Руководство пользователя

Таргет РМЖ

Набор реагентов для одновременного выявления биомаркеров, ассоциированных со злокачественными новообразованиями молочной железы, методом высокопроизводительного секвенирования

по ТУ 21.20.23-009-91709359-2024

ООО «ОНКОАТЛАС»

Содержание

Описание и назначение 3

Состав набора 5

Принцип действия набора 7

Характеристики набора 13

Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы, не включенные в набор 15

Анализируемые образцы и пробоподготовка 18

Экстракция ДНК из исследуемых образцов 19

Общие правила и рекомендации для работы с набором 20

Протокол проведения анализа 22

I Проведение целевого обогащения ДНК 23

II Приготовление библиотек ДНК 25

1 Удаление праймеров из ПЦР продуктов 25

2 Лигирование адаптеров к ампликонам 26

3 Первый этап очистки библиотек 27

4 Второй этап очистки библиотек 28

5 Преамплификация библиотеки 29

6 Очистка преамплифицированной библиотеки 31

7 Измерение концентрации библиотек и расчет фактора разведения 32

III Настройка параметров запуска 33

IV Подготовка образцов к секвенированию 36

V Секвенирование 38

VI Анализ данных и интерпретация результатов 43

Транспортировка и хранение 80

Описание и назначение

Набор «Таргет РМЖ» предназначен для одновременного выявления биомаркеров[1] (генетических вариантов в образцах ДНК человека, выделенной из цельной крови; генетических вариантов, микросателлитной нестабильности и амплификации гена ERBB2 (HER2) в образцах ДНК человека, выделенной из операционного или биопсийного материала, фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки)), ассоциированных со злокачественными новообразованиями молочной железы, методом высокопроизводительного секвенирования. Набор валидирован совместно с Генетическим секвенатором MiSeq, вариант исполнения: MiSeq (РУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014).

Требования к эксплуатации набора

Для анализа данных, полученных с помощью набора, должно применяться программное обеспечение «Solo AVES» https://aves.oncoatlas.ru/, версия 1.03.04 от 04.02.2023 (далее - ПО «Solo AVES»), входящее в состав набора.

Применение набора по назначению возможно только при наличии доступа к сети интернет со скоростью загрузки не менее 1 Mbps и скоростью отдачи не менее 10 Mbps (для анализа данных на ПО «Solo AVES»).

До начала работы следует выполнить тестовый вход в систему по ссылке https://aves.oncoatlas.ru/ с парой логин/пароль (предоставляется ООО «ОНКОАТЛАС»): при переходе по ссылке должна открыться стартовая страница авторизации в личном кабинете пользователя, куда необходимо ввести логин и пароль в соответствующих полях, затем нажать кнопку «Войти». При корректной авторизации осуществляется переход в личный кабинет пользователя. Необходимо убедиться, что на главной странице личного кабинета есть кнопка «Запустить анализ данных» и вкладки «Образцы», «Анализ данных». В случае отсутствия данных элементов следует обновить страницу нажатием комбинации клавиш Ctrl+F5. При неудачной попытке тестового входа необходимо связаться с производителем набора реагентов по электронной почте it-solo@oncoatlas.ru.

Рекомендованная глубина покрытия при анализе библиотек, приготовленных с помощью набора из ДНК, выделенной из операционного или биопсийного материала, фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE блоков), составляет не менее 650x; из ДНК, выделенной из цельной крови - не менее 250x.

[1] В концепции разработки данного набора биомаркеры – это генетические варианты в генах BRCA1, BRCA2, PIK3CA, PALB2, ATM, CHEK2, AKT1, PTEN, ESR1, ERBB2, BRAF, TP53, STK11, определение микросателлитной нестабильности и амплификации гена ERBB2 (HER2).

ВАЖНО

При возникновении технических сбоев в работе компьютера или сети Интернет рекомендуется обратиться к ПО «Solo AVES» после устранения неполадок со стороны пользователя или провайдера либо осуществить доступ к ПО «Solo AVES» с другого компьютера, подключенного к другой сети, соответствующей требованиям, предъявляемым к сети Интернет для корректной работы ПО «Solo AVES». Потеря доступа к сети Интернет никак не влияет на качество получаемого отчета, если предприняты рекомендованные меры.

Показанием к применению набора является необходимость выявления биомаркеров, ассоциированных со злокачественными новообразованиями молочной железы.

В состав набора входит контрольный образец. Его использование рекомендовано в каждом отдельном запуске, так как обеспечивает контроль правильности срабатывания теста и отсутствия контаминации.

В рутинной клинической практике анализ амплификации генов преимущественно осуществляется с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), в то время как метод NGS выступает дополнительным. Метод NGS может использоваться для подтверждения положительного статуса амплификации, установленного ранее с помощью иных методов.

Выявление амплификаций с помощью набора «Таргет РМЖ» рекомендуется в качестве дополнительного к рутинным лабораторным методам.

Состав набора

Набор выпускается в 4 вариантах исполнения: «Таргет РМЖ А», «Таргет РМЖ Б», «Таргет РМЖ С-А» и «Таргет РМЖ С-Б», рассчитанных на проведение анализа 48 образцов, включая контрольный образец (КО).

Варианты исполнения «Таргет РМЖ А» и «Таргет РМЖ Б» включают только компоненты для целевого обогащения ДНК, приготовления библиотек и ПО “Solo AVES”, в то время как варианты исполнения «Таргет РМЖ С-А» и «Таргет РМЖ С-Б» включают также компоненты для подготовки образца к секвенированию и компоненты для секвенирования.

Варианты исполнения «Таргет РМЖ А» и «Таргет РМЖ Б» могут использоваться совместно с наборами «Таргет РМЖ С-А» и «Таргет РМЖ С-Б». Допускается объединять библиотеки ДНК, приготовленные с помощью разных вариантов исполнения набора, при условии, что в одном цикле секвенирования каждая комбинация индексов будет встречаться только 1 раз. Варианты исполнения «Таргет РМЖ А» и «Таргет РМЖ Б» отличаются только наборами олигонуклеотидных индексов, аналогично варианты исполнения «Таргет РМЖ С-А» и «Таргет РМЖ С-Б» различаются наборами олигонуклеотидных индексов. Чередование использования наборов с литерами «А» и «Б» позволяет избежать попадания примесей образцов из предыдущего анализа в процессе секвенирования.

Контрольный образец (КО) рекомендуется включать в каждую постановку в дополнение к анализируемым образцам.

Наборы «Таргет РМЖ А» и «Таргет РМЖ Б» включают два комплекта: Комплект для целевого обогащения ДНК (его необходимо хранить в пре-ПЦР зоне) и Комплект для приготовления библиотек (его необходимо хранить в пост-ПЦР зоне). Наборы «Таргет РМЖ С-А» и «Таргет РМЖ С-Б» включают четыре комплекта: Комплект для целевого обогащения ДНК (необходимо хранить в пре-ПЦР зоне), Комплект для приготовления библиотек (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне), Комплект для подготовки образца к секвенированию (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне) и Комплект для секвенирования (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне).

Состав набора представлен в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора «Таргет РМЖ»

Наименование компонента	Цвет вкладыша на крышке	Объем	Хранение
Комплект для целевого обогащения ДНК			
ПЦР-смесь 1	Красный	192 мкл	От -25 до -15°C
Раствор праймеров 1	Желтый	240 мкл	От -25 до -15°C
Раствор праймеров 2	Желтый	240 мкл	От -25 до -15°C
КО	Черный	24 мкл	От -25 до -15°C
Комплект для приготовления библиотек ДНК			
Реагент В	Белая круглая этикетка с символом В	4 500 мкл	От -25 до -15°C
ТЕ буфер	Белая круглая этикетка с символом ТЕ	2 пробирки × 4 500 мкл	От -25 до -15°C
ПЦР-смесь 2	Черный	2 пробирки × 1 152 мкл	От -25 до -15°C
Активатор	Зеленый	96 мкл	От -25 до -15°C
Раствор Л	Желтый	192 мкл	От -25 до -15°C
ДНК-лигаза	Синий	96 мкл	От -25 до -15°C
ЛС адаптеры	Прозрачный	96 мкл	От -25 до -15°C
Олигонуклеотидные индексы Си	Зеленый, круглая этикетка с номером индекса	6 пробирок × 16 мкл	От -25 до -15°C
Олигонуклеотидные индексы Ли	Фиолетовый, круглая этикетка с номером индекса	8 пробирок × 12 мкл	От -25 до -15°C
Магнитные частицы[2]	Нет вкладыша	3 840 мкл	От -25 до -15°C

Комплект для подготовки образца к секвенированию[3]			
Раствор HT1	1 пробирка	5 мл	От -25 до -15°C
Картридж	1 шт.	35 мл	От -25 до -15°C
Комплект для секвенирования[4]			
Раствор PR2	1 бутыль	500 мл	От +2 до +8°C
Проточная кювета	1 шт.	—	От +2 до +8°C

ПО «Solo AVES» https://aves.oncoatlas.ru/, версия 1.03.04 от 04.02.2023.

Принцип действия набора

Набор предназначен для одновременного выявления биомаркеров, ассоциированных со злокачественными новообразованиями молочной железы. В основе работы набора лежит амплификация целевых участков ДНК методом мультиплексной ПЦР. Процесс состоит из 3 этапов приготовления библиотеки и этапа секвенирования с использованием прибора «Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения: MiSeq, MiSeqDx» (РУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014).

1 этап

ДНК, выделенная из биоматериала пациента, используется для наработки целевых фрагментов в виде продуктов мультиплексной ПЦР.

2 этап

Удаление праймеров с концевых участков ПЦР продуктов и лигирование к ним олигонуклеотидных адаптеров, необходимых для последующего секвенирования библиотеки. Очистка библиотек на магнитных частицах.

[2] Магнитные частицы должны храниться при температуре от -25 до -15°C до первого вскрытия, после него — при температуре от +2 до +8°C

[3] Входит в состав вариантов исполнения «Таргет РМЖ С-А», «Таргет РМЖ С-Б»

[4] Входит в состав вариантов исполнения «Таргет РМЖ С-А», «Таргет РМЖ С-Б»

3 этап

Амплификация и очистка библиотек. На данном этапе проводится индексирование библиотек. Для каждого образца ДНК используется собственная уникальная комбинация олигонуклеотидных индексов, которая позволяет аттрибуцировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования.

4 этап

Секвенирование. На данном этапе происходит секвенирование полученных библиотек на генетическом секвенаторе MiSeq. Анализ полученных на секвенаторе данных осуществляется последовательно: в начале с помощью программного обеспечения Local Run Manager (версия 2.0 и выше) получают FASTQ файлы, потом с помощью программного обеспечения “Solo AVES” https://aves.oncoatlas.ru/, версия 1.03.04 от 04.02.2023 (далее ПО “Solo AVES”), входящего в состав набора, анализируются FASTQ файлы. ПО “Solo AVES” одновременно анализирует генетические варианты целевых регионов генов BRCA1, BRCA2, PIK3CA, PALB2, ATM, CHEK2, AKT1, PTEN, ESR1, ERBB2, BRAF, TP53, STK11, а также статус микросателлитной нестабильности и амплификации гена ERBB2(HER2).

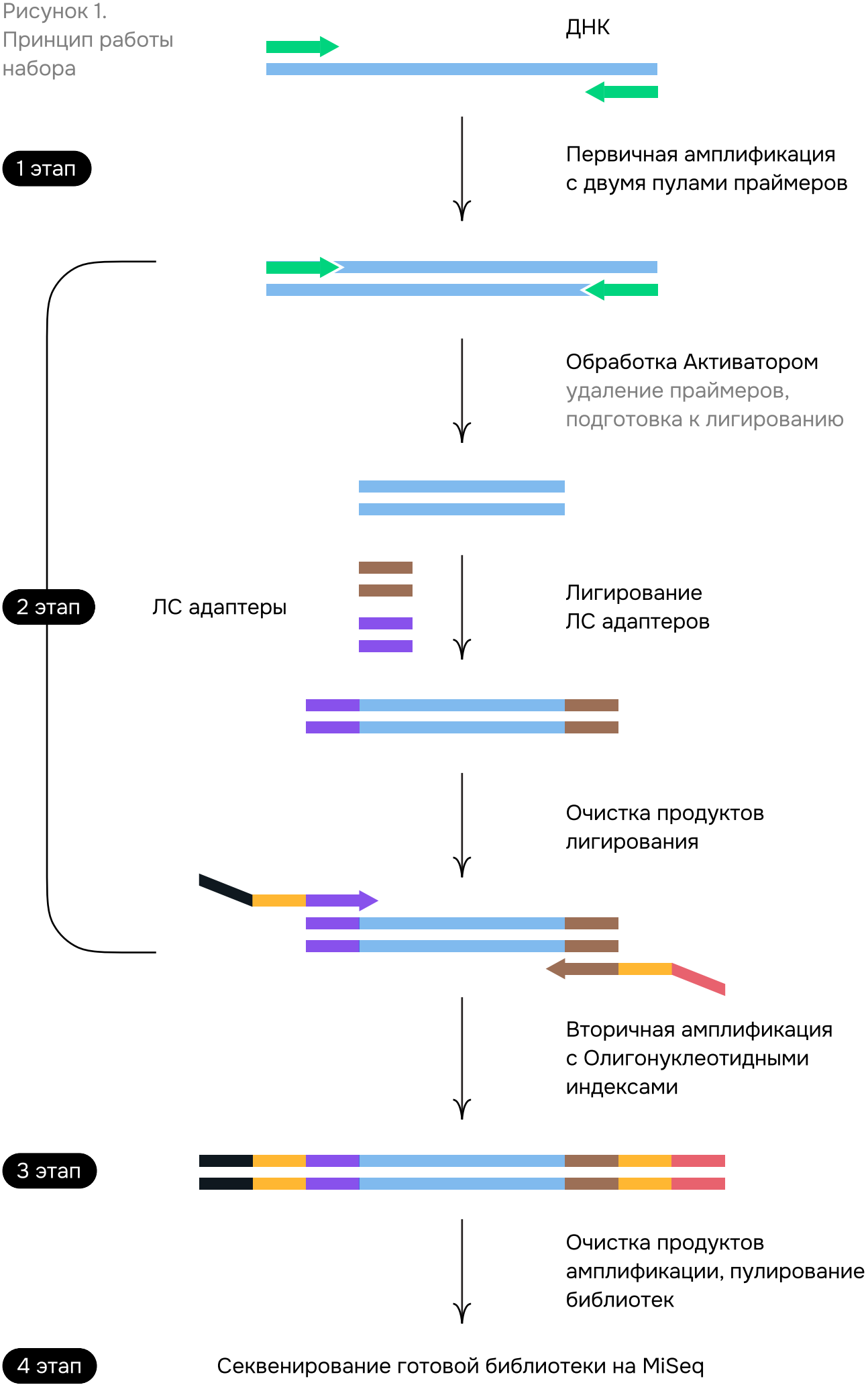
Класс потенциального риска применения ПО “Solo AVES” – 2б.

Класс безопасности ПО “Solo AVES” – А.

В вариантах исполнения набора “Таргет РМЖ С-А” и “Таргет РМЖ С-Б” имеются четыре комплекта, необходимые для реализации каждого вышеописанного этапа. Четвертый этап для вариантов исполнения набора “Таргет РМЖ А” и “Таргет РМЖ Б” реализуется при совместном использовании Комплекта для подготовки образца к секвенированию и Комплекта для секвенирования из наборов варианта исполнения “Таргет РМЖ С-А” и “Таргет РМЖ С-Б”.

Принцип работы набора проиллюстрирован на рис. 1:

Рисунок 1.
Принцип работы набора



Набор включает следующие комплекты

Комплект для целевого обогащения ДНК

Комплект для целевого обогащения ДНК необходим для обогащения фрагментами ДНК, содержащими исследуемые регионы генов. Для осуществления первого этапа - постановки первичной амплификации (мультиплексной ПЦР) - используется смесь реагентов для амплификации («ПЦР-смесь 1») и набор праймеров, состоящий из двух отдельных пулов (в пробирках «Раствор праймеров 1» и «Раствор праймеров 2»). Реакция амплификации выполняется отдельно для каждого пула праймеров. Остальные компоненты для проведения ПЦР-реакции входят в состав «ПЦР-смеси 1». Кроме того, в Комплект входит контрольный образец (пробирка «КО»), содержащий генетический вариант chr7:140453136A>T, амплификацию гена ERBB2 (HER2), а также имеет положительный статус микросателлитной нестабильности и позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования. Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК приводится в таблице 2.

Таблица 2. Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК

Название	Описание
Раствор праймеров 1	Необходим для наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые генетические варианты, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)
Раствор праймеров 2	Необходим для наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые генетические варианты, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)
ПЦР-смесь 1	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения первичной амплификации ДНК (мультиплексной ПЦР)
КО	Водный раствор ДНК человека, который содержит генетический вариант chr7:140453136A>T, амплификацию гена ERBB2 (HER2) и положительный статус микросателлитной нестабильности. Он позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования

Комплект для приготовления библиотек

Комплект для приготовления библиотек необходим для приготовления библиотек из полученных с помощью Комплекта для целевого обогащения ДНК продуктов ПЦР.

По завершении ПЦР-реакции продукты амплификации, полученные с использованием двух пулов праймеров для одного исходного образца ДНК, объединяются. На следующем этапе происходит удаление праймеров с концов полученных продуктов ПЦР и подготовка концевых участков к лигированию с помощью «Активатора». Далее проводится лигирование универсальных адаптеров (пробирка «ЛС адаптеры») к продуктам амплификации с помощью «Раствора Л» и «ДНК-лигазы». После этого проводится очистка полученных фрагментов ДНК с помощью «Магнитных частиц».

На следующем этапе проводится вторичная амплификация для введения олигонуклеотидных индексов, комбинация которых уникальна для каждого исходного образца ДНК (пробирки «Олигонуклеотидные индексы», «ПЦР-смесь 2»). Введение таких индексов позволяет проводить одновременное секвенирование множества образцов за один запуск прибора. Далее проводится очистка полученного продукта ПЦР на магнитных частицах с использованием «Магнитных частиц», «Реагента В» и «ТЕ буфера». После необходимо измерить концентрацию получившихся библиотек, довести их концентрацию до 4 000 пмоль/л, и смешать в равных объемах. Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек приводится в таблице 3.

Таблица 3. Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек

Название	Описание
Активатор	Обеспечивает удаление праймеров с концов продуктов первичной амплификации и подготовку концевых участков фрагментов к последующему лигированию
Раствор Л	Обеспечивает работу ДНК-лигазы (содержит необходимые для её работы компоненты), необходим для лигирования ЛС адаптеров
ДНК-лигаза	Лигирует («пришивает») ЛС адаптеры к наработанным в результате первичной амплификации фрагментам ДНК
ЛС адаптеры	Короткие двуцепочечные олигонуклеотиды, необходимые для проведения вторичной амплификации (являются местом отжига для Олигонуклеотидных индексов), а также для проведения секвенирования
Магнитные частицы	Необходимы для очистки целевых фрагментов ДНК (от ЛС адаптеров, Олигонуклеотидных индексов)
Реагент В	Необходим для очистки целевых фрагментов ДНК от свободных Олигонуклеотидных индексов
ТЕ буфер	Необходим для элюции фрагментов ДНК после очистки на Магнитных частицах от свободных Олигонуклеотидных индексов

●	ПЦР-смесь 2	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения вторичной амплификации ДНК
● ●	Олигонуклеотидные индексы	Необходимы для создания уникальной маркировки фрагментов одного образца и позволяют атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования

Комплект для подготовки образца к секвенированию

Комплект для подготовки образца к секвенированию используется для подготовки полученной смеси библиотек с концентрацией 4 000 пмоль/л к секвенированию. Проводится щелочная денатурация двуцепочечных молекул ДНК с использованием «Раствора HT1». Денатурированная библиотека помещается в предназначенный для этого резервуар «Картриджа», после чего Картридж помещается в прибор MiSeq. Описание компонентов Комплекта для подготовки образца к секвенированию приводится в таблице 4.

Таблица 4. Описание компонентов Комплекта для подготовки образца к секвенированию

Название	Описание
Раствор HT1	Буферный солевой раствор, необходимый для гибридизации фрагментов ДНК на поверхности проточной кюветы для последующего секвенирования
Картридж	Флакон, содержащий все необходимые для секвенирования растворы, за исключением раствора PR2

Комплект для секвенирования

Комплект для секвенирования необходим для проведения процесса секвенирования. Он содержит «Раствор PR2» и «Проточную кювету», которые требуются для запуска прибора MiSeq. Описание компонентов Комплекта для секвенирования приводится в таблице 5.

Таблица 5. Описание компонентов Комплекта для секвенирования

Название	Описание
Раствор PR2	Буферный солевой раствор, необходимый для проведения секвенирования
Проточная кювета	Представляет собой ячейку во флаконе с высококонцентрированным солевым раствором. Проточная ячейка необходима для проведения секвенирования. На стеклянной поверхности ячейки происходит реакция, необходимая для прочтения нуклеотидной последовательности прибором MiSeq

Характеристики набора

Аналитическая чувствительность — минимальная концентрация выделенной из FFPE блоков и цельной крови ДНК в пробе, необходимая для проведения анализа, составляет 5 нг/мкл. Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей A260/280 нм, должна составлять не менее 1.6 – 1.8.

Предел обнаружения (LoD) — наименьшая частота мутантного аллеля в регионах генов BRCA1, BRCA2, PIK3CA, PALB2, ATM, CHEK2, AKT1, PTEN, ESR1, ERBB2, BRAF, TP53, STK11, которую способно выявлять изделие, должна составлять 10%.

