

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ»	Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»	
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ	#UM_L-102ru	Страница 1 из 69	

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Меркулов И.А.

«30» октября 2024 г.



Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»

для определения клинически значимых генетических вариантов,
ассоциированных с немелкоклеточным раком легкого, методом
высокопроизводительного секвенирования

по ТУ 21.20.23-027-39429653-2023

Каталожный номер

- OS-L1-96 • OS-L13-16
- OS-LS1-96 • OS-L14-16
- OS-L11-16 • OS-L15-16
- OS-L12-16 • OS-L16-16

Символы

	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Код партии
	Номер по каталогу
	Использовать до
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Символ наличия дополнительной информации о безопасности в соответствующем разделе инструкции по применению
	Символ опасности для здоровья человека
	Символ «Коробка» для обозначения упаковки в составе изделия

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ.....	5
1.1.	СОКРАЩЕНИЯ, ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	5
1.2.	НАЗНАЧЕНИЕ	7
1.3.	ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	9
1.4.	ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ.....	9
1.5.	НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ.....	9
1.6.	ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	10
1.7.	ОПИСАНИЕ	10
1.8.	ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ	12
1.9.	КОМПЛЕКТНОСТЬ И ВАРИАНТЫ ИСПОЛНЕНИЯ	12
1.10.	СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	13
1.11.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	19
1.12.	ИНТЕРФЕРЕНТЫ.....	21
1.13.	ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	23
1.14.	ИЗВЕСТНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ.....	23
1.15.	РИСКИ, СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗДЕЛИЯ	24
1.16.	ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ	24
1.17.	ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ	25
1.18.	МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ.....	26
1.19.	УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ.....	28
2.	ПРОТОКОЛ	28
2.1.	ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК	29
2.2.	ПОДГОТОВКА К СЕКВЕНИРОВАНИЮ И ДЕНАТУРАЦИЯ	34
2.3.	СЕКВЕНИРОВАНИЕ.....	35
3.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	42
3.1.	АЛГОРИТМ АНАЛИЗА ДАННЫХ.....	42
3.2.	КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	43
3.2.1.	Метрики качества образца	43
3.2.2.	Метрики качества ДНК	43
3.2.3.	Метрики качества РНК.....	43
3.2.4.	Алгоритм контроля качества.....	43
3.2.5.	Пороговые значения метрик качества.....	44
3.2.6.	Библиотека контрольных образцов (КД/КР).....	45
3.3.	ВНЕШНИЕ ИСТОЧНИКИ АННОТАЦИИ	45
3.4.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	46
3.5.	УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ.....	49
4.	ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ.....	51
ПК	4.1. РЕКОМЕНДОВАННЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬСКОГО	52
	ДОСТУП К ПО.....	52
	4.3. ИМПОРТ ДАННЫХ.....	52
	4.3.1. Выбор серии реагентов.....	53
	4.3.2. Заполнение метаданных.....	53

4.3.3.	Добавление образцов.....	53
4.3.4.	Загрузка.....	54
4.4.	АНАЛИЗЫ	54
4.5.	ДЕТАЛИ АНАЛИЗА ОБРАЗЦА.....	54
4.5.1.	Варианты.....	55
4.5.2.	Хотспоты «NSCLC».....	56
4.5.3.	Визуализация прочтений в геномном браузере IGV	58
4.5.4.	Анализ покрытия	58
4.5.5.	BIDs.....	59
4.6.	АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ	59
4.6.1.	Менеджмент аннотации.....	61
4.6.2.	Просмотр аннотации варианта	63
4.6.3.	Подписки на аннотации	63
4.7.	ХОТСПОТЫ	64
4.8.	ОТЧЕТ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА	65
4.9.	ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	66
5.	ОТКАЗ ОТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ.....	66
6.	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	66
6.1.	УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ.....	66
6.2.	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ	67
7.	СРОК ГОДНОСТИ	68
8.	ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА.....	68
9.	УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ	68
10.	КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	69

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. СОКРАЩЕНИЯ, ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

ACMG – Руководство по интерпретации генетических вариантов: совместный Консенсус Американского колледжа медицинской генетики и геномики, и Ассоциации молекулярных патологов (Richards S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24).

ACMG значимость – значимость герминативного генетического варианта по критериям Американского колледжа медицинской генетики.

AMP – Руководство по интерпретации генетических вариантов и выдаче заключений в онкологии: совместный Консенсус Ассоциации молекулярных патологов, Американского общества клинической онкологии и Колледжа американских патологов (Li MM et al. Standards and guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017 Jan;19(1):4-23).

AMP уровень – уровень значимости соматического генетического варианта по критериям Американского общества молекулярных патологов.

BIDs – биологический идентификатор образца. Дополнительные 13 пар праймеров в ДНК пуле праймеров, 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).

CI – доверительный интервал.

FFPE (Formalin-fixed paraffin-embedded) – образец ткани, фиксированный в формалине и заключенный в парафиновый блок.

FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) – цитогенетический метод, применяемый для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах *in situ*.

HGNC номенклатура – номенклатура значимых генов человека Комитета по номенклатуре Международной организации по изучению генома человека (HUGO).

HGVS номенклатура – номенклатура генетических вариантов Общества по изучению вариаций генома человека (HGVS).

HKG (House-keeping genes; гены «домашнего хозяйства») – стабильно экспрессирующиеся в разных типах тканей гены, как правило, необходимые для поддержания базовых процессов жизнедеятельности клетки – анаболизм, катаболизм и другие. Гены «домашнего хозяйства» экспрессируются в большинстве тканей, вследствие чего служат положительным контролем качества РНК-аналита. Кроме того, покрытие генов «домашнего хозяйства» используется при расчете 5'/3' дисбаланса.

HQR (High-quality region) – регион с высоким качеством секвенирования. Участок целевого региона с покрытием не менее 64 по каждой из цепей ДНК. Генотипирование проводится только в регионах с высоким качеством.

IHC (Immunohistochemistry) – метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомым веществ и основанный на

обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в данной ситуации служит антигеном.

LQR (Low-quality region) – регион с низким качеством секвенирования. Участок целевого региона с покрытием менее 64 по каждой из цепей ДНК. В регионах с низким качеством генотипирование не проводится.

Soft-clip позиции – краевые позиции выравненного прочтения, имеющие замены относительно референсной последовательности.

Адаптер – синтетический олигонуклеотид известной последовательности, который может быть добавлен к 3' или 5' концам фрагмента нуклеиновой кислоты.

Аллельная фракция – доля прочтений с альтернативной аллели от общего числа прочтений в локусе.

Ампликон – продукт ПЦР амплификации, включающий последовательности праймеров.

Аналит – компонент, представленный в названии измеряемой величины.

Вставка – добавление одной или нескольких пар нуклеотидных оснований в последовательности ДНК.

Массивное параллельное секвенирование (MPS, или секвенирование нового поколения, NGS) – метод, позволяющий проводить высокопроизводительное секвенирование ДНК с использованием концепции параллельной обработки очень большого числа молекул.

Генетический вариант (мутация) – отличия одного или нескольких оснований нуклеиновой кислоты в последовательности по отношению к ожидаемому(мым) основанию(ям).

Ген-партнер – ген, обладающий значительным уровнем экспрессии в определённой ткани, в результате транслокации с онкогеном приводящий к образованию фьюжен-гена с повышенной экспрессией, и, как следствие, к развитию онкологического заболевания.

Герминативный генетический вариант – изменение последовательности ДНК, возникающее в половых клетках и передающееся по наследству.

Делеция – потеря одной (или более) пары нуклеотидных оснований из последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с ее эталонной последовательностью.

Двойное комбинаторное индексирование – индексирование секвенируемых образцов, при котором каждый образец маркируется парой индексов, при этом в запуске уникальной является пара индексов, тогда как каждый отдельный индекс может маркировать несколько образцов.

Индекс – уникальная последовательность, маркирующая секвенируемые фрагменты ДНК, принадлежащие одному образцу.

Индел (INDEL) – вставка или делеция нуклеотидов в геноме ДНК.

Мультинуклеотидная замена (MNV) – однонуклеотидные замены, расположенные в пределах 3 п.н., и инсерции/делеции, расположенные в пределах 4 п.н.

Набор реагентов либо **Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»** - Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» для определения клинически значимых генетических вариантов, ассоциированных с немелкоклеточным раком легкого, методом высокопроизводительного секвенирования по ТУ 21.20.23-027-39429653-2023.

НК – нуклеиновая кислота.

NMPЛ (NSCLC) – немелкоклеточный рак легкого (non-small cell lung cancer).

Однонуклеотидная замена (SNV) – изменение одного нуклеотида в ДНК.

Биоинформатический конвейер (пайплайн) – отдельные программы, сценарии или части программного обеспечения, связанные между собой, в которых необработанные данные

или выход одной программы используют в качестве входных данных для следующего этапа обработки данных.

Потеря экзона (EXLOSS) – пропуск экзона в результате делеции экзона в ДНК или альтернативного сплайсинга мРНК.

Приобретение экзона (EXGAIN) – появление нового экзона (целого или части) в результате дупликации или перетасовки экзонов.

Праймер – олигонуклеотид, служащий затравкой при ПЦР.

Соматический генетический вариант – изменение последовательности ДНК, возникающее в соматических (не половых) клетках, не передающееся по наследству.

Сплит-прочтения – химерные прочтения, не имеющие непрерывного выравнивания на референсный геном, но имеющие как минимум два частичных выравнивания на референсный геном.

Фьюжен-ген (FUSION) – ген, образованный путем транслокации 3'-конца онкогена с 5'-эндом гена партнера (как правило, имеющего высокий уровень экспрессии в анализируемой ткани).

Хотспот – значимый генетический вариант.

1.2. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» для определения клинически значимых генетических вариантов, ассоциированных с немелкоклеточным раком легкого, методом высокопроизводительного секвенирования по ТУ 21.20.23-027-39429653-2023 предназначен для таргетного обогащения целевых регионов генома и транскриптома с последующим созданием библиотек для высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina MiSeq System (ПУ №РЗН 2014/1568 от 29.04.2014) и качественного определения значимых генетических вариантов в образцах геномной ДНК и тотальной РНК, выделенных из фиксированных в формалине и заключенных в парафин (FFPE) образцов тканей НМРЛ, влияющих на чувствительность к таргетной терапии НМРЛ.

Перечень генов, клинически значимых вариантов и препаратов:

NSCLC ДНК			
Ген	Транскрипт	Анализируемые маркеры	Препараты*
ALK	NM_004304.5	активирующие мутации (в т.ч. F1245L, R1192P)	Резистентность к анти-ALK ингибиторам тирозинкиназ (1)
BRAF	NM_004333.6	V600	Дабрафениб Траметиниб
EGFR	NM_005228.5	активирующие мутации (в т.ч. L858R, del ex19, ins ex20, G719, T790M, L861Q, S768I)	Афатиниб Гефитиниб Эрлотиниб Осимертиниб
ERBB2	NM_004448.4	активирующие мутации (в т.ч. ins ex20)	Трастузумаб дерукстекан (2)
KRAS	NM_004985.5	активирующие мутации (в т.ч. G12, G13, Q61)	Соторасиб
MET	NM_001127500.3	активирующие мутации (в т.ч. Y1021, D1246N, D1246V, D1028)	Капматиниб

NRAS	NM_002524.5	активирующие мутации (в т.ч. G12, G13, Q61)	Траметиниб, кобиметиниб (3)
PIK3CA	NM_006218.4	H1047, E542K, E545, Q546R, E453K	Алпелисиб (4)
ROS1	NM_002944.3	активирующие мутации (в т.ч. R2072W, R2039C, D2033N, G2032R, L2026M, S1986F, S1986Y)	Резистентность к анти-ROS1 ингибиторам тирозинкиназ (5)
TP53	NM_000546.6	SNV, MNV, INDEL (в т.ч. V157F, R175H, L194F, G245V, R248Q, R273C, R280K, R282W)	Препараты на стадии КИ (6)

NSCLC PHK			
Ген	Транскрипт	Анализируемые маркеры	Препараты
NTRK1	NM_002529.4	транслокации	Энтретиниб Ларотрентиниб
NTRK2	NM_001018064.3	транслокации	Энтретиниб Ларотрентиниб
NTRK3	NM_001012338.3	транслокации	Энтретиниб Ларотрентиниб
ALK	NM_004304.5	транслокации	Кризотиниб Алектиниб Церитиниб Лорлатиниб
ROS1	NM_002944.3	транслокации	Кризотиниб Энтретиниб
RET	NM_020975.6	транслокации	Селперкатиниб (7)
MET	NM_001127500.3	METloss14ex	Капматиниб
ERBB2	NM_004448.4	ERBB2loss16ex	Трастузумаб дерукстекан

(1) Первичная и вторичная резистентность к препаратам кризотиниб, алектиниб, церитиниб, лорлатиниб.

(2) Трастузумаб дерукстекан – зарегистрирован в РФ для рака молочной железы, для НМРЛ может назначаться по решению врачебной комиссии.

(3) Траметиниб, кобиметиниб – зарегистрирован в РФ для меланомы кожи, для НМРЛ может назначаться по решению врачебной комиссии.

(4) Алпелисиб – зарегистрирован в РФ для рака молочной железы, для НМРЛ может назначаться по решению врачебной комиссии.

(5) Первичная и вторичная резистентность к препаратам кризотиниб, энтретиниб

(6) Nishikawa S, Iwakuma T. Drugs Targeting p53 Mutations with FDA Approval and in Clinical Trials. Cancers (Basel). 2023 Jan 9;15(2):429.

(7) Селперкатиниб – зарегистрирован в РФ для рака щитовидной железы, для НМРЛ может назначаться по решению врачебной комиссии.

***Назначение приведенных лекарственных препаратов осуществляется исключительно лечащим врачом.**

Функциональное назначение:

Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» является вспомогательным средством в диагностике.

Популяционные и демографические аспекты применения:

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

1.3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

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

1.4. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

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

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

1.5. НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, рак легкого является самой частой причиной смерти среди всех онкологических заболеваний, унеся около 1'800'000 жизней в 2020 году [3]. Пятилетняя выживаемость после установления диагноза варьирует от 4% до 17%. Ранняя диагностика затруднена из-за низкой чувствительности неинвазивных методов (радиографии грудной клетки и цитологического исследования мокроты). У 75% пациентов заболевание диагностируется на стадии прогрессии [1].

Факторы риска заболевания включают в себя: активное или пассивное курение табака, курение электронных сигарет, повышенная концентрация радона во вдыхаемом воздухе, факторы окружающей среды и личная история заболеваний дыхательных путей пациента [2].

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ, NSCLC) – самый распространенный тип рака легкого. На его долю приходится до 90% всех случаев заболевания [3]. НМРЛ объединяет три заболевания – аденокарциному, плоскоклеточный рак и крупноклеточный рак (недифференцированный), среди которых самый распространенный – аденокарцинома, рак железистых клеток дыхательных путей, составляющий около 40% всех случаев [4].

НМРЛ подразделяют на 4 стадии (I–IV) по степени поражения тканей самих легких, прилегающих лимфатических узлов, а также наличию метастазов [5]. Основным способом лечения рака легкого на ранних стадиях остается хирургическое удаление опухоли в сочетании с химиотерапией и радиолучевой терапией [6]. Согласно Российским рекомендациям [5,7] по диагностике и лечению НМРЛ, следует проводить генетическое тестирование пациентов на наличие мутаций в следующих генах: ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, MET, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET, ROS1.

При выявлении драйверных мутаций в этих генах пациентам показано назначение таргетных препаратов, направленных на подавление работы мутировавших белков и остановку прогрессии заболевания. Также обнаружение генетических перестроек может использоваться как критерий включения пациента в клиническое исследование [2].

Методы высокопроизводительного секвенирования ДНК позволяют быстро и точно определять нуклеотидную последовательность интересующих генов за счет 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 генетических вариантов, ассоциированных с развитием рака, рекомендуется применять технологию высокопроизводительного секвенирования, поскольку данный метод позволяет исследовать широкий спектр значимых генетических вариантов и достичь максимальной диагностической чувствительности [1].

Список использованных источников:

1. Wadowska K., Bil-Lula I., Trembecki L., Sliwinska-Mosson M. Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(13), 4569.
2. Schabath M., Dalvi T., A Dai H., et al. A Molecular Epidemiological Analysis of Programmed Cell Death Ligand-1 (PD-L1) Protein Expression, Mutations and Survival In Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Manag Res. 2019 Nov 7; 11:9469-9481.
3. Planchard D., Popat S., Kerr K., et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. Ann Oncol. 2018 Oct 1;29(Suppl 4): iv192-iv237.
4. Myers D., Wallen J. Lung Adenocarcinoma. StatPearls Publishing LLC, 2022.
5. Лактионов К. К., Артамонова Е. В., Бредер В. В., Горбунова В. А., Демидова И. А., Деньгина Н. В. и соавт. Практические рекомендации по лекарственному лечению немелкоклеточного рака легкого. Практические рекомендации RUSSCO, часть 1. Злокачественные опухоли, 2023 (том 13), #3s2, стр. 42-65.
6. Postmus P., Kerr K., Oudkerk M., et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. Ann Oncol. 2017 Jul 1;28(suppl_4): iv1-iv21.
7. Министерство Здравоохранения Российской Федерации, Клинические рекомендации "Злокачественное новообразование бронхов и легкого, 2021.

1.6. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показания к применению: определение значимых генетических вариантов в образцах геномной ДНК и тотальной РНК тканей НМРЛ, влияющих на чувствительность к таргетной терапии НМРЛ.

Противопоказания к применению: Набор реагентов не имеет противопоказаний к применению в рамках назначения, установленного производителем.

1.7. ОПИСАНИЕ

Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» для определения клинически значимых генетических вариантов, ассоциированных с немелкоклеточным раком легкого, методом высокопроизводительного секвенирования по ТУ 21.20.23-027-39429653-2023 позволяет проводить таргетное обогащение регионов генома и транскриптома, ассоциированных с НМРЛ, приготовление ДНК и РНК библиотек и, в сочетании с реагентами для секвенирования на платформе Illumina, секвенировать образцы и идентифицировать варианты, ассоциированные с НМРЛ.

Диагностика с использованием Набора реагентов может проводиться в медицинских учреждениях, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот и высокопроизводительное секвенирование на генетических секвенаторах нового поколения.

Формат определения – качественный.

Тип анализируемого образца: геномная ДНК человека, выделенная из FFPE-образца ткани НМРЛ/ тотальная РНК человека, выделенная из FFPE-образца ткани НМРЛ.

