



HERMANS & SCHUTTEVAER
NOTARISSEN ADVISEURS

Ref: DU/RGE (March 02th, 2023)

Dos: 2023.0035.20

LEGALIZATION

Seen for legalization by me, Ingeborg Marguerithe Duyverman, civil law notary, practicing in Utrecht, the Netherlands, the signature of the Wietse Mulder, acting in the capacity of managing director of the private company with limited liability: Genome Diagnostics B.V., incorporated under the laws of the Netherlands, having its corporate seat in Utrecht, business address: Yalelaan 48, 3584 CM Utrecht, listed with the Trade Register of the Dutch Chamber of Commerce with number: 30202468, the latter company hereinafter referred to as: the Company.

1. This legalization is related to the signature on the attached documents well as to the authority of the signatory.
2. The attachment was done by a standard procedure. Furthermore every single page is provided with a legal notary imprint, which imprint will be lost when a copy is made of the imprinted document.

The identity of Wietse Mulder, was verified by me, civil law notary, by means of a passport bearing. Pursuant to an excerpt of the Trade Register of the Dutch Chamber of Commerce as per today Wietse Mulder is solely authorized to represent Genome Diagnostics B.V.

The significance of the legalization is strictly limited to the verification of the identity and the statement with respect to the signature, as well as to the authority of the signatory.

The contents of the signed document and the legal consequences arising therefrom have not been assessed by me civil law notary.

The general terms and conditions of Hermans & Schuttevaer Notarissen N.V., with registered office in Utrecht, the Netherlands, apply to our services. The general terms and conditions are filed with the registry of the District Court in Utrecht, the Netherlands, with number 37/2013.

Utrecht, the Netherlands, March 02th, 2023.

I.M. Duyverman



GENDX

02.03.2023

To be submitted to the Competent Health Authorities in Russian Federation

I herewith confirm that the content of medical device "Reagent kit NGSgo Library Full Kit for libraries preparation and indexing, for High Resolution HLA Gene Typing by Next Generation Sequencing (NGS)" instruction for use is valid and true.

Genome Diagnostics B.V., Yalelaan 48, 3584 CM Utrecht, THE NETHERLANDS is the original manufacturer of the device, mentioned in the instruction for use.

On behalf of Genome Diagnostics B.V.

GenDx
Yalelaan 48 | 3584 CM Utrecht
The Netherlands
Trade register: 30202468 | VAT: NL814323194B01

Signature

Wietse Mulder PhD
Managing Director (CEO)

GenDx | Alexander Numan Building | Yalelaan 48 | 3584 CM Utrecht | The Netherlands
Phone: +31 (0)30 252 3799 | info@gendx.com | www.GenDx.com
IBAN: NL73 RABO 0311 3449 76 | BIC: RABONL2U | VAT: NL814323194B01
Trade register: 30202468 | GenDx is a registered trade name of Genome Diagnostics B.V.

personalising diagnostics

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Официальный документ изготовителя на русском языке

Медицинское изделие «Набор реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)»

Изготовитель: **Genome Diagnostics B.V. (Геном Диагностикс Б.В.)**
Yalelaan 48, 3584 CM Utrecht, THE NETHERLANDS (Ялелан 48, 3584 CM Утрехт,
Нидерланды)

Версия 3
Дата составления: 2023/03



СОДЕРЖАНИЕ

Расшифровка символов	3
Наименование	4
Состав набора	4
Транспортировка, хранение, эксплуатация	6
Срок хранения	7
Стабильность при использовании	7
Техническая помощь и контактная информация	8
Назначение	8
Показания к применению	8
Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия	8
Противопоказания	8
Побочные действия	8
Информация о пользователе	9
Количество тестов	9
Описание аналита и его медицинское обоснование	9
Информация об изделии	10
Особые указания и меры предосторожности	10
Общие меры предосторожности в отношении окружающей среды	10
Валидация протокола и контроль качества	10
Информация по технике безопасности	11
Принцип метода	11
Основные технические характеристики	13
Аналитические и функциональные характеристики	15
Клинические рабочие характеристики	17
Медицинские изделия, применяемые совместно	17
Необходимые материалы, не предоставляемые производителем	17
Этап подготовки амплифицированных продуктов пцр (ампликонов)	18
Протоколы работы	18
Протокол 1. Амплификация	18
Протокол 3А. Фрагментация и лигирование адаптеров	19
Протокол 3В. Очистка днк и отбор фрагментов по размеру с магнитными частицами 0,45х	21
Протокол 3С. Индексирующая пцр с использованием планшетов с индексами NGSgo-IndX	22
Важные примечания перед началом работы	22
Протокол 3D. Пулирование библиотек, очистка днк и отбор фрагментов по размеру с магнитными частицами 0,6х	24
Протокол 4. Количественная оценка библиотеки с помощью флуориметра Qubit	25
Стабильность приготовленных ngs библиотек	26
Рекомендации по секвенированию	26
Рекомендации по интерпретации результатов и анализу данных	27
Возможные неисправности и методы их устранения	27
Соглашение об ограниченной лицензии	29
Техническое обслуживание	29
Информация о возможности повторного применения	29
Перечень стандартов, которым соответствует медицинское изделие	30
Утилизация и уничтожение медицинского изделия	31
Гарантийная информация	31

РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ



Маркировка CE



Медицинское изделие для
диагностики in vitro



Номер вещества



Объём



Компоненты



Код / номер партии



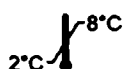
Каталожный номер



Уникальный идентификатор
изделия



Хранить при -20°C



Хранить при температуре от 2°C
до 8°C



Содержит реагенты для N тестов



Добавить жидкость



Использовать до



Официальный производитель



Смотрите инструкцию по
применению

www.gendx.com/ifu

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS).

СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS), в составе:

1) NGSgo Library Full Kit, часть 1 из 2 (NGSgo-IndX Plate I или II или III или IV & NGSgo-LibrX) в составе:

1. Фермент для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Enzyme - 2 флакона по 72 мкл.;
2. Буфер для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Buffer - 2 флакона по 156 мкл.;
3. Смесь лигаз NGSgo-LibrX Ligase Mix - 2 флакона по 360 мкл.;
4. Энхансер лигирования NGSgo-LibrX Ligation Enhancer - 2 флакона по 24 мкл.;
5. Смесь для ПЦР NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix - 3 флакона по 600 мкл.;
6. Фермент для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Enzyme - 2 флакона по 100 мкл.;
7. Буфер для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Buffer - 3 флакона по 100 мкл.;
8. Безнуклеазная вода (Nuclease Free H₂O) - 3 флакона по 1.25 мл.;
9. Адаптеры для Illumina NGSgo-IndX Adapter (AD-IL), 2 флакона для проведения 96 реакций.
10. Планшет с индексами NGSgo-IndX Plate (I или II или III или IV) - 1 шт. для проведения 96 реакций.

2) NGSgo Library Full Kit, часть 2 из 2 (GenDx-AMPure XP) в составе:

1. Буфер для элюции GenDx-AMPure XP Elution Buffer - 1 флакон, 5 мл.;
2. Магнитные частицы GenDx-AMPure XP AMPure beads - 1 флакон, 5 мл.

3) Инструкция по применению - 1 шт.

Примечание:

Набор реагентов NGSgo Library Full Kit состоит из двух частей: часть 1 из 2 (NGSgo-IndX и NGSgo-LibrX) и часть 2 из 2 (GenDx-AMPure XP).

Набор реагентов NGSgo Library Full Kit доступен под четырьмя разными каталожными номерами, каждый из которых содержит разные номера планшета с индексами NGSgo-IndX Plate (I или II или III или IV), которые идентичны по выполняемым функциям, составу, объему и количеству тестирований и различаются маркировкой с номером планшета, для удобства пользователя при анализе большого количества проб (более 96 за один анализ):

(NGSgo-IndX Plate I) **Номер по каталогу: 2842156**

(NGSgo-IndX Plate II) **Номер по каталогу: 2842256**

(NGSgo-IndX Plate III) **Номер по каталогу: 2842356**

(NGSgo-IndX Plate IV) **Номер по каталогу: 2842456**

Содержимое набора, часть 1 из 2**Хранить при -20°C**

Фермент для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Enzyme	72 мкл, 96 реакций	2 флакона	№ в-ва 2002005.1
Буфер для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Buffer	156 мкл, 96 реакций	2 флакона	№ в-ва 2002005.2
Смесь лигаз NGSgo-LibrX Ligase Mix	360 мкл, 96 реакций	2 флакона	№ в-ва 2002005.3
Энхансер лигирования NGSgo-LibrX Ligation Enhancer	24 мкл, 96 реакций	2 флакона	№ в-ва 2002005.4
Смесь для ПЦП NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix	600 мкл, 96 реакций	3 флакона	№ в-ва 2002005.5
Фермент для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Enzyme	100 мкл, 96 реакций	2 флакона	№ в-ва 2002005.6
Буфер для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Buffer	100 мкл, 96 реакций	3 флакона	№ в-ва 2002005.8
Безнуклеазная вода (Nuclease Free H ₂ O)	1.25 мл, 96 реакций	3 флакона	№ в-ва 3000000
Адаптер NGSgo-IndX Adapter для платформы Illumina (AD-IL)	96 реакций	2 флакона	№ в-ва 2002103.1
Планшет с индексами NGSgo-IndX Plate I или Plate II или Plate III или Plate IV	96 реакций	1 шт.	№ в-ва 2002153
	96 реакций	1 шт.	№ в-ва 2002253
	96 реакций	1 шт.	№ в-ва 2002353
	96 реакций	1 шт.	№ в-ва 2002453

Содержимое набора, часть 2 из 2**Хранить при 2-8°C**

Буфер для элюции GenDx-AMPure XP Elution Buffer	5 мл, 96 реакций	1 флакон	№ в-ва 5003653.1
Магнитные частицы AMPure GenDx-AMPure XP AMPure beads	5 мл, 96 реакций	1 флакон	№ в-ва 5003653.2

