

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Павлов А.Е.

«14» 06 2021 г.



Инструкция по применению

медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «**VARIFIND™ CFTR SOLUTION**»

для качественного определения клинически значимых вариантов
гена CFTR с целью диагностики или скрининга носительства
муковисцидоза

Каталожный номер

VF-CFTR-24 (24 реакции)

VF-CFTR-96 (96 реакций)

VF-CFTR-384 (384 реакции)

Символы

	Обратитесь к инструкции
	Изготовитель
	Код партии
	Номер по каталогу
	Использовать до
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Для IN VITRO диагностики

РЕВИЗИИ ИНСТРУКЦИИ

№ документа	Дата	Примечания к ревизии
UM_L-37ru	15.01.2021	Первичный выпуск

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ.....	6
1.1.	НАЗНАЧЕНИЕ	6
1.2.	НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ	7
1.3.	ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	7
1.4.	ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ	9
1.5.	ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕШЕНИЯ	10
1.6.	КОМПЛЕКТАЦИЯ.....	13
1.7.	ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ	13
1.8.	ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ	14
1.9.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	15
1.10.	ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА.....	16
2.	ПРОТОКОЛ	17
2.1.	ТАРГЕТНОЕ ОБОГАЩЕНИЕ	17
2.2.	ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК	19
2.3.	СЕКВЕНИРОВАНИЕ	19
2.3.1.	Денатурация пула библиотек	20
2.3.2.	Запуск секвенирования	20
2.3.2.1.	Включение секвенатора	21
2.3.2.2.	Разморозка картриджа для секвенирования.....	21
2.3.2.3.	Загрузка библиотек	21
2.3.2.4.	Очистка ячейки	21
2.3.2.5.	Настройка запуска секвенирования.....	22
2.3.2.6.	Загрузка ячейки.....	22
2.3.2.7.	Загрузка раствора и проверка бутылки для сбора отходов.....	23
2.3.2.8.	Загрузка картриджа с реактивами	23
2.3.2.9.	Выбор sample sheet	23
2.3.2.10.	Запуск секвенирования	24
2.3.2.11.	Мониторинг секвенирования	24
3.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	25
3.1.	АНАЛИЗ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА	25

3.2. ИЗВЕСТНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ	25
3.3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	26
3.4. АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ	27
3.5. ВНЕШНИЕ ИСТОЧНИКИ АННОТАЦИИ	28
3.6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	31
4. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ.....	31
4.1. РЕКОМЕНДОВАННЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	32
4.2. ДОСТУП К ПО	32
4.3. ИМПОРТ ДАННЫХ	33
4.3.1. Выбор серии реагентов.....	33
4.3.2. Заполнение метаданных.....	34
4.3.3. Добавление образцов.....	35
4.3.4. Загрузка	35
4.4. ЗАПУСКИ	36
4.5. АНАЛИЗЫ.....	38
4.6. ДЕТАЛИ АНАЛИЗА ОБРАЗЦА.....	38
4.6.1. Варианты.....	39
4.6.2. Клин. варианты	40
4.6.3. Визуализация прочтений в геномном браузере IGV	42
4.6.4. Анализ покрытия	42
4.6.5. BIDs.....	43
4.7. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	44
5. ФОРМАТ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ.....	45
6. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	50
7. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА.....	50
8. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ	50
9. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	51

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «VariFind™ CFTR solution» предназначен для высокопроизводительного секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (ПУ №ПЗН 2014/1568 от 29.04.2014) целевых регионов гена *CFTR* и качественного определения клинически значимых герминативных вариантов в клинических образцах геномной ДНК человека, выделенных из цельной крови, буккального эпителия или сухих пятен крови, обогащенных методом мультиплексной ПЦР с использованием специфичных урацил-содержащих праймеров, и подготовленных к секвенированию с помощью набора для создания ДНК-библиотек на основе урацил-содержащих ампликонов, с целью диагностики или скрининга носительства муковисцидоза.

Функциональным назначением исследования, выполняемого с помощью Набора реагентов, является определение генетического статуса пациента по гену *CFTR* с целью диагностики и скрининга носительства муковисцидоза. Это тяжелое заболевание является моногенным с известной генетической этиологией. Необходимость ранней диагностики муковисцидоза определяется следующими факторами:

- раннее начало лечения обеспечивает более высокий терапевтический эффект и улучшает прогноз течения заболевания, а также снижает затраты на ведение пациента;
- своевременная постановка диагноза вносит ясность в понимание родителями состояния ребенка и позволяет им и больному вовремя адаптироваться к трудностям, связанным с хроническим заболеванием;
- задержка в постановке диагноза, а, следовательно, отсутствие своевременной терапии, может привести к развитию необратимых патологических изменений в организме;
- несвоевременность постановки диагноза может быть сопряжена с излишними, сложными, дорогостоящими диагностическими и лечебными мероприятиями, связанными с лечением осложнений заболеваний;
- проведение генетического консультирования, пренатальной диагностики, планирования последующих беременностей облегчается при известном генетическом статусе пациента.

ВНИМАНИЕ!

Результаты, полученные с помощью данного решения, должны интерпретироваться специалистами только в контексте общей клинической картины.

1.2. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Муковисцидоз - самое частое моногенное заболевание, частота в Европейских популяциях варьирует от 1/2000 до 1/4000. В других популяциях частота муковисцидоза несколько ниже: 1/15000 среди афроамериканцев и 1/30000 среди азиатского населения (Jorde L. et al., 2010).

Причиной муковисцидоза являются мутации в гене *CFTR* (трансмембранный регулятор муковисцидоза), кодирующем цАМФ-зависимый ионный канал, локализованный в мембране эпителиальных клеток, и отвечающий за транспорт ионов натрия и хлора (Vankeerberghen A. et al., 2002).

Муковисцидоз характеризуется высокой генетической гетерогенностью. Данные о генетическом разнообразии муковисцидоза в России собираются в Российском регистре больных муковисцидозом (Капранов Н.И., Чучалин А.Г., 2014).

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. Для диагностики и скрининга носительства муковисцидоза рекомендуется применять технологию высокопроизводительного секвенирования, поскольку данный метод позволяет исследовать полный спектр клинически значимых генетических вариантов и достичь максимальной диагностической чувствительности (Beauchamp et al., 2019).

1.3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор реагентов предназначен для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Исследования с использованием Набора реагентов могут проводиться в научно-исследовательских лабораториях, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот и высокопроизводительное секвенирование на генетических секвенаторах нового поколения.

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 генетических секвенаторах.

Набор реагентов предназначен для обследования людей любого возраста, а также всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

Формат определения – качественный.

Показания к применению: подтверждающая диагностика у пациентов с клиническими проявлениями муковисцидоза; диагностика в рамках неонатального скрининга на муковисцидоз; обследование родственников и репродуктивных партнеров больных муковисцидозом; обследование доноров половых клеток.

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

Тип анализируемого образца: геномная ДНК человека, выделенная из цельной крови (капиллярной или венозной), буккального эпителия или сухих пятен крови. Минимальная концентрация геномной ДНК в образце 1 нг/мкл.

Измерение концентрации рекомендуется проводить спектрофотометрически с использованием анализатора «Varioskan Flash» (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме Поглощения (Absorbance), РУ №РЗН 2014/1842 от 08.08.2014 г.

Взятие, предобработку и хранение биоматериала проводят в соответствии с методическим пособием «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанным ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Выделение ДНК проводят в соответствии с используемым комплектом реагентов, который гарантирует отсутствие интерферирующих веществ в образце геномной ДНК.

При выделении ДНК из цельной крови рекомендуется использовать комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия), РУ №ФСР 2009/05220 от 18.05.2017 г.

При выделении ДНК из буккального эпителия или сухих пятен крови рекомендуется использовать набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала на основе спиртового осаждения «Экстра-ДНК-Био» (ООО «Алкор Био», Россия), РУ №ФСР 2012/13631 от 29.06.2012 г.

Для сбора, хранения и транспортировки сухих пятен крови рекомендуется использовать ДНК-Карты (ООО «Алкор Био», Россия), РУ №РЗН 2016/4615 от 23.08.2016 г.

Для сбора буккального эпителия рекомендуется использовать щетки 4N6FLOQSwabs Regular («Coran Flock Technologies», Италия), РУ №ФСЗ 2012/13327 от 04.12.2012 г. Для хранения и транспортировки образцов буккального эпителия использовать транспортный раствор (АО «Вектор-Бест», Россия), РУ №РЗН 2017/6004 от 24.07.2017 г.

Для подготовки образца ДНК к секвенированию рекомендуется использовать набор для создания библиотек на основе урацил-содержащих ампликонов Prep&Seq™ U-target kit (ООО «Парсек Лаб», Россия) по ТУ 20.59.52.190-003-39429653-2020.

Набор реагентов рассчитан на однократное применение после вскрытия без возможности повторных заморозок-разморозок и дробных постановок.

Набор реагентов содержит ДНК, аналогичные последовательностям геномной ДНК человека.

Вид медицинского изделия – код 306810 (набор реагентов и других связанных с ними материалов, предназначенный для исследования клинического образца для диагностирования, мониторинга или прогнозирования возникновения единичной или множественных мутаций, связанных с развитием врожденного генетического нарушения - муковисцидоза (cystic fibrosis), обусловленного мутацией в гене трансмембранного регуляторного белка при муковисцидозе (CFTR) методом мультиплексного анализа).

