Omixon Holotype HLA y Omixon HLA Twin

Limitaciones conocidas del producto

Versión 4

Publicado el 19/10/2018

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

1 Revisión e historial de cambios

Versión	Resumen de cambios
v1	Se recopilaron limitaciones algorítmicas. Se fusionó el documento con documento de limitaciones específicas de Holotype HLA.
v2	Las limitaciones relacionadas con la base de datos IMGT/HLA se actualizaron en virtud de IMGT/HLA v3.28.0 y v3.29.0.1. La sección de limitaciones del software se extendió en virtud de las siguientes versiones del software: Twin 2.1.3, Twin 2.1.4 y Twin 2.5.0.
v3	Se han añadido más casos relacionados con la distinción de fases. Se ha añadido una breve guía para identificar distinciones de fases incorrectas. Se han actualizado las limitaciones relacionadas con la base de datos de IMGT/HLA para adaptarlas a IMGT/HLA v3.30.0. La sección de limitaciones del software se extendió en virtud de las siguientes versiones del software: Twin 2.5.1 y Twin 3.0.0.
v4	Se han actualizado las limitaciones relacionadas con la base de datos de IMGT/HLA para adaptarlas a IMGT/HLA v3.31.0. La sección de limitaciones del software se extendió en virtud de las siguientes versiones del software: Twin 3.1.0 y Twin 3.1.1. Se ha eliminado la información relacionada con las versiones del software e IMGT/HLA que tenía una antigüedad superior a 12+1 meses. Versiones afectadas: Omixon HLA Twin 2.1.3 y 2.1.4, IMGT/HLA 3.28.0_4. Se han eliminado ejemplos específicos de problemas en los que no se podía probar la especificidad del alelo. Se han añadido limitaciones adicionales para el algoritmo de genotipificación estadístico.

2 Alcance de este documento

El objetivo de este documento es proporcionar una lista detallada de las limitaciones conocidas del producto Holotype HLA y Omixon HLA Twin. La versión actual (v4) de este documento se confeccionó en virtud de Holotype HLA versiones 1 y 2.1 y Omixon HLA Twin versiones 2.5.0 (CE&RUO), 2.5.1 (CE&RUO), 3.0.0 (RUO), 3.1.0 (RUO) y 3.1.1 (CE&RUO) con IMGT/HLA 3.29.0.1_5, 3.30.0_5 y 3.31.0_5. Salvo que se especifique lo contrario, las limitaciones enumeradas afectan a todas las versiones de ensayos, software y bases de datos dentro del alcance de este documento.

3 Descripción de las limitaciones conocidas del producto

3.1 Limitaciones específicas de Holotype HLA

3.1.1 Ambigüedades específicas de Holotype HLA

En esta sección se presentan las ambigüedades causadas por el diseño del ensayo Omixon Holotype HLA y las limitaciones tecnológicas de NGS (es decir, la ubicación y la secuencia de sitios de inicio y la distribución del tamaño de fragmentos producida por el método usado en el protocolo). Esas ambigüedades no se pueden resolver y se presentan en todas las versiones del software.

Se creó una alineación de secuencias múltiples para cada locus que contenía todas las secuencias de alelos y las secuencias de inicio de Holotype. A continuación, se cortó dicha alineación en virtud de la región meta (es decir, se cortaron los sitios de iniciación y las posiciones fuera de los sitios de iniciación). Se verificaron las secuencias resultantes en busca de duplicados exactos y se recopilaron las relaciones subsiguientes y todas las ambigüedades en los tres campos o resolución inferior o en cualquier resolución que afectara a los alelos con niveles de expresión no estándares.

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

3.1.2 Ambigüedades del primero, segundo y tercer campo

Lineamientos para la confección del informe: Informar como ambiguo

Alelos ambiguos		Efecto en la expresión	Versiones afectadas de IMGT/HLA	Nivel de ambigüedad	Versiones de ensayos afectadas
DPB1*13:01:01	DPB1*107:01	NO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	1.er campo	v1, v2.1
DPB1*105:01:01	DPB1*665:01	NO	v3.30.0_5 v3.31.0_5	1.er campo	v1, v2.1
DQB1*06:01:01	DQB1*06:01:151	NO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	3.er campo	v1
DRB1*09:01:02	DRB1*09:31	NO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	2.do campo	v1, v2.1
DRB1*12:01:01	DRB1*12:10	NO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	2.do campo	v1, v2.1
DRB1*15:02:01	DRB1*15:140	NO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	2.do campo	v1, v2.1

[1] La ambigüedad se resuelve con el uso los cebadores del grupo 1 de DQB1.

