизнь.

Нарушения в развитии нервной системы встречаются у более, чем 3% людей во всем мире, включая умственную отсталость, задержку психического развития и расстройства аутистического спектра. У 30% этих пациентов диагноз объясняется той или иной генетической вариабельностью, тогда как для более половины из них этиология нарушения не выясняется (Soden et al., 2014). Расстройства аутистического спектра занимают значительную долю этой категории пациентов и мировая распространенность составляет более 2% (Center for Disease Control, 2020).

2.3. Современная ситуация в Казахстане (в мире)

В исследовании национального генетического регистра «Үміт» приведена статистика по распространенности генетической патологии в Республике Казахстан (Абильдинова et al., 2017). Согласно авторам публикации, из 4000 зарегистрированных случаев врожденные пороки развития составили 50% пациентов, тогда как хромосомная патология и моногенная патология, обнаруженные цитогенетическими и генетическими методами (G - бандинг, FISH – метод, ПДРФ, МЛРА, масс-спектрометрические и флуориметрические методы), составляли 28% и 22% соответственно (Таблица 1). Среди хромосомных патологий чаще всего встречались Синдром Дауна (62,7%) и Синдром Эдвардса (16,2%). Среди моногенных превалировали патологии аутосомно-рецессивного типа наследования (52%), а именно спинальная мышечная амиотрофия, фенилкетонурия и муковисцидоз. Тем временем, доли детей с аутосомно-домinantным и X-



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	5 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

сцепленным видами наследования составляли 32% и 26% соответственно. Вдобавок, авторы привели статистику по орфанным заболеваниям, которые составляли 74 (1,8%) пациента. С точки зрения периода диагностирования заболеваний, то у 13% пациентов в регистре из 4000 человек патологии были найдены впренатальном периоде. Из хромосомных патологий этот показатель был выше, 33% случаев.

Врожденные пороки развития чаще всего были связаны с нарушениями в сердечно-сосудистой (34,8%), пищеварительной (14,3%), нервной (13,1%) и мочевыделительной (10,1%) системах. Стоит отметить, что авторы не указали, представлялось ли молекулярное диагностирование данной категории пациентов.

Таблица 1. Статистика врожденных патологий: генетический регистр «Үміт» (Адаптировано из Абильдинова et al., 2017).

Наименование	Количество (%)
Врожденные пороки развития	2002 (50%)
Хромосомная патология	1129 (28%)
Моногенная патология	869 (22%)
Всего	4000 (100%)

2.4. Описание технологии (описание, показания, противопоказания, срок эксплуатации, побочные явления, ожидаемый эффект от внедрения)

Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с использованием NGS технологий – метод, позволяющий одновременно просеквенировать сотни и тысячи генов за один эксперимент в сравнении с традиционным секвенированием по Сангеру, который покрывает ограниченное количество генетической информации (Płoski, 2016). К примеру, если секвенирование по Сангеру может проанализировать максимум 75,000 парных оснований (менее 20 регионов ДНК), то показатель для полноэкзомного секвенирования составляет более 1 000 000 парных основ. Приблизительное количество генов в человеке находится в диапазоне от 20,000 до 25,000 генов (Genetics Home Reference, 2020). Метод полноэкзомного секвенирования ДНК анализирует транскрибуемые участки ДНК (экзомы), представляющие собой 1.5% генетического материала ДНК человека, в которых находятся около 22,000 генов. Учитывая, что предполагаемые 85% генных мутаций, ассоциированных с заболеваниями, находятся в экзомных регионах, метод полноэкзомного секвенирования рассматривается как ценный инструмент для применения в научной и клинической практике (Majewski et al., 2011). Тем не менее, результаты полноэкзомного секвенирования зачастую



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	6 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

подвергаются проверке «золотым стандартом», секвенированием по Сангеру. Более того, из-за неполного покрытия всех генов и нетранскрибуемых участков, метод полноэкзомного секвенирования уступает объему информации, получаемой в ходе более дорогостоящего, энергоемкого и длительного метода секвенирования всего генома человека.

Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с использованием NGS технологий представляет собой несколько этапов, включающих фрагментирование цепочки ДНК, дальнейшую прицепку биотинилированных олигонуклеотидов, которые прикрепляются к экзомам (Warr et al., 2015). Далее, магнитические частицы стрептавидина прикрепляются к биотинилированным олигонуклеотидам и отправляются на полимеразную цепную реакцию для увеличения количества фрагментов ДНК, тогда как неприкрепленные участки (неэкзомы) смываются в ходе процесса подготовки. После этого полученные цепочки ДНК в ходе полимеразной цепной реакции считаются секвенатором для дальнейшего биоинформационического анализа.

Полноэкзомное секвенирование ДНК рекомендуется для поиска редких мутаций в генах, малоизученных ранее (Płoski, 2016). Благодаря методу полноэкзомного секвенирования ДНК удалось найти более 150 новых генов, ассоциированных с тем или иным наследственным заболеванием (Rabbani et al., 2014). Более того, полноэкзомное секвенирование ДНК может быть показано при отрицательных результатах традиционных негенетических и генетических методов диагностики болезни (Warr et al., 2015).

Противопоказания: не имеются

Срок эксплуатации: платформы (набор реагентов) используются при каждом новом секвенировании, для секвенаторов информация отсутствует, но компания Illumina предоставляет годовую гарантию на оборудование (Illumina, 2009).

Побочные явления: не имеются

Ожидаемый эффект от внедрения: нахождение мутаций в генах, ассоциированных с заболеванием, для постановки молекулярного диагноза, возможной дальнейшей корректировки лечения пациентов и для дополнительного рассмотрения планирования беременности.

2.5. История создания, различные модели /версии/ модификации.

Метод полноэкзомного секвенирования был впервые описан в 2009 году Ng et al. как более экономичная и быстрая альтернатива полногеномного секвенирования. В том же году у мужчины с изначальным диагнозом синдром Бартера с помощью полноэкзомного секвенирования ДНК была диагностирована



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	7 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

диарея, ассоциированная с мутацией гена, влиявшим на значительную потерю хлора из организма. Это был одним из самых первых случаев применения полноэкзомного секвенирования ДНК в клинической практике для постановки молекулярного диагноза.

Еще одним из первых успешных случаев использования метода полноэкзомного секвенирования ДНК для корректного диагностирования и дальнейшего лечения связан с ребенком неонатального возраста, у которого была редкая форма воспалительного заболевания кишечника в 2011 году (Worthey et al., 2011). В этом случае стандартная диагностика не смогла найти объяснение серьезной манифестации симптомов болезни. Мультидисциплинарная группа специалистов, состоящая из врачей-специалистов и биоинформатиков выявила мутацию в гене ингибитора апоптоза (*XIAP*), которая привела к потере толерантности к бактериям в пищеварительной системе. Новый диагноз ребенка был сформулирован как лимфопролиферативное заболевание X-хромосомы, который позволил провести трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток и дальнейшему эффективному лечению этого заболевания.

После этого случая использование полноэкзомного секвенирования ДНК стало набирать обороты в различных целях: диагностирование тех пациентов, кому так и не был поставлен диагноз, а также пренатальная диагностика и ранее диагностирование тяжелых болезней (Warr et al., 2015). Кроме того, нахождение причинной мутации помогает поменять курс лечения, превентативность дальнейшего диагностирования, корректный прогноз течения болезни, а также подтверждение диагнозов.