Значения диагностических характеристик набора по данным клинических испытаний

Диагностические характеристики правильности определения генетических вариантов набором «Таргет РМЖ»

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	**Результаты испытаний** с доверительной вероятностью 95%	
		Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Суммарно по всем образцам	300	98,0-100%	98,0-100%
Цельная кровь	150	96,0-100%	96,0-100%
FFPE-блоки	150	96,0-100%	96,0-100%

Диагностические характеристики правильности определения микросателлитной нестабильности набором «Таргет РМЖ»

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	**Результаты испытаний** с доверительной вероятностью 95%	
		Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
FFPE-блоки	150	83,8-100%	97,7-100%

Диагностические характеристики правильности определения амплификаций гена ERBB2 набором «Таргет РМЖ»

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	**Результаты испытаний** с доверительной вероятностью 95%	
		Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
FFPE-блоки	150	88,7-100%	97,6-100%

Параметры секвенирования
Для образцов ДНК, выделенных из FFPE-блоков

Метрика	Значение	Тип значения
Расчётная чувствительность	0.96	минимальное
Равномерность покрытия пула 1 (MAPD)	1	максимальное
Равномерность покрытия пула 2 (MAPD)	1	максимальное
Средняя глубина покрытия пула 1	450x	минимальное
Средняя глубина покрытия пула 2	450x	минимальное
Средняя глубина покрытия целевой последовательности	650x	минимальное

Для образцов ДНК, выделенных из цельной крови

Метрика	Значение	Тип значения
Расчётная чувствительность	0.96	минимальное
Равномерность покрытия пула 1 (MAPD)	1	максимальное
Равномерность покрытия пула 2 (MAPD)	1	максимальное
Средняя глубина покрытия пула 1	100x	минимальное
Средняя глубина покрытия пула 2	100x	минимальное
Средняя глубина покрытия целевой последовательности	250x	минимальное

Срок годности набора 12 месяцев.
Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы

Наименование	Пример модели и производителя
Генетический секвенатор MiSeq	Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения: MiSeq, MiSeqDx (Illumina Inc., США), № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014
Термоциклер	Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000, с принадлежностями (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016
Магнитный штатив	Магнитный штатив для пробирок на 0,2 мкл стрипованных или одинокостоящих МагниРэк-3202-ОС (Helicon Company, Россия), № РЗН 2022/16360 от 21.01.2022
Вортекс	Миницентрифуга-вортекс FV-2400 (SIA «Biosan», Латвия)

Спектрофотометр	Анализатор NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США, Свидетельство об утверждении типа средств измерений №56026-13) / Спектрофотометр «BioSpec-nano» ("Шимадзу Корпорэйпш", Япония, Свидетельство об утверждении типа средств измерений № 48405-11), ФСЗ 2010/06804 от 24.05.2010
Дозаторы переменного объема со сменными наконечниками	Дозаторы пипеточные переменного объема со сменными наконечниками с диапазонами измерения от 0,5 до 10 мкл, от 2 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл Eppendorf Research® Plus с принадлежностями (Eppendorf AG, Германия), ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011
Салфетки безворсовые	Салфетки безворсовые Kimwipes (Kimtech, Тайвань)
Пробирки 1,5 мл - 2 мл	Пробирки 1,5 мл - 2,0 мл типа Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro DNA LoBind, PCR clean (Eppendorf AG, Германия), ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009
Стрипованные микропробирки	Пробирки в стрипах по 8 штук с отдельно прикрепленными плоскими крышками, PCR clean, бесцветные (Scientific Specialties Incorporated, США), ФСЗ № 2011/10287 от 11.04.2017
Штативы для пробирок	Штатив для пробирок 0,5 мл «рабочее место» на 200 лунок, (ООО "НПФ Хеликон", Россия) РЗН 2022/16372 от 21.01.2022
Центрифуга лабораторная	Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 54xx, с принадлежностями (Centrifuge 5430) (Eppendorf AG, Германия), ФСЗ 2009/04411 от 03.06.2009
Бокс лабораторный	Бокс лабораторный с УФ лампой для проведения полимеразной цепной реакции БЛ-ПЦР по ТУ 9452-009-46482062-2013 (ООО "НПО ДНК-Технология", Россия), РЗН 2015/3193 от 16.10.2015
Перчатки	Перчатки нитриловые неопудренные
Штатив для стрипов и планшетов	Штатив для стрипов и планшетов (Scientific Specialties Incorporated, США), ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017

Штативы для хранения и транспортировки пробирок	Штативы для хранения и транспортировки пробирок, криопробирок объемом от 0,2 мл до 50 мл (Scientific Specialties Incorporated, США), ФСЗ № 2011/10287 от 11.04.2017
Спирт этиловый лабораторный, 96%	Разные модели и производители
Раствор 1,0 М NaOH	Разные модели и производители
Холодильная камера, поддерживающая температуру 2-8˚С	Разные модели и производители
Морозильная камера, поддерживающая температуру от -25˚С до -15˚С	Разные модели и производители
Вода деионизованная бидистиллированная	Разные модели и производители
Пластиковый пинцет	Разные модели и производители
Пробирки для хранения и транспортировки проб и образцов	Пробирки для хранения и транспортировки проб и образцов, завинчивающиеся, конические и с основанием, с крышками и без крышек, объемом от 0,5 мл до 50 мл (Scientific Specialties Incorporated, США), ФСЗ № 2011/10287 от 11.04.2017
Наконечники универсальные с фильтром	Наконечники универсальные с фильтром, для лабораторных дозаторов, объемом от 0,1 мкл до 10 мл, стерильные и нестерильные (Scientific Specialties Incorporated, США), ФСЗ № 2011/10287 от 11.04.2017
Секундомер механический однострелочный СО	Разные модели и производители
Флуориметр	Флуориметр Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., США)/ Анализатор иммунологический “Varioskan Flash”, ("Термо Фишер Сайентифик Ой", Финляндия), № РЗН 2014/1842 от 08.08.2014
Тонкостенные пробирки для ПЦР	Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом от 0,2 мл до 0,5 мл / Тонкостенные пробирки для ПЦР с выпуклой крышкой объемом 0,2 мл (ФСЗ 2009/05024 от 19.12.2022)

Плашки для ПЦР	Плашки для ПЦР на 48 лунок / Плашки для ПЦР на 96 лунок (ФСЗ 2009/05024 от 19.12.2022)
Комплект для целевого обогащения ДНК, комплект для приготовления библиотек ДНК	Комплект для целевого обогащения ДНК, комплект для приготовления библиотек ДНК (из наборов «Таргет РМЖ С-А», «Таргет РМЖ С-Б», «Таргет РМЖ А», «Таргет РМЖ Б»)
Комплект для подготовки к секвенированию, комплект для секвенирования	Комплект для подготовки к секвенированию, комплект для секвенирования (из наборов «Таргет РМЖ С-А», «Таргет РМЖ С-Б»)

Для экстракции ДНК из исследуемых образцов дополнительно понадобятся:

1. При работе с образцами цельной крови – набор «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по ТУ 21.20.23-232-17253567-2018» (РУ №РЗН 2019/9331 от 02.12.2019)
2. При работе с образцами парафиновых блоков (FFPE) – набор «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE блоков для диагностики in vitro по ТУ 9398-001-11248074-2017» (РУ № РЗН 2019/9172 от 14 апреля 2020) или «Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)» (РУ №ФСЗ 2012/12715 от 03 августа 2017)

Анализируемые образцы и пробоподготовка

Для работы с набором необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенной из цельной крови, а также пробы опухолевой ДНК, выделенной из операционного (биопсийного) материала пациента, фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки).

Для цельной крови необходимо соблюдать следующие требования: взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

ВАЖНО

Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Для парафиновых блоков (FFPE) необходимо соблюдать следующие требования: предварительно провести их морфологический анализ. Рекомендовано использовать образцы, в которых ткань опухоли занимает не менее 80% площади препарата, допустимое минимальное количество опухоли - не менее 20% площади препарата. В случае невыполнения данного условия рекомендуется подготовить гистологический препарат биоматериала и по результатам гистологического исследования провести разметку препарата с обратной стороны предметного стекла, отметив границы зоны опухоли. В дальнейшем для выделения ДНК необходимо использовать отмеченную область препарата, содержащую опухолевую ткань. Для проведения исследования рекомендуется использовать фрагмент парафинового блока, соответствующий следующим параметрам: толщина каждого среза от 5 до 6 мкм; суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани и комплексов клеток человека от 2 см². Хранить и транспортировать материал в парафиновых блоках (FFPE) необходимо при температуре от +5 до +40°С с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

Выделение ДНК из образцов цельной крови осуществляется с помощью набора «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по ТУ 21.20.23-232-17253567-2018» (РУ №РЗН 2019/9331 от 02.12.2019), из парафиновых блоков (FFPE) - с помощью наборов «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE блоков для диагностики in vitro по ТУ 9398-001-11248074-2017» (РУ № РЗН 2019/9172 от 14 апреля 2020) и «Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)» (РУ №ФСЗ 2012/12715 от 03 августа 2017).

Образцы выделенной из FFPE блоков ДНК должны иметь концентрацию **не менее 5 нг/мкл.**

Минимальная валидированная концентрация ДНК – 2 нг/мкл.

Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения поглощения света образцом ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8. Концентрацию выделенной ДНК и поглощение света образцом ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм для оценки степени чистоты (A260/280) рекомендуется измерять с помощью анализатора NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США, Свидетельство об утверждении типа средств измерений №56026-13) или спектрофотометра «BioSpec-nano» ("Шимадзу Корпорэйпш", Япония,

ФСЗ 2010/06804 от 24.05.2010, Свидетельство об утверждении типа средств измерений № 48405-11). Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки. Анализируемая ДНК должна храниться и транспортироваться при температуре от 2°С до 8°С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°С.

Общие правила и рекомендации для работы с набором

- Все манипуляции рекомендуется проводить на льду или в охлажденных штативах.
- Протокол описан для работы с индивидуальными пробирками, но позволяет работать как с образцами в формате 96-луночной планшеты, так и в формате 8-луночных стрипов.
- При работе с набором используйте пластик, рекомендованный производителем вашего ПЦР амплификатора. Не допускайте испарения реакций.
- На протяжении всего протокола необходимо использовать наконечники для дозаторов с фильтром, которые необходимо менять для каждого образца и каждого компонента.
- Делайте общие ПЦР смеси для создания максимально одинаковых условий ПЦР для разных образцов. При расчете финальных объемов общих смесей, закладывайте запас в 10% на ошибки работы дозаторов.
- Рекомендуется планировать не более 4 постановок с использованием одного набора для минимизации потерь реагентов при пипетировании.
- Вязкие жидкости отбирайте медленно. Тщательно перемешивайте растворы, компонентами которых являются данные реактивы. ПЦР-смесь 1, ПЦР-смесь 2, Активатор и ДНК-лигазу можно перемешивать только кратковременным вортексированием или пипетированием.
- Избегайте кросс-контаминации при работе с Олигонуклеотидными индексами: чаще меняйте перчатки и открывайте пробирки с индексами по очереди.
- Если в пробирке с Раствором Л и с ПЦР-смесью 2 виден осадок, растворите его вортексированием или пипетированием, чтобы осадок полностью растворился.
- За 30 минут до начала работы с Реагентом В поместите его на комнатную температуру, тщательно перемешайте реактивы после разморозки.
- Реагент В при -20°С может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен. В любом случае, после достижения Реагентом В комнатной температуры, необходимо его тщательно перемешать. Отбирайте этот реагент дозатором медленно и осторожно.

- За 30 минут до начала работы с Магнитными частицами поместите их на комнатную температуру и тщательно вортексируйте, чтобы перемешать частицы. Отбирайте этот реагент дозатором медленно и осторожно.

- Для приготовления 80% этилового спирта смешайте 96% этиловый спирт с водой в расчете 500 мкл спирта 96% на 100 мкл воды на один образец. Используйте только свежеприготовленный 80% спирт!

Протокол проведения анализа

При получении набора:

1. Снять внешнюю упаковку (пленку).
2. Комплект для целевого обогащения ДНК перенести и хранить в пре-ПЦР зоне в морозильной камере при температуре от -25°С до -15°С.
3. Комплект для приготовления библиотек перенести и хранить в пост-ПЦР зоне.
4. «Магнитные частицы» из комплекта для приготовления библиотек ДНК должны храниться при температуре от -25°С до -15°С до первого вскрытия, после него — при температуре от +2°С до +8°С.
5. Комплект для приготовления библиотек (без «Магнитных частиц») хранить в морозильной камере при температуре от -25°С до -15°С.

Для наборов «Таргет РМЖ С-А» и «Таргет РМЖ С-Б»

1. Комплект для подготовки образца к секвенированию хранить в морозильной камере при температуре от -25°С до -15°С.
2. Комплект для секвенирования хранить в холодильной камере при температуре от +2°С до +8°С.

I. Проведение целевого обогащения ДНК

! Работа проводится в пре-ПЦР зоне

Потребуется:

- ПЦР-смесь 1
- Раствор праймеров 1
- Раствор праймеров 2
- КО
- Анализируемые образцы ДНК (концентрация - 5 нг/мкл)

В каждую постановку в дополнение к образцам рекомендуется ставить КО.

1. Приготовить 2 раствора для амплификации (по одному для каждого раствора праймеров) на необходимое количество реакций согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию
ПЦР-смесь 1	2 мкл
Раствор праймеров (№1 или №2)	5 мкл
Всего	**7 мкл**

2. Смешать в отдельных пробирках стрипа (также допустимо использование микропробирок или плашек) по 3 мкл образца с 7 мкл каждого раствора для амплификации. Общий объем каждой реакционной смеси составит 10 мкл. Пробирки должны быть совместимы с используемым термоциклером.

! Сначала раскапать по индивидуальным пробиркам готовые растворы для амплификации, затем отдельными наконечниками - исследуемые образцы и КО

3. Пробирки с образцами и КО плотно закрыть, перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1 000 об/мин в течение 1–3 сек. Поместить в термоциклер.

4 Запрограммировать термоциклер и запустить программу амплификации:

Количество циклов	Шаг	T°C	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °C	15 мин
17 циклов	Денатурация	99 °C	15 сек
	Отжиг и элонгация	60 °C	4 мин
1 цикл	Хранение	4°C	∞

ПЦР продукт может храниться 1 ночь от +4 до +10°C, при более долгом хранении ПЦР продукт должен храниться при −20°C

II. Приготовление библиотек ДНК

Далее работа проводится в пост-ПЦР зоне

1. Удаление праймеров из ПЦР продуктов

Потребуется:

- ПЦР продукт
- Активатор

1. Для каждого образца объединить продукты ПЦР из обеих пробирок (с Праймерами №1 и №2). Полученный объем для каждого образца будет составлять 20 мкл.

2. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл Активатора в каждую пробирку с объединенными продуктами ПЦР. Тщательно перемешать пипетированием, не допуская образования пузырей. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием при 1 000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

3. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время	Кол-во циклов
50°C	10 минут	1
55°C	10 минут	
60°C	20 минут	
10°C	Хранение не более 1 часа	

По окончанию выполнения программы извлечь пробирки из реакционного модуля прибора. Незамедлительно перейти к лигированию адаптеров.

2. Лигирование адаптеров к ампликонам

Потребуется:

- ПЦР продукт, обработанный Активатором
- Раствор Л
- ЛС адаптеры
- ДНК-лигаза

4. Подготовить ЛС адаптеры и Раствор Л согласно расчету:

Компонент	Объем на 1 реакцию
ЛС адаптеры	2 мкл
Раствор Л	4 мкл
Всего	**6 мкл**

5. Тщательно перемешать смесь на вортексе после приготовления.

6. Добавить по 6 мкл полученной смеси в пробирки к образцам после обработки Активатором. Тщательно перемешать пипетированием. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

7. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл ДНК-лигазы в каждую пробирку, перемешать пипетированием. Общий объем смеси составит 30 мкл. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1 000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

8. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
22°C	30 минут
72°C	10 минут
10°C	(хранение до 1 часа)

9 Вынуть пробирки из термоциклера.

При необходимости пробирки можно хранить при температуре не выше -20°C

Если планируете перейти к Первому этапу очистки библиотек, поместите магнитные частицы на комнатную температуру и тщательно провортексируйте, чтобы перемешать частицы

3. Первый этап очистки библиотек

Потребуется:

- Полученная библиотека
- Магнитные частицы
- Деионизированная вода

За 30 минут до начала работы с Магнитными частицами поместите их на комнатную температуру и тщательно провортексируйте, чтобы перемешать частицы

10 Смешать суспензию Магнитных частиц с деионизированной водой согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию
Магнитные частицы	22 мкл
Деионизированная вода	20 мкл
Всего	**42 мкл**

11 Внести 42 мкл приготовленной суспензии в каждую пробирку с библиотекой, перемешать пипетированием, инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

12. Поместить пробирку, в которой находится реакционная смесь, на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.

13. Перенести супернатант в новую чистую пробирку, не задевая осадок частиц.

Супернатант содержит библиотеку

4. Второй этап очистки библиотек

Потребуется:

- Полученная библиотека
- Магнитные частицы
- Свежеприготовленный 80% этанол

Поместите ПЦР-смесь 2 на комнатную температуру, она понадобится на этапе Преамплификации библиотек п.22

14. Внести 58 мкл Магнитных частиц (неразведенных!) в каждую пробирку с супернатантом, содержащим библиотеку, тщательно перемешать пипетированием.

15. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

16. Поместить пробирку, в которой находится реакционная смесь, на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.

17. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц. Выждать 10 секунд, отобрать и удалить остатки супернатанта пипеткой на 10 мкл. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить п. 16-17.

Библиотека содержится на магнитных частицах!

18. Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 80% этанола в каждую пробирку, выждать 30 секунд.

19. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирке. Выждать 10 секунд, отобрать и удалить остатки супернатанта пипеткой на 10 мкл. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

20. Повторить шаги 18-19 для повторной промывки магнитных частиц.

21. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить капли кратковременным центрифугированием, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд при комнатной температуре и удалить излишки спирта пипеткой на 10 мкл, не задевая магнитных частиц. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая из магнитного штатива.

Не пересушивать магнитные частицы. Если частицы пересушены, на них заметны потрескивания.

После окончания сушки сразу же приступить к следующему этапу.

5. Преамплификация библиотеки

Потребуется:

- Полученная библиотека на магнитных частицах
- ПЦР-смесь 2
- Олигонуклеотидные индексы Си
- Олигонуклеотидные индексы Ли

Поместите Реагент B и TE на комнатную температуру, он понадобится на этапе Очистки преамплифицированной библиотеки

22. Добавить в каждую пробирку по 48 мкл ПЦР-смеси 2.

23. Добавить по 2 мкл одного Олигонуклеотидного индекса Си и одного Олигонуклеотидного индекса Ли. В одном запуске секвенирования каждому образцу должна соответствовать уникальная (неповторяющаяся) комбинация Олигонуклеотидных индексов — это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Индексы из наборов с литерами «А» и «Б» можно комбинировать между собой.

24. Зафиксировать комбинации номеров индексов, соответствующие каждому образцу в таблице (см. Приложение 1 или https://oncoatlas.ru/target-bc.pdf).

25. Перемешать содержимое на вортексе, чтобы ресуспендировать магнитные частицы и осадить на центрифуге для сбора капель. Установить пробирки в термоциклер.

26. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
1 цикл	98°C	2 минуты
6 циклов	98°C	15 секунд
	64°C	1 минута
Хранение	10°C	~1 час или более

Не допускается замораживание смеси библиотек с магнитными частицами при -20°C. После окончания ПЦР амплификации приступить к следующему этапу.

6. Очистка преамплифицированной библиотеки

Потребуется:

- Полученная библиотека на магнитных частицах
- Реагент B
- Свежеприготовленный 80% этанол
- TE буфер

27. Тщательно перемешать на вортексе Реагент B перед использованием (Реагент B при -20°C может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен, однако, даже в этом случае необходимо довести Реагент B до комнатной температуры и тщательно перемешать). Добавить 85 мкл Реагента B в каждую библиотеку и тщательно перемешать на вортексе. Коротко осадить центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек., чтобы сбросить капли.

28. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

29. Поместить пробирку на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая частицы. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

30. Добавить к Магнитным частицам 150 мкл свежеприготовленного 80% этанола и подождать 30 секунд, не снимая пробирку с магнитного штатива. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

31. Повторить шаг 30 для повторной промывки магнитных частиц.

32. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить кратковременным центрифугированием, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд и удалить излишки спирта, не задевая магнитных частиц. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку, повторить инкубацию и отобрать спирт заново. Просушить магнитные частицы, не вынимая пробирку из магнитного штатива.

Не пересушивать магнитные частицы. Если частицы пересушены, на них заметны потрескивания.

33 Удалить пробирку с магнитного штатива и добавить в каждую пробирку 35 мкл ТЕ буфера.

34 Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц, осадить на центрифуге для сбора капель и инкубировать 5 минут.

35 Поместить пробирку на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Перенести супернатант с готовыми ДНК библиотеками в новую пробирку, не задевая магнитных частиц. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

7. Измерение концентрации библиотек и расчет фактора разведения

Дополнительная нормализация может не проводиться при условии использования одинаковой концентрации ДНК образцов при приготовлении библиотек. Однако, рекомендуется перед разведением измерить концентрацию полученных библиотек на флуориметре Qubit 3.0 с использованием набора Qubit®dsDNA HS Assay Kit или на анализаторе иммунологическом “Varioskan Flash” ("Термо Фишер Сайентифик Ой", Финляндия), РЗН № 2014/1842 от 08.08.2014. Если исходная концентрация библиотеки данного образца ниже требуемой, образец признается непригодным для анализа.

36 Развести библиотеки деионизированной водой, свободной от нуклеаз, до концентрации 4 000 пмоль/л (эквивалентно 680 нг/мл), используя 15 мкл исходной библиотеки. Рекомендуется использовать пробирки DNA LoBind.

37 Если полученная концентрация библиотеки данного образца ниже требуемой (4 нмоль/л), образец признается непригодным для секвенирования.

38 Смешать в равных объемах библиотеки, планируемые к секвенированию.

Неразведенные библиотеки хранить в морозильной камере при температуре от -22 до - 20˚С до 6 месяцев

Полученные библиотеки готовы к секвенированию на MiSeq.

III. Настройка параметров запуска

1. Запуск секвенатора и получение FASTQ файлов осуществляется с помощью встроенного пайплайна Local Run Manager (версия 2.0. и выше) - специализированного программного обеспечения, встроенного в секвенатор MiSeq.

2. Скачайте файл template_Target (https://ivd.oncoatlas.ru/target) и поместите его в папку Local Run Manager/templates. Запустите программу Local Run Manager. Зайдите в раздел Menu, пункт TOOLS и выберите раздел Library Prep Kit (Рис. 2).

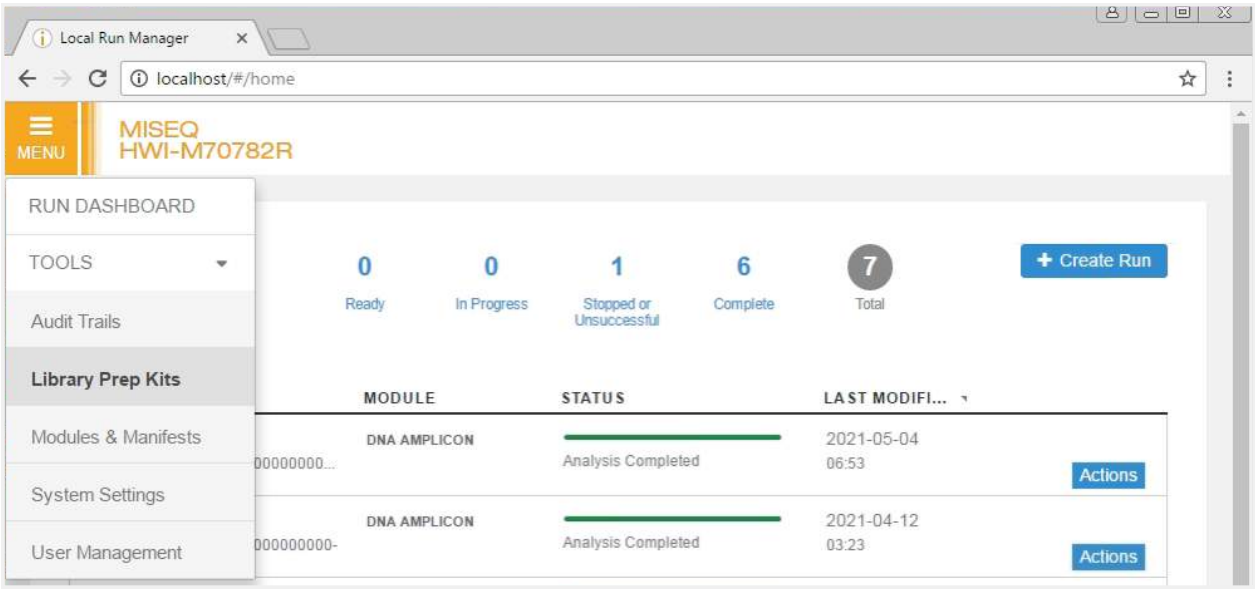


Рисунок 2. Окно главного меню в Local Run Manager

3. Открыв раздел Add Library Prep Kit, найдите файл template_Target, откройте его. Теперь template файл успешно загружен (Рис. 3).

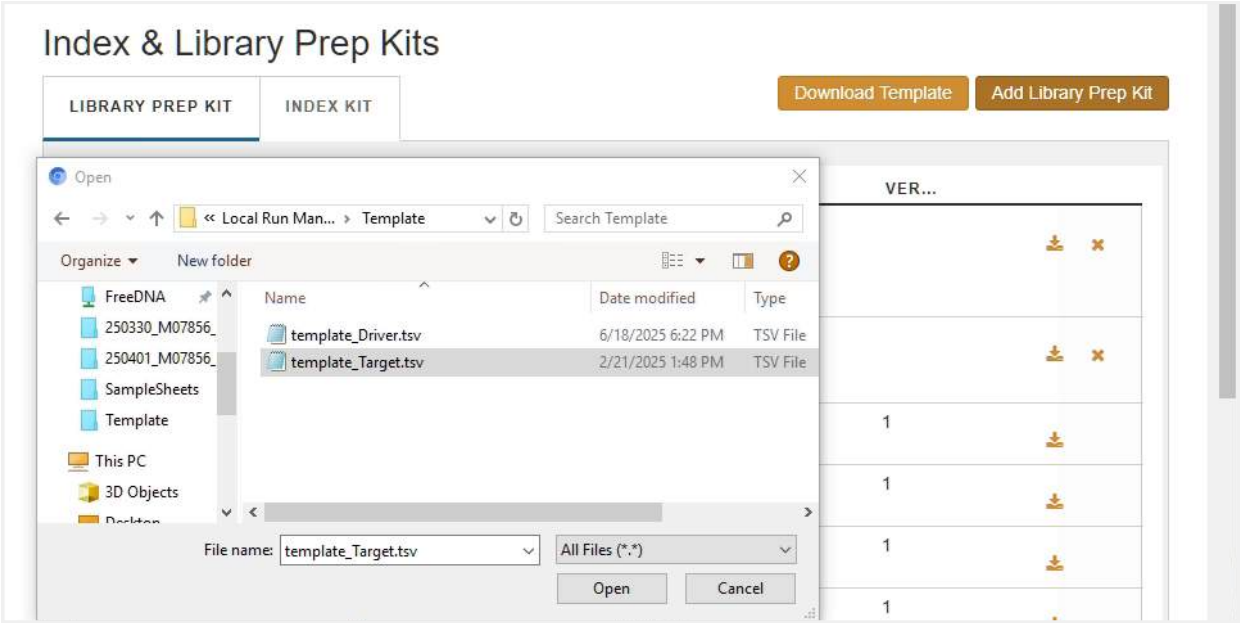


Рисунок 3. Пример окна Library Prep Kit в Local Run Manager

4 Создайте новый запуск (Run), нажав кнопку Create Run и выбрав вариант GenerateFASTAQ (Рис. 4).

