

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«МОСКОВСКАЯ ГОРОДСКАЯ ОНКОЛОГИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА № 62  
ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ г. МОСКВЫ

«УТВЕРЖДЕНО»

На заседании Ученого совета

№ 2 от «28» февраля 2024 г.



«СОГЛАСОВАНО»

Д.Ю.Каннер

29 февраля 2024 г.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ПРОГРАММА  
ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ

По теме: «МЕТОДИКА МАССИВНОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.  
ВВОДНЫЙ КУРС».

**Категория слушателей:**

31.08.05 Врач-клинической лабораторной диагностики;

31.08.06 Врач-лабораторный генетик;

06.04.01 Биолог (магистратура)

**Продолжительность:** 36 часов (5 дней)

**Форма обучения:** очная

**Руководитель курса:** Демидова И.А., заведующая молекулярно-биологической лабораторией.

Москва, 2024 г.

Дополнительная профессиональная программа повышения квалификации «Методика массивного параллельного секвенирования. Вводный курс» составлена на основании требований Федерального закона от 29.12.2012 № 273-ФЗ (ред.13.06.2023) «Об образовании в Российской Федерации», Федерального закона от 21.11.2011 №323-ФЗ (ред.28.04.2023) «Об основах охраны здоровья граждан в российской Федерации», Приказа Минобрнауки России от 01.07.2013 № 499 (ред.15.11.2013) «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по дополнительным профессиональным программам»

Дополнительная профессиональная программа повышения квалификации (далее- Программа) разработана с учетом профессионального стандарта 02.032 «Специалист в области клинической лабораторной диагностики» (утвержден приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 14 марта 2018 года №145н)

Направленность программы практико-ориентированная

Связь программы с Профессиональным стандартом

<b>Профессиональный стандарт «Специалист в области клинической лабораторной диагностики»</b>		
<b>ОТФ</b>	<b>Трудовые функции</b>	
	<b>Код ТФ</b>	<b>Наименование ТФ</b>
Выполнение, организация и аналитическое обеспечение клинических лабораторных исследований четвертой категории сложности, консультирование медицинских работников и пациентов	В/03.8	Выполнение клинических лабораторных исследований четвертой категории сложности

**Цель обучения:** совершенствование имеющихся профессиональных компетенций и повышение профессионального уровня в рамках имеющейся квалификации по специальности «Врач-клинической лабораторной диагностики» или «Врач-лабораторный генетик» или «Биолог».

**Структура** Программы включает в себя ряд требований к результатам освоения программы:

1. исполнение учебно-методического плана;
2. соблюдение календарного учебного графика;
3. итоговая аттестация.

## **ТРЕБОВАНИЯ К РЕЗУЛЬТАТАМ ОСВОЕНИЯ**

1. Требования к квалификации: высшее медицинское образование по специальности «Врач-клинической лабораторной диагностики» или «Врач-лабораторный генетик» или высшее образование по направлению подготовки «Биология» (магистратура).
2. В результате освоения Программы появятся новые профессиональные компетенции-готовность к организации, выполнению и квалифицированной оценке результатов исследований методом массивного параллельного секвенирования.

### **ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ**

В результате освоения Программы слушатель должен приобрести знания, умения и навыки, необходимые для качественного изменения профессиональных компетенций в соответствии с профессиональным стандартом.

#### **По окончании обучения слушатель должен знать:**

1. Теоретические основы метода
2. Технику выполнения исследования и технику владения работы с высокопроизводительным секвенатором
3. Принципы оценки результатов исследования с использованием основ биоинформатической обработки
4. Правила составления заключения с использованием современной международной номенклатуры

#### **По окончании обучения слушатель должен уметь:**

1. Отбирать образцы для проведения исследования методом массивного параллельного секвенирования.
2. Выполнять необходимые этапы первичной пробоподготовки и приготовления библиотек.
3. Проводить исследование на приборах для высокопроизводительного секвенирования, освоить стандартные операционные процедуры запуска и владеть навыками работы с прилагаемыми программами биоинформатической обработки полученных данных.
4. Уметь правильно оценивать результат исследования с использованием существующих национальных и международных рекомендаций
5. Правильно составлять заключение по результатам исследования