Существуют несколько видов платформ (набор реагентов), с помощью которых происходит полноэкзомное секвенирование ДНК. Одними из самых распространенных являются NimbleGen's SeqCap EZ Exome Library, Illumina's TruSeq Exome Enrichment Kit, Illumina's Nextera Rapid Capture Exome Kit (Warr et al., 2015). Они варьируется по длине олигонуклеотидов (55-105 пар оснований), размеру анализируемой ДНК (50-62 Mb), выходу генетического материала на дальнейший биоинформационический анализ (40,1-66%). В силу технических особенностей каждой платформы имеются преимущества по высокой чувствительности и специфичности у NimbleGen's SeqCap EZ Exome Library и хорошего покрытия нетранслируемых участков ДНК у Illumina's TruSeq Exome Enrichment Kit и Illumina's Nextera Rapid Capture Exome Kit.



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	8 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

2.6. Опыт использования в мире (какие производители).

Самые распространенные платформы, необходимые для полноэкзомного секвенирования ДНК, производятся в Соединенных Штатах Америки (Bodi et al., 2013). Компания Illumina, производящая платформы Illumina's TruSeq Exome Enrichment Kit и Illumina's Nextera Rapid Capture Exome Kit, находится в городе Сан-Диего, штат Калифорния. Тем временем, платформа NimbleGen's SeqCap EZ Exome Library производится компанией Roche в городе Мэдисон, Висконсин.

Касательно секвенаторов, необходимых для непосредственного считывания генной информации, то выделяют Genome Analyzer IIx systems от компании Illumina и Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology, производимый Thermo Fisher в городе Уолтем, штат Массачусетс (Doherty, 2018). Реже используется секвенатор германского происхождения компании Qiagen, город Хильден.

2.7. Опыт использования в Казахстане, кадровый потенциал, материально-техническое обеспечение для внедрения.

Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с использованием NGS технологий выполняется в научных и клинических целях и в Казахстане. Однако, стоит отметить, что использование этого метода происходит в ограниченных количествах в рамках научных исследований и платных услуг при РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ (БМЦ УДП РК, 2020, Лаборатория биоинформатики и системной биологии Назарбаев Университета, n.d.).

Для проведения полноэкзомного секвенирования ДНК человека с использованием технологии NGS потребуются платформы для секвенирования, секвенатор, инструмент для количественного определения нуклеиновых кислот, анализатор качества нуклеиновых кислот, термоциклир, ультрасоникатор, центрифуга, обычные лабораторные принадлежности (пипетки, 96-луночные планшеты, центрифужные пробирки) (Illumina, 2020).

Проведение полноэкзомного секвенирования ДНК предполагает мультидисциплинарную команду, состоящую из врачей-генетиков, лаборантов и биоинформатиков (Jelin et al., 2018). Комплексный подход важен для корректной интерпретации результатов, особенно при нахождении новых мутаций, ассоциированных с симптомами.

3. Клинический обзор



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	9 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

3.1. Методы, стратегия поиска по диагностической эффективности и безопасности

В поиске данных по клинической эффективности полноэкзомного секвенирования ДНК человека с использованием NGS технологий для поиска мутаций наследственных заболеваний, определения мутаций при задержке психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройствах были использованы следующие базы данных с ключевыми словами «whole exome sequencing», «hereditary», «psychomotor development», «autistic», «neurological disorder»: EBSCOhost, PubMed, Cochrane, CADTH. Были подробно изучены систематические обзоры (n=2), отчет оценки технологий CADTH и исследования (n=10) использования полноэкзомного секвенирования ДНК человека для поиска мутаций в вышеперечисленных заболеваниях. В большинстве исследований результаты метода полноэкзомного секвенирования ДНК проверялись на подлинность «золотым стандартом», методом секвенирования по Сангеру.

3.2. Результаты по клинической эффективности и безопасности.

Sawyer et al. (2015) провели обзор существующей литературы по полноэкзомному секвенированию и исследование в рамках проекта по определению генов у детей с редкими заболеваниями (FORGE) с помощью полноэкзомного секвенирования ДНК. К примеру, авторы привели статистику, что около 46% пациентов, обратившихся к традиционным методам исследования на наличие генных мутаций (кариотипы, хромосомные нарушения, исследования одного гена, генная панель, генные биохимические тесты), получили молекулярный или генный диагноз (Shashi et al., 2014). Из них у 72% диагноз определился с первого визита, тогда как остальным понадобилось проводить дальнейшие исследования до выявления диагноза. Полноэкзомное секвенирование ДНК показало 8% выявляемость редких заболеваний у пациентов, у которых ранее не были найдены заболевания стандартными методами диагностики (Need et al., 2012). Кроме этого, авторы нашли и другие исследования, подтверждающие пользу данного метода. Например, около 50% пациентов из 12 участников исследования с различными фенотипными изменениями получили молекулярный диагноз, в то время как данный показатель у пациентов с нарушениями интеллектуального или психомоторного развития составил от 16% до 45% (Dixon-Salazar et al., 2012, Rauch et al., 2012, Vissers et al., 2010, de Ligt et al., 2012, Soden et al., 2014). Более того,



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	10 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

молекулярный диагноз эпилепсии подтвердился у 8 из 9 семей в исследовании FORGE, опубликованных ранее (Dummet et al., 2015).

Полноэкзомное секвенирования ДНК применялось как основной метод молекулярного диагностирования в Канадском национальном проекте по определению ассоциированных мутаций у детей с редкими заболеваниями (FORGE) (Sawyer et al., 2015). В исследовании участвовало более 500 детей из 362 семей, которые находились на разных стадиях диагностирования своих заболеваний – в начале и после различных генных исследований. У более половины участников исследования (51,9%) удалось обнаружить мутации в генах, ассоциированные с заболеванием. Стоит учесть, что известные гены, связанные с заболеваниями, были обнаружены у 55,8% участников, тогда оставшиеся гены были найдены впервые. Тем не менее, авторы заострили внимание на том, что у меньшей половины участников (48,1%) все-таки не получилось выявить гены, которые могли сыграть большую роль в развитии заболевания. Кроме этого, полученная информация о мутациях в генах позволила изменить тактику лечения некоторых пациентов и добиться положительных изменений в симптомах, что случилось у 26% участников исследования после результатов секвенирования ДНК. К примеру, у двух близняшек возраста 30 лет с эпилепсией и задержкой интеллектуального развития была найдена мутация в гене, отвечающим за транспорт фолиевой кислоты в мозге. Дальнейшее назначение фолиевой кислоты не только снизило количество эпилептических припадков, но и увеличило качество жизни пациентов. Хотя дефицит этого витамина уже нанес значительные изменения на белое вещество мозга, более раннее диагностирование мутаций может значительно сказать на лечении и эффекте на здоровье пациента. В ходе исследования FORGE, ассоциированные с обнаруженными генными мутациями, чаще всего диагностировались пациенты с цилиопатией (44%), с нарушениями в метаболизме и психомоторном развитии (38,7%) и другими симптомами в различных категориях (сердечно-сосудистая система, эндокринология, ментальное здоровье, легкие) – 40%. Более того, полноэкзомное секвенирование позволило выявить генетическую причину фенотипов, которые ранее не были установлены стандартными генетическими методами исследования. Авторы утверждают, что у 46,7% имелись множественные мутации, а у 27,6% - атипичные мутации, что удалось выявить только после полноэкзомного секвенирования ДНК. Таким образом, авторы утверждают об эффективности использования молекулярной диагностики редких заболеваний методом полноэкзомного секвенирования ДНК.

