

Организация-производитель

Организация-разработчик

СОГЛАСОВАНО

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

ООО «НПФ ДНК-Технология»

  
С.А. Самарин  
С.П. Левичев

« 05 » сентября 2019 г.

« 05 » сентября 2019 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ****Набор реагентов**

**для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов для  
генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS)  
(HLA-Эксперт)**

2019 г.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| HLA | - Human Leukocyte Antigens          |
| NGS | - Next Generation Sequencing        |
| ПО  | - программное обеспечение           |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция       |
| К-  | - отрицательный контрольный образец |
| ДИ  | - доверительный интервал            |



## ВВЕДЕНИЕ

HLA (от Human Leukocyte Antigens, антигены лейкоцитов человека) - главный комплекс генов гистосовместимости человека (синоним: МНС - major histocompatibility complex), компактно расположен на коротком плече 6-ой хромосомы человека [9].

Каждый человек обладает индивидуальным набором HLA-молекул и, соответственно, индивидуальным набором HLA-генов, кодирующих эти молекулы. Ребенок наследует по одному аллельному варианту каждого HLA-гена от своих биологических родителей.

«Классические» гены HLA I и II классов играют ключевую роль в развитии приобретенного иммунного ответа на антигены чужеродных и измененных собственных белков. Их основная физиологическая функция – эффективный иммунный ответ на вирусные и бактериальные инфекции. Гены HLA участвуют в репродуктивной функции человека. Установлена связь определенных вариантов HLA-генов с развитием инфекционных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний [6-8, 11-13].

«Классические» гены HLA I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и II классов (HLA-DRB1, HLA-DQB1 и HLA-DPB1) и «неклассические» гены HLA II класса DRB3/4/5 являются самыми вариабельными из числа всех известных на сегодняшний день генов человека. В настоящее время общее количество аллелей этих генов составляет около 22 000. Белки, кодируемые вариабельной частью «классических» HLA-генов, образуют антигенсвязывающий домен, в котором происходит удержание собственных и чужеродных пептидов, что является необходимым условием для распознавания их клетками иммунной системы [2,9].

Типирование HLA-генов на уровне высокого разрешения подразумевает определение всех HLA аллелей, кодирующих одинаковую последовательность белка в антигенсвязывающем домене, и исключение нулевых аллелей, имеющих полиморфизмы при отсутствии экспрессии кодируемого белка на клетке [1]. Для решения этой задачи использовано генотипирование 2 и 3 экзона для генов HLA I класса и 2 экзона для генов HLA II класса. Для решения задачи определения истинных гомозигот и других неопределенностей использовано генотипирование дополнительных экзонов и интронов.

Высокопроизводительное секвенирование нового поколения (Next Generation Sequence -NGS), представляет собой одновременное (параллельное) прочтение нуклеотидной последовательности нескольких миллионов «коротких» фрагментов исходного «длинного» фрагмента ДНК с последующей «реконструкцией» исходного «длинного» фрагмента ДНК из «коротких» с помощью биоинформационных методов [4,5,16].

Технологические этапы высокопроизводительного секвенирования:

1. Выделение ДНК из образца биоматериала;
2. Оценка качества выделенной ДНК;



3. Фрагментация выделенной ДНК (физическая, ферментативная или наработка с помощью ПЦР целевого участка гена для «таргетного» секвенирования);
4. Присоединение уникальных синтетических олигонуклеотидных последовательностей (индексов) к фрагментам ДНК для обеспечения возможности их последующей идентификации – маркировка «библиотеки» фрагментов ДНК;
5. Оценка соответствия качественно-количественных характеристик подготовленной «библиотеки» требованиям, необходимым для проведения последующей клональной амплификации;
6. Клональная амплификация (эмульсионная ПЦР или мостиковая ПЦР);
7. Автоматическое секвенирование (определение нуклеотидной последовательности амплифицированной ДНК проводится на приборе для NGS);
8. Обработка результатов секвенирования (проводится программным обеспечением прибора для NGS);
9. Биоинформационный анализ данных.

Список литературы:

1. Standards for histocompatibility immunogenetics testing
2. Marsh S.G.E.; by the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2017 // HLA. 2017 Jul;90(1):70-76. doi: 10.1111/tan.13054.
3. Middleton D., Hahn A.B., Marsh S.G.E. Publication Ethos in the Immunogenetics community. // Int J Immunogenet. 2017 Aug;44(4):151-152. doi: 10.1111/iji.12326.
4. Jankevic T., Korostin D., Kochetkova T., Mukosey I., Shubina E., Altukhova O., Boldyreva M., Trofimov D. Modification of amplicon and libraries preparation for NGS HLA-typing // 30th European Immunogenetics & Histocompatibility Conference, Kos, Greece, 2016, P.112.
5. Jankevic T., Korostin D., Kochetkova T., Mukosey I., Shubina E., Altukhova O., Boldyreva M., Trofimov D. HLA-typing of 3 populations of Russia using a modified procedure NGS typing // 30th European Immunogenetics & Histocompatibility Conference, Kos, Greece, 2016, P.161.
6. Riezzo I., Pascale N., La Russa R., Liso A., Salerno M., Turillazzi E. Donor Selection for Allogenic Hemopoietic Stem Cell Transplantation: Clinical and Ethical Considerations. // Stem Cells Int. 2017; 2017:5250790. doi: 10.1155/2017/5250790. Epub 2017 Jun 7.
7. Eapen M., Wang T., Veys P.A., Boelens J.J., St Martin A. et al. Allele-level HLA matching for umbilical cord blood transplantation for non-malignant diseases in children: a retrospective analysis. // Lancet Haematol. 2017 Jul; 4(7):e325-e333. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30104-7. Epub 2017 Jun 13.
8. Querol S., Mufti G.J., Marsh S.G.E. et al. Cord blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? // Haematologica. 2009 Apr; 94(4): 536-541.



9. Болдырева М.Н. HLA (класс II) и естественный отбор. «Функциональный» генотип, гипотеза преимущества «функциональной» гетерозиготности. // Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, 2007.
10. Куранов А.Б. Аллельный полиморфизм генов HLA класса II в казахской популяции и его прогностическое значение при ревматоидном артрите // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 2016.
11. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Барцева О.Б., Гузов И.И., Барков И.Ю., Померанцева Е.И., Богатова О.В., Гуськова И.А., Янкевич Т.Э., Хромова Н.А., Сергеев И.В., Филиппова Е.В., Алексеев Л.П. Исследование роли HLA-D RB1-генов при невынашивании беременности неясного генеза. // Иммунология. – 2004. – Том 25. - №1. - С. 4-8.
12. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Дедов И.И., Богатова О.В., Гуськова И.А., Янкевич Т.Э., Зилов А.В., Осокина И.В., Евсеева И.В., Ганичева Л.Л., Кашенин М.Н. Алексеев Л.П. Новый взгляд на механизм HLA ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1 типа. Теоретические и прикладные аспекты. // Иммунология. – 2005. – №6. – С. 324-328.
13. Болдырева М.Н., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М., Гуськова И.А., Богатова О.В., Янкевич Т.Э., Хромова Н.А., Балановская Е.В., Балановский О.П., Пшеничных А.С., Целинская И.Н., Кашенин М.Н., Ганичева Л.Л., Поздеева О.С., Евсеева И.В., Сароянц Л.В. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. I. Русские. // Иммунология. – 2005. – Т. 26 (5). – С.260-263.
14. Болдырева М.Н., Гуськова И.А., Богатова О.В., Янкевич Т.Э., Хромова Н.А., Тегако О.В., Атраментова Л.А., Ищук М.В., Дубова Н.А., Ганичева Л.Л., Поздеева О.С., Балановская Е.В., Алексеев Л.П. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. II. Народы европейской части. //Иммунология. - 2006. - Т.27. - №4. - С.198-202.
15. Хорошкеева О.В., Тетруашвили Н.К., Агаджанова А.А., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю. Полная гистосовместимость матери и плода как один из факторов преждевременных родов и плацентарной недостаточности. // Акушерство и гинекология. 2015. №10. С.103-106.
16. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. – М.: «БИНОМ. Лаборатории знаний», 2014.

## 1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1 Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) (HLA-Эксперт), далее по тексту набор реагентов.
- 1.2 Набор реагентов HLA-Эксперт предназначен для типирования генов HLA I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и HLA II (DRB1, DQB1, DPB1, DRB3/4/5) на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе Illumina с помощью программного обеспечения «HLA-Эксперт» в биологическом материале человека (периферическая кровь).
- 1.3 Функциональное назначение: Изделие предназначено для диагностики *in vitro* (подготовка библиотек фрагментов геномной ДНК человека для последующего типирования генов HLA I и II классов на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования).
- 1.4 Показания к проведению исследования: HLA-генотипирование потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток для включения в Регистр и обследование потенциальных доноров и реципиентов с целью подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, супружеских пар с репродуктивными нарушениями и больных с иммуноопосредованными заболеваниями.
- 1.5 В качестве биологического материала для анализа используют цельную периферическую кровь.
- 1.6 Набор реагентов может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.7 Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.8 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.
- 1.9 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.



## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1 Состав набора

Набор реагентов выпускается в фасовке N (для ручного дозирования) и в фасовке А (для автоматизированного дозирования).

#### I. Фасовка N v3-600:

##### 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК

- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
- Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Буфер для разведения ДНК – 6 пробирок (по 4,5 мл);
- Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
- Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
- Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).

##### 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК

- Индексы ts1 – ts96 – 1 микропланшет;
- Индексы ts97 – ts192 – 1 микропланшет;
- Индексы ts193 – ts288 – 1 микропланшет;
- Адгезивная плёнка – 3 шт.

##### 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК

- Раствор МЧ – 1 пробирка (2,4 мл);
- Элюирующий раствор TEL – 1 пробирка (3,0 мл).

##### 4) Комплект реагентов для секвенирования v3-600:

- Картридж с реагентами – 1 шт.;
- HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
- PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
- Проточная ячейка – 1 шт.

##### 5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.

**II. Фасовка N v2-500:****1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
- Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Буфер для разведения ДНК – 6 пробирок (по 4,5 мл);
- Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
- Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
- Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).

**2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Индексы ts1 – ts96 – 1 микропланшет;
- Индексы ts97 – ts192 – 1 микропланшет;
- Индексы ts193 – ts288 – 1 микропланшет;
- Адгезивная плёнка – 3 шт.

**3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК**

- Раствор МЧ – 1 пробирка (2,4 мл);
- Элюирующий раствор TEL – 1 пробирка (3,0 мл).

**4) Комплект реагентов для секвенирования v2-500:**

- Картридж с реагентами – 1 шт.;
- HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
- PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
- Проточная ячейка – 1 шт.

**5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.**



**III. Фасовка N v1:****1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
- Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Буфер для разведения ДНК – 6 пробирок (по 4,5 мл);
- Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
- Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
- Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).

**2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Индексы ts1 – ts96 – 1 микропланшет;
- Индексы ts97 – ts192 – 1 микропланшет;
- Индексы ts193 – ts288 – 1 микропланшет;
- Адгезивная плёнка – 3 шт.

**3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК**

- Раствор МЧ – 1 пробирка (2,4 мл);
- Элюирующий раствор TEL – 1 пробирка (3,0 мл).

**4) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.**

**IV. Фасовка А v3-600:****1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
- Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
- Картридж с реагентами № 1 – 3 шт.;
- Картридж с реагентами № 2 – 3 шт.;
- Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
- Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).

**2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Индексы ts1 – ts96 – 1 микропланшет;
- Индексы ts97 – ts192 – 1 микропланшет;
- Индексы ts193 – ts288 – 1 микропланшет;
- Адгезивная плёнка – 3 шт.

**3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК**

- Картридж с реагентами № 3 – 1 шт.;
- Стрипы по 8 пробирок – 3 шт.;
- Крышки для стрипов – 3 шт.

**4) Комплект реагентов для секвенирования v3-600:**

- Картридж с реагентами – 1 шт.;
- HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
- PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
- Проточная ячейка – 1 шт.

**5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.**



**V. Фасовка А v2-500:****1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
- Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
- Картридж с реагентами № 1 – 3 шт.;
- Картридж с реагентами № 2 – 3 шт.;
- Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
- Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).

**2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Индексы ts1 – ts96 – 1 микропланшет;
- Индексы ts97 – ts192 – 1 микропланшет;
- Индексы ts193 – ts288 – 1 микропланшет;
- Адгезивная плёнка – 3 шт.

**3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК**

- Картридж с реагентами № 3 – 1 шт.;
- Стрипы по 8 пробирок – 3 шт.;
- Крышки для стрипов – 3 шт.

**4) Комплект реагентов для секвенирования v2-500:**

- Картридж с реагентами – 1 шт.;
- HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
- PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
- Проточная ячейка – 1 шт.

**5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.**

**VI. Фасовка A v1:****1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
- Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
- Картридж с реагентами № 1 – 3 шт.;
- Картридж с реагентами № 2 – 3 шт.;
- Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
- Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
- Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
- Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).

**2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК**

- Индексы ts1 – ts96 – 1 микропланшет;
- Индексы ts97 – ts192 – 1 микропланшет;
- Индексы ts193 – ts288 – 1 микропланшет;
- Адгезивная плёнка – 3 шт.

**3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК**

- Картридж с реагентами № 3 – 1 шт.;
- Стрипы по 8 пробирок – 3 шт.;
- Крышки для стрипов – 3 шт.

**4) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.**

**Внимание!** Проведение секвенирования библиотек фрагментов ДНК на приборе MiSeq возможно только с реагентами для секвенирования, поставляемыми в составе набора «HLA-Эксперт».



Комплект поставки включает:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.;
- Инструкция по применению набора реагентов – 1 экз.;
- Паспорт – 1 экз.;
- Программное обеспечение;
- Руководство пользователя.

Дистрибутив с программным обеспечением и Руководство пользователя поставляется на электронном носителе (USB-флеш-накопитель) или по сети Интернет.

Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов HLA-Эксперт.

Инструкция по применению набора реагентов может предоставляться заказчику на бумажном/электронном носителе или на указанном сайте изготовителя.

**Компоненты набора реагентов**

| Фасовка N                                                                 |                                                                                                |                          |                              |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК |                                                                                                |                          |                              |
| Наименование компонентов                                                  | Внешний вид                                                                                    | Количество пробирок, шт. | Номинальный объём компонента |
| Смесь для амплификации KBM                                                | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                        | по 1,2 мл                    |
| Смесь для амплификации HLA I                                              | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                        | по 1,0 мл                    |
| Смесь для амплификации HLA II                                             | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                        | по 1,0 мл                    |
| Буфер для разведения ДНК                                                  | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 6                        | по 4,5 мл                    |
| Смесь для амплификации библиотек ИЛМ                                      | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 1                        | 300 мкл                      |
| Фермент-TAT (30)                                                          | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                        | по 30 мкл                    |
| Фермент-TAT (100)                                                         | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                        | по 100 мкл                   |
| Реагент L1                                                                | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                        | по 340 мкл                   |
| Реагент L2                                                                | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                        | по 340 мкл                   |
| Фермент-LIG                                                               | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                        | по 100 мкл                   |
| Фермент-TAT (15)                                                          | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 1                        | 15 мкл                       |
| Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК                 |                                                                                                |                          |                              |
| Наименование компонентов                                                  | Внешний вид                                                                                    | Количество               |                              |
| Индексы ts1 – ts96                                                        | Высушенные смеси в виде осадка синего цвета                                                    | 1 микропланшет           |                              |
| Индексы ts97 – ts192                                                      | Высушенные смеси в виде осадка синего цвета                                                    | 1 микропланшет           |                              |
| Индексы ts193 – ts288                                                     | Высушенные смеси в виде осадка синего цвета                                                    | 1 микропланшет           |                              |
| Адгезивная плёнка                                                         | Бесцветная прозрачная полиэфирная плёнка с липким адгезивным слоем                             | 3 шт.                    |                              |
| Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК                   |                                                                                                |                          |                              |
| Наименование компонентов                                                  | Внешний вид                                                                                    | Количество пробирок, шт. | Номинальный объём компонента |
| Раствор МЧ                                                                | Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании | 1                        | 2,4 мл                       |
| Элюирующий раствор TEL                                                    | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 1                        | 3,0 мл                       |
| Комплект реагентов для секвенирования                                     |                                                                                                |                          |                              |
| Картридж с реагентами                                                     | Резервуар, заполненный реагентами                                                              | 1                        | -                            |
| HT1 буфер                                                                 | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 1 пробирка               | 4,5 мл                       |
| PR2 буфер                                                                 | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 1 флакон                 | 500 мл                       |
| Проточная ячейка                                                          | Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе                                                | 1                        | -                            |



| Фасовка А                                                                 |                                                                                                |                                     |                              |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК |                                                                                                |                                     |                              |
| Наименование компонентов                                                  | Внешний вид                                                                                    | Количество пробирок/картриджей, шт. | Номинальный объём компонента |
| Смесь для амплификации KBM                                                | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                                   | по 1,2 мл                    |
| Смесь для амплификации HLA I                                              | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                                   | по 1,0 мл                    |
| Смесь для амплификации HLA II                                             | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                                   | по 1,0 мл                    |
| Смесь для амплификации библиотек ИЛМ                                      | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 1                                   | 300 мкл                      |
| Картридж № 1, ряд 1 и 2, ячейки 1 и 2 - Буфер для разведения ДНК          | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                                   | по 7,5 мл                    |
| Фермент-TAT (30)                                                          | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                                   | по 30 мкл                    |
| Фермент-TAT (100)                                                         | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                                   | по 100 мкл                   |
| Реагент L1                                                                | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3                                   | по 340 мкл                   |
| Реагент L2                                                                | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                                   | по 340 мкл                   |
| Фермент-LIG                                                               | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 3                                   | по 100 мкл                   |
| Фермент-TAT (15)                                                          | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость                                              | 1                                   | 15 мкл                       |
| Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК                 |                                                                                                |                                     |                              |
| Наименование компонентов                                                  | Внешний вид                                                                                    | Количество                          | Номинальный объём компонента |
| Индексы ts1 – ts96                                                        | Высушенные смеси в виде осадка синего цвета                                                    | 1 микропланшет                      | -                            |
| Индексы ts97 – ts192                                                      | Высушенные смеси в виде осадка синего цвета                                                    | 1 микропланшет                      | -                            |
| Индексы ts193 – ts288                                                     | Высушенные смеси в виде осадка синего цвета                                                    | 1 микропланшет                      | -                            |
| Адгезивная плёнка                                                         | Бесцветная прозрачная полиэфирная плёнка с липким адгезивным слоем                             | 3 шт.                               | -                            |
| Картридж № 2, ряд 1, ячейки 1 и 2 - Буфер для разведения ДНК              | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 3 шт.                               | по 7,5 мл                    |
| Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК                   |                                                                                                |                                     |                              |
| Наименование компонентов                                                  | Внешний вид                                                                                    | Количество картриджей, шт.          | Номинальный объём компонента |
| Картридж № 3, ряд 1, ячейка 1 - Раствор МЧ                                | Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании | 1                                   | 2,4 мл                       |
| Картридж № 3, ряд 1, ячейка 2 - Элюирующий раствор TEL                    | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 |                                     | 3,0 мл                       |
| Комплект реагентов для секвенирования                                     |                                                                                                |                                     |                              |
| Картридж с реагентами                                                     | Резервуар, заполненный реагентами                                                              | 1                                   | -                            |
| HT1 буфер                                                                 | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 1 пробирка                          | 4,5 мл                       |
| PR2 буфер                                                                 | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                 | 1 флакон                            | 500 мл                       |
| Проточная ячейка                                                          | Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе                                                | 1                                   | -                            |

Примечание – Расположение индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК в пробирках микропланшета приведено в Приложении 1.



## 2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для одноразового применения. Набор реагентов рассчитан на 288 исследований.

## 2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и реакция лигирования; качественный анализ.

В основе работы набора реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР и лигирования дуплексов комплементарных олигонуклеотидов, несущих биоинформатическую метку, с полученными ампликонами.

Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой. На данном этапе происходит наработка целевых продуктов необходимой длины, что позволяет исключить в дальнейшем этап фрагментации.

Использование мультиплексирования праймеров позволяет сократить количество пробирок до 2-х, поскольку появляется возможность амплификации до 27 участков ДНК в одной пробирке.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего старта», который обеспечивается модификацией полимеразы. Используемый подход исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

Исследование с применением набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) состоит из следующих этапов:

- 1. Выделение ДНК.**
- 2. Подготовка библиотек фрагментов ДНК.**

### *2.1. Оценка качества и количества исходной ДНК методом количественной ПЦР.*

Предварительная оценка количества и качества исходной ДНК методом количественной ПЦР позволяет оценить количество ДНК без учета разрушенной, а также определить в растворе ДНК наличие веществ, влияющих на проведение ПЦР. Такой подход позволяет проводить нормализацию (выравнивание) концентрации ДНК перед ПЦР-амплификацией.



## 2.2. Нормализация концентрации ДНК.

Нормализация (выравнивание) концентрации ДНК проводится путем разведения исходной ДНК буфером для разведения ДНК. Кратность разведения каждого образца рассчитывается по формуле:

$$a=2^{(Cp \text{ max}-b)}, \text{ где:}$$

$a$  – кратность разведения;

$Cp \text{ max}$  – значение  $Cp$ , по которому проводится нормализация;

$b$  –  $Cp$  КВМ для данного образца.

## 2.3. ПЦР-амплификация ДНК для наработки ампликонов необходимой длины.

## 2.4. Присоединение индексов к полученным ампликонам с помощью реакции лигирования.

Для маркировки фрагментов ДНК используются индексы (дуплексы комплементарных олигонуклеотидов), которые имеют уникальную последовательность, позволяющую в дальнейшем программному обеспечению идентифицировать образцы. Маркировка библиотек фрагментов ДНК индексами, происходит с помощью реакции лигирования. Фермент ДНК-лигаза катализирует образование фосфодиэфирных связей между 3'-гидроксилем и 5'-фосфатом расположенных рядом оснований в ДНК, за счет чего способна «сшивать» двухцепочечные фрагменты ДНК.

В результате лигирования формируются **библиотеки фрагментов ДНК**, соответствующие исследуемым образцам.

## 2.5. Дополнительная ПЦР-амплификация для наработки библиотек с двумя индексами.

## 2.6. Пулирование (объединение) библиотек.

## 2.7. Подготовка библиотек к проведению секвенирования (разведение и денатурация библиотек).

# 3. Проведение высокопроизводительного секвенирования.

# 4. Анализ данных с помощью программного обеспечения HLA-Эксперт.

4.1 Начальные этапы обработки данных – процедуры *демультиплексирования* и *генерации FASTQ файлов данных* – выполняются на оборудовании производителя (секвенаторе). В результате получаются FASTQ файлы с данными, соответствующими анализируемым образцам.

4.2 Программное обеспечение HLA-Эксперт проводит анализ FASTQ файлов, полученных с секвенатора, процедура анализа включает:



- *Выравнивание последовательностей.* Полученные последовательности сравниваются с референтной последовательностью. Данные последовательностей экзонов аллелей берут из базы данных IPD-IMGT/HLA. Для выравнивания используется метод глобального выравнивания последовательностей, применяется алгоритм Нидлмана-Вунша с использованием одинакового веса замен и аффинной функции для вставок/удалений. На основании статистического анализа для каждого аллельного варианта в образце формируются средние (консенсусные) последовательности.
- *Определение HLA-генотипа.* Проводится поиск полученных консенсусных последовательностей групп в базе последовательностей экзонов IPD-IMGT/HLA по каждому исследуемому гену. Для каждого аллельного варианта определяется его значимость (ранг) в соответствии с количественной представленностью (весом) экзонов. Аллели с лучшим рангом определяют результаты типирования. Определение более двух аллелей свидетельствует о возможной контаминации. В этом случае результат считается недостоверным. Если в процессе анализа обнаружены варианты, не имеющие соответствия базе данных IPD-IMGT/HLA, делается вывод о возможном присутствии нового аллеля.
- *Вывод результатов.* Найденные аллельные варианты выводятся для просмотра в интерфейсе программы. В программе также предусмотрена возможность генерации отчетов с результатами для вывода на печать, сохранения в формате pdf, а также экспорт в файлы формата csv, xlsx.

Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов HLA-Эксперт.

**ВНИМАНИЕ!** Клинико-диагностическая лаборатория должна провести валидацию медицинского изделия HLA-Эксперт перед началом процесса (при первичной подготовке библиотек) с использованием референтных образцов. Для валидации медицинского изделия в качестве контроля используются образцы с известными нуклеотидными последовательностями HLA, например, образцы из референтных панелей SET EPT, INWG, UCLA.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки и проведения секвенирования) – от 8 часов.



### 3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

#### 3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения – 5,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку, что соответствует концентрации ДНК 1,0 нг/мкл. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу набора.

#### 3.2 Аналитическая специфичность

В отрицательном контрольном образце на этапе проведения гель-электрофореза должны отсутствовать продукты амплификации длиной 329-377 п.н. для HLA I и 318-375 п.н. для HLA II.

На этапе оценки библиотеки на электрофореграмме должны определяться пики длиной от 440 до 520 п.н. После проведения секвенирования программное обеспечение «HLA-Эксперт» должно определить генотипы по HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DPB1, DQB1, DRB3/4/5.

Реактивность (инклюзивность) проверена на коллекции из 70 образцов ДНК с известным генотипом, предоставленной Европейским обществом иммуногенетиков EFI в ходе проведения внешнего контроля качества HLA-типирования (CET2011-2017). В коллекции представлены как образцы с самыми частыми, характерными для жителей Европы, HLA-генотипами, так и образцы с редкими HLA-генотипами. В коллекциях представлены как гетерозиготные, так и гомозиготные образцы. Генотипы всех испытанных образцов были установлены в 100% случаев.

Интерферирующие вещества в концентрациях: билирубин – 684 мкмоль/л, гемоглобин 2 г/л, холестерин 13 ммоль/л, триглицериды – 37 ммоль/л не влияют на специфичность набора реагентов.

**ВНИМАНИЕ!** Набор не позволяет определять следующие нулевые аллели, необходимые для типирования на уровне высокого разрешения в соответствии с международными требованиями (NMDP Policy for Adult Donor and Patient HLA Confirmatory Typing Policy с января 2015, версия базы IPD-IMGT/HLA 3.36.0): A\*68:11N и C\*04:09N.

### 3.3 Диагностические характеристики, точность, воспроизводимость

|                                                                                                                                                                                                                        | Диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС),<br>правильность/точность |     |    |    |    |        |        |                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|----|----|--------|--------|------------------|------------|
| Показатель                                                                                                                                                                                                             | Кол-во                                                                                              | ИП  | ИО | ЛП | ЛО | ДЧ (%) | ДС (%) | Точность,<br>(%) | 95% ДИ     |
| HLA-A                                                                                                                                                                                                                  | 96                                                                                                  | 96  | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 96,2-100,0 |
| HLA-B                                                                                                                                                                                                                  | 96                                                                                                  | 96  | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 96,2-100,0 |
| HLA-C                                                                                                                                                                                                                  | 96                                                                                                  | 96  | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 96,2-100,0 |
| HLA-DRB1                                                                                                                                                                                                               | 96                                                                                                  | 96  | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 96,2-100,0 |
| HLA-DQB1                                                                                                                                                                                                               | 96                                                                                                  | 96  | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 96,2-100,0 |
| HLA-DPB1                                                                                                                                                                                                               | 30                                                                                                  | 30  | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 88,4-100,0 |
| HLA-DRB3/4/5                                                                                                                                                                                                           | 30                                                                                                  | 30  | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 88,4-100,0 |
| Всего                                                                                                                                                                                                                  | 540                                                                                                 | 540 | 0  | 0  | 0  | 100    | НО     | 100              | 99,3-100,0 |
| P <sub>ист</sub>                                                                                                                                                                                                       | 99,6                                                                                                |     |    |    |    |        |        |                  |            |
| ИП – Истинно положительный результат<br>ИО – Истинно отрицательный результат<br>ЛП – Ложноположительный результат<br>ЛО – Ложноотрицательный результат<br>ДИ – Доверительный интервал<br>НО – Не может быть определена |                                                                                                     |     |    |    |    |        |        |                  |            |

| Показатели<br>сравнения                                        | Воспроизводимость                  |                                   |                                                  |              |                                    |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|------------------------------------|
|                                                                | Между<br>сериями                   | Между<br>вариантами<br>исполнения | Между вариантами исполнения +<br>между запусками |              | Между<br>приборами+<br>операторами |
| HLA-A                                                          | 100% (48/48)                       | 100% (48/48)                      | 100% (48/48)                                     | 100% (96/96) | 100% (30/30)                       |
| HLA-B                                                          | 100% (48/48)                       | 100% (48/48)                      | 100% (48/48)                                     | 100% (96/96) | 100% (30/30)                       |
| HLA-C                                                          | 100% (48/48)                       | 100% (48/48)                      | 100% (48/48)                                     | 100% (96/96) | 100% (30/30)                       |
| HLA-DRB1                                                       | 100% (48/48)                       | 100% (48/48)                      | 100% (48/48)                                     | 100% (96/96) | 100% (30/30)                       |
| HLA-DQB1                                                       | 100% (48/48)                       | 100% (48/48)                      | 100% (48/48)                                     | 100% (96/96) | 100% (30/30)                       |
| HLA-DPB1                                                       | -                                  | 100% (30/30)                      | 100% (30/30)                                     | 100% (30/30) | 100% (30/30)                       |
| HLA-<br>DRB3/4/5                                               | -                                  | 100% (30/30)                      | 100% (30/30)                                     | 100% (30/30) | 100% (30/30)                       |
| Совпадение<br>результатам<br>по всем<br>вариантам<br>сравнения | 100% (1590/1590), $P_{ист} = 99,9$ |                                   |                                                  |              |                                    |



#### 4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации за исключением этапов проведения детекции методом гель-электрофореза и подготовки библиотек, которые проводят в зоне 4 (МУ 1.3.2569-09).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

Использованные одноразовые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора реагентов для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК, ПЦР, детекции результатов амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.