3.1.3 Ambigüedades que afectan la expresión

Lineamientos para la confección del informe: Los alelos de expresión baja se informan como resultados de segundo campo

Primeros tres campos comunes en el grupo de alelos	4.to campo en el grupo de alelos ambiguos
A*02:01:01	01, *02L*, 16
B*39:01:01	03, *02L*, 05

3.1.4 Ambigüedades Cis/Trans

Las ambigüedades Cis/Trans (es decir, alelos ambiguos donde los distintos pares de alelos solo difieren en las fases cis/trans) pueden tener diversas causas. La mayoría de esas ambigüedades se informan debido a limitaciones de la tecnología y la base de datos IMGT/HLA.

3.2 Lista de limitaciones conocidas de Omixon HLA Twin

3.3 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación de consenso

3.3.1 Introducción

Todas las limitaciones enumeradas a continuación se basan en las observaciones informadas por los clientes de Holotype HLA o detectadas durante la validación interna y las pruebas de regresión. Tenga en cuenta que antes de

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

finalizar el año 2018, se detectaron estas observaciones en más de 100 000 muestras de kits de Holotype HLA vendidos en todo el mundo.

3.3.2 Falso gen nuevo informado

De manera poco frecuente, HLA Twin puede informar genes nuevos falsos al usuario final. Tenga en cuenta que la gran mayoría de estos genes nuevos falsos pueden ser eliminados mediante la inspección manual de los resultados en Omixon HLA Twin por parte de un usuario capacitado.

3.3.3 Largas inserciones/eliminaciones (indels) de genes nuevos no informadas

Se han observado dos casos en los que Omixon HLA Twin no ha informado de las inserciones o eliminaciones de genes nuevos.

3.3.4 Gen nuevo doble SNP no informado (Versión de solución: Omixon HLA Twin 2.5.1)

Se observó un único caso en el que no se informó de dos genes nuevos SNP consecutivos.

3.3.5 Distinción de fases incorrecta

Se ha observado un número pequeño de casos en los que las fases de las secuencias de consenso se distinguieron de manera incorrecta.

Identificación incorrecta de fases de secuencias de consenso

Se puede sospechar que existe una distinción de fases cis/trans incorrecta si se observa una o más de las siguientes características:

- Se informa de dos alelos nuevos dentro de un solo par de máxima coincidencia.
- Se informa de un alelo nuevo y un alelo parcialmente definido.
- Se informa de uno o dos alelos raros.
- Hay varias posiciones nuevas.

Si se sospecha de una identificación de fases incorrecta, es aconsejable que el usuario inspeccione los resultados del algoritmo de genotipificación estadístico.

3.3.6 Ambigüedad Cis/trans debido a separación en fases deficiente

En algunos casos excepcionales, se informa de ambigüedades de segundo o tercer nivel de campo debido a la existencia de una identificación de fases ineficiente. En estos casos, se recomienda volver a hacer el análisis de los loci afectados con más lecturas.

3.3.7 Resultado de QC informado incorrecto

Modo de falla	**Versión de solución**	**Versiones afectadas del software**
En ocasiones, se asignan valores de índice de ruido de punto a posiciones de consenso incorrectas.	Twin 3.0.0	Twin 2.5.0, Twin 2.5.1

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

3.4 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación estadístico

3.4.1 Algunas secuencias de exones se determinan de manera incorrecta en los análisis de solo exones (Versión de solución: Omixon HLA Twin 3.1.0)

Modo de falla	Versión de solución	Versión afectada del software
Debido a la existencia de algunas incoherencias en la base de datos de IMGT/HLA y en el método de manejo de la base de datos de IMGT/HLA introducido en Twin 3.1.0, algunas secuencias de regiones se determinaron de manera incorrecta en los análisis de solo exones.	Twin 3.1.0	Twin 3.0.0

4 Limitaciones conocidas de HLA-A

4.1 Limitaciones específicas de Omixon HLA Twin

4.1.1 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación estadístico

Alelos no informados conocidos del algoritmo de genotipificación estadístico

Debido a la similitud de las secuencias de exones de algunos pares de alelos, el algoritmo de genotipificación estadístico informa de alelos incorrectos en algunos casos en los siguientes grupos de alelos:

- A*24:02/A*24:253

5 Limitaciones conocidas de HLA-B

5.1 Limitaciones específicas de Holotype HLA

5.1.1 Alelos que pueden presentar amplificación baja.

La amplificación baja significa que el conteo leído generado para un alelo no es suficiente para la genotipificación. En casos extremos, es probable que el alelo no se informe en absoluto (omisión).