1.4. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

- Набор реагентов «VariFind™ CFTR solution» позволяет провести таргетное обогащение образца ДНК целевыми фрагментами гена *CFTR*, секвенирование на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc., США), и определить клинически значимые варианты в гене *CFTR* с помощью ПО «VariFind™ CFTR software» версия 1.
- Для каждого образца ДНК проводится реакция таргетного обогащения методом мультиплексной ПЦР с урацил-содержащими праймерами для наработки целевых фрагментов, соответствующих кодирующей части и сайтам сплайсинга гена *CFTR*. **Количество ампликонов, нарабатываемых с помощью пулов праймеров, составляет 67.**
- Для приготовления библиотек рекомендуется использовать Набор реагентов «Prep&Seq™ U-target IL library kit» для создания библиотек ампликонов для последующего таргетного высокопроизводительного секвенирования.
- **Контрольный образец (КО)** представляет собой образец синтетической геномной ДНК мужского пола с концентрацией 1 нг/мкл, соответствующий следующему генотипу по гену *CFTR*: F508del/CFTRdele2,3. Рекомендуется включать Контрольный образец в каждую постановку анализа.
- Секвенирование осуществляется на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (РУ №РЗН 2014/1568 от 29.04.2014). Метод секвенирования Illumina реализует технологию высокопроизводительного секвенирования, основанную на многократном прочтении большого количества ДНК-клонов. Секвенирование осуществляется путем синтеза ДНК, оптическая детекция сигнала происходит при присоединении флуоресцентно меченого нуклеотида к синтезируемой цепи ДНК.
- Анализ данных осуществляется с помощью программного обеспечения «VariFind™ CFTR software» версия 1 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ»). Программное обеспечение выполняет выравнивание прочтений, оценку качества, идентификацию генетических вариантов, формирование отчета по результатам анализа и предоставление данных пользователю.

1.5. ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕШЕНИЯ

Аналитические характеристики набора установлены с помощью международных референсных материалов (NIST RM-8398) и стандартных образцов предприятия (JOSCD-01, JOSCD-02).

- Набор реагентов идентифицирует точечные герминативные генетические вариации в целевых регионах гена *CFTR*.
- Набор реагентов идентифицирует вариацию копийности *CFTR*dele2,3 в гене *CFTR*.
- Набор реагентов идентифицирует вариации коротких tandemных повторов poly-T/TG в гене *CFTR*.
- Набор реагентов идентифицирует контаминированные образцы с примесью чужеродной ДНК 10% и более.
- Набор реагентов идентифицирует пол образца по результатам секвенирования.
- **Предел обнаружения** Набора реагентов составляет 0,33 нг/мкл (в объеме не менее 6 мкл).
- **Аналитическая чувствительность** Набора реагентов в пределах целевых регионов составляет 100%. Под аналитической чувствительностью понимается способность набора реагентов верно определять наличие генетического варианта в пределах целевых регионов генома.
- **Аналитическая специфичность** Набора реагентов в пределах целевых регионов составляет 100%. Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов верно определять отсутствие генетического варианта в пределах целевых регионов генома.
- **Повторяемость** результатов в пределах запуска составляет 100% (ДИ 95%: 90,11%-100,00%).
- **Воспроизводимость** результатов составляет 100% (95% ДИ: 90,36%-100,00%).
- **Диагностическая чувствительность** Набора реагентов в отношении пациентов с установленным диагнозом муковисцидоз составляет 100% с нижним пределом доверительного интервала в 95,47%.
- **Диагностическая чувствительность** Набора реагентов в отношении носителей одного варианта в гене *CFTR* составляет 100% с нижним пределом доверительного интервала в 95,00%.
Под диагностической чувствительностью понимается способность Набора реагентов идентифицировать присутствие целевого маркера, сочетающегося с конкретной болезнью или состоянием.
- **Диагностическая специфичность** Набора реагентов составляет 100% с нижним пределом доверительного интервала в 95,13%. Под диагностической специфичностью понимается способность методики диагностического исследования *in vitro* распознавать отсутствие целевого маркера конкретной болезни или состояния.

- Координаты целевых регионов гена *CFTR* (относительно референсного генома человека GRCh38):

№ п/п	Хромосома	Координата начала	Координата конца	Регион
1	chr7	117480054	117480320	Экзон 1
2	chr7	117498112	117498382	Инtron 1
3	chr7	117504196	117504456	Экзон 2
4	chr7	117508824	117509257	Экзон 3
5	chr7	117519359	117519464	Инtron 3
6	chr7	117530711	117531191	Экзон 4
7	chr7	117534071	117534561	Экзон 5
8	chr7	117535223	117535493	Экзон 6
9	chr7	117536491	117536751	Экзон 7
10	chr7	117538894	117539156	Инtron 7
11	chr7	117540057	117540478	Экзон 8
12	chr7	117541865	117542128	Экзон 9
13	chr7	117548543	117548605	Инtron 9
14	chr7	117548635	117548930	Экзон 10
15	chr7	117559428	117559686	Экзон 11
16	chr7	117587696	117587949	Экзон 12
17	chr7	117589278	117589539	Инtron 12
18	chr7	117590272	117590541	Экзон 13
19	chr7	117591774	117592688	Экзон 14
20	chr7	117594886	117595268	Экзон 15
21	chr7	117602749	117603004	Экзон 16
22	chr7	117603426	117604022	Экзон 17
23	chr7	117606581	117606847	Экзон 18
24	chr7	117610193	117610456	Инtron 18
25	chr7	117610465	117610915	Экзон 19
26	chr7	117611444	117611867	Экзон 20
27	chr7	117614440	117614911	Экзон 21
28	chr7	117626028	117626258	Инtron 21
29	chr7	117627415	117627824	Экзон 22
30	chr7	117639901	117640167	Инtron 22
31	chr7	117642290	117642722	Экзон 23
32	chr7	117648228	117648425	Инtron 23
33	chr7	117652726	117652986	Экзон 24
34	chr7	117664523	117664917	Экзон 25
35	chr7	117665319	117665727	Экзон 26
36	chr7	117666677	117667132	Экзон 27

- **Биологическим референтным интервалом** применения медицинского изделия является дикий тип (референсный геном человека GRCh38).

- **Диапазон измерения** включает точечные мутации: однонуклеотидные замены, делеции, инсерции. Диапазон измерения не включает вариации копийности за исключением CFTRdele2,3.

1.6. КОМПЛЕКТАЦИЯ

Изделие выпускается в 3 вариантах комплектации со следующими каталожными номерами:

- **VF-CFTR-24.** Содержимого достаточно для амплификации и секвенирования 24 образцов ДНК.
- **VF-CFTR-96.** Содержимого достаточно для амплификации и секвенирования 96 образцов ДНК.
- **VF-CFTR-384.** Содержимого достаточно для амплификации и секвенирования 384 образцов ДНК.

Состав Набора реагентов «VariFind™ CFTR solution»

№ п/п	Компоненты	Количество		
		VF-CFTR-24	VF-CFTR-96	VF-CFTR-384
1. Комплект для таргетного обогащения				
1.1	Пул праймеров 1 (ПП1)	1 x 140 мкл	1 x 550 мкл	2 x 1100 мкл
1.2	Пул праймеров 2 (ПП2)	1 x 140 мкл	1 x 550 мкл	2 x 1100 мкл
1.3	Контрольный образец (КО)	1 x 10 мкл	1 x 10 мкл	1 x 10 мкл
2. Комплект для секвенирования				
2.1	Картридж для секвенирования	1 штука	1 штука	1 штука
2.2	Ячейка и раствор для секвенирования	1 штука	1 штука	1 штука
3. Программное обеспечение VariFind™ CFTR Software				
3.1	Программное обеспечение VariFind™ CFTR Software	Доступ к веб-приложению	Доступ к веб-приложению	Доступ к веб-приложению

1.7. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Описание	Поставщик	Каталожный номер	РУ
ПЦР-бокс (ламинар или рабочее место)	Lamsystems	-	РУ ФСР 2010/07113 от 18.03.2010
Система очистки воды Milli-Q	Millipore	Z00QSV0WW	РУ №РЗН2013/265
ПЦР-амплификатор (Veriti™, SimpliAmp™)	Thermo Fisher Scientific	4375786 A24811	РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 РУ № РЗН 2019/9341 от 06.12.2019

Оптические 96-луночные планшеты для ПЦР MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates	Thermo Fisher Scientific	N8010560	РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017
Пленки для 96-луночных планшетов MicroAmp® Clear Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	4306311	
Пробирки 0,2 мл для ПЦР	SSI	SSI-3220-00	РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 2-20 мкл, на 10—100 мкл; на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	Eppendorf	-	РУ ФСЗ 2011/11028
Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	SSI	-	РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любая	-	-
Анализатор иммунологический «Varioskan Flash»	Thermo Fisher Scientific	N06354	РУ № РЗН 2014/1842 от 08.08.2014
Набор реагентов Prep&Seq™ U-target IL library kit	ПАРСЕК ЛАБ	UTK-IL-96-1 UTK-IL-96-2 UTK-IL-96-3 UTK-IL-96-4	xxxxxx
Магнитный штатив	Thermo Fisher Scientific	12331D	-
Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл	Eppendorf	022431021	РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009
Пробирки LoBind™ объемом 2 мл	Eppendorf	022431048	
Пробирки типа Falcon 50 мл	Eppendorf	0030122178	
Этанол, медицинский	любой	-	-
Перчатки неопудренные	любые	-	-

1.8. ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ

Аналитом для Набора реагентов «VariFind™ CFTR solution» является геномная ДНК человека, выделенная из цельной крови (капиллярной или венозной), буккального эпителия или сухих пятен крови.

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.

Рекомендуется использование образцов крови, собранных в пробирки, покрытые микрокаплями антикоагулянта ЭДТА K2 (2-замещенная калиевая соль

этилендиаминтетрауксусной кислоты) или ЭДТА КЗ (3-замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). ЭДТА предотвращает свертывание крови путем связывания ионов кальция и не влияет на гематологические параметры.