Выделение ДНК и РНК проводится в соответствии с инструкцией используемого набора для выделения. **Рекомендуемый набор для выделения ДНК и РНК – Набор реагентов «PureCode™ DNA/RNA Double Magnetic FFPE» для выделения ДНК и РНК из образцов тканей FFPE методом сорбции на магнитных частицах по ТУ 21.20.23-028-39429653-2023 (кат. РС-DMDR-50-IVD, ООО «ПАРСЕК ЛАБ»).**

Полный список целевых регионов и анализируемых маркеров Набора реагентов представлены в таблице:

№	Ген	Транскрипт	Анализируемые маркеры	Целевые регионы
NSCLC ДНК				
1	ALK	NM_004304.5	SNV, MNV, INDEL	экзоны 20-25
2	BRAF	NM_004333.6	SNV, MNV, INDEL	экзоны 11, 15
3	EGFR	NM_005228.5	SNV, MNV, INDEL	все экзоны
4	ERBB2	NM_004448.4	SNV, MNV, INDEL	экзоны 16-21
5	KRAS	NM_004985.5	SNV, MNV, INDEL	все экзоны
6	MET	NM_001127500.3	Y1021X, D1028X, D1246N	экзон 14, 19
7	NRAS	NM_002524.5	SNV, MNV, INDEL	все экзоны
8	PIK3CA	NM_006218.4	SNV, MNV, INDEL	экзоны 2, 8, 10, 21
9	ROS1	NM_002944.3	R2072W, R2039C, D2033N, G2032R, L2026M, S1986F, S1986Y	экзоны 37-39
10	TP53	NM_000546.6	SNV, MNV, INDEL	все экзоны
NSCLC РНК онкогены				
1	NTRK1	NM_002529.4	FUSION	границы всех экзонов
2	NTRK2	NM_001018064.3	FUSION	границы всех экзонов
3	NTRK3	NM_001012338.3	FUSION	границы всех экзонов
4	ALK	NM_004304.5	FUSION	границы всех экзонов
5	ROS1	NM_002944.3	FUSION	границы всех экзонов
6	RET	NM_020975.6	FUSION	границы всех экзонов
7	MET	NM_001127500.3	EXLOSS	экзон 14
8	ERBB2	NM_004448.4	EXLOSS	экзон 16
NSCLC РНК гены-партнеры				
1	IRF2BP2	NM_182972.3	FUSION	границы всех экзонов
2	SQSTM1	NM_003900.5	FUSION	границы всех экзонов
3	TPM3	NM_152263.4	FUSION	границы всех экзонов
4	TRIM24	NM_015905.3	FUSION	границы всех экзонов
5	AKAP13	NM_007200.5	FUSION	границы всех экзонов
6	ETV6	NM_001987.5	FUSION	границы всех экзонов
7	EML4	NM_019063.5	FUSION	границы всех экзонов
8	CD74	NM_001025159.3	FUSION	границы всех экзонов
9	KIF5B	NM_004521.3	FUSION	границы всех экзонов
NSCLC РНК гены «домашнего хозяйства» (house-keeping genes)				

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ»	Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»	
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ		#UM_L-102ru	Страница 12 из 69

1	CHMP2A	NM_014453.4	нет	границы всех экзонов
2	GUSB	NM_000181.4	нет	границы всех экзонов
3	LMNA	NM_170707.4	нет	границы всех экзонов
4	LRP1	NM_002332.3	нет	границы всех экзонов
5	OAZ1	NM_004152.3	нет	границы всех экзонов
6	TBP	NM_003194.5	нет	границы всех экзонов
7	VCP	NM_007126.5	нет	границы всех экзонов

1.8. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» включает полный комплект реагентов, необходимых для приготовления библиотек для таргетного секвенирования. С использованием Набора реагентов проводится обогащение целевых регионов генов, ассоциированных с развитием НМРЛ, методом мультиплексной ПЦР и ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров с последующим созданием библиотек ампликонов, анализируемых методом высокопроизводительного секвенирования, и последующим биоинформатическим анализом с визуализацией полученных результатов.

На первом этапе проводятся реакция таргетного обогащения для образцов геномной ДНК и объединенная реакция обратной транскрипции и таргетного обогащения для образцов тотальной РНК. Таргетное обогащения для обоих аналитов проводится методом мультиплексной ПЦР с использованием специфических праймеров, содержащих последовательность универсального адаптера для платформы Illumina. Ампликоны, полученные в ходе таргетного обогащения ДНК и РНК, объединяются в одну реакцию и подвергаются очистке на магнитных частицах, после чего осуществляется амплификация библиотеки и молекулярное индексирование образцов. Финальная библиотека проходит очистку на магнитных частицах.

Секвенирование осуществляется на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.). 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 «OncoScope™ Software»¹ (ООО «ПАРСЕК ЛАБ»). Программное обеспечение выполняет выравнивание прочтений, оценку качества, идентификацию генетических вариантов, визуализацию данных и формирование отчета по результатам анализа.

1.9. КОМПЛЕКТНОСТЬ И ВАРИАНТЫ ИСПОЛНЕНИЯ

Набор реагентов выпускается в двух вариантах комплектации – на 96 реакций и на 16 реакций. Вариант комплектации на 96 реакций выпускается в двух вариантах исполнения (с включением реагентов для секвенирования и без), вариант комплектации на 16 реакций выпускается в шести вариантах исполнения, отличающихся между собой наборами индексированных праймеров. Варианты исполнения не влияют на функционал, но при этом позволяют выбирать удобное сочетание индексов.

Для варианта исполнения на 96 реакций без включения реагентов для секвенирования (set 1S) можно использовать реагенты для секвенирования из других вариантов исполнения (set 1, set 1-1, set 1-2, set 1-3, set 1-4, set 1-5, set 1-6).

¹ Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024660495 от 07.05.2024.

Все варианты исполнения Набора реагентов предусмотрены для однократного применения без возможности дробных постановок.

№	Кат. #	Вариант исполнения
96 реакций		
1	OS-L1-96	set 1
2	OS-LS1-96	set 1S
16 реакций		
3	OS-L11-16	set 1-1
4	OS-L12-16	set 1-2
5	OS-L13-16	set 1-3
6	OS-L14-16	set 1-4
7	OS-L15-16	set 1-5
8	OS-L16-16	set 1-6

Комплектность:

- Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» – 1 шт.
- Инструкция по применению – прикладывается к поставке медицинского изделия вне зависимости от количества изделий в поставке – 1 шт.
- Электронная версия инструкции по применению – <https://parseq.pro>.
- Паспорт – прикладывается к поставке медицинского изделия вне зависимости от количества изделий в поставке – 1 шт.

1.10. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

№ п/п	Компонент набора реагентов	Объем	Количество	Внешний вид
Вариант исполнения set 1				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	600 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	600 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	1200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
6	Обратная транскриптаза (ОТ)	130 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	6400 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	3600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными	55 мкл x 96	96 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость

	праймерами set 1 (ПС2 с ИП)			
10	Картридж для секвенирования	-	1 штука	Пластиковый контейнер с ячейками, заполненными жидкостью
11	Буфер НТ1	4,5 мл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
12	Ячейка для секвенирования	-	1 штука	Флакон с ячейкой, погруженной в бесцветную жидкость
13	Раствор PR2	500 мл	1 флакон	Бесцветная жидкость
14	ПО OncoScope™ Software	Доступ к веб-приложению		
Вариант исполнения set 1S				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	600 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	600 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	1200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
6	Обратная транскриптаза (ОТ)	130 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	6400 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	3600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1S (ПС2 с ИП)	55 мкл x 96	96 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость
10	ПО OncoScope™ Software	Доступ к веб-приложению		
Вариант исполнения set 1-1				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
6	Обратная транскриптаза (ОТ)	25 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	1200 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными	55 мкл x 16	16 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость

	праймерами set 1-1 (ПС2 с ИП)			
10	Картридж для секвенирования	-	1 штука	Пластиковый контейнер с ячейками, заполненными жидкостью
11	Буфер HT1	4,5 мл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
12	Ячейка для секвенирования	-	1 штука	Флакон с ячейкой, погруженной в бесцветную жидкость
13	Раствор PR2	500 мл	1 флакон	Бесцветная жидкость
14	ПО OncoScore™ Software	Доступ к веб-приложению		
Вариант исполнения set 1-2				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
6	Обратная транскриптаза (ОТ)	25 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	1200 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-2 (ПС2 с ИП)	55 мкл x 16	16 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость
10	Картридж для секвенирования	-	1 штука	Пластиковый контейнер с ячейками, заполненными жидкостью
11	Буфер HT1	4,5 мл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
12	Ячейка для секвенирования	-	1 штука	Флакон с ячейкой, погруженной в бесцветную жидкость
13	Раствор PR2	500 мл	1 флакон	Бесцветная жидкость
14	ПО OncoScore™ Software	Доступ к веб-приложению		
Вариант исполнения set 1-3				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость

6	Обратная транскриптаза (ОТ)	25 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	1200 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-3 (ПС2 с ИП)	55 мкл x 16	16 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость
10	Картридж для секвенирования	-	1 штука	Пластиковый контейнер с ячейками, заполненными жидкостью
11	Буфер НТ1	4,5 мл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
12	Ячейка для секвенирования	-	1 штука	Флакон с ячейкой, погруженной в бесцветную жидкость
13	Раствор PR2	500 мл	1 флакон	Бесцветная жидкость
14	ПО OncoScope™ Software	Доступ к веб-приложению		
Вариант исполнения set 1-4				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
6	Обратная транскриптаза (ОТ)	25 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	1200 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-4 (ПС2 с ИП)	55 мкл x 16	16 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость
10	Картридж для секвенирования	-	1 штука	Пластиковый контейнер с ячейками, заполненными жидкостью
11	Буфер НТ1	4,5 мл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
12	Ячейка для секвенирования	-	1 штука	Флакон с ячейкой, погруженной в бесцветную жидкость
13	Раствор PR2	500 мл	1 флакон	Бесцветная жидкость
14	ПО OncoScope™ Software	Доступ к веб-приложению		
Вариант исполнения set 1-5				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость

2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
6	Обратная транскриптаза (ОТ)	25 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	1200 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-5 (ПС2 с ИП)	55 мкл x 16	16 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость
10	Картридж для секвенирования	-	1 штука	Пластиковый контейнер с ячейками, заполненными жидкостью
11	Буфер НТ1	4,5 мл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
12	Ячейка для секвенирования	-	1 штука	Флакон с ячейкой, погруженной в бесцветную жидкость
13	Раствор PR2	500 мл	1 флакон	Бесцветная жидкость
14	ПО OncoScope™ Software	Доступ к веб-приложению		
Вариант исполнения set 1-6				
1	NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
2	NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	100 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
3	Контрольный образец ДНК (КД)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
4	Контрольный образец РНК (КР)	20 мкл	1 пробирка	Бесцветная жидкость
5	ПЦР смесь 1 (ПС1)	200 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
6	Обратная транскриптаза (ОТ)	25 мкл	1 пробирка	Бесцветная вязкая жидкость
7	Реагент В (В)	1200 мкл	1 флакон	Бесцветная вязкая жидкость
8	Магнитные частицы (М)	600 мкл	1 флакон	Жидкость коричневого цвета (или прозрачная жидкость с коричневым осадком)
9	ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-6 (ПС2 с ИП)	55 мкл x 16	16 стрипованных пробирок	Бесцветная вязкая жидкость
10	Картридж для секвенирования	-	1 штука	Пластиковый контейнер с ячейками, заполненными жидкостью
11	Буфер НТ1	4,5 мл	1 пробирка	Бесцветная жидкость

12	Ячейка для секвенирования	-	1 штука	Флакон с ячейкой, погруженной в бесцветную жидкость
13	Раствор PR2	500 мл	1 флакон	Бесцветная жидкость
14	ПО OncoScope™ Software	Доступ к веб-приложению		

NSCLC ДНК пул праймеров (ПД) – пул специфических праймеров с универсальным адаптером Illumina для амплификации целевых регионов ДНК-маркеров.

NSCLC РНК пул праймеров (ПР) – пул специфических праймеров с универсальным адаптером Illumina для амплификации целевых регионов РНК-маркеров.

Контрольный образец ДНК (КД) – образец, представляющий собой последовательности, имитирующие целевые регионы генома.

Контрольный образец РНК (КР) – образец, представляющий собой последовательности, имитирующие целевые регионы транскриптома.

ПЦР смесь 1 (ПС1) – смесь для амплификации, содержащая Taq-полимеразу, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, буфер для полимеразы с солями магния, глицерин.

Обратная транскриптаза (ОТ) – РНК-зависимая ДНК-полимераза (выполняющая синтез комплементарной цепи ДНК (кДНК) на матрице одноцепочечной РНК).

Реагент В (В) – буфер с хлоридом натрия для работы магнитных частиц.

Магнитные частицы (М) – магнитные частицы для очистки ДНК и фрагментов ДНК волюметрическим способом.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1 (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A1...N12 для индивидуального мечения библиотек.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1S (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A1...N12 для индивидуального мечения библиотек.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-1 (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A1...N2 для индивидуального мечения библиотек.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-2 (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A3...N4 для индивидуального мечения библиотек.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-3 (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A5...N6 для индивидуального мечения библиотек.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-4 (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A7...N8 для индивидуального мечения библиотек.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-5 (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая

полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A9...H10 для индивидуального мечения библиотек.

ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами set 1-6 (ПС2 с ИП) – смесь для амплификации с одновременным индексированием библиотек для NGS, включающая полимеразу, оптимизированный буфер с хлоридом магния, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и индексированные праймеры A11...H12 для индивидуального мечения библиотек.

Картридж для секвенирования – картридж представляет собой контейнер с резервуарами, которые содержат реагенты для секвенирования.

Буфер HT1 – буферный раствор в пластиковом флаконе, необходимый для разбавления библиотек перед запуском.

Ячейка для секвенирования – ячейка представляет собой одноразовый субстрат на основе стекла, на котором выполняется реакция секвенирования.

Раствор PR2 – промывочный буфер для секвенирования.

1.11. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Показатель	Определение	ДНК		РНК
Концентрация библиотеки	Концентрация ДНК/РНК-библиотеки с соответствующими парами индексированных праймеров для платформы секвенирования Illumina	≥ 1400 нг/мл		
Предел обнаружения	Минимально детектируемая концентрация аналита	2 нг/мкл (6 нг ДНК)		3 нг/мкл (6 нг РНК)
Аналитическая специфичность	Доля прочтений, выравненных на целевые регионы генома/транскриптома человека	79±15%		
Процент положительного согласования²	Доля положительных вариантов, среди истинно-положительных вариантов	94,6% (95%CI: 86,9–97,9%)		95,2% ³ (95%CI: 77,3–99,1%)
Предсказательная ценность положительного результата⁴	Доля положительных вариантов среди истинно- и ложноположительных вариантов.	94,9% (95%CI: 87,5–98,0%)		100% ⁵ (95%CI: 84,5–100%)
Минимальная детектируемая аллельная фракция	Доля прочтений с альтернативной аллели от общего числа прочтений в локусе	5%		не применимо

² Positive percentage agreement, PPA. $PPA = TP / (TP + FN) * 100\%$, где TP – количество истинно-положительных вариантов; FN – количество ложноположительных вариантов.

³ Рассчитано для фьюжен-генов с известными партнерами и потерь экзонов.

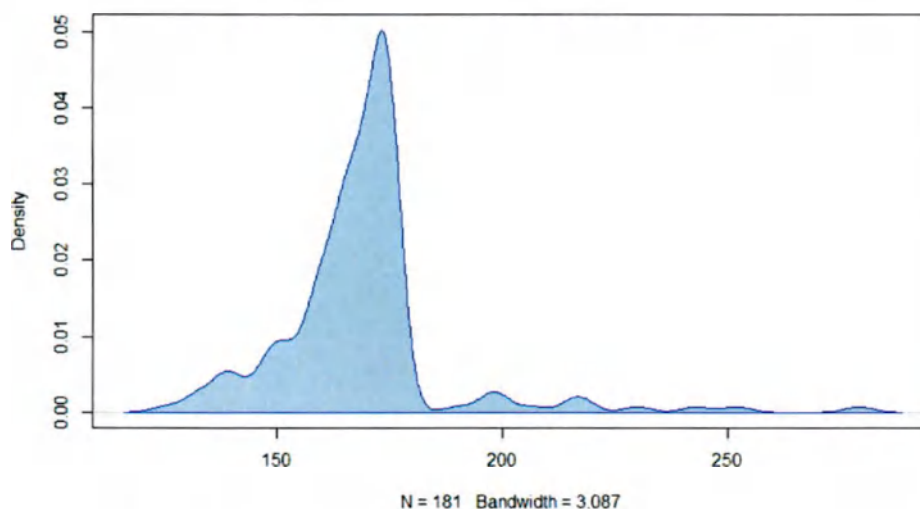
⁴ Positive predictive value, PPV. $PPV = TP / (TP + FP) * 100\%$, где TP – количество истинно-положительных вариантов; FP – количество ложноположительных вариантов.

⁵ Рассчитано для фьюжен-генов с известными партнерами и потерь экзонов.

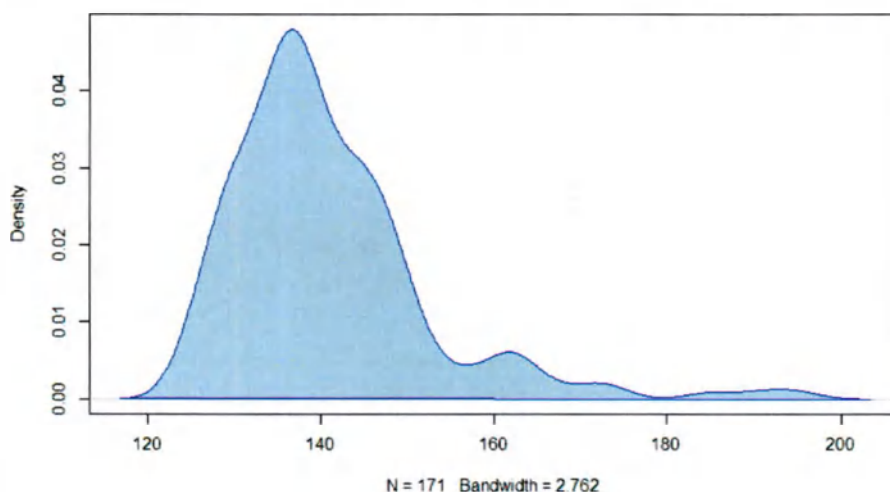
Повторяемость	Близость значений (коэффициент вариации, CV) аллельной фракции, полученных при повторном секвенировании одного анализа	$CV \leq 1$	не применимо
Воспроизводимость	Близость значений (коэффициент вариации, CV) аллельной фракции, полученных при повторном секвенировании одного анализа, приготовленного разными операторами и на разных сериях реагентов	$CV \leq 1$	не применимо
Идентификация контаминированных образцов	Минимальная детектируемая доля примеси чужеродной ДНК	10%	не применимо
Точность определения пола образца⁶	Доля образцов, в которых пол идентифицирован корректно	100% (95%CI: 83,89-100%)	не применимо
Число ампликонов	Количество пар праймеров в одном пуле	181 (168 целевых; 13 BIDs)	171 (160 целевых; 11 HKG)
Ожидаемое число прочтений	При рекомендуемом числе прочтений 500 000 на образец	450 000	50 000
Референсный интервал	Диапазон нормальных значений	Дикий тип (hg38)	Дикий тип (hg38 транскриптом)
Типы детектируемых вариантов	SNP – однонуклеотидные замены; INS – инсерции длиной до 50 п.н.; DEL – делеции длиной до 50 п.н.; MNV – мультинуклеотидные замены (инделлы) длиной до 50 п.н.; EXLOSS – потери экзона; FUSION – фьюжен-гены, в том числе с неизвестными партнерами	SNP, INS, DEL, MNV	EXLOSS, FUSION

Распределение длин ампликонов без адаптеров для ДНК панели (по оси X длина ампликона в п.н.; по оси Y – нормированное число ампликонов соответствующей длины):

⁶ для внутрилабораторной проверки перепутывания образца.