При проведении электрофореза запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

**ВНИМАНИЕ!** Картридж с реагентами из Комплекта реагентов для секвенирования (ячейка 8) содержит формамид, который является репродуктивным токсином (НЗ60<sup>1</sup>). Может наносить вред при вдыхании, заглатывании, попадании на кожу или в глаза. Меры предосторожности: P201, P202, P260, P270, P280, P264, P272, P308+P313, P362, P405, P501<sup>2</sup>. PR2 буфер содержит раздражающие компоненты.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Набор реагентов не содержит материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности.

<sup>1</sup> НЗ60 – Может нарушать способность к размножению или причинять вред нерождённому ребёнку. Может наносить вред при вдыхании.

<sup>2</sup> P201 - Перед использованием получить специальные инструкции. P202 - Не приступать к обработке до тех пор, пока не прочитана и не понята информация о мерах предосторожности. P260 - Не вдыхать пыль/дымовые газы/газ/туман/пары/аэрозоль. P270 - Не принимать пищу, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P280 - Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица. P264 - После работы тщательно вымыть лицо, руки и все открытые участки кожи. P272 - Не выносить загрязненную одежду с рабочего места. P308 + P313 - ПРИ воздействии или беспокойности: Обратиться к врачу. P362 - Утилизировать содержимое/контейнер на предназначенном для этого предприятии по переработке отходов.



## 5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий с подогреваемой крышкой  
(например, ДТлайт, РУ № ФСР 2011/10228; ДТпрайм, РУ № ФСР 2011/10229 или ДТ-96, РУ № ФСР 2007/01250, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- дозирующее устройство ДТстрим (для фасовки А, РУ № РЗН 2015/2982, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- геномный секвенатор MiSeq (Illumina, США, РУ № РЗН 2014/1568);
- дозаторы электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объема одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл (например, ВЮНИТ, «Биохит Биотех (Сучжоу) Ко., Лтд.», Китай, РУ № ФСЗ 2012/11562; Eppendorf Research® Plus, Эппендорф АГ, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028);
- набор/комплект реагентов для выделения ДНК (например, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696; MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche Diagnostics GmbH, Германия, РУ ФСЗ 2009/04405).

Дополнительное общелабораторное оборудование:

- ПЦР-бокс;
- устройство для запечатывания планшет ДТпак (для фасовки А, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник с морозильной камерой;
- магнитный штатив;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 и 1,5 мл;
- источник питания (например, Эльф-4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- трансиллюминатор ультрафиолетовый (флуоскоп);
- флуориметр или флуоресцентный анализатор.

Дополнительные расходные материалы:

- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, вместимостью

- одноразовые пробирки вместимостью 0,2 мл, 0,5 мл, 1,5 мл;
- одноразовые пробирки вместимостью 0,2 мл в стрипах по 8 шт.;
- полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшет ПЦР;
- микропланшет ПЦР, 96 лунок;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для детекции ДНК методом гель-электрофореза (например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- маркер длин амплифицированных фрагментов (pUC19 ДНК/MspI) (например, ООО «Силекс», Россия).



## 6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

### 6.1 Материалы для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту (набору) для выделения ДНК из биологического материала.

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2 – 3 раза.

**ВНИМАНИЕ!** Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

### 6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре минус 20 °С в течение одного месяца.

**7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**ВНИМАНИЕ!** Клинико-диагностическая лаборатория должна перед началом процесса (при первичной подготовке библиотек) провести валидацию медицинского изделия HLA-Эксперт с использованием референтных образцов. Для этого вместе с исследуемыми образцами, начиная от этапа оценки пригодности ДНК (п.7.1.2), необходимо провести исследование не менее пяти контрольных образцов с известными нуклеотидными последовательностями HLA, например, образцы из референтных панелей SET EPT, INWG, UCLA.

Валидация медицинского изделия HLA-Эксперт считается успешной при корректном определении последовательностей контрольных образцов.

Рекомендуется пройти обучение по использованию набора реагентов HLA-Эксперт на всех этапах проведения анализа. Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 17 Инструкции по применению.

**7.1 Выделение ДНК из биологического материала**

**7.1.1** Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту (набору) реагентов. Для проведения выделения ДНК рекомендуются комплекты/наборы реагентов, предназначенные для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

Пригодность полученной ДНК для исследования необходимо определить с использованием «смеси для амплификации KBM», входящей в состав набора реагентов HLA-Эксперт. Для корректной работы набора реагентов количество анализируемой ДНК должно быть не менее 5,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует  $C_p (FAM) = 29,7 \pm 0,5$ .

**Примечание** – Допускается хранение ДНК при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 месяца или от минус 18 °С до минус 22 °С не более 6 месяцев.

**ВНИМАНИЕ!** Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

**ВНИМАНИЕ!** При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия



## **7.2 Оценка пригодности выделенной ДНК (Фасовка N)**

### **7.2.1 Проведение ПЦР (Фасовка N)**

- 7.2.1.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации KBM» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.1.2 Промаркируйте необходимое количество пустых пробирок объёмом 0,2 мл для каждого исследуемого образца и одну для отрицательного контрольного образца. Например: Необходимо проанализировать три образца. Нужно промаркировать три пробирки для исследуемых образцов и одну пробирку для «К-».
- 7.2.1.3 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (30)» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (30) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.1.4 Приготовьте смесь фермента-ТАТ (30) со смесью для амплификации KBM. Для этого смешайте в отдельной пробирке объёмом 0,5 мл:
- 12 x (N+1) мкл Смеси для амплификации KBM,
  - 0,3 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (30),
- где N – количество анализируемых образцов.
- 7.2.1.5 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.1.6 Внесите в каждую промаркированную пробирку по 12 мкл смеси для амплификации KBM с ферментом-ТАТ (30).
- 7.2.1.7 Внесите по 6,0 мкл выделенного препарата ДНК в соответствующую пробирку для исследуемых образцов. В пробирку «К-» ДНК не вносится. Закройте крышки пробирок.
- 7.2.1.8 Внесите по 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирку, маркированную «К-». Закройте крышку пробирки.
- 7.2.1.9 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
- 7.2.1.10 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 1.

### 7.2.2 Проведение ПЦР (Фасовка А)

7.2.2.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации KBM» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.2.2 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (30)» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

**Примечание** – Фермент-ТАТ (30) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.2.3 Установите пробирки со смесью для амплификации KBM, с ферментом-ТАТ (30), с препаратами ДНК и отрицательным контрольным образцом, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в приложении 3, рис.1.

7.2.2.4 После завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшет ДТпак.

7.2.2.5 Запечатайте микропланшет адгезивной плёнкой.

7.2.2.6 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.2.2.7 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 1.

**Таблица 1 – Программа амплификации**

| № блока | Температура, °С | Время |     | Число циклов | Режим оптических измерений | Тип блока |
|---------|-----------------|-------|-----|--------------|----------------------------|-----------|
|         |                 | мин   | с   |              |                            |           |
| 1       | 80,0            | 2     | 30  | 1            | -                          | Цикл      |
|         | 94,0            | 3     | 30  |              | -                          |           |
| 2       | 94,0            | 0     | 30  | 5            | -                          | Цикл      |
|         | 64,0            | 0     | 15  |              | √                          |           |
| 3       | 94,0            | 0     | 10  | 45           | -                          | Цикл      |
|         | 64,0            | 0     | 15  |              | √                          |           |
| 4       | 94,0            | 00    | 05  | 1            | -                          | Цикл      |
| 5       | 10,0            | ...   | ... | Хранение     | -                          | Хранение  |



## 7.2.3 Интерпретация результатов ПЦР (оценка пригодности ДНК).

- Допустимые значения  $C_p$  по каналу Fam не должны превышать 29,7, что соответствует пределу обнаружения (5,0 нг на амплификационную пробирку или 1,0 нг/мкл).
- В случае получения результата  $C_p$  больше 29,7 необходимо повторить процедуру выделения данного образца.

Для образцов с концентрацией ДНК, близкой к пределу обнаружения, возможно нарушение корреляции полученного значения  $C_p$  со значением концентрации ДНК, определённым спектрофотометрическим методом (т.е. для образцов с концентрацией ДНК 1,0 нг/мкл, определённой спектрофотометрическим методом, значение  $C_p$  может превышать 29,7). Это связано с тем, что при измерении концентрации ДНК спектрофотометрическим методом определяется концентрация тотальной ДНК (в т.ч. разрушенной) и не учитывается наличие в растворе ДНК веществ, влияющих на проведение ПЦР. В связи с этим последующая нормализация концентрации ДНК в образцах **проводится только по значению  $C_p$  КВМ для этих образцов**, результаты спектрофотометрии не учитываются.

## 7.2.4 Нормализуйте концентрацию ДНК образцов:

7.2.4.1 Нормализация проводится **по образцу с наибольшим значением  $C_p$  КВМ** в данной постановке (обозначается  **$C_p \max$** ) при условии, что это значение не превышает предел обнаружения ( $C_p \text{ КВМ} \leq 29,7$ ). См.п.7.2.3

В случае, если полученный  $C_p \max < 26,0$ , рекомендуется принять значение  $C_p \max = 27$ .

## 7.2.4.2 Кратность разведения полученной ДНК для каждого образца (а) рассчитывается по формуле:

$$a = 2^{(C_p \max - b)}, \text{ где:}$$

$a$  – кратность разведения данного образца;

$C_p \max$  – значение  $C_p$  КВМ, по которому проводится нормализация;

$b$  –  $C_p$  КВМ для данного образца.

## 7.2.4.3 Нормализация концентрации ДНК:

- Промаркируйте необходимое количество пробирок (для каждого исследуемого образца).
- Разведите каждый образец в необходимое количество раз ( $a$  – кратность разведение данного образца), используя буфер для разведения ДНК.

Например:  $C_p \text{ КВМ образца} = 27,0$ ,  $C_p \max = 29,0$  Разведение:  $2^{(29-27)} = 2^2 = 4$

Исходную ДНК необходимо развести в 4 раза:

Для этого, в отдельную пробирку объемом 0,5 мл нужно добавить 10 мкл исходной ДНК и 30 мкл буфера для разведения ДНК. Полученную разведенную ДНК использовать для проведения амплификации.



### 7.3 Амплификация фрагментов ДНК

#### 7.3.1 Проведение ПЦР (Фасовка N)

7.3.1.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации HLA I», «Смесь для амплификации HLA II» и «Буфер для разведения ДНК» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.1.2 Промаркируйте необходимое количество пустых пробирок объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца (включая образцы для валидации при первичной подготовке) и две для отрицательного контрольного образца.

Например: необходимо проанализировать три образца. Нужно промаркировать шесть пробирок для исследуемых образцов и две пробирки для «К-». Общее количество пробирок – восемь (таблица 2).

В случае если необходимо провести валидацию методики, для анализа трёх исследуемых образцов и пяти контрольных образцов нужно промаркировать шесть пробирок для исследуемых образцов, 10 пробирок для контрольных образцов и две пробирки для «К-». Общее количество пробирок – 18.

Таблица 2 – Пример маркировки пробирок для проведения ПЦР

| № образца | № амплификационной пробирки | Наименование вносимой смеси для амплификации |
|-----------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| Образец 1 | 1-1                         | HLA I                                        |
|           | 1-2                         | HLA II                                       |
| Образец 2 | 2-1                         | HLA I                                        |
|           | 2-2                         | HLA II                                       |
| Образец 3 | 3-1                         | HLA I                                        |
|           | 3-2                         | HLA II                                       |
| К-        | «К- 1»                      | HLA I                                        |
|           | «К- 2»                      | HLA II                                       |

Примечание - Далее в тексте инструкции используется следующее обозначение для промаркированных пробирок:

| № образца | № амплификационной пробирки для образца X | Наименование вносимой смеси для амплификации |
|-----------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Образец X | X-1                                       | HLA I                                        |
|           | X-2                                       | HLA II                                       |

где X – номер исследуемого образца



7.3.1.3 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (100)» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (100) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.1.4 Приготовьте смеси фермента-ТАТ (100) со смесями для амплификации HLA. Для этого промаркируйте две пробирки объёмом 0,5 мл «HLA I» и «HLA II».

7.3.1.5 Смешайте в пробирке «HLA I»:

- 10 x (N+1) мкл Смеси для амплификации HLA I,
- 20 x (N+1) мкл Буфера для разведения ДНК,
- 0,5 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (100),

где N – количество тестируемых образцов с учётом «К-».

7.3.1.6 Смешайте в пробирке «HLA II»:

- 10 x (N+1) мкл Смеси для амплификации HLA II,
- 20 x (N+1) мкл Буфера для разведения ДНК,
- 0,5 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (100),

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-».

7.3.1.7 Закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.1.8 Внесите в каждую пробирку «Х-1», промаркированную для внесения смеси HLA I, по 30 мкл смеси для амплификации HLA I с ферментом-ТАТ (100).

7.3.1.9 Внесите в каждую пробирку «Х-2», промаркированную для внесения смеси HLA II, по 30 мкл смеси для амплификации HLA II с ферментом-ТАТ (100).

Примечание – Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.3.1.10 Внесите по 5,0 мкл выделенного и разведенного до нужной концентрации препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов. При проведении валидации внесите ДНК контрольных образцов в соответствующие пробирки. В пробирки «К-» ДНК не вносится. Закройте крышки пробирок.

7.3.1.11 Внесите по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирки, маркированные «К-». Закройте крышку пробирки.

7.3.1.12 Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.



- 7.3.1.13 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 3.
- 7.3.1.14 После окончания амплификации извлеките пробирки из амплификатора и поместите на рабочий стол.

### 7.3.2 Проведение ПЦР (Фасовка А)

- 7.3.2.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации HLA I», «Смесь для амплификации HLA II» и «Буфер для разведения ДНК» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.3.2.2 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (100)» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

**Примечание** – Фермент-ТАТ (100) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.3.2.3 Установите картридж №1, пробирки со смесью для амплификации HLA I, смесью для амплификации HLA II, с ферментом-ТАТ (100), с препаратами ДНК, контрольными образцами ДНК (в случае проведения валидации) и отрицательным контрольным образцом, прошедшим этап выделения ДНК, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в приложении 3, рис.1.
- 7.3.2.4 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.3.2.5 Запечатайте микропланшет адгезивной пленкой.
- 7.3.2.6 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.
- 7.3.2.7 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 3.
- 7.3.2.8 После окончания амплификации извлеките микропланшет из амплификатора и поместите на рабочий стол.



**Таблица 3 – Программа амплификации**

| № блока | Температура, °C | Время |     | Число циклов | Режим оптических измерений* | Тип блока |
|---------|-----------------|-------|-----|--------------|-----------------------------|-----------|
|         |                 | мин   | с   |              |                             |           |
| 1       | 80,0            | 2     | 30  | 1            | -                           | Цикл      |
|         | 94,0            | 3     | 30  |              | -                           |           |
| 2       | 94,0            | 0     | 30  | 5            | -                           | Цикл      |
|         | 64,0            | 0     | 15  |              | _*                          |           |
| 3       | 94,0            | 0     | 10  | 25           | -                           | Цикл      |
|         | 64,0            | 0     | 15  |              | _*                          |           |
| 4       | 60,0            | 20    | 00  | 1            | -                           | Цикл      |
| 5       | 10,0            | ...   | ... | Хранение     | -                           | Хранение  |

\*Режим оптических измерений устанавливается при использовании детектирующего амплификатора.

**Примечание** - Допускается хранение продукта амплификации при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C не более 1 месяца.

### 7.3.3 Регистрация результатов ПЦР

После окончания реакции амплификации проанализируйте результаты.

7.3.3.1 Регистрация результата производится методом горизонтального гель-электрофореза в 2,5% агарозном геле.

**Примечание** – При использовании детектирующего амплификатора регистрация результата возможна путём оценки экспоненциального роста кривой по каналу Fam.

7.3.3.2 Осторожно внесите отдельным наконечником по 5,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буфер. В соседние с первой и последней лунками агарозного геля, в которые внесены продукты амплификации, внести по 5,0 мкл маркера длин амплифицированных фрагментов (pUC19 ДНК/MspI).

7.3.3.3 Наденьте защитную маску или установите защитный экран, включите трансиллюминатор и проанализируйте полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

7.3.3.4 В каждой дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирок, промаркированных как «X-1», где X – номер

*исследуемого образца*, должна быть видна светящаяся полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагментам амплифицированных продуктов размером 329-377 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

7.3.3.5 В каждой дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирок, промаркированных как «X-2», где X – номер *исследуемого образца*, должна быть видна светящаяся полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагментам амплифицированных продуктов размером 318-375 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

7.3.3.6 В дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирки, промаркированной «К-1», не должно быть видно светящихся полос оранжево-красного цвета, соответствующих фрагментам специфических амплифицированных продуктов размером 329-377 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

В случае наличия продукта размером 329-377 п.н. результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

7.3.3.7 В дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирки, промаркированной «К-2», не должно быть видно светящихся полос оранжево-красного цвета, соответствующих фрагментам специфических амплифицированных продуктов размером 318-375 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

В случае наличия продукта размером 318-375 п.н. результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.



#### 7.4 Подготовка библиотек фрагментов ДНК

##### 7.4.1 Подготовка фрагментов ДНК к лигированию (Фасовка N)

Смешивание продуктов амплификации одного образца HLA I : HLA II в соотношении 7:1.

- 7.4.1.1 Промаркируйте необходимое количество пустых пробирок объемом 0,5 мл для каждого исследуемого образца (таблица 4).
- 7.4.1.2 Внесите в соответствующие пробирки, в каждую, отдельным наконечником по 20 мкл продукта амплификации из пробирок, промаркированных как «X-1», где X – номер исследуемого образца.
- 7.4.1.3 Внесите в соответствующие пробирки, в каждую, отдельным наконечником по 3,0 мкл продукта амплификации из пробирок, промаркированных как «X-2», где X – номер исследуемого образца.
- 7.4.1.4 Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Таблица 4 – Пример маркировки пробирок для смешивания ампликонов

| № образца | № пробирки для смешивания ампликонов | Название вносимого компонента        | Количество вносимого компонента, мкл |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Образец 1 | «Amp-1»                              | Продукт амплификации из пробирки 1-1 | 20                                   |
|           |                                      | Продукт амплификации из пробирки 1-2 | 3                                    |
| Образец 2 | «Amp-2»                              | Продукт амплификации из пробирки 2-1 | 20                                   |
|           |                                      | Продукт амплификации из пробирки 2-2 | 3                                    |
| Образец 3 | «Amp-3»                              | Продукт амплификации из пробирки 3-1 | 20                                   |
|           |                                      | Продукт амплификации из пробирки 3-2 | 3                                    |
| Образец X | «Amp-X»                              | Продукт амплификации из пробирки X-1 | 20                                   |
|           |                                      | Продукт амплификации из пробирки X-2 | 3                                    |

##### 7.4.2 Подготовка фрагментов ДНК к лигированию (Фасовка A)

Смешивание продуктов амплификации одного образца HLA I : HLA II в соотношении 7:1.

- 7.4.2.1 Установите микропланшет с полученными ампликонами HLA I и HLA II, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации дозирующего устройства. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в приложении 3, рис.2.

**Примечание** - Допускается хранение смешанных продуктов амплификации при температуре от минус 10 °C до минус 22 °C не более 1 месяца.



### 7.4.3 Лигирование библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)

- 7.4.3.1 Возьмите необходимое количество микропланшетов с индексами.
- 7.4.3.2 Внесите в соответствующие пробирки микропланшета с индексами, в каждую, отдельным наконечником, по 2,0 мкл содержимого из пробирки (ампликоны), промаркированной «Аmp-X», где X – номер исследуемого образца (таблица 4).
- 7.4.3.3 Зафиксируйте в протоколе постановки соответствие индексов и образца (таблица 5).
- 7.4.3.4 Инкубируйте при комнатной температуре пробирки «Реагент L1» и «Реагент L2» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** В пробирке с реагентом L1 возможно выпадение осадка. Встряхивайте пробирку до полного растворения осадка. Не допускается нагревания пробирки с реагентом L1. Не допускается использование реагента L1 с нерастворенным осадком.

Таблица 5 – Пример заполнения протокола постановки

|               |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Обр.1<br>/ts1 | Обр.9<br>/ts9   | Обр.17<br>/ts17 | Обр.25/<br>ts25 | Обр.33/<br>ts33 | Обр.41/<br>ts41 | Обр.49/<br>ts49 | Обр.57/<br>ts57 | Обр.65/<br>ts65 | Обр.73<br>/ts73 | Обр.81/<br>ts81 | Обр.89/<br>ts89 |
| Обр.2<br>/ts2 | Обр.10/<br>ts10 | Обр.18/<br>ts18 | Обр.26/<br>ts26 | Обр.34/<br>ts34 | Обр.42/<br>ts42 | Обр.50/<br>ts50 | Обр.58/<br>ts58 | Обр.66/<br>ts66 | Обр.74/<br>ts74 | Обр.82/<br>ts82 | Обр.90/<br>ts90 |
| Обр.3<br>/ts3 | Обр.11/<br>ts11 | Обр.19/<br>ts19 | Обр.27/<br>ts27 | Обр.35/<br>ts35 | Обр.43/<br>ts43 | Обр.51/<br>ts51 | Обр.59/<br>ts59 | Обр.67/<br>ts67 | Обр.75/<br>ts75 | Обр.83/<br>ts83 | Обр.91/<br>ts91 |
| Обр.4<br>/ts4 | Обр.12/<br>ts12 | Обр.20/<br>ts20 | Обр.28/<br>ts28 | Обр.36/<br>ts36 | Обр.44/<br>ts44 | Обр.52/<br>ts52 | Обр.60/<br>ts60 | Обр.68/<br>ts68 | Обр.76/<br>ts76 | Обр.84/<br>ts84 | Обр.92/<br>ts92 |
| Обр.5<br>/ts5 | Обр.13/<br>ts13 | Обр.21/<br>ts21 | Обр.29/<br>ts29 | Обр.37/<br>ts37 | Обр.45/<br>ts45 | Обр.53/<br>ts53 | Обр.61/<br>ts61 | Обр.69/<br>ts69 | Обр.77/<br>ts77 | Обр.85/<br>ts85 | Обр.93/<br>ts93 |
| Обр.6<br>/ts6 | Обр.14/<br>ts14 | Обр.22/<br>ts22 | Обр.30/<br>ts30 | Обр.38/<br>ts38 | Обр.46/<br>ts46 | Обр.54/<br>ts54 | Обр.62/<br>ts62 | Обр.70/<br>ts70 | Обр.78/<br>ts78 | Обр.86/<br>ts86 | Обр.94/<br>ts94 |
| Обр.7<br>/ts7 | Обр.15/<br>ts15 | Обр.23/<br>ts23 | Обр.31/<br>ts31 | Обр.39/<br>ts39 | Обр.47/<br>ts47 | Обр.55/<br>ts55 | Обр.63/<br>ts63 | Обр.71/<br>ts71 | Обр.79/<br>ts79 | Обр.87/<br>ts87 | Обр.95/<br>ts95 |
| Обр.8<br>/ts8 | Обр.16/<br>ts16 | Обр.24/<br>ts24 | Обр.32/<br>ts32 | Обр.40/<br>ts40 | Обр.48/<br>ts48 | Обр.56/<br>ts56 | Обр.64/<br>ts64 | Обр.72/<br>ts72 | Обр.80/<br>ts80 | Обр.88/<br>ts88 | Обр.96/<br>ts96 |

- 7.4.3.5 Встряхните пробирку «Фермент-LIG» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

**Примечание** - Фермент-LIG необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.4.3.6 Приготовьте смесь реагентов L1 и L2 с Ферментом-LIG. Для этого смешайте в отдельной пробирке объемом 0,5 мл:

- 3,5 x (N+1) мкл Реагента L1,
- 3,5 x (N+1) мкл Реагента L2,



- 1,0 x (N+1) мкл Фермента-LIG.
- 25,0 x (N+1) мкл Буфера для разведения ДНК.

где N – количество подготавливаемых библиотек (соответствует количеству анализируемых образцов).

- 7.4.3.7 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.3.8 Осторожно добавьте в пробирки микропланшета, содержащие смесь соответствующих индексов и ампликонов, в каждую, отдельным наконечником по 33,0 мкл приготовленной смеси и перемешайте пипетированием 5 раз.
- 7.4.3.9 Запечатайте микропланшет адгезивной плёнкой.
- 7.4.3.10 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.
- 7.4.3.11 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите реакцию лигирования с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа для проведения лигирования приведена в таблице 6.
- 7.4.3.12 После окончания лигирования извлеките микропланшет из амплификатора и поместите на рабочий стол.

В результате лигирования формируются библиотеки фрагментов ДНК, соответствующие исследуемым образцам.

#### **7.4.4 Лигирование библиотек фрагментов ДНК (фасовка А)**

- 7.4.4.1 Инкубируйте при комнатной температуре пробирки «Реагент L1» и «Реагент L2» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** В пробирке с реагентом L1 возможно выпадение осадка. В этом случае необходимо встряхивать пробирку до полного растворения осадка. Не допускается нагревания пробирки с реагентом L1. Не допускается использование реагента L1 с нерастворенным осадком.

- 7.4.4.2 Встряхните пробирку «Фермент-LIG» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

**Примечание** – Фермент-LIG необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.4.4.3 Установите картридж №2, пробирки с реагентом L1, L2 и ферментом-LIG, микропланшет со смешанными ампликонами (п.7.4.2.1) и микропланшет с

индексами на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в приложении 3, рис.2.

- 7.4.4.4 После завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим аккуратно, не встряхивая, поместите микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшет ДТпак
- 7.4.4.5 Запечатайте микропланшет адгезивной плёнкой.
- 7.4.4.6 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.
- 7.4.4.7 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите реакцию лигирования с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа для проведения лигирования приведена в таблице 6.

Таблица 6 – Программа лигирования

| № блока | Температура, °С | Время |     | Число циклов | Режим оптических измерений* | Тип блока |
|---------|-----------------|-------|-----|--------------|-----------------------------|-----------|
|         |                 | мин   | с   |              |                             |           |
| 1       | 17,0            | 60    | 00  | 1            | -                           | Цикл      |
| 2       | 85,0            | 10    | 00  | 1            | -                           | Цикл      |
| 5       | 10,0            | ...   | ... | Хранение     | -                           | Хранение  |

\*Режим оптических измерений при данной процедуре не устанавливается.

- 7.4.4.8 После окончания лигирования извлеките микропланшет из амплификатора и поместите на рабочий стол.

В результате лигирования формируются библиотеки фрагментов ДНК, соответствующие исследуемым образцам.

#### 7.4.5 Пулирование, очистка и проведение амплификации библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)

Пулирование библиотек проводится по 16 или 18 исследуемых образцов.

- 7.4.5.1 Промаркируйте по одной пустой пробирке объёмом 0,5 мл для каждого пула образцов (см. пример в таблице 7).
- 7.4.5.2 Внесите в пробирки объемом 0,5 мл, промаркированные «Пул X-Z», где X-Z – номера исследуемых образцов, по 30 мкл из соответствующих пробирок микропланшета с библиотеками, закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.



**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок объемом 0,5 мл, промаркированных «Пул X-Z» не хранить и сразу использовать для дальнейшей постановки.

Таблица 7 – Пример маркировки пробирок для пулирования 16 библиотек фрагментов ДНК

| № образца  | № библиотеки  | № пробирки для пула |
|------------|---------------|---------------------|
| Образец 1  | Библиотека 1  | Пул 1-16            |
| Образец 2  | Библиотека 2  |                     |
| Образец 3  | Библиотека 3  |                     |
| Образец 4  | Библиотека 4  |                     |
| ...        | ...           |                     |
| Образец 13 | Библиотека 13 |                     |
| Образец 14 | Библиотека 14 |                     |
| Образец 15 | Библиотека 15 |                     |
| Образец 16 | Библиотека 16 |                     |

- 7.4.5.3 Встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте при комнатной температуре не менее 30 мин.
- 7.4.5.4 Перед использованием встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета.
- 7.4.5.5 Промаркируйте пустые пробирки объемом 1,5 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.5.6 Внесите в пробирки объемом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z» по 50 мкл раствора МЧ. Затем добавьте в каждую пробирку отдельным наконечником 70 мкл из соответствующих пробирок объемом 0,5 мл. Закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Хранение остатков пулов не допускается. Утилизация остатков пулов проводится в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

- 7.4.5.7 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.
- 7.4.5.8 Приготовьте 70% этанол. Смешайте в отдельном флаконе:

– 1,0 x (N+1) мл 96% этанола,  
360 x (N+1) мкл деионизированной воды.

где N – количество подготавливаемых пулов.

**ВНИМАНИЕ!** Срок хранения 70% этанола не более 3-х дней. При превышении этого срока, готовится новый раствор.

- 7.4.5.9 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.4.5.10 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 3 мин либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.4.5.11 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.5.12 Добавьте 200 мкл 70 % этанола.
- 7.4.5.13 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.
- 7.4.5.14 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.5.15 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.16 Верните пробирки в магнитный штатив и, используя дозатор, позволяющий отбирать объёмы жидкости от 2 до 20 мкл, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.5.17 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.
- 7.4.5.18 Добавьте в пробирки 37 мкл элюирующего раствора TEL. Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течение 5-10 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.19 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.4.5.20 Промаркируйте по одной пустой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.5.21 Внесите в пробирки объёмом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z» по 25 мкл раствора МЧ.
- 7.4.5.22 Перенесите 35 мкл надосадочной жидкости из пробирок на магнитном штативе в пробирки объёмом 1,5 мл с раствором МЧ с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы. Закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.23 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.
- 7.4.5.24 Поместите пробирки в магнитный штатив.