При работе с биологическими образцами обязательно использовать индивидуальные средства защиты, в том числе перчатки, непромокаемые халаты, средства защиты лица и глаз (маски, очки, экраны).

При выделении ДНК из цельной крови рекомендуется использовать комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия), РУ №ФСР 2009/05220 от 18.05.2017 г.

При выделении ДНК из буккального эпителия или сухих пятен крови рекомендуется использовать набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала на основе спиртового осаждения «Экстра-ДНК-Био» (ООО «Алкор Био», Россия), РУ №ФСР 2012/13631 от 29.06.2012 г.

Для сбора, хранения и транспортировки сухих пятен крови рекомендуется использовать ДНК-Карты (ООО «Алкор Био», Россия), РУ №РЗН 2016/4615 от 23.08.2016 г.

Для сбора буккального эпителия рекомендуется использовать щетки 4N6FLOQSwabs Regular («Copan Flock Technologies», Италия), РУ №ФСЗ 2012/13327 от 04.12.2012 г. Для хранения и транспортировки образцов буккального эпителия использовать транспортный раствор (АО «Вектор-Бест», Россия), РУ №РЗН 2017/6004 от 24.07.2017 г.

Измерение концентрации рекомендуется проводить спектрофотометрически с использованием анализатора «Varioskan Flash» (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме Поглощения (Absorbance), РУ №РЗН 2014/1842 от 08.08.2014 г.

Минимальное количество ДНК для амплификации – 1 нг в 1-3 мкл для каждого пула. Работа может проводиться с входным количеством 1 или 10 нг ДНК.

При отсутствии ограничений в источнике ДНК рекомендуется использовать 10 нг материала.

1.9. 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.
- 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 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».

1.10. 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	
Гемоглобин	
Источник интерферента:	Компонент крови
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР
Содержание гемоглобина не должно превышать 1 мг/мл в реакции ПЦР. Более высокие концентрации ингибируют полимеразу.	
Билирубин	
Источник интерферента:	Компонент крови
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР
Содержание билирубина не должно превышать 2 мкг/мл в реакции ПЦР. Более высокие концентрации ингибируют полимеразу.	
Триглицериды	
Источник интерферента:	Компонент крови
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР
Содержание триглицеридов не должно превышать 1,28 мкг/мкл в реакции ПЦР. Более высокие концентрации ингибируют полимеразу	
Муцин	
Источник интерферента:	Компонент ротовой слюны
Стадия проявления потенциального интерферента:	ПЦР

Содержание муцина (слизи) не должно превышать 1 мкг/мкл в реакции ПЦР. Более высокие концентрации блокируют полимеризующую способность Taq-полимеразы.

Источники:

1. 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.
2. Waleed Abu Al-Soud. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. J Clin Microbiol. 2001 Feb; 39(2): 485–493.
3. Naoyuki Nishimura et al. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. Ann Clin Biochem 2000; 37: 674–680.
4. Waleed Abu Al-Soud et al. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of Helicobacter species. FEMS Immunology & Medical Microbiology, Volume 44, Issue 2, May 2005, Pages 177–182.

2. ПРОТОКОЛ

Для работы с «VariFind™ CFTR solution» необходимо использование Набора реагентов «Prep&Seq™ U-target IL library kit» (кат. № UTK-IL-96-1, UTK-IL-96-2, UTK-IL-96-3, UTK-IL-96-4) производства ООО «ПАРСЕК ЛАБ».

2.1. ТАРГЕТНОЕ ОБОГАЩЕНИЕ

Таргетное обогащение ДНК проводится в двух независимых реакциях для каждого образца с использованием **Пулов праймеров 1 (ПП1) и 2 (ПП2)** и **ПЦР смеси 1 (ПС1)** из Набора реагентов «Prep&Seq™ U-target IL library kit». Объем каждой из двух реакций составляет 10 мкл.

Перед началом работы:

- При необходимости осуществите предварительное разведение образцов.
- Достаньте Пулы праймеров 1 и 2 из морозильной камеры и выдержите при комнатной температуре 20 мин. Убедитесь, что реагенты полностью разморожены. После размораживания тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Поместите исследуемые образцы ДНК на комнатную температуру до полной разморозки. Тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Достаньте **ПЦР смесь 1 (ПС1)** из морозильной камеры, тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель. Оставьте реагент на -20°C перед внесением.

1. Установите программу таргетной амплификации на термоциклере.

Внимание: количество циклов ПЦР зависит от количества стартового материала.

Для 10 нг – 20 циклов, для 1 нг – 23 цикла.

Количество циклов	Температура	Время
1	95°C	15 мин
20-23	99°C	15 сек
	60°C	4 мин
1	4°C	Хранение ¹

2. Для проведения таргетного обогащения приготовьте два мастер-микса для каждого образца ДНК по следующему протоколу:

Компонент	Объем, мкл
ПС1	2
ПП1	5
Итого	7

и

Компонент	Объем, мкл
ПС1	2
ПП2	5
Итого	7

Рекомендуется готовить общий мастер-микс на несколько образцов.

- Тщательно перемешайте каждый мастер-микс на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме. Перенесите 7 мкл каждого мастер-микса в новые микроцентрифужные пробирки или лунки 96-луночного планшета и добавьте 3 мкл исследуемого образца ДНК в каждую пробирку или лунку.
- Перемешайте реакции на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме и поместите в амплификатор с созданной согласно п.1 программой.

¹ Ампликоны могут храниться 12 ч при 4°C. Для более длительного хранения поместите ампликоны на -20°C и храните до 1 месяца.

5. По завершению программы центрифугируйте реакции в импульсном режиме и объедините две 10 мкл реакции ПЦР от каждого образца в одну 20 мкл реакцию.
6. Выполните дальнейшие этапы пробоподготовки согласно инструкции UM_L-38ru Набор реагентов «PREP&SEQ™ U-TARGET IL LIBRARY KIT», начиная с этапа Отрезание праймеров с восстановлением концов.

2.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК

Приготовление библиотек после этапа таргетного обогащения включает следующие стадии:

- Отрезание праймеров с восстановлением концов;
- Лигирование адаптеров;
- Обогащение путем индексирующей ПЦР.

В ходе приготовления библиотек происходит две очистки – после этапа лигирования и после амплификации библиотек.

Все необходимые реагенты, включая индексы и магнитные частицы для очистки, входят в состав **Набор реагентов «PREP&SEQ™ U-TARGET IL LIBRARY KIT»**.

Полученные финальные библиотеки перед секвенированием необходимо спулировать в одну пробирку в концентрации 1400 нг/мкл.

2.3. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

- Секвенирование следует осуществлять на генетическом секвенаторе MiSeq с использованием одноразового **Комплекта для секвенирования**.
- При секвенировании следует устанавливать режим single-end прочтений: 300 циклов.
- При работе с оборудованием следует руководствоваться соответствующей эксплуатационной документацией.

Используемые варианты картриджей для разных вариантов комплектаций:

Набор для секвенирования	Число образцов	Вариант комплектации
MiSeq Reagent Kit v2 Nano	24	VF-CFTR-24
MiSeq Reagent Kit v2 Micro	96	VF-CFTR-96
MiSeq Reagent Kit v2	384	VF-CFTR-384

2.3.1. Денатурация пула библиотек

После приготовления библиотек и непосредственно перед секвенированием необходимо произвести денатурацию пула.

1. Начните разморозку картриджа для секвенирования и разморозьте Hyb buffer из **Комплекта для секвенирования**.
2. Приготовьте свежий 0,2М NaOH, объединив 80 мкл воды 1 типа и 20 мкл 1М NaOH. Полученный раствор представляет собой 1 мл 0,2М NaOH. Не храните 0,2М NaOH более 1 суток.
3. В 1,5 мл пробирке LoBind™ приготовьте следующую смесь для проведения денатурации:

Компонент	Объем, мкл
Пул библиотек	5
0,2М NaOH	5
Итого	10

4. Вortexируйте и центрифугируйте в импульсном режиме.
5. Инкубируйте смесь 5 минут при комнатной температуре.
6. К 10 мкл денатурированной библиотеки добавьте 990 мкл Hyb buffer.
7. Вortexируйте и центрифугируйте в импульсном режиме. Полученный раствор представляет собой 1000 мкл 20 пМ денатурированной библиотеки.
8. В картридж при секвенировании на приборе MiSeq загружается 600 мкл из 1000 мкл полученного раствора.

2.3.2. Запуск 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. Отработанная 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.

2.3.2.1. 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.

2.3.2.2. 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 картридж с реактивами на лед на срок до 6 часов или положите в холодильник с температурой от $+2$ до $+8$ °C до начала секвенирования.

2.3.2.3. 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 2.3.1. денатурированного пула библиотек. Не касайтесь колпачка из фольги.

2.3.2.4. Очистка ячейки

Наденьте новую пару неопудренных перчаток. Захватите проточную кювету за основание пластикового картриджа и извлеките ее из емкости. Слегка промойте проточную кювету

деионизованной водой до тех пор, пока стеклянный и пластиковый картриджи не будут тщательно отмыты от избытка солей. Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе. Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах визуализации.

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

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

2.3.2.5. Настройка запуска секвенирования

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

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

2.3.2.6. 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).

2.3.2.7. Загрузка раствора и проверка бутылки для сбора отходов

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

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

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

2.3.2.8. Загрузка картриджа с реактивами

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

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

2.3.2.9. Выбор sample sheet

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

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

1. Выберите Change Sample Sheet (Смена протокола анализа) на экране Load Reagents (Загрузка реактивов).
2. Выберите Browse (Обзор), чтобы переместиться к sample sheet.
3. Нажмите Open (Открыть).
4. Выберите Save and Continue (Сохранить и продолжить).
5. Нажмите Next (Далее).