Обзор Jelin et al. (2018) о целесообразности использования полноэкзомного секвенирования ДНК в пренатальной диагностике выявил определенные условия,



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	11 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

при которых применение данного метода будет наиболее актуальным. После обзора 7 публикаций, основанных на 185 случаях секвенирования экзома плода при аномалиях, обнаруженных при ультразвуковом исследовании, авторы наблюдали выявляемость патогенной мутации от 10% до 42,9% участников. Причем в 6 из 7 исследований проводилась секвенирование экзома ребенка и обоих родителей. Кроме того, авторы предполагают, что полноэкзомное секвенирование ДНК может быть полезно при операциях на плоде во время беременности для устранения скелетных дисплазий и других фетальных терапий. Далее, постнатальная диагностика показывает от 25 до 30% выявляемости причины на генном уровне при неэффективности традиционных методов исследования генотипа. Среди недостатков метода авторы отметили отсутствие функции выявления хромосомных аномалий (анеуплоидия, полиплоидия), генных транслокаций, тринуклеотидных повторов, регионов с высоким содержанием нуклеотидов гуанина и цитозина, а также большую длительность для получения результатов (от 2-3 недель). Для проверки достоверности результатов полноэкзомного секвенирования ДНК все также остается метод «золотого стандарта», секвенирование по Сангеру. Таким образом, авторы рекомендуют прибегать к методу полноэкзомного секвенирования ДНК только при редких гетерогенных мутациях (многочисленные врожденные аномалии, гетеротаксии, скелетные дисплазии), причины которых не были выявлены традиционными способами в силу новизны метода и его недостаточной изученности.

Авторы отчета Канадского агентства по лекарствам и технологиям в здравоохранении (CADTH, 2014) проводили оценку методов секвенирования нового поколения: полноэкзомное, полногеномное и целевое секвенирование генов. Эти методы рассматривались с точки зрения информативности и затрато-эффективности в сравнении с секвенированием Сангера («золотой стандарт»). После обзора литературы с 2009 по 2014 годы авторами были рассмотрены только лабораторные рекомендации по применению изучаемых методов. Учитывая ограниченное количество опубликованных работ, авторы пишут, что метод полноэкзомного секвенирования ДНК имеет самую низкую чувствительность к генной информации среди других методов секвенирования, что зачастую может потребовать проверки секвенированием Сангера. Также авторы пишут о вероятности ложноположительных результатов из-за естественной вариации генов. Тем не менее, метод полноэкзомного секвенирования ДНК остается одной из возможностью исследования неизведанных взаимосвязей генетических мутаций и болезней.



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	12 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

При сравнении метода полноэкзомного секвенирования ДНК с заявленными альтернативами, RFLP анализ, MLPA метод, секвенирование по Сангеру, стоит учесть, что специфика первых двух позволяет определить только общую информацию о генах (количество хромосом, расположение, схожесть между образцами от разных людей), а не точные мутации, которые можно выявить с помощью метода полноэкзомного секвенирования ДНК и секвенирования по Сангеру. Более того, в большинстве исследований секвенирование по Сангеру остается «золотым стандартом», который подтверждает все результаты, найденные методом полноэкзомного секвенирования ДНК, а также RFLP и MLPA методами, которые в свою очередь дополняют метод полноэкзомного секвенирования ДНК с точки зрения общей хромосомной и генной информации.

К примеру, в исследовании 39 участников из 6 семей с наследственным множественным экзостозом, аутосомным доминантным заболеванием, характеризующимся косте-хрящевыми образованиями, были проведены 3 анализа генов *EXT1* и *EXT2* методами полноэкзомного секвенирования, MLPA и секвенирования по Сангеру (Long et al., 2019). Авторами были исследованы ДНК 21 пациента с симптомами болезни, остальных 18 членов семей без проявления болезни и 200 здоровых контролей. Метод полноэкзомного секвенирования ДНК позволил определить как известные, так и новые мутации в генах *EXT1* и *EXT2*, далее с помощью метода MLPA удалось выяснить отсутствуют ли генные участки, а секвенирование по Сангеру подтвердило полученные результаты. В данной ситуации, проанализировав генеалогии и ДНК представителей каждого семейства, авторы заключили, что комбинация метода полноэкзомного секвенирования ДНК и MLPA позволила найти возможные причины наследственного множественного экзостоза, тогда как метод «золотого стандарта» подтверждает достоверность результатов. Li et al. (2019) в своем исследовании изучали два клинических случая пациентов с синдромом Ангельмана с помощью методов полноэкзомного секвенирования ДНК и MLPA анализа и проверяли результаты секвенированием по Сангеру. Врожденный порок психомоторного развития зачастую ассоциирован с различными дефектами в гене *UBE3A*, а MLPA – это широкоприменяемый метод в диагностировании этого заболевания. Авторы хотели изучить валидность применения полноэкзомного секвенирования для молекулярной диагностики синдрома Ангельмана. Хотя количество случаев было всего два, полученные результаты методом полноэкзомного секвенирования ДНК были сопоставимы с MLPA и подтверждены секвенированием по Сангеру. Тем не менее, метод «золотого стандарта» добавил недостающую информацию по подвиду мутации. На основе этих результатов, авторы предполагают, что наряду с устоявшимся методом



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	13 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

MLPA новый метод полноэкзомного секвенирования имеет хорошие шансы для использования в диагностике пациентов с синдромом Ангельмана.

С точки зрения валидации результатов метода полноэкзомного секвенирования ДНК «золотым стандартом», Hamilton et al. (2016) исследовали генотип 26 людей с подозрением на редкие генетические заболевания. Авторы обнаружили высокую сопоставимость результатов (97,3%) метода полноэкзомного секвенирования с методом по Сангеру. Тем не менее, авторы заметили низкое качество анализа методом полноэкзомного секвенирования ДНК 17,6% генов, связанных с заболеваниями. Авторы связывают это с регионами с высоким содержанием основных пар гуанина и цитозина, которые метод полноэкзомного секвенирования ДНК плохо считывает. Кроме того, качество секвенирования еще зависит от набора реагентов, которые периодически обновляются для более высокого и точного покрытия экзонов. В целом, авторы рекомендуют комбинированное использование метода полноэкзомного секвенирования для выявления мутации в редких заболеваниях с гетерогенными мутациями с секвенированием по Сангеру. В свою очередь, метод «золотого стандарта» сможет проанализировать остальные гены, которые метод полноэкзомного секвенирования ДНК плохо считывает.

Применение метода полноэкзомного секвенирования ДНК в молекулярном диагностировании наследственных заболеваний, задержки психомоторного развития, аутистического спектра и неврологических расстройствах было изучено в рамках опубликованных клинических случаев и когортных исследований, причем практически все исследования имели небольшую выборку.