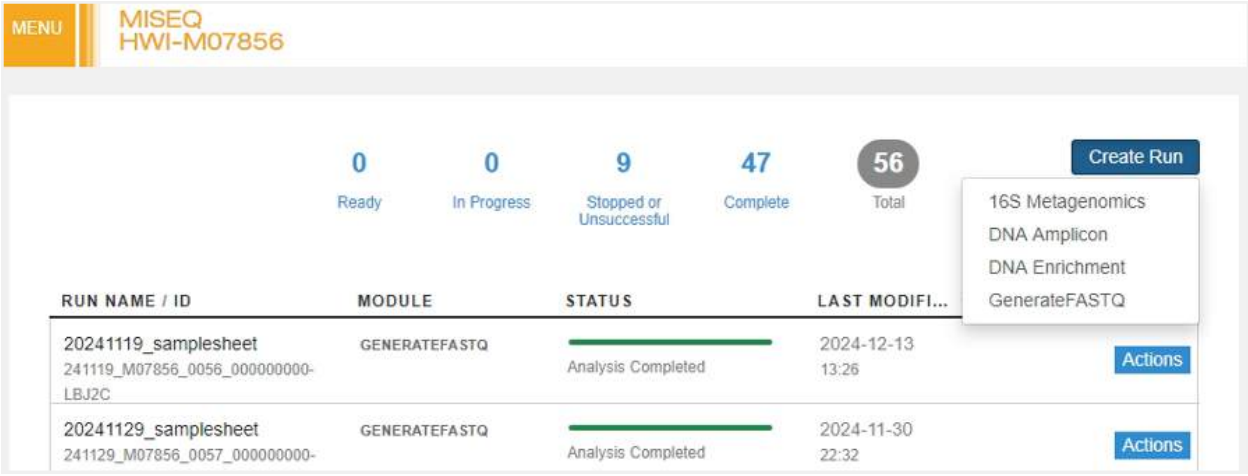


Рисунок 4. Пример окна нового запуска (Run) в Local Run Manager

5 В поле Run Name задайте имя вашего запуска. В поле Library Prep Kit выберите вариант SolotestTarget, после чего ряд настроек автоматически заполнится (Рис. 5).

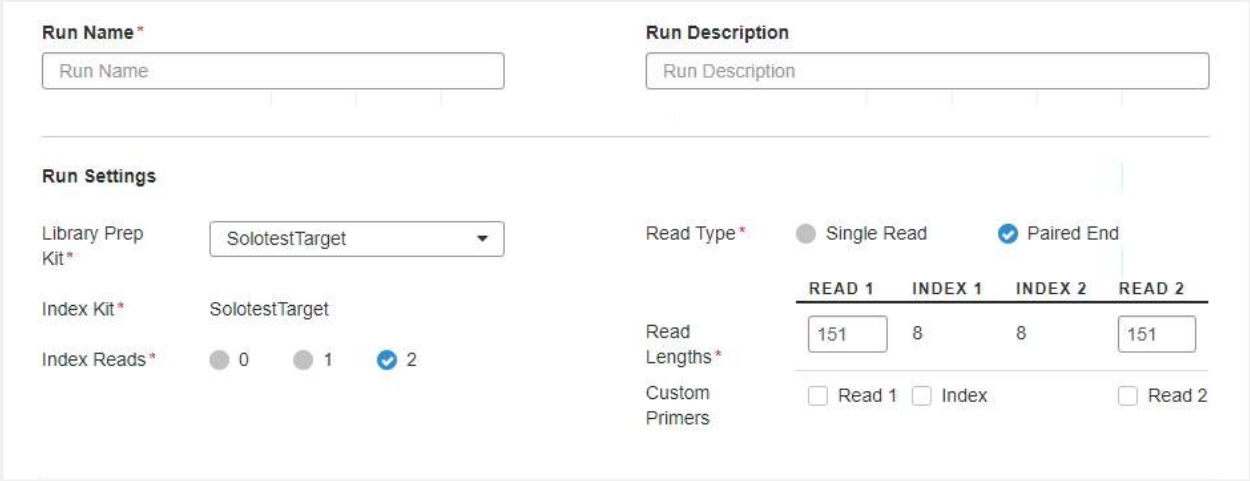


Рисунок 5. Пример окна конфигурации запуска в Local Run Manager

6 Ниже необходимо заполнить информацию об образцах. Для этого в таблице указать название образца (Sample ID) и использованную для каждого образца комбинацию индексов из выпадающего списка (Рис. 6).

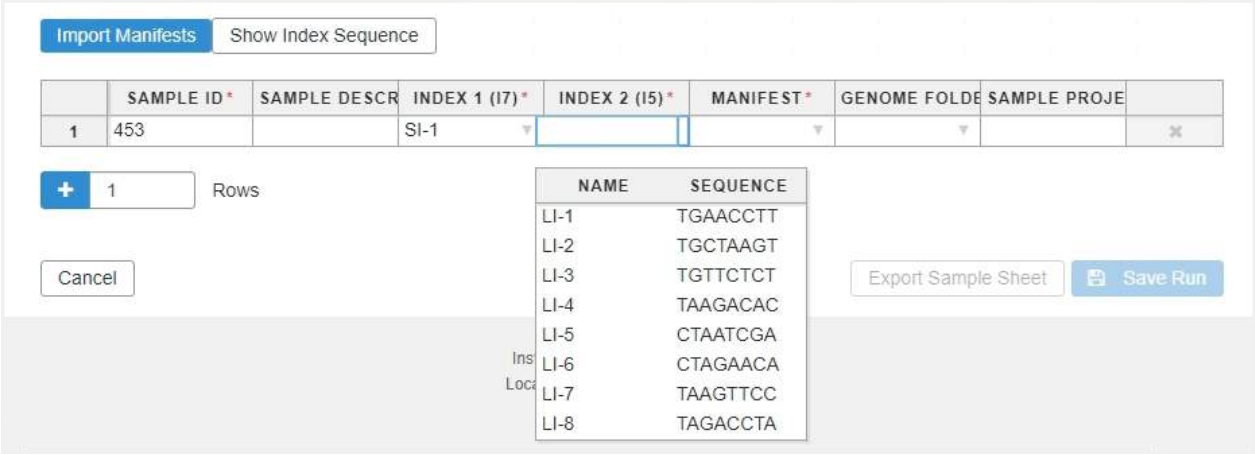


Рисунок 6. Пример окна конфигурации запуска в Local Run Manager

7 Сохранить настройки, нажав Save Run. Далее, после запуска секвенирования Local Run Manager будет ожидать завершения процесса секвенирования и демультиплексирования образцов. По завершению статус изменится на Analysis Completed (Рис. 7).

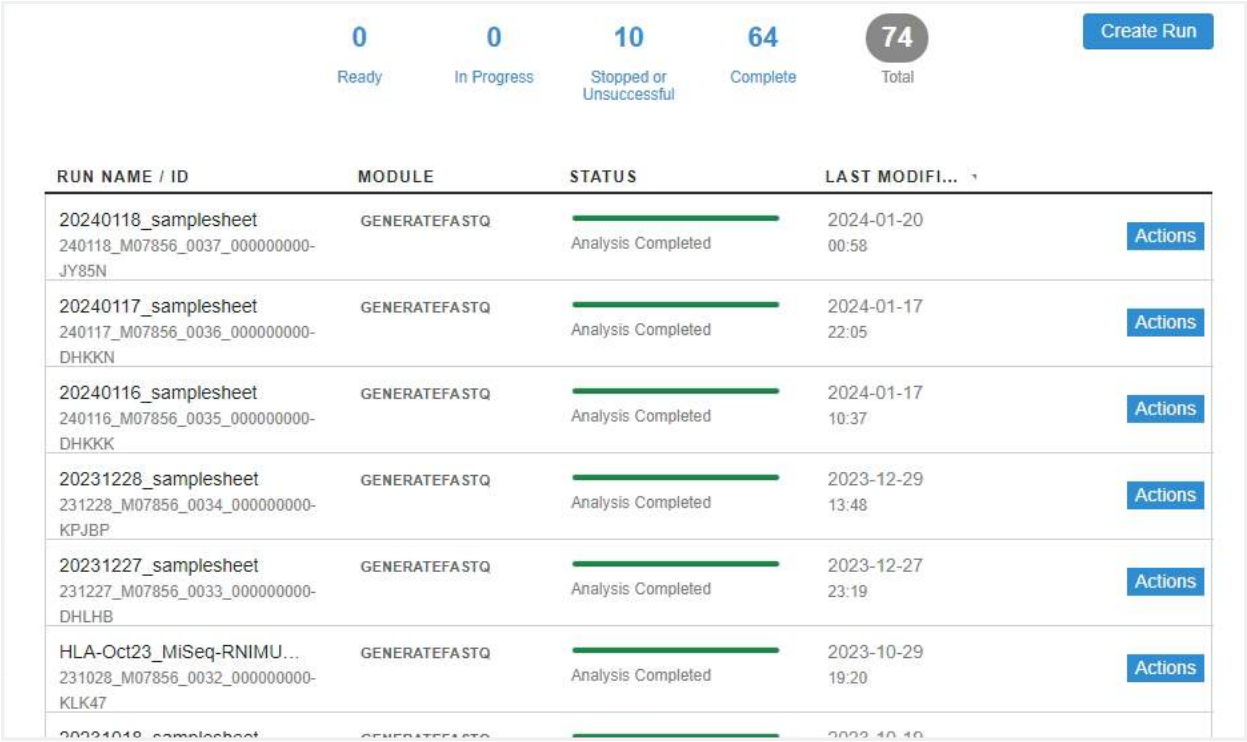


Рисунок 7. Пример окна запуска секвенирования в Local Run Manager

IV. Подготовка образцов к секвенированию

1. Извлечь картридж из морозильной камеры с температурой от –25°C до –15 °C.

2. Поместить картридж с реактивами в водяную баню, содержащую воду в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами. Нельзя погружать картридж глубже линии, указанной на его боковой поверхности (Рис. 8).

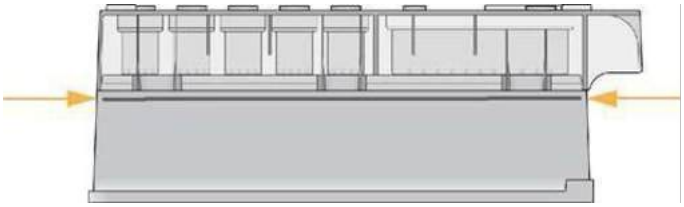


Рисунок 8. Линия максимального уровня воды

3. Оставить картридж с реактивами размораживаться в водяной бане комнатной температуры до полного оттаивания на 60 минут.

4. Разморозить раствор HT1 при комнатной температуре, тщательно перемешать и оставить во льду.

5. Приступить к подготовке библиотеки: приготовить 1 мл свежего раствора 0,2 M NaOH путем смешивания 800 мкл деионизированной воды и 200 мкл 1 M NaOH.

6. Приготовить эквимолярную смесь ДНК библиотек (далее «пулированную библиотеку»): разморозить (если была заморожена), тщательно перемешать. В одном анализе (цикле секвенирования) могут быть объединены до 96 ДНК-библиотек (при объединении библиотек, приготовленных несколькими наборами соответствующих вариантов исполнения), включая контрольные образцы.

7. Смешать в чистой пробирке 5 мкл пулированной библиотеки и 5 мкл свежеприготовленного 0,2 M NaOH. Тщательно перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре 5 минут.

8. Добавить к смеси 990 мкл охлажденного раствора HT1. Тщательно перемешать. Теперь концентрация пулированной библиотеки составляет 20 пМ.

9. Выбрать конечную концентрацию библиотеки для внесения в картридж (стандартно 12пМ, но может быть скорректировано). Развести библиотеки до конечной концентрации, используя объемы реагентов, приведенные в таблице, тщательно перемешать и сбросить капли кратким центрифугированием.

Концентрация	8 пМ	10 пМ	12 пМ	15 пМ
20 пМ библиотека	240 мкл	300 мкл	360 мкл	450 мкл
Охлажденный HT1	360 мкл	300 мкл	240 мкл	150 мкл

10. Загрузить образцы в картридж. Для этого вынуть картридж из водяной бани и осторожно постучать им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытереть основание картриджа насухо.

11. Перевернуть картридж с реактивами десять раз для перемешивания растаявших реактивов, а затем внимательно проверить, что все позиции оттаяли, равномерно перемешаны и не содержат осадка.

12. Осторожно постучать картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реактивах.

13. Очистить безворсовой салфеткой колпачок из фольги, покрывающий емкость, отмеченную оранжевой окружностью.

14. Проколоть колпачок из фольги чистым наконечником для пипетки на 1 мл.

15. Внести с помощью пипетки 600 мкл подготовленной пулированной библиотеки в резервуар, отмеченный оранжевой окружностью. Не касаться колпачка из фольги (Рис. 9).

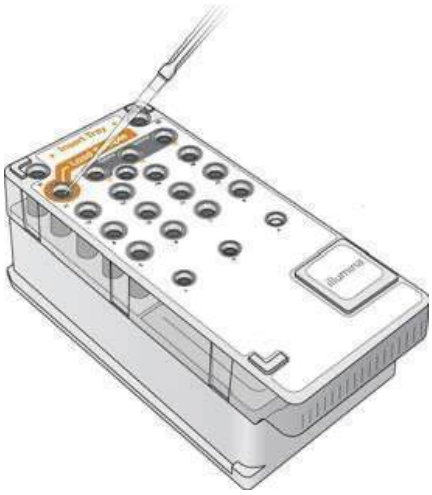


Рисунок 9. Загрузка библиотек

V. Секвенирование

1. Открыть программу MiSeq Control Software, перейти в раздел секвенирование, затем в окно Local Run Manager, выбрать там созданный ранее запуск. Убедиться в соответствии заданных ранее условий запуска параметрам, представленным на экране (парные чтения длиной 151+151, двойное чтение индексов).

2. Надеть новую пару неопудренных перчаток.

3. Пользуясь пластиковыми щипцами, захватить проточную кювету за основание пластмассового кейса и извлечь ее из емкости (Рис. 10).

Рисунок 10. Извлечение проточной кюветы

4. Тщательно промыть проточную кювету деионизированной водой до тех пор, пока стеклянная ячейка и пластиковый кейс не будут тщательно отмыты от избытка солей (Рис. 11). Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе. Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах анализа.

Рисунок 11. Промывка проточной кюветы

5. Насухо протереть проточную кювету (Рис. 12) безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы. Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой.

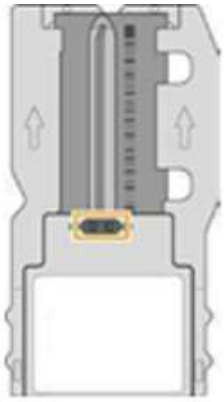


Рисунок 12. Отверстия и прокладка проточной кюветы

6 Протереть стекло проточной кюветы спиртовой салфеткой (Рис. 13). Удостовериться в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки. Не протирать спиртовой салфеткой область прокладки проточной кюветы.

Рисунок 13. Сушка проточной кюветы

7 Избыток спирта протереть безворсовой салфеткой.

8 Удостовериться в том, что в отверстиях проточной кюветы нет препятствий и что прокладка плотно прилегает по окружности отверстий кюветы.

9 Если выяснится, что прокладка смещена, осторожно вернуть её на место и добиться того, чтобы она надежно располагалась вокруг отверстий кюветы.

Загрузка проточной кюветы

10 Поднять дверцу отсека проточной кюветы и нажать кнопку справа от защелки проточной кюветы. Защелка проточной кюветы откроется (Рис. 14).

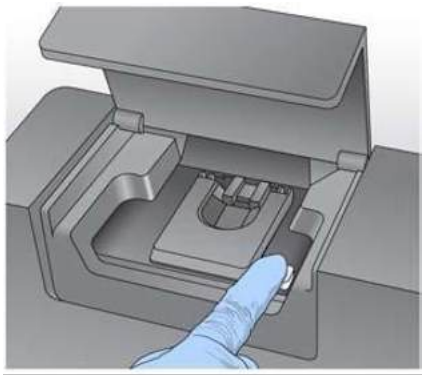


Рисунок 14. Открывание защелки проточной кюветы

11 Убедиться в том, что на площадке проточной кюветы отсутствует ворс. Если на площадке есть волокна или иные загрязнения, протереть площадку начисто спиртовой салфеткой или безворсовой тканью, смоченной этанолом. Тщательно протереть поверхность площадки проточной кюветы — она должна быть чистой и сухой.

12 Удерживая проточную кювету за края, поставить её на площадку проточной кюветы (Рис. 15).

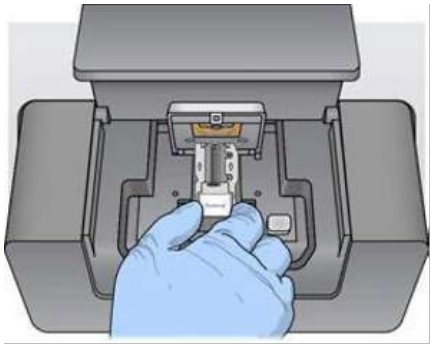


Рисунок 15. Установка проточной кюветы на столик

13 Осторожно нажать на защелку проточной кюветы в направлении книзу так, чтобы она защелкнулась над кюветой.

14 Когда защелка проточной кюветы закрывается, два центровочных штырька позиционируют проточную кювету. Если вы услышали щелчок, это означает, что защелка проточной кюветы надежно закреплена (Рис. 16).

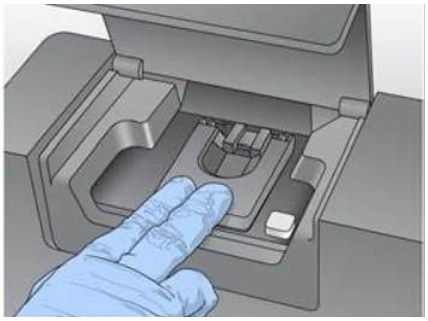


Рисунок 16. Закрывание защелки проточной кюветы

15 Закрыть дверцу отсека проточной кюветы.

16 Нажать на экране Next (Далее).

Загрузка раствора PR2 и проверка бутыли для сбора отходов

17 Извлечь флакон с раствором PR2 из хранилища с температурой от +2°C до +8°C. Перевернуть для перемешивания, а затем снять крышку.

18 Открыть дверцу отсека с реактивами.

19 Поднять сипперную рукоятку.

20 Извлечь промывную бутыль и загрузить бутыль с раствором PR2 (Рис. 17).

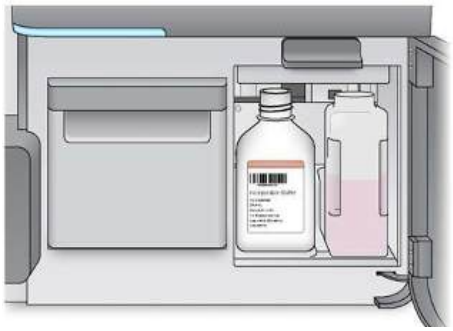


Рисунок 17. Загрузка бутыли с раствором PR2

21 Перелить содержимое бутыли для сбора отходов в соответствующий контейнер для отходов.

22 Медленно опустить сипперную рукоятку вниз до конца. Убедиться в том, что сипперные трубки опустились во флакон с раствором PR2 и в бутыли для сбора отходов (Рис. 18).

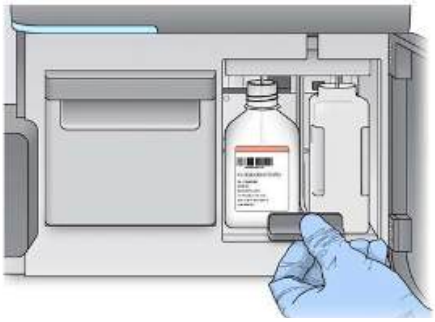


Рисунок 18. Опускание сипперной рукоятки

23 Нажать на экране Next (Далее).

24 Открыть дверцу холодильника для реактивов. Извлечь промывочный картридж.

25 Придерживая картридж с реактивами за рукоятку, вставить его в холодильник для реактивов до упора (Рис. 19).

Рисунок 19. Загрузка картриджа с реактивами

26 Закрыть дверцу отсека для охлаждения реактивов (слева).

27 Закрыть дверцу отсека с реактивами (справа).

28 Нажать на экране Next (Далее).

29 После загрузки проточной кюветы и реактивов, выполнить предварительную проверку устройства, затем запустить секвенатор MiSeq.

VI. Анализ данных и интерпретация результатов

1. Анализ полученных на секвенаторе данных осуществляется последовательно: полученные файлы FASTQ анализируются с помощью ПО «Solo AVES» https://aves.oncoatlas.ru/, версия 1.03.04 от 04.02.2023.

2. Для получения FASTQ файлов используется программное обеспечение Local Run Manager (версия 2.0. и выше) - специализированное программное обеспечение, встроенное в секвенатор MiSeq. Обработка данных пайплайном начинается автоматически сразу по завершении работы секвенатора.

3. Полученные в результате секвенирования на Illumina MiSeq данные сохраняются в формате BCL (binary base call) и представляют собой результаты прочтения нуклеотидных последовательностей за один цикл работы секвенатора. При одновременном секвенировании нескольких образцов их последовательности объединяются, мультиплексируются. В результате за один цикл секвенатор считывает одновременно все последовательности в библиотеках, сохраняя их в формате BCL. Для того, чтобы разделить прочтения с разных образцов, на стадии подготовки библиотек к последовательностям каждого образца «прикрепляются» специальные последовательности - индексы, уникальные для каждого образца. Благодаря им можно провести разделение прочтений по образцам - демультиплексирование. При этом прочтения сохраняются в формате FASTQ, который впоследствии можно обрабатывать множеством биоинформатических инструментов.

4. Демультиплексирование и переформатирование данных секвенирования из формата BCL в формат FASTQ осуществляется автоматически при помощи пайплайна Local Run Manager (DNA Amplicon Workflow, Version 3.24.1.8+master, Generate FASTQ Workflow, Version 3.0.1). Далее программа проводит проверку качества прочтений с использованием порога по значению Q-score. Это значение, описывающее вероятность ошибочного прочтения нуклеотида в каждой позиции. В качестве минимального значения используется значение Q=30, соответствующее вероятности ошибки прочтения 0.1%.

5. Файлы FASTQ, полученные в рамках анализа полученных на секвенаторе данных с помощью программного обеспечения от поставщика генетического секвенатора, анализируются с помощью ПО «Solo AVES» https://aves.oncoatlas.ru/, версия 1.03.04 от 04.02.2023. Анализ файлов FASTQ с помощью ПО «Solo AVES» осуществляется через веб-браузер (поддерживается веб-браузером Chrome™ версии 39) при наличии доступа в интернет со скоростью загрузки не менее 1 Mbps и скоростью отдачи не менее 10 Mbps. Для начала работы с ПО необходимо перейти по ссылке https://aves.oncoatlas.ru/ и выполнить вход в систему по паре логин/пароль, полученной от производителя набора реагентов, после чего нажать кнопку «Войти» (Рис. 20).