### **ТРЕБОВАНИЯ К ИТОГОВОЙ АТТЕСТАЦИИ**

1. Итоговая аттестация проводится в форме тестового зачета и выявляет теоретическую и практическую подготовленность слушателей в соответствии с требованиями квалификационных характеристик специалиста.
2. К итоговой аттестации допускаются слушатели, полностью выполнившие программу обучения. Зачет проводится в форме тестирования.
3. Лица, успешно освоившие Программу, получают удостоверение о повышении квалификации, установленного образца.
4. Лица, не прошедшие итоговую аттестацию или получившие в ее результате неудовлетворительные оценки, получают взамен удостоверения справку о прохождении курса обучения без итоговой аттестации, установленного образца.

## КАЛЕНДАРНЫЙ УЧЕБНЫЙ ГРАФИК

<b>Форма обучения</b>	<b>Академических часов в день</b>	<b>Дней в неделю</b>	<b>Общая трудоемкость Программы в часах</b>	<b>Итоговая аттестация</b>
очная	8	5	36	зачет

### УЧЕБНО-ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

Всего часов - 36 часов, из них:

лекции- 10 часов;

практические занятия –26 часов;

самостоятельная работа под контролем куратора -8 часа;

проведение контрольного опроса и проверка полученных практических навыков – 2 часа.

Форма обучения: очная

Режим занятий: 8 часов в день

№ п/п	Наименование разделов и тем программы	Всего часов	В том числе			Форма контроля
			Лекции	Практические занятия	Самостоятельная работа под контролем куратора	Зачет
1.	<b>Общие принципы метода массивного параллельного секвенирования</b>	2	2	-	-	да
1.1	Сущность метода массивного параллельного секвенирования, его основные этапы	1	1	-	-	да
1.2	Возникновение и совершенствование метода, его виды, новейшие разработки	1	1	-	-	да
2.	<b>Применение метода в онкологической практике</b>	8	8	-	-	да
2.1	Принципы отбора образцов для массивного параллельного секвенирования, целевые группы пациентов согласно национальным и	1	1			

	международным рекомендациям					
2.1	Тестирование герминальных вариантов с целью выявления наследственных онкологических синдромов	1	1	-	-	да
2.2	Тестирование соматических вариантов с целью персонализации терапии	1	1	-	-	да
2.3	Основы биоинформатической обработки данных массивного параллельного секвенирования	2	2	-	-	да
2.4	Основы формирования заключений при тестировании герминальных и соматических вариантов	1	1	-	-	да
2.5	Использование результатов массивного параллельного секвенирования в реальной клинической практике	1	1	-	-	да
2.6	Сложности и основные ошибки в технологии, трактовке и репортировании результатов	1	1	-	-	да
3.	<b>Практическое изучение методики</b>	16	-	12	4	да
3.1	Основные этапы пробоподготовки и приготовления библиотек	8	-	6	2	да
3.2	Работа с высокопроизводительным секвенатором, оценка технических метрик	8	-	6	2	да

4.	<b>Формирование заключения по результатам исследования</b>	8	-	4	4	да
4.1	Знакомство с основами биоинформатической обработки данных, работа с ПО и базами данных	4	-	2	2	да
4.2	Формирование заключений с учетом международной номенклатуры и общих национальных и международных правил	4	-	2	2	да
	Итоговый контроль	2				
	<b>Всего часов</b>	<b>36</b>	<b>10</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>2</b>

