

# ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

---

16, 32, 48 ΚΑΙ 96 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

## **SOPHiA DDM™ Dx** **Myeloid Solution (Διάλυμα** **μυελοειδούς)**



Για In Vitro διαγνωστική (IVD) χρήση  
Όχι για αυτοέλεγχο

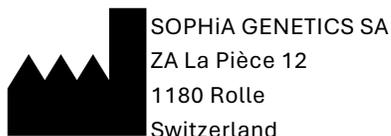




## ΣΥΝΟΨΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Όνομα προϊόντος               | SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (SOPHiA DDM™ Διάλυμα μυελοειδούς)               |
| Τύπος προϊόντος               | Συνδυασμός διαλυμάτων   |
| Οικογένεια προϊόντων          | Εφαρμογή μοριακής διαγνωστικής (κιτ + αναλυτικά στοιχεία)                       |
| Αναγνωριστικό αλγόριθμου      | ILL1XG1S9_CNV   |
| Αναγνωριστικό πίνακα γονιδίων | MYS_v1  |
| Έκδοση προϊόντος              | 1,0   |
| Τύπος δείγματος               | Σωματικό DNA που απομονώθηκε από αίμα   |
| Αναλυτής αλληλουχίας          | Illumina - MiSeq  |
| Περιγραφή GMDN                | Κιτ αντιδραστηρίων IVD / Λογισμικό ερμηνείας ανθρώπινης γονιδιωματικής ανάλυσης |
| Αναγνωριστικό εγγράφου        | SG-00678  |
| Έκδοση εγγράφου               | V6.0  |
| Ημερομηνία αναθεώρησης        | 27 Ιανουαρίου 2026  |

Αυτές οι Οδηγίες χρήσης ισχύουν για όλες τις εκδόσεις SOPHiA DDM™ Dx.  
Διαβάστε προσεκτικά την Οδηγίες χρήσης προτού χρησιμοποιήσετε αυτό το προϊόν.





## ΚΩΔΙΚΟΙ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

|            | ΠΛΗΡΗΣ ΚΩΔΙΚΟΣ<br>ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ | BOX 1           | BOX 2        | ΚΙΤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ<br>ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ |
|------------|-----------------------------|-----------------|--------------|----------------------------------|
| <b>REF</b> | BS0103ILLCSML01-016         | B1.01.0003.C-16 | B2.0003.C-16 | 700232                           |
|            | BS0103ILLCSML01-032         | B1.01.0003.C-32 | B2.0003.C-32 | 700232                           |
|            | BS0103ILLCSML01-048         | B1.01.0003.C-48 | B2.0003.C-48 | 700234                           |
|            | BS0103ILLCSML01-96          | B1.01.0003.C-96 | B2.0003.C-48 | 700234                           |



## ΑΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΥΘΥΝΩΝ

Το έγγραφο αυτό και το περιεχόμενό του αποτελούν ιδιοκτησία της SOPHiA GENETICS SA και των θυγατρικών της («SOPHiA GENETICS») και προορίζονται αποκλειστικά για συμβατική χρήση από τον πελάτη της σε σχέση με τη χρήση των προϊόντων που περιγράφονται στο παρόν και για κανέναν άλλον σκοπό. Το έγγραφο αυτό και το περιεχόμενό του δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ή να διανεμηθούν για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και να κοινοποιηθούν, γνωστοποιηθούν ή αναπαραχθούν με άλλον τρόπο ή να αναφέρονται με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την προηγούμενη γραπτή συγκατάθεση της SOPHiA GENETICS.

Η SOPHiA GENETICS δεν εκχωρεί καμία άδεια στο πλαίσιο του διπλώματος ευρεσιτεχνίας της, του εμπορικού σήματος, των πνευματικών δικαιωμάτων ή των κοινοτικών δικαιωμάτων της, ούτε παρόμοια δικαιώματα τρίτων, από αυτό το έγγραφο. Οι οδηγίες στο έγγραφο αυτό πρέπει να ακολουθούνται αυστηρά και ρητά από εξειδικευμένο και επαρκώς εκπαιδευμένο προσωπικό, για διασφάλιση της ορθής και ασφαλούς χρήσης των προϊόντων που περιγράφονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του εγγράφου αυτού πρέπει να διαβαστούν και να κατανοηθούν πλήρως πριν από τη χρήση τέτοιου είδους προϊόντων.

Η ΜΗ ΠΛΗΡΗΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΡΗΤΗ ΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΟΔΗΓΙΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ, ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΕΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΖΗΜΙΑ ΣΕ ΑΛΛΑ ΠΕΡΙΟΥΣΙΑΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.

Η SOPHiA GENETICS ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ Η ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΚΑΤΑΛΛΗΛΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΕΔΩ (ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ Ή ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ).

## ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ

Τα Illumina® και MiSeq® αποτελούν σήματα κατατεθέντα της Illumina, Inc.

Τα AMPure® και Agencourt® αποτελούν σήματα κατατεθέντα της Beckman Coulter, Inc.

Τα Qubit® και Dynabeads® αποτελούν σήματα κατατεθέντα της Thermo Fisher Scientific Inc.

Το KAPA™ αποτελεί εμπορικό σήμα της Roche.

Το QIAseq® αποτελεί σήμα κατατεθέν της Qiagen.

Τα SOPHiA GENETICS™ και SOPHiA DDM™ Dx αποτελούν εμπορικά σήματα της SOPHiA GENETICS SA ή/και των θυγατρικών αυτής στις ΗΠΑ ή/και σε άλλες χώρες. Όλα τα άλλα ονόματα, λογότυπα και άλλα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων τους. ΕΚΤΟΣ ΑΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΤΑΙ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΩΣ ΕΧΕΙ, Η ΧΡΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ ΤΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΗ SOPHiA GENETICS ΔΕΝ ΥΠΟΔΗΛΩΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΣΧΕΣΗ, ΧΟΡΗΓΙΑ Ή ΕΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ SOPHiA GENETICS ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΟΧΩΝ ΤΩΝ ΕΝ ΛΟΓΩ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ. Οποιοσδήποτε αναφορές από μέρους της SOPHiA GENETICS σε εμπορικά σήματα τρίτων προορίζονται για προσδιορισμό των αντίστοιχων προϊόντων ή/και υπηρεσιών τρίτων και θα θεωρούνται ονομαστική θεμιτή χρήση σύμφωνα με τη νομοθεσία περί εμπορικών σημάτων.



## ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΕΩΝ

| ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΟ ΕΓΓΡΑΦΟΥ/ ΕΚΔΟΣΗ | ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ          | Αγγλική έκδοση ισοδύναμη με τις οδηγίες χρήσης | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ  |
|--------------------------------|---------------------|--|--|
| SG-00678 – 6.0                 | Ιανουάριος 2026     | SG-00659 – 8.0                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Αλλαγή στο σύστημα αρίθμησης εκδόσεων, χωρίς πρόσθετες εκδόσεις μεταξύ της έκδοσης 5.4 και της έκδοσης 6.0.</li> <li>Προστέθηκε μια νέα στήλη στον πίνακα ιστορικού αναθεωρήσεων για την παρακολούθηση της αντίστοιχης αγγλικής έκδοσης. Η στήλη είναι κενή για όλες τις προηγούμενες αναθεωρήσεις.</li> <li>Ενότητα 2: Αφαίρεση ενδείξεων νόσου. Ενημέρωση του ονόματος του συστατικού προετοιμασίας βιβλιοθήκης.</li> <li>Ενότητα 3: Αφαίρεση στοιχείων εκτός πεδίου εφαρμογής της εφαρμογής SOPHiA DDM για υπολογιστές από την περιγραφή.</li> <li>Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις: Προσθήκη του αριθμού αναγνώρισης CAS και της συγκέντρωσης κάθε επικίνδυνου συστατικού που αναφέρεται.</li> <li>Αφαίρεση των περιορισμών εκτός πεδίου εφαρμογής.</li> <li>Αφαίρεση των οδηγιών εκτός πεδίου εφαρμογής από την ενότητα «Εξάρτημα προϊόντος».</li> <li>Αφαίρεση της ενότητας «Περίληψη και επεξήγηση της δοκιμής».</li> <li>Το «Διαδικτυακή εφαρμογή SOPHiA DDM™» άλλαξε σε «Λειτουργία SOPHiA DDM™ Dx».</li> <li>Μικρές αναδιατυπώσεις που σχετίζονται με την παραπάνω αλλαγή.</li> <li>Μειωμένος όγκος περιεχομένου των ανιχνευτών υβριδοποίησης SOPHiA GENETICS από 20 µl σε 18 µl (βλ. ενότητα 5.1.1 Περιεχόμενο κιτ - BOX 1).</li> <li>Αφαίρεση της πνευματικής ιδιοκτησίας παρόχου τρίτου μέρους από τις ενότητες 5.1.1 Περιεχόμενο κιτ, 5.3.1 Συγκέντρωση βιβλιοθηκών και 5.3.2 Υβριδοποίηση.</li> </ul> |
| SG-00678 - 5.4                 | 24. Σεπτέμβριος. 25 |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ενημέρωση διεύθυνσης EC REP</li> </ul>  |
| SG-00678 - 5.3                 | 23. Μαΐου. 25       |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Παράρτημα 1: Ο πίνακας «16 συμβατοί με Illumina® Προσαρμογείς διπλού δείκτη σε μορφή πλάκας 96 φρεατίων (7 µl έκαστος)» αφαιρέθηκε από το Παράρτημα 1 λόγω κατάργησης της μορφής πλάκας με 16 διπλούς δείκτες.</li> <li>Ενότητα 5.1.1 Περιεχόμενα κιτ – ΚΟΥΤΙ 1: Ενημερώθηκε ώστε να αποδίδει την παραπάνω αλλαγή.</li> </ul>   |



| ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΟ ΕΓΓΡΑΦΟΥ/ ΕΚΔΟΣΗ | ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ    | Αγγλική έκδοση ισοδύναμη με τις οδηγίες χρήσης | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ   |
|--------------------------------|---------------|--|---|
| SG-00678 - 5.2                 | 19. Μάρ. 2025 |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ενότητα 5.1.1 Περιεχόμενο κιτ - BOX 1: Αύξηση του όγκου</li> <li>του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης 2x από 50 μl σε 75 μl- αύξηση του όγκου του ενισχυτικού ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης από 20 μl σε 30 μl.</li> </ul>  |
| SG-00678 - 5.1                 | 9 Ιαν. 23     |  | Διόρθωση σφαλμάτων μορφοποίησης   |
| SG-00678 - 5.0                 | 14 Σεπ. 22    |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Προστέθηκε το σύμβολο του εμπορικού σήματος SOPHiA DDM και SOPHiA GENETICS.</li> <li>Η ονομασία Library Prep Kit αλλάζει σε SOPHiA GENETICS™ Dx παγκοσμίως.</li> <li>Η έκδοση του εγγράφου μεταβαίνει στον επόμενο ακέραιο αριθμό χωρίς δεκαδικό ψηφίο.</li> </ul>   |
| SG-00678 - 4.5                 | 19.Απρ.22     |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Προστέθηκαν οδηγίες για τη διαδικτυακή εφαρμογή SOPHiA DDM™</li> </ul>   |
| SG-00158 - 4.4                 | 14.Απρ.22     |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Περιορισμοί και προειδοποιήσεις: Τροποποιήθηκε</li> <li>Η διεύθυνση γραφείου της SOPHiA GENETICS ενημερώθηκε</li> <li>Αλλαγές στο Wet Lab, όπως συνιστάται παγκοσμίως</li> <li>Μικρές αλλαγές και διορθώσεις σε τυπογραφικά λάθη</li> </ul>  |
| ID-60101-17 - 4.3              | 21.Ιουλ.21    |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Σελίδα 2 - Το αναγνωριστικό εγγράφου διορθώθηκε.</li> <li>Σελίδα 2, 29 - Αισθητικές αλλαγές.</li> <li>Σελίδα 17 - Η σειρά βημάτων άλλαξε.</li> <li>Σελίδα 26 - Διορθώθηκε ο όγκος προ-μείγματος PCR «48 δειγμάτων».</li> </ul>   |
| ID-60101-17 - 4.2              | 16.Ιουν.21    |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Σελίδα 3 - Τροποποιήθηκε το εμπορικό σήμα.</li> <li>Σελίδα 44 - Μικρή προσθήκη στις προδιαγραφές του αρχείου.</li> <li>Σελίδα 55, 56 - Το τυπογραφικό λάθος της επικεφαλίδας «Μοναδικό» αφαιρέθηκε.</li> </ul>   |
| ID-60101-17 - 4.1              | 28.Μαΐου.21   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Σελίδα 2 - Τροποποιήθηκε ο συνοπτικός πίνακας πληροφοριών.</li> <li>Σελίδα 3 - Τροποποιήθηκε η αποποίηση ευθυνών.</li> <li>Σελίδα 11, 13, 15, 29 - Τροποποιήθηκε η κεφαλίδα πίνακα.</li> <li>Σελίδα 16 - Ανταλλάχθηκαν οι ακολουθίες βημάτων 1 και 2.</li> <li>Σελίδα 17 - Η προετοιμασία αιθανόλης μετακινήθηκε στην ενότητα «Προετοιμασία».</li> </ul> |



| ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΟ ΕΓΓΡΑΦΟΥ/ ΕΚΔΟΣΗ | ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | Αγγλική έκδοση ισοδύναμη με τις οδηγίες χρήσης | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ  |
|--------------------------------|------------|--|--|
|                                |            |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Σελίδα 12, 18, 19, 21, 22, 23, 27, 35, 36, 37, 38, 43 - Αισθητικές αλλαγές και τυπογραφικά λάθη.</li> <li>Σελίδα 20 - Σημείο 1, Κουκκίδα 2 - άλλαξε το «Ενισχυτής FX» σε «Προ-μείγμα αντίδρασης FX».</li> <li>Σελίδα 47 - Οι κουκκίδες 2 και 18 προστέθηκαν, η κουκκίδα 19 τροποποιήθηκε.</li> </ul>  |
| ID-60101-17 - 4.0              | 30.Μαρ.21  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Σελίδα τίτλου, λογότυπο εταιρείας, κεφαλίδα, υποσέλιδο, τελευταία σελίδα.</li> <li>Αναδιοργάνωση των θεμάτων.</li> <li>Συμπεριλαμβάνονται οι οδηγίες εγκατάστασης, μεταφόρτωσης και τις συμβάσεις ονοματοδοσίας της διαδικτυακής εφαρμογής SOPHiA DDM™.</li> <li>Συνδυάστηκε μαζί το μέγεθος τεσσάρων κιτ «Οδηγίες χρήσης» για να περιλαμβάνει διαφορετικούς αριθμούς δειγμάτων. Συμπεριλαμβάνονται πίνακες και εφάρμοσε τις κατάλληλες αλλαγές όπως και όταν ήταν απαραίτητο για τον σκοπό αυτό.</li> <li>Τα ακόλουθα έγγραφα για τις «Οδηγίες χρήσης» του κιτ συνδυάστηκαν: <ul style="list-style-type: none"> <li>PM_CEIVD_B2.1.1.14_r2en</li> <li>PM_CEIVD_B2.1.1.16_r2en</li> <li>PM_CEIVD_B2.1.1.18_r2en</li> <li>PM_CEIVD_B2.1.1.24_r1en</li> </ul> </li> <li>Μικρές αλλαγές για λόγους σαφήνειας στις ακόλουθες ενότητες: <ul style="list-style-type: none"> <li>Ενότητα 5.3.1 Συνένωση βιβλιοθηκών</li> <li>Ενότητα 5.3.5 Πραγματοποιήστε πλύση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης για αφαίρεση μη δεσμευμένου DNA</li> </ul> </li> </ul> |



# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

|  |    |
|--|----|
| 1. Προβλεπόμενη χρήση/σκοπός.....  | 10 |
| 2. Γενική δήλωση αρχής/ διαδικασίας δοκιμής .....  | 11 |
| 3. Εξαρτήματα προϊόντος .....  | 12 |
| 4. Υλικά του κιτ και μέθοδοι .....   | 13 |
| 4.1. Αρχικές εκτιμήσεις.....   | 13 |
| 4.1.1. Περιεχόμενο κιτ (16, 32, 48 ή 96 δείγματα) .....  | 13 |
| 4.1.2. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις .....   | 15 |
| 4.1.3. Υλικό που απαιτείται (δεν παρέχεται) .....  | 18 |
| 4.2. Προετοιμασία βιβλιοθήκης.....   | 19 |
| 4.2.1. Γονιδιωματική Προετοιμασία DNA .....  | 19 |
| 4.2.2. Προ-μείγματα και Προετοιμασία αντιδραστηρίων .....  | 21 |
| 4.2.3. Ενζυμικός κατακερματισμός, επιδιόρθωση End Repair και A-Tailing .....                     | 23 |
| 4.2.4. Αντίδραση λιγάσης .....   | 24 |
| 4.2.5. Καθαρισμός μετά από αντίδραση λιγάσης .....   | 25 |
| 4.2.6. Επιλογή διπλού μεγέθους.....  | 26 |
| 4.2.7. Ενίσχυση βιβλιοθήκης.....   | 27 |
| 4.2.8. Καθαρισμός μετά από ενίσχυση.....   | 29 |
| 4.2.9. Ποσοτικοποίηση Μεμονωμένης βιβλιοθήκης και Ποιοτικός έλεγχος .....                        | 30 |
| 4.3. Σύλληψη .....   | 31 |
| 4.3.1. Συνένωση βιβλιοθήκης .....  | 31 |
| 4.3.2. Υβριδισμός.....   | 32 |
| 4.3.3. Προετοιμασία σφαιριδίων στρεπταβιδίνης .....  | 35 |
| 4.3.4. Δέσμευση υβριδοποιημένων στόχων στα σφαιρίδια .....                                       | 36 |
| 4.3.5. Πραγματοποιήστε Πλύση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης για να αφαιρέσετε μη δεσμευμένο DNA ..... | 37 |
| 4.3.6. Ενίσχυση μετά τη σύλληψη .....  | 38 |
| 4.3.7. Καθαρισμός ενίσχυσης μετά τη σύλληψη .....  | 40 |
| 4.3.8. Ποσοτικοποίηση Τελικής βιβλιοθήκης και Ποιοτικός έλεγχος .....                            | 41 |
| 4.4. Αλληλούχηση .....   | 42 |
| 4.4.1. Προετοιμασία βιβλιοθήκης για αλληλούχηση .....  | 42 |
| 5. Διαδικασία ανάλυσης.....  | 43 |
| 5.1. Οδηγίες εγκατάστασης λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx.....  | 43 |
| 5.2. Περιγραφή ροής εργασιών ανάλυσης για δημιουργία αποτελεσμάτων IVD .....                     | 43 |
| 6. Περιορισμοί, προειδοποιήσεις και προφυλάξεις .....  | 44 |
| 7. Μη κλινική αξιολόγηση απόδοσης .....  | 47 |
| 7.1. ΜΕΘΟΔΟΙ.....  | 47 |
| 7.2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ .....  | 49 |
| 7.3. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....   | 50 |
| 7.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....   | 51 |



|  |    |
|--|----|
| 8. Σύμβολα .....   | 53 |
| 9. Υποστήριξη .....  | 54 |
| Παράρτημα 1. Πλάκες προσαρμογέα διπλού δείκτη .....  | 55 |
| Παράρτημα 2. Εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στο Εργαστήριο SOPHiA GENETICS ..... | 58 |
| Παράρτημα 3. Γενική ροή εργασιών – SOPHiA DDM™ Capture Solutions (Διαλύματα δέσμευσης) .....   | 61 |
| Παράρτημα 4. Κατάλογος των περιοχών-στόχων και των εφαρμόσιμων επισημασμένων περιοχών .....    | 63 |



# 1. ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ/ΣΚΟΠΟΣ

Το προϊόν προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό παραλλαγών που εμφανίζονται σε 30 γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε μυελοειδή νεοπλάσματα, στοχεύοντας συγκεκριμένες θέσεις οι οποίες είναι επιρρεπείς σε μεταλλάξεις εντός της γονιδιωματικής αλληλουχίας. Στόχος του προϊόντος είναι να βοηθήσει τους επαγγελματίες υγείας να λάβουν μια κλινική απόφαση σχετικά με τα μυελοειδή νεοπλάσματα και να παρέχει μοριακή λογική για την κατάλληλη θεραπεία.