2.3.2.10. 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).

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

2.3.2.11. Мониторинг секвенирования

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

Cluster Density (K/mm²) (Плотность кластеров, K/mm²). 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 послецикловой промывке.

3. АНАЛИЗ ДАННЫХ

3.1. АНАЛИЗ КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА

В состав Набора реагентов входит контрольный образец с известными вариантами в гене *CFTR*, установленными референсным методом (секвенирование по Сангеру). **Рекомендуется включать контрольный образец в каждую постановку.**

Контрольный образец представляет собой продукты LR-PCR гена *CFTR*. Для контроля качества запуска следует сравнить клинически значимые варианты, обнаруженные в контрольном образце с референсным генотипом (см. ниже). Если для контрольного образца показатели метрик не соответствуют установленным порогам (см. раздел Контроль качества), или по генотипу выявлено неполное совпадение, запуск признается непрошедшим контроль качества (в этом случае рекомендуется повторить постановку целиком).

Генотип контрольного образца в составе Набора реагентов (клинически значимые варианты):

Образец	Генотип
Контрольный образец (КО)	F508del/CFTRdele2,3

3.2. ИЗВЕСТНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Набор реагентов валидирован только для использования вместе с программным обеспечением VariFind™ CFTR Software.

- Метод не позволяет идентифицировать варианты в гомополимерах длиной более 15 п.н., и коротких tandemных повторах (STR) длиной более 10 повторов, за исключением повторов poly-T/TG в интроне 9;
- Метод не позволяет идентифицировать вставки и делеции длиной более 50 п.н.;
- Метод не предназначен для идентификации хромосомных перестроек и вариаций копииности (CNV), за исключением CFTRdele2,3;
- Метод не позволяет выявлять глубокие интронные варианты, за исключением канонических сайтов сплайсинга и вариантов, включенных в актуальную версию базы данных;
- Метод не предназначен для идентификации генетических вариантов у пациентов с полиплоидией и мозаицизмом;
- Метод не предназначен для идентификации «цис-»/«транс-» положения генетических вариантов, за исключением повторов poly-T/TG в интроне 9;
- В случае наличия в образце варианта в сайте посадки праймера возможно снижение амплификации соответствующей аллели, вплоть до полного выпадения;

- Метод не предназначен для генетического тестирования при пренатальной и преимплантационной генетической диагностике.

3.3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Все метрики качества данных рассчитываются и оцениваются в автоматическом режиме.

Число прочтений на образец: общее число прочтений по образцу, полученное в результате высокопроизводительного секвенирования. Показатель качества пробоподготовки.

Доля выровненных прочтений: доля прочтений, выровненных на целевые регионы генома. Показатель специфичности панели праймеров.

Покрытие целевых регионов: процентная доля целевого региона, покрытая достаточным количеством прочтений с обеих цепей ДНК. Основной показатель качества секвенирования образца.

Однородность покрытия: процентная доля позиций (баз) с покрытием не менее $0,2x$, где x - среднее покрытие по всем позициям целевых регионов панели. Показывает разброс по покрытию целевых регионов.

Корреляция с контрольным профилем: степень идентичности профилей покрытия между образцом и референсными значениями по панели, выраженная в процентах. Рассчитывается отдельно для каждого пула праймеров. Показывает робастность таргетного обогащения. Под контрольным профилем понимается среднее количество прочтений, выровненных на ампликон, характерное для конкретной панели при постановке по определенному протоколу.

Контаминированный образец: анализ, представляющий собой смесь ДНК неродственных индивидуумов (Подробнее см. раздел BID).

Установленные пороговые значения по метрикам качества представлены в таблице:

Показатель	Значение
Число прочтений на образец	$\geq 25\,000$ прочтений
Доля выровненных прочтений	$\geq 80\%$
Покрытие целевых регионов	$\geq 90\%$
Однородность покрытия	$\geq 90\%$
Корреляция с контрольным профилем по пулу 1	$\geq 80\%$

Корреляция с контрольным профилем по пулу 2

≥ 80%

Контаминация

Не обнаружено

При значении показателя ниже порогового и в случае обнаружения контаминации образцу будет присвоен соответствующий бейдж.

Для просмотра значений метрик контроля качества необходимо перейти к деталям анализа образца и нажать на кнопку **МЕТРИКИ КК** в правом верхнем углу окна.

3.4. АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ

Клиническая значимость вариантов установлена разработчиками VariFind™ CFTR solution в соответствии с критериями руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных путем массового параллельного секвенирования².

Согласно критериям, варианту нуклеотидной последовательности может быть присвоена одна и следующих характеристик:

Характеристика	Сокращение	Обозначение
Патогенный (pathogenic)	Патогенный	

² Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика 2019; 18(2): 3-23

Вероятно патогенный (likely pathogenic)	Вероятно пат.	
Неопределенного значения (uncertain significance)	Неопределенный	
Вероятно доброкачественный (likely benign)	Вероятно добр.	
Доброкачественный (benign)	Доброкачественный	

Для аннотации обнаруженных неаннотированных вариантов необходимо обратиться в службу поддержки ООО «ПАРСЕК ЛАБ». Для этого необходимо перейти на вкладку Варианты, нажать на иконку меню дополнительных действий и выбрать пункт «Отправить на аннотацию».



Вариант, аннотированный как патогенный или вероятно патогенный, будет добавлен в список клинически значимых вариантов.

3.5. ВНЕШНИЕ ИСТОЧНИКИ АННОТАЦИИ

В качестве внешних источников даны ссылки на базы данных, которые могут быть использованы для поиска дополнительной информации о варианте:

База данных	Описание
CFTR1 http://genet.sickkids.on.ca	Локус-специфичная база данных генетических вариантов в гене CFTR. Аннотация включает информацию о фенотипе пациента, у которого был обнаружен вариант.
CFTR2 https://cftr2.org	Локус-специфичная база данных генетических вариантов в гене CFTR.

	Аннотация включает информацию о клинической значимости и клинических проявлениях варианта или комбинации вариантов.
med-gen (LOVD) http://seqdb.med-gen.ru	Локус-специфичная база данных генетических вариантов в гене CFTR. Аннотация включает информацию о клинической значимости и частоте вариантов в Российской популяции. Ресурс рекомендован для интерпретации вариантов в гене CFTR Национальным консенсусом «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» (2019).
gnomAD https://gnomad.broadinstitute.org	Популяционная база данных. Аннотация содержит информацию о частоте генетических вариантов в общей популяции.
rare_variants	Популяционная база данных ПО VariFind™ CFTR software. Перечень редких генетических вариантов в соответствии с критериями руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека³.
ClinVar https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar	Общая база данных генетических вариантов в геноме человека. Аннотация включает информацию о клинической значимости генетических вариантов, предоставленную научным и клиническим сообществом.
dbSNP https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	Общая база данных генетических вариантов в геноме человека. Перечень генетических вариантов, изначально идентифицированных в рамках проекта «1000 геномов», и пополняемый научным сообществом по результатам других геномных проектов.
CFTR-France	Локус-специфичная база данных генетических вариантов в гене CFTR. БД содержит данные, необходимые для аннотации варианта по критериям руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека³.
Russian_CF_Register	Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации.

³ Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика 2019; 18(2): 3-23.

	В Регистр включены данные 81 региона-субъекта Российской Федерации. Представлено обобщение данных о пациентах с МВ по федеральным округам.
SeqDB	База данных ПО VariFind™ CFTR software. Содержит аннотации вариантов в соответствии с критериями руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека ³ .

3.6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку муковисцидоз является аутосомно-рецессивным заболеванием, для его проявления требуется наличие в генотипе двух клинически значимых вариантов (гомозигота или компаундная гетерозигота). Для определения цис-/транс-положения обнаруженных клинически значимых вариантов рекомендуется подтверждение их носительства у родителей пациента.

Наличие клинически значимого варианта на одной из двух гомологичных хромосом свидетельствует о носительстве заболевания, что создает риск рождения больного ребенка.

При отсутствии клинически значимых вариантов у пациентов с клинической картиной муковисцидоза, рекомендуется проведение дальнейших обследований пациента, направленных на поиск CNV.

