



Прич и

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Павлов А.Е.

«26» июля 2019 г.



Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «**VARIFIND™ HLA SOLUTION IL-v2**»
для типирования генов HLA в высоком разрешении методом
высокопроизводительного секвенирования

по ТУ 21.20.23-001-39429653-2018

Каталожный номер

HLA_v2

Символы

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Код партии
	Номер по каталогу
	Использовать до
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Не допускать воздействия солнечного света

	Значок «коробка» для обозначения комплекта в составе изделия
---	---

РЕВИЗИИ ИНСТРУКЦИИ

№ документа Ревизия	Примечания к ревизии
UM_L-20ru B/190419	Первичный выпуск

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ	5
1.1.	НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
1.2.	НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ	5
1.3.	МЕДИЦИНСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ	6
1.4.	ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	7
1.5.	ОПИСАНИЕ	7
1.6.	ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
1.7.	СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	11
1.8.	ОБЩАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА	13
1.9.	ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА	13
1.10.	ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ	16
1.10	ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ	18
1.11	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	19
1.12	РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИКИ РАБОТЫ	20
1.13	РИСКИ СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗДЕЛИЯ	22
2.	ПРОТОКОЛ	23
2.1.	КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ОБРАЗЦОВ	23
2.2.	ТАРГЕТНОЕ ОБОГАЩЕНИЕ	29
2.3.	ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК	32
2.4.	РАЗВЕДЕНИЕ, ПУЛИРОВАНИЕ И ДЕНАТУРАЦИЯ	43
2.5.	СЕКВЕНИРОВАНИЕ	45
3.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	53
3.1.	УСТАНОВКА ПРИЛОЖЕНИЯ VARIFIND™ HLA SOFTWARE	53
3.2.	АЛГОРИТМ АНАЛИЗА ДАННЫХ	54
3.2.1.	Требования к входным данным	54
3.2.2.	Алгоритм обработки данных	54
3.2.3.	Просмотр результатов анализа	55
3.3.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	55
3.4.	МЕТРИКИ КАЧЕСТВА ДАННЫХ	56
3.4.1.	Число прочтений на экзоны	57
3.4.2.	Среднее качество прочтений	57
3.4.3.	Размер вставки	57
3.4.4.	Дисбаланс покрытия по ключевым экзонам	58
3.5.	ОЦЕНКА КОНТАМИНАЦИИ	58
3.6.	ФОРМАТЫ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ	59
3.6.1.	Отчет по образцу	59
3.6.2.	Таблица генотипов по образцам	59
3.6.3.	Отчет по запуску	60
3.7.	АНАЛИЗ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА	61
3.8.	УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ	61
4.	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	64
5.	УКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	64
6.	БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ	65
7.	ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА	66
8.	КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	66
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Пример отчета по образцу	67
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Пример отчета по запуску	71

1. ВВЕДЕНИЕ

При первом применении Набора реагентов необходимо обратиться к производителю для настройки оборудования и программного обеспечения.

1.1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов «VariFind™ HLA solution IL-v2» предназначен для качественного определения аллелей HLA генов (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) в разрешении 4 digit (2 fields) в образцах дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенных из цельной крови или лейкоцитарной массы человека, обогащенных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) длинных фрагментов с последующим высокопроизводительным секвенированием на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (ПУ №ПЗН 2014/1568 от 29.04.2014) и генотипированием с целью определения тканевой специфичности доноров костного мозга для создания регистров.

Набор реагентов «VariFind™ HLA solution IL-v2» предназначен для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Набор реагентов предназначен для обследования всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

Набор реагентов предназначен только для профессионального применения. Исследования с использованием Набора реагентов могут выполнять специалисты с высшим медицинским, биологическим или биотехнологическим образованием: биолог, молекулярный биолог, биотехнолог, инженер-технолог, медицинский лабораторный техник, лаборант, врач клинической лабораторной диагностики.

Персонал, проводящий исследования с использованием Набора реагентов, должен владеть навыками проведения молекулярно-биологических исследований и работы на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (ПУ №ПЗН 2014/1568 от 29.04.2014). Перед первой постановкой рекомендуется пройти инструктаж в лаборатории производителя Набора реагентов.

1.2. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Гены человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA-гены) – это комплекс генов, расположенных на шестой хромосоме, которые кодируют высоко полиморфные молекулы двух классов: HLA класс I и HLA класс II. К первому классу относятся гены HLA-A, HLA-B и HLA-C; ко второму классу относятся группы генов HLA-DR, HLA-DQ и

HLA-DP. Продукты генов HLA представляют собой гликопротеины, расположенные на поверхности всех ядерных клеток (HLA класс I), или на поверхности специализированных антиген-презентирующих иммунных клеток (HLA класс II). Основной функцией генов HLA является связывание собственных, измененных (в результате мутаций) собственных и чужеродных пептидных антигенов, образованных преимущественно из внутриклеточных (HLA класс I) или внеклеточных (HLA класс II) белков. Связывание приводит к активации и клональной пролиферации Т-клеток, то есть запуску иммунного ответа (*T. Shiina, H. Inoko, J.K. Kulski, An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations, 2004*).

Система HLA-генов характеризуется огромным разнообразием аллельных вариантов каждого гена и еще большим числом возможных комбинаций аллелей. Набор аллелей по HLA-локусу, называемый HLA-генотипом или HLA-типом, специфичен для каждого индивидуума. Совпадение по всем локусам характерно только для монозиготных близнецов (*S.J. Mack et al., Common and well-documented HLA alleles, 2013*).

Информация об аллельном разнообразии генов HLA собирается в единой базе данных IMGT HLA (открытая база данных Номенклатурного комитета HLA Всемирной Организации Здравоохранения - <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>).

Методы высокопроизводительного секвенирования ДНК позволяют быстро и точно определять нуклеотидную последовательность интересующих генов за счет многократного прочтения множества коротких многократно клонированных фрагментов ДНК. Высокая производительность методов достигается за счет того, что секвенирование нескольких образцов идет параллельно в одном анализе. Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом HLA-типирования в случаях, когда требуется протипировать большое количество образцов с высоким разрешением, от 4 digit (2 fields) и выше, то есть до конкретной аллели или подгруппы аллелей (*J.M. Walker, HLA Typing Methods and Protocols, 2018*).

1.3. МЕДИЦИНСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Антигены HLA играют важнейшую роль в регуляции иммунного ответа на чужеродные антигены, определяют уникальность тканевого типа человека и ответственны за отторжение чужеродных тканей при трансплантации.

HLA-генотипирование в клинических условиях применяется для определения тканевой специфичности донора и реципиента с целью подбора гистосовместимой пары при аллогенной трансплантации органов или тканей.

Наиболее частой причиной поиска донора является необходимость трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) красного костного мозга

(ККМ). Трансплантация ГСК является эффективным методом лечения онкогематологических и ряда других онкологических и наследственных заболеваний.

Для подбора пар «донор-реципиент» создаются специализированные базы данных, так называемые Регистры доноров ГСК. HLA-типирование потенциальных доноров и внесение данных в регистр осуществляется специализированными клинико-диагностическими лабораториями (*J. Filipiak et al., Organization and Development of Bone Marrow Donation and Transplantation in Poland, 2015*).

Для создания регистров и подбора доноров рекомендуется проводить типирование по 5 локусам (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1)¹ с разрешением 4 digit (2 fields)².

1.4. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показания к применению: HLA-типирование с целью создания Регистров доноров ГСК.

Противопоказания к применению: Набор реагентов не имеет противопоказаний к применению.

1.5. ОПИСАНИЕ

Набор реагентов «VariFind™ HLA solution IL-v2» позволяет подготовить образец для проведения высокопроизводительного секвенирования с последующим типированием по 5 генам HLA-локуса.

На первом этапе осуществляется количественная оценка препаратов геномной ДНК флуориметрическим методом для дальнейшей нормализации образцов ДНК до 10 нг/мкл. Далее для каждого образца ДНК проводится реакция таргетного обогащения методом мультиплексной ПЦР длинных фрагментов (long range PCR, LR-PCR) для наработки специфичных продуктов генов по каждому из 5 анализируемых локусов HLA (5 локусов амплифицируются в одной пробирке). На следующем этапе

¹ Развитие регистра неродственных доноров костного мозга в Российской Федерации: опыт НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой / А.Л. Алянский, О.А. и др. // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2016. – Т.3. – №2. – С. 68-74.

² Standards for Histocompatibility Testing. Version 7.0. European Federation of Immunogenetics. 2018

проводится фрагментация ПЦР-продуктов, их очистка от ферментов и фрагментов малого размера, после чего осуществляется восстановление концов, аденилирование, лигирование адаптеров и очистка. Далее в ходе короткой ПЦР к фрагментам добавляются молекулярные баркоды (индексы), одновременно происходит наработка целевых продуктов с лигированными адаптерами и баркодами. Полученные таким образом библиотеки проходят финальную очистку на магнитных частицах, количественную флуориметрическую оценку, разводятся до единой концентрации, объединяются и секвенируются.

Секвенирование осуществляется на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (ПУ №РЗН 2014/1568 от 29.04.2014). Метод секвенирования Illumina использует технологию секвенирования путем синтеза, параллельно детектируя присоединение флуоресцентно меченого нуклеотида к синтезируемой цепи ДНК в множестве молекулярных кластеров.

Анализ данных осуществляется с помощью программного обеспечения (ПО) VariFind™ HLA Software (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2018618585). Программное обеспечение автоматически осуществляет импорт данных с секвенатора, выполняет выравнивание прочтений, оценивает качество, определяет HLA-генотип образца, формирует отчет по результатам анализа и предоставляет данные пользователю. Подробнее см. раздел 3 – **Анализ данных**.

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 192 образцов ДНК, включая контрольный образец из состава набора.

1.6. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Набор реагентов позволяет определять HLA-генотип с разрешением 4 digit (2 fields) по целевым локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1 и HLA-DRB1. Таргетные регионы локусов приведены в таблице 1.

Таблица № 1.

Локус	Регионы	Размер, т.п.н.
HLA-A	Весь ген (все экзоны и интроны)	3,2
HLA-B	Весь ген (все экзоны и интроны)	4,6
HLA-C	Весь ген (все экзоны и интроны)	3
HLA-DQB1	1-5 экзоны	6,1
HLA-DRB1	2-4 экзоны	4,3

- Набор реагентов идентифицирует аллели, входящие в базу данных IMGT HLA.
- Аналитическая чувствительность Набора реагентов составляет 10 нг/мкл геномной ДНК человека.
- Аналитическая специфичность Набора реагентов по целевым локусам составляет 100%.
(определена как способность набора реагентов идентифицировать генотип (пару аллелей) только целевых HLA-локусов среди гомологичных локусов в исследуемом образце)
- Диагностическая чувствительность - 100% в отношении каждого из целевых локусов.
(установлена как доля истинноположительных аллелей, определенных по базе данных IMGT HLA на репрезентативной выборке образцов)
- Диагностическая специфичность - 100% в отношении каждого из целевых локусов.
(установлена как доля истинноотрицательных аллелей, определенных по базе данных IMGT HLA на репрезентативной выборке образцов)
- Набор реагентов идентифицирует контаминированные образцы.
- Анализ данных и HLA-типирование осуществляется с помощью входящего в состав программного обеспечения «VariFind™ HLA Software» версия 2.1. Программное обеспечение представляет собой набор консольных (без графического интерфейса) приложений, установленных на удалённом сервере.

Загрузка результатов секвенирования (без передачи персональных данных) на сервер осуществляется автоматически после завершения процесса секвенирования. Далее, без участия оператора, запускается процесс анализа данных. Результаты анализа данных сохраняются в локальной вычислительной инфраструктуре пользователя, доступ к которым осуществляется с персонального компьютера (ПК).

- Набор реагентов обеспечивает получение результатов анализа, удовлетворяющим критериям качества по таблице 2.

Таблица № 2.

Показатель	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
Число прочтений на экзоны	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
Среднее качество прочтений (величина Phred3)	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30
Размер вставки	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.
Дисбаланс по ключевым экзонам	≤ 80%	≤ 80%	≤ 80%	≤ 80%	≤ 80%

- Набор реагентов корректно идентифицирует генотип контрольного образца, входящего в состав изделия – таблица 3.

Таблица № 3.

Локус	Генотип контрольного образца
HLA-A	HLA-A*02:01 + HLA-A*11:01
HLA-B	HLA-B*18:01 + HLA-B*44:02
HLA-C	HLA-C*02:02 + HLA-C*05:01
HLA-DQB1	HLA-DQB1*03:01 + HLA-DQB1*03:01
HLA-DRB1	HLA-DRB1*04:01+HLA-DRB1*08:03

³ NGS: высокопроизводительное секвенирование. Д.В. Ребриков [и др.]. – М.: БИНОМ. 2014.

1.7. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 192 образцов ДНК, включая контрольный образец.

№ п/п	Комплекты и их компоненты	Количество
1. Комплект для таргетного обогащения		1 комплект
1.1	HLA ПЦР-буфер	2 пробирки
1.2	Смесь праймеров	2 пробирки
1.3	Полимераза	2 пробирки
1.4	Контрольный образец	1 пробирка
2. Комплект для приготовления библиотек		2 комплекта
2.1	Буфер для фрагментации	1 пробирка
2.2	Смесь для фрагментации	1 пробирка
2.3	Буфер для восстановления концов	1 пробирка
2.4	Смесь для восстановления концов	1 пробирка
2.5	Буфер для аденилирования	1 пробирка
2.6	Смесь для аденилирования	1 пробирка
2.7	Буфер для лигирования	1 пробирка
2.8	Лигаза	1 пробирка
2.9	Адаптер	1 пробирка
2.10	ПЦР-смесь для обогащения	2 пробирки
3. Комплект для молекулярного баркодирования A-P		1 комплект
3.1	Баркод А	1 пробирка
3.2	Баркод В	1 пробирка
3.3	Баркод С	1 пробирка
3.4	Баркод D	1 пробирка
3.5	Баркод Е	1 пробирка
3.6	Баркод F	1 пробирка
3.7	Баркод G	1 пробирка
3.8	Баркод H	1 пробирка
3.9	Баркод I	1 пробирка
3.10	Баркод J	1 пробирка
3.11	Баркод K	1 пробирка
3.12	Баркод L	1 пробирка
3.13	Баркод M	1 пробирка
3.14	Баркод N	1 пробирка
3.15	Баркод O	1 пробирка
3.16	Баркод P	1 пробирка
4. Комплект для молекулярного баркодирования 1-12		1 комплект
4.1	Баркод 1	1 пробирка
4.2	Баркод 2	1 пробирка

4.3	Баркод 3	1 пробирка
4.4	Баркод 4	1 пробирка
4.5	Баркод 5	1 пробирка
4.6	Баркод 6	1 пробирка
4.7	Баркод 7	1 пробирка
4.8	Баркод 8	1 пробирка
4.9	Баркод 9	1 пробирка
4.10	Баркод 10	1 пробирка
4.11	Баркод 11	1 пробирка
4.12	Баркод 12	1 пробирка
5. Комплект для очистки		2 комплекта
5.1	Магнитные частицы	2 пробирки
6. Комплект для количественной оценки		2 комплекта
6.1	Буфер для количественной оценки	3 пробирки
6.2	Краситель	1 пробирка
6.3	Калибратор 1	1 пробирка
6.4	Калибратор 2	1 пробирка
6.5	Калибратор 3	1 пробирка
7. Компакт-диск		1 штука
7.1	Программное обеспечение «VariFind™ HLA Software» версия 2.1	1 файл
7.2	Инструкция по применению набора реагентов «VariFind™ HLA solution IL-v2»	1 файл
8. Комплект для секвенирования		1 комплект
8.1	Картридж для секвенирования	1 штука
8.2	Ячейка и раствор для секвенирования	1 штука

Принадлежности отсутствуют.

