

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Павлов А.Е.

«16» 02 2021 г.


PAR

allele

Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «**PARAllele™ HLA solution v3**»
для типирования генов HLA в высоком разрешении методом
высокопроизводительного секвенирования

ТОМ 1 из 3

Общие сведения о наборе реагентов и лабораторный протокол

Каталожный номер

HLA-v3a

HLA-v3b

Символы

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Код серии
	Номер по каталогу
	Использовать до
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Значок «коробка» для обозначения комплекта в составе изделия

PARallele™ - товарный знак, правообладатель ООО «ПАРСЕК ЛАБ» RU № 803655).

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
1.1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
1.2. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ	5
1.3. МЕДИЦИНСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ.....	6
1.4. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	7
1.5. ОПИСАНИЕ	7
1.6. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
1.7. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	9
1.8. ОБЩАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.....	12
1.9. ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА.....	13
1.10. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ.....	15
1.11. ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ.....	17
1.12. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	17
1.13. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИКИ РАБОТЫ.....	18
1.14. РИСКИ, СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗДЕЛИЯ	20
2. ПРОТОКОЛ.....	21
2.1. ТАРГЕТНОЕ ОБОГАЩЕНИЕ.....	22
2.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК.....	26
2.3. РАЗВЕДЕНИЕ И ДЕНАТУРАЦИЯ.....	33
2.4. СЕКВЕНИРОВАНИЕ.....	35
2.4.1. Планирование запуска.....	35
2.4.2. Комплект для секвенирования.....	45
2.4.3. Включение секвенатора.....	45
2.4.4. Разморозка картриджа для секвенирования.....	45
2.4.5. Загрузка библиотек	46
2.4.6. Очистка ячейки.....	46
2.4.7. Настройка запуска секвенирования.....	47
2.4.8. Загрузка ячейки.....	47
2.4.9. Загрузка раствора и проверка бутылки для сбора отходов	48
2.4.10. Загрузка картриджа с реактивами	48
2.4.11. Выбор sample sheet.....	48
2.4.12. Запуск секвенирования.....	49
2.4.13. Мониторинг секвенирования.....	49
2.4.14. Контроль плотности кластеров.....	49
3. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ.....	51
4. УКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	51
5. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ	52
6. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА	52
7. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	52
8. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	55

1. ВВЕДЕНИЕ

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

Набор реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» является усовершенствованной версией медицинского изделия «VariFind™ HLA solution IL-v2» (№ РЗН 2019/8988) со следующими улучшениями относительно предыдущей версии:

- новый упрощенный протокол с сокращением числа стадий;
- возможность определения генотипа в разрешении 3 поля (3 fields);
- идентификация новых аллелей;
- отсутствие количественной оценки и этапов нормализации образцов и библиотек;
- новое программное обеспечение с графическим интерфейсом.

1.1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» предназначен для качественного определения аллелей HLA-генов (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) в разрешении 3 поля (3 fields) в образцах дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенных из цельной крови или лейкоцитарной массы человека, обогащенных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) длинных фрагментов с последующим высокопроизводительным секвенированием на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (ПУ №РЗН 2014/1568 от 29.04.2014) и генотипированием с целью определения тканевой специфичности донора и/или реципиента для создания регистров и трансплантации органов и тканей.

Набор реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» предназначен для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

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

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

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

1.2. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Гены человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA-гены) – это комплекс генов, расположенных на шестой хромосоме, которые кодируют высоко полиморфные молекулы двух классов: HLA класс I и HLA класс II. К первому классу относятся гены HLA-A, HLA-B и HLA-C; ко второму классу относятся группы генов HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. Продукты генов HLA представляют собой гликопротеины, расположенные на поверхности всех ядерных клеток (HLA класс I), или на поверхности специализированных антиген-презентирующих иммунных клеток (HLA класс II). Основной функцией генов HLA является связывание собственных, измененных собственных (в результате мутаций) и чужеродных пептидных антигенов, образованных преимущественно из внутриклеточных (HLA класс I) или внеклеточных (HLA класс II) белков. Связывание приводит к активации и колониальной пролиферации Т-клеток, то есть запуску иммунного ответа (*T. Shiina, H. Inoko, J.K. Kulski, An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations, 2004*).

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

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

Методы высокопроизводительного секвенирования ДНК позволяют быстро и точно определять нуклеотидную последовательность интересующих генов за счет многократного прочтения множества коротких многократно клонированных фрагментов ДНК. Высокая производительность методов достигается за счет того, что секвенирование нескольких образцов идет параллельно в одном анализе. Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом HLA-типирования в случаях, когда требуется протипировать большое количество образцов с высоким разрешением, от 2-

го поля (2 fields) и выше, то есть до конкретной аллели или подгруппы аллелей (*J.M. Walker, HLA Typing Methods and Protocols, 2018*).

1.3. МЕДИЦИНСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ

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

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

Наиболее частой причиной поиска донора является необходимость трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) красного костного мозга (ККМ). Трансплантация ГСК является эффективным методом лечения онкогематологических и ряда других онкологических и наследственных заболеваний.

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

Для создания регистров и подбора доноров рекомендуется проводить типирование по 5 локусам (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1)¹ с разрешением 3 поля (3 fields)².

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

² Standards for Histocompatibility Testing. Version 8.0. European Federation of Immunogenetics. 2020

1.4. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показания к применению: HLA-типирование с целью создания регистров доноров ГСК и банков биологических материалов; HLA-типирование с целью трансплантации ГСК и солидных органов.

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

1.5. ОПИСАНИЕ

Набор реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» позволяет подготовить образец для проведения высокопроизводительного секвенирования с последующим типированием по 5 генам HLA-локуса.

На первом этапе для каждого образца ДНК проводится реакция таргетного обогащения методом мультиплексной ПЦР длинных фрагментов (long range PCR, LR-PCR) для наработки специфичных продуктов по каждому из 5 анализируемых локусов HLA (5 локусов амплифицируются в одной пробирке). На следующем этапе проводится фрагментация с одновременным восстановлением концов. Затем осуществляется этап лигирования, в ходе которого к фрагментам сразу пришиваются уникальные баркодированные адаптеры, после чего образцы пулируются и производится очистка пула магнитными частицами. После очистки пул библиотек разводится до целевой концентрации и секвенируется.

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

Анализ данных осуществляется с помощью программного обеспечения (ПО) «PARAllele™ HLA software» (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2020615630). В программное обеспечение импортируются результаты секвенирования и метаданные запуска, после чего автоматически запускается выравнивание прочтений, оценка качества и определение HLA-генотипа образца. После просмотра результатов пользователь экспортирует отчет. *Подробнее см. Том 2. Анализ данных и Том 3. Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software».*

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 192 образцов ДНК, включая контрольный образец, входящий в состав набора.

1.6. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Набор реагентов позволяет определять HLA-генотип с разрешением 3 поля (3 fields) по целевым локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1 и HLA-DRB1. Таргетные регионы локусов приведены в таблице 1.

Таблица № 1.

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

- Набор реагентов идентифицирует аллели, входящие в базу данных IPD/IMGT-HLA актуальной версии, и позволяет идентифицировать новые аллели. *Подробнее см. Том 2. Анализ данных.*
- Аналитическая чувствительность (*предел обнаружения*) Набора реагентов составляет 5 нг/мкл в объеме 10 мкл геномной ДНК человека.
- Диапазон рабочих концентраций: 5-100 нг/мкл.
- Аналитическая специфичность Набора реагентов по целевым локусам составляет 100%.
(определена как способность набора реагентов идентифицировать генотип (пару аллелей) только целевых HLA-локусов среди гомологичных локусов в исследуемом образце).

Локус	Аналитическая специфичность	95% ДИ
HLA-A	100%	99,65–100,00%
HLA-B	100%	99,65–100,00%
HLA-C	100%	99,65–100,00%
HLA-DQB1	100%	99,65–100,00%

HLA-DRB1	100%	99,65–100,00%
----------	------	---------------

- Диагностическая чувствительность - 100% в отношении каждого из целевых локусов.
(установлена как доля истинноположительных аллелей, определенных по базе данных IPD/IMGT-HLA на репрезентативной выборке образцов).

Локус	Диагностическая чувствительность	95% ДИ
HLA-A	100%	99,87–100,00%
HLA-B	100%	99,87–100,00%
HLA-C	100%	99,87–100,00%
HLA-DQB1	100%	99,87–100,00%
HLA-DRB1	100%	99,87–100,00%

- Диагностическая специфичность - 100% в отношении каждого из целевых локусов.
(установлена как доля истинноотрицательных аллелей, определенных по базе данных IPD/IMGT-HLA на репрезентативной выборке образцов).

Локус	Диагностическая специфичность	95% ДИ
HLA-A	100%	100,00–100,00%
HLA-B	100%	100,00–100,00%
HLA-C	100%	100,00–100,00%
HLA-DQB1	100%	100,00–100,00%
HLA-DRB1	100%	100,00–100,00%

- Повторяемость результатов в пределах запуска составляет 100% (ДИ 95%: 90,11%–100,00%).
- Воспроизводимость результатов составляет 100% (95% ДИ: 90,36%–100,00%).
- Набор реагентов идентифицирует контаминированные образцы.
- Анализ данных и HLA-типирование осуществляется с помощью входящего в состав набора программного обеспечения «PARAllele™ HLA software» версия 1 и алгоритма mercury-pipeline версия 1. Подробнее см. Том 2. Анализ данных и Том 3. Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software».

1.7. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Состав изделия с каталожным номером **HLA-v3a**:

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

Каталожный номер изделия HLA-v3a комплектуется планшетами для молекулярного баркодирования БА1 и БА2.

№ п/п	Комплекты и их компоненты	Сокращенное наименование	Объем	Количество
1. Комплект для таргетного обогащения				1 комплект
1.1	HLA ПЦР-буфер	ПБ	600 мкл	2 пробирки
1.2	Смесь праймеров	СП	325 мкл	2 пробирки
1.3	Полимераза	П	45 мкл	2 пробирки
1.4	Контрольный образец	К	50 мкл	1 пробирка
2. Комплект для приготовления библиотек				1 комплект
2.1	Буфер для фрагментации и восстановления	БО	820 мкл	2 пробирки
2.2	Смесь для фрагментации и восстановления	СО	85 мкл	2 пробирки
2.3	Буфер для лигирования	БЛ	1100 мкл	2 пробирки
2.4	Лигаза	Л	230 мкл	2 пробирки
2.5	Нейтрализующий буфер	Н	80 мкл	1 пробирка
3. Комплект для молекулярного баркодирования				1 комплект
3.1	Планшет для молекулярного баркодирования БА1	БА1	по 10 мкл	1 планшет
3.2	Планшет для молекулярного баркодирования БА2	БА2	по 10 мкл	1 планшет
4. Комплект для очистки				1 комплект
4.1	Стоп-реагент	СТ	2000 мкл	3 пробирки
4.2	Магнитные частицы	М	200 мкл	1 пробирка
5. Комплект для секвенирования				1 комплект
5.1	Картридж для секвенирования		-	1 штука
5.2	Ячейка и раствор для секвенирования		-	1 штука
6. Программное обеспечение PARAllele™ HLA software				Доступ к веб-приложению

Принадлежности отсутствуют.

Состав изделия с каталожным номером **HLA-v3b**:

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

Каталожный номер изделия HLA-v3b комплектуется планшетами для молекулярного баркодирования БА3 и БА4.

№ п/п	Комплекты и их компоненты	Сокращенное наименование	Объем	Количество
1. Комплект для таргетного обогащения				1 комплект
1.1	HLA ПЦР-буфер	ПБ	600 мкл	2 пробирки
1.2	Смесь праймеров	СП	325 мкл	2 пробирки
1.3	Полимераза	П	45 мкл	2 пробирки
1.4	Контрольный образец	К	50 мкл	1 пробирка
2. Комплект для приготовления библиотек				1 комплект
2.1	Буфер для фрагментации и восстановления	БО	820 мкл	2 пробирки
2.2	Смесь для фрагментации и восстановления	СО	85 мкл	2 пробирки
2.3	Буфер для лигирования	БЛ	1100 мкл	2 пробирки
2.4	Лигаза	Л	230 мкл	2 пробирки
2.5	Нейтрализующий буфер	Н	80 мкл	1 пробирка
3. Комплект для молекулярного баркодирования				1 комплект
3.1	Планшет для молекулярного баркодирования БА3	БА3	по 10 мкл	1 планшет
3.2	Планшет для молекулярного баркодирования БА4	БА4	по 10 мкл	1 планшет
4. Комплект для очистки				1 комплект
4.1	Стоп-реагент	СТ	2000 мкл	3 пробирки
4.2	Магнитные частицы	М	200 мкл	1 пробирка
5. Комплект для секвенирования				1 комплект
5.1	Картридж для секвенирования		-	1 штука
5.2	Ячейка и раствор для секвенирования		-	1 штука
6. Программное обеспечение PARAllele™ HLA software				Доступ к веб-приложению

Принадлежности отсутствуют.

Контрольный образец

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

Образец следует включать в каждую постановку «PARAllele™ HLA solution v3» для контроля корректности исполнения исследования.

Анализ данных

В составе набора реагентов поставляется полностью автоматизированное программное обеспечение «PARAllele™ HLA software» версия 1.

Подробнее см. Том 2. Анализ данных и Том 3. Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software».

1.8. ОБЩАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Этап	Описание	Общее время постановки (на 192 образца)	Время работы оператора постановки
Таргетное обогащение	В ходе мультиплексной ПЦР длинных фрагментов 5 локусов HLA нарабатываются в одной пробирке. Для анализа рекомендуется использовать геномную ДНК, выделенную из цельной крови или лейкоцитарной массы человека. Количество ДНК, необходимое для анализа одного образца ДНК, составляет от 50 до 1000 нг.	5-6 ч	1-2 ч
Создание библиотек	Библиотека представляет собой фрагментированные продукты LR-PCR с лигированными адаптерами Illumina. Баркодирование осуществляется в ходе лигирования. После баркодирования все образцы объединяются в пул. Финальная очистка производится для единого пула на 192 образца.	4-5 ч	2-3 ч
Приготовление образца	Приготовление образца заключается в денатурации, нейтрализации и разбавлении пула для последующего секвенирования на приборе MiSeq.	0,5 ч	0,5 ч
Секвенирование	Секвенирование осуществляется на приборе MiSeq с использованием Комплекта для секвенирования.	24 ч	0,5 ч
Анализ данных и формирование отчета	Анализ данных секвенирования включает выравнивание прочтений на полно-генные и кодирующие последовательности базы данных IPD/IMGT-HLA, оценку качества и формирование отчетов.	6-8 ч	-

1.9.ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

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

Потенциальные интерференты	
ДМСО (диметилсульфоксид)	
Источник интерферента:	Биоматериал (лейкоцитарная масса)
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР длинных фрагментов
Последствия и рекомендуемые меры: Высокие концентрации ДМСО будут приводить к ингибированию или неэффективному прохождению ПЦР длинных фрагментов при таргетном обогащении. Предельно допустимая концентрация ДМСО, используемого в качестве криопротектора при заготовке лейкоцитарной массы, составляет 5% в образце.	
Этанол	
Источник интерферента:	- Набор для выделения; - Протокол подготовки библиотек (очистка)
Стадия проявления потенциального интерферента:	- ПЦР длинных фрагментов; - Восстановление концов, лигирование
Последствия и рекомендуемые меры: Предельно допустимая концентрация этанола в образце составляет 5%. Превышение ПДК приводит к ингибированию работы ферментов нуклеинового обмена. Этанол используется в наборах для выделения ДНК и входит в состав буферов для промывки образца в процессе выделения. Использование некачественных колонок для выделения и/или несоблюдение инструкции по выделению ДНК будет приводить к появлению этанола в препарате ДНК и, как следствие, ингибированию ПЦР длинных фрагментов. Требуется точное соблюдение инструкций производителя Набора для выделения. Недостаточная просушка магнитных частиц после промывки этанолом во время выполнения протокола пробоподготовки может привести к неэффективной генерации кластеров при секвенировании. Требуется точное соблюдение инструкции производителя.	
Гемоглобин	
Источник интерферента:	Образец крови
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР длинных фрагментов;

Содержание гемоглобина не должно превышать 1 мг/мл в реакции ПЦР. Более высокие концентрации ингибируют полимеразу.	
Билирубин	
<i>Источник интерферента:</i>	Образец крови
<i>Стадия проявления потенциального интерферента:</i>	ПЦР длинных фрагментов;
Содержание билирубина не должно превышать 2 мкг/мл в реакции ПЦР. Более высокие концентрации ингибируют полимеразу.	

Источники:

1. The Intravascular Life Span of Transfused Leukocytes Tagged with Atabrine. LAURENS P. WHITE, Blood, 9:73-82, 1954.
2. Рекомендации по организации преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований. Кишкун А.А., Гильманов А.Ж., Долгих Т.И., Грищенко Д.А., Скороходова Т.Г., 2013
3. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. C. Schrader A. Schielke L. Ellerbroek R. Johne. Journal of Applied Microbiology. 2012.
4. Влияние диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида на термическую денатурацию человеческого сывороточного альбумина. К.Р. Григорян, Ш.А. Маркарян, М.Г. Азнаурян. Теоретическая и Экспериментальная Кробиология. Проблемы Кробиологии, т.19, 2009, №1.
5. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992). International Journal of Food Microbiology, 17(1), 37–45. doi:10.1016/0168-1605(92)90017-w
6. Effects of Heparin on Polymerase Chain Reaction for Blood White Cells. Masaharu Yokota, Noriyuki Tatsumi, Oytip Nathalang, Tetsuaki Yamada and Izumi Tsuda. Journal of Clinical Laboratory Analysis 13:133–140 (1999)
7. D. Loffert, S. Stump, N. Schaffrath, M. Berkenkopf and J. Kang, 1997 PCR: effects of template quality. Qiagen News 1: 8-10.
8. Zhian Zhang et al. Direct DNA Amplification from Crude Clinical Samples Using a PCR Enhancer Cocktail and Novel Mutants of Taq. J Mol Diagn. 2010 Mar; 12(2): 152–161.
9. Waleed Abu Al-Soud. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. J Clin Microbiol. 2001 Feb; 39(2): 485–493.

1.10. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Комплект оборудования, материалов и реагентов, необходимый для работы с «PARAllele™ HLA solution v3» и не входящий в состав Набора реагентов.