### ТЕМАТИКА ЛЕКЦИОННЫХ ЗАНЯТИЙ

№ п/п	Тема	Часы	Содержание	Формируемые знания
1.	Сущность метода массивного параллельного секвенирования, его основные этапы	1	Описание основ метода, его основных принципов, его этапов и их значения	Понимание сущности метода, его теоретических основ
2.	Возникновение и совершенствование метода, его виды, новейшие разработки	1	История появления метода, его разновидности, их особенности, преимущества и недостатки, будущие направления развития	Формирование представлений о разнообразии методик, умение оценивать правильность применения метода для разных клинических и исследовательских целей
3.	Принципы отбора образцов для массивного параллельного секвенирования, целевые группы пациентов согласно национальным и международным рекомендациям	1	Определение важности правильного отбора образцов для различных групп пациентов, значения преаналитической подготовки и подходы к оптимальному выделению нуклеиновых кислот	Умение правильно определять пригодность материала для диагностических целей согласно клиническим рекомендациям и выделять целевые группы для оптимального применения методики

4.	Тестирование герминальных вариантов с целью выявления наследственных онкологических синдромов	1	Изучение оптимальных подходов к детекции герминальных вариантов у пациентов с подозрением на наследственные онкологические синдромы	Понимание особенностей тестирования у пациентов с признаками наследственных онкологических синдромов и правил оценки патогенности вариантов
5.	Тестирование соматических вариантов с целью персонализации терапии	1	Изучение оптимальных подходов к тестированию опухолевого материала для назначения таргетной терапии и определения прогноза течения заболевания	Владение современными принципами исследования соматических вариантов в опухолевой ткани, понимание особенностей оценки чувствительности вариантов к таргетной терапии
6.	Основы биоинформатической обработки данных массивного параллельного секвенирования	2	Знакомство с общими принципами оценки полученных данных с использованием программного обеспечения приборов, работы с программами обработки данных и доступными базами герминальных и соматических вариантов	Владение основами правильной обработки результатов исследований и использования существующих баз данных для оценки полученных результатов
7.	Основы формирования заключений при тестировании герминальных и соматических вариантов	1	Знакомство с международными классификаторами и кодировками, необходимыми для формирования заключения	Необходимые навыки по правильному формированию заключения с учетом национальных и международных рекомендаций и правил GLP (Good Laboratory Practice)
8.	Использование результатов массивного параллельного секвенирования в реальной клинической практике	1	Определение значимости исследований для персонализации терапии онкологических пациентов, знакомство с современными национальными и международными	Понимание важности проведения исследований в целевых группах пациентов с определенными нозологическими формами онкологических заболеваний

			клиническими рекомендациями	
9.	Сложности и основные ошибки в технологии, трактовке и репортировании результатов	1	Знакомство с основными проблемами всех этапов методики, технологическими ошибками, ошибками в оценке результатов и формировании заключений	Умение правильно оценить возможные ошибки всех этапов тестирования, владение инструментами, позволяющими вычислить причины ошибок и исправить неточности
	<b>Всего часов</b>	<b>10</b>		

### ТЕМАТИКА ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

№ п/п	Тема	Часы	Содержание	Формируемые знания
1.	Выделение ДНК из биологических препаратов, особенности работы с парафиновыми блоками	2	Определение необходимых условий для правильного отбора образцов, пригодных для проведения исследования	Умение выбирать и использовать соответствующие методы и реагенты для проведения ПЦР, учитывая специфику образцов и требования к анализу
2.	Работа в пре-ПЦР зоне, первый этап приготовления библиотеки для ресеквенирования	2	Измерение концентрации, нормализация образцов, сбор смеси для мультиплексной ПЦР и амплификация	Приобретение необходимых навыков по определению концентрации и количества смеси мультиплексной ПЦР. Навыки работы с оборудованием и программным обеспечением, используемыми в процессе проведения ПЦР
3.	Работа в пост-ПЦР зоне, последующие этапы приготовления библиотеки, контаминация	2	Проведение пост-ПЦР этапов, контроль качества библиотеки для ресеквенирования. Пересчет молярности. Меры профилактики и ликвидации контаминации	Самостоятельные навыки проведения лабораторных манипуляций до этапа загрузки прибора. Понимание важности соблюдения мер профилактики и ликвидации контаминации в процессе проведения ПЦР.