Контрольный образец

Контрольный образец представляет собой продукты LR-PCR анализируемых HLA-локусов с концентрацией 10 нг/мл с известным по 5 анализируемым локусам HLA генотипом, подтвержденным методом SBT (sequence-based typing). Контрольный образец (К) входит в состав Комплекта для таргетного обогащения.

Образец следует включать в каждую постановку «VariFind™ HLA solution IL-v2» для контроля корректности исполнения исследования (см. раздел 3.7 - АНАЛИЗ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА).

Анализ данных

В составе набора реагентов поставляется полностью автоматизированное программное обеспечение VariFind™ HLA Software. Программное обеспечение поставляется на компакт-диске. Подробнее см. раздел **3. Анализ данных**.

1.8. ОБЩАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Этап	Описание	Время (на 192 образца)
Измерение концентрации ДНК и разведение	Для анализа рекомендуется использовать геномную ДНК, выделенную из цельной крови. Количество ДНК, необходимое для анализа одного образца ДНК, составляет 100 нг. Для количественной оценки используйте флуориметрический метод. После количественной оценки ДНК разводится водой I типа до концентрации 10 нг/мкл.	2-3 часа
Таргетное обогащение	В ходе мультиплексной ПЦР длинных фрагментов 5 локусов HLA нарабатываются в одной пробирке.	5—6 часов
Создание библиотек	Библиотека представляет собой фрагментированные продукты LR-PCR с лигированными адаптерами Illumina. Баркодирование и одновременное обогащение библиотеки осуществляется в ходе короткой ПЦР с 5 циклами. Благодаря молекулярному баркодированию возможно анализировать до 192 образцов ДНК в одном запуске секвенирования.	8-12 часов
Приготовление образца	Приготовление образца заключается в разведении библиотек, их пулировании и денатурации для последующего секвенирования на приборе MiSeq.	2 часа
Секвенирование	Секвенирование осуществляется на приборе MiSeq с использованием Комплекта для секвенирования.	24 часа
Анализ данных и формирование отчета	Анализ данных секвенирования включает выравнивание прочтений на полно-геномные и кодирующие последовательности базы данных IMGT HLA, оценку качества и формирование отчетов.	6—8 часов

1.9. ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Производителем проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ при работе с МИ. Предельные количества потенциально интерферирующих веществ и их эффекты были определены по литературным данным.

Потенциальные интерференты	
Геномная ДНК стороннего индивидуума	
Источник интерферента:	Состояние после переливания донорской крови
Стадия проявления потенциального интерферента:	Анализ результатов генотипирования
Последствия и рекомендуемые меры: Переливание компонентов крови, содержащих лейкоцитарную фракцию, может привести к контаминации целевого анализата и получению ложных результатов генотипирования. Данный эффект может наблюдаться в течении непродолжительного времени (1-2 дня) после трансфузионных манипуляций и требует консультации специалиста для исключения лейкоцитарного микрохимеризма.	
Гепарин	
Источник интерферента:	Биоматериал (цельная кровь, лейкоцитарная масса)
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР длинных фрагментов
Последствия и рекомендуемые меры: Не допускается сбор цельной крови в пробирки с гепарином. Гепарин в образце в количестве >48 единиц на 1 мл крови будет приводить к ингибированию ПЦР длинных фрагментов и отсутствию продуктов таргетного обогащения в реакции.	
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)	
Источник интерферента:	Биоматериал (цельная кровь, лейкоцитарная масса)
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР длинных фрагментов
Последствия и рекомендуемые меры: Повышенная концентрация ЭДТА будет ингибировать ПЦР длинных фрагментов. Концентрация ЭДТА в пробирке для сбора цельной крови не должна превышать 1,8 мг/мл в полностью заполненных кровью на заданный объем пробирках.	
ДМСО (диметилсульфоксид)	
Источник интерферента:	Биоматериал (лейкоцитарная масса)
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР длинных фрагментов
Последствия и рекомендуемые меры: Высокие концентрации ДМСО будут приводить к ингибированию или неэффективному прохождению ПЦР длинных фрагментов при таргетном обогащении.	

Содержание ДМСО, используемого в качестве криопротектора при заготовке лейкоцитарной массы, не должно превышать 5% в образце.

Этанол

Источник интерферента:

- Набор для выделения;
- Протокол подготовки библиотек (очистка)

Стадия проявления потенциального интерферента:

- ПЦР длинных фрагментов;
- Восстановление концов, лигирование, ПЦР с баркодированием

Последствия и рекомендуемые меры:

Содержание этанола в образце более 5% приводит к ингибированию работы ферментов нуклеинового обмена.

Этанол используется в наборах для выделения ДНК и входит в состав буферов для промывки образца в процессе выделения. Использование некачественных колонок для выделения и/или несоблюдение инструкции по выделению ДНК будет приводить к появлению этанола в препарате ДНК и, как следствие, ингибированию ПЦР длинных фрагментов. Требуется точное соблюдение инструкций производителя Набора для выделения.

Недостаточная просушка магнитных частиц после промывки этанолом во время выполнения протокола пробоподготовки может привести к ингибированию ферментов нуклеинового обмена и, как следствие, отсутствию или низкой концентрации библиотек, предназначенных для секвенирования. Требуется точное соблюдение инструкции производителя.

Пудра с перчаток

Источник интерферента:

Лабораторные перчатки опудренные

Стадия проявления потенциального интерферента:

Все стадии работы с Набором реагентов

Последствия и рекомендуемые меры:

Использование перчаток ненадлежащего типа (опудренных перчаток с кукурузным крахмалом и оксидом цинка) может приводить к ингибированию и/или некорректному прохождению этапов приготовления библиотек для секвенирования. Требуется точное соблюдение требований производителя к применяемым расходным материалам.

Нуклеазы

Источник интерферента:

Лабораторный пластик

Стадия проявления потенциального интерферента:

Пробоподготовка, приготовление библиотек

Последствия и рекомендуемые меры:

Использование лабораторного пластика ненадлежащей чистоты, содержащего нуклеазы, может приводить к ингибированию этапов приготовления библиотек для секвенирования. Требуется точное соблюдение требований производителя к применяемым расходным материалам.

Источники:

1. The Intravascular Life Span of Transfused Leukocytes Tagged with Atabrine. LAURENS P. WHITE, Blood, 9:73-82, 1954.
2. Рекомендации по организации преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований. Кишкун А.А., Гильманов А.Ж., Долгих Т.И., Грищенко Д.А., Скороходова Т.Г., 2013
3. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. C. Schrader A. Schielke L. Ellerbroek R. Johne. Journal of Applied Microbiology. 2012.
4. Влияние диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида на термическую денатурацию человеческого сывороточного альбумина. К.Р. Григорян, Ш.А. Маркарян, М.Г. Азнаурян. Теоретическая и Экспериментальная Кробиология. Проблемы Кробиологии, т.19, 2009, №1.
5. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992). International Journal of Food Microbiology, 17(1), 37–45. doi:10.1016/0168-1605(92)90017-w
6. Effects of Heparin on Polymerase Chain Reaction for Blood White Cells. Masaharu Yokota, Noriyuki Tatsumi, Oytip Nathalang, Tetsuaki Yamada, and Izumi Tsuda. Journal of Clinical Laboratory Analysis 13:133–140 (1999)
7. D. Loffert, S. Stump, N. Schaffrath, M. Berkenkopf and J. Kang, 1997 PCR: effects of template quality. Qiagen News 1: 8-10.

1.10. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Комплект оборудования, материалов и реагентов, необходимый для работы с «VariFind™ HLA solution IL-v2» и не входящий в состав Набора реагентов.

Описание	Производитель/ Поставщик	Каталожный номер
ОБОРУДОВАНИЕ		
ПЦР-бокс (ламинар или рабочее место)	любой	-
Вода I типа, 18MΩ	любой	-
ПЦР-амплификатор Veriti® 96-well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, США	4375786
Реал-тайм ПЦР-амплификатор StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific, США	4376600
Центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов	любой	-
Вортекс для 96-луночных планшетов	Вортекс для перемешивания содержимого 96-луночных планшетов с корпусом из металла и резиновой насадкой, циркуляционно-	

	вибрационным типом движения, амплитудой колебания не менее 5 мм, частотой колебания до 2500 оборотов в минуту. Габариты не имеют существенного значения.	
Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 10—100 мкл; на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
Восьмиканальный дозатор 30—300 мкл	любой	-
Восьмиканальный дозатор 0,5—10 мкл	любой	-
Магнитный штатив	12331D, «Thermo Fisher Scientific», США или аналогичный магнитный штатив для 96-луночного планшета, выполненный из пластика и содержащий неодимовые магниты, размером не более 110 × 153 × 46 мм, для работы с суспензиями магнитных частиц и осуществляющий горизонтальную (по рядам), радиальную (по краям лунки) или угловую (с одной стороны лунки) магнитизацию частиц.	
Генетический секвенатор MiSeq с принадлежностями	Illumina Inc., США	SY-410-1003
Компьютер	Операционная система: Windows 7 (64 bit) / Windows 10 (64 bit) и выше; Процессор: Intel Core i3/i5/i7 (от 2,4 ГГц); Объем оперативной памяти: 4 ГБ и более; Объем дискового накопителя: 500 ГБ и более	
Сервер	Сервер должен поддерживать работу по протоколу CIFS/SMB (загрузка данных с секвенатора) и протоколам SSH+RSYNC (для передачи данных на удаленный сервер анализа и получения результатов). Канал доступа в сеть Интернет не менее 10 Мбит/сек.	
МАТЕРИАЛЫ		
Оптические 96-луночные планшеты для ПЦР (например, MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates, или аналогичные)	Thermo Fisher Scientific	N8010560
Защитные пленки для 96-луночных планшетов (например, Thermo Fisher Scientific или Axygen)	-	-
Оптические стрипы или планшеты объемом 0,1 мл для StepOnePlus	SSI UltraFlux clr tube (strips)	3248-00
	Или SSI 96 Well PCR	3426-00

Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	любой	-
Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл	Eppendorf	022431021
Пробирки LoBind™ объемом 2 мл	Eppendorf	022431048
Пробирки типа «фалькон» 50 мл	любой	0030 122.178
Холодный штатив для планшетов и пробирок 0,2 мл	любой	-
Холодный штатив для планшетов и пробирок 1,5-2 мл	любой	-
KIMWIPES Delicate Task Wipes	KIMTECH SCIENCE	-
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ		
Этанол, медицинский	любой	-
Tween 20, класс чистоты: для молекулярной биологии	любой	-
NaOH, класс чистоты: для молекулярной биологии	любой	-
ЭДТА (динатриевая соль), класс чистоты: для молекулярной биологии	любой	-

1.10 ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ

Аналитом является геномная ДНК человека. Для анализа одного образца требуется **100 нг ДНК (10 мкл ДНК в концентрации 10 нг/мкл)**.

Взятие, предобработку и хранение биоматериала проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и согласно пользовательской инструкции набора для экстракции ДНК.

Для экстракции ДНК возможно использовать наборы реагентов, зарегистрированные на территории РФ, предназначенные для работы с цельной кровью и лейкоцитарной массой человека.

Выделение ДНК проводят в соответствии с используемым комплектом реагентов, который гарантирует отсутствие интерферирующих веществ (см. раздел **1.9 Интерферирующие вещества**) в образце геномной ДНК. Рекомендуемый набор - Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» (ПУ №ФСР2009/05220 от 18.05.2017 г.).

1.11 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Потенциальный риск применения Набора реагентов – класс 2б (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г).
- Набор реагентов содержит ДНК, аналогичную последовательностям геномной ДНК человека и фага лямбда. Данный материал синтетического происхождения и не представляет опасности для человека.
- При работе с Набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». СП 1.3.2333-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Не использовать компоненты Набора реагентов после истечения срока их годности.
- Перед началом работы с любыми компонентами внимательно ознакомиться с документами по безопасности, предоставленными производителями, а также актуальными инструкциями по их использованию.
- Во избежание контаминации ДНК необходимо пространственное разделение этапов пре- и пост-ПЦР: отдельные помещения, отдельные халаты, отдельные пипетки и другие лабораторные материалы.
- Персонал, проводящий исследования, должен проводить работы в защитной одежде – лабораторные халаты, средства индивидуальной защиты.
- При работе с химическими реагентами свести к минимуму непосредственный контакт с ними: надевать халаты и перчатки.
- Не допускать вдыхания испарений от химических реагентов: не оставлять реагенты открытыми, работать с реагентами только в хорошо проветриваемых помещениях.
- При работе с образцами биоматериала необходимо руководствоваться МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и соблюдать санитарно-эпидемические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

1.12 РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИКИ РАБОТЫ

Необходимо соблюдать МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Рекомендации по контролю контаминации

- Во избежание контаминации ДНК настоятельно рекомендуется пространственное разделение пре- и пост-ПЦР зон.
- Всегда проводите работу в лабораторной одежде: халат с длинным рукавом и манжетами, одноразовые неопудренные медицинские перчатки.
- Приготовление всех рабочих смесей, в том числе смесей для ПЦР, должно проводиться с использованием наконечников с фильтрами.
- Всегда меняйте наконечник между разными образцами и баркодами.
- Не держите одновременно открытыми несколько пробирок с баркодами, всегда открывайте баркоды поочередно. **Контаминация баркодов недопустима.**
- Меняйте перчатки при их контаминации баркодом или ДНК.
- Пипетируйте образцы медленно во избежание вспенивания.
- Протирайте рабочие поверхности до начала и после завершения работы деконтаминирующими средствами.
- Проводите регулярные деконтаминационные мероприятия для предупреждения загрязнения стоков реагентов и образцов.

Рекомендации по работе с протоколом

- Не следует размораживать/повторно замораживать реагенты более 10 раз.
- Перед каждым этапом работы необходимо заблаговременно размораживать только необходимые для протокола реагенты и перемешивать их вортексированием.
- Вортексирование, или перемешивание, должно проводиться на настольном вортексе/центрифуге с разной интенсивностью для разных типов реагентов. Образцы ДНК, праймеры, баркоды и буферные растворы, а также **Смесь для фрагментации (СФ)** должны перемешиваться не менее 10 секунд с высокой интенсивностью. Смеси ферментов, кроме **Смеси для фрагментации (СФ)**, должны перемешиваться с осторожностью: либо 1—2 секунды на вортексе с низкой интенсивностью, либо аккуратным встряхиванием пробирки.

