



Omixon Holotype HLA și Omixon HLA Twin

Limitările cunoscute ale produsului

Versiunea 4

Publicată la data de 19/10/2018

1 Istoricul reviziilor și modificărilor

Versiune	Rezumatul modificărilor
v1	Limitări algoritmice colectate. Document fuzionat cu documentul privind limitările specifice Holotype HLA.
v2	Limitările legate de baza de date IMGT/HLA au fost actualizate în vederea concordanței cu IMGT/HLA v3.28.0 și v3.29.0.1. Secțiunea cu limitări ale programului software a fost extinsă, în vederea concordanței cu versiunile de software de mai jos: Twin 2.1.3, Twin 2.1.4 și Twin 2.5.0.
v3	S-au adăugat cazuri suplimentare legate de fază. S-a adăugat un scurt ghid pentru identificarea fazei incorecte. Limitările legate de baza de date IMGT/HLA au fost actualizate în vederea concordanței cu IMGT/HLA v3.30.0. Secțiunea cu limitări ale programului software a fost extinsă, în vederea concordanței cu versiunile de software de mai jos: Twin 2.5.1 și Twin 3.0.0.
v4	Limitările legate de baza de date IMGT/HLA au fost actualizate în vederea concordanței cu IMGT/HLA v3.31.0. Secțiunea cu limitări ale programului software a fost extinsă, în vederea concordanței cu versiunile de software de mai jos: Twin 3.1.0 și Twin 3.1.1. Informațiile legate de versiunile software-ului și ale IMGT/HLA care erau mai vechi de 12+1 luni au fost eliminate. Versiuni afectate: Omixon HLA Twin 2.1.3 și 2.1.4, IMGT/HLA 3.28.0_4. S-au eliminat exemple specifice pentru situații în care specificitatea alelelor nu a putut fi dovedită. S-au adăugat limitări suplimentare pentru algoritmul de genotipare statistică.

2 Sfera de aplicabilitate a acestui document

Scopul acestui document este de a furniza o listă completă a limitărilor cunoscute ale produselor pentru Holotype HLA și Omixon HLA Twin. Versiunea curentă (v4) a acestui document a fost generată utilizându-se Holotype HLA, versiunile 1 și 2.1 și Omixon HLA Twin, versiunile 2.5.0 (CE&RUO), 2.5.1 (CE&RUO), 3.0.0 (RUO), 3.1.0 (RUO) și 3.1.1 (CE&RUO), cu IMGT/HLA 3.29.0.1_5, 3.30.0_5 și 3.31.0_5. Cu excepția cazurilor în care se specifică altceva, limitările enumerate afectează toate versiunile de teste, software și baze de date incluse în sfera de aplicabilitate a prezentului document.

3 Prezentare generală a limitărilor cunoscute ale produsului

3.1 Limitările specifice Holotype HLA

3.1.1 Ambiguitățile specifice Holotype HLA

Această secțiune conține ambiguități cauzate de designul testului Omixon Holotype HLA și de limitările tehnologice ale NGS (adică amplasamentul și secvența situsurilor pentru primer și distribuția dimensiunilor fragmentelor, generată de metoda de selectare a dimensiunilor care se utilizează în cadrul protocolului). Aceste ambiguități nu pot fi soluționate și există în toate versiunile software-ului.

S-a creat o aliniere cu secvențe multiple pentru fiecare locus care conține toate secvențele de alele și secvențele de primer Holotype. Apoi s-au îndepărtat porțiuni din aliniere, aceasta acoperind doar regiunea vizată (adică s-au îndepărtat situsurile pentru primer și orice poziție care se află în afara situsurilor pentru primer). Secvențele rezultate au fost verificate pentru a se identifica duplicatele exacte și relațiile subsecvente și s-au înregistrat toate ambiguitățile cu rezoluții pe trei câmpuri sau mai scăzute sau cu orice rezoluție, dar care afectau alelele cu nivele de expresie non-standard.

