





# Omixon Holotype HLA a Omixon HLA Twin

## Známá omezení produktu

Verze 5

Publikováno 14.1.2019

## 1 Historie revizí a změn

Verze	Datum odsouhlasení	Autor	Přehled změn	Schválil
v1	 5. července 2017	Krisztina Rigó	Sebraná algoritmická omezení. Dokument sloučený s dokumentem Omezení specifická pro Holotype HLA.	Efithymia Melista, Zoltán Simon, Peter Meintjes, Gabiella Adlovits
v2	 31. ledna 2018	Krisztina Rigó	Omezení týkající se databáze IMGT/HLA byly aktualizovány tak, aby odpovídaly IMGT/HLA v3.28.0 a v3.29.0.1. Sekce omezení softwaru byla rozšířena tak, aby odpovídala následujícím verzím softwaru: Twin 2.1.3, Twin 2.1.4 a Twin 2.5.0.	Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabiella Adlovits
v3	 4. července 2018	Krisztina Rigó	Byly přidány další případy související s rozdělením. Byl přidán stručný průvodce pro identifikaci nesprávného rozdělení. Omezení týkající se databáze IMGT/HLA byly aktualizovány tak, aby odpovídaly IMGT/HLA v3.30.0. Sekce omezení softwaru byla rozšířena tak, aby odpovídala následujícím verzím softwaru: Twin 2.5.1 a Twin 3.0.0.	Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabiella Adlovits
v4	 19. října 2018	Krisztina Rigó	Omezení týkající se databáze IMGT/HLA byly aktualizovány tak, aby odpovídaly IMGT/HLA v3.31.0. Sekce omezení softwaru byla rozšířena tak, aby odpovídala následujícím verzím softwaru: Twin 3.1.0 a Twin 3.1.1. Informace týkající se softwaru a verzí IMGT/HLA starších než 12+1 měsíců byly odstraněny. Ovlivněné verze: Omixon HLA Twin 2.1.3 a 2.1.4, IMGT/HLA 3.28.0_4. Byly odstraněny zvláštní příklady u situací, u kterých nebylo možné prokázat specifitu alely. Byla přidána další omezení statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm).	Márton Pogány, Gergely Tölgyesi, Gabiella Adlovits

Verze	Datum odsouhlasení	Autor	Přehled změn	Schválil
v5	14. ledna 2019	Krisztina Rigó	<p>Omezení týkající se databáze IMGT/HLA byly aktualizovány tak, aby odpovídaly IMGT/HLA v3.32.0. Informace týkající se verzí IMGT/HLA starších než 12+1 měsíců byly odstraněny. Ovlivněná verze: IMGT/HLA 3.29.0.1_5.</p> <p>Části omezení testu byly rozšířeny o následující verzi testu: Holotype HLA v3.0. Formátování bylo změněno v části „Nejednoznačnosti ovlivňující expresi“ a byl přidán nový případ.</p> <p>K části HLA-DPB1 „Cis/Trans nejednoznačnosti“ byl přidán další případ.</p> <p>Další drobné změny a aktualizace.</p>	Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabiella Adlovits

## 2 Zaměření tohoto dokumentu

Účelem tohoto dokumentu je poskytnout komplexní seznam známých omezení produktu Holotype HLA a Omixon HLA Twin. Aktuální verze (v4) tohoto dokumentu byla sestavena pomocí Holotype HLA verzí 1, 2.1 a 3.0 a Omixon HLA Twin verzí 2.5.0 (CE&RUO), 2.5.1 (CE&RUO), 3.0.0 (RUO), 3.1.0 (RUO) a 3.1.1 (CE&RUO) s verzemi IMGT/HLA 3.30.0\_5, 3.31.0\_5 a 3.32.0\_5. Pokud není uvedeno jinak, mají uvedená omezení vliv na všechny verze testů, softwaru a databází v rámci tohoto dokumentu.