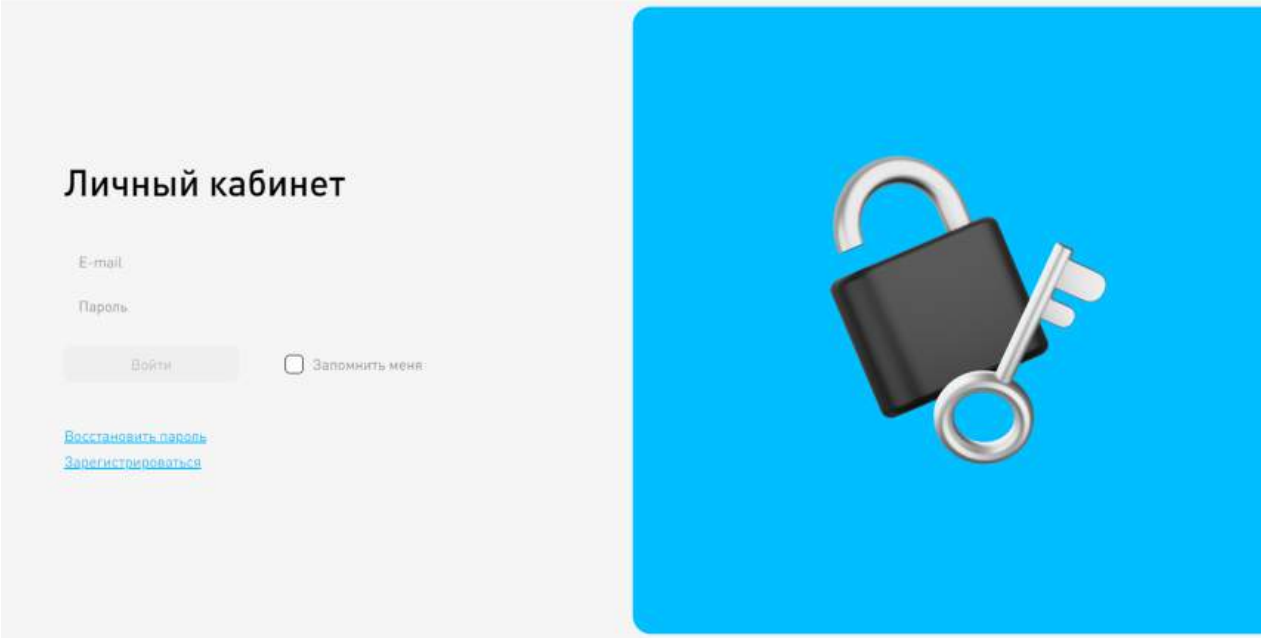


Рисунок 20. Вход в программное обеспечение Solo AVES

В течение не более полугода после получения наборов реагентов пара логин/пароль, в случае если не предоставлялась пользователю ранее, предоставляется производителем набора реагентов в срок не более 7 рабочих дней после запроса пользователя электронным путем (электронная почта, запрос направляется на почту it-solo@oncoatlas.ru).

6 Создание заявки на анализ данных.

Шаг 1. Перейти в раздел «Запустить анализ данных» (Рис. 21).

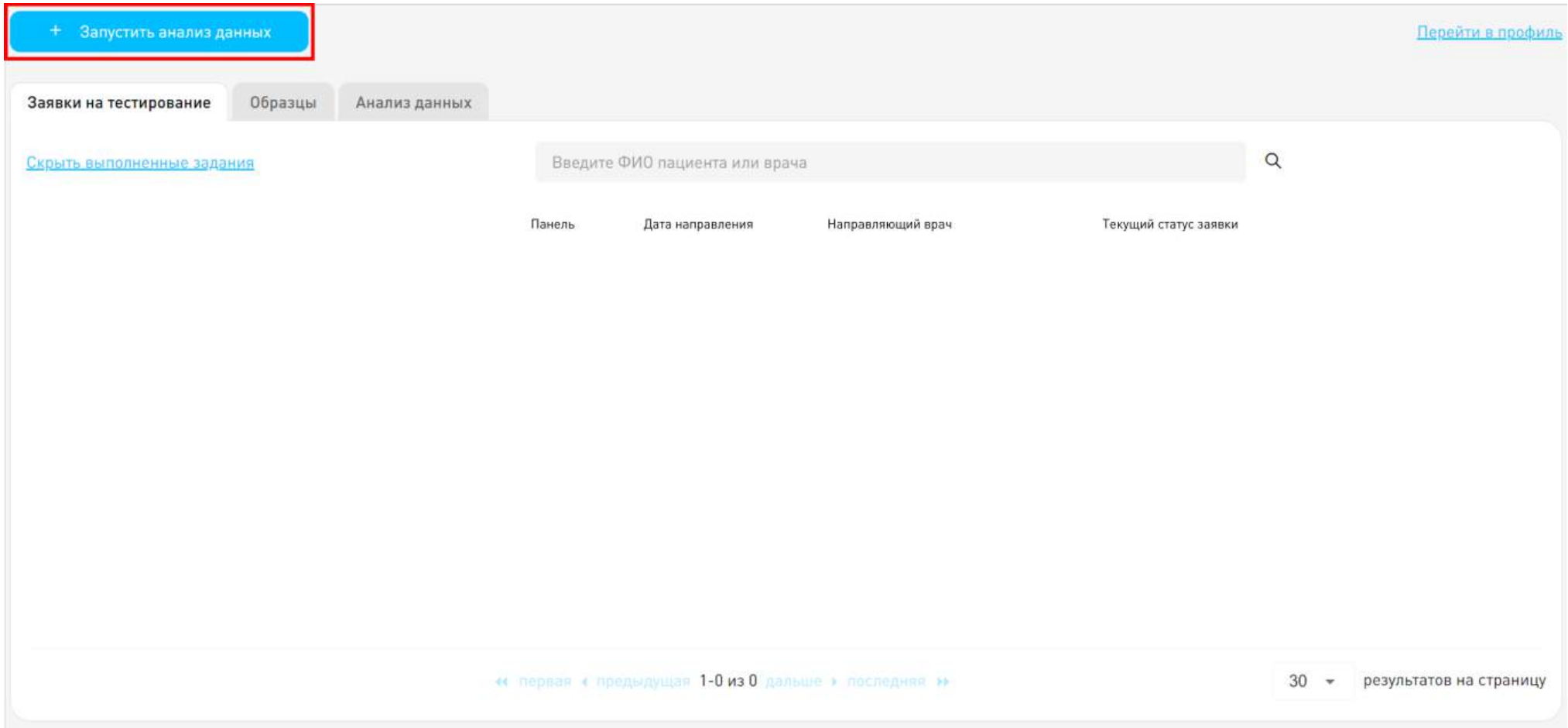


Рисунок 21. Экран запуска анализа данных

Шаг 2. Откроется окно создания заявки на анализ данных. В рамках одной заявки на анализ данных можно проанализировать любое количество образцов, которые секвенировались в рамках одного запуска прибора. Для создания заявки на анализ данных необходимо:

1. Ввести информацию о запуске;

2. Добавить данные секвенирования;

3. Ввести информацию об образцах, которые соответствуют добавленным данным секвенирования.

Крайне НЕ рекомендуется в рамках одной заявки на анализ данных анализировать данные секвенирования с разных запусков одного или нескольких секвенаторов. **Крайне рекомендуется** в рамках одной заявки на анализ данных анализировать все данные, которые были получены в рамках одного запуска прибора с помощью наборов реагентов от ООО «ОНКОАТЛАС»; создание отдельных заявок на анализ данных на каждый отдельный образец **НЕ рекомендовано.**

В новом окне заполнить дату секвенирования и выбрать из выпадающего окна платформу секвенирования (Рис. 22).

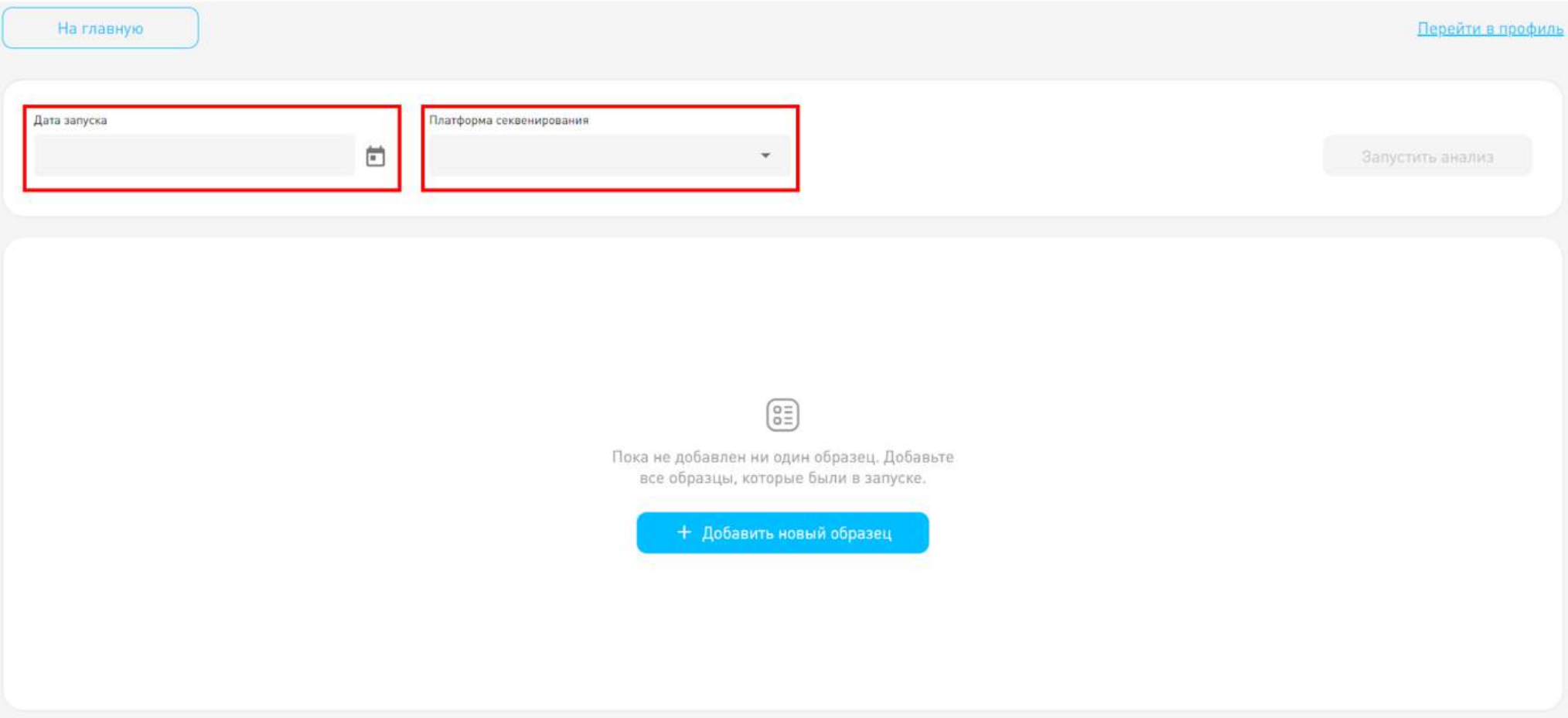


Рисунок 22. Заполнение информации о дате запуска и платформе секвенирования

Шаг 3. С помощью кнопки «Добавить новый образец» добавьте данные секвенирования (Рис. 23).

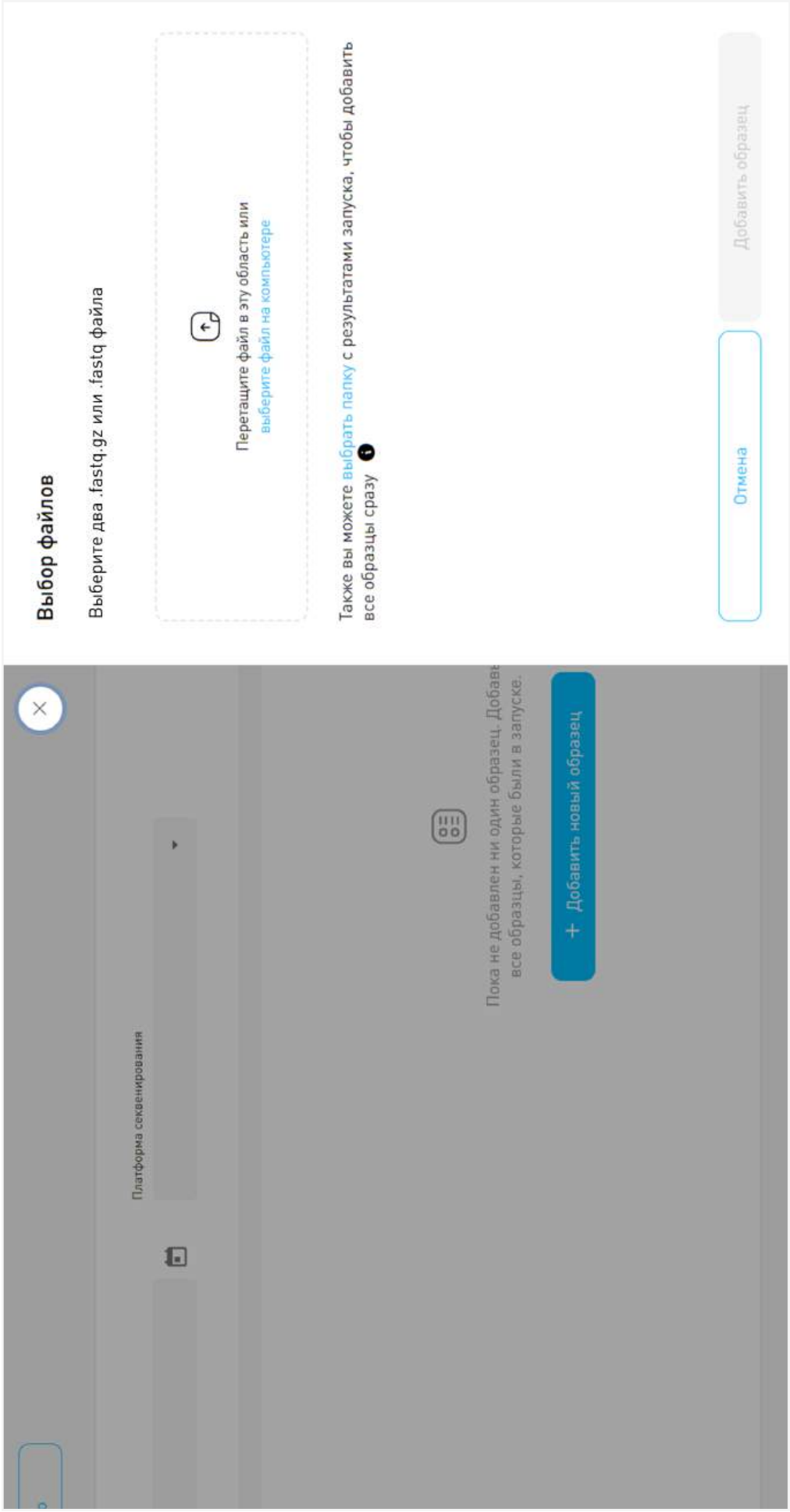


Рисунок 23. Окно добавления данных секвенирования

3.1. Возможно добавление отдельного образца. Для этого необходимо выбрать два .fastq файла с компьютера и нажать «Добавить образец» (Рис. 24).

А

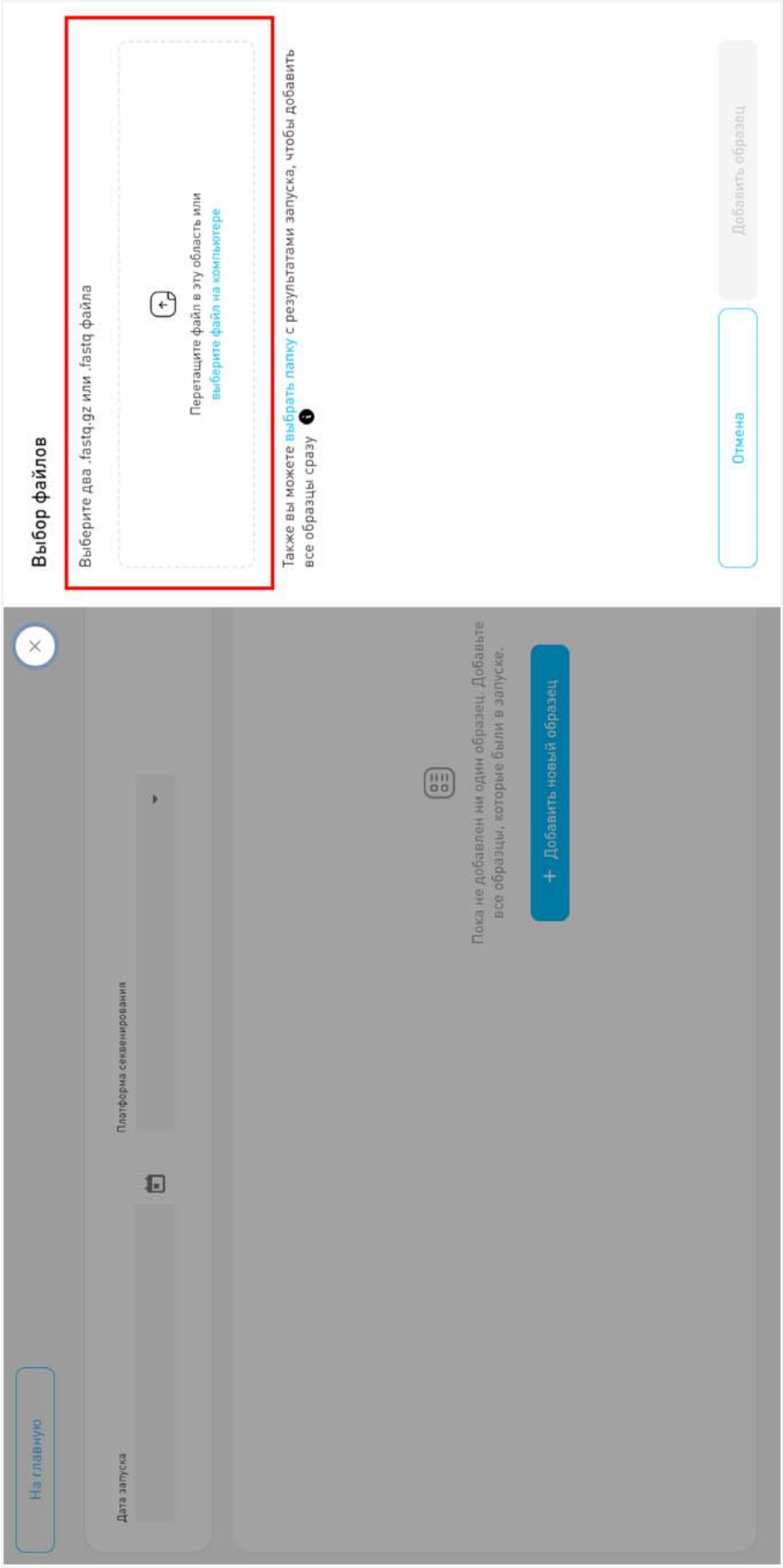


Рисунок 24. Добавление данных секвенирования одного образца. Красной рамкой выделена область добавления .fastq файлов

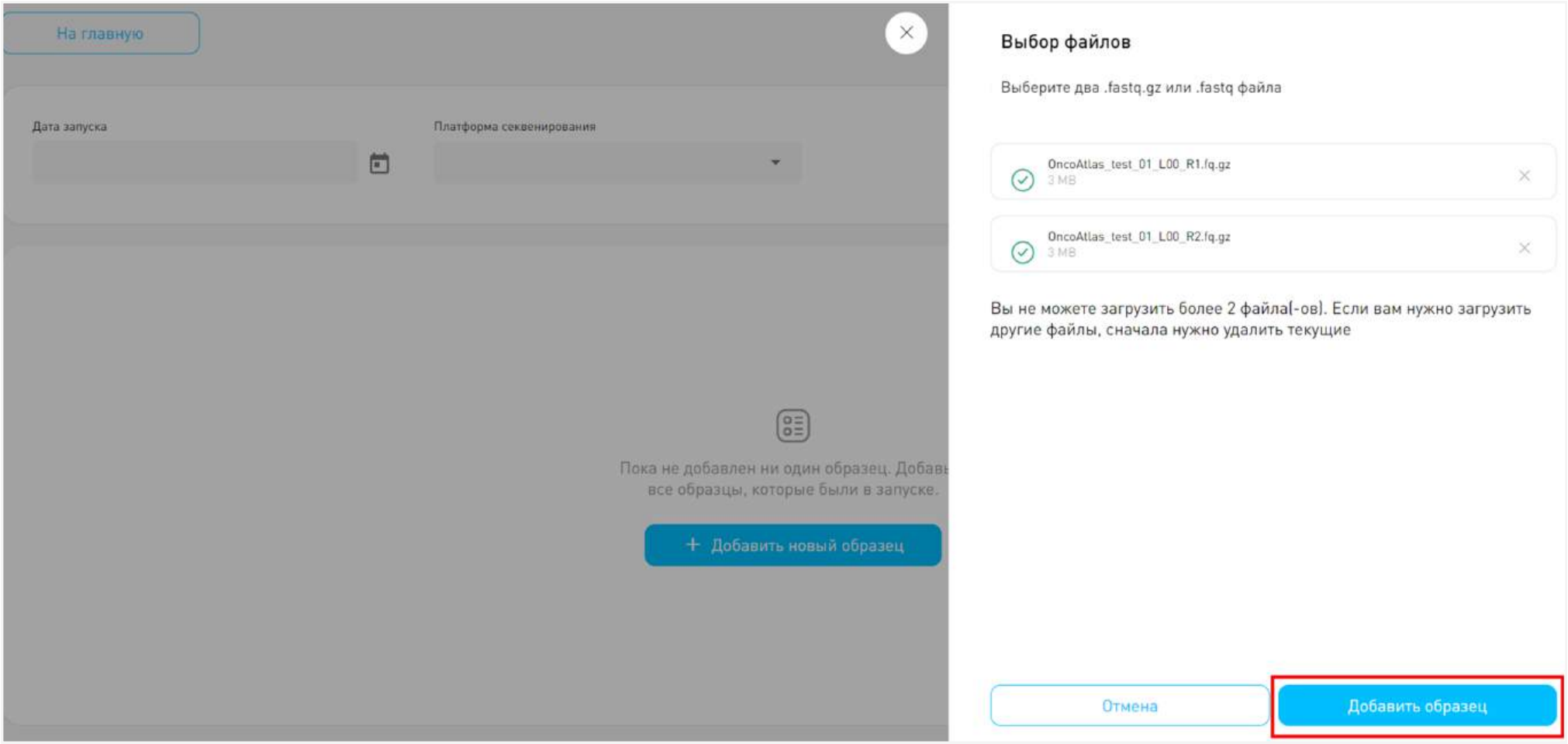


Рисунок 24. Добавление данных секвенирования одного образца.
Красной рамкой выделена кнопка «Добавить образец»

3.2. Также возможно добавление всех образцов, которые были в запуске. Для этого необходимо нажать «выбрать папку», в открывшемся окне выбрать папку на компьютере с результатами секвенирования. После загрузки всех образцов нажать «Добавить образцы» (Рис. 25).

