



Omixon Holotype HLA and Omixon HLA Twin

Kendte produktbegrænsninger

Version 14

Published on 08/12/2020

1 Dokumentets omfang

Formålet med dette dokument er at give en omfattende liste over kendte produktbegrænsninger for Holotype HLA og Omixon HLA Twin. Den aktuelle version af dette dokument er sammensat af Holotype HLA version 2.1 (RUO&CE), 2.2 (RUO), 3.0 (RUO) og 3.0.1 (CE&RUO) og Omixon HLA Twin version 4.0.0 (RUO), 4.0.1 (RUO), 4.1.0 (CE&RUO) 4.2.0 (CE&RUO) og 4.2.2 (CE&RUO) med IMGT/HLA version 3.37.0_8, 3.38.0_8, 3.38.0_9 og 3.39.0_9. Medmindre andet er angivet, berører de anførte begrænsninger alle analyse-, software- og databaseversioner, som er omfattet af dette dokument.

En oversigt over tidligere versioner af og ændringer i dette dokument kan findes i afsnittet "Revisions- og ændringshistorik".

2 Oversigt over kendte produktbegrænsninger

2.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

2.1.1 Falske positive resultater, der berører DRB3/DRB4 eller DRB5

Falske positive resultater kan blive observeret ved meget sjældne lejligheder for HLA-DRB3, HLA-DRB4 eller for HLA-DRB5 med analyseworkflow version 3.0 og 3.0.1. Den grundlæggende årsag til dette sporadisk forekommende fænomen er ved at blive undersøgt.

2.1.2 Specifik begrænsning for Holotype HLA-analyseprotokol version 3.0

Ved brug af Holotype HLA v3.0-protokollen kan nogle brugere opleve tilstedeværelsen af et hvidt bundfald efter trinnet med adapterligering. Vi har fundet frem til, at dette bundfald dannes af en krydsreaktion af en forbindelse i Promega LR-PCR-blandingen og én i endereparationsbufferen. I nogle tilfælde kan dette bundfald have små virkninger i slutbiblioteket, men det berører ikke resultaterne af genotypebestemmelse. For rådgivning om, hvordan dette fænomen håndteres, bedes du kontakte support@omixon.com eller din Field Application Scientist direkte.

2.1.3 Holotype HLA-specifikke ambiguiteter

Dette afsnit indeholder ambiguiteter, som skyldes Omixon Holotype HLA-analysens design og de teknologiske begrænsninger ved NGS (dvs. placering og rækkefølge af primersites og den fragmentstørrelsesfordeling, som produceres af den størrelsesvalgmetode, der anvendes i protokollen). Disse ambiguiteter kan ikke løses, og de præsenteres af alle softwareversioner.

Der blev oprettet en multisekvensalignment for hvert locus med alle allelsekvenser og Holotype-primærsekvenserne. Derefter blev denne alignment trimmet til målregionen (dvs. primersitene og alle positioner uden for primersitene blev trimmet). De resulterende sekvenser blev derefter kontrolleret for nøjagtige duplikater og undersekvensrelationer, og alle ambiguiteter på tre-felts- eller lavere opløsning eller ved enhver opløsning, som berører alleler med ikke-standardiserede ekspressionsniveauer, blev indsamlet.

2.1.4 Ambiguiteter i første, andet og tredje felt

Retningslinjer for rapportering: Rapportér som ambiguitet

Alleler med ambiguitet		Berørt(e) IMGT/HLA-version(er)	Ambiguitetsgrad
DPB1*13:01:01	DPB1*107:01	Alle ¹	1. felt
DPB1*105:01:01	DPB1*665:01	Alle ¹	1. felt
DPB1*584:01:01	DPB1*584:01:02	Alle ¹	3. felt
DRB1*01:01:01	DRB1*01:100	Alle ¹	2. felt
DRB1*03:01:01	DRB1*03:147	Alle ¹	2. felt
DRB1*09:01:02	DRB1*09:31	3.37.0_8	2. felt
DRB1*09:21	DRB1*09:31	3.37.0_8	2. felt
DRB1*12:01:01	DRB1*12:10	Alle ¹	2. felt
DRB1*14:25:01	DRB1*14:25:02	Alle ¹	3. felt
DRB1*14:54:01	DRB1*14:216	v3.38.0_8 v3.38.0_9 v3.39.0_9	2. felt
DRB1*15:02:01	DRB1*15:140/ DRB1*15:149	Alle ¹	2. felt/ 2. felt
DRB3*01:01:02	DRB3*01:62	3.37.0_8	2. felt

¹ Alle: Alle databaseversioner, som er omfattet af dette dokument, er berørt.