Таблица 2. Основные материалы изготовления

Компонент изделия	Основные материалы	Замечания
NGSgo Library Full Kit, часть 1 из 2 (NGSgo-IndX Plate I или II или III или IV & NGSgo-LibrX) в составе:		
Фермент для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Enzyme	50% глицерин, <1% фермент	В растворе
Буфер для восстановления концов NGSgo-	500 мМ Трис- HCl	В растворе

LibrX End Prep Buffer	100 мМ MgCl ₂ 4 мМ ДНТФ (каждый) 10 мМ АТФ	
Смесь лигаз NGSgo-LibrX Ligase Mix	20% глицерин 13,6% ПЭГ- 6000 1,5% Трис-НСl 10% Фермент	В растворе
Энхансер лигирования NGSgo-LibrX Ligation Enhancer	50% глицерин, <1% энхансер	В растворе
Смесь для ПЦР NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix	10% глицерин 8% ДМСО 2% Трис <1% фермент <1% ДНТФ	В растворе
Фермент для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Enzyme	50% глицерин 50 мМ NaCl 10 мМ Трис-НСl 0,1 мм ЭДТА 0,15% Тритон X- 100 200 мкг/мл БСА <1% фермент	В растворе
Буфер для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Buffer	20 мМ Трис-НСl 10 мМ MgCl ₂ 0,15% Тритон X-100 50 мМ NaCl	В растворе
Безнуклеазная вода (Nuclease Free H ₂ O)	Безнуклеазная вода, 100%	-
Адаптер NGSgo-IndX Adapter для платформы Illumina (AD-IL)	Олигонуклеотиды: 24191 пмоль Трис-НСl: 100 мкм	В растворе
Планшет с индексами NGSgo-IndX plate I	Олигонуклеотиды, высушенные гранулы, 12,5 пмоль/реакция	Высушенный осадок (лиофилизат)
Планшет с индексами NGSgo-IndX plate II	Олигонуклеотиды, высушенные гранулы, 12,5 пмоль/реакция	Высушенный осадок (лиофилизат)
Планшет с индексами NGSgo-IndX plate III	Олигонуклеотиды, высушенные гранулы, 12,5 пмоль/реакция	Высушенный осадок (лиофилизат)
Планшет с индексами NGSgo-IndX plate IV	Олигонуклеотиды, высушенные гранулы, 12,5 пмоль/реакция	Высушенный осадок (лиофилизат)
NGSgo Library Full Kit, часть 2 из 2 (GenDx-AMPure XP) в составе:		
Буфер для элюции GenDx-AMPure XP Elution Buffer	Трис-HCL: 10 мкм Твин 20: 0,1%	В растворе
Магнитные частицы GenDx-AMPure XP beads	Магнитные частицы GenDx-AMPure < 0,1% Азид натрия < 0,1%	В растворе

ТРАНСПОРТИРОВКА, ХРАНЕНИЕ, ЭКСПЛУАТАЦИЯ

Условия эксплуатации, транспортировки и хранения

- ☐ Условия эксплуатации набора реагентов и его компонентов представлены в разделе

«ПРОТОКОЛЫ РАБОТЫ».

- ☐ Транспортирование набора реагентов NGSgo Library Full Kit, часть 1 из 2 осуществляют с использованием сухого льда при температуре -20°C, а после хранят при температуре -20°C. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах.
- ☐ Интервал между отправкой и прибытием не должен превышать 3 дней без пополнения сухого льда.
- ☐ Набор реагентов NGSgo Library Full Kit, часть 2 из 2: Транспортирование осуществляют с использованием охлаждения при температуре 2-8°C, а после хранят при температуре 2-8°C. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах.
- ☐ Период между отправкой и прибытием набора не должен превышать 7 дней.
- ☐ Реагенты из набора NGSgo Library Full Kit следует вернуть на хранение при рекомендованных температурах сразу после использования.
- ☐ Изменения внешнего вида реагентов набора могут указывать на ухудшение свойств изделия и влиять на его эффективность.
- ☐ В случае наличия повреждений на упаковке свяжитесь с нами по следующему адресу электронной почты: support@gendx.com или с уполномоченным представителем производителя на территории РФ по адресу электронной почты hla@biochemmack.ru или по контактной информации в разделе «ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ И КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ» настоящей инструкции.
- ☐ Изделия, транспортированные или хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок хранения

- ☐ Компоненты набора NGSgo Library Full Kit сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетках, при хранении при указанных температурах.
- ☐ Гарантийный срок хранения набора реагентов составляет 18 месяцев после даты изготовления. Гарантийный срок хранения равен сроку годности. Не используйте медицинское изделие после истечения срока годности.

Стабильность при использовании

- ☐ Компоненты набора NGSgo-LibrX выдерживают 12 циклов заморозки/оттаивания.
- ☐ Компоненты набора NGSgo-IndX и безнуклеазная вода (Nuclease Free H₂O) выдерживают 24 цикла заморозки/оттаивания.
- ☐ Реагенты NGSgo Library Full Kit, часть 2 из 2 не следует подвергать заморозке.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ И КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Для получения технической помощи и дополнительной информации:

Genome Diagnostics B.V. (Геном Диагностикс Б.В.)

Сокращенное наименование компании-изготовителя: GenDx

Yalelaan 48, 3584 CM Utrecht, THE NETHERLANDS

(Ялелан 48, 3584 CM Утрехт, Нидерланды)

Электронная почта: support@gendx.com

Веб-сайт: www.gendx.com/support Тел.: +31 (0) 30 252 3799

Или свяжитесь с Уполномоченным представителем производителя на территории РФ:

АО «БиоХимМак Диагностика», 119192, г Москва, Ломоносовский проспект, дом 29, корпус 1, комната 3, этаж 1, помещение IV

Тел.: (495) 647-27-40

Электронная почта: hla@biochemmack.ru

Веб-сайт: www.biochemmack.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для подготовки NGS библиотек, состоящих из фрагментов ДНК HLA-локусов и применяется в ходе качественного определения аллелей HLA-генов (локусов HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 и DPB1) в образцах ДНК, выделенной из цельной крови человека, на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS) на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (Рег. Удостоверение № РЗН 2014/1568).

Набор предназначен для использования в трансплантационной диагностике с целью определения тканевой специфичности донора и/или реципиента и для создания регистров доноров костного мозга (гемопозитических стволовых клеток).

Набор 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: медицинский лабораторный техник, лаборант, врач клинической лабораторной диагностики, биолог.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Изделие показано для применения в соответствии с его назначением.

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ, ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Изделие применяется без градации пациентов по популяционному и демографическому признаку, а также без градации по полу и возрасту пациента.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Данное изделие не следует применять для HLA-типирования посмертных доноров, так как это требует более быстрого времени для выдачи результатов анализа.

ПОБОЧНЫЕ ДЕЙСТВИЯ

Не применимо.

ИНФОРМАЦИЯ О ПОЛЬЗОВАТЕЛЕ

Медицинское изделие для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* в результате специального образования и обучения: специалисты с высшим медицинским, биологическим или биотехнологическим образованием: медицинский лабораторный техник, лаборант, врач клинической лабораторной диагностики, биолог.

КОЛИЧЕСТВО ТЕСТОВ

Один набор медицинского изделия рассчитан на проведение 96 реакций (96 анализируемых проб).

ОПИСАНИЕ АНАЛИТА И ЕГО МЕДИЦИНСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Примечание: Далее в тексте, может встречаться термин HLA-типирование как более удобный в употреблении и обозначающий собой качественное определение аллелей HLA-генов.

Человеческие лейкоцитарные антигены (HLA) играют ключевую роль в функционировании иммунной системы человека, а также отвечают за развитие иммунологического отторжения трансплантата при пересадке органов и тканей. Совместимость HLA-генотипов у донора и реципиента является важнейшим фактором, определяющим результат трансплантации органов и костного мозга/гемопозитических стволовых клеток, необходимо точно определить HLA-генотипы до трансплантации.

Гены HLA, расположенные на коротком плече 6-ой хромосомы человека, широко известны как высокополиморфные. Классические гены HLA (состоят из трех разных локусов двух классов) включают: локусы I класса, именуемые A, B и C, и локусы II класса, именуемые DP, DQ и DR. Белки класса I присутствуют на поверхности всех клеток организма (за исключением эритроцитов и клеток ворсинчатого трофобласта) и вступают в реакцию (взаимодействуют) с Т-клетками и берут на себя ключевую роль в разрушении инфицированных клеток, тогда как белки класса II способствуют выработке клеточно-зависимого иммунитета путём клеточного распознавания при взаимодействии с Т-клетками. Система HLA-генов характеризуется огромным разнообразием аллелей. Информация об аллельном разнообразии генов HLA собирается в Единой Базе Данных Номенклатурного Комитета HLA Всемирной Организации Здравоохранения (IPD/IMGT-HLA).

Для определения тканевой специфичности донора и/или реципиента и для создания регистров доноров костного мозга (гемопозитических стволовых клеток) необходимо провести типирование по локусам HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 и DPB1 с высоким разрешением на уровне второго поля и выше.

Таким образом, полностью совместимый неродственный донор – донор, полностью совпадающий с пациентом не менее, чем по 12 из 12 HLA-генов (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 и DPB1) с высоким разрешением на уровне второго поля и выше.

HLA-типирование с высоким (high) разрешением – это идентификация HLA-аллелей, кодирующих одинаковую аминокислотную последовательность полипептида HLA-антигена. Высокое разрешение идентифицирует аллели с разрешением не ниже второго поля (четыре цифры) – например, A*01:01, A*26:02.

Традиционно, HLA-типирование проводилось с использованием серологических методов. Однако этот тип анализа был заменен методами ДНК-типирования с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования.

Типирование генов HLA методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) представляет собой одновременное (параллельное) прочтение последовательности нескольких миллионов разных фрагментов исходной ДНК. Преимуществом технологии NGS является секвенирование одноцепочечной молекулы ДНК в сочетании с большим количеством прочтений, что исключает возникновение гетерозиготных неоднозначностей.