Το προϊόν προορίζεται μόνο για in vitro διαγνωστική χρήση και επαγγελματική χρήση.



## 2. ΓΕΝΙΚΉ ΔΉΛΩΣΗ ΑΡΧΉΣ/ ΔΙΑΔΙΚΑΣΪΑΣ ΔΟΚΙΜΉΣ

Η επικυρωμένη λειτουργία των αναλυτικών στοιχείων του SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) είναι η ανάλυση ακατέργαστων δεδομένων NGS που δημιουργούνται από ένα όργανο Illumina MiSeq® με MiSeq® Reagent Kit v3, σε σωματικά δείγματα που απομονώνονται από αίμα με το KAPA® Library Amplification Kit και το SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

Το SOPHiA DDM™ Dx MYs περιλαμβάνει τρία κύρια βήματα. Το πρώτο βήμα είναι να προσδιοριστεί το δείγμα DNA από αίμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή. Το δεύτερο είναι η μη αυτόματη προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχηση, η οποία ονομάζεται προετοιμασία βιβλιοθήκης. Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης αποτελείται από επτά βασικά βήματα: Κατακερματισμός DNA, αντίδραση λιγάσης προσαρμογών, ενίσχυση με PCR μεμονωμένων βιβλιοθηκών, συνένωση βιβλιοθηκών, υβριδισμός ανιχνευτών, ενίσχυση PCR κατά τη σύλληψη και μετά τη σύλληψη. Η τρίτη διαδικασία είναι η αλληλούχηση του παρασκευασμένου δείγματος χρησιμοποιώντας χημεία SBS (αλληλούχηση μέσω σύνθεσης) στον αναλυτή αλληλουχίας Illumina MiSeq®.

Για ανάλυση, τα αποτελέσματα θα πρέπει να μεταφορτωθούν στην πλατφόρμα SOPHiA DDM™ και να αναλυθούν χρησιμοποιώντας την εφαρμογή SOPHiA DDM™ Dx MYs.

**Πίνακας 1: Λίστα των γονιδίων που αποτελούν στόχο του προϊόντος**

|        |      |        |
|--------|------|--------|
| ABL1   | FLT3 | PTPN11 |
| ASXL1  | HRAS | RUNX1  |
| BRAF   | IDH1 | SETBP1 |
| CALR   | IDH2 | SF3B1  |
| CBL    | JAK2 | SRSF2  |
| CEBPa  | KIT  | TET2   |
| CSF3R  | KRAS | TP53   |
| DNMT3A | MPL  | U2AF1  |
| ETV6   | NPM1 | WT1    |
| EZH2   | NRAS | ZRSR2  |



### 3. ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Το SOPHiA DDM™ Dx MYS αποτελείται από δύο στοιχεία: το κιτ NGS και τη ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών βιοπληροφορικής που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ένα αξεσουάρ IVD, τη λειτουργία SOPHiA DDM™ Dx που βασίζεται σε cloud.

- Σκοπός του κιτ NGS είναι να προετοιμάσει και να εμπλουτίσει βιβλιοθήκες DNA από δείγματα αίματος κατάλληλα για αλληλούχηση σε αναλυτή αλληλούχησης Illumina® MiSeq®. Το κιτ NGS επιτρέπει στους χρήστες να δημιουργούν στοχευμένα δεδομένα αλληλούχησης. Τα στοιχεία περιγράφονται στην ενότητα 5 που ακολουθεί. Υλικά του κιτ και μέθοδοι 5.1. Αρχικές εκτιμήσεις - 5.1.1 Περιεχόμενο κιτ.
- Η ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών βιοπληροφορικής («ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών MYS») επεξεργάζεται τα ακατέργαστα δεδομένα NGS μέσω αλγορίθμων ικανών να αξιολογήσουν τη γονιδιωματική ακεραιότητα.
- Η λειτουργία SOPHiA DDM™ Dx αποτελεί διαδικτυακή εφαρμογή διεπαφής χρήστη διαθέσιμη σε μορφή «λογισμικό ως υπηρεσία» (SaaS) που χρησιμοποιείται για δημιουργία αναφοράς με δυνατότητα λήψης για γονίδια που αναφέρονται στον Πίνακα 1 για SNV και INDEL. Ισχύουν περιορισμοί - δείτε την ενότητα 7 - Περιορισμοί, προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.



## 4. ΥΛΙΚΑ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1. Αρχικές εκτιμήσεις

Κατά την παραλαβή, βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες είναι φυσικά άθικτοι και αποθηκευμένοι σύμφωνα με τις συνιστώμενες θερμοκρασίες, για βέλτιστη απόδοση του κιτ. Ο ακατάλληλος χειρισμός και αποθήκευση των εξαρτημάτων του κιτ υπό άλλες συνθήκες μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση του κιτ.

#### 4.1.1. Περιεχόμενο κιτ (16, 32, 48 ή 96 δείγματα)

Να προκαλείτε πάντα στιγμιαία περιδίνηση στους σωλήνες πριν από τη χρήση για να συλλέξετε όλο το υγρό.

Ανάλογα με τη μορφή του κιτ, παρέχονται τα ακόλουθα εξαρτήματα:

| ΕΞΑΡΤΗΜΑ  | ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΑΠΟ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΚΙΤ |                           |                     |  |
|---|---|---------------------------|---------------------|--|
|   | Κιτ<br>16 δειγμάτων                               | Κιτ<br>32 δειγμάτων       | Κιτ<br>48 δειγμάτων | Κιτ<br>96 δειγμάτων                                    |
| BOX 1   | 1   | 1                         | 1                   | 2<br>(48 δείγματα έκαστο)                              |
| Προσαρμογείς συμβατοί με Illumina® με διπλό δείκτη (σε μορφή πλάκας 96 φρεατίων που περιλαμβάνεται στο Κουτί 1) | 32  | 32                        | 48                  | 96<br>(Η πλάκα περιέχεται σε ένα από τα δύο Κουτιά 1s) |
| BOX 2   | 1   | 1                         | 1                   | 2<br>(48 δείγματα έκαστο)                              |
| SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I   | 1   | 2<br>(16 δείγματα έκαστο) | 1                   | 2<br>(48 δείγματα έκαστο)                              |

#### BOX 1 (ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ -25°C ΕΩΣ -15°C)

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Myeloid Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2X Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10X Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10X Wash Buffer I (160 µl)



- 10X Wash Buffer II (110 µl)
- 10X Wash Buffer III (110 µl)
- Ανάλογα με τη μορφή του κιτ: Ανάλογα με τη μορφή του κιτ: 32, 48 ή 96 Προσαρμογείς συμβατοί με Illumina® διπλού δείκτη σε μορφή πλάκας 96 φρεατίων (7 µl έκαστο): δείτε το Παράρτημα 1 για προβολή των προσαρμογών και των ακολουθιών.

## BOX 2 (ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ +2°C ΕΩΣ +8°C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml για 16 δείγματα, 8,7 ml για 32 δείγματα και 11,6 ml για 48 δείγματα, βλ. Σημείωση για 96 δείγματα)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

**Σημείωση:** Για 96 δείγματα, παρέχεται δύο φορές το Κουτί 2 με 48 δείγματα (δείτε τον πίνακα στην προηγούμενη σελίδα).



**Σημαντικό:** Ανατρέξτε στις Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις πιο κάτω για πρόσθετες λεπτομέρειες.

## SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I (ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ -25°C ΕΩΣ -15°C)

- Για 32 δείγματα, παρέχονται δύο κιτ 16 δειγμάτων.
- Για 96 δείγματα, παρέχονται δύο κιτ 48 δειγμάτων.

| ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ   | ΜΟΡΦΗ ΚΙΤ        |                  |
|--|------------------|------------------|
|  | Κιτ 16 δειγμάτων | Κιτ 48 δειγμάτων |
| HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)   | 500              | 1560             |
| Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® Ενίσχυση βιβλιοθήκης) (σε µl) | 30               | 95               |
| Μείγμα ενζύμων FX (σε µl)  | 200              | 625              |
| Ρυθμιστικό διάλυμα FX 10x (σε µl)  | 100              | 315              |
| Ενισχυτής FX (σε µl)   | 100              | 315              |
| DNA λιγάσης (σε µl)  | 200              | 625              |
| Ρυθμιστικό διάλυμα DNA λιγάσης 5x (σε µl)  | 400              | 1250             |



**Σημαντικό:** Ανατρέξτε στις Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις πιο κάτω για πρόσθετες λεπτομέρειες.



## 4.1.2. Προειδοποιήσεις και προφυλαξεις

| Όνομα προϊόντος                     | GHS          |  |                      |  |
|-------------------------------------|--------------|--|----------------------|--|
|                                     | Εικονόγραμμα | Δηλώσεις Επικινδυνότητας και Προφύλαξης  | Προειδοποιητική λέξη | Επικίνδυνο συστατικό   |
| 2X<br>Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού |              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• H300 Θανατηφόρο σε περίπτωση κατάποσης.</li> <li>• H311 Τοξικό σε επαφή με το δέρμα.</li> <li>• H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.</li> <li>• H370 Προκαλεί βλάβες σε όργανα.</li> <li>• H370 Προκαλεί βλάβες σε όργανα (Κεντρικό νευρικό σύστημα).</li> <li>• H411 Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς με μακροχρόνιες επιπτώσεις.</li> <li>• P260 Μην αναπνέετε ατμούς/ εκνεφώματα.</li> <li>• P264 Πλύνετε σχολαστικά το μολυσμένο δέρμα μετά τον χειρισμό.</li> <li>• P270 Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε όταν χρησιμοποιείτε αυτό το προϊόν.</li> <li>• P273 Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.</li> <li>• P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο.</li> <li>• P301+P310 Σε περίπτωση κατάποσης: Καλέστε αμέσως το κέντρο δηλητηριάσεων/γιατρό.</li> <li>• P302+P352 Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα: Πλύνετε με άφθονο νερό.</li> <li>• P308+P311 Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Καλέστε το κέντρο δηλητηριάσεων ή γιατρό.</li> <li>• P321 Ειδική θεραπεία (βλ. ιατρική συμβουλή σε αυτή την ετικέτα).</li> <li>• P330 Ξεπλύνετε το στόμα.</li> <li>• P332+P313 Σε περίπτωση που παρουσιαστεί ερεθισμός του δέρματος: Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε ιατρό.</li> <li>• P362+P364 Αφαιρέστε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε.</li> <li>• P391 Συλλέξτε την ουσία ή το προϊόν που χύθηκε.</li> <li>• P405 Να φυλάσσεται κλειδωμένο.</li> </ul> | Κίνδυνος             | <b>Τετραμεθυλο-χλωριούχο αμμώνιο</b><br><b>Συγκέντρωση: 49%</b><br><b>CAS: 75-57-0</b> |



| GHS   |                 |   |                          |   |
|---|-----------------|---|--------------------------|---|
| Όνομα προϊόντος                                   | Εικονόγραμ<br>α | Δηλώσεις Επικινδυνότητας και<br>Προφύλαξης  | Προειδοποιητι<br>κή λέξη | Επικίνδυνο συστατικό  |
| Ενισχυτής ρυθμιστικού<br>διαλύματος<br>υβριδισμού |                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• P501 Απορρίψτε το περιεχόμενο/<br/>περιέκτη σύμφωνα με τους εθνικούς<br/>κανονισμούς.</li> </ul>   |                          |   |
| Ενισχυτής ρυθμιστικού<br>διαλύματος<br>υβριδισμού |                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• H351 Υποπτο για πρόκληση καρκίνου.</li> <li>• H360 Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή<br/>το έμβρυο.</li> <li>• H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα<br/>όργανα λόγω παρατεταμένης ή<br/>επανεπιλημμένης έκθεσης.</li> <li>• P201 Λάβετε ειδικές οδηγίες πριν από τη<br/>χρήση.</li> <li>• P202 Μην το χειρίζεστε έως ότου<br/>διαβάσετε και κατανοήσετε όλες τις<br/>προφυλάξεις ασφαλείας.</li> <li>• P260 Μην αναπνέετε ατμούς/<br/>εκνεφώματα.</li> <li>• P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/<br/>προστατευτικά ενδύματα/ μέσα<br/>ατομικής προστασίας για τα μάτια/<br/>πρόσωπο.</li> <li>• P308+P313 Σε περίπτωση έκθεσης ή<br/>ανησυχίας:<br/>Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε ιατρό.</li> <li>• P314 Συμβουλευθείτε/ επισκεφθείτε<br/>ιατρό εάν αισθάνεστε αδιαθεσία.</li> <li>• P405 Να φυλάσσεται κλειδωμένο.</li> <li>• P501 Απορρίψτε το περιεχόμενο/<br/>περιέκτη σύμφωνα με τους εθνικούς<br/>κανονισμούς.</li> </ul> | Κίνδυνος                 | <b>Φορμαμίδη</b><br><b>Συγκέντρωση: 100%</b><br><b>CAS: 75-12-7</b>   |
| 10x Ρυθμιστικό<br>διάλυμα αυστηρής<br>έκπλυσης    |                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• H302 Επιβλαβές σε περίπτωση<br/>κατάποσης.</li> <li>• H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.</li> <li>• H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό<br/>ερεθισμό</li> </ul>   | Κίνδυνος                 | <b>Δινάτριο άλας</b><br><b>αιθυλενοδιαμινοτετραο</b><br><b>ξικού οξέος</b><br><b>Συγκέντρωση: 2,5%</b><br><b>CAS: 6381-92-6</b> |
| 10x Ρυθμιστικό<br>διάλυμα έκπλυσης I              |                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• H228 Εύφλεκτο στερεό.</li> <li>• H302 Επιβλαβές σε περίπτωση<br/>κατάποσης.</li> <li>• H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.</li> <li>• H318 Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική<br/>βλάβη.</li> <li>• H332 Επιβλαβές σε περίπτωση<br/>εισπνοής.</li> <li>• H401 Τοξικό για τους υδρόβιους<br/>οργανισμούς.</li> </ul>  | Κίνδυνος                 | <b>Δωδεκυλοθειικό νάτριο</b><br><b>Συγκέντρωση: 4,9%</b><br><b>CAS: 151-21-3</b>  |



| GHS                               |                 |   |                        |   |
|-----------------------------------|-----------------|---|------------------------|---|
| Όνομα προϊόντος                   | Εικονόγραμ<br>α | Δηλώσεις Επικινδυνότητας και<br>Προφύλαξης  | Προειδοποιη<br>τή λέξη | Επικίνδυνο συστατικό  |
|                                   |                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• H402 Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς.</li> <li>• H412 Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς με μακροχρόνιες επιπτώσεις.</li> <li>• P273 Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.</li> <li>• P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο.</li> <li>• P305+P351+P338 Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αφαιρέστε τους φακούς επαφής, εάν φοράτε και είναι εύκολο να το κάνετε. Συνεχίστε το ξέπλυμα.</li> <li>• P310 Καλέστε αμέσως το κέντρο δηλητηριάσεων/γιατρό.</li> <li>• P501 Απορρίψτε το περιεχόμενο/ περιέκτη σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς.</li> </ul> |                        |   |
| Ρυθμιστικό διάλυμα DNA λιγάσης 5x |                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• H335 Μπορεί να προκαλέσει αναπνευστικό ερεθισμό.</li> <li>• P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο/ ακοή.</li> </ul>  | Προειδοποίηση          | <b>πολυ(αιθυλενογλυκόλη)</b><br><b>Συγκέντρωση:</b> 1-5%<br><b>CAS:</b> 9002-93-1 |

Χρησιμοποιείτε  και  ως μέσα ατομικής προστασίας.



### 4.1.3. Υλικό που απαιτείται (δεν παρέχεται)

#### ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΧΡΗΣΤΗ (ΑΓΟΡΑΖΟΝΤΑΙ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ)

- KAPA™ Library Amplification kit KK2620 (Κιτ ενίσχυσης βιβλιοθήκης KAPA™ KK2620) (Κατ. Roche Αριθ.: 07958978001)
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase
- Σωλήνες 1,5 ml χαμηλής δέσμησης DNA
- Σωλήνες 1,5 ml
- Κωνικοί σωλήνες 50 ml
- Επιστόμια φίλτρων
- Αιθανόλη (βαθμίδα μοριακής βιολογίας)
- Illumina® sequencing reagents (Αντιδραστήρια αλληλούχησης Illumina®)

#### ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Για να αποφύγετε τη μόλυνση του δείγματος:

- Ζώνη Προ-PCR
  - Φθοριομετρικός ποσοτικός εξοπλισμός και αντιδραστήρια
  - Μαγνητική βάση διαχωρισμού (τύπου 96 φρεατίων)
  - Πολυκάναλες πιπέτες (P10 ή P20, P100, P200)
  - Επιτραπέζιος μικροφυγοκεντρητής (συμβατός με ταινίες 8 σωλήνων)
  - Θερμικός κυκλοποιητής (προγραμματιζόμενο θερμαινόμενο καπάκι)
  - Αναδευτήρας Vortex
- Ζώνη Μετά-PCR
  - Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης
  - Συμπυκνωτής κενού DNA
  - Θερμομπλόκ ή υδατόλουτρο (συμβατό με σωλήνες 1,5 ml)
  - Φθοριομετρικός ποσοτικός εξοπλισμός και αντιδραστήρια
  - Μαγνητική βάση διαχωρισμού (συμβατό με σωλήνες 1,5 ml)
  - Μαγνητική βάση διαχωρισμού (τύπου 96 φρεατίων)
  - Πολυκάναλες πιπέτες (P10 ή P20, P100, P200)
  - Επιτραπέζιος μικροφυγοκεντρητής (συμβατός με ταινίες 8 σωλήνων)
  - Θερμικός κυκλοποιητής (προγραμματιζόμενο θερμαινόμενο καπάκι)
  - Αναδευτήρας Vortex



## 4.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

### 4.2.1. Γονιδιωματική Προετοιμασία DNA

#### ΥΛΙΚΑ

- Δίκλωνο γονιδιωματικό DNA υψηλής ποιότητας (gDNA)
- Ενισχυτής FX
- IDTE
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase

#### ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ

Η ακεραιότητα, η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA είναι καίριας σημασίας κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου. Η καθαρότητα του DNA μπορεί να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο UV. Οι συνιστώμενες αναλογίες απορρόφησης είναι μεταξύ 1,8-2,0 για αναλογία 260/280 και εντός 1,6-2,4 για 260/230. Προτείνουμε επιβεβαίωση της ακεραιότητας του δείγματος με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ή μια αντίστοιχη τεχνική. Για να αποφευχθούν λάθη με την εισαγωγή DNA, συνιστάται αρχική αραίωση για να επιτευχθεί συγκέντρωση στην περιοχή 50 έως 100 ng/μl. Η συγκέντρωση DNA θα πρέπει να επιβεβαιωθεί μέσω φθοριομετρικής ποσοτικοποίησης (π.χ. Qubit®, Thermo Fisher) και η τιμή που προκύπτει να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της τελικής αραίωσης.

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Αφαιρέστε τον Ενισχυτή FX από αποθήκευση στους -20°C και πραγματοποιήστε απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απόψυξη, αναμίξτε το αντιδραστήριο αναστρέφοντας απαλά τον σωλήνα 5 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση σε μικροφυγοκεντρική.

Ανάλογα με τη μορφή του κιτ, ο αριθμός δειγμάτων DNA που θα συγκεντρωθούν ανά αντίδραση σύλληψης θα ποικίλλει σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη προτού αρχίσετε.

| ΜΟΡΦΗ ΚΙΤ                                   | Κιτ 16<br>δειγμάτων | Κιτ 32<br>δειγμάτων | Κιτ 48<br>δειγμάτων | Κιτ 96<br>δειγμάτων* |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Αριθμός μεμονωμένων βιβλιοθηκών ανά σύλληψη | 4                   | 8                   | 12                  | 12                   |

\* Για 96 δείγματα παρέχονται δύο κιτ 48 δειγμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν 8 αντιδράσεις σύλληψης.



## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προετοιμάστε τις ακόλουθες ταινίες PCR σύμφωνα με τον αριθμό αντιδράσεων:

| ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ | 4            | 8            | 12           | 16           | 24           | 32           | 48           |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ταινία PCR          | 4<br>σωλήνες | 4<br>σωλήνες | 4<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες |
| Αριθμός ταινιών     | 1            | 2            | 3            | 2            | 3            | 4            | 6            |

2. Προετοιμάστε μια αραιώση για κάθε δείγμα γονιδιωματικού DNA (gDNA) υψηλής ποιότητας στον κατάλληλο αριθμό ταινιών PCR, με τον ακόλουθο τρόπο:

| ΑΡΑΙΩΣΗ gDNA |                       |
|--------------|-----------------------|
| gDNA         | 200 ng                |
| IDTE         | Συμπληρώστε στα 30 μl |

- Αναμίξτε στιγμιαία μετακινώντας απαλά μια πιπέτα πάνω και κάτω 5 φορές και στη συνέχεια προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση σε μικροφυγοκεντρική για να συλλέξετε όλο το υγρό.



**Συμβουλή:** Ασφαλές σημείο στάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C.

- Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, προχωρήστε ως ακολούθως:
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **4 δειγμάτων**, προσθέστε 5 μl ενισχυτή FX σε κάθε σωλήνα της ταινίας 4 σωλήνων που περιέχει 30 μl δείγματα gDNA (σύνολο 35 μl σε κάθε σωλήνα της ταινίας 4 σωλήνων).
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **8 ή περισσότερων δειγμάτων**, προχωρήστε ως ακολούθως:
    - a. Για να διευκολύνετε τη μεταφορά με πιπέτα, δημιουργήστε μια δεξαμενή Ενισχυτή FX προσθέτοντας τους ακόλουθους όγκους σε ένα νέο σετ ταινιών 4 ή 8 σωλήνων σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

| ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ   | 8                | 12               | 16               | 24               | 32               | 48               |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Ταινία PCR (1 ταινία) | 4<br>σωλήν<br>ες | 4<br>σωλήν<br>ες | 8<br>σωλήν<br>ες | 8<br>σωλήν<br>ες | 8<br>σωλήν<br>ες | 8<br>σωλήν<br>ες |
| Ενισχυτής FX (σε μl)  | 11,5             | 17,5             | 11,5             | 17,5             | 24               | 36               |

- b. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 5 μl του Ενισχυτή FX από τους πιο πάνω σωλήνες στα δείγμα gDNA 30 μl (συνολικά 35 μl σε κάθε σωλήνα των ταινιών 4 ή 8 σωλήνων).
- Χρησιμοποιώντας μια πολυκάναλη πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 20 μl, αναμίξτε απαλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 5 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση σε μικροφυγοκεντρική.

3. Διατηρήστε σε πάγο έως ότου ρυθμιστεί η αντίδραση ενζυμικού κατακερματισμού.



## 4.2.2. Προ-μείγματα και Προετοιμασία αντιδραστηρίων

### ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Μείγμα ενζύμων FX
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x
- Ρυθμιστικό διάλυμα DNA λιγάσης 5x
- DNA λιγάσης
- HiFi PCR Master Mix 2x
- Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® Ενίσχυση βιβλιοθήκης)
- Νερό χωρίς νουκλεάση
- Σφαιρίδια AMPure® XP
- Αιθανόλη

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

- Αφαιρέστε τα συστατικά του SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I από την αποθήκευση στους -20°C και απόψυξη σε πάγο.
- Αφαιρέστε την πλάκα προσαρμογών διπλού δείκτη από την αποθήκευση στους -20°C και τοποθετήστε την στο ψυγείο στους 4°C για μελλοντική χρήση.
- Αφαιρέστε τα σφαιρίδια AMPure® XP από αποθήκευση στους 2-8°C και αφήστε τα να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά.
- Προετοιμάστε φρέσκια αιθανόλη 80% (όγκος σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα, με βάση τον αριθμό αντιδράσεων):

| 80% ΑΙΘΑΝΟΛΗ         |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Αριθμός αντιδράσεων  | 4  | 8  | 12 | 16 | 24 | 32 | 48 |
| 80% αιθανόλη (σε ml) | 10 | 20 | 30 | 30 | 40 | 50 | 70 |

- Αφού αποψυχθούν τα συστατικά του SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I, αναμίξτε τα αντιδραστήρια αντιστρέφοντας τον σωλήνα 5-10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση σε μικροφυγοκεντρική.

### ΠΡΟ-ΜΕΙΓΜΑΤΑ

1. Προετοιμάστε το **Προ-μείγμα αντίδρασης FX** ως ακολούθως:

| ΠΡΟ-ΜΕΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ FX          |      |      |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Αριθμός αντιδράσεων               | 4    | 8    | 12  | 16  | 24  | 32  | 48  |
| Ρυθμιστικό διάλυμα FX 10x (σε ml) | 23,6 | 47,1 | 75  | 95  | 150 | 190 | 300 |
| Μείγμα ενζύμων FX (σε ml)         | 47,1 | 94,2 | 150 | 190 | 300 | 380 | 600 |

- Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.
- Διατηρήστε σε πάγο.



2. Προετοιμάστε το **προ-μείγμα αντίδρασης λιγάσης** ως ακολούθως:

| ΠΡΟ-ΜΕΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΛΙΓΑΣΗΣ  |      |       |     |     |     |     |      |
|--------------------------------|------|-------|-----|-----|-----|-----|------|
| Αριθμός αντιδράσεων            | 4    | 8     | 12  | 16  | 24  | 32  | 48   |
| DNA Ligation Buffer 5x (in μl) | 95   | 190   | 300 | 380 | 600 | 760 | 1200 |
| DNA λιγάσης (σε μl)            | 47,5 | 95    | 150 | 190 | 300 | 380 | 600  |
| Νερό χωρίς νουκλεάση (σε μl)   | 71,3 | 142,5 | 225 | 285 | 450 | 570 | 900  |

- Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.
- Διατηρήστε σε πάγο.



**Σημαντικό:** Το Ρυθμιστικό διάλυμα DNA λιγάσης είναι πολύ παχύρρευστο, γι' αυτό θα πρέπει να το μεταφέρετε απαλά με πιπέτα και να φροντίσετε να λάβετε ένα ομοιογενές προ-μείγμα αντίδρασης λιγάσης.

3. Προετοιμάστε το **προ-μείγμα PCR** ως ακολούθως:

| ΠΡΟ-ΜΕΙΓΜΑ PCR   |      |      |      |      |      |       |       |
|--|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Αριθμός αντιδράσεων  | 4    | 8    | 12   | 16   | 24   | 32    | 48    |
| HiFi PCR Master Mix 2x (in μl)   | 115  | 230  | 345  | 460  | 690  | 920   | 1380  |
| Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® Ενίσχυση βιβλιοθήκης) (σε μl) | 6,9  | 13,8 | 20,7 | 27,6 | 41,4 | 55,2  | 82,8  |
| Νερό χωρίς νουκλεάση (σε μl)   | 16,1 | 32,2 | 48,3 | 64,4 | 96,6 | 128,2 | 193,2 |

- Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.
- Διατηρήστε σε πάγο.



## 4.2.3. Ενζυμικός κατακερματισμός, επιδιόρθωση End Repair και A-Tailing

### ΥΛΙΚΑ

- Αραιωμένο και ρυθμισμένο δίκλωνο g DNA σε 35 μl
- Προ-μείγμα Αντίδραση FX
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

- Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή για Κατακερματισμό FX με τις ακόλουθες ρυθμίσεις:

|           | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C) | ΧΡΟΝΟΣ (ΛΕΠΤΑ) |
|-----------|------------------|----------------|
| Καπάκι    | 70               | -              |
| Βήμα 1    | 4                | 1              |
| Βήμα 2    | 32               | 5              |
| Βήμα 3    | 65               | 30             |
| Διατήρηση | 4                | ∞              |

- Αρχίστε το πρόγραμμα Κατακερματισμός FX. Όταν το μπλοκ φτάσει στο Βήμα 1 (4°C), σταματήστε το πρόγραμμα.

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ



**Σημαντικό:** Διατηρείτε πάντα τα δείγματα και το προ-μείγμα σε πάγο πριν και μετά την επώαση για να αποκλείσετε την ενζυματική αντίδραση.

1. Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, προχωρήστε ως ακολούθως:
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **4 δειγμάτων**, προχωρήστε στο βήμα 2.
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **8 ή περισσότερων δειγμάτων**, για να διευκολύνετε τη μεταφορά με πιπέτα, δημιουργήστε μια δεξαμενή προ-μείγματος Αντίδραση FX προσθέτοντας τους ακόλουθους όγκους σε ένα νέο σετ ταινιών 4 ή 8 σωλήνων σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

| ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ             | 8            | 12           | 16           | 24           | 32           | 48           |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ταινία PCR (1 ταινία)           | 4<br>σωλήνες | 4<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες |
| Προ-μείγμα Αντίδραση FX (σε μl) | 33           | 52,5         | 33           | 52,5         | 66           | 105          |



## 2. Συγκεντρώστε την αντίδραση ως ακολούθως:

- Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα εάν επεξεργάζεστε 8 ή περισσότερα δείγματα, προσθέστε 15 μl προ-μείγματος Αντίδραση FX σε κάθε ένα από τα δείγματα gDNA των 35 μl (συνολικά 50 μl σε ταινίες 4 ή 8 σωλήνων).
- Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 40 μl (πολυκάναλη εάν επεξεργάζεστε 8 ή περισσότερα δείγματα), αναμίξτε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 5 φορές και προκαλέστε περιδίνηση στιγμιαία σε μικροφυγοκεντρική.

## 3. Τοποθετήστε το στον θερμικό κυκλοποιητή και συνεχίστε το πρόγραμμα Κατακερματισμός FX.

Προχωρήστε αμέσως στην Αντίδραση λιγάσης

## 4.2.4. Αντίδραση λιγάσης

### ΥΛΙΚΑ

- Προϊόντα αντίδρασης Κατακερματισμού FX σε 50 μl έκαστο
- Προ-μείγμα αντίδρασης λιγάσης
- Προσαρμογείς διπλού δείκτη
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

- Αφαιρέστε την πλάκα του προσαρμογέα διπλού δείκτη από τους 4°C (μεταφέρθηκε από τους -20°C στους 4°C νωρίτερα) και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση στην πλάκα για να συλλέξετε όλο το υγρό. Ανατρέξτε στο Παράρτημα 1 για την αντίστοιχη μορφή πλάκας.
- Κατά τη διάρκεια του Κατακερματισμού FX προετοιμάστε νέες ταινίες PCR με 5 μl διαφορετικών Προσαρμογέων διπλού δείκτη ανά σωλήνα, βάσει της στρατηγικής ευρετηρίασής σας, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

| ΑΡΙΘΜΟΣ<br>ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ | 4            | 8            | 12           | 16           | 24           | 32           | 48           |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ταινία PCR             | 4<br>σωλήνες | 4<br>σωλήνες | 4<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες | 8<br>σωλήνες |
| Αριθμός ταινιών        | 1            | 2            | 3            | 2            | 3            | 4            | 6            |

- Ρυθμίστε τον θερμικό κυκλοποιητή στους 20°C (ανοιχτό καπάκι)



## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, προχωρήστε ως ακολούθως:
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **4 δειγμάτων**, προχωρήστε στο βήμα 2.
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **8 ή περισσότερων δειγμάτων**, για να διευκολύνετε τη μεταφορά με πιπέτα, δημιουργήστε μια δεξαμενή προ-μείγματος αντίδρασης λιγάσης σε ένα νέο σετ ταινιών PCR σωλήνων σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

| ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ        | 8       | 12      | 16      | 24      | 32      | 48      |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Ταινία PCR (1 ταινία)      | 4       | 4       | 8       | 8       | 8       | 8       |
|                            | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες |
| Προ-μείγμα λιγάσης (σε μl) | 100     | 160     | 100     | 160     | 200     | 320     |

- Χρησιμοποιώντας μια πολυκάναλη πιπέτα, μεταφέρετε τα 50 μl από ένα προϊόν αντίδρασης Κατακερματισμού FX στις ταινίες 4 ή 8 σωλήνων που περιέχουν 5 μl Προσαρμογείς διπλού δείκτη.
- Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.
- Χρησιμοποιώντας μια πολυκάναλη πιπέτα, εάν επεξεργάζεστε 8 ή περισσότερα δείγματα, προσθέστε 45 μl Προ-μείγματος αντίδρασης λιγάσης σε κάθε προϊόν αντίδρασης Κατακερματισμού FX (55 μl σε κάθε σωλήνα της ταινίας 4 ή 8 σωλήνων).
- Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.
- Επωάστε στον θερμικό κυκλοποιητή στους 20°C για 15 λεπτά (ανοικτό καπάκι).



**Σημαντικό:** Μην τοποθετείτε τις ταινίες σε πάγο στο τέλος της αντίδρασης λιγάσης καθώς μπορεί να μειώσει τη δέσμευση του DNA στα σφαιρίδια.

Προχωρήστε σε Καθαρισμό μετά από αντίδραση λιγάσης.

### 4.2.5. Καθαρισμός μετά από αντίδραση λιγάσης

#### ΥΛΙΚΑ

- Προϊόντα αντίδρασης λιγάσης σε 100 μl έναστο
- Τα σφαιρίδια AMPure XP εξισορροπήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- Φρεσκοπαρασκευασμένη αιθανόλη 80%
- Νερό χωρίς νουκλεάση
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase



## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 80 μl σφαιριδίων AMPure® XP σε κάθε ένα από τα προϊόντα αντίδρασης λιγάνης 100 μl. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές.
2. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.
3. Τοποθετήστε την ταινία 4 ή 8 σωλήνων σε μαγνητική βάση πλάκας 96 φρεατίων για 5 λεπτά ή μέχρι να γίνει το υγρό διαυγές.
4. Απορρίψτε προσεκτικά 170 μl υπερκείμενου χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.

### **Κρατήστε τους σωλήνες στη μαγνητική βάση για τα ακόλουθα βήματα.**

5. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 170 μl αιθανόλης 80% στα σφαιρίδια. Επώαστε για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.
6. Απορρίψτε προσεκτικά την αιθανόλη χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.
7. Επαναλάβετε τα βήματα 5 και 6 μία φορά.
8. Αφαιρέστε την υπολειπόμενη αιθανόλη χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα P10 ή P20.
9. Στεγνώστε τα σφαιρίδια στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μην στεγνώνετε υπερβολικά τα σφαιρίδια καθώς αυτό θα μπορούσε να μειώσει την ποσότητα του ανακτημένου DNA.

### **Αφαιρέστε τους σωλήνες από τη μαγνητική βάση.**

10. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 105 μl νερού χωρίς νουκλεάση στα σφαιρίδια και περιμένετε μερικά δευτερόλεπτα.

Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.

11. Τοποθετήστε τις ταινίες 4 ή 8 σωλήνων σε μαγνητική βάση πλάκας 96 φρεατίων για 5 λεπτά ή μέχρι να γίνει το υγρό διαυγές.
12. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, μεταφέρετε προσεκτικά 100 μl του υπερκείμενου σε νέες, επισημασμένες ταινίες 4 ή 8 σωλήνων.

Προχωρήστε στην Επιλογή διπλού μεγέθους.

## 4.2.6. Επιλογή διπλού μεγέθους

### ΥΛΙΚΑ

- Προϊόντα αντίδρασης λιγάνης σε 100 μl έκαστο
- Τα σφαιρίδια AMPure XP εξισορροπήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- Φρεσκοπαρασκευασμένη αιθανόλη 80%
- IDTE
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase



## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 60 μl σφαιριδίων AMPure XP σε κάθε ένα από τα προϊόντα αντίδρασης λιγάσης 100 μl. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές.
2. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.
3. Τοποθετήστε τις ταινίες 4 ή 8 σωλήνων σε μαγνητική βάση πλάκας 96 φρεατίων για 5 λεπτά ή μέχρι να γίνει το υγρό διαυγές.
4. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, να μεταφέρετε προσεκτικά 140 μl του υπερκειμένου σε νέες, επισημασμένες ταινίες 4 ή 8 σωλήνων οι οποίες περιέχουν 20 μl σφαιριδίων AMPure XP. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές.
5. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.
6. Τοποθετήστε τις ταινίες 4 ή 8 σωλήνων σε μαγνητική βάση πλάκας 96 φρεατίων για 3 λεπτά ή μέχρι να γίνει το υγρό διαυγές.
7. Απορρίψτε προσεκτικά 150 μl του υπερκειμένου χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.

### **Κρατήστε τους σωλήνες στη μαγνητική βάση για τα ακόλουθα βήματα.**

8. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 170 μl αιθανόλης 80% στα σφαιρίδια.  
Αφήστε τους σωλήνες να σταθούν για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.
9. Απορρίψτε προσεκτικά την αιθανόλη χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.
10. Να επαναλάβετε τα βήματα 8 και 9 μία φορά.
11. Αφαιρέστε την υπολειπόμενη αιθανόλη χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα P10 ή P20.
12. Στεγνώστε τα σφαιρίδια στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά. Μην στεγνώνετε υπερβολικά τα σφαιρίδια καθώς αυτό θα μπορούσε να μειώσει την ποσότητα του ανακτημένου DNA.

### **Αφαιρέστε τους σωλήνες από τη μαγνητική βάση.**

13. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 20 μl IDTEM στα σφαιρίδια. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.

Προχωρήστε στην Ενίσχυση βιβλιοθήκης.

## 4.2.7. Ενίσχυση βιβλιοθήκης

### ΥΛΙΚΑ

- Επιλεγμένη αντίδραση λιγάσης διπλού μεγέθους Προϊόντα και σφαιρίδια επανεναιωρημένα σε 20 μl IDTE το κάθε ένα
- Προ-μείγμα PCR



## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή για Ενίσχυση βιβλιοθήκης με τις ακόλουθες ρυθμίσεις:

|                           | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ<br>(°C) | ΧΡΟΝΟΣ<br>(ΔΕΥΤΕΡΟΛΕΠΤΑ) |          |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|----------|
| Καπάκι                    | 99                  | -                        |          |
| Βήμα 1: Αρχική μετουσίωση | 98                  | 120                      |          |
| Βήμα 2: Μετουσίωση        | 98                  | 20                       | 8 κύκλοι |
| Βήμα 3: Ανόπτηση          | 60                  | 30                       |          |
| Βήμα 4: Επέκταση          | 72                  | 30                       |          |
| Βήμα 5: Τελική επέκταση   | 72                  | 60                       |          |
| Διατήρηση                 | 10                  | ∞                        |          |

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, προχωρήστε ως ακολούθως:
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **4 δειγμάτων**, προχωρήστε στο βήμα 2.
  - Σε περίπτωση επεξεργασίας **8 ή περισσότερων δειγμάτων**, προχωρήστε ως ακολούθως:
    - Για να διευκολύνετε τη μεταφορά με πιπέτα, δημιουργήστε μια δεξαμενή με Προ-μείγμα PCR προσθέτοντας τους ακόλουθους όγκους σε ένα νέο σετ ταινιών 4 ή 8 σωλήνων σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

| ΑΡΙΘΜΟΣ<br>ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ | 8       | 12      | 16      | 24      | 32      | 48      |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Ταινία PCR (1 ταινία)  | 4       | 4       | 8       | 8       | 8       | 8       |
|                        | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες | σωλήνες |
| Προ-μείγμα PCR (σε μl) | 65      | 100     | 65      | 100     | 130     | 200     |

- Συγκεντρώστε την αντίδραση ως ακολούθως:
  - Χρησιμοποιώντας μια πολυκάναλη πιπέτα, εάν επεξεργάζεστε 8 ή περισσότερα δείγματα, προσθέστε 30 μl προ-μείγματος PCR στη διπλού μεγέθους επιλεγμένη αντίδραση λιγάσης Προϊόντα και σφαιρίδια (συνολικός όγκος 50 μl = 30 μl + 20 μl).



- Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.
3. Τοποθετήστε τους σωλήνες στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα Ενίσχυση βιβλιοθήκης.



**Συμβουλή:** Ασφαλές σημείο στάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C.

## 4.2.8. Καθαρισμός μετά από ενίσχυση

### ΥΛΙΚΑ

- Προϊόντα αντίδρασης PCR σε 50 μl έκαστο
- Τα σφαιρίδια AMPure XP εξισορροπήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- Φρεσκοπαρασκευασμένη αιθανόλη 80%
- Νερό χωρίς νουκλεάση
- Σωλήνες χαμηλής δέσμευσης DNA για την αποθήκευση βιβλιοθηκών

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 50 μl σφαιριδίων AMPure XP σε κάθε ένα από τα προϊόντα PCR των 50 μl. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές.
2. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.
3. Τοποθετήστε τις ταινίες 4 ή 8 σωλήνων σε μαγνητική βάση πλάκας 96 φρεατίων για 5 λεπτά ή μέχρι να γίνει το υγρό διαυγές.

4. Απορρίψτε προσεκτικά 90 μl υπερκείμενου χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.

**Κρατήστε τους σωλήνες στη μαγνητική βάση για τα ακόλουθα βήματα.**

5. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 170 μl αιθανόλης 80% στα σφαιρίδια.  
Αφήστε τους σωλήνες να σταθούν για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.
6. Απορρίψτε προσεκτικά την αιθανόλη χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.
7. Επαναλάβετε τα βήματα 5 και 6 μία φορά.
8. Αφαιρέστε την υπολειπόμενη αιθανόλη χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα P10 ή P20.
9. Στεγνώστε τα σφαιρίδια στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μην στεγνώνετε υπερβολικά τα σφαιρίδια καθώς αυτό θα μπορούσε να μειώσει την ποσότητα του ανακτημένου DNA.

**Αφαιρέστε τους σωλήνες από τη μαγνητική βάση.**



10. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 20 μl νερού χωρίς νουκλεάση στα σφαιρίδια. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.
11. Τοποθετήστε την ταινία 4 ή 8 σωλήνων σε μαγνητική βάση πλάκας 96 φρεατίων για 5 λεπτά ή μέχρι να γίνει το υγρό διαυγές.
12. Μεταφέρετε προσεκτικά 18 μl του υπερκειμένου (συνιστάται μεταφορά δύο φορές 9 μl σε αυτό το βήμα) σε ένα νέο, επισημασμένο σωλήνα αποθήκευσης βιβλιοθήκης.



**Συμβουλή:** Ασφαλές σημείο στάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C ή -20 °C για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας.

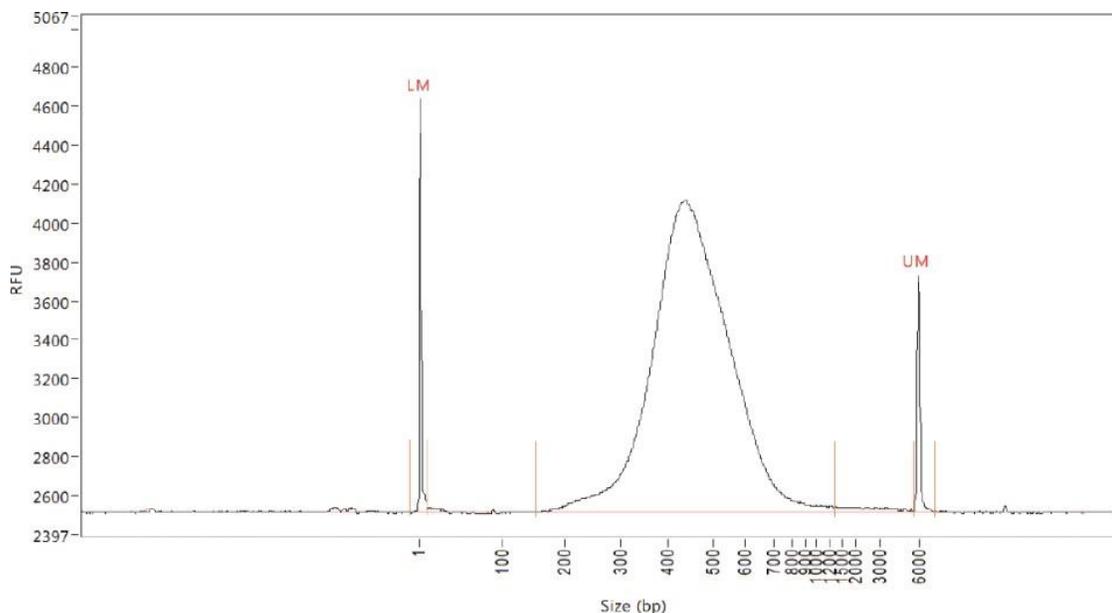
## 4.2.9. Ποσοτικοποίηση Μεμονωμένης βιβλιοθήκης και Ποιοτικός έλεγχος

### ΥΛΙΚΑ

- Φθοριομετρικός ποσοτικός εξοπλισμός και αντιδραστήρια
- Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης
- Νερό χωρίς νουκλεάση
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προετοιμάστε μια αραιώση 4 φορές κάθε βιβλιοθήκης με νερό χωρίς νουκλεάση (π.χ. 2 μl βιβλιοθήκης σε 6 μl νερό χωρίς νουκλεάση).
2. Ποσοτικοποιήστε τις βιβλιοθήκες με φθοριομετρική μέθοδο (π.χ. ποσοτικοποίηση Qubit HS χρησιμοποιώντας 2 μl της αραιώσης βιβλιοθήκης 4x, όπως αναφέρεται πιο πάνω).
3. Ελέγξτε την ποιότητα των βιβλιοθηκών αναλύοντας το προφίλ τους μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Τα θραύσματα DNA της βιβλιοθήκης πρέπει να έχουν κατανομή μεγέθους μεταξύ τους 300bp και 700bp.



Παράδειγμα κατανομής βιβλιοθήκης DNA που ελήφθη μέσω του συστήματος τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης Agilent Fragment Analyzer (Ευέλικτος αναλυτής θραυσμάτων). UM-Ανώτερος δείκτης, LM-Κατώτερος δείκτης

## 4.3. Σύλληψη

### 4.3.1. Συνένωση βιβλιοθήκης

#### ΥΛΙΚΑ

- Μεμονωμένες βιβλιοθήκες
- Ανθρώπινο Cot DNA
- Universal Blockers - TS Mix (Καθολικοί αναστολείς - Μείγμα TS)
- Σωλήνες 1,5 ml χαμηλής δέσμησης DNA

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προετοιμάστε ένα προ-μείγμα των ακόλουθων σε έναν σωλήνα χαμηλής δέσμησης DNA:

| ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΛΛΗΨΕΩΝ<br>(Ανατρέξτε στον πίνακα, στο σημείο 3)                        | 1 | 2   | 3    | 4   |
|---|---|-----|------|-----|
| Ανθρώπινο Cot DNA (σε µl)   | 5 | 11  | 16,5 | 22  |
| Universal Blockers - TS Mix (σε µl)<br>(Καθολικοί αναστολείς - Μείγμα TS (σε µl)) | 2 | 4,4 | 6,6  | 8,8 |



- Εάν εκτελείτε δύο ή περισσότερες συλλήψεις, να μεταφέρετε με πιπέτα 7 μl από το πιο πάνω προ-μείγμα σε μεμονωμένους σωλήνες χαμηλής δέσμησης DNA.
- Στους μεμονωμένους σωλήνες που περιέχουν το πιο πάνω προ-μείγμα, προσθέστε μια ομάδα μεμονωμένων βιβλιοθηκών σύμφωνα με τη μορφή του κιτ:

| ΜΟΡΦΗ ΚΙΤ                                   | Κιτ 16<br>δειγμάτων | Κιτ 32<br>δειγμάτων | Κιτ 48<br>δειγμάτων | Κιτ 96<br>δειγμάτων |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Αριθμός μεμονωμένων βιβλιοθηκών ανά σύλληψη | 4                   | 8                   | 12                  | 12                  |
| Ποσότητα κάθε βιβλιοθήκης ανά σύλληψη       | 300 ng              | 200 ng              | 150 ng              | 150 ng              |
| Συνολικός αριθμός βιβλιοθηκών ανά σύλληψη   | 1200 ng             | 1600 ng             | 1800 ng             | 1800 ng             |

- Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση.
- Στεγνώστε κάθε μείγμα χρησιμοποιώντας συμπυκνωτή DNA υπό κενό, μέχρι το μείγμα να λυοφιλοποιηθεί πλήρως. Χρησιμοποιήστε ήπια θέρμανση (45-50°C) για να επιταχύνετε τη λυοφιλοποίηση.



**Συμβουλή:** Ασφαλές σημείο στάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας στους -20 °C.

## 4.3.2. Υβριδισμός

### ΥΛΙΚΑ

- Λυοφιλοποιημένες βιβλιοθήκες
- 2x Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού
- Ενισχυτής ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού
- Ανιχνευτές Myeloid Solution (Διάλυμα μυελοειδούς)
- Νερό χωρίς νουκλεάση
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase
- Σωλήνες 1,5 ml
- 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I
- 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II
- 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης III
- 10x Ρυθμιστικό διάλυμα αυστηρής έκπλυσης
- 2x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

- Προθερμάνετε τον θερμικό κυκλοποιητή στους 95°C (ρυθμίστε το καπάκι στους 99°C).
- Μετά τη 10λεπτη μετουσίωση, αλλάξτε αμέσως στους 65°C (ρυθμίστε το καπάκι στους 75°C).



**Σημαντικό:** Προτείνουμε χρήση διαφορετικών θερμικών κυκλοποιητών για επωάσεις 95 °C και 65 °C, εάν υπάρχουν.



## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προετοιμάστε ένα προ-μείγμα υβριδισμού σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων σύλληψης:

| ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΛΛΗΨΕΩΝ                                   | 1   | 2    | 3     | 4     |
|---|-----|------|-------|-------|
| 2x Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (σε μl)            | 8,5 | 18,7 | 28,05 | 37,4  |
| Ενισχυτής ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού (σε μl) | 3,4 | 7,48 | 11,22 | 14,96 |
| Νερό χωρίς νουκλεάση (σε μl)                        | 1,1 | 2,42 | 3,63  | 4,84  |

2. Επανεναυρώστε το λυοφιλοποιημένο ίζημα σε 13 μl του προ-μείγματος υβριδοποίησης.
3. Μεταφέρετε το επανεναυρωμένο ίζημα σε σωλήνα PCR (έναν σωλήνα ανά αντίδραση σύλληψης).
4. Επιάστε στον θερμικό κυκλοποιητή στους 95°C για 10 λεπτά.



**Σημαντικό:** Μην αφήνετε τη θερμοκρασία του σωλήνα να πέσει κάτω από τους 65 °C από το βήμα 3 έως το 5, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ανόπτηση του ανιχνευτή.

5. Μετακινήστε τον σωλήνα PCR από τον θερμικό κυκλοποιητή 95°C στους 65°C κι έπειτα προσθέστε 4 μl ανιχνευτών στο μείγμα. Χρησιμοποιώντας πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 13 μl, αναμίξτε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 5 φορές.
6. Επιάστε στον θερμικό κυκλοποιητή στους 65°C για 4 ώρες.
7. Προετοιμάστε εκ των προτέρων τα 1x διαλύματα εργασίας διαφορετικών ρυθμιστικών διαλύματος έκπλυσης, όπως περιγράφεται στις ακόλουθες σελίδες, για να τους επιτρέψετε να φτάσουν σε ισορροπία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υβριδισμού.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ ΓΙΑ 1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

| ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ                        | ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ (μl) | ΝΕΡΟ (μl) | ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ 1Χ (μl) |
|---|------------------------------------|-----------|-----------------------|
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I         | 33                                 | 297       | 330                   |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II        | 22                                 | 198       | 220                   |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης III       | 22                                 | 198       | 220                   |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα αυστηρής έκπλυσης  | 44                                 | 396       | 440                   |
| 2x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων | 275                                | 275       | 550                   |



**Σημαντικό:** Προθερμάνετε 1x Αυστηρό ρυθμιστικό διάλυμα και ποσότητα 110 μl από 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I στους 65 °C σε θερμομπλόκ ή υδατόλουτρο για τουλάχιστον 2 ώρες. Διατηρήστε το υπόλοιπο Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I σε θερμοκρασία δωματίου.



## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ ΓΙΑ 2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

| ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ                        | ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ (μl) | ΝΕΡΟ (μl) | ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ 1X (μl) |
|---|------------------------------------|-----------|-----------------------|
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I         | 66                                 | 594       | <b>660</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II        | 44                                 | 396       | <b>440</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης III       | 44                                 | 396       | <b>440</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα αυστηρής έκπλυσης  | 88                                 | 792       | <b>880</b>            |
| 2x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων | 550                                | 550       | <b>1100</b>           |



**Σημαντικό:** Προθερμάνετε 1x Αυστηρό ρυθμιστικό διάλυμα και ποσότητα 220 μl από 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I στους 65 °C σε θερμομπλόκ ή υδατόλουτρο για τουλάχιστον 2 ώρες. Διατηρήστε το υπόλοιπο Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I σε θερμοκρασία δωματίου.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ ΓΙΑ 3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

| ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ                        | ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ (μl) | ΝΕΡΟ (μl) | ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ 1X (μl) |
|---|------------------------------------|-----------|-----------------------|
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I         | 99                                 | 891       | <b>990</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II        | 66                                 | 594       | <b>660</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης III       | 66                                 | 594       | <b>660</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα αυστηρής έκπλυσης  | 132                                | 1188      | <b>1320</b>           |
| 2x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων | 825                                | 825       | <b>1650</b>           |



**Σημαντικό:** Προθερμάνετε 1x Αυστηρό ρυθμιστικό διάλυμα και ποσότητα 330 μl από 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I στους 65 °C σε θερμομπλόκ ή υδατόλουτρο για τουλάχιστον 2 ώρες. Διατηρήστε το υπόλοιπο Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I σε θερμοκρασία δωματίου.



## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ ΓΙΑ 4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

| ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ                        | ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ (μl) | ΝΕΡΟ (μl) | ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ 1X (μl) |
|---|------------------------------------|-----------|-----------------------|
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I         | 132                                | 1188      | <b>1320</b>           |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II        | 88                                 | 792       | <b>880</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης III       | 88                                 | 792       | <b>880</b>            |
| 10x Ρυθμιστικό διάλυμα αυστηρής έκπλυσης  | 176                                | 1584      | <b>1760</b>           |
| 2x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων | 1100                               | 1100      | <b>2200</b>           |



**Σημαντικό:** Προθερμάνετε 1x Αυστηρό ρυθμιστικό διάλυμα και ποσότητα 440 μl από 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I στους 65 °C σε θερμομπλόκ ή υδατόλουτρο για τουλάχιστον 2 ώρες. Διατηρήστε το υπόλοιπο Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I σε θερμοκρασία δωματίου.

### 4.3.3. Προετοιμασία σφαιριδίων στρεπταβιδίνης

#### ΥΛΙΚΑ

- Τα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης εξισορροπήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων
- Σωλήνες 1,5 ml
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Εκτελέστε τα βήματα αυτά λίγο πριν το τέλος της 4ωρης επώασης υβριδισμού.

1. Αναμίξτε τα σφαιρίδια χάντρες αναμινγώντας τα για 15 δευτερόλεπτα.
2. Μεταφέρετε 100 μl σφαιριδίων ανά σύλληψη (200 μl για 2 αντιδράσεις, 300 μl για 3 αντιδράσεις, 400 μl για 4 αντιδράσεις) σε έναν μόνο σωλήνα 1,5 ml.
3. Τοποθετήστε τον σωλήνα πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον να σταθεί μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.



4. Προσθέστε 200 μl από 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων ανά σύλληψη (400 μl για 2 αντιδράσεις, 600 μl για 3 αντιδράσεις, 800 μl για 4 αντιδράσεις) στον σωλήνα. Πραγματοποιήστε περιδίνηση για 10 δευτερόλεπτα.
5. Τοποθετήστε τον σωλήνα πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον να σταθεί μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.
6. Επαναλάβετε τα βήματα 4 και 5 μία φορά.
7. Προσθέστε 100 μl από 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σφαιριδίων ανά σύλληψη (200 μl για 2 αντιδράσεις, 300 μl για 3 αντιδράσεις, 400 μl για 4 αντιδράσεις) στον σωλήνα. Πραγματοποιήστε περιδίνηση για 10 δευτερόλεπτα.
8. Μεταφέρετε 100 μl καθαρισμένων σφαιριδίων σε έναν νέο σωλήνα PCR (έναν σωλήνα ανά αντίδραση σύλληψης).
9. Τοποθετήστε τους σωλήνες πάνω σε μια μαγνητική βάση με μορφή πλάκας 96 φρεατίων και αφήστε τους να σταθούν μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.



**Σημαντικό:** Μην επιτρέπετε στα σφαιρίδια να στεγνώσουν.

Προχωρήστε απευθείας σε Δέσμευση υβριδοποιημένων στόχων στα σφαιρίδια.

## 4.3.4. Δέσμευση υβριδοποιημένων στόχων στα σφαιρίδια

### ΥΛΙΚΑ

- Καθαρισμένα σφαιρίδια Στρεπταβιδίνης σε σωλήνα(-ες) PCR
- Αντίδραση/Αντιδράσεις υβριδισμού

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ



**Σημαντικό:** Εργαστείτε γρήγορα για να εξασφαλίσετε ότι η θερμοκρασία του δείγματος παραμένει κοντά στους 65 °C.

1. Αφαιρέστε τις αντιδράσεις υβριδισμού από τον θερμικό κυκλοποιητή, περιστρέψτε στιγμιαία τους σωλήνες και τοποθετήστε τους ξανά στον θερμικό κυκλοποιητή.
2. Τοποθετήστε τους πλυμένους σωλήνες σφαιριδίων Στρεπταβιδίνης στον θερμικό κυκλοποιητή (όχι περισσότερους από δύο σωλήνες κάθε φορά, ώστε να μην στεγνώσουν τα σφαιρίδια).
3. Για κάθε αντίδραση υβριδισμού, να μεταφέρετε 17 μl του διαλύματος της αντίδρασης υβριδισμού σε έναν σωλήνα PCR που περιέχει καθαρισμένα σφαιρίδια. Επαναιωρήστε τα σφαιρίδια μεταφέροντάς τα με την πιπέτα πάνω-κάτω, μέχρι να γίνει ομοιογενές το διάλυμα.
4. Δεσμεύστε το DNA στα σφαιρίδια τοποθετώντας τους σωλήνες σε θερμικό κυκλοποιητή που έχει ρυθμιστεί στους 65°C (το καπάκι στους 75°C). Επιάστε επί 45 λεπτά.
5. Κατά τη διάρκεια της επώασης, να μεταφέρετε απαλά με την πιπέτα πάνω και κάτω τους σωλήνες κάθε 15 λεπτά, για να βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια παραμένουν σε εναιώρηση.



Προχωρήστε απευθείας σε Πλύση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης για να αφαιρέσετε μη δεσμευμένο DNA.