- После перемешивания все реагенты необходимо центрифугировать в импульсном режиме (1—2 секунды) для сбрасывания капель со стенок и крышек пробирок.
- **Для этапа фрагментации критично использование холодного штатива.**

Рекомендации по работе с магнитными частицами

- Перед использованием необходимо выдержать магнитные частицы при комнатной температуре не менее 30 минут.
- Перед использованием необходимо тщательно вортексировать магнитные частицы 15—30 секунд до гомогенизации раствора.
- При раскапывании необходимо свести к минимуму потери объема магнитных частиц и строго соблюдать количество добавляемых частиц, указанное в протоколе. Необходимо следить за гомогенностью раствора и не допускать осаждения частиц. **Изменение вносимого количества магнитных частиц критично для получения качественной библиотеки!**
- Инкубируйте раствор с частицами при комнатной температуре в течение времени, указанного в протоколе, для максимального связывания ДНК.
- При промывке частиц спиртовым раствором **важно не снимать** 96-луночный планшет или пробирки с магнитного штатива. Отбирайте супернатант медленно во избежание размывания частиц по пробирке, не задевая осадок из частиц.
- Всегда готовьте **свежий 70% спирт**. Использование старого спиртового раствора может привести к потере ДНК.
- Во время удаления спирта **важно полностью отобрать остаточные капли спирта**. Используйте дозатор 0,5—10 мкл для окончательного отбора спирта из пробирки/лунки планшета. Спирт ингибирует последующие этапы пробоподготовки.
- При просушке осадка из частиц **важно не снимать** 96-луночный планшет или пробирки с магнитного штатива во избежание утери частиц за счет действия электростатических сил.
- Использование многоканальной полуавтоматической пипетки на этапе промывки спиртовым раствором может помочь в экономии времени и трудозатрат.
- При элюции ДНК с частиц тщательно перемешивайте раствор.

1.13 РИСКИ СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗДЕЛИЯ

При анализе риска медицинского изделия «Набор реагентов «VariFind™ HLA solution IL-v2» на всех стадиях его жизненного цикла было выявлено 52 риска.

После применения мер по управлению рисками остаточные риски по медицинскому изделию «Набор реагентов «VariFind™ HLA solution IL-v2» составили:

- неприемлемая зона – 0;
- пограничная зона – 37;
- приемлемая зона – 15.

Полный остаточный риск является допустимым.

Медицинское изделие «Набор реагентов «VariFind™ HLA solution IL-v2» является надежным и безопасным для пациента, производящего и эксплуатирующего персонала, третьих лиц и окружающей среды.

2. ПРОТОКОЛ

Протокол работы с Набором реагентов состоит из 5 основных этапов:

- таргетное обогащение,
- создание библиотек,
- подготовка образца,
- секвенирование,
- анализ данных.

Библиотека создается для каждого образца отдельно. После измерения и разведения библиотек всех анализируемых образцов ДНК до эквимольной концентрации библиотеки смешиваются для приготовления единого образца для секвенирования.

Библиотека Контрольного образца готовится одновременно с другими библиотеками ДНК и включается в запуск секвенирования.

Готовые библиотеки предназначены для секвенирования на платформе MiSeq (Illumina) согласно инструкции производителя.

2.1. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ОБРАЗЦОВ

Количественная оценка образцов ДНК перед приготовлением библиотек необходима для нормализации образцов до концентрации 10 нг/мкл. Выравнивание образцов до стандартной концентрации важно для обеспечения эффективной ПЦР при таргетном обогащении и воспроизводимой эффективности исполнения протокола между образцами.

Измерение концентрации образцов ДНК следует проводить флуориметрическим методом с использованием амплификатора StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, США) и калибраторов с известной концентрацией, входящих в состав Набора реагентов.

Калибраторы имеют следующие концентрации:

Калибратор 1 – 0 нг/мкл

Калибратор 2 – 10 нг/мкл

Калибратор 3 – 100 нг/мкл

Прослеживаемость значений концентраций калибраторов обеспечивается посредством доступных референсных методов измерения концентраций (спектрофотометр, флуориметр).

Методика количественной оценки ДНК обеспечивает необходимую точность, воспроизводимость и линейность в диапазоне от 5 до 100 нг/мкл.

Оборудование, материалы и реагенты для количественной оценки образцов

Описание	Производитель/ Поставщик	Каталожный номер
Компоненты из Набора реагентов		
Комплект для количественной оценки		
ОБОРУДОВАНИЕ		
ПЦР-бокс (ламинар или рабочее место)	любой	-
Вода I типа, 18MΩ	любой	-
Реал-тайм ПЦР-амплификатор StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific, США	4376600
Центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов	любой	-
Вортекс для 96-луночных планшетов	См.описание в разделе 1.10	
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-
Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 10—100 мкл; на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
Компьютер	Операционная система: Windows 7 (64 bit) / Windows 10 (64 bit) и выше; Процессор: Intel Core i3/i5/i7 (от 2,4 ГГц); Объем оперативной памяти: 4 ГБ и более; Объем дискового накопителя: 500 ГБ и более	
МАТЕРИАЛЫ		
Оптические стрипы или планшеты объемом 0,1 мл для StepOnePlus	SSI UltraFlux clr tube (strips)	3248-00
	Или SSI 96 Well PCR	3426-00

Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	любой	-
Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл	Eppendorf	022431021
Пробирки LoBind™ объемом 2 мл	Eppendorf	022431048
Пробирки типа фалькон 50 мл	Eppendorf	0030 122.178

Настройка StepOnePlus

1. Запустите StepOne™ Software v2.3. Выберите вариант Advanced Setup.
2. Во вкладке Experiment Properties задайте тип эксперимента - Quatitation - Standard Curve, реагент – SYBR Green Reagents.
3. Во вкладке Plate Setup/Define Standards and Samples присвойте Target Name (например, SYBR), добавьте новые образцы (add new sample) по количеству анализируемых образцов. Присвойте образцам соответствующие названия.
4. Во вкладке Plate Setup/Assign Standards and Samples установите target (SYBR) и значок «U» во все анализируемые лунки.
5. Присвойте всем лункам соответствующее обозначение образца (assign sample).
6. В Run Method установите режим:

Температура	Время
60°C	1 мин*

*data collection on

Reaction Volume – 50 мкл.

7. Сохраните программу и передайте копию на StepOnePlus через вкладку send experiment to instrument.

Проведение количественной оценки

Перед началом работы:

- Достаньте из холодильника **Буфер для количественной оценки (Б)**, выдержите при комнатной температуре.
- Достаньте из холодильника **Краситель (КР)**. Не подвергать Краситель (КР) воздействию света!

- Достаньте из холодильника камеры Калибраторы (К1, К2 и К3). Тщательно перемешайте калибраторы вортиксированием, сбросьте капли быстрым центрифугированием (повторить 3 раза).
- Выдержите анализируемые образцы ДНК при комнатной температуре, тщательно перемешайте вортиксированием, сбросьте капли быстрым центрифугированием.

1. Приготовьте рабочий раствор для количественной оценки по следующему протоколу с учетом измерения в каждом запуске, помимо образцов ДНК, 3 Калибраторов (К1, К2 и К3) в 3 повторах (итого, 9 реакций калибраторов) (необходимо готовить единый раствор сразу для всего набора анализируемых образцов):

Компонент	Объем, мкл
Буфер для количественной оценки (Б)	49,95
Краситель (КР)	0,05
Итого	50

Рабочий раствор можно хранить в темноте в течение 1 часа.

Внимание: Калибраторы необходимы для построения калибровочной кривой и их постановка обязательна. Калибраторы измеряются вместе с исследуемыми образцами ДНК в одном 96-луночном планшете или в соседних стрипах. Измерение Калибраторов отдельно от исследуемых образцов ДНК может привести к получению некорректных значений концентраций ДНК. При измерении концентраций целого сета из 96 образцов проводится 2 запуска прибора, в каждый запуск необходимо включать калибраторы.

2. В лунку 96-луночного планшета (или пробирку стрипа) для StepOnePlus внесите по 48 мкл рабочего раствора.
3. В каждую лунку с рабочим раствором внесите по 2 мкл Калибратора или анализируемого образца ДНК.
4. Запечатайте планшет пленкой (закройте стрипы), тщательно перемешайте реакции на вортексе, сбросьте капли быстрым центрифугированием.
5. Установите в прибор планшет (стрипы), запустите созданную ранее программу.
6. По завершении программы скачайте эксперимент из амплификатора с помощью StepOne™ Software v2.3 (нажмите Download Experiment from Instrument).
7. Откройте скачанный эксперимент, экспортируйте (вкладка Export) сырые данные (Raw data) в excel-файл.

8. Создайте новый excel файл. Перенесите в него значения столбца GREEN из excel файла «Raw data», соответствующие калибраторам.
9. Для каждого из калибраторов рассчитайте среднее значение по 3 измерениям (формула для строки excel =СРЗНАЧ). Подпишите ячейки среднего значения соответственно концентрации калибраторов 0, 10, 100.

Пример:

Левый столбец – среднее значение raw data для каждого из калибраторов.

Правый столбец – соответствующая концентрация калибратора.

77,33333	0
----------	---

10264,33	10
----------	----

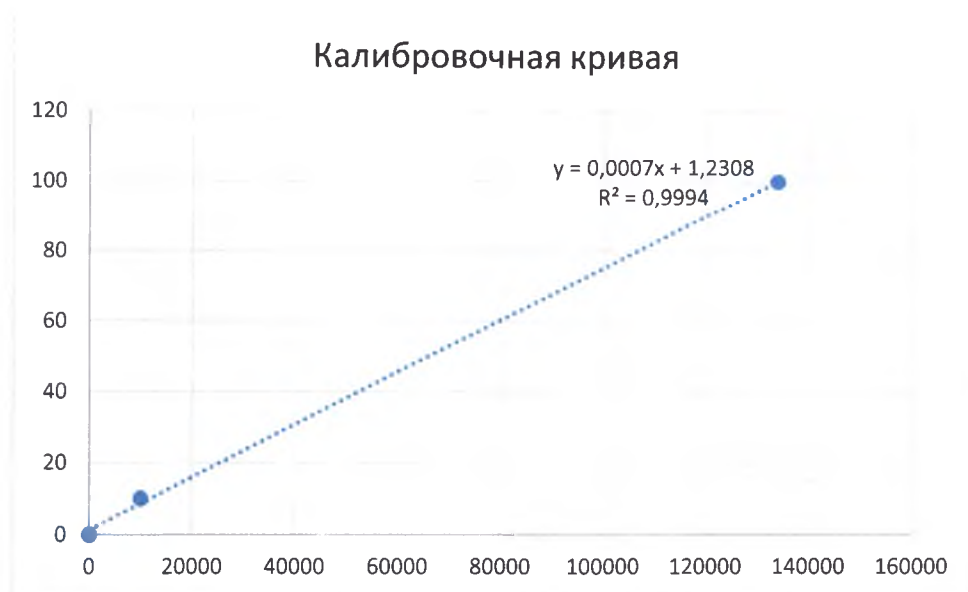
134105,3	100
----------	-----

10. Создайте в этом же excel файле точечную диаграмму (Вставка -> диаграммы -> точечная), выберите данные для диаграммы, выделив средние значения raw data, полученные по калибраторам, и концентрации калибраторов. На диаграмме появятся размеченные оси и 3 точки значений (ось X – значения raw data, ось Y – концентрация калибраторов). Добавьте линию тренда, для этого нажмите на одну из точек правой кнопкой мыши -> добавить линию тренда.
11. Во вкладке «Параметры линии тренда» выбрать «линейная» и нажать галочки «показывать уравнение на диаграмме», «поместить на диаграмму величину достоверной аппроксимации». На диаграмме появятся 2 формулы:

- формула R^2 (величина достоверной аппроксимации). Значение R^2 должно быть не ниже 0,9.

- формула уравнения калибровочной кривой в формате $y = Ax + B$ или $y = Ax - B$.

Пример графика калибровочной кривой с уравнениями:



12. Создайте в этом же excel файле таблицу с названиями анализируемых образцов. В столбец напротив каждого образца внесите значение Green из Raw data. Создайте пустой столбец для расчета концентраций по каждому образцу.

Пример:

Sample ID	GREEN	C, нг/мкл
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

13. В первой ячейке с концентрацией пропишите следующую формулу $=A \cdot R \pm B$, где А и В соответствующие числа из уравнения калибровочной кривой, R – ячейка со значением raw data образца.

14. Полученное с применением данной формулы значение является концентрацией образца в нг/мкл.

15. Растяните формулу для расчета концентраций по всем ячейкам.

2.2. ТАРГЕТНОЕ ОБОГАЩЕНИЕ

В ходе таргетного обогащения анализируемые гены HLA (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DQB1* и *HLA-DRB1*) амплифицируются методом мультиплексной LR-PCR с использованием специфической смеси праймеров. Все анализируемые локусы нарабатывается в одной пробирке.

Оборудование, материалы и реагенты для таргетного обогащения

Описание	Производитель	Кат. номер
Компоненты из Набора реагентов		
Комплект для таргетного обогащения		
ОБОРУДОВАНИЕ		
ПЦР-бокс (ламинар или рабочее место)	любой	-
Вода I типа, 18MΩ	любой	-
ПЦР-амплификатор Veriti® 96-well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, США	4375786
Центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов	любой	-
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-
Вортекс для 96-луночных планшетов	См.описание в разделе 1.10	
Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 10—100 мкл; на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
МАТЕРИАЛЫ		
Оптические 96-луночные планшеты для ПЦР (например, MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates, или аналогичные)	Thermo Fisher Scientific	N8010560
Защитные пленки для 96-луночных планшетов (например, Thermo Fisher Scientific или Axygen)	-	-
Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	любой	-
Пробирки LoBind™ объемом 2 мл	Eppendorf	022431048

Перед началом работы:

- Включите амплификатор, чтобы обеспечить нагрев крышки перед запуском ПЦР.
- Подготовьте образцы ДНК – рабочая концентрация образцов ДНК для работы с протоколом 10 нг/мкл. Перед началом работы перемешайте на вортексе образцы ДНК и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из морозильной камеры HLA ПЦР-буфер (ПБ), Смесь праймеров (СП) и Контрольный образец (К), выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки компонентов. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из морозильной камеры Полимеразу (П), коротко вортексируйте пробирку, центрифугируйте в импульсном режиме.