Alelos de amplificación baja	Compensación en HLA Twin	Resolución de detección
B*51:01:02	SÍ	SÍ

5.2 Limitaciones específicas de Omixon HLA Twin

5.2.1 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación de consenso

Resultados ambiguos informados debido a un pérdida de consenso para uno de los alelos

Alelo afectado	Alelos adicionales informados
B*08:01:01	B*08:182, B*08:01:20
B*40:01:02	B*40:01:45
B*35:01:01	B*35:347, B*35:01:23, B*35:42:01

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

HLA-B*15:01 mal informado

En algunos casos excepcionales, se puede informar mal de alelos que pertenecen al siguiente grupo de alelos:

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

5.2.2 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación estadístico

Se detectan HLA-B*44:02:01 y HLA-B*44:03:01 por error debido a la presencia de una secuencia de exón idéntica en HLA-C.

Resultados de genotipificación estadística	Resultado correcto
HLA-B*40:01:02+HLA-B*44:188/HLA-B*44:46	HLA-B*40:01:02+HLA-B*44:03:01
HLA-B*45:01:01+HLA-B*44:188/HLA-B*44:46	HLA-B*45:01:01+HLA-B*44:03:01

6 Limitaciones conocidas de HLA-C

6.1 Limitaciones específicas de Omixon HLA Twin

6.1.1 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación estadístico

Alelos no informados habituales del algoritmo de genotipificación estadístico

Debido a la similitud de las secuencias de exones de algunos pares de alelos, el algoritmo de genotipificación estadístico informa de alelos incorrectos en algunos casos en los siguientes grupos de alelos:

- C*04:01/C*04:09N
- C*07:02/C*07:01/C*07:18

7 Limitaciones conocidas de HLA-DPB1

7.1 Limitaciones específicas de Holotype HLA

7.1.1 Amplificación menor o fallada para HLA-DPB1 en DP-multiplex

Modo de falla	Versiones de ensayo afectadas
Se observa una amplificación reducida o una falla en la amplificación de HLA-DPB1.	Configuración de Holotype HLA v1: 11 locus

7.1.2 Ambigüedades Cis/Trans

Lineamientos para la confección del informe: Es decisión de cada laboratorio si se informa la ambigüedad de los grupos G o se informan los pares de alelos específicos que son ambiguos.

Alelos ambiguos		Causa de la ambigüedad	Diferencia de 2 campos
DPB1*02:01:02+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01+ DPB1*416:01	Falta de fases entre el exón 2, el intrón 2 (si corresponde) y el exón 3	SÍ

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

Alelos ambiguos		Causa de la ambigüedad	Diferencia de 2 campos
DPB1*03:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*351:01+ DPB1*463:01	Falta de fase entre los exones 2 y 3	SÍ
DPB1*04:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01 / DPB1*665:01 + DPB1*126:01	Falta de fase entre los exones 2 y 3	SÍ
DPB1*04:01:01+ DPB1*13:01:01 (DPB1*107:01)	DPB1*133:01+ DPB1*350:01	Falta de fase entre los exones 2 y 3	SÍ
DPB1*04:01:01+ DPB1*14:01:01	DPB1*350:01+ DPB1*651:01	Falta de fase entre los exones 2 y 3	SÍ
DPB1*04:02:01+ DPB1*17:01:01	DPB1*105:01+ DPB1*460:01	Falta de fases entre el exón 2, el intrón 2 (si corresponde) y el exón 3	SÍ
DPB1*04:01:01+ DPB1*463:01	DPB1*105:01+ DPB1*350:01	Falta de fase entre los exones 2 y 3	SÍ

7.2 Limitaciones específicas de Omixon HLA Twin

7.2.1 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación de consenso

Ambigüedad no informada

Resultado informado por Twin	Resultado correcto	Versiones de IMGT/HLA afectadas
DPB1*126:01+DPB1*665:01| DPB1*105:01+DPB1*126:01	DPB1*126:01+DPB1*665:01| DPB1*105:01+DPB1*126:01| **DPB1*04:01+DPB1*04:02**	v3.30.0_5, v3.31.0_5

8 Limitaciones conocidas de HLA-DQB1

8.1 Limitaciones específicas de Holotype HLA

8.1.1 Alelos que pueden presentar amplificación baja.

La amplificación baja significa que el conteo leído generado para un alelo no es suficiente para la genotipificación. Es posible que en algunos casos no se informe del alelo en absoluto (omisión).

