






Omixon Holotype HLA og Omixon HLA Twin


Kendte produktbegrænsninger

Version 5

Offentliggjort 14.1.2019

1 Revisions- og ændringshistorik

Version	Godkendelsesdato	Forfatter	Resumé af ændringer	Godkendt af
v1	 5. jul. 2017	Krisztina Rigó	Algoritmiske begrænsninger indsamlet. Dokument lagt sammen med Holotype HLA-specifikt begrænsningsdokument.	Efithymia Melista, Zoltán Simon, Peter Meintjes, Gabriella Adlovits
v2	 31. jan. 2018	Krisztina Rigó	Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen er opdateret for at svare til IMGT/HLA v3.28.0 og v3.29.0.1. Softwarebegrænsningsafsnit er udvidet, så det svarer til følgende softwareversioner: Twin 2.1.3, Twin 2.1.4 og Twin 2.5.0.	Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits
v3	 4. jul. 2018	Krisztina Rigó	Yderligere fasningsrelaterede tilfælde er tilføjet. En kort vejledning i identifikation af forkert fasnig er tilføjet. Begrænsninger vedrørende IMGT/HLA-databasen blev opdateret for at svare til IMGT/HLA v3.30.0. Softwarebegrænsningsafsnit er udvidet, så det svarer til følgende softwareversioner: Twin 2.5.1 og Twin 3.0.0.	Efithymia 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. Softwarebegrænsningsafsnit 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. 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>	Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabiella Adlovits

2 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 (v4) af dette dokument er sammensat af Holotype HLA version 1, 2.1 og 3.0 og Omixon HLA Twin version 2.5.0 (CE&RUO), 2.5.1 (CE&RUO), 3.0.0 (RUO), 3.1.0 (RUO) og 3.1.1 (CE&RUO) med IMGT/HLA version 3.30.0_5, 3.31.0_5 og 3.32.0_5. Medmindre andet er angivet, berører de anførte begrænsninger alle analyse-, software- og databaseversioner, som er omfattet af dette dokument.

3 Oversigt over kendte produktbegrænsninger

3.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

3.1.1 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.

3.1.2 Ambiguiteter i første, andet og tredje felt

Retningslinjer for rapportering: Rapportér som ambiguitet

Alleler med ambiguitet		Har indvirkning på ekspresion	Berørt(e) IMGT/HLA-version(er)	Ambiguitets grad	Berørte analyseversion(er)
DPB1*13:01:01	DPB1*107:01	NEJ	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	1. felt	v1, v2.1, v3.0
DPB1*105:01:01	DPB1*665:01	NEJ	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	1. felt	v1, v2.1, v3.0
DQB1*06:01:01	DQB1*06:01:15 ¹	NEJ	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	3. felt	v1
DRB1*09:01:02	DRB1*09:31	NEJ	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	2. felt	v1, v2.1, v3.0
DRB1*12:01:01	DRB1*12:10	NEJ	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	2. felt	v1, v2.1, v3.0
DRB1*15:02:01	DRB1*15:140	NEJ	v3.30.0_5 v3.31.0_5 v3.32.0_5	2. felt	v1, v2.1, v3.0
DRB1*15:02:01	DRB1*15:149	NEJ	v3.32.0_5	2. felt	v1, v2.1, v3.0

¹ Ambiguitet løses, når DQB1 set 1-primere anvendes

3.1.3 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/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*03:01:01:01/03:01:01:10/03:01:01:20/03:276N¹

¹ Ambiguitet er kun til stede for analyser med IMGT/HLA 3.32.0_5 eller højere med analyseversion Holotype HLA v1, når set 1-primersæt ikke bruges eller har lav amplificering.

3.1.4 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.

3.2 Liste over kendte begrænsninger for Omixon HLA Twin

3.2.1 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.

Lange nye insertioner/deletioner udeladt

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

Dobbelt ny SNP ikke rapporteret (rettet version: Omixon HLA Twin 2.5.1)

Der er observeret et enkelt tilfælde, hvor to konsekutive nye SNP'er ikke blev rapporteret.

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.

Forkert QC-resultat rapporteret

Fejlmodus	Rettet version	Berørte softwareversion(er)
Støjforholdsværdier tildeles af og til forkerte konsensuspositioner	Twin 3.0.0	Twin 2.5.0, Twin 2.5.1

Intet resultat rapporteret trods vellykket konsensusgenerering (rettet version: Omixon HLA Twin 3.1.1)

Fejlmodus	Rettet version	Berørte softwareversion(er)
I nogle sjældne tilfælde rapporteres der ikke noget allelkald, selvom der blev genereret en konsensussekvens	Twin 3.1.1	Twin 2.5.0, Twin 2.5.1 Twin 3.0.0 Twin 3.1.0

3.2.2 Kendte begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

Nogle exoniske sekvenser bestemt forkert i analyser kun med exoner (rettet version: Omixon HLA Twin 3.1.0)

Fejlmodus	Rettet version	Berørt softwareversion
På grund af nogle inkonsekvenser i IMGT/HLA-databasen og den IMGT/HLA-databasehåndteringsmetode, der blev introduceret i Twin 3.1.0, blev nogle regionssekvenser bestemt forkert for analyser kun med exoner.	Twin 3.1.0	Twin 3.0.0

4