Soden et al. (2014) применяли метод полноэкзомного секвенирования ДНК для диагностики детей с различными видами психомоторной задержки развития. Было исследовано 119 детей со средним возрастом 7 лет и их родители (трио-комбинация). Самыми распространенными фенотипами, встречавшимися у детей, были общая задержка развития, энцефалопатия, мышечная слабость. В результате полноэкзомного секвенирования ДНК 53 ребенка из 119 получили определенный молекулярный диагноз, подтвержденный методом Сангера. Вдобавок, стоит учесть, что у 40% детей удалось поставить диагноз после неуспешных попыток традиционными негенетическими методами (среднее количество тестов = 13,3). Кроме этого, изменение в курсе лечения наблюдалась у 49% детей после поставленного молекулярного диагноза, что способствовало позитивному изменению в самочувствии пациентов.

Nolan et al. (2016) выявили позитивную динамику как в диагностике, так и в клиническом менеджменте детей с нарушениями психомоторного развития.



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	14 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

Авторы изучали результаты детей, наблюдавшихся в Педиатрической Неврологической клинике при Университете Мичигана с 2011 по 2015 годы. Всего к прохождению методом полноэкзомного секвенирования ДНК было рекомендовано 135 детей, но в силу издержек медицинских страховых планов, только 53 ребенка прошли полноэкзомное секвенирование. Средний возраст возникновения симптомов составлял 2 года, а диагностирования методом полноэкзомного секвенирования ДНК – около 7 лет. Если изначально только 25% детей было диагностировано традиционными негенетическими методами, то после полноэкзомного секвенирования ДНК этот показатель увеличился до 48%. Результаты были подтверждены методом Сангера. У второй половины детей без точного молекулярного диагноза после проведения полноэкзомного секвенирования ДНК были найдены неизвестные варианты генов, которые не смогли быть ассоциированы с симптомом. Дальнейший менеджмент пациентов с молекулярным диагнозом подразумевал изменение в курсе лечения, консультации дополнительных специалистов, а также объяснение симптомов. Таким образом, семьи пациентов имели большее понимание дальнейшего менеджмента заболевания. Авторы отмечают, что метод полноэкзомного секвенирования ДНК чаще всего рекомендуется именно детям с нарушениями психомоторного развития, и в своем исследовании поддерживают применение метода в диагностике этой категории заболеваний.

Если в предыдущем исследовании симптомы болезней не были летальными, то Tong et al. (2018) опубликовали исследование с применением метода полноэкзомного секвенирования ДНК у детей с задержкой психомоторного развития с опасным для жизни состоянием, необъяснимой одышкой. Образцы ДНК 31 ребенка и обоих родителей были проанализированы методом полноэкзомного секвенирования, а результаты проверены «золотым стандартом». У 12 пациентов (38,7%) были выявлены различные синдромы, включая метилмалоновую ацидурию и гомоцистинурию, болезнь накопления гликогена, дефицит митохондриального комплекса 1, дефицит карнитина. У 30% пациентов были обнаружены новые патогенные мутации, которые не были опубликованы в других исследованиях и базах данных. Аккуратное диагностирование причин нарушения психомоторного развития в дальнейшем позволило не только исключить дополнительные генетические исследования, но и своевременно принять необходимые меры для спасения детей от необъяснимой одышки. К примеру, были скорректированы курс лечения (применение рибофлавина, карнитина, коэнзима Q10, витамин D, B1, крахмал, кальций) и диета, которые привели к нормализации биохимических показателей в крови, усилию мышц, толерантности к физическим нагрузкам и



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	15 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

дальнейшему уменьшению проявлений клинических симптомов. В целом, авторы рекомендуют использование полноэкзономного секвенирования ДНК детям с различными нарушениями психомоторного развития в критических состояниях. Однако важно учитывать временные ограничения теста, ведь проведение секвенирования и анализ результатов занимает от 2-3 недель.

Если полноэкзономное секвенирование для редких заболеваний и нарушений психомоторного развития исследовалось в группах с небольшой выборкой, то для изучения возможных генетических мутаций при расстройстве аутистического спектра включали намного больше участников.

Более масштабные исследования детей с расстройством аутистического спектра и их здоровых братьев и сестер из 2500 семей позволили выявить что 43% обнаруженных новых мутаций ассоциированы с 9% диагнозов (Iossifov et al. 2014). Авторам удалось классифицировать мутации по следующим категориям: модификаторы хроматина, FMRP-ассоциированные гены, а также гены, экспрессирующиеся на эмбриональном уровне. Iossifov et al. (2014) также было обнаружено, что по большей части мутированные гены были в одном экземпляре и у него был здоровый вариант от другой хромосомы. Авторы предполагают, что клинический менеджмент пациентов может быть направлен на усиление активации более здоровой версии гена, а также может быть схожим с пациентами с нарушением умственного развития и шизофрении в силу схожести мутаций.

В 2015 году Tammimies et al. провели полноэкзономное секвенирование ДНК неродственных 95 детей с расстройством аутистического спектра в Канаде. Из них 8,4% получили молекулярный диагноз, подтверждающий заболевание. Наследственность мутаций была выявлена у всех пациентов. Более того, почти у всех выявленных случаев (6,2% из 8,4%) дальнейшая корректировка лечения согласно обнаруженной мутации привела к уменьшению проявления симптомов и увеличению общей выживаемости. Однако, остальным 91,6% участников так и не удалось выяснить молекулярную причину расстройства, что может свидетельствовать о малой изученности данной области.

В более недавнем исследовании детей из 80 семей с расстройством аутистического спектра в Китае были похожие результаты молекулярного диагностирования, 9,2% (Du et al., 2018). Кроме того, этот показатель составил 6,7% детей с подозрением на расстройство аутистического спектра. Далее, все участники ранее получили негативные результаты генетического метода анализа вариации числа копий генов. При полученной выявляемости молекулярной причины симптомов в пределах 10-15% авторы пришли к заключению, что полноэкзономное секвенирование является эффективным диагностическим



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	<i>№340 от 15.06.2020</i>	<i>16 из 29</i>

Отчет оценки технологий здравоохранения

инструментом в молекулярной диагностике расстройства аутистического спектра и может привести в раннему предупреждению заболевания и лечению, особенно при негативных результатов других тестов.

4. Экономический обзор

4.1. Методы, стратегия поиска по экономической эффективности

В поиске данных по экономической эффективности проведения полноэкзомного секвенирования ДНК человека с использованием NGS технологий для поиска мутаций наследственных заболеваний, определения мутаций при задержке психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройствах были использованы следующие базы данных с ключевыми словами «whole exome sequencing», «cost», «cost-effectiveness»: EBSCOhost, PubMed, Cochrane, CADTH. Для дальнейшего изучения были отобраны систематические обзоры, отчет оценки технологий CADTH и фармакоэкономические исследования использованием метода полноэкзомного секвенирования ДНК для диагностики заболеваний.

4.2. Результаты по экономической эффективности (опубликованные экономические оценки, экономические расчеты с учетом данных Казахстана, стоимость существующих методов в Казахстане).

Согласно данным, предоставленным Заявителем, стоимость проведения одного исследования полноэкзомного секвенирования ДНК человека с использованием NGS технологий (поиск мутаций наследственных заболеваний, определение мутаций при задержке психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройствах) в РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ составит 755 718,20 тг (Таблица 2).