- 7.4.5.25 Инкубируйте 3 мин при комнатной температуре либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.4.5.26 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.5.27 Добавьте 200 мкл 70% этанола.
- 7.4.5.28 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, повернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.
- 7.4.5.29 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.5.30 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.31 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы с использованием дозатора на 2-20 мкл.
- 7.4.5.32 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.
- 7.4.5.33 Добавьте в пробирки 27 мкл элюирующего раствора TEL.
- 7.4.5.34 Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течении 5-10 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.35 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.4.5.36 Промаркируйте по одной пустой пробирке объемом 0,2 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.5.37 Перенесите 25 мкл жидкости в пробирку объемом 0,2 мл с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы.

Примечание – Допускается хранение очищенного продукта лигирования при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 1 месяца.

- 7.4.5.38 Инкубируйте при комнатной температуре «Смесь для амплификации библиотек ИЛМ» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.39 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (15)» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (15) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.



7.4.5.40 Внесите в отдельную пробирку объемом 0,5 мл:

- 10 x (N+1) мкл Смеси для амплификации библиотек ИЛМ,
- 0,5 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (15),

где N – количество подготавливаемых пулов.

7.4.5.41 Закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.5.42 Осторожно добавьте в пробирки, содержащие пулы подготавливаемых библиотек, в каждую, отдельным наконечником по 10 мкл приготовленной смеси, закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.5.43 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 8.

7.4.5.44 После окончания амплификации извлеките пробирки из амплификатора и поставьте на рабочий стол.

#### **7.4.6 Пулирование, очистка и проведение амплификации библиотек фрагментов ДНК (Фасовка А)**

7.4.6.1 Приготовьте в отдельном флаконе 70% этанол:

- 12,0 мл 96% этанола,
- 4,3 мл деионизированной воды.

**ВНИМАНИЕ!** Срок хранения 70% этанола не более 3-х дней. При превышении этого срока, готовится новый раствор.

7.4.6.2 Инкубируйте при комнатной температуре «Смесь для амплификации библиотек ИЛМ» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.6.3 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (15)» в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

**Примечание** – Фермент-ТАТ (15) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.6.4 Установите Картридж №3, пробирки со смесью для амплификации библиотек ИЛМ, ферментом-ТАТ (15), микропланшет с лигированными продуктами, а также одноразовые пробирки объемом 1,5 мл и объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. на рабочий стол ДТстрим. Пример расположения реагентов на рабочем столе



- 7.4.6.5 Внесите по 8,0 мл 70% этанола в картридж №3, ряд 5, ячейки 1, 2 и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.4.6.6 Снимите два стрипа с раскапанной смесью для амплификации библиотек ИЛМ и образцами с рабочего стола ДТстрим, установите в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 8.

Таблица 8 – Программа амплификации

| № блока | Температура, °С | Время |     | Число циклов | Режим оптических измерений* | Тип блока |
|---------|-----------------|-------|-----|--------------|-----------------------------|-----------|
|         |                 | мин   | с   |              |                             |           |
| 1       | 94,0            | 5     | 00  | 1            | -                           | Цикл      |
| 2       | 94,0            | 0     | 20  | 8            | -                           | Цикл      |
|         | 60,0            | 0     | 15  |              | -                           |           |
|         | 72,0            | 0     | 30  |              | -                           |           |
| 3       | 72,0            | 5     | 00  | 1            | -                           | Цикл      |
| 5       | 10,0            | ...   | ... | Хранение     | -                           | Хранение  |

\*Режим оптических измерений при данной процедуре не устанавливается.

#### 7.4.7 Очистка библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)

- 7.4.7.1 Встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте при комнатной температуре не менее 30 минут.
- 7.4.7.2 Встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета перед использованием.
- 7.4.7.3 Промаркируйте по одной пустой пробирке объемом 1,5 мл, для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.7.4 Внесите в пробирки объемом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z», где X-Z – номера исследуемых образцов, по 25 мкл раствора МЧ и добавьте отдельными наконечниками весь объем из соответствующих пробирок микропланшета с библиотеками, закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.5 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.
- 7.4.7.6 Поместите пробирки в магнитный штатив.



- 7.4.7.7 Инкубируйте 3 минуты при комнатной температуре либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.4.7.8 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.7.9 Добавьте 200 мкл 70% этанола.
- 7.4.7.10 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.
- 7.4.7.11 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.7.12 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.13 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы с использованием дозатора на 2-20 мкл.
- 7.4.7.14 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.
- 7.4.7.15 Добавьте в пробирки 37 мкл элюирующего раствора TEL. Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течение 5-10 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.16 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.4.7.17 Промаркируйте по одной пустой пробирке объемом 1,5 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.7.18 Внесите в пробирки объемом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z» по 25 мкл раствора МЧ.
- 7.4.7.19 Перенесите 35 мкл надосадочной жидкости из пробирок на магнитном штативе в пробирки объемом 1,5 мл с раствором МЧ с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы. Закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.20 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.
- 7.4.7.21 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.4.7.22 Инкубируйте 3 мин при комнатной температуре либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.4.7.23 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.7.24 Добавьте 200 мкл 70% этанола.
- 7.4.7.25 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.
- 7.4.7.26 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.



- 7.4.7.27 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.28 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы с использованием дозатора на 2-20 мкл.
- 7.4.7.29 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.
- 7.4.7.30 Добавьте в пробирки 50 мкл элюирующего раствора TEL. Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течение 5-10 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.31 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.4.7.32 Промаркируйте по одной пустой пробирке объемом 0,5 мл, для каждого пула библиотек. Укажите номера внесенных индексов (таблица 9).
- 7.4.7.33 Перенесите 45 мкл жидкости в пробирку объемом 0,5 мл с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы.

Таблица 9 – Пример маркировки пробирок для готовой библиотеки

| № образца  | № пробирки для пула библиотек |
|------------|-------------------------------|
| Образец 1  | «Пул Lib1-16 ts1 – ts 16»     |
| Образец 2  |                               |
| Образец 3  |                               |
| Образец 4  |                               |
| ...        |                               |
| Образец 13 |                               |
| Образец 14 |                               |
| Образец 15 |                               |
| Образец 16 |                               |

Примечание – Допускается хранение библиотеки при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 1 месяца или в морозильной камере на минус 70 °С не более 1 года.

#### 7.4.8 Очистка библиотек фрагментов ДНК (Фасовка А)

- 7.4.8.1 После окончания амплификации извлеките пробирки из амплификатора и верните на рабочий стол ДТстрим и проведите дальнейшее дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации к дозирующему устройству.

## 8 ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА И КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕКИ

### 8.1 Оценка количества и качества полученных библиотек

Проведите оценку количества и качества полученных пулов библиотек на флуориметре или флуоресцентном анализаторе согласно инструкции к набору реагентов и прибору.

Для оценки качественного профиля библиотеки (длины представленных в библиотеке фрагментов, долю лигированных продуктов) можно использовать метод горизонтального гель-электрофореза в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для детекции продуктов ПЦР методом гель-электрофореза.

### 8.2 На полученной электрофореграмме должны присутствовать основные пики длиной от 442 до 520 п.н. Более короткие пики должны отсутствовать либо составлять не более 20% от концентрации всего продукта. Допускается наличие продуктов длиной более 520 п.н.

При проведении гель-электрофореза в каждой дорожке геля, в которую были внесены пулы библиотек, должна быть видна светящаяся полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагментам амплифицированных продуктов размером 442 до 520 п.н. Более короткие полосы должны отсутствовать. Допускается наличие светящихся полос длиной более 520 п.н. и разной степени интенсивности.

### 8.3 Молярная концентрация библиотеки должна быть не менее 2000 пмоль/л (не менее 2 нмоль/л).

Если прибор выдаёт концентрацию в «нг/мкл», то для расчёта молярной концентрации (нмоль/л) необходимо концентрацию, полученную в «нг/мкл», умножить на коэффициент 3,03.

### 8.4 Библиотеки готовы для дальнейшего проведения секвенирования.

## 9 ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Секвенирование библиотек следует проводить на приборе MiSeq (Illumina, USA, РУ № РЗН 2014/1568) с использованием Комплекта реагентов для секвенирования из набора реагентов HLA-Эксперт, согласно Приложению 4 к данной инструкции и Инструкции к прибору MiSeq.



Регистрация результатов секвенирования проводится прибором автоматически во время проведения секвенирования. Первичный анализ данных секвенирования осуществляется прибором после завершения программы.

## 10 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Типирование генов HLA I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и HLA II (DRB1, DQB1, DPB1, DRB3/4/5) на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) осуществляется с помощью программного обеспечения «HLA-Эксперт» согласно Руководству пользователя к программному обеспечению. Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов «HLA-Эксперт». Рекомендуется пройти обучение. Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 17 Инструкции по применению.

Программное обеспечение «HLA-Эксперт» и Руководство пользователя предоставляется на USB-флеш-накопителе или представлено на Интернет-ресурсе компании-производителя.

*Информация об Интернет-ресурсе для скачивания программного обеспечения и Руководства пользователя будет указана в инструкции к набору реагентов после получения регистрационного удостоверения на медицинское изделие.*

## 11 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

## 11.1 Транспортирование

- 11.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.
- 11.1.2 Допускается транспортирование реагентов, упакованных для хранения от 2 °С до 8 °С, в вариантах исполнения «Фасовка N v1» и «Фасовка A v1» при температуре от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 11.1.3 Допускается транспортирование реагентов, упакованных для хранения от минус 18 °С до минус 22 °С, в вариантах исполнения «Фасовка N v1» и «Фасовка A v1», при температуре не выше 8 °С не более 5 суток.
- 11.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

## 11.2 Хранение

- 11.2.1 Следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности следующие компоненты:

- Смесь для амплификации KBM, Смесь для амплификации HLA I, Смесь для амплификации HLA II, Буфер для разведения ДНК, Смесь для амплификации библиотек ИЛМ, Индексы ts1 – ts96, Индексы ts97 – ts192, Индексы ts193 – ts288, Адгезивная плёнка, Раствор МЧ, Элюирующий раствор TEL, PR2 буфер, Проточная ячейка.

Указанные компоненты упакованы в коробку для хранения при температуре от 2 °С до 8 °С.

Смеси для амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте.

- 11.2.2 Следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности следующие компоненты:

- Фермент-TAT (30), Фермент-TAT (100), Реагент L1, Реагент L2, Фермент-LIG, Фермент-TAT (15), Картридж с реагентами, HT1 буфер.

Указанные компоненты упакованы в коробку для хранения при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С.

- 11.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.



- 11.3 Указания по эксплуатации
- 11.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 11.3.2 Допускается хранить после вскрытия первичной упаковки при следующих условиях:
- Смесь для амплификации библиотек ИЛИМ, Буфер для разведения ДНК, Раствор МЧ, Элюирующий раствор TEL - при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности;
  - Фермент-ТАТ (15) - при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности, допускается замораживание/размораживание до 3 раз.
- 11.3.3 Смесь для амплификации KBM, Смесь для амплификации HLA I, Смесь для амплификации HLA II, Индексы ts1 – ts96, Индексы ts97 – ts192, Индексы ts193 – ts288, Картридж с реагентами №1, Картридж с реагентами №2, Картридж с реагентами №3 предназначены для одноразового использования.
- 11.3.4 PR2 буфер, Проточная ячейка, HT1 буфер предназначены для одноразового использования и должны быть извлечены из холодильника непосредственно перед использованием.
- 11.3.5 Картридж с реагентами (из комплекта реагентов для секвенирования) должен быть использован не позднее, чем через 6 часов после размораживания; до использования необходимо хранить при температуре от 2 °С до 8 °С.
- 11.3.6 Фермент-ТАТ (30), Фермент-ТАТ (100), Реагент L1, Реагент L2, Фермент-LIG предназначены для одноразового использования и должны быть извлечены из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
- 11.3.7 Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.

## 12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 12.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790 и МУ 1.3.2569.
- 12.2 При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 12.3 Жидкие компоненты, входящие в состав набора реагентов и пришедшие в непригодность, перед сливом в канализацию должны быть предварительно разбавлены водой 1:100. Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

### 13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2 Срок годности набора реагентов и контрольных образцов к набору – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

### 14 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

### 15 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

|                                                                                     |                                              |                                                                                     |                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|   | Медицинское изделие для диагностики in vitro |   | Дата изготовления                              |
|  | Температурный диапазон                       |  | Обратитесь к инструкции по применению          |
|  | Количество тестов                            |  | Каталожный номер                               |
|  | Годен до                                     |  | Адрес изготовителя                             |
|  | Серия набора                                 |  | Одноразовое использование                      |
|  | Не стерильно                                 |  | Не допускается воздействие солнечного света    |
|  | Репродуктивная токсичность                   |  | Осторожно!<br>Содержит раздражающие компоненты |



## 16 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

### Примечания

- 1 Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым документом).
- 2 Перечень стандартов, относящихся к программному обеспечению, приведён в руководстве пользователя.





**Приложение 1**

Расположение индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК:

– ts1 – ts96 – 1 микропланшет

|     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ts1 | ts9  | ts17 | ts25 | ts33 | ts41 | ts49 | ts57 | ts65 | ts73 | ts81 | ts89 |
| ts2 | ts10 | ts18 | ts26 | ts34 | ts42 | ts50 | ts58 | ts66 | ts74 | ts82 | ts90 |
| ts3 | ts11 | ts19 | ts27 | ts35 | ts43 | ts51 | ts59 | ts67 | ts75 | ts83 | ts91 |
| ts4 | ts12 | ts20 | ts28 | ts36 | ts44 | ts52 | ts60 | ts68 | ts76 | ts84 | ts92 |
| ts5 | ts13 | ts21 | ts29 | ts37 | ts45 | ts53 | ts61 | ts69 | ts77 | ts85 | ts93 |
| ts6 | ts14 | ts22 | ts30 | ts38 | ts46 | ts54 | ts62 | ts70 | ts78 | ts86 | ts94 |
| ts7 | ts15 | ts23 | ts31 | ts39 | ts47 | ts55 | ts63 | ts71 | ts79 | ts87 | ts95 |
| ts8 | ts16 | ts24 | ts32 | ts40 | ts48 | ts56 | ts64 | ts72 | ts80 | ts88 | ts96 |

– ts97 – ts192 – 1 микропланшет

|       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ts97  | ts105 | ts113 | ts121 | ts129 | ts137 | ts145 | ts153 | ts161 | ts169 | ts177 | ts185 |
| ts98  | ts106 | ts114 | ts122 | ts130 | ts138 | ts146 | ts154 | ts162 | ts170 | ts178 | ts186 |
| ts99  | ts107 | ts115 | ts123 | ts131 | ts139 | ts147 | ts155 | ts163 | ts171 | ts179 | ts187 |
| ts100 | ts108 | ts116 | ts124 | ts132 | ts140 | ts148 | ts156 | ts164 | ts172 | ts180 | ts188 |
| ts101 | ts109 | ts117 | ts125 | ts133 | ts141 | ts149 | ts157 | ts165 | ts173 | ts181 | ts189 |
| ts102 | ts110 | ts118 | ts126 | ts134 | ts142 | ts150 | ts158 | ts166 | ts174 | ts182 | ts190 |
| ts103 | ts111 | ts119 | ts127 | ts135 | ts143 | ts151 | ts159 | ts167 | ts175 | ts183 | ts191 |
| ts104 | ts112 | ts120 | ts128 | ts136 | ts144 | ts152 | ts160 | ts168 | ts176 | ts184 | ts192 |

– ts193 – ts288 – 1 микропланшет

|       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ts193 | ts201 | ts209 | ts217 | ts225 | ts233 | ts241 | ts249 | ts257 | ts265 | ts273 | ts281 |
| ts194 | ts202 | ts210 | ts218 | ts226 | ts234 | ts242 | ts250 | ts258 | ts266 | ts274 | ts282 |
| ts195 | ts203 | ts211 | ts219 | ts227 | ts235 | ts243 | ts251 | ts259 | ts267 | ts275 | ts283 |
| ts196 | ts204 | ts212 | ts220 | ts228 | ts236 | ts244 | ts252 | ts260 | ts268 | ts276 | ts284 |
| ts197 | ts205 | ts213 | ts221 | ts229 | ts237 | ts245 | ts253 | ts261 | ts269 | ts277 | ts285 |
| ts198 | ts206 | ts214 | ts222 | ts230 | ts238 | ts246 | ts254 | ts262 | ts270 | ts278 | ts286 |
| ts199 | ts207 | ts215 | ts223 | ts231 | ts239 | ts247 | ts255 | ts263 | ts271 | ts279 | ts287 |
| ts200 | ts208 | ts216 | ts224 | ts232 | ts240 | ts248 | ts256 | ts264 | ts272 | ts280 | ts288 |

**Приложение 2**

Исследование с использованием NGS состоит из следующих этапов:

| №  | Этап                                                       | Участие набора «HLA-Эксперт»                                                                                                                 |
|----|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Получение биологического материала                         | -                                                                                                                                            |
| 2  | Выделение ДНК                                              | -                                                                                                                                            |
| 3  | Оценка качества и количества полученной ДНК                |                                                                                                                                              |
| 4  | Фрагментация ДНК (амплификация – таргетное секвенирование) | 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК                                                                 |
| 5  | Оценка качества полученных ампликонов                      | -                                                                                                                                            |
| 6  | Присоединение индексов                                     | 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК<br>2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК |
| 7  | Промежуточная очистка фрагментов ДНК                       | 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК                                                                                   |
| 8  | Дополнительная амплификация                                | 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК                                                                 |
| 9  | Финальная очистка библиотеки                               | 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК                                                                                   |
| 10 | Оценка количества и качества полученной библиотеки         | -                                                                                                                                            |
| 11 | ПЦР обогащение (совмещен с проведением секвенирования)     | -                                                                                                                                            |
| 12 | Проведение секвенирования                                  | 4) Комплект реагентов для проведения секвенирования                                                                                          |
| 13 | Регистрация и обработка результата                         | -                                                                                                                                            |
| 14 | Анализ полученных данных. Генотип.                         | 5) Программное обеспечение «HLA-Эксперт»                                                                                                     |



Приложение 3

Пример расположения реагентов на рабочем столе дозирующего устройства ДТстрим на этапах оценки пригодности выделенной ДНК и подготовки реагентов к проведению ПЦР

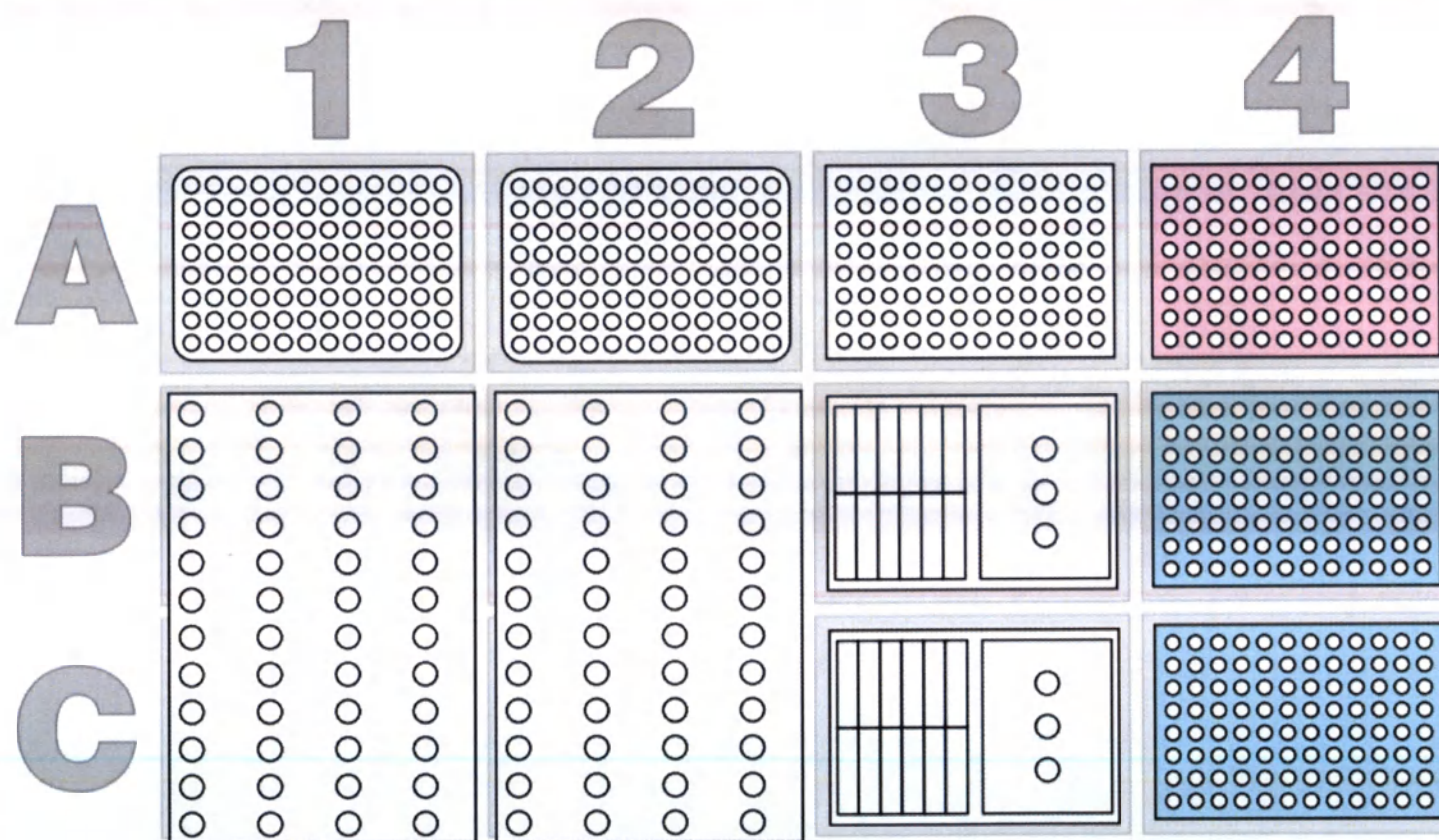


Рис. 1



Пример расположения реагентов на рабочем столе дозирующего устройства ДТстрим на этапах подготовки фрагментов ДНК к лигированию и лигирование библиотек фрагментов ДНК

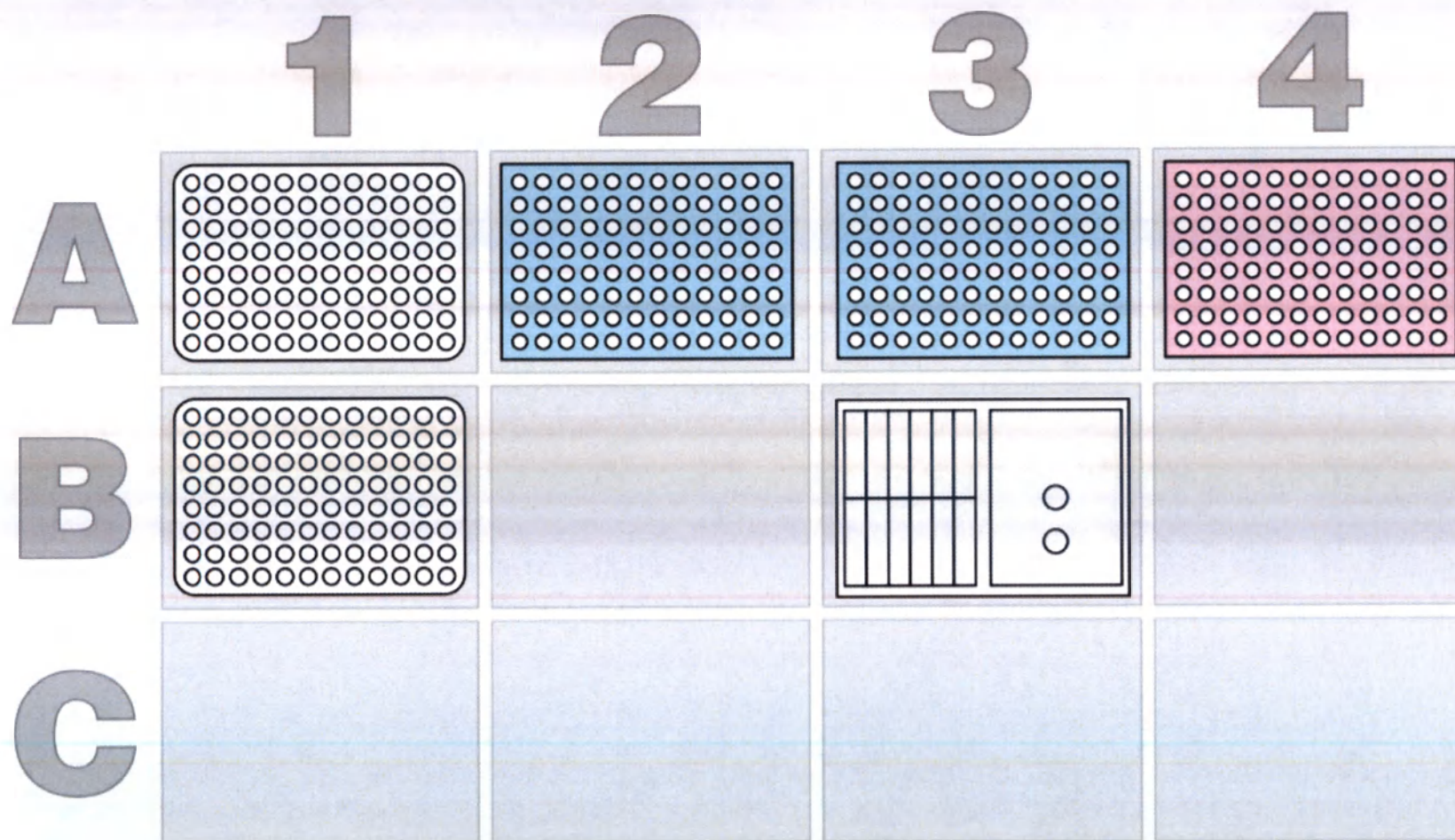


Рис. 2



Пример расположения реагентов на рабочем столе дозирующего устройства ДТстрим  
на этапах очистки и амплификации библиотек фрагментов ДНК

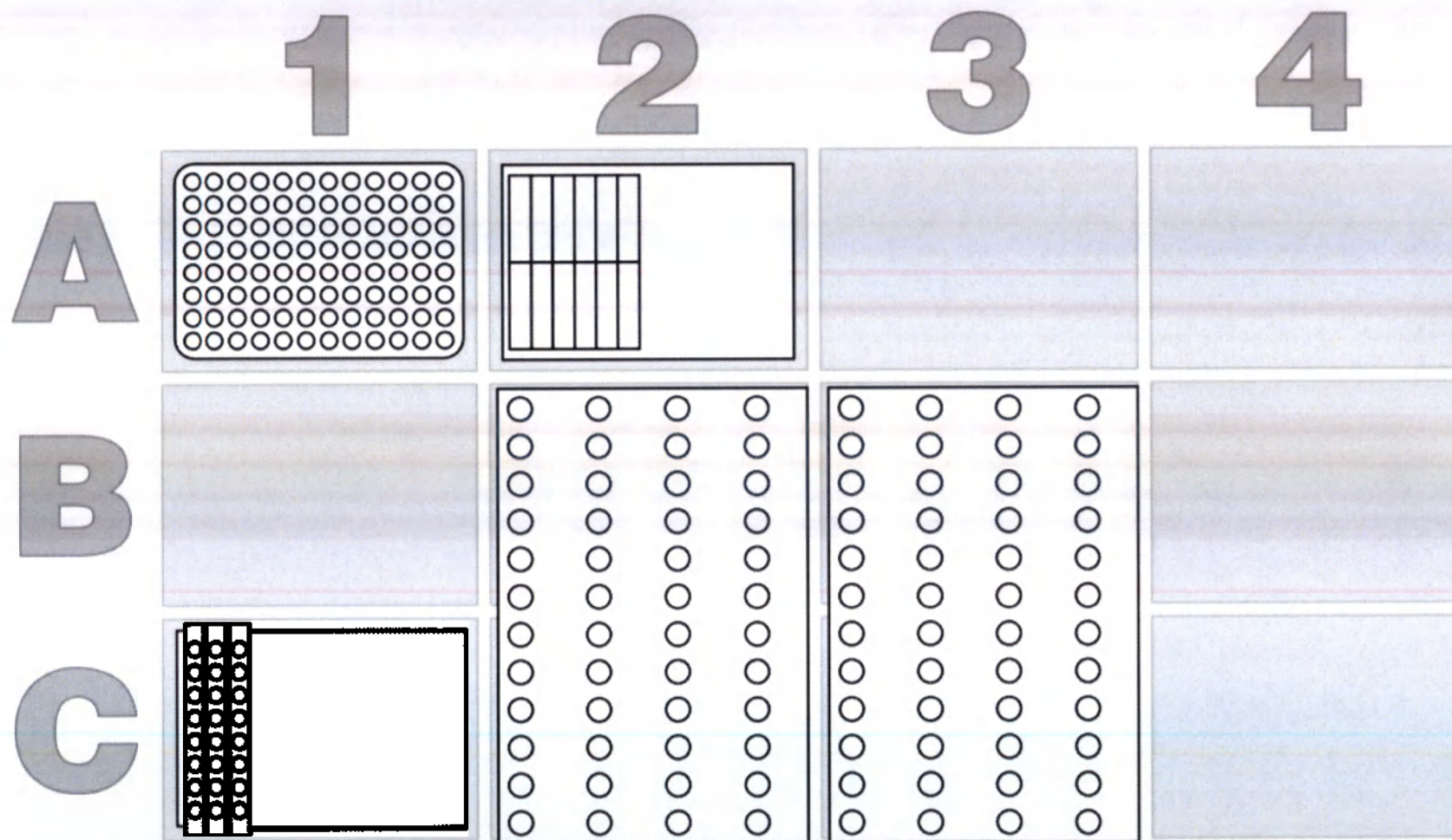


Рис. 3

## ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

### I. Подготовка к проведению секвенирования: денатурирование и разбавление библиотек

Проведение секвенирования и подготовка к секвенированию проводится в соответствии с Инструкцией к прибору MiSeq (Illumina, USA, РУ №РЗН 2014/1568 от 29.04.2014).