Описание	Производитель / Поставщик	Каталожный номер
ОБОРУДОВАНИЕ		
ПЦР-бокс (ламинар или рабочее место)	любой	-
ПЦР-амплификатор Veriti® 96-well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, США	4375786
Центрифуга-вортекс для ПЦР планшетов CVP-2	SIA Biosan, Латвия	BS-010219
Центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов (опционально)	любой	-
Вортекс для 96-луночных планшетов (опционально)	Вортекс для перемешивания содержимого 96-луночных планшетов с корпусом из металла и резиновой насадкой, циркуляционно-вибрационным типом движения, амплитудой колебания не менее 5 мм, частотой колебания до 2500 оборотов в минуту. Габариты не имеют существенного значения.	-
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-
Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 2—20 мкл; на 10—100 мкл (опционально); на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
Восьмиканальный дозатор 0,5—10 мкл	любой	-
96-канальный дозатор 0,5—10 мкл (опционально)	любой	-
Магнитный штатив	12331D (Thermo Fisher Scientific, США) или VP 772F6-3 (V&P Scientific Inc., США) или аналогичный магнитный штатив для 96-луночного планшета или 0,2 мл пробирок, выполненный из пластика и содержащий неодимовые магниты, для работы с суспензиями магнитных частиц и осуществляющий магнитизацию частиц.	-
Генетический секвенатор MiSeq с принадлежностями	Illumina Inc., США	SY-410-1003

Компьютер

Операционная система: Windows 7 (64 bit) / Windows 10 (64 bit) и выше;

Процессор: Intel Core i3/i5/i7 (от 2,4 ГГц);

Объем оперативной памяти: 4 ГБ и более;

Объем дискового накопителя: 500 ГБ и более

Сервер

Сервер должен поддерживать работу по протоколу CIFS/SMB (загрузка данных с секвенатора) и протоколам SSH+RSYNC (для передачи данных на удаленный сервер анализа и получения результатов).

Канал доступа в сеть Интернет не менее 10 Мбит/сек.

МАТЕРИАЛЫ

Оптические 96-луночные планшеты для ПЦР (например, MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates, или аналогичные)

Thermo Fisher Scientific

N8010560

Защитные пленки для 96-луночных планшетов (например, Thermo Fisher Scientific или Axugen)

-

-

Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл

любой

-

Оптические 0,2 мл пробирки для ПЦР

SSI

3225-00

Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл

Eppendorf

022431021

Пробирки LoBind™ объемом 2 мл

Eppendorf

022431048

Холодный штатив для планшетов и пробирок 0,2 мл

любой

-

KIMWIPES Delicate Task Wipes

KIMTECH SCIENCE

-

Ванночки пластиковые для реактивов

любой

-

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

Этанол, медицинский

любой

-

Tween 20, класс чистоты: для молекулярной биологии

любой

-

NaOH, класс чистоты: для молекулярной биологии

любой

-

Вода I типа, 18MΩ

любой

-

1.11. ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ

Аналитом является геномная ДНК человека. Минимально допустимая концентрация геномной ДНК в образце 5 нг/мкл. Протокол работает с входной ДНК в диапазоне концентраций 5 – 100 нг/мкл. Выравнивание концентраций образцов не производится. Возможна предварительная оценка входной ДНК флуориметрическим методом после процедуры выделения (например, флуориметр Qubit, Thermo Fisher Scientific).

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

Для экстракции ДНК возможно использовать наборы реагентов, зарегистрированные на территории РФ, предназначенные для работы с цельной кровью или лейкоцитарной массой человека. Выделение ДНК проводят в соответствии с используемым комплектом реагентов, который гарантирует отсутствие интерферирующих веществ (см. раздел **1.9. Интерферирующие вещества**) в образце геномной ДНК. Рекомендуют набор для выделения ДНК - Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия), РУ №ФСР2009/05220 от 18.05.2017 г. Для сбора образцов цельной крови использовать вакуумные пробирки для сбора крови с ЭДТА К2 или ЭДТА К3.

1.12. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Потенциальный риск применения Набора реагентов – класс 2Б (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г).
- Набор реагентов содержит ДНК, аналогичную последовательностям геномной ДНК человека. Данный материал синтетического происхождения и не представляет опасности для человека.
- При работе с Набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». СП 1.3.2333-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Не использовать компоненты Набора реагентов после истечения срока их годности.
- Перед началом работы с любыми компонентами внимательно ознакомиться с документами по безопасности, предоставленными производителями, а также актуальными инструкциями по их использованию.
- Во избежание контаминации ДНК необходимо пространственное разделение этапов пре- и пост-ПЦР: отдельные помещения, отдельные халаты, отдельные пипетки и другие лабораторные материалы.
- Персонал, проводящий исследования, должен проводить работы в защитной одежде – лабораторные халаты, средства индивидуальной защиты.
- При работе с химическими реагентами свести к минимуму непосредственный контакт с ними: надевать халаты и перчатки.
- Не допускать вдыхания испарений от химических реагентов: не оставлять реагенты открытыми, работать с реагентами только в хорошо проветриваемых помещениях.
- При работе с образцами биоматериала необходимо руководствоваться МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и соблюдать санитарно-эпидемические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

1.13. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИКИ РАБОТЫ

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

Рекомендации по контролю контаминации

- Во избежание контаминации ДНК настоятельно рекомендуется пространственное разделение пре- и пост-ПЦР зон.
- Всегда проводите работу в лабораторной одежде: халат с длинным рукавом и манжетами, одноразовые неопудренные медицинские перчатки.

- Приготовление всех рабочих смесей, в том числе смесей для ПЦР, должно проводиться с использованием наконечников с фильтрами.
- Всегда меняйте наконечник между разными образцами и баркодами.
- Для каждого этапа пробоподготовки используйте новые защитные пленки во избежание контаминации.
- Соблюдайте осторожность при работе с баркодами. Контаминация баркодов недопустима, поскольку приведет к неправильной идентификации генотипа.
- Меняйте перчатки при их контаминации баркодами или ДНК.
- Пипетируйте образцы медленно во избежание вспенивания.
- Протирайте рабочие поверхности до начала и после завершения работы деконтаминирующими средствами.
- Проводите регулярные деконтаминационные мероприятия для предупреждения загрязнения стоков реагентов и образцов.

Рекомендации по работе с протоколом

- Перед каждым этапом работы необходимо заблаговременно размораживать только необходимые для протокола реагенты и перемешивать их вортексированием.
- Вортексирование, или перемешивание, должно проводиться на настольном вортексе/центрифуге с разной интенсивностью для разных типов реагентов. Образцы ДНК, праймеры, баркоды и буферные растворы должны перемешиваться не менее 10 секунд с высокой интенсивностью. Смеси ферментов, должны перемешиваться с осторожностью: либо 1—2 секунды на вортексе с низкой интенсивностью, либо аккуратным встряхиванием пробирки.
- После перемешивания все реагенты необходимо центрифугировать в импульсном режиме (1—2 секунды) для сбрасывания капель со стенок и крышек пробирок.
- **Для этапов фрагментации и лигирования критично использование холодного штатива.**
- **Допустимо использование степпера для внесения реактивов при условии, что реактив вносится в лунку планшета, не затрагивая стенок и содержимого лунок.**

- Для внесения индексов строго рекомендуется использование 8- или 96-канального дозатора во избежание контаминации между лунками.

Рекомендации по работе с магнитными частицами

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

1.14. РИСКИ, СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗДЕЛИЯ

При анализе риска медицинского изделия «Набор реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» на всех стадиях его жизненного цикла было выявлено 52 риска.

После применения мер по управлению рисками остаточные риски по медицинскому изделию «Набор реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» составили:

- неприемлемая зона – 0;
- пограничная зона – 37;
- приемлемая зона – 17.

Полный остаточный риск является допустимым.

Набор реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» является надежным и безопасным для пациента, производящего и эксплуатирующего персонала, третьих лиц и окружающей среды.

2. ПРОТОКОЛ

Протокол работы с Набором реагентов состоит из 5 основных этапов:

- таргетное обогащение;
- создание баркодированных библиотек;
- пулирование и подготовка образца;
- секвенирование;
- анализ данных.

Библиотека создается для каждого образца отдельно. Объединение библиотек осуществляется после этапа лигирования с баркодированием для приготовления единого образца для секвенирования.

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

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

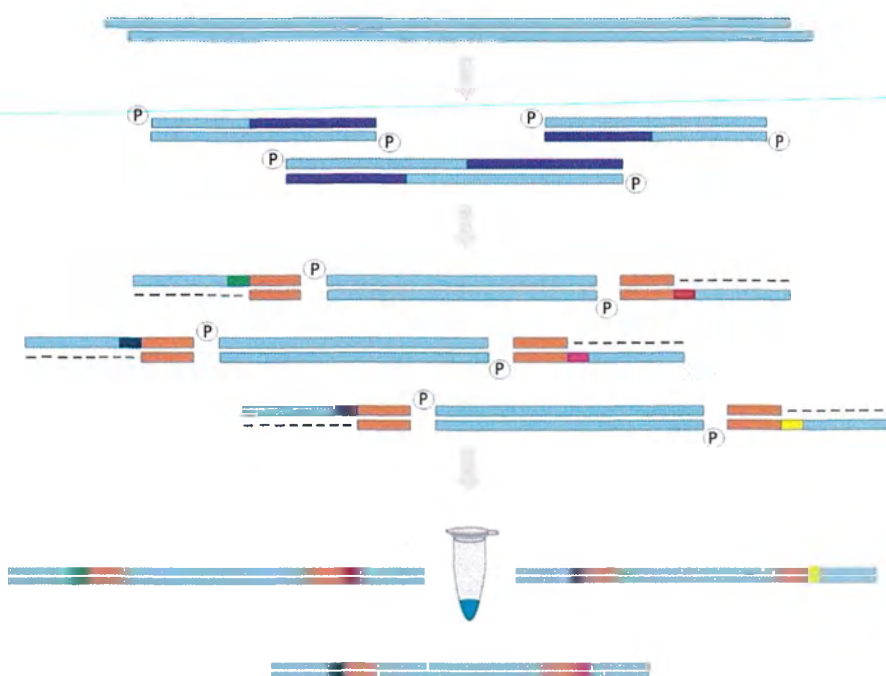
Схема приготовления библиотек

Продукты ПЦР длинных
фрагментов

Фрагментация и
восстановление

Лигирование
баркодированных
адаптеров

Создание общего пула
лигированных
библиотек



2.1.ТАРГЕТНОЕ ОБОГАЩЕНИЕ

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

Оборудование, материалы и реагенты для таргетного обогащения

Описание	Производитель	Кат. номер
Компоненты из Набора реагентов		
Комплект для таргетного обогащения		
ОБОРУДОВАНИЕ		
ПЦР-бокс (ламинар или рабочее место)	любой	-
ПЦР-амплификатор Veriti® 96-well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, США	4375786
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-
Центрифуга/вортекс для 96-луночных	См.описание в разделе 1.10	

планшетов

Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 2—20 мкл; на 10—100 мкл (опционально); на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
--	-------	---

МАТЕРИАЛЫ

Оптические 96-луночные планшеты для ПЦР (например, MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates, или аналогичные)	Thermo Fisher Scientific	N8010560
Защитные пленки для 96-луночных планшетов (например, Thermo Fisher Scientific или Axygen)	-	-
Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	любой	-
Пробирки LoBind™ объемом 2 мл	Eppendorf	022431048

Дополнительные реагенты

Вода I типа, 18MΩ	любой	-
-------------------	-------	---

Перед началом работы:

- Включите амплификатор, чтобы обеспечить нагрев крышки перед запуском ПЦР.
- Установите на амплификаторе программу таргетного обогащения.
- Подготовьте образцы ДНК – рабочая концентрация образцов ДНК для работы с протоколом составляет от 5 до 100 нг/мкл. Перед началом работы тщательно вортексируйте образцы ДНК и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из морозильной камеры HLA ПЦР-буфер (ПБ), Смесь праймеров (СП) и Контрольный образец (К), выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки компонентов. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Достаньте из морозильной камеры Полимеразу (П), коротко вортексируйте пробирку, центрифугируйте в импульсном режиме.

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

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

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

2. Тщательно перемешайте полученный мастер-микс на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
3. Приготовьте 96-луночный планшет и внесите в лунки планшета, соответствующие образцам, по 10 мкл мастер-микса.
4. В соответствующие лунки с мастер-миксом внесите по 10 мкл анализируемого образца ДНК.
5. Запечатйте планшет защитной пленкой. Тщательно вортексируйте планшет и центрифугируйте для сбора капель на дне лунок.
6. Запустите ПЦР-амплификатор со следующей программой (объем реакции 20 мкл):

Количество циклов	Температура	Время
1	94°C	2 мин
2	98°C	10 сек
	70°C	15 сек
2	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	69°C	15 сек
2	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	68°C	15 сек
2	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	67°C	15 сек
2	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек

	66°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	65°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
3	64°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	63°C	15 сек
3	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	62°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
3	98°C	10 сек
	61°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
3	60°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	59°C	15 сек
3	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
2	58°C	15 сек
	68°C	5,5 мин
	98°C	10 сек
	57°C	15 сек
2	68°C	5,5 мин
	68°C	10 мин
1	4°C	∞ ³

БЕЗОПАСНАЯ ОСТАНОВКА ПРОТОКОЛА

³ Готовые продукты ПЦР можно оставить на ночь в амплификаторе на +4 °C или необходимо поместить на хранение при -20 °C.

2.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК

Приготовление библиотек включает следующие основные этапы:

- фрагментация и восстановление концов;
- лигирование баркодированных адаптеров;
- пулирование;
- очистка аликвот пула.

После таргетного обогащения ПЦР-смесь подвергается ферментативной фрагментации с одновременным восстановлением концов. Затем к фрагментам пришиваются баркодированные адаптеры, после чего библиотеки пулируются. После пулирования образец проходит очистку.

Очищенная библиотека готова к секвенированию.

Оборудование, материалы и реагенты для приготовления библиотек

Описание	Производитель	Кат. Номер
Компоненты из Набора реагентов		
Комплект для приготовления библиотек		
Планшет для молекулярного баркодирования БА1 или БА3		
Планшет для молекулярного баркодирования БА2 или БА4		
Комплект для очистки		
ОБОРУДОВАНИЕ		
Рабочее место	любой	-
ПЦР-амплификатор Veriti® 96-well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, США	4375786
Центрифуга/вортекс для 96-луночных планшетов	См. описание в разделе 1.10	-
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-
Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 2—20 мкл; на 10—100 мкл (опционально); на 20—200	любой	-

мкл; на 100—1000 мкл

Восьмиканальный дозатор 0,5—10 мкл

любой

96-канальный дозатор 0,5—10 мкл

любой

Ванночка для реагентов

любой

Магнитный штатив

См. описание в разделе 1.10

МАТЕРИАЛЫ

0,2 мл пробирки для ПЦР

любой

Защитные пленки для 96-луночных планшетов (например, Thermo Fisher Scientific или Axugen)

Наконечники с фильтром в штативах для

дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл

любой

Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл

Eppendorf

022431021

Пробирки LoBind™ объемом 2 мл

Eppendorf

022431048

Холодный штатив для планшетов и пробирок 0,2 мл

любой

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

Этанол, медицинский

любой

Вода I типа, 18MΩ

любой

Фрагментация и восстановление концов

Перед началом работы:

- Заблаговременно подготовьте к работе холодный штатив: выдержите в морозильной камере не менее 30 минут до начала работы.
- Важно: заблаговременно включите амплификатор, чтобы обеспечить нагрев крышки прибора перед началом этапа фрагментации и восстановления!
- Установите на амплификаторе программу для фрагментации и восстановления (см. ниже).
- Достаньте из морозильной камеры **Буфер для фрагментации и восстановления (БО)**, выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки буфера. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в

импульсном режиме.

- Достаньте из морозильной камеры **Смесь для для фрагментации и восстановления (СО)**. Вortexируйте пробирку 1-2 секунды и центрифугируйте в импульсном режиме.

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

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

Компонент	Объем, мкл
Буфер для фрагментации и восстановления (БО)	7,3
Смесь для фрагментации и восстановления (СО)	0,7
Итого	8

2. Тщательно vortexируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.
3. Установите 96-луночный планшет с продуктами ПЦР **на холодный штатив и выдержите пару минут до охлаждения реакции.**
4. В каждую лунку планшета с продуктами ПЦР внесите **по 8 мкл** мастер-микса для фрагментации и восстановления концов.
5. Снимите планшет с холодного штатива. Уберите холодный штатив в морозильную камеру.
6. Запечатайте планшет защитной пленкой, тщательно vortexируйте планшет, центрифугируйте для сбора капель на дне лунок и поместите планшет в амплификатор с заданной программой (объем реакции 28 мкл):

Температура	Время
37°C	10 мин
65°C	20 мин

4°C

до 1 часа⁴

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

Лигирование баркодированных адаптеров

Перед началом работы:

- Достаньте из морозильной камеры **Буфер для лигирования (БЛ)**, выбранный **Планшет для молекулярного баркодирования** и выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки реагентов. Тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме.
- Установите на амплификаторе программу для лигирования (см. ниже).

1. Достаньте из морозильной камеры Лигазу (Л). Вортексируйте пробирку 2 секунды, центрифугируйте в импульсном режиме.
2. Приготовьте мастер-микс для лигирования по следующему протоколу (из расчета на каждый образец):

Компонент	Объем, мкл
Вода I типа	6
Буфер для лигирования (БЛ)	10
Лигаза (Л)	2
Итого	18

3. Тщательно вортексируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.
4. **Уберите мастер-микс для лигирования до начала работы в холодильную камеру на температурный режим +2...+8°C.**
5. Установите 96-луночный планшет с фрагментированными и восстановленными образцами ДНК на **холодный штатив** и **выдержите пару минут до охлаждения реакции.**

⁴ Продукт фрагментации и восстановления не подлежит хранению. После окончания реакции необходимо сразу приступить к следующему этапу.

6. С использованием 8-канального или 96-канального дозатора из планшета для молекулярного баркодирования перенесите по 4 мкл смеси баркодированных адаптеров в лунки рабочего планшета с продуктами фрагментации и восстановления концов.
7. Извлеките из холодильной камеры мастер-микс для лигирования, тщательно вортексируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.
8. В каждую лунку рабочего планшета внесите **по 18 мкл** мастер-микса для лигирования.
9. Снимите планшет с холодного штатива, запечатайте планшет защитной пленкой, тщательно вортексируйте, центрифугируйте для сбора капель на дне лунок и поместите планшет в амплификатор с заданной программой (объем реакции 50 мкл):

Температура	Время
22°C	30 мин
65°C	10 мин
4°C	до 1 часа ⁵

10. После окончания программы извлеките планшет из амплификатора.

БЕЗОПАСНАЯ ОСТАНОВКА ПРОТОКОЛА

Пулирование баркодированных библиотек

Перед началом работы:

- Достаньте из холодильной камеры **Комплект для очистки**, приготовьте Магнитные частицы (M), выдержите их при комнатной температуре 20 мин. Тщательно перемешайте частицы перед использованием!
- Приготовьте не менее 1,2 мл 70% этанола. **Внимание! Очистка идет для 2 аликвот единого пула библиотек.**

⁵ Лигированный продукт можно хранить при температуре -20 °C в течение 14 дней.