### 4.3.5. Πραγματοποιήστε Πλύση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης για να αφαιρέσετε μη δεσμευμένο DNA

#### ΥΛΙΚΑ

- Υβριδοποιημένοι στόχοι σε σφαιρίδια
- Ταινίες 8 σωλήνων 0,2 ml χωρίς RNase/DNase
- Σωλήνες 1,5 ml χαμηλής δέσμευσης DNA
- 1X Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I (1/3 στους 65°C και 2/3 σε θερμοκρασία δωματίου)
- 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II
- 1x Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης III
- 1x Ρυθμιστικό διάλυμα αυστηρής έκπλυσης (στους 65°C)
- Νερό χωρίς νουκλεάση
- IDTE

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ



**Σημαντικό:** Διασφαλίστε ότι η θερμοκρασία παραμένει κοντά στους 65 °C για τα βήματα 1 έως 7.

**Σημείωση:** Εάν εργάζεστε με 2 ή περισσότερους σωλήνες σύλληψης, να εργαστείτε με κλιμακωτό τρόπο από τα βήματα 2 έως το βήμα 8, συμπεριλαμβανομένων των ακόλουθων:

1. Όταν τοποθετείτε τον πρώτο σωλήνα σε θερμομπλόκ στους 65°C για την 1η επώαση 5 λεπτών (βήμα 5), ξεκινήστε ένα χρονόμετρο.
2. Αρχίστε την επεξεργασία του δεύτερου σωλήνα.
3. Όταν τοποθετείτε τον δεύτερο σωλήνα στους 65°C, προσέξτε τον χρόνο διαχωρισμού των σωλήνων και βεβαιωθείτε ότι τηρείτε το συγκεκριμένο χρονικό κενό κατά τη διάρκεια των βημάτων 2 έως 8, ώστε να διασφαλίσετε ότι κάθε σωλήνας επωάζει ακριβώς 5 λεπτά στους 65°C με την αυστηρή πλύση.

1. Προσθέστε 100 μl 1x ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης I (στους 65°C) σε κάθε έναν από τους υβριδοποιημένους σωλήνες στόχου/στρεπταβιδίνης.
2. Δουλεύοντας με έναν σωλήνα κάθε φορά, επαναιωρήστε και μεταφέρετε το μείγμα ένα προς ένα σε έναν νέο σωλήνα 1,5 ml χαμηλής δέσμευσης DNA. Εάν εργάζεστε με δύο ή περισσότερους σωλήνες σύλληψης, εργαστείτε με κλιμακωτό τρόπο όπως υποδεικνύεται πιο πάνω.
3. Τοποθετήστε τον σωλήνα πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον να σταθεί μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.
4. Προσθέστε 200 μl 1x ρυθμιστικού διαλύματος αυστηρής έκπλυσης (στους 65°C) στον σωλήνα.  
Επαναιωρήστε απαλά τα σφαιρίδια μετακινώντας μια πιπέτα πάνω και κάτω.  
**Η ισχυρή ανάμειξη των σφαιριδίων με το ρυθμιστικό διάλυμα αυστηρής έκπλυσης μπορεί να μειώσει την ποιότητα της σύλληψης.**
5. Επώαστε στους 65°C επί 5 λεπτά.



6. Τοποθετήστε τον σωλήνα πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον να σταθεί μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.
7. Επαναλάβετε τα βήματα 4 έως 6 μία φορά.

**Δουλέψτε σε θερμοκρασία δωματίου.**

8. Προσθέστε 200 μl 1x ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (σε θερμοκρασία δωματίου) στον σωλήνα σας. Επαναιωρήστε απαλά τα σφαιρίδια μετακινώντας μια πιπέτα πάνω και κάτω.

**Σημείωση: Εάν εργάζεστε με 2 ή περισσότερους σωλήνες σύλληψης, από αυτό το βήμα κι έπειτα, επεξεργαστείτε όλους τους σωλήνες ταυτόχρονα.**

9. Πραγματοποιήστε περιδίνηση για 2 λεπτά.
10. Τοποθετήστε τον/τους σωλήνα(ες) πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον/τους να σταθεί(ούν) μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.
11. Προσθέστε 200 μl 1x ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης II σε κάθε σωλήνα. Πραγματοποιήστε περιδίνηση για 1 λεπτό.
12. Τοποθετήστε τον/τους σωλήνα(ες) πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον/τους να σταθεί(ούν) μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.
13. Προσθέστε 200 μl 1x ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης III σε κάθε σωλήνα. Πραγματοποιήστε περιδίνηση για 30 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε στιγμιαία για να συγκεντρώσετε όλο το υγρό.
14. Τοποθετήστε τον/τους σωλήνα(ες) πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον/τους να σταθεί(ούν) μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.
15. Προσθέστε 200 μl 1x IDTE σε κάθε σωλήνα. Επαναιωρήστε τα σφαιρίδια. Περιστρέψτε στιγμιαία για να συγκεντρώσετε όλο το υγρό.
16. Τοποθετήστε τον/τους σωλήνα(ες) πάνω σε μια μαγνητική βάση και αφήστε τον/τους να σταθεί(ούν) μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το υπερκείμενο του διαλύματος.
17. Αφαιρέστε όλο το υγρό που απομένει χρησιμοποιώντας μια πιπέτα P10 ή P20.
18. Προσθέστε 20 μl νερού χωρίς νουκλεάση σε κάθε σωλήνα, επαναιωρήστε και μεταφέρετε το μείγμα σφαιριδίων/νερού σε έναν νέο σωλήνα PCR.

### 4.3.6. Ενίσχυση μετά τη σύλληψη

#### ΥΛΙΚΑ

- Σφαιρίδια στρεπταβιδίνης/υδατικό εναιώρημα χωρίς νουκλεάση (20 μl)
- 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10x Library Amplification Primer Mix (Μείγμα Primer ενίσχυσης βιβλιοθήκης)
- Νερό χωρίς νουκλεάση



## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή για Ενίσχυση μετά τη σύλληψη, χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες ρυθμίσεις:

|                           | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ<br>(°C) | ΧΡΟΝΟΣ<br>(ΔΕΥΤΕΡΟΛΕΠΤΑ) |              |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|--------------|
| Καπάκι                    | 99                  | -                        | 15<br>κύκλοι |
| Βήμα 1: Αρχική μετουσίωση | 98                  | 45                       |              |
| Βήμα 2: Μετουσίωση        | 98                  | 15                       |              |
| Βήμα 3: Ανόπτωση          | 60                  | 30                       |              |
| Βήμα 4: Επέκταση          | 72                  | 30                       |              |
| Βήμα 5: Τελική επέκταση   | 72                  | 60                       |              |
| Διατήρηση                 | 10                  | ∞                        |              |

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προετοιμάστε το προ-μείγμα PCR ως ακολούθως:

| ΠΡΟ-ΜΕΙΓΜΑ PCR  |     |     |      |     |
|---|-----|-----|------|-----|
| Αριθμός αντιδράσεων   | 1   | 2   | 3    | 4   |
| 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (σε μl)   | 25  | 55  | 82,5 | 110 |
| 10x Library Amplification Primer Mix (Μείγμα Primer ενίσχυσης βιβλιοθήκης)(σε μl) | 2,5 | 5,5 | 8,25 | 11  |
| Νερό χωρίς νουκλεάση (σε μl)  | 2,5 | 5,5 | 8,25 | 11  |

2. Προσθέστε 30 μl Προ-μείγματος PCR σε κάθε εναιώρημα σφαιριδίων. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές και προκαλέστε στιγμιαία περιδίηση.
3. Τοποθετήστε τους σωλήνες στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα Ενίσχυση μετά τη σύλληψη.



**Συμβουλή:** Ασφαλές σημείο στάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C ή -20 °C για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας.



## 4.3.7. Καθαρισμός ενίσχυσης μετά τη σύλληψη

### ΥΛΙΚΑ

- Προϊόντα αντίδρασης PCR σε 50 μl έκαστο
- Τα σφαιρίδια AMPure® XP εξισορροπήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- Φρεσκοπαρασκευασμένη αιθανόλη 80%
- IDTE
- Σωλήνες χαμηλής δέσμευσης DNA για την αποθήκευση βιβλιοθήκης

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προσθέστε 50 μl σφαιριδίων AMPure® XP σε κάθε ένα από τα προϊόντα αντίδρασης PCR των 50 μl. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές.
2. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.
3. Τοποθετήστε τους σωλήνες πάνω σε μια μαγνητική βάση για 5 λεπτά ή μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές.
4. Απορρίψτε προσεκτικά 90 μl υπερκειμένου χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.  
**Κρατήστε τους σωλήνες στη μαγνητική βάση για τα ακόλουθα βήματα.**
5. Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα, προσθέστε 170 μl αιθανόλης 80% στα σφαιρίδια. Αφήστε τους σωλήνες να σταθούν για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.
6. Απορρίψτε προσεκτικά την αιθανόλη.
7. Επαναλάβετε τα βήματα 5 και 6 μία φορά.
8. Αφαιρέστε την υπολειπόμενη αιθανόλη χρησιμοποιώντας πιπέτα P10 ή P20.
9. Στεγνώστε τα σφαιρίδια στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μην στεγνώνετε υπερβολικά τα σφαιρίδια καθώς αυτό θα μπορούσε να μειώσει την ποσότητα του ανακτημένου DNA.  
**Αφαιρέστε τους σωλήνες από τη μαγνητική βάση.**
10. Προσθέστε 20 μl IDTE στα σφαιρίδια. Αναδεύστε καλά μετακινώντας την πιπέτα πάνω-κάτω 10 φορές. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά και προκαλέστε στιγμιαία περιδίνηση ώστε να συλλέξετε όλο το υγρό.
11. Τοποθετήστε τους σωλήνες πάνω σε μια μαγνητική βάση για 5 λεπτά ή μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές.
12. Μεταφέρετε προσεκτικά 18 μl του υπερκειμένου (συνιστάται μεταφορά δύο φορές 9 μl σε αυτό το βήμα) σε ένα νέο, επισημασμένο σωλήνα αποθήκευσης βιβλιοθήκης.



**Συμβουλή:** Ασφαλές σημείο στάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C ή -20 °C για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας.



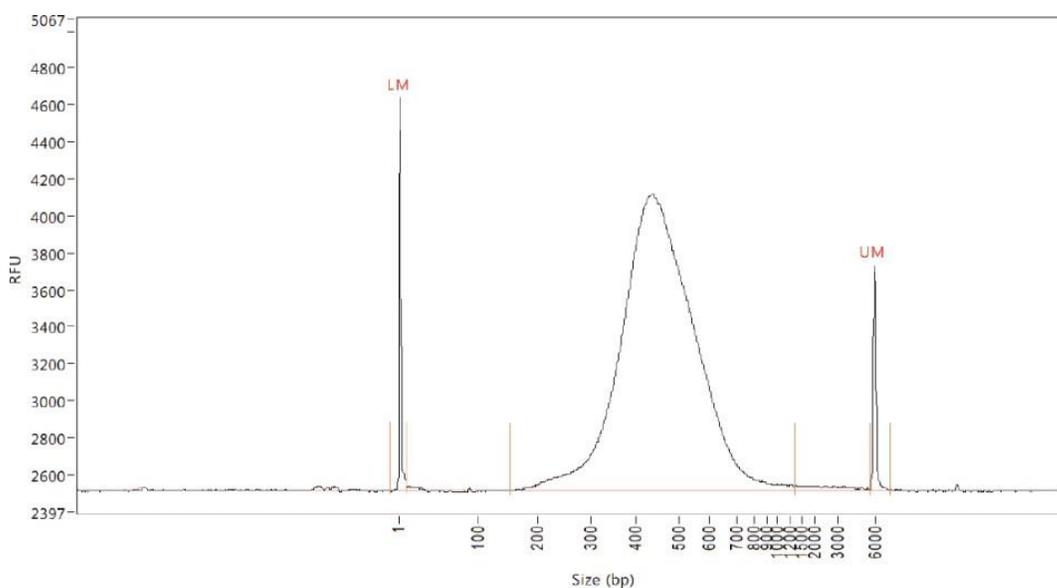
## 4.3.8. Ποσοτικοποίηση Τελικής βιβλιοθήκης και Ποιοτικός έλεγχος

### ΥΛΙΚΑ

- Φθοριομετρικός ποσοτικός εξοπλισμός και αντιδραστήρια
- Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Ποσοτικοποιήστε κάθε δεξαμενή βιβλιοθήκης που έχει συλληφθεί με φθοριομετρική μέθοδο (π.χ. ποσοτικοποίηση Qubit HS χρησιμοποιώντας 2 μl της βιβλιοθήκης).
2. Ελέγξτε την ποιότητα της συλλογής βιβλιοθηκών αναλύοντας το προφίλ τους μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Τα θραύσματα DNA της βιβλιοθήκης πρέπει να έχουν κατανομή μεγέθους μεταξύ τους 300bp και 700bp.



Παράδειγμα κατανομής μεγέθους δεξαμενής βιβλιοθήκης που ελήφθη μέσω του συστήματος τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης Agilent Fragment Analyzer (Ευέλικτος αναλυτής θραυσμάτων). UM-Ανώτερος δείκτης, LM-Κατώτερος δείκτης



## 4.4. Αλληλούχηση

### 4.4.1. Προετοιμασία βιβλιοθήκης για αλληλούχηση

#### ΥΛΙΚΑ

- Illumina MiSeq® Reagent Kit (Κιτ αντιδραστηρίου Illumina MiSeq®) v3
- Τελικές βιβλιοθήκες που ελήφθησαν
- Ρυθμιστικό διάλυμα EBT ή παρόμοιο

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προσδιορίστε τη μοριακότητα κάθε δεξαμενής με το μέσο μέγεθος της βιβλιοθήκης (μέγεθος κορυφής σε ζεύγη βάσεων) και τη συγκέντρωση (ng/μl) που ελήφθησαν κατά το βήμα 5.3.8 ως ακολούθως:

$$\text{Μοριακότητα βιβλιοθήκης (nM)} = \frac{\text{Συγκέντρωση βιβλιοθήκης (ng/μl)}}{\text{Μέσο μέγεθος σε βασικά ζεύγη x 649,5}} \times 10^6$$

2. Αραιώστε κάθε δεξαμενή στα 4 nM και ανακατέψτε σε ίση ποσότητα (π.χ. 5 μl από κάθε ένα). Αναμίξτε καλά και χρησιμοποιήστε την αραιώση αυτή σύμφωνα με την τυπική σύσταση μετουσίωσης Illumina®.
3. Φορτώστε μια αραιώση 10 pM των μετουσιωμένων βιβλιοθηκών στο MiSeq®.
4. Οι προτεινόμενες ελάχιστες αναγνώσεις είναι 2,0 εκατομμύριο αναγνώσεις ανά δείγμα, με μήκος ανάγνωσης 300 bp.

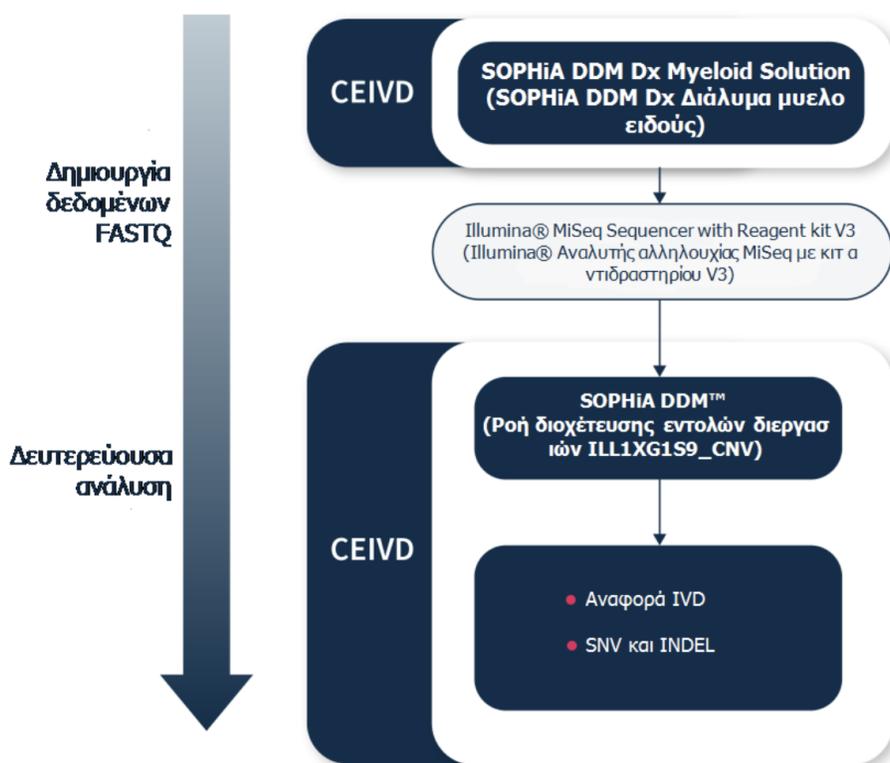


## 5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝ'ΑΛΥΣΗΣ

### 5.1. Οδηγίες εγκατάστασης λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx

Δεν απαιτείται εγκατάσταση για χρήση της λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx. Θα σταλεί email με οδηγίες κι έναν σύνδεσμο προς τη λειτουργία SOPHiA DDM™. Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήσης της λειτουργίας SOPHiA DDM™ για πληροφορίες σχετικά με τη διαχείριση λογαριασμού, τις συμβατότητες του προγράμματος περιήγησης και άλλες σημαντικές ειδοποιήσεις. Τα έγγραφα υποστήριξης είναι επίσης διαθέσιμα απευθείας μέσω της λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx.

### 5.2. Περιγραφή ροής εργασιών ανάλυσης για δημιουργία αποτελεσμάτων IVD



Περιγραφή της ροής εργασιών ανάλυσης για το SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution

Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης της λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx για πλήρη περιγραφή της ροής εργασιών μεταφόρτωσης.



## 6. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ, ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

### ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

- Για λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με το λογισμικό, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης της λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx.
- Εάν αλλάξει οποιοδήποτε μέρος του χειρισμού, του πρωτοκόλλου, του αναλυτή αλληλουχίας, της πολυπλεξίας κ.λπ., οι αναλύσεις δεν θα καλύπτονται από τις περιγραφόμενες οδηγίες χρήσης.
- Τα δεδομένα που παρέχονται στην Αναφορά ποιότητας (διαθέσιμη για λήψη από την πλατφόρμα SOPHiA DDM™) είναι μόνο για ενημέρωση και δεν προορίζονται για διαγνωστική χρήση.
- Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της ανάλυσης δεν είναι εγγυημένη. Τα εργαστήρια αλληλούχησης πρέπει να εκτελούν ποιοτικούς ελέγχους των δειγμάτων και να επισημαίνουν μη εγκεκριμένα δείγματα. Μη κατάλληλα δείγματα (π.χ. ανεπαρκές δείγμα βιοψίας) μπορούν να οδηγήσουν σε διακυβευμένα αποτελέσματα. Η SOPHiA GENETICS δεν ευθύνεται για τα αποτελέσματα και τις επακόλουθες αποφάσεις που λαμβάνονται με βάση τα εν λόγω αποτελέσματα.
- Απαιτούνται πρότυπα και διαδικασίες ορθής εργαστηριακής πρακτικής, επιπλέον της αυστηρής τήρησης των Οδηγιών χρήσης, ώστε να επιτευχθεί σωστή απόδοση του προϊόντος. Για συγκεκριμένες πληροφορίες ασφάλειας, ανατρέξτε στα αντίστοιχα Φύλλα Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού (MSDS) τα οποία παρέχονται με κάθε εξάρτημα του προϊόντος.
- Θα πρέπει να οριστούν φυσικά διαχωρισμένες αίθουσες προ- και μετά-PCR, προς αποφυγή μόλυνσης του δείγματος DNA. Να χρησιμοποιείτε πάντα φρέσκα αντιδραστήρια, ορθά εκχυλισμένο και αποθηκευμένο DNA. Για λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα και την ακεραιότητα του DNA, ανατρέξτε στην Ενότητα 5 των Οδηγιών χρήσης. Υλικά του κιτ και μέθοδοι - Ενότητα 5.2.1 Προετοιμασία γονιδιωματικού DNA.
- Για εκτέλεση του πειράματος θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ορθά βαθμονομημένες πιπέτες και κατάλληλος εργαστηριακός εξοπλισμός.
- Δεν πρέπει να αναμιγνύονται διαφορετικοί αριθμοί παρτίδων αντιδραστηρίων.
- Οι αποφάσεις για την περίθαλψη και θεραπεία των ασθενών πρέπει να βασίζονται στην ανεξάρτητη ιατρική κρίση του θεράποντος ιατρού, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις ισχύουσες πληροφορίες σχετικά με την πάθηση του ασθενούς, όπως το ιστορικό του ασθενούς και το οικογενειακό ιστορικό, τις φυσικές εξετάσεις, πληροφορίες από άλλες διαγνωστικές εξετάσεις και τις προτιμήσεις των ασθενών, σύμφωνα με το πρότυπο περίθαλψης μιας συγκεκριμένης κοινότητας.

### ΓΕΝΙΚΟΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Τα κακής ποιότητας δεδομένα λόγω προβλημάτων στην προετοιμασία του δείγματος ή στο στάδιο της αλληλούχησης, μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση στην ανάλυση δεδομένων και Ψευδώς θετικά και/ή Ψευδώς αρνητικά.
- Η απουσία παραλλαγής στην αναφορά δεν αποκλείει την παρουσία παραλλαγής κάτω από τα όρια ανίχνευσης της ανάλυσης.



# ΓΙΑ IN-VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

## SNV / INDEL

- Η ανίχνευση παραλλαγής στο προϊόν αυτό έχει βελτιστοποιηθεί για ανίχνευση SNV και σύντομων INDEL (έως τα 2/3 του μήκους ανάγνωσης). Να θυμάστε ότι ο αλγόριθμος μπορεί να παραλείψει οποιονδήποτε άλλον τύπο τροποποίησης.
  1. Δεν είναι δυνατή η ανίχνευση συγχωνεύσεων ή αναστροφών γονιδίων.
  2. Πιθανώς να μην εντοπιστούν διαγραφές ή εισαγωγές με σημείο διακοπής εκτός της περιοχής στόχου.
- Η ανίχνευση παραλλαγής στο προϊόν αυτό έχει βελτιστοποιηθεί στις περιοχές που ορίζονται ως «περιοχές στόχου». Να θυμάστε ότι οι περιοχές εκτός αυτού του ορισμού ενδέχεται να παρουσιάζουν ψευδώς αρνητικά ή/και ψευδώς θετικά.
- Για ισχυρή απόδοση του αλγορίθμου, συνιστούμε κάλυψη τουλάχιστον 1.000x για να πληρούται η στατιστική σημασία σε σύγκριση με τον θόρυβο για τις περισσότερες θέσεις. Η χαμηλότερη κάλυψη θα αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο Ψευδώς αρνητικών κλήσεων παραλλαγής.
- Οι παραλλαγές μπορεί να χαθούν ή να κληθούν εσφαλμένα λόγω περιορισμών στον σχεδιασμό του κит.
- Οι παραλλαγές στις περιοχές για τις οποίες το σχετικό θραύσμα του DNA δεν αφαιρείται από τους ανιχνευτές δεν μπορούν να ανιχνευθούν από το προϊόν. Η λήψη παραλλαγών μπορεί να περιοριστεί από:
  1. INDEL τα οποία επηρεάζουν τον υβριδισμό των ανιχνευτών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μη ανίχνευση ή λανθασμένη εκτίμηση κλασμάτων παραλλαγής.
  2. Η παρουσία πρόσθετων μεταλλάξεων στην περιοχή στόχο του ανιχνευτή στο ίδιο αλληλόμορφο.
- Τα SNV ή τα INDEL σε ομοπολυμερή μήκους δέκα βασικών ζευγών ή μεγαλύτερου δεν μπορούν να καλούνται με σιγουριά, καθώς η ανίχνευσή τους συγχέεται από τον υψηλό θόρυβο περιβάλλοντος.
- Οι σύνθετες διαγραφές-εισαγωγές μπορούν να αναφερθούν ως πολλαπλές παραλλαγές σε περίπτωση που αντιπροσωπεύονται στην ευθυγράμμιση ως πολλαπλές μικρότερες παραλλαγές, οι οποίες διαχωρίζονται από περισσότερα από 2 νουκλεοτίδια.
- Τα SNV ή τα INDEL σε περιοχές μακράς επανάληψης ή χαμηλής πολυπλοκότητας που καθορίζονται στις επισημασμένες περιοχές στο Παράρτημα 4 ενδέχεται και αυτά να παραληφθούν.
- Οι επισημασμένες περιοχές στο Παράρτημα 4 παρουσιάζουν χαρακτηριστικά τα οποία καθιστούν την ανίχνευση παραλλαγής αναξιόπιστη. Αναφέρονται με προειδοποιήσεις στη διεπαφή SOPHiA DDM™ και οι παραλλαγές που ανιχνεύονται στις περιοχές αυτές αναφέρονται με σημαία.
- Περιοχές με υψηλή ομολογία αλληλούχησης μπορεί να προκαλέσουν αβεβαιότητα αντιστοίχισης και κίνδυνο απουσίας ή κλήση λανθασμένων παραλλαγών.
- Οι παραλλαγές μπορούν να αναπαρασταθούν με διαφορετικές μορφές σε μια δεδομένη περιοχή. Εάν ένα τμήμα των αναγνώσεων αναφέρει την παραλλαγή σε διαφορετική μορφή ή δεν καταγράφει την παραλλαγή, το κλάσμα παραλλαγής μπορεί να υποτιμηθεί ή η παραλλαγή ενδέχεται να παραληφθεί λόγω του χαμηλού κλάσματος παραλλαγής.



- Σε περίπτωση πολλαπλών εισαγωγών/διπλασιασμών στην ίδια περιοχή, ενδέχεται να μην αναφέρονται όλες σωστά. Ειδικά, όταν μια μικρότερη εισαγωγή περιέχεται πλήρως σε μια μεγαλύτερη εισαγωγή, πιθανώς να μην υπάρχουν αναγνώσεις οι οποίες να προσδιορίζουν μοναδικά τη μικρότερη εισαγωγή και μπορεί να χαθεί και να αναφέρεται μόνο η μεγαλύτερη εισαγωγή.
- Σε περίπτωση ύπαρξης πολλαπλών εισαγωγών/διπλασιασμών στην ίδια περιοχή, ενδέχεται να μην ποσοτικοποιούνται όλες σωστά. Ειδικά, όταν μια μικρότερη εισαγωγή εμπεριέχεται πλήρως σε μια μεγαλύτερη εισαγωγή, πιθανώς να μην υπάρχουν αναγνώσεις οι οποίες να προσδιορίζουν μοναδικά τη μικρότερη εισαγωγή και το κλάσμα παραλλαγής της μικρότερης εισαγωγής ενδέχεται να υποεκτιμηθεί, ενώ αυτό της μεγαλύτερης εισαγωγής να υπερεκτιμηθεί.
- Η αλληλεπίδραση του δείγματος λόγω μεταπήδησης δείκτη μπορεί να επιδεινωθεί από τους ακόλουθους παράγοντες:
  1. Πολύ υψηλή κάλυψη σε ένα ή λίγα δείγματα λόγω προβλημάτων κατά την ποσοτικοποίηση / κανονικοποίηση του δείγματος ή υψηλού επιπέδου γονιδιακές ενισχύσεις
  2. Υπερφόρτωση του κυττάρου ροής, δηλ. υψηλή πυκνότητα συστάδας
  3. Διαφορές στο ποσοστό μετατροπής μιας βιβλιοθήκης
- Η αλληλεπίδραση του δείγματος όταν υπάρχει μόλυνση με δείκτη χαμηλού επιπέδου (<1%) μπορεί να επιδεινωθεί από τους ακόλουθους παράγοντες:
  1. Πολύ υψηλή κάλυψη σε ένα ή λίγα δείγματα λόγω προβλημάτων κατά την ποσοτικοποίηση / κανονικοποίηση του δείγματος ή υψηλού επιπέδου γονιδιακές ενισχύσεις
  2. Υπερφόρτωση του κυττάρου ροής, δηλ. υψηλή πυκνότητα συστάδας
  3. Διαφορές στο ποσοστό μετατροπής μιας βιβλιοθήκης
- Προτείνεται ο χρήστης να είναι προσεκτικός στην ερμηνεία παραλλαγών που αναφέρονται με ποσοστό κάτω από 2,5% και πιθανώς να χρησιμοποιήσει εναλλακτικές μεθόδους δοκιμών για επιβεβαίωση.
- Οποιοδήποτε πρόβλημα κατά την επεξεργασία των NGS ή προβλήματα με την υποβάθμιση του δείγματος μπορεί να προκαλέσει χαμηλό λόγο σήματος-προς-θόρυβο και να επηρεάσει αρνητικά την κλήση παραλλαγής.
- Οι αλλαγές που αναφέρονται μπορεί να περιλαμβάνουν σωματικές (όχι κληρονομικές) ή βλαστικές (κληρονομικές) αλλοιώσεις. Ωστόσο, η δοκιμή δεν κάνει διάκριση μεταξύ βλαστικών και σωματικών αλλοιώσεων. Η δοκιμή δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ευπάθεια.



## 7. ΜΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### 7.1. ΜΕΘΟΔΟΙ

#### Γενικά

Στη μελέτη αυτή, η απόδοση του kit SOPHiA DDM™ Dx MYS (SOPHiA DDM™ Dx Διάλυμα μυελοειδούς) και της ροής διοχέτευσης εντολών διεργασιών SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1S9\_CNV αξιολογήθηκε με δεδομένα που δημιουργήθηκαν σε ένα όργανο Illumina MiSeq® χρησιμοποιώντας την ανάλυση SOPHiA DDM™ Dx MYS. Το φίλτράρισμα παραλλαγής ρυθμίστηκε σύμφωνα με τον θόρυβο περιβάλλοντος που μετρήθηκε σε δείγματα αραιώσης βλαστικής σειράς και οι παρούσες αξιώσεις αφορούν παραλλαγές πάνω από το όριο ανίχνευσης που καθορίστηκε από τα πειράματά μας.

Τα ομοπολυμερή 10 bp ή περισσότερο εξαιρέθηκαν, όπως επίσης και οι περιοχές που καλύπτονταν από λιγότερες από 1.000 αναγνώσεις. Για κάθε δείγμα, οι παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν από τη ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών συγκρίθηκαν με τις επιβεβαιωμένες παραλλαγές «σημείου αναφοράς» που παρέχονται από κάθε κέντρο αλληλούχησης. Τυχόν παραλλαγές που εντοπίστηκαν εκτός των περιοχών-στόχων δεν ελήφθησαν υπόψη (βλ. Παράρτημα 4 για την πλήρη λίστα των περιοχών-στόχων και των επισημασμένων περιοχών). Μια περιοχή, το εξόνιο 15 του JAK2 με επένδυση 25 bp, είχε σταθερά χαμηλότερη κάλυψη και επομένως εξαιρέθηκε από τις αναλύσεις μας.

### Ορισμοί της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της ακρίβειας, της πιστότητας, της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας

Κάθε θέση που αναλύθηκε τόσο με τη μέθοδο αναφοράς όσο και με τη μέθοδο που συνδυάζει τη χρήση του οργάνου MiSeq® και του πίνακα SOPHiA DDM™ Dx MYS, λήφθηκε υπόψη για υπολογισμό των αναλυτικών παραμέτρων απόδοσης όπως η ευαισθησία, η ειδικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα και η συνέπεια.

Για όλες τις θέσεις που καλύπτονται από τον πίνακα SOPHiA DDM™ Dx MYS και για τις οποίες ήταν διαθέσιμες πληροφορίες αναφοράς, καθορίστηκαν οι αριθμοί των ακόλουθων κατηγοριών: Τα Αληθώς θετικά (TP) και τα Αληθώς αρνητικά (TN) υπάρχουν και στα δύο σύνολα, τα Ψευδώς θετικά (FP) υπάρχουν μόνο στις παραλλαγές που ανιχνεύονται από το SOPHiA DDM™ Dx και τα Ψευδώς αρνητικά (FN) υπάρχουν μόνο στον πίνακα επιβεβαιωμένων παραλλαγών. Όλες οι θέσεις που ελέγχθηκαν (Αληθώς θετικά (TP)+Ψευδώς θετικά (FP)+Αληθώς αρνητικά (TN)+Ψευδώς αρνητικά (FN)) προσδιορίστηκαν αφαιρώντας μη προσδιορισμένες θέσεις από την περιοχή-στόχο του πίνακα SOPHiA DDM™ Dx MYS, που είναι CDS ± 25bp των γονιδίων και των εξονίων που καθορίζονται στην τεκμηρίωση του SOPHiA DDM™ Dx MYS:

- Μη καθορισμένες περιοχές: Περιοχές που περιέχουν παραλλαγές χαμηλής αξιοπιστίας ή επιβεβαιωμένες παραλλαγές κάτω από το όριο αναφοράς και για αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα, περιοχές κάτω από 1000x βάθος για αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας και της επαναληψιμότητας της κάλυψης
- Το εξόνιο 15 του JAK2, το οποίο έχει αναγνωριστεί ως περιοχή όπου η κάλυψη είναι δύσκολη
- Γνωστές περιοχές με σφάλματα (επισημασμένες περιοχές)
- Περιοχές όπου δεν υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία αναφοράς ή όπου ήταν διφορούμενα (βλ. επίσης 5.1.3). Για παράδειγμα, η αλληλούχηση κατά Sanger δεν μπορεί να αναφέρει μεγάλα INDEL στο FLT3, επομένως αυτές οι παραλλαγές εξαιρέθηκαν.



Επιπρόσθετα, τα INDEL που βρίσκονται σε περιοχές ομοπολυμερούς τουλάχιστον 10 bp εξαιρέθηκαν από τους υπολογισμούς.

Όλες οι παράμετροι υπολογίστηκαν με τους ακόλουθους τύπους:

1. Η **ευαισθησία** προσδιορίστηκε ως το ποσοστό των επιβεβαιωμένων παραλλαγών που εντοπίστηκαν:

$$\text{Ευαισθησία} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$$

2. Η **ειδικότητα** προσδιορίστηκε ως το ποσοστό των αρνητικών θέσεων που αναγνωρίστηκαν σωστά ως αρνητικές:

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

(με (Αληθώς αρνητικά (TN)) = όλες οι θέσεις Αληθώς θετικά (TP)-Ψευδώς θετικά (FP)-Ψευδώς αρνητικά (FN) που ελέγχθηκαν)

3. Η **ακρίβεια** προσδιορίστηκε ως το ποσοστό των σωστών κλήσεων (θετικές και αρνητικές):

$$\text{Ακρίβεια} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100$$

4. Η **πιστότητα** προσδιορίστηκε ως το ποσοστό των σωστών θετικών κλήσεων από όλες τις θετικές κλήσεις:

$$\text{Πιστότητα} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

5. Η **επαναληψιμότητα αλληλούχησης** προσδιορίστηκε, για κάθε ζεύγος πανομοιότυπων εντός της εκτέλεσης A και B, ως το ποσοστό των καλά καθορισμένων βάσεων (SP) και στα δύο δείγματα, μεταξύ βάσεων που ήταν καλά καθορισμένες σε τουλάχιστον ένα δείγμα. Οι βάσεις θεωρούνται καλά καθορισμένες εάν καλύπτονται επαρκώς και δεν περιέχουν κλήσεις παραλλαγής χαμηλής αξιοπιστίας.

$$\text{Επαναληψιμότητα αλληλούχησης} = \frac{\sum_{ie}[SP_A \cap SP_B]^1}{\sum_{ie}[SP_A \cup SP_B]^1}$$

6. **Επαναληψιμότητα παραλλαγής** - όλες οι θέσεις που ήταν καλά καθορισμένες και στα δύο πανομοιότυπα λαμβάνονται υπόψη για τον υπολογισμό του κλάσματος των βάσεων που είναι ίδιες και στα δύο αντίγραφα. Λαμβάνοντας υπόψη τα αντίγραφα A και B εντός της εκτέλεσης με καλά καθορισμένες θέσεις SPA και SPB, τα SPA[i] και SPB[i] αποτελούν την κατάσταση παραλλαγής στη θέση i. Το dx είναι ο τελεστής που επιστρέφει 1 όταν x=0 και 0 όταν x<sup>1</sup>0, η Επαναληψιμότητα παραλλαγής ορίζεται ως:

$$\text{Επαναληψιμότητα παραλλαγής} = \frac{\sum_{ie}[SP_A \cap SP_B]^{\delta_{SP_A[i]-SP_B[i]}}}{\sum_{ie}[SP_A \cap SP_B]^1}$$



7. Η **Επαναληψιμότητα** ορίστηκε ως το προϊόν των δύο παραπάνω μέτρων:

$$\text{Επαναληψιμότητα} = \text{Επαναληψιμότητα παραλλαγής} \times \text{Επαναληψιμότητα αλληλούχησης} \times 100$$

8. Η **Αναπαραγωγιμότητα** ορίστηκε ισοδύναμα με την Επαναληψιμότητα (βλ. Τύπους (5)-(7)) για τα αντίγραφα A και B εντός της εκτέλεσης.

Τα Αληθώς θετικά (TP), Ψευδώς θετικά (FP), Αληθώς αρνητικά (TN) και Ψευδώς αρνητικά (FN) υπολογίστηκαν αθροίζοντας όλα τα δείγματα από κάθε εκτέλεση. Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η ακρίβεια και η πιστότητα υπολογίστηκαν με βάση αυτές τις συνολικές μετρήσεις, σύμφωνα με τους τύπους που αναφέρονται πιο πάνω. Η ειδικότητα, η ακρίβεια και η πιστότητα υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας μόνο πλήρως χαρακτηρισμένα δείγματα λόγω της έλλειψης Αληθώς αρνητικών θέσεων στα μερικώς χαρακτηρισμένα δείγματα. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας όλες τις θέσεις για όλα τα δείγματα και όλες τις εκτελέσεις.

Για προσδιορισμό των διαστημάτων αξιοπιστίας σε περίπτωση ευαισθησίας 100% ή άλλων μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφονται από τους Mattocks et al (2010) (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). Σε περιπτώσεις όπου το κριτήριο μέτρησης ήταν μικρότερο από 100%, χρησιμοποιήθηκε η ακριβής μέθοδος (Clopper, et al 1934) για να ληφθεί το διάστημα αξιοπιστίας στη διωνυμική πιθανότητα για ευαισθησία, ειδικότητα, ακρίβεια και πιστότητα (Clopper C et al, Biometrika, 1934). Για να αντικατοπτριστεί η πραγματική ποικιλομορφία των παραλλαγών, χρησιμοποιήθηκαν μόνο μοναδικά Αληθώς θετικά (TP), Ψευδώς θετικά (FP), Ψευδώς αρνητικά (FN) και Αληθώς αρνητικά (TN) στους υπολογισμούς διαστημάτων αξιοπιστίας.

## 7.2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα διαθέσιμα δείγματα ομαδοποιούνται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον χαρακτηρισμό υψηλής αξιοπιστίας που είναι διαθέσιμος για όλες τις συγκρίσεις σημείων αναφοράς. Πρώτον, μερικώς χαρακτηρισμένα δείγματα όπου έχουν εντοπιστεί γνωστές παραλλαγές υψηλής αξιοπιστίας υποβλήθηκαν σε επεξεργασία είτε από τη SOPHiA GENETICS (Τοποθεσία A) είτε από εξωτερικούς συνεργάτες (Τοποθεσίες B έως E) χρησιμοποιώντας προτεινόμενες πειραματικές συνθήκες.