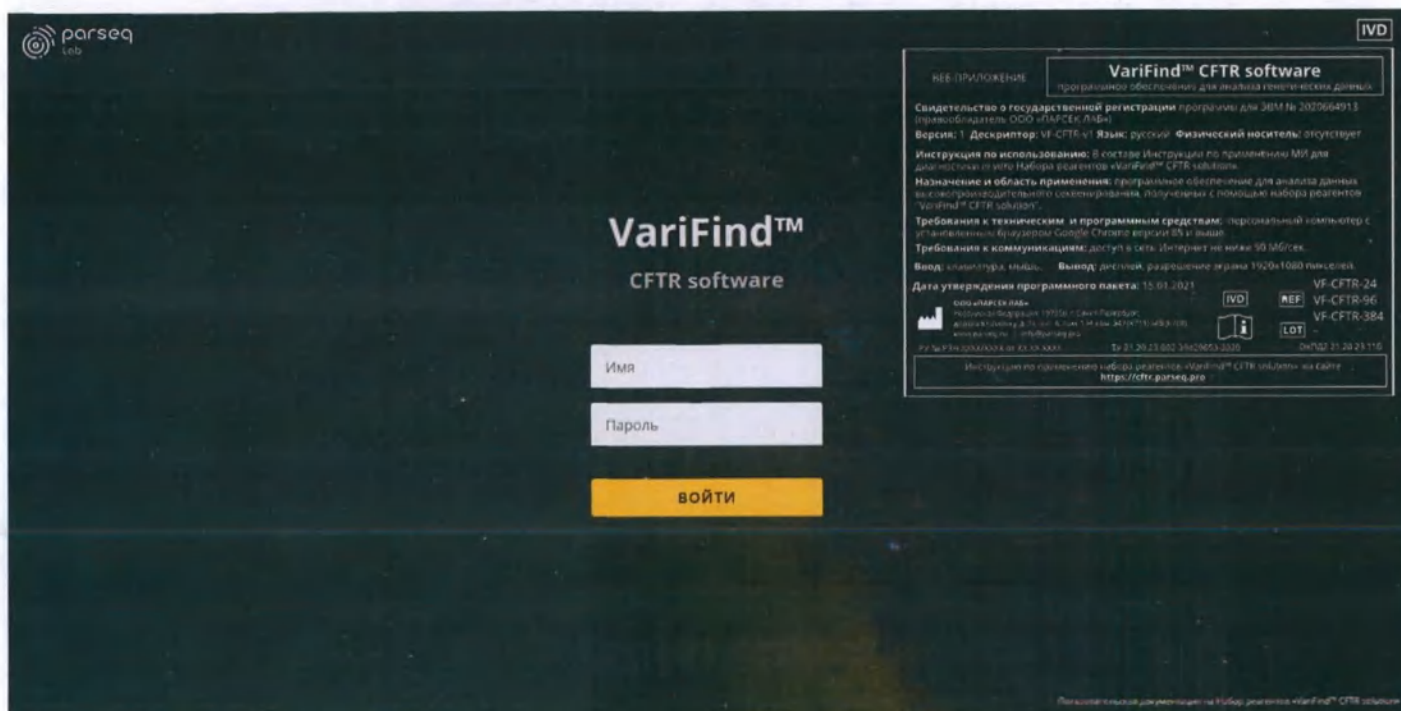
Клинически значимые варианты проаннотированы в ПО. В случае обнаружения неаннотированных вариантов необходимо отправить вариант на аннотацию (*подробнее см. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ*).

4. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

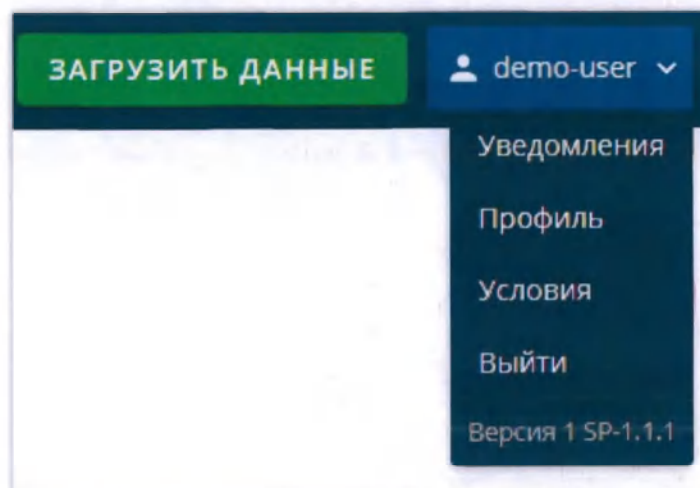
Программное обеспечение «VariFind™ CFTR software» версия 1 (далее ПО) предназначено для анализа данных высокопроизводительного секвенирования, полученных с помощью набора реагентов для качественного определения клинически значимых вариантов гена *CFTR* VariFind™ CFTR Solution (производства ООО «ПАРСЕК ЛАБ»).

ПО обладает следующими функциональными возможностями:

- импорт “сырых” прочтений результатов секвенирования и метаданных;
- выравнивание прочтений на референсный геном человека GRCh38;
- контроль качества полученных данных;
- определение точечных герминативных генетических вариантов в целевых регионах гена *CFTR*;
- определение вариации копийности *CFTR*dele2,3 в гене *CFTR*;
- определение вариаций коротких tandemных повторов poly-T/TG в гене *CFTR*;
- дискриминация контаминированных и не контаминированных образцов;
- определение пола;
- визуализация результатов генотипирования;
- сортировка и фильтрация данных для формирования отчетов;
- экспорт результатов в различных форматах.



Актуальная версия программного обеспечения «VariFind™ CFTR software» указана в меню пользователя:



4.1. РЕКОМЕНДОВАННЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Скорость соединения не менее 50 Мбит/с;
- Браузер Google Chrome версии 85 и выше;
- Разрешение экрана – 1920x1080 пикселей.

4.2. ДОСТУП К ПО

Программное обеспечение «VariFind™ CFTR software» версия 1 используется исключительно в составе Набора реагентов «VariFind™ CFTR solution» для качественного

определения клинически значимых вариантов гена *CFTR* с целью диагностики или скрининга носительства муковисцидоза (производства ООО «ПАРСЕК ЛАБ»).

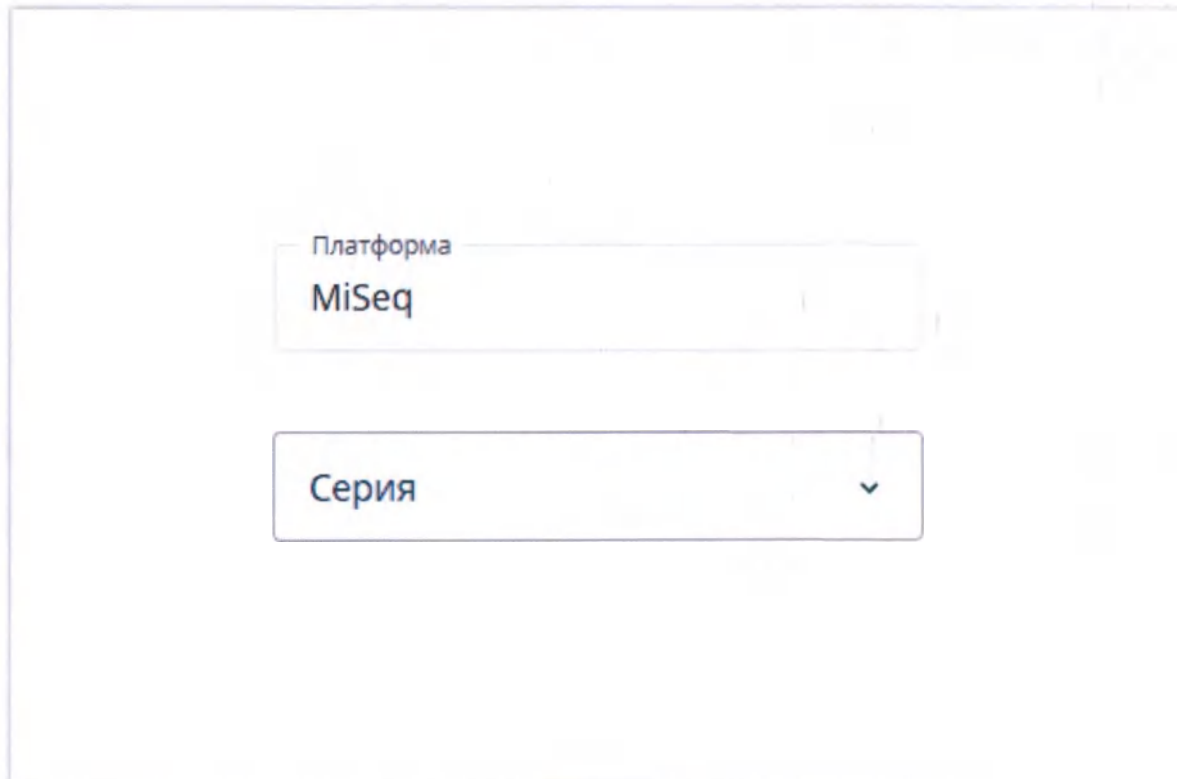
Доступ к программному обеспечению осуществляется путем авторизации на сайте <https://cftr.parseq.pro> после принятия лицензионного соглашения. Учетные данные пользователя указываются в сопроводительных документах к договору на поставку Набора реагентов.

4.3. ИМПОРТ ДАННЫХ

Для перехода на страницу импорта данных требуется нажать кнопку ЗАГРУЗИТЬ ДАННЫЕ в правом верхнем углу экрана, на панели инструментов. Импорт данных включает 4 этапа: выбор серии реагентов, заполнение метаданных, добавление образцов и загрузку. До момента начала загрузки введенная информация не сохраняется.

4.3.1. Выбор серии реагентов

На первом этапе указывается серия Набора реагентов, использованного для подготовки образцов из запуска. Серия указана на боковой этикетке комплекта реагентов. Комбинирование библиотек, приготовленных с помощью разных серий, в одном запуске не допускается.



Платформа
MiSeq

Серия ▼

Нажатие на кнопку ВПЕРЕД приведет к переходу на следующий шаг.