Данное приложение составлено на основе «Руководства по денатурированию и разбавлению библиотек для системы MiSeq (документ № 15039740)», адаптировано к набору реагентов HLA-Эксперт.

Таблица 4.1 - Маркировка компонентов Комплекта реагентов для секвенирования.

| Расположение                                                                   | Внешний вид                          | Маркировка компонента (англ)                              | Наименование в инструкции | Комментарий                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Коробка для хранения при минус 18 °С - минус 22 °С (минус 15 °С – минус 25 °С) | Резервуар, заполненный реактивами    | - MiSeq v2 Reagent Tray<br>или<br>- MiSeq v3 Reagent Tray | Картридж с реагентами     | Осторожно!<br>Содержит опасные компоненты (формамид).<br>См.раздел 4 |
|                                                                                | Пробирка с жидкостью                 | - HT1<br>- Hyb Buffer<br>- 4,5 ml                         | HT1 буфер                 |                                                                      |
| Коробка для хранения при 2 °С - 8 °С                                           | Флакон (бутыл) с жидкостью           | - PR2<br>- Incorporation Buffer<br>- 500 ml               | PR2 буфер                 | Осторожно!<br>Содержит раздражающие компоненты                       |
|                                                                                | Ёмкость с проточной ячейкой в буфере | - PE MiSeq FlowCell                                       | Проточная ячейка          |                                                                      |

Для разведения и денатурирования библиотек требуются следующие реагенты и расходные материалы:

- **HT1 буфер** из комплекта реагентов для проведения секвенирования;
- 1,0 М раствор NaOH (для молекулярно-биологических исследований).
- Деионизированная вода (для молекулярно-биологических исследований).
- Реагент PhiX Control производства Illumina, USA (Кат. номер FC-110-3001)
- Одноразовые пробирки вместимостью 1,5 мл.



**1. Подготовка реагентов для денатурирования и разведения библиотек****1.1 Приготовить свежий раствор 0,2 М NaOH.**

Для этого смешайте в отдельной пробирке 1,5 мл:

- 400 мкл деионизированной воды;
- 100 мкл 1 М NaOH.

Встряхнуть пробирку с 0,2 М NaOH в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе

**1.2 Подготовить НТ1 буфер:**

Разморозьте при комнатной температуре **НТ1 буфер** из Комплекта реагентов для секвенирования.

**2. Приготовление библиотеки с концентрацией 4 нМ**

2.1 Готовые библиотеки (п.8.6) смешайте эквимольно. Повторите измерение концентрации полученного пула библиотек или рассчитайте его концентрацию.

2.2 Рассчитайте кратность разведения полученной библиотеки.

$$Y = X/4$$

Где:

Y – кратность разведения библиотеки (п.2.1)

X – концентрация библиотеки (п.2.1).

2.3 Развести библиотеку до концентрации 4 нМ

Для этого смешайте в отдельной пробирке объёмом 1,5 мл:

- 10 мкл библиотеки,
- (10\*Y) -10 мкл деионизированной воды,

Где Y – кратность разведения для данной библиотеки.

2.4 Встряхнуть пробирку с библиотекой 4 нМ в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе

**3. Денатурирование библиотеки 4 нМ**

3.1 Смешайте в отдельной пробирке 1,5 мл библиотеки:

- 5 мкл Библиотеки 4 нМ;
- 5 мкл 0,2 М NaOH

3.2 Встряхнуть пробирку в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

3.3 Инкубировать пробирку 5 мин при комнатной температуре

3.4 Развести библиотеку до 20 pM:

Добавить к 10 мкл денатурированной библиотеки добавить 990 мкл **HT1 буфера**, предварительно инкубированного при комнатной температуре.

*В результате получается 1,0 мл денатурированной 20 pM библиотеки.*

3.5 Встряхнуть пробирку в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

#### **4. Разведение денатурированной библиотеки**

4.1 Развести денатурированную библиотеку до 10 pM.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 300 мкл Библиотеки 20 pM;
- 300 мкл HT1 буфера.

4.2 Встряхнуть пробирку в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

#### **5. Приготовление 4 нМ PhiX Control**

5.1 Развести PhiX Control до 4 нМ.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 3 мкл Деионизированной воды;
- 2 мкл PhiX Control (исходная концентрация 10 нМ).

5.2 Встряхнуть пробирку в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе

5.3 Денатурировать 4 нМ PhiX Control

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 5 мкл PhiX 4 нМ;
- 5 мкл 0,2 М NaOH

5.4 Встряхнуть пробирку в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

5.5 Инкубировать пробирку при 5 мин при комнатной температуре.

#### **6. Приготовление 20 pM PhiX Control**

6.1 Развести PhiX Control до 20 pM. Для этого к 10 мкл денатурированного PhiX Control добавить 990 мкл HT1 реагента, предварительно инкубированного при комнатной температуре.

6.2 Встряхнуть пробирку в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.



**ВНИМАНИЕ!** При использовании комплекта реагентов для секвенирования v3-600 дальнейшего разведения не требуется.

**7. Приготовление 12,5 pM PhiX Control (выполняется только для комплекта реагентов для секвенирования v2-500)**

Развести PhiX Control до 12,5 pM.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 375 мкл PhiX Control 20 pM;
- 225 мкл HT1 буфера

**8. Приготовление смеси библиотеки и PhiX**

Смешайте в отдельной пробирке:

- 594 мкл Библиотеки 10 pM;
- 5 мкл PhiX Control (12,5 pM или 20 pM).

**Библиотека в смеси с PhiX Control готова к загрузке в картридж для проведения секвенирования. Хранить на льду до загрузки в картридж с реагентами.**

**II. Подготовка реагентов из комплекта реагентов для проведения секвенирования к загрузке в прибор**

**1. Оттаивание картриджа с реагентом**

- 1.1 Извлеките **картридж с реагентом** из места хранения с температурой от -15°C до -25°C.
- 1.2 Поместите картридж с реагентом на водяную баню, содержащую достаточное количество деионизированной воды комнатной температуры для погружения основания картриджа с реагентом. Не допускайте превышения максимального уровня воды, указанного на картриджах с реагентами.
- 1.3 Дайте картриджу с реагентом (Комплект реагентов для секвенирования v3-600) оттаять на водяной бане комнатной температуры примерно 60-90 минут или до полного оттаивания.
- 1.4 Дайте картриджу с реагентом (Комплект реагентов для секвенирования v2-500) оттаять на водяной бане комнатной температуры примерно 1 час или до полного

- 1.5 Извлеките картридж из водяной бани и легонько постучите им по столу для удаления воды из основания картриджа. Высушите основание картриджа.
2. Проверка картриджа с реагентом
  - 2.1 Переверните картридж с реагентами десять раз, чтобы смешать размороженные реагенты, а затем визуально проверьте, что все позиции разморожены.
  - 2.2 Визуально проверьте реагенты в положениях 1, 2 и 4, чтобы убедиться, что они полностью перемешаны и не содержат осадков.
  - 2.3 Легонько постучите картридж по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реагентах.

Примечание – Сипперы MiSeq опускаются на дно каждого резервуара для всасывания реагентов, поэтому важно, чтобы резервуары были свободны от воздушных пузырьков.
  - 2.4 Поместите картридж с реагентом на лед или оставьте на время (до 6 часов) при температуре от 2°C до 8°C до готовности к работе. Для получения наилучших результатов перейдите непосредственно к загрузке образца и настройке запуска.
3. Загрузите библиотеку в картридж с реагентами в **ячейку 17, промаркированную Load Samples** (Загрузка образцов).
4. Используя интерфейс контрольного программного обеспечения MiSeq, выполните шаги настройки запуска, чтобы загрузить проточную ячейку и реагенты, а затем запустите постановку.

### III. Провести запуск прибора MiSeq согласно инструкции к прибору.



62 ЛИСТОВ  
Директор ФГБУН КНИИГиПК  
ФМБА России  
И.В. Парамонов

62 ЛИСТОВ

**Директор ФГБУН КНИИГиПК  
ФМБА России**

**И.В. Парамонов**

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

«DNA-Technology TS» С.А. Самарин

« 05 » сентября 2019 г.



Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»

С.П. Левичев

« 05 » сентября 2019 г.



Руководство пользователя

**Программное обеспечение «HLA-ЭКСПЕРТ»**

**Набор реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS)**

**HLA-Эксперт**

Версия 2.0 от 29.08.2019



**СОДЕРЖАНИЕ**

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Назначение программы .....                                         | 4  |
| 1.1 Функции HLA-Эксперт .....                                        | 4  |
| 1.2 Информационная безопасность .....                                | 4  |
| 2 Условия выполнения программы .....                                 | 5  |
| 2.1 Аппаратное обеспечение .....                                     | 5  |
| 2.2 Программное обеспечение .....                                    | 5  |
| 2.3 Уровень подготовки пользователя .....                            | 6  |
| 3 Установка и обновление программы .....                             | 7  |
| 3.1 Установка HLA-Эксперт (ОС Windows).....                          | 7  |
| 3.2 Установка HLA-Эксперт (ОС семейства Unix, Mac OS).....           | 10 |
| 3.3 Обновление HLA-Эксперт .....                                     | 10 |
| 3.3.1 Обновление программного обеспечения HLA-Эксперт .....          | 10 |
| 3.3.2 Обновление базы данных IPD-IMGT/HLA.....                       | 11 |
| 3.4 Настройка параметров HLA-Эксперт .....                           | 12 |
| 3.4.1 Настройка темы HLA-Эксперт .....                               | 13 |
| 4 Выполнение программы.....                                          | 14 |
| 4.1 Запуск программы.....                                            | 14 |
| 4.2 Загрузка файлов образцов в HLA-Эксперт.....                      | 14 |
| 4.2.1 Статусы обработки файлов образцов.....                         | 16 |
| 4.2.2 Переход к просмотру результатов обработки файла образцов ..... | 17 |
| 4.2.3 Поиск файла образца .....                                      | 18 |
| 4.2.4 Настройка отображения перечня файлов образцов.....             | 18 |
| 4.2.5 Добавление файла образца в перечень .....                      | 20 |
| 4.2.6 Обновление перечня файлов образцов .....                       | 21 |
| 4.2.7 Настройка фильтрации файлов образцов .....                     | 21 |
| 4.2.8 Контроль качества файлов образцов.....                         | 22 |
| 4.2.9 Анализ качества данных файлов FASTQ.....                       | 23 |
| 4.2.10 Распаковка gz-архивов файлов данных .....                     | 24 |
| 4.3 Проведение обработки файлов образцов.....                        | 25 |
| 4.3.1 Запуск обработки одного файла образца.....                     | 25 |
| 4.3.2 Запуск обработки нескольких файлов образцов .....              | 26 |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.3 Запуск обработки всех загруженных файлов образцов.....         | 26 |
| 4.3.4 Проведение обработки файла образца.....                        | 26 |
| 4.3.5 Остановка обработки файла образца .....                        | 28 |
| 4.3.6 Повторный запуск обработки файла образца.....                  | 29 |
| 4.4 Работа с результатами типирования .....                          | 30 |
| 4.4.1 Просмотр результатов .....                                     | 30 |
| 4.4.1.1 Просмотр вариантов неоднозначности цис-транс положений ..... | 31 |
| 4.4.1.2 Просмотр списка аллелей для гена .....                       | 31 |
| 4.4.2 Просмотр формы статистики .....                                | 32 |
| 4.4.3 Обновление результатов.....                                    | 42 |
| 4.4.4 Редактирование атрибутов файла образца .....                   | 42 |
| 4.4.5 Печать результатов .....                                       | 43 |
| 4.5 Операции с файлами результатов.....                              | 43 |
| 4.5.1 Экспорт результатов типирования в файл формата *.csv .....     | 44 |
| 4.5.2 Печать результатов типирования .....                           | 45 |
| 4.5.3 Параметры экспорта .....                                       | 46 |
| 4.6 Завершение работы с HLA-Эксперт.....                             | 47 |
| 4.7 Удаление HLA-Эксперт.....                                        | 47 |
| 4.8 Техническая поддержка.....                                       | 48 |
| 4.8.1 Отправка сообщения в Службу клиентской поддержки.....          | 48 |
| 4.8.2 Контактные данные Службы клиентской поддержки.....             | 49 |
| 5 Адрес для обращения.....                                           | 50 |
| Приложение А .....                                                   | 51 |
| Перечень сокращений.....                                             | 52 |



## **1 НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ**

Программное обеспечение HLA-Эксперт предназначено для получения результатов типирования генов HLA I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и II (HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DRB3/4/5) классов, полученных методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina с использованием набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) HLA-Эксперт.

Перечень национальных стандартов, применяемых к HLA-Эксперт, представлен в приложении А данного руководства.

### **1.1 Функции HLA-Эксперт**

Программное обеспечение HLA-Эксперт обеспечивает выполнение следующих функций:

- выбор файлов данных в формате \*.fastq для обработки;
- настройка отображения параметров файлов для обработки;
- запуск обработки файлов;
- просмотр результатов типирования;
- печать результатов типирования;
- экспорт результатов типирования.

### **1.2 Информационная безопасность**

В HLA-Эксперт не осуществляется хранение и обработка персональных данных, таким образом к данной программе не применимы нормы и требования по защите персональных данных.

В HLA-Эксперт не предусмотрены встроенные средства защиты от несанкционированного доступа (НД) и от копирования. Защита от НД осуществляется стандартными средствами операционной системы (ОС), а именно настройкой прав пользователей на доступ к программному обеспечению.

## **2 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ**

Корректное функционирование HLA-Эксперт возможно при соблюдении минимальных требований к аппаратному и общесистемному программному обеспечению персонального компьютера.

Рекомендуется обеспечить подключение персонального компьютера пользователя к сети Интернет. Наличие подключения позволит пользователю обновлять базу данных IPD-IMGT/HLA и отправлять сообщения в Службу клиентской поддержки. Данный функционал расширяет возможности программы, но не является основным, таким образом наличие сети Интернет – целесообразное, но не обязательное условие корректного функционирования программы.

### **2.1 Аппаратное обеспечение**

Минимальные требования к аппаратному обеспечению приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Требования к аппаратному обеспечению

| Наименование                 | Требование                                                                                        |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Количество и тип процессоров | 8-ядерный процессор или 4-ядерный с гиперпоточностью                                              |
| Объем оперативной памяти     | 8 ГБ                                                                                              |
| Дисковая подсистема          | Жесткий диск с интерфейсом IDE или SATA и емкостью 100 ГБ                                         |
| Сетевой контроллер           | Fast Ethernet (100 Мбит/с)                                                                        |
| Графический контроллер       | Работа с разрешением 1280x960,<br>объем памяти 8 ГБ                                               |
| Видеомонитор                 | ЖК-монитор с рабочим разрешением не менее 1280x960                                                |
| USB-разъем                   | Требуется наличие свободного порта в компьютере,<br>соответствующего стандарту USB 2.0 High-speed |
| Клавиатура                   | Требуется наличие русифицированной клавиатуры,<br>совместимой с ПК пользователя                   |
| «Мышь»                       | Требуется наличие двухкнопочной «мышь»                                                            |

### **2.2 Программное обеспечение**

Минимальные требования к программным средствам (ПС), обеспечивающим выполнение HLA-Эксперт, представлены в таблице 2.



Таблица 2 – Минимальные требования к программному обеспечению

| Наименование          | Требование                                          |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|
| ОС                    | MS Windows 7 (и выше), ОС семейства Unix, Mac OS    |
| Среда выполнения Java | Java SE Runtime Environment (JRE) (версия 8 и выше) |

### 2.3 Уровень подготовки пользователя

Пользователь HLA-Эксперт должен обладать следующими необходимыми знаниями и навыками для работы с программой:

- знание предметной области и положений нормативных и руководящих документов;
- практические навыки работы с ПК;
- практические навыки работы с графическим пользовательским интерфейсом ОС MS

Windows.

Перед началом работы с программным обеспечением HLA-Эксперт необходимо ознакомиться с данным Руководством пользователя.

**ВНИМАНИЕ!** Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов «HLA-Эксперт». Рекомендуется пройти обучение. Контактные данные Службы клиентской поддержки представлены в разделе 4.8.2 данного руководства.

### 3 УСТАНОВКА И ОБНОВЛЕНИЕ ПРОГРАММЫ

#### 3.1 Установка HLA-Эксперт (ОС Windows)

Для установки HLA-Эксперт в операционной среде Windows выполните нижеописанные действия.

**Шаг 1.** Запустите установочный файл программного обеспечения HLA-Эксперт 2.0 для Windows.

Примечание. Установочный файл поставляется на USB-флэш-накопителе, также может быть получен по сети Интернет.

На экране отобразится окно с выбором языка, на котором будет выполняться установка программы (рисунок 1).

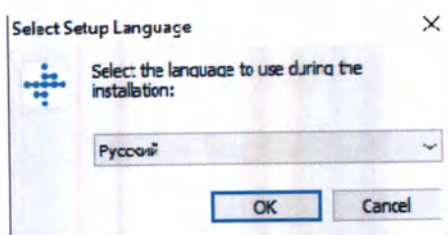


Рисунок 1 – Выбор языка, используемого при установке программы

С помощью раскрывающегося списка выберите вариант Русский / English и нажмите кнопку [OK].

**Шаг 2.** На экране отобразится окно с выбором каталога для установки HLA-Эксперт. По умолчанию указывается папка «HLAExpert» в каталоге «DNA-Technology» диска C:\ (рисунок 2).

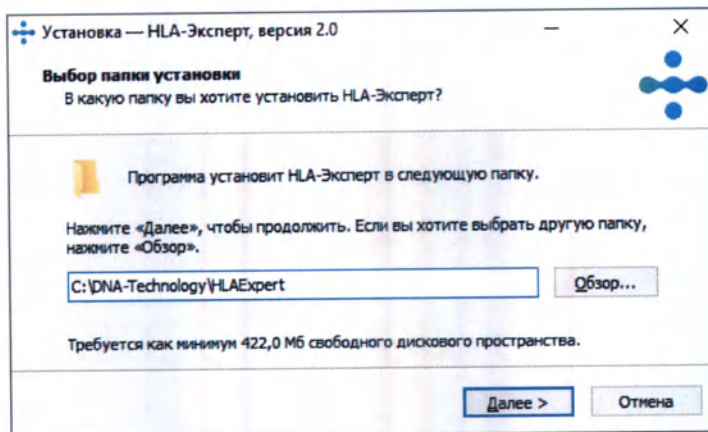


Рисунок 2 – Выбор каталога для установки HLA-Эксперт

Примечание. Для изменения каталога установки используйте кнопку [Обзор...].



Нажмите кнопку [Далее]. На экране отобразится окно с подтверждением создания нового каталога. Нажмите кнопку [Да].

**Шаг 3.** Для создания ярлыка программы на Рабочем столе установите флаг выбора в строке «Создать значок на Рабочем столе» (рисунок 3).

Нажмите кнопку [Далее].

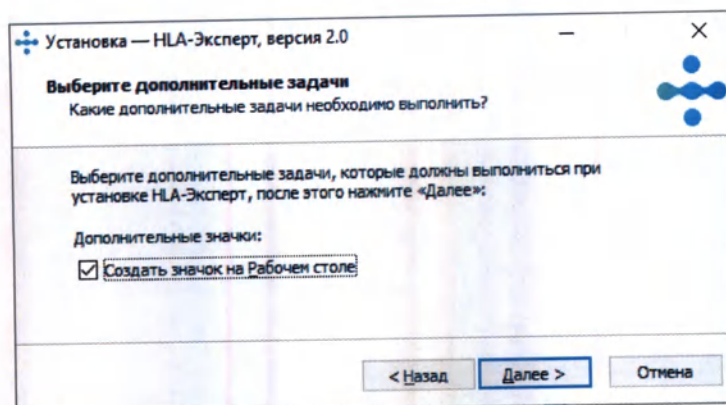


Рисунок 3 – Создание ярлыка HLA-Эксперт на Рабочем столе пользователя

**Шаг 4.** Мастер установки сообщит о готовности начать установку программы HLA-Эксперт (рисунок 4).

Проверьте выбранные ранее параметры (папка установки, папка в меню «Пуск», создание ярлыка на Рабочем столе) и нажмите кнопку [Установить].

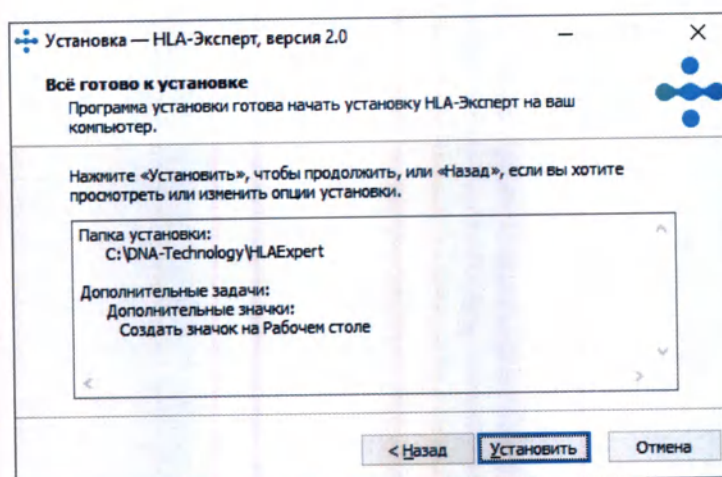


Рисунок 4 – Проверка выбранных параметров установки

На экране отобразится процесс установки HLA-Эксперт (рисунок 5).

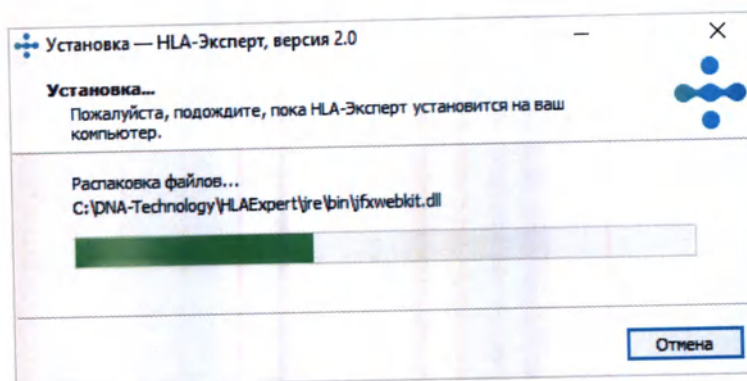


Рисунок 5 – Процесс установки HLA-Эксперт на ПК пользователя

По завершении процесса установки в окне Мастера отобразится соответствующее сообщение (рисунок 6).

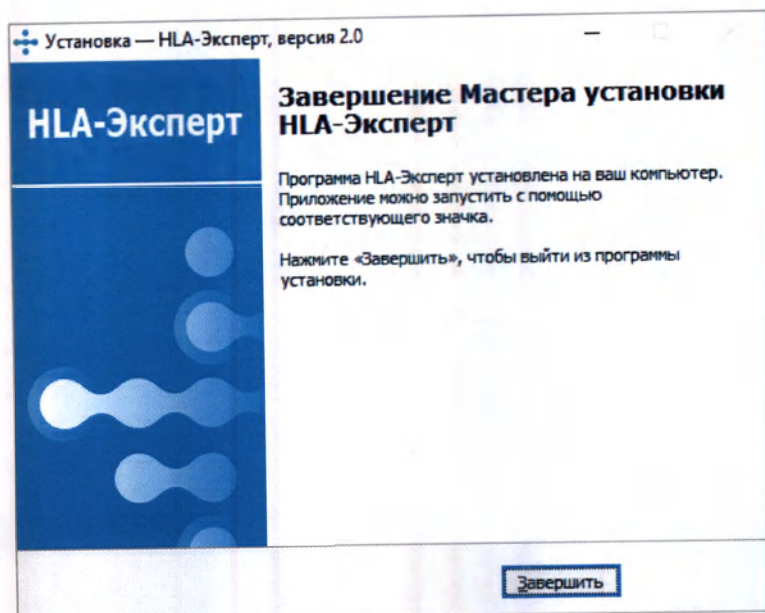


Рисунок 6 – Сообщение об успешной установке HLA-Эксперт

**Шаг 5.** Нажмите кнопку **[Завершить]** для выхода из Мастера установки.

В результате установки HLA-Эксперт на ПК пользователя:



1. На Рабочем столе появится ярлык **HLA-Эксперт** для запуска программы.
2. В меню Пуск отобразится каталог «DNA-Technology», содержащий ярлык для запуска программы HLA-Эксперт (рисунок 7).

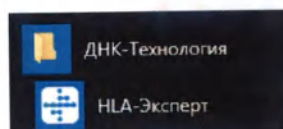


Рисунок 7 – Каталог программы HLA-Эксперт в меню Пуск



### 3.2 Установка HLA-Эксперт (ОС семейства Unix, Mac OS)

Для установки HLA-Эксперт в ОС семейства Unix или Mac выполните нижеописанные действия.

**Шаг 1.** Загрузите архив установочных файлов приложения HLA-Эксперт.

**Шаг 2.** Создайте отдельный каталог для размещения файлов программы.

**Шаг 3.** Распакуйте архив вместе с подкаталогами в данный каталог.

Основным исполняемым файлом программы «HLA-Эксперт» является HLAExpert.jar.

### 3.3 Обновление HLA-Эксперт

Обновление HLA-Эксперт может быть двух видов:

1. Обновление программного обеспечения HLA-Эксперт.
2. Обновление базы данных IPD-IMGT/HLA.

Примечание. Новая версия ПО HLA-Эксперт может быть доступна после внесения изменений в комплект документации регистрационного досье в Росздравнадзоре в установленном порядке.

#### 3.3.1 Обновление программного обеспечения HLA-Эксперт

Для обновления HLA-Эксперт выберите пункт «Обновление программы» меню «Сервис».

При наличии обновления на экране отобразится окно с соответствующим сообщением (рисунок 8).

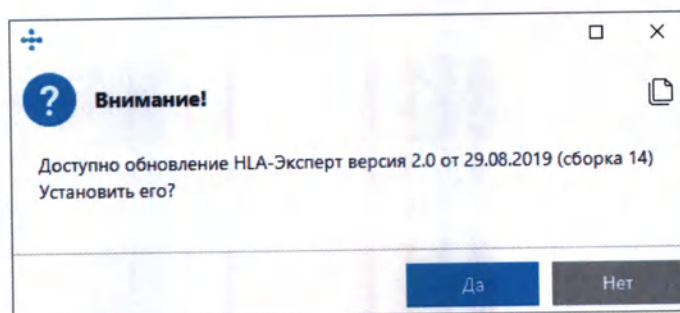
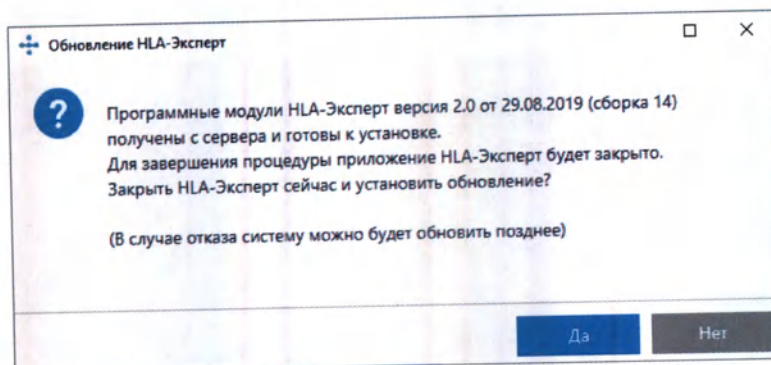


Рисунок 8 – Окно с сообщением о наличии обновлений HLA-Эксперт

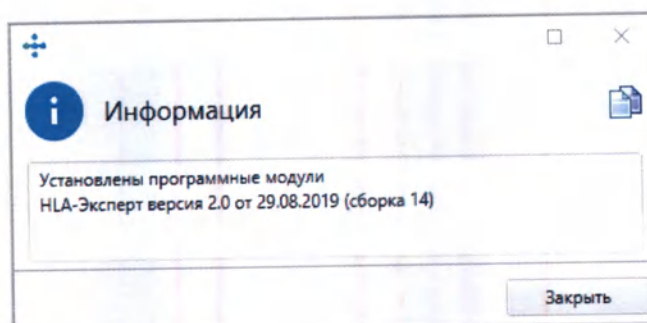
Для запуска обновления нажмите кнопку [Да] в данном окне.

С сервера будет загружено обновление HLA-Эксперт, после чего на экране отобразится окно с сообщением о продолжении процесса установки обновления (рисунок 9).



**Рисунок 9 – Установка обновления HLA-Эксперт**

Нажмите кнопку **[Да]**. Запустится процесс обновления программы, по завершении которого на экране отобразится соответствующее сообщение (рисунок 10).



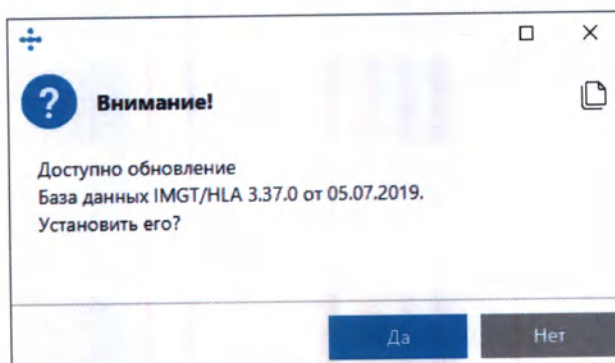
**Рисунок 10 – Завершение установки обновлений**

Нажмите кнопку **[Заккрыть]**, после чего HLA-Эксперт будет перезапущен автоматически.