1. Приготовьте ПЦР мастер-микс по следующему протоколу (из расчета на каждый образец):

(Важно: при приготовлении мастер-миксов закладывайте дополнительные реакции на погрешности пипетирования)

Компонент	Объем, мкл
Вода I типа	1
HLA ПЦР-буфер (ПБ)	5,6
Смесь праймеров (СП)	3
Полимераза (П)	0,4
Итого	10

2. Тщательно перемешайте полученный мастер-микс на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
3. Приготовьте 96-луночный планшет и внесите в лунки планшета, соответствующие образцам, по 10 мкл мастер-микса.
4. В соответствующие лунки с мастер-миксом внесите по 10 мкл анализируемого образца ДНК.
5. Запечатайте планшет защитной пленкой. Тщательно вортексируйте планшет и центрифугируйте для сбора капель на дне лунок.
6. Запустите ПЦР-амплификатор со следующей программой:

Количество циклов	Температура	Время
1	94°C	2 мин
2	98°C	10 сек

	70°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
2	98°C	10 сек
	69°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
2	98°C	10 сек
	68°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
2	98°C	10 сек
	67°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
2	98°C	10 сек
	66°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	65°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	64°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	63°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	62°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	61°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	60°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	59°C	15 сек
2	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	58°C	15 сек
2	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	57°C	15 сек
	68°C	5,5 мин

1	68°C	10 мин
1	4°C	∞ ⁴

2.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК

Приготовление библиотек включает следующие основные этапы:

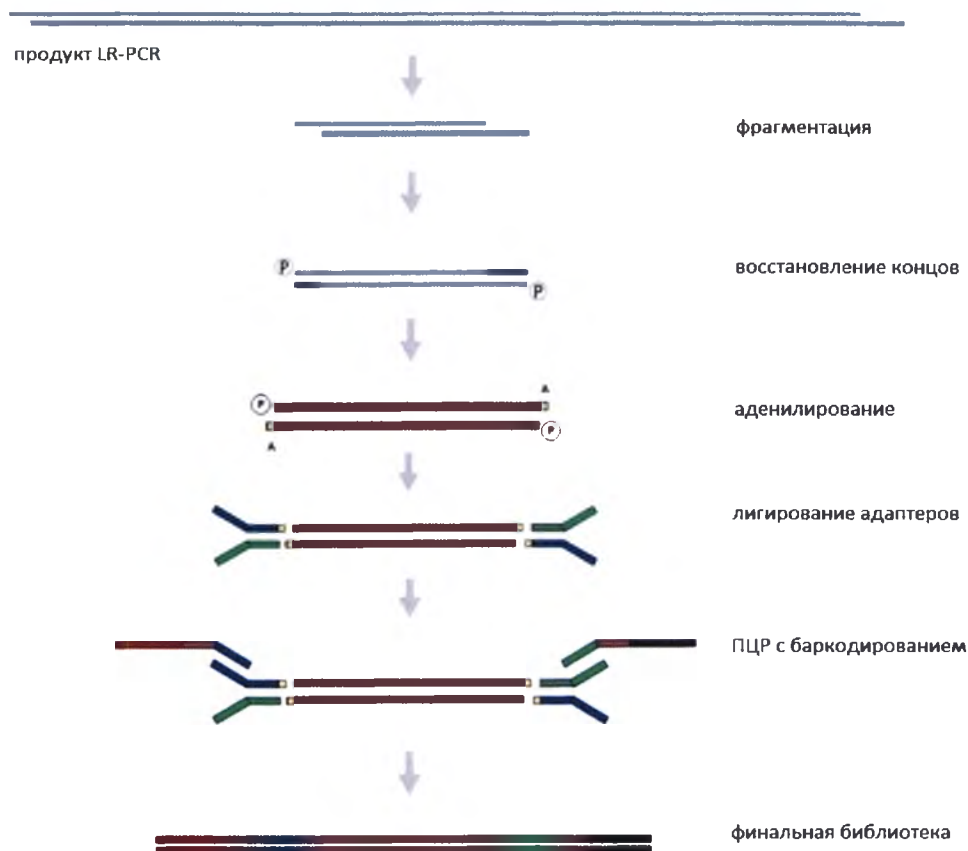
- фрагментация,
- восстановление концов,
- аденилирование,
- лигирование адаптеров,
- амплификация библиотек.

После таргетного обогащения ПЦР-смесь подвергается ферментативной фрагментации, после чего у фрагментов восстанавливаются концы, осуществляется их аденилирование для создания липких концов. Затем к фрагментам пришиваются адаптеры, после чего в ходе короткой ПЦР происходит одновременное баркодирование и амплификация библиотек.

В ходе приготовления библиотек осуществляется несколько этапов очистки на магнитных частицах. Финальные библиотеки количественно оцениваются флуориметрическим методом на приборе StepOnePlus и объединяются (пулируются).

⁴ Готовые продукты ПЦР можно оставить на ночь в амплификаторе на +4 °C или необходимо поместить на хранение при -20 °C.

Схема приготовления библиотек



Оборудование, материалы и реагенты для приготовления библиотек

Описание	Производитель	Кат. Номер
Компоненты из Набора реагентов		
Комплект для приготовления библиотек		
Комплект для молекулярного баркодирования A-P		
Комплект для молекулярного баркодирования 1-12		
Комплект для очистки		
ОБОРУДОВАНИЕ		
Рабочее место	любой	-
Вода I типа, 18MΩ	любой	-
ПЦР-амплификатор Veriti® 96-well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, США	4375786
Центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов	любой	-
Вортекс для 96-луночных планшетов	См. описание в разделе 1.10	
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-

Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 10—100 мкл; на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
Восьмиканальный дозатор 30—300 мкл	любой	-
Восьмиканальный дозатор 0,5—10 мкл	любой	-
Магнитный штатив	См.описание в разделе 1.10	
МАТЕРИАЛЫ		
Оптические 96-луночные планшеты для ПЦР (например, MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates, или аналогичные)	Thermo Fisher Scientific, США	N8010560
Защитные пленки для 96-луночных планшетов (например, Thermo Fisher Scientific или Axygen)	-	-
Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	любой	-
Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл	Eppendorf	022431021
Пробирки LoBind™ объемом 2 мл	Eppendorf	022431048
Пробирки типа фалькон 50 мл	Eppendorf	0030 122.178
Холодный штатив для планшетов и пробирок 0,2 мл	любой	-
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ		
Этанол, медицинский	любой	-
ЭДТА (динатриевая соль), класс чистоты: для молекулярной биологии	любой	-

Фрагментация

Перед началом работы:

- Заблаговременно подготовьте к работе холодный штатив: выдержите в морозильной камере не менее 30 минут до начала этапа фрагментации.
- Приготовьте 0,5М ЭДТА (pH=8.0) в необходимом объеме по прописи:

Компонент	Характеристика	
	стокового раствора	на 50 мл 0,5М ЭДТА
ЭДТА (динатр.соль)	372,24 г/моль	9,31 г
NaOH*	10 М	~2,5 мл**
Вода	I типа	~42,12 мл

**EDTA не растворяется в воде при кислом pH; при растворении нужно постепенно добавлять щелочь и контролировать pH.*

***Объем щелочи может быть большим или меньшим в зависимости от условий приготовления и свойств реагента.*

- Важно: заблаговременно включите амплификатор, чтобы обеспечить нагрев крышки прибора перед началом фрагментации!
- Установите на амплификаторе программу для фрагментации (см.ниже).
- Достаньте из морозильной камеры **Буфер для фрагментации (БФ)**, выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки буфера. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из морозильной камеры **Смесь для фрагментации (СФ)**. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из холодильной камеры **Комплект для очистки** и оставьте при комнатной температуре на 30 мин.

Внимание: этап фрагментации следует проводить на холодном штативе.

1. В каждую лунку нового планшета внесите по 16 мкл ПЦР-смеси соответствующего образца ДНК.

2. Приготовьте мастер-микс для фрагментации по следующему протоколу (из расчета на каждый образец):

(Важно: при приготовлении мастер-миксов закладывайте дополнительные реакции на погрешности пипетирования)

Компонент	Объем, мкл
Буфер для фрагментации (БФ)	2
Смесь для фрагментации (СФ)	2
Итого	4

3. Тщательно вортексируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.
4. Установите планшет на холодный штатив. В каждую лунку с образцом внесите по 4 мкл мастер-микса для фрагментации.
5. Запечатйте планшет защитной пленкой, тщательно вортексируйте планшет, центрифугируйте для сбора капель на дне лунок и поместите планшет в амплификатор с заданной программой:

Температура	Время
37°C	5 мин

6. **Незамедлительно** после окончания программы извлеките планшет из амплификатора, **поместите на холодный штатив** и внесите в каждую лунку с образцом 5 мкл 0,5М ЭДТА. Запечатйте планшет защитной пленкой, тщательно вортексируйте планшет, центрифугируйте в импульсном режиме.

Очистка на магнитных частицах

Перед началом работы:

- Достаньте из холодильной камеры **Комплект для очистки**, выдержите магнитные частицы при комнатной температуре 30 мин. Тщательно перемешайте частицы перед использованием!
- Приготовьте свежий 70% спирт из расчета 300 мкл на образец.

1. Добавьте 12,5 мкл тщательно перемешанных магнитных частиц к каждому образцу ДНК.
2. Запечатйте планшет защитной пленкой, тщательно перемешайте на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
3. Инкубируйте полученную смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

4. По истечении времени инкубации поместите планшет на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
5. Не снимая планшета с магнитного штатива, удалите супернатант, не задевая осадок магнитных частиц. Осадок содержит целевые фрагменты ДНК.
6. Добавьте в каждую пустую лунку с осадком 150 мкл 70% спирта. Переместите планшет относительно магнитных рядов для промывки магнитных частиц. Удалите спирт, не задевая осадка.
7. Повторите пункт 6 еще раз.
8. После удаления спирта снимите планшет с магнитного штатива, запечатайте защитной пленкой и центрифугируйте в импульсном режиме. Поместите планшет на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта.
9. Подсушите осадок в течение 3-4 минут на магнитном штативе до полной просушки пеллеты, не запечатывая планшет пленкой.
10. Снимите планшет с магнитного штатива, добавьте 16 мкл воды в каждую лунку с осадком, запечатайте планшет защитной пленкой и тщательно перемешайте содержимое на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
11. Поместите планшет обратно на магнитный штатив. Инкубируйте до восстановления прозрачности раствора.
12. Очищенные продукты фрагментации можно хранить при -20 °C не более 1 недели. В случае хранения необходимо перенести супернатант с частиц в новый 96-луночный планшет. В случае продолжения протокола приступайте к этапу восстановления концов.

БЕЗОПАСНАЯ ОСТАНОВКА ПРОТОКОЛА⁵

Восстановление концов

Перед началом работы:

- Достаньте из морозильной камеры **Буфер для восстановления концов (БВ)**, выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки буфера. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из морозильной камеры **Смесь для восстановления концов (СВ)**. Встряхните пробирку и центрифугируйте в импульсном режиме.

⁵ Очищенные продукты фрагментации можно хранить при -20 °C не более 1 недели.

1. Приготовьте мастер-микс для восстановления концов по следующему протоколу (из расчета на каждый образец):

(Важно: при приготовлении мастер-миксов закладывайте дополнительные реакции на погрешности пипетирования)

Компонент	Объем, мкл
Буфер для восстановления концов (БВ)	2
Смесь для восстановления концов (СВ)	2,5
Итого	4,5

2. Тщательно вортексируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.
3. В каждую лунку 96-луночного планшета внесите по 4,5 мкл мастер-микса для восстановления концов.
4. Перенесите 15,5 мкл супернатанта, содержащего очищенные фрагментированные продукты, в соответствующие лунки с мастер-миксом для восстановления концов.
5. Запечатйте планшет защитной пленкой, тщательно вортексируйте планшет, центрифугируйте для сбора капель на дне лунок и поместите планшет в амплификатор с заданной программой:

Температура	Время
20°C	30 мин
4°C	∞

6. После окончания программы извлеките планшет из амплификатора. Приступайте к следующему этапу.

Аденилирование

Перед началом работы:

- Достаньте из морозильной камеры **Буфер для аденилирования (БА)**, выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки буфера. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из морозильной камеры **Смесь для аденилирования (СА)**. Встряхните пробирку и центрифугируйте в импульсном режиме.

1. Приготовьте мастер-микс для аденилирования по следующему протоколу (из расчета на каждый образец):

(Важно: при приготовлении мастер-миксов закладывайте дополнительные реакции на погрешности пипетирования)

Компонент	Объем, мкл
вода I типа	24,8
Буфер для аденилирования (БА)	5
Смесь для аденилирования (СА)	0,2
Итого	30

2. Тщательно вортексируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.
3. В каждую лунку 96-луночного планшета внесите по 30 мкл мастер-микса для аденилирования.
4. Запечатйте планшет защитной пленкой, тщательно вортексируйте планшет, центрифугируйте для сбора капель на дне лунок и поместите планшет в амплификатор с заданной программой:

Температура	Время
72°C	30 мин
4°C	∞

5. После окончания программы извлеките планшет из амплификатора.

БЕЗОПАСНАЯ ОСТАНОВКА ПРОТОКОЛА⁶

Лигирование адаптеров

Перед началом работы:

- Перенесите 28 мкл продукта аденилирования в новый 96-луночный планшет для проведения реакции лигирования (оставшиеся 22 мкл можно заморозить).
- Достаньте из морозильной камеры **Буфер для лигирования (БЛ)** и **Адаптер (А)**, выдержите при комнатной температуре с учетом полной

⁶ Продукты аденилирования можно хранить при -20 °C не более 1 месяца.

разморозки реагентов. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.

1. Приготовьте мастер-микс для лигирования по следующему протоколу (из расчета на каждый образец):

Компонент	Объем, мкл
Вода I типа	9
Буфер для лигирования (БЛ)	10
Адаптер (А)	1
Итого	20

2. Тщательно вортексируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.
3. В каждую лунку 96-луночного планшета внесите по 20 мкл мастер-микса для лигирования.
4. Достаньте из морозильной камеры Лигазу (Л). Вортексируйте пробирку 2 секунды, центрифугируйте в импульсном режиме.
5. В каждую лунку 96-луночного планшета внесите по 2 мкл Лигазы (Л).
6. Запечатайте планшет защитной пленкой, тщательно вортексируйте планшет, центрифугируйте для сбора капель на дне лунок и инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
7. Приступите к очистке продуктов лигирования.

Очистка на магнитных частицах

Перед началом работы:

- Достаньте из холодильной камеры **Комплект для очистки**, выдержите магнитные частицы при комнатной температуре 30 мин. Тщательно перемешайте частицы перед использованием!
- Приготовьте свежий 70% спирт из расчета 300 мкл на образец.

1. Добавьте 32 мкл тщательно перемешанных магнитных частиц к каждому образцу ДНК.
2. Запечатайте планшет защитной пленкой, тщательно перемешайте на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
3. Инкубируйте полученную смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.
4. По истечении времени инкубации поместите планшет на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.

5. Не снимая планшета с магнитного штатива, удалите супернатант, не задевая осадок магнитных частиц. Осадок содержит целевые фрагменты ДНК.
6. Добавьте в каждую пустую лунку с осадком 150 мкл 70% спирта. Переместите планшет относительно магнитных рядов для промывки магнитных частиц. Удалите спирт, не задевая осадка.
7. Повторите пункт 6 еще раз.
8. После удаления спирта снимите планшет с магнитного штатива, запечатайте защитной пленкой и центрифугируйте в импульсном режиме. Поместите планшет на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта.
9. Подсушите осадок в течение 5 минут на магнитном штативе, не запечатывая планшет пленкой.
10. Снимите планшет с магнитного штатива, добавьте 15,5 мкл воды в каждую лунку с осадком, запечатайте планшет защитной пленкой и тщательно перемешайте содержимое на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
11. Поместите планшет обратно на магнитный штатив. Инкубируйте до восстановления прозрачности раствора.
12. Очищенные продукты лигирования можно хранить при -20 °C не более 1 недели. В случае хранения необходимо перенести супернатант с частиц в новый 96-луночный планшет. В случае продолжения протокола приступайте к этапу ПЦР с баркодированием.