- Подготовьте стоп-реагент (СТ) для работы. Внесите **6 мл** СТ в ванночку для реагентов.

1. С использованием 8-канального дозатора внесите в каждую лунку 96-луночных планшетов с баркодированными библиотеками **по 6,8 мкл** стоп-реагента (СТ) из ванночки для реагентов.
2. **Тщательно** вортексируйте планшеты, центрифугируйте для сбора капель на дне лунок.
3. В 2 мл пробирке Lo-Bind™ объедините **по 10 мкл** каждой баркодированной библиотеки в единый пул из 192 библиотек. **Рекомендуется пулировать все библиотеки одним наконечником, используя дозатор объемом до 20 мкл.**
4. Тщательно вортексируйте пул и центрифугируйте в импульсном режиме. Повторите цикл вортексирования-центрифугирования 3 раза.
5. Отберите из пула **2 аликвоты, по 80 мкл каждая**, в 0,2 мл пробирки и приступайте к этапу очистки.

Очистка пула на магнитных частицах

Работа проводится с 2 аликвотами пула объемом 80 мкл каждая.

1. К каждой аликвоте пула баркодированных библиотек объемом **80 мкл** добавьте **36 мкл** тщательно перемешанных магнитных частиц.
2. Тщательно вортексируйте смеси, центрифугируйте в импульсном режиме.
3. Инкубируйте полученные смеси в течение 5 минут при комнатной температуре.
4. По истечении времени инкубации поместите пробирки на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
5. Не снимая пробирок с магнитного штатива, аккуратно перенесите супернатант в две новые пробирки (каждая аликвота отдельно), не задевая осадка магнитных частиц. Удалите осадок магнитных частиц.

Примечание: целевые фрагменты находятся в супернатанте. Сохраните супернатант!

6. Добавьте **20 мкл** тщательно перемешанных магнитных частиц к супернатантам из пункта 5. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.
7. Инкубируйте образцы 5 минут при комнатной температуре.

8. По истечении времени инкубации поместите пробирки на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
9. Не снимая образцы с магнитного штатива, удалите супернатант, не задевая осадок магнитных частиц.

Примечание: целевые фрагменты связаны с осадком магнитных частиц. Сохраните осадок магнитных частиц!

10. Добавьте в пробирки с осадком по 150 мкл 70% спирта. Удалите спирт, не задевая осадок.
11. Повторите пункт 10 еще раз.
12. После удаления спирта снимите пробирки с магнитного штатива, закройте крышки и центрифугируйте в импульсном режиме. Поместите пробирки на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта.
13. Подсушите осадок в течение 3-5 минут на магнитном штативе, не закрывая пробирку.
14. **Снимите пробирки с магнитного штатива, добавьте по 30 мкл воды 1 типа к каждой аликвоте и тщательно перемешайте содержимое на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.** Инкубируйте в течение 1 минуты.
15. Не удаляя частицы, добавьте по **18 мкл** тщательно перемешанных магнитных частиц к каждой аликвоте.
16. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
17. Инкубируйте полученные смеси в течение 5 минут при комнатной температуре.
18. По истечении времени инкубации поместите пробирки на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
19. Не снимая пробирок с магнитного штатива, удалите супернатант, не задевая осадок магнитных частиц. **Осадок содержит целевые фрагменты ДНК.** Добавьте в пробирки с осадком 150 мкл 70% спирта. Удалите спирт, не задевая осадка.
20. Повторите пункт 19 еще раз.
21. После удаления спирта снимите пробирки с магнитного штатива и центрифугируйте в импульсном режиме. Поместите пробирки на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта.
22. Подсушите осадок в течение 3-5 минут на магнитном штативе, не закрывая пробирку.
23. Снимите пробирки с магнитного штатива, добавьте в каждую пробирку **20 мкл** воды 1 типа и тщательно перемешайте содержимое на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
24. Поместите пробирки обратно на магнитный штатив. Инкубируйте до восстановления прозрачности раствора.

25. Перенесите по **20 мкл** супернатанта от каждой аликвоты в одну новую пробирку. **Объединенный супернатант в объеме 40 мкл** содержит единый пул готовых библиотек.
26. Готовый пул библиотек предназначен для секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США).⁶

2.3. РАЗВЕДЕНИЕ И ДЕНАТУРАЦИЯ

ВНИМАНИЕ!

Не храните денатурированный пул библиотек. После денатурации незамедлительно приступайте к запуску секвенирования.

Во время данного этапа очищенный пул библиотек денатурируется для получения одноцепочечной библиотеки, которая предназначена для загрузки в картридж.

Оборудование, материалы и реагенты для разведения, пулирования и денатурации

Описание	Производитель/Поставщик	Каталожный номер
Компоненты из Набора реагентов		
Нейтрализующий буфер (Н) из Комплекта для приготовления библиотек		
Комплект для секвенирования		
ОБОРУДОВАНИЕ		
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-
Пипетки одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 2—20 мкл; на 10—100 мкл (опционально); на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	любой	-
Компьютер	Операционная система: Windows 7 (64 bit) / Windows 10 (64 bit) и выше; Процессор: Intel Core i3/i5/i7 (от 2,4 ГГц);	

⁶ Очищенный пул библиотек может храниться при +4°C в течение суток или при -20°C в течение 1 месяца.

Объем оперативной памяти: 4 ГБ и более;
Объем дискового накопителя: 500 ГБ и более;

МАТЕРИАЛЫ

Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	любой	-
Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл	Eppendorf	022431021

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

NaOH, класс чистоты: для молекулярной биологии	любой	-
Вода I типа, 18MΩ	любой	-

Денатурация пула библиотек

1. Начните разморозку картриджа для секвенирования и разморозьте реагент HT1 из Комплекта для секвенирования.
2. Приготовьте свежий 0,2M NaOH, объединив 800 мкл воды 1 типа и 200 мкл 1M NaOH. Полученный раствор представляет собой 1 мл 0,2M NaOH. Не храните 0,2M NaOH более 1 недели.
3. В 1,5 мл пробирке LoBind™ приготовьте следующую смесь для проведения денатурации:

Компонент	Объем, мкл
Пул библиотек	20
0,2M NaOH	20
Итого	40

4. Вortexируйте и центрифугируйте в импульсном режиме.
5. Инкубируйте смесь 5 минут при комнатной температуре.
6. К 40 мкл денатурированного пула библиотек добавьте **20 мкл Нейтрализующего буфера (Н)**.
7. Вortexируйте и центрифугируйте в импульсном режиме.
8. К 60 мкл денатурированного пула библиотек из пункта 6 добавьте **940 мкл** реагента HT1 (входит в состав **Комплекта для секвенирования**).
9. Вortexируйте и центрифугируйте в импульсном режиме.

10. В картридж при секвенировании на приборе MiSeq загружается **600 мкл** из 1000 мкл полученного раствора.

2.4. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

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

Секвенирование следует осуществлять на генетическом секвенаторе MiSeq с использованием **Комплекта для секвенирования**. При работе с оборудованием следует руководствоваться соответствующей эксплуатационной документацией.

2.4.1. Планирование запуска

Под планированием запуска понимается создание конфигурации запуска с основными параметрами:

- тип индексирования образцов (одинарное/двойное);
- режим прочтений (парноконцевое/непарноконцевое чтение);
- количество циклов для прочтений и индексов;
- последовательности адаптеров;
- протокол анализа данных (генерация «сырых» прочтений, выравнивание и т.п.);
- перечень образцов и соответствующих пар индексов.

Для секвенирования с настоящим набором реагентов требуется установить следующие параметры запуска:

Параметр	Значение
Тип индексирования	Двойное индексирование (Dual Index sequencing)
Режим прочтений	Парноконцевое чтение (Paired-end sequencing)
Количество циклов (flows)	• Прямые прочтения: 151 • Обратные прочтения: 151 • Индекс i7: 8 • Индекс i5: 8
Последовательность адаптера	• Прямые прочтения:

	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA • Обратные прочтения: AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
Протокол анализа данных	Генерация сырых прочтений (GenerateFASTQ)

Перечень пар индексов для варианта комплектации HLAв3a:

Лунка	Название индекса i7	Последовательность индекса i7	Название индекса i5	Последовательность индекса i5
Планшет для молекулярного баркодирования БА1				
A1	1	ATTACTCG	A	TATAGCCT
B1	1	ATTACTCG	B	ATAGAGGC
C1	1	ATTACTCG	C	CCTATCCT
D1	1	ATTACTCG	D	GGCTCTGA
E1	1	ATTACTCG	E	AGGCGAAG
F1	1	ATTACTCG	F	TAATCTTA
G1	1	ATTACTCG	G	CAGGACGT
H1	1	ATTACTCG	H	GTA CTGAC
A2	2x	GCTACGCT	A	TATAGCCT
B2	2x	GCTACGCT	B	ATAGAGGC
C2	2x	GCTACGCT	C	CCTATCCT
D2	2x	GCTACGCT	D	GGCTCTGA
E2	2x	GCTACGCT	E	AGGCGAAG
F2	2x	GCTACGCT	F	TAATCTTA
G2	2x	GCTACGCT	G	CAGGACGT
H2	2x	GCTACGCT	H	GTA CTGAC
A3	3	CGCTCATT	A	TATAGCCT
B3	3	CGCTCATT	B	ATAGAGGC
C3	3	CGCTCATT	C	CCTATCCT
D3	3	CGCTCATT	D	GGCTCTGA
E3	3	CGCTCATT	E	AGGCGAAG
F3	3	CGCTCATT	F	TAATCTTA
G3	3	CGCTCATT	G	CAGGACGT
H3	3	CGCTCATT	H	GTA CTGAC
A4	4	GAGATTCC	A	TATAGCCT
B4	4	GAGATTCC	B	ATAGAGGC
C4	4	GAGATTCC	C	CCTATCCT
D4	4	GAGATTCC	D	GGCTCTGA
E4	4	GAGATTCC	E	AGGCGAAG
F4	4	GAGATTCC	F	TAATCTTA
G4	4	GAGATTCC	G	CAGGACGT
H4	4	GAGATTCC	H	GTA CTGAC
A5	5x	CGAGGCTG	A	TATAGCCT

B5	5x	CGAGGCTG	B	ATAGAGGC
C5	5x	CGAGGCTG	C	CCTATCCT
D5	5x	CGAGGCTG	D	GGCTCTGA
E5	5x	CGAGGCTG	E	AGGCGAAG
F5	5x	CGAGGCTG	F	TAATCTTA
G5	5x	CGAGGCTG	G	CAGGACGT
H5	5x	CGAGGCTG	H	GTA CTGAC
A6	6	GAATTCGT	A	TATAGCCT
B6	6	GAATTCGT	B	ATAGAGGC
C6	6	GAATTCGT	C	CCTATCCT
D6	6	GAATTCGT	D	GGCTCTGA
E6	6	GAATTCGT	E	AGGCGAAG
F6	6	GAATTCGT	F	TAATCTTA
G6	6	GAATTCGT	G	CAGGACGT
H6	6	GAATTCGT	H	GTA CTGAC
A7	7	CTGAAGCT	A	TATAGCCT
B7	7	CTGAAGCT	B	ATAGAGGC
C7	7	CTGAAGCT	C	CCTATCCT
D7	7	CTGAAGCT	D	GGCTCTGA
E7	7	CTGAAGCT	E	AGGCGAAG
F7	7	CTGAAGCT	F	TAATCTTA
G7	7	CTGAAGCT	G	CAGGACGT
H7	7	CTGAAGCT	H	GTA CTGAC
A8	8	TAATGCGC	A	TATAGCCT
B8	8	TAATGCGC	B	ATAGAGGC
C8	8	TAATGCGC	C	CCTATCCT
D8	8	TAATGCGC	D	GGCTCTGA
E8	8	TAATGCGC	E	AGGCGAAG
F8	8	TAATGCGC	F	TAATCTTA
G8	8	TAATGCGC	G	CAGGACGT
H8	8	TAATGCGC	H	GTA CTGAC
A9	9	CGGCTATG	A	TATAGCCT
B9	9	CGGCTATG	B	ATAGAGGC
C9	9	CGGCTATG	C	CCTATCCT
D9	9	CGGCTATG	D	GGCTCTGA
E9	9	CGGCTATG	E	AGGCGAAG
F9	9	CGGCTATG	F	TAATCTTA
G9	9	CGGCTATG	G	CAGGACGT
H9	9	CGGCTATG	H	GTA CTGAC
A10	10x	TGCAGCTA	A	TATAGCCT
B10	10x	TGCAGCTA	B	ATAGAGGC
C10	10x	TGCAGCTA	C	CCTATCCT
D10	10x	TGCAGCTA	D	GGCTCTGA
E10	10x	TGCAGCTA	E	AGGCGAAG
F10	10x	TGCAGCTA	F	TAATCTTA
G10	10x	TGCAGCTA	G	CAGGACGT

H10	10x	TGCAGCTA	H	GTAAGGAG
A11	11	TCTCGCGC	A	TATAGCCT
B11	11	TCTCGCGC	B	ATAGAGGC
C11	11	TCTCGCGC	C	CCTATCCT
D11	11	TCTCGCGC	D	GGCTCTGA
E11	11	TCTCGCGC	E	AGGCGAAG
F11	11	TCTCGCGC	F	TAATCTTA
G11	11	TCTCGCGC	G	CAGGACGT
H11	11	TCTCGCGC	H	GTAAGGAG
A12	12	AGCGATAG	A	TATAGCCT
B12	12	AGCGATAG	B	ATAGAGGC
C12	12	AGCGATAG	C	CCTATCCT
D12	12	AGCGATAG	D	GGCTCTGA
E12	12	AGCGATAG	E	AGGCGAAG
F12	12	AGCGATAG	F	TAATCTTA
G12	12	AGCGATAG	G	CAGGACGT
H12	12	AGCGATAG	H	GTAAGGAG

Планшет для молекулярного баркодирования БА2

A1	1	ATTACTCG	I	TAGATCGC
B1	1	ATTACTCG	J	CTCTCTAT
C1	1	ATTACTCG	K	TATCCTCT
D1	1	ATTACTCG	L	AGAGTAGA
E1	1	ATTACTCG	M	GTAAGGAG
F1	1	ATTACTCG	N	ACTGCATA
G1	1	ATTACTCG	O	AAGGAGTA
H1	1	ATTACTCG	P	CTAAGCCT
A2	2x	GCTACGCT	I	TAGATCGC
B2	2x	GCTACGCT	J	CTCTCTAT
C2	2x	GCTACGCT	K	TATCCTCT
D2	2x	GCTACGCT	L	AGAGTAGA
E2	2x	GCTACGCT	M	GTAAGGAG
F2	2x	GCTACGCT	N	ACTGCATA
G2	2x	GCTACGCT	O	AAGGAGTA
H2	2x	GCTACGCT	P	CTAAGCCT
A3	3	CGCTCATT	I	TAGATCGC
B3	3	CGCTCATT	J	CTCTCTAT
C3	3	CGCTCATT	K	TATCCTCT
D3	3	CGCTCATT	L	AGAGTAGA
E3	3	CGCTCATT	M	GTAAGGAG
F3	3	CGCTCATT	N	ACTGCATA
G3	3	CGCTCATT	O	AAGGAGTA
H3	3	CGCTCATT	P	CTAAGCCT
A4	4	GAGATTCC	I	TAGATCGC
B4	4	GAGATTCC	J	CTCTCTAT
C4	4	GAGATTCC	K	TATCCTCT
D4	4	GAGATTCC	L	AGAGTAGA

E4	4	GAGATTCC	M	GTAAGGAG
F4	4	GAGATTCC	N	ACTGCATA
G4	4	GAGATTCC	O	AAGGAGTA
H4	4	GAGATTCC	P	CTAAGCCT
A5	5x	CGAGGCTG	I	TAGATCGC
B5	5x	CGAGGCTG	J	CTCTCTAT
C5	5x	CGAGGCTG	K	TATCCTCT
D5	5x	CGAGGCTG	L	AGAGTAGA
E5	5x	CGAGGCTG	M	GTAAGGAG
F5	5x	CGAGGCTG	N	ACTGCATA
G5	5x	CGAGGCTG	O	AAGGAGTA
H5	5x	CGAGGCTG	P	CTAAGCCT
A6	6	GAATTCGT	I	TAGATCGC
B6	6	GAATTCGT	J	CTCTCTAT
C6	6	GAATTCGT	K	TATCCTCT
D6	6	GAATTCGT	L	AGAGTAGA
E6	6	GAATTCGT	M	GTAAGGAG
F6	6	GAATTCGT	N	ACTGCATA
G6	6	GAATTCGT	O	AAGGAGTA
H6	6	GAATTCGT	P	CTAAGCCT
A7	7	CTGAAGCT	I	TAGATCGC
B7	7	CTGAAGCT	J	CTCTCTAT
C7	7	CTGAAGCT	K	TATCCTCT
D7	7	CTGAAGCT	L	AGAGTAGA
E7	7	CTGAAGCT	M	GTAAGGAG
F7	7	CTGAAGCT	N	ACTGCATA
G7	7	CTGAAGCT	O	AAGGAGTA
H7	7	CTGAAGCT	P	CTAAGCCT
A8	8	TAATGCGC	I	TAGATCGC
B8	8	TAATGCGC	J	CTCTCTAT
C8	8	TAATGCGC	K	TATCCTCT
D8	8	TAATGCGC	L	AGAGTAGA
E8	8	TAATGCGC	M	GTAAGGAG
F8	8	TAATGCGC	N	ACTGCATA
G8	8	TAATGCGC	O	AAGGAGTA
H8	8	TAATGCGC	P	CTAAGCCT
A9	9	CGGCTATG	I	TAGATCGC
B9	9	CGGCTATG	J	CTCTCTAT
C9	9	CGGCTATG	K	TATCCTCT
D9	9	CGGCTATG	L	AGAGTAGA
E9	9	CGGCTATG	M	GTAAGGAG
F9	9	CGGCTATG	N	ACTGCATA
G9	9	CGGCTATG	O	AAGGAGTA
H9	9	CGGCTATG	P	CTAAGCCT
A10	10x	TGCAGCTA	I	TAGATCGC
B10	10x	TGCAGCTA	J	CTCTCTAT