4.	Работа с приборной базой для ресеквенирования	2	Планирование и программирование прибора, подготовка прибора к запуску, обслуживание, ПО. Загрузка образцов в прибор	Умение работать с современным оборудованием на практике, освоение стандартных операций для запуска прибора
5.	Контроль качества проводимых исследований	2	Метрики контроля качества, требования к глубине покрытия, возможные ошибки и их причины	Знакомство с метриками контроля качества и способами их оценки. Разбор случаев ошибка > решение
6.	Анализ данных	4	Структура файлов, их предназначения, классификация вариантов, текущие рекомендации по интерпретации вариантов	Приобретение необходимых знаний о биоинформатических подходах для анализа данных, критериев для интерпретации полученных результатов
7.	Формирование заключений	2	Правила формирования заключений по полученным результатам согласно национальным и международным стандартам	Навыки правильного формирования заключения по результатам тестирования соматических и герминальных вариантов
	<b>Всего часов</b>	<b>16</b>		

### ТЕМАТИКА САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ПОД КОНТРОЛЕМ КУРАТОРА

№ п/п	Тема	Часы	Содержание	Формируемые знания
1.	Отбор образцов, изучение оптимальных методов выделения нуклеиновых кислот	1	Самостоятельная работа по выделению нуклеиновых кислот и оценке их количества и качества	Приобретение навыков правильного проведения первого этапа работы с образцами
2.	Основные этапы приготовления библиотек в пре-ПЦР и пост-ПЦР зоне	2	Совместная работа по проведению подготовки библиотек для секвенирования и оценка их качества	Приобретение навыков по самостоятельному проведению всех этапов приготовления библиотек для секвенирования
3.	Работа с высокопроизводительным секвенатором, оценка технических метрик	2	Изучение особенностей работы с прибором, его технического	Владение основными принципами работы с высокопроизводительным секвенатором, понимание

			обслуживания, выполнение запуска, первичная оценка метрик качества	критериев оценки качества полученных данных
4.	Анализ полученных данных	2	Изучение основ биоинформатической обработки, правил классификации выявленных вариантов и их интерпретации	Приобретение навыков по основным этапам обработки полученных данных и их грамотной оценке
5.	Отработка навыков написания заключения	1	Демонстрация принципов формирования заключений согласно принципам международной номенклатуры	Владение принципами правильного формирования заключения
	<b>Всего часов</b>	<b>8</b>		

### ССЫЛКИ И РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Принципы биохимии и молекулярной биологии. Под редакцией К.Уилсона и Дж.Уокера, изд Лаборатория знаний, 2020
2. NGS: Высокпроизводительное секвенирование. Под редакцией Д.В. Ребрикова. 6-е издание (электронное). Бинوم. Лаборатория знаний, последнее обновление: 2024
3. Молекулярно-генетические исследования в онкологии. Под редакцией В.В. Омеляновского и Е.И. изд Наука, 2021

ГБУЗ «МГОБ №62 ДЗМ» обеспечивает каждого обучающегося неограниченным доступом к электронным образовательным ресурсам через сеть Интернет.

### ОПИСАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ОЦЕНИВАНИЯ И ПРАВИЛ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ОЦЕНИВАНИЯ

Итоговая аттестация проводится в форме тестового зачета и выявляет теоретическую и практическую подготовленность слушателей в соответствии с требованиями квалификационных характеристик.

К итоговой аттестации допускаются слушатели, полностью выполнившие программу обучения. Зачет проводится в форме тестирования. Вопросы для подготовки к тестированию слушатели получают в первые дни начала обучения. В случае успешного прохождения итогового экзамена слушатели получают удостоверение о повышении квалификации, образец которого самостоятельно устанавливается организацией, осуществляющей образовательную деятельность. Формулировка результата «зачтено-не зачтено» проводится по критериям, изложенным в таблице паспорта комплекта оценочных средств.