### **3.3.2 Обновление базы данных IPD-IMGT/HLA**

Для обновления базы данных IPD-IMGT/HLA выберите пункт «Обновление данных IMGT-HLA» меню «Сервис».

В случае наличия обновлений с сервера будет загружена последняя версия файлов данных IMGT-HLA, после чего на экране отобразится окно с сообщением о продолжении процесса установки обновления (рисунок 11).



**Рисунок 11 – Сообщение о наличии новой базы данных IMGT-HLA**



Далее программа обновит файлы данных IMGT-HLA, после чего на экране отобразится соответствующее сообщение (рисунок 12).

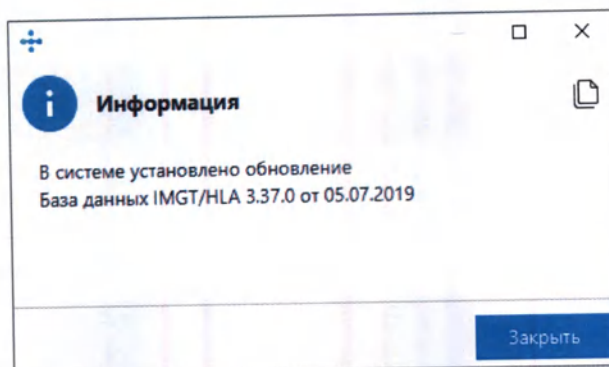


Рисунок 12 – Успешное обновление файлов данных IMGT-HLA

### 3.4 Настройка параметров HLA-Эксперт

Для настройки параметров HLA-Эксперт выберите пункт «Параметры приложения» в меню «Сервис».

На экране отобразится окно с параметрами HLA-Эксперт (рисунок 13).

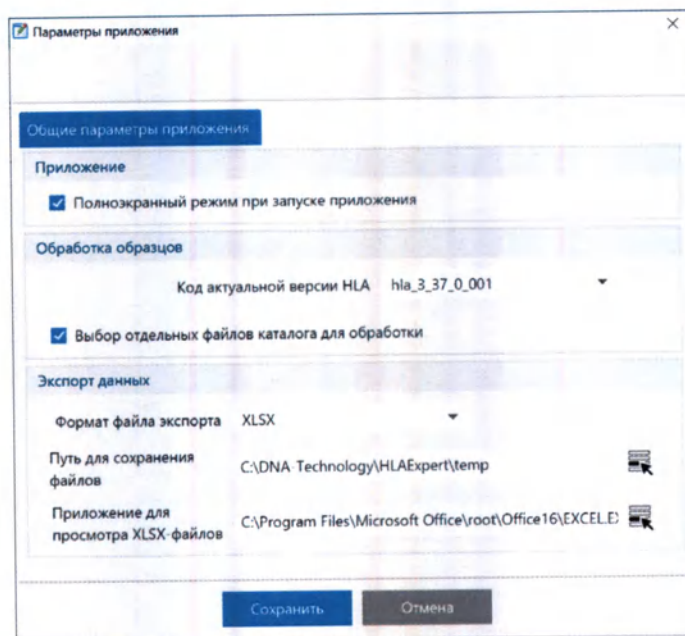


Рисунок 13 – Настройка параметров приложения

В качестве настройки HLA-Эксперт доступны для редактирования следующие параметры:

– полноэкранный режим при запуске приложения – при установленном флаге выбора HLA-Эксперт после запуска будет отображаться во всю ширину Рабочего стола;

– код актуальной версии HLA – переключение между версиями БД IPD-IMGT/HLA (по умолчанию выбрана последняя версия);

– возможность выбора отдельных файлов каталога для обработки – при установленном флаге выбора пользователь сможет добавлять отдельные файлы для обработки, а не весь каталог целиком;

– формат экспорта – выбор формата файла, создаваемого при выгрузке данных (\*.xlsx или \*.csv);

– путь для сохранения файлов – каталог, в котором будут сохраняться файлы с данными;

– приложение для просмотра xlsx-файлов – сторонняя программа, предназначенная для просмотра файлов указанного формата (например, Microsoft Excel).

После изменения параметров нажмите кнопку **[Сохранить]**.

### **3.4.1 Настройка темы HLA-Эксперт**

Программа HLA-Эксперт реализована в двух графических интерфейсах (темах). Переключение между ними осуществляется нижеописанным способом.

Откройте пункт «Темы» в меню «Сервис» и выберите интересующую вас тему: «Классическая» или «Светлая» (выбрана по умолчанию). Изменение интерфейса произойдет автоматически без перезапуска программы.

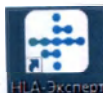


## 4 ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

### 4.1 Запуск программы

Запуск программы HLA-Эксперт осуществляется одним из следующих способов:

1. В ОС Windows:



- с помощью ярлыка HLA-Эксперт на Рабочем столе;
- с помощью пункта «HLA-Эксперт» в меню «Пуск» (путь по умолчанию Пуск – DNA-Technology).

2. В ОС семейства Unix или Mac:

- запустив на выполнение файл HLAExpert.jar;
- с помощью командной строки: >[Путь к папке Java Runtime Environment]\bin\java -jar HLAExpert.jar.

В результате загрузки на экране отобразится окно программы (рисунок 14).

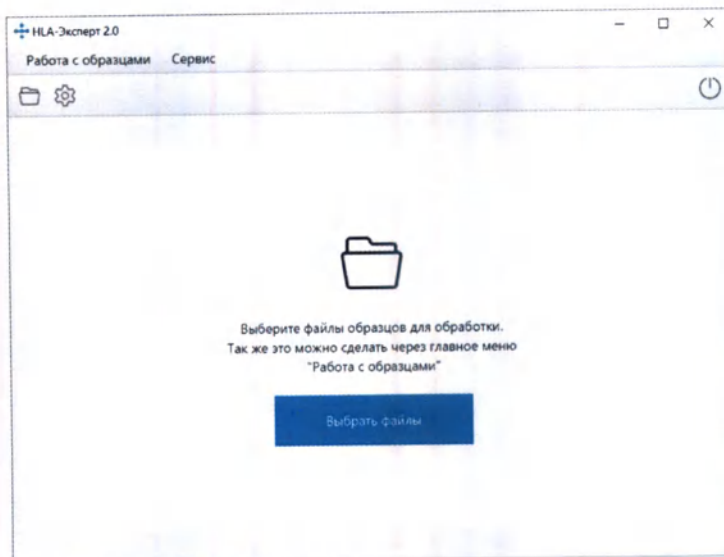


Рисунок 14 – Стартовое окно HLA-Эксперт

### 4.2 Загрузка файлов образцов в HLA-Эксперт

Получение результатов типирования осуществляется на основании файлов в формате \*.fastq, содержащих сведения об исследуемых образцах.

Файлы необходимо получить с компьютера, управляющего прибором. За получением детальных инструкций о получении файлов в формате \*.fastq, следует обратиться к эксплуатационной документации производителя, поставляемой с прибором.

Загрузка файлов образцов в HLA-Эксперт осуществляется одним из следующих способов:

- с помощью кнопки  на панели инструментов;
- с помощью кнопки «Выбрать файлы», расположенной в рабочей области программы (данная кнопка доступна только при запуске программы, см. рисунок 14);
- с помощью меню «Работа с образцами – Обработка файлов образцов» (рисунок 15).

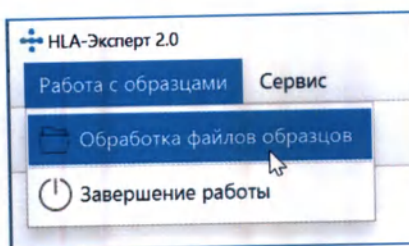


Рисунок 15 – Переход к загрузке файлов образцов с помощью пункта меню

После выполнения одного из описанных действий на экране отобразится стандартное окно ОС для поиска и выбора нужных файлов (рисунок 16). В данном окне откройте каталог с файлами образцов, выделите любой файл и нажмите кнопку **[Открыть]**. Все файлы из выбранного каталога будут загружены в программу.

Примечание. Для выборочной загрузки одного или нескольких файлов из каталога необходимо в настройках программы установить флаг в строке «Выбор отдельных файлов каталога для обработки» (см. п. 3.4 данного руководства).

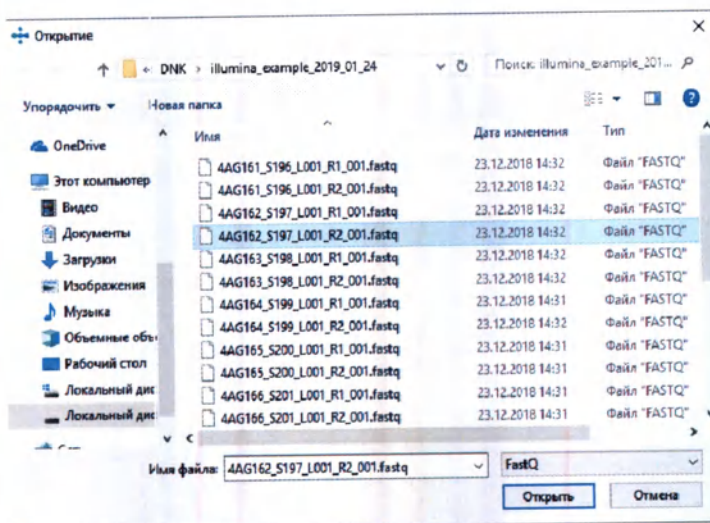
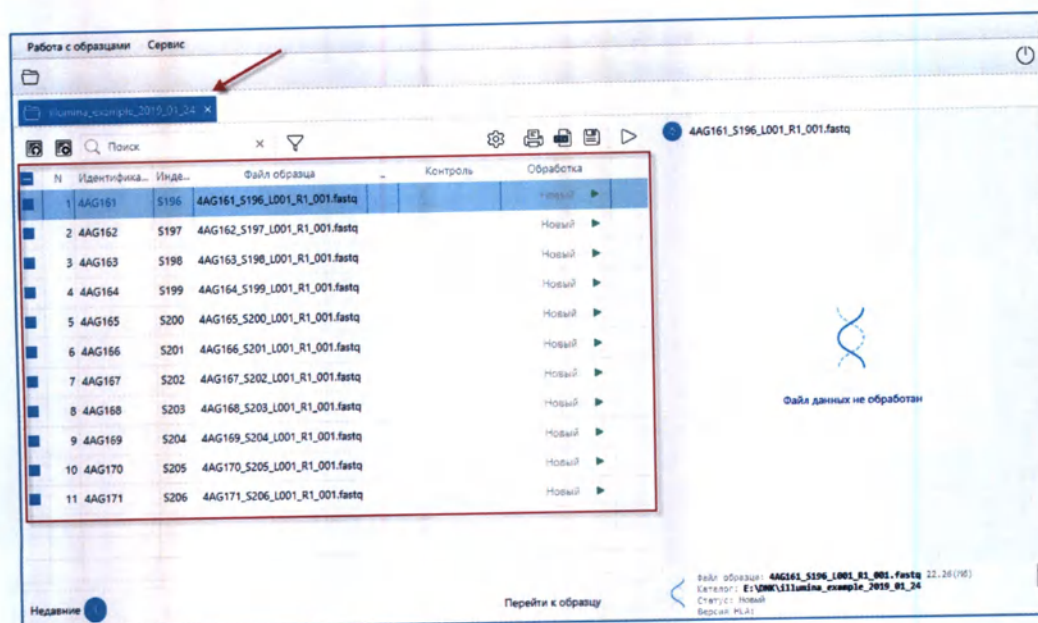


Рисунок 16 – Загрузка файлов в формате \*.fastq в программу

Выбранные файлы отобразятся в HLA-Эксперт на новой вкладке в виде таблицы данных (рисунок 17).





**Рисунок 17 – Отображение файлов, загруженных в HLA-Эксперт**

Примечание. В перечне отображаются только файлы с суффиксом R1, при этом соответствующие им файлы с суффиксом R2 загружаются в программу автоматически, но не отображаются в общем перечне.

Для каждого файла образца отображаются следующие данные:

- порядковый номер в текущем перечне;
- идентификатор образца;
- индекс;
- значок по результатам обработки файла:
  -  – предупреждение о необходимости дополнительного контроля гена;
  -  – ошибка;
  -  – новый аллель;
  -  – ошибка (типировано более 2-х аллелей, возможна контаминация);
- данные контроля качества файла;
- наименование файла;
- статус обработки файла.

Примечание. Настройка данных, отображающихся в столбцах «Идентификатор» и «Индексы», описана в п. 4.2.4 данного руководства.

#### **4.2.1 Статусы обработки файлов образцов**

Возможные статусы обработки файла:

- «Новый» – файл только что загружен, обработка не выполнялась;
- «Обработан» – обработка файла успешно завершена;
- «Ожидание» – файл в очереди на обработку;
- «Ошибка» – возникла ошибка при обработке файла или обработка файла была

остановлена пользователем.

#### 4.2.2 Переход к просмотру результатов обработки файла образцов

Ниже перечня загруженных файлов отображается экспресс-панель для быстрого перехода к просмотру результатов последних просмотренных файлов (рисунок 18).

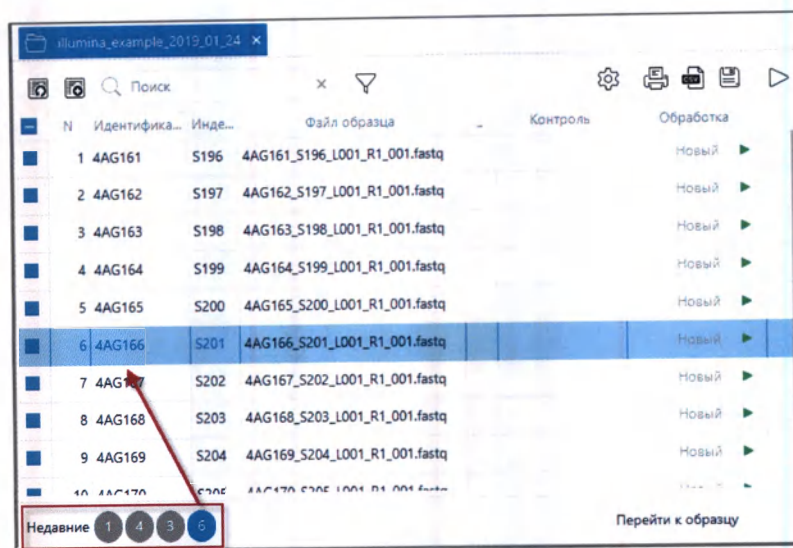


Рисунок 18 – Экспресс-панель для перехода к просмотру результатов обработки

Данная экспресс-панель содержит порядковые номера десяти недавно просмотренных файлов образцов, при этом текущий открытый файл выделяется цветом.

Дополнительно в программе реализована возможность быстрого перехода к определенному файлу – для этого введите порядковый номер нужного файла в поле «Перейти к образцу» и нажмите клавишу <Enter>. Программа выделит указанный файл в перечне и отобразит результат его обработки, если типирование уже было проведено (рисунок 19).

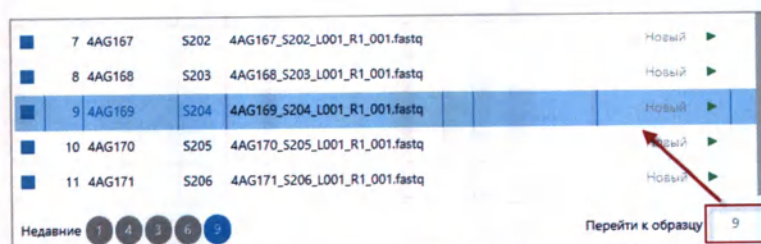


Рисунок 19 – Пример перехода к образцу



### 4.2.3 Поиск файла образца

Поиск файла образца осуществляется по частичному соответствию введенных данных искомым параметрам.

Для поиска нужного файла образца введите искомый фрагмент названия объекта в текстовое поле, расположенное над реестром файлов образцов, и нажмите клавишу <Enter>. Строка с файлом образца, отвечающему параметру поиска, будет выделена (рисунок 20).

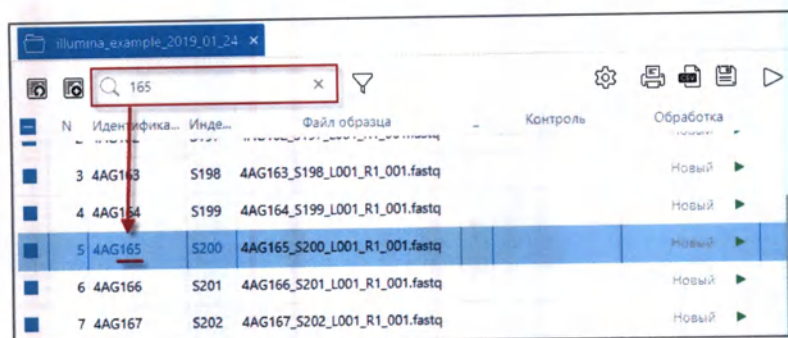


Рисунок 20 – Пример выполнения поиска файла образца

### 4.2.4 Настройка отображения перечня файлов образцов

В HLA-Эксперт реализована возможность настройки сведений, которые отображаются в перечне файлов образцов в столбцах «Идентификатор» и «Индексы» (рисунок 21).

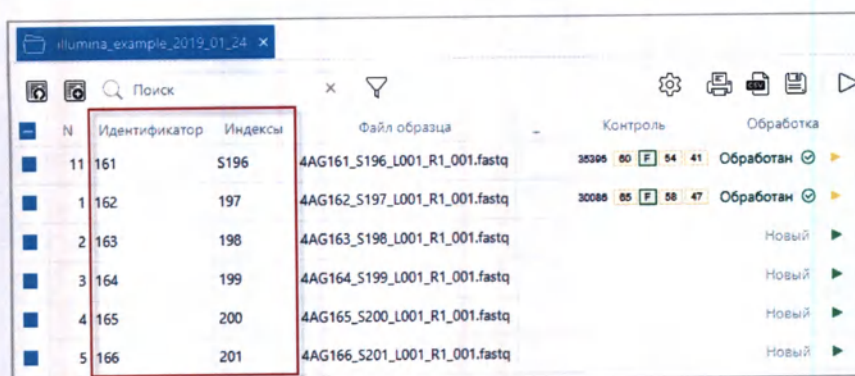


Рисунок 21 – Столбцы с настраиваемым содержимым

Сведения для данных столбцов берутся из имени файла образца и заполняются автоматически, согласно заданным настройкам.

Для настройки параметров отображения нажмите кнопку  над реестром файлов. На экране отобразится окно редактирования параметров просмотра (рисунок 22).

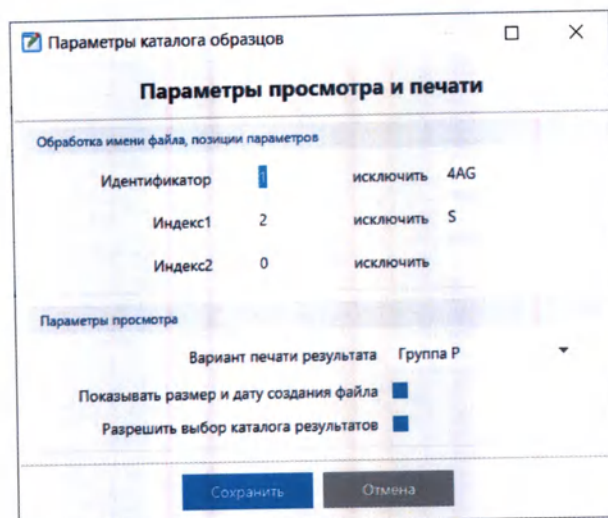


Рисунок 22 – Окно редактирования параметров просмотра

Для **настройки идентификатора образца** укажите номер позиции в имени файла, содержащей идентификатор образца. В поле «исключить» укажите данные, которые присутствуют на указанной позиции, но не являются частью идентификатора (рисунок 23).

Пример. Предположим, есть файл образца с именем «4AG161\_S196\_L001\_R1\_001», его идентификатор – «161». Как видно из имени файла идентификатор расположен в самом начале, в комбинации «4AG161». Символ «\_» разделяет имя файла на условные позиции (также возможно использование символа «-»). Комбинация «4AG161» – первая позиция. Таким образом, в поле «Идентификатор» указываем значение «1», а так как «4AG» не является частью идентификатора, в поле «исключить» указываем «4AG». После сохранения настроек в столбце «Идентификатор» для данного файла образца будет указано «161».

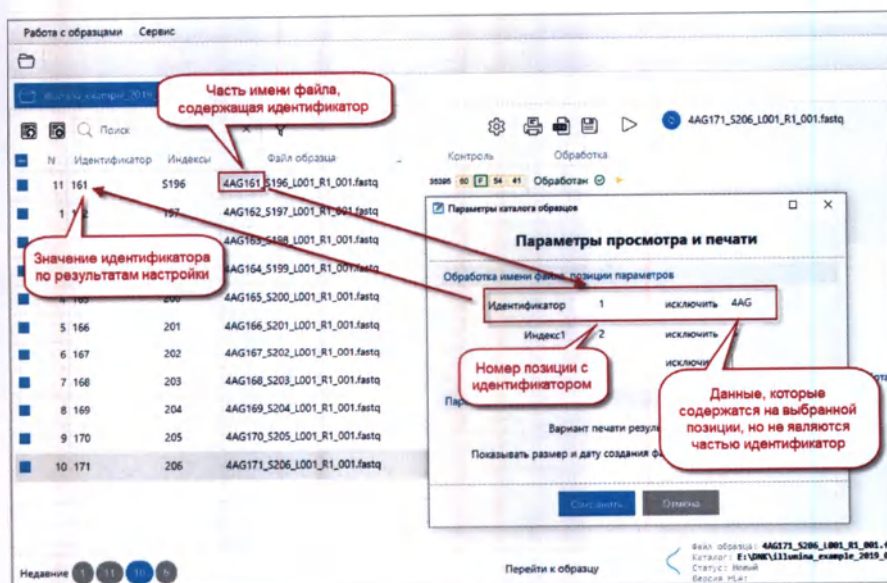


Рисунок 23 – Настройка идентификатора



Столбец «Индексы» может включать до двух параметров, записанных через «/». Настройка столбца осуществляется аналогично настройке идентификатора. Если для индекса указать значение «0», данный индекс выводиться не будет (рисунок 24).

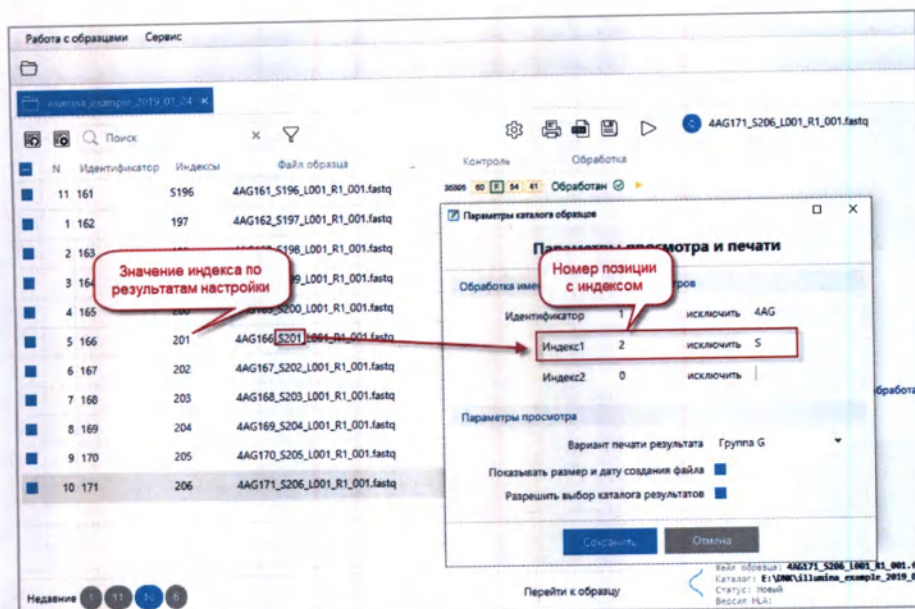


Рисунок 24 – Настройка индексов

**Вариант печати результата** позволяет выбрать вид отчета с полученными результатами по списку образцов, используемый по умолчанию.

**Показывать размер и дату создания файла** добавляет в колонке имени файла информацию о его размере и дате создания файла.

**Разрешить выбор каталога результатов** позволяет выбирать каталог для хранения результатов расчета. Если данная настройка не установлена (по умолчанию), данные результатов расчетов хранятся в каталоге исходных файлов образцов – \*.fastq.

#### 4.2.5 Добавление файла образца в перечень

Для добавления файла образца в сформированный перечень нажмите кнопку , расположенную над реестром файлов (рисунок 25).

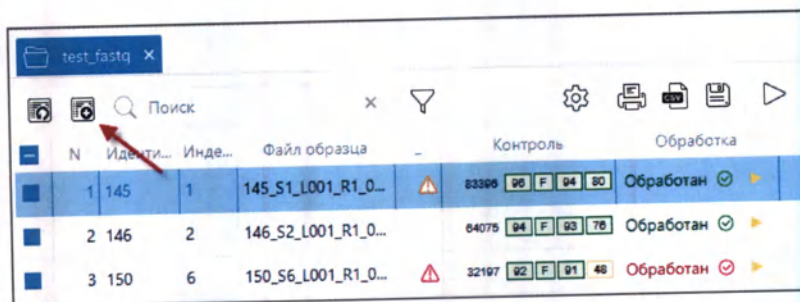


Рисунок 25 – Кнопка для добавления файла образца

На экране отобразится стандартное окно ОС для поиска и выбора файлов. Укажите нужный файл образца и нажмите кнопку **[Открыть]**. Выбранный файл отобразится в общем перечне.

#### 4.2.6 Обновление перечня файлов образцов

Для обновления перечня файлов образцов нажмите кнопку , расположенную над реестром файлов (см. рисунок 25). После чего данные в перечне будут обновлены.

#### 4.2.7 Настройка фильтрации файлов образцов

В HLA-Эксперт реализована возможность фильтрации загруженных файлов образцов.

Для настройки фильтра нажмите кнопку  над реестром файлов образцов (рисунок 26).

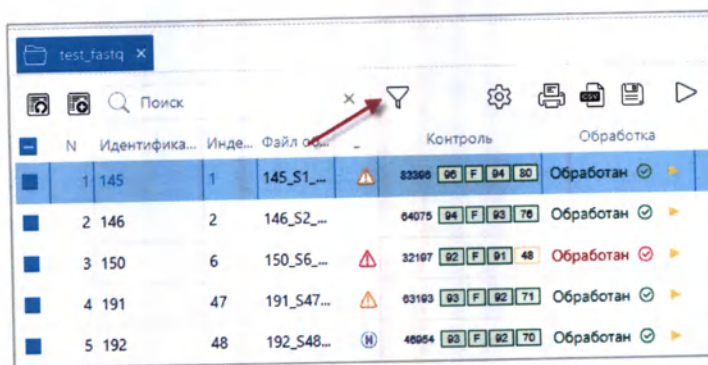


Рисунок 26 – Кнопка для настройки параметров фильтрации

На экране отобразится окно с параметрами фильтрации (рисунок 27).



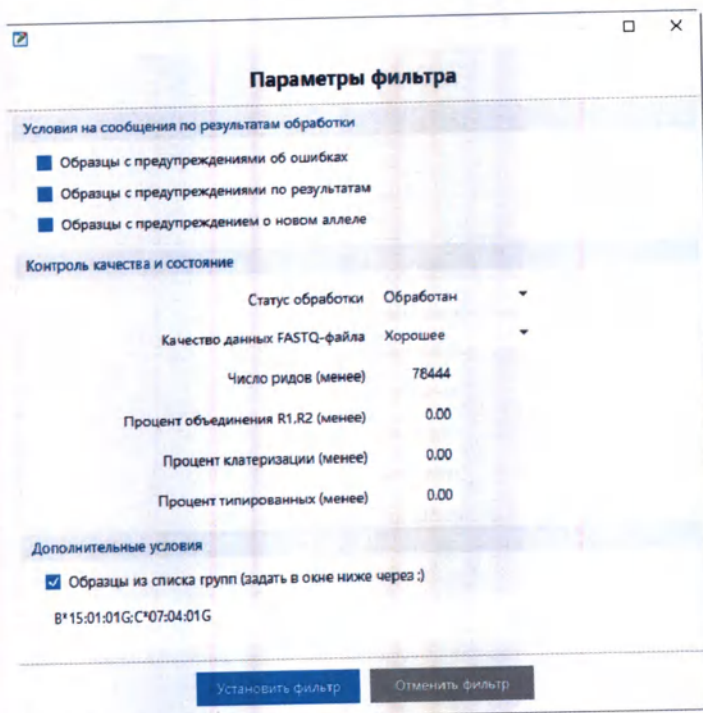


Рисунок 27 – Параметры фильтрации файлов образцов

Установите параметры фильтрации, используя предоставленные настройки.

Нажмите кнопку **[Установить фильтр]**. В реестре файлов образцов отобразятся только те записи, что полностью соответствуют заданным параметрам (рисунок 28).

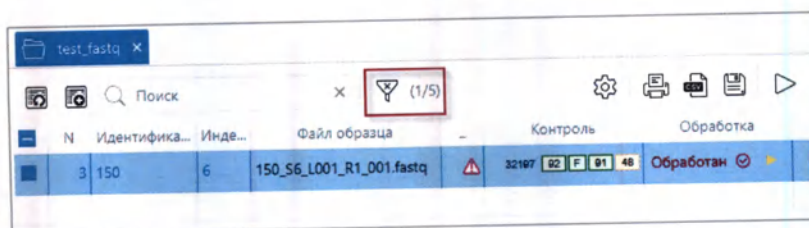


Рисунок 28 – Пример настройки фильтрации

Чтобы снять параметры фильтрации, нажмите кнопку . На экране отобразится окно с параметрами фильтрации файлов образцов, нажмите кнопку **[Отменить фильтр]**. В перечне файлов вновь отобразятся все загруженные файлы образцов без ограничений.