Секвенирование осуществляется на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (Рег. Удостоверение № РЗН 2014/1568). Метод секвенирования Illumina использует технологию

секвенирования путем синтеза, параллельно детектируя присоединение флуоресцентно-меченых нуклеотидов к синтезируемой цепи ДНК в множестве молекулярных кластеров.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИЗДЕЛИИ

Остаточные риски / Нежелательные явления / Ограничения метода

- ☐ В случае получения гомозиготного результата типирования рекомендуется проверить, действительно ли образец является гомозиготным или содержит ли он второй аллель, который недостаточно представлен в данных (*Виттиг и др., Нуклеиновые кислоты Res. 2015 23 июня; 43(11): e70*).
- ☐ Аллель HLA-DQB1*03:276N невозможно отличить от HLA-DQB1*03:01:01:01/10/20, поэтому он проявится как аллельная неоднозначность в образцах с аллелью HLA-DQB1*03:01:01:01, HLA-DQB1*03:01:01:10 или HLA-DQB1*03:01:01:20, так как последовательности указанных аллелей идентичны в ампликонах (*Штайнер Н.К., Хоу Л., Херли К.К.). Характеристика аллелей с большими делециями с использованием регион-специфичной экстракции. Hum Immunol. 2018 июнь; 79(6):491-493*).

Особые указания и меры предосторожности

- ☐ Для обеспечения наилучшей производительности используйте набор NGSgo Library Full Kit с материалами, реагентами и оборудованием, рекомендованными в разделах «Необходимые материалы, не предоставляемые производителем» и «Медицинские изделия применяемые совместно».
- ☐ Использование веществ, отличных от указанных, подлежит валидации пользователем!
- ☐ Ресуспендирование или разбавление реагентов в объемах, которые отличаются от указанных в данной инструкции по применению, может привести к ошибкам в производительности, а посему настоятельно не рекомендуется.
- ☐ Избегайте контаминации индексов.
- ☐ Придерживайтесь точек безопасной остановки в протоколе, чтобы обеспечить оптимальный выход библиотеки.
- ☐ Настоятельно рекомендуется использовать свежую безнуклеазную воду из набора.
- ☐ При работе с химическими веществами всегда носите специальный лабораторный халат, надевайте одноразовые перчатки и защитные очки.
- ☐ Набор Library Full Kit не устойчив к вариативности числа циклов индексирующей ПЦР.

Общие меры предосторожности в отношении окружающей среды

- ☐ Обратите внимание, что открытие пробирок после ПЦР может привести к выбросу продуктов амплификации в виде аэрозоля, который может контаминировать ваше рабочее место. По этой причине рабочие зоны для пре- и постамплификационных процедур следует разделить.
- ☐ В идеале пре- и постамплификационные процедуры следует проводить в отдельных помещениях.
- ☐ Для проведения преамплификационных процедур используйте отдельный набор пипеток. Настоятельно рекомендуется использовать микродозаторы с гидрофобными фильтрами.
- ☐ В случае контаминации лабораторные столы, приборы и дозаторы необходимо обеззаразить, например, 1%-ным раствором дезинфицирующего средства Distel в соответствии с инструкциями производителя. Контаминированные образцы и реагенты по возможности рекомендуется выбросить.
- ☐ Протоколы 2, 3, 4 и 5 данного документа должны выполняться в зоне для послеамплификационных процедур.

Валидация протокола и контроль качества

- ☐ Протокол прошел проверку в термоциклере Veriti (Рег. Удостоверение № ФСЗ

2011/09244) для амплификации с использованием ампликонов, полученных с помощью набора реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS) и набора реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS).

□ Валидация протокола выполнена с использованием набора реагентов NGSgo Library Full Kit, совместимого с генетическим секвенатором Illumina MiSeq (Illumina Inc.) (Пер. Удостоверение № РЗН 2014/1568).

□ Протокол прошел валидацию на использование геномной ДНК (гДНК), выделенной из цельной крови человека.

□ Перед внедрением протокола в целях HLA-типирования по методу NGS («секвенирование нового поколения») в вашей лаборатории выполните, пожалуйста, валидацию методов типирования на основе секвенирования с использованием стандартизированных молекулярно типированных образцов. Такие образцы (эталонные панели HLA) могут быть получены от Международной рабочей группы по антигенам гистосовместимости IHWG (Питерсдорф И.В. и соавт., IHWG: международная рабочая группа по вопросам гистосовместимости при трансплантации гемопоэтических клеток. *Инт. Дж. Иммуногенет.* 2013;40(1):2-10) или института Кориелла (Беттинонни М. и соавт. *Характеристика 108 эталонных материалов геномной ДНК для 11 локусов антигенов лейкоцитов человека: Совместный проект GeT-RM. J Mol Diag* 2018, 20: 703-715), стандартизированной панели UCLA, Центр иммуногенетики, США, или любой другой доступной эталонной панели HLA.

Информация по технике безопасности

□ При возникновении в процессе использования данного продукта серьёзного происшествия как можно скорее сообщите о нём компании «GenDx» в целях скорейшего уведомления соответствующего компетентного органа в вашей стране.

□ Компания «GenDx» не оказывает поддержку при возникновении каких-либо проблем в результате несоблюдения настоящей «Инструкции по применению».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Качественное определение аллелей HLA-генов (локусов HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 и DPB1) в образцах ДНК, выделенной из цельной крови человека, на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS) проводится с применением выделенных из цельной крови человека образцов ДНК в несколько последовательных этапов, с применением различных медицинских изделий. Краткое описание этапов качественного определения аллелей HLA генов:

I этап:

Создание ампликонов HLA-аллелей с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)

Набор реагентов NGSgo-MX6-1 состоит из реагентов для амплификации ПЦР, амплифицирующих гены системы человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA). Реагенты обеспечивают мультиплексную амплификацию следующих генов HLA: HLA-A (полный ген), HLA-B (полный ген), HLA-C (полный ген), HLA-DRB1 (от экзона 2 до экзона 3), HLA-DQB1 (от экзона 2 до части экзона 4) и HLA-DPB1 (от экзона 2 до экзона 5).

Амплификацию, специфичную для локуса HLA, проводят в термоциклере (амплификаторе) с использованием смеси праймеров NGSgo-MX6-1, воды, матричной геномной ДНК и Мастер-микса GenDx-LongMix. Полученные ампликоны, специфичные для локусов HLA, используются в качестве исходного материала ДНК для набора реагентов NGSgo Library Full Kit.

II этап:

Фрагментация и лигирование адаптеров с использованием набора реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)

Компонент NGSgo-LibrX набора Library Full Kit состоит из реагентов для приготовления библиотек для амплифицированных продуктов ПЦР (ампликонов). В изделии NGSgo-LibrX используются разные ферменты для произвольной фрагментации и восстановления концов ампликонов. Данный шаг необходим для создания участков связывания для адаптеров, совместимых с платформой Illumina, которые лигируются с фрагментами ДНК при использовании реагентов для лигирования NGSgo-LibrX и адаптеров NGSgo-IndX. Адаптеры создают участки связывания для совместимых с платформой Illumina индексов и для праймеров для секвенирования. После лигирования адаптеров фрагменты ДНК отбираются по размеру, и очищаются с помощью магнитных частиц GenDx-AMPure XP. Выбираются фрагменты ДНК длиной ~400 п.о. и более, а другие более короткие фрагменты или оставшиеся ферменты и соли удаляются.

III этап:

Индексирование с использованием набора реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)

Фрагменты ДНК, лигированные с помощью адаптеров, подвергаются двойному индексированию во время индексирующей ПЦР с использованием смеси для ПЦР NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix и планшета NGSgo-IndX. Индексы состоят из праймеров индекса 1 (i7) и индекса 2 (i5), содержащих последовательности, необходимые для формирования кластеров и идентификации образца. После индексирования выполняется второй этап отбора фрагментов по размеру и очистки с использованием магнитных частиц. Индексированные библиотеки объединяются для создания одного пула библиотек, представляющего различные гены нескольких образцов.

IV этап:

Окончательный пул библиотек, созданный в протоколе 3D, можно секвенировать на платформе секвенирования Illumina. Платформа для секвенирования MiSeq (Illumina Inc.) (Рег. Удостоверение № РЗН 2014/1568), полностью совместима с набором реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit. По результатам секвенирования происходит качественное определение аллелей HLA-генов (локусов HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 и DPB1) в образцах ДНК человека на высоком разрешении. Для проведения секвенирования обратитесь к Руководству по эксплуатации на генетический секвенатор MiSeq (Illumina Inc.) (Рег. Удостоверение № РЗН 2014/1568).

ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Наименование компонента	Характеристика
NGSgo Library Full Kit, часть 1 из 2 (NGSgo-IndX Plate I или II или III или IV & NGSgo-LibrX) в составе:	
Фермент для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Enzyme	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,0 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	13,0 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	6,0 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	1,55 г ± 0,25г
Цвет крышки	зеленый
Объем реагента во флаконе	72 мкл ± 10 мкл
Буфер для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Buffer	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,5 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	13,0 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	6,0 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	1,65 г ± 0,25 г
Цвет крышки	зеленый
Объем реагента во флаконе	156 мкл ± 15 мкл
Смесь лигаз NGSgo-LibrX Ligase Mix	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,2 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	13,0 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	6,0 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	2,0 г ± 0,2 г
Цвет крышки	красный
Объем реагента во флаконе	360 мкл ± 20 мкл
Энхансер лигирования NGSgo-LibrX Ligation Enhancer	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,3 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	13,0 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	6,0 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	1,5 г ± 0,2 г
Цвет крышки	красный
Объем реагента во флаконе	24 мкл ± 5 мкл
Смесь для ПЦР NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,2 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	12,8 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	5,9 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	2,3 г ± 0,2 г
Цвет крышки	синий
Объем реагента во флаконе	600 мкл ± 50 мкл
Фермент для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Enzyme	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,3 мм ± 2,0 мм

Наименование компонента	Характеристика
Диаметр крышки	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	5,9 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	1,6 г ± 0,2 г
Цвет крышки	белый
Объем реагента во флаконе	100 мкл ± 10 мкл
Буфер для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Buffer	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,3 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	13,0 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	6,0 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	1,6 г ± 0,2 г
Цвет крышки	белый
Объем реагента во флаконе	100 мкл ± 10 мкл
Безнуклеазная вода (Nuclease Free H₂O)	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	46,6 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	5,8 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	2,8 г ± 0,2 г
Цвет крышки	белый
Объем реагента во флаконе	1,25 мл ± 0,20 мл
Адаптеры для Illumina NGSgo-IndX Adapter (AD-IL)	
Диаметр флакона в самой широкой части	12,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	46,7 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	12,8 мм ± 2,0 мм
Высота крышки	6,0 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	1,6 г ± 0,2 г
Цвет крышки	розовый
Планшет с индексами NGSgo-IndX Plate (I или II или III или IV)	
Габаритные размеры планшета (высота*ширина*длина)	125,5 мм * 85,2 мм * 21,5 мм ± 3,0 мм
Масса планшета	35,2 г ± 5,0 г
Количество лунок планшета	96 шт.
Потребительская упаковка (часть 1 из 2)	
Габаритные размеры упаковки	167 мм * 67 мм * 130 мм ± 5 мм
Масса упаковки с изделием	158 г ± 5 г
NGSgo Library Full Kit, часть 2 из 2 (GenDx-AMPure XP) в составе:	
Буфер для элюции GenDx-AMPure XP Elution Buffer	
Диаметр флакона в самой широкой части	24,9 мм ± 2,0 мм
Высота флакона с закрытой крышкой	45,3 мм ± 2,0 мм
Диаметр крышки	23,8 мм ± 2 мм
Высота крышки	14,5 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	11,7 г ± 0,5 г
Цвет крышки	белый
Объем реагента во флаконе, мл	5 мл ± 1 мл
Магнитные частицы GenDx-AMPure XP AMPure beads	
Диаметр флакона в самой широкой части	25 мм ± 2 мм

Наименование компонента	Характеристика
Высота флакона с закрытой крышкой	45,5 мм ±2,0 мм
Диаметр крышки	23,8 мм ±2,0 мм
Высота крышки	14,7 мм ± 2,0 мм
Масса флакона с содержимым	12,3 г ± 2,0 г
Цвет крышки	белый
Объем реагента во флаконе	5 мл±1 мл
Потребительская упаковка (часть 2 из 2)	
Габаритные размеры потребительской упаковки с изделием	62 мм *66 мм *45 мм ±2 мм
Масса потребительской упаковки с изделием	37,9 г ±2,0 г

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Примечание:

Аналитические характеристики медицинского изделия оцениваются, как характеристики единой аналитической системы для качественного определения аллелей HLA-генов по рабочим протоколам с применением всех совместно применяемых медицинских изделий, для качественного определения аллелей HLA-генов (локусов HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 и DPB1) в образцах геномной ДНК, выделенной из цельной крови человека, на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS) на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (ПУ № РЗН 2014/1568) и получения HLA-генотипа пациента на высоком разрешении (на уровне второго поля). Аналитические характеристики подтверждены с использованием следующих совместно применяемых медицинских изделий:

- Набор реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)
- Набор реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)
- Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, с принадлежностями (Пер. Удостоверение ФЦЗ 2011/09244)
- Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения: MiSeq, MiSeqDx (Пер. Удостоверение № РЗН 2014/1568)
- Набор реагентов ИВД MiSeqTM Dx v3 (MiSeqTM Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот (Пер. Удостоверение № РЗН 2020/13097)

Аналитические и функциональные рабочие характеристики

Предел обнаружения: 60 нг геномной ДНК

Предел обнаружения

Предел обнаружения был подтвержден с использованием 3 образцов геномной ДНК человека стандартизированной HLA панели IHWG с различной концентрацией. Результатом теста стало значение предела обнаружения в 60 нг геномной ДНК, для определения HLA-генотипа с высоким разрешением на уровне второго поля.

Аналитическая специфичность

Валидация аналитической специфичности, определяемой как способность к определению HLA-генотипа с высоким разрешением на уровне второго поля, выполнена с использованием образцов геномной ДНК человека стандартизированной HLA панели IHWG. Результаты сравнивались с подтвержденными результатами HLA-типирования каждого образца геномной ДНК человека стандартизированной HLA панели IHWG. Совпадение составило 100% для всех результатов HLA-типирования аллелей HLA-генов для локусов: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1.

Прецизионность (повторяемость и воспроизводимость)

3 образца геномной ДНК человека стандартизированной HLA панели IHWG были протестированы для исследования повторяемости и воспроизводимости внутри одной партии и между партиями. Данные показали:

- 100% повторяемость результатов качественного определения аллелей HLA-генов (HLA-типирования) по локусам A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 с высоким разрешением на уровне второго поля.
- 100% воспроизводимость результатов качественного определения аллелей HLA-генов (HLA-типирования) по локусам A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 с высоким разрешением на уровне второго поля.

Интерференция

Наличие потенциально перекрестно реагирующих веществ никоим образом не влияет на амплификацию генов результаты качественного определения аллелей HLA-генов (HLA-типирования) по локусам A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 с высоким разрешением на уровне второго поля, на нижеследующих этапах:

Интерференция на этапе создания ампликонов (с применением набора реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)):

- Следы этанола в образцах геномной ДНК до 5 % не интерферируют.
- Следы NaCl в образцах геномной ДНК в концентрации до 50 мМ не интерферируют.
- Следы РНК в образцах геномной ДНК до 1,5 % не интерферируют.
- Следы белка (BCA) в образцах геномной ДНК до 1 мкг/мкл не интерферируют.

На этапе приготовления NGS библиотек (с применением набора реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)):

- Присутствие этанола в количествах 1 мкл после очистки влияет на количество, но не на качество библиотек, полученных с помощью набора реагентов NGSgo Library Full Kit.

Метрики качества метода NGS в ходе определения HLA-генотипа с высоким разрешением

Метрики качества определяются для каждого отдельного анализа при определении HLA-генотипа с высоким разрешением:

Картируемость

Картируемость описывает процент прочтений, который может быть присвоен локусу HLA. Средняя картируемость должна составлять >60%.

Размер вставки

Размер вставки является репрезентативным для размера фрагмента. Средний размер вставки должен составлять >150.

Средний максимальный уровень шума [экзон+]

Средний максимальный уровень шума [экзон+] должен составлять <12%.

Средняя наименьшая глубина прочтения (LRD) [Экзон+]

Средняя наименьшая глубина прочтения (LRD) [Экзон+] должна составлять > 150.

Среднее число несоответствий (MM) [экзон+]

Среднее число несоответствий (MM) [экзон+] должно быть равно 0, для всех известных аллелей из актуальной версии базы данных IMGT/HLA.

Среднее отношение дельта-сигнала к шуму (DSN) [экзон+]

Среднее отношение дельта-сигнала к шуму (DSN) [экзон+] должно составлять >10% для гетерозиготных аллелей. Для гомозиготных аллелей эта метрика качества не применяется.

Среднее значение предполагаемого второго аллеля (ESA) [экзон+]

Среднее значение предполагаемого второго аллеля (ESA) [экзон+] должно составлять >20% для гетерозиготных аллелей. Для гомозиготных аллелей эта метрика качества не применяется.

Клинические рабочие характеристики

Ожидаемые значения

- HLA-гены присутствуют всегда и у всех людей, независимо от состояния заболевания. Таким образом, ожидаемые значения для нормальной и поражённой популяций идентичны.
- Для медицинского изделия не ожидается никаких специфических ошибок в ходе качественного определения аллелей HLA-генов (HLA-типирования) по локусам A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 с высоким разрешением на уровне второго поля для исследуемой популяции.
- Медицинское изделие было проверено на образцах, которые охватывают большинство распространенных аллелей, присутствующих в популяциях людей во всем мире (см. Примечание ниже).

Положительное и отрицательное прогностическое значение.

Клиническое положительное прогностическое значение составляет 100 % по результатам набора реагентов в исследовательских центрах. Все исследуемые образцы были правильно типированы по обоим аллелям (истинно-положительные) и ни один из них не был типирован неправильно (ложноположительные). Результаты HLA-типирования были валидированы методом секвенирования по Сэнгеру.

Клиническое отрицательное прогностическое значение составляет 100 % на основании одного отрицательного контроля, проведённого в исследовательских центрах, который по итогам испытания остался отрицательным (истинно-отрицательная), и клинических образцов, ни один из которых не дал отрицательного результата по итогам испытания (ложноотрицательная). Результаты HLA-типирования были валидированы методом секвенирования по Сэнгеру.

Диагностическая чувствительность и специфичность

Диагностическая чувствительность и специфичность составляют 100% с учетом доверительного интервала (95% ДИ).

МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ СОВМЕСТНО

- Набор реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)
- Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, с принадлежностями (Рег. Удостоверение ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017)
- Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения: MiSeq, MiSeqDx (Рег. Удостоверение № РЗН 2014/1568)
- Набор реагентов ИВД MiSeqTM Dx v3 (MiSeqTM Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот (Рег. Удостоверение № РЗН 2020/13097)

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ

Таблица 3. Оборудование и реагенты

Оборудование и реагенты	Каталожный номер	Поставщик
Дозаторы автоматические с гидрофобными фильтрами	Н/П	Разные
Многоканальные дозаторы автоматические (20 мкл и 300 мкл)	Н/П	Разные
Лёд или охлаждающий штатив (4°C)	Н/П	Разные
Реакционные пробирки и/или 96-луночные реакционные планшеты для ПЦР	Н/П	Разные
Клейкие пленки или стрипованные 8-луночные крышки	Н/П	Разные

Микроцентрифуга	Н/П	Разные
Центрифуга	Н/П	Разные
Термоциклер	Н/П	Разные
Вортекс	Н/П	Разные
Вода MilliQ	Н/П	Разные
Магнитный штатив для 96-луночного планшета	Н/П	Разные
Магнитный штатив для пробирок 1,5 мл	Н/П	Разные
Шейкер (1500 об/мин)	Н/П	Разные
Этанол 96%	Н/П	Разные
Набор для количественного определения ДНК Qubit DNA BR Assay Kit (500 анализов)	Q32853	Thermo Fisher Scientific, США
Флуориметр Qubit 4	Q33238	Thermo Fisher Scientific, США
Пробирки для анализа Qubit	Q32856	Thermo Fisher Scientific, США

ЭТАП ПОДГОТОВКИ АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ПЦР (АМПЛИКОНОВ)

Набор реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit разработан для работы с амплифицированными продуктами ПЦР (ампликонами), полученными с применением медицинского изделия «Набор реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)».