A

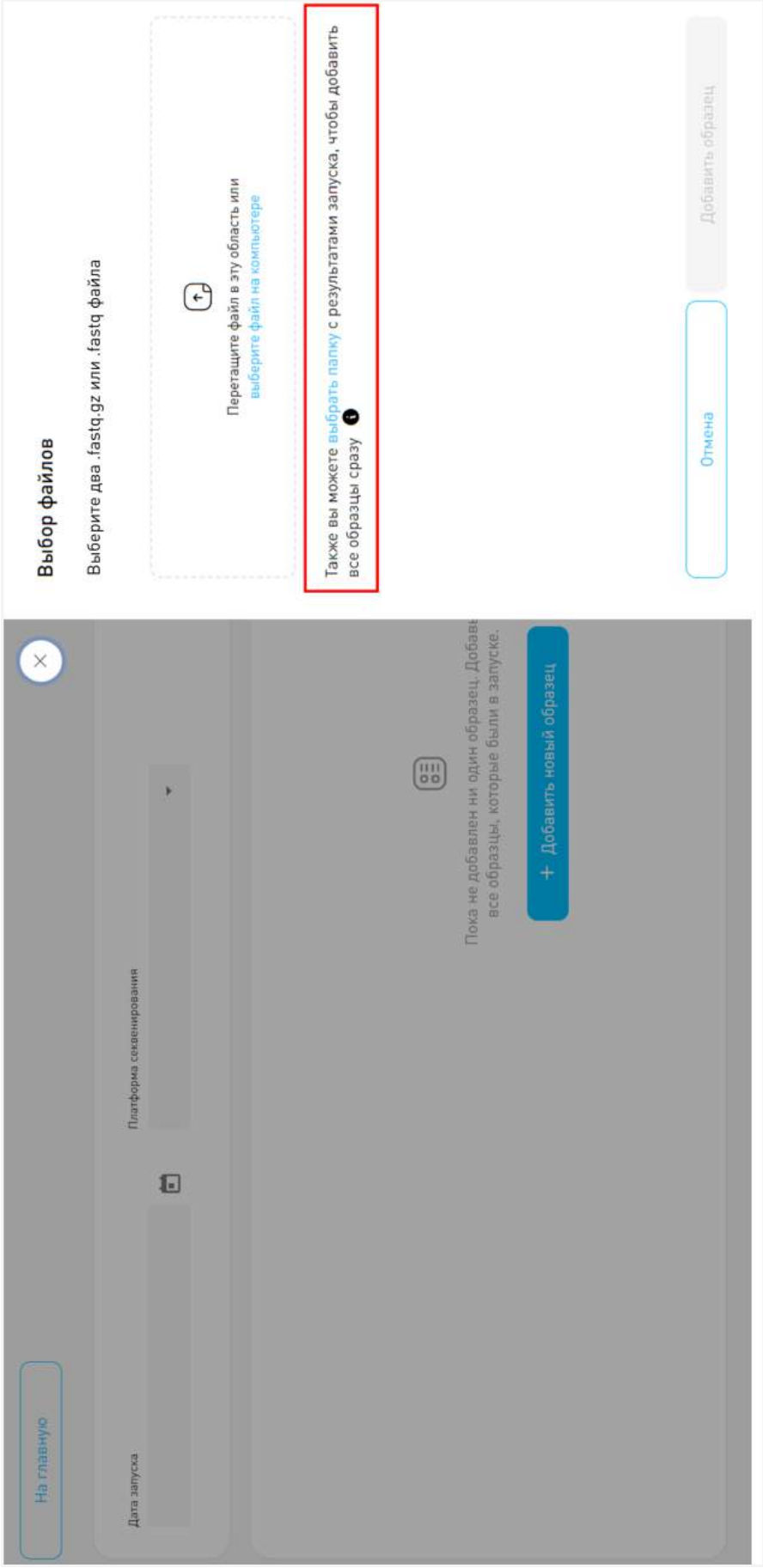


Рисунок 25. Добавление данных секвенирования всех образцов запуска. Красной рамкой выделена область выбора папки

Б

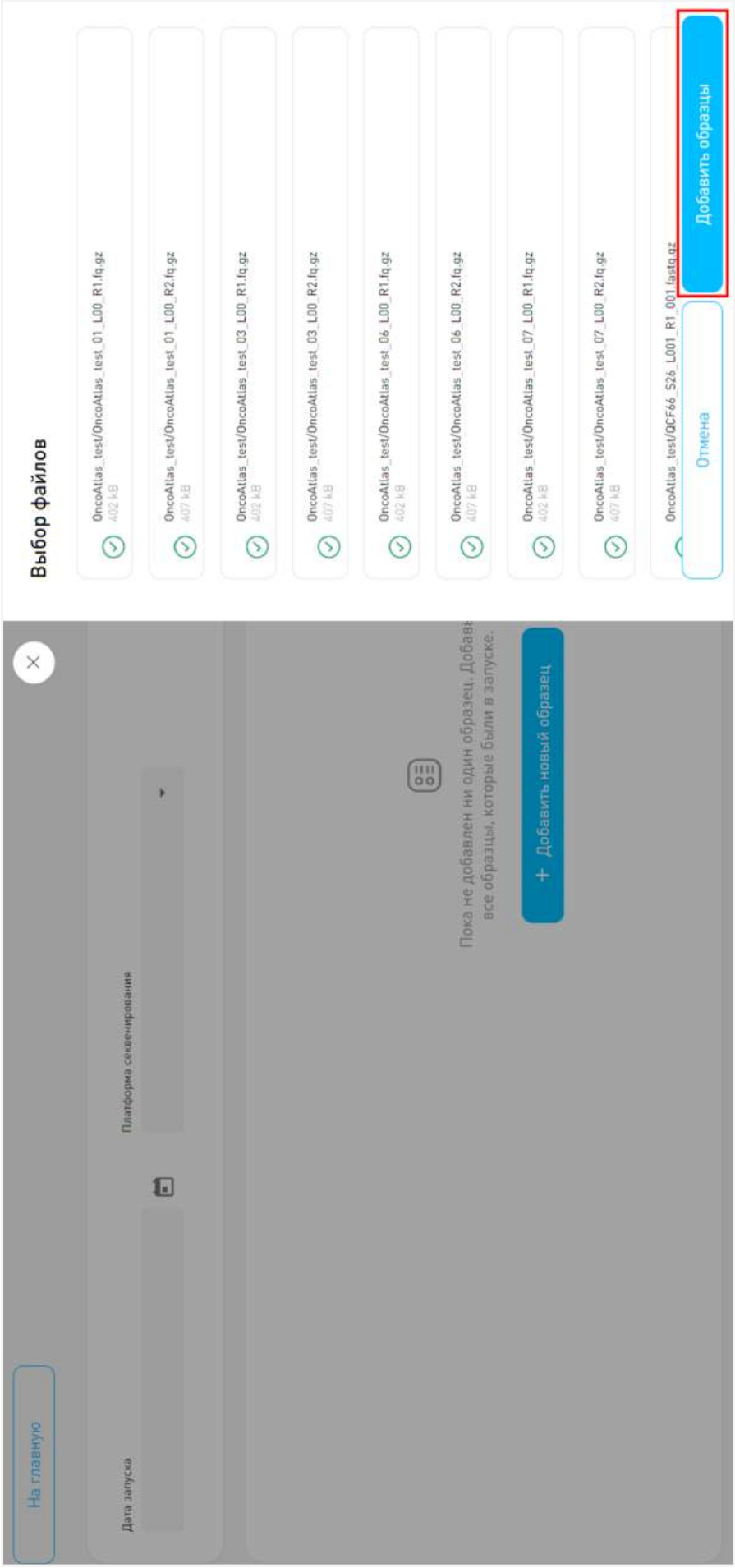


Рисунок 25. Добавление данных секвенирования всех образцов запуска. Красной рамкой выделена кнопка «Добавить образцы»

Если после выбора папки не было обнаружено данных секвенирования, необходимо перейти к шагу (3.1) и добавить каждый образец отдельно (Рис. 26).

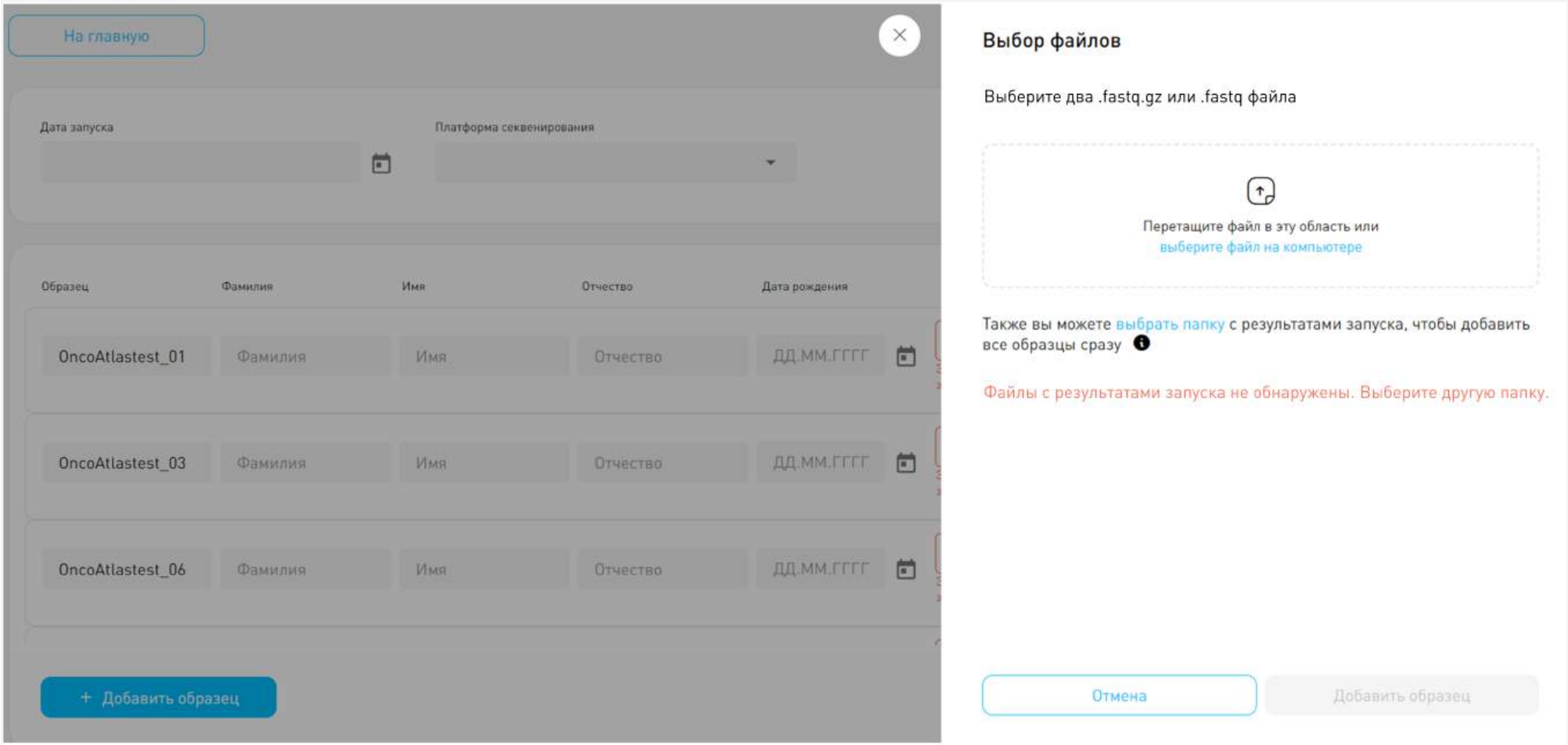


Рисунок 26. Возможное предупреждение о неудачной попытке добавления данных секвенирования всех образцов запуска

Шаг 4. После шага 3 добавить дополнительные образцы, которые секвенировались в рамках одного запуска секвенатора, можно с помощью кнопки «Добавить образец». (Рис. 27). Рекомендуется в рамках одной заявки на анализ данных добавить все образцы, которые были в запуске, и которые секвенировались с помощью набора реагентов от компании ООО «ОНКОАТЛАС». В рамках одной заявки на анализ данных нельзя добавлять данные секвенирования с разных запусков одного прибора или разных приборов.

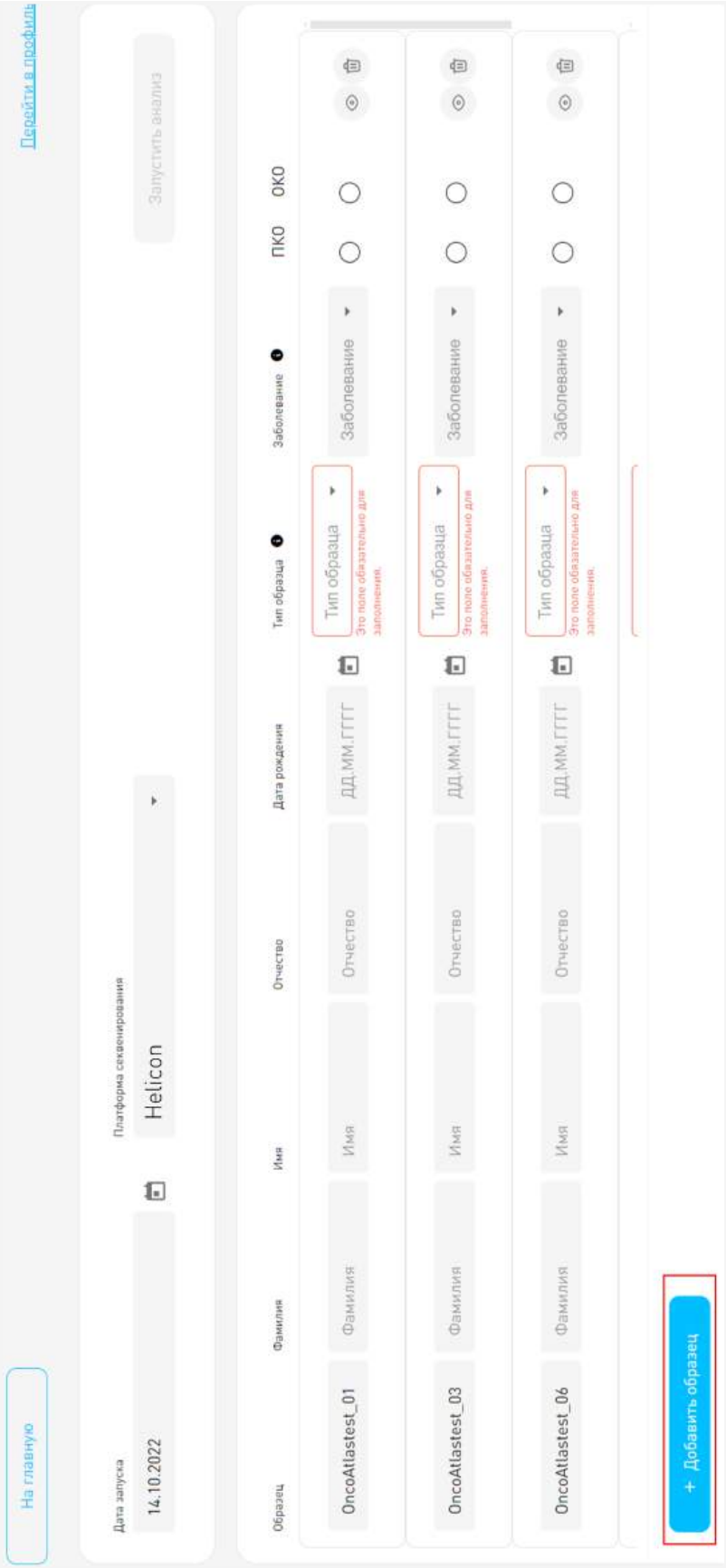


Рисунок 27. Добавление данных секвенирования дополнительных образцов

Шаг 5. Для каждого добавленного образца необходимо указать тип аналита в колонке «Тип образца» (Рис. 28):

- FFPE: ДНК, выделенная из FFPE материала
- WB: ДНК, выделенная из цельной крови (геномная ДНК)

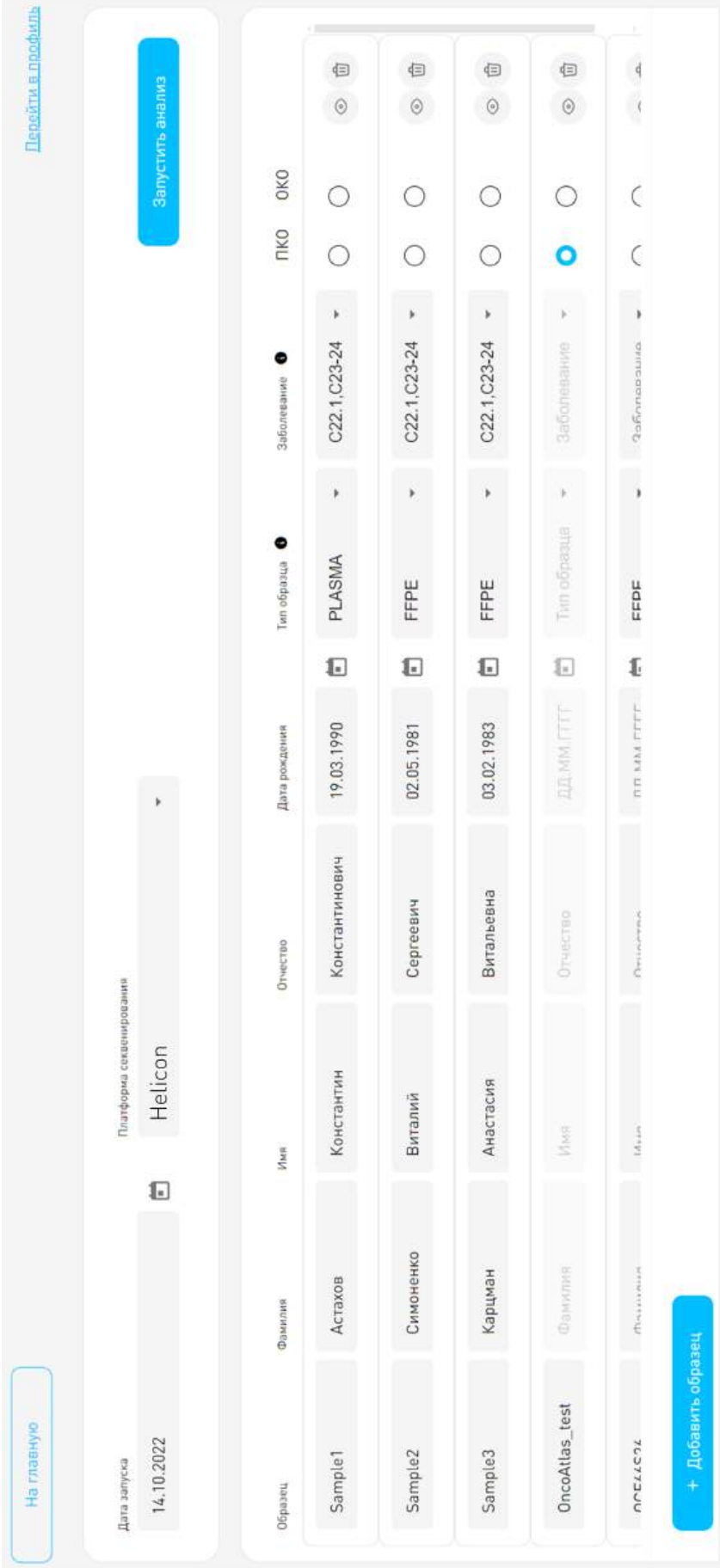


Рисунок 28. Указание данных для каждого добавленного образца

Также для каждого образца рекомендовано (не обязательно) указать заболевание пациента (колонка «Заболевание») – информация о заболевании используется в дальнейшем для интерпретации результатов анализа данных и генерации отчета.

Указание Фамилии, Имени, Отчества и Даты рождения не обязательно, но рекомендовано. Эта информация используется для:

1. генерации отчета
2. автоматического соотнесения данных секвенирования от одного пациента (в случае, если от одного пациента в рамках одного или нескольких запусков было проанализировано больше одного образца)
3. связи с ЛК врача и бесшовной отправкой отчета о секвенировании направляющему врачу

Информацию о заболевании, ФИО, дате рождения пациента также можно указать после завершения анализа по заявке на анализ данных.

В колонке «ПКО» необходимо указать образец, который использовался как контрольный образец (КО). В рамках одной заявки на анализ данных может быть использован только один КО. Наличие КО не является обязательным для завершения заявки на анализ данных (Рис. 29).

Программное обеспечение «Solo AVES» позволяет анализировать данные, полученные с помощью тест-наборов, производителем которых является ООО «ОНКОАТЛАС». ПО «Solo AVES» не предназначено для анализа данных, полученных с помощью наборов реагентов от других производителей. Конкретный набор реагентов, который использовался для секвенирования, определяется в ходе анализа данных.

С помощью иконки «Корзина» можно удалить образец из таблицы, если он был добавлен ошибочно. Удаленный образец можно добавить обратно с помощью шага (3.1). С помощью иконки «глаз» можно исключить образец из анализа, не удаляя его из таблицы – этот образец не будет включен в заявку на анализ данных (Рис. 29).

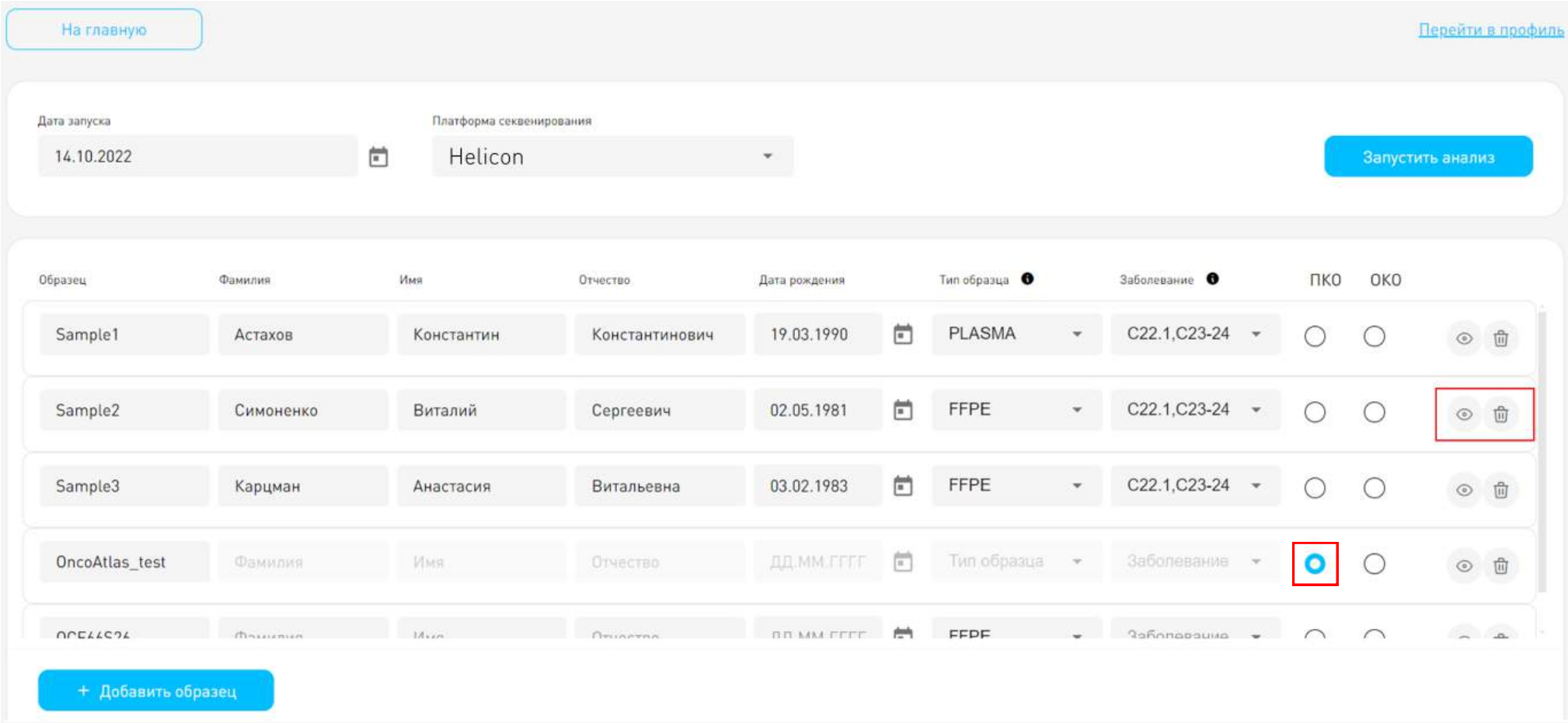


Рисунок 29. Удаление и исключение образца из анализа данных

Шаг 6. После завершения ввода информации запуск анализа осуществляется с помощью кнопки «Запустить анализ» (Рис. 30).