## КОМПЛЕКТ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

### Проведение контрольного опроса и проверка полученных практических навыков

#### Примеры тестовых заданий

##### 1) Исторически два первых метода секвенирования НК.

1. Метод Сенгера или метод обрыва цепи
2. Пиросеквенирование
3. Нанопоровое секвенирование
4. Химическое секвенирование
5. 1 и 2
6. 3 и 4

##### 2) Разновидности методик секвенирования следующего поколения

1. Секвенирование путем обрыва цепи;
2. Секвенирование путем синтеза;
3. Пиросеквенирование;
4. Секвенирование путем лигирования.
5. Все вышеперечисленное
6. 2,3 и 4

##### 3) Преимуществами массивного параллельного секвенирования перед секвенированием по Сэнгеру являются:

1. Параллельное секвенирование образцов нескольких пациентов;
2. Предсказание структуры белка;
3. Большая точность;
4. Высокая производительность.
5. 1 и 4
6. 1 и 2

##### 4) Основные области применения секвенирования нового поколения в медицине, доказавшие свою валидность

1. Диагностика наследственных заболеваний
2. Пренатальная диагностика и скрининг новорожденных
3. Определение полигенной предрасположенности к заболеваниям
4. Исследование генетических вариантов в опухолевой ткани
5. 1, 2 и 4
6. 1 и 2

##### 5) Варианты рутинного применения НГС в онкологии

1. Поиск герминальных мутаций для выявления наследственных онкологических синдромов
2. Соматическое тестирование для выявления вариантов, потенциально чувствительных к таргетной терапии
3. Полногеномное секвенирование
4. Секвенирование транскриптома
5. Все вышеперечисленное
6. 1 и 2

##### 6) Для каких злокачественных опухолевых заболеваний ESMO рекомендовано проведение соматического секвенирования?

1. Немелкоклеточный рак легкого
2. Холангиокарцинома
3. Рак яичников
4. Рак предстательной железы
5. Все вышеперечисленное

**7) Перед тем, как выполнить выделение ДНК из парафинового блока нужно:**

1. Определить количество опухолевых клеток
2. Выявить очаги некроза
3. Если нужно выполнить микродиссекцию
4. Сделать подрез для приготовления свежих срезов
5. Все вышеперечисленное

**8) Пациент с раком предстательной железы обратился в лабораторию с целью выполнить HRR тестирование, какой материал для этого необходим:**

1. Кровь
2. Плазма крови
3. Парафиновые блоки

**9) Измерение концентрации ДНК выполняется для того, чтобы определить:**

1. Качество и количество нуклеиновых кислот
2. Качество нуклеиновых кислот
3. Количество нуклеиновых кислот

**10) Молярность ДНК конструктора (библиотеки) находится в зависимости от:**

1. Только от концентрации
2. Только от размера вставки
3. От размера вставки и концентрации

**11) Вы выполнили секвенирование опухолевой ткани и выявили клинически значимый вариант, как доказать, что вариант соматический?**

1. Никак, он и так соматический
2. Выполнить секвенирование другой опухолевой ткани (другой блок)
3. Выполнить секвенирование нормальной ткани и обнаружить вариант среди других вариантов
4. Выполнить секвенирование нормальной ткани и не обнаружить вариант среди других вариантов, при условии, что данный регион достаточно покрыт данными прочтений

**12) Рекомендованное минимальное покрытие изучаемых регионов для образцов из опухолевой ткани и крови:**

1. 150 и 300
2. 100 и 500
3. 1000 и 100

**13) У Вас есть две пробирки с Индексами (i7)**

**U56 GAATGAGA  
T12 TGCGGCGT**

**И 6 пробирок с индексами (i5)**

**t1 AGTATCTT**

t2 GACGCTCC  
t3 CATGCCAT  
t4 TGCATTGC  
t5 ATTGGAAC

**Какое максимальное количество образцов для одного запуска и типа библиотеки можно приготовить, используя имеющиеся набор индексов?**