Тип анализируемого образца

Амплифицированные продукты ПЦР (ампликоны), полученные из образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной венозной крови человека КЗ-ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Для получения информации, связанной с преаналитическим этапом и этапами создания ампликонов:

- Сбор образцов крови
- Выделение геномной ДНК
- Подготовка образцов
- Важные примечания перед началом работы
- Протоколы работы для подготовки ампликонов

обратитесь к инструкции по применению на медицинское изделие «Набор реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)» для получения более полной информации.

ПРОТОКОЛЫ РАБОТЫ

ПРОТОКОЛ 1. АМПЛИФИКАЦИЯ

Перед использованием набора реагентов Library Full Kit следует использовать протокол амплификации.

Таблица 4. Протоколы амплификации, совместимые с набором NGSgo Library Full Kit

Протокол амплификации	Тип	Инструкция
Набор реагентов для мультиплексной амплификации HLA-аллелей NGSgo-MX6-1 для типирования генов HLA на высоком	Мультиплекс	Протокол смотрите в инструкции по применению изделия

ПРОТОКОЛ 3А. ФРАГМЕНТАЦИЯ И ЛИГИРОВАНИЕ АДАПТЕРОВ

Важные примечания перед началом работы

- ☐ Оптимальное количество вводимой ДНК для достижения оптимального размера вставки и концентрации библиотеки составляет 250 нг. Однако можно использовать количество вводимой ДНК в диапазоне 5–1500 нг с оптимальным диапазоном 50–500 нг.
- ☐ Для получения оптимальных размеров фрагментов и выхода библиотеки выполните фрагментацию, лигирование адаптеров (3А) и очистку (3В) последовательно. Не помещайте образцы на хранение в какой-либо момент времени во время выполнения Протоколов 3А и 3В. Образцы можно поместить на хранение после очистки (Протокол 3В).
- ☐ Объем реакционной смеси должен быть на ~10% больше, чем требуется для проведения общего количества анализов.
- ☐ Магнитные частицы GenDx-AMPure XP AMPure beads, необходимые в протоколе 3В, при запуске должны иметь комнатную температуру, поэтому перед запуском протокола 3А рекомендуется достать флакон из холодильника.

Протокол

1. Проводите все реакции на холодном штативе (4°C) или с использованием льда. Разморозьте фермент для фрагментации, буфер для фрагментации, буфер для восстановления концов, фермент для восстановления концов и безнуклеазную воду. Тщательно смешайте растворы и коротко отцентрифугируйте их перед использованием. Храните все реагенты при температуре 4°C.
2. Подготовьте мастер-микс как указано в Таблице 5.

Таблица 5. Состав реакционной смеси для фрагментации и восстановления концов

Компонент	Цвет крышки	Объем
Ампликоны HLA (~ 250 нг)		Варьируемый
Буфер для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Buffer	Белый	2 мкл
Буфер для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Buffer	Зелёный	3,25 мкл
Фермент для фрагментации NGSgo-LibrX Fragmentase Enzyme	Белый	1,5 мкл
Фермент для восстановления концов NGSgo-LibrX End Prep Enzyme	Зелёный	1,5 мкл
Безнуклеазная вода (Nuclease Free H ₂ O)	Белый	Варьируемый
Общий объем		32,5 мкл

3. Тщательно перемешайте мастер-микс без ампликонов и отцентрифугируйте в течение короткого времени.
4. Внесите соответствующий объем мастер-микса в каждую пробирку или лунку планшета.
5. Внести соответствующий объем ампликонов (~ 250 нг) в каждую пробирку или лунку планшета. Рекомендуется использовать минимальный объем ДНК 1 мкл.
6. Тщательно перемешайте реакционную смесь и кратковременно отцентрифугируйте.
7. Поместите реакционную смесь в термоциклер с нагреваемой крышкой и запустите программу, как описано в таблице 6.

Таблица 6. Протокол термоциклирования для фрагментации и реакции восстановления концов

Этап	Температура	Длительность
Фрагментация и	25°C	20 мин
восстановление концов	70°C	10 мин
Охлаждение	15°C	*



Не является точкой безопасной остановки.
Сразу переходите к следующему шагу.

Разморозьте смесь лигаз, энхансер лигирования и адаптеры (AD-IL). Тщательно смешайте растворы и коротко отцентрифугируйте их перед использованием. Храните все реагенты при температуре 4°C.

Подготовьте мастер-микс для лигирования адаптеров в пробирке, как указано в Таблице 7.

Таблица 7. Состав мастер-микса для лигирования адаптеров

Компонент	Цвет крышки	Объем
Смесь лигаз NGSgo-LibrX Ligase Mix	Красный	7,5 мкл
Энхансер лигирования NGSgo-LibrX Ligation Enhancer	Красный	0,5 мкл
Адаптеры для Illumina NGSgo-IndX Adapter (AD-IL)	Красный	0,25 мкл
Безнуклеазная вода (Nuclease Free H ₂ O)	Белый	1 мкл
Общий объем		9,25 мкл

Тщательно перемешайте реакционную смесь и кратковременно отцентрифугируйте.

Добавьте 9,25 мкл мастер-микса для лигирования адаптеров к 32,5 мкл фрагментов ДНК с dA-хвостами, как описано в таблице 8.

Таблица 8. Состав реакционной смеси для лигирования адаптеров

Компонент	Объём
Мастер-микс для лигирования адаптеров (Таблица 7)	9,25 мкл
Фрагменты ДНК с dA-хвостом	32,5 мкл
Общий объём	41,75 мкл

Тщательно перемешайте реакционную смесь и кратковременно отцентрифугируйте.

Инкубируйте при 20°C в течение 15 минут в термоциклере в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9. Протокол термоциклирования для реакции лигирования адаптеров

Этап	Температура	Длительность
Лигирование адаптеров	20°C	15 мин
Охлаждение	15°C	*



Не является точкой безопасной остановки.
Сразу переходите к следующему шагу.

8. Вortexируйте пробирки или планшет в течение короткого времени и немедленно переходите к протоколу 3В для очистки и отбора фрагментов по размеру образцов ДНК с использованием магнитных частиц GenDx-AMPure XP.

ПРОТОКОЛ 3В. ОЧИСТКА ДНК И ОТБОР ФРАГМЕНТОВ ПО РАЗМЕРУ С МАГНИТНЫМИ ЧАСТИЦАМИ 0,45х

Важные примечания перед началом работы

- ☐ Подготовьте свежий 80%-й этанол перед использованием.
- ☐ Набор Library Full Kit содержит магнитные частицы GenDx-AMPure XP AMPure beads и буфер для элюции GenDx-AMPure XP Elution Buffer.
- ☐ Перед использованием убедитесь, что магнитные частицы и буфер для элюции имеют комнатную температуру.

Протокол

9. Проводите все реакции при комнатной температуре. Тщательно перемешайте магнитные частицы на вортексе, чтобы ресуспендировать их.

10. Добавьте 18,8 мкл ресуспендированных частиц к 41,75 мкл реакционной смеси для лигирования адаптеров из протокола 3А, в результате чего соотношение частицы: ДНК будет 0,45х.

11. Хорошо перемешайте на вортексе или пипетируя смесь вверх и вниз не менее 10 раз. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре, желательно на шейкере (1500 об/мин).

12. Кратко центрифугируйте (3–4 секунды при 500 об/мин), чтобы собрать жидкость на дне лунок планшета. Частицы должны остаться в растворе.

13. Поместите планшет на соответствующий магнитный штатив, чтобы отделить частицы от надосадочной жидкости. После того, как раствор станет прозрачным (приблизительно через 5 минут), осторожно удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора.

14. Добавьте 200 мкл свежеприготовленного 80%-го этанола в планшет, пока он находится на магнитном штативе. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 секунд, а затем осторожно удалите надосадочную жидкость. Повторите этот шаг дважды, всего три промывки.
15. Удалите весь остаточный этанол дозатором на 10 мкл. Визуально убедитесь, что весь этанол удалён.
16. Высушите частицы на воздухе в течение 3-5 минут, пока планшет находится на магнитном штативе с открытой крышкой. Убедитесь, что весь этанол испарился. Не пересушивайте частицы, чтобы они не слиплись.
17. Снимите планшет с магнитного штатива.
18. Отделите ДНК от частиц, добавив 12,5 мкл буфера для элюции.
19. Тщательно перемешайте на вортексе в течение 30 секунд. Убедитесь, что частицы находятся в растворе.
20. Инкубируйте в течение двух минут при комнатной температуре, желательно на шейкере (1500 об/мин).
21. Кратко центрифугируйте (3–4 секунды при 500 об/мин), чтобы собрать жидкость на дне лунок планшета. Частицы должны остаться в растворе.
22. Поместите планшет на магнитный штатив. Тем временем подготовьте реакционную смесь для индексирующей ПЦР (протокол 3С), оставив планшет на магните. После того, как раствор станет прозрачным (приблизительно через 5 минут), перенесите 10 мкл элюата в новый планшет или, продолжая работу со всеми 96 лунками планшета с индексами IndX Plate, перенесите 10 мкл элюата непосредственно на подготовленный планшет с индексами IndX Plate.



Точка безопасной остановки.