4.3.2. Заполнение метаданных

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

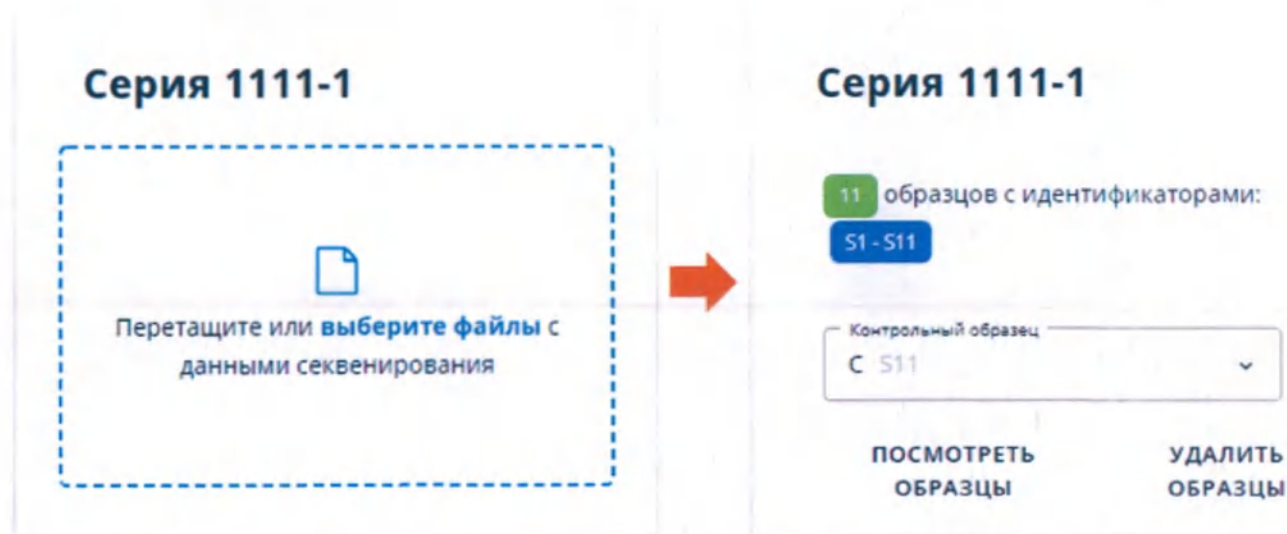


ID запуска	YCHVS
Набор для секвенирования	MiSeq Reagent Kit v2 ▼
Циклы	300
Дата запуска	13.01.2021 📅

Нажатие на кнопку ВПЕРЕД приведет к переходу на следующий шаг.

4.3.3. Добавление образцов

Далее необходимо добавить образцы. Это можно сделать с помощью перетаскивания файлов или с помощью файлового менеджера браузера.



После добавления количество образцов и их идентификаторы отображаются на карточке. Для просмотра образцов и файлов, готовых к импорту, требуется нажать кнопку ПРОСМОТРЕТЬ ОБРАЗЦЫ. Для указания контрольного образца требуется установить курсор и нажать на поле КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ.

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

4.3.4. Загрузка

На последнем шаге рекомендуется проверить все введенные данные и начать загрузку, нажав на соответствующую кнопку. После чего на экране будет отображен индикатор процесса загрузки образцов.

Платформа

MiSeq

ID запуска

YCHVS

Набор для секвенирования

MiSeq Reagent Kit v2

Циклы

300

Дата запуска

13.01.2021

Серия 1111-1

11 образцов с идентификаторами:

S1-S11

Контрольный образец: S11

НАЗАД

НАЧАТЬ ЗАГРУЗКУ

В процессе импорта образцов соответствующее окно браузера должно быть открытым до полного завершения импорта. В случае успешного завершения импорта на экране будет выведено сообщение об успешном окончании загрузки, либо сообщение об ошибке при импорте образцов.

4.4. ЗАПУСКИ

В разделе «ЗАПУСКИ» пользователю доступен список всех запусков, представленных в виде карточек. На карточке указано имя запуска, дата постановки, набор для секвенирования, версия алгоритма анализа данных и серия набора, использованного для подготовки образцов.

Запуски с образцами в процессе анализа имеют соответствующий бейдж, посмотреть их результаты возможно после завершения анализа всех образцов.

Для поиска по идентификатору запуска требуется установить курсор в поле ИМЯ ЗАПУСКА и ввести идентификатор искомого запуска.

Для поиска запусков по датам требуется нажать на стрелку вниз в поле ИМЯ ЗАПУСКА, указать желаемые даты и нажать ПОИСК.

Имя запуска



ABCD1 MiSeq Reagent Kit v2 300 cftr-pipeline-1-SP-1.0-1 5021-1 01.02.2021

ABCD2 MiSeq Reagent Kit v2 300 cftr-pipeline-1-SP-1.0-1 5021-1 01.02.2021

ABCD3 MiSeq Reagent Kit v2 300 cftr-pipeline-1-SP-1.0-1 5021-1 01.02.2021

ABCD4 MiSeq Reagent Kit v2 300 cftr-pipeline-1-SP-1.0-1 5021-1 01.02.2021

↑
Имя запуска **Набор реагентов и количество циклов** **Версия и SP алгоритма** **Серия** **Дата секвенирования**

Для просмотра результатов запуска требуется нажать на его карточку.

Экран, открывшийся после выбора запуска, предоставляет информацию о клинически значимых вариантах и метриках контроля качества в красной зоне в образцах запуска. Экран просмотра запуска дает возможность фильтровать образцы по вариантам, искать образцы и переходить к экрану деталей анализа образца.

Имя и дата запуска	Набор реагентов и количество циклов	Версия и SP алгоритма				
ABCD2 01.02.2021	MiSeq Reagent Kit v2 300	cftr-pipeline-1-SP-1.0-1	Количество клин. вариантов	11	1	0
CONTROL						
11111	S1	V232D	G551S			
11112	S2	G551S	V232D			
11113	S3	G551S	V232D			
11114	S4	V232D	G551S			
11115	S5	V232D	G551S			
11116	S6	G551S	V232D			
11117	S7	G551S	V232D			
11118	S8	V232D	G551S			
11119	S9	G551S	V232D			
11120	S10	G551S	V232D			

↑
Бейджи контроля качества **Имя образца** **Номер образца в запуске** **Клинически значимые варианты** **Пользовательские бейджи**

Статистика по образцам отображает частоты клинически значимых вариантов в запуске.

4.5. АНАЛИЗЫ

Приложение предназначено для просмотра и поиска интересных анализов образцов. Для каждого образца приведено название, ID в запуске и пользовательские бейджи и бейджи контроля качества.

Имя запуска	Набор реагентов и количество циклов		Версия и SP алгоритма	Серия	Дата секвенирования
ABCD2	MiSeq Reagent Kit v2 300 flows		cftr-pipeline-1-SP-1.0-1	5021-1	01.02.2021
11111	S1	Важно Новый вариант			
11112	S2	Важно			
11113	S3				
11114	S4				
11115	S5	Важно			
11116	S6				
11117	S7				
11118	S8				
11119	S9				
11120	S10	Важно Новый вариант			
CONTROL	S11				

Имя образца: CONTROL
 Номер образца в запуске: S11
 Пользовательские бейджи: Важно, Новый вариант
 Бейдж контроля качества: Конформация

4.6. ДЕТАЛИ АНАЛИЗА ОБРАЗЦА

После выбора интересующего образца будет открыто окно для детального изучения информации о его анализе. Окно анализа образца состоит из экранов «Варианты», «Клин. варианты», «Анализ покрытия» и «BIDs».

На верхней панели окна деталей анализа отображается общая информация об образце:

- Имя запуска.
- Дата секвенирования.
- Имя образца.
- Версия алгоритма анализа данных.
- Серия набора реагентов.
- Бейджи контроля качества.
- Пользовательские бейджи.

При нажатии на кнопку **МЕТРИКИ КК** доступны значения метрик контроля качества (*подробнее см. раздел КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА*).

Кнопка **ФАЙЛЫ** на верхней панели окна деталей анализа образца дает доступ к следующим файлам:

- Выравнивание (.bam) и его индекс (.bai).
- Варианты (.vcf).
- Регионы с низким качеством (.bed).
- Покрытие ампликонов (.tsv).
- Статистики профиля покрытия (.json).

4.6.1. Варианты

Все варианты, обнаруженные в пределах целевых регионов, представлены на экране просмотра вариантов. Экран «Варианты» можно использовать для расширенного анализа образца в исследовательских целях.

Визуально экран «Варианты» аналогичен экрану «Клин. варианты» и представляет таблицу:

- Меню дополнительных действий (*См. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ и Визуализация прочтений в геномном браузере IGV*).
- Клиническая значимость (*См. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ*).
- Генотип — дает информацию о зиготности (гомозигота/гетерозигота).

Генотип	Бейдж
Гомозигота	
Гетерозигота	

- Тривиальное название — общеизвестное, исторически сложившееся наименование генетического варианта.
- Название согласно номенклатуре HGVS⁴. Представлено относительно генома (gDNA), транскрипта (cDNA) и белка.
- Внешние источники (см. раздел **ВНЕШНИЕ ИСТОЧНИКИ АННОТАЦИИ**).

The screenshot displays the Parseq Lab interface with the following elements:

- Top Bar:** Includes fields for 'Имя и дата запуска' (Run name and date), 'Имя образца' (Sample name), 'Версия и SP алгоритма' (Version and SP algorithm), and 'Серия' (Series).
- Navigation:** Tabs for 'Варианты' (Variants), 'Клин. варианты' (Clinical variants), 'v2', 'Анализ покрытия' (Coverage analysis), and 'BIOs'.
- Filters:** A sidebar on the left allows filtering by 'Генотип' (Genotype) with checkboxes for 'Гетерозигота' and 'Гомозигота', and 'Клин. значимость' (Clinical significance) with color-coded circles for 'Патогенный', 'Вероятно пат.', 'Доброкачественный', 'Неизвестно', 'Неопределенный', and 'Вероятно добр.'.
- Table:** A central table lists variants with columns for 'Генотип', 'Тривиальное имя' (Trivial name), 'gDNA', and 'Внешние источники' (External sources).
- Annotations:** Red arrows point to 'Меню дополнительных действий' (Additional actions menu) and 'Клиническая значимость' (Clinical significance) in the table headers.

В рамках экрана доступна фильтрация по генотипу и клинической значимости, а также поиск по тривиальной номенклатуре и HGVS.

4.6.2. Клин. варианты

Экран содержит информацию о всех клинически значимых вариантах, определяемых при помощи набора VariFind™ CFTR solution. Варианты представляются в виде таблицы со следующими колонками:

⁴ <http://www.hgvs.org/mutnomen>

- Меню дополнительный действий (См. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ и Визуализация прочтений в геномном браузере IGV).
- Клиническая значимость (См. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ).
- Генотип — дает информацию о наличии или отсутствии варианта, а также о зиготности (гомозигота/гетерозигота/вариант не определен/вариант отсутствует).