## 3 Přehled známých omezení produktu

### 3.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

#### 3.1.1 Nejednoznačnosti specifické pro Holotype HLA

Tato část obsahuje nejednoznačnosti, které jsou způsobeny konstrukcí testu Omixon Holotype HLA a technologickými omezeními NGS (tj. umístění a sekvence primerových míst a rozdělení velikosti fragmentů způsobené metodou výběru velikosti použitou v protokolu). Tyto nejednoznačnosti nelze vyřešit a vyskytují se ve všech verzích softwaru.

Pro každý lokus obsahující všechny sekvence alel a holotypové primerové sekvence byl vytvořen vícesekvenční alignment. Pak byl tento alignment oříznut do cílové oblasti (tj. byla oříznuta místa primerů a libovolné polohy mimo místa primerů). U výsledných sekvencí se poté zkontrolovaly přesné duplikáty a vztahy subsekvencí a při rozlišení na tři pole, nižším nebo při libovolném rozlišení se shromáždily všechny nejednoznačnosti, kromě ovlivňujících alel s nestandardními úrovněmi exprese.

### 3.1.2 Nejednoznačnosti prvního, druhého a třetího pole

**Pokyny pro vykazování:** Zpráva jako nejednoznačná

Nejednoznačné alely		Má vliv na expresi	Ovlivněná(é) verze IMGT/HLA	Úroveň nejednoznačnosti	Ovlivněná(é) verze testu
DPB1*13:01:01	DPB1*107:01	NE	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	1. pole	v1, v2.1, v3.0
DPB1*105:01:01	DPB1*665:01	NE	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	1. pole	v1, v2.1, v3.0
DQB1*06:01:01	DQB1*06:01:15 <sup>1</sup>	NE	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	3. pole	v1
DRB1*09:01:02	DRB1*09:31	NE	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	2. pole	v1, v2.1, v3.0
DRB1*12:01:01	DRB1*12:10	NE	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	2. pole	v1, v2.1, v3.0
DRB1*15:02:01	DRB1*15:140	NE	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	2. pole	v1, v2.1, v3.0
DRB1*15:02:01	DRB1*15:149	NE	v3.32.0_5	2. pole	v1, v2.1, v3.0

<sup>1</sup> Nejednoznačnost je vyřešena, jestliže se používají primery DQB1 souboru 1

### 3.1.3 Nejednoznačnosti ovlivňující expresi

**Pokyny pro vykazování:** Alely s nízkou expresí se vykazují jako výsledek druhého pole

Nejednoznačné skupiny alel

- HLA-A\*02:01:01:01/HLA-A\*02:01:01:02L/HLA-A\*02:01:01:16
- HLA-B\*39:01:01:03/HLA-B\*39:01:01:02L/HLA-B\*39:01:01:05
- HLA-DQB1\*03:01:01:01/03:01:01:10/03:01:01:20/03:276N<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nejednoznačnost je přítomna pouze u analýz s IMGT/HLA 3.32.0\_5 nebo vyšší s verzí testu Holotype HLA v1, pokud se nepoužije sada primerů 1 nebo má nízké zesílení.

### 3.1.4 Cis/Trans nejednoznačnosti

Cis/Trans nejednoznačnosti (tj. nejednoznačné vyvolání alel, kde se různé páry alel liší pouze ve fázování cis/trans) mohou mít několik příčin. Většina těchto nejednoznačností je vykazována kvůli omezením technologie a databáze IMGT/HLA.

## 3.2 Seznam známých omezení pro Omixon HLA Twin

### 3.2.1 Známa omezení konsensuálního algoritmu genotypizace

#### Úvod

Všechna omezení uvedená níže byla založena na pozorováních hlášených zákazníky Holotype HLA nebo provedena během interní validace a regresního testování. Je třeba zmínit, že před koncem roku 2018 byla tyto pozorování provedena na skoro 100 000 vzorcích Holotype HLA sad prodaných po celém světě.

