



Omixon Holotype HLA e Omixon HLA Twin

Limitações conhecidas do produto

Versão 4

Publicada em 19/10/2018

1 Histórico de revisões e alterações

Versão	Resumo de alterações
v1	Limitações algorítmicas recolhidas. Documento combinado com documento de limitações específicas do Holotype HLA.
v2	As limitações associadas à base de dados IMGT/HLA foram atualizadas, para corresponder à IMGT/HLA v3.28.0 e v3.29.0.1. A secção de limitação de software foi expandida para corresponder às seguintes versões de software: Twin 2.1.3, Twin 2.1.4 e Twin 2.5.0.
v3	Foram adicionados casos associados a faseamentos adicionais. Foi adicionado um guia breve para identificar faseamentos incorretos. As limitações associadas à base de dados IMGT/HLA foram atualizadas, para corresponder à IMGT/HLA v3.30.0. A secção de limitação de software foi expandida para corresponder às seguintes versões de software: Twin 2.5.1 e Twin 3.0.0.
v4	As limitações associadas à base de dados IMGT/HLA foram atualizadas, para corresponder à IMGT/HLA v3.31.0. A secção de limitação de software foi expandida para corresponder às seguintes versões de software: Twin 3.1.0 e Twin 3.1.1. Foram removidas as informações relacionadas com o software e com as versões IMGT/HLA anteriores a 12+1 meses. Versões afetadas: Omixon HLA Twin 2.1.3 e 2.1.4, IMGT/HLA 3.28.0_4. Foram removidos exemplos específicos para questões em que não foi possível comprovar a especificidade do alelo. Foram adicionadas limitações adicionais para o algoritmo de genotipagem estatístico

2 Âmbito deste documento

O objetivo deste documento é fornecer uma lista abrangente de limitações de produto conhecidas para o Holotype HLA e o Omixon HLA Twin. A versão atual (v4) deste documento foi compilada utilizando as versões Holotype HLA 1 e 2.1 e Omixon HLA Twin versões 2.5.0 (CE&RUO), 2.5.1 (CE&RUO), 3.0.0 (RUO), 3.1.0 (RUO), e 3.1.1 (CE&RUO) com IMGT/HLA 3.29.0.1_5, 3.30.0_5, e 3.31.0_5. Salvo especificação em contrário, as limitações listadas estão a afetar todas as versões de teste, software e base de dados, no âmbito deste documento.

3 Aspectos gerais das limitações conhecidas do produto

3.1 Limitações específicas do Holotype HLA

3.1.1 Ambiguidades específicas do Holotype HLA

Esta secção contém ambiguidades que são causadas pelo design de teste do Omixon Holotype HLA e pelas limitações tecnológicas de NGS (ou seja, a localização e sequência de locais de iniciadores e a distribuição de tamanho de fragmento produzida pelo método de seleção de tamanho utilizado no protocolo). Essas ambiguidades não são solucionáveis e apresentam-se em todas as versões do software.

Foi criado um alinhamento de sequência múltipla para cada loci, incluindo todas as sequências de alelos e as sequências de iniciadores de holótipo. Em seguida, este alinhamento foi cortado para a região alvo (isto é, foram cortados os locais de iniciadores e qualquer posição fora dos locais de iniciadores). As sequências resultantes foram então verificadas relativamente a duplicados exatos e a relações de subsequência, tendo sido recolhidas todas as

ambiguidades de campo três ou resolução mais baixa ou em qualquer resolução, porém afetando alelos com níveis de expressão não padronizados.