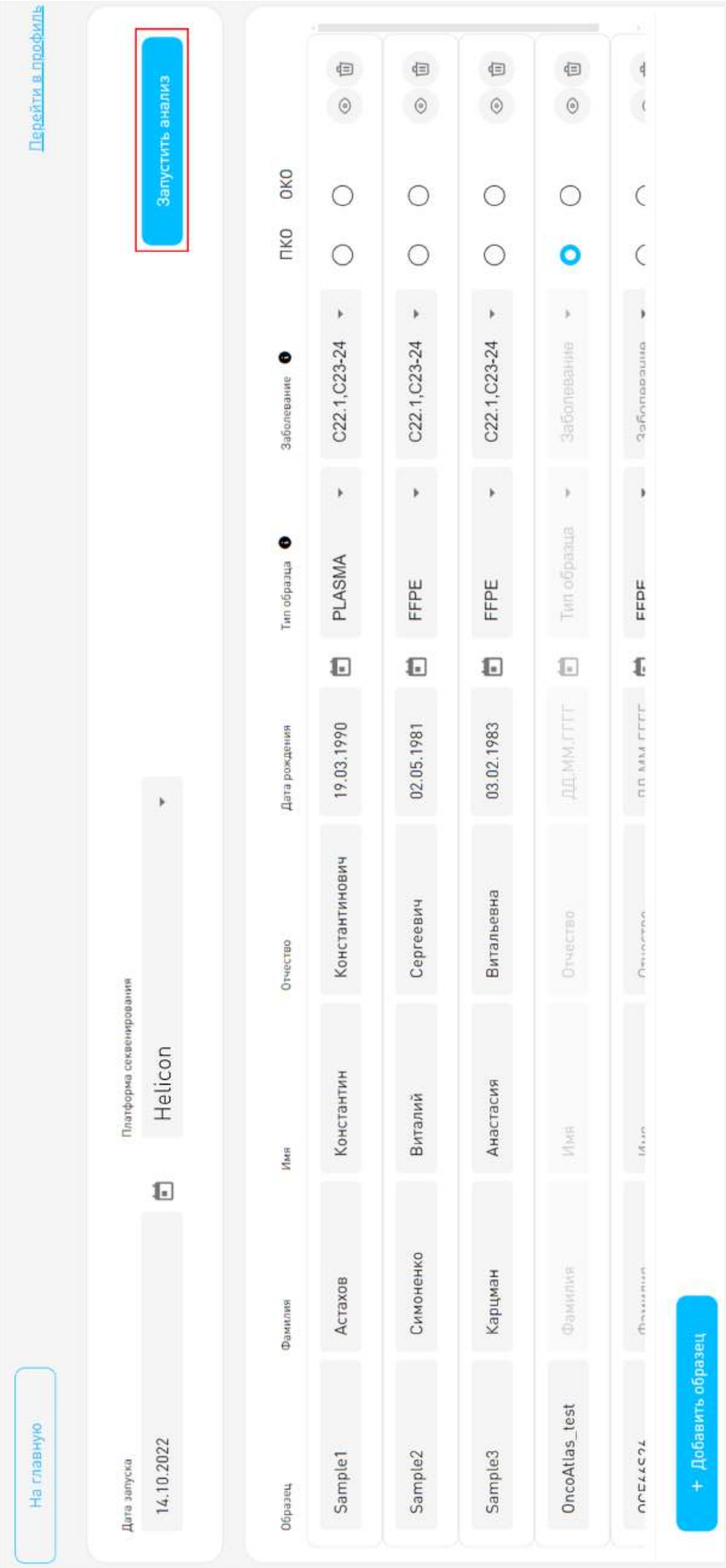


Рисунок 30. Запуск анализа данных

Шаг 7. После создания заявки на анализ данных, ее статус можно посмотреть на главной странице на вкладке «Анализ данных». Статус заявки указан в колонке «Статус». После окончания анализа данных, заявка перейдет в статус «Анализ завершен», который будет отображен в колонке статуса (Рис. 31).

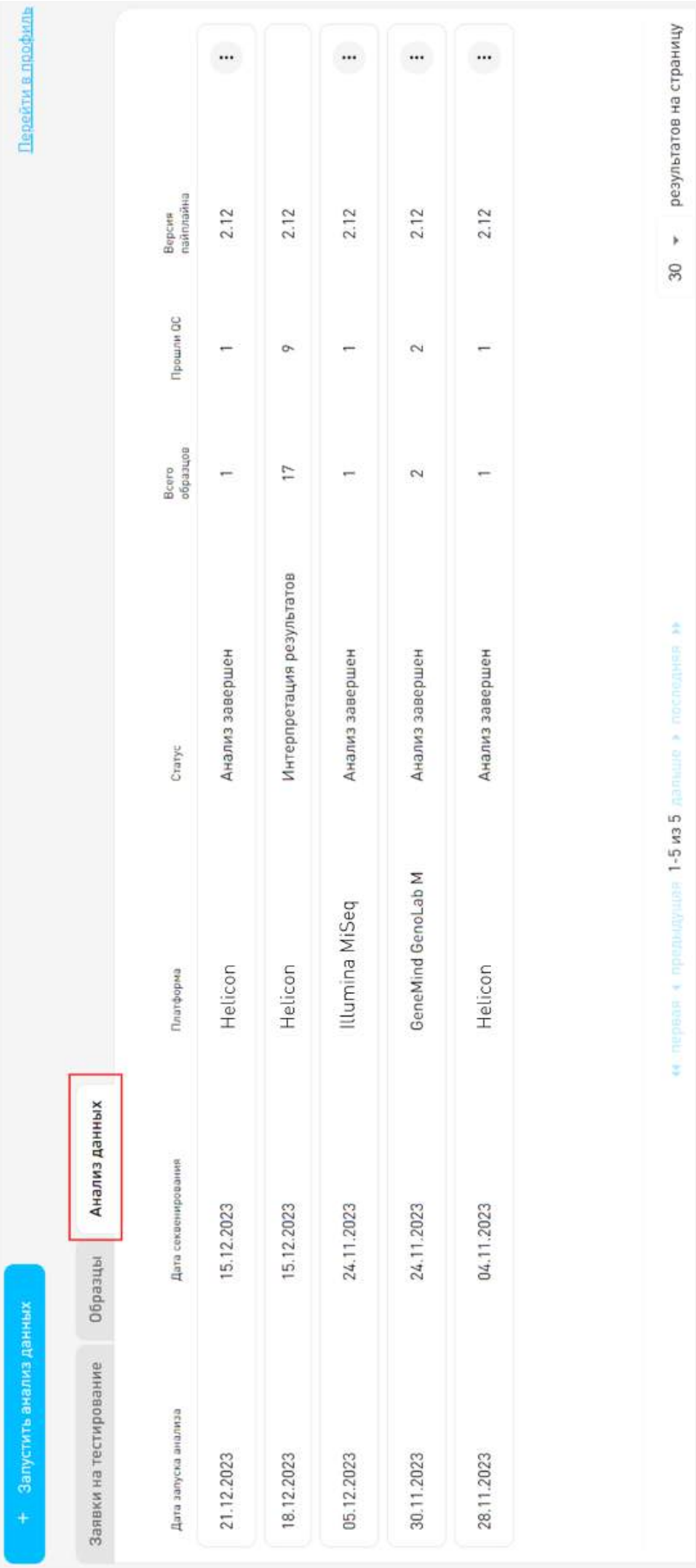


Рисунок 31. Актуализация статуса заявки на анализ данных

7 Просмотр результатов анализа.
После завершения анализа данных результаты можно скачать на вкладке «Анализ данных» в виде таблицы .xlsx, либо в формате .pdf (Рис. 32).

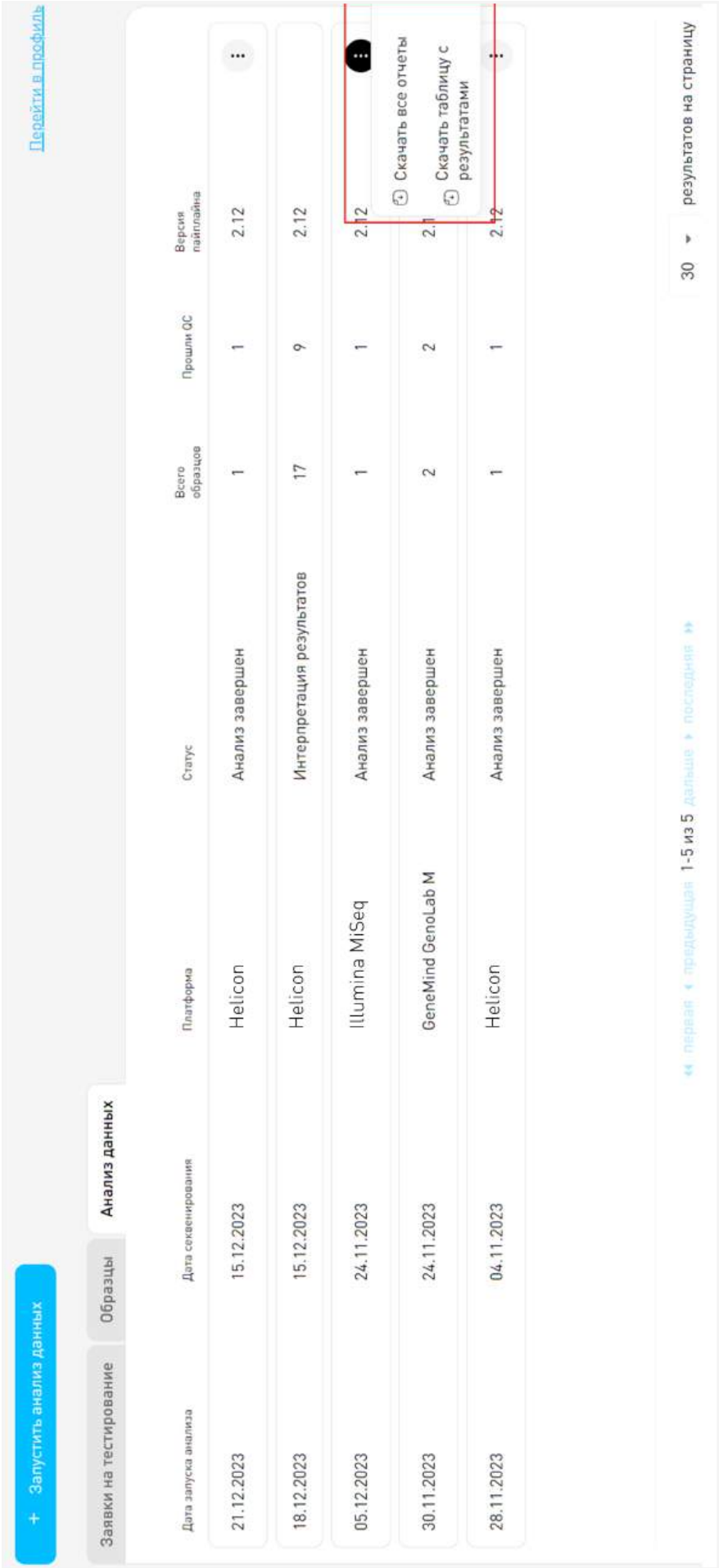


Рисунок 32. Выгрузка данных после анализа

Таблица с результатами скачивается в формате .xlsx. В книге EXCEL присутствуют листы: «QC» и «result». На листе «QC» (Рис. 33) отражены результаты анализа качества данных. В столбце «RESULT» (Рис. 34) указывается итоговый результат:

- PASS – образец прошел контроль качества данных
- FAIL* – образец не прошел контроль качества данных

Также на листе QC отражены контрольные метрики анализа качества данных:

- TotalReads – общее количество чтений
- ReadsPool1 – количество чтений в пуле 1 (для двухпульных панелей)
- ReadsPool2 – количество чтений в пуле 2 (для двухпульных панелей)
- Q30 – количество н.п. с качеством прочтения выше Q30
- OnTargetFraction – количество прочтений, картируемых на целевые области генома
- Uniformity – униформность покрытия (процент целевых регионов с покрытием 0.2 и выше от среднего покрытия целевого региона)
- SensGermlineAC – интегральная расчетная чувствительность детектирования известных клинически-значимых (патогенных) наследственных мутаций-основателя (если панель их покрывает) (в соответствии с [Ivanov et al., 2019])
- SensGermlineHP – интегральная расчетная чувствительность детектирования известных распространенных наследственных генетических вариантов, которые могут быть ассоциированы с чувствительностью к терапии / повышенными рисками онкологических заболеваний (в соответствии с [Ivanov et al., 2019]).
- SensSomaticAC – интегральная расчетная чувствительность детектирования известных клинически значимых соматических мутаций (в соответствии с [Ivanov et al., 2019])
- SensSomaticHP – интегральная расчетная чувствительность детектирования соматических мутаций в известных рекуррентных позициях соматического мутагенеза (хотспоты) (в соответствии с [Ivanov et al., 2019])
- Coverage – среднее покрытие целевого региона
- EvennessScore – униформность покрытия (в соответствии с [Konrad Oexle, 2016])
- MAPD – униформность покрытия (медиана абсолютных парных отклонений покрытия соседних ампликонов)
- CoveragePool1 - среднее покрытие целевого региона пула 1 (для двухпульных панелей)
- EvennessScorePool1 - униформность покрытия пула 1 (в соответствии с [Konrad Oexle, 2016] для двухпульных панелей)

* в случае, если образец не прошел контроль качества данных, а КО образец в запуске прошел контроль качества, рекомендуется повторить исследование на другом биологическом материале этого же пациента.

A1 | SampleID

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
1	SampleID	SampleNa	SpecimenT	Panel	RESULT	TotalRead	ReadsPool	ReadsPool	OnTargetF	Uniformity	SensGerml	SensGerml	SensSoma	SensSoma	Coverage	EvennessS	MAPD	CoverageP	EvennessS	MAPDPool	CoverageP	EvennessS	MAPDPool2	
2	18711-01-	OncoAtlas	WB	AODHRD1	FAIL	51676	22686	28733	0.98	0.57	0.91	0.86	NA	NA	67	0.4151314	1.937	59	0.4249206	1.812	75	0.4092014	2.235	
3	20121-01-	OncoAtlas	WB	AODABCV	PASS	385382	186816	193070	0.97	0.99	1.00	1.00	NA	NA	733	0.8560459	0.302	720	0.8502949	0.307	745	0.8628531	0.263	
4	37551-01-	OncoAtlas	WB	UNKNOWI	FAIL	468	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
5	58951-01-	OncoAtlas	WB	AODHRD1	PASS	987025	477546	514746	0.96	0.98	1.00	1.00	NA	NA	1293	0.8255651	0.233	1244	0.8366513	0.23	1342	0.8158163	0.278	
6	62293-01-	OncoAtlas	FFPE	AODABCV	PASS	374608	168790	194037	0.95	0.98	NA	NA	1.00	1.00	700	0.8607682	0.321	650	0.8611227	0/278	751	0.8663539	0.26	
7	67067-01-	OncoAtlas	WB	AODHRD1	PASS	985831	491511	496838	0.97	0.98	1.00	1.00	NA	NA	1286	0.8173383	0.247	1280	0.8319845	0.221	1293	0.8024197	0.256	

Рисунок 33. Пример таблицы с результатами (лист «QC»)

E26

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
1	SampleID	SampleNa	Gene	Significan	Origin	AD	DP	AF	Conseque	HGVSg	HGVSc	HGVSp	Transcript	dbSNP	COSMIC	GNOMAD	TOPMED	ExAC	spliceAI	CADD	PROVEAN	SIFT	MutPred	MetaLR
2	58951-01-(	OncoAtlas	CDK12	damaging	germline	396	1293	0.318	stop_gain	chr17:376	c.1952C>G	p.Ser651T	ENST00000447079		-	0	-	-	N	D	-	-	-	-
3	58951-01-(	OncoAtlas	CDK12	damaging	germline	484	1084	0.4491	frameshif	chr17:376	c.2309_23	p.Thr770S	ENST00000447079		-	0	-	-	N	-	-	-	-	-
4	58951-01-(	OncoAtlas	CHEK2	damaging	germline	474	652	0.7187	splice_do	chr22:291	c.573+1G>	-	ENST0000	rs1219086	COSV6042	0,0001	6,37E-05	0,000107	D	N	-	-	N	-
5	20121-01-(	OncoAtlas	BRCA1	damaging	germline	276	655	0.4271	stop_gain	chr17:412	c.4752C>G	p.Tyr1584	ENST0000	rs8035743	-	3,99E-06	7,96E-06	-	N	D	-	-	-	-
6	62293-01-(	OncoAtlas	PALB2	damaging	germline	377	700	0.5294	frameshif	chr16:236	c.1958_19	p.Cys653T	ENST00000261584		-	0	-	-	N	-	-	-	-	-

Рисунок 34. Пример таблицы с результатами (лист «result»)

- MAPDPool1 - униформность покрытия пула 1 (медиана абсолютных парных отклонений покрытия соседних ампликонов) (для двухпульных панелей)
- CoveragePool2 - среднее покрытие целевого региона пула 2 (для двухпульных панелей)
- EvennessScorePool2 - униформность покрытия пула 2 (в соответствии с [Konrad Oexle, 2016]) (для двухпульных панелей)
- MAPDPool2 - униформность покрытия пула 2 (медиана абсолютных парных отклонений покрытия соседних ампликонов) (для двухпульных панелей)

Для образцов, которые не проходят контроль качества данных, последующий анализ данных (включая детектирование молекулярных альтераций и интерпретацию результатов) не проводится.

На листе «result» книги EXCEL приводятся результаты детектирования молекулярных альтераций. Приводятся все типы обнаруженных альтераций, включая: SNV, MNV, indel, CNV, MSI (в зависимости от назначения набора реагентов). Указываемые технические характеристики детектирования молекулярных альтераций включают: AD (количество чтений альтернативного аллеля – только для SNV/MNV/indel), DP (общее покрытие сайта варианта – только для SNV/MNV/indel/CNV), VAF (частота альтернативного аллеля после коррекции – только для SNV/MNV/indel), CN (количество копий гена – только для CNV). На листе «result» приводятся только клинически значимые варианты (в соответствии с назначением набора реагентов, а также в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ).

Отчеты по каждому образцу можно скачать с помощью кнопки «скачать все отчеты». В каждом отчете есть разделы: 1. Заключение; 2. Приложение. В разделе «Заключение» есть подразделы «Сводная Информация»; «Результат» (Положительный результат означает обнаружение одной или более молекулярной альтерации, которая является клинически значимой в соответствии с назначением набора реагентов, а также клиническими рекомендациями Министерства здравоохранения РФ); «Статус микросателлитной нестабильности» (либо раздел «Результаты молекулярно-генетического исследования»); «Обнаруженные генетические варианты/амплификации» – указываются только клинически значимые генетические варианты и амплификации в соответствии с назначением набора реагентов, а также клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ (указываются как маркеры чувствительности к терапии, так и патогенные генетические варианты, ассоциированные с развитием наследственного онкологического синдрома; в разделе указываются следующие типы молекулярных альтераций: SNV/MNV/indel/CNV); «Интерпретация результата» (приводятся наименования МНН препаратов в соответствии с обнаруженными предиктивными маркерами); «Качество данных». В разделе «Приложение» указываются все обнаруженные молекулярные альтерации, которые не являются клинически значимыми в соответствии с назначением набора реагентов, а также клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ, что включает: значимые риск-факторы развития онкологических заболеваний; фармакогенетические маркеры; драйверные соматические варианты.

Настройки генерации отчета доступны в профиле пользователя (Рис. 35):

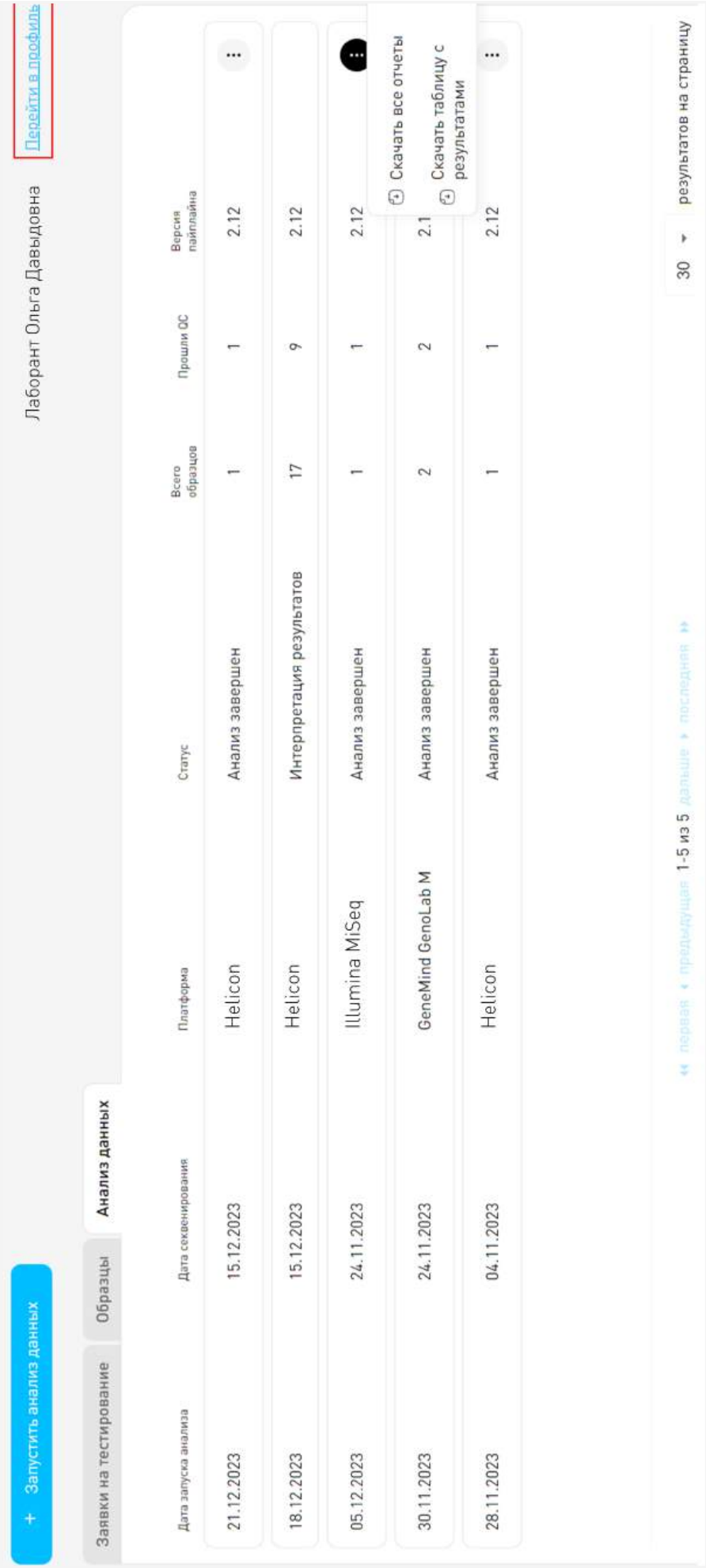


Рисунок 35. Переход в профиль пользователя для настройки генерации отчета

8 Просмотр результатов анализа отдельного образца. Список проанализированных образцов доступен на вкладке «Образцы» главной страницы (Рис. 36):

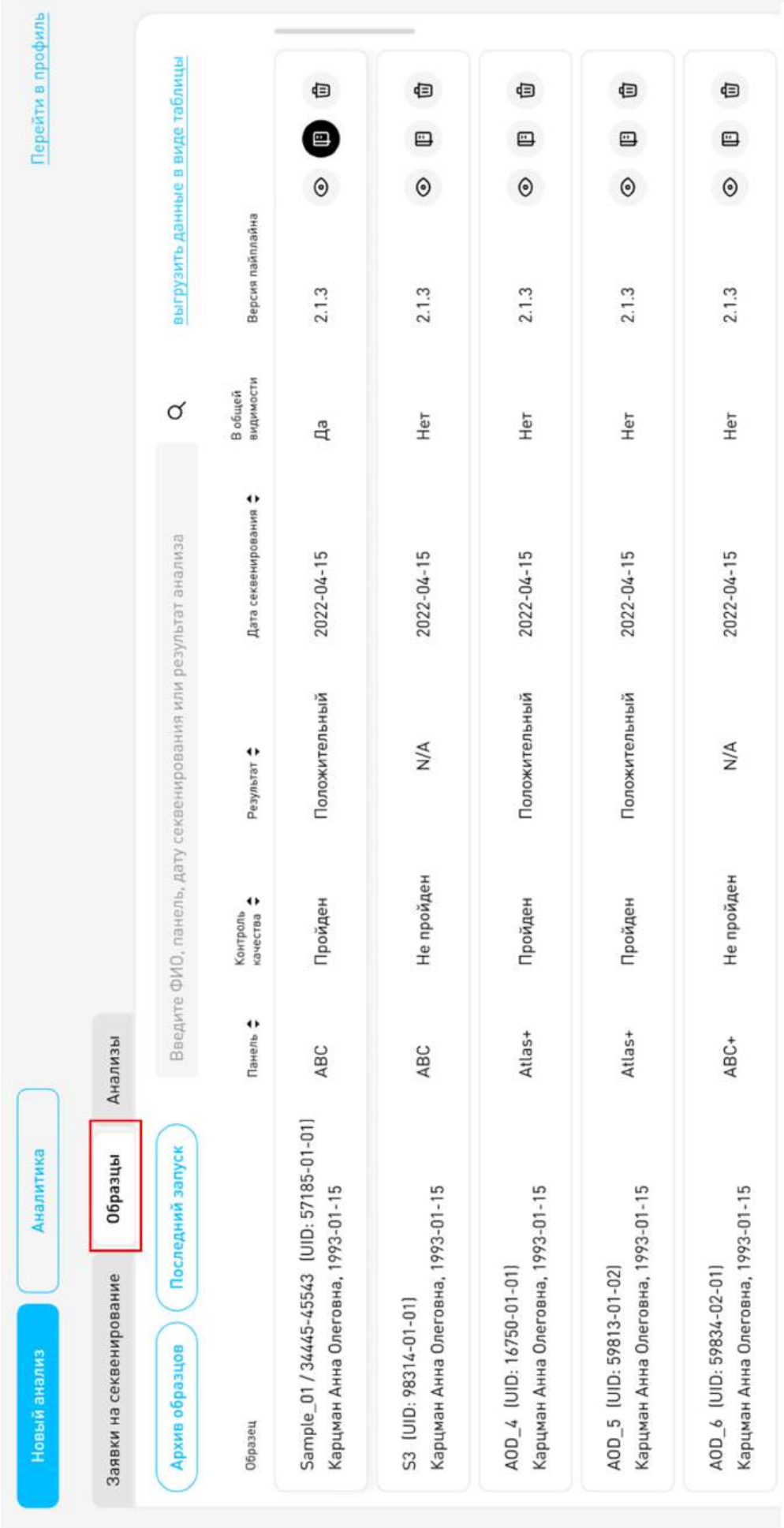


Рисунок 36. Вид списка проанализированных образцов

Скачать отчет в формате .pdf по отдельному образцу можно с помощью иконки «книга». Для перемещения образца в архив необходимо нажать иконку «Корзина» (при переходе в архив образцов можно либо восстановить образец из архива, либо удалить его окончательно). Для детального просмотра и редактирования результатов анализа по образцу необходимо нажать иконку «Глаз» (Рис. 37).