Распределение длин ампликонов без адаптеров для РНК панели (по оси X длина ампликона в п.н.; по оси Y – нормированное число ампликонов соответствующей длины):



1.12. ИНТЕРФЕРЕНТЫ

Потенциальные интерференты определены по литературным данным. Предельные количества потенциальных интерферентов установлены экспериментально. Результаты оценки влияния потенциально интерферирующих веществ приведены в таблице:

Потенциальные интерференты	
Некротическая ткань	
Источник интерферента	Биоматериал (образец ткани FFPE)
Стадия проявления потенциального интерферента	Анализ данных
Последствия и рекомендуемые меры: Наличие некротической ткани в исследуемом образце потенциально может повлиять на соотношение пригодных к исследованию клеток к общему количеству клеток в образце. Тем не менее по данным литературы нет доказательств того, что некротическая ткань в регионе интереса образца ткани FFPE может интерферировать данные секвенирования образцов FFPE. Пользователям следует проводить макродиссекцию (обогащение интересующей ткани путем исключения нежелательной ткани) некротических областей или	

выбирать альтернативный образец для последующего анализа, если это возможно. Определено, что 60% содержание некротической ткани в образце FFPE не влияет ни на эффективность выделения ДНК и РНК из FFPE, ни на метрики качества образца при секвенировании и установление генотипа.

Этанол

Источник интерферента

Промывочные буферы для выделения ДНК и РНК из FFPE;
Стадии очистки при пробоподготовке библиотек

Стадия проявления потенциального интерферента

ПЦР/ОТ-ПЦР⁷, ПЦР с индексированием

Последствия и рекомендуемые меры:

Предельно допустимая концентрация (ПДК) этанола в образце составляет **1%** в реакциях ПЦР/ОТ-ПЦР и **1%** в реакции ПЦР с индексированием. Превышение ПДК приводит к ингибированию работы ферментов нуклеинового обмена. Этанол используется в наборе для выделения ДНК и РНК для промывки образца в процессе выделения. Несоблюдение инструкции по выделению и недостаточная просушка магнитных частиц при выделении будет приводить к появлению этанола в препаратах ДНК и РНК и, как следствие, ингибированию ПЦР при пробоподготовке. Требуется точное соблюдение инструкций производителя Набора для выделения. Недостаточная просушка магнитных частиц после промывки этанолом во время выполнения протокола пробоподготовки может привести к ингибированию амплификации библиотек с индексированием. Требуется точное соблюдение инструкции производителя

Парафин⁸

Источник интерферента

Биоматериал (образец ткани FFPE)

Стадия проявления потенциального интерферента

ПЦР/ОТ-ПЦР

Последствия и рекомендуемые меры:

Парафин – специализированный расходный материал для гистологии, представляет собой высокоочищенную, гомогенизированную смесь тугоплавких парафинов и пластификаторов, предназначен для гистологической проводки и заливки тканевых образцов. Удаление парафина из образца ткани является одним из определяющих шагов эффективной экстракции, поскольку нерастворенный парафин приводит к ухудшению качества образца и снижению его чистоты из-за неэффективных промывок.

Определено, что 4-кратное увеличение содержания парафина от рекомендуемого при выделении ДНК и РНК из FFPE не приводит к ухудшению качества образца и снижению его чистоты.

Протеиназа К⁹

Источник интерферента

Биоматериал (образец ткани FFPE)

⁷ Для данной стадии интерферент исследовался в рамках Набора реагентов «PureCode™ DNA/RNA Double Magnetic FFPE» для выделения ДНК и РНК из образцов тканей FFPE методом сорбции на магнитных частицах.

⁸ Интерферент исследовался в рамках Набора реагентов «PureCode™ DNA/RNA Double Magnetic FFPE» для выделения ДНК и РНК из образцов тканей FFPE методом сорбции на магнитных частицах.

⁹ Интерферент исследовался в рамках Набора реагентов «PureCode™ DNA/RNA Double Magnetic FFPE» для выделения ДНК и РНК из образцов тканей FFPE методом сорбции на магнитных частицах.

Стадия проявления
потенциального интерферента
ПЦР/ОТ-ПЦР

Последствия и рекомендуемые меры:

В случае превышения рекомендуемой рабочей концентрации Протеиназы К в растворе с выделенной нуклеиновой кислотой существует риск того, что она будет способна расщепить фермент, необходимый для осуществления ПЦР/ОТ-ПЦР.

Определено, что 4-кратное увеличение содержания Протеиназы К (80 мкл) от рекомендуемого при выделении ДНК и РНК из FFPE не приводит к ингибированию ПЦР/ОТ-ПЦР.

Гемоглобин¹⁰
Источник интерферента

Биоматериал (образец ткани FFPE)

Стадия проявления
потенциального интерферента
ПЦР/ОТ-ПЦР

Последствия и рекомендуемые меры:

Гемоглобин является одним из основных ингибиторов ПЦР. Механизм ингибирования может быть связан со способностью гемоглобина освобождать ионы железа в ПЦР смесь.

Содержание гемоглобина не должно превышать **2 мг/мл** в реакции ПЦР. Более высокие концентрации способны ингибировать полимеразу.

1.13. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В ходе клинико-лабораторных испытаний Набора реагентов:

- для оценки диагностической чувствительности использовались ДНК и РНК, выделенные из 100 остаточных FFPE-блоков биопсийного и послеоперационного материала от пациентов с диагнозом немелкоклеточный рак легкого. Диагностическая чувствительность составила 100% (100/100, 95% ДИ: 96,30% – 100%);
- для оценки диагностической специфичности использовались ДНК и РНК, выделенные из 100 остаточных образцов FFPE-блоков биопсийного и послеоперационного материала от пациентов с другим, не НМРЛ, диагнозом (доброкачественные новообразования легкого). Диагностическая специфичность составила 100% (100/100, 95% ДИ: 96,30% – 100%).

1.14. ИЗВЕСТНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

- Набор реагентов валидирован только для использования вместе с программным обеспечением «OncoScope™ Software»;
- Варианты E1210K, S1206Y, S1206C, D1203N, G1202R в гене *ALK* попадают в регион низкого качества;
- Набор реагентов не позволяет детектировать вариант E294* в гене *TP53*;
- Метод не позволяет дискриминировать соматические и герминативные генетические варианты в отсутствии образца здоровой ткани;
- 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 инсерции и делеции длиной более 50 п.н.;

¹⁰ Интерферент исследовался в рамках Набора реагентов «PureCode™ DNA/RNA Double Magnetic FFPE» для выделения ДНК и РНК из образцов тканей FFPE методом сорбции на магнитных частицах

- Чувствительность в отношении протяженных инсерций и делеций, расположенных на краю ампликона/целевого региона, может быть снижена;
- Идентификация фьюжен-генов с неизвестными партнерами осуществляется исключительно по наличию 5'/3'-дисбаланса в покрытии онкогена. Рекомендуется подтверждать обнаруженные фьюжен-гены с неизвестным партнером альтернативными методами исследования (например, FISH или IHC);
- Метод не предназначен для идентификации амплификации генов и структурных вариаций, за исключением вариантов, указанных в разделе 1.7. Описание (Анализируемые маркеры);
- Метод не позволяет выявлять варианты, расположенные за пределами целевых регионов ДНК пула праймеров;
- Метод не предназначен для идентификации «цис-»/«транс-» положения генетических вариантов;
- При наличии в образце варианта в сайте посадки праймера возможно снижение амплификации соответствующей аллели, вплоть до полного выпадения;
- Аннотация вариантов в ПО «OncoScope™ Software» предоставляется для ознакомительных целей, интерпретация результатов должна осуществляться квалифицированным специалистом с учетом всех обнаруженных вариантов и клинической картины пациента.

1.15. РИСКИ, СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗДЕЛИЯ

При анализе риска медицинского изделия Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» на всех стадиях его жизненного цикла были проанализированы опасности для пациента, эксплуатирующего персонала, производящего персонала, третьих лиц, окружающей среды и опасности, связанные с программным обеспечением в составе медицинского изделия.

Остаточные риски, находящиеся в пограничной зоне, связаны с человеческим фактором (внимательностью) эксплуатирующего персонала.

Выявленные риски снижены настолько, насколько это практически осуществимо, принимая во внимание техническую осуществимость мер по управлению риском.

Совокупный остаточный риск оценен как допустимый.

1.16. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Описание	Пример оборудования/материала/реагента
Бокс абактериальной воздушной среды	ООО "Биосан", Латвия, ЗУ № РЗН 2023/19369 от 18.01.2023
Система водоочистительная лабораторная для подготовки воды I типа, 18MΩ	"Миллипор С.А.С.", Франция, РУ №РЗН 2013/265 от 15.03.2013
Автоматический термоциклический амплификатор нуклеиновых кислот	"Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.", Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019
Генетический секвенатор MiSeq	"Иллюмина, Инк.", США, РУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014
Плашки реакционные оптические 96-луночные	"Сайентифик Спешиаалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)", США, ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Пленка самоклеящаяся для плашек реакционных оптических 96-луночных	"Сайентифик Спешиаалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)", США, ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017

Пробирки 0,2 мл для ПЦР	"Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)", США, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Дозаторы пипеточные переменного объема одноканальные: на 0,5-10 мкл; на 2-20 мкл, на 10-100 мкл; на 20-200 мкл; на 100-1000 мкл	"Эппендорф АГ", Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011
Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	"Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)", США, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011
Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	Biosan, Латвия, FV-2400
Центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов, скорость от 2800 об/мин	"Эппендорф АГ", Германия, РУ № ФСЗ 2009/04411 от 03.06.2009
Вортекс для 96-луночных планшетов	"Эппендорф АГ", Германия, РУ № ФСЗ 2009/04410 от 03.06.2009
Спектрофотометр: пределы поглощения длин волн: 190-850 нм/ Флуориметр: диапазон длин волн поглощения: 470-625 нм Диапазон длин волн испускания: 525-690 нм	Thermo Fisher Scientific, NanoDrop One, номер в госреестре - 71642-18/ Thermo Fisher Scientific, США Анализатор иммунологический «Varioskan Flash», "Термо Фишер Сайентифик Ой", Финляндия, РУ № РЗН 2014/1842 от 08.08.2014
Магнитный штатив	ООО "НПФ Хеликон", Россия, РУ № РЗН 2022/16360 от 21.01.2022
Изотермический штатив (поддержка температуры от 0 °С до минус 21 °С для пробирок 0,5 мл или 1,5/2 мл)	"Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)", США, РУ № ФСЗ № 2011/10287 от 11.04.2017
Пробирки DNA LoBind™ объемом 1,5 мл	"Эппендорф АГ", Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009
Пробирки DNA LoBind™ объемом 2 мл	"Эппендорф АГ", Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009
Пробирки Falcon 50 мл	"Эппендорф АГ", Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009
Этанол, медицинский (95%)	АО «РФК», Россия
NaOH, класс чистоты: для молекулярной биологии	Sigma Aldrich, США
Перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные	«ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия, РУ № РЗН 2017/5747 от 26.10.2023

1.17. ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ

Характеристика	Значение
Аналит	Геномная ДНК и тотальная РНК человека, выделенные из FFPE
Биоматериал	Операционный или тонкоигольная биопсия

Предел обнаружения набора реагентов для ДНК и РНК аналитов указан в разделе ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ. На преаналитическом этапе **измерение концентрации ДНК и РНК аналитов проводить не требуется**, так как на качество данных более существенное влияние оказывает степень деградации НК.

Внимание! В образцах с высокой степенью деградации / фрагментации НК наблюдается снижение равномерности таргетного обогащения и падение качества данных. Повреждения НК, вызванные действием фиксирующих агентов и накапливающиеся в

образцах при длительном хранении, могут привести к появлению ложноположительных и ложноотрицательных результатов генотипирования.

Внимание! Стандартные процедуры фиксации в формалине и заключения в парафин приводят к значительной фрагментации нуклеиновых кислот. Рекомендуется придерживаться следующих правил для минимизации степени фрагментации нуклеиновых кислот в образце:

- 1) Использование нейтрального 10% формалина для фиксации образцов тканей;
- 2) Ограничение времени фиксации до 24–48 часов (в зависимости от размера ткани);
- 3) Полная дегидратация образцов перед заключением в парафин.

Внимание! Рекомендуется следовать Стандартным технологическим процедурам при проведении патологоанатомических исследований. Клинические рекомендации Российского Общества Патологоанатомов от 2016 г.

При выделении ДНК и РНК из образцов FFPE рекомендуется использовать Набор реагентов «PureCode™ DNA/RNA Double Magnetic FFPE» для выделения ДНК и РНК из образцов тканей FFPE методом сорбции на магнитных частицах по ТУ 21.20.23-028-39429653-2023 (кат. РС-UMDR-50-IVD, ООО «ПАРСЕК ЛАБ»). Препараты ДНК рекомендуется хранить при температуре от минус 22 до минус 18°C. Препараты РНК рекомендуется хранить при температуре ≤ минус 80°C. Качество проведения преаналитического этапа исследования имеет значительное влияние на результаты анализа.

1.18. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

- Использовать только для диагностики *in vitro*.
- Потенциальный риск применения Набора реагентов – класс 2б.
- Набор реагентов предназначен только для профессионального применения.
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять Набор реагентов строго в соответствии с назначением, установленным производителем.
- Внутренний контроль качества Набора реагентов пользователем осуществляется с использованием контрольных образцов, входящих в состав набора, в соответствии с инструкцией по применению.
- Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать Набор реагентов и его компоненты по истечении срока годности.
- Во избежание контаминации НК необходимо пространственное разделение этапов пре- и пост-ПЦР: отдельные помещения, отдельные халаты, отдельные пипетки и другие лабораторные материалы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических или механических дозаторов с фильтром. Одноразовые пластиковые материалы (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- При работе с Набором реагентов использовать поверенные средства измерения;
- Персонал, проводящий исследования, должен проводить работы в защитной одежде – лабораторные халаты, средства индивидуальной защиты.
- Картридж для секвенирования и раствор PR2 классифицируются как опасные компоненты. Вещества, повлиявшие на классификацию, а также коды заявлений об опасности и мер предосторожности, требуемые при работе с данными компонентами, приведены ниже:

Компонент	Опасные вещества	Код заявления об опасности	Код меры предосторожности
Картридж для секвенирования	Формаид	H351 H360 H373	P201 P202 P260 P280 P308 + P313 P314 P405
Раствор PR2	Метилизотиазолинон	H317	P261 P272 P280 P302 + P352 P333 + P313 P362 + P364

- Заявления об опасности и меры предосторожности:

Заявления об опасности	
H317: при контакте с кожей может вызывать аллергическую реакцию	H351: предполагается, что данная химическая продукция вызывает раковые заболевания
H360: может отрицательно повлиять на способность к деторождению или на неродившегося ребенка	H373: может поражать органы в результате многократного или продолжительного воздействия
Меры предосторожности	
P201: ознакомиться с инструкциями по технике безопасности	P202: перед использованием пройти инструктаж по работе с продукцией
P260: не вдыхать газ/пары/аэрозоли	P261: избегать вдыхания газа/пара/аэрозолей
P272: не уносить загрязненную спецодежду с места работы	P280: использовать перчатки/спецодежду/средства защиты глаз/лица
P302 + P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом	P308 + P313: при подозрении на возможность воздействия обратиться за медицинской помощью
P314: при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью	P333 + P313: при возникновении раздражения или покраснения кожи обратиться за медицинской помощью
P362 + P364: снять всю загрязненную одежду и выстирать перед повторным использованием	P405: хранить в не доступном для посторонних месте

Остальные реактивы, входящие в состав компонентов Набора реагентов в используемых концентрациях, являются нетоксичными. При попадании данных растворов на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

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-эпидемиологические правила СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Набор реагентов не содержит: лекарственные средства для медицинского применения, материалы животного и (или) человеческого происхождения.

- Воздействие на функционирование внешних факторов в диапазоне их возможного изменения при применении Набора реагентов в медицинских учреждениях - не существенно, включая электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температуру воздуха.
- Применение Набора реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.
- Применение Набора реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав материала не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

1.19. УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ

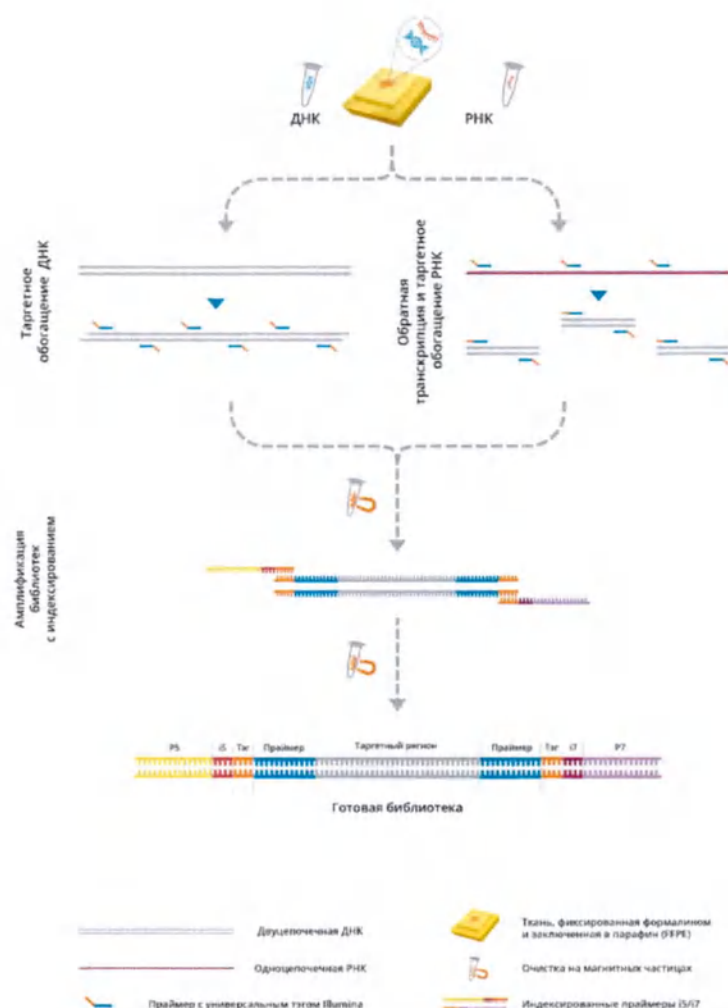
- Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» должен применяться в строгом соответствии с данной инструкцией по применению.
- Неправильное обращение с исследуемыми образцами и изменение процедуры проведения анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению.
- Набор реагентов не имеет принадлежностей и/или медицинских изделий, предусмотренных для использования в комбинации с Набором реагентов.
- Набор реагентов не подлежит установке, монтажу, настройке, калибровке, техническому обслуживанию и ремонту.
- Набор реагентов не имеет предыдущих модификаций, находящихся в обращении.
- Набор реагентов является нестерильным и не требует стерилизации перед использованием.
- Все варианты исполнения Набора реагентов предназначены для однократного применения.
- Условия эксплуатации Набора реагентов¹¹:
 - температура окружающей среды (15 – 35) °C;
 - относительная влажность воздуха – не более 95 %.