3.1.2 Ambiguități pentru primul, al doilea și al treilea câmp

Linii directoare cu privire la raportare: Raportează ca prezentând ambiguități

Alele cu ambiguități		Are efect asupra expresiei	Versiuni IMGT/HLA afectate	Nivel de ambiguitate	Versiuni ale testelor afectate
DPB1*13:01:01	DPB1*107:01	NU	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	Primul câmp	v1, v2.1
DPB1*105:01:01	DPB1*665:01	NU	v3.30.0_5 v3.31.0_5	Primul câmp	v1, v2.1
DQB1*06:01:01	DQB1*06:01:151	NU	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	Al treilea câmp	v1
DRB1*09:01:02	DRB1*09:31	NU	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	Al doilea câmp	v1, v2.1
DRB1*12:01:01	DRB1*12:10	NU	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	Al doilea câmp	v1, v2.1
DRB1*15:02:01	DRB1*15:140	NU	v3.29.0.1_5 v3.30.0_5 v3.31.0_5	Al doilea câmp	v1, v2.1

¹ Ambiguitatea este înlăturată când se utilizează primeri din setul 1 DQB1

3.1.3 Ambiguități care afectează expresia

Linii directoare cu privire la raportare: Alelele cu expresie scăzută sunt raportate ca rezultate aferente câmpului 2

Primele trei câmpuri comune din grupul alelelor	Al patrulea câmp din grupul alelelor cu ambiguități
A*02:01:01	01, 02L, 16
B*39:01:01	03, 02L, 05

3.1.4 Ambiguități cis/trans

Ambiguitățile cis/trans (adică alele cu ambiguități în care perechile diferite de alele se diferențiază numai în faza cis/trans) pot avea mai multe cauze. Majoritatea acestor ambiguități sunt raportate din cauza limitărilor tehnologiei și din cauza bazei de date IMGT/HLA.

3.2 Lista limitărilor cunoscute pentru Omixon HLA Twin

3.3 Limitările cunoscute ale Algoritmului de genotipare a consensului

3.3.1 Introducere

Toate limitările indicate mai jos au la bază observațiile raportate de clienții Holotype HLA sau observațiile efectuate în cursul procesului de validare internă și în cursul testelor de regresie. Rețineți că înainte de sfârșitul anului 2018, aceste observații au fost rezultatul probelor efectuate pe aproape 100.000 de eșantioane de kituri Holotype HLA vândute în întreaga lume.

3.3.2 Noi expresii false identificate

În cazuri rare, există posibilitatea ca HLA Twin să raporteze noi expresii false către utilizatorii finali. Rețineți că marea majoritate a acestor noi expresii false poate fi eliminată printr-o inspecție manuală a rezultatelor obținute prin intermediul Omixon HLA Twin, efectuată de un utilizator instruit corespunzător.

3.3.3 Indels (inserțiile/delețiile) pentru expresia nouă lungă nu au fost identificate

Au existat două cazuri în care inserțiile sau delețiile expresiei noi lungi nu au fost raportate de Omixon HLA Twin.

3.3.4 SNP cu nouă expresie dublă neraportat (Versiune care include remedierea: Omixon HLA Twin 2.5.1)

A existat un singur caz în care două SNP consecutive cu expresie nouă nu au fost raportate.

3.3.5 Fază incorectă

Au existat câteva cazuri, puține la număr, în care faza secvențelor consens a fost incorectă.

Identificarea secvențelor consens cu fază incorectă

Fazele cis/trans incorecte pot fi suspectate dacă se observă una sau mai multe dintre caracteristicile de mai jos:

- Două alele noi sunt raportate în cadrul aceleiași perechi de potriviri.
- Se raportează o alelă nouă și o alelă parțial definită.
- Se raportează una sau două alele rare.
- Există mai multe poziții noi.

Dacă se suspectează existența fazei incorecte, se recomandă ca utilizatorul să inspecteze rezultatele algoritmului de genotipare statistică.

3.3.6 Ambiguitate cis/trans cauzată de faza ineficientă

În anumite cazuri rare sunt raportate ambiguități pentru al doilea și al treilea câmp, din cauza fazei ineficiente. În aceste cazuri, se recomandă efectuarea din nou a analizei locusurilor afectate, cu efectuarea mai multor citiri.