Τα αποτελέσματα αυτά περιέχουν μεγάλο εύρος αντιπροσωπευτικών κλινικών περιπτώσεων και επιτρέπουν εκτιμήσεις ευαισθησίας για κλήση παραλλαγής. Επιπλέον, συμπεριλήφθηκαν πανομοιότυπα για εκτίμηση της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας. Η δεύτερη κατηγορία δειγμάτων αποτελείται από δείγματα αναφοράς με περιοχές υψηλής αξιοπιστίας που παρέχονται από τον προμηθευτή ή παραλλαγές υψηλής εμπιστοσύνης Genome in a bottle (GIAB) (Γονιδίωμα σε φιάλη) και κλινικά δείγματα όπου μεγάλα τμήματα των περιοχών στόχου SOPHiA DDM™ Dx MYS έχουν αναλυθεί με αλληλούχηση κατά Sanger ή άλλες μεθόδους υψηλής ακρίβειας (όπως επιτρέπουν τα όρια ανίχνευσης αντίστοιχων μεθόδων). Αυτό το σύνολο καλά χαρακτηρισμένων δειγμάτων επιτρέπει προσδιορισμό της ειδικότητας, της ακρίβειας και της πιστότητας καθώς και της ευαισθησίας. Τα δεδομένα εισόδου προέρχονται από αρκετές εκτελέσεις πολλών ασθενών (ένα αρχείο ακολουθίας ανά ασθενή) που εκτελούνται από τέσσερα διαφορετικά κέντρα αλληλούχησης: Τοποθεσία A-E. Όλα τα αρχεία μιας εκτέλεσης αναλύθηκαν μαζί ως μέρος της ίδιας επεξεργασίας παρτίδας.



## 7.3. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ακόλουθος πίνακας περιλαμβάνει τις πλήρεις περιλήψεις των παραλλαγών που εντοπίστηκαν σε σύγκριση με τη λίστα επιβεβαιωμένων παραλλαγών (Αληθώς θετικά (TP)/Ψευδώς αρνητικά (FN)) για κάθε εκτέλεση που περιέχει μερικώς χαρακτηρισμένα δείγματα.

**Πίνακας 2. Περιλήψεις παραλλαγών για κάθε εκτέλεση μερικώς χαρακτηρισμένων δειγμάτων**

| Εκτέλεση      | # Δείγματα | ΑΛΗΘΩΣ ΘΕΤΙΚΑ<br>(TP) | ΨΕΥΔΩΣ<br>ΑΡΝΗΤΙΚΑ<br>(FN) |
|---------------|------------|-----------------------|----------------------------|
| SiteA_Run01   | 1          | 15                    | 0                          |
| SiteA_Run02   | 15         | 36                    | 0                          |
| SiteA_Run03   | 16         | 37                    | 0                          |
| SiteA_Run04   | 1          | 2                     | 0                          |
| SiteA_Run06   | 1          | 15                    | 0                          |
| SiteA_Run07   | 21         | 31                    | 0                          |
| SiteA_Run08   | 20         | 142                   | 0                          |
| SiteA_Run09   | 20         | 142                   | 0                          |
| SiteA_Run10   | 24         | 599                   | 0                          |
| SiteA_Run11   | 10         | 15                    | 0                          |
| SiteA_Run14   | 8          | 8                     | 0                          |
| SiteA_Run15   | 14         | 14                    | 0                          |
| SiteB_Run01   | 22         | 78                    | 0                          |
| SiteB_Run02   | 18         | 55                    | 1                          |
| SiteC_Run01   | 11         | 57                    | 0                          |
| SiteC_Run02   | 10         | 40                    | 0                          |
| SiteD_Run01   | 10         | 15                    | 0                          |
| SiteE_Run01   | 15         | 31                    | 0                          |
| <b>Σύνολο</b> | <b>237</b> | <b>1332</b>           | <b>1</b>                   |

Ο ακόλουθος πίνακας περιλαμβάνει τις πλήρεις περιλήψεις των παραλλαγών που εντοπίστηκαν σε σύγκριση με τη λίστα επιβεβαιωμένων παραλλαγών (Αληθώς θετικά (TP)/Ψευδώς αρνητικά (FN)/Ψευδώς θετικά (FP)) και τις βασικές θέσεις χωρίς παραλλαγές (Ψευδώς αρνητικά (TN)) για κάθε εκτέλεση που περιέχει πλήρως χαρακτηρισμένα δείγματα.



**Πίνακας 3. Περίληψεις παραλλαγών για κάθε εκτέλεση πλήρως χαρακτηρισμένων δειγμάτων**

| Εκτέλεση      | # Δείγματα | ΑΛΗΘΩΣ<br>ΘΕΤΙΚΑ<br>(TP) | ΨΕΥΔΩ<br>Σ<br>ΑΡΝΗΤ<br>ΙΚΑ<br>(FN) | ΨΕΥΔ<br>ΩΣ<br>ΘΕΤΙΚ<br>Α (FP) | ΑΛΗΘΩΣ<br>ΑΡΝΗΤΙΚΑ<br>(TN) |
|---------------|------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| SiteA_Run08   | 18         | 132                      | 0                                  | 0                             | 469693                     |
| SiteA_Run09   | 18         | 132                      | 0                                  | 0                             | 469231                     |
| Άλλο          | 11         | 152                      | 0                                  | 2                             | 480194                     |
| <b>Σύνολο</b> | <b>47</b>  | <b>416</b>               | <b>0</b>                           | <b>2</b>                      | <b>1419118</b>             |

Ο πιο κάτω πίνακας εμφανίζει τις μοναδικές θέσεις βάσης Αληθώς αρνητικά (TN) και τις παραλλαγές που εντοπίστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολόγησης απόδοσης. Ο συνολικός αριθμός θέσεων βάσης στις περιοχές που αναλύθηκαν ήταν 48.093 βάσεις. Στη μελέτη ανιχνεύθηκαν διακόσιες δεκαεννέα (219) μοναδικές επιβεβαιωμένες παραλλαγές. Μοναδικά αληθώς αρνητικά όπου υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα αναφοράς υψηλής αξιοπιστίας και κάλυψαν συνολικά 48.092 bp, τα οποία καλύπτουν το 99% των περιοχών-στόχων μείον το εξόνιο JAK2 που εξαιρείται (48.547bp).

**Πίνακας 4. Περίληψεις παραλλαγών σε όλες τις εκτελέσεις**

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| <b>ΑΛΗΘΩΣ<br/>ΘΕΤΙΚΑ (TP)</b>   | 219   |
| <b>ΨΕΥΔΩΣ<br/>ΘΕΤΙΚΑ (FP)</b>   | 2     |
| <b>ΨΕΥΔΩΣ<br/>ΑΡΝΗΤΙΚΑ (FN)</b> | 1     |
| <b>ΑΛΗΘΩΣ<br/>ΑΡΝΗΤΙΚΑ (TN)</b> | 48092 |

## 7.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο συνδυασμός του οργάνου Illumina MiSeq® ή HiSeq™, της ανάλυσης SOPHiA DDM™ Dx MYS και του SOPHiA DDM™ Dx οδηγεί σε παρατηρούμενη απόδοση 99,92% ευαισθησίας, 99,99% ειδικότητας, 99,99% ακρίβειας, 99,52% πιστότητας, 98,69% επαναληψιμότητας και 99,30% αναπαραγωγιμότητας.



Πίνακας 5. Περίληψη απόδοσης

| Αριθ. | Μέτρηση απόδοσης       | Μέση τιμή            | 5ο εκατοστημόριο |
|-------|------------------------|----------------------|------------------|
| A     | Ποσοστό επί του στόχου | 87,41%               | [59,59%]         |
| B     | Ομοιομορφία            | 99,88%               | [99,40%]         |
| C     | Όριο ανίχνευσης        | 2,5%* (παρατηρήθηκε) | [1%]             |

| Αριθ. | Μέτρηση απόδοσης | Παρατηρήθηκε | [Χαμηλότερο 95% CI]** |
|-------|------------------|--------------|-----------------------|
| 1     | Ευαισθησία       | 99,92%       | [97,49%]              |
| 2     | Ειδικότητα       | 99,99%       | [99,98%]              |
| 3     | Ακρίβεια         | 99,99%       | [99,98%]              |
| 4     | Πιστότητα        | 99,52%       | [91,47%]              |

| Αριθ. | Μέτρηση απόδοσης  | Παρατηρήθηκε | [Χαμηλότερο 95% CI]*** |
|-------|-------------------|--------------|------------------------|
| 5     | Επαναληψιμότητα   | 98,69%       | [98,66%]               |
| 6     | Αναπαραγωγιμότητα | 99,30%       | [99,27%]               |

\* Για SNV και INDEL. Εξαιρείται το FLT3 ITD.

\*\* Το 95% CI υπολογίστηκε στις μοναδικές παραλλαγές στη μελέτη αξιολόγησης απόδοσης, ώστε να αντικατοπτρίζει την πραγματική ποικιλομορφία των παραλλαγών.

\*\*\* Το 95% CI υπολογίστηκε σε όλες τις θέσεις για όλα τα δείγματα. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα βασίζονται σε συγκρίσεις που περιγράφονται στην ισοδυναμία επιλογής Διπλού μεγέθους και στην αναπαραγωγιμότητα Μεταξύ τοποθεσιών.



## 8. ΣΥΜΒΟΛΑ

| Σύμβολο   | Τίτλος  |
|---|---|
|    | Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης   |
|    | Αριθμός καταλόγου   |
|    | Κωδικός παρτίδας (Αριθμός παρτίδας)   |
|    | Προσοχή   |
|    | Κατασκευαστής   |
|    | Όριο θερμοκρασίας   |
|   | Χρήση με βάση την ημερομηνία  |
|  | Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση  |
|  | Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα  |
|  | In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν  |
|  | Επαρκεί για <n> δοκιμές   |
|  | Εισαγωγέας  |
|  | Ημερομηνία κατασκευής   |
|  | Ανατρέξτε στις <b>Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις</b> στην «Ενότητα 5. Υλικά του κιτ και μέθοδοι» |
|  | Ανατρέξτε στις <b>Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις</b> στην «Ενότητα 5. Υλικά του κιτ και μέθοδοι» |



## 9. ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ

Σε περίπτωση δυσκολίας με τη χρήση της λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx, συμβουλευτείτε την ενότητα αντιμετώπισης προβλημάτων του εγχειριδίου χρήσης της λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx που είναι διαθέσιμο στη λειτουργία SOPHiA DDM™ Dx ή επικοινωνήστε με τη γραμμή υποστήριξης τηλεφωνικά στο +41 21 694 10 60 ή μέσω e-mail στο [support@sophiagenetics.com](mailto:support@sophiagenetics.com). Επισκεφθείτε τη διεύθυνση [www.sophiagenetics.com](http://www.sophiagenetics.com) για περισσότερες λεπτομέρειες. Η υποστήριξη μπορεί επίσης να επιτευχθεί μέσω διαδικτυακού αιτήματος, από την οθόνη Πίνακας εργαλείων στην ενότητα «Υποστήριξη» της λειτουργίας SOPHiA DDM™ Dx.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. ΠΛΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΑ ΔΙΠΛΟΥ ΔΕΙΚΤΗ

**32 συμβατοί με Illumina® Προσαρμογείς διπλού δείκτη σε μορφή πλάκας 96 φρεατίων (7 μl έκαστος)**

|   | 1       | 2       | 3       | 4       | 5 | 6 | 7 | ... | 12 |
|---|---------|---------|---------|---------|---|---|---|-----|----|
| A | 701-501 | 701-502 | 701-503 | 701-504 |   |   |   |     |    |
| B | 702-501 | 702-502 | 702-503 | 702-504 |   |   |   |     |    |
| C | 703-501 | 703-502 | 703-503 | 703-504 |   |   |   |     |    |
| D | 704-501 | 704-502 | 704-503 | 704-504 |   |   |   |     |    |
| E | 705-501 | 705-502 | 705-503 | 705-504 |   |   |   |     |    |
| F | 706-501 | 706-502 | 706-503 | 706-504 |   |   |   |     |    |
| G | 707-501 | 707-502 | 707-503 | 707-504 |   |   |   |     |    |
| H | 708-501 | 708-502 | 708-503 | 708-504 |   |   |   |     |    |



## 48 συμβατοί με Illumina® Προσαρμογείς διπλού δείκτη σε μορφή πλάκας 96 φρεατίων (7 μl έκαστος)

|   | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7 | ... | 12 |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---|-----|----|
| A | 701-501 | 703-502 | 705-503 | 707-501 | 709-502 | 711-503 |   |     |    |
| B | 702-501 | 704-502 | 706-503 | 708-501 | 710-502 | 712-503 |   |     |    |
| C | 703-501 | 705-502 | 701-504 | 709-501 | 711-502 | 707-504 |   |     |    |
| D | 704-501 | 706-502 | 702-504 | 710-501 | 712-502 | 708-504 |   |     |    |
| E | 705-501 | 701-503 | 703-504 | 711-501 | 707-503 | 709-504 |   |     |    |
| F | 706-501 | 702-503 | 704-504 | 712-501 | 708-503 | 710-504 |   |     |    |
| G | 701-502 | 703-503 | 705-504 | 707-502 | 709-503 | 711-504 |   |     |    |
| H | 702-502 | 704-503 | 706-504 | 708-502 | 710-503 | 712-504 |   |     |    |

## 96 συμβατοί με Illumina® Προσαρμογείς διπλού δείκτη σε μορφή πλάκας 96 φρεατίων (7 μl έκαστος)

|   | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A | 701-501 | 702-501 | 703-501 | 704-501 | 705-501 | 706-501 | 707-501 | 708-501 | 709-501 | 710-501 | 711-501 | 712-501 |
| B | 701-502 | 702-502 | 703-502 | 704-502 | 705-502 | 706-502 | 707-502 | 708-502 | 709-502 | 710-502 | 711-502 | 712-502 |
| C | 701-503 | 702-503 | 703-503 | 704-503 | 705-503 | 706-503 | 707-503 | 708-503 | 709-503 | 710-503 | 711-503 | 712-503 |
| D | 701-504 | 702-504 | 703-504 | 704-504 | 705-504 | 706-504 | 707-504 | 708-504 | 709-504 | 710-504 | 711-504 | 712-504 |
| E | 701-505 | 702-505 | 703-505 | 704-505 | 705-505 | 706-505 | 707-505 | 708-505 | 709-505 | 710-505 | 711-505 | 712-505 |
| F | 701-506 | 702-506 | 703-506 | 704-506 | 705-506 | 706-506 | 707-506 | 708-506 | 709-506 | 710-506 | 711-506 | 712-506 |
| G | 701-507 | 702-507 | 703-507 | 704-507 | 705-507 | 706-507 | 707-507 | 708-507 | 709-507 | 710-507 | 711-507 | 712-507 |
| H | 701-508 | 702-508 | 703-508 | 704-508 | 705-508 | 706-508 | 707-508 | 708-508 | 709-508 | 710-508 | 711-508 | 712-508 |



| i5   | i5 αλληλουχίες για φύλλο δειγμάτων |
|------|------------------------------------|
| D501 | TATAGCCT                           |
| D502 | ATAGAGGC                           |
| D503 | CCTATCCT                           |
| D504 | GGCTCTGA                           |
| D505 | AGGCGAAG                           |
| D506 | TAATCTTA                           |
| D507 | CAGGACGT                           |
| D508 | GTACTGAC                           |
|      |                                    |
|      |                                    |
|      |                                    |
|      |                                    |

| i7   | i7 αλληλουχίες για φύλλο δειγμάτων |
|------|------------------------------------|
| D701 | ATTACTCG                           |
| D702 | TCCGGAGA                           |
| D703 | CGCTCATT                           |
| D704 | GAGATTCC                           |
| D705 | ATTCAGAA                           |
| D706 | GAATTCGT                           |
| D707 | CTGAAGCT                           |
| D708 | TAATGCGC                           |
| D709 | CGGCTATG                           |
| D710 | TCCGCGAA                           |
| D711 | TCTCGCGC                           |
| D712 | AGCGATAG                           |



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ SORPHIA GENETICS

| ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΧΡΗΣΤΗ          | ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ              | ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ  | ΑΡΙΘ. ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ  |
|--|--------------------------|--|--|
| Ταινίες 8 σωλήνων χωρίς RNase/DNase (0,2 ml) | Thermo Fisher Scientific | EasyStrip Snap Tubes (Σωλήνες EasyStrip με κούμπωμα)                                 | AB-2000  |
| Σωλήνες χαμηλής δέσμευσης DNA (1,5 ml)       | Axygen                   | MaxyClear Microcentrifuges Tubes (Σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης MaxyClear)              | MCT-175-C  |
| Σωλήνες (1,5 ml)                             | Eppendorf                | Σωλήνες Eppendorf  | 3810X  |
| Κωνικοί σωλήνες (15 ml και 50 ml)            | Falcon                   | 15 ml & 50 ml Conical Centrifuge Tubes (Κωνικοί φυγοκεντρικοί σωλήνες 15 ml & 50 ml) | 352096 και 352070  |
| Επιστόμια φίλτρων                            | Starlab                  | TipOne RPT   | S1180-3710,<br>S1183-1740,<br>S1180-8710,<br>S1180-9710,<br>S1182-1730 |
| Αιθανόλη (βαθμίδα μοριακής βιολογίας)        | Merck                    | Ethanol Absolute (Απόλυτη αιθανόλη)  | 1.00983.1000   |

| ΖΩΝΗ ΠΡΟ-PCR  | ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ              | ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ  | ΑΡΙΘ. ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ                          |
|---|--------------------------|--|--|
| Αναδευτήρας Vortex  | Scientific Industries    | Vortex Genie 2   | SI-0236                                  |
| Επιτραπέζιος μικροφυγοκεντρητής (συμβατός με ταινίες 8 σωλήνων) | Starlab                  | Mini Centrifuge (Μίνι φυγοκεντρητής)                   | N2631-0007                               |
| Μαγνητική βάση διαχωρισμού τύπου 96 φρεατίων                    | Alpaqua                  | 96S Super Magnet Plate (Πλάκα σούπερ μαγνήτη 96S)      | A001322                                  |
| Μαγνητική βάση διαχωρισμού τύπου 96 φρεατίων                    | Thermo Fisher Scientific | DynaMag-96 Side Magnet (Πλευρικός μαγνήτης DynaMag-96) | 12331D                                   |
| Πολυκάναλες πιπέτες (P10, P100, P300)                           | StarLab                  | ErgoOne  | S7108-0510,<br>S7108-1100,<br>S7108-3300 |



| ΖΩΝΗ ΠΡΟ-PCR   | ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ              | ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ  | ΑΡΙΘ. ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ                                |
|--|--------------------------|--|--|
| Θερμικός κυκλοποιητής με προγραμματιζόμενο θερμαινόμενο καπάκι | Biometra                 | TAdvanced 96   |  |
| Φθοριομετρικός ποσοτικός εξοπλισμός και αντιδραστήριο          | Thermo Fisher Scientific | Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit (Φθοριόμετρο Qubit 3.0 και Κιτ ανάλυσης Qubit dsDNA HS) | Q33216 και Q32854                              |
| Πιπέτες μονού καναλιού (P10, P100, P200, P1000)                | StarLab                  | ErgoOne  | S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000 |