Однако, стоит также учитывать дополнительные затраты на остальное оборудование, которое может потребоваться в условиях других организаций, а именно секвенатор, инструмент для количественного определения нуклеиновых кислот, анализатор качества нуклеиновых кислот, термоциклир, ультрасоникатор, центрифуга, обычные лабораторные принадлежности (пипетки, 96-луночные планшеты, центрифужные пробирки) (Illumina, 2020).

Таблица 2. Заявленная стоимость полноэкзомного секвенирования ДНК.

№	Наименование	Стоимость (тг)
----------	---------------------	-----------------------



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	17 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

1	Прямые затраты, в том числе:	730 401,39
1.1	Затраты на оплату труда специалистов на проведение исследования	1 156,81
1.2	Затраты на одноразовые изделия медицинского назначения	729 244,58
2	Затраты на амортизацию оборудования (износ основных средств)	24 009,61
3	Накладные расходы	1 307,20
	Итого	755 718,20

В Приказе Министра здравоохранения Республики Казахстан от 5 сентября 2018 года № КР ДСМ-10 (2020) молекулярно-генетические методы, оказываемые в рамках гарантированного объема медицинской помощи и в системе обязательного медстрахования, представлены тарифами кодов В09.000.017 (Приложение, Таблица 1). Стоимость тестов на определение мутаций в генах на различные заболевания находится в диапазоне от 6925,67 до 63014,50 тг. При сравнении с существующими методами, возмещаемые государством, заявляемая стоимость полноэкзонного секвенирования ДНК больше в 12-100 раз. Очевидно, что стоимость полноэкзонного секвенирования ДНК существенно превосходит другие методы, но недостаточно информации о количестве и общих затратах на диагностику заболеваний в Казахстане на сегодняшний день. Тем самым, информативно было бы сопоставить показатели затрат на стандартную диагностику заболеваний в стране с заявленной стоимостью метода полноэкзонного секвенирования ДНК, на которых данные в настоящее время ограниченны.

Далее представлены результаты опубликованных отчета оценки технологий здравоохранения CADTH, систематического обзора и отдельных исследований по экономической эффективности внедрения метода полноэкзонного секвенирования ДНК в клиническую практику.

С точки зрения затрато-эффективности метода полноэкзонного секвенирования ДНК авторы отчета Канадского агентства по лекарствам и технологиям в здравоохранении не пришли к однозначному выводу из-за ограниченного количества данных на период написания отчета (CADTH, 2014).

В систематическом обзоре Schwarze et al. (2018) изучали опубликованные в 2011-2017 годах исследования по экономической эффективности полноэкзонного секвенирования ДНК. Всего в обзор было включено 24 исследования, в которых изучались затраты и затрато-эффективность метода полноэкзонного секвенирования ДНК. Количество участников доходило до 2000, но по большей части (53%) менее 100 человек. Участниками исследований в 36% являлись дети и



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	18 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

новорожденые, тогда как взрослые и ребенок+родители составляли 25% и 17% исследований соответственно, в остальных информации отсутствовала. Наиболее частые заболевания, исследованные методом полноэкзомного секвенирования ДНК, оказались неврологические болезни и расстройства психомоторного развития. Schwarze et al. (2018) было обнаружено, что в 18 исследованиях стоимость одного теста методом полноэкзомного секвенирования ДНК находилась в промежутке от 555 \$ до 5,169 \$. Тем временем, диапазон стоимости тройного теста (ребенок+родители) составил 3,825-9,304. В целом, при применении полноэкзомного секвенирования ДНК диагностическая выявляемость заболеваний повышалась в сравнении с традиционными методами диагностики наряду с дополнительными затратами на сам тест. Так, авторами было найдено, что затраты на метод полноэкзомного секвенирования ДНК за дополнительный диагноз в сравнении с традиционными генетическими и негенетическими методами варьировались от 1,484 \$ до 12,092 \$ за дополнительный диагноз. Стоит отметить, что при выборе метода полноэкзомного секвенирования ДНК как один из первых методов тестирования заболеваний, затраты за дополнительный диагноз были меньше, от 1,484 \$ до 3,242 \$ за дополнительный диагноз. Вдобавок, метод полноэкзомного секвенирования ДНК может быть затрато-сберегательным в сравнении с комбинацией традиционных методов диагностики детских мышечных заболеваний (секвенирование по Сангеру, биопсия, гистологические и биохимические тесты), сохраняя 9,342 \$/дополнительный диагноз. Более того, в одном из исследований, вошедших в систематический обзор, авторы предполагают, что затрато-эффективность метода полноэкзомного секвенирования ДНК будет сохраняться при максимальной стоимости за тест 2 996 \$ на человека (Soden et al. 2014). Тем не менее, авторами обзора было заключено, что информации по затрато-эффективности обширного использования полноэкзомного секвенирования ДНК в клинической практике недостаточно в силу фундаментальных различий в системах здравоохранения стран, небольшой выборки, а также ограниченной обобщаемости результатов исследований.

Что же касается отдельных исследований, не вошедших в систематический обзор, то в обеих работах (Nolan et al., 2016, Tan et al., 2017) метод полноэкзомного секвенирования ДНК рассматривается как затрато-эффективный метод диагностики генетических заболеваний. Оба исследования изучали известные мутации в определенных генах, ассоциированные с недугом, при этом исключая более широкий профиль других мутаций. Nolan et al. (2016) рассчитали возможные затраты на исследование генетическими методами и выявили, что более раннее проведение полноэкзомного секвенирования может сэкономить средства на



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	19 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

дополнительную генетическую диагностику. В среднем, экономия может составить 2465,62 \$ за дополнительный диагноз. В то время как Tan et al. (2017) на исследовании 44 детей обнаружили, что использование метода полноэкзомного секвенирования ДНК детям с подозрением на генетическое заболевание в сравнении с традиционными негенетическими методами может привести к затрато-сбережениям в 6,838 \$ за дополнительный диагноз. Более того, при применении метода полноэкзомного секвенирования ДНК как один из тестов первой линии затрато-сбережения составят 4,140 \$ за дополнительный диагноз.

Таким образом, заявленная стоимость полноэкзомного секвенирования заметно превосходит существующие альтернативы, финансируемые государством в рамках ГОБМП. Тем не менее, заявленная стоимость находится в диапазоне международных показателей (средний курс доллара в 2020 году = 401,7 тг), 1881,3 \$ (755 718,2 тг) и 555 \$ - 5,169 \$ соответственно (Национальный банк, 2020). Более того, априори секвенирование технологиями нового поколения подразумевает более высокую стоимость за тест в сравнении с остальными генетическими методами в силу затрат на оборудование и реагенты. Даже если отдельные международные исследования и предполагают затрато-эффективность и затрато-сбережение использования полноэкзомного секвенирования в диагностике различных заболеваний, то авторы систематического обзора и оценки технологий здравоохранения не пришли к однозначному выводу из-за возможных различий между странами и недостаточно репрезентативной выборкой. В целом, экономическая целесообразность внедрения в перечень возмещения в рамках здравоохранения Казахстана так же остается неоднозначной.