3.3.7 Rezultat CC incorect raportat

Mod eroare	Versiune care include remedierea	Versiune(i) software afectată(e)
Valorile aferente ratei perturbațiilor sunt asociate uneori unor poziții consens incorecte	Twin 3.0.0	Twin 2.5.0, Twin 2.5.1

3.4 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare statistică

3.4.1 Anumite secvențe exonice determinate incorect în analize efectuate exclusiv pe exoni (Versiune care include remedierea: Omixon HLA Twin 3.1.0)

Mod eroare	Versiune care include remedierea	Versiune software afectată
Din cauza unor neconcordanțe la nivelul bazei de date IMGT/HLA și a metodei de gestionare a bazei de date IMGT/HLA care a fost introdusă de Twin 3.1.0, anumite secvențe ale regiunii au fost determinate incorect pentru analize efectuate exclusiv pe exoni.	Twin 3.1.0	Twin 3.0.0

4 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-A

4.1 Limitările specifice Omixon HLA Twin

4.1.1 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare statistică

Identificări eronate cunoscute ale algoritmului de genotipare statistică

Din cauza similarității secvențelor exonice ale anumitor perechi de alele, algoritmul de genotipare statistică raportează alele incorecte în anumite cazuri, pentru următoarele grupuri de alele:

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

5 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-B

5.1 Limitările specifice Holotype HLA

5.1.1 Alele pentru care este posibil să se afișeze o amplificare redusă

Amplificarea redusă înseamnă că numărul de citiri generat pentru o alelă nu este suficient pentru genotipare. În cazuri extreme, este posibil ca alela să nu fie raportată deloc (dropout).

Alele cu amplificare redusă	Compensare în HLA Twin	Rezoluție detectare
B*51:01:02	DA	DA

5.2 Limitările specifice Omixon HLA Twin

5.2.1 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare a consensului

Rezultate ambigue raportate din cauza pierderii consensului pentru una dintre alele

Alela afectată	Alele raportate suplimentar
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

Identificare greșită HLA-B*15:01

În situații rare, alelele care fac parte din grupul de alele de mai jos pot fi identificate eronat:

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

5.2.2 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare statistică

HLA-B*44:02:01 și HLA-B*44:03:01 sunt identificate incorect din cauza prezenței unei secvențe de exoni identici în HLA-C

Rezultatul genotipării statistice	Rezultatul corect
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 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-C

6.1 Limitările specifice Omixon HLA Twin

6.1.1 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare statistică

Identificări eronate comune ale algoritmului de genotipare statistică

Din cauza similarității secvențelor exonice ale anumitor perechi de alele, algoritmul de genotipare statistică raportează alele incorecte în anumite cazuri, pentru următoarele grupuri de alele:

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

7 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-DPB1

7.1 Limitările specifice Holotype HLA

7.1.1 Amplificare redusă sau nereușită pentru HLA-DPB1 în DP-multiplex

Mod eroare	Versiuni ale testelor afectate
HLA-DPB1 este caracterizată de amplificare redusă sau nu se amplifică	Holotype HLA v1 – configurație cu 11 locusuri

7.1.2 Ambiguități cis/trans

Linii directe cu privire la raportare: Laboratoarele trebuie să aleagă fie raportarea ambiguității cu ajutorul grupurilor G, fie raportarea perechilor specifice de alele care sunt ambigue.

Alele cu ambiguități		Cauza ambiguității	Diferența de 2 câmpuri
DPB1*02:01:02+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01+ DPB1*416:01	Lipsa fazei între exonul 2, intronul 2 (dacă este cazul) și exonul 3	DA

Alele cu ambiguități		Cauza ambiguității	Diferența de 2 câmpuri
DPB1*03:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*351:01+ DPB1*463:01	Lipsa fazei între exonii 2 și 3	DA
DPB1*04:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01 / DPB1*665:01 + DPB1*126:01	Lipsa fazei între exonii 2 și 3	DA
DPB1*04:01:01+ DPB1*13:01:01 (DPB1*107:01)	DPB1*133:01+ DPB1*350:01	Lipsa fazei între exonii 2 și 3	DA
DPB1*04:01:01+ DPB1*14:01:01	DPB1*350:01+ DPB1*651:01	Lipsa fazei între exonii 2 și 3	DA
DPB1*04:02:01+ DPB1*17:01:01	DPB1*105:01+ DPB1*460:01	Lipsa fazei între exonul 2, intronul 2 (dacă este cazul) și exonul 3	DA
DPB1*04:01:01+ DPB1*463:01	DPB1*105:01+ DPB1*350:01	Lipsa fazei între exonii 2 și 3	DA

7.2 Limitările specifice Omixon HLA Twin

7.2.1 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare a consensului

Ambiguitatea nu este raportată

Rezultat identificat de Twin	Rezultatul corect	Versiune(i) IMGT/HLA afectată(e)
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 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-DQB1

8.1 Limitările specifice Holotype HLA

8.1.1 Alele pentru care este posibil să se afișeze o amplificare redusă

Amplificarea redusă înseamnă că numărul de citiri generat pentru o alelă nu este suficient pentru genotipare. În anumite cazuri, este posibil ca alela să nu fie raportată deloc (dropout).