C10	10x	TGCAGCTA	K	TATCCTCT
D10	10x	TGCAGCTA	L	AGAGTAGA
E10	10x	TGCAGCTA	M	GTAAGGAG
F10	10x	TGCAGCTA	N	ACTGCATA
G10	10x	TGCAGCTA	O	AAGGAGTA
H10	10x	TGCAGCTA	P	CTAAGCCT
A11	11	TCTCGCGC	I	TAGATCGC
B11	11	TCTCGCGC	J	CTCTCTAT
C11	11	TCTCGCGC	K	TATCCTCT
D11	11	TCTCGCGC	L	AGAGTAGA
E11	11	TCTCGCGC	M	GTAAGGAG
F11	11	TCTCGCGC	N	ACTGCATA
G11	11	TCTCGCGC	O	AAGGAGTA
H11	11	TCTCGCGC	P	CTAAGCCT
A12	12	AGCGATAG	I	TAGATCGC
B12	12	AGCGATAG	J	CTCTCTAT
C12	12	AGCGATAG	K	TATCCTCT
D12	12	AGCGATAG	L	AGAGTAGA
E12	12	AGCGATAG	M	GTAAGGAG
F12	12	AGCGATAG	N	ACTGCATA
G12	12	AGCGATAG	O	AAGGAGTA
H12	12	AGCGATAG	P	CTAAGCCT

Перечень пар индексов для варианта комплектации HLA_{v3b}:

Лунка	Название индекса i7	Последовательность индекса i7	Название индекса i5	Последовательность индекса i5
Планшет для молекулярного баркодирования БА3				
A1	S1	ATCACGAC	SA	TGAACCTT
B1	S1	ATCACGAC	SB	TGCTAAGT
C1	S1	ATCACGAC	SC	TGTTCTCT
D1	S1	ATCACGAC	SD	TAAGACAC
E1	S1	ATCACGAC	SE	CTAATCGA
F1	S1	ATCACGAC	SF	CTAGAACA
G1	S1	ATCACGAC	SG	TAAGTTCC
H1	S1	ATCACGAC	SH	TAGACCTA
A2	S2	ACAGTGGT	SA	TGAACCTT
B2	S2	ACAGTGGT	SB	TGCTAAGT
C2	S2	ACAGTGGT	SC	TGTTCTCT
D2	S2	ACAGTGGT	SD	TAAGACAC
E2	S2	ACAGTGGT	SE	CTAATCGA
F2	S2	ACAGTGGT	SF	CTAGAACA
G2	S2	ACAGTGGT	SG	TAAGTTCC
H2	S2	ACAGTGGT	SH	TAGACCTA
A3	S3	CAGATCCA	SA	TGAACCTT
B3	S3	CAGATCCA	SB	TGCTAAGT

C3	S3	CAGATCCA	SC	TGTTCTCT
D3	S3	CAGATCCA	SD	TAAGACAC
E3	S3	CAGATCCA	SE	CTAATCGA
F3	S3	CAGATCCA	SF	CTAGAACA
G3	S3	CAGATCCA	SG	TAAGTTCC
H3	S3	CAGATCCA	SH	TAGACCTA
A4	S4	AACCCCTC	SA	TGAACCTT
B4	S4	AACCCCTC	SB	TGCTAAGT
C4	S4	AACCCCTC	SC	TGTTCTCT
D4	S4	AACCCCTC	SD	TAAGACAC
E4	S4	AACCCCTC	SE	CTAATCGA
F4	S4	AACCCCTC	SF	CTAGAACA
G4	S4	AACCCCTC	SG	TAAGTTCC
H4	S4	AACCCCTC	SH	TAGACCTA
A5	S5	CCCAACCT	SA	TGAACCTT
B5	S5	CCCAACCT	SB	TGCTAAGT
C5	S5	CCCAACCT	SC	TGTTCTCT
D5	S5	CCCAACCT	SD	TAAGACAC
E5	S5	CCCAACCT	SE	CTAATCGA
F5	S5	CCCAACCT	SF	CTAGAACA
G5	S5	CCCAACCT	SG	TAAGTTCC
H5	S5	CCCAACCT	SH	TAGACCTA
A6	S6	GAAACCCA	SA	TGAACCTT
B6	S6	GAAACCCA	SB	TGCTAAGT
C6	S6	GAAACCCA	SC	TGTTCTCT
D6	S6	GAAACCCA	SD	TAAGACAC
E6	S6	GAAACCCA	SE	CTAATCGA
F6	S6	GAAACCCA	SF	CTAGAACA
G6	S6	GAAACCCA	SG	TAAGTTCC
H6	S6	GAAACCCA	SH	TAGACCTA
A7	S7	AGGGTCAA	SA	TGAACCTT
B7	S7	AGGGTCAA	SB	TGCTAAGT
C7	S7	AGGGTCAA	SC	TGTTCTCT
D7	S7	AGGGTCAA	SD	TAAGACAC
E7	S7	AGGGTCAA	SE	CTAATCGA
F7	S7	AGGGTCAA	SF	CTAGAACA
G7	S7	AGGGTCAA	SG	TAAGTTCC
H7	S7	AGGGTCAA	SH	TAGACCTA
A8	S8	AGGAGTGG	SA	TGAACCTT
B8	S8	AGGAGTGG	SB	TGCTAAGT
C8	S8	AGGAGTGG	SC	TGTTCTCT
D8	S8	AGGAGTGG	SD	TAAGACAC
E8	S8	AGGAGTGG	SE	CTAATCGA
F8	S8	AGGAGTGG	SF	CTAGAACA
G8	S8	AGGAGTGG	SG	TAAGTTCC
H8	S8	AGGAGTGG	SH	TAGACCTA

A9	S9	CGTACTAG	SA	TGAACCTT
B9	S9	CGTACTAG	SB	TGCTAAGT
C9	S9	CGTACTAG	SC	TGTTCTCT
D9	S9	CGTACTAG	SD	TAAGACAC
E9	S9	CGTACTAG	SE	CTAATCGA
F9	S9	CGTACTAG	SF	CTAGAACA
G9	S9	CGTACTAG	SG	TAAGTTCC
H9	S9	CGTACTAG	SH	TAGACCTA
A10	S10	GGACTCCT	SA	TGAACCTT
B10	S10	GGACTCCT	SB	TGCTAAGT
C10	S10	GGACTCCT	SC	TGTTCTCT
D10	S10	GGACTCCT	SD	TAAGACAC
E10	S10	GGACTCCT	SE	CTAATCGA
F10	S10	GGACTCCT	SF	CTAGAACA
G10	S10	GGACTCCT	SG	TAAGTTCC
H10	S10	GGACTCCT	SH	TAGACCTA
A11	S11	TAGGCATG	SA	TGAACCTT
B11	S11	TAGGCATG	SB	TGCTAAGT
C11	S11	TAGGCATG	SC	TGTTCTCT
D11	S11	TAGGCATG	SD	TAAGACAC
E11	S11	TAGGCATG	SE	CTAATCGA
F11	S11	TAGGCATG	SF	CTAGAACA
G11	S11	TAGGCATG	SG	TAAGTTCC
H11	S11	TAGGCATG	SH	TAGACCTA
A12	S12	CTCTCTAC	SA	TGAACCTT
B12	S12	CTCTCTAC	SB	TGCTAAGT
C12	S12	CTCTCTAC	SC	TGTTCTCT
D12	S12	CTCTCTAC	SD	TAAGACAC
E12	S12	CTCTCTAC	SE	CTAATCGA
F12	S12	CTCTCTAC	SF	CTAGAACA
G12	S12	CTCTCTAC	SG	TAAGTTCC
H12	S12	CTCTCTAC	SH	TAGACCTA

Планшет для молекулярного баркодирования БА4

A1	S1	ATCACGAC	SI	AGCGCTAG
B1	S1	ATCACGAC	SJ	GATATCGA
C1	S1	ATCACGAC	SK	CGCAGACG
D1	S1	ATCACGAC	SL	TATGAGTA
E1	S1	ATCACGAC	SM	ACATAGCG
F1	S1	ATCACGAC	SN	GTGCGATA
G1	S1	ATCACGAC	SO	CCAACAGA
H1	S1	ATCACGAC	SP	TTGGTGAG
A2	S2	ACAGTGGT	SI	AGCGCTAG
B2	S2	ACAGTGGT	SJ	GATATCGA
C2	S2	ACAGTGGT	SK	CGCAGACG
D2	S2	ACAGTGGT	SL	TATGAGTA
E2	S2	ACAGTGGT	SM	ACATAGCG

F2	S2	ACAGTGGT	SN	GTGCGATA
G2	S2	ACAGTGGT	SO	CCAACAGA
H2	S2	ACAGTGGT	SP	TTGGTGAG
A3	S3	CAGATCCA	SI	AGCGCTAG
B3	S3	CAGATCCA	SJ	GATATCGA
C3	S3	CAGATCCA	SK	CGCAGACG
D3	S3	CAGATCCA	SL	TATGAGTA
E3	S3	CAGATCCA	SM	ACATAGCG
F3	S3	CAGATCCA	SN	GTGCGATA
G3	S3	CAGATCCA	SO	CCAACAGA
H3	S3	CAGATCCA	SP	TTGGTGAG
A4	S4	AACCCCTC	SI	AGCGCTAG
B4	S4	AACCCCTC	SJ	GATATCGA
C4	S4	AACCCCTC	SK	CGCAGACG
D4	S4	AACCCCTC	SL	TATGAGTA
E4	S4	AACCCCTC	SM	ACATAGCG
F4	S4	AACCCCTC	SN	GTGCGATA
G4	S4	AACCCCTC	SO	CCAACAGA
H4	S4	AACCCCTC	SP	TTGGTGAG
A5	S5	CCCAACCT	SI	AGCGCTAG
B5	S5	CCCAACCT	SJ	GATATCGA
C5	S5	CCCAACCT	SK	CGCAGACG
D5	S5	CCCAACCT	SL	TATGAGTA
E5	S5	CCCAACCT	SM	ACATAGCG
F5	S5	CCCAACCT	SN	GTGCGATA
G5	S5	CCCAACCT	SO	CCAACAGA
H5	S5	CCCAACCT	SP	TTGGTGAG
A6	S6	GAAACCCA	SI	AGCGCTAG
B6	S6	GAAACCCA	SJ	GATATCGA
C6	S6	GAAACCCA	SK	CGCAGACG
D6	S6	GAAACCCA	SL	TATGAGTA
E6	S6	GAAACCCA	SM	ACATAGCG
F6	S6	GAAACCCA	SN	GTGCGATA
G6	S6	GAAACCCA	SO	CCAACAGA
H6	S6	GAAACCCA	SP	TTGGTGAG
A7	S7	AGGGTCAA	SI	AGCGCTAG
B7	S7	AGGGTCAA	SJ	GATATCGA
C7	S7	AGGGTCAA	SK	CGCAGACG
D7	S7	AGGGTCAA	SL	TATGAGTA
E7	S7	AGGGTCAA	SM	ACATAGCG
F7	S7	AGGGTCAA	SN	GTGCGATA
G7	S7	AGGGTCAA	SO	CCAACAGA
H7	S7	AGGGTCAA	SP	TTGGTGAG
A8	S8	AGGAGTGG	SI	AGCGCTAG
B8	S8	AGGAGTGG	SJ	GATATCGA
C8	S8	AGGAGTGG	SK	CGCAGACG

D8	S8	AGGAGTGG	SL	TATGAGTA
E8	S8	AGGAGTGG	SM	ACATAGCG
F8	S8	AGGAGTGG	SN	GTGCGATA
G8	S8	AGGAGTGG	SO	CCAACAGA
H8	S8	AGGAGTGG	SP	TTGGTGAG
A9	S9	CGTACTAG	SI	AGCGCTAG
B9	S9	CGTACTAG	SJ	GATATCGA
C9	S9	CGTACTAG	SK	CGCAGACG
D9	S9	CGTACTAG	SL	TATGAGTA
E9	S9	CGTACTAG	SM	ACATAGCG
F9	S9	CGTACTAG	SN	GTGCGATA
G9	S9	CGTACTAG	SO	CCAACAGA
H9	S9	CGTACTAG	SP	TTGGTGAG
A10	S10	GGACTCCT	SI	AGCGCTAG
B10	S10	GGACTCCT	SJ	GATATCGA
C10	S10	GGACTCCT	SK	CGCAGACG
D10	S10	GGACTCCT	SL	TATGAGTA
E10	S10	GGACTCCT	SM	ACATAGCG
F10	S10	GGACTCCT	SN	GTGCGATA
G10	S10	GGACTCCT	SO	CCAACAGA
H10	S10	GGACTCCT	SP	TTGGTGAG
A11	S11	TAGGCATG	SI	AGCGCTAG
B11	S11	TAGGCATG	SJ	GATATCGA
C11	S11	TAGGCATG	SK	CGCAGACG
D11	S11	TAGGCATG	SL	TATGAGTA
E11	S11	TAGGCATG	SM	ACATAGCG
F11	S11	TAGGCATG	SN	GTGCGATA
G11	S11	TAGGCATG	SO	CCAACAGA
H11	S11	TAGGCATG	SP	TTGGTGAG
A12	S12	CTCTCTAC	SI	AGCGCTAG
B12	S12	CTCTCTAC	SJ	GATATCGA
C12	S12	CTCTCTAC	SK	CGCAGACG
D12	S12	CTCTCTAC	SL	TATGAGTA
E12	S12	CTCTCTAC	SM	ACATAGCG
F12	S12	CTCTCTAC	SN	GTGCGATA
G12	S12	CTCTCTAC	SO	CCAACAGA
H12	S12	CTCTCTAC	SP	TTGGTGAG

На заключительном этапе в план запуска вносится перечень образцов в соответствии с использованными при создании библиотек парами индексов.

Планирование запуска осуществляется в соответствии с инструкцией производителя секвенатора. Как правило, основные параметры запуска указываются в конфигурационном файле (sample sheet), который может быть создан с помощью ПО, поставляемого с секвенатором.

2.4.2. Комплект для секвенирования

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

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

Ячейка и раствор для секвенирования. Ячейка MiSeq представляет собой нанесенный на стеклянную подложку одноразовый субстрат, в котором происходит генерация кластеров и выполняется реакция секвенирования. Реактивы попадают в проточную кювету через входное отверстие, проходят по односторонней области визуализации, а затем покидают проточную кювету через выходное отверстие. Обработанная жидкость из проточной кюветы направляется в бутылку для сбора отходов. Перед настройкой цикла библиотеки загружаются в картридж с реактивами, а затем автоматически переносятся в проточную кювету после начала цикла.

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

2.4.3. Включение секвенатора

Включите прибор MiSeq, следуйте инструкции производителя.

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

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

2.4.4. Разморозка картриджа для секвенирования

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

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

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

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

2.4.5. Загрузка библиотек

После полной разморозки картриджа необходимо осуществить загрузку заранее подготовленного пула библиотек в картридж.

Проколите колпачок из фольги чистым наконечником на 1 мл. В резервуар с пометкой Load Samples (Загрузка образцов) внесите 600 мкл подготовленного согласно разделу 2.3. РАЗВЕДЕНИЕ И ДЕНАТУРАЦИЯ денатурированного пула библиотек. Не касайтесь колпачка из фольги.

2.4.6. Очистка ячейки

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

Насухо протрите ячейку и картридж безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы.

Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой. Протрите стекло ячейки салфеткой, смоченной в спирте. Удостоверьтесь в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки.

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

2.4.7. Настройка запуска секвенирования

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

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

2.4.8. Загрузка ячейки

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

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

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

2.4.9. Загрузка раствора и проверка бутылки для сбора отходов

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

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

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

2.4.10. Загрузка картриджа с реагентами

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

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

2.4.11. Выбор sample sheet

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

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

1. Выберите Change Sample Sheet (Смена протокола анализа) на экране Load Reagents (Загрузка реагентов).
2. Выберите Browse (Обзор), чтобы переместиться к sample sheet.
3. Нажмите Open (Открыть).

4. Выберите Save and Continue (Сохранить и продолжить).

5. Нажмите Next (Далее).

2.4.12. Запуск секвенирования

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

2.4.13. Мониторинг секвенирования

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

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

Cluster Density (K/mm^2) (Плотность кластеров, K/mm^2). Служит для отображения количества кластеров, обнаруженных на квадратном миллиметре во время цикла.

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

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

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

2.4.14. Контроль плотности кластеров

Для обеспечения эффективной генерации кластеров производитель оборудования для секвенирования Illumina Inc. рекомендует для загрузки на ячейку денатурированный пул библиотек в концентрации 20 пМ (по документу MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide, 15039740 v10). Протокол денатурации и разведения при стандартной концентрации пула библиотек, полученного в ходе пробоподготовки с Набором реагентов, описан в разделе 2.3. РАЗВЕДЕНИЕ И ДЕНАТУРАЦИЯ. Оптимальная плотность кластеров (до фильтрации) составляет 1000-1200 K/mm². При недостаточной плотности кластеров по результатам секвенирования возможно изменение параметров денатурации и финального разведения. Для достижения нужной плотности кластеров пропорционально увеличьте объемы пула библиотек, 0,2М NaOH и Нейтрализующего буфера (например, в 1,5 или 2 раза) и добавьте реагент HT1 до объема 1000 мкл.

Для проведения анализа данных следуйте информации в Инструкции пользователя - Том 2. Анализ данных и Том 3. Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software».

3. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

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

4. УКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

- температура окружающего воздуха – от +20°C до +25 °C;
- относительная влажность – от 40% до 60%;
- атмосферное давление 740 – 760 мм рт. ст.

5. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

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

6. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

7. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

HLA (Human Leukocyte Antigens): человеческие лейкоцитарные антигены, представляющие собой поверхностные рецепторы иммунных клеток, кодируемые группой тесно сцепленных генов на 6-й хромосоме. Антигены HLA играют важнейшую роль в регуляции иммунного ответа на чужеродные антигены, определяют уникальность тканевого типа человека и ответственны за отторжение чужеродных тканей при трансплантации.

IPD-IMGT/HLA: специализированная база данных последовательностей HLA, номенклатурного комитета по HLA-системе Всемирной Организации Здравоохранения, представленная на сайте <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla> Под актуальной понимается версия базы данных IPD-IMGT/HLA, используемая для выравнивания прочтений в программном обеспечении PARAllele™ HLA software. Обновление версии IPD-IMGT/HLA в PARAllele™ HLA software осуществляется каждые 6 месяцев.

UTR (Untranslated Region): участки ДНК, комплементарные особым участкам РНК, прилегающим с обеих сторон к транскрибируемой области, но не выступающим в качестве матрицы для синтеза белка.

Аллель: вариант последовательности ДНК в локусе.