Генотип	Бейдж
Гомозигота	
Гетерозигота	
Вариант не определен	
Вариант отсутствует	

- Тривиальное название — название замены, принятое во врачебном сообществе.
- Название согласно номенклатуре HGVS⁵. Представлено относительно генома (gDNA), транскрипта (cDNA) и белка.
- Внешние источники (см. раздел ВНЕШНИЕ ИСТОЧНИКИ АННОТАЦИИ).

Имя и дата запуска: **AVC02** 01.02.2021

Имя образца: **11111** 51

Версия и SP алгоритма: **cftr-pipeline-1-SP-1.0-1**

Серия: **30211**

Пользовательский бейдж: **Вариант** +

МЕТРИКИ КК | ФАЙЛЫ

Варианты: **Клин. варианты v2** | Анализ покрытия | BIOs

Генотип:

- ☒ Гетерозигота (2)
- ☐ Гомозигота (3)
- ☒ Не определен (4)
- ☐ Вариант отсутствует (100%)

Тривиальное имя: **V232D** | **G551S**

gDNA: **g.117535363T>A** (c.499T>A) p.(G551S) | **g.117587805G>A** (p.1821G>A) p.(G551S)

Внешние источники: **NCBI** | **Ensembl** | **UniProt**

HGVS: **g.117535363T>A**

☐ Только редкие варианты

СБРОСИТЬ ФИЛЬТРЫ

Меню дополнительных действий | Клиническая значимость

ОТЧЕТ

⁵ <http://www.hgvs.org/mutnomen>

Для удобства анализа обнаруженных клинически значимых вариантов предоставлена возможность фильтровать по генотипу и искать интересующий вариант по тривиальному названию и названию в номенклатуре HGVS. По умолчанию показаны только найденные в образце варианты и варианты в регионах с низким качеством. Для просмотра отсутствующих в образце вариантов необходимо снять фильтр «Вариант отсутствует».

4.6.3. Визуализация прочтений в геномном браузере IGV

Для доступа к геномному браузеру IGV, находясь на экране Варианты, Клини. варианты или Анализ покрытия, требуется нажать на иконку меню дополнительных действий и выбрать пункт «Посмотреть в IGV».

The screenshot shows the 'Варианты' (Variants) tab in the Parseq web interface. On the left, there are filters for 'Генотип' (Genotype) with options for 'Гетерозигота' (Heterozygote) and 'Гомозигота' (Homozygote), and 'Клини. значимость' (Clinical significance) with a color-coded legend. The main table lists variants with columns for 'Генотип', 'Тривиальное имя' (Trivial name), and 'gDNA'. A red arrow points to the 'More actions' icon (three dots) in the top right of the table header area.

The screenshot shows the IGV (Integrative Genomics Viewer) interface. The top header includes navigation buttons: 'Предыдущий вариант' (Previous variant), 'Клини. значимость' (Clinical significance), 'Ген' (Gene), 'Генотип' (Genotype), 'Вариант' (Variant), 'Название варианта в HGVS' (Variant name in HGVS), and 'Следующий вариант' (Next variant). The main area displays a genomic track for chr7:117,262,628-117,262,660. The track shows coordinates, reference sequence, coverage, and reads. The variant W1282X is highlighted, and its HGVS name is shown as g.117120149A>G c.123A>G p.T23Ter.

4.6.4. Анализ покрытия

Покрытие – это соотношение между числом прочтений, выровненных на ампликон, и числом прочтений, выровненных на все ампликоны панели. Каждый ампликон имеет специфическое покрытие, которое определяется эффективностью таргетного обогащения. Во время анализа данных секвенирования программное обеспечение вычисляет степень идентичности между покрытием ампликонов образцов запуска и средним покрытием ампликонов для решения (коэффициент детерминации). Отклонения этих параметров могут свидетельствовать об отклонениях от протокола на этапе таргетного обогащения.

Оценить покрытие можно на отдельном экране приложения. Информация по покрытию ампликонов приведена в таблице с возможностью фильтрации по хромосомам, координате, длине, пулу, количеству прочтений.

Имя и дата запуска: ABC02 01.02.2021
Имя образца: 11111 S1
Версия и SP алгоритма: chr-pipeline-1-SP-1.0-1
Серия: 0001-A
Пользовательский бейдж: [иконка]

Варианты: Клини. варианты v2 - Анализ покрытия BIDs

Метрики: КК файлы

ID ампликона	Пул	Координаты	Длина	Регион	Прочтения	SB
7162509462	1	chr1:18722630-18722936	306	exon	1105	-0.0769
7161217589	1	chr2:228992279-228992569	290	exon	702	0.0396
7162509467	1	chr5:2447959-2448225	266	exon	1305	-0.0731
7157202284	1	chr7:117119813-117120074	261	5'UTR	394	0.0088
7155413409	2	chr7:117120063-117120281	218	exon-1	1357	0.0525
7159435337	1	chr7:117138219-117138520	301	intron-1	1504	0.0531
7160470638	2	chr7:117143951-117144250	299	intron-1	839	0.1053
7154894555	1	chr7:117144225-117144511	286	exon-2	524	0.1778
7160470639	2	chr7:117148764-117149037	273	intron-2	908	-0.1409
7154894546	1	chr7:117149003-117149294	291	exon-3	923	0.1317
7156511513	2	chr7:117159231-117159526	295	intron-3	655	0.0557
7154894540	1	chr7:117170756-117170978	222	intron-3-exon-4	970	-0.0286

Меню дополнительных действий

Strand Bias

4.6.5. BIDs

Биологические идентификаторы (BID) — это дополнительные 13 пар праймеров в панели, специфичные к высокополиморфным участкам генома. Биологические образцы (за исключением монозиготных близнецов и близких родственников) имеют уникальные гаплотипы по данным регионам, что позволяет осуществлять контроль качества путем определения пола образца и контаминации, а также уникальную природу каждого образца в запуске секвенирования (гаплотип по биологическим идентификаторам).



Координаты BID локусов (относительно референсного генома человека GRCh38):

#	Хромосома	Старт	Стоп	Название
1	chr1	18396141	18396396	BID1_001
2	chr10	13881982	13882248	BID1_002
3	chr11	99414595	99414855	BID1_003
4	chr13	53595113	53595363	BID1_004
5	chr16	81504637	81504901	BID1_005
6	chr18	75862676	75862925	BID2_001
7	chr19	22506576	22506785	BID2_002
8	chr2	227227570	227227825	BID2_003
9	chr21	42835717	42835989	BID2_004
10	chr5	2444204	2444466	BID2_005
11	chrY	2971204	2971395	BID1_006
12	chrY	15368468	15368713	BID2_006
13	chrY	21494245	21494503	BID2_007

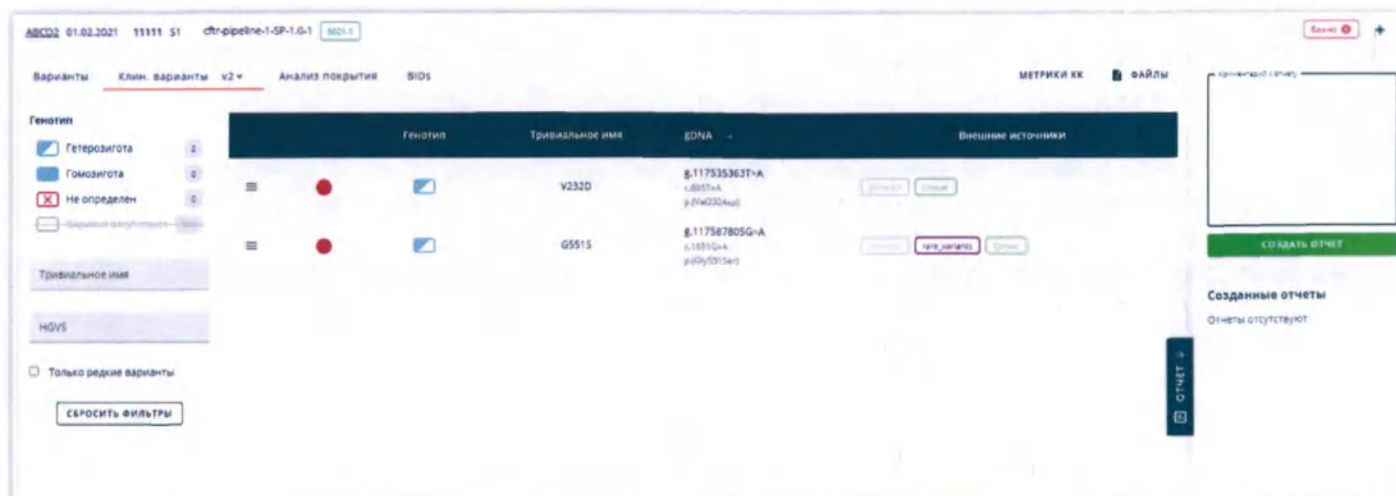
4.7. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

В случае возникновения общих вопросов и вопросов, связанных с работой ПО следует обратиться в службу технической поддержки производителя через сайт:

<https://support.parseq.pro/>.

5. ФОРМАТ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ

Для получения отчета необходимо перейти к деталям анализа образца. Нажмите на кнопку ОТЧЕТ для открытия окна создания отчета. Возможно добавить комментарий к отчету и создать отчет, нажав на соответствующую кнопку. Отчет предоставляется в формате PDF.