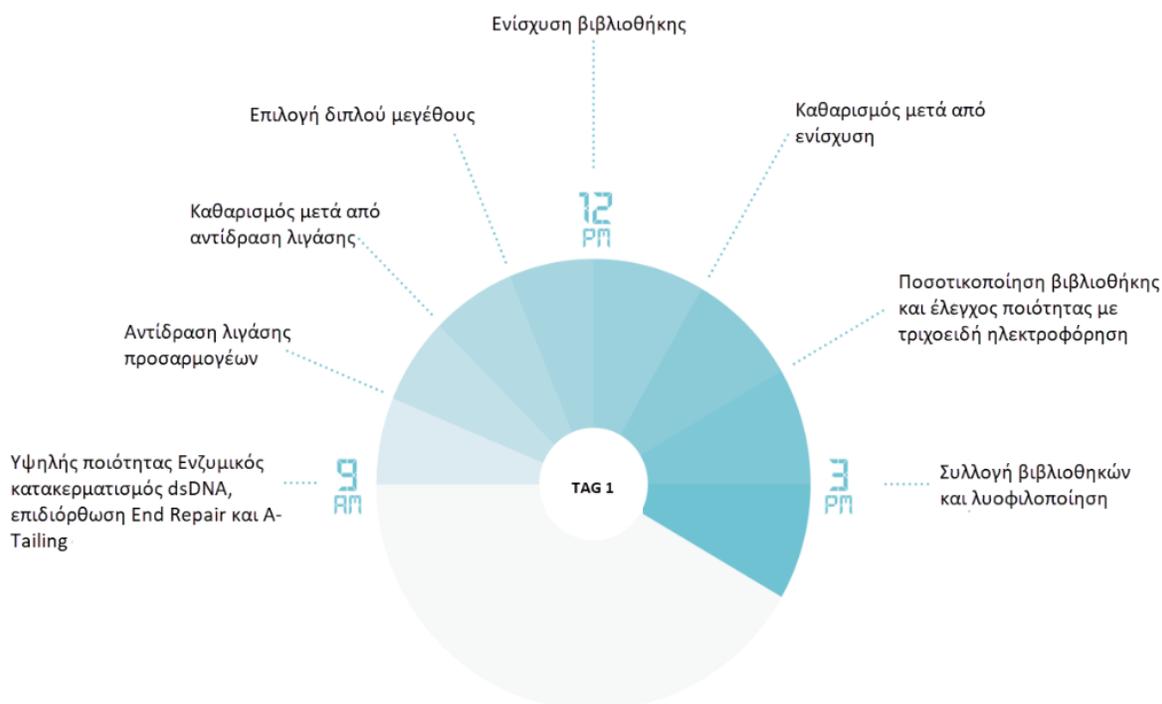
| ΖΩΝΗ ΜΕΤΑ-PCR   | ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ              | ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ   | ΑΡΙΘ. ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ |
|---|--------------------------|---|-----------------|
| Θερμικός κυκλοποιητής με προγραμματιζόμενο θερμαινόμενο καπάκι    | Biometra                 | TAdvanced 96  |                 |
| Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης                                | Advanced Analytical      | Agilent Fragment Analyzer (Ευέλικτος αναλυτής θραυσμάτων)                               |                 |
| Συμπυκνωτής κενού (SpeedVac™ ή παρόμοιος)                         | Thermo Fisher Scientific | Savant DNA120-230   |                 |
| Θερμαντήρας ξηρού μπλοκ ή υδατόλουτρο (συμβατό με σωλήνες 1,5 ml) | Techne                   | Dri-Block DB-1  |                 |
| Μαγνητική βάση διαχωρισμού (συμβατό με σωλήνες 1,5 ml)            | Thermo Fisher Scientific | MagJET Separation Rack, 12 x 1.5 mL tube (Βάση διαχωρισμού MagJET, 12 x 1,5 mL σωλήνες) | MR02            |
| Μαγνητική βάση διαχωρισμού (τύπου 96 φρεατίων)                    | Alpaqua                  | 96S Super Magnet Plate (Πλάκα σούπερ μαγνήτη 96S)                                       | A001322         |
| Μαγνητική βάση διαχωρισμού τύπου 96 φρεατίων                      | Thermo Fisher Scientific | DynaMag-96 Side Magnet (Πλευρικός μαγνήτης DynaMag-96)                                  | 12331D          |
| Αναδευτήρας Vortex  | Grant instrument         | Multi-tube Vortex Mixer, V32 (Αναδευτήρας Vortex πολλαπλών σωλήνων Vortex, V32)         |                 |
| Αναδευτήρας Vortex  | Scientific Industries    | Vortex Genie 2  | SI-0236         |



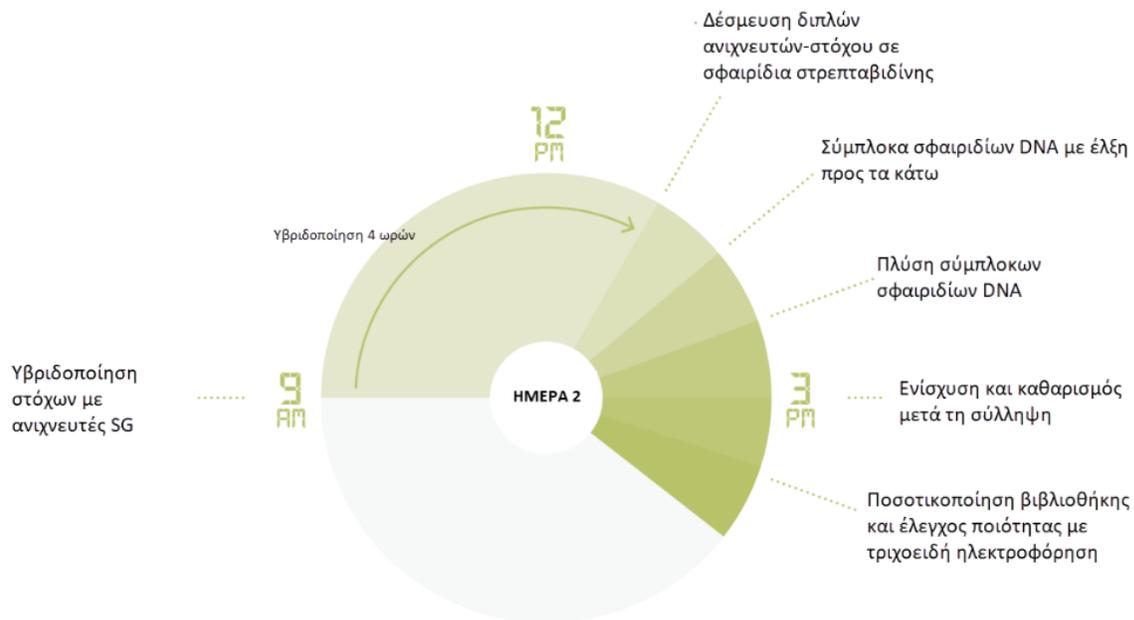
| ΖΩΝΗ ΜΕΤΑ-PCR   | ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ              | ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ  | ΑΡΙΘ. ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ   |
|---|--------------------------|--|---|
| Επιτραπέζιος μικροφυγοκεντρητής (συμβατός με ταινίες 8 σωλήνων) | StarLab                  | Mini Centrifuge (Μίνι φυγοκεντρητής)   | N2631-0007  |
| Πολυκάναλες πιπέτες (P10, P100, P300)                           | StarLab                  | ErgoOne  | S7108-0510,<br>S7108-1100,<br>S7108-3300                |
| Φθοριομετρικός ποσοτικός εξοπλισμός και αντιδραστήριο           | Thermo Fisher Scientific | Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit (Φθοριόμετρο Qubit 3.0 και Κιτ ανάλυσης Qubit dsDNA HS) | Q33216 και Q32854                                       |
| Πιπέτες μονού καναλιού (P10, P100, P200, P1000)                 | StarLab                  | ErgoOne  | S7100-0510,<br>S7100-1100,<br>S7100-2200,<br>S7100-1000 |



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. ΓΕΝΙΚΗ ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ – SOPHiA DDM™ CAPTURE SOLUTIONS (ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ)



## Προετοιμασία βιβλιοθήκης Με το SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I (Κιτ προετοιμασίας βιβλιοθήκης SOPHiA GENETICS™ DNA)



## ΣΥΛΛΗΨΗ

### ΕΥΚΟΛΗ ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

- ΜΟΝΟ 1-2 ΣΩΛΗΝΕΣ ΓΙΑ ΧΕΙΡΙΣΜΟ (ΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ)
- ΜΟΝΟ 3 ΩΡΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΩΝ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ

### ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΤΟΧΟΙ\*

| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ    | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ |
|-----------|-----------|-------------|
| 1         | 36931671  | 36931826    |
| 1         | 36931932  | 36932534    |
| 1         | 36932805  | 36932937    |
| 1         | 36933133  | 36933277    |
| 1         | 36933397  | 36933588    |
| 1         | 36933650  | 36933847    |
| 1         | 36934731  | 36934883    |
| 1         | 36935227  | 36935466    |
| 1         | 36937008  | 36937272    |
| 1         | 36937641  | 36937765    |
| 1         | 36937813  | 36938017    |
| 1         | 36938092  | 36938312    |
| 1         | 36939010  | 36939248    |
| 1         | 36939339  | 36939513    |
| 1         | 36940952  | 36941299    |
| 1         | 36945008  | 36945122    |
| 1         | 43814908  | 43815055    |
| 1         | 115256395 | 115256624   |
| 1         | 115258645 | 115258806   |
| 2         | 25457122  | 25457314    |
| 2         | 25458550  | 25458719    |
| 2         | 25459779  | 25459899    |
| 2         | 25461973  | 25462109    |
| 2         | 25463145  | 25463344    |
| 2         | 25463483  | 25463624    |
| 2         | 25464405  | 25464601    |



| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ    | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ |
|-----------|-----------|-------------|
| 2         | 25466741  | 25466876    |
| 2         | 25466998  | 25467232    |
| 2         | 25467383  | 25467546    |
| 2         | 25468096  | 25468226    |
| 2         | 25468863  | 25468958    |
| 2         | 25469003  | 25469203    |
| 2         | 25469463  | 25469670    |
| 2         | 25469894  | 25470052    |
| 2         | 25470434  | 25470643    |
| 2         | 25470880  | 25471146    |
| 2         | 25472500  | 25472618    |
| 2         | 25475037  | 25475091    |
| 2         | 25497784  | 25497981    |
| 2         | 25498343  | 25498437    |
| 2         | 25505231  | 25505605    |
| 2         | 25522982  | 25523137    |
| 2         | 25536756  | 25536878    |
| 2         | 198266440 | 198266637   |
| 2         | 198266683 | 198266879   |
| 2         | 198267254 | 198267575   |
| 2         | 198267647 | 198267784   |
| 2         | 198268283 | 198268513   |
| 2         | 198269774 | 198269926   |
| 2         | 198269973 | 198270221   |
| 2         | 209113067 | 209113409   |
| 4         | 55561652  | 55561972    |
| 4         | 55589724  | 55589889    |
| 4         | 55591997  | 55592241    |
| 4         | 55593358  | 55593515    |
| 4         | 55593556  | 55593733    |
| 4         | 55594151  | 55594312    |
| 4         | 55599210  | 55599383    |



| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ    | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ |
|-----------|-----------|-------------|
| 4         | 55602638  | 55602800    |
| 4         | 106155074 | 106158622   |
| 4         | 106162470 | 106162611   |
| 4         | 106163965 | 106164109   |
| 4         | 106164701 | 106164960   |
| 4         | 106180750 | 106180951   |
| 4         | 106182890 | 106183030   |
| 4         | 106190741 | 106190929   |
| 4         | 106193695 | 106194100   |
| 4         | 106196179 | 106197701   |
| 5         | 170834678 | 170834803   |
| 5         | 170837505 | 170837594   |
| 7         | 140453049 | 140453218   |
| 7         | 148504712 | 148504823   |
| 7         | 148506137 | 148506272   |
| 7         | 148506376 | 148506507   |
| 7         | 148507399 | 148507531   |
| 7         | 148508691 | 148508837   |
| 7         | 148511025 | 148511254   |
| 7         | 148511980 | 148512156   |
| 7         | 148512572 | 148512663   |
| 7         | 148513750 | 148513895   |
| 7         | 148514288 | 148514508   |
| 7         | 148514943 | 148515234   |
| 7         | 148516662 | 148516804   |
| 7         | 148523520 | 148523749   |
| 7         | 148524230 | 148524383   |
| 7         | 148525806 | 148525997   |
| 7         | 148526794 | 148526965   |
| 7         | 148529700 | 148529867   |
| 7         | 148543536 | 148543715   |
| 7         | 148544248 | 148544415   |



| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ    | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ |
|-----------|-----------|-------------|
| 9         | 5021962   | 5022238     |
| 9         | 5029757   | 5029931     |
| 9         | 5044377   | 5044545     |
| 9         | 5050660   | 5050856     |
| 9         | 5054537   | 5054909     |
| 9         | 5055643   | 5055813     |
| 9         | 5064857   | 5065065     |
| 9         | 5066652   | 5066814     |
| 9         | 5068996   | 5069233     |
| 9         | 5069899   | 5070077     |
| 9         | 5072466   | 5072651     |
| 9         | 5073672   | 5073810     |
| 9         | 5077427   | 5077605     |
| 9         | 5078280   | 5078469     |
| 9         | 5080203   | 5080405     |
| 9         | 5080507   | 5080708     |
| 9         | 5081699   | 5081886     |
| 9         | 5089648   | 5089888     |
| 9         | 5090420   | 5090595     |
| 9         | 5090713   | 5090936     |
| 9         | 5122978   | 5123146     |
| 9         | 5126307   | 5126471     |
| 9         | 5126658   | 5126816     |
| 9         | 133738124 | 133738447   |
| 9         | 133747490 | 133747625   |
| 9         | 133748221 | 133748449   |
| 9         | 133750229 | 133750464   |
| 9         | 133753776 | 133753979   |
| 9         | 133755429 | 133755569   |
| 11        | 533740    | 533969      |
| 11        | 534186    | 534347      |
| 11        | 32410578  | 32410750    |



| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ    | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ |
|-----------|-----------|-------------|
| 11        | 32413492  | 32413635    |
| 11        | 32414186  | 32414326    |
| 11        | 32417777  | 32417978    |
| 11        | 32421468  | 32421615    |
| 11        | 119148850 | 119149032   |
| 11        | 119149194 | 119149448   |
| 12        | 11803036  | 11803119    |
| 12        | 11905358  | 11905538    |
| 12        | 11992048  | 11992263    |
| 12        | 12006335  | 12006520    |
| 12        | 12022332  | 12022928    |
| 12        | 12037353  | 12037546    |
| 12        | 12038834  | 12038985    |
| 12        | 12043849  | 12044005    |
| 12        | 25380142  | 25380371    |
| 12        | 25398182  | 25398343    |
| 12        | 112888096 | 112888341   |
| 12        | 112910722 | 112910869   |
| 12        | 112915429 | 112915559   |
| 12        | 112915635 | 112915844   |
| 12        | 112919852 | 112920034   |
| 12        | 112924253 | 112924458   |
| 12        | 112926221 | 112926339   |
| 12        | 112926802 | 112927004   |
| 13        | 28592578  | 28592751    |
| 13        | 28607998  | 28608153    |
| 13        | 28608193  | 28608376    |
| 13        | 28608412  | 28608569    |
| 15        | 90631793  | 90632004    |
| 17        | 7572901   | 7573033     |
| 17        | 7573901   | 7574058     |
| 17        | 7576511   | 7576682     |



| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ   | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ |
|-----------|----------|-------------|
| 17        | 7576827  | 7576951     |
| 17        | 7576993  | 7577180     |
| 17        | 7577473  | 7577633     |
| 17        | 7578151  | 7578314     |
| 17        | 7578345  | 7578579     |
| 17        | 7579286  | 7579615     |
| 17        | 7579674  | 7579746     |
| 17        | 7579813  | 7579937     |
| 17        | 74732855 | 74733267    |
| 18        | 42529820 | 42533330    |
| 19        | 13054501 | 13054752    |
| 19        | 33792218 | 33793345    |
| 20        | 31019360 | 31019507    |
| 20        | 31021061 | 31021745    |
| 20        | 31022209 | 31025166    |
| 21        | 36164406 | 36164932    |
| 21        | 36171572 | 36171784    |
| 21        | 36193939 | 36194018    |
| 21        | 36206681 | 36206923    |
| 21        | 36231745 | 36231900    |
| 21        | 36252828 | 36253035    |
| 21        | 36259114 | 36259434    |
| 21        | 36265196 | 36265285    |
| 21        | 36421113 | 36421221    |
| 21        | 44514739 | 44514923    |
| 21        | 44524399 | 44524537    |
| X         | 15808593 | 15808684    |
| X         | 15809031 | 15809161    |
| X         | 15817969 | 15818101    |
| X         | 15821785 | 15821944    |
| X         | 15822208 | 15822345    |
| X         | 15826330 | 15826419    |



| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ   | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ |
|-----------|----------|-------------|
| X         | 15827297 | 15827466    |
| X         | 15833774 | 15834038    |
| X         | 15836684 | 15836790    |
| X         | 15838304 | 15838464    |
| X         | 15840828 | 15841390    |

\*Μια περιοχή στόχος είναι η θέση όπου η ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών θα αναφέρει παραλλαγές υψηλής αξιοπιστίας, όταν υπάρχουν. Οι συντεταγμένες βασίζονται σε 1 και η τελική συντεταγμένη περιλαμβάνεται στην περιοχή.

## ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΕΣ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ\*\*

| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ    | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ  | GENE_EXON   |
|-----------|-----------|-------------|--|-------------|
| 1         | 36933564  | 36933584    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | CSFR3_ex14  |
| 17        | 7572977   | 7573010     | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | TP53_ex11   |
| 18        | 42533111  | 42533125    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | SETBP1_ex04 |
| 21        | 36206686  | 36206787    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | RUNX1_ex07  |
| 2         | 198267762 | 198267783   | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με πειραματικά σφάλματα   | SF3B1_ex13  |
| 5         | 170837510 | 170837526   | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με πειραματικά σφάλματα   | NPM1_ex11   |
| 9         | 5126453   | 5126462     | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | JAK2_ex24   |



| ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ | ΕΝΑΡΞΗ    | ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ  | GENE_ EXON      |
|-----------|-----------|-------------|--|-----------------|
| 11        | 119149355 | 119149373   | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | CBL_<br>ex09    |
| 19        | 33792754  | 33792775    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | CEBPA_<br>ex01  |
| 19        | 33793007  | 33793041    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | CEBPA_<br>ex01  |
| 20        | 31022441  | 31022449    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με σφάλματα αλληλούχησης εάν χρησιμοποιηθεί χημεία Illumina® V2 | ASXL1_<br>ex12  |
| 7         | 148543693 | 148543705   | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με πειραματικά σφάλματα   | EZH2_<br>ex41   |
| 17        | 74733013  | 74733013    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με πειραματικά σφάλματα   | SRSF2_<br>ex1   |
| 20        | 31022262  | 31022262    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με πειραματικά σφάλματα που προκαλούν χιμαιρικές αναγνώσεις     | ASXL1_<br>ex12  |
| 18        | 42531410  | 42531410    | Παραλλαγές σε αυτήν την περιοχή με κλάσμα παραλλαγής κάτω του 10% μπορεί να συγχέονται με πειραματικά σφάλματα που προκαλούν χιμαιρικές αναγνώσεις     | SETBP1_<br>ex04 |
| 12        | 112919878 | 112920009   | Αυτή η περιοχή είναι εξαιρετικά ομόλογη  | PTPN11_<br>ex10 |

\*\* Μια επισημασμένη περιοχή είναι μια συγκεκριμένη περιοχή που επικαλύπτει ένα εξόνιο και θα μπορούσε να προκαλέσει κάποια αβεβαιότητα στην κλήση της παραλλαγής, π.χ. χαμηλής πολυπλοκότητας, θορυβώδης, ψευδογενής, κ.λπ. Θα μπορούσε να εξαρτάται από την τεχνολογία της αλληλούχησης. Μια παραλλαγή που ανιχνεύεται σε αυτήν την περιοχή δεν θα ταξινομηθεί ως χαμηλής αξιοπιστίας στο SOPHiA DDM™ Dx, αλλά θα συσχετιστεί με ένα προειδοποιητικό τρίγωνο κι ένα λεπτομερές προειδοποιητικό μήνυμα μπορεί να βρεθεί στην καρτέλα προειδοποιήσεων. Η στήλη φίλτρου της αντίστοιχης παραλλαγής στον τελικό πίνακα πλήρους παραλλαγής δεν θα επισημανθεί λόγω αυτής της περιοχής. Οι συντεταγμένες βασίζονται σε 1 και η τελική συντεταγμένη περιλαμβάνεται στην περιοχή.



Document Approvals  
Approved Date: 28 Jan 2026

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Approval<br>Verdict: Approve | Coleman Spence,<br>(cspence@sophiagenetics.com)<br>Regulatory Approval<br>28-Jan-2026 01:08:16 GMT+0000 |
|------------------------------|---|

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| QA Approval<br>Verdict: Approve | Claire Mullane,<br>(cmullane@sophiagenetics.com)<br>Quality Assurance Approval<br>28-Jan-2026 08:58:34 GMT+0000 |
|---------------------------------|---|