Аллельное разрешение HLA: это результат HLA-типирования, соответствующий одной аллели, согласно текущей версии WHO HLA Nomenclature Report. Каждая аллель в зависимости от разрешения может иметь 2-, 4-, 6- или 8-значный идентификатор, определяемый ее нуклеотидной последовательностью. Первые 2 цифры описывают тип, соответствующий серологическому антигену. Третья и четвертая цифры используются для обозначения специфического подтипа белка. Аллели, номера которых отличаются по первым четырем цифрам, должны отличаться по одной или нескольким нуклеотидным заменам, изменяющим аминокислотную последовательность кодируемого белка. Аллели, которые отличаются только синонимичными нуклеотидными заменами в кодирующей последовательности, описываются с использованием пятой и шестой цифр. Аллели, которые отличаются только вариантами последовательностей в интронах или нетранскрибируемых областях, описываются с использованием седьмой и восьмой цифр.

Генотип: комбинация аллелей гена.

Аналит: компонент, искомый или определяемый в пробе вещества или материала объекта аналитического контроля.

Аналитическая чувствительность: минимальная концентрация ДНК в исследуемом образце, при которой не наблюдается выпадение аллелей в результатах генотипирования.

Аналитическая специфичность: способность набора реагентов идентифицировать генотип (пару аллелей) только целевых HLA-локусов среди гомологичных локусов в исследуемом образце. Рассчитывается как доля корректно идентифицированных аллелей в наборе стандартных образцов предприятия.

Контаминированный образец: анализ, представляющий собой смесь ДНК неродственных индивидуумов.

Новая аллель: аллель, нуклеотидная последовательность которой отличается от нуклеотидных последовательностей экзонов аллелей актуальной версии базы данных IPD-IMGT/HLA.

Локус: местоположение искомого региона генома на генетической карте хромосомы.

Высокопроизводительное секвенирование: метод определения нуклеотидной последовательности ДНК, основанный на многократном прочтении большого количества ДНК-клонов.

Полимеразная цепная реакция длинных фрагментов (LR-PCR): ПЦР, с помощью которой осуществляется синтез длинных фрагментов ДНК (1-10 тыс. п.н. и более).

8. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Поддержка клиентов в сети Интернет – support.parseq.pro

Доступ к ПО «PARAllele™ HLA software» версия 1 и электронной версии
Инструкции пользователя предоставляется по адресу <https://hla.parseq.pro>.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Павлов А.Е.

« 16 » 05 2021 г.



PAR allele

Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «**PARAllele™ HLA solution v3**»
для типирования генов HLA в высоком разрешении методом
высокопроизводительного секвенирования

ТОМ 2 из 3

Анализ данных

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	3
2. МЕТРИКИ КАЧЕСТВА ДАННЫХ	3
2.1. Метрики качества запуска	4
2.2. Метрики качества образца	4
2.3. Метрики качества локуса	5
2.4. Контаминация	5
2.5. Качество генотипирования	6
3. НОВЫЕ АЛЛЕЛИ	6
4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ	7
5. ИЗВЕСТНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ	7
5.1. АЛЛЕЛИ С ПОНИЖЕННОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ	8
5.2. ИЗВЕСТНЫЕ НЕРАЗРЕШИМЫЕ НЕОДНОЗНАЧНОСТИ ПО АЛЛЕЛИ	8
5.3. ИЗВЕСТНЫЕ НЕРАЗРЕШИМЫЕ НЕОДНОЗНАЧНОСТИ ПО ГЕНОТИПУ	8
6. ФОРМАТЫ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ	8
6.1. ОТЧЕТ ПО ОБРАЗЦУ	9
6.2. ОТЧЕТ ПО ЗАПУСКУ	9
6.3. ТАБЛИЦА ГЕНОТИПОВ ПО ОБРАЗЦАМ	10
7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА	11
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Пример отчета по образцу	13
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Пример отчета по запуску	15

Для работы с ПО используйте Инструкцию пользователя - Том 3. Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software».

Доступ к ПО «PARAllele™ HLA software» версия 1 и электронной версии Инструкции пользователя предоставляется по адресу <https://hla.parseq.pro>.

1. ВВЕДЕНИЕ

Анализ данных и HLA-генотипирование осуществляются с помощью алгоритма **mercury-pipeline версия 1**, интегрированного в ПО «PARAllele™ HLA software» (далее Алгоритм). Алгоритм выполняет следующие функции:

- выравнивание прочтений несколькими независимыми алгоритмами на последовательности базы данных IPD-IMGT/HLA актуальной версии;
- оценку качества данных (включая оценку контаминации) с последующей автоматической сортировкой и фильтрацией образцов по качеству;
- определение HLA-генотипа с заданным разрешением по анализируемым локусам HLA;
- определение новых аллелей

Алгоритм представляет собой программный конвейер, принимающий на вход результаты секвенирования и метаданные запуска, и выдающий результаты HLA-типирования соответствующего разрешения. На первом этапе происходит программное отрезание (тримминг) технических последовательностей и концевых оснований с низким качеством прочтения, а также выравнивание на базу данных IPD-IMGT/HLA соответствующей версии. Далее происходит расчет и оценка метрик качества данных, и HLA-генотипирование путем интеграции результатов нескольких независимых алгоритмов определения HLA-аллелей, за счет чего достигаются высокие аналитические характеристики.

При обновлении базы данных IPD-IMGT/HLA, Алгоритм проходит внутреннюю верификацию, в ходе которой устанавливаются аналитические характеристики и ограничения Набора реагентов. Обновление выполняется автоматически в виде установки сервисных пакетов (SP), после чего пользователи получают уведомление об изменениях.

Обновление базы данных IPD-IMGT/HLA осуществляется не реже, чем один раз в 6 месяцев, также предусмотрены плановые обновления Алгоритма по мере эксплуатации с целью улучшения аналитических и потребительских характеристик Набора реагентов.

Ограничения метода устанавливаются путем *in silico* анализа базы данных IPD-IMGT/HLA и технических характеристик конкретной версии Набора реагентов для HLA-типирования (разрешение типирования, панель праймеров, размер вставки, алгоритмы HLA-типирования).

2. МЕТРИКИ КАЧЕСТВА ДАННЫХ

Все метрики качества данных рассчитываются и оцениваются в автоматическом режиме.

2.1. Метрики качества запуска

Основной метрикой качества данных по запуску секвенатора является **среднее качество прочтений в образцах запуска**. Среднее качество по запуску определяется по минимальному значению среднего качества образца в данном запуске. Среднее качество прочтений по запуску определяется в первую очередь качеством реагентов для секвенирования, соблюдением сроков и условий их хранения, а также соблюдением протокола, в том числе при выборе параметров секвенирования. Среднее качество прочтений по запуску не является блокирующей метрикой при анализе данных, однако при значении ниже заданного порога рекомендуется повторить постановку.

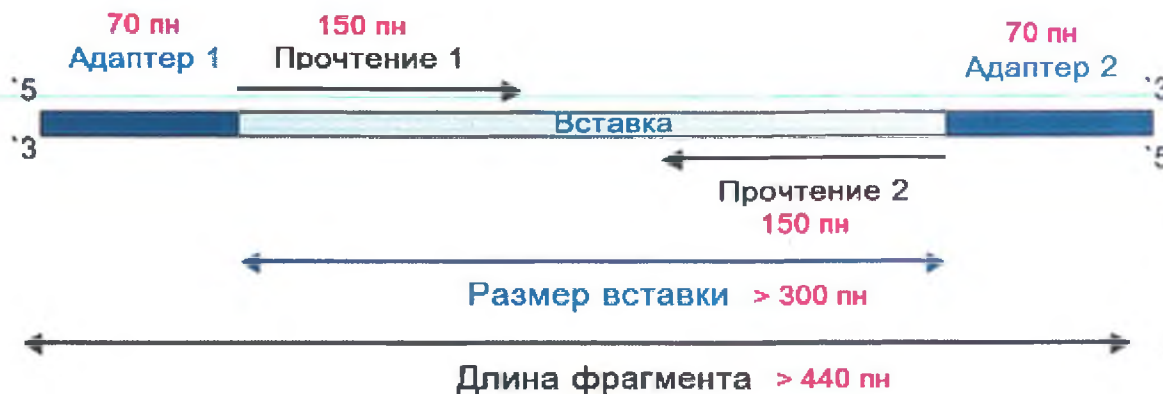
2.2. Метрики качества образца

Среднее качество прочтений образца рассчитывается как среднее качество по всем прочитанным нуклеотидам. Качество прочтения отдельных нуклеотидов рассчитывается секвенатором и записывается в файл вместе с последовательностью прочтения. Этот параметр отражает вероятность ошибки, которая для технологии высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) составляет не менее 30, то есть вероятность ошибки составляет 1/1000, или 99,9%. В норме качество несколько снижается к концу прочтения. Среднее качество прочтений по образцу определяется в первую очередь качеством реагентов для секвенирования, соблюдением сроков и условий их хранения, а также соблюдением протокола, в том числе при выборе параметров секвенирования. Среднее качество прочтений по образцу является блокирующей метрикой при анализе данных, то есть при значении ниже заданного порога, образец является непригодным для дальнейшего анализа.

Число прочтений на образец – основная метрика качества секвенирования образца – количество прямых и обратных прочтений, полученное для образца. Число прочтений на образец складывается из **целевых прочтений** (выровненных на анализируемые локусы HLA), **гомологичных прочтений** (выровненных на гомологи анализируемых локусов HLA), **нецелевых прочтений** (выровненных на локусы, отличные от HLA) и **триммированных по качеству прочтений** (под триммингом понимается отсечение с конца прочтений нуклеотидов с качеством ниже заданного; если после этого длина прочтения становится менее заданного значения, такое прочтение удаляется). Число прочтений на образец определяется соблюдением протокола на этапах измерения концентрации готовых библиотек, разведения и пулирования образцов. Число прочтений на образец по образцу является блокирующей метрикой при анализе данных, то есть при значении ниже заданного порога, образец является непригодным для дальнейшего анализа. Превышение рекомендованного значения не способствует повышению качества результата, но при этом негативно влияет на распределение прочтений по другим образцам.

Размер вставки — это средняя длина секвенируемых фрагментов, определенная по результатам выравнивания пары прочтений на последовательности аллелей из базы

данных IPD-IMGT/HLA актуальной версии. Под вставкой понимается длина фрагмента без учета последовательностей адаптеров:



Размер вставки в основном зависит от точности соблюдения протокола на этапе фрагментации и при очистках магнитными частицами. Низкий размер вставки может привести к невозможности фазирования аллелей и увеличению неоднозначности результатов генотипирования. Повышенное значение размера вставки может привести к неравномерности покрытия внутри локуса. Размер вставки является блокирующей метрикой при контроле качества, то есть при значении ниже заданного порога, образец является непригодным для дальнейшего анализа.

2.3. Метрики качества локуса

Основной метрикой качества анализируемого локуса является **число прочтений, выровненное на локус** (при этом учитываются только те, прочтения в которых оба прочтения из пары выровнялись на данный локус). Каждый локус анализируется независимо от других локусов. Недостаточное покрытие по одному из анализируемых локусов может свидетельствовать о выпадении аллелей (drop out, потеря гетерозиготности), то есть наличии в образце аллелей, которые не могут быть амплифицированы с помощью Набора реагентов. Число прочтений на локус является блокирующей метрикой при анализе данных, то есть при значении ниже заданного порога, локус является непригодным для дальнейшего анализа. *Подробнее см. раздел Аллели с пониженной амплификацией.*

2.4. Контаминация

Контаминация исследуемых образцов посторонней геномной ДНК человека или продуктами её амплификации, идентифицируется автоматически как высокая степень неоднозначности полученных результатов генотипирования, и показывает присутствие третьей аллели с частотой не менее 25% (в формате «обнаружено/не обнаружено»). Идентификация контаминации в образце является блокирующей метрикой при анализе данных, то есть при заданном значении, образец является непригодным для дальнейшего анализа. Образец признается контаминированным, если по 4 из 5 анализируемых локусов наблюдается неоднозначность на уровне первого поля (1 field). При обнаружении

контаминации рекомендуется повторно забрать биоматериал, выделить ДНК и секвенировать образец с помощью Набора реагентов.

2.5. Качество генотипирования

После определения наиболее вероятного генотипа по результатам интеграции генотипов, полученных по нескольким независимым алгоритмам, оценивается качество генотипирования путем оценки степени неоднозначности по генотипам и по аллелям. Качество генотипирования по локусу является блокирующей метрикой при анализе данных, то есть при значении выше заданного порога по степени неоднозначности, генотип признается некорректным, и образец автоматически направляется в службу поддержки. При этом неоднозначные генотипы и неоднозначные аллели, входящие в список известных неразрешимых неоднозначностей, **не являются некорректным результатом** и подлежат выдаче наряду с однозначными генотипами и аллелями.

Установленные пороговые значения по метрикам качества представлены в таблице:

Метрика	Зеленая зона	Красная зона
Среднее качество (phred)	≥ 30	< 25
Число прочтений на образец	100 000 – 300 000	$< 30\,000$
Размер вставки (п.н.)	300 - 600	< 200
Число прочтений на локус HLA-A	7 000 – 43 000	$< 3\,000$
Число прочтений на локус HLA-B	3 000 – 22 000	$< 2\,500$
Число прочтений на локус HLA-C	7 000 – 39 000	$< 3\,000$
Число прочтений на локус HLA-DQB1	3 000 – 31 000	$< 2\,500$
Число прочтений на локус HLA-DRB1	7 000 – 43 000	$< 3\,000$
Контаминация	Не обнаружено	Обнаружено
Число генотипов на локус (за исключением известных неразрешимых неоднозначностей по генотипу)	1	> 1
Число аллелей на локус (за исключением известных неразрешимых неоднозначностей по аллели)	2	> 2

Значения, не попадающие в зеленую и красную зоны, относятся к желтой зоне, соответствующей субоптимальным значениям.

3. НОВЫЕ АЛЛЕЛИ

Алгоритм HLA-генотипирования позволяет идентифицировать аллели, не включенные в базу данных IPD-IMGT/HLA актуальной версии. В случае обнаружения такой аллели в образце, алгоритм в автоматическом режиме направит образец в службу

поддержки, где новая аллель будет подтверждена и описана специалистами ООО «ПАРСЕК ЛАБ».

4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ

В соответствии с номенклатурой¹, аллели могут быть присвоены буквенные суффиксы, отражающие особенности ее экспрессии. В соответствии с п. F1.1.4.1.2 Стандартов Европейской Федерации Иммуногенетики² информация об экспрессии должна быть указана в результатах HLA-типирования. Функциональная аннотация аллели предоставляется программным обеспечением при ее наличии в базе данных IPD-IMGT/HLA. Функциональная аннотация доступна только в том случае, если замена, влияющая на уровень экспрессии, произошла в кодирующей последовательности (в экзоне).

Возможные суффиксы и их значения приведены в таблице:

Суффикс	Значение
N	Нуль аллель. Белок не экспрессируется. (Null)
L	Аллель имеет низкую экспрессию по сравнению с нормальным уровнем. (Low)
S	Кодируемый аллелью белок экспрессируется в виде секреторной молекулы, отсутствует на клеточной поверхности. (Secreted)
C	Кодируемый аллелью белок присутствует в цитоплазме, но отсутствует на клеточной поверхности. (Cytoplasm)
A	Аберрантная экспрессия. Указывается, когда есть сомнения в том, экспрессируется ли белок. (Aberrant)
Q	Уровень экспрессии остается под вопросом, но в аллели обнаружена мутация, которая оказывает влияние на экспрессию. (Questionable)

Внимание! Суффикс может быть присвоен алгоритмом только если замена, отражающаяся на экспрессии, произошла в экзоне.

Известные нуль аллели и аллели с альтернативной экспрессией, для актуальной версии базы данных IPD-IMGT/HLA, доступны на сайте номенклатурного комитета по HLA-системе Всемирной Организации Здравоохранения по ссылке <http://hla.alleles.org/alleles/nulls.html>.

5. ИЗВЕСТНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

¹ Комитета по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ
<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>.

² Standards For Histocompatibility & Immunogenetics Testing, version 8.

Ограничения метода установлены путем *in silico* анализа базы данных IPD-IMGT/HLA и технических характеристик конкретной версии набора реагентов для HLA-типирования (разрешение типирования, панель праймеров, размер вставки, алгоритмы HLA-типирования).

5.1. АЛЛЕЛИ С ПОНИЖЕННОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ

Пониженная амплификация приводит к недостаточному для генотипирования числу прочтений. В случае полного отсутствия прочтений говорят о выпадении аллели.

Эффективность амплификации снижается в случае наличия в аллели замены, находящейся в сайте посадки праймера.

В редких случаях отдельные аллели групп HLA-DQB1*02, HLA-DQB1*03 и HLA-DQB1*06 могут иметь пониженную амплификацию, вплоть до полного выпадения.

Другой причиной пониженной амплификации может являться значительная разница в длине аллелей. Это характерно для аллелей группы HLA-DRB1*04, размер которых примерно на 1 т.п.н. больше, чем размер других аллельных групп.

5.2. ИЗВЕСТНЫЕ НЕРАЗРЕШИМЫЕ НЕОДНОЗНАЧНОСТИ ПО АЛЛЕЛИ

Под неоднозначностью по аллели понимается невозможность однозначно установить HLA-аллель, присутствующую в образце, вследствие неполноты покрытия локуса. На уровне 2-го и 3-го поля неоднозначность по аллели возникает в случае, если панель не покрывает полностью один или несколько экзонов гена. Неоднозначными являются аллели, последовательности нуклеотидов которых имеют отличия только в пределах регионов, не покрытых при секвенировании.

Поскольку Набор реагентов покрывает гены HLA class I полностью, неразрешимые неоднозначности по аллели характерны только для генов HLA class II.

5.3. ИЗВЕСТНЫЕ НЕРАЗРЕШИМЫЕ НЕОДНОЗНАЧНОСТИ ПО ГЕНОТИПУ

Под неоднозначностью по генотипу понимается невозможность однозначно установить пару HLA-аллелей, присутствующую в образце, вследствие невозможности фазирования замен, расположенных в разных экзонах локуса. Неоднозначность по генотипу возникает в случае, когда в генотипе присутствует сочетание аллелей, для каждой из которых известна высокогомологичная аллель, отличающаяся заменой, расположенной на расстоянии, превышающем размер вставки.