Alelos de amplificación baja	Compensación en HLA Twin	Resolución de detección
DQB1*03	SÍ	SÍ[1]

[1] Sugerencia basada en desequilibrio de ligamento (DL) con DQA1

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

9 Limitaciones conocidas de HLA-DRB1

9.1 Limitaciones tecnológicas

Puede observarse desequilibrio moderado de alelos en el caso de alelos que tengan secuencias significativamente más largas que la media (por ejemplo, algunos alelos HLA-DRB1*04). En algunos casos excepcionales, se puede observar un alto desequilibrio de alelos. También cabe esperar que esporádicamente se produzcan omisiones de alelos.

9.2 Limitaciones específicas de Holotype HLA

9.2.1 Amplificación no específica

Modo de falla	Posibles efectos	Versiones de ensayos afectadas
En algunos casos excepcionales, se puede observar un amplicón adicional en la segunda mitad del gen (del intrón 4 al 3'UTR).	Si el amplicón no específico solo está presente para uno de los alelos, es posible que se informen inconsistencias falsas para el intrón 4.	v1

9.2.2 Amplificación baja

En algunos casos se puede observar desequilibrio entre moderado y alto para los alelos HLA-DRB1*07. En casos extremadamente excepcionales, cabe esperar que esporádicamente se produzcan omisiones de alelos.

9.3 Limitaciones específicas de Omixon HLA Twin

9.3.1 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación de consenso

Ambigüedad de HLA-DRB1*12:01 no informada

Resultado informado por Twin	Resultado correcto	Versiones de IMGT/HLA afectadas
DRB1*12:10	DRB1*12:10/DRB1*12:01:01	v3.29.0.1_5, v3.30.0_5, v3.31.0_5

9.3.2 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación estadístico

Alelos no informados habituales del algoritmo de genotipificación estadístico

Debido a la similitud de las secuencias de exones de algunos pares de alelos, el algoritmo de genotipificación estadístico informa de alelos incorrectos o no informa de ambigüedades inherentes en algunos casos en los siguientes grupos de alelos:

- DRB1*08:01:01/DRB1*08:77
- DRB1*09:01:02/DRB1*09:31/DRB1*09:21
- DRB1*15:02:01/DRB1*15:140

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.

10 Limitaciones conocidas de HLA-DRB3

10.1 Limitaciones específicas de Holotype HLA

10.1.1 Amplificación no específica

Modo de falla	Posibles efectos	Versiones de ensayos afectadas
En algunos casos excepcionales, se puede observar un amplicón adicional en la segunda mitad del gen (del intrón 4 al 3'UTR).	Si el amplicón no específico solo está presente para uno de los alelos, es posible que se informen inconsistencias falsas para el intrón 4.	v1

11 Limitaciones conocidas de HLA-DRB4

11.1 Limitaciones específicas de Holotype HLA

11.1.1 Alelos que pueden presentar amplificación baja.

La amplificación baja significa que el conteo leído generado para un alelo no es suficiente para la genotipificación. En casos extremos, es probable que el alelo no se informe en absoluto (omisión). Se han observado con mucha frecuencia amplificación baja y omisiones de alelos para HLA-DRB4*01:01. En casos excepcionales, se ha informado de omisiones de alelos para los alelos HLA-DRB4*01:03. En ambos casos, Omixon HLA Twin sugiere la presencia del alelo sobre la base del desequilibrio de ligamento.

11.1.2 Otras limitaciones relacionadas con el ensayo

Mediciones de concentración positiva falsas en HLA-DRB4

Se pueden observar concentraciones de amplicón en algunos casos, aunque:

- el individuo no tenga una copia del gen HLA-DRB4; o
- el individuo no tenga un o dos copias del gen HLA-DRB4, pero la amplificación no haya sido exitosa.

11.2 Limitaciones específicas de Omixon HLA Twin

11.2.1 Limitaciones conocidas del algoritmo de genotipificación de consenso

Ambigüedad no informada

Resultado informado por Twin	Resultado correcto
DRB4*01:02N	DRB4*01:02N/DRB4*01:03N
DRB4*01:01:01:01	DRB4*01:01:01:01/DRB4*01:03N

Copyright 2018, Omixon Biocomputing Ltd. Privado y confidencial.