БЕЗОПАСНАЯ ОСТАНОВКА ПРОТОКОЛА⁷

ПЦР с баркодированием

Перед началом работы:

Достаньте из морозильной камеры **ПЦР-смесь для обогащения (ПС)** и необходимое количество **Баркодов А-Р** и **Баркодов 1-12** (с учетом одной непересекающейся пары Баркодов на образец), выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.

1. Внесите в каждую лунку нового 96-луночного планшета, предназначенную для образца, 25 мкл ПЦР-смеси для обогащения (ПС).
2. Перенесите 15 мкл супернатанта, содержащего очищенные лигированные продукты, в соответствующие лунки с ПЦР-смесью для обогащения (ПС).
3. К каждому образцу добавьте 5 мкл Баркода А-Р и 5 мкл Баркода 1-12 с учетом непересечения пар баркодов между анализируемыми образцами.

⁷ Очищенные продукты лигирования можно хранить при -20 °C не более 1 недели.

- Запечатйте планшет защитной пленкой, тщательно вортексируйте планшет и центрифугируйте для сбора капель на дне лунок.
- Поместите планшет в амплификатор с заданной программой:

Количество циклов	Температура	Время
1	98°C	30 сек
5	98°C	10 сек
	65°C	1 мин 15 сек
1	65°C	5 мин
1	4°C	∞

БЕЗОПАСНАЯ ОСТАНОВКА ПРОТОКОЛА⁸

Очистка на магнитных частицах

Перед началом работы:

- Достаньте из холодильной камеры **Комплект для очистки**, выдержите магнитные частицы при комнатной температуре 30 мин. Тщательно перемешайте частицы перед использованием!
- Приготовьте свежий 70% спирт из расчета 300 мкл на образец.

- Добавьте 32 мкл тщательно перемешанных магнитных частиц к каждому образцу ДНК.
- Запечатйте планшет защитной пленкой, тщательно перемешайте на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
- Инкубируйте полученную смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.
- По истечении времени инкубации поместите планшет на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
- Не снимая планшета с магнитного штатива, удалите супернатант, не задевая осадок магнитных частиц. Осадок содержит целевые фрагменты ДНК.
- Добавьте в каждую пустую лунку с осадком 150 мкл 70% спирта. Переместите планшет относительно магнитных рядов для промывки магнитных частиц. Удалите спирт, не задевая осадка.
- Повторите пункт 6 еще раз.

⁸ Продукты ПЦР можно хранить при -20 °C не более 1 недели.

8. После удаления спирта снимите планшет с магнитного штатива, запечатайте защитной пленкой и центрифугируйте в импульсном режиме. Поместите планшет на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта.
9. Подсушите осадок в течение 5 минут на магнитном штативе, не запечатывая планшет пленкой.
10. Снимите планшет с магнитного штатива, добавьте 20 мкл воды в каждую лунку с осадком, запечатайте планшет защитной пленкой и тщательно перемешайте содержимое на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
11. Поместите планшет обратно на магнитный штатив. Инкубируйте до восстановления прозрачности раствора.
12. Перенесите 20 мкл супернатанта в новый 96-луночный планшет. Супернатант содержит готовую библиотеку.
13. Приступите к количественной оценке библиотек.

Количественная оценка

Количественную оценку библиотек необходимо проводить флуориметрическим методом с использованием амплификатора StepOnePlus (AB) согласно разделу 2.1. Количественная оценка образцов.

Средние значения концентраций, получаемые с использованием протокола, составляют от **10 000** до **20 000 нг/мл**.

Готовые библиотеки предназначены для секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США).

2.4. РАЗВЕДЕНИЕ, ПУЛИРОВАНИЕ И ДЕНАТУРАЦИЯ

ВНИМАНИЕ!

Не храните объединенные и денатурированные библиотеки. После пулирования и денатурации незамедлительно приступайте к запуску секвенирования.

Во время данного этапа очищенные библиотеки разводятся водой I типа до оптимальной концентрации, пулируются, затем осуществляется денатурация для получения одноцепочечной библиотеки, которая предназначена для загрузки в картридж.

Внимание: оптимальная концентрация для пулирования – **10 000 нг/мл (4 нМ)**. Допустимо взятие в анализ образцов с концентрацией не ниже 8000 нг/мл, добавляя их в пул без предварительного разведения.

Оборудование, материалы и реагенты для разведения, пулирования и денатурации

Описание	Производитель/Поставщик	Каталожный номер
Компоненты из Набора реагентов		
Комплект для секвенирования		
ОБОРУДОВАНИЕ		
Вода I типа, 18MΩ	любой	-
Центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов	любой	-
Вортекс для 96-луночных планшетов	См.описание в разделе 1.10	
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-
Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 10—100 мкл; на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
Компьютер	Операционная система: Windows 7 (64 bit) / Windows 10 (64 bit) и выше; Процессор: Intel Core i3/i5/i7 (от 2,4 ГГц); Объем оперативной памяти: 4 ГБ и более; Объем дискового накопителя: 500 ГБ и более;	
МАТЕРИАЛЫ		
Защитные пленки для 96-луночных планшетов (например, Thermo Fisher Scientific или Axygen)	-	-
Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	любой	-
Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл	Eppendorf	022431021
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ		
NaOH, класс чистоты: для молекулярной биологии	любой	-

Разведение и пулирование библиотек

1. Проведите на компьютере расчет разведения библиотек до концентрации 10 000 нг/мл.
2. Осуществите разведение и пулирование, объединяя удобное для пипетирования количество готовых библиотек.
3. Тщательно вортексируйте готовый пул и центрифугируйте в импульсном режиме.

Денатурация пула библиотек

1. Приготовьте свежий 0,2М NaOH, объединив 800 мкл воды 1 типа и 200 мкл 1М NaOH. Полученный раствор представляет собой 1 мл 0,2М NaOH. Не храните 0,2М NaOH более 1 недели.
2. В 1,5 мл пробирке Lo-Bind™ приготовьте следующую смесь для проведения денатурации:

Компонент	Объем, мкл
10000 нг/мл (4 нМ) библиотека	5
0,2М NaOH	5
Итого	10

3. Вortexируйте и центрифугируйте в импульсном режиме.
4. Инкубируйте смесь 5 минут при комнатной температуре.
5. К 10 мкл денатурированной библиотеки из пункта 2 добавьте 990 мкл охлажденного HT1 (входит в состав **Комплекта для секвенирования**). Полученный раствор представляет собой 1000 мкл 20 пМ денатурированной библиотеки.
6. В картридж при секвенировании на приборе MiSeq загружается **600 мкл** из 1000 мкл полученного раствора.

2.5. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Реагенты для секвенирования, входящие в Набор, проходят контроль качества в составе медицинского изделия и отвечают установленным производителем техническим требованиям.

Секвенирование следует осуществлять на генетическом секвенаторе MiSeq с использованием **Комплекта для секвенирования**. При работе с оборудованием следует руководствоваться пользовательскими документами на генетический секвенатор MiSeq.

Комплект для секвенирования

Для выполнения секвенирования библиотек HLA на приборе MiSeq требуется одноразовый **Комплект для секвенирования**. Для HLA-типирования следует устанавливать режим равных прочтений: **150+150 циклов**.

Каждый тип комплекта реактивов MiSeq включает в себя тип кюветы для конкретного комплекта и реактивы, требующиеся для выполнения секвенирования.

Ячейка и раствор для секвенирования. Ячейка MiSeq представляет собой нанесенный на стеклянную подложку одноразовый субстрат, в котором происходит

генерирование кластеров и выполняется реакция секвенирования. Реактивы попадают в проточную кювету через входное отверстие, проходят по одноканальной области визуализации, а затем покидают проточную кювету через выходное отверстие. Обработанная жидкость из проточной кюветы направляется в бутылку для сбора отходов. Перед настройкой цикла библиотеки загружаются в картридж с реактивами, а затем автоматически переносятся в проточную кювету после начала цикла.

Картридж для секвенирования. Картридж с реактивами MiSeq представляет собой одноразовый расходный материал, состоящий из емкостей с колпачками из фольги, предварительно заполненных реактивами для кластеризации и секвенирования в количестве, достаточном для секвенирования одной проточной кюветы. Все емкости картриджа с реактивами пронумерованы. Библиотеки образцов загружаются в положение 17 картриджа, отмеченное этикеткой Load Samples.

Запуск прибора MiSeq

Включите прибор MiSeq, следуйте инструкции производителя.

По завершении инициализации откроется главная страница. На главной странице выберите Run Options (Опции цикла). Выберите вкладку Run Settings (Настройки цикла). Выберите Post Run Wash (Послецикловая промывка) или Maintenance Wash (Профилактическая промывка). Промывку прибора требуется выполнять после каждого цикла секвенирования.

Программное обеспечение требует, чтобы промывка выполнялась перед настройкой последующего цикла. Послецикловая промывка занимает около 30 минут. Профилактическая промывка занимает около 1 часа.

Разморозка картриджа для секвенирования

Извлеките картридж из морозильной камеры с температурой от -22 до -18 °C. Поместите картридж в воду комнатной температуры, содержащую деионизированную воду в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами. Нельзя погружать картридж глубже, чем до линии, указанной на его упаковке.

Оставьте картридж с реактивами размораживаться при комнатной температуре до полной разморозки (~ 60 минут). Достаньте картридж и осторожно постучите им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытрите основание картриджа насухо.

Переверните картридж с реактивами десять раз для перемешивания размороженных реактивов, а затем внимательно проверьте, что все позиции разморожены. Проверьте реактивы в положениях 1, 2 и 4 и удостоверьтесь в том, что они равномерно перемешаны и не содержат осадка. Осторожно постучите картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реактиве.

Поместите кассету с реактивами на лед на срок до 6 часов или положите в холодильник с температурой от плюс 2 до плюс 8°C до начала секвенирования.

Создание sample sheet

Файл sample sheet – файл формата csv (comma-separated values), который содержит информацию, необходимую для установки параметров, исполнения и анализа запуска секвенирования. Рекомендуется создавать sample sheet файл во время разморозки картриджа перед секвенированием.

Файл sample sheet создается в любом текстовом редакторе и должен содержать 4 обязательных раздела:

- Header (заголовки)
- Reads (прочтения)
- Settings (Настройки)
- Data (Данные)

Между разделами должна быть одна пустая строка.

Раздел Header представляет собой набор строк вида «Параметр,Значение». Для части параметров значения фиксированы.

Между разделами должна быть одна пустая строка.

Образец заполнения раздела Header:

[Header]

IEMFileVersion,**5**

Investigator Name,*Maria*

Experiment Name,**IL-v2**

Date,*10.10.2018*

Workflow,**GenerateFASTQ**

Application,**VariFind**

Instrument Type,**MiSeq**

Assay,**VariFind HLA solution IL-v2**

Index Adapters,**VariFind Barcodes s1-s4**

Description,*2818-1*

Chemistry,**Amplicon**

Фиксированные значения выделены полужирным шрифтом и должны оставаться неизменными при каждом заполнении sample sheet. Переменные значения выделены курсивом и должны заполняться пользователем. В поле Description следует указывать лот Набора реагентов, с которым приготовлены библиотеки для запуска рана секвенирования.

В разделе Reads (прочтения) записывается количество циклов для прямого и обратного прочтения. Значения должны быть 151 для прямого и 151 для обратного прочтения.

Образец заполнения раздела Reads:

[Reads]

151

151

В разделе Settings все значения фиксированные.

Образец заполнения поля Settings:

[Settings]

ReverseComplement,0

Adapter,AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA

AdapterRead2,AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

В разделе Data записываются данные об образцах, предназначенных для секвенирования. В данном разделе 10 столбцов для заполнения информации о каждом образце. Данные об образце записываются в строку через разделитель в виде запятой без пробела. Первая строка раздела [Data] содержит заголовки столбцов:

Sample_ID (идентификатор образца)

Sample_Name (название образца)

Sample_Plate (название сета образцов)

Sample_Well (номер лунки)

I7_Index_ID (ID индекса i7)

Index (последовательность индекса i7)

I5_Index_ID (ID индекса i5)

index2 (последовательность индекса i5)

Sample_Project (проект)

Description (описание)

Образец заполнения раздела Data:

[Data]

Sample_ID,Sample_Name,Sample_Plate,Sample_Well,I7_Index_ID,index,I5_Index_ID,index2,Sample_Project,Description

7082,7082,set-6,A01,1,ATTACTCG,A,TATAGCCT,,

7083,7083,set-6,A02,2,TCCGGAGA,A,TATAGCCT,,

7084,7084,set-6,A03,3,CGCTCATT,A,TATAGCCT,,

Столбцы Sample_Project (проект) и Description (описание) не заполняются, однако после последовательности индекса i5 необходимо поставить два разделителя в виде запятой, чтоб не нарушить структуру файла.

Последовательности индексов для заполнения раздела Data:

ID индекса i7	Последовательности индексов i7	ID индекса i5	Последовательности индексов i5
1	ATTACTCG	A	TATAGCCT
2	TCCGGAGA	B	ATAGAGGC
3	CGCTCATT	C	CCTATCCT
4	GAGATTCC	D	GGCTCTGA
5	ATTCAGAA	E	AGGCGAAG
6	GAATTCGT	F	TAATCTTA
7	CTGAAGCT	G	CAGGACGT
8	TAATGCGC	H	GTAAGGAG
9	CGGCTATG	I	ACTGCATA
10	TCCGCGAA	J	AAGGAGTA
11	TCTCGCGC	K	CTAAGCCT
12	AGCGATAG	L	
		M	
		N	
		O	
		P	

Итоговый файл необходимо сохранить с расширением .csv и присвоить готовому файлу sample sheet название согласно идентификатору картриджа с реактивами (номер штрих-кода), с которым будет запускаться секвенирование.

Далее:

1. Скопируйте готовый sample sheet файл на флэш-карту.
2. Вставьте флэш-карту в секвенатор на правой панели прибора.
3. На главной странице меню секвенатора выберите Manage files (Управление файлами). В открывшемся окне выберите sample sheets и нажмите Upload (Загрузить), затем выберите диск E. Откроется папка с содержимым флэш-карты.

4. Найдите нужный файл sample sheet.csv, кликните на него для загрузки в папку секвенатора.

Загрузка библиотек

Когда картридж с реактивами полностью разморозился, необходимо осуществить загрузку заранее подготовленного пула библиотек в картридж.

Проколите колпачок из фольги чистым наконечником на 1 мл. В резервуар с пометкой Load Samples (Загрузка образцов) внесите 600 мкл подготовленного согласно разделу 2.4. РАЗВЕДЕНИЕ, ПУЛИРОВАНИЕ И ДЕНАТУРАЦИЯ денатурированного пула библиотек. Не касайтесь колпачка из фольги.

Очистка ячейки

Наденьте новую пару неопудренных перчаток. Захватите проточную кювету за основание пластикового картриджа и извлеките ее из емкости. Слегка промойте проточную кювету деионизованной водой до тех пор, пока стеклянный и пластиковый картриджи не будут тщательно отмыты от избытка солей. Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе. Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах визуализации.