2.1.5 Ambiguiteter, som berører ekspresion

Retningslinjer for rapportering: Svagt eksprimerende alleler rapporteres som resultat for 2. felt

Allelgrupper med ambiguitet

- HLA-A*02:01:01:01/**02:01:01:02L**/02:01:01:16/02:01:01:50
- HLA-B*39:01:01:03/**39:01:01:02L**/39:01:01:05/39:01:01:09
- HLA-DQB1*03:01/03:19/03:191/03:297/03:312/03:377/03:419/**03:358N**¹

¹ Ambiguitet er til stede med IMGT/HLA 3.36.0_8 og derover. HLA-DQB1*03:358N indeholder en deletion i exon 3, som medfører et frameshift og et præmaturot stop i codon 191 (kilde: <http://hla.alleles.org/alleles/nulls.html>, adgangsdato: 16. juli 2019). Indtil 16. juli 2019 er dette allel blevet observeret i to biologiske prøver med ukendt etnisk oprindelse af et enkelt laboratorium. Der var ingen offentligt tilgængelige oplysninger om kildesekvenserne for dette allel på tidspunktet for udarbejdelse af dette dokument. Baseret på de tilgængelige oplysninger i IMGT/HLA 3.36.0 kan dette allel ikke skelnes fra de andre alleler, der er angivet i allelgrupperne med ambiguitet, af softwaren, men det kan udelukkes ved manuel sammenligning af allelsekvenserne i genbrowseren. Vær opmærksom på, at ikke alle angivne alleler er rapporteret som med ambiguitet i alle tilfælde.



2.1.6 Cis/Trans-ambiguiteter

Cis/Trans-ambiguiteter (dvs. meldinger med ambiguitet, hvor de forskellige allelpar kun adskiller sig i cis/trans-fasningen) kan have flere årsager. De fleste af disse ambiguiteter rapporteres på grund af begrænsninger i teknologien og IMGT/HLA-databasen.

Retningslinjer for rapportering: Det er op til det enkelte laboratorium, om man vil rapportere ambiguiteten ved hjælp af G-grupperne, eller om man vil rapportere specifikke allelpar med ambiguitet.

2.2 Liste over kendte begrænsninger for Omixon HLA Twin

2.2.1 Kendte begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen

Introduktion

Alle nedenstående begrænsninger er baseret på observationer, som er rapporteret af Holotype HLA-kunder eller foretaget under intern validering og regressionstest. Bemærk, at disse observationer før udgangen af 2018 er gjort på næsten 100.000 prøver af Holotype HLA-kit, som er solgt over hele verden.

Falsk nyhed meldt

HLA Twin kan i sjældne tilfælde rapportere falske nyheder til slutbrugeren. Bemærk, at de fleste af disse nyheder kan elimineres ved manuel inspektion af resultaterne i Omixon HLA Twin udført af en trænet bruger.

Ambiguitet rapporteres ikke for nye alleler

Designet er således, at kun et enkelt nyt allel rapporteres af konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen. I meget sjældne tilfælde kan flere lige sandsynlige nye alleler identificeres, men kun én af mulighederne meldes af algoritmen.

Nye insertioner/deletioner udeladt

Ekstremt sjældent rapporteres nye insertioner eller deletioner ikke af Omixon HLA Twin.

Forkert fasning

I sjældne tilfælde er konsensussekvenserne blevet faset forkert.

Identifikation af forkert fasede konsensussekvenser

Der kan være mistanke om forkert cis/trans-fasning, hvis et eller flere af følgende karakteristika observeres:

- To nye alleler rapporteres inden for et enkelt bedste match-par.
- Et nyt allel og et delvist defineret allel rapporteres.
- Et eller to sjældne alleler rapporteres.
- Der er flere nye positioner.