5. Важность для системы здравоохранения (психологические, социальные и этические аспекты; организационные и профессиональные последствия; экономические последствия: последствия для ресурсов, анализ влияния на бюджет)

Проведение полноэкзомного секвенирования ДНК может повлиять на постановку корректного молекулярного диагноза для пациентов с нарушениями в развитии нервной системы. Особенно это может быть важно для тех пациентов, у которых стандартные методы секвенирования (моногенные или хромосомные) не обнаружили генетические мутации, связанные с симптомами заболеваний. Более того, раннее применение полноэкзомного секвенирования сократит время на стандартные генетические и негенетические методы диагностики заболевания. Тем самым, увеличиваются шансы для более раннего вмешательства в предупреждении развития болезни, начала лечения, корректировки лечения и диеты и, в целом, для



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	20 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

увеличении качества жизни и информированности пациента (Jelin et al., 2018). Кроме того, эти аспекты могут повлиять и при пренатальной диагностике для прагматичного планирования беременности.

Тем не менее, в силу малоизученности всех возможных мутаций, ассоциированных с заболеваниями, могут возникнуть трудности в интерпретации совершенно новых мутаций. Более того, метод может потребовать компетентный и комплексный подход в виде мультидисциплинарной команды специалистов и повторному рассмотрению результатов. Особенно это касается должно положительных и должно отрицательных результатов, которые могут повлиять на дальнейшие выводы и действия врачей-специалистов и самого пациента.

Введение полноэкзомного секвенирования ДНК потребует значительных финансовых и человеческих ресурсов, как на само секвенирование, оборудование, подготовку специалистов, так и на дополнительное медицинское обследование и подтверждение результатов «золотым стандартом».

6. Обсуждение (краткое изложение результатов, обсуждение релевантности, ограничения исследования)

Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с применением NGS исследуется на протяжении последних 11 лет. Применение в клинической практике находится на стадии исследования по всему миру, включая национальный проект FORGE по диагностике редких заболеваний Канады. Полноэкзомное секвенирование зачастую использовалось для корректной молекулярной диагностики нарушений развития нервной системы в силу их множественной генетической этиологии и ограниченных возможностей существующих методов.

По результатам обзора по клинической эффективности по большей части метод полноэкзомного секвенирования применялся пациентам с редкими заболеваниями нервной системы, метаболизма и мышечной ткани, часто характеризующимися мутациями во многих генах одновременно. Более того, метод применялся при неэффективности стандартных методов диагностики и гетерогенных мутациях. Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с применением NGS позволяло находить мутации, ассоциированные с симптомами заболевания, до 50% пациентов. Применение полноэкзомного секвенирования ДНК человека для диагностирования наследственных заболеваний встречалось намного реже зачастую в связи с их ассоциированностью только с одним геном и успешным вывлением стандартными генетическими тестами. Результаты исследований применения метода полноэкзомного секвенирования ДНК человека



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	21 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

подтверждалась до 97% случаев методом «золотого стандарта», секвенированием по Сангеру.

В целом, авторы обзоров и исследований рекомендуют использование полноэкзомного секвенирования для редких нарушений развития нервной системы при непонятной этиологии заболевания. Результаты обзора затрато-экономической эффективности показали, что заявленная стоимость метода находится в диапазоне международных показателей, 1881,3 \$ (755 718,2 тг) и 555 \$ - 5,169 \$ соответственно. Однако, авторы систематического обзора в силу различий условий здравоохранения стран, стоимости и различных сценариев диагностики заболеваний сделали вывод, что затрато-эффективность применения метода полноэкзомного секвенирования ДНК человека неоднозначна, несмотря на положительные результаты отдельных исследований.

По итогам проведенного исследования целесообразности введения метода полноэкзомного секвенирования ДНК человека в клиническую практику результаты показали положительную тенденцию применения в диагностике редких заболеваний, включая нарушения развития нервной системы (задержка психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологические расстройства) с точек зрения постановки корректного молекулярного диагноза и дальнейшего менеджмента заболевания. Однако, информации по применению полноэкзомного секвенирования ДНК человека для определения наследственных заболеваний недостаточно для рекомендации использования теста для этой категории пациентов на данный момент. Кроме того, наследственные заболевания чаще всего рекомендуются диагностировать секвенированием по Сангеру и другими стандартными методами в силу превалирования моногенных мутаций у этой группы пациентов. Также при молекулярной диагностике пациентов с расстройством аутистического спектра наблюдалась выявляемость мутаций, ассоциированных с симптомами, в пределах 10-15%, что стоит учитывать при проведении диагностики этой категории пациентов.

Касательно введения в список возмещения, то учитывая потенциал метода полноэкзомного секвенирования ДНК человека для редких заболеваний с множественными мутациями и дальнейшее влияние на курс лечения пациента, сопоставимую цену с международными показателями, высокую стоимость в сравнении с имеющимися тестами в списке ГОБМ, повышенных затрат в целом, то заключение потребует дополнительного рассмотрения. Вышеупомянутый национальный проект по диагностике редких заболеваний в Канаде FORGE применял новый метод на 500 пациентах с редкими заболеваниями, включая нарушения в развитии нервной системы, метаболизме, нервномышечных



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	<i>№340 от 15.06.2020</i>	<i>22 из 29</i>

Отчет оценки технологий здравоохранения

окончаний, а также цилиопатию (Sawyer et al., 2015). Целью проекта было выявить новые ассоциированные мутации с редкими заболеваниями у детей и изучить потенциал использования полноэкзомного секвенирования. В силу небольшой распространенности заболеваний, нагрузка на бюджет страны не отмечалась авторами исследования, но их изучение помогало оценить потенциал использования этого метода.

В Австралии ежегодно в рамках программы Australian Genomics Health Alliance государство финансирует 3000 семей для полноэкзомного или полногеномного секвенирования с целью обнаружить причины развития умственной отсталости у детей и дальнейшего развитию науки (Australian Genomics Health Alliance, 2020). Максимальные затраты на трех представителей одной семьи на тесты не должны превышать 2,900 австралийский долларов. Стоит отметить, что каждый кандидат на сдачу теста, финансируемого государством, рассматривается соответствующим комитетом. Учитывая схожесть систем здравоохранения этих двух стран и их опыт, в случае одобрения в список возмещения заявляемой технологии рекомендуется ограничить количество проводимых тестов в год для молекулярной диагностики редких болезней в случае неэффективности имеющихся методов и потенциала изменения клинического менеджмента заболевания.

7. Выводы, преимущества и недостатки метода

В силу наличия показанной клинической эффективности как при молекулярном диагностировании заболевания, так и при дальнейшем менеджменте пациентов (до 50%), полноэкзомное секвенирование рекомендуется для применения в клинической практике для поиска мутаций при задержке психомоторного развития, расстройстве аутистического спектра и неврологических расстройствах. Стоит отметить, что для повышенной эффективности рекомендуется исследовать пациентов с редкими генетическими заболеваниями, которые сложно выявляются традиционными методами диагностики. Рекомендуется более комплексный подход к решению поиска мутаций при наследственных заболеваниях новым методом, так как зачастую они являются моногенными с известными мутациями в генах и выявляемыми традиционными генетическими методами.