Генотип	Тривиальное имя	EDNA	Внешние источники
V232D	G117535363T-A c.695T>A p.(N623DAsp)	Ссылка	Ссылка
G551S	G117547805G-A c.1651G>A p.(Dy101Ser)	Ссылка	Ссылка

Отчет по генетическому тестированию содержит 10 разделов:

- ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ
- КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
- ОПРЕДЕЛЕННЫЙ ПОЛ
- ОБНАРУЖЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВАРИАНТЫ
- КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВАРИАНТЫ С НЕОПРЕДЕЛЕННЫМ ГЕНОТИПОМ
- ОТСУТСТВУЮЩИЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВАРИАНТЫ
- ПРОЧИЕ ОБНАРУЖЕННЫЕ ВАРИАНТЫ
- КОММЕНТАРИЙ
- ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА
- ОТКАЗ ОТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

Пример отчета по образцу:

Отчёт по генетическому тестированию	Набор реагентов «VariFind™ CFTR solution»	Отчет создан: 18.02.2021, 13:31:38	1/4
-------------------------------------	---	---------------------------------------	-----

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



Отчёт по генетическому тестированию

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тест-система	Набор реагентов «VariFind™ CFTR solution»
Метод анализа	Высокопроизводительное секвенирование
Платформа	Illumina MiSeq System
Референсный геном	GRCh38
Анализируемые гены	CFTR (транскрипт NM_000492.3)
Ассоциированные заболевания	Муковисцидоз (МКБ-11 – CA25; тип наследования - аутосомно-рецессивный)

Образец	111
Серия	0120-1
Дата секвенирования	01.01.2020
Имя запуска	ABCDE
Идентификатор образца в запуске	S1
Пользователь	Симакова Тамара
Дата анализа	03.01.2020
БД клинически значимых вариантов	SeqDB CFTR 1
Алгоритм	cftr-pipeline-1.0-1
Программное обеспечение	VariFind™ CFTR software версия 1 (SP 1.0.0)

Отчёт по генетическому тестированию	Набор реагентов «VariFind™ CFTR solution»	Отчет создан: 18.02.2021, 13:31:38	2/4
-------------------------------------	---	---------------------------------------	-----

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Показатель	Значение	Результат
Число прочтений на образец	32651	Пройден
Доля выровненных прочтений	93%	Пройден
Покрывание целевых регионов	91%	Пройден
Однородность покрытия	95%	Пройден
Корреляция с контрольным профилем (пул 1)	89%	Пройден
Корреляция с контрольным профилем (пул 2)	98%	Пройден
Контаминация	Не обнаружено	Пройден

ОПРЕДЕЛЕННЫЙ ПОЛ

Женский

ОБНАРУЖЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВАРИАНТЫ

Вариант	HGVS (по кДНК)	HGVS (по белку)	Генотип	Клин. значимость
N505H	c.1513A>C	p.Asn505His	Гетерозигота	Патогенный
G480S	c.1438G>A	p.Gly480Ser	Гетерозигота	Патогенный

КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВАРИАНТЫ С НЕОПРЕДЕЛЕННЫМ ГЕНОТИПОМ

Не обнаружено

ОТСУТСТВУЮЩИЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВАРИАНТЫ

1078delT, 10TG7T, 10TG9T, 11TG5T, 11TG9T, 1248+1G>A, 1259insA, 12TG5T, 12TG7T, 1342-2A>C, 1342-3C>G, 1367del5, 13TG5T, 1525-1G>A, 1660delG, 1677delTA, 1716+1G>A, 1717-1G>A, 175delC, 1811+1, 1812-1G>C, 185+1G>T, 1898+1G>A, 1898+1G>C, 1898+73T>G, 2043delG, 2118del4, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2185insC, 2721del11, 2789+5G>A, 2790-2A>G, 296+1G>T, 3041-15T>G, 3120+1G>A, 3125delA, 3272-11A>G, 3272-16T>A, 3272-26A>G, 359insT, 3659delC, 3667ins4, 3791delC, 3821delT, 3849+10kbC>T, 3849G>A, 3944delGT, 394delTT, 4005+1G>T, 4015delA, 4016insT, 4040delA, 406-1G>A, 4095+1G>T, 4374+1G>A, 4382delA, 4428insGA, 541del4, 574delA, 604insA, 621+1G>T, 621+3A>G, 624delT, 663delT, 681delC, 6kbA>G, 712-1G>T, 9TG9T, A141D, A455E, A96E, CFTRdele2, 3, D110H, D1152H, D443EfsX19, D537TfsX3, D572N, D579Y, D58EfsX32, D806G,

Отчёт по генетическому тестированию	Набор реагентов «VariFind™ CFTR solution»	Отчет создан: 18.02.2021, 13:31:38	3/4
-------------------------------------	---	---------------------------------------	-----

D993A, E1104X, E1433G, E403D, E407NfsX35, E528RfsX40, E831DfsX13, E831X, E92A, E92K, E92X, F1052V, F1078I, F1286S, F508del, G1069R, G1249E, G1298EfsX30, G178R, G194R, G27X, G461E, G480S, G509D, G509R, G509V, G542X, G551D, G576A, G85E, G970D, H199Y, I1109SfsX12, I1234V, I1328K, I506T, I556V, I807M, IVS12+2T>C, IVS13+2T>C, IVS13-877G>T, IVS13-883A>G, IVS15+1G>A, IVS19-313A>T, IVS22-1304C>G, IVS24-2A>G, IVS24-4522A>G, IVS6+2T>A, IVS7+2T>G, IVS8-1110delGAAT, IVS8-1111A>C, K1468N, K598X, K598ins, K710X, L1335P, L218X, L233F, L24X, L568F, L570RfsX17, L581X, L732X, L812X, L88FfsX21, L997F, M952I, N1303K, N505H, P205S, P205T, P988R, Q1038X, Q1412X, Q1476X, Q151RfsX2, Q290X, Q359K, Q39X, Q493R, Q720X, Q98R, R1066C, R1066H, R1070W, R1102X, R1158X, R1162X, R117C, R117H, R153I, R334W, R347H, R347P, R553X, R709X, R75X, R785X, R792X, R851X, S1159F, S1159P, S118LfsX6, S1196X, S1255P, S1455X, S466X, S549N, S549R, S737F, S945L, T1036N, T360K, T388M, T421IfsX21, T604I, V392G, W1063X, W1282R, W1282X, W1310X, W1310_Q1313del, W19G, W277R, W277X, W361X, W401X, W496X, W57G, W882X, Y1092H, Y362X, Y569D, Y569H, Y84X

ПРОЧИЕ ОБНАРУЖЕННЫЕ ВАРИАНТЫ

Не обнаружено

КОММЕНТАРИЙ

Отчёт по генетическому
тестированию

Набор реагентов «VariFind™
CFTR solution»

Отчет создан:
18.02.2021, 13:31:38

4/4

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Метод не позволяет идентифицировать варианты в гомополимерах длиной более 15 п.н., и коротких tandemных повторах (STR) длиной более 10 повторов;
- Метод не позволяет идентифицировать вставки и делеции длиной более 50 п.н.;
- Метод не предназначен для идентификации хромосомных перестроек и вариаций копийности (CNV), за исключением CFTRdele2,3
- Метод не позволяет выявлять глубокие интронные варианты, за исключением канонических сайтов сплайсинга и вариантов, включенных в актуальную версию базы данных;
- Метод не предназначен для идентификации генетических вариантов у пациентов с полиплоидией и мозаицизмом;
- Метод не предназначен для идентификации «цис-»/«транс-» положения генетических вариантов, за исключением повторов poly-T/TG в интроне 9;
- В случае наличия в образце варианта в сайте посадки праймера, возможно снижение амплификации соответствующей аллели, вплоть до полного выпадения;
- Метод не предназначен для генетического тестирования при пренатальной и предимплантационной генетической диагностики.

ОТКАЗ ОТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

- Результаты генетического тестирования должны интерпретироваться исключительно в контексте клинической картины пациента и/или семейного анамнеза;
- Для подтверждения «транс-» положения обнаруженных клинически значимых генетических вариантов рекомендуется установление статуса носительства у каждого из родителей;
- Тестирование носительства наследственного заболевания должно сопровождаться генетическим консультированием, чтобы разъяснить пациенту потенциально важные последствия для него и других членов его семьи.

ТУ 21.20.23-002-39429653-2020

6. 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.
- 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.
- Наборы, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
- Набор реагентов рассчитан на однократное применение после вскрытия без возможности повторных заморозок-разморозок и дробных постановок.
- Набор реагентов стабилен после вскрытия в течение постановки.
- Срок годности Набора реагентов 9 месяцев⁶.

7. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Гарантийный срок годности 9 месяцев со дня приемки изделия отделом технологического контроля.
- Рекламации могут быть направлены в письменном виде на почтовый адрес производителя либо по электронной почте.

8. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

- При утилизации отходов необходимо руководствоваться требованиями СанПиН 2.1.3684-21.
- Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

⁶ Стабильность изделия подтверждена данными исследования стабильности в режиме реального времени.

- После истечения срока годности пробирки с реагентами и картонные пачки утилизируются как отходы класса А (эпидемиологически безопасные).

9. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Parseq Lab Co. Ltd.

ИНН 7816584473, ОГРН 1147847123797

Почтовый и фактический адрес:

197350, Россия, г. Санкт-Петербург, дорога в Каменку, д. 74, лит. А,
помещение 1-Н, комната 347 (K711) 348 (K708)

E-mail: info@parseq.pro

Телефон: +7 812 243 1190

Web-сайт: www.parseq.ru

Поддержка клиентов в сети Интернет – <https://support.parseq.pro/>.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 51
(пятьдесят один) листа (ов).

Должность, ФИО ген. директор
Гаврилов А.В.

(подпись) _____

« 08 » сентября 2021 г.