Hvis der er mistanke om forkert fasning, rådes brugeren til at kontrollere resultaterne af den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme.

Cis/trans-ambiguitet på grund af ineffektiv fasning

I nogle sjældne tilfælde rapporteres der ambiguiteter på andet- og tredjefeltniveau på grund af ineffektiv fasning. I disse tilfælde foreslås reanalyse med flere aflæsninger af de berørte loci.



Ambiguitet ikke rapporteret

I sjældne tilfælde:

- Rapporteres G-gruppe-cis/trans-ambiguiteter ikke for HLA-DPB1.
- Følgende ambiguiteter rapporteres ikke (rapporterede alleler/**ikke rapporterede alleler**):
 - HLA-DRB1 – DRB1*12:10/**DRB1*12:01:01**, DRB1*15:140/DRB1*15:149/**DRB1*15:02**, DRB1*03:147/**DRB1*03:01:01**,
 - HLA-DQB1 – DQB1*03:276N/**DQB1*03:01**.

Intet resultat rapporteret trods vellykket konsensusgenerering

I meget sjældne tilfælde rapporteres der ikke noget allelkald, selvom der blev genereret en konsensussekvens

Analyse kan ikke fuldføres med nyere IMGT/HLA-databaseversioner (rettet i Omixon HLA Twin 4.2.0)

I nogle prøver kan genotypebestemmelse med Omixon HLA Twin ikke fuldføres med IMGT/HLA 3.38.0 og derover, fordi softwaren løber tør for hukommelse. Meget sjældent kan et lignende fænomen observeres med tidligere IMGT/HLA-versioner (f.eks. version 3.37.0_8).

Forkert alignment vist i genbrowseren

I sjældne tilfælde, hvor de rapporterede alleler har signifikante længdeforskelle i nogle genregioner, kan sekvenssporene i genbrowseren være alignet forkert, og unødvendige huller vises. Dette forhold berører ikke allelkaldet eller værdierne beregnet for QC-metrikker. Det kan eliminere denne visualiseringsdefekt at vise alleler separat.

2.2.2 Kendte begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

På grund af den høje lighed af exonsekvenserne i nogle alleler rapporterer den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme i nogle tilfælde forkerte alleler.

3 Kendte produktbegrænsninger for HLA-B

3.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

3.1.1 Alleler, som kan vise lav amplificering

Lav amplificering betyder, at den genererede tæller aflæsning for et allel ikke er tilstrækkelig til genotypebestemmelse. I ekstreme tilfælde bliver allelet måske slet ikke rapporteret (dropout).

Alleler med lav amplificering	Kompensation i HLA Twin	Påvisningsopløsning
B*51:01:02	JA	JA

3.2 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

3.2.1 Kendte begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen

Forkert konsensussekvens på grund af ineffektiv registrering af krydsmapping (rettet i Omixon HLA Twin 4.2.0)

- I nogle sjældne tilfælde rapporteres der resultater med ambiguiteter på grund af delvist tab af konsensus ved start af konsensus.
- Der rapporteres i sjældne tilfælde falske nyheder på grund af en forkert konsensussekvens nær ved start af konsensus.

HLA-B*15:01 meldt forkert

I meget sjældne tilfælde kan alleler fra følgende allelgruppe blive meldt forkert, og aminosyreoplysningerne kan være forkerte på grund af inkonsekvenser i databasen:

- HLA-B*15:01:01:01,
- HLA-B*15:01:01:02N,
- HLA-B*15:NY

3.2.2 Kendte begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

Nogle HLA-B-alleler meldes forkert på grund af tilstedeværelse af en identisk exon-sekvens i HLA-C

En gruppe HLA-B-alleler (flere HLA-B*44-alleler og HLA-B*47:04) har en exon 2-sekvens, som er identisk med HLA-C*16:85. På grund af denne lighed kan disse alleler meldes forkert af den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme.

4 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DQB1

4.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

4.1.1 Alleler, som kan vise lav amplificering

Alleler med lav amplificering	Kompensation i HLA Twin	Påvisningsopløsning
DQB1*03	JA	JA ¹

¹ Forslag baseret på koblingsuligevægt (LD) med DQA1

4.1.2 Alleler, som ikke amplificeres

DQB1*03:276N – på grund af en lang deletion, som dækker 5' amplificeringsprimersitet, amplificeres dette allel ikke.