2. ПРОТОКОЛ

Приготовление библиотек состоит из следующих этапов:

- 1) таргетное обогащение образца геномной ДНК;
- 2) объединенная реакция обратной транскрипции и таргетного обогащения образца тотальной РНК;
- 3) амплификация продуктов таргетного обогащения с индексированием.

¹¹ Атмосферное давление не оказывает влияния на работу Набора реагентов.



2.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК

Таргетное обогащение ДНК

Перед началом работы:

- Достаньте **NSCLC ДНК Пул праймеров (ПД)** и **Контрольный образец ДНК (КД)** из морозильной камеры и выдержите при температуре от 15 до 35°C до полного размораживания. Тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Внимание!** **Контрольный образец ДНК (КД)** рекомендуется включать в постановку.
- Поместите исследуемые образцы ДНК на температуру от 15 до 35°C до полной разморозки. Тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.

1. Установите программу для таргетного обогащения ДНК на амплификаторе (объем реакции 25 мкл):

Количество циклов	Температура	Время
1	95°C	15 мин
5	95°C	15 сек
	60°C	4 мин

17	95°C	15 сек
	63°C	1 мин
1	4°C	Хранение ¹²

2. Достаньте **ПЦР смесь 1 (ПС1)** из морозильной камеры, вортиксируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.

3. Приготовьте мастер-микс для таргетного обогащения ДНК по следующему протоколу, сделав расчеты на нужное количество образцов в постановке:

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
ПС1	5
ПД	5
Вода I типа	12

4. Тщательно вортиксируйте смесь и центрифугируйте в импульсном режиме.

5. В чистые пластиковые пробирки для ПЦР (или лунки 96-луночного планшета) внесите по 22 мкл мастер-микса на нужное количество реакций.

6. В каждую пробирку внесите по 3 мкл исследуемого образца ДНК. (При постановке Контрольного образца ДНК внесите 3 мкл КД).

7. Перемешайте реакционные смеси на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме и поместите в амплификатор с программой для таргетного обогащения ДНК.

Обратная транскрипция и таргетное обогащение РНК

Перед началом работы:

- Достаньте **NSCLC РНК Пул праймеров (ПР)** и **Контрольный образец РНК (КР)** из морозильной камеры и выдержите при температуре от 15 до 35°C до полного размораживания. Тщательно вортиксируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
 - **Внимание! Контрольный образец РНК (КР)** рекомендуется включать в постановку.
 - Поместите исследуемые образцы РНК на температуре от 15 до 35°C до полной заморозки. Вортиксируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Поместите на холодный штатив на время работы.**

1. Установите программу для обратной транскрипции и таргетного обогащения РНК на амплификаторе (объем реакции 25 мкл):

Количество циклов	Температура	Время
1	50°C	60 мин
1	95°C	15 мин
5	95°C	15 сек
	60°C	4 мин
20	95°C	15 сек
	63°C	1 мин

¹² Ампликоны могут храниться 12 ч при температуре от 2 до 8°C. Для более длительного хранения поместите ампликоны на температуру от минус 22 до минус 18°C и храните до одного месяца.

1

4°C

Хранение¹³

2. Достаньте **ПЦР смесь 1 (ПС1)** из морозильной камеры. Тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.

3. Достаньте **Обратную транскриптазу (ОТ)** из морозильной камеры. Вортексируйте 1-2 секунды и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.

4. Приготовьте мастер-микс для обратной транскрипции и таргетного обогащения РНК по следующему протоколу, сделав расчеты на нужное количество образцов в постановке:

Компонент	Объем, мкл
ПС1	5
ОТ	1
ПР	5
Вода I типа	12

Внимание! Объемы образца ДНК 3 мкл и образца РНК 2 мкл рекомендованы при работе с аналитами, получаемыми с помощью Набор реагентов «PureCode™ DNA/RNA Double Magnetic FFPE» для выделения ДНК и РНК из образцов тканей FFPE методом сорбции на магнитных частицах по ТУ 21.20.23-028-39429653-2023 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ»). Пропорция прочтений при секвенировании должна стремиться к значению ДНК:РНК=9:1. Подробнее см. Раздел 3.5. **Устранение проблем.**

5. Тщательно вортексируйте мастер-микс и центрифугируйте в импульсном режиме.

6. В чистые пластиковые пробирки для ПЦР (или лунки 96-луночного планшета) внесите по 23 мкл мастер-микса на нужное количество реакций.

7. В каждую пробирку внесите по 2 мкл исследуемого образца РНК. (При постановке Контрольного образца РНК внесите 2 мкл КР).

8. Перемешайте реакционные смеси на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме и поместите в амплификатор с программой для обратной транскрипции и таргетного обогащения РНК.

Объединение продуктов таргетного обогащения и очистка

Перед началом работы:

- Достаньте **Магнитные частицы (М)** из холодильной камеры и выдержите при температуре от 15 до 35°C 30 мин. Тщательно вортексируйте частицы в течение 15–30 сек перед использованием.

- Приготовьте свежий 70 % спирт из расчета 300 мкл на образец.

- Достаньте стрипованные пробирки с компонентом **ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами (ПС2 с ИП)** из морозильной камеры. Расположение пар индексированных праймеров в стрипованных пробирках приведено в разделе **2.3. СЕКВЕНИРОВАНИЕ.**

- При дробных постановках отрежьте канцелярским ножом необходимое количество пробирок с компонентом **ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами (ПС2 с ИП)**, не

¹³ Ампликоны могут храниться 12 ч при температуре от 2 до 8°C. Для более длительного хранения поместите ампликоны на температуру от минус 22 до минус 18°C и храните до одного месяца.

снимая стрипованные пробирки со штатива. Неиспользуемые в постановке пробирки с компонентом оставьте в штативе и уберите в морозильную камеру, не размораживая. Нужные стрипованные пробирки переставьте в другой рабочий штатив, выдержите при температуре от 15 до 35°C до полной разморозки. Тщательно вортексируйте размороженные компоненты и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.

Внимание! Не трогать руками поверхность фольги стрипованных пробирок.

1. В новую пробирку или лунку 96-луночного планшета внесите **12 мкл** продукта таргетного обогащения образца ДНК и **3 мкл** продукта обратной транскрипции и таргетного обогащения соответствующего образца РНК. Добавьте **10 мкл** воды I типа с получением 25 мкл объединенных продуктов таргетного обогащения.

2. В новую пробирку или лунку 96-луночного планшета внесите **12 мкл** продукта таргетного обогащения **Контрольного образца ДНК (КД)** и **3 мкл** продукта обратной транскрипции и таргетного обогащения **Контрольного образца РНК (КР)**. Добавьте **10 мкл** воды I типа с получением 25 мкл объединенных продуктов таргетного обогащения Контрольных образцов. Остатки реакций можно заморозить.

3. Добавьте **28,8 мкл** тщательно перемешанных **Магнитных частиц (М)** к 25 мкл объединенного ПЦР продукта. Тщательно вортексируйте до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.

4. Инкубируйте образцы 5 минут при температуре от 15 до 35°C.

5. По истечении времени инкубации поместите образцы на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.

6. Не снимая образцы с магнитного штатива, удалите супернатант (~55 мкл), не задевая осадок магнитных частиц.

Примечание: целевые ампликоны находятся на магнитных частицах. Сохраните осадок магнитных частиц!

7. Добавьте 150 мкл свежеприготовленного 70% спирта к осадку магнитных частиц. Удалите весь спирт, не задевая осадок магнитных частиц.

8. Повторите пункт 7 для повторной промывки осадка.

9. После удаления спирта снимите образцы с магнитного штатива и центрифугируйте в импульсном режиме. Верните пробирки на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта. Подсушите осадок 5 минут на магнитном штативе при температуре от 15 до 35°C. Не пересушивайте осадок.

Амплификация библиотек с индексированием

1. Используя дозатор с наконечником на 20-200 мкл, проколите фольгу стрипованной пробирки с компонентом **ПЦР смесь 2 с CD индексированными праймерами (ПС2 с ИП)**, заберите **50 мкл** компонента и внесите в пробирку с сухим осадком частиц.

Примечание: фольга со стрипованных пробирок не снимается! Стрипованные пробирки с проколотой фольгой служат возможным источником контаминации. Сразу после забора компонента следует утилизировать пробирки с остатками компонента.

2. Тщательно вортексируйте реакционные смеси, центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель и поместите в амплификатор с заданной программой (объем реакции 50 мкл).

Примечание: сохраняйте частицы в реакции, ПЦР проводится в присутствии частиц.

Количество циклов	Температура	Время
1	98°C	2 мин
9	98°C	30 сек
	55°C	30 сек
	72°C	1 мин
1	72°C	5 мин
1	4°C	Хранение ¹⁴

Очистка библиотек после амплификации

Перед началом работы:

- Достаньте **Реагент В (В)** из холодильной камеры и выдержите при температуре от 15 до 35°C 30 мин. Тщательно вортексируйте частицы в течение 15–30 сек перед использованием.
- Приготовьте свежий 70% спирт из расчета 300 мкл на образец.

1. Добавьте 50 мкл **Реагента В (В)** к амплифицированной библиотеке. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.
2. Инкубируйте образцы 5 минут при температуре от 15 до 35°C.
3. По истечении времени инкубации поместите образцы на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
4. Не снимая образцы с магнитного штатива, удалите супернатант (~100 мкл), не задевая осадок магнитных частиц.

Примечание: целевые библиотеки находятся на магнитных частицах. Сохраните осадок магнитных частиц!

5. Добавьте 150 мкл свежеприготовленного 70% спирта к осадку магнитных частиц. Удалите весь спирт, не задевая осадок магнитных частиц.
6. Повторите пункт 5 для повторной промывки осадка.
7. После удаления спирта снимите образцы с магнитного штатива и центрифугируйте в импульсном режиме. Верните пробирки на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта. Подсушите осадок 5 минут на магнитном штативе при температуре от 15 до 35°C. **Не пересушивайте осадок.**
8. Добавьте к каждому образцу **25 мкл** воды I типа.
9. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.
10. Поместите образцы на магнитный штатив и инкубируйте 5 минут при температуре от 15 до 35°C или до полного восстановления прозрачности раствора.

¹⁴ Продукты ПЦР могут храниться до 1 суток при температуре от 2 до 8°C. Не допускается замораживание ПЦР-продукта, несущего магнитные частицы.

11. Перенесите супернатант, содержащий **очищенные библиотеки**¹⁵, в чистые пробирки.

Количественная оценка библиотек

Количественная оценка библиотек выполняется с помощью спектрофотометра либо флуориметра. Полученные финальные ДНК/РНК библиотеки перед секвенированием на приборе MiSeq необходимо пулировать в концентрации 1400 нг/мл. Библиотеки с субоптимальными концентрациями (>900 нг/мл) допускается брать в секвенирование с пропорциональным увеличением объема пулирования.

2.2. ПОДГОТОВКА К СЕКВЕНИРОВАНИЮ И ДЕНАТУРАЦИЯ

Секвенирование осуществляется на генетическом секвенаторе Illumina MiSeq с использованием реагентов для секвенирования, включенных в состав медицинского изделия.

Для варианта исполнения на 96 реакций без включения реагентов для секвенирования (set 1S) можно использовать реагенты для секвенирования из других вариантов исполнения (set 1, set 1-1, set 1-2, set 1-3, set 1-4, set 1-5, set 1-6).

Все варианты исполнения Набора реагентов предусмотрены для однократного применения без возможности дробных постановок.

Расчетное число прочтений для одной библиотеки в запуске – 500000 прочтений. Число образцов на запуск для разных вариантов комплектации приведено в таблице:

Каталожный номер	Режим прочтений	Число образцов на запуск	Максимальное число парных прочтений для ячейки
OS-L11-16 OS-L12-16 OS-L13-16 OS-L14-16 OS-L15-16 OS-L16-16	150 + 150	16	До 8 млн прочтений
OS-LS-96	150 + 150	96	До 50 млн прочтений
OS-LS1-96	150 + 150	96	-

Готовый пул библиотек для секвенирования с концентрацией 1400 нг/мл подлежит денатурации. Во время данного этапа очищенный пул библиотек денатурируется для получения одноцепочечной библиотеки, которая предназначена для загрузки в картридж.

Денатурация пула библиотек

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

Компонент	Объем, мкл
Пул библиотек (1400 нг/мл)	5

¹⁵ Библиотеки могут храниться при температуре от 2 до 8°C в течение недели и при температуре от минус 22° до минус 18°C в течение 6 месяцев.

0,2М NaOH	5
Итого	10

4. Вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме.
5. Инкубируйте смесь 5 минут при температуре от 15 до 35°C.
6. К 10 мкл денатурированного пула библиотек добавьте **990 мкл** буфера HT1.
7. Вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме.
8. В картридж при секвенировании на приборе MiSeq загружается **600 мкл** из 1000 мкл полученного раствора.

2.3. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Библиотеки, приготовленные при помощи Набора реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL», требуют секвенирования в режиме парноконцевых прочтений длиной 150 циклов. Рекомендуемая емкость ячейки, необходимая для одной библиотеки – 500000 прочтений.

По завершении работы секвенатор выполнит демультиплексирование образцов и создаст файлы *.fastq.gz. Эти файлы будут использованы для загрузки в ПО «OncoScope™ Software».

Примечание: рекомендуется выполнять демультиплексирование без допуска замен в последовательностях индексов.

Как правило, секвенатор автоматически выбирает количество допустимых замен в последовательностях индексов. Допуск замен позволяет проигнорировать часть ошибок в прочтениях индексов и соотнести прочтения с соответствующих кластеров с определенным образцом. В ряде случаев игнорирование ошибки в прочтении индекса приводит к неверному соотнесению прочтений и образцов, в результате неверно соотнесенные прочтения принесет неверную информацию в анализ. Доля таких неверно соотнесенных прочтений невелика. Однако она может существенно повлиять на поиск соматических вариантов, которые также присутствуют в небольшой пропорции к референсной последовательности. Примесные прочтения могут стать причиной обнаружения ложноположительных вариантов.

В случае запрета замен в прочтениях индексов вся информация от кластеров, для которых нет однозначно совпавшего прочтения индекса с последовательностью из Sample Sheet, будет проигнорирована. Это приведет к уменьшению общего числа прочтений для образцов, однако повысит достоверность обнаруживаемых соматических вариантов с низкой аллельной частотой. Также правило всегда запрещать замены в прочтениях индексов позволяет стандартизировать результаты между постановками, поскольку количество примесных прочтений всегда будет равно нулю.

Ввести запрет замен в прочтениях индексов можно при повторном демультиплексировании при помощи сторонних инструментов. Например, можно воспользоваться собственным решением от Illumina, программой bcl2fastq Conversion Software присвоив аргументу «--barcode-mismatches» значение «0». Это приложение свободно распространяется вместе с подробной инструкцией на официальном сайте производителя. Обновленные файлы *.fastq.gz можно использовать для загрузки в ПО. Пожалуйста, сохраняйте паттерн названия файлов, содержащий информацию о номере образца в Sample Sheet (S), номере дорожки (L) и прочтения (R) при демультиплексировании сторонними инструментами. Например, «SampleName_S1_L001_R1_001.fastq.gz».

В Наборе реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» применяется двойное комбинаторное индексирование. Индексы имеют длину 8 нуклеотидов.

Каталожные номера **OS-L1-96** и **OS-LS1-96** комплектуются 96 стрипованными пробирками, в каждой из которых содержится ПЦР смесь 2 с уникальной парой индексированных праймеров из расчета на одну постановку.

Каждый из комплектов с каталожными номерами **OS-L11-16, OS-L12-16, OS-L13-16, OS-L14-16, OS-L15-16, OS-L16-16** комплектуется 16 стрипованными пробирками, в каждой из которых содержится ПЦР смесь 2 с уникальной парой индексированных праймеров из расчета на одну постановку.

Последовательности индексов приведены в таблице:

Варианты исполнения (16 реакций)	Пробирка	Название индекса I7	Последовательность индекса I7	Название индекса I5	Последовательность индекса I5	Варианты исполнения (96 реакций)
set 1-1	A1	1	ATTACTCG	A	TATAGCCT	set 1, set 1S
	B1	1	ATTACTCG	B	ATAGAGGC	
	C1	1	ATTACTCG	C	CCTATCCT	
	D1	1	ATTACTCG	D	GGCTCTGA	
	E1	1	ATTACTCG	E	AGGCGAAG	
	F1	1	ATTACTCG	F	TAATCTTA	
	G1	1	ATTACTCG	G	CAGGACGT	
	H1	1	ATTACTCG	H	GTAAGTAC	
	A2	2	GCTACGCT	A	TATAGCCT	
	B2	2	GCTACGCT	B	ATAGAGGC	
	C2	2	GCTACGCT	C	CCTATCCT	
	D2	2	GCTACGCT	D	GGCTCTGA	
	E2	2	GCTACGCT	E	AGGCGAAG	
	F2	2	GCTACGCT	F	TAATCTTA	
	G2	2	GCTACGCT	G	CAGGACGT	
	H2	2	GCTACGCT	H	GTAAGTAC	
set 1-2	A3	3	CGCTCATT	A	TATAGCCT	
	B3	3	CGCTCATT	B	ATAGAGGC	
	C3	3	CGCTCATT	C	CCTATCCT	
	D3	3	CGCTCATT	D	GGCTCTGA	
	E3	3	CGCTCATT	E	AGGCGAAG	
	F3	3	CGCTCATT	F	TAATCTTA	
	G3	3	CGCTCATT	G	CAGGACGT	
	H3	3	CGCTCATT	H	GTAAGTAC	
	A4	4	GAGATTCC	A	TATAGCCT	
	B4	4	GAGATTCC	B	ATAGAGGC	
	C4	4	GAGATTCC	C	CCTATCCT	
	D4	4	GAGATTCC	D	GGCTCTGA	
	E4	4	GAGATTCC	E	AGGCGAAG	
	F4	4	GAGATTCC	F	TAATCTTA	
	G4	4	GAGATTCC	G	CAGGACGT	
	H4	4	GAGATTCC	H	GTAAGTAC	
set 1-3	A5	5	CGAGGCTG	A	TATAGCCT	
	B5	5	CGAGGCTG	B	ATAGAGGC	
	C5	5	CGAGGCTG	C	CCTATCCT	
	D5	5	CGAGGCTG	D	GGCTCTGA	
	E5	5	CGAGGCTG	E	AGGCGAAG	
	F5	5	CGAGGCTG	F	TAATCTTA	
	G5	5	CGAGGCTG	G	CAGGACGT	
	H5	5	CGAGGCTG	H	GTAAGTAC	
	A6	6	GAATTCGT	A	TATAGCCT	
	B6	6	GAATTCGT	B	ATAGAGGC	
	C6	6	GAATTCGT	C	CCTATCCT	
	D6	6	GAATTCGT	D	GGCTCTGA	
	E6	6	GAATTCGT	E	AGGCGAAG	
	F6	6	GAATTCGT	F	TAATCTTA	