3.1.2 Ambiguidades de primeiro, segundo e terceiro campos

Diretrizes para comunicação: indicar como ambíguo

Alelos ambíguos		Tem efeito na expressão	Versões IMGT/HLA afetadas	Nível de ambiguidade	Versões de teste afetadas
DPB1*13:01:01	DPB1*107:01	NÃO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	1º campo	v1, v2.1
DPB1*105:01:01	DPB1*665:01	NÃO	v3.30.0_5 v3.31.0_5	1º campo	v1, v2.1
DQB1*06:01:01	DQB1*06:01:151	NÃO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	3º campo	v1
DRB1*09:01:02	DRB1*09:31	NÃO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	2º campo	v1, v2.1
DRB1*12:01:01	DRB1*12:10	NÃO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	2º campo	v1, v2.1
DRB1*15:02:01	DRB1*15:140	NÃO	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	2º campo	v1, v2.1

¹ A ambiguidade é resolvida quando são utilizados iniciadores DQB1 série 1

3.1.3 Ambiguidades que afetam a expressão

Diretrizes para comunicação: Os alelos de baixa expressão são comunicados como resultado de 2.º campo

Primeiros três campos comuns no grupo de alelos	4º campo no grupo de alelos ambíguos
A*02:01:01	01, 02L, 16
B*39:01:01	03, 02L, 05

3.1.4 Ambiguidades Cis/Trans

As ambiguidades Cis/Trans (ou seja, obtenção de alelos ambíguos em que os diferentes pares de alelos apenas diferem na fase Cis/Trans) podem ter várias causas principais. A maioria destas ambiguidades são comunicadas devido a limitações da tecnologia e da base de dados IMGT/HLA.

3.2 Lista de limitações conhecidas para o Omixon HLA Twin

3.3 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem consensual

3.3.1 Introdução

Todas as limitações listadas abaixo foram baseadas em observações comunicadas pelos clientes do Holotype HLA ou efetuadas durante a validação interna e o teste de regressão. Ter em atenção que, antes do final de 2018, estas observações foram efetuadas a partir de quase 100 000 amostras de kits Holotype HLA, vendidos em todo o mundo.

3.3.2 Novidades incorretas obtidas

Raramente, o HLA Twin pode comunicar novidades incorretas ao utilizador final. Ter em atenção que a grande maioria destas novidades incorretas podem ser eliminadas por verificação manual dos resultados no Omixon HLA Twin por um utilizador devidamente formado para o efeito.

3.3.3 Novidades de indels longos perdidos

Foram observados dois casos, nos quais inserções ou eliminações de novidades de indels longos não foram comunicadas pelo Omixon HLA Twin.

3.3.4 Novidade SNP dupla não comunicada (Versão corrigida: Omixon HLA Twin 2.5.1)

Foi observado um único caso em que duas novidades SNP consecutivas não foram comunicadas.

3.3.5 Faseamento incorreto

Foram observados poucos casos em que as sequências de consenso foram faseadas incorretamente.

Identificação de sequências de consenso faseadas incorretamente

Pode suspeitar-se de faseamento Cis/Trans incorreto se uma ou mais das seguintes características forem observadas:

- Dois alelos novos forem comunicados dentro de um único par de melhor correspondência.
- Se for comunicado um alelo novo e um alelo parcialmente definido.
- Se forem comunicados um ou dois alelos raros.
- Se existirem várias posições novas.

Se houver suspeita de faseamentos incorretos, o utilizador é aconselhado a verificar os resultados do algoritmo de genotipagem estatística.

3.3.6 Ambiguidade Cis/Trans devido a faseamento ineficiente

Em alguns casos raros, são comunicadas ambiguidades de segundo ou terceiro nível de campo devido a faseamentos ineficazes. Nestes casos, sugere-se nova análise dos loci afetados com mais leituras.

3.3.7 Comunicado resultado CQ incorreto

Modo de falha	Corrigir versão	Versões de software afetadas
Os valores da relação de ruído local são, por vezes, atribuídos a posições de consenso incorretas	Twin 3.0.0	Twin 2.5.0, Twin 2.5.1

3.4 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem estatístico

3.4.1 Algumas sequências de exões determinadas incorretamente em análises apenas de exões (versão corrigida: Omixon HLA Twin 3.1.0)

Modo de falha	Corrigir versão	Versão de software afetada
Devido a algumas inconsistências na base de dados IMGT/HLA e no método de tratamento de base de dados IMGT/HLA introduzido no Twin 3.1.0, algumas sequências de regiões foram determinadas incorretamente para análises apenas de exões.	Twin 3.1.0	Twin 3.0.0