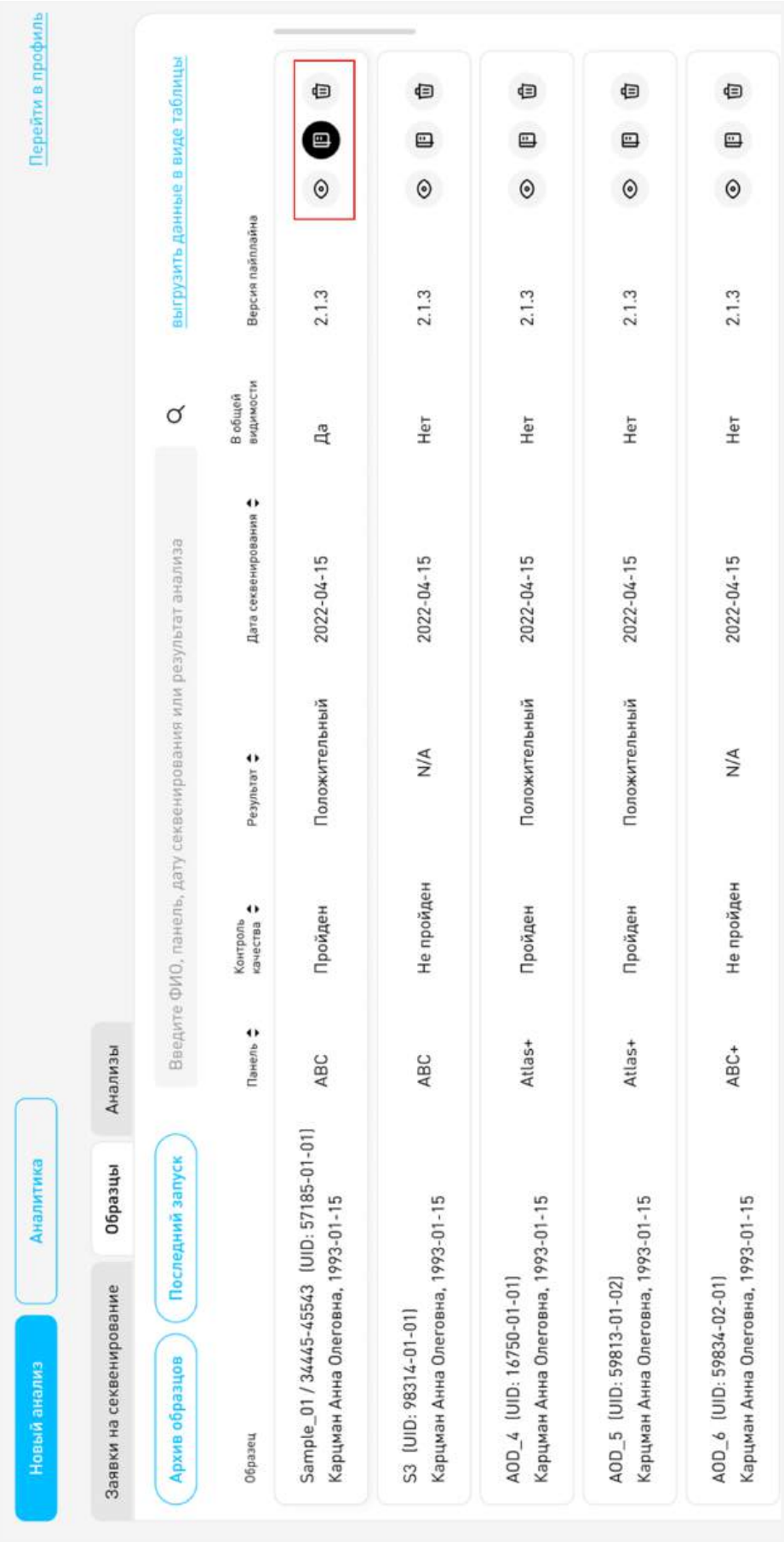


Рисунок 37. Возможные опции работы с результатом анализа отдельного образца: «книга» - скачать отчет в формате .pdf, «корзина» - перемещение образца в архив, «глаз» - детальный просмотр и редактирование результата анализа

Детальный просмотр результатов анализа образца позволяет редактировать результаты детектирования генетических вариантов, интерпретацию результатов, скачать результаты в формате .bam, просмотреть результаты в Genome Browser, а также редактировать информацию по образцу/пациенту с последующим обновлением генерируемого отчета (Рис. 38).

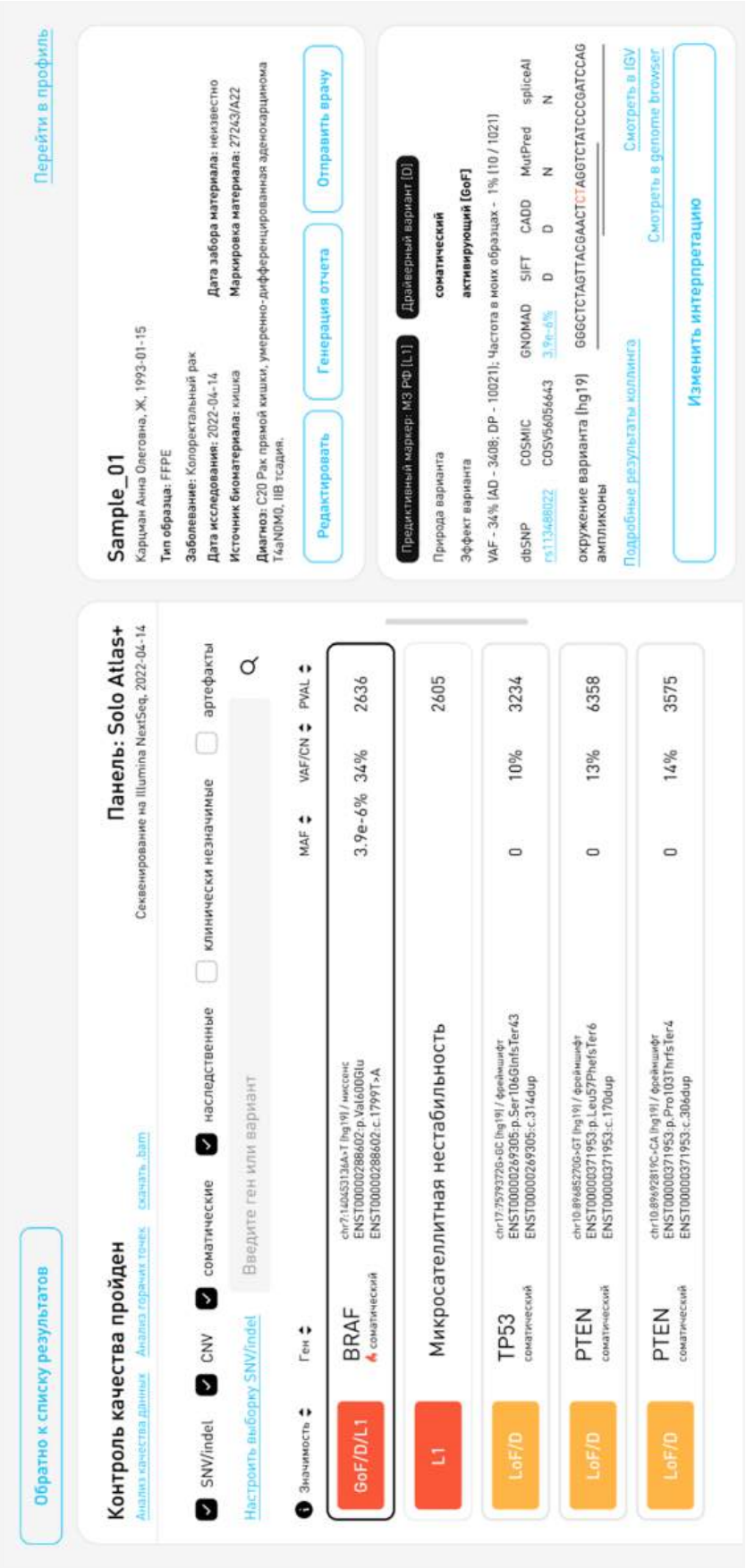


Рисунок 38. Пример детального просмотра результатов анализа образца

Редактирование информации по образцу/пациенту доступно в правой верхней панели с помощью кнопки «Редактировать». В открывшемся окне необходимо обновить информацию и нажать кнопку «Сохранить». Введенные данные будут отображены в отчете после его новой генерации (Рис. 39-40).

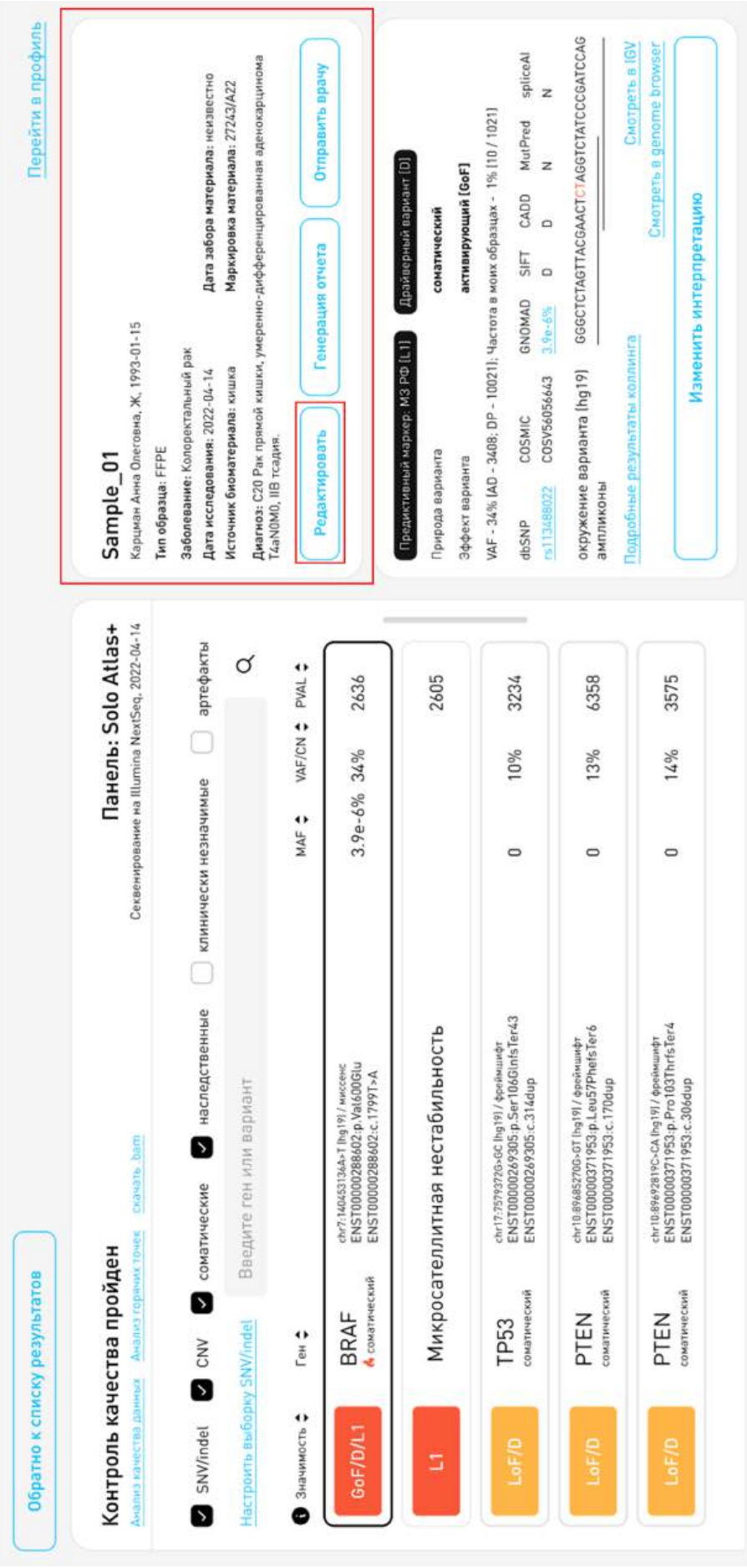


Рисунок 39. Переход к редактированию результатов анализа образца (выделен красной рамкой)

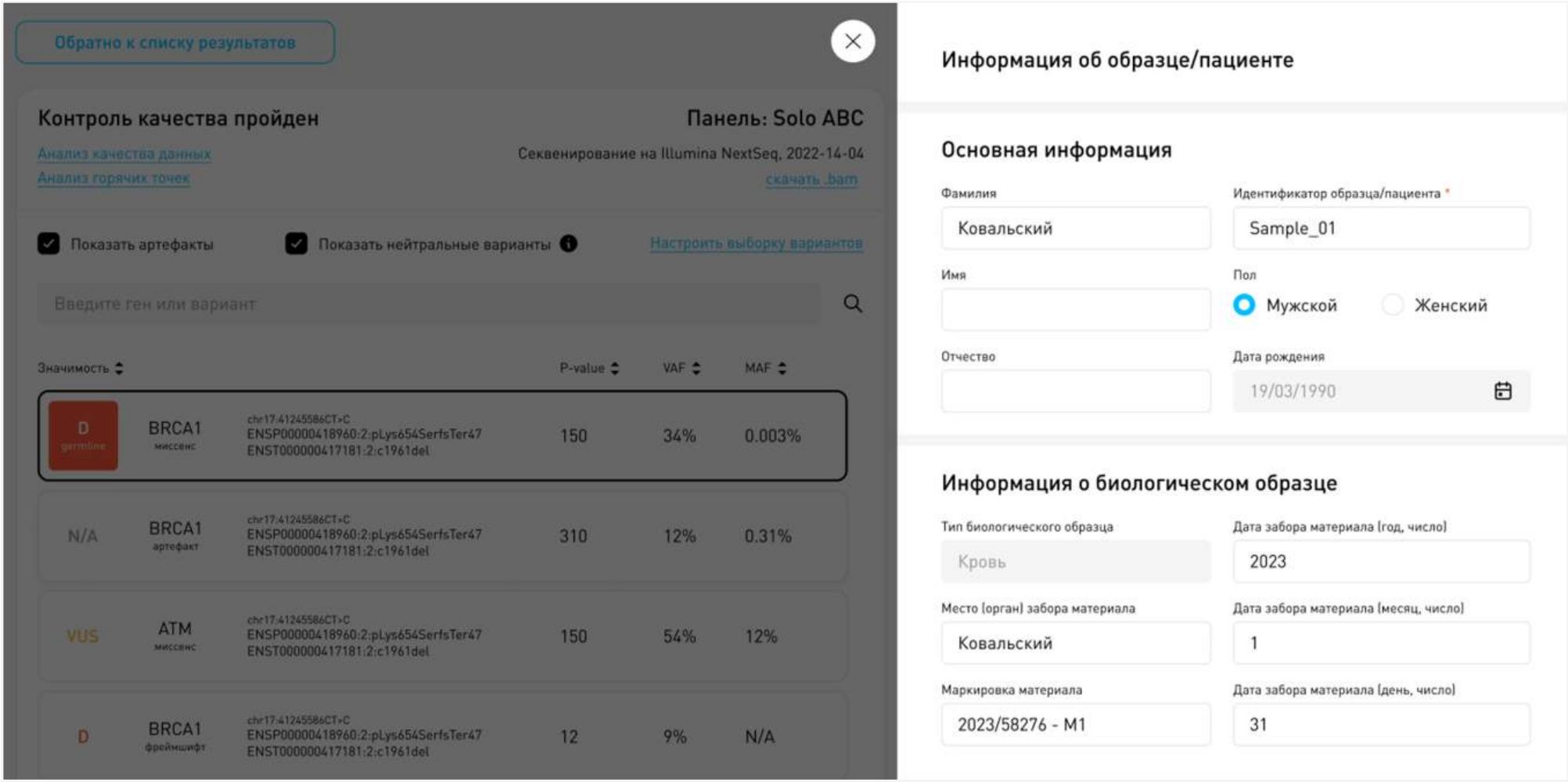


Рисунок 40. Окно изменения информации об образце или пациенте

В основной таблице приведены все обнаруженные молекулярные альтерации, включая SNV/MNV/indel/CNV/MSI (типы детектируемых молекулярных альтераций могут зависеть от назначения набора реагентов). В колонке «значимость» приведена клиническая и биологическая значимость каждой молекулярной альтерации:

- [L1]: молекулярная альтерация является предиктивным маркером в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ
- [P]: генетический вариант ассоциирован с наследственным опухолевым синдромом
- [L2]: молекулярная альтерация является предиктивным маркером, который не входит в клинические рекомендации Министерства Здравоохранения РФ, но входит в международные рекомендации NCCN/ESMO/ASCO или имеет значимость I-III уровня в соответствии с системой уровней доказательности ESCAT
- [PgX]: генетический вариант ассоциирован с токсичностью противоопухолевой терапии или незначимым снижением её эффективности (фармакогенетический маркер)
- [R]: генетический вариант не ассоциирован с развитием наследственного опухолевого синдрома, но приводит к статистически-значимому повышению риска онкологических заболеваний (риск-фактор)
- [D]: молекулярная альтерация потенциально является (или может являться) драйверным событием в канцерогенезе (относится к повреждающим вариантам в генах опухолевой супрессии или активирующим вариантам в онкогенах)
- [GoF]: молекулярная альтерация приводит к значительному повышению активности продукта гена (активирующий вариант / gain of function)
- [LoF]: молекулярная альтерация приводит к значительному снижению активности продукта гена (повреждающий вариант / loss of function)
- [N]: молекулярная альтерация не приводит к изменению активности продукта гена

В колонке «Ген» также указывается потенциальная природа молекулярной альтерации (наследственный/соматический). Определение природы молекулярной альтерации осуществляется в случае, если аналитом является ДНК, выделенная из биологического материала, в котором могут обнаруживаться соматические варианты (FFPE). Анализ проводится с помощью методов машинного обучения на основании нескольких параметров, среди которых:

- Наличие варианта в базах данных наследственных генетических вариантов и соматических мутаций, а также популяционная частота генетического варианта в случае, если ранее он уже был обнаружен в рамках крупных геномных проектов
- Частота обнаружения варианта в образцах FFPE и цельной крови по аккаунту
- Частота альтернативного аллеля конкретного варианта в чтениях, покрывающих сайт варианта
- Частота альтернативного аллеля близлежащих полиморфизмов
- Вероятность полной делеции гена (LoH) в части опухолевых клеток

- Вероятность происхождения конкретной нуклеотидной замены в соматическом или наследственном статусе
- Априорная вероятность обнаружения соматического или наследственного повреждающего (или активирующего) варианта в данной позиции
- Частота альтернативного аллеля прочих достоверно соматических и достоверно наследственных генетических вариантов в опухолевом образце

В случае, если по результатам биоинформатического анализа вариант с вероятностью 95% и более является наследственным, то в результатах анализа будет отмечено, что вариант является наследственным. В случае, если по результатам биоинформатического анализа вариант с вероятностью 95% и более является соматическим, то в результатах анализа будет отмечено, что вариант является соматическим. В остальных случаях в результатах анализа будет отмечено, что наследственную/соматическую природу варианта достоверно определить нельзя.

В случае, если для пациента ранее уже были получены данные секвенирования крови, автоматически проводится сопоставление обнаруженных ранее в крови генетических вариантов, и природа варианта определяется достоверно на основании сравнения с нормальной тканью. Достоверность определения природы варианта отображается в генерируемом отчете формата .pdf.

Наличие иконки «Огонь» (Рис. 41) рядом с природой варианта в колонке «Ген» означает, что вариант является мутацией основателя (для наследственных вариантов) или располагается в позиции рекуррентного соматического мутагенеза / хотспот вариант (для соматических вариантов).

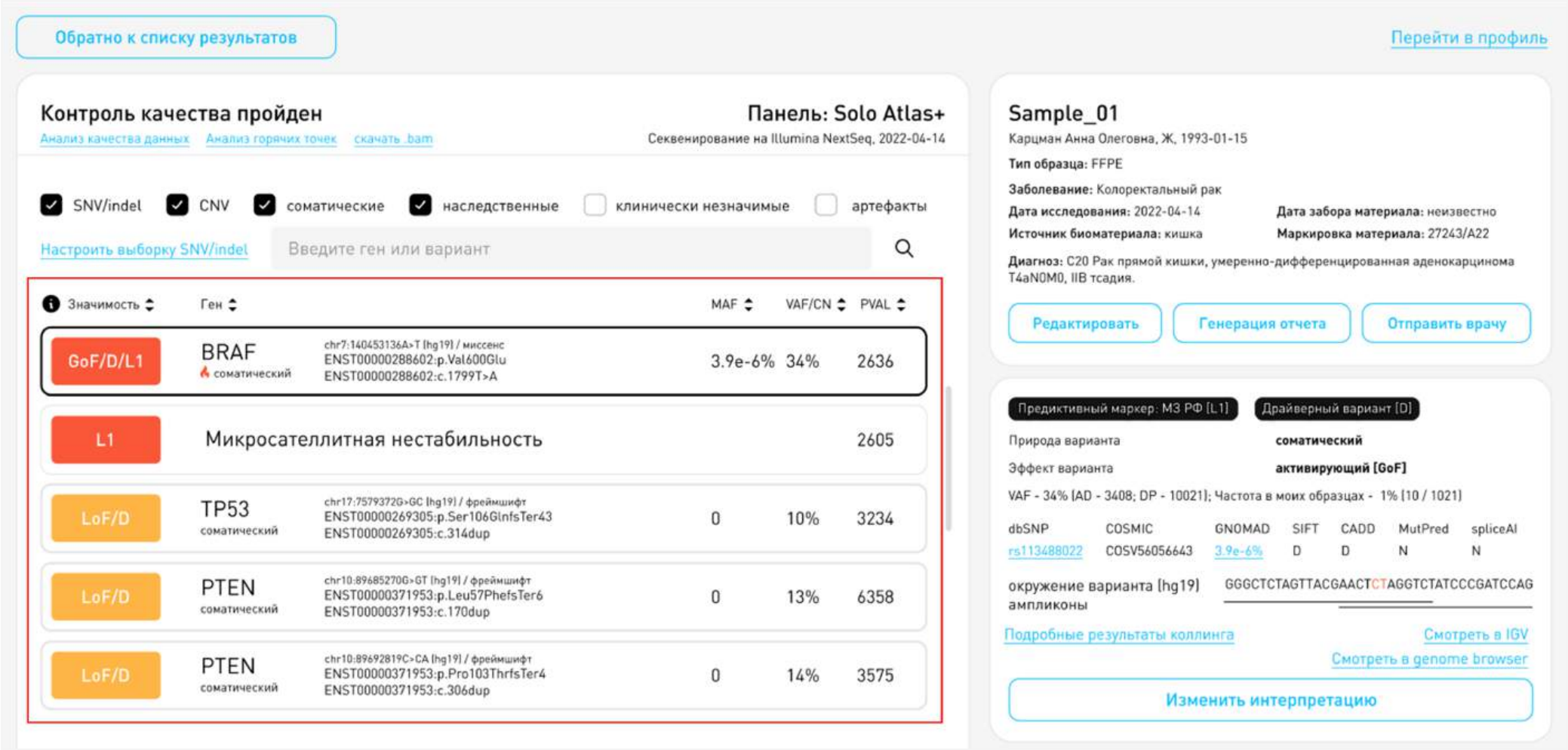


Рисунок 41. Пример обозначения символом «огонь» варианта-мутации основателя (для наследственных вариантов) или варианта, расположенного в позиции рекуррентного соматического мутагенеза / хотспот вариант (для соматических вариантов)

Панель фильтрации молекулярных альтераций позволяет отобрать варианты, которые будут отображены в основной таблице (Рис. 42).