После очистки образцы можно хранить при температуре 4-8°C.

ПРОТОКОЛ 3С. ИНДЕКСИРУЮЩАЯ ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАНШЕТОВ С ИНДЕКСАМИ NGSGO-INDX

Важные примечания перед началом работы

- ☐ Избегайте перекрёстной контаминации индексов после ресуспендирования.
- ☐ Для обеспечения уникальных комбинаций индексов i5 и i7 для каждого образца в цикле секвенирования можно использовать любую комбинацию лунок в одном и том же планшете или в разных вариантах планшета IndX Plate (I, II, III или IV). Не используйте одну и ту же лунку планшета одной и той же версии дважды для приготовления библиотек для одного запуска секвенирования.
- ☐ Рекомендуются применять ротацию индексов, чтобы предотвратить перенос ДНК между последовательными запусками.
- ☐ Если используется только часть лунок планшета, то его можно использовать несколько раз. Обязательно запечатайте лунки, которые использовались ранее.
- ☐ Не используйте самоклеящиеся пленки от ранее использованных лунок. Вместо этого используйте ранее снятые крышки или новые стрипованные крышки.

Протокол

23. Проводите все реакции на холодном штативе (4°C) или с использованием льда. Разморозьте смесь для ПЦР NGSGo-LibrX HiFi PCR Mix. Тщательно перемешайте смесь для

ПЦР NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix и коротко отцентрифугируйте перед использованием.

24. Достаньте планшет с индексами NGSgo-IndX Plate. Индексы предоставляются в сухом виде. Центрифугируйте планшет и снимите крышки с лунок, которые будут использоваться. Для создания таблицы образцов зарегистрируйте номер планшета (I, II, III или IV) и исходную лунку планшета IndX, используемую для индексирования конкретного образца.

25. Если не используются все лунки планшета IndX, перейдите к шагу 32. При использовании всего планшета сразу перейдите к шагу 33.

26. Частичное использование планшета с индексами NGSgo-IndX:

- Приготовьте реакционную смесь в планшете с индексами NGSgo-IndX, добавив 14 мкл смеси для ПЦР NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix в каждую используемую лунку.
- Закройте лунки соответствующими крышками (или новыми) и оставьте не менее чем на 3 минуты.
- Соберите образцы, очищенные в соответствии с протоколом 3В, и перенесите 10 мкл элюата каждого образца в новый 96-луночный планшет.
- Тщательно перемешайте планшет с индексами NGSgo-IndX с реакционной смесью на вортексе и отцентрифугируйте в течение короткого времени.
- Снимите крышки с ресуспендированных лунок планшета с индексами NGSgo-IndX.
- Внесите по 12,5 мкл ресуспендированных индексов в лунки планшета с элюатом. Общий реакционный объем в каждой лунке будет составлять 22,5 мкл.
- Закройте использованные лунки стрипованными крышками во избежание перекрестной контаминации во время хранения и храните при температуре -20°C.
- Перемешайте реакционную смесь, быстро провортексировав планшет. Поместите в термоциклер с нагреваемой крышкой и запустите программу, как описано в таблице 10.

27. Используются все 96 лунок планшета с индексами NGSgo-IndX:

- Снимите крышки с планшета с индексами NGSgo-IndX.
- Приготовьте реакционную смесь в планшете с индексами NGSgo-IndX, добавив 12,5 мкл смеси для ПЦР NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix в каждую используемую лунку.
- Закройте лунки соответствующими крышками (или новыми) и оставьте не менее чем на 3 минуты.
- Тщательно перемешайте планшет NGSgo-IndX с реакционной смесью на вортексе и отцентрифугируйте в течение короткого времени.
- Снимите крышки с планшета с индексами NGSgo-IndX.
- Внесите 10 мкл элюата каждого образца из Протокола 3В в лунки планшета. Общий реакционный объем в каждой лунке будет составлять 22,5 мкл.
- Закройте лунки соответствующими крышками или новыми.
- Перемешайте реакционную смесь, быстро провортексировав планшет. Поместите в термоциклер с нагреваемой крышкой и запустите программу, как описано в таблице 10.

Таблица 10. Протокол термоциклирования для индексирующей ПЦР-реакции с использованием планшета NGSgo-IndX

	Этап	Температура	Длительность
10 циклов	Первичная денатурация	98°C	30 сек
	Денатурация	98°C	10 сек
	Отжиг праймеров	65°C	30 сек
3-этапный цикл	Элонгация	72°C	30 сек
	Окончательная элонгация	72°C	5 мин
	Охлаждение	15°C	∞

28. Центрифугируйте планшет в течение короткого времени и переходите к протоколу

3D для очистки и отбора фрагментов по размеру образцов ДНК с использованием магнитных частиц 0.6x.



Точка безопасной остановки.

После индексирующей ПЦР образцы можно хранить при температуре 4-15°C.

ПРОТОКОЛ 3D. ПУЛИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕК, ОЧИСТКА ДНК И ОТБОР ФРАГМЕНТОВ ПО РАЗМЕРУ С МАГНИТНЫМИ ЧАСТИЦАМИ 0,6x

Важные примечания перед началом работы

- ☐ Подготовьте свежий 80%-й этанол перед использованием.
- ☐ Набор Library Full Kit содержит частицы GenDx-AMPure XP AMPure beads и буфер для элюции GenDx-AMPure XP Elution Buffer.
- ☐ Перед использованием убедитесь, что магнитные частицы и буфер для элюции имеют комнатную температуру.

Протокол

29. Возьмите образцы из термоциклера после завершения индексирующей ПЦР. Объем каждого образца составляет 22,5 мкл.

30. Пулируйте все образцы, перенеся равный объем (2-22,5 мкл) каждого образца в одну новую пробирку.

Общий объем пула должен быть не менее 100 мкл.

Если у вас 4 или меньше образцов, вы не получите объема 100 мкл. В этом случае пулируйте путем переноса 20 мкл каждого образца в одну новую пробирку и пропустите шаг 37. На шаге 39 добавьте объем частиц, равный: 12 мкл x количество образцов (соотношение частицы: ДНК 0,6x).

31. Внесите 100 мкл пула в новую пробирку на 1,5 мл.

32. Проводите все реакции по очистке с магнитными частицами при комнатной температуре. Тщательно перемешайте магнитные частицы на вортексе, чтобы ресуспендировать их.

33. Добавьте 60 мкл ресуспендированных магнитных частиц в 100 мкл пула образцов, в результате чего соотношение частицы: ДНК станет 0,6x.

34. Хорошо перемешайте на вортексе или пипетируя смесь вверх и вниз не менее 10 раз. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре, желательно на шейкере (1500 об/мин).

35. Кратко центрифугируйте (3–4 секунды при 500 об/мин), чтобы собрать жидкость на дне пробирки. Частицы должны остаться в растворе.

36. Поместите пробирку на соответствующий магнитный штатив, подходящий для пробирок объемом 1,5 мл, с открытой крышкой, чтобы отделить частицы от надосадочной жидкости. После того, как раствор станет прозрачным (приблизительно через 5 минут), осторожно удалите надосадочную жидкость.

37. Добавьте 0,8 мл свежеприготовленного 80%-го этанола в пробирку, пока она находится на магнитном штативе. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 секунд, а затем осторожно удалите надосадочную жидкость. Повторите этот шаг ещё раз, всего две промывки.

38. Удалите весь остаточный этанол дозатором на 10 мкл. Визуально убедитесь, что весь

этанол удалён.

39. Высушите частицы на воздухе в течение 3-5 минут, пока пробирка находится на магнитном штативе с открытой крышкой. Убедитесь, что весь этанол испарился. Не пересушивайте частицы, чтобы они не слиплись.

40. Извлеките пробирку с магнитного штатива и элюируйте ДНК от частиц, добавив 66 мкл буфера для элюции GenDx-AMPure XP Elution Buffer.

Если на шаге 36 вы использовали 4 или менее образцов, используйте меньшее количество буфера для элюции (15 мкл x количество образцов).

41. Тщательно перемешайте на вортексе в течение 30 секунд. Убедитесь, что частицы находятся в растворе.

42. Инкубируйте в течение двух минут при комнатной температуре, желательно на шейкере (1500 об/мин).

43. Кратко центрифугируйте (3-4 секунды при 500 об/мин), чтобы собрать жидкость на дне пробирки. Частицы должны остаться в растворе.

44. Поместите пробирку на магнитный штатив. После того, как раствор станет прозрачным (приблизительно через 5 минут), перенесите элюат в новую пробирку. Убедитесь, что частицы не были перенесены; несколько микролитров можно оставить, чтобы предотвратить перенос частиц. Элюат представляет собой окончательный пул библиотек, который будет секвенирован.



Точка безопасной остановки.

Библиотеки можно хранить в течение 4 месяцев при температуре от 4°C до 8°C.

45. Перейдите к Протоколу 4, чтобы количественно определить концентрацию пулированной библиотеки ДНК.

ПРОТОКОЛ 4. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА БИБЛИОТЕКИ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРИМЕТРА QUBIT

Важные примечания перед началом работы

☐ Количественное определение библиотеки можно выполнить с помощью флуориметра Qubit.

☐ Стандартные образцы ДНК Qubit хранятся при 4°C, а краситель и буфер хранятся при комнатной температуре в защищённом от света месте. Перед началом количественного определения ДНК убедитесь, что все реагенты Qubit имеют комнатную температуру.

Протокол

52. Проводите все реакции при комнатной температуре и в защищённом от света месте. Надевайте перчатки при работе с пробирками. Используйте только тонкостенные прозрачные пробирки объёмом 0,5 мл, которые подходят для использования с флуориметром Qubit.

53. Установите две пробирки Qubit для двух стандартных образцов ДНК и одну пробирку Qubit для каждого исследуемого образца.

54. Приготовьте рабочий раствор Qubit, разведя реагент Qubit в буфере Qubit в соотношении 1:200 в соответствии с таблицей 11. Подготовьте 200 мкл рабочего раствора для каждого стандартного образца ДНК или образца ДНК. Рекомендуется сделать мастер-микс с достаточным объёмом для всех образцов и стандартных образцов.