#### Vyvolána chybná novinka

Vzácně může HLA Twin vykazovat koncovému uživateli chybné novinky. Je třeba vzít v úvahu, že drtivá většina těchto falešných novinek může být eliminována školeným uživatelem manuální kontrolou výsledků v Omixon HLA Twin.

#### Nové dlouhé INDEly byly opomenuty

Ve výjimečných případech přístroj Omixon HLA Twin nové dlouhé INDEly nevykáže.

#### Dvojitě nové SNP nebylo vykááno (opravit verzi: Omixon HLA Twin 2.5.1)

Byl pozorován jeden případ, kdy dvě po sobě jdoucí nová SNP nebyla vykáána.

#### Nesprávné rozdělení

Ve vzácných případech jsou shodné sekvence nesprávně rozděleny.

#### Identifikace nesprávně rozdělených shodných sekvencí

Může vzniknout podezření na nesprávné rozdělení cis/trans, pokud je pozorována jedna nebo více následujících charakteristik:

- Jsou vykáány dvě nové alely v rámci jediného páru s nejlepší shodou.
- Je vykáána jedna nová alela a jedna částečně definovaná alela.
- Je vykáána jedna nebo dvě vzácné alely.
- Existuje několik nových pozic.

Pokud existuje podezření na nesprávné rozdělení, doporučuje se, aby uživatel zkontroloval výsledky statistického algoritmu genotypizace.

#### Cis/trans nejednoznačnost způsobená neefektivním fázováním

V některých vzácných případech byly v důsledku neúčinného rozdělení vykáány nejednoznačnosti druhé nebo třetí úrovně. V těchto případech se doporučuje provést opakovanou analýzu ovlivněných lokusů s více odečty.

#### Vykazování nesprávného výsledku QC

Režim selhání	Opravit verzi	Ovlivněná(é) verze softwaru
Hodnoty poměru spotového šumu jsou někdy přiřazeny na nesprávné konsensuální pozice.	Twin 3.0.0	Twin 2.5.0, Twin 2.5.1

Žádný výsledek nebyl vykázan navzdory úspěšnému generování shody (opravená verze: Omixon HLA Twin 3.1.1)

Režim selhání	Opravit verzi	Ovlivněná(é) verze softwaru
V některých vzácných případech není vykázan žádný signál alely, i když byla úspěšně generována shodná sekvence.	Twin 3.1.1	Twin 2.5.0, Twin 2.5.1 Twin 3.0.0 Twin 3.1.0

### 3.2.2 Známá omezení statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

V analýzách zkoumajících pouze exony byly některé exonové sekvence určeny nesprávně (opravit verzi: Omixon HLA Twin 3.1.0)

Režim selhání	Opravit verzi	Ovlivněná verze softwaru
Z důvodu některých nesrovnalostí v databázi IMGT/HLA a metodě zpracování databáze IMGT/HLA zavedené v Twin 3.1.0 byly při analýze zkoumajících pouze exony některé sekvence oblastí určeny nesprávně.	Twin 3.1.0	Twin 3.0.0

## 4 Známá omezení produktu HLA-A

### 4.1 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

#### 4.1.1 Známá omezení statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

Známá chybná zjištění statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

Vzhledem k podobnosti exonových sekvencí některých párů alel vykazuje statistický algoritmus genotypizace v některých případech nesprávné alely pro následující skupiny alel:

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

## 5 Známá omezení produktu HLA-B

### 5.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

#### 5.1.1 Alely, které mohou vykazat nízké zesílení

Nízké zesílení znamená, že generovaný počet čtení pro alelu není pro genotypizaci dostatečný. V krajních případech nemůže být o alele podána žádná zpráva (bude vynechána).