4.2 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

Advarslen for koblingsuligevægt-baseret dropout er ikke funktionel i Omixon HLA Twin version 4.0.0 (RUO) og 4.0.1 (RUO).

5 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DRB1

5.1 Teknologiske begrænsninger

Der kan observeres moderat allelubalance for alleler med signifikant længere sekvenser end gennemsnittet (f.eks. nogle HLA-DRB1*04-alleler). I sjældne tilfælde kan der observeres høj allelubalance. Der kan sporadisk forekomme alleldropout.

5.2 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

5.2.1 Lav amplificering

Der kan i nogle tilfælde observeres moderat til høj allelubalance for HLA-DRB1*07-alleler. Der kan i meget sjældne tilfælde forventes alleldropouts.

6 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DRB4

6.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

6.1.1 Alleler, som kan vise lav amplificering

Lav amplificering betyder, at den genererede tæller aflæsning for et allel ikke er tilstrækkelig til genotypebestemmelse. I ekstreme tilfælde bliver allelet måske slet ikke rapporteret (dropout). Der er ofte observeret lav amplificering og alleldropouts for HLA-DRB4*01:01. I sjældne tilfælde er der rapporteret alleldropouts for HLA-DRB4*01:03-alleler. I begge tilfælde foreslås tilstedeværelse af allelet ud fra koblingsulige vægt af Omixon HLA Twin.

6.1.2 Andre analyserelaterede begrænsninger

Falsk positive koncentrationsmålinger for HLA-DRB4

Der kan observeres høje amplikonkoncentrationer i nogle prøver, selvom:

- personen ikke har en kopi af HLA-DRB4-genet eller
- personen ikke har en eller to kopier af HLA-DRB4-genet, men amplificeringen ikke lykkedes.

6.2 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

6.2.1 Kendte begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen

Ambiguitet ikke rapporteret

Resultat meldt af Twin	Korrekt resultat
DRB4*01:01:01:01	DRB4*01:01:01:01/DRB4*03:01N

7 Revisions- og ændringshistorik

Version	Godkendelsesdato	Forfatter	Resumé af ændringer	Godkendt af
v1	05-jul-2017	Krisztina Rigó	Algoritmiske begrænsninger indsamlet. Dokument lagt sammen med det Holotype HLA-specifikke begrænsningsdokument.	Efthymia Melista, Zoltán Simon, Peter Meintjes, Gabriella Adlovits
v2	31-jan-2018	Krisztina Rigó	Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA v3.28.0 og v3.29.0.1. Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversioner: Twin 2.1.3, Twin 2.1.4 og Twin 2.5.0.	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v3	04-jul-2018	Krisztina Rigó	Yderligere fasningsrelaterede tilfælde er tilføjet. En kort vejledning i identifikation af forkert fasninng er tilføjet. Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA v3.30.0. Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversioner: Twin 2.5.1 og Twin 3.0.0.	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v4	19-okt-2018	Krisztina Rigó	Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA v3.31.0. Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversioner: Twin 3.1.0 og Twin 3.1.1. Oplysninger vedrørende software- og IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørte versioner: Omixon HLA Twin 2.1.3 og 2.1.4, IMGT/HLA 3.28.0_4. Specifikke eksempler er fjernet, hvor allelspecificitet ikke kunne dokumenteres. Yderligere begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme er tilføjet.	Márton Pogány, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits

Version	Godkendelsesdato	Forfatter	Resumé af ændringer	Godkendt af
v5	14-jan-2019	Krisztina Rigó	<p>Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA v3.32.0.</p> <p>Oplysninger vedrørende IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørt version: IMGT/HLA 3.29.0.1_5.</p> <p>Afsnittene om analysebegrænsning blev udvidet med følgende analyseversion: Holotype HLA v3.0.</p> <p>Formateringen er ændret i afsnittet "Ambiguiteter, som berører ekspression", og der blev tilføjet et nyt tilfælde.</p> <p>Der blev tilføjet endnu et tilfælde i afsnittet "Cis/Trans-ambiguiteter" for HLA-DPB1.</p> <p>Yderligere mindre ændringer og opdateringer.</p>	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v6	26-mar-2019	Krisztina Rigó	<p>Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA 3.32.0_7, 3.33.0_7 og 3.34.0_8.</p> <p>Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversion: Twin 3.1.3.</p> <p>Oplysninger vedrørende software- og IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørte versioner: Omixon HLA Twin 2.5.0, IMGT/HLA 3.30.0_5 og 3.31.0_5.</p> <p>Produktversioner, som er berørt af DQB1*03:276N-ambiguiteten, er rettet og opdateret.</p> <p>Specifikke eksempler er fjernet fra afsnittet om Cis/Trans-ambiguiteter for HLA-DPB1.</p> <p>Yderligere mindre ændringer og opdateringer.</p>	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v7	26-apr-2019	Krisztina Rigó	<p>Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA 3.35.0_8.</p> <p>En begrænsning i den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme, som skyldes identiske regionssekvenser på forskellige loci, er opdateret.</p> <p>En begrænsning i konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen vedrørende nye insertioner/deletioner er opdateret.</p> <p>Afsnittet "Ambiguiteter i første, andet og tredje felt" er omorganiseret.</p>	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits

Version	Godkendelsesdato	Forfatter	Resumé af ændringer	Godkendt af
v8	19-jul-2019	Krisztina Rigó	Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA 3.36.0_8. Oplysninger vedrørende software- og IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørte versioner: Omixon HLA Twin 2.5.1, IMGT/HLA 3.32.0_5, 3.32.0_7. En begrænsning for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen, der berører HLA-DRB3, blev tilføjet.	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v9	8. aug. 2019	Krisztina Rigó	Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversion: Omixon HLA Twin 4.0.0 Oplysninger vedrørende softwareversioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørt version: Omixon HLA Twin 3.0.0. En begrænsning for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen, der berører HLA-DRB1, blev tilføjet.	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Beatrix Kosiba
v10	16. okt. 2019	Krisztina Rigó	Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversion: Omixon HLA Twin 4.0.1.	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v11	19. nov. 2019	Krisztina Rigó	Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA 3.37.0_8. Oplysninger vedrørende software- og IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørte versioner: Omixon HLA Twin 3.1.0, IMGT/HLA 3.33.0_7. Begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme og ambiguitetsrelaterede begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen er omorganiseret.	Efthymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v12	7. jan. 2020	Krisztina Rigó	Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA 3.38.0_8. Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversion: Twin 4.1.0. Oplysninger vedrørende software- og IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørte versioner: IMGT/HLA 3.34.0_8.	Efthymia Melista, Adrienn Kocsis, Gabriella Adlovits

Version	Godkendelsesdato	Forfatter	Resumé af ændringer	Godkendt af
v13	26. mar. 2020	Gergely Tölgyesi, Krisztina Rigó	<p>Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA 3.38.0_9.</p> <p>Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversion: Twin 4.2.0.</p> <p>Oplysninger vedrørende software- og IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørte versioner: IMGT/HLA 3.35.0_8.</p> <p>En begrænsning for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen, der berører nyere IMGT/HLA-versioner, blev tilføjet. Afsnittet om analysebegrænsning blev udvidet med problemet med sporadisk forekommende specifikke falske positive resultater for DRB3/4/5, og det specifikke fænomen i analyseworkflow 3.0 med "hvidt bundfald" og forslag til håndtering af dette.</p>	Efthymia Melista, Gabriella Adlovits, Elmar Schilling
v14	1. juli 2020	Gergely Tölgyesi, Krisztina Rigó	<p>Oplysninger vedrørende software- og IMGT/HLA-versioner, som er mere end 12+1 måned gamle, er fjernet. Berørte versioner: IMGT/HLA 3.36.0_8, Omixon HLA Twin version 3.1.1 og 3.1.3.</p> <p>Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA 3.39.0_9.</p> <p>Softwarebegrænsningsafsnittet er udvidet, så det svarer til følgende softwareversion: Twin 4.2.2.</p> <p>Oplysninger knyttet til Holotype HLA v1 blev fjernet, da denne analyseversion ikke længere understøttes.</p>	Libor Kolesar, Nándor Varga, Gabriella Adlovits, Gergely Tölgyesi, Krisztina Rigó