Таблица 11. Состав рабочего раствора Qubit

Компонент	Объём
Реагент Qubit	1 мкл
Буфер Qubit	199 мкл
Общий объём	200 мкл

55. Подготовьте пробирки для анализа Qubit в соответствии с таблицей 12.

Таблица 12. Состав пробирок для анализа Qubit

Компонент	Стандартный образец ДНК	Образец ДНК
Рабочий раствор Qubit	190 мкл	195 мкл
Стандартный образец ДНК (из набора)	10 мкл	-
Образец библиотеки	-	5 мкл
Общий объём	200 мкл	200 мкл

56. Провортексируйте пробирки в течение 2-3 секунд.

57. Инкубируйте пробирки в течение 2 минут при комнатной температуре в защищённом от света месте.

58. Вставьте пробирки во флуориметр Qubit и снимите показания. Определите концентрацию библиотеки.

Концентрацию можно рассчитать автоматически с помощью функции калькулятора разбавления флуориметра Qubit. Чтобы рассчитать концентрацию вручную, умножьте измеренную концентрацию на коэффициент разбавления (40x) разведённого образца ДНК.

59. Умножьте результат, полученный на флуориметре Qubit (нг/мкл) на 1,9, чтобы получить концентрацию в нМ. (Результаты Qubit представлены в нг/мкл.) Чтобы преобразовать концентрацию библиотеки в нМ (наномолярную), концентрацию следует умножить на поправочный коэффициент 1,9. Например, результат Qubit 15 нг/мкл соответствует концентрации библиотеки 28,5 нМ.

60. Концентрация библиотеки должна находиться в диапазоне ~ 10-100 нМ при использовании ~ 250 нг вносимого пула ампликонов.

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРИГОТОВЛЕННЫХ NGS БИБЛИОТЕК

Приготовленные NGS библиотеки могут храниться до 6 месяцев при температуре 4-8°C до проведения HLA-типирования на основе секвенирования нового поколения (NGS).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО СЕКВЕНИРОВАНИЮ

Используйте 2 мкл HLA-ампликонов, полученных с помощью набора реагентов NGSgo-MX6-1 в качестве исходного материала для приготовления библиотеки (протокол 3), которые должны быть в диапазоне от 50 до 1000 нг (оптимально 250 нг).

Концентрацию ампликонов в каждом образце можно нормализовать таким образом, чтобы использовать в качестве стандартного внесения 250 нг. Однако количественная оценка ампликонов не требуется, так как 2 мкл должны равняться оптимальному количеству внесения порядка ~250 нг.

Окончательный пул NGS библиотек, созданный с помощью набора NGSgo Library Full Kit, можно секвенировать на платформе секвенирования Illumina. Платформа для секвенирования MiSeq (Illumina Inc.) (Рег. Удостоверение № РЗН 2014/1568), полностью совместима с

набором реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit. По результатам секвенирования происходит качественное определение аллелей HLA-генов (локусов HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 и DPB1) в образцах ДНК человека на высоком разрешении. Для проведения секвенирования обратитесь к Руководству по эксплуатации на генетический секвенатор MiSeq (Illumina Inc.) (Пер. Удостоверение № РЗН 2014/1568).

Для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina) (Пер. Удостоверение № РЗН 2014/1568) выполните парно-концевое секвенирование с использованием реагентов для секвенирования (Набор реагентов ИВД MiSeq™ Dx v3 (MiSeq™ Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот. Пер. Удостоверение № РЗН 2020/13097).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ И АНАЛИЗУ ДАННЫХ

Для определения HLA-генотипа и метрик качества метода NGS в ходе определения HLA-генотипа с высоким разрешением рекомендуется использовать программное обеспечение «NGSengine». Программное обеспечение в полностью автоматизированном режиме определяет HLA-генотип на основании информации, приведенной в открытой международной базе данных IMGT/HLA.

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

Идентифицируются аллели, включенные в актуальную версию базы данных IMGT HLA.

ВОЗМОЖНЫЕ НЕИСПРАВНОСТИ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Контаминация или смешение ампликонов и/или библиотек

- | | | |
|----|---|---|
| а) | Подозрение на контаминацию или смешение ампликонов и/или библиотек. | Контаминация и/или смешение можно обнаружить, изучив результат HLA-типирования, соотношения аллелей и уровни шума в данных NGS. |
|----|---|---|

Считывание необычно быстрое или долгое

- | | | |
|----|---|---|
| а) | Ферменты для фрагментации/обработки концов не были добавлены в мастер-микс или не были надлежащим образом смешаны при добавлении. | Повторите приготовление библиотеки, уделив особое внимание процессу добавления и смешивания ампликонов, фрагментазы, ферментов и буферов для восстановления концов. |
|----|---|---|

- | | | |
|----|-------------------|--|
| b) | Перефрагментация. | Повторите приготовление библиотеки, следя за тем, чтобы фрагментация выполнялась на льду. Учитывайте в процессе приготовления библиотеки точки безопасной остановки. |
|----|-------------------|--|

- | | | |
|----|-----------------------------|---|
| с) | Недостаточная фрагментация. | Повторно определите пул ампликонов и убедитесь, что ввод ампликонов находится в пределах от 50 нг до 1000 нг. Повторите приготовление библиотеки. |
|----|-----------------------------|---|

- | | | |
|----|--|--|
| d) | Неправильный отбор фрагментов по размеру с магнитными частицами. | Убедитесь, что применяются правильные соотношения ДНК: частицы, как описано в ИПП. Убедитесь, что магнитные частицы имеют комнатную температуру и смешаны до однородного раствора при использовании. |
|----|--|--|

Низкий выход библиотеки

- | | | |
|----|--|--|
| а) | Ферменты для фрагментации/восстановления концов/ смесь лигаз/ энхансер лигирования/ ферменты HiFi PCR или буфер не были добавлены в смесь или не были надлежащим образом смешаны при добавлении. | Неоптимальное приготовление библиотеки может привести к снижению выхода библиотеки. Повторите приготовление библиотеки, если окончательный пул библиотеки составит <4 нМ. Уделите особое внимание добавлению и перемешиванию всех компонентов. |
|----|--|--|

b)	Адаптеры, индексы или фрагменты ДНК не были добавлены в смесь или не были надлежащим образом смешаны при добавлении.	Неоптимальное приготовление библиотеки может привести к снижению выхода библиотеки. Повторите приготовление библиотеки, если окончательный пул библиотеки составит <4 нМ. Уделите особое внимание добавлению и перемешиванию всех компонентов.
c)	Неоптимальные условия циклов.	Убедитесь, что установлена правильная температура и условия циклов для следующих процессов: 1) фрагментация/ восстановление концов, 2) лигирование адаптеров, 3) индексирующая ПЦР.
d)	Этанол не полностью удаляется после сушки магнитных частиц на воздухе.	Любой оставшийся этанол следует удалить дозатором на 10 мкл. Высушите частицы на воздухе в течение 3-5 минут перед элюцией.
e)	Магнитные частицы слипаются во время элюирования.	Убедитесь, что частицы высохли на воздухе в течение 3-5 минут. Не пересушивайте частицы.
f)	Различные объёмы магнитных частиц на образец.	Раствор с частицами следует поместить на вортекс перед использованием, чтобы обеспечить однородность раствора для частиц.
g)	Случайный забор частиц во время промывки и/или элюирования.	Раствор ДНК/частиц можно пипетировать обратно в пробирку. Поместите пробирку на магнит примерно на 5 минут, пока раствор не станет прозрачным. Повторите процедуру промывки или элюирования.
h)	Низкий выход библиотеки после очистки.	Убедитесь, что частицы имеют комнатную температуру и смешаны до однородного раствора при использовании, а процедура очистки выполняется при комнатной температуре.
Необычный вывод данных количественного определения библиотеки		
a)	Концентрация библиотеки ниже/выше, чем обычно.	Ожидается, что концентрация библиотеки будет находиться в диапазоне ~ 10-100 нМ при использовании ~ 250 нг вносимого пула ампликонов. Если концентрация библиотеки отклоняется от нормы, рекомендуется проверить часть пула библиотеки на 1% агарозном геле, чтобы оценить размер фрагментов, выход и качество. Фрагменты ДНК в геле должны иметь размер в диапазоне от 400 до 1000 п.о.
b)	Результаты количественного определения библиотеки не воспроизводимы.	Выполните двойные или тройные измерения серии разведений библиотеки. При отклонении повторных измерений, повторите количественную оценку.
Хранение продуктов ПЦР и библиотек		
a)	Хранение продуктов ПЦР.	Продукты ПЦР можно хранить до 3 месяцев при температуре от 4°C до 8°C. Если температура и/или продолжительность хранения превышают этот диапазон, целостность продуктов ПЦР можно проверить на агарозном геле перед тем, как приступить к приготовлению библиотеки. Продукты ПЦР не требуют очистки (например, Exo/SAP) перед хранением.
b)	Хранение промежуточных библиотек.	Библиотеки <u>нельзя</u> хранить после этапа фрагментации или лигирования адаптеров (Протокол 3А). Библиотеки можно безопасно хранить в течение ночи после этапов очистки магнитными частицами (при температуре от 4 °C

до 8 °С) или после индексирующей ПЦР (при температуре от 4°С до 15°С).

с) Хранение финальной библиотеки.

Финальная (неденатурированная) библиотека может храниться до 4 месяцев при температуре от 4°С до 8°С перед секвенированием. Используйте свежedenатурированные библиотеки для секвенирования.

СОГЛАШЕНИЕ ОБ ОГРАНИЧЕННОЙ ЛИЦЕНЗИИ

Использование данного изделия означает согласие любого покупателя или пользователя наборов реагентов NGSgo Library Full Kit со следующими условиями:

☐ Наборы реагентов NGSgo Library Full Kit можно применять исключительно в соответствии с инструкцией по применению NGSgo Library Full Kit. Компания «GenDx» не предоставляет на основании своих прав на интеллектуальную собственность каких-либо лицензий на использование или компонентов данного набора или их совместное использование с любыми иными компонентами, не входящими в состав данного набора, за исключением случаев, указанных в документе «Инструкция по применению» для NGSgo Library Full Kit протоколах, размещённых на сайте www.GenDx.com.