Alely s nízkým zesílením	Náhrada v HLA Twin	Rozlišení detekce
B*51:01:02	ANO	ANO

## 5.2 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

### 5.2.1 Známá omezení konsenzuálního algoritmu genotypizace

Nesprávná shodná sekvence kvůli neúčinné detekci mapování křížení

- V některých vzácných případech jsou zaznamenány nejednoznačné výsledky kvůli částečné ztrátě shody v místě začátku shody.
- Vzácně jsou hlášeny falešné novinky kvůli nesprávné shodné sekvenci v blízkosti začátku shody.

HLA-B\*15:01 nesprávně pojmenováno

V některých vzácných případech mohou být chybně vyhodnoceny alely patřící do následující skupiny alel:

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

### 5.2.2 Známá omezení statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

HLA-B\*44:02:01 a HLA-B\*44:03:01 se špatně vyvolávají v důsledku přítomnosti shodné exonové sekvence v HLA-C

Statistický výsledek genotypizace	Správný výsledek
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 Známá omezení produktu HLA-C

### 6.1 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

#### 6.1.1 Známá omezení statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

Běžná chybná zjištění statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

Vzhledem k podobnosti exonových sekvencí některých párů alel vykazuje statistický algoritmus genotypizace v některých případech nesprávné alely pro následující skupiny alel:

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

## 7 Známa omezení produktu HLA-DPB1

### 7.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

#### 7.1.1 Nízké nebo neúspěšné zesílení HLA-DPB1 v DP-multiplexu

Režim selhání	Ovlivněná verze testu
V některých případech HLA-DPB1 zobrazuje nízké zesílení nebo se nezesiluje.	Holotype HLA v1 – 11 konfigurace lokusu

#### 7.1.2 Cis/Trans nejednoznačnosti

**Pokyny pro vykazování:** Záleží na jednotlivých laboratořích, jestli budou vykazovat nejednoznačnosti s využitím G skupin, nebo budou vykazovat specifické páry alel, které jsou nejednoznačné.

Nejednoznačné alely		Příčina nejednoznačnosti
DPB1*02:01:02+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01+ DPB1*416:01	Nedostatek fáze mezi exonem 2, intronem 2 (v příslušných případech) a exonem 3
DPB1*03:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*351:01+ DPB1*463:01	Nedostatek fáze mezi exony 2 a 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01 / DPB1*665:01 + DPB1*126:01	Nedostatek fáze mezi exony 2 a 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*13:01:01 (DPB1*107:01)	DPB1*133:01+ DPB1*350:01	Nedostatek fáze mezi exony 2 a 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*14:01:01	DPB1*350:01+ DPB1*651:01	Nedostatek fáze mezi exony 2 a 3
DPB1*04:02:01+ DPB1*17:01:01	DPB1*105:01+ DPB1*460:01	Nedostatek fáze mezi exonem 2, intronem 2 (v příslušných případech) a exonem 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*463:01	DPB1*105:01+ DPB1*350:01	Nedostatek fáze mezi exony 2 a 3
DPB1*05:01+ DPB1*13:01	DPB1*135:01+ DPB1*519:01	Nedostatek fáze mezi exony 2 a 4

### 7.2 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

#### 7.2.1 Známa omezení konsenzuálního algoritmu genotypizace

Nejednoznačnost není vykazována.

Výsledek vyvolaný Twin	Správný výsledek
DPB1*126:01+DPB1*665:01   DPB1*105:01+DPB1*126:01	DPB1*126:01+DPB1*665:01   DPB1*105:01+DPB1*126:01   <b>DPB1*04:01+DPB1*04:02</b>



## 8 Známa omezení produktu HLA-DQB1

### 8.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

#### 8.1.1 Alely, které mohou vykazat nízké zesílení

Nízké zesílení znamená, že generovaný počet čtení pro alelu není pro genotypizaci dostatečný. V některých případech může dojít k tomu, že alela nebude vůbec vykázána (bude vynechána).