Варианты исполнения (16 реакций)	Пробирка	Название индекса I7	Последовательность индекса I7	Название индекса I5	Последовательность индекса I5	Варианты исполнения (96 реакций)
set 1-4	G6	6	GAATTCGT	G	CAGGACGT	
	H6	6	GAATTCGT	H	GTAAGTAC	
	A7	7	CTGAAGCT	A	TATAGCCT	
	B7	7	CTGAAGCT	B	ATAGAGGC	
	C7	7	CTGAAGCT	C	CCTATCCT	
	D7	7	CTGAAGCT	D	GGCTCTGA	
	E7	7	CTGAAGCT	E	AGGCGAAG	
	F7	7	CTGAAGCT	F	TAATCTTA	
	G7	7	CTGAAGCT	G	CAGGACGT	
	H7	7	CTGAAGCT	H	GTAAGTAC	
	A8	8	TAATGCGC	A	TATAGCCT	
	B8	8	TAATGCGC	B	ATAGAGGC	
	C8	8	TAATGCGC	C	CCTATCCT	
	D8	8	TAATGCGC	D	GGCTCTGA	
	E8	8	TAATGCGC	E	AGGCGAAG	
	F8	8	TAATGCGC	F	TAATCTTA	
set 1-5	G8	8	TAATGCGC	G	CAGGACGT	
	H8	8	TAATGCGC	H	GTAAGTAC	
	A9	9	CGGCTATG	A	TATAGCCT	
	B9	9	CGGCTATG	B	ATAGAGGC	
	C9	9	CGGCTATG	C	CCTATCCT	
	D9	9	CGGCTATG	D	GGCTCTGA	
	E9	9	CGGCTATG	E	AGGCGAAG	
	F9	9	CGGCTATG	F	TAATCTTA	
	G9	9	CGGCTATG	G	CAGGACGT	
	H9	9	CGGCTATG	H	GTAAGTAC	
	A10	10	TGCAGCTA	A	TATAGCCT	
	B10	10	TGCAGCTA	B	ATAGAGGC	
	C10	10	TGCAGCTA	C	CCTATCCT	
	D10	10	TGCAGCTA	D	GGCTCTGA	
	E10	10	TGCAGCTA	E	AGGCGAAG	
	F10	10	TGCAGCTA	F	TAATCTTA	
set 1-6	G10	10	TGCAGCTA	G	CAGGACGT	
	H10	10	TGCAGCTA	H	GTAAGTAC	
	A11	11	TCTCGCGC	A	TATAGCCT	
	B11	11	TCTCGCGC	B	ATAGAGGC	
	C11	11	TCTCGCGC	C	CCTATCCT	
	D11	11	TCTCGCGC	D	GGCTCTGA	
	E11	11	TCTCGCGC	E	AGGCGAAG	
	F11	11	TCTCGCGC	F	TAATCTTA	
	G11	11	TCTCGCGC	G	CAGGACGT	
	H11	11	TCTCGCGC	H	GTAAGTAC	
	A12	12	AGCGATAG	A	TATAGCCT	
	B12	12	AGCGATAG	B	ATAGAGGC	
	C12	12	AGCGATAG	C	CCTATCCT	
	D12	12	AGCGATAG	D	GGCTCTGA	
	E12	12	AGCGATAG	E	AGGCGAAG	
	F12	12	AGCGATAG	F	TAATCTTA	
	G12	12	AGCGATAG	G	CAGGACGT	
	H12	12	AGCGATAG	H	GTAAGTAC	

2.3.1. Планирование запуска

Под планированием запуска понимается создание конфигурации запуска с основными параметрами:

- тип индексирования образцов (одинарное/двойное);

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

Для секвенирования с Набором реагентов требуется установить следующие параметры запуска:

Параметр	Значение
Тип индексирования	Двойное индексирование (Dual Index sequencing)
Режим прочтений	Парноконцевое чтение (Paired-end sequencing)
Количество циклов (flows)	• Прямые прочтения: 150 • Обратные прочтения: 150 • Индекс i7: 8 • Индекс i5: 8
Последовательность адаптера	• Прямые прочтения: AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA • Обратные прочтения: AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
Протокол анализа данных	Генерация сырых прочтений (GenerateFASTQ)

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

Внесите в sample sheet файл названия образцов и присвойте им соответствующие индексы согласно подготовленным библиотекам.

Для выполнения секвенирования библиотек на приборе MiSeq требуются реагенты для секвенирования, включенные в состав Набора реагентов в вариантах исполнения set 1, set 1-1, set 1-2, set 1-3, set 1-4, set 1-5, set 1-6.

Каждый тип комплекта реактивов MiSeq включает в себя проточную ячейку, картридж для секвенирования, буфер HT1 и бутылку с раствором PR2.

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 однопорожечной 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. 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.

2.3.3. Разморозка картриджа для секвенирования

Извлеките картридж из морозильной камеры с температурой от минус 22 до минус 18 °C. Поместите картридж в воду температуры от 15 до 35°C, 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 температуре от 15 до 35°C 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.

2.3.4. Загрузка библиотек

После полной разморозки картриджа необходимо осуществить загрузку заранее одготовленного 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 денатурированного пула библиотек. Не касайтесь колпачка из фольги.

2.3.5. Очистка ячейки

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

Насухо протрите ячейку 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 ячейки.

2.3.6. Настройка запуска секвенирования

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

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

2.3.7. Загрузка ячейки

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

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

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

2.3.8. Загрузка раствора и проверка бутылки для сбора отходов

Достаньте бутылку с раствором из комплекта для секвенирования. Переверните для перемешивания, а затем снимите крышку. Откройте дверцу отсека с реагентами. Поднимите ипперную 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).

2.3.9. Загрузка картриджа с реагентами

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

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

2.3.10. Выбор sample sheet

По умолчанию программное обеспечение ищет файл протокола с названием, которое совпадает с номером штрих-кода на картридже с реагентами, загруженном в прибор. Если

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ»	Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ	#UM_L-102ru	Страница 41 из 69

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).

2.3.11. 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).

2.3.12. Мониторинг секвенирования

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

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

Cluster Density (K/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 послещикловой промывке.

2.3.13. Контроль плотности кластеров

Для обеспечения эффективной генерации кластеров производитель оборудования для секвенирования Illumina Inc. рекомендует для загрузки на ячейку денатурированный пул библиотек в концентрации 20 пМ (по документу MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide, 15039740 v10). Оптимальная плотность кластеров (до фильтрации) составляет 1000-1200 K/mm².

3. АНАЛИЗ ДАННЫХ

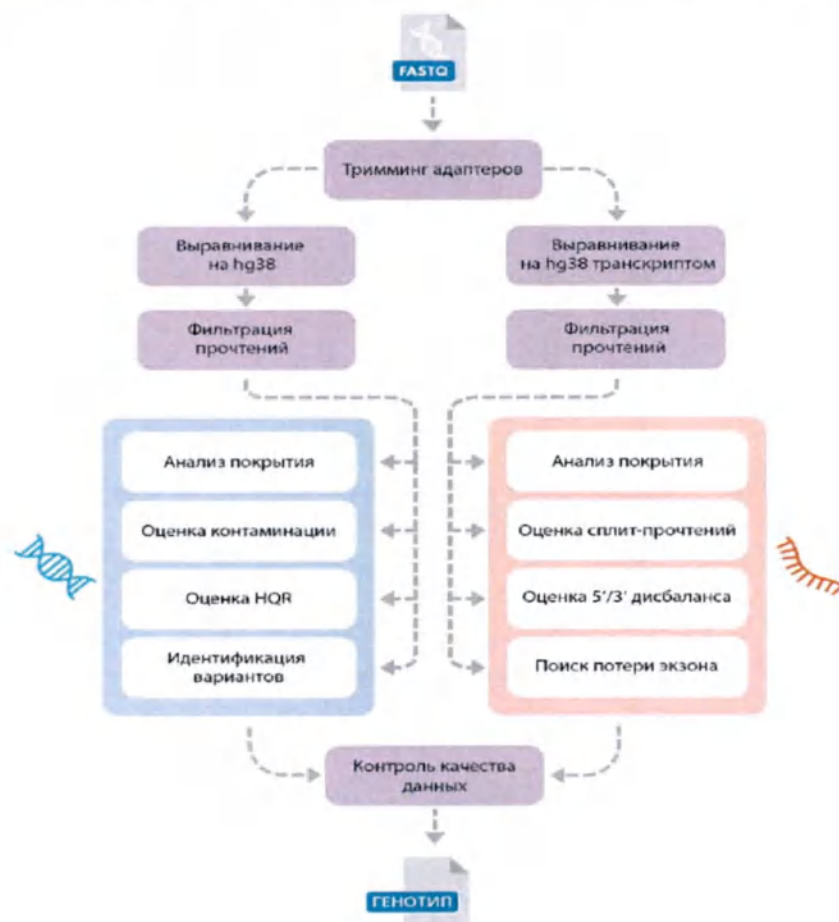
3.1. АЛГОРИТМ АНАЛИЗА ДАННЫХ

Выбор запускаемого пайплайна анализа данных осуществляется автоматически по номеру серии реагентов, указанному при импорте данных в ПО «OncoScope™ Software». Программа автоматически разделяет ДНК- и РНК-прочтения, и запускает два независимых алгоритма для выравнивания, расчета метрик качества данных и идентификации ДНК- и РНК-вариантов. Далее программа последовательно оценивает полученные значения метрик качества, то есть сравнивает их с пороговыми значениями, и классифицирует образец/аналит как прошедший или не прошедший контроль качества. Образцы/аналиты, не прошедшие контроль качества, не пригодны для интерпретации результатов и требуют перестановки, либо проведения мероприятий по устранению проблем. Алгоритм анализа данных представлен на схеме.

Идентификация фьюжен-генов с известными партнерами осуществляется с помощью двух независимых алгоритмов: по наличию сплит-прочтений и по наличию 5'/3' дисбаланса в покрытии онкогенов. При этом для онкогена определяется крайний 5'-экзон, а для гена-партнера – крайний 3'-конец гена, участвующие в образовании фьюжен-гена.

Идентификация фьюжен-генов с неизвестными партнерами осуществляется исключительно по наличию 5'/3'-дисбаланса в покрытии онкогена. Рекомендуется подтверждать обнаруженные фьюжен-гены с неизвестным партнером альтернативными методами исследования (например, FISH или IHC).

Идентификация потери экзона осуществляется по наличию сплит-прочтений.



3.2. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для просмотра значений метрик контроля качества перейдите на страницу образца и нажмите на кнопку МЕТРИКИ КК в правом верхнем углу страницы.

3.2.1. Метрики качества образца

- **Число прочтений на образец:** общее число прямых и обратных прочтений.
- **Число нецелевых прочтений:** число прочтений, не выравненных на целевые регионы генома и транскриптома.
- **Доля нецелевых прочтений:** процентная доля прочтений, не выравненных на целевые регионы генома и транскриптома, от числа прочтений на образец.
- **Соотношение ДНК:РНК** – это отношение между числом прочтений ДНК и РНК после фильтрации в образце.

3.2.2. Метрики качества ДНК

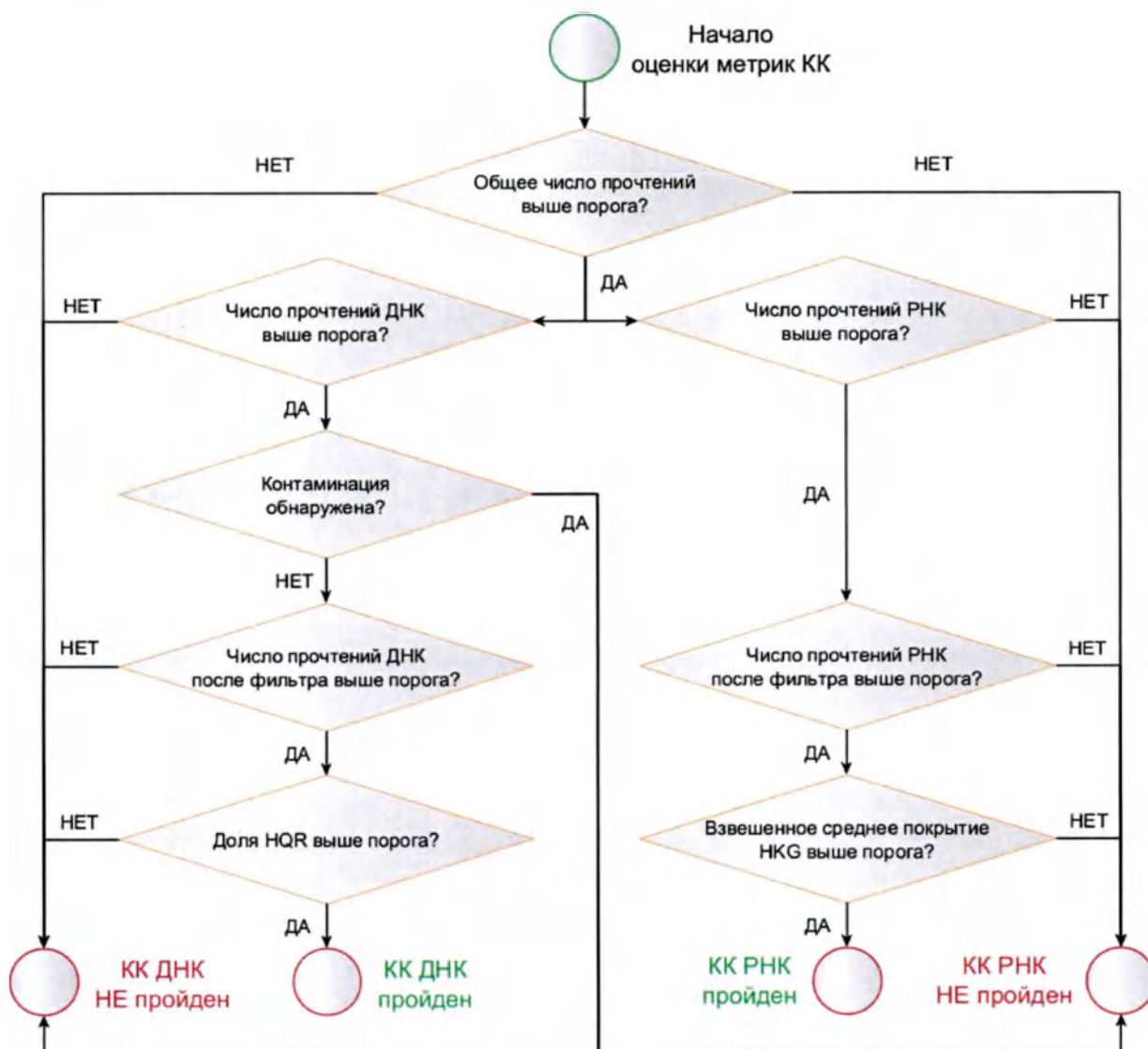
- **Число прочтений ДНК:** число прочтений, выравненных на целевые регионы ДНК.
- **Число прочтений ДНК после фильтрации:** число прочтений, выравненных на целевые регионы ДНК, после фильтрации по качеству и длине прочтения.
- **Доля прочтений ДНК после фильтрации:** процентная доля прочтений, выравненных на целевые регионы ДНК, после фильтрации по качеству и длине прочтения, от числа прочтений ДНК.
- **Однородность покрытия:** процентная доля позиций (баз), с покрытием не менее 20% от среднего покрытия по всем позициям целевых регионов панели. Отражает разброс покрытия по целевым регионам.
- **Среднее покрытие на ампликон ДНК.**
- **Доля HQR:** процентная доля целевого региона, покрытая с высоким качеством. Основной показатель качества секвенирования ДНК анализата.
- **Контаминация:** метрика показывает наличие (обнаружено), либо отсутствие (не обнаружено) примеси чужеродной человеческой ДНК в образце. *Подробнее см. раздел BIDs.*

3.2.3. Метрики качества РНК

- **Число прочтений РНК:** число прочтений, выравненных на целевые регионы РНК.
- **Число прочтений РНК после фильтрации:** число прочтений, выравненных на целевые регионы РНК, после фильтрации по ориентации прямого и обратного прочтения, длине прочтения и количеству soft-clip позиций.
- **Доля прочтений РНК после фильтрации:** процентная доля прочтений, выравненных на целевые регионы РНК, после фильтрации по ориентации прямого и обратного прочтения, длине прочтения и количеству soft-clip позиций, от числа РНК прочтений.
- **Взвешенное арифметическое среднее покрытие ампликонов HKG:** определяется как отношение суммы произведений значений покрытий ампликонов HKG и весов (частота встречаемости значения покрытия) к сумме весов. Основной показатель качества секвенирования РНК анализата.

3.2.4. Алгоритм контроля качества

Алгоритм контроля качества представлен на схеме:



3.2.5. Пороговые значения метрик качества

Установленные пороговые значения по метрикам качества представлены в таблице:

Показатель	Пороговое значение
Метрики качества образца	
Число прочтений на образец	≥ 10 000
Метрики качества ДНК	
Число прочтений ДНК	≥ 100 000
Число прочтений ДНК после фильтрации	≥ 100 000
Доля HQR	≥ 50%
Контаминация	Не обнаружено
Метрики качества РНК	
Число прочтений РНК	≥ 5 000
Число прочтений РНК после фильтрации	≥ 5 000
Взвешенное арифметическое среднее покрытие ампликонов НКГ	≥ 350

При значении показателя ниже порогового и в случае обнаружения контаминации в образце **будет установлен соответствующий метрике бейдж красного цвета и красный бейдж аналита. Результаты по аналиту, имеющему красный бейдж, не подлежат интерпретации, образец рекомендуется секвенировать повторно:**

Бейдж	Аналит	Статус	Описание
	ДНК	Контроль качества ДНК пройден	Результаты по аналиту ДНК пригодны для интерпретации.
	ДНК	Контроль качества ДНК НЕ пройден	Результаты по аналиту ДНК НЕ пригодны для интерпретации.
	РНК	Контроль качества РНК пройден	Результаты по аналиту РНК пригодны для интерпретации.
	РНК	Контроль качества РНК НЕ пройден	Результаты по аналиту РНК НЕ пригодны для интерпретации.

3.2.6. Библиотека контрольных образцов (КД/КР)

Контрольные образцы (КД и КР) используются для создания ДНК/РНК библиотеки контрольных образцов. Соответствие значений метрик качества библиотеки контрольных образцов значениям, указанным в разделе **ПОРОГОВЫЕ ЗНАЧЕНИЯ МЕТРИК КАЧЕСТВА**, свидетельствует о корректном выполнении протокола пробоподготовки и секвенирования библиотек.

В случае, если оба аналита контрольных образцов имеют зеленые бейджи, при этом аналиты анализируемых образцов имеют красные бейджи, обратитесь к разделу **УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ**.

В случае, если оба аналита и контрольных образцов, и анализируемых образцов имеют красные бейджи обратитесь к разделу **УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ**.

В случае, если хотя бы один из аналитов контрольных образцов имеет красный бейдж, при этом аналиты анализируемых образцов имеют зеленые бейджи, обратитесь в поддержку ООО ПАРСЕК ЛАБ».