Анализ публикаций по экономической эффективности показал, что заявленная стоимость теста составляет 755 718,2 тг (1 881,3 \$) и находится диапазоне международных показателей, 555 \$ - 5,169 \$. Если отдельные



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	23 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

исследования предполагают затрато-эффективность применения полноэкзомного секвенирования ДНК человека как в качестве теста первой, так и второй линии, то авторы систематического обзора оставляют выводы неоднозначными. Опираясь на международный опыт, можно предположить, что отдельные небольшие исследования или ограниченное количество тестов, финансируемых государством, могут быть осуществлены в условиях здравоохранения Казахстана для поиска мутаций при задержке психомоторного развития, расстройстве аутистического спектра и неврологических расстройствах и редких гетерогенных заболеваниях.

Преимущества метода:

- Обширное покрытие генных участков в сравнении с секвенированием Сангера, 1 миллион и более и 75 тысяч основных пар соответственно
- Применение для поиска редких гетерогенных мутаций
- Повышенная вероятность нахождения новых мутаций
- Потенциальность в сокращении расходов для обширного обследования причины заболевания негенетическими и генетическими способами
- Дополнение к существующим генетическим тестам, MLPA, RFLP, методу секвенирования по Сангеру
- Стоимость, сопоставимая с международными показателями

Недостатки метода:

- Отсутствие функции выявления хромосомных аномалий (анеуплоидия, полиплоидия), генных транслокаций, тринуклеотидных повторов, регионов с высоким содержанием нуклеотидов гуанина и цитозина
- Высокая длительность для получения результатов (от 2-3 недель)
- Стоимость метода полноэкзомного секвенирования ДНК в десятки раз превосходит стоимость имеющихся генетических тестов
- Может потребоваться проверка результатов полноэкзомного секвенирования ДНК «золотым стандартом», методом секвенирования по Сангеру
- Имеется вероятность получения ложно положительных и ложно отрицательных результатов



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	24 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

8. Приложения (список литературы, таблицы, рисунки)

Таблицы.

Таблица 1. Стоимость тарифов молекулярно-генетических методов.

Полный код услуги	Наименование услуги	Стоимость
B09.000.017	Молекулярно-генетический метод	
B09.776.017	Выделение ДНК из биологического материала молекулярно-генетический методом	3713,22
B09.777.017	Исследование ДНК на мутации молекулярно-генетический методом	16403,17
B09.778.017	Определение 17 аутосомных маркеров хромосом человека в ДНК молекулярно-генетический методом	63014,50
B09.779.017	Определение AZF фактора Y хромосомы в ДНК молекулярно-генетический методом	10446,17
B09.780.017	Определение Y хромосомы плода в крови матери молекулярно-генетический методом	23500,00
B09.781.017	Определение гаплогруппы ДНК по 17 аллелям молекулярно-генетический методом	27272,64
B09.782.017	Определение мутации F2 ДНК молекулярно-генетический методом	6925,67
B09.783.017	Определение мутации F5 ДНК молекулярно-генетический методом	6925,67
B09.784.017	Определение мутаций гена LMNB1 при лейкодистрофии в ДНК молекулярно-генетический методом	44374,67
B09.785.017	Определение мутаций гена MLD при миопатии Дюшенна в ДНК молекулярно-генетический методом	50385,67
B09.786.017	Определение мутаций гена РАН при фенилкетонуре в ДНК молекулярно-генетический методом	16876,17
B09.787.017	Определение мутаций гена SMN при спинальной мышечной амиотрофии в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.788.017	Определение мутаций гена муковисцидоза в ДНК молекулярно-генетический методом	10772,55
B09.789.017	Определение мутаций гена при болезни Сляя 7 типа в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.790.017	Определение мутаций гена при синдроме Гурлера 1 типа в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.791.017	Определение мутаций гена при синдроме Марото-Лами 6 типа в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.792.017	Определение мутаций гена при синдроме Мартина -Белла в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.793.017	Определение мутаций гена при синдроме Моркио 4 типа в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.794.017	Определение мутаций гена при синдроме Санфилиппо 3 типа в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.795.017	Определение мутаций гена при синдроме Хантера 2 типа в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.796.017	Определение мутаций при мукополисахаридозах в ДНК молекулярно-генетический методом	44663,67
B09.797.017	Определение полиморфизма в геноме человека молекулярно-генетический методом	42731,60



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	25 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

Список литературы.

Australian Genomics Health Alliance. (2020). Retrieved June 18, 2020 from <https://www.australiangenomics.org.au/funding-for-genetic-testing-to-affect-thousands-of-families/>

Bodi, K., Perera, A. G., Adams, P. S., Bintzler, D., Dewar, K., Grove, D. S., ... & Singh, S. (2013). Comparison of commercially available target enrichment methods for next-generation sequencing. Journal of biomolecular techniques: JBT, 24(2), 73.

Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. (2014). Next Generation DNA Sequencing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines. Ottawa, Canada.

Center for Disease Control. (2020). Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder. Retrieved June 17, 2020 from <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>

Chang, Y. S., Huang, H. D., Yeh, K. T., & Chang, J. G. (2017). Evaluation of whole exome sequencing by targeted gene sequencing and Sanger sequencing. Clinica Chimica Acta, 471, 222-232.

De Ligt, J., Willemsen, M. H., Van Bon, B. W., Kleefstra, T., Yntema, H. G., Kroes, T., ... & del Rosario, M. (2012). Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. New England Journal of Medicine, 367(20), 1921-1929.

Dixon-Salazar, T. J., Silhavy, J. L., Udpa, N., Schroth, J., Bielas, S., Schaffer, A. E., ... & Mansour, L. A. (2012). Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. Science translational medicine, 4(138), 138ra78-138ra78.

Doherty, E. (2018). How Low Can the Price of a Next Generation DNA Sequencer Go? <https://www.labiatech.eu/medical/ngs-dna-sequencing-illumina-qiaen/>

Du, X., Gao, X., Liu, X., Shen, L., Wang, K., Fan, Y., ... & Wang, Y. (2018). Genetic diagnostic evaluation of trio-based whole exome sequencing among children with diagnosed or suspected autism spectrum disorder. Frontiers in genetics, 9, 594.

Dyment, D. A., Tetreault, M., Beaulieu, C. L., Hartley, T., Ferreira, P., Chardon, J. W., ... & Parboosinh, J. S. (2015). Whole- exome sequencing broadens the phenotypic spectrum of rare pediatric epilepsy: a retrospective study. Clinical genetics, 88(1), 34-40.

Faghihi, M. A., Mottagui-Tabar, S., & Wahlestedt, C. (2004). Genetics of neurological disorders. Expert review of molecular diagnostics, 4(3), 317-332.

Genetics Home Reference. (2020). What is a gene? Retrieved June 15, 2020 from <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/gene>

Hamilton, A., Tétreault, M., Dyment, D. A., Zou, R., Kernohan, K., Geraghty, M. T., ... & Boycott, K. M. (2016). Concordance between whole- exome sequencing and



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	26 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

clinical Sanger sequencing: implications for patient care. Molecular genetics & genomic medicine, 4(5), 504-512.

Jelin, A. C., & Vora, N. (2018). Whole exome sequencing: applications in prenatal genetics. Obstetrics and Gynecology Clinics, 45(1), 69-81.