#### 4.2.8 Контроль качества файлов образцов

При обработке образца файла осуществляется контроль качества данного файла. Критериями качества выступают:

- количество ридов в образце;
- процент объединения R1 и R2;
- качество данных FASTQ файла;

- процент кластеризованных ридов;
- процент ридов, использованных в результатах типирования.

Данные о качестве отображаются непосредственно в строке с записью о файле в столбце «Контроль». При наведении курсора на значение параметра на экране отобразится всплывающая подсказка с детальной информацией по результатам контроля (рисунок 29).

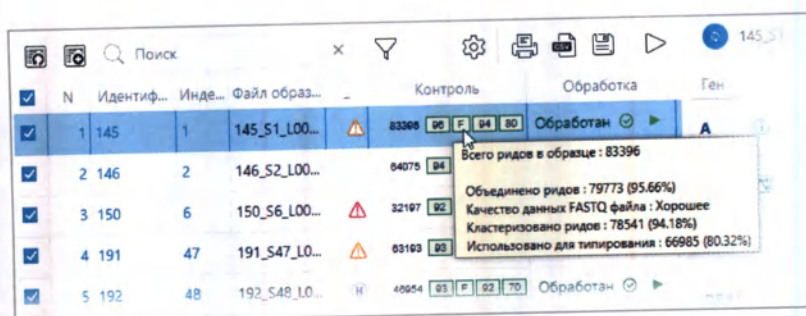


Рисунок 29 – Просмотр результатов контроля качества

Параметр «Качество данных FASTQ файла» определяет средневзвешенное качество чтения позиций в рядах FASTQ файла и может принимать значение: Хорошее, Среднее или Плохое (подробнее см. п. 4.2.9).

#### 4.2.9 Анализ качества данных файлов FASTQ

Для выполнения анализа вызовите контекстное меню для нужного файла образца (выделите запись о файле и нажмите правую кнопку мыши) и выберите нужный тип анализа (рисунок 30).

В программе реализованы следующие виды анализа файла FASTQ:

- анализ качества объединенного FASTQ файла (R1+R2);
- анализ качества FASTQ файла (R1);
- анализ качества FASTQ файла (R2).

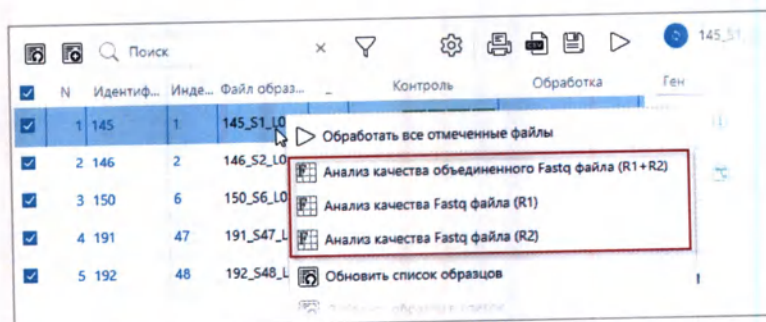
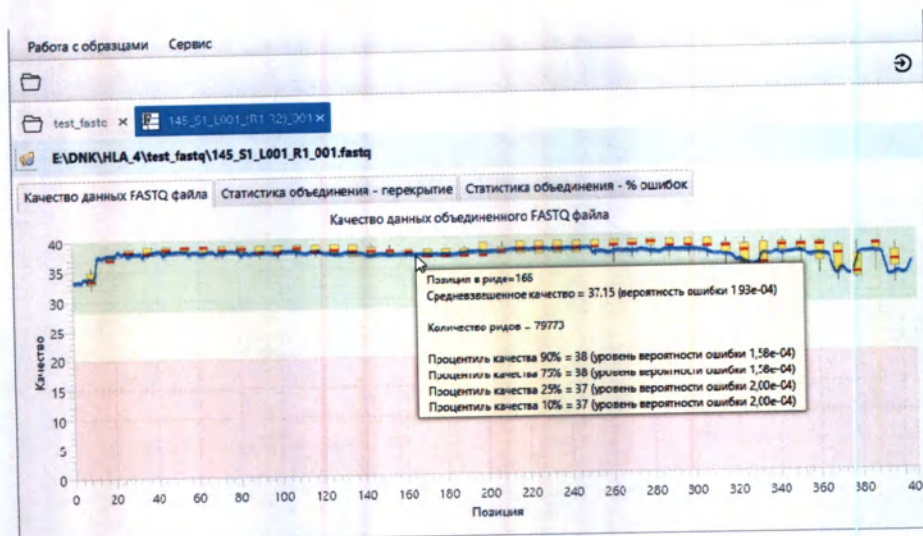


Рисунок 30 – Переход к анализу качества FASTQ файла

Данные с результатами анализа отобразятся на новой вкладке (рисунок 31).





**Рисунок 31 – Просмотр анализа качества FASTQ файла**

На диаграмме представлены средневзвешенные значения показателей качества чтения (Q) символов в рядах. Данные берутся из FASTQ файла. Уровнем значений хорошего качества считается  $Q \geq 28$ , среднего –  $28 > Q > 20$ , плохого –  $Q < 20$ .

Значение Q представлено по оси Y, по оси X – позиции символов в рядах.

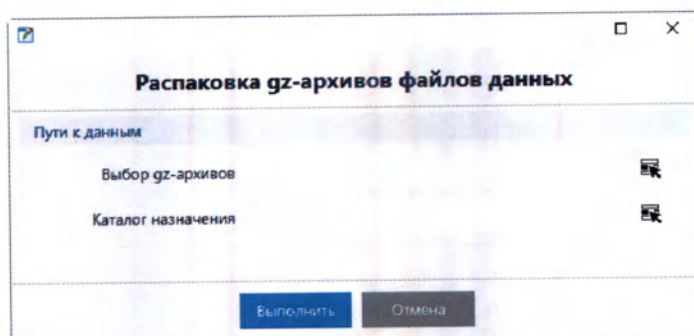
Графические элементы диаграммы:

- синяя кривая – средневзвешенное значение Q;
- желтый прямоугольник – значение процентиля Q от 25% до 75%;
- черный отрезок – значение процентиля Q от 10% до 90%
- красная метка – среднее значение Q.

#### **4.2.10 Распаковка gz-архивов файлов данных**

Чтобы извлечь fastq-файлы из архива формата \*.gz, выберите пункт «Распаковка gz-архивов» в меню «Сервис».

На экране отобразится окно с полями для выбора \*.gz файла, а также каталога, в котором будут сохранены разархивированные файлы \*.fastq (рисунок 32).



**Рисунок 32 – Окно выбора исходного каталога и каталога назначения**

Для выбора gz-архива нажмите кнопку , расположенную с одной строке с нужным полем. На экране отобразится стандартное окно ОС для поиска и выбора файлов. Перейдите к каталогу с нужными gz-архивами, выделите те из них, что необходимо разархивировать и нажмите кнопку **[Открыть]**.

Запись пути до выбранных архивов, а также их количество отобразится в окне «Распаковка gz-архивов файлов данных» (рисунок 33).

Аналогичным образом укажите каталог, в котором будут сохранены разархивированные fastq-файлы (каталог назначения).

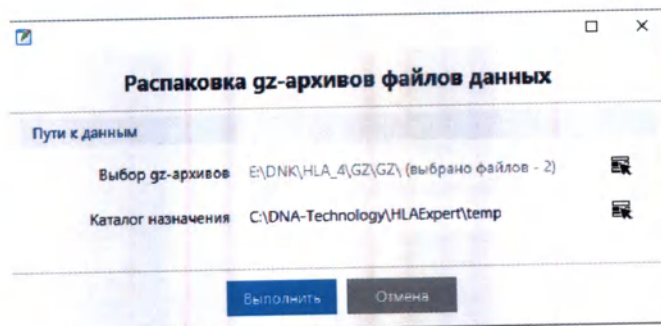


Рисунок 33 – Пример выбора каталогов

Нажмите кнопку **[Выполнить]**.

На экране отобразится процесс распаковки архивов, а по его завершении – окно с сообщением об успешно выполненной операции (рисунок 34).

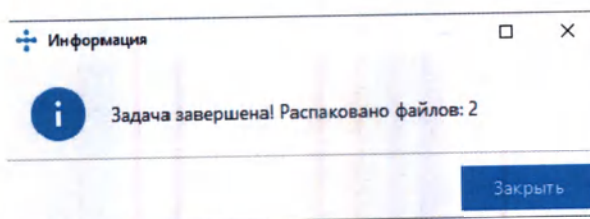


Рисунок 34 – Сообщение об успешном извлечении данных из выбранного архива

Нажмите кнопку **[Закреть]**. Извлеченные fastq-файлы сохранены в выбранном каталоге.

### 4.3 Проведение обработки файлов образцов

#### 4.3.1 Запуск обработки одного файла образца

Для запуска обработки одного файла образца нажмите кнопку  в строке с нужным файлом (рисунок 35).



|  | N | Идентифика... | Инде... | Файл образца                  | Контроль | Обработка |
|--|---|---------------|---------|-------------------------------|----------|-----------|
|  | 1 | 4AG161        | S196    | 4AG161_S196_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |
|  | 2 | 4AG162        | S197    | 4AG162_S197_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |
|  | 3 | 4AG163        | S198    | 4AG163_S198_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |
|  | 4 | 4AG164        | S199    | 4AG164_S199_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |

Рисунок 35 – Запуск обработки одного файла образца

#### 4.3.2 Запуск обработки нескольких файлов образцов

Для запуска обработки нескольких файлов образцов выделите нужные файлы, установив флажок выбора в соответствующих строках таблицы, и нажмите кнопку ▶ на панели инструментов (рисунок 36).

|                                     | N | Идентифика... | Инде... | Файл образца                  | Контроль | Обработка |
|-------------------------------------|---|---------------|---------|-------------------------------|----------|-----------|
|                                     | 1 | 4AG161        | S196    | 4AG161_S196_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |
|                                     | 2 | 4AG162        | S197    | 4AG162_S197_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3 | 4AG163        | S198    | 4AG163_S198_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4 | 4AG164        | S199    | 4AG164_S199_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |
|                                     | 5 | 4AG165        | S200    | 4AG165_S200_L001_R1_001.fastq |          | Новый ▶   |

Рисунок 36 – Запуск обработки набора файлов

#### 4.3.3 Запуск обработки всех загруженных файлов образцов

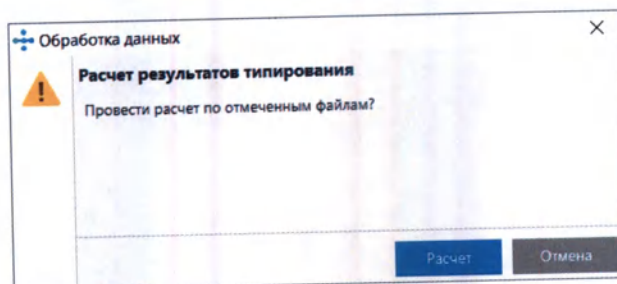
Для обработки всех файлов образцов нажмите кнопку, показанную на рисунке 37, после чего нажмите кнопку ▶ на панели инструментов, как в п. 4.3.2.

|                                     | N | Идентифика... |
|-------------------------------------|---|---------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1 | 4AG161        |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2 | 4AG162        |

Рисунок 37 – Выбор всех доступных файлов образцов

#### 4.3.4 Проведение обработки файла образца

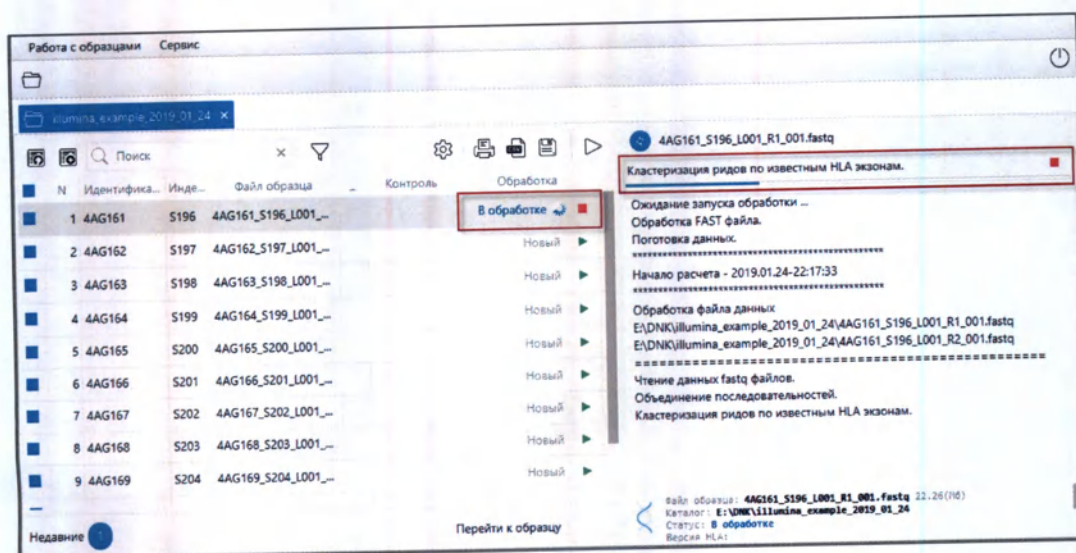
После запуска обработки на экране отобразится окно с подтверждением запуска расчета данных по выбранному образцу или набору образцов (рисунок 38).



**Рисунок 38 – Подтверждение запуска расчета данных**

Подтвердите свой выбор, нажав кнопку **[Расчет]**.

В окне программы отобразится процесс обработки каждого выбранного файла (и соответствующих им файлов R2) с указанием текущей операции (рисунок 39). Статус файла в реестре изменится на «В обработке».



**Рисунок 39 – Расчет данных для выбранного файла**

По завершении обработки статус файла изменится на «Обработан», а в правой части рабочей области программы отобразится результат типирования (рисунок 40).



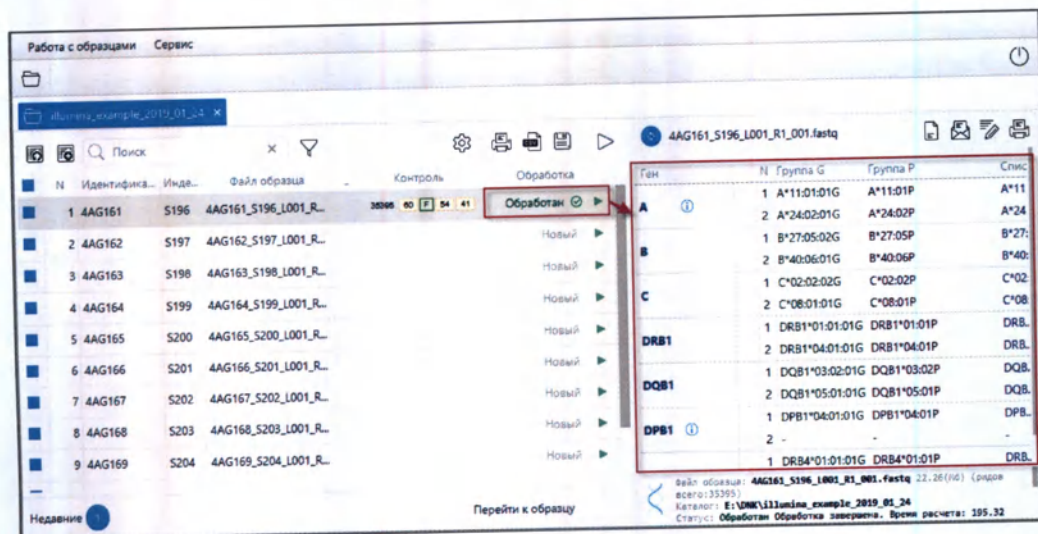


Рисунок 40 – Результат обработки файла

Также в строке с записью файла отобразятся результаты контроля качества файла (рисунок 41).

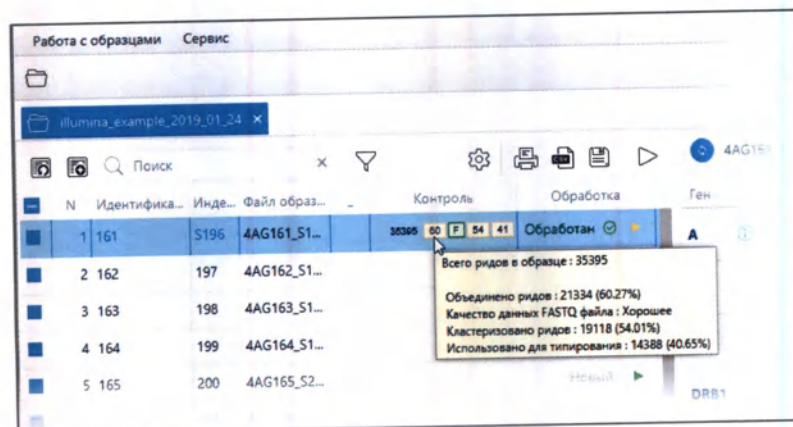


Рисунок 41 – Результаты контроля качества файла образца

После завершения обработки результаты типирования автоматически сохраняются в файл формата \*.csv, который отобразится в каталоге с исходными файлами образцов. Для каждого файла образца будет создан свой файл результатов.

#### 4.3.5 Остановка обработки файла образца

Для остановки операции расчета нажмите кнопку  в списке файлов (если обработка проводится для одного файла) или аналогичную кнопку в строке с процессом обработки файла (см. рисунок 39). На экране отобразится окно с сообщением о подтверждении остановки операции расчета (рисунок 42).

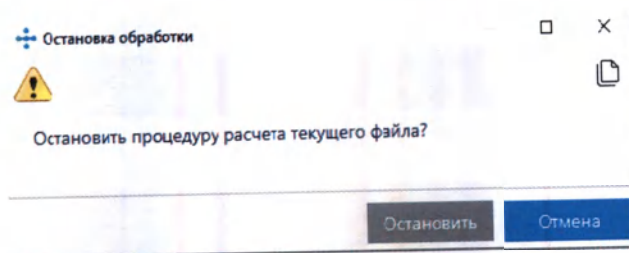


Рисунок 42 – Подтверждение остановки операции расчета файла

Подтвердите свой выбор, нажав кнопку **[Остановить]**, после чего проведение обработки будет остановлено, а статус файла образца изменится на «Ошибка» (рисунок 43).

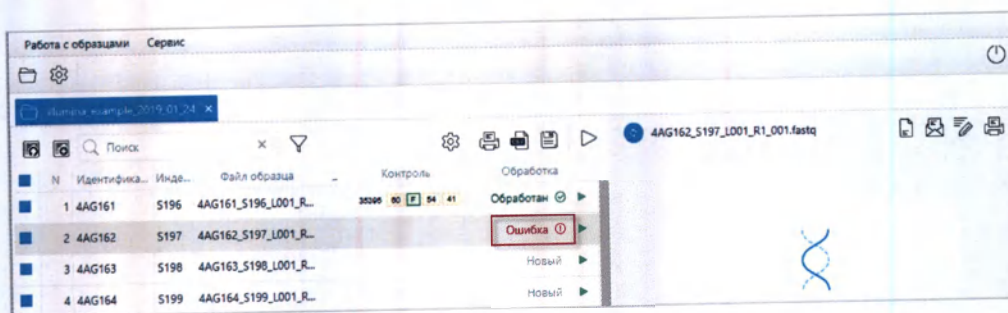


Рисунок 43 – Отмена обработки файла

#### 4.3.6 Повторный запуск обработки файла образца

Для повторной обработки файла нажмите кнопку  в строке с нужным файлом. Далее подтвердите свой выбор, нажав кнопку **[Да]** в появившемся окне (рисунок 44), после чего программа проведет обработку и отобразит результаты.

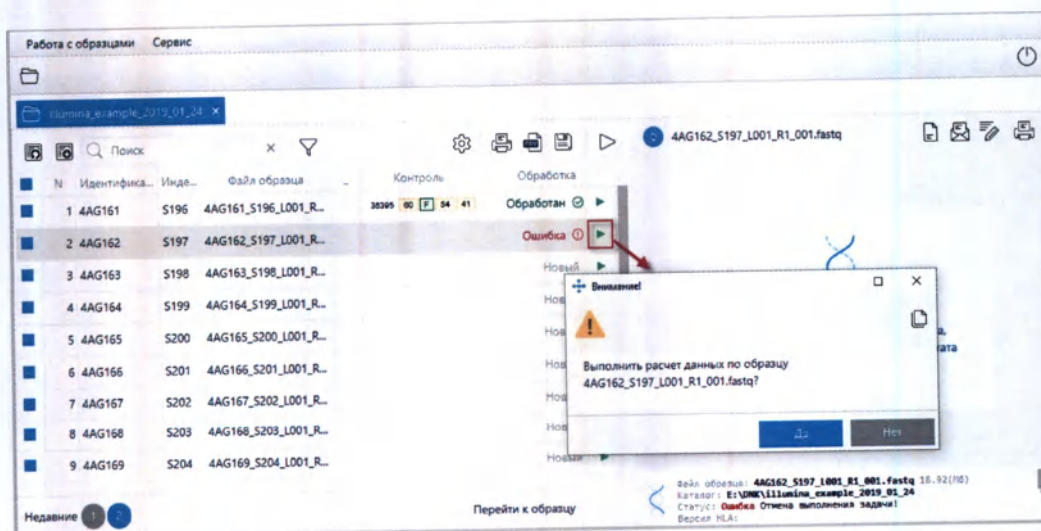


Рисунок 44 – Повторный запуск обработки файла образца



## 4.4 Работа с результатами типирования

### 4.4.1 Просмотр результатов

Результат проведения типирования отображается в правой части экрана для выбранного файла образца (рисунок 45).

| Ген  | N | Группа G       | Группа P    | Список аллелей  |
|------|---|----------------|-------------|-----------------|
| A    | 1 | A*03:01:01G    | A*03:01P    | A*03:01:01/A*   |
|      | 2 | -              | -           | -               |
| B    | 1 | B*35:01:01G    | B*35:01P    | B*35:01:01/B*   |
|      | 2 | B*41:02:01G    | B*41:02P    | B*41:02:01/B*   |
| C    | 1 | C*04:01:01G    | C*04:01P    | C*04:01:01/C*   |
|      | 2 | C*17:01:01G    | C*17:01P    | C*17:01:01/C*   |
| DRB1 | 1 | DRB1*01:01:01G | DRB1*01:01P | DRB1*01:01:01/D |
|      | 2 | DRB1*13:03:01G | DRB1*13:03P | DRB1*13:03:01   |
| DQB1 | 1 | DQB1*03:01:01G | DQB1*03:01P | DQB1*03:01:01   |
|      | 2 | DQB1*05:01:01G | DQB1*05:01P | DQB1*05:01:01   |
| DPB1 | 1 | DPB1*04:01:01G | DPB1*04:01P | DPB1*04:01:01   |
|      | 2 | -              | -           | -               |

Файл образца: 145\_S1\_L001\_R1\_001.fastq (44,5 Кб) (размер всего: 83396)  
Каталог: E:\DNA\HLA\_4\test\_fastq  
Статус: Обработан Обработка завершена. Время расчета: 456.39 сек.  
24.02.2019-12:11:08 (456.39 сек.)

Рисунок 45 – Просмотр результатов типирования

Результаты генотипирования представлены в трех разных форматах.

#### Формат группы G

Группы, обозначаемые буквой «G» объединяют аллели, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности экзонов, кодирующие антигенсвязывающие домены (экзоны 2 и 3 для аллелей HLA I класса и экзон 2 – для аллелей HLA II класса). Обозначенная группа содержит как минимум шесть цифр, а буква «G» следует за первыми 3 полями аллеля с наименьшим номером в группе (A\*01:01:01G). Состав всех групп доступен на сайте международной ассоциации иммуногенетиков: [http://hla.alleles.org/alleles/g\\_groups.html](http://hla.alleles.org/alleles/g_groups.html).

#### Формат группы P

Группы, обозначаемые буквой «P» объединяют аллели, имеющие нуклеотидные последовательности, которые кодируют одну и ту же последовательность белка для антигенсвязывающих доменов (экзоны 2 и 3 для аллелей HLA I класса и экзона 2 – для аллелей HLA II класса). Обозначенная группа содержит как минимум четыре цифры, а буква «P» следует за первыми 2 полями аллеля с наименьшим номером в группе (A\*01:01P). Состав всех групп доступен на сайте международной ассоциации иммуногенетиков: [http://hla.alleles.org/alleles/p\\_groups.html](http://hla.alleles.org/alleles/p_groups.html).

#### Формат списка аллелей



В данном формате отображаются все аллели, которые входят в группу G с уточнением дополнительных экзонов для HLA I/II классов. Уточнение по экзонам, не кодирующим антигенсвязывающий домен, позволяет отличить истинную гомозиготу от ложной гомозиготы в большом количестве случаев.

Значок  в строке с геном обозначает наличие информационного сообщения по аллелю (рисунок 46).

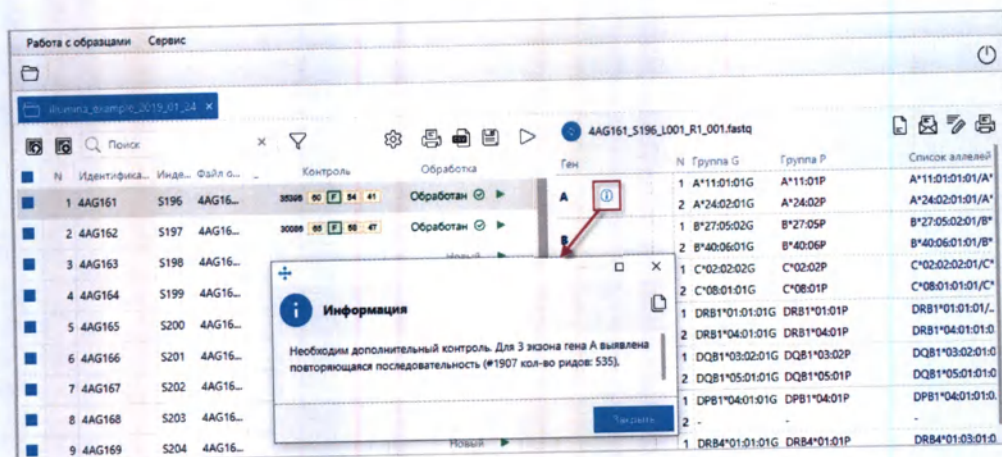


Рисунок 46 – Просмотр информационного сообщения по аллелю

#### 4.4.1.1 Просмотр вариантов неоднозначности цис-транс положений

Гены, по которым найдены неоднозначности цис-транс положений, имеют значок . Для просмотра вариантов необходимо нажать на значок **[+]** (рисунок 47).

KRV1\_4\_S4\_L001\_R1\_001.fastq

| Ген                                                                                             | N | Группа G       | Группа P    | Список аллелей                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------|-------------|--------------------------------------------|
| <b>A</b>                                                                                        | 1 | A*02:01:01G    | A*02:01P    | A*02:01:01:01/A*02:01:01:02L/A*02:01:0...  |
|                                                                                                 | 2 | A*03:01:01G    | A*03:01P    | A*03:01:01:01/A*03:01:01:03/A*03:01:01:... |
| <b>B</b>     | 1 | B*07:02:01G    | B*07:02P    | B*07:02:01:01/B*07:02:01:02/B*07:02:01:... |
|                                                                                                 | 2 | B*41:02:01G    | B*41:02P    | B*41:02:01:01/B*41:02:01:02/B*41:02:01:... |
| <b>C</b>     | 1 | B*07:02:01G    | B*07:02P    | B*07:02:01:01/B*07:02:01:02/B*07:02:01:... |
|                                                                                                 | 2 | B*41:02:01G    | B*41:02P    | B*41:02:01:01/B*41:02:01:02/B*41:02:01:... |
| <b>DRB1</b>  | 1 | B*40:32        | B*40:32     | B*40:32                                    |
|                                                                                                 | 2 | B*42:01:01G    | B*42:01P    | B*42:01:01/B*42:01:04                      |
| <b>DQB1</b>  | 2 | DQB1*05:01:01G | DQB1*05:01P | DQB1*05:01:01:01/DQB1*05:01:01:02/D...     |
| <b>DPB1</b>  | 1 | DPB1*04:01:01G | DPB1*04:01P | DPB1*04:01:01:01/DPB1*04:01:01:02/DP...    |
|                                                                                                 | 2 | -              | -           | -                                          |
| <b>DRB3</b>  | 1 | DRB3*01:01:02G | DRB3*01:01P | DRB3*01:01:02:01/DRB3*01:01:02:02/DR...    |
|                                                                                                 | 2 | DRB3*01:80     | DRB3*01:80  | DRB3*01:80                                 |

Рисунок 47 – Просмотр вариантов неоднозначности цис-транс положений

#### 4.4.1.2 Просмотр списка аллелей для гена

Для просмотра списка аллелей одного из генов кликните указателем «мыши» на данный список, после чего он отобразится в отдельном окне (рисунок 48).