☐ Компания «GenDx» не даёт гарантий (кроме гарантий, однозначно указанных в лицензиях) того, что данный набор и/или его использование не нарушают права третьих лиц.

☐ Лицензия на данный набор и его компоненты предполагает их одноразовое использование, поэтому их повторное использование, восстановление или перепродажа запрещены.

☐ Компания «GenDx» напрямую отказывается от любых других лицензий (в прямой или косвенной форме), за исключением однозначно указанных.

☐ Покупатель и пользователь программного обеспечения согласны не предпринимать и не разрешать другим лицам предпринимать любые действия, которые могут привести к или способствовать любым вышезапрещённым действиям. Компания «GenDx» может потребовать в судебном порядке соблюдения ограничений настоящего Соглашения об ограниченной лицензии в любом суде, при этом должна возместить все свои расходы на расследование и судебные издержки, в т.ч. на оплату услуг адвоката в любом иске по обеспечению соблюдения настоящего Соглашения об ограниченной лицензии или любого из своих прав интеллектуальной собственности на программное обеспечение.

Последние обновления условий лицензии см. на сайте www.GenDx.com.

СТЕРИЛЬНОСТЬ

Поставляется в нестерильном виде. Стерильность не требуется.

ТЕКУЩИЙ РЕМОНТ

Не требуется.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Не требуется.

ИНФОРМАЦИЯ О ВОЗМОЖНОСТИ ПОВТОРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Не подлежит повторному применению.

ПЕРЕЧЕНЬ СТАНДАРТОВ, КОТОРЫМ СООТВЕТСТВУЕТ МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

NEN-EN-ISO 13485:2016/C12:2018	Медицинские изделия. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования (ISO 13485:2016)	2018
NEN-EN-ISO 19011	Руководящие указания по аудиту систем менеджмента	2018
NEN-EN-ISO 22301+CLN1	Социальная и гражданская безопасность	2019
NEN-EN 13612:2002/C1:2003	Оценка эффективности медицинских изделий для диагностики in vitro	2003
NEN-EN-ISO 14971:2019	Медицинские изделия. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям	2019
NPR-CEN-ISO / TR 24971:2020 en	Медицинские изделия. Руководство по применению стандарта ISO 14971 (ISO/TR 24971:2020,IDT)	2020
NEN-EN-ISO 15223-1:2016(Cor. 2017-04)	Изделия медицинские. Символы, используемые на этикетках медицинских изделий, в маркировке и информации, предоставляемой производителем. Часть 1	2016
NEN-EN-ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая производителем (маркировка). Часть 1: Термины, определения и общие требования (ISO 18113-1:2009,IDT)	2011
NEN-EN-ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая производителем (маркировка). Часть 2: Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования (ISO 18113-2:2009,IDT)	2011
NEN-EN-ISO 23640:2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro (ISO 23640:2011,IDT)	2015
Регламент (ЕС) № 1272/2008	Классификация, маркировка и упаковка веществ и смесей	2008
NEN ISO 20916: 2019	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Исследования клинических характеристик с использованием образцов человека. Надлежащая практика исследований +	2019
NPR-CEN-ISO / TR 20416: 2020 en	Медицинские изделия. Надзор изготовителей после размещения продукции на рынке	2020
IEC 62366-1:2015+A1:2020-CSV en	Медицинские изделия. Часть 1: Проектирование медицинских изделий с учётом эксплуатационной пригодности	2020
NPR-IEC/TR 62366-2:2016 en	Медицинские изделия. Часть 2: Руководство по применению проектирования с учётом эксплуатационной пригодности к медицинским изделиям	2020
NEN-EN-ISO 9000:2015 en	Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь	2015
SOR/98-282	Положение об эксплуатации медицинских изделий (Канада)	Июнь, 2019
РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 2017/746	Медицинские изделия для диагностики in vitro	2017

Резолюция RDC № 16 (Бразилия)	Утверждает Технический регламент по надлежащей производственной практике медицинских изделий и изделий для диагностики <i>in vitro</i> и содержит другие положения.	2013
РЕЗОЛЮЦИЯ – RDC № 23 (Бразилия)	Правила обязательного выполнения и отчётности о действиях в отношении изделий владельцами регистрации изделий медицинского назначения в Бразилии.	2012
РЕЗОЛЮЦИЯ – RDC № 36 (Бразилия)	Описывает классификацию рисков, системы кадастрового и регистрационного контроля, а также требования к маркировке и инструкции по применению изделий для диагностики <i>in vitro</i> , включая их инструменты, а также содержит другие положения.	2015
РЕЗОЛЮЦИЯ – RDC № 56 (Бразилия)	рассматривает необходимость наличия минимальных требований для подтверждения безопасности и эффективности изделий медицинского назначения;	2001
РЕЗОЛЮЦИЯ – RDC № 67 (Бразилия)	Положения, касающиеся надзора после размещения продукции на рынке, применимые к владельцам регистрации изделий медицинского назначения в Бразилии.	2009

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

При использовании в медицинских учреждениях утилизировать по классу А или Б (СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»). Утилизация изделия должна производиться в соответствии с требованиями местного, регионального и национального законодательства.

Неиспользованные наборы, у которых закончился срок годности, а также компоненты наборов, должны быть утилизированы как медицинские отходы класса А.

ГАРАНТИЙНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик медицинского изделия заявленным в эксплуатационной документации при условии применения изделия в соответствии с инструкцией и по назначению, предусмотренному производителем.

По всем вопросам, для получения технической консультации и поддержки, а также подачи рекламаций следует обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

Акционерное общество «БиоХимМак Диагностика» (АО «БиоХимМак Диагностика»)

119192, г Москва, Ломоносовский проспект, дом 29, корпус 1, комната 3, этаж 1, помещение IV

тел.: (495) 647-27-40

Веб-сайт: www.biochemmack.ru

Ссылка: DU/RGE (02 марта 2023 г.)

Документ: 2023.0035.20

ЛЕГАЛИЗАЦИЯ

Я, Ингеборг Маргарит Дюверман, нотариус, действующий в системе гражданского права, практикующий в г. Утрехте, Нидерланды, удостоверяю в целях легализации подпись Витсе Малдера, действующего в качестве управляющего директора частной компании с ограниченной ответственностью: «Геном Диагностикс Б.В.» (Genome Diagnostics B.V.), зарегистрированной в соответствии с законодательством Нидерландов, юридический адрес в г. Утрехте, фактический адрес: Ялелан 48, 3584 CM Утрехт, указанной в Торговом реестре Голландской торговой палаты под номером: 30202468, далее по тексту: Компания.

1. Настоящая легализация относится к подписи на прилагаемых документах, а также к полномочиям подписавшегося лица.

2. Приложение прошло стандартную процедуру. Кроме того, на каждой странице имеется печать нотариуса, оттиск которой теряется, когда с содержащего печать документа делается копия.

Личность Витсе Малдера была удостоверена мной, нотариусом по гражданским делам, на основании паспорта. В соответствии с выпиской из Торгового реестра Голландской торговой палаты в настоящий момент Витсе Малдер уполномочен представлять компанию «Геном Диагностикс Б.В.» (Genome Diagnostics B.V.) единолично.

Значение легализации строго ограничено проверкой личности и подтверждения в отношении подписи, а также полномочий подписавшего.

Содержание подписанного документа и правовые последствия, возникающие из него, мной как нотариусом по гражданским делам, оценены не были.

Общие положения и условия компании «Германс энд Шаттеваер Нотариссен Н.В.», зарегистрированной в г. Утрехте, Нидерланды, применяются к нашим услугам. Общие положения и условия переданы в канцелярию федерального окружного суда в г. Утрехте, Нидерланды, под номером 37/2013.

Утрехт, Нидерланды, 02 марта 2023 г.

(подпись)

И.М. Дюверман

«Германс энд Шаттеваер Нотариссен Н.В.»
www.herschut.nl

гототип/ GenDx

2.03.2023 г.

для предоставления в компетентные органы здравоохранения в Российской Федерации

Настоящим я подтверждаю, что содержание инструкции по применению медицинского изделия «Набор реагентов для приготовления библиотек и индексирования NGSgo Library Full Kit для типирования генов HLA на высоком разрешении методом секвенирования следующего поколения (NGS)» является действительным и верным.

Компания «Геном Диагностикс Б.В.» (Genome Diagnostix B.V.) Ялелан 48, 3584 CM Утрехт, Нидерланды, является официальным производителем изделия, указанного в инструкции по применению.

от имени компании «Геном Диагностикс Б.В.»:

Печат: GenDx

Ялелан 48, 3584 CM Утрехт

Нидерланды

Торговый реестр: 30202468 | НДС: NL814323194b01

Подпись

Витсе Малдер, доктор наук

Управляющий директор

«GenDx» | «Александр Нуман Билдинг» | Ялелан 48 | 3584 CM Утрехт | Нидерланды

Телефон: +31 (0) 30 252 3799 | info@gendx.com | www.GenDx.com

Международный номер банковского счёта: NL73 RABO 0311 3449 76 | БИК: RABONL2U | НДС: NL814323194B01

Торговый реестр: 30202468 | «GenDx» является зарегистрированной торговой маркой компании «Геном Диагностикс Б.В.»

персонализация
диагностики

Далее следует текст на русском языке

Переводчик

Троицкая О.Н.

Российская Федерация

Город Москва

Пятнадцатого марта две тысячи двадцать третьего года

Я, Кузнецова Наталья Ириковна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Троицкой Олеси Николаевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/217-н/77-2023-3-303

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.

Н.И. Кузнецова



Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 34 листов.
I m f u g i s a n t e c o n t r a
Нотариус _____