4 Limitações conhecidas do produto para o HLA-A

4.1 Limitações específicas do Omixon HLA Twin

4.1.1 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem estatístico

Estimativas incorretas conhecidas do algoritmo de genotipagem estatístico

Devido à similaridade das sequências de exões de alguns pares de alelos, o algoritmo de genotipagem estatístico comunica alelos incorretos em alguns casos para os seguintes grupos de alelos:

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

5 Limitações conhecidas do produto para o HLA-B

5.1 Limitações específicas do Holotype HLA

5.1.1 Alelos que podem apresentar amplificação baixa

A amplificação baixa significa que a contagem gerada para um alelo não é suficiente para genotipagem. Em casos extremos, os alelos poderão nem chegar a ser comunicados (abandonados).

Alelos de baixa amplificação	Compensação no HLA Twin	Resolução de detecção
B*51:01:02	SIM	SIM

5.2 Limitações específicas do Omixon HLA Twin

5.2.1 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem consensual

Resultado ambíguo comunicado devido a perda consensual para um dos alelos

Alelo afetado	Alelos comunicados adicionalmente
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

HLA-B*15:01 obtido incorretamente

Em alguns casos raros, podem ser estimados incorretamente os alelos que pertencem ao seguinte grupo de alelos:

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

5.2.2 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem estatístico

HLA-B*44:02:01 e HLA-B*44:03:01 não são obtidos devido à presença de uma sequência exónica idêntica em HLA-C

Resultado de genotipagem estatística	Resultado correto
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 Limitações conhecidas do produto para HLA-C

6.1 Limitações específicas do Omixon HLA Twin

6.1.1 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem estatístico

Estimativas incorretas comuns do algoritmo de genotipagem estatístico

Devido à similaridade das sequências de exões de alguns pares de alelos, o algoritmo de genotipagem estatístico comunica alelos incorretos em alguns casos para os seguintes grupos de alelos:

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

7 Limitações conhecidas do produto para HLA-DPB1

7.1 Limitações específicas do Holotype HLA

7.1.1 Amplificação baixa ou falhada para HLA-DPB1 no DP-multiplex

Modo de falha	Versão de teste afetada
O HLA-DPB1 apresenta amplificação baixa ou falha ao amplificar	Holotype HLA v1 – configuração locus 11

7.1.2 Ambiguidades Cis/Trans

Diretrizes para comunicação: Fica ao critério de cada laboratório a comunicação da ambiguidade, utilizando os grupos G ou a indicação dos pares de alelos específicos que são ambíguos.

Alelos ambíguos		Causa da ambiguidade	Diferença entre os dois campos
DPB1*02:01:02+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01+ DPB1*416:01	Inexistência de fase entre o exão 2, o intrão 2 (se aplicável) e o exão 3	SIM

Alelos ambíguos		Causa da ambiguidade	Diferença entre os dois campos
DPB1*03:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*351:01+ DPB1*463:01	Inexistência de fase entre os exões 2 e 3	SIM
DPB1*04:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01 / DPB1*665:01 + DPB1*126:01	Inexistência de fase entre os exões 2 e 3	SIM
DPB1*04:01:01+ DPB1*13:01:01 (DPB1*107:01)	DPB1*133:01+ DPB1*350:01	Inexistência de fase entre os exões 2 e 3	SIM
DPB1*04:01:01+ DPB1*14:01:01	DPB1*350:01+ DPB1*651:01	Inexistência de fase entre os exões 2 e 3	SIM
DPB1*04:02:01+ DPB1*17:01:01	DPB1*105:01+ DPB1*460:01	Inexistência de fase entre o exão 2, o intrão 2 (se aplicável) e o exão 3	SIM
DPB1*04:01:01+ DPB1*463:01	DPB1*105:01+ DPB1*350:01	Inexistência de fase entre os exões 2 e 3	SIM

7.2 Limitações específicas do Omixon HLA Twin

7.2.1 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem consensual

Ambiguidade não comunicada

Resultado obtido por Twin	Resultado correto	Versões IMGT/HLA afetadas
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 Limitações conhecidas do produto para HLA-DQB1

8.1 Limitações específicas do Holotype HLA

8.1.1 Alelos que podem apresentar amplificação baixa

A amplificação baixa significa que a contagem gerada para um alelo não é suficiente para genotipagem. Em alguns casos, os alelos poderão nem chegar a ser comunicados (abandonados).