Alely s nízkým zesílením	Náhrada v HLA Twin	Rozlišení detekce
DQB1*03	ANO	ANO <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Návrh založený na nerovnováze vazby (Linkage Disequilibrium = LD) s DQA1

#### 8.1.2 Nízké zesílení pro primery sady 1 Holotype HLA v1

V některých případech zobrazuje amplikon vytvořený primery sady 1 Holotype HLA v1 nízké zesílení.

## 9 Známa omezení produktu HLA-DRB1

### 9.1 Technologická omezení

U alel s výrazně delšími sekvencemi než průměr (např. některé alely HLA-DRB1\*04) lze pozorovat mírnou nerovnováhu alel. V některých vzácných případech lze pozorovat výraznou alelickou nerovnováhu. Sporadicky lze očekávat vynechání alel.

### 9.2 Omezení specifické pro Holotype HLA

#### 9.2.1 Nespecifické zesílení

Režim selhání	Možné účinky	Ovlivněná(é) verze testu
V některých vzácných případech lze pozorovat další amplikon v druhé polovině genu (od intronu 4 přes 3'UTR).	Pokud je nespecifický amplikon přítomen pouze u jedné z alel, mohou se u intronu 4 vykazovat falešné nesoulady.	v1

#### 9.2.2 Nízké zesílení

V některých případech lze u alel HLA-DRB1\*07 pozorovat středně velkou až výraznou alelovou nerovnováhu. Velmi vzácně lze očekávat vynechání alel.

### 9.3 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

#### 9.3.1 Známa omezení konsenzuálního algoritmu genotypizace

Nejednoznačnost HLA-DRB1\*12:01 je v některých případech nezjištěna.

Výsledek vyvolaný Twin	Správný výsledek
DRB1*12:10	DRB1*12:10/DRB1*12:01:01

### 9.3.2 Známá omezení statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

#### Běžná chybná zjištění statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

Vzhledem k podobnosti exonových sekvencí některých párů alel vykazuje statistický algoritmus genotypizace v některých případech nesprávné alely nebo nevykazuje inherentní nejednoznačnosti pro následující skupiny alel:

- DRB1\*04:07:01/DRB1\*04:92
- 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 Známá omezení produktu HLA-DRB3

### 10.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

#### 10.1.1 Nespecifické zesílení

Režim selhání	Možné účinky	Ovlivněná(é) verze testu
V některých vzácných případech lze pozorovat další amplikon v druhé polovině genu (od intronu 4 přes 3'UTR).	Pokud je nespecifický amplikon přítomen pouze u jedné z alel, mohou se u intronu 4 vykazovat falešné nesoulady.	v1

## 11 Známá omezení produktu HLA-DRB4

### 11.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

#### 11.1.1 Alely, které mohou vykazat nízké zesílení

Nízké zesílení znamená, že generovaný počet čtení pro alelu není pro genotypizaci dostatečný. V krajních případech nemůže být o alele podána žádná zpráva (bude vynechána). Pro HLA-DRB4\*01:01 byla často pozorována nízká zesílení a výpadky alel. Ve vzácných případech byly pro alely HLA-DRB4\*01:03 vykazány výpadky alel. V obou případech je přítomnost alely navržena na základě nerovnováhy vazby přístrojem Omixon HLA Twin.

#### 11.1.2 Další omezení týkající se testu

##### Falešně pozitivní měření koncentrací HLA-DRB4

U některých vzorků lze pozorovat vysoké koncentrace amplikonu, přestože:

- jedinec nemá kopii genu HLA-DRB4, nebo
- jedinec má jednu nebo dvě kopie genu HLA-DRB4, ale zesílení nebylo úspěšné.

## 11.2 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

### 11.2.1 Známa omezení konsenzuálního algoritmu genotypizace

Nejednoznačnost není vykazována.

Výsledek vyvolaný Twin	Správný výsledek
DRB4*01:02N	DRB4*01:02N/DRB4*01:03N
DRB4*01:01:01:01	DRB4*01:01:01:01/DRB4*01:03N