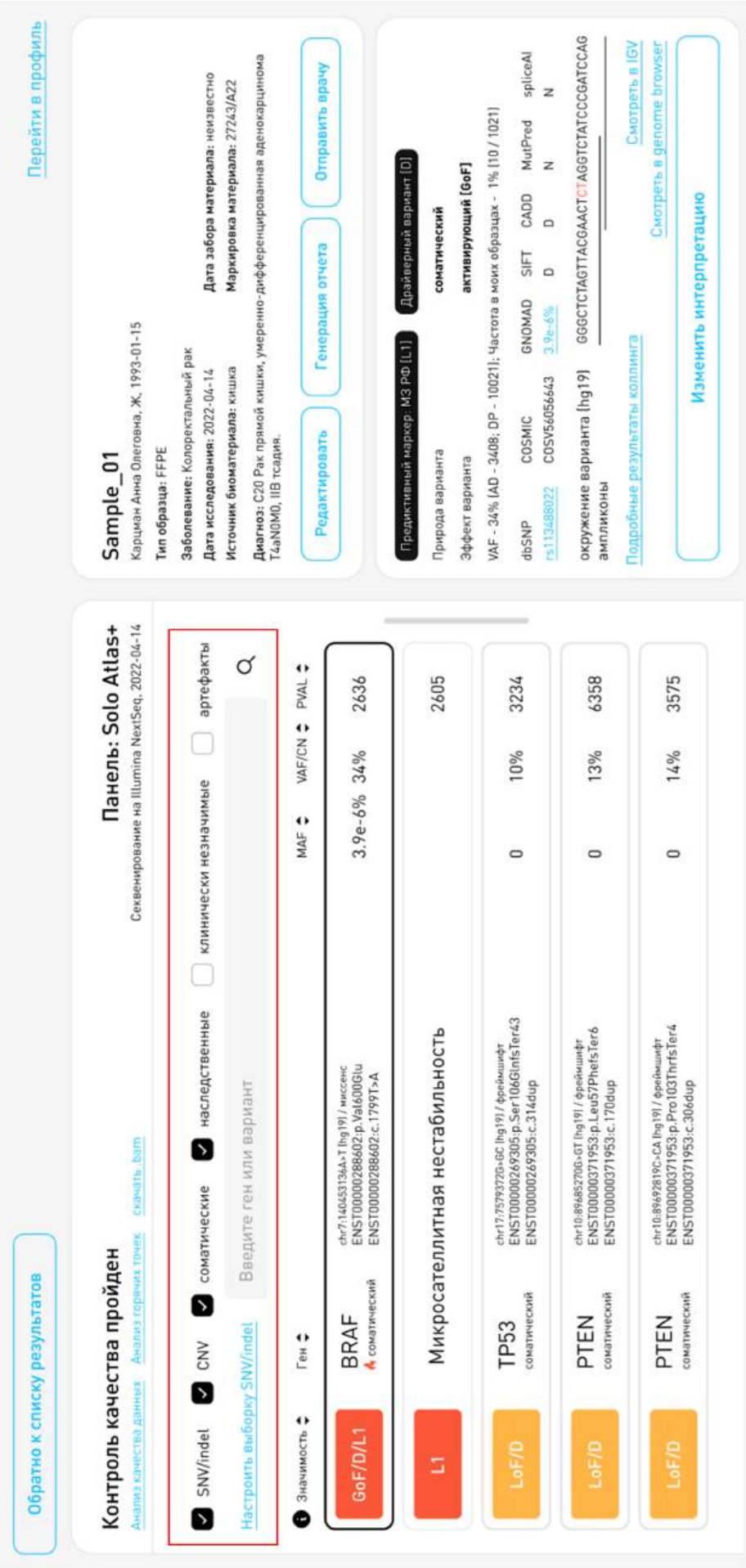


Рисунок 42. Панель фильтрации молекулярных альтераций (обозначена красной рамкой)

Нажатие на строку конкретной молекулярной альтерации в основной таблице позволяет просмотреть детальную информацию по качеству детектирования этого варианта, а также его аннотацию в правой нижней панели (Рис. 43).

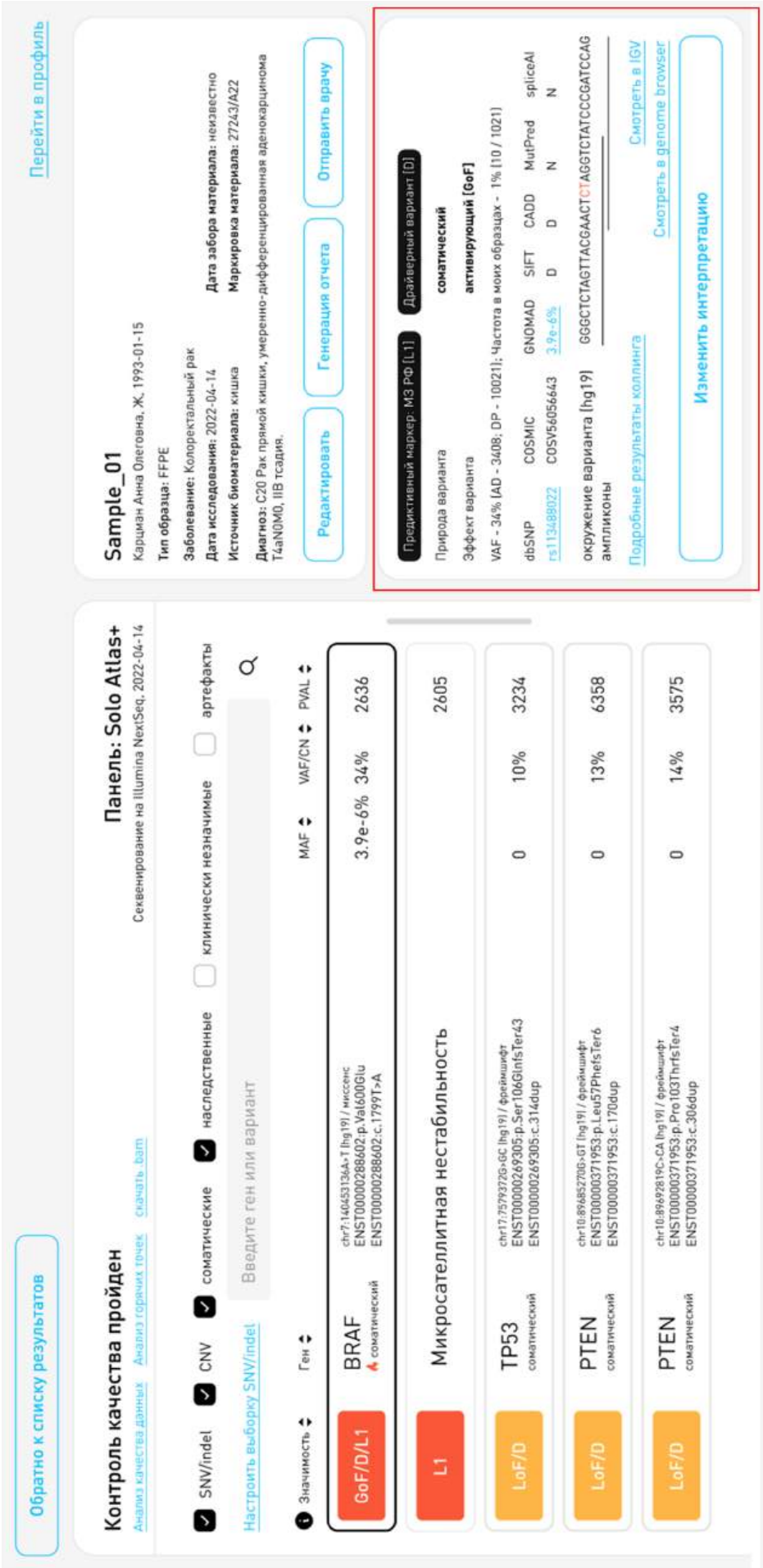


Рисунок 43. Пример детальной информации о качестве детектирования варианта и его аннотация (выделены красной рамкой)

Нажатие кнопки «Изменить интерпретацию» в правой нижней панели позволяет изменить природу варианта (наследственный / соматический / артефакт) и биологический эффект вариант (LoF/GoF/N). После выбора новых значений необходимо нажать кнопку «сохранить». В основной таблице с помощью панели фильтрации молекулярных альтераций можно отобразить кандидаты в генетические варианты, которые по результатам биоинформатического анализа были признаны артефактами. Изменение природы варианта с «артефакт» на «наследственный»/«соматический» и обратно позволяет редактировать результаты детектирования генетических вариантов. После внесения изменений необходимо нажать кнопку «Генерация отчета» в правой верхней панели для того, чтобы сформировать новый отчет в соответствии с введенными изменениями в результаты детектирования генетических вариантов и/или их интерпретации (Рис. 44).

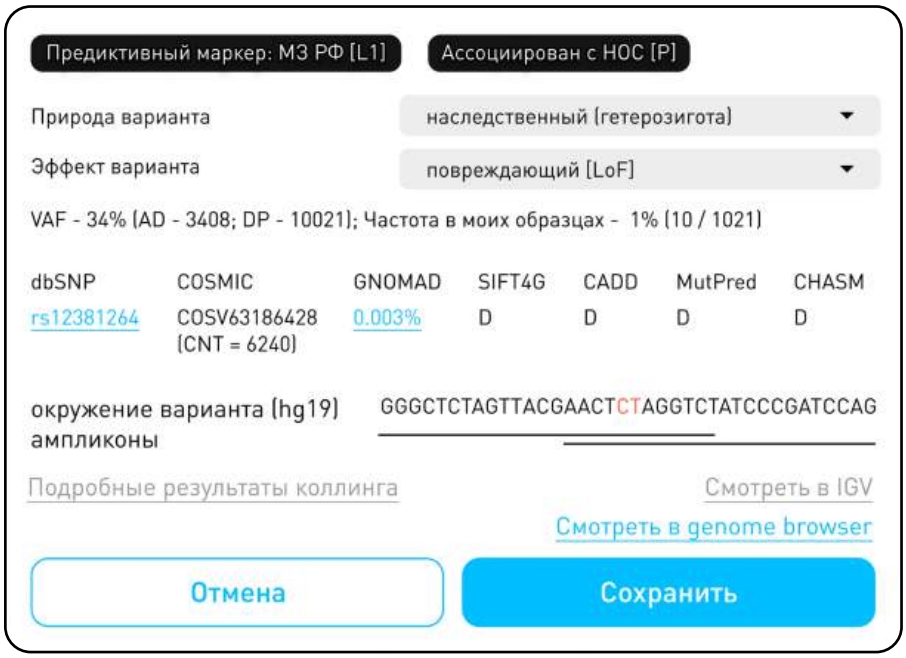


Рисунок 44. Пример окна с детальной информацией о качестве детектирования варианта и его аннотацией в режиме редактирования

Детальный просмотр результатов анализа качества данных доступен в левой верхней панели (Рис. 45).

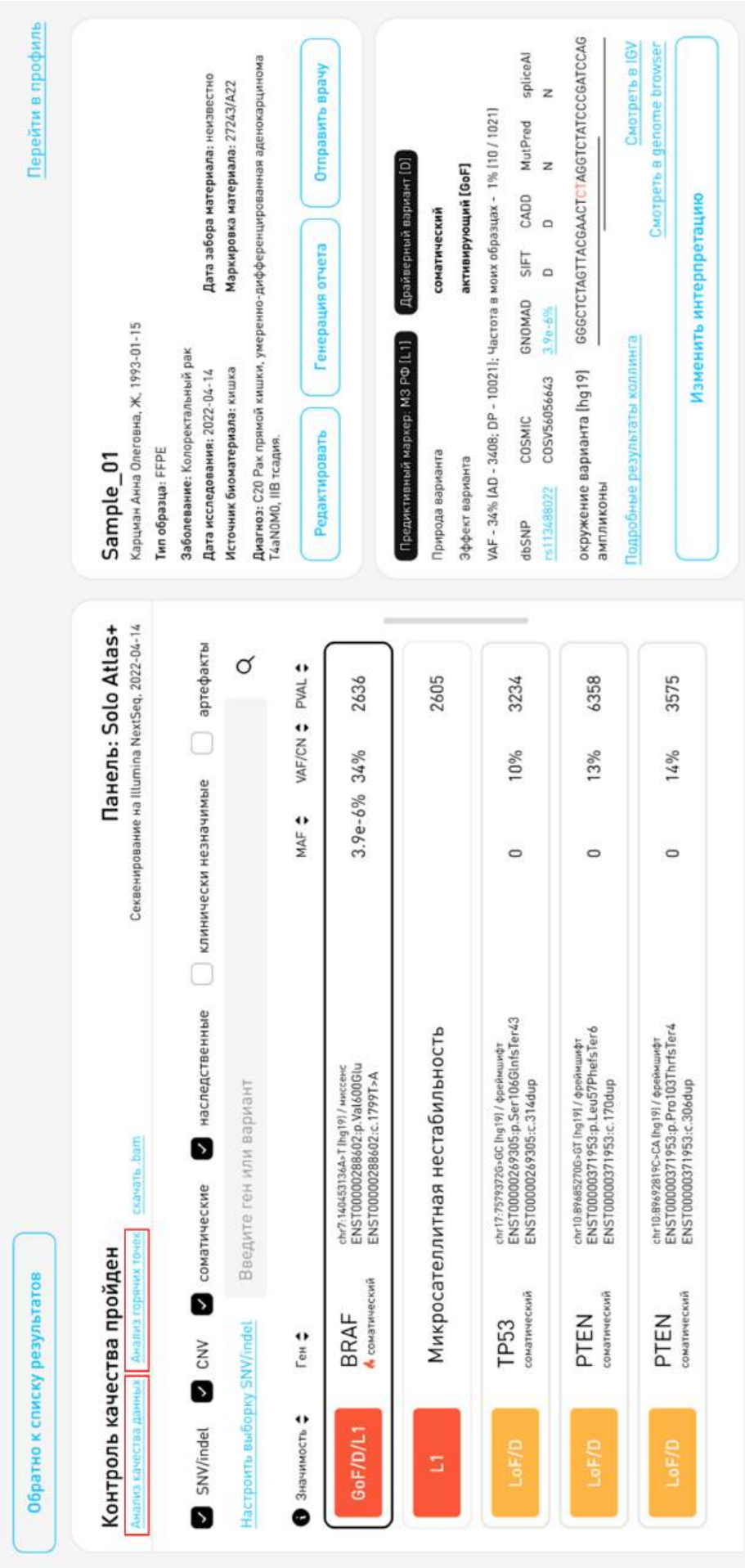


Рисунок 45. Пример детального просмотра результатов анализа качества данных (выделен красной рамкой)

9. После завершения работы ПО «Solo AVES» результаты анализа сохраняются в виде отчетов формата .pdf по каждому образцу. Каждый отчет по отдельному образцу будет иметь название вида SampleName.pdf, где SampleName - имя образца, указанное при его добавлении в окне «запустить анализ данных». Открыть отчет по образцу можно с помощью любой программы для просмотра .pdf файлов (например, Adobe Acrobat Reader версии 22 и выше).

10. В отчете по каждому образцу указывается информация об обнаруженных генетических вариантах в регионах генов BRCA1, BRCA2, PIK3CA, PALB2, ATM, CHEK2, AKT1, PTEN, ESR1, ERBB2, BRAF, TP53, STK11, о наличии амплификации гена ERBB2 (HER2), о статусе микросателлитной нестабильности, а также информация о контрольных метриках качества набора прочтений, включая такие показатели как: интегральная расчетная чувствительность детектирования рекуррентных генетических вариантов, равномерность покрытия пула (униформность), средняя глубина покрытия пула (Рис. 46).

11. Интерпретация результатов. Результаты считаются валидными, если следующие метрики качества данных секвенирования для каждого исследуемого образца соответствуют заявленным (Рис. 47). Контрольные метрики качества рассчитываются с помощью ПО «Solo AVES» и приводятся в .pdf отчете в разделе «качество данных» (Рис. 46).

Результаты молекулярно-генетического исследования методом NGS

oncoatlas

Направляющий врач	Образец	Пациент
Иванов И.И.	Тип образца: FFPE материал Источник биоматериала: операционный материал Дата забора материала: 26.10.2023 Идентификатор материала: 2/012	ФИО: Кузнецова А.А. Дата рождения: 1987 год Заболевание: Рак молочной железы (C50)

Результат: Положительный

Статус микросателлитной нестабильности: Отрицательный (MSI-)

Обнаруженные генетические варианты/амплификации:

BRCA1	chr17:41209079T>TG (hg19) ENST00000471181:c.5329dup ENST00000471181:p.Gln1777ProfsTer74 rs80357906	Наследственный/ соматический статус не может быть определен Обнаруживается с частотой альтернативного аллеля 20%	повреждающий
ERBB2	Амплификация (35x)	Соматический	повреждающий

Описание исследования: Исследование выполнено с помощью набора реагентов "Таргет РМЖ" (производитель ООО "ОнкоАтлас", г.Москва)

Качество данных: Биоинформатический контроль качества пройден. Глубина покрытия: 1195x (пул 1 – 1162x, пул 2 – 1198x); униформность (MAPD): 0.2 (пул 1 – 0.224; пул 2 – 0.203); расчетная чувствительность: 100%

Отчет предназначен для использования специалистами в области клинической онкологии и/или генетики

Рисунок 46. Пример отчета, сгенерированного по результатам анализа данных в ПО «Solo AVES» (Красным выделены основные элементы отчета: 1) В разделе «статус микросателлитной нестабильности» приводится статус микросателлитной нестабильности, 2) В разделе «Обнаруженные генетические варианты/амплификации» приводится список обнаруженных генетических вариантов, а также амплификаций), 3) В разделе «Качество данных» приводятся контрольные метрики качества данных высокопроизводительного секвенирования.

	контрольные метрики качества данных секвенирования, рассчитываемые при анализе образцов опухолевой ДНК, выделенных из операционного или биопсийного материала пациента, фиксированного в формалине заключенного в парафин (FFPE)			контрольные метрики качества данных секвенирования, рассчитываемые при анализе образцов геномной ДНК, выделенной из образцов цельной крови пациента		
	Интегральная рассчетная чувствительность детектирования рекуррентных генетических вариантов	Равномерность покрытия в пуле (максимальное значение)	Средняя глубина покрытия пула (минимальное значение)	Интегральная рассчетная чувствительность детектирования рекуррентных генетических вариантов	Равномерность покрытия в пуле (максимальное значение)	Средняя глубина покрытия пула (минимальное значение)
BRCA1	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
BRCA2	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
PIK3CA	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
PALB2	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
ATM	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
CHEK2	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
AKT1	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
PTEN	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
ESR1	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
ERBB2	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
BRAF	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
TP53	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
STK11	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x
Регионы STR	не менее 0.96	не более 1	не менее 450x	не менее 0.96	не более 1	не менее 100x

Рисунок 47. Контрольные метрики качества данных секвенирования

Транспортировка и хранение

Наборы вариантов исполнения «Таргет РМЖ С-А» и «Таргет РМЖ С-Б» должны транспортироваться в разукомплектованном виде до 6 часов следующим образом: «Комплект для целевого обогащения ДНК», «Комплект для приготовления библиотек ДНК», «Комплект для подготовки образца к секвенированию» транспортируются при температуре от минус 22°С до минус 5°С, «Комплект для секвенирования» - при температуре от плюс 2°С до плюс 8°С. При более длительной транспортировке набор должен транспортироваться в разукомплектованном виде следующим образом: «Комплект для целевого обогащения ДНК», «Комплект для приготовления библиотек ДНК», «Комплект для подготовки образца к секвенированию» транспортируются при температуре от минус 25°С до минус 15°С, «Комплект для секвенирования» - при температуре от плюс 2°С до плюс 8°С.

Наборы вариантов исполнения «Таргет РМЖ А» и «Таргет РМЖ Б» должны транспортироваться при температуре от минус 22°С до минус 5°С в течение 6 часов. Более длительное транспортирование производится всеми видами крытого транспорта при температуре от минус 25°С до минус 15°С.

Транспортировка наборов производится всеми видами крытого транспорта в соответствующих температурных условиях не более 96 часов.

После получения «Комплект для целевого обогащения ДНК» должен храниться в зоне «пре-ПЦР» при температуре от минус 25°С до минус 15°С в течение всего срока годности, а «Комплект для приготовления библиотек ДНК» (при температуре от минус 25°С до минус 15°С), «Комплект для подготовки образца к секвенированию» (при температуре от минус 25°С до минус 15°С), «Комплект для секвенирования» (при температуре от плюс 2°С до плюс 8°С) должны храниться в зоне «пост-ПЦР» в течение всего срока годности. Магнитные частицы из комплекта для приготовления библиотек ДНК должны храниться при температуре от минус 25°С до минус 15°С до первого вскрытия, после него - при температуре от плюс 2°С до плюс 8°С.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

«Таргет РМЖ С-А», «Таргет РМЖ А»			
№ образца	Название образца	Индекс Си	Индекс Ли
1		Си-1	Ли-1
2		Си-1	Ли-2
3		Си-1	Ли-3
4		Си-1	Ли-4
5		Си-1	Ли-5
6		Си-1	Ли-6
7		Си-1	Ли-7
8		Си-1	Ли-8
9		Си-2	Ли-1
10		Си-2	Ли-2
11		Си-2	Ли-3
12		Си-2	Ли-4
13		Си-2	Ли-5
14		Си-2	Ли-6
15		Си-2	Ли-7
16		Си-2	Ли-8
17		Си-3	Ли-1
18		Си-3	Ли-2
19		Си-3	Ли-3
20		Си-3	Ли-4
21		Си-3	Ли-5
22		Си-3	Ли-6
23		Си-3	Ли-7
24		Си-3	Ли-8
25		Си-4	Ли-1
26		Си-4	Ли-2
27		Си-4	Ли-3
28		Си-4	Ли-4
29		Си-4	Ли-5
30		Си-4	Ли-6
31		Си-4	Ли-7
32		Си-4	Ли-8
33		Си-5	Ли-1
34		Си-5	Ли-2
35		Си-5	Ли-3
36		Си-5	Ли-4
37		Си-5	Ли-5
38		Си-5	Ли-6
39		Си-5	Ли-7
40		Си-5	Ли-8
41		Си-6	Ли-1
42		Си-6	Ли-2
43		Си-6	Ли-3
44		Си-6	Ли-4
45		Си-6	Ли-5
46		Си-6	Ли-6
47		Си-6	Ли-7
48		Си-6	Ли-8

Приложение 1. Таблица соответствия адаптеров исследуемым образцам

«Таргет РМЖ С-Б», «Таргет РМЖ Б»			
№ образца	Название образца	Индекс Си	Индекс Ли
1		Си-7	Ли-1
2		Си-7	Ли-2
3		Си-7	Ли-3
4		Си-7	Ли-4
5		Си-7	Ли-5
6		Си-7	Ли-6
7		Си-7	Ли-7
8		Си-7	Ли-8
9		Си-8	Ли-1
10		Си-8	Ли-2
11		Си-8	Ли-3
12		Си-8	Ли-4
13		Си-8	Ли-5
14		Си-8	Ли-6
15		Си-8	Ли-7
16		Си-8	Ли-8
17		Си-9	Ли-1
18		Си-9	Ли-2
19		Си-9	Ли-3
20		Си-9	Ли-4
21		Си-9	Ли-5
22		Си-9	Ли-6
23		Си-9	Ли-7
24		Си-9	Ли-8
25		Си-10	Ли-1
26		Си-10	Ли-2
27		Си-10	Ли-3
28		Си-10	Ли-4
29		Си-10	Ли-5
30		Си-10	Ли-6
31		Си-10	Ли-7
32		Си-10	Ли-8
33		Си-11	Ли-1
34		Си-11	Ли-2
35		Си-11	Ли-3
36		Си-11	Ли-4
37		Си-11	Ли-5
38		Си-11	Ли-6
39		Си-11	Ли-7
40		Си-11	Ли-8
41		Си-12	Ли-1
42		Си-12	Ли-2
43		Си-12	Ли-3
44		Си-12	Ли-4
45		Си-12	Ли-5
46		Си-12	Ли-6
47		Си-12	Ли-7
48		Си-12	Ли-8

Приложение 1. Таблица соответствия адаптеров исследуемым образцам

Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по QR-коду:

Производитель
ООО «ОНКОАТЛАС»

Юридический адрес
Российская Федерация, г. Москва, вн. тер. г. Муниципальный Округ Якиманка, пр-кт Ленинский, д. 4, стр. 1А, помещ. 2/2

E-mail
solo@oncoatlas.ru