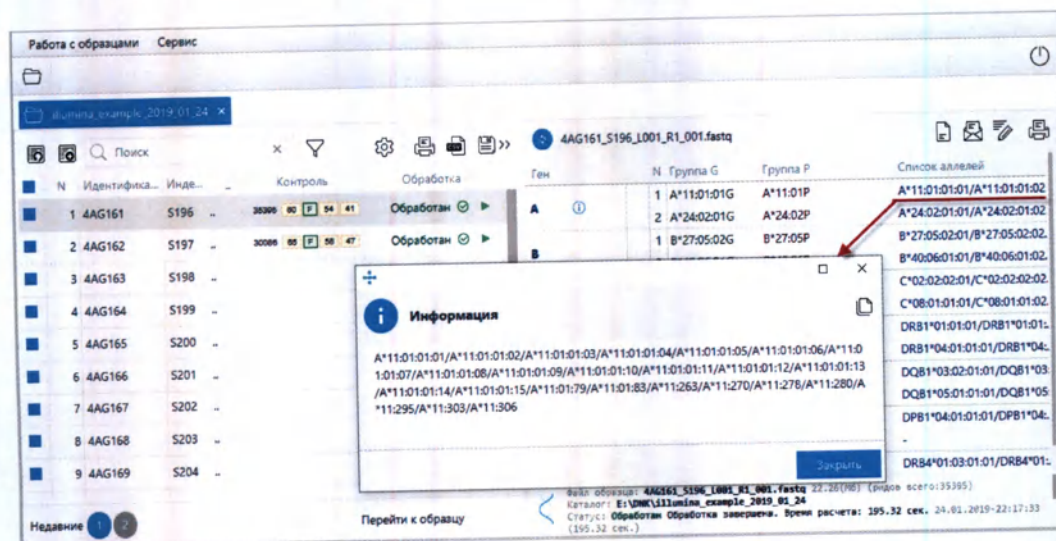


Рисунок 48 – Пример просмотра списка аллелей

#### 4.4.2 Просмотр формы статистики

Для просмотра статистических данных по конкретному образцу необходимо нажать кнопку  над результатами типирования. Откроется форма просмотра данных, которая содержит несколько вкладок, на которых представлены промежуточные результаты этапов обработки файла.

### Вкладка «Результат по аллелям»

На вкладке приведены результаты анализа распределения ридов по аллелям (рисунок 49), на основе которых проведен анализ (таблица 3).

HLA-Эксперт 2.0

Работа | Обработка | Сервис

ERRORS | 2019-07-22-182101 | C:\VLS\_4\_S4\_L001\_R1\_501.calc

C:\NGS\_DATA\ERRORS\results\2019-07-22-182101\KRV1\_4\_S4\_L001\_R1\_001\_calc.csv

Результаты по аллелям | Аллели | Статистика покрытия | Группы рядов

| Аллель      | T | Эксон 2 |        |       | Эксон 3 |        |       | Эксон 4 |        |        | Итого  |        |         | Коды последовательности.. |         |                           | Список аллелей |
|-------------|---|---------|--------|-------|---------|--------|-------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------------------------|---------|---------------------------|----------------|
|             |   | Кол-во  | Вес(%) | Норм. | Кол-во  | Вес(%) | Норм. | Кол-во  | Вес(%) | Кол-во | Ранг   | Ранг N | Эксон 2 | Эксон 3                   | Эксон 4 |                           |                |
| A*02:01:01G | T | 1332    | 76.16  | 80.83 | 2347    | 50.65  | 62.69 | 786     | 67.58  | 4465   | 143.51 | 1      | 56634   | 56586                     | 56832   | A*02:01:01:01/A*02:01:01  |                |
| A*02:01:01G |   | 1332    | 76.16  |       | 2347    | 50.65  |       | 5       | 0.43   | 3684   | 143.51 | 1      | 56634   | 56586                     | 108809  | A*02:327                  |                |
| A*02:01:01G |   | 1332    | 76.16  |       | 2347    | 50.65  |       |         |        | 3679   | 143.51 | 1      | 56634   | 56586                     |         | A*02:01:08/A*02:01:104    |                |
| A*03:01:01G | T | 292     | 16.70  | 17.72 | 1397    | 30.15  | 37.31 | 317     | 27.26  | 2006   | 55.03  | 2      | 56967   | 56970                     | 56973   | A*03:01:01:01/A*03:01:01  |                |
| A*03:01:01G |   | 292     | 16.70  |       | 1397    | 30.15  |       |         |        | 1689   | 55.03  | 2      | 56967   | 56970                     |         | A*03:01:01:02N/A*03:01:01 |                |
| A*03:89:01  |   | 1332    | 76.16  | 80.83 | 1397    | 30.15  | 37.31 |         |        | 2729   | 5.91   | 3      | 56634   | 56970                     |         | A*03:89:01                |                |
| A*02:01:02  |   | 24      | 1.37   | 1.46  | 2347    | 50.65  | 62.69 | 786     | 67.58  | 3157   | 4.59   | 4      | 95136   | 56586                     | 56832   | A*02:01:02                |                |
| B*07:02:01G | T | 432     | 22.01  | 39.85 | 512     | 16.31  | 72.73 | 263     | 14.14  | 1207   | 112.58 | 1      | 57219   | 57222                     | 56940   | B*07:02:01:01/B*07:02:01  |                |
| B*07:02:01G |   | 432     | 22.01  |       | 512     | 16.31  |       |         |        | 944    | 112.58 | 1      | 57219   | 57222                     |         | B*07:02:06/B*07:02:09/E   |                |
| B*41:02:01G | T | 652     | 33.21  | 60.15 | 192     | 6.12   | 27.27 | 246     | 13.23  | 1090   | 87.42  | 2      | 56589   | 56760                     | 56745   | B*41:02:01:01/B*41:02:01  |                |
| B*41:02:01G |   | 652     | 33.21  |       | 192     | 6.12   |       |         |        | 844    | 87.42  | 2      | 56589   | 56760                     |         | B*41:43                   |                |
| B*40:32     | V | 652     | 33.21  | 60.15 | 512     | 16.31  | 72.73 | 263     | 14.14  | 1427   | 6.84   | 3      | 56589   | 57222                     | 56940   | B*40:32                   |                |
| B*42:01:01G | V | 432     | 22.01  | 39.85 | 192     | 6.12   | 27.27 | 246     | 13.23  | 870    | 3.36   | 4      | 57219   | 56760                     | 56745   | B*42:01:01/B*42:01:04     |                |
| B*42:01:01G |   | 432     | 22.01  |       | 192     | 6.12   |       |         |        | 624    | 3.36   | 4      | 57219   | 56760                     |         | B*42:25                   |                |
| C*17:01:01G | T | 198     | 12.67  | 28.53 | 1829    | 55.12  | 72.90 | 1208    | 58.08  | 3235   | 101.43 | 1      | 58380   | 57003                     | 66064   | C*17:01:01:02/C*17:01:01  |                |
| C*17:01:01G |   | 198     | 12.67  |       | 1829    | 55.12  |       |         |        | 2027   | 101.43 | 1      | 58380   | 57003                     |         | C*17:37                   |                |
| C*07:02:01G | T | 496     | 31.73  | 71.47 | 680     | 20.49  | 27.10 | 749     | 36.01  | 1925   | 98.57  | 2      | 57165   | 57285                     | 57159   | C*07:02:01:01/C*07:02:01  |                |
| C*07:02:01G |   | 496     | 31.73  |       | 680     | 20.49  |       |         |        | 1176   | 98.57  | 2      | 57165   | 57285                     |         | C*07:03:03/C*07:03:04     |                |

Сообщения по результатам обр...  
Аллер исключен из результатов типирования, т.е. отношение ранга к рангу лучшего аллеля меньше полного значения 0.150  
Ген - Объект Код...  
A A\*02:01:02 106  
A A\*03:89:01 106

Список аллелей

| Аллель      | Группа      |
|-------------|-------------|
| A*02:01:01  | A*02:01:01G |
| A*02:01:02L | A*02:01:01G |
| A*02:01:03  | A*02:01:01G |
| A*02:01:04  | A*02:01:01G |
| A*02:01:05  | A*02:01:01G |
| A*02:01:06  | A*02:01:01G |
| A*02:01:07  | A*02:01:01G |
| A*02:01:08  | A*02:01:01G |

Рисунок 49 – Просмотр результатов по аллелям



Таблица 3 – Описание данных, представленных на вкладке «Результат по аллелям»

| Колонка таблицы       | Описание                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | Отметка наличия Сообщений по результатам обработки гена                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Аллель                | Выведено имя аллеля                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Т                     | Указан признак типирования данного аллеля. Типированные строки подсвечены желтым фоном и имеют значение «Т». Для групп/аллелей по которым есть неоднозначности цис.транс положения в этой колонке выводится символ «V», в случае неоднозначности по группе с учетом 2 и 3-го экзона для I-класса 2-го экзона для II класса, и символ «М», в случае неоднозначности по группе с учетом 4-го экзона для I-класса и 3-го экзона для II класса. Эти строки подсвечены зеленым фоном.                                                              |
| Экзон ## /<br>Кол-во  | Выведено количество используемых ридов (кол-во точных совпадений + выравнивание) по экзону ## данного аллеля                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Экзон ## /<br>Вес(%)  | Выведено процентное соотношение количества используемых ридов по экзону ## и общего количества ридов, кластеризованных на экзон ## данного гена. Это отношение <Экзон##/Кол-во> к количеству «Кластеризовано» ридов с закладки «Статистика покрытия»                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Экзон ## /<br>Норм(%) | Выведено процентное соотношение количества используемых ридов по экзону ## данного аллеля и общего количества используемых ридов, которые учитываются по какому-либо экзону ## для данного гена                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Итог/<br>Кол-во       | Указано количество используемых ридов по указанного аллеля                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Итог/<br>Ранг         | <p>Результат вычисления ранга аллеля.</p> <p>Ранг вычисляется:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- для аллелей генов первого класса, как сумма нормированных весов 2-го и 3-го экзонов (аллели с одинаковыми 2-м и 3-м экзоном имеют одинаковый ранг);</li> <li>- для генов второго класса, как нормированный вес второго экзона (аллели с одинаковыми 2-ми экзонами имеют одинаковый ранг).</li> </ul> <p>При совпадении последовательностей экзонов в разных аллелях нормированный вес учитывается с понижающим коэффициентом.</p> |



| Колонка таблицы                                    | Описание                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                    | Аллели с максимальным рангом, попадают в результаты типирования                                                                                                                          |
| Итог/<br>Ранг N                                    | Определяет номер группы аллелей в пределах гена в порядке убывания ранга аллелей. Группы аллелей определяются по 2-му и 3-му экзону для генов I класса и 2-му экзону для генов II класса |
| Коды<br>последовательностей<br>экзонов<br>Экзон ## | Код уникальной последовательности экзона ##                                                                                                                                              |
| Список аллелей                                     | Перечислены аллели, в которых встречается определенная комбинация 2-го и 3-го экзонов для генов I класса и 2-го экзонов для генов II класса                                              |

Элементы управления:

 – информация о последовательности экзона. При расположении курсора на ячейке с кодом последовательности отображается форма «Информация о DNA последовательности экзона» (рисунок 50).

 – установить/отменить экзон маску для сравнения. Используется для возможности сравнивать последовательности экзонов в выделенных строках с выравнением на указанную последовательность.

 – сравнение выделенных. Вызывается форма выравнивания последовательностей экзонов по выделенным ячейкам с кодами последовательностей (рисунок 51).

 – просмотр выравнивания групп ридов (рисунок 52).

 – поиск по текущему столбцу.

 – сортировка по текущему столбцу.

Дополнительно на панели в правой части формы размещена таблица со списком с сообщений по результатам обработки гена и списком аллелей. Для удобства текст сообщения выводится в информационном окне.

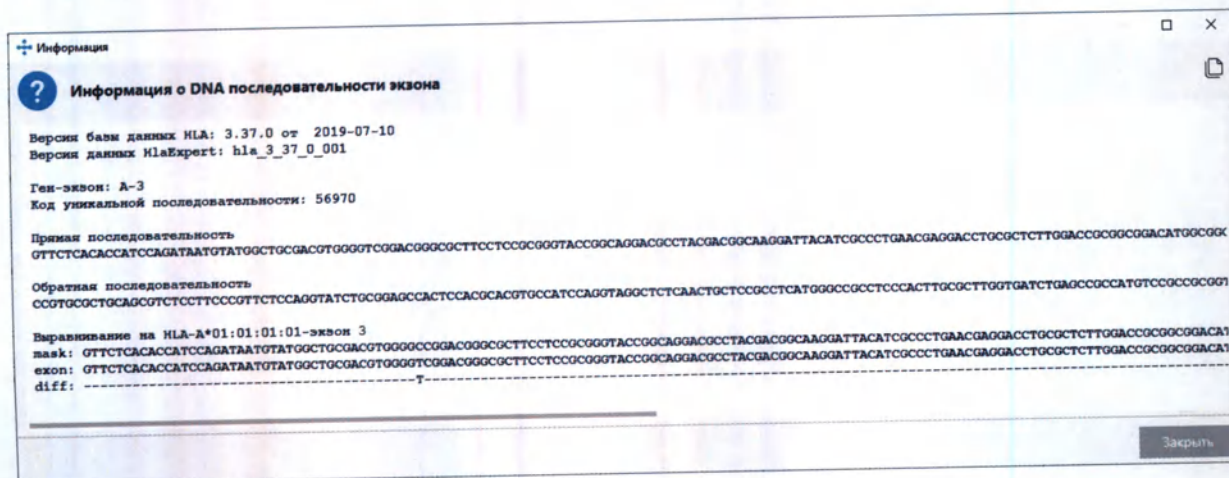


Рисунок 50 – Информация о последовательности экзона

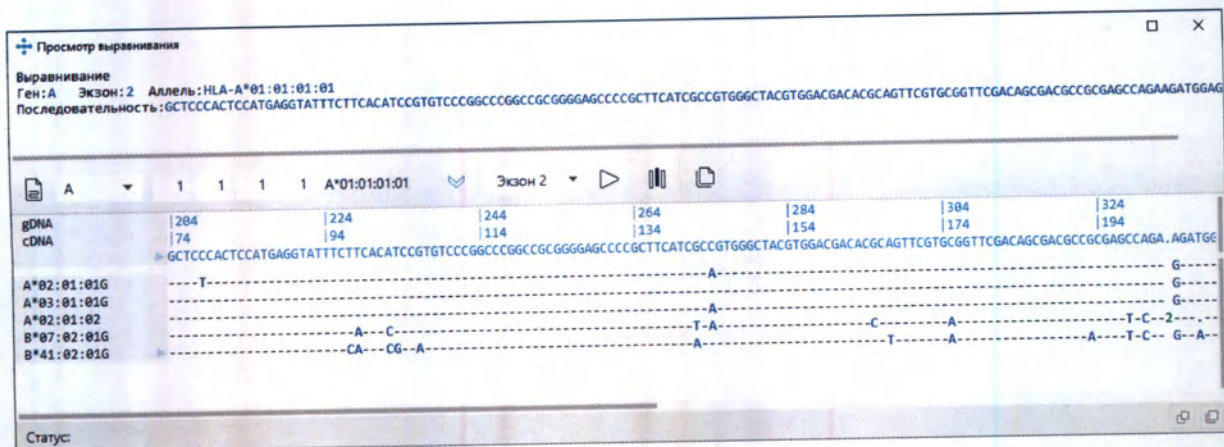


Рисунок 51 – Выравнивание последовательностей экзонов по выделенным ячейкам с кодами последовательностей

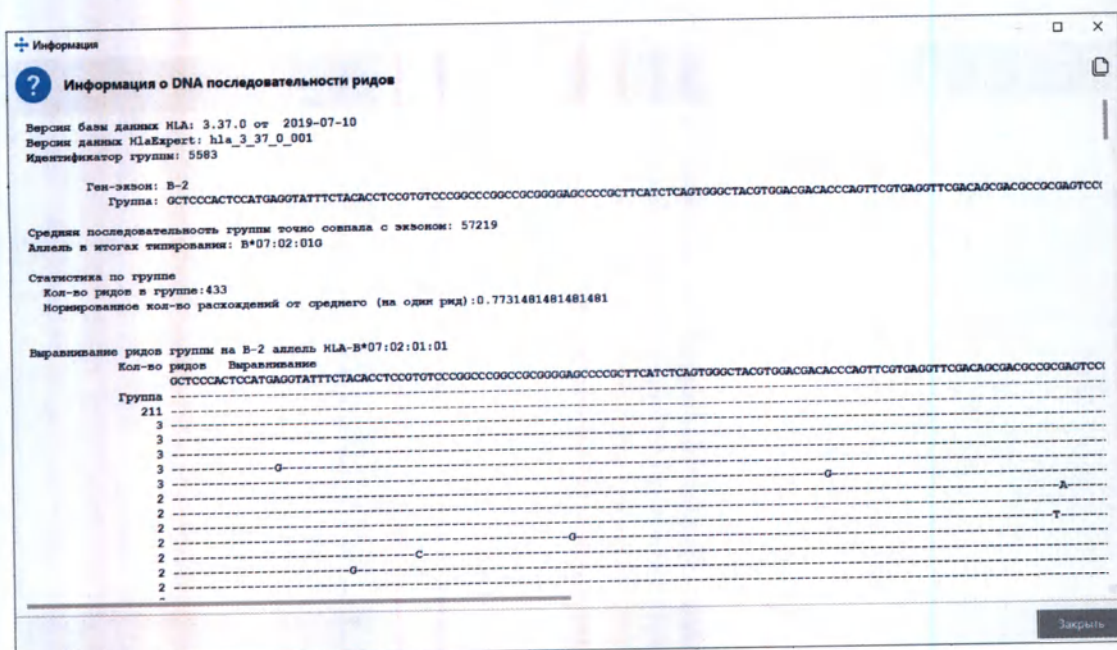
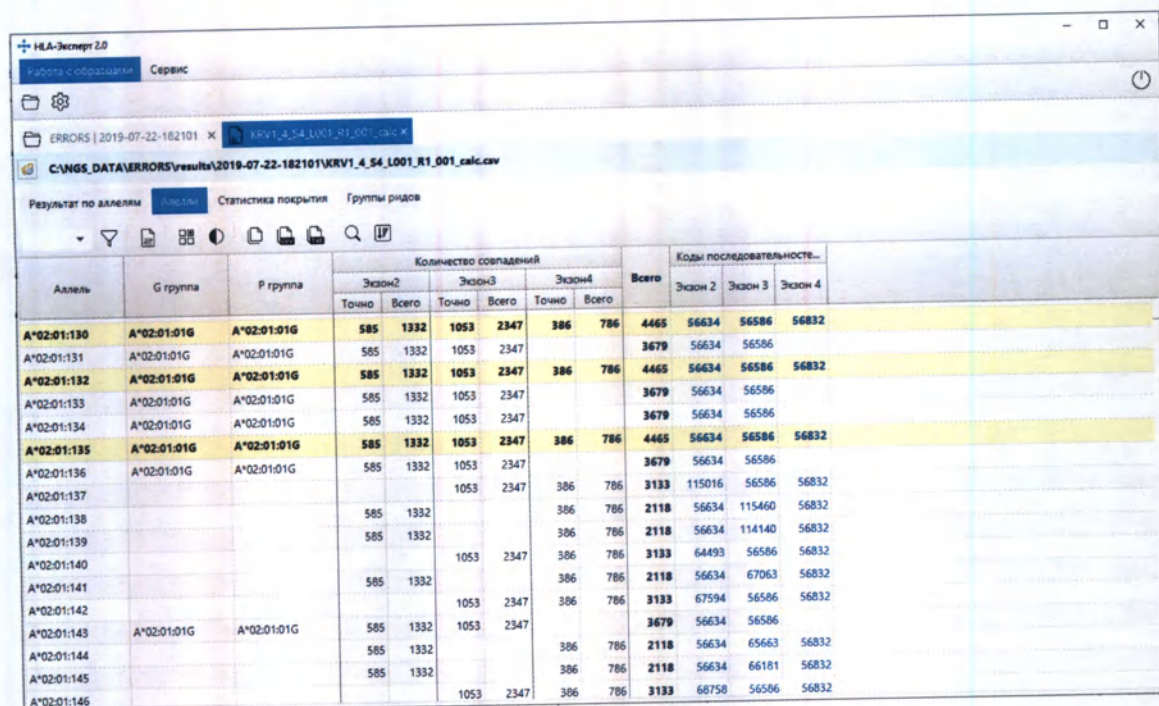


Рисунок 52 – Просмотр выравнивания групп рядов



**Вкладка «Аллели»**

Вкладка содержит таблицу (рисунок 53), в которой приведены данные вычисления точных совпадений ридов с экзонами и объединения их в аллели (таблица 4).



| Аллель      | G группа    | R группа    | Количество совпадений |       |        |       |        |       | Коды последовательности |         |         |         |
|-------------|-------------|-------------|-----------------------|-------|--------|-------|--------|-------|-------------------------|---------|---------|---------|
|             |             |             | Экзон2                |       | Экзон3 |       | Экзон4 |       | Всего                   | Экзон 2 | Экзон 3 | Экзон 4 |
|             |             |             | Точно                 | Всего | Точно  | Всего | Точно  | Всего |                         |         |         |         |
| A*02:01:130 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  | 386    | 786   | 4465                    | 56634   | 56586   | 56832   |
| A*02:01:131 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  |        |       | 3679                    | 56634   | 56586   |         |
| A*02:01:132 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  | 386    | 786   | 4465                    | 56634   | 56586   | 56832   |
| A*02:01:133 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  |        |       | 3679                    | 56634   | 56586   |         |
| A*02:01:134 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  |        |       | 3679                    | 56634   | 56586   |         |
| A*02:01:135 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  | 386    | 786   | 4465                    | 56634   | 56586   | 56832   |
| A*02:01:136 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  |        |       | 3679                    | 56634   | 56586   |         |
| A*02:01:137 |             |             |                       |       | 1053   | 2347  | 386    | 786   | 3133                    | 115016  | 56586   | 56832   |
| A*02:01:138 |             |             | 585                   | 1332  |        |       | 386    | 786   | 2118                    | 56634   | 115460  | 56832   |
| A*02:01:139 |             |             | 585                   | 1332  |        |       | 386    | 786   | 2118                    | 56634   | 114140  | 56832   |
| A*02:01:140 |             |             |                       |       | 1053   | 2347  | 386    | 786   | 3133                    | 64493   | 56586   | 56832   |
| A*02:01:141 |             |             | 585                   | 1332  |        |       | 386    | 786   | 2118                    | 56634   | 67063   | 56832   |
| A*02:01:142 |             |             |                       |       | 1053   | 2347  | 386    | 786   | 3133                    | 67594   | 56586   | 56832   |
| A*02:01:143 | A*02:01:01G | A*02:01:01G | 585                   | 1332  | 1053   | 2347  |        |       | 3679                    | 56634   | 56586   |         |
| A*02:01:144 |             |             | 585                   | 1332  |        |       | 386    | 786   | 2118                    | 56634   | 65663   | 56832   |
| A*02:01:145 |             |             | 585                   | 1332  |        |       | 386    | 786   | 2118                    | 56634   | 66181   | 56832   |
| A*02:01:146 |             |             |                       |       | 1053   | 2347  | 386    | 786   | 3133                    | 66758   | 56586   | 56832   |

Рисунок 53 – Просмотр вкладки «Аллели»

Таблица 4 – Описание данных, представленных на вкладке «Аллели»

| Колонка таблицы                              | Описание                                                                                                |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Аллель                                       | Выведено имя аллеля                                                                                     |
| G-группа                                     | Указана G группа, к которой принадлежит аллель. Если группы нет, то выводится пустая ячейка             |
| R-группа                                     | Указана R группа, к которой принадлежит аллель. Если группы нет, то выводится пустая ячейка             |
| Количество совпадений/<br>Экзон ##/<br>Точно | Выведено количество точных совпадений ридов с экзоном ## данного аллеля                                 |
| Количество совпадений/<br>Экзон ##/<br>Всего | Выведено количество учитываемых ридов (точные совпадения + выравнивание) по экзону ## данного аллеля    |
| Всего                                        | Выведено количество учитываемых ридов (точные совпадения + выравнивание) по всем экзонам данного аллеля |



| Колонка таблицы                       | Описание                                    |
|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| Коды последовательностей/<br>Экзон ## | Код уникальной последовательности экзона ## |

Элементы управления:

  – фильтр по гену. При установленном фильтре:  – очистить фильтр.

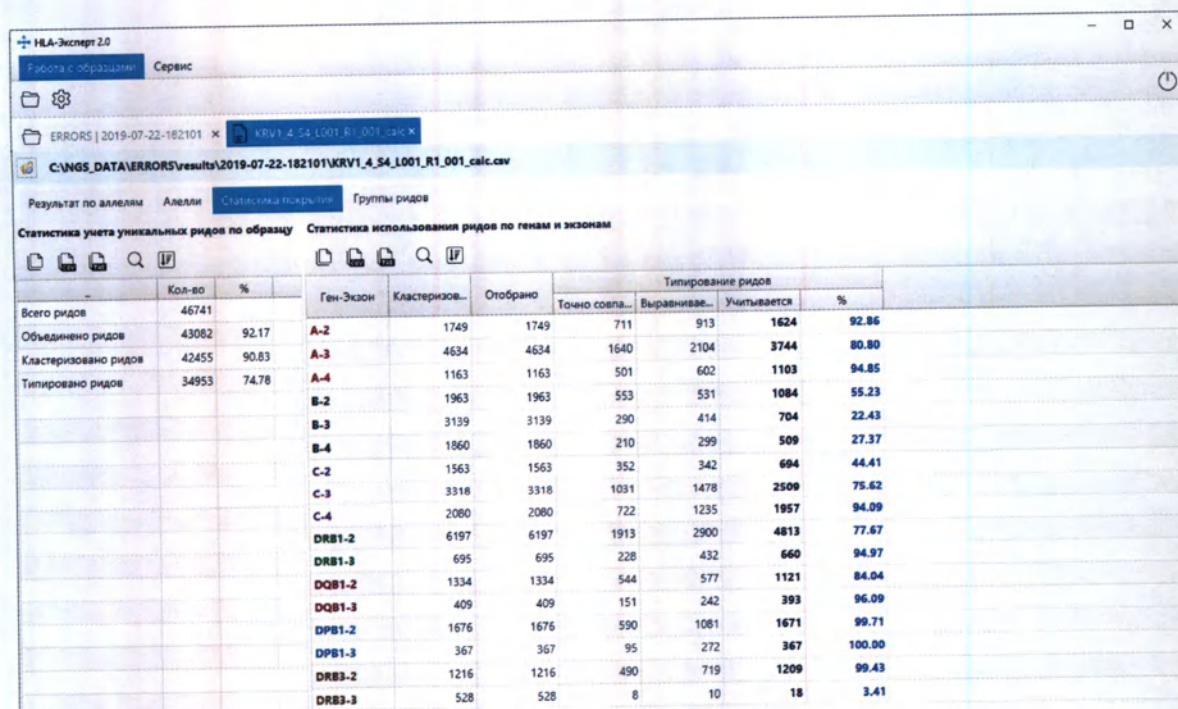
 – копировать в буфер обмена данные выделенных ячеек, разделенные символом перевода каретки.

 – копировать в буфер обмена данные выделенных ячеек, разделенные символом запятой.

 – копировать в буфер обмена данные выделенных ячеек, разделенные символом табуляции.

### Вкладка «Статистика покрытия»

На вкладке «Статистика покрытия» представлена таблица (рисунок 54), в которой приведены данные кластеризации ридов по экзонам генов.



|                      | Кол-во | %     | Ген-Экзон | Кластеризов... | Отобрано | Типирование ридов |               |             |        |
|----------------------|--------|-------|-----------|----------------|----------|-------------------|---------------|-------------|--------|
|                      |        |       |           |                |          | Точно совпа...    | Выравнивае... | Учитывается | %      |
| Всего ридов          | 46741  |       |           |                |          |                   |               |             |        |
| Объединено ридов     | 43082  | 92.17 | A-2       | 1749           | 1749     | 711               | 913           | 1624        | 92.86  |
| Кластеризовано ридов | 42455  | 90.83 | A-3       | 4634           | 4634     | 1640              | 2104          | 3744        | 80.80  |
| Типировано ридов     | 34953  | 74.78 | A-4       | 1163           | 1163     | 501               | 602           | 1103        | 94.85  |
|                      |        |       | B-2       | 1963           | 1963     | 553               | 531           | 1084        | 55.23  |
|                      |        |       | B-3       | 3139           | 3139     | 290               | 414           | 704         | 22.43  |
|                      |        |       | B-4       | 1860           | 1860     | 210               | 299           | 509         | 27.37  |
|                      |        |       | C-2       | 1563           | 1563     | 352               | 342           | 694         | 44.41  |
|                      |        |       | C-3       | 3318           | 3318     | 1031              | 1478          | 2509        | 75.62  |
|                      |        |       | C-4       | 2080           | 2080     | 722               | 1235          | 1957        | 94.09  |
|                      |        |       | DRB1-2    | 6197           | 6197     | 1913              | 2900          | 4813        | 77.67  |
|                      |        |       | DRB1-3    | 695            | 695      | 228               | 432           | 660         | 94.97  |
|                      |        |       | DQB1-2    | 1334           | 1334     | 544               | 577           | 1121        | 84.04  |
|                      |        |       | DQB1-3    | 409            | 409      | 151               | 242           | 393         | 96.09  |
|                      |        |       | DPB1-2    | 1676           | 1676     | 590               | 1081          | 1671        | 99.71  |
|                      |        |       | DPB1-3    | 367            | 367      | 95                | 272           | 367         | 100.00 |
|                      |        |       | DRB3-2    | 1216           | 1216     | 490               | 719           | 1209        | 99.43  |
|                      |        |       | DRB3-3    | 528            | 528      | 8                 | 10            | 18          | 3.41   |

Рисунок 54 – Просмотр вкладки «Статистика покрытия»



Информация на вкладке состоит из двух таблиц – «Статистика учета ридов по образцу» (таблица 5) и «Статистика использования ридов» (таблица 6).