6. ФОРМАТЫ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ

6.1. ОТЧЕТ ПО ОБРАЗЦУ

- Пример отчета по образцу приведен в Приложении 1 настоящей Инструкции.
- Отчет по образцу состоит из пяти разделов: ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ, МЕТРИКИ КАЧЕСТВА, ОШИБКИ АНАЛИЗА, НОВЫЕ АЛЛЕЛИ и РЕЗУЛЬТАТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ.
- Общая информация включает: сокращенное наименование медицинского изделия, метод анализа, анализируемые локусы, разрешение генотипирования, номер образца, номер запуска, серию, КК контрольного образца, дату секвенирования, номер образца в запуске, имена лаборанта и супервизора, дату анализа, версию базы данных IMGT HLA, название алгоритма анализа данных, название программного обеспечения.
- Метрики качества приведены в соответствующем разделе в таблице: показатель, значение. Также в разделе приведена информация о наличии или отсутствии контаминации и статусе образца.
- При наличии ошибок анализа они указываются в таблице: показатель и значение.
- Информация об аллелях, не включенных в базу данных IPD-IMGT/HLA актуальной версии, указывается в разделе НОВЫЕ АЛЛЕЛИ.
- Результат генотипирования представлен в таблице: локус и генотип.
- Формат записи генотипа: 'Аллель 1 + Аллель 2', где ND (not determined) - аллель не установлена - обозначает случай определения гомозиготы³.
- Неоднозначные генотипы разделены символом «|» и записываются в столбце соответствующего локуса.
- Неоднозначные аллели разделены символом «/».
- При наличии функциональной аннотации аллели суффикс указывается в круглых скобках рядом с номером аллели: 'Аллель 1 (суффикс) + Аллель 2'.
- Формат отчета: PDF.

6.2. ОТЧЕТ ПО ЗАПУСКУ

- Пример отчета по запуску приведен в Приложении 2 настоящей Инструкции.
- Отчет по запуску включает разделы: ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ ОБ АНАЛИЗЕ, КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА, СТАТУСЫ ОБРАЗЦОВ В ЗАПУСКЕ, ОШИБКИ АНАЛИЗА, НОВЫЕ АЛЛЕЛИ и РЕЗУЛЬТАТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ.
- Общая информация включает: сокращенное наименование медицинского изделия, метод анализа, анализируемые локусы, разрешение генотипирования, номер запуска, серию, КК контрольного образца, дату секвенирования, номер образца в запуске, имена лаборанта и супервизора, дату анализа, версию базы данных IMGT HLA, название алгоритма анализа данных, название программного обеспечения.

³ В соответствии с требованиями Европейской Федерации Иммуногенетики, гомозиготный генотип может указываться только в случае подтверждения аллели у обоих родителей.

- Раздел о качестве данных включает: графики по среднему качеству прочтений, размеру вставки, числу прочтений на образец, числу прочтений на анализируемые локусы.
- Статусы образцов в запуске представлены в таблице: статус и количество образцов.
- Ошибки анализа указываются при наличии. Приведена таблица: образец и показатель.
- Информация об аллелях, не включенных в базу данных IPD-IMGT/HLA актуальной версии, указывается в разделе НОВЫЕ АЛЛЕЛИ.
- Результаты генотипирования представлены в таблице: порядковый номер, название образца, генотип по локусу HLA-A, генотип по локусу HLA-B, генотип по локусу HLA-C, генотип по локусу HLA-DQB1, генотип по локусу HLA-DRB1.
- Формат записи генотипа: 'Аллель 1 + Аллель 2', где ND (not determined) - аллель не установлена - обозначает случай определения гомозиготы, когда не исключено выпадение второй аллели.
- Неоднозначные генотипы разделены символом «|» и записываются в столбце соответствующего локуса.
- Неоднозначные аллели разделены символом «/».
- Отсутствующие в актуальной версии базы данных IMGT HLA аллели обозначаются как «Новая аллель».
- При наличии функциональной аннотации аллели суффикс указывается в круглых скобках рядом с номером аллели: 'Аллель 1 (суффикс) + Аллель 2'.
- Формат отчета: PDF.

6.3. ТАБЛИЦА ГЕНОТИПОВ ПО ОБРАЗЦАМ

- Объединенная таблица по результатам генотипирования всех образцов в одной постановке.
- Таблица содержит следующие колонки:

Колонка 1 – статус образца (Resolution);

Колонка 2 – имя образца (Sample name);

Колонка 3 – серия Набора реагентов (Reagent kit lot);

Колонка 4 – номер запуска (Run Id);

Колонка 5 – номер образца в запуске (Sample id in run);

Колонка 6 – имя пользователя, загрузившего запуск (Uploaded by);

Колонка 7 – дата анализа данных (Analysis date);

Колонка 8 – версия алгоритма анализа данных (Pipeline);

Колонка 9 – релиз IPD-IMGT/HLA (IMGT);

Колонка 10 – имя Супервизора (Approved by);

Колонка 11 – дата утверждения/одобрения (Approved at);

Колонка 12 – генотип по локусу HLA-A;

Колонка 13 – генотип по локусу HLA-B;

Колонка 14 – генотип по локусу HLA-C;

Колонка 15 – генотип по локусу HLA-DQB1;

Колонка 16 – генотип по локусу HLA-DRB1;

Колонка 17 – функциональные аннотации по локусу HLA-A;

Колонка 18 – функциональные аннотации по локусу HLA-B;

Колонка 19 – функциональные аннотации по локусу HLA-C;

Колонка 20 – функциональные аннотации по локусу HLA-DQB1;

Колонка 21 – функциональные аннотации по локусу HLA-DRB1.

- Генотип записывается соответствии с номенклатурой IMGT HLA.
- Значение «ND+ND» (not determined) соответствует значению «генотип не определен».
- Гомозиготный генотип записывается как «Аллель 1 + ND», где ND (not determined) – аллель не определена.
- Неоднозначные генотипы разделены символом «|» и записываются в столбце соответствующего локуса.
- Неоднозначные аллели разделены символом «/».
- Формат файла: CSV.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T		
Resolution	Sample ID	Reagent	Run ID	Sample ID	Uploaded by	Analysis date	Pipeline	IMGT	Approved by	Approved at	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1	FUNCTIONAL
1	COMPLETED	1117 6019-1	ABCEDE	1	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
2	COMPLETED	1117 6019-1	ABCEDE	2	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
3	COMPLETED	1118 6019-1	ABCEDE	3	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
4	COMPLETED	1118 6019-1	ABCEDE	4	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
5	COMPLETED	1118 6019-1	ABCEDE	5	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
6	COMPLETED	1118 6019-1	ABCEDE	6	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
7	COMPLETED	1117 6019-1	ABCEDE	7	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
8	COMPLETED	1118 6019-1	ABCEDE	8	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
9	COMPLETED	1118 6019-1	ABCEDE	9	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
10	COMPLETED	1120 6019-1	ABCEDE	10	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
11	COMPLETED	1121 6019-1	ABCEDE	11	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
12	COMPLETED	1122 6019-1	ABCEDE	12	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
13	COMPLETED	1123 6019-1	ABCEDE	13	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
14	COMPLETED	1124 6019-1	ABCEDE	14	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
15	COMPLETED	1125 6019-1	ABCEDE	15	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
16	COMPLETED	1126 6019-1	ABCEDE	16	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
17	COMPLETED	1127 6019-1	ABCEDE	17	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
18	COMPLETED	1128 6019-1	ABCEDE	18	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
19	COMPLETED	1129 6019-1	ABCEDE	19	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
20	COMPLETED	1130 6019-1	ABCEDE	20	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
21	COMPLETED	1131 6019-1	ABCEDE	21	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
22	COMPLETED	1132 6019-1	ABCEDE	22	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
23	COMPLETED	1133 6019-1	ABCEDE	23	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
24	COMPLETED	1134 6019-1	ABCEDE	24	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
25	COMPLETED	1135 6019-1	ABCEDE	25	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
26	COMPLETED	1136 6019-1	ABCEDE	26	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
27	COMPLETED	1137 6019-1	ABCEDE	27	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
28	COMPLETED	1138 6019-1	ABCEDE	28	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
29	COMPLETED	1139 6019-1	ABCEDE	29	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
30	COMPLETED	1140 6019-1	ABCEDE	30	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
31	COMPLETED	1141 6019-1	ABCEDE	31	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
32	COMPLETED	1142 6019-1	ABCEDE	32	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
33	COMPLETED	1143 6019-1	ABCEDE	33	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
34	COMPLETED	1144 6019-1	ABCEDE	34	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
35	COMPLETED	1145 6019-1	ABCEDE	35	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
36	COMPLETED	1146 6019-1	ABCEDE	36	miyanov	2020-03-23T19:00:00	mercury-pipeline-1.1.1	3.39.0	asimirova	2020-03-24T06:24:07	18:01:01+35:01:01	04:01:01+05:01:01	02:01:01+06:02:01	03:01:01+13:17:15:01:01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА

В состав Набора реагентов входит контрольный образец с известным HLA-генотипом, установленным референсным методом. Контрольный образец представляет собой продукты LR-PCR анализируемых HLA локусов. **Рекомендуется включать контрольный образец в каждую постановку.** В случае если контрольный образец указан при импорте данных, программа автоматически проанализирует результат, полученный по контрольному образцу, и сравнит его с референсным генотипом (см. ниже). В случае, если контрольный образец не проходит контроль качества или по генотипу выявлено неполное совпадение, программа автоматически маркирует запуск как непрошедший контроль качества (в этом случае рекомендуется повторить постановку целиком). Генотип контрольного образца в составе Набора реагентов относительно базы данных IPD-IMGT/HLA: 3.39.0:

Локус	Генотип
HLA-A	HLA-A*02:01:01 + HLA-A*11:01:01
HLA-B	HLA-B*18:01:01 + HLA-B*44:02:01 HLA-B*18:01:33 + HLA-B*44:02:59 HLA-B*18:177 + HLA-B*44:464:01
HLA-C	HLA-C*02:02:02 + HLA-C*05:01:01
HLA-DQB1	HLA-DQB1*03:01:01 + HLA-DQB1*03:01:01
HLA-DRB1	HLA-DRB1*04:01:01 + HLA-DRB1*08:03:02

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Пример отчета по образцу

Отчёт по HLA типированию	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3	Отчет создан: 19.10.2020, 13:01:02	1/2
--------------------------	---	---------------------------------------	-----

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»
 197350, Россия, г. Санкт-Петербург
 дорога в Каменку, д. 74, лит. А
 помещение 1-Н, комната 347 (К711) 348 (К708)
 телефон: (812) 243 1190
 e-mail: info@parseq.pro
 web-сайт: http://parseq.ru



Отчёт по HLA типированию образца

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тест-система	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3
Метод анализа	Высокопроизводительное секвенирование
Анализируемые локусы	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1
Разрешение HLA типирования	3 поля (3 fields)

Образец	44461
Номер запуска	J3YKM
Серия	6020-14
КК контрольного образца	Пройден
Дата секвенирования	24.08.2020
Номер образца в запуске	S1
Лаборант	Васильева Евгения
Супервизор	Симакова Тамара
Дата анализа	07.09.2020
Версия IMGT-HLA	3.39.0
Алгоритм	mercury-pipeline-2.2-6-dev
Программное обеспечение	PARAllele™ HLA software версия 1 (SP 1.5.5)

ТУ 21.20.23-007-39429653-2020

Отчёт по HLA типированию	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3	Отчет создан: 19.10.2020, 13:01:02	2/2
--------------------------	---	---------------------------------------	-----

МЕТРИКИ КАЧЕСТВА

Статус образца: утвержден

Контаминация: не идентифицирована

Показатель	Значение
Число прочтений на образец	270246
Среднее качество прочтений (величина Phred)	38.00
Размер вставки (п.н.)	372
Число прочтений на локус HLA-A	26056
Число прочтений на локус HLA-B	14704
Число прочтений на локус HLA-C	24214
Число прочтений на локус HLA-DQB1	18274
Число прочтений на локус HLA-DRB1	27082

ОШИБКИ АНАЛИЗА

Не обнаружено

НОВЫЕ АЛЛЕЛИ

Не обнаружено

РЕЗУЛЬТАТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ¹

Локус	Генотип
HLA-A	02:01:01+11:01:01
HLA-B	07:02:01+35:03:01
HLA-C	04:01:01+07:02:01
HLA-DQB1	05:01:01+ND
HLA-DRB1	01:01:01/01:100+ND

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Пример отчета по запуску

Таблица генотипов в примере отчета по запуску приводится в сокращенном виде.

Отчёт по HLA типированию	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3	Отчет создан: 19.10.2020, 13:01:02	1/9
--------------------------	---	---------------------------------------	-----

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



Отчёт по запуску HLA

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тест-система	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3
Метод анализа	Высокопроизводительное секвенирование
Анализируемые локусы	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1
Разрешение HLA типирования	3 поля (3 fields)

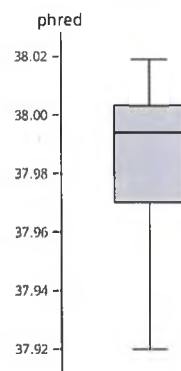
Номер запуска	ИЗУКМ
Серия	6020-14
КК контрольного образца	Пройден
Дата секвенирования	24.08.2020
Всего образцов	184
Лаборант	Васильева Евгения
Супервизор	Симакова Тамара
Дата анализа	24.08.2020
Версия IMGT-HLA	3.39.0
Алгоритм	mercury-pipeline-2.2-6-dev
Программное обеспечение	PARAllele™ HLA software версия 1 (SP 1.5.5)

ТУ 21.20.23-007-39429653-2020

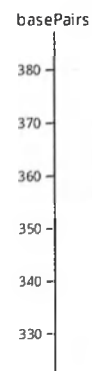
Отчёт по HLA типированию	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3	Отчет создан: 19.10.2020, 13:01:02	2/9
--------------------------	---	---------------------------------------	-----

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

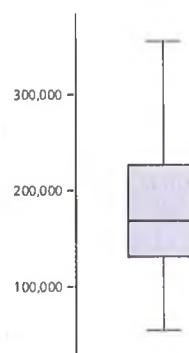
Среднее качество прочтений (величина Phred)



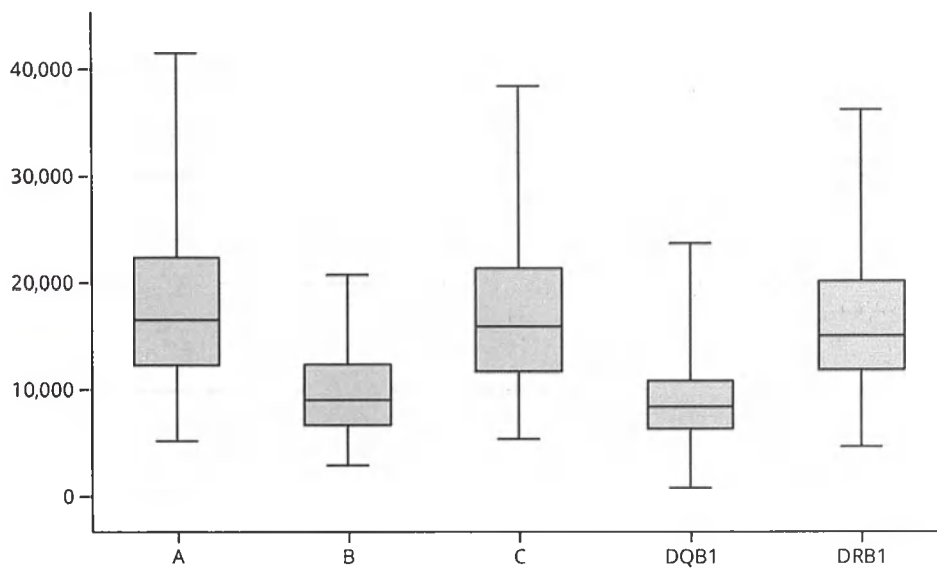
Размер вставки (п.н.)



Число прочтений на образец



Число прочтений на локус



ТУ 21.20.23-007-39429653-2020

Отчёт по HLA типированию	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3	Отчет создан: 19.10.2020, 13:01:02	3/9
--------------------------	---	---------------------------------------	-----

СТАТУСЫ ОБРАЗЦОВ В ЗАПУСКЕ

Статус	Количество образцов
Всего импортировано	184
Утверждено	181
Одобрено	1
Лаб. ошибка	1
Ошибка типирования	1

ОШИБКИ АНАЛИЗА

Не обнаружено

НОВЫЕ АЛЛЕЛИ

Не обнаружено

РЕЗУЛЬТАТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ¹

№	Образец	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
1	44461	02:01:01+11:01:01	07:02:01+35:03:01	04:01:01+07:02:01	05:01:01+ND	01:01:01/01:100+ND
2	44462	01:01:01+02:01:01	08:01:01+38:01:01	07:01:01+12:03:01	03:01:01+06:03:01	04:01:01+13:01:01
3	44463	25:01:01+30:01:01	13:02:01+18:01:01	06:02:01+12:03:01 06:02:38+12:03:08	02:02:01+06:03:01	07:01:01+13:01:01
4	44464	02:01:01+31:01:02 02:364:01+31:135	15:01:01+39:01:01	03:04:01+12:03:01	03:01:01+ND	12:01:01/12:10+ND
5	44465	02:01:01+24:02:01	18:01:01+44:02:01 18:01:33+44:02:59 18:177+44:464:01	05:01:01+07:01:01	05:02:01+ND	16:01:01+ND
6	44466	02:01:01+11:01:01	13:02:01+44:03:01	06:02:01+16:01:01	02:02:01+06:03:01	07:01:01+13:01:01
7	44467	24:02:01+66:01:01	13:02:01+41:02:01	06:02:01+17:03:01	02:02:01+03:01:01	07:01:01+13:03:01
8	44468	29:02:01+33:03:01	44:03:01+58:01:01	03:02:02+16:01:01	02:01:01+05:01:01	01:01:01/01:100+ 03:01:01/03:147
9	44469	01:01:01+24:02:01	08:01:01+35:03:01	07:01:01+12:03:01	05:01:01+ND	01:01:01/01:100+ND
10	44470	01:01:01+02:01:01	44:27:01+57:01:01	06:02:01+07:04:01	03:03:02+05:02:01	07:01:01+16:01:01
11	44471	01:01:01+26:01:01	08:01:01+49:01:01	07:01:01+ND	02:01:01+06:04:01	03:01:01/03:147+ 13:02:01
12	44472	24:02:01+25:01:01	44:02:01+48:01:01	07:04:01+08:01:01	03:01:01+ND	11:01:01+12:01:01/ 12:10
13	44473	02:01:01+ND	27:05:02+49:01:01	02:02:02+07:01:01	03:01:01+04:02:01	08:01:01+12:01:01/ 12:10

Отчёт по HLA типированию	Набор реагентов PARAllele™ HLA solution v3	Отчет создан: 30.09.2020, 15:23:45	9/9
--------------------------	---	---------------------------------------	-----