Alelos de baixa amplificação	Compensação no HLA Twin	Resolução de detecção
DQB1*03	SIM	SIM ¹

¹ Sugestão baseada no desequilíbrio de ligação (LD) com DQA1

9 Limitações conhecidas do produto para HLA-DRB1

9.1 Limitações tecnológicas

É possível observar um desequilíbrio alélico moderado para alelos com sequências significativamente mais longas do que a média (por exemplo, alguns alelos HLA-DRB1*04). Em alguns casos raros, pode ser observado um desequilíbrio alélico elevado. Esporadicamente, podem esperar-se alelos abandonados.

9.2 Limitações específicas do Holotype HLA

9.2.1 Amplificação não específica

Modo de falha	Efeitos possíveis	Versões de teste afetadas
Em alguns casos raros, é possível observar um amplicon adicional na segunda metade do gene (desde o intrão 4 através de 3'UTR).	Caso o amplicon não específico se encontre presente apenas num dos alelos, podem ser comunicadas incompatibilidades falsas para o intrão 4.	v1

9.2.2 Amplificação baixa

Em alguns casos, pode ser observado um desequilíbrio alélico moderado a elevado para alelos HLA-DRB1*07. Muito raramente, podem esperar-se alelos abandonados.

9.3 Limitações específicas do Omixon HLA Twin

9.3.1 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem consensual

Ambiguidade HLA-DRB1*12:01 em falta

Resultado obtido por Twin	Resultado correto	Versões IMGT/HLA afetadas
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 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem estatístico

Estimativas incorretas comuns do algoritmo de genotipagem estatístico

Devido à similaridade das sequências de exões de alguns pares de alelos, o algoritmo de genotipagem estatístico comunica alelos incorretos ou não comunica ambiguidades inerentes em alguns casos para os seguintes 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

10 Limitações conhecidas do produto para HLA-DRB3

10.1 Limitações específicas do Holotype HLA

10.1.1 Amplificação não específica

Modo de falha	Efeitos possíveis	Versões de teste afetadas
Em alguns casos raros, é possível observar um amplicon adicional na segunda metade do gene (desde o intrão 4 através de 3'UTR).	Caso o amplicon não específico se encontre presente apenas num dos alelos, podem ser comunicadas incompatibilidades falsas para o intrão 4.	v1

11 Limitações conhecidas do produto para HLA-DRB4

11.1 Limitações específicas do Holotype HLA

11.1.1 Alelos que podem apresentar amplificação baixa

A amplificação baixa significa que a contagem gerada para um alelo não é suficiente para genotipagem. Em casos extremos, os alelos poderão nem chegar a ser comunicados (abandonados). Têm sido observados frequentemente amplificação baixa e alelos abandonados para HLA-DRB4*01:01. Em casos raros, foram comunicados alelos abandonados para alelos HLA-DRB4*01:03. Em ambos os casos, a presença do alelo é sugerida com base no desequilíbrio de ligação do Omixon HLA Twin.

11.1.2 Limitações associadas a outro teste

Medições de concentração falsa positiva para HLA-DRB4

Podem ser observadas concentrações elevadas de amplicon em algumas amostras, apesar de:

- o indivíduo não possuir cópia do gene HLA-DRB4 ou
- o indivíduo possuir efetivamente uma ou duas cópias do gene HLA-DRB4, porém a amplificação não ter sido bem sucedida.

11.2 Limitações específicas do Omixon HLA Twin

11.2.1 Limitações conhecidas do algoritmo de genotipagem consensual

A ambiguidade não é comunicada

Resultado obtido por Twin	Resultado correto
DRB4*01:02N	DRB4*01:02N/DRB4*01:03N
DRB4*01:01:01:01	DRB4*01:01:01:01/DRB4*01:03N