1. 24
2. 7
3. 10

**14) После выравнивания на приборе Miseq у вас получились нулевые fastq.gz файлы для всех образцов и прочтений и тяжеловесные undetermined.fastq.gz файлы и прибор выдал ошибку. Вы вспоминаете, что использовали в LRM индексы для прибора Nextseq и решаетесь выполнить reverse complement для i5 праймеров. На примере индекса t3 из задания 7 выберите из списка правильную последовательность, которая соответствует reverse complement t3:**

1. CATGCCAT
2. GTACGGTA
3. TACCGTAC
4. ATGGCATG

**15) Какое теоретическое покрытие на образец вы получите если после секвенирования по протоколу 2 по 150 циклов, получилось 26 миллионов ридов, для 96 образцов (добавленных эквимолярно) при использовании таргетной панели размером 68000 пар оснований (качеством прочтения, оффтаргетным процентом выравнивания пренебречь)?**

1. 1195
2. 4
3. 120
4. Такое невозможно

**16) Зачем нужен phix spike in для приборов Illumina?**

1. Контроль качества секвенирования
2. Контроль для траблшутинга
3. Для повышения плексности секвенирования
4. Все вышеперечисленное

**17) Источники ошибок на этапе подготовки образцов**

1. Неправильная маркировка образцов
2. Выделение нуклеиновых кислот за несколько дней до выполнения исследований
3. Контаминация образца чужеродными нуклеиновыми кислотами
4. Все вышеперечисленное
5. 1 и 3

**18) Источники ошибок на этапе подготовки библиотек**

1. Перекрестная контаминация образцов
2. Неправильное использование адаптеров
3. Аппаратные ошибки в процессе проведения ПЦР
4. Все вышеперечисленное

### 19) Ограничения метода таргетного ресеквенирования

1. Сложности в прочтении крупных структурных вариантов
2. Невозможность выявления химерных структур
3. Невозможность правильной аннотации однонуклеотидных вариантов

### 20) Обязательные пункты в заключении по результатам исследования

1. Тройная идентификация пациента
2. Описание используемой реагентки и приборной базы
3. Технические характеристики запуска
4. Классификация варианта по AMP (ESCAT)
5. Все вышеперечисленное

### Виды и задания по самостоятельной практической работе

1. Лабораторная работа по проведению 1 этапа приготовления библиотеки для секвенирования из контрольных образцов (отбор образцов, измерение концентрации нуклеиновых кислот, нормализация образцов, сбор смеси для мультиплексной ПЦР и амплификация).
2. Лабораторная работа по проведению 2 этапа приготовления библиотеки для секвенирования (проведение пост-ПЦР этапов, контроль качества библиотеки для ресеквенирования).
3. Оценка результатов исследования с оценкой технических характеристик запуска, аннотацией и классификацией вариантов, проведение подсчетов, самостоятельное формирование заключений.

Предмет(ы) оценивания	Объект(ы) оценивания	Показатели оценки	Критерии оценки
Тесты	Знания, умения, навыки слушателей	Понимает сущностное содержание предложенного материала	«Зачтено»-знает, понимает и в полной мере владеет материалом. «Не зачтено»- не имеет достаточно полное представление о сущности изученного, отсутствуют знания, представления об изученном материале.

#### Условия выполнения задания:

1. Место выполнения: учебная аудитория и помещение лаборатории
2. Максимальное время выполнения задания: 120 минут

## **МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ**

1. Учебные аудитории, оснащены материалами и оборудованием для проведения учебного процесса.
2. Библиотечный фонд, электронные возможности для самостоятельной подготовки обучающихся.
3. Лабораторные мощности, оснащенные всем необходимым оборудованием и контрольными образцами для отработки практических навыков.

## **КАДРОВОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ**

Реализация программы осуществляется преподавательским составом, состоящим из специалистов, систематически занимающихся лабораторной деятельностью по данному профилю, со стажем работы по специальности не менее 10 лет.