№	Образец	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
164	44717	02:01:01+03:01:01	35:01:01+38:01:01	04:01:01+12:03:01	05:01:01+06:03:01	01:01:01/01:100+ 13:01:01
165	44719	24:02:01+30:01:01	13:02:01+ND	06:02:01+ND	02:02:01+ND	07:01:01+ND
166	44721	03:01:01+68:01:01	08:01:01+40:01:02	03:04:01+07:01:01	06:03:01+ND	13:01:01+ND
167	44722	11:01:01+23:01:01	35:01:01+44:03:01 35:380:01+44:302	04:01:01+ND	02:01:01+05:01:01	01:01:01/01:100+ 03:01:01/03:147
168	44724	01:01:01+03:01:01	07:02:01+51:01:01 07:381+51:230:01	07:02:01+15:02:01	06:02:01+ND	15:01:01+ND
169	44726	03:01:01+ND	35:01:01+ND	04:01:01+ND	05:01:01+ND	01:01:01/01:100+ND
170	44728	01:01:01+11:01:01	35:01:01+54:01:01	01:02:01+04:01:01	05:01:01+06:01:01	01:01:01/01:100+ 08:03:02
171	44729	01:01:01+33:01:01	14:02:01+38:01:01	08:02:01+12:03:01	05:01:01+06:01:01	01:02:01+15:02:01/ 15:140/15:149
172	44732	01:01:01+02:01:01	13:02:01+46:01:01	01:02:01+06:02:01	02:02:01+03:03:02	07:01:01+09:01:02
173	44735	02:01:01+25:01:01	13:02:01+18:01:01	07:04:01+12:03:01	02:02:01+06:02:01	07:01:01+15:01:01
174	44737	02:01:01+26:01:01	38:01:01+44:27:01	07:04:01+12:03:01	03:03:02+05:02:01	09:01:02+16:01:01
175	44739	25:01:01+68:01:01	07:02:01+35:03:01	04:01:01+07:02:01	03:03:02+06:01:01	07:01:01+15:02:01/ 15:140/15:149
176	44740	03:01:01+29:01:01	13:02:01+35:02:01	04:01:01+06:02:01	02:02:01+03:01:01	07:01:01+11:01:01
177	44741	02:01:01+ND	18:01:01+56:01:01	01:02:01+07:01:01	03:01:01+05:01:01	01:01:01/01:100+ 11:04:01
178	44742	02:01:01+30:01:01	13:02:01+40:01:02	03:04:01+06:02:01	02:02:01+06:03:01	07:01:01+13:01:01
179	44743	03:01:01+24:03:01	35:03:01+44:03:01	04:01:01+ND	02:02:01+04:02:01	07:01:01+08:01:01
180	44745	02:01:01+68:01:02	07:02:01+44:02:01	02:02:02+05:01:01	03:02:01+05:02:01	04:01:01+16:01:01
181	44746	02:01:01+ND	15:01:01+44:02:01 15:535+44:464:01	03:03:01+05:01:01	05:01:01+06:02:01	01:01:01/01:100+ 13:01:01
182	44747	02:01:01+03:01:01	38:01:01+49:01:01	07:01:01+12:03:01	05:01:01+06:03:01	10:01:01+13:01:01
183	44748	02:01:01+02:05:01	40:01:02+50:01:01 40:379+50:57	03:04:01+06:02:01	02:02:01+06:04:01	07:01:01+13:02:01
184	B18	02:01:01+11:01:01	18:01:01+44:02:01 18:01:33+44:02:59 18:177+44:464:01	02:02:02+05:01:01	03:01:01+ND	04:01:01+08:03:02

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

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Павлов А.Е.

«16» _____ 2021 г.



Инструкция по применению медицинского изделия для
диагностики *in vitro*

Набор реагентов «**PARAllele™ HLA solution v3**»
для типирования генов HLA в высоком разрешении методом
высокопроизводительного секвенирования

ТОМ 3 из 3

Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software»

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	3
1.1. ТРЕБУЕМЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПК	3
2. ДОСТУП К ПО	3
3. РОЛЕВАЯ СИСТЕМА	4
4. ПРИЛОЖЕНИЯ И РАБОЧИЙ ПРОЦЕСС	5
4.1. СТРАНИЦА ВХОДА	5
4.2. СХЕМА АНАЛИЗА ОБРАЗЦА	6
4.3. ИМПОРТ ДАННЫХ	8
4.4. ЛАБ. КК	11
4.5. УТВЕРЖДЕНИЕ	14
4.6. ОДОБРЕНИЕ	15
4.7. ОБРАЗЦЫ	16
4.8. ЭКСПОРТ ДАННЫХ	17
5. КАРТОЧКА ОБРАЗЦА	18
6. НОВЫЕ АЛЛЕЛИ	21
7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА	22
8. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	22

1. ВВЕДЕНИЕ

Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software» версия 1 (далее ПО) предназначено для анализа данных высокопроизводительного секвенирования, полученных с помощью набора реагентов для типирования генов HLA в высоком разрешении методом высокопроизводительного секвенирования (производства ООО «ПАРСЕК ЛАБ»), далее набор реагентов.

ПО обеспечивает следующие возможности:

- импорт "сырых" прочтений и метаданных секвенирования;
- анализ загруженных прочтений различными алгоритмами с целью определения HLA-генотипа с разрешением 3 поля (3 fields) по локусам: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1 и HLA-DRB1;
- визуализацию и оценку качества результатов типирования;
- экспорт результатов типирования;
- встроенный канал взаимодействия со службой поддержки;
- разделение пользователей по ролям;
- анализ и хранение данных осуществляются в "облачной" вычислительной инфраструктуре.

Потоковые исследования по HLA-генотипированию требуют высокой производительности, надежности и воспроизводимости результатов, ПО назначает генотипы в полностью автоматическом режиме, ручное назначение генотипов пользователем ПО не предусмотрено. В случае невозможности автоматического назначения HLA-генотипа хотя бы по одному из локусов, образец автоматически направляется в службу поддержки.

Обновление ПО для актуализации компонентов выполняется автоматически в виде установки сервисных пакетов (SP), после чего пользователи получают уведомление об изменениях.

Персональные данные пациентов и добровольцев (доноров), прошедших процедуру HLA-типирования, не передаются и не хранятся в ПО. Полученные данные не используются производителем для создания регистров.

1.1. ТРЕБУЕМЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПК

- Скорость доступа в сеть Интернет не менее 50 Мбит/с.
- Браузер Google Chrome версии 80 и выше.
- Разрешение экрана – 1920x1080 пикселей.

2. ДОСТУП К ПО

Программное обеспечение «PARAllele™ HLA software» используется исключительно для работы с Набором реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» для типирования генов HLA в высоком разрешении методом высокопроизводительного секвенирования (производства ООО «ПАРСЕК ЛАБ»).

Доступ к программному обеспечению осуществляется путем авторизации на сайте <https://hla.parseq.pro>, после принятия лицензионного соглашения. Учетные данные пользователя указываются в сопроводительных документах к договору на поставку Набора реагентов.

3. РОЛЕВАЯ СИСТЕМА

Рабочий процесс предполагает разделение пользователей на специалиста, выполняющего постановку в лаборатории, и руководителя, осуществляющего утверждение генотипов образцов. В ПО реализовано соответствующее разграничение прав доступа.

Предусмотрены следующие роли:

Лаборант - выполняет загрузку данных в приложение и оценивает качество запусков.

Супервизор - осуществляет утверждение генотипов образцов и экспорт результатов.

В соответствии с п. E3 «Computer assisted analysis» руководства «Standards for Histocompatibility & Immunogenetics Testing», версия 8 (EFI, 2020), руководитель должен просмотреть, утвердить и подписать HLA-генотип, определенный автоматически с помощью ПО. Свое согласие с генотипом, установленным автоматически, **Супервизор** выражает путем нажатия на кнопку «Утвердить».

Работа начинается с выбора приложения для работы. Список доступных приложений находится в навигационной панели.

Доступность приложений по пользовательским ролям:

Приложение	Описание	Лаборант	Супервизор
Лаб. КК	Оценка лабораторных метрик качества запусков	✓	✓
Импорт данных	Загрузка результатов секвенирования в ПО	✓	✓
Образцы	Просмотр статусов и результатов генотипирования всех образцов, загруженных в аккаунт, экспорт результатов для выбранных образцов	✓	✓

Утверждение	Утверждение результатов автоматического генотипирования образцов, которые прошли все проверки контроля качества	✗	✓
Одобрение	Одобрение результатов ручного генотипирования образцов	✗	✓
Экспорт данных	Экспорт результатов по запускам	✗	✓

4. ПРИЛОЖЕНИЯ И РАБОЧИЙ ПРОЦЕСС

4.1. СТРАНИЦА ВХОДА

На странице входа расположена форма для авторизации в ПО: поля для ввода имени и пароля. Подробнее о доступе к «PARAllele™ HLA software» см. раздел *Доступ к ПО*. Также на странице размещена ссылка на пользовательскую документацию. При первой авторизации будет предложено ознакомиться и принять лицензионное соглашение.

4.2. СХЕМА АНАЛИЗА ОБРАЗЦА

СХЕМА АНАЛИЗА ОБРАЗЦА



На схеме представлены основные переходы между статусами образца.

Анализ образца начинается с импорта «сырых» данных и заканчивается экспортом результатов генотипирования. В случае, если произошла техническая ошибка при анализе данных (например, загружены данные, полученные не с Набором реагентов) образцу будет присвоен статус **ТЕХ. ОШИБКА**. По результатам корректного завершения автоматического анализа образцу будет присвоен один из статусов: **ОЖИДАЕТ УТВЕРЖДЕНИЯ**, **В ПОДДЕРЖКЕ** и **ЛАБ. ОШИБКА**.

Статус **ЛАБ. ОШИБКА** присваивается образцам, не прошедшим контроль качества лабораторного этапа. Статус **ЛАБ. ОШИБКА** является терминальным статусом образца, установить генотип в этом случае невозможно, требуется повторное секвенирование образца.

Статус **ОЖИДАЕТ УТВЕРЖДЕНИЯ** присваивается образцам, прошедшим все этапы контроля качества. Эти образцы готовы для утверждения генотипа пользователем в роли Супервизора. Если результат типирования не вызывает сомнений, Супервизор утверждает генотип, после чего образец переходит в терминальный статус **УТВЕРЖДЁН**. Если генотип вызывает сомнения, Супервизор направляет образец в техническую поддержку, после чего образцу автоматически присваивается статус **В ПОДДЕРЖКЕ**. В случае возникновения вопросов, связанных с анализом конкретного образца или локуса до утверждения генотипа Супервизором, рекомендуется отправить образец в поддержку непосредственно через ПО.

Статус **В ПОДДЕРЖКЕ** присваивается образцам, прошедшим контроль качества лабораторного этапа, но не прошедшим контроль качества на этапе анализа данных, либо образцам, направленным в поддержку Супервизором. После дополнительного анализа специалистами ООО «ПАРСЕК ЛАБ», образцы из данного статуса "переходят" в статус

ОЖИДАЕТ ОДОБРЕНИЯ. Эти образцы готовы для подтверждения генотипа Супервизором. Если генотип образца не вызывает сомнений, Супервизор утверждает генотип, после чего образец переходит в терминальный статус УТВЕРЖДЕН. Если по результатам дополнительного анализа генотип установить не удалось, образец переходит в терминальный статус ОШИБКА ТИПИРОВАНИЯ.

После того, как все образцы в запуске достигают терминального статуса, результаты по запуску могут быть экспортированы.

Возможные статусы образцов приведены в таблице:

Статус образца	Описание	Тип
АНАЛИЗИРУЕТСЯ	Образец в процессе анализа	Промежуточный
В ПОДДЕРЖКЕ	Образец на рассмотрении специалистов поддержки	Промежуточный
ОЖИДАЕТ ОДОБРЕНИЯ	Образец рассмотрен специалистами поддержки и ожидает одобрения результата Супервизором	Промежуточный
ОЖИДАЕТ УТВЕРЖДЕНИЯ	Образец проанализирован и ожидает утверждения генотипа Супервизором	Промежуточный
ЛАБ. ОШИБКА	Образец не прошел контроль качества лабораторных метрик	Терминальный
ОШИБКА ТИПИРОВАНИЯ	Генотип хотя бы по одному из локусов не может быть установлен	Терминальный
ТЕХ. ОШИБКА	Анализ образца не завершен корректно	Терминальный
УТВЕРЖДЁН	Генотип по всем анализируемым локусам установлен, результаты по образцу готовы к экспорту	Терминальный

Два типа переходов между статусами:

Переход	Описание
Отмеченный на схеме пунктирной линией	Переход, не требующий активного участия пользователей (переход осуществляется автоматически, либо техническими специалистами производителя ПО)

Отмеченный на схеме сплошной линией Переход, требующий активных действий от пользователя (Лаборанта и/или Супервизора) или специалиста поддержки

4.3. ИМПОРТ ДАННЫХ

Импорт данных разделен на четыре шага: выбор серии, заполнение метаданных, добавление образцов и загрузка. До момента начала загрузки введенная информация нигде не сохраняется.

1 Выбор серии

На первом шаге необходимо выбрать серию Набора реагентов, использованного для подготовки образцов из запуска.

Платформа
MiSeq System

Серия

ВПЕРЕД

Нажатие на кнопку ВПЕРЕД приведет к переходу на следующий шаг.

2 Заполнение метаданных

Заполнить метаданные можно вручную, или перетащив RunInfo.xml файл в зону загрузки (у MiSeq он находится в папке с результатами запуска). Также можно выбрать файл, нажав на соответствующий текст внутри зоны загрузки.



Перетащите или **выберите файл RunInfo.xml**



→ перемещение

или заполните вручную

ID запуска

Y5DLV

Набор для секвенирования

MiSeq Reagent Kit v2

Циклы

151 + 151

Дата запуска

25.09.2020



НАЗАД

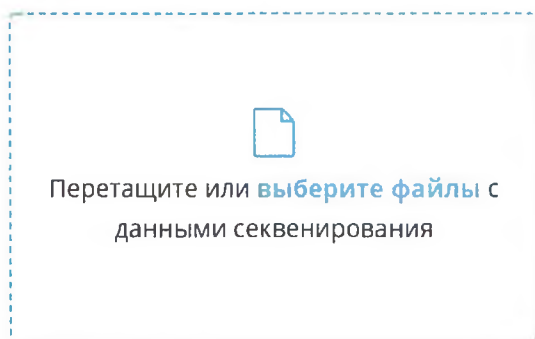
ВПЕРЕД

Нажатие на кнопку ВПЕРЕД приведет к переходу на следующий шаг.

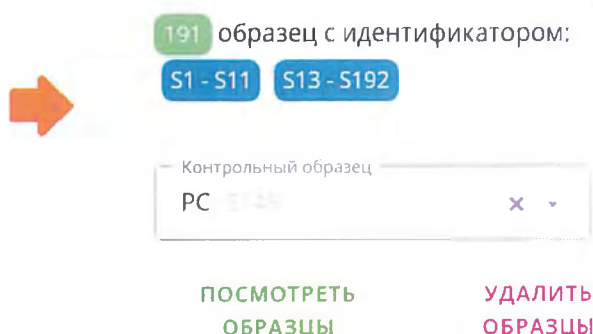
3 Добавление образцов

На третьем этапе необходимо добавить образцы. Это можно сделать с помощью перетаскивания файлов или с помощью файлового менеджера браузера.

Серия 1111-1



Серия 1111-1



После добавления образцов их количество и списки их идентификаторов отображаются на карточке. В норме, при загрузке всех образцов, бейдж с идентификаторами должен быть один. Если их несколько, значит какие-то образцы отсутствуют. На этом же шаге следует выбрать контрольный образец. Полностью посмотреть список образцов и файлов, которые им принадлежат, можно, нажав на кнопку ПОСМОТРЕТЬ ОБРАЗЦЫ.

Требуется нажать на кнопку ВПЕРЕД, чтобы перейти к следующему шагу, или кнопку НАЗАД для возврата к шагу 2.

4 Загрузка

На последнем шаге необходимо еще раз проверить все введенные данные и начать загрузку, нажав на соответствующую кнопку. После ее нажатия будут отображены полосы прогресса загрузки образцов.

Платформа
MiSeq System

ID запуска
Y5DLV

Серия 1111-1

Набор для секвенирования
MiSeq Reagent Kit v2 Nan

191 образец с
идентификатором: S1 - S11

S13 - S192

Циклы
151 + 151

Контрольный образец: S149

Дата запуска
25.09.2020

НАЗАД

НАЧАТЬ ЗАГРУЗКУ

Пока идет загрузка образцов, закрывать вкладку нельзя, это приведет к прерыванию загрузки. При попытке закрыть вкладку во время загрузки образцов будет вызвано браузерное уведомление для подтверждения закрытия вкладки (если они не заблокированы настройками браузера).

Если соединение прервалось во процессе импорта образцов, то поврежденные данные будут удалены автоматически, в этом случае необходимо повторно импортировать все образцы.

4.4. ЛАБ. КК

Предназначение: анализ лабораторных метрик качества.

В данном окне предоставлен список всех запусков организации. Для каждого запуска указано его имя, дата постановки, серия Набора реагентов, использованного для подготовки образцов, и количество образцов, попавших в оптимальную, субоптимальную и не прошедшую контроль качества по лабораторным метрикам группы.

Для поиска конкретного запуска можно воспользоваться фильтром.

Введите ID запуска

Запуски с образцами в процессе анализа будут иметь соответствующую подпись. Посмотреть их результаты можно будет после успешного завершения анализа всех образцов. Для перехода к конкретному запуску, требуется нажать на него.

G2DLA	09.07.20	6019-1	Идет анализ
G2DM4	09.07.20	6019-1	189 3 0
G59G2	09.07.20	6019-1	Идет анализ
D843M3	09.07.20	6019-1	Идет анализ
G2HB5	09.07.20	6019-2	189 3 0

Имя запуска Дата секвенирования Серия Количество образцов в зеленой, желтой и красной зонах

Окно лабораторного контроля качества запуска разделено на 3 компонента:

• **Общая информация по запуску:**

- имя запуска;
- дата секвенирования;
- набор реагентов и количество циклов;
- общее количество образцов;
- серия Набора реагентов, с которым были поставлены образцы;
- индикатор среднего качества прочтений образцов запуска.