Illumina. (2009). Genome Analyzer IIx systems. Retrieved June 16, 2020 from https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/specifications/specification_genome_analyzer.pdf

Illumina. (2020). Next-Generation Sequencing Cost Considerations. Retrieved June 18, 2020 from <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-cost.html>

Iossifov, I., O'roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., ... & Smith, J. D. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. Nature, 515(7526), 216-221.

Li, H., Yang, H., Lv, N., Ma, C., Li, J., & Shang, Q. (2019). Whole exome sequencing and methylation- specific multiplex ligation- dependent probe amplification applied to identify Angelman syndrome due to paternal uniparental disomy in two unrelated patients. Molecular medicine reports, 20(2), 1178-1186

Lobo, I., Zhaurova, K. (2008). Birth Defects: Causes and Statistics. Retrieved June 17, 2020 from <https://www.nature.com/scitable/topicpage/birth-defects-causes-and-statistics-863/>

Long, X., Li, Z., Huang, Y., Zhang, L., Lv, W., Teng, Y., ... & Wu, L. (2019). Identification of pathogenic mutations in 6 Chinese families with multiple exostoses by whole-exome sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification: Case series. Medicine, 98(20).

Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A., & Jabado, N. (2011). What can exome sequencing do for you?. Journal of medical genetics, 48(9), 580-589.

National Human Genome Research Institute. (2018). Retrieved June 16, 2020 from <https://www.genome.gov/For-Patients-and-Families/Genetic-Disorders#:~:text=Genetic%20disorders%20can%20be%20caused,entire%20chromosomes%2C%20the%20structures%20that>

Need AC, Shashi V, Hitomi Y et al. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. J Med Genet 2012; 49: 353–361."

Need, A. C., Shashi, V., Hitomi, Y., Schoch, K., Shianna, K. V., McDonald, M. T., ... & Goldstein, D. B. (2012). Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. Journal of medical genetics, 49(6), 353-361.



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	27 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Bigham, A. W., Lee, C., ... & Bamshad, M. (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461(7261), 272-276.

Nolan, D., & Carlson, M. (2016). Whole exome sequencing in pediatric neurology patients: clinical implications and estimated cost analysis. *Journal of child neurology*, 31(7), 887-894.

Płoski, R. (2016). Next Generation Sequencing—General Information about the Technology, Possibilities, and Limitations. In *Clinical Applications for Next-Generation Sequencing* (pp. 1-18). Academic Press.

Rabbani, B., Tekin, M., & Mahdieh, N. (2014). The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of human genetics*, 59(1), 5-15.

Rauch, A., Wieczorek, D., Graf, E., Wieland, T., Ende, S., Schwarzmayr, T., ... & Dufke, A. (2012). Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *The Lancet*, 380(9854), 1674-1682.

Sanders, S. J., Murtha, M. T., Gupta, A. R., Murdoch, J. D., Raubeson, M. J., Willsey, A. J., ... & Walker, M. F. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, 485(7397), 237-241.

Sawyer, S. L., Hartley, T., Dyment, D. A., Beaulieu, C. L., Schwartzentruber, J., Smith, A., ... & Bulman, D. E. (2016). Utility of whole- exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clinical genetics*, 89(3), 275-284.

Schwarze, K., Buchanan, J., Taylor, J. C., & Wordsworth, S. (2018). Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genetics in Medicine*, 20(10), 1122-1130.

Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B et al. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med* 2014; 16: 176–182.

Soden, S. E., Saunders, C. J., Willig, L. K., Farrow, E. G., Smith, L. D., Petrikin, J. E., ... & Twist, G. (2014). Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Science translational medicine*, 6(265), 265ra168-265ra168.

Tammimies, K., Marshall, C. R., Walker, S., Kaur, G., Thiruvahindrapuram, B., Lionel, A. C., ... & Woodbury-Smith, M. (2015). Molecular diagnostic yield of chromosomal microarray analysis and whole-exome sequencing in children with autism spectrum disorder. *Jama*, 314(9), 895-903.



Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

Отдел оценки технологий здравоохранения	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	№340 от 15.06.2020	28 из 29

Отчет оценки технологий здравоохранения

Tan, T. Y., Dillon, O. J., Stark, Z., Schofield, D., Alam, K., Shrestha, R., ... & Jarmolowicz, A. (2017). Diagnostic impact and cost-effectiveness of whole-exome sequencing for ambulant children with suspected monogenic conditions. *JAMA pediatrics*, 171(9), 855-862.

Timothy, W. Y., Chahrour, M. H., Coulter, M. E., Jiralerspong, S., Okamura-Ikeda, K., Ataman, B., ... & D'Gama, A. M. (2013). Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron*, 77(2), 259-273.

Tong, W., Wang, Y., Lu, Y., Ye, T., Song, C., Xu, Y., ... & Gu, W. (2018). Whole-exome sequencing helps the diagnosis and treatment in children with neurodevelopmental delay accompanied unexplained dyspnea. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.

Vissers, L. E., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Steehouwer, M., de Vries, P., ... & van Bon, B. W. (2010). A de novo paradigm for mental retardation. *Nature genetics*, 42(12), 1109-1112.

Warr, A., Robert, C., Hume, D., Archibald, A., Deeb, N., & Watson, M. (2015). Exome sequencing: current and future perspectives. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(8), 1543-1550.

WHO. (n.d.). Genes and human diseases. Retrieved June 16, 2020 from <https://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html>

Worthey, E. A., Mayer, A. N., Syverson, G. D., Helbling, D., Bonacci, B. B., Decker, B., ... & Basehore, M. J. (2011). Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genetics in Medicine*, 13(3), 255-262.

Абильдинова, Г. Ж., Жанатаева, Д. Ж., & Нагимтаева, А. А. (2017). Распространенность генетической патологии в популяции казахстана по данным информационно-аналитической системы «Umit». Клиническая медицина Казахстана, (3 (45)).

БМЦ УДП РК. (2020). Услуги и цены. Retrieved June 18, 2020 from <https://bmcudp.kz/kz/>

Лаборатория биоинформатики и системной биологии Назарбаев Университета. (n.d.). Retrieved June 18, 2020 from <https://nla.nu.edu.kz/ru/lbsb-ru>

Национальный банк. Курс доллара к тенге. (2020). Retrieved June 18, 2020 from <https://nationalbank.kz/?docid=763&switch=russian>.

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 5 сентября 2018 года № КР ДСМ-10. (2020). Об утверждении тарифов на медицинские услуги, оказываемые в рамках гарантированного объема бесплатной медицинской помощи



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

Центр экономики и оценки технологий здравоохранения

<i>Отдел оценки технологий здравоохранения</i>	<i>Номер экспертизы и дата</i>	<i>Страница</i>
	<i>№340 от 15.06.2020</i>	<i>29 из 29</i>

Отчет оценки технологий здравоохранения

и в системе обязательного социального медицинского страхования. Retrieved June 15, 2020 from <http://adilet.zan.kz/rus/docs/V1800017353>

Главный специалист Отдела ОТЗ
Центра Экономики и ОТЗ

М. Разбекова

Начальник отдела ОТЗ
Центра Экономики и ОТЗ

З. Жолдасов

И.о. Руководителя Центра Экономики и ОТЗ

А. Табаров