3.3. 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
COSMIC https://cancer.sanger.ac.uk/	Общая база данных соматических вариантов. Аннотация содержит информацию о типе варианта, предполагаемом эффекте и образцах, в которых обнаружен вариант.
CIVIC https://civicdb.org	Общая база данных соматических вариантов в геноме человека. База данных содержит информацию о вариантах, заболеваниях, препаратах и клинических испытаниях, предоставленную научным и клиническим сообществом.

ClinVar https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar	Общая база данных генетических вариантов в геноме человека. Аннотация включает информацию о 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.
IARC TP53 https://tp53.isb-cgc.org/	Локус-специфичная база данных соматических и герминативных вариантов в гене TP53.
gnomAD https://gnomad.broadinstitute.org	Популяционная база данных. Аннотация содержит информацию о частоте генетических вариантов в общей популяции.
IntOGen https://www.intogen.org	База данных драйверных мутаций в различных типах опухолей.

По запросу пользователей возможно добавление других внешних источников аннотации.

3.4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов должна выполняться специалистом, квалифицированным в области интерпретации результатов высокопроизводительного секвенирования, знакомым с принципами технологии секвенирования Illumina, номенклатурой генетических вариантов и рекомендациями по интерпретации соматических и герминативных вариантов.

Варианты, обнаруженные в образце, представлены на вкладке «Варианты» в ПО «OncoScope™ Software». Для варианта приводится следующая аннотация:

- уровень значимости по критериям AMP (применяется для соматических вариантов);
- значимость варианта по критериям ACMG (применяется для герминативных вариантов);
- HGNC название гена, название фьюжен-гена или потери экзона;
- тип варианта и эффект¹⁶ (предсказание влияния варианта на белок; только для ДНК вариантов);
- HGVS номенклатура (только для ДНК вариантов; мультинуклеотидные замены в соответствии с правилами HGVS идентифицируются как инделы);
- аллельная фракция (только для ДНК вариантов);
- покрытие
 - для ДНК вариантов указывается число прочтений в локусе, в котором обнаружен вариант;

¹⁶ Тип варианта и эффект генерируются на основании HGVS номенклатуры, в редких случаях структура генетического варианта может быть сложной, и запись HGVS, тип и эффект могут не отражать в полной мере эффект варианта на уровне белка.

- для фьюжен-генов с известным партнером и пропусков экзона указывается число обнаруженных сплит-прочтений;
- для фьюжен-генов с неизвестным партнером отображается бейдж дисбаланса, при наведении на который указывается дисбаланс по покрытию - нормированное значение 5'/3'-дисбаланса покрытия онкогена. Значение величины варьирует в пределах [-100; 100]. Отрицательные значения соответствуют отсутствию фьюжен-гена; положительные - наличию фьюжен-гена. При этом значения в пределах [-1; 1] соответствуют серой зоне, в которой невозможно достоверно определить наличие, отсутствие фьюжен-гена в образце.

- категории AMP и чувствительность к препаратам;
- частота варианта по аккаунту (учитываются только уникальные по BIDs образцы);
- ссылки на внешние источники аннотации¹⁷ (только для ДНК вариантов).

Хотспоты (значимые варианты), анализируемые в панели, представлены на вкладке «Хотспоты» в ПО «OncoScope™ Software». Для хотспота приводится следующая аннотация:

- уровень значимости по критериям AMP (применяется для соматических вариантов);
- значимость варианта по критериям ACMG (применяется для герминативных вариантов; только для ДНК вариантов);
- HGNC название гена, фьюжен-гена или потери экзона;
- тип варианта и эффект¹⁸ (предсказание влияния варианта на белок);
- HGVS номенклатура (только для ДНК вариантов; мультинуклеотидные замены в соответствии с правилами HGVS идентифицируются как инделлы);
- аллельная фракция (только для ДНК вариантов; для дикого типа указывается значение «< LOD», то есть «ниже предела обнаружения»);
- категории AMP и чувствительность к препаратам;
- частота варианта по аккаунту (учитываются только уникальные по BIDs образцы);
- ссылки на внешние источники аннотации¹⁹ (только для ДНК вариантов).

Генотипирование проводится только в регионах с высоким качеством секвенирования (HQR). Хотспоты, расположенные в LQR, имеют статус «генотип не определен», то есть в данном анализе данных хотспот не проанализирован.

Фьюжен-гены могут быть определены как ненадежные в случае пограничных значений двух независимых алгоритмов генотипирования (по сплит-прочтениям и по 5'/3' дисбалансу), такие варианты маркированы красной заливкой и требуют подтверждения альтернативным методом.

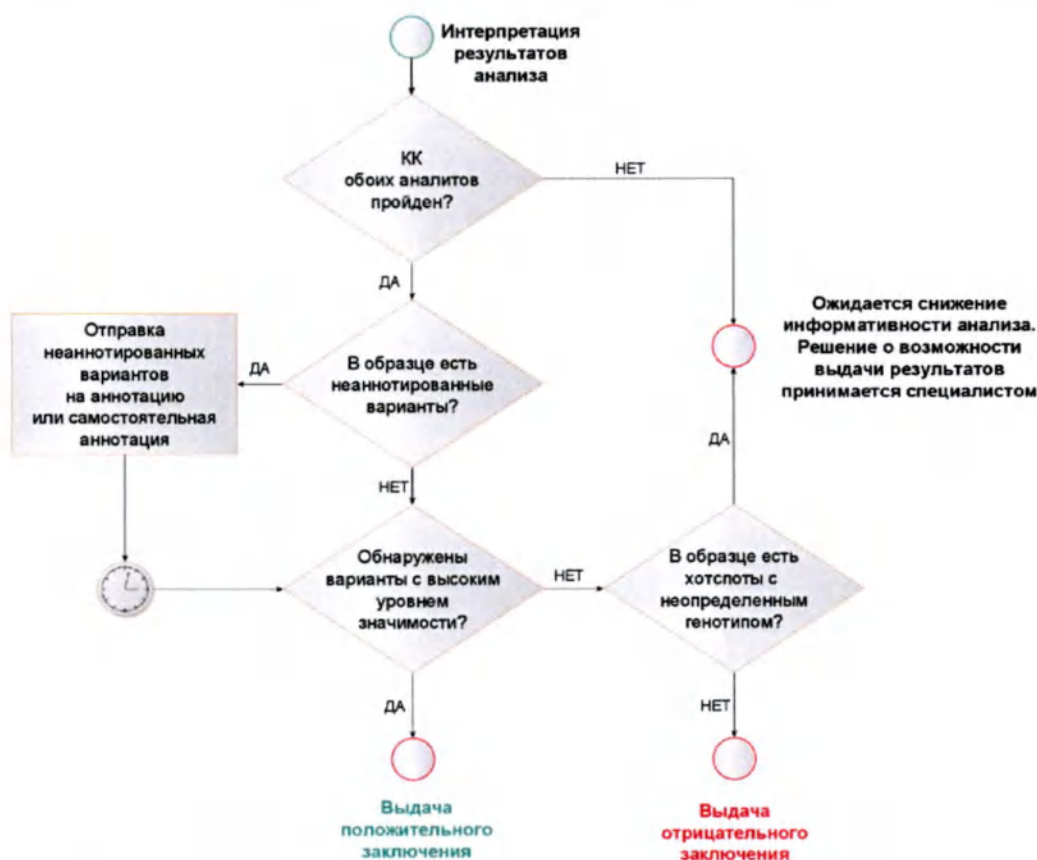
Рекомендуется подтверждать альтернативным методом обнаруженные фьюжен-гены с неизвестным партнером.

При интерпретации результатов специалист критически оценивает представленную аннотацию и, руководствуясь рекомендациями AMP/ACMG, с учетом своего опыта и фенотипических данных по образцу, делает заключение о результатах анализа. Алгоритм интерпретации приведен на схеме:

¹⁷ Подробнее см. раздел ВНЕШНИЕ ИСТОЧНИКИ АННОТАЦИИ

¹⁸ Тип варианта и эффект генерируются на основании HGVS номенклатуры, в редких случаях структура генетического варианта может быть сложной, и запись HGVS, тип и эффект могут не отражать в полной мере эффект варианта на уровне белка.

¹⁹ Подробнее см. раздел ВНЕШНИЕ ИСТОЧНИКИ АННОТАЦИИ



Для каждого варианта есть возможность просмотра сиквенса во встроенном геномном браузере, который открывается через меню ($\equiv$), находящееся слева на каждой строке варианта (нажать «Посмотреть в IGV»). Рекомендуется делать визуальную оценку значимых вариантов, выносимых в заключение.

При нажатии на аннотированный вариант открываются окна с аннотацией по каждой из трех категорий (терапевтическая, прогностическая, диагностическая). В каждом окне приводится уровень по классификации AMP; препарат / прогноз / подтип опухоли; тезис, соответствующий данному уровню AMP; ссылки на внешние источники и тип опухоли, для которого приводится данная классификация.

В соответствии с ГОСТ Р 58505-2019, в настоящее время используют два подхода к классификации генетических вариантов: по патогенности и по значимости возможной лекарственной терапии. В ПО «OncoScope™ Software» представлены оба подхода – международная классификация AMP по клинической значимости, и международная классификация ACMG по патогенности. При этом существуют альтернативные системы классификации вариантов, которые могут также использоваться клиницистами на свое усмотрение:

- Руководство по интерпретации клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования. Гордиев М. Г., Бровкина О. И., Еникеев Р. Ф., Никитин А. Г., Сакаева Д. Д. 2020.
- Интерпретация соматических генетических вариантов, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК, на примере онкологических заболеваний детского возраста. Спектор М.А., Ясько Л.А., Друй А.Е. 2021.

- Annotation of Variant Data from High-Throughput DNA Sequencing from Tumor Specimens: Filtering Strategies to Identify Driver Mutations. Sun S. et al. 2019.
 - Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). Horak P. et al. 2021.
- Неаннотированные варианты рекомендуется направлять на аннотацию специалистам ПАРСЕК ЛАБ (подробнее см. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ).

3.5. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема (красный бейдж)	Возможная причина	Устранение проблемы
Число прочтений	При импорте образца указана некорректная серия реагентов	Повторно импортировать результаты по образцу в ПО «OncoScope™ Software» с указанием корректного номера серии.
	Образец проиндексирован с парой индексов, отличной от той, которая внесена в SampleSheet.	Повторно разобрать прочтения по индексам с корректным SampleSheet (подробнее см. документацию соответствующей платформы секвенирования) и проанализировать в ПО «OncoScope™ Software».
	Некорректное пулирование библиотеки (взято недостаточное количество библиотеки)	Если концентрация библиотеки удовлетворяет требованиям в разделе ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ, рекомендуется повторно секвенировать библиотеку в следующем запуске и проанализировать в ПО «OncoScope™ Software».
	Образцы ДНК и РНК не были добавлены в реакцию при таргетном обогащении.	Если концентрация библиотеки не удовлетворяет требованиям в разделе ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ, рекомендуется повторно приготовить библиотеку и повторить анализ.
Прочтения ДНК	Входное количество ДНК ниже предела обнаружения.	Провести повторное выделение ДНК, рекомендуемым набором, либо, если недостаточно биоматериала в срезе или FFPE блоке, сделать повторный срез или повторить забор и фиксацию биоматериала.
	Деградированная ДНК в FFPE образце.	Выполнить повторный забор биоматериала.
	Наличие ингибиторов ПЦР в образце ДНК.	Провести повторное выделение ДНК рекомендуемым набором.
	Нарушение протокола ПЦР при таргетном обогащении с ДНК пулом праймеров.	При выявлении неисправности или ошибок в журнале амплификатора, либо некорректного протокола ПЦР, рекомендуется повторно приготовить библиотеку и повторить анализ.
	Некорректное пулирование ПЦР продукта (взято недостаточное количество ПЦР продукта ДНК)	Повторно приготовить библиотеку и повторить анализ.
ДНК после фильтра	Сильно деградированная ДНК в FFPE образце.	Выполнить повторный забор биоматериала.

	Нарушение протокола ПЦР при таргетном обогащении с ДНК пулом праймеров.	При выявлении неисправности или ошибок в журнале амплификатора, либо некорректного протокола ПЦР, рекомендуется повторно приготовить библиотеку и повторить анализ.
Доля HQR	Аналогично проблеме «Прочтения ДНК»	Аналогично проблеме «Прочтения ДНК». Обнаруженные значимые варианты могут быть выданы.
Контаминация	Контаминация на уровне забора биоматериала, пробоподготовки и секвенирования.	Результаты по обоим анализам не пригодны для интерпретации. Рекомендуется повторить анализ с этапа предполагаемой контаминации.
Прочтения РНК	Входное количество РНК ниже предела обнаружения.	Повторить секвенирование, увеличив общее покрытие образца в запуске, либо повторить приготовление библиотек, увеличив долю РНК-амплификата в объединенном продукте. При воспроизводимом низком покрытии РНК-мишеней провести повторное выделение РНК рекомендуемым набором, либо, если недостаточно биоматериала в срезе или FFPE блоке, сделать повторный срез или повторить забор и фиксацию биоматериала.
	Деградированная РНК в FFPE образце.	Выполнить повторный забор биоматериала.
	Наличие ингибиторов ПЦР в образце РНК.	Провести повторное выделение РНК рекомендуемым набором.
	Нарушение протокола ПЦР при таргетном обогащении с РНК пулом.	При выявлении неисправности или ошибок в журнале амплификатора, либо некорректного протокола ПЦР рекомендуется повторно приготовить библиотеку и повторить анализ.
	Некорректное пулирование ПЦР продукта (взято недостаточное количество ПЦР продукта РНК)	Повторно приготовить библиотеку и повторить анализ.
РНК после фильтра	Сильно деградированная РНК в FFPE образце.	Выполнить повторный забор биоматериала.
	Нарушение протокола ПЦР при таргетном обогащении с РНК пулом.	При выявлении неисправности или ошибок в журнале амплификатора, либо некорректного протокола ПЦР, рекомендуется повторно приготовить библиотеку и повторить анализ.
Покрытие HKG	Специфика образца (профиль экспрессии HKG)	Рекомендуется повторно секвенировать образец, увеличив число прочтений на образец.

Соотношение прочтений ДНК:РНК

Причиной появления красных бейджей по числу прочтений ДНК или РНК может являться неоптимальное соотношение прочтений по этим анализам. Типичное соотношение числа прочтений ДНК к числу прочтений РНК должно стремиться к 9:1 (см. рисунок ниже). Соотношение ДНК:РНК конкретного образца можно найти в метриках качества в программном обеспечении (см. раздел 4.7. Детали анализа образца). При регулярном неоптимальном соотношении прочтений по анализам (обычно в случае использования пользовательского, не рекомендованного производителем, набора для выделения) требуется индивидуальный подбор

объемов соединения продуктов таргетной амплификации ДНК и РНК. На рисунке на примере четырех разных образцов FFPE (I-IV) продемонстрировано, как меняются доли прочтений по анализам при разном соотношении объемов объединения продуктов таргетной амплификации ДНК и РНК (от 0,5:1 до 4:1). При использовании рекомендованного набора для выделения при объединении продуктов таргетной амплификации ДНК и РНК в соотношении **4:1** образцы стремятся к оптимальному соотношению числа прочтений **9:1**.



4. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Программное обеспечение «OncoScope™ Software» (версия 1²⁰; разработчик ООО «ПАРСЕК ЛАБ») (далее ПО) предназначено для анализа и визуализации данных высокопроизводительного секвенирования, полученных с помощью Набора реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL».

Класс безопасности ПО – А.

ПО обладает следующими функциональными возможностями:

- импорт результатов секвенирования и метаданных;
- выравнивание прочтений на референсный геном человека;
- контроль качества полученных данных;
- определение точечных генетических вариантов в целевых регионах;
- определение целевых транслокаций (фьюжен-генов) и пропусков экзона;
- дискриминация контаминированных и не контаминированных образцов;
- определение пола;
- визуализация результатов генотипирования;
- сортировка и фильтрация данных;
- экспорт результатов в различных форматах.

²⁰ Главный номер версии – изменяется при добавлении новых функций, существенно меняющих возможности ПО. Для ПО входящего в состав зарегистрированных МИ обновления версий не предусмотрены.



Обновление ПО для актуализации компонентов выполняется автоматически в виде установки сервисных пакетов²¹ (SP).

Персональные данные не передаются и не хранятся в ПО.

Анализ и хранение геномных данных осуществляются с помощью облачного сервиса, сертифицированного в соответствии с Федеральным законом от 27.07.2006 N 152-ФЗ "О персональных данных" и имеющего сертификат безопасности Федеральной службы по техническому и экспортному контролю России.

4.1. РЕКОМЕНДОВАННЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬСКОГО ПК

Скорость соединения не менее 50 Мбит/с;

Браузер Google Chrome версии 85 и выше;

Монитор - разрешение экрана 1920x1080 пикселей, диагональ не менее 21 дюйма.

4.2. ДОСТУП К ПО

Программное обеспечение «OncoScope™ Software» используется исключительно для анализа данных, полученных с использованием Набора реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL» (производства ООО «ПАРСЕК ЛАБ»).

Доступ к программному обеспечению осуществляется путем авторизации на сайте <https://apps.parseq.pro> после принятия лицензионного соглашения. Учетные данные пользователя указываются в сопроводительных документах к договору на поставку Набора реагентов, либо передаются во время первичного инструктажа. После авторизации необходимо выбрать «OncoScope™».

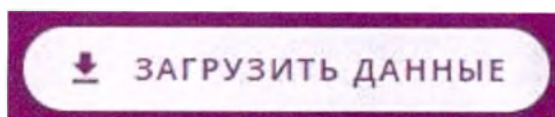
Анализ сторонних данных в ПО «OncoScope™ Software» запрещён правообладателем.

4.3. ИМПОРТ ДАННЫХ

Для перехода на страницу импорта данных нажмите 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.

²¹ Номер сборки сервисного пакета в формате SP-X.Y.Z изменяется при исправлении ошибок, не вносящих изменения в функционал ПО.