Насухо протрите ячейку и картридж безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы. Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой. Протрите стекло ячейки салфеткой, смоченной в спирте. Удостоверьтесь в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки.

Избыток спирта протрите безворсовой салфеткой. Удостоверьтесь в том, что в отверстиях ячейки нет препятствий и что прокладка плотно прилегает по окружности отверстий кюветы. Если выяснится, что прокладка смещена, осторожно верните ее на место и добейтесь того, чтобы она надежно располагалась вокруг отверстий кюветы.

Настройка запуска секвенирования

На главной странице выберите Sequence (Секвенирование), чтобы начать настройку секвенирования. Откроется экран опций среды BaseSpace. После выбора опции Sequence (Секвенирование) на главной странице открывается серия экранов настройки цикла в следующем порядке: BaseSpace Option (Опция BaseSpace), Load Flow Cell (Загрузка проточной кюветы), Load Reagents (Загрузка реактивов), Review (Просмотр) и Pre-Run Check (Предварительная проверка).

На экране BaseSpace Options (Опции BaseSpace) снимите отметку с опций Use BaseSpace for storage and analysis (Использовать BaseSpace для хранения и анализа) и Use BaseSpace Onsite for storage and analysis (Использовать BaseSpace Onsite для хранения и анализа). Нажмите Next (Далее).

Загрузка ячейки

Поднимите дверцу отсека ячейки и нажмите кнопку справа от защелки ячейки. Защелка проточной кюветы откроется.

Удерживая проточную кювету за края, поставьте ее на площадку проточной кюветы. Осторожно нажмите на защелку проточной кюветы в направлении книзу так, чтобы она защелкнулась над кюветой. Когда защелка проточной кюветы закрывается, два центровочных штырька ее позиционируют. Если вы услышали щелчок, это означает, что защелка проточной кюветы надежно закреплена.

Программное обеспечение должно идентифицировать ячейку. Закройте дверцу отсека, нажмите Next (Далее).

Загрузка раствора и проверка бутылки для сбора отходов

Достаньте бутылку с раствором из комплекта для секвенирования. Переверните для перемешивания, а затем снимите крышку. Откройте дверцу отсека с реактивами. Поднимите сипперную рукоятку до щелчка. Извлеките промывную бутылку и загрузите бутылку с раствором.

Перелейте содержимое бутылки для сбора отходов в соответствующий контейнер для отходов и верните бутылку обратно. Медленно опустите сипперную рукоятку. Убедитесь в том, что сипперные трубки опустились во флакон с раствором и в бутылку для сбора отходов.

Программное обеспечение должно определить раствор для секвенирования. Нажмите Next (Далее).

Загрузка картриджа с реактивами

Откройте дверцу отсека для картриджа. Придерживая картридж с реактивами за тот конец, на котором имеется метка Illumina, вставьте его в отсек для реактивов до упора. Закройте дверцу отсека для охлаждения реактивов.

Программное обеспечение должно определить картридж для секвенирования. Нажмите Next (Далее).

Выбор sample sheet

По умолчанию программное обеспечение ищет файл протокола с названием, которое совпадает с номером штрих-кода на картридже с реактивами, загруженном в прибор. Если протокол анализа не найден, появится сообщение с приглашением перейти туда, где находится нужный для данного цикла протокол анализа.

Во избежание безуспешного поиска воспользуйтесь командой Change Sample Sheet (Изменить протокол анализа) на экране загрузки реактивов, чтобы направить программное обеспечение к нужному протоколу анализа.

1. Выберите Change Sample Sheet (Смена протокола анализа) на экране Load Reagents (Загрузка реактивов).

2. Выберите Browse (Обзор), чтобы переместиться к sample sheet.
3. Нажмите Open (Открыть).
4. Выберите Save and Continue (Сохранить и продолжить).
5. Нажмите Next (Далее).

Запуск секвенирования

Перед секвенированием система выполняет проверку всех компонентов цикла, дискового пространства и сетевых соединений перед началом цикла. Если какие-либо позиции не проходят предварительную проверку, на экране появится сообщение об этом и указания относительно того, как исправить ошибку. Если все позиции прошли предварительную проверку, нажмите Start Run (Запуск цикла). Продолжительность цикла секвенирования составляет 24 часа.

Мониторинг секвенирования

Во время секвенирования можно наблюдать за его ходом, интенсивностью и качеством распознавания оснований, используя для этого экран прибора.

Q-Score All Cycles (Баллы Q-Score для всех циклов). Служит для отображения средней процентной доли оснований, для которых значение баллов качества Q-Score превышает Q30. Величина Q-score является прогнозом вероятности неправильного распознавания оснований. Баллы Q-Scores вычисляются после 25-го внутреннего цикла.

Cluster Density (K/mm²) (Плотность кластеров. К/мм²). Служит для отображения количества кластеров, обнаруженных на квадратном миллиметре во время цикла.

Clusters Passing Filter (%) (Кластеры, проходящие фильтр. %). Служит для отображения доли кластеров, проходящих фильтр, на основе фильтра чистоты Illumina, измеряющего качество распознавания. Эти данные появляются только после 25-го цикла.

Estimated Yield (Mb) (Ожидаемый выход, в мегабазах). Эта информация отражает количество оснований, распознанных в ходе цикла (единица измерения — мегабаза, 1 млн нуклеотидных оснований). Эти данные появляются только после 25-го цикла.

По окончании секвенирования появляется кнопка Next (Далее). Нажмите Next (Далее) для выхода из экрана Sequencing (Секвенирование) и перехода к послещикловой промывке.

«Сырые» данные результата секвенирования автоматически передаются на сервер для анализа (см. Раздел 3. **Анализ данных**).

3. АНАЛИЗ ДАННЫХ

Анализ данных и HLA-типирование осуществляется с помощью программного обеспечения «VariFind™ HLA Software» версия 2.1 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ») в полностью автоматизированном режиме. Программа предназначена для анализа данных высокопроизводительного секвенирования, полученных с помощью набора реагентов VariFind™ HLA solution IL-v2. Программное обеспечение представляет собой набор консольных (без графического интерфейса) приложений, установленных на сервере. Загрузка «сырых» данных (результатов секвенирования) на сервер осуществляется автоматически после завершения процесса секвенирования. Далее без участия оператора запускается процесс анализа данных. Результаты сохраняются в директорию на сервере, доступ к которой осуществляется с персонального компьютера пользователя. ПО осуществляет:

- импорт данных с локального сервера пользователя, подключенного к секвенатору, на удаленный сервер (без передачи персональных данных);
- выравнивание прочтений на последовательности из базы данных IMGT HLA;
- оценку качества данных;
- определение HLA-генотипа;
- формирование отчетов;
- визуализацию результатов;
- экспорт результатов на локальный сервер пользователя.

Программное обеспечение VariFind™ HLA Software соответствует классу А по безопасности в соответствии с ГОСТ Р МЭК 62304-2013.

3.1. УСТАНОВКА ПРИЛОЖЕНИЯ VARIFIND™ HLA SOFTWARE

Перед первой постановкой необходимо осуществить (самостоятельно или при поддержке производителя) установку приложения для доступа к результатам генотипирования. **Компакт-диск** с установочным файлом «VariFind™ HLA Software setup.exe» входит в состав изделия. Запустите установочный файл, следуйте подсказкам диалогового окна установщика. По окончании установки на Рабочем столе компьютера появится ярлык «VariFind™ HLA Software версия 2.1».

3.2. АЛГОРИТМ АНАЛИЗА ДАННЫХ

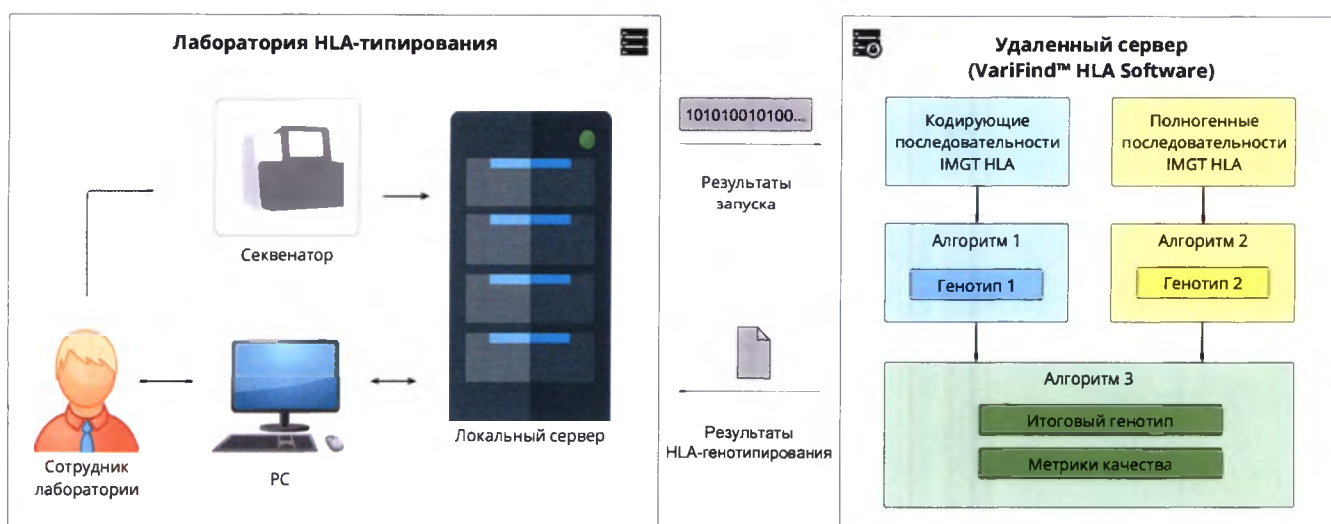
3.2.1. Требования к входным данным

- ✓ Входными данными для программы являются прочтения с генетического секвенатора MiSeq в формате FASTQ.GZ.
- ✓ Название образца не должно в длину превышать 15 символов;
- ✓ Допустимые символы для названия образца:

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZabcdefghijklmnopqrstuvwxyz0123456789-

3.2.2. Алгоритм обработки данных

- Анализ данных начинается автоматически после завершения копирования файлов в рабочую директорию программы на локальном сервере;
- Данные передаются на удаленный сервер;
- После завершения передачи параллельно запускаются два алгоритма анализа;
- Алгоритм 1 осуществляет выравнивание прочтений на кодирующие последовательности аллелей базы данных IMGT HLA и генотипирование с разрешением 4 digit (2 fields);
- Алгоритм 2 осуществляет выравнивание прочтений на полногенные последовательности аллелей базы данных IMGT HLA и генотипирование с разрешением 4 digit (2 fields);
- Алгоритм 3 оценивает метрики качества данных, сравнивает результаты алгоритмов 1 и 2, и выбирает наиболее вероятный генотип;
- По результатам алгоритма 3 формируется отчет по образцу (Приложение 1), таблица генотипов по всем образцам запуска, отчет по запуску (Приложение 2) и пользовательский отчет (подробнее см. раздел **3.6. Форматы выходных данных**);
- Выходные данные экспортируются на локальный сервер пользователя.



3.2.3. Просмотр результатов анализа

Общая продолжительность обработки данных программным обеспечением VariFind™ Software от момента окончания секвенирования до получения результатов анализа составляет от 22 до 24 часов. По желанию пользователя может быть настроено e-mail оповещение о готовности.

Доступ к результатам генотипирования осуществляется через ярлык на Рабочем столе «VariFind™ HLA Software версия 2.1» (см. **раздел 3.1**); также результаты доступны в сетевой папке пользователя по адресу⁹:

.. \RUN-ID\result1,

где RUN-ID – идентификатор запуска секвенатора; result1 – папка с результатами.

Содержание папки с результатами описано в разделе 3.6. **Форматы выходных данных.**

3.3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Идентификация аллелей/генотипов осуществляется полностью автоматически, ручное назначение аллелей и разрешение неоднозначностей не требуется;

⁹ Указан относительный путь к папке. Абсолютный путь задается инженером производителя ПО при первичной установке.

- Идентифицируются аллели, включенные в актуальную версию базы данных IMGT HLA;
- Под актуальной понимается версия базы данных IMGT HLA, используемая для выравнивания прочтений в программном обеспечении VariFind™ HLA Software;
- Обновление версии IMGT HLA в VariFind™ HLA Software осуществляется каждые 6 месяцев;
- Версия базы данных IMGT HLA указывается в отчете по образцу и отчете по запуску;
- Генотип определяется по пяти локусам: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1 и HLA-DRB1;
- Разрешение генотипирования: 4 digit (2 fields);
- Генотип записывается соответствии с [номенклатурой IMGT HLA](#);
- В случае если генотип не определен, см. разделы **3.4. Метрики качества данных** и **3.8. Устранение проблем**.
- Перед интерпретацией результатов постановки необходимо убедиться в корректности определения генотипа Контрольного образца из состава набора (см. раздел **3.7 АНАЛИЗ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА**).

3.4. МЕТРИКИ КАЧЕСТВА ДАННЫХ

Метрики качества данных рассчитываются автоматически для каждого локуса HLA в отдельности. При выходе значений метрик за установленные пороги (см. таблицу) алгоритм автоматически присваивает статус генотипа по локусу **«Отсутствует (не пройден автоматический контроль качества)»** (см. раздел **3.8. Устранение проблем**).

Метрики качества и установленные пороги значений:

Показатель	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
Число прочтений на экзоны	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
Среднее качество прочтений (величина Phred ¹⁰)	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30
Размер вставки	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.	≥ 250 п.н.

¹⁰ NGS: высокопроизводительное секвенирование. Д.В. Ребриков [и др.]. – М.: БИНОМ. 2014.

Дисбаланс по ключевым экзонам	≤ 80%	≤ 80%	≤ 80%	≤ 80%	≤ 80%
----------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------

Основным критерием качества секвенирования является метрика «Среднее качество прочтений» (см. раздел **3.4.2. Среднее качество прочтений**).

3.4.1. Число прочтений на экзоны

- Число прочтений, выровненных на кодирующие последовательности локуса и прошедших фильтрацию по качеству;
- Пороговое значение для прохождения контроля качества: ≥ 500 прочтений на локус;
- Основной показатель точности генотипирования на уровне 4 digit;
- Недостаточное количество прочтений может привести к ошибочному генотипированию или невозможности генотипирования по локусу.

3.4.2. Среднее качество прочтений

- Среднее phred-качество по всем прочтениям, выровненным на кодирующие последовательности локуса;
- Параметр phred отражает вероятность ошибки; для технологии высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) около 90% нуклеотидов имеют качество равное 30, то есть вероятность ошибки составляет 1/1000, или точность прочтения 99,9%;
- Параметр зависит от качества реагентов для секвенирования и соблюдения протокола при выборе параметров запуска секвенатора;
- Пороговое значение для прохождения контроля качества: ≥ 30 .

3.4.3. Размер вставки

- Средняя длина секвенируемых фрагментов, определенная по результатам выравнивания на локус пары прочтений;
- Под вставкой понимается длина фрагмента без учета последовательностей адаптеров;



- Размер вставки в основном зависит от точности соблюдения протокола на этапе фрагментации и при очистках магнитными частицами;
- Пороговое значение для прохождения контроля качества: ≥ 250 п.н.
- Низкий размер вставки может привести к увеличению неоднозначности результатов генотипирования.