Таблица 5 – Описание данных, представленных в таблице «Статистика учета ридов по образцу»

| Колонка таблицы | Описание                                                               |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------|
| –               | Наименование показателя                                                |
| Кол-во          | Количество ридов                                                       |
| %               | Процентное соотношение показателя от общего количества ридов в образце |

Таблица 6 – Описание данных, представленных в таблице «Статистика использования ридов»

| Колонка таблицы | Описание                                                                                               |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ген-экзон       | Выведено имя гена и номер экзона                                                                       |
| Кластеризовано  | Количество кластеризованных на этот ген-экзон ридов                                                    |
| Отобрано        | Количество ридов по данному ген-экзону, отобранных для дальнейшего использования по критериям качества |
| Точно совпало   | Количество ридов, точно совпавших с каким-либо экзоном.                                                |
| Выравнивается   | Количество ридов, которые выравниваются на какой-либо экзон                                            |
| Учитывается     | <Точно совпало> + <Выравнивается>                                                                      |
| %               | Отношение = <Учитывается>*100/<Кластеризовано>                                                         |

### Вкладка «Группы ридов»

На вкладке «Группы ридов» представлена таблица (рисунок 55), в которой приведены данные выравнивания ридов.

**Группы по средним последовательностям**

| Ген-экзон | Алель       | Код группы выравнивания | Кол-во ридов | =>  | <=  | СрОшибка | Средняя после... |
|-----------|-------------|-------------------------|--------------|-----|-----|----------|------------------|
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 56634           | 1332         | 690 | 642 | 0.88     | GCTCTCACTCC...   |
| A-2       | A*03:01:01G | 834 A-2 56967           | 292          | 143 | 149 | 0.93     | GCTCCCACTCC...   |
| A-2       |             | 847 A-2 95136           | 24           | 11  | 13  | 3.33     | GCTCCCACTCC...   |
| A-2       |             | 861 A-2 114182          | 11           | 6   | 5   | 1.09     | GCTCTCACTCC...   |
| A-2       |             | 890                     | 8            | 4   | 4   | 0.62     | GCTCTCACTCC...   |
| A-2       |             | 876 A-2 113804          | 5            | 2   | 3   | 1.00     | GCTCTCACTCC...   |
| A-2       |             | 850                     | 3            | 3   |     | 1.00     | GCTCCCACTCC...   |
| A-2       |             | 925                     | 3            | 1   | 2   | 1.67     | GCTCTCACTCC...   |

**Группы по совпадению последовательностей ридов**

| Ген-экзон | Алель       | Код группы выравнивания | Длина | Кол-во ридов | =>  | <=  | Последовательность... |
|-----------|-------------|-------------------------|-------|--------------|-----|-----|-----------------------|
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 56634           | 270   | 585          | 312 | 273 | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*03:01:01G | 834 A-2 56967           | 270   | 126          | 65  | 61  | GCTCCCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 12           | 7   | 5   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 10           | 7   | 3   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 8            | 6   | 2   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 8            |     | 8   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 117527          | 270   | 7            | 1   | 6   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 7            | 4   | 3   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 7            | 3   | 4   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 116930          | 270   | 7            | 4   | 3   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 70140           | 270   | 6            | 5   | 1   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       |             | 847 A-2 95136           | 270   | 6            | 3   | 3   | GCTCCCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 75429           | 270   | 6            | 4   | 2   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 6            | 2   | 4   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 111221          | 270   | 5            | 1   | 4   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856                     | 270   | 5            | 1   | 4   | GCTCTCACTCCATGAG...   |
| A-2       | A*02:01:01G | 856 A-2 98994           | 270   | 5            | 4   | 1   | GCTCTCACTCCATGAG...   |

Рисунок 55 – Просмотр вкладки «Группы ридов»

Информация на вкладке состоит из двух таблиц – «Группы по средним последовательностям» (таблица 7) и «Группы по совпадению последовательностей ридов» (таблица 8).

Таблица 7 – Описание данных, представленных в таблице «Группы по средним последовательностям»

| Колонка таблицы | Описание                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ген-экзон       | Выведено имя гена и номер экзона                                                                                                                                                                                       |
| Аллель          | Выводится значение аллеля, в случае если группа участвует в типировании.                                                                                                                                               |
| Код группы      | Идентификатор группы   Ген-экзон   Идентификатор последовательности ген-экзона.                                                                                                                                        |
| =>              | Кол-во прямых ридов в группе                                                                                                                                                                                           |
| <=              | Кол-во обратных ридов в группе                                                                                                                                                                                         |
| СрОшибка        | Средняя ошибка вычисляется следующим образом: для каждого рида в группе определяется количество расхождений от средней последовательности. Далее это количество суммируется и делится на общее количество ридов группы |



| Колонка таблицы            | Описание                                       |
|----------------------------|------------------------------------------------|
| Средняя последовательность | Средняя нуклеотидная последовательность группы |

Таблица 8 – Описание данных, представленных в таблице «Группы по совпадению последовательностей ридов»

| Колонка таблицы           | Описание                                                                                                                   |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ген-экзон                 | Выведено имя гена и номер экзона                                                                                           |
| Длина                     | Длина последовательности группы                                                                                            |
| Совпадение / выравнивание | Для точно совпавших ридов выводится:<br><Ген>-<Экзон>-<ИдЭкзона><br>Для точно выровненных ридов выводится:<br>~ <ИдЭкзона> |
| Кол-во                    | Кол-во ридов в группе                                                                                                      |
| =>                        | Кол-во прямых ридов в группе                                                                                               |
| <=                        | Кол-во обратных ридов в группе                                                                                             |

Элементы управления:



– скрыть панель средних последовательностей.



– информация о последовательности группы. При расположении курсора на строке группы вызывается форма Информация о DNA последовательности группы аналогично рисунку 50.



– установить/отменить маску для сравнения. Используется для возможности сравнивать последовательности в выделенных строках с выравниванием на выбранную запись с последовательностью группы.



– сравнение выделенных. Вызывается форма выравнивания последовательностей групп по выделенным ячейкам аналогично рисунку 51.



– выделить все записи группы. Для текущей записи группы выделяются все соответствующие ей записи групп в таблице «Группы по совпадению последовательностей ридов».



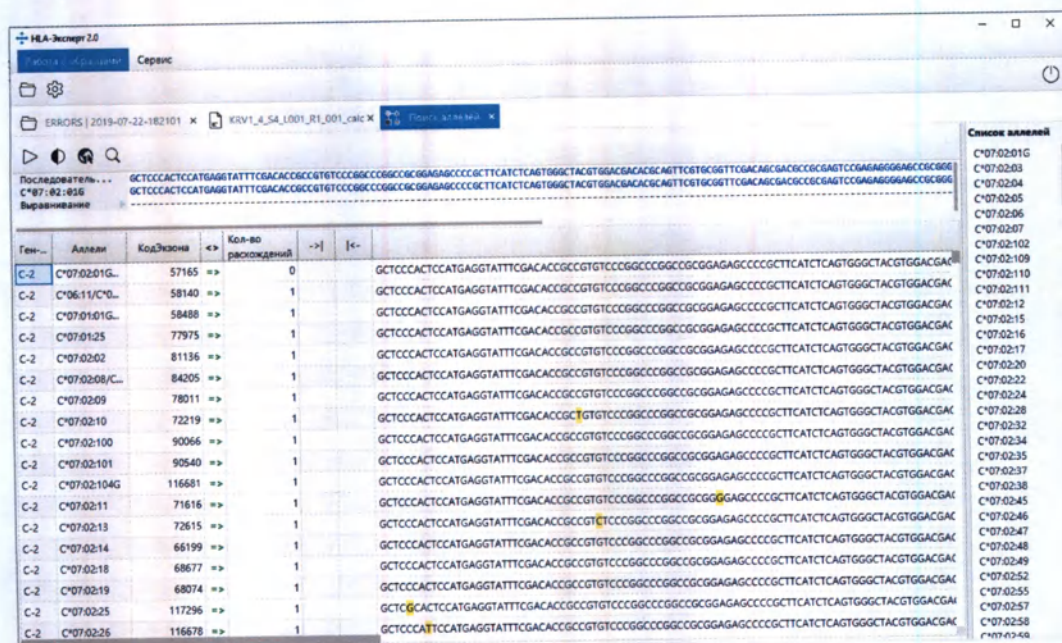
 – поиск ближайших аллелей. Происходит поиск аллелей по базе данных IMGT/HLA в которые входит последовательность из текущей записи группы с количеством возможных расхождений не более 5. Результат выводится в отдельную вкладку (рисунок 56).

A-2 ▾ – фильтр по гену и номеру экзона.

Без других генов ▾ – фильтр по принадлежности записей к указанному гену.

 – очистить фильтр.

 – поиск по текущему столбцу.



| Ген... | Аллели          | Код экзона | Кол-во расхождений | → | ← |
|--------|-----------------|------------|--------------------|---|---|
| C-2    | C*07:02:01G...  | 57165 =>   | 0                  |   |   |
| C-2    | C*06:11/C*0...  | 58140 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:01:01G...  | 58488 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:01:25      | 77975 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:02      | 81136 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:08/C... | 84205 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:09      | 78011 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:10      | 73219 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:100     | 90666 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:101     | 90540 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:104G    | 116681 =>  | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:11      | 71616 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:13      | 72615 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:14      | 66199 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:18      | 68677 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:19      | 68074 =>   | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:25      | 117296 =>  | 1                  |   |   |
| C-2    | C*07:02:26      | 116678 =>  | 1                  |   |   |

Рисунок 56 – Поиск ближайших аллелей

Элементы управления:

 – выполнить поиск аллелей. Вызывается форма ввода последовательности для поиска (рисунок 57).

 – сравнение выделенных последовательностей. Вызывается форма выравнивания последовательностей по выделенным ячейкам аналогично рисунку 51.

 – открыть NCBI BLAST+. При наличии сети Интернет в браузере откроется сайт:  
[https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_ncbiblast/toolform.ebi?tool=ncbiblast&context=nucleotide&database=imgthla](https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_ncbiblast/toolform.ebi?tool=ncbiblast&context=nucleotide&database=imgthla).

 – поиск по текущему столбцу.



**Поиск аллелей, на которые выравнивается последовательность**

Последовательность

```
GCTCTCACTCCATGAGGTATTCTTCACATCCGTGTCCCGGCCGGCCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCAG
TGGGCTACGTGGACGACACGAGTTCGTGCGTTTCACAGCGACGCCGAGCCAGAGGATGGAGCCCGG
GGCGCCGTGGATAGACGAGGAGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGAGACCGGAAAGTGAAGGCCACGC
ACAGACTCACCAGTGGACCTGGGACCTGCGCGGCTACTACAACAGAGCGAGGCCG
```

Выполнить Отмена

Рисунок 57 – Окно ввода последовательности для поиска

#### 4.4.3 Обновление результатов

Для обновления результатов типирования используйте кнопку , расположенную над таблицей результатов (рисунок 58).

| Ген | N | Группа G    | Группа P |
|-----|---|-------------|----------|
| A   | 1 | A*11:01:01G | A*11:01P |
|     | 2 | A*24:02:01G | A*24:02P |

Рисунок 58 – Обновление результатов проведения типирования

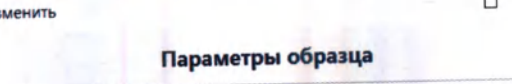
#### 4.4.4 Редактирование атрибутов файла образца

В HLA-Эксперт предусмотрены следующие атрибуты файла образца:

- идентификатор образца;
- индекс;
- комментарий.

Для редактирования данных атрибутов выполните нижеописанные действия.

**Шаг 1.** Нажмите кнопку  над результатами обработки файлов образцов. На экране отобразится форма редактирования атрибутов файла результата (рисунок 59).



Изменить

### Параметры образца

|                       |               |
|-----------------------|---------------|
| Идентификатор образца | 164           |
| Индекс(ы)             | 199           |
| Комментарий           | //комментарий |

Сохранить Отмена

Рисунок 59 – Форма редактирования атрибутов файла результатов

**Шаг 2.** Внесите необходимые изменения в соответствующие поля формы.

**Шаг 3. Нажмите кнопку [Сохранить].**

Внесенные изменения будут сохранены. Данные атрибуты отображаются при печати файла результата типирования (рисунок 60).

HLA-Эксперт 2.0  
Работа с образцами Сервис

История изменений: 2019.01.24

Образец: 1 Масштаб: 1 2

**ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ**  
Веб-сайт: <http://www.dna-technology.ru>  
Электронный адрес: [mail@dna-technology.ru](mailto:mail@dna-technology.ru)

HLA-Эксперт. Версия 2.0 (Сборка 14)  
ИМГТ HLA, версия 3.36.0 от 17.04.2019

**Результаты HLA типирования**

Образец: 164  
Файл образца: 4AG164\_S199\_L001\_R1\_001.fastq  
Индекс: 199  
Дата обработки: 05.09.2019-23:48:50

| Локус | N | Группа G                 | Группа P            | KK |
|-------|---|--------------------------|---------------------|----|
| A     | 1 | A*24:02:01G              | A*24:02P            |    |
|       | 2 | A*31:01:02G              | A*31:01P            |    |
| B     | 1 | B*40:01:01G   B*40:80    | B*40:01P   B*40:80  |    |
|       | 2 | B*48:01:01G   B*48:03:01 | B*48:01P   B*48:03P |    |
| C     | 1 | C*03:04:01G              | C*03:04P            |    |
|       | 2 | C*08:01:01G              | C*08:01P            |    |
| DRB1  | 1 | DRB1*12:01:01G           | DRB1*12:01P         |    |

Рисунок 60 – Пример отображения атрибутов в файле результатов типирования

#### 4.4.5 Печать результатов

Для печати результата типирования нажмите кнопку , расположенную над таблицей результатов.

На экране отобразится форма предварительного просмотра (см. рисунок 60).

Для печати данных нажмите кнопку  в верхней части формы. Чтобы сохранить данные в pdf-файл нажмите кнопку .

#### 4.5 Операции с файлами результатов

Итоговая информация о результатах типирования образцов сохраняется в файлах результатов. Реализованные операции с файлами результатов обеспечивают фиксацию результата



на бумажном носителе, а также реализуют способы передачи информации (обмена) в вышестоящие системы (например, лабораторные информационные системы) посредством передачи файлов. Реализованные способы передачи не являются исчерпывающими. Возможна доработка механизмов передачи информации (обмена) для конкретных решений.

В настоящий момент в HLA-Эксперт предусмотрены следующие операции с файлами результатов:

- экспорт результатов типирования в файл формата \*.csv;
- печать результатов;
- параметры экспорта результатов.

Далее каждая операция рассмотрена более подробно.

#### 4.5.1 Экспорт результатов типирования в файл формата \*.csv

Для записи результатов типирования всех обработанных файлов образцов в один файл формата \*.csv выполните нижеописанные действия.

**Шаг 1.** Нажмите кнопку  над перечнем файлов образцов (рисунок 61).

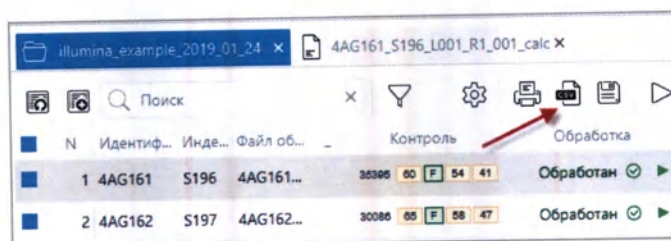


Рисунок 61 – Переход к экспорту результатов типирования

На экране отобразится окно для ввода имени и пути сохранения создаваемого csv-файла (рисунок 62).

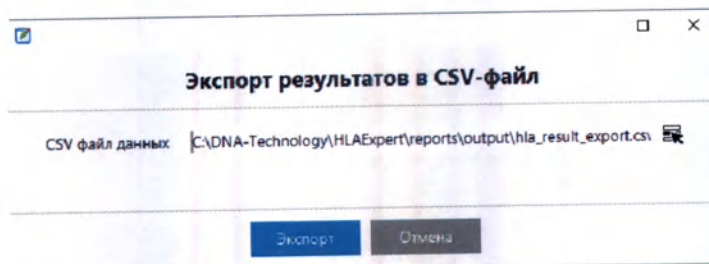


Рисунок 62 – Имя и путь сохранения csv-файла

**Шаг 2.** В поле «CSV файл данных» отображается имя и системный путь до создаваемого файла. В случае необходимости отредактируйте автоматически сформированные данные.

**Шаг 3.** Нажмите кнопку [Экспорт].

На экране отобразится окно с указанием системного пути до созданного csv-файла (рисунок 63).

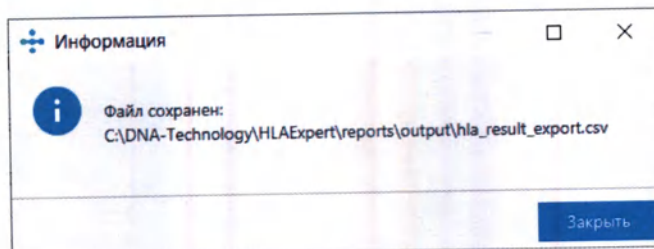


Рисунок 63 – Системный путь до созданного файла с результатом типирования

Примечание. По умолчанию все файлы сохраняются в подкаталог \reports\output каталога, в который была установлена программа HLA-Эксперт.

**Шаг 4.** Нажмите кнопку [Заккрыть].

Ознакомиться с содержимым созданного csv-файла можно с помощью сторонней программы, например, Microsoft Excel.

#### 4.5.2 Печать результатов типирования

Для печати результатов типирования всех обработанных файлов образцов выполните нижеописанные действия.

**Шаг 1.** Нажмите кнопку  над перечнем загруженных файлов образцов. На экране отобразится окно выбора данных для печати (рисунок 64). Доступны следующие варианты:

- группа G;
- группа P;
- список аллелей.

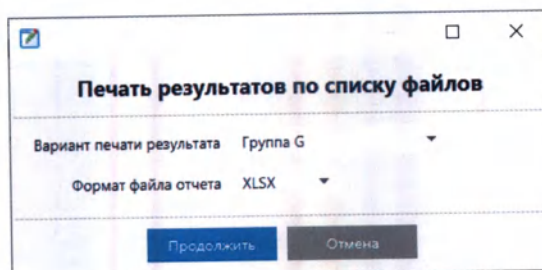


Рисунок 64 – Выбор данных для печати

**Шаг 2.** Выберите вариант печати результатов, а также формат файла отчета с помощью соответствующих раскрывающихся списков и нажмите кнопку [Продолжить].



На экране отобразится процесс формирования отчета. По завершении форматирования отчета на экране отобразится вкладка предварительного просмотра, в случае HTML – формата файла отчета, либо сообщение о сохраненном файле XLSX – отчета и вызове внешней программы для просмотра, если такая была настроена в Параметрах работы приложения (см. п. 3.4 данного руководства).

#### 4.5.3 Параметры экспорта

Для экспорта результатов типирования обработанных файлов образцов, выделите нужные файлы (флаг ☒ в начале строки) и нажмите кнопку , расположенную над реестром файлов (рисунок 65).

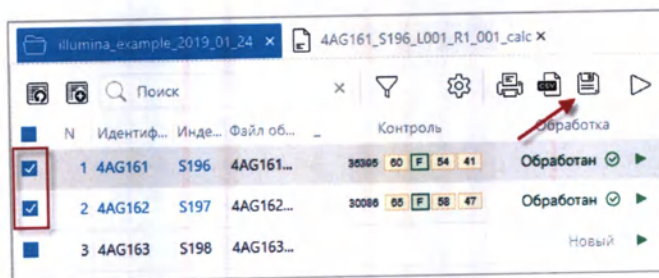


Рисунок 65 – Пример экспорта обработанных файлов образцов

На экране отобразится окно с параметрами экспорта (рисунок 66).  
Укажите необходимые сведения и нажмите кнопку [Экспорт].

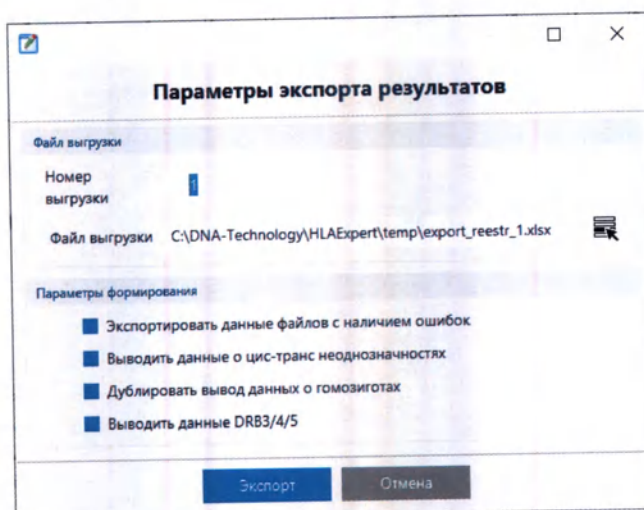


Рисунок 66 – Параметры экспорта результатов

Результаты будут сохранены в файл формата \*.xlsx, а на экране отобразится окно с указанием системного пути до созданного файла (рисунок 67).

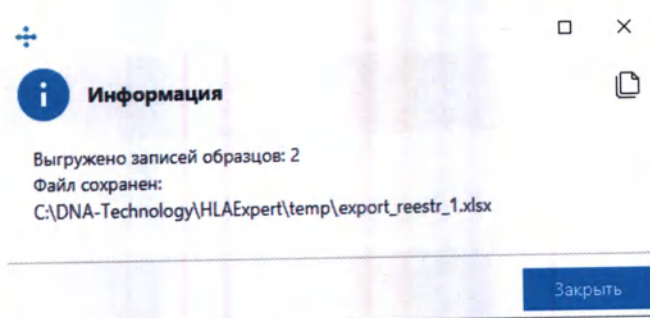


Рисунок 67 – Системный путь до созданного файла

Примечание. Выбор формата создаваемого файла (\*.xlsx или \*.csv), а также внешней программы просмотра, осуществляется в настройках программы (см. п. 3.4 данного руководства).

#### 4.6 Завершение работы с HLA-Эксперт

Завершение работы с HLA-Эксперт осуществляется одним из следующих способов (рисунок 68):

- выберите пункт «Завершение работы» меню «Работа с образцами»;
- используйте стандартные средства ОС для закрытия программы;
- нажмите кнопку  на Панели инструментов.

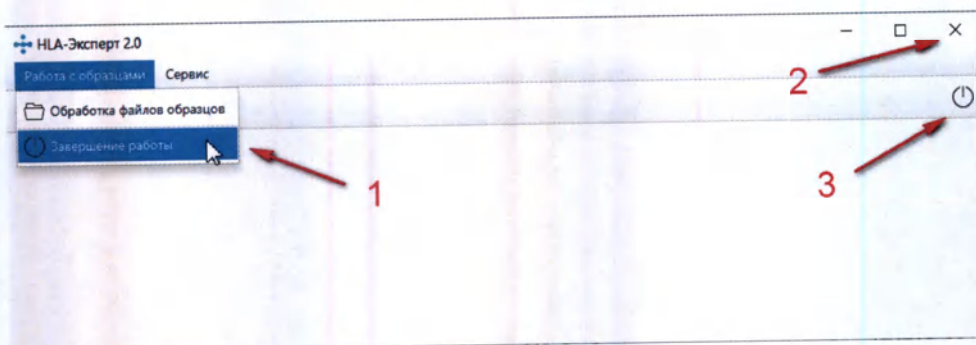


Рисунок 68 – Завершение работы с программой

Далее подтвердите свой выбор, нажав кнопку [Да] в окне, отобразившемся на экране, после чего работа с программой будет завершена.

#### 4.7 Удаление HLA-Эксперт

Удаление HLA-Эксперт с компьютера пользователя осуществляется стандартными средствами ОС. При этом каталог, в который была выполнена установка программы, удаляется со всем содержимым, в том числе подкаталог «data», содержащий базы данных IPD-IMGT/HLA.



## 4.8 Техническая поддержка

Если при работе с HLA-Эксперт возникли проблемы и вы не нашли их решения в данном руководстве, вам поможет Служба клиентской поддержки компании-производителя.

### 4.8.1 Отправка сообщения в Службу клиентской поддержки

Если возникшая проблема связана с обработкой конкретных файлов образцов, то воспользуйтесь функцией отправки сообщения в Службу клиентской поддержки, реализованной в HLA-Эксперт.

Для отправки сообщения об ошибке выполните следующие действия:

**Шаг 1.** Нажмите кнопку  над таблицей результатов обработки нужного файла образца (рисунок 69).

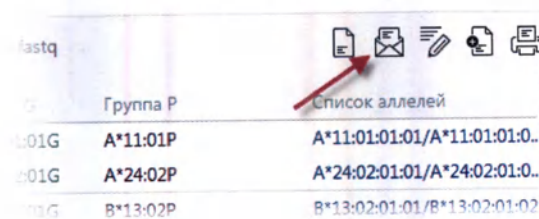
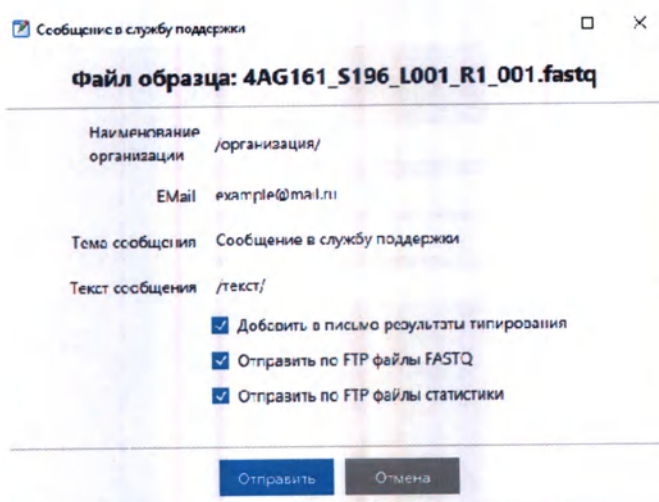


Рисунок 69 – Кнопка создания сообщения в службу поддержки

На экране отобразится форма создания сообщения (рисунок 70).



**Сообщение в службу поддержки**

**Файл образца: 4AG161\_S196\_L001\_R1\_001.fastq**

Наименование организации: /организация/

E-Mail: example@mail.ru

Тема сообщения: Сообщение в службу поддержки

Текст сообщения: /текст/

☒ Добавить в письмо результаты типирования

☒ Отправить по FTP файлы FASTQ

☒ Отправить по FTP файлы статистики

**Отправить** **Отмена**

Рисунок 70 – Форма создания сообщения

**Шаг 2.** Заполните поля формы, указав следующие данные:

- наименование организации;
- Email отправителя;

– тему и текст сообщения.

Также установите соответствующие флаги выбора, если к сообщению необходимо прикрепить результаты типирования, файлы образцов и файлы статистики.

**Шаг 3.** Нажмите кнопку [Отправить], после чего сообщение будет отправлено в Службу клиентской поддержки.

#### 4.8.2 Контактные данные Службы клиентской поддержки

Телефоны Службы клиентской поддержки:

8 800 200-75-15 (по России звонки осуществляются бесплатно),

+7 495 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

Электронный адрес: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru).

По телефону можно обращаться по будням с 9:00 до 18:00 по московскому времени.

Время ожидания ответа от специалиста поддержки по электронной почте: по будням – в течение рабочего дня, в выходной – до трех дней.



**5 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ**

**Производитель:** Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»;  
ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

**Адрес производителя:** ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва,  
Научный проезд, д. 20, стр. 4.

**Место производства:** ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва,  
Научный проезд, д. 20, стр.4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов HLA-Эксперт и работы программного обеспечения HLA-Эксперт следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6, этаж 5, ком. 14, тел./факс +7 (495) 640-17-71,

[www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)

**Служба клиентской поддержки:**

8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

Email: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru)

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУН КНИИГиПК

ФМБА России



И.В. Парамонов

«11» 10 2019 г.

Приложение А  
(справочное)

**ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ**

Перечень национальных стандартов, применяемых к HLA-Эксперт, включает:

- ГОСТ Р ИСО/МЭК 12119-2000 Информационная технология. Пакеты программ. Требования к качеству и тестирование;
- ГОСТ Р ИСО/МЭК 9126-93 Информационная технология. Оценка программной продукции. Характеристики качества и руководства по их применению;
- ГОСТ Р ИСО 9127-94 Системы обработки информации. Документация пользователя и информация на упаковке для потребительских программных пакетов;
- ГОСТ 28195-89 Оценка качества программных средств. Общие положения;
- ГОСТ Р ИСО/МЭК ТО 9294-93 Информационная технология. Руководство по управлению документированием программного обеспечения;
- ГОСТ Р 51188-98 Защита информации. Испытания программных средств на наличие компьютерных вирусов. Типовое руководство;
- ГОСТ Р МЭК 62304-2013 Изделия медицинские. Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла.

Примечание. Указанные выше стандарты действительны на момент утверждения Руководства пользователя.



**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ**

|           |                                               |
|-----------|-----------------------------------------------|
| БД        | – база данных                                 |
| ГОСТ      | – межгосударственный стандарт                 |
| ГОСТ Р    | – государственный стандарт России             |
| ИСО (ISO) | – Международная организация по стандартизации |
| МЭК (IEC) | – Международная электротехническая комиссия   |
| НД        | – несанкционированный доступ                  |
| ООО       | – общество с ограниченной ответственностью    |
| ОС        | – операционная система                        |
| ПК        | – персональный компьютер                      |
| ПС        | – программное средство                        |
| HLA       | – Human Leukocyte Antigens                    |
| IDE       | – Integrated Drive Electronics                |
| IPD       | – Immuno Polymorphism Database                |
| IMGT      | – International Immuno-Genetics Database      |
| JRE       | – Java SE Runtime Environment                 |
| NGS       | – Next Generation Sequencing                  |
| SATA      | – Serial Advanced Technology Attachment       |



Пронумеровано, сброшюровано,  
удостоверено печатью и подписью  
директора ФГБУН КНИИГиПК  
ФМБА России

 52 ЛИСТОВ

Директор ФГБУН КНИИГиПК  
ФМБА России

И.В. Парамонов