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ»	Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ	#UM_L-102ru	Страница 53 из 69



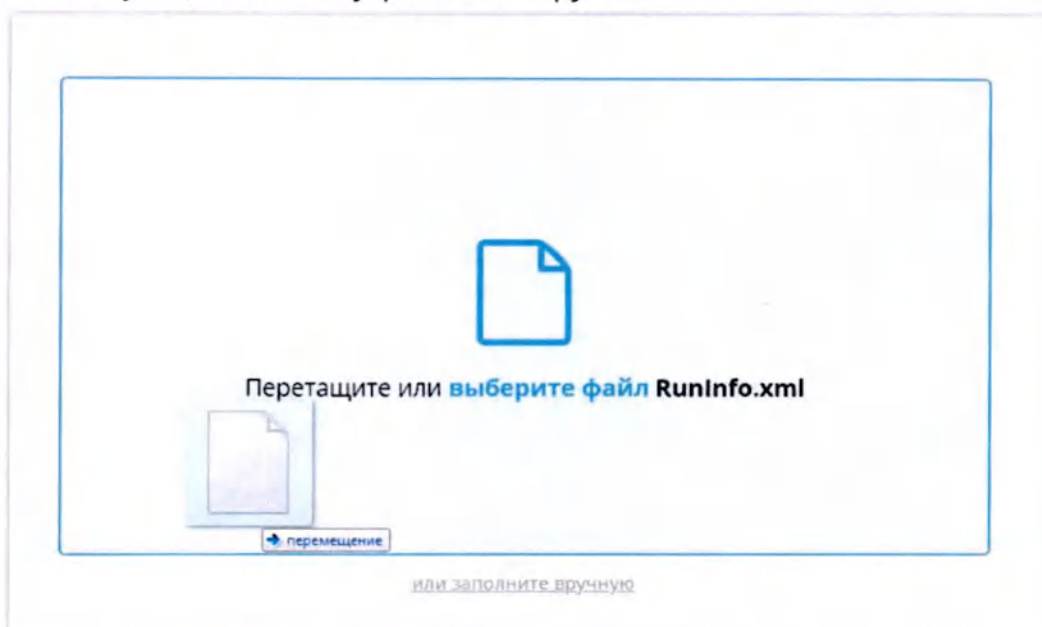
4.3.1. Выбор серии реагентов

Укажите прибор, на котором выполнено секвенирование, и серию Набора реагентов (*подробнее см. раздел АЛГОРИТМ АНАЛИЗА ДАННЫХ*), использованного для подготовки образцов из запуска. Серия указана на боковой этикетке комплекта реагентов. В одном запуске допускается комбинирование библиотек, приготовленных с помощью разных серий.

Нажмите кнопку ВПЕРЕД для перехода 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.



Нажмите кнопку ВПЕРЕД для перехода на следующий шаг.

4.3.3. Добавление образцов

Добавьте образцы путем перетаскивания файлов *.fastq.gz или с помощью файлового менеджера браузера.

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

Нажмите кнопку ВПЕРЕД для перехода на следующий шаг 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 этого на экране будет отображен индикатор процесса загрузки образцов.

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. АНАЛИЗЫ

Приложение предназначено для просмотра и поиска интересующих запусков и анализов образцов. Приложение представляет список запусков, для каждого из которых указаны следующие характеристики:

- ID запуска;
- серия набора реагентов;
- набор реагентов для приготовления библиотек;
- набор реагентов для секвенирования;
- количество циклов;
- дата секвенирования;
- число образцов в запуске;

По нажатию на интересующий запуск открывается список образцов, секвенированных в запуске. Для каждого образца приведено:

- название образца;
- номер образца в постановке;
- дата анализа;
- доля HQR;
- пол;
- статус анализа ДНК и РНК;
- число аннотаций;
- пользовательские метки;
- бейджи контроля качества, если значение метрики не прошло установленный порог.

Приложение предоставляет доступ для поиска образцов по названию панели, названию образца, обнаруженным вариантам, ID запуска, дате и полу. Для доступа к расширенным настройкам поиска нажмите на иконку дополнительный действий ▼.

4.5. ДЕТАЛИ АНАЛИЗА ОБРАЗЦА

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

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

- название образца;

- номер образца в запуске;
- ID запуска;
- серия набора реагентов и версия алгоритма анализа данных по наведению на серию;
- дата секвенирования;
- бейджи контроля качества;
- пользовательские метки.

Кнопка дополнительных действий слева от названия образца дает возможность перейти к другим образцам в запуске.

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).

4.5.1. Варианты

Все варианты, обнаруженные в образце (*см. раздел АНАЛИЗ ДАННЫХ*), представлены на экране просмотра вариантов.

Варианты представляются в виде таблицы со следующими колонками:

- AMP уровень (*см. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ*). По клику на значение можно перейти в карточку варианта.
- ACMG значимость (*см. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ*). По клику на значение можно перейти в карточку варианта.
- Название гена в соответствии с номенклатурой HGNC.
- Тип и эффект варианта.
- Название согласно номенклатуре HGVS²². Представлено относительно генома (gDNA), транскрипта (cDNA) и белка. Для РНК вариантов дается название фьюжен-гена или потери экзона.
- Аллельная фракция. Нажатием на значение можно перейти в геномный браузер IGV.

Покрытие — количество прочтений данной позиции генома. Нажатием на значение можно перейти в геномный браузер IGV.

Категории AMP — число аннотаций с терапевтической, диагностической и прогностической значимостью (*см. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ*). По клику на значение раскроется таблица аннотаций.

Частота варианта по аккаунту — процент образцов с данным вариантом по аккаунту. Если в аккаунт был загружен новый запуск, частоты вариантов будут обновлены после завершения анализа всех образцов. Для расчета частоты учитываются только уникальные образцы, в

²² <http://www.hgvs.org/mutnomen>

которых вариант был секвенирован с высоким качеством (см. раздел АНАЛИЗ ДАННЫХ). По клику на значение откроется поиск образцов с данным вариантом.

Частота варианта по GnomAD — максимальная частота варианта в популяции по данным базы gnomAD, соответствует значению faf95_пормах - самая высокая максимально достоверная частота аллели в популяции для конкретного заболевания, для которого наблюдаемое число аллелей не совместимо с патогенностью²³.

Ссылки на внешние источники аннотации.

Для фьюжен-генов и пропусков экзона следующая аннотация не предоставляется:

- номенклатура HGVS;
- аллельная фракция;
- ссылки на внешние источники.

Строки таблицы, содержащие хотспоты, обозначены красной вертикальной чертой.

В рамках экрана доступна фильтрация по типу варианта и эффекту, AMP уровню и ACMG значимости, а также поиск варианта по HGVS номенклатуре, наличию во внешних источниках и гену.

Ген	Тип варианта	Эффект	Вариант	Аллельная фракция	Покрываемость	Категория AMP	Частота	Частота ACMG	Внешние источники
ALK	FUSION		3223 ALK (201 + 214) (12)		322		33%		
MT	DEL	MT1000 14 bp			1644		32%		
EGFR	DEL	g.85174772_85174786del c.2238_2249del p.(Glu746_Ala750del)		18%	2694		3%		
TP53	SNV	g.78737750A c.844C>T p.(Arg282Trp)		15%	944		3%		
BRB2	SNV	g.39723358A>G c.1362A>G p.(His455Val)		100%	3394		19%		
EGFR	SNV	g.85148655C>T c.474C>T p.(Arg158W)		44%	1912		38%		
EGFR	SNV	g.85181270G>A c.2261G>A p.(Gln737W)		47%	910		43%		
EGFR	SNV	g.85186724T>C c.2709T>C p.(Thr908W)		100%	416		47%		
TP53	SNV	g.78761540G>C c.218C>G p.(His73Leu)		96%	2714		50%		

4.5.2. Хотспоты «NSCLC»

Хотспоты представляют собой значимые генетические варианты в пределах целевого региона. Список хотспотов, установленных производителем Набора реагентов, представлен на экране «NSCLC» и может обновляться по мере накопления научных/клинических данных. Также пользователю предоставляется возможность создавать собственные списки хотспотов, подробнее см. раздел ХОТСПОТЫ.

Визуально экран «Хотспоты NSCLC» аналогичен экрану «Варианты» и представляет таблицу всех хотспотов, определяемых при помощи набора «OncoScope™ NSCLC Solution IL». Варианты представляются в виде таблицы со следующими колонками:

- AMP уровень (См. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ). Нажатием на значение можно перейти в карточку варианта.

²³ Подробнее см. <https://gnomad.broadinstitute.org/help/faf>

- ACMG значимость (См. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ). Нажатием на значение можно перейти в карточку варианта.
- Название гена в соответствии с номенклатурой HGNC (для ДНК вариантов). Для РНК вариантов дается название фьюжен-гена или потери экзона.
- Тип и эффект варианта (для ДНК вариантов).
- Название согласно номенклатуре HGVS²⁴ (для ДНК вариантов). Представлено относительно генома (gDNA), транскрипта (cDNA) и белка. Для РНК вариантов дается название фьюжен-гена или потери экзона.
- Аллельная фракция. Нажатием на значение можно перейти в геномный браузер IGV.
- Категории AMP — число аннотаций с терапевтической, диагностической и прогностической значимостью и чувствительность к препаратам (См. раздел АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ).
- Частота варианта по аккаунту — процент образцов с данным вариантом по аккаунту. Если в аккаунт был загружен новый запуск, частоты вариантов будут обновлены после завершения анализа всех образцов. Для расчета частоты учитываются только уникальные образцы, в которых вариант был секвенирован с высоким качеством (см. раздел АНАЛИЗ ДАННЫХ). Нажатием на значение откроется поиск образцов с данным вариантом.
- Частота варианта по GnomAD — максимальная частота варианта в популяции по данным базы gnomAD, соответствует значению faf95_портах — самая высокая максимально достоверная частота аллели в популяции для конкретного заболевания, для которого наблюдаемое число аллелей не совместимо с патогенностью²⁵.
- Ссылки на внешние источники аннотации (для ДНК вариантов).

Для удобства анализа обнаруженных хотспотов предоставлена возможность фильтрации по генотипу и поиск интересующего варианта по названию варианта в номенклатуре HGVS, эффекту и типу. По умолчанию показаны только варианты с частотой выше предела детекции и варианты в регионах с низким качеством. Для просмотра вариантов ниже предела детекции необходимо снять фильтр «Ниже LOD».

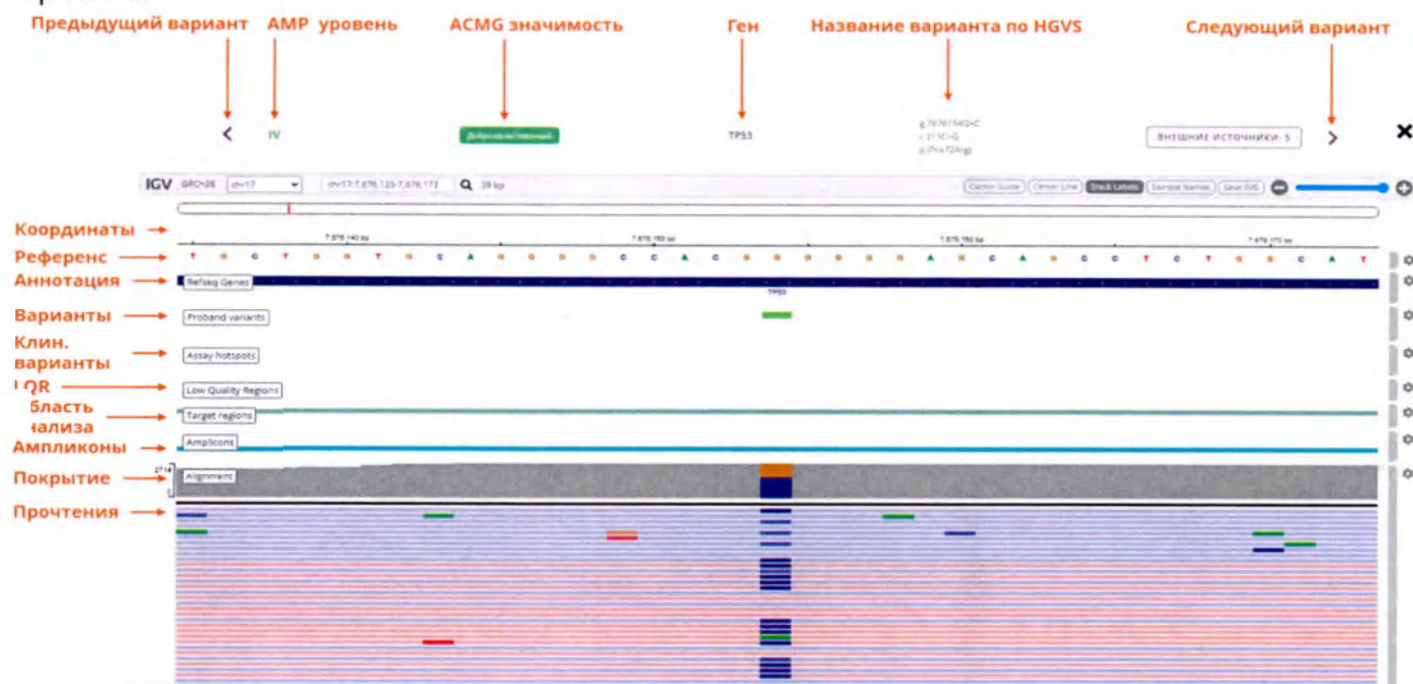
²⁴ <http://www.hgvs.org/mutnomen>

²⁵ Подробнее см. <https://gnomad.broadinstitute.org/help/faf>

7 из 370	AMP уровень	ACMG значимость	Ген	Тип варианта	Вариант	Аллельная фракция	Категория AMP	Частота	Матрица	Внешние источники
	I-A		ALK	PUSON	3223 ALK (T) > T (C)			33%		
	I-A		VEG	BIGLOD	VEG (G) > G (A)			33%		
	I-A		EGFR	DEL	g.88174772_88174784del c.2203_2249del p.(Glu743_Ala750del)	18%		0%		
	I-B		TP53	SNV	g.76727762G>A c.344C>T p.(Arg108Ter)	18%		0%		
			TP53	SNV	g.76727762G>A c.344C>T p.(Arg108Ter)			41%		
			TP53	SNV	g.76727762G>A c.344C>T p.(Arg108Ter)			41%		
			TP53	SNV	g.76727762G>A c.344C>T p.(Arg108Ter)			41%		

4.5.3. Визуализация прочтений в геномном браузере IGV

Для доступа к геномному браузеру IGV, находясь на экране Варианты, Хотспоты, Анализ покрытия или BIDs, нажмите на кнопку меню дополнительных действий  и выберите «Посмотреть в IGV» или нажмите на значение аллельной фракции или покрытия интересующего варианта.

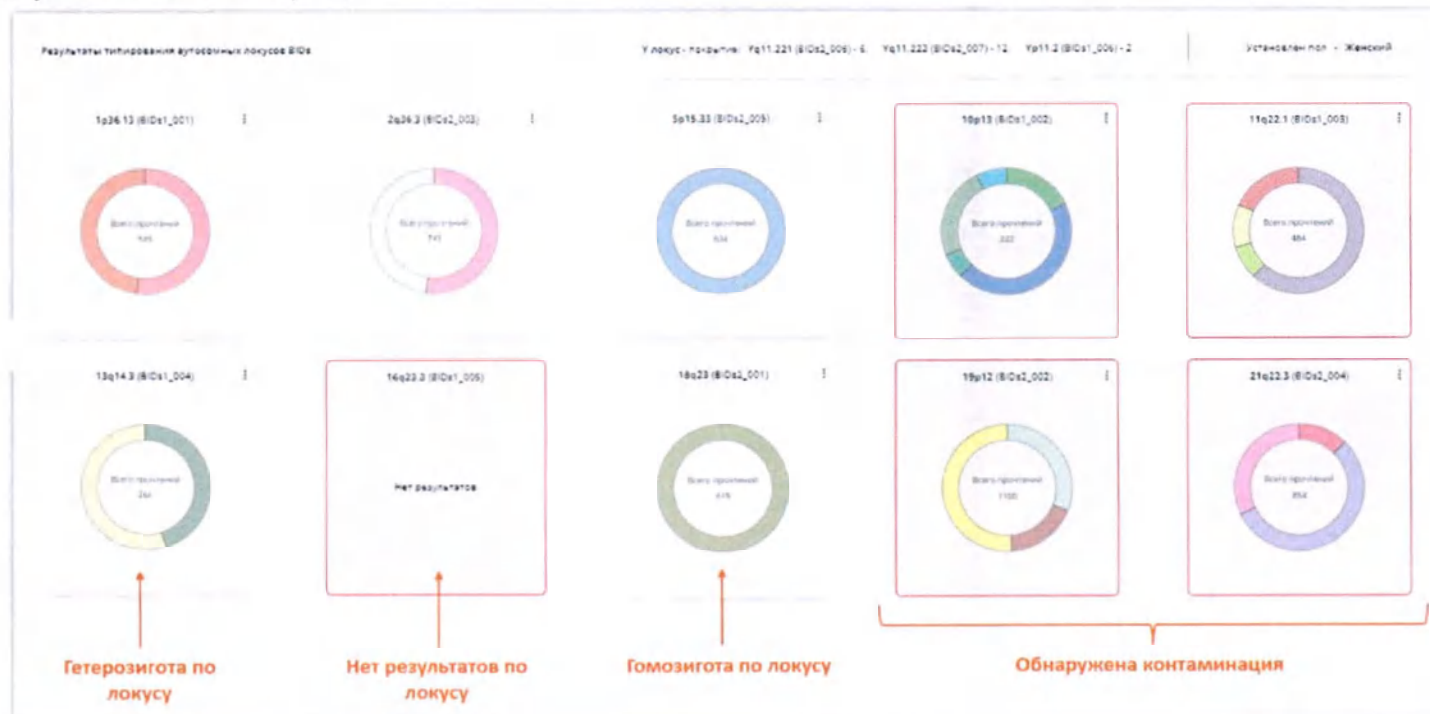


4.5.4. Анализ покрытия

Каждый ампликон имеет специфическое покрытие, которое определяется эффективностью таргетного обогащения. Оценить покрытие ДНК и РНК можно на отдельных экранах приложения. Информация по покрытию ампликонов приведена в таблице с возможностью фильтрации по ID ампликона, гену, координатам, длине, региону, количеству прочтений и длине региона с низким качеством.

4.5.5. BIDs

Биологические идентификаторы представлены на экране BIDs. Каждый BID локус представлен в виде кольца, разделенного на цветные сектора. Каждый сектор представляет собой отдельную аллель в локусе. В случае наличия контаминации в образце присутствует более двух аллелей (секторов).



4.6. АННОТАЦИЯ ВАРИАНТОВ

Терапевтическая и прогностическая значимость вариантов выполнена специалистами ПАРСЕК ЛАБ в соответствии с критериями совместного Консенсуса AMP/ASCO/CAP²⁶ «Руководство о интерпретации и представлению опухолевых маркеров» (Li M.M. et al., 2017).

Согласно данным критериям, варианту нуклеотидной последовательности может быть присвоен один или несколько уровней, при этом в таблицу вариантов выносятся наиболее значимый уровень:

AMP уровень	Значимость	Описание
I-A	Высокая	- Вариант ассоциирован с чувствительностью к препарату, одобренному FDA и/или включенному в клинические руководства для данного онкологического заболевания. - Вариант ассоциирован с устойчивостью к препарату, одобренному FDA и/или включенному в клинические руководства для данного онкологического заболевания. - Вариант включен в клинические руководства для данного онкологического заболевания.

²⁶ AMP – Association for Molecular Pathology; ASCO – American Society of Clinical Oncology; CAP – College of American Pathologists.