Alele cu amplificare redusă	Compensare în HLA Twin	Rezoluție detectare
DQB1*03	DA	DA ¹

¹ Sugestie bazată pe dezechilibrele de la nivelul înlănțuirii (LD) cu DQA1

9 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-DRB1

9.1 Limitări tehnologice

Se pot observa dezechilibre moderate ale alelelor în cazul alelelor cu secvențe semnificativ mai lungi față de medie (de exemplu, anumite alele HLA-DRB1*04). În situații rare, se pot observa dezechilibre semnificative ale alelelor. Se preconizează existența sporadică a situațiilor în care alelele nu sunt raportate deloc (dropouts).

9.2 Limitările specifice Holotype HLA

9.2.1 Amplificare nespecifică

Mod eroare	Efecte posibile	Versiuni ale testelor afectate
În anumite cazuri rare, se poate observa prezența unui amplicon suplimentar în a doua jumătate a genei (de la intronul 4 și până la 3'UTR inclusiv).	Dacă ampliconul nespecific este prezent numai pentru una dintre alele, este posibil să se raporteze neconcordanțe false pentru intronul 4.	v1

9.2.2 Amplificare redusă

În anumite situații se pot observa dezechilibre moderate spre semnificative ale alelelor pentru alelele HLA-DRB1*07. Se preconizează existența, în situații foarte rare, a situațiilor în care alelele nu sunt raportate deloc (dropouts).

9.3 Limitările specifice Omixon HLA Twin

9.3.1 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare a consensului

Ambiguitatea HLA-DRB1*12:01 neidentificată

Rezultat identificat de Twin	Rezultatul corect	Versiune(i) IMGT/HLA afectată(e)
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 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare statistică

Identificări eronate comune ale algoritmului de genotipare statistică

Din cauza similarității secvențelor exonice ale anumitor perechi de alele, algoritmul de genotipare statistică raportează alele incorecte sau nu raportează ambiguități inerente, în anumite cazuri, pentru următoarele grupuri de alele:

- 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 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-DRB3

10.1 Limitările specifice Holotype HLA

10.1.1 Amplificare nespecifică

Mod eroare	Efecte posibile	Versiuni ale testelor afectate
În anumite cazuri rare, se poate observa prezența unui amplicon suplimentar în a doua jumătate a genei (de la intronul 4 și până la 3'UTR inclusiv).	Dacă ampliconul nespecific este prezent numai pentru una dintre alele, este posibil să se raporteze neconcordanțe false pentru intronul 4.	v1

11 Limitările cunoscute ale produsului pentru HLA-DRB4

11.1 Limitările specifice Holotype HLA

11.1.1 Alele pentru care este posibil să se afișeze o amplificare redusă

Amplificarea redusă înseamnă că numărul de citiri generat pentru o alelă nu este suficient pentru genotipare. În cazuri extreme, este posibil ca alela să nu fie raportată deloc (dropout). S-au observat frecvent, pentru HLA-DRB4*01:01, cazuri de amplificare redusă și de neraportare a alelelor. În cazuri rare, au existat situații de neraportare a alelelor pentru alelele HLA-DRB4*01:03. În ambele cazuri, prezența alelei este sugerată de dezechilibrul la nivelul înălțurii indicat de Omixon HLA Twin.

11.1.2 Alte limitări legate de test

Măsurători ale concentrației cu rezultate fals pozitive pentru HLA-DRB4

S-au observat concentrații ridicate de ampliconi pentru anumite probe, chiar dacă:

- individul nu prezenta o copie a genei HLA-DRB4 sau
- individul prezenta una sau două copii ale genei HLA-DRB4, dar amplificarea nu s-a realizat cu succes.

11.2 Limitările specifice Omixon HLA Twin

11.2.1 Limitările cunoscute ale algoritmului de genotipare a consensului

Ambiguitatea nu este raportată

Rezultat identificat de Twin	Rezultatul corect
DRB4*01:02N	DRB4*01:02N/DRB4*01:03N
DRB4*01:01:01:01	DRB4*01:01:01:01/DRB4*01:03N