3.4.4. Дисбаланс покрытия по ключевым экзонам

- Среднее соотношение между покрытием аллелей по ключевым экзонам;
- Ключевые экзоны: экзоны 2 и 3 для HLA class I; экзон 2 для HLA class II.
- Значения, близкие к 0,5, соответствуют сбалансированной гетерозиготе;
- Значения, близкие к 0,0 и 1,0 свидетельствуют о дисбалансе между количеством прочтений с гомологичных хромосом;
- Гомозиготные аллели имеют значение 0,5;
- Пороговое значение для прохождения контроля качества: $\leq 80\%$.

3.5. ОЦЕНКА КОНТАМИНАЦИИ

- Контаминация исследуемых образцов посторонней геномной ДНК человека идентифицируется автоматически и показывает присутствие третьей аллели с частотой более 25% (в формате «обнаружено/не обнаружено»);
- При обнаружении контаминации алгоритм присваивает статус генотипа по локусу **«Отсутствует (не пройден автоматический контроль качества)»** (см. раздел 3.8. Устранение проблем).

3.6. ФОРМАТЫ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ

3.6.1. Отчет по образцу

- Пример отчета по образцу приведен в Приложении 1 настоящей Инструкции;
- Отчет по образцу состоит из четырех разделов: общая информация об анализе, результат генотипирования, контроль качества (КК) и раздел пользователя;
- Общая информация включает: сокращенное наименование медицинского изделия и серию набора реагентов, метод анализа, анализируемые локусы, разрешение генотипирования; номер образца и материал; дату секвенирования, номер запуска, номер образца в постановке, дату анализа и версию базы данных IMGT HLA;
- Результат генотипирования представлен в таблице: локус, генотип и результат контроля качества (КК) в формате «Пройден/Не пройден»;
- В случае если степень неоднозначности высока и запись генотипа превышает 300 символов, в графе генотип указывается "Отображение невозможно: степень неоднозначности выше предельно допустимой" (подробнее см. раздел **3.7. Устранение проблем**).
- Контроль качества содержит информацию о метриках качества по каждому локусу, заданных порогах и результат КК, подробнее см. раздел **3.4 – Метрики качества данных**;
- Раздел пользователя опционально заполняется вручную после печати отчета и включает информацию об исполнителях, а также служебные заметки;
- Формат отчета: PDF.

3.6.2. Таблица генотипов по образцам

- Объединенная таблица по результатам генотипирования всех образцов в одной постановке;
- 7-колоночная таблица;

Колонка 1 – порядковый номер;

Колонка 2 – название образца;

Колонка 3 – генотип по локусу HLA-A;

Колонка 4 – генотип по локусу HLA-B;

Колонка 5 – генотип по локусу HLA-C;

Колонка 6 – генотип по локусу HLA-DQB1;

Колонка 7 – генотип по локусу HLA-DRB1;

- Генотип записывается соответствии с [номенклатурой IMGT HLA](#);
- Значение "." Соответствует значению "генотип не определен";
- Гомозиготный генотип указан в формате "Аллель 1 + ND", где ND – аллель не определена;
- Формат файла: TXT.

A	B	C	D	E	F	G
1	2	3	4	5	6	7
1	Sample	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
2	2542		HLA-B*07:02+HLA-B*27:02	HLA-C*02:02+HLA-C*07:02	HLA-DQB1*05:01+HLA-DQB1*06:03	HLA-DRB1*01:01+HLA-DRB1*13:01
3	2543	HLA-A*03:01+HLA-A*23:01	HLA-B*35:01+HLA-B*49:01	HLA-C*04:01+HLA-C*07:01	HLA-DQB1*03:02+HLA-DQB1*05:01	HLA-DRB1*01:01+HLA-DRB1*04:04
4	2545	HLA-A*02:01+HLA-A*23:01	HLA-B*44:02+HLA-B*44:03	HLA-C*04:01+HLA-C*05:01	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*03:02	HLA-DRB1*04:01+HLA-DRB1*11:04
5	2546	HLA-A*01:01+HLA-A*03:01	HLA-B*06:01+HLA-B*15:01	HLA-C*04:01+HLA-C*07:01	HLA-DQB1*03:03+ND	HLA-DRB1*07:01+ND
6	2547	HLA-A*02:01+HLA-A*24:02	HLA-B*13:02+HLA-B*15:01	HLA-C*03:03+HLA-C*06:02	HLA-DQB1*02:02+HLA-DQB1*06:02	HLA-DRB1*07:01+HLA-DRB1*15:01
7	2548	HLA-A*03:01+HLA-A*25:01	HLA-B*07:02+HLA-B*16:01	HLA-C*07:02+HLA-C*12:03	HLA-DQB1*03:02+HLA-DQB1*06:02	HLA-DRB1*04:04+HLA-DRB1*15:01
8	2549	HLA-A*03:01+HLA-A*11:01	HLA-B*40:01+HLA-B*50:01	HLA-C*03:04+HLA-C*06:02	HLA-DQB1*02:02+HLA-DQB1*06:09	HLA-DRB1*07:01+HLA-DRB1*13:02
9	2550	HLA-A*11:01+HLA-A*32:01	HLA-B*18:01+HLA-B*40:02	HLA-C*02:02+HLA-C*07:01	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*05:01	HLA-DRB1*01:01+HLA-DRB1*11:04
10	2551	HLA-A*02:01+HLA-A*30:01	HLA-B*07:02+HLA-B*13:02	HLA-C*06:02+HLA-C*07:02	HLA-DQB1*02:02+HLA-DQB1*05:01	HLA-DRB1*01:01+HLA-DRB1*07:01
11	2552	HLA-A*02:01+HLA-A*24:02	HLA-B*06:01+HLA-B*13:02	HLA-C*06:02+HLA-C*07:01	HLA-DQB1*02:01+HLA-DQB1*06:02	HLA-DRB1*03:01+HLA-DRB1*15:01
12	5571	HLA-A*02:01+HLA-A*02:06	HLA-B*15:18+HLA-B*35:01	HLA-C*03:04+HLA-C*07:04	HLA-DQB1*04:01+HLA-DQB1*06:01+HLA-DQB1*06:01	HLA-DRB1*04:05+HLA-DRB1*15:02+HLA-DRB1*15:14
13	5636	HLA-A*02:01+HLA-A*26:01	HLA-B*15:01+HLA-B*40:02	HLA-C*03:04+HLA-C*08:01	HLA-DQB1*02:01+ND	HLA-DRB1*03:01+HLA-DRB1*04:01
14	5637	HLA-A*02:01+HLA-A*02:06	HLA-B*13:01+HLA-B*40:06	HLA-C*03:04+HLA-C*08:01	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*06:02	HLA-DRB1*12:02+HLA-DRB1*15:01
15	5638	HLA-A*02:06+HLA-A*24:02	HLA-B*45:01+HLA-B*54:01	HLA-C*01:02+HLA-C*16:01	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*05:03	HLA-DRB1*12:01+HLA-DRB1*14:05
16	5639	HLA-A*11:01+HLA-A*33:03	HLA-B*35:01+HLA-B*58:01		HLA-DQB1*06:03+HLA-DQB1*06:09	HLA-DRB1*13:01+HLA-DRB1*13:02
17	5642	HLA-A*02:01+ND	HLA-B*27:07+HLA-B*40:02	HLA-C*03:04+HLA-C*15:02	HLA-DQB1*05:02+HLA-DQB1*05:03	HLA-DRB1*14:05+HLA-DRB1*16:01
18	5647	HLA-A*26:01+HLA-A*30:01	HLA-B*13:02+HLA-B*35:01	HLA-C*03:03+HLA-C*06:02	HLA-DQB1*03:03+ND	HLA-DRB1*07:01+HLA-DRB1*09:01
19	5648	HLA-A*01:01+HLA-A*24:02	HLA-B*40:01+HLA-B*57:01	HLA-C*03:04+HLA-C*06:02	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*06:02	HLA-DRB1*11:04+HLA-DRB1*15:01
20	5649	HLA-A*11:01+HLA-A*33:03	HLA-B*35:01+HLA-B*44:03	HLA-C*04:01+HLA-C*14:03	HLA-DQB1*05:01+HLA-DQB1*06:04	HLA-DRB1*01:01+HLA-DRB1*13:02
21	5650	HLA-A*02:06+HLA-A*24:02	HLA-B*15:27+HLA-B*27:05	HLA-C*01:02+HLA-C*04:01	HLA-DQB1*03:02+HLA-DQB1*05:01	HLA-DRB1*01:01+HLA-DRB1*04:06
22	5658	HLA-A*02:07+ND	HLA-B*15:01+HLA-B*40:03	HLA-C*03:03+HLA-C*03:04	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*05:03	HLA-DRB1*12:01+HLA-DRB1*14:05
23	5663	HLA-A*26:01+HLA-A*32:01	HLA-B*27:07+HLA-B*40:02	HLA-C*03:04+HLA-C*07:01	HLA-DQB1*02:01+HLA-DQB1*06:02	HLA-DRB1*03:01+HLA-DRB1*15:01
24	5664	HLA-A*02:06+HLA-A*24:02	HLA-B*15:02+HLA-B*35:01	HLA-C*03:03+HLA-C*08:01	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*03:03	HLA-DRB1*09:01+HLA-DRB1*12:02

3.6.3. Отчет по запуску

- Пример отчета по запуску приведен в Приложении 2 настоящей Инструкции;
- Отчет по запуску включает оглавление и три основных раздела: общая информация об анализе, информация о качестве данных по запуску и результаты генотипирования;
- Общая информация включает: название и версию набора реагентов, метод анализа, анализируемые локусы, разрешение генотипирования, номер образца и материал, дату секвенирования, номер запуска, номер образца в постановке, дату анализа и версию базы данных IMGT HLA;
- Информация о качестве данных включает: покрытие по локусам (среднее количество прочтений на локус), кросс-мэппинг (выравнивание прочтения на несколько высоко-гомологических локусов), размер вставки (подробнее см. раздел **3.4.3. Размер вставки**), покрытие экзонов по локусам (среднее количество прочтений, выровненных на каждый из анализируемых экзонов);
- Результаты генотипирования в отчете по запуску соответствуют таблице генотипов по образцам (подробнее см. раздел **3.6.2. Таблица генотипов по образцам**);
- Формат отчета: PDF.

3.7. АНАЛИЗ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА

Корректность исполнения всех этапов исследования подтверждается сравнением результата генотипирования Контрольного образца из состава набора с установленным значением - генотип Контрольного образца:

Локус HLA	Генотип
HLA-A	HLA-A*02:01+HLA-A*11:01
HLA-B	HLA-B*18:01+HLA-B*44:02
HLA-C	HLA-C*02:02+HLA-C*05:01
HLA-DQB1	HLA-DQB1*03:01+HLA-DQB1*03:01
HLA-DRB1	HLA-DRB1*04:01+HLA-DRB1*08:03

При несовпадении генотипа Контрольного образца со значениями в таблице, запуск признаётся неудачным и полученные результаты не могут быть использованы в работе (см. раздел **3.8. Устранение проблем**).

3.8. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Все лабораторные процедуры должны проводиться в строгом соответствии с данной инструкцией.

- Раздел предназначен для установления причин и устранения проблем, связанных с не определением генотипа и/или не прохождением порогов по качеству данных;
- Если проблема наблюдается во всех образцах или отсутствует в списке проблем, обращайтесь в службу поддержки клиентов производителя.

Проблема	Возможная причина	Решение
Низкое число прочтений на образец	Ошибка при измерении концентрации и разведении библиотеки. Ошибка при пулировании готовых библиотек.	Измерить концентрацию готовой библиотеки заново. В случае низкой концентрации переделать библиотеку. Секвенировать в следующем запуске.
Низкое число прочтений на локус	Низкая эффективность LR-PCR	При неудовлетворительном результате переставить LR-PCR для

	(по разным причинам).	данного образца. Секвенировать в следующем запуске.
Низкое качество прочтений	Неудовлетворительное качество реагентов для секвенирования	Секвенировать с использованием реагентов надлежащего качества.
Размер вставки отклоняется от ожидаемого (250 – 1500 п.н.)	Отклонение от протокола на этапе фрагментации и очисток	Приготовить библиотеку заново, внимательно соблюдая протокол. Секвенировать в следующем запуске.
Дисбаланс покрытия по ключевым экзонам при гетерозиготном генотипе	Неравномерная амплификация аллелей. Гомозиготная аллель с контаминацией.	Если количество проблемных локусов более одного, высока вероятность контаминации образца. В случае одного проблемного локуса контаминация маловероятна.
Дисбаланс покрытия по ключевым экзонам при гомозиготном генотипе	Потеря гетерозиготности. Гомозиготная аллель с контаминацией.	Если количество проблемных локусов более одного, высока вероятность контаминации образца. В случае одного проблемного локуса высока вероятность выпадения аллели.
В образце идентифицирована контаминация по всем локусам	Контаминация образца.	По возможности выделить ДНК из биологического образца заново.
Высокая степень неоднозначности генотипа по локусу	Все из вышеперечисленных причин	Проверить все метрики качества. При невозможности самостоятельного устранения проблемы обратиться в службу поддержки.
Генотип не определен при пройденных порогах по качеству	Новая аллель	Обратиться в службу поддержки.

В некоторых случаях генотип по локусу не может быть получен в однозначном виде и в результатах генотипирования представлен в виде неоднозначности. Данный результат признаётся корректным и может быть использован в работе без снижения эффективности и безопасности изделия:

Локус	Генотип	Экзон	Причина
HLA-A	HLA-A*02:05:01/HLA-A*02:14+ любая другая аллель	2-3	Сложность фазирования

HLA-A	HLA-A*02:06 + HLA-A*02:07 HLA-A*02:01 + HLA-A*02:474	3	Сложность фазирования
HLA-A	HLA-A*02:93 + HLA-A*68:01 HLA-A*02:93 + HLA-A*68:164	3	Сложность фазирования
HLA-B	HLA-B*35:01 + HLA-B*58:34 HLA-B*35:03 + HLA-B*58:01	2-3	Сложность фазирования
HLA-DQB1	HLA-DQB1*06:02+HLA-DQB1*06:04 HLA-DQB1*06:39 + HLA-DQB1*06:84	2-3	Сложность фазирования
HLA-DQB1	HLA-DQB1*06:02+HLA-DQB1*06:09 HLA-DQB1*06:84+HLA-DQB1*06:88	2-3	Сложность фазирования
HLA-DQB1	HLA-DQB1*06:03+HLA-DQB1*06:04 HLA-DQB1*06:39+HLA-DQB1*06:41	2-3	Сложность фазирования
HLA-DRB1	HLA-DRB1*09:01:02/HLA-DRB1*09:31+ любая другая аллель	1	Регион не покрыт праймерами
HLA-DRB1	HLA-DRB1*12:01/HLA-DRB1*12:10+ любая другая аллель	1	Регион не покрыт праймерами
HLA-DRB1	HLA-DRB1*15:02/HLA-DRB1*15:140+ любая другая аллель	1	Регион не покрыт праймерами

4. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

- Транспортировку Набора реагентов производить крытыми видами транспорта при двух температурах: от минус 22 до минус 18°C, и от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается транспортировка с использованием термоконтейнера и хладоэлементов не более 3 суток. Транспортирование изделий должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.
- Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
- Изделие транспортируется на двух температурных режимах в температурных пакетах. Общая упаковка изделия транспортируется вместе с температурным пакетом +2...+8°C.
- Компоненты Набора реагентов должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя при обозначенной температуре (от минус 22 до минус 18°C, и от плюс 2 до плюс 8°C) в течение всего срока годности набора. Хранение изделий при температуре от плюс 2°C до плюс 8°C и от минус 22 до минус 18°C должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим.
- Набор реагентов рассчитан на однократное применение после вскрытия без возможности повторных заморозок-разморозок и дробных постановок.
- Краситель (КР) беречь от воздействия света.
- Срок годности Набора реагентов 12 месяцев.

5. УКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- Набор реагентов должен применяться согласно инструкции по применению, утвержденной генеральным директором предприятия-изготовителя. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.
- Не допускается смешивание или одновременное использование компонентов из разных серий Набора реагентов. Реагенты с истекшим сроком годности применению не подлежат.
- Набор реагентов рассчитан на однократное применение. Дробные постановки не применимы.
- Набор реагентов не подлежит ремонту и обслуживанию.
- После подготовки к эксплуатации изделие должно применяться в нормальных климатических условиях:
 - температура окружающего воздуха – от +20°C до +25 °C;

- относительная влажность – от 40% до 60%
- атмосферное давление 740 – 760 мм рт. ст.

6. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

- При утилизации отходов необходимо руководствоваться требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.
- Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.
- После истечения срока годности пробирки с реагентами и картонные пачки утилизируются как отходы класса А (эпидемиологически безопасные).
- Жидкие компоненты (растворы, реактивы) уничтожаются путем слива в канализацию.
- Сбор твердых отходов класса А осуществляется в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного. Одноразовые пакеты располагаются внутри многоразовых контейнеров. Емкости для сбора отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А". Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты доставляются и перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора отходов данного класса, установленные на специальной площадке (помещении). Многоразовая тара после опорожнения подлежит мытью и дезинфекции.

7. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Гарантийный срок годности Набора реагентов 12 месяцев со дня приемки изделия отделом технологического контроля.
- Рекламации могут быть направлены в письменном виде на почтовый адрес производителя, либо по электронной почте.

8. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ» Parseq Lab Co. Ltd. ИНН 7816584473, ОГРН 1147847123797 Почтовый и фактический адрес: 197350, Россия, г. Санкт-Петербург, дорога в Каменку, д. 74, лит. А, помещение 1-Н, комната 347 (K711) 348 (K708) E-mail: info@parseq.pro Телефон: +7 812 243 1190 Web-сайт: www.parseq.ru
--	--

Поддержка клиентов в сети Интернет – support.parseq.pro

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Пример отчета по образцу

Подробнее - смотри **раздел 3.6.1.**

Отчёт по HLA типированию	Тест-система: VariFind™ HLA solution IL-v2	Отчёт создан: 02.03.2019	1 / 4
-----------------------------	---	-----------------------------	-------

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»
197350, Россия, г. Санкт-Петербург,
дорога в Каменку, д. 74, лит. А,
помещение 1-Н, комната 347 (K711) 348 (K708)
телефон: (812) 243 1190
e-mail: info@parseq.pro
web-сайт: <http://parseq.ru>



Отчёт по HLA типированию образца

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ ОБ АНАЛИЗЕ

Тест-система	VariFind HLA solution IL-v2
Лот	0219-1
Метод анализа	Высокопроизводительное секвенирование
Материал	Геномная ДНК
Анализируемые локусы	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1
Разрешение HLA типирования	4-digit

Образец	2530
----------------	-------------

Дата секвенирования	01.03.2019
Номер запуска	BCYP5
Номер образца в постановке	S1
Дата анализа	02.03.2019
Версия IMGT-HLA	3.35.0

Отчёт по HLA типированию	Тест-система: VariFind™ HLA solution IL-v2	Отчёт создан: 02.03.2019	2 / 4
-----------------------------	---	-----------------------------	-------

Образец	2530
----------------	-------------

РЕЗУЛЬТАТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

Формат записи: 'Аллель 1 + Аллель 2', где ND (not determined) - аллель не установлена - обозначает случай определения гомозиготы, когда не исключено выпадение второй аллели

Локус	Генотип	Результат КК
HLA-A	HLA-A*01:01 + HLA-A*31:01	Пройден
HLA-B	HLA-B*40:02 + HLA-B*57:01	Пройден
HLA-C	HLA-C*02:02 + HLA-C*06:02	Пройден
HLA-DQB1	HLA-DQB1*03:01 + HLA-DQB1*03:02	Пройден
HLA-DRB1	HLA-DRB1*04:02 + HLA-DRB1*11:01	Пройден

Отчёт по HLA типированию	Тест-система: VariFind™ HLA solution IL-v2	Отчёт создан: 02.03.2019	3 / 4
-----------------------------	---	-----------------------------	-------

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА (КК)

Информация о метриках качества, заданных критериях, типичных значениях, а также описание возможных проблем представлены в РУКОВОДСТВЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ.

HLA-A

HLA-A*01:01 + HLA-A*31:01			
Показатель	Критерий КК	Результат	Результат КК
Число прочтений (на экзоны)	≥ 500	2018	Пройден
Среднее качество прочтений	≥ 30	35	Пройден
Размер вставки	≥ 250	265	Пройден
Дисбаланс по ключевым экзонам	≤ 80	50	Пройден
Оценка контаминации	Не обнаружено	Не обнаружено	Пройден

HLA-B

HLA-B*40:02 + HLA-B*57:01			
Показатель	Критерий КК	Результат	Результат КК
Число прочтений (на экзоны)	≥ 500	1708	Пройден
Среднее качество прочтений	≥ 30	36	Пройден
Размер вставки	≥ 250	281	Пройден
Дисбаланс по ключевым экзонам	≤ 80	52	Пройден
Оценка контаминации	Не обнаружено	Не обнаружено	Пройден

HLA-C

HLA-C*02:02 + HLA-C*06:02			
Показатель	Критерий КК	Результат	Результат КК
Число прочтений (на экзоны)	≥ 500	2654	Пройден
Среднее качество прочтений	≥ 30	35	Пройден
Размер вставки	≥ 250	269	Пройден
Дисбаланс по ключевым экзонам	≤ 80	51	Пройден

Отчёт по HLA типированию	Тест-система: VariFind™ HLA solution IL-v2	Отчёт создан: 02.03.2019	4 / 4
Оценка контаминации	Не обнаружено	Не обнаружено	Пройден

HLA-DQB1

HLA-DQB1*03:01 + HLA-DQB1*03:02

Показатель	Критерий КК	Результат	Результат КК
Число прочтений (на экзоны)	≥ 500	2332	Пройден
Среднее качество прочтений	≥ 30	36	Пройден
Размер вставки	≥ 250	298	Пройден
Дисбаланс по ключевым экзонам	≤ 80	50	Пройден
Оценка контаминации	Не обнаружено	Не обнаружено	Пройден

HLA-DRB1

HLA-DRB1*04:02 + HLA-DRB1*11:01

Показатель	Критерий КК	Результат	Результат КК
Число прочтений (на экзоны)	≥ 500	3682	Пройден
Среднее качество прочтений	≥ 30	35	Пройден
Размер вставки	≥ 250	299	Пройден
Дисбаланс по ключевым экзонам	≤ 80	68	Пройден
Оценка контаминации	Не обнаружено	Не обнаружено	Пройден

Лабораторное исследование выполнил

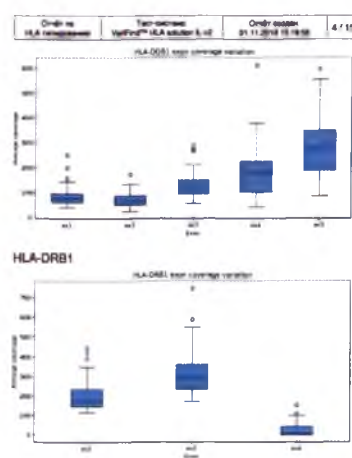
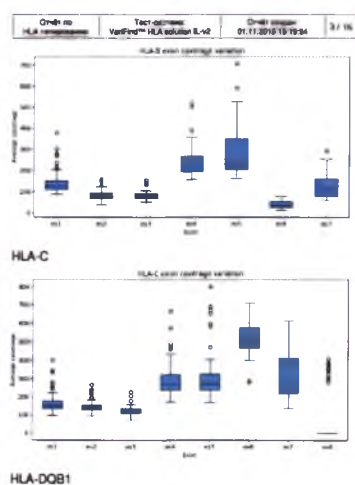
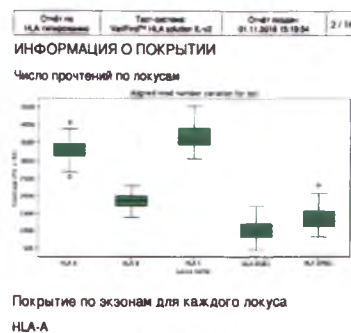
Отчёт проверил

Служебные заметки:

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Пример отчета по запуску

Подробнее - смотри **раздел 3.6.3.**

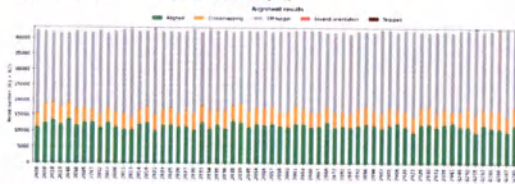
Отчет по: HLA типирование	Тест-система: VariFind™ HLA solution IL-v2	Отчет создан: 01.11.2018 15:19:54	1 / 16
Результат: Секрет-Патент +7 (812) 452-18-28, info@parseq.ru www.parseq.ru			
Отчет по запуску HLA			
ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ ОБ АНАЛИЗЕ			
Тест-система	VariFind HLA solution IL-v2		
Лот	2318-1		
Метод анализа	Секвенирование на платформе Illumina		
Анализируемые локусы	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1		
Разрешение HLA типирования	4-диг		
Номер запуска		G2DLL	
Дата создания отчета		21.06.2018	
Всего образцов		62	
Секвенсирование		Геномная M.A.	
Дата анализа		24.10.2018	
Версия ИМОТ-HLA		1.30.0	



Order no HLA типирование	Test system VariFind™ HLA solution IL-v2	Order number 01.11.2018 15:19:55	5 / 16
-----------------------------	---	-------------------------------------	--------

Покрываемость по экзонам для каждого из образцов

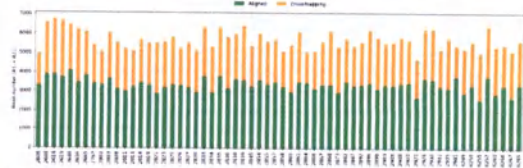
Результаты выравнивания на экзон (все локусы)



HLA-A

Order no HLA типирование	Test system VariFind™ HLA solution IL-v2	Order number 01.11.2018 15:19:56	6 / 16
-----------------------------	---	-------------------------------------	--------

HLA-B alignment results



HLA-B

Order no HLA типирование	Test system VariFind™ HLA solution IL-v2	Order number 01.11.2018 15:19:56	7 / 16
-----------------------------	---	-------------------------------------	--------

HLA-C alignment results



HLA-C

Order no HLA типирование	Test system VariFind™ HLA solution IL-v2	Order number 01.11.2018 15:19:57	8 / 16
-----------------------------	---	-------------------------------------	--------

HLA-D alignment results



HLA-DQB1

Order no HLA типирование	Test system VariFind™ HLA solution IL-v2	Order number 01.11.2018 15:19:57	9 / 16
-----------------------------	---	-------------------------------------	--------

HLA-DQB1 alignment results



HLA-DQB1

Order no HLA типирование	Test system VariFind™ HLA solution IL-v2	Order number 01.11.2018 15:19:57	10 / 16
-----------------------------	---	-------------------------------------	---------

HLA-DQB1 alignment results



Order no HLA transporters	Test selected: Varifind™ HLA solution L v2	Order date: 01.11.2018 15:18:57	11/18
------------------------------	---	------------------------------------	-------

РЕЗУЛЬТАТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

Фигуры на рисунке: 1 – Архив; 2 – не NO (not determined); архивы не упоминаются, описываются только экспериментальные результаты, когда не упомянуто
Analogous group archive

#	Options	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DPB1
1	2008	HLA*01:01 + N2	HLA*02:01	HLA*07:02 + N1A*07:03	HLA*02:01 + N1A*02:02	HLA*01:01 + N1A*01:01
2	2008	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
3	2010	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
4	2008	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
5	2008	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
6	2008	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
7	2008	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
8	2107	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
9	2002	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
10	2008	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01
11	2008	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01	HLA*01:01 + N1A*01:01

Ověřte název HLA translokace	Tech. informace: Variflow™ HLA solution & kit	Ověřte číslo: 01-11-2018-15-19-17	12 / 16
---------------------------------	--	--------------------------------------	---------

[illegible]

Order no 10-6-2019-00000000000000000000	Test options ModEON-H & modEON-H-C	Order date: 01.11.2019 10:18:00	13 / 16
---	--	---	----------------

[illegible]

Objekt na 14. 5. 2014	Tab. 14. 5. 2014	Objekt na 14. 5. 2014	14. 5. 2014
--------------------------	------------------	--------------------------	-------------

		Hypothese 1: $H_1 = H_2 = H_3 = H_4 = H_5 = H_6 = H_7 = H_8 = H_9 = H_{10}$									
38	2002	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
39	2002	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
40	2002	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
41	2002	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
42	2002	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
43	2008	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
44	2008	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
45	2008	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
46	2008	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
47	2008	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
48	2008	HA1070101	HA1070102	HA1070103	HA1070104	HA1070105	HA1070106	HA1070107	HA1070108	HA1070109	HA1070110
49	2002	HA1071101	HA1071102	HA1071103	HA1071104	HA1071105	HA1071106	HA1071107	HA1071108	HA1071109	HA1071110
50	2002	HA1071101	HA1071102	HA1071103	HA1071104	HA1071105	HA1071106	HA1071107	HA1071108	HA1071109	HA1071110
51	2008	HA1071101	HA1071102	HA1071103	HA1071104	HA1071105	HA1071106	HA1071107	HA1071108	HA1071109	HA1071110
52	2008	HA1071101	HA1071102	HA1071103	HA1071104	HA1071105	HA1071106	HA1071107	HA1071108	HA1071109	HA1071110
53	2008	HA1071101	HA1071102	HA1071103	HA1071104	HA1071105	HA1071106	HA1071107	HA1071108	HA1071109	HA1071110
54	2008	HA1071101	HA1071102	HA1071103	HA1071104	HA1071105	HA1071106	HA1071107	HA1071108	HA1071109	HA1071110
55	2008	HA1071101	HA1071102	HA1071103	HA1071104	HA1071105	HA1071106	HA1071107	HA1071108	HA1071109	HA1071110

Всего прошито, пронумеровано
и скреплено печатью

73

листов

Генеральный директор
ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

А.Е. Павлов