I-B	Высокая	- Вариант ассоциирован с чувствительностью к препарату на основании непротиворечивых результатов исследований с высокой статистической мощностью, одобренных консенсусом специалистов для данного онкологического заболевания. - Вариант ассоциирован с устойчивостью к препарату на основании непротиворечивых результатов исследований с высокой статистической мощностью, одобренных консенсусом специалистов для данного онкологического заболевания. - Значение для данного онкологического заболевания основано на непротиворечивых результатах исследований с высокой статистической мощностью и/или множества небольших исследований, подтвержденных консенсусом специалистов.
II-C	Потенциальная	- Вариант ассоциирован с чувствительностью к препарату, одобренному FDA и/или включенному в клинические руководства для другого онкологического заболевания. - Вариант ассоциирован с устойчивостью к препарату, одобренному FDA и/или включенному в клинические руководства для другого онкологического заболевания. - Вариант является критерием включения в клинические исследования по данному онкологическому заболеванию. - Значение для данного онкологического заболевания на основании результатов множества небольших исследований, одобренных специалистами.
II-D	Потенциальная	- Потенциальное терапевтическое значение на основании доклинических исследований. - Значение для данного онкологического заболевания на основании результатов нескольких небольших исследований, без учета одобрения специалистами.
III	Неясная	- Вариант отсутствует в популяционных базах данных, либо встречается с очень низкой частотой. - Вариант отсутствует в онкологических базах данных, либо присутствует без убедительных данных об ассоциации с каким-либо онкологическим заболеванием.
IV	Доброкачественная	Вариант присутствует в популяционных базах данных с высокой частотой без данных об ассоциации с каким-либо онкологическим заболеванием.

Для диагностики наследственных опухолевых синдромов приводится также аннотация вариантов согласно критериям совместного Консенсуса ACMG/AMP²⁷ «Руководство по интерпретации генетических вариантов» (Richards S. et al., 2015). **Данная аннотация применима только для диагностики наследственных заболеваний, и не должна использоваться для назначения таргетной терапии при онкологических заболеваниях.** Согласно данной классификации, выделяют пять категорий значимости генетического варианта (подробнее см. Richards S. et al., 2015):

²⁷ ACMG – American College of Medical Genetics and Genomics; AMP – Association for Molecular Pathology.

ACMG значимость	Обозначение	Описание
Патогенный		В соответствии с правилами классификации представлены убедительные доказательства патогенности варианта.
Вероятно-патогенный		В соответствии с правилами классификации представлены доказательства патогенности варианта.
Неопределенный		Противоречивые данные о значимости варианта.
Неаннотированный		Значимость варианта не оценивалась.
Вероятно-доброкачественный		В соответствии с правилами классификации представлены доказательства доброкачественности варианта.
Доброкачественный		В соответствии с правилами классификации представлены убедительные доказательства доброкачественности варианта.

Для создания запроса на аннотацию неаннотированных вариантов на вкладке Варианты нажмите на меню (≡) с левой стороны каждого варианта, далее выберите пункт «Отправить на аннотацию». Указанные пользователем варианты будут проаннотированы специалистами ПАРСЕК ЛАБ. Для создания собственной аннотации выберите пункт «Перейти к аннотации варианта» в том же меню.

Аннотация варианта может обновляться по мере накопления научных/клинических данных. Если в аннотации варианта произошло важное изменение, то образец и вариант будут отмечены знаком . Для настройки уведомлений перейдите в настройки профиля. Для этого нажмите на логин в правом верхнем углу экрана и выберите «Профиль». Уведомления настраиваются для всех пользователей организации. Возможно выбрать такие уведомления:

- Удалена высокоуровневая ACMG аннотация;
- Удалена высокоуровневая (I-A, I-B, II-C, II-D) AMP аннотация;
- Создана новая высокоуровневая ACMG аннотация;
- Создана новая высокоуровневая (I-A, I-B, II-C, II-D) AMP аннотация;
- Низкий уровень ACMG повысился;
- Высокий уровень ACMG снизился.

История аннотации варианта доступна на вкладке Варианты в меню (≡) с левой стороны каждого варианта.

Чтобы убрать отметку об изменении аннотации, необходимо нажать на иконку обновления аннотации в заголовке таблицы вариантов на экране деталей анализа образца.

Курируемые аннотации, созданные специалистами ПАРСЕК ЛАБ, в разделе Организация имеют бейдж CURATED.

4.6.1. Менеджмент аннотации

Для создания и редактирования аннотаций перейдите в приложение Аннотации. Доступ к приложению имеют только пользователи с ролью куратора аннотации.

Левая часть экрана позволяет выбрать вариант для аннотации. Список будет содержать все варианты, обнаруженные в анализах и варианты, которые были импортированы в формате VCF. Чтобы открыть дополнительные фильтры, нажмите на иконку .

Выбранный вариант отображается в правой части экрана. Здесь представлены существующие аннотации и общая информация о варианте. Для отображения информации о варианте необходимо выбрать транскрипт. Если вариант был обнаружен в анализе, то транскрипт будет выбран автоматически.

Для создания аннотации по критериям AMP необходимо:

- Ознакомиться с критериями совместного Консенсуса AMP/ASCO/CAP²⁸ «Руководство по интерпретации и представлению опухолевых маркеров» (Li M.M. et al., 2017).
- Выбрать вариант.
- Выбрать тип аннотации (терапевтическое, диагностическое, прогностическое значение, либо аннотация 3-4 уровня).
- Нажать на иконку добавления новой аннотации .
- Выбрать:
 - Уровень.
 - Значение чувствительности (для терапевтического значения).
 - Препарат (для терапевтического значения).
 - Подтип опухоли (для диагностического значения).
 - Прогноз (для прогностического значения).
 - Ссылки на источники²⁹.
 - Тип опухоли.
 - При выборе опции «Сделать аннотацию публичной», пользователи из других организаций получают доступ к просмотру данной аннотации.
- Нажать на кнопку «Добавить»

Для создания аннотации по критериям ACMG необходимо:

- Ознакомиться с критериями совместного Консенсуса ACMG/AMP³⁰ «Руководство по интерпретации генетических вариантов» (Richards S. et al., 2015).
- Выбрать вариант.
- Нажать на символ редактирования слева от названия организации.



DemoOrganisation

Неаннотированный

-
- Выбрать подходящие критерии, добавить ссылки на источники.

²⁸ AMP – Association for Molecular Pathology; ASCO – American Society of Clinical Oncology; CAP – College of American Pathologists.

²⁹ При создании терапевтических AMP аннотаций рекомендуется дать ссылки, показывающие связь варианта с препаратом и связь препарата с клиническими рекомендациями.

³⁰ ACMG – American College of Medical Genetics and Genomics; AMP – Association for Molecular Pathology.

- Калькулятор автоматически рассчитает значение патогенности. Полученное значение может быть изменено специалистом.



- При выборе опции «Сделать аннотацию публичной», пользователи из других организаций получают доступ к просмотру данной аннотации.
- Нажать «Сохранить».

4.6.2. Просмотр аннотации варианта

Просмотр аннотации варианта доступен из экранов «Варианты» и «Хотспоты» по нажатию на вариант и на карточке варианта. Наличие аннотаций по критериям AMP отражено в колонке «Категории AMP» и обозначается следующими символами:

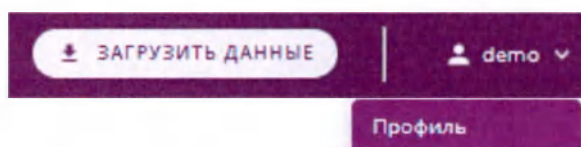
Символ	Значение
	Терапевтическое
	Диагностическое
	Прогностическое
	Аннотация низкого уровня (III и IV)

Блок аннотаций содержит уровень по критериям AMP, препараты, тезисы, ссылки на источники и тип опухоли.

Для перехода на карточку варианта нажмите на значения в колонке «AMP уровень» или «CMG значимость». Карточка варианта содержит общую информацию о варианте, ссылки на внешние источники, историю аннотации, ссылки на вариант в других анализах и аннотации всех организаций, на которые действует подписка (подробнее см. раздел «Подписки на аннотации»).

4.6.3. Подписки на аннотации

ПО дает возможность увидеть аннотации, сделанные в других организациях. Для настройки отображения аннотаций перейдите в настройки профиля

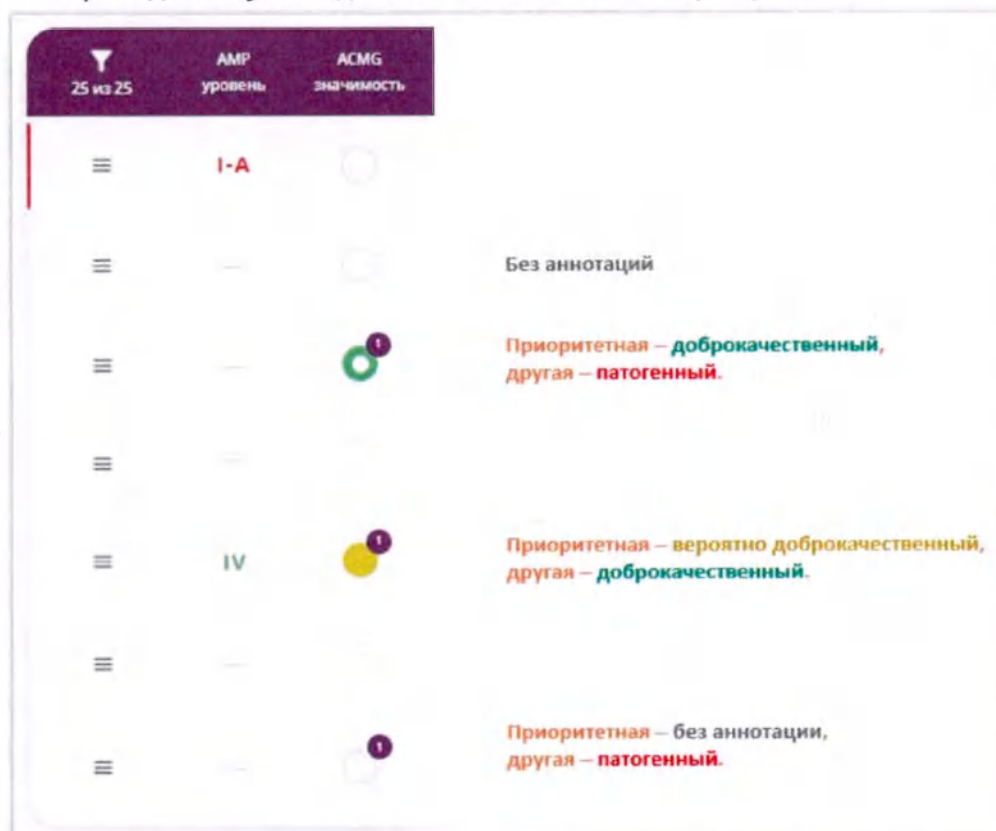


В открывшемся окне выберете «Подписки на аннотации». Из списка подписок на организации выберете те, которые будут показаны в списке аннотаций.

Приоритетная организация для отображения аннотации может быть выбрана для каждой панели отдельно. Аннотации выбранной организации будут показаны в столбце «ACMG

значимость» на экранах просмотра вариантов и хотспотов. Эта же аннотация будет экспортирована в отчет. Индекс указывает количество аннотаций организаций, на которые действует подписка. В случае разных аннотаций от разных организаций по критериям ACMG, центр круга будет окрашен белым цветом, а сам круг будет иметь цвет приоритетной аннотации.

В столбце «AMP уровень» будет указан наибольший уровень значимости из всех аннотаций, на которые действует подписка, независимо от приоритета.



4.7. ХОТСПОТЫ

Приложение Хотспоты предназначено для создания, просмотра и редактирования пользовательских списков хотспотов. Список хотспотов можно привязать к панели, в этом случае список отобразится на экране просмотра деталей анализа образца.

Чтобы создать список, перейдите в приложение Хотспоты и нажмите кнопку "СОЗДАТЬ", расположенную в левом нижнем углу экрана. Затем введите название и описание списка. Если вы хотите, чтобы список хотспотов был доступен пользователям из других организаций, отметьте соответствующий чекбокс при создании списка. Таким образом, список станет публичным.

Чтобы изменить описание списка или установить его публичность, нажмите кнопку "РЕДАКТИРОВАТЬ".

Для наполнения списка хотспотов вариантами, отфильтруйте нужные варианты или найдите конкретный интересующий вариант с помощью поиска и нажмите значок добавления

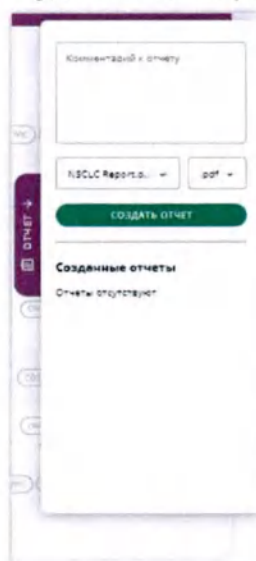


. Для удаления варианта из списка нажмите на кнопку удаления варианта. По завершении составления списка, нажмите кнопку "СОХРАНИТЬ".

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ»	Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»	
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ	#UM_L-102ru	Страница 65 из 69	

4.8. ОТЧЕТ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА

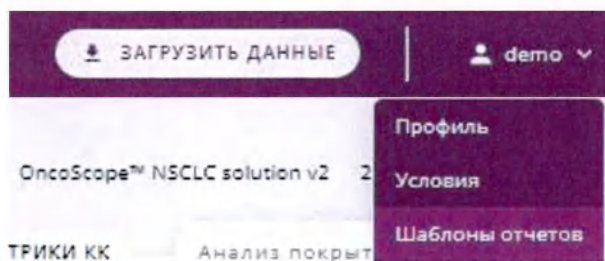
Программное обеспечение предоставляет функцию создания отчета по результатам генетического тестирования. Отчет создается по образцу. Для создания отчета выберите образец, перейдите к деталям анализа образца и нажмите кнопку «ОТЧЕТ», расположенную в правой части экрана. Далее выберите шаблон отчета и формат файла (PDF, DOCX или ODT), напишите комментарий к отчету. Отчет будет создан при нажатии на кнопку «СОЗДАТЬ ОТЧЕТ».



Стандартный шаблон отчета содержит следующие разделы:

- обнаруженные хотспоты;
- выявленные фьюжен-гены и пропуски экзонов;
- общую информацию по анализу;
- результаты контроля качества образца;
- хотспоты ниже LOD;
- хотспоты с неопределённым генотипом;
- прочие обнаруженные варианты;
- анализируемые маркеры;
- комментарии;
- ограничения метода;
- отказ от ответственности.

Программное обеспечение предоставляет возможность редактировать шаблон отчета. Для редактирования и просмотра уже загруженных шаблонов нажмите на меню пользователя и выберите пункт «Шаблоны отчетов». Для каждого шаблона отчета доступно меню дополнительных действий, нажав на которое можно скачать или удалить шаблон. Нажатие на кнопку «Предпросмотр шаблона» приводит к загрузке отчета по образцу Demo-sample.



Для редактирования скачайте шаблон, откройте его в текстовом редакторе, внесите изменения и загрузите обновленный шаблон в ПО. Для обновления ранее загруженного шаблона необходимо импортировать отредактированный файл с тем же названием, что и старый. Для добавления еще одного шаблона измените имя файла.

4.9. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

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

5. ОТКАЗ ОТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

- Результаты генетического тестирования должны интерпретироваться исключительно в контексте клинической картины пациента и/или семейного анамнеза;
- Аннотация вариантов в ПО «OncoScope™ Software» предоставляется для ознакомительных целей, интерпретация результатов должна осуществляться квалифицированным специалистом с учетом всех обнаруженных вариантов и клинической картины пациента.
- Для подтверждения «транс-» положения обнаруженных значимых герминативных 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.

6. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

Информация, об особенностях транспортирования и хранения должна учитываться всеми лицами, участвующими в транспортировании, хранении и утилизации (уничтожении) данного Набора реагентов.

6.1. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Транспортирование Набора реагентов производить не более 3 суток при двух температурах: от минус 22 до минус 18 °С для компонентов: NSCLC ДНК пул праймеров (ПД), NSCLC РНК пул праймеров (ПР), Контрольный образец ДНК (КД), Контрольный образец РНК (КР), Обратная транскриптаза (ОТ), ПЦР смесь 1 (ПС1), ПЦР смесь 2 с CD ИП (ПС2 с ИП), Картридж для секвенирования и Буфер HT1, и от 2 до 8°С для компонентов: Магнитные частицы (М), Реагент В (В), Ячейка для секвенирования и Раствор PR2.

Пакеты медицинского изделия транспортируются с Температурным пакетом -22...-18 °С.

Для варианта исполнения set 1S допускается транспортирование всего набора при температуре от 2 до 8°С.

В зависимости от планируемого времени транспортировки подбирается количество холодоэлементов в соответствии с рекомендациями производителя используемых термоконтейнеров.

Транспортирование Набора реагентов производится всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при соблюдении температурного режима.

Транспортирование Наборов реагентов при температурах, требующих соблюдения «Холодовой цепи», обеспечивающей сохранность температурного режима, должно

осуществляться в термоконтейнерах одноразового/многократного пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой, или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

Наборы реагентов, транспортировавшиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

6.2. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

После транспортирования Набор реагентов хранится в соответствии с температурными режимами хранения компонентов:

Название компонента	Температура хранения
NSCLC ДНК пул праймеров (ПД)	от минус 22 до минус 18°C
NSCLC РНК пул праймеров (ПР)	
Контрольный образец ДНК (КД)	
Контрольный образец РНК (КР)	
Обратная транскриптаза (ОТ)	
ПЦР смесь 1 (ПС1)	
ПЦР смесь 2 с CD ИП (ПС2 с ИП)	
Картридж для секвенирования	
Буфер HT1	от 2 до 8°C
Магнитные частицы (М)	
Реагент В (В)	
Ячейка для секвенирования	
Раствор PR2	

Хранение компонентов Набора реагентов при температуре от 2°C до 8°C должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

Хранение компонентов Набора реагентов при температуре ниже 0°C должно осуществляться в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

Компоненты Набора реагентов, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Все варианты исполнения Набора реагентов предназначены для однократного применения и не подлежат хранению после вскрытия.

Набор реагентов не подлежит повторному размораживанию-замораживанию.

7. СРОК ГОДНОСТИ

- Срок годности Набора реагентов составляет 6 месяцев с даты производства.
- Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

8. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Предприятие-изготовитель гарантирует стабильность Наборов реагентов, соответствие основных параметров и характеристик Наборов реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации на протяжении всего срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.
- По вопросам, касающимся качества Набора реагентов, а также в случае изменения аналитических характеристик следует обращаться к производителю, обращения могут быть направлены в письменном виде на почтовый адрес производителя либо по электронной почте, указанные в разделе КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.
- При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению Набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации Набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному в разделе КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

9. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

- Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями 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".
- В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым коммунальным отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 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" собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного. Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров. Емкости для сбора медицинских отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А". Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора медицинских отходов данного класса, установленные на специальной площадке (в помещении). Многоразовая тара после удаления из нее отходов подлежит мойке и дезинфекции.

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ»	Набор реагентов «OncoScope™ NSCLC Solution IL»	
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ		#UM_L-102ru	Страница 69 из 69

- Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

- Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

- Потребительская упаковка Набора реагентов подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

10. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	ООО «ПАРСЕК ЛАБ» ИНН 7816584473, ОГРН 1147847123797
	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.pro

Всего прошито, пронумеровано
и скреплено печатью

69 (шестьдесят девять) листов
цифрами прописью

Генеральный директор ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Меркулов И.А.

« 26 » ноября 2024 г.