• D8D3R



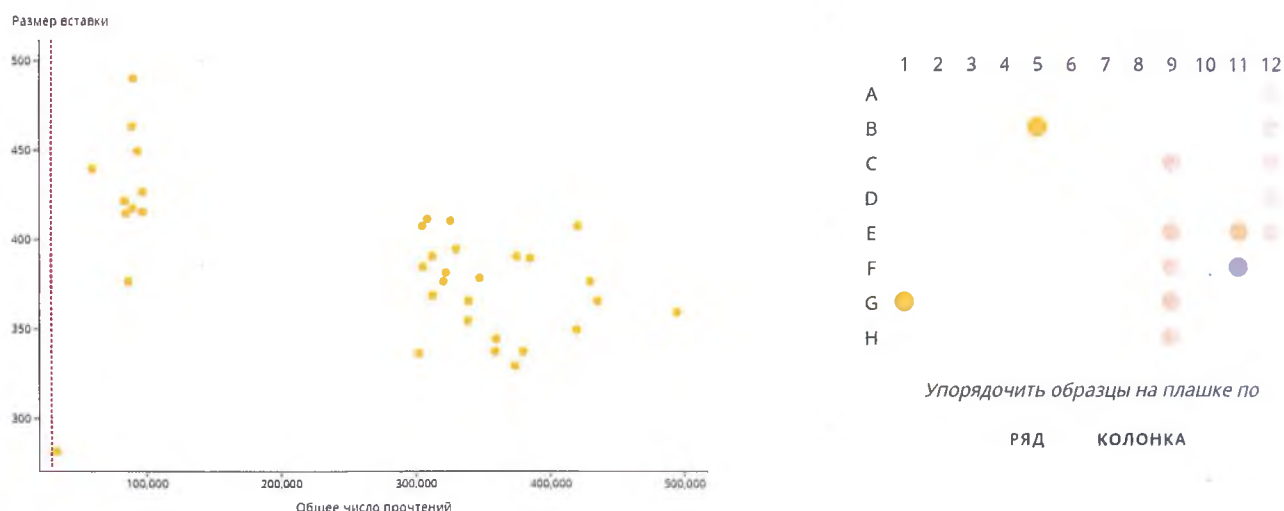
• Список образцов с не оптимальными значениями метрик контроля качества

В таблице указаны образцы, лабораторные метрики которых выходят из оптимальной зоны. Желтый бейдж - значение метрики в субоптимальной зоне. Красный бейдж - контроль качества по этой метрике не пройден. В бейджах указано значение метрики. Число, указанное в бейдже, может быть сокращено на 3 разряда, что обозначено буквой k, например, 341000 будет записано как 341k. При наведении на строку с образцом, этот же образец подсвечивается на графике.

	4	6	Общее число прочтений	Размер вставки	
52104			25k		
52105					СМЕСЬ
52106				50	
52107				700	
52108			25k	200	СМЕСЬ
52110			96k		
52125			324k		
52133			332k		
52149			315k		
52175			82k		

• Графики, позволяющие оценить распределение значений метрик для всех образцов запуска

Первый график показывает распределение образцов по размеру вставки и общему числу прочтений. Узнать, какому образцу соответствует точка, можно при наведении на нее. Образцы, лабораторные метрики которых находятся в оптимальной зоне, окрашены в бледно-голубой цвет. Субоптимальная и зона плохого качества на графиках отмечаются фоном соответственно желтого и красного цвета при наведении на образцы, попавшие в эти зоны. Стоит заметить, что красные образцы могут встретиться и в оптимальной зоне – такие образцы являются контаминированными. Если образец попал в красную зону, он также может быть контаминирован.



Второй график показывает расположение образцов на планшетах при условии, что образцы раскапывались по порядку: колонками или рядами (образцы идут друг за другом в порядке увеличения их идентификатора в запуске). Переключить направление с колонок на ряды можно с помощью управляющего элемента. Данная схема может помочь определить взаимное расположение проблемных образцов в запуске.

4.5. УТВЕРЖДЕНИЕ

Предназначение: одобрение генотипов, полученных в полностью автоматическом режиме.

Приложение состоит из карточки образца и элементов управления. Для детального знакомства с карточкой образца см. раздел *Карточка образца*.

Для перехода к следующему/предыдущему образцу можно использовать кнопки в виде стрелок по бокам карточки анализа, либо воспользоваться *стрелками влево/вправо* на клавиатуре. Если результаты анализа не вызывают вопросов, то образец можно утвердить, нажав на кнопку **УТВЕРДИТЬ** или на *стрелку вниз* на клавиатуре.

ОТПРАВИТЬ В ПОДДЕРЖКУ!

05.02.2020

B-18

ДЕТАЛИ КК

СРТКН

S79

6020-16

Локус

Генотип

A

02:01:01 + 11:01:01

18:01:01 + 44:02:01

B

18:01:33 + 44:02:59

18:177 + 44:464:01

C

02:02:02 + 05:01:01

DQB1

03:01:01 + ND

DRB1

04:01:01 + 08:03:02

УТВЕРДИТЬ

Если в вашей организации есть несколько запусков с анализами, ожидающими утверждения, их список с количеством соответствующих анализов будет отображен в правой части экрана. С его помощью можно перейти к интересующему запуску.

4.6. ОДОБРЕНИЕ

Предназначение: утверждение генотипов, назначенных специалистом службы поддержки.

Приложение состоит из карточки образца и элементов управления. Карточка образца разделена на 2 смысловые части: метаданные и генотипы. Подробнее о карточке образца см. раздел *Карточка образца*.

Для перехода к следующему/предыдущему образцу можно использовать кнопки в виде стрелок по бокам карточки анализа. Либо воспользоваться стрелками влево/вправо на клавиатуре.

Если внесенные работником службы поддержки изменения не вызывают вопросов, то образец можно утвердить, нажав на кнопку ОДОБРИТЬ или на *стрелку вниз* на

клавиатуре. Если внесенные работником службы поддержки изменения вызывают вопросы, можно отправить образец в поддержку, нажав на кнопку **ОТПРАВИТЬ В ПОДДЕРЖКУ** или на *стрелку вверх* на клавиатуре. В открывшемся модальном окне необходимо отметить локусы, вызывающие вопросы, и оставить комментарии для сотрудника службы поддержки.

ОТПРАВИТЬ В ПОДДЕРЖКУ

05.02.2020

B-18
[ДЕТАЛИ КК](#)

СРТКН

S79

6020-16

Локус	Старый генотип	Новый генотип
A	02:01:01 + 11:01:01	Изменения отсутствуют
B	ND + ND	18:01:01 + 44:02:01 18:01:33 + 44:02:59 18:177 + 44:464:01
C	02:02:02 + 05:01:01	Изменения отсутствуют
DQB1	03:01:01 + ND	Изменения отсутствуют
DRB1	04:01:01 + 08:03:02	Изменения отсутствуют

ОДОБРИТЬ

Если в вашей организации есть несколько запусков с анализами, ожидающими одобрения, их список с количеством соответствующих анализов будет отображен в правой части экрана. С его помощью можно перейти к интересующему запуску.

4.7. ОБРАЗЦЫ

Предназначение: просмотр и экспорт результатов анализа образцов организации.

Каждый элемент в списке образцов включает в себя:

- имя образца,
- бейдж со статусом,

- дату секвенирования.

7470	УТВЕРЖДЁН	21.06.2019
7471	УТВЕРЖДЁН	21.06.2019
7472	УТВЕРЖДЁН	21.06.2019
7473	УТВЕРЖДЁН	21.06.2019
↑ Имя образца	↑ Статус образца	↑ Дата секвенирования

Выбранный в списке образец отображается справа в виде карточки с подробной информацией. Подробнее о карточке образца см. раздел *Карточка образца*.

Для открытия списка всех фильтров нужно нажать на иконку в правой части строки поиска. Нажатие на кнопку экспорта запустит скачивание отчета по всем отфильтрованным образцам.

 **ЭКСПОРТ**

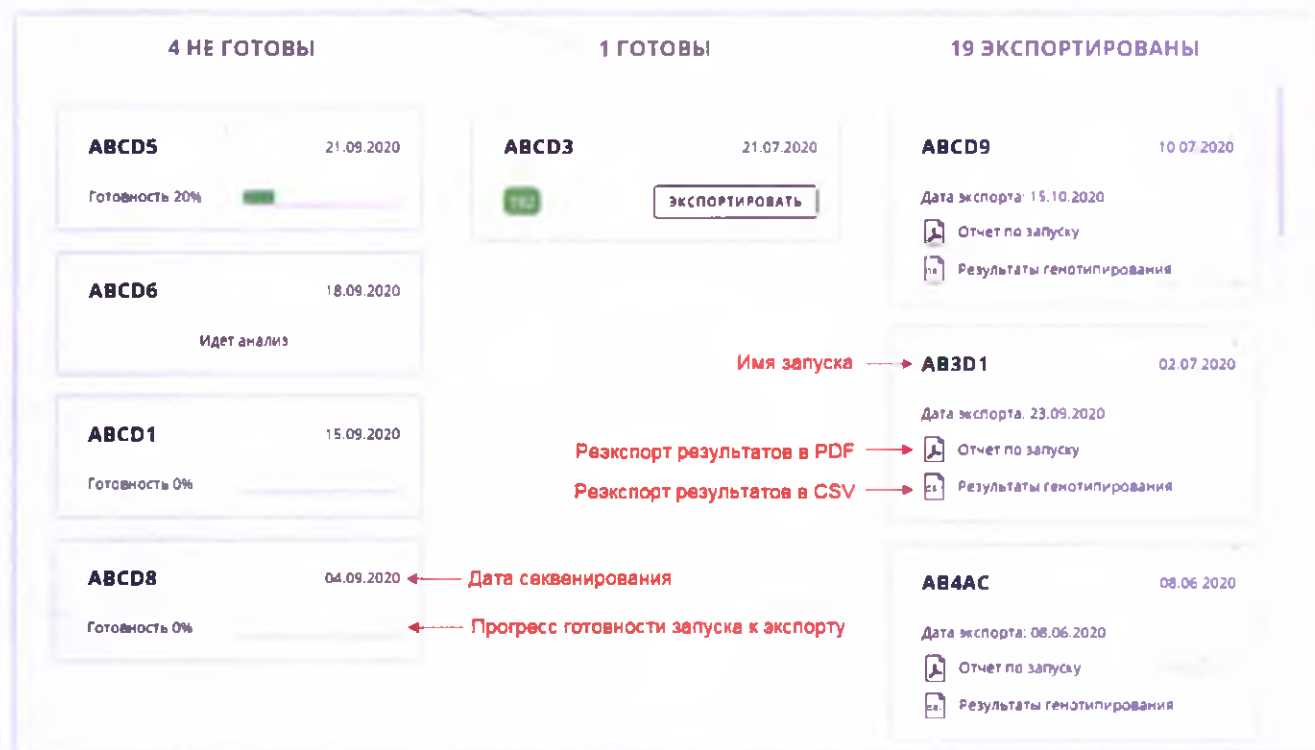
4.8. ЭКСПОРТ ДАННЫХ

Предназначение: просмотр готовности запусков к экспорту и экспорт результатов.

Все запуски разделены на 3 группы:

- Не готовы к экспорту: в запуске есть анализы в промежуточном статусе.
- Готовы к экспорту: все анализы в запуске в терминальном статусе, но его результаты не были экспортированы.
- Экспортированы: запуски, результаты которых уже были экспортированы.

Переход запусков между группами осуществляется автоматически, после выполнения соответствующих условий.



5. КАРТОЧКА ОБРАЗЦА

Метаданные по образцу, результаты HLA-генотипирования и детали контроля качества (КК) представлены на карточке образца, доступной через приложения «Утверждение», «Одобрение» и «Образцы». Карточка образца разделена на 2 смысловые части: метаданные и генотипы, а также предоставляет возможность просмотра деталей контроля качества образца и историю его статусов.

Метаданные:

- имя образца;
- дата секвенирования;
- имя запуска;
- номер образца в запуске;
- серия Набора реагентов, с которым был поставлен образец;

Генотипы:

- Результаты HLA-генотипирования представлены в таблице, каждая строка которой содержит название локуса и генотип в формате: **аллель 1 + аллель 2**, где аллель 1 и аллель 2 – пара гомологичных аллелей.

- В соответствии с требованием п. F1.2.3 «Reporting Homozygosity and Heterozygosity» руководства «Standards for Histocompatibility & Immunogenetics Testing», версия 8 (EFI, 2020), гомозиготный генотип записывается как **аллель 1 + ND**, где ND (not determined) – аллель не определена.
- Редкие аллели (аллели с частотой по образцам в аккаунте организации менее 5%) подчеркнуты желтой чертой, при наведении на аллель отображается соответствующий бейдж.
- Неоднозначные генотипы записываются друг под другом в одной строке соответствующего локуса.
- Неоднозначные аллели разделены символом «/».
- Если аллель не умещается целиком, то при наведении на нее будет возникать всплывающая подсказка, в которой будет отображено полное "название" аллели.
- Функциональная аннотация отображается рядом с номером аллели в виде бейджа с соответствующим суффиксом.

В приложении «Одобрение» результаты генотипирования содержат «Старый генотип» (определенный автоматически в рамках ПО) и «Новый генотип» (генотип, установленный специалистами технической поддержки производителя), в приложении «Утверждение» содержится только генотип, определенный автоматически.

Версия алгоритма анализа данных, использованного для анализа текущего образца, и базы IMGT указаны во всплывающей подсказке бейджа серии. Версия IMGT со ссылкой на сайт указана внизу карточки.

Контекстное меню на карточке образца в приложении «Образцы» позволяет открыть окно деталей контроля качества, историю статусов образца и скачать отчет по образцу.

- В соответствии с требованием п. F1.2.3 «Reporting Homozygosity and Heterozygosity» руководства «Standards for Histocompatibility & Immunogenetics Testing», версия 8 (EFI, 2020), гомозиготный генотип записывается как **аллель 1 + ND**, где ND (not determined) – аллель не определена.
- Редкие аллели (аллели с частотой по образцам в аккаунте организации менее 5%) подчеркнуты желтой чертой, при наведении на аллель отображается соответствующий бейдж.
- Неоднозначные генотипы записываются друг под другом в одной строке соответствующего локуса.
- Неоднозначные аллели разделены символом «/».
- Если аллель не уместается целиком, то при наведении на нее будет возникать всплывающая подсказка, в которой будет отображено полное "название" аллели.
- Функциональная аннотация отображается рядом с номером аллели в виде бейджа с соответствующим суффиксом.

В приложении «Одобрение» результаты генотипирования содержат «Старый генотип» (определенный автоматически в рамках ПО) и «Новый генотип» (генотип, установленный специалистами технической поддержки производителя), в приложении «Утверждение» содержится только генотип, определенный автоматически.

Версия алгоритма анализа данных, использованного для анализа текущего образца, и базы IMGT указаны во всплывающей подсказке бейджа серии. Версия IMGT со ссылкой на сайт указана внизу карточки.

Контекстное меню на карточке образца в приложении «Образцы» позволяет открыть окно деталей контроля качества, историю статусов образца и скачать отчет по образцу.

Номер образца в запуске Дата секвенирования

Имя образца → **11111 S9**

Имя запуска → **ABCD4** 04.09.2020

Серия → **1111-1**

Локус	Генотип
A	01:01:01 + 24:02:01
B	08:01:01 + 35:03:01
C	07:01:01 + 12:03:01
DQB1	05:01:01 + ND
DRB1	01:01:01 / 01:100 + ND

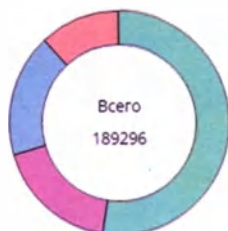
Детали контроля качества (Детали КК) содержат следующую информацию:

- число прочтений на образец;
- распределение прочтений по типам (триммированные по качеству, нецелевые, гомологичные и целевые);
- размер вставки по образцу (п.н.) и диаграмму размаха по запуску;
- среднее качество прочтений по образцу (phred) и диаграмму размаха по запуску;
- число прочтений на анализируемые локусы и соответствующие диаграммы размаха по запуску.

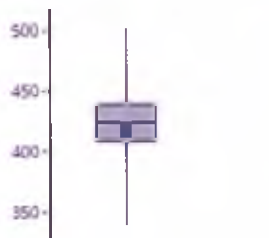
Верхние и нижние точки (границы усов) соответствуют максимальному и минимальному значению показателя по запуску, ящик соответствует первому и третьему квартилю, внутри ящика отмечена медиана. Синяя точка соответствует значению показателя контроля качества данного образца.

Образец 11111

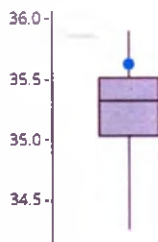
Распределение прочтений



Размер вставки



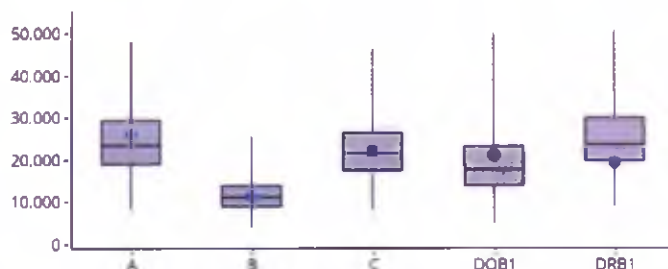
Ср. качество прочтений



Общие проблемы

Не обнаружены

Число прочтений на локус



Локус-специфичные проблемы

Не обнаружены

ЗАКРЫТЬ

Также в разделе Детали контроля качества представлены результаты контроля качества по образцу: общие проблемы (субоптимальные значения покрытия по образцу) и локус-специфичные проблемы (субоптимальные значения покрытия по локусу, неопределенный генотип по локусу).

История образца содержит следующую информацию:

- список всех статусов, которые прошел образец;
- изменения генотипа образца;
- логин пользователя, которым был изменен статус образца;
- дата и время изменения статуса образца.

6. НОВЫЕ АЛЛЕЛИ

Алгоритм HLA-генотипирования позволяет идентифицировать аллели, не включенные в базу данных IPD-IMGT/HLA актуальной версии. Такой образец автоматически попадет в поддержку, где новая аллель будет подтверждена и описана специалистами ООО «ПАРСЕК ЛАБ».

На карточке образца, вместо новой аллели, отображается бейдж

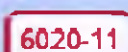
New

7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА

В состав набора реагентов входит контрольный образец с известным HLA-генотипом, установленным референсным методом. Рекомендуется включать контрольный образец в каждую постановку.

Если контрольный образец указан при импорте данных, программа автоматически анализирует результат, полученный по контрольному образцу, и сравнит его с референсным генотипом. Если контрольный образец не проходит контроль качества или по генотипу выявлено неполное совпадение, программа автоматически маркирует запуск как непрошедший контроль качества (в этом случае рекомендуется повторить постановку целиком).

Статус прохождения контроля качества контрольным образцом (отображаемый на бейдже серии) может быть одним из:

Статус	Описание	Бейдж
НЕИЗВЕСТНЫЙ	Контрольный образец не был поставлен в запуске или не был указан при импорте запуска	
ПРОЙДЕН	Контрольный образец прошел контроль качества и генотипы полностью совпали с референсными значениями	
НЕ ПРОЙДЕН	Контрольный образец не прошел контроль качества или генотипы не полностью совпали с референсными значениями	

8. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

В случае возникновения общих вопросов и вопросов, связанных с работой ПО следует обратиться в службу технической поддержки производителя через сайт: <https://support.parseq.pro/>.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 95
(девятая пятая) листа (ов).
Должность,
ФИО генеральный директор
Павлов А.Е.
(подпись)
М.П.
« 16 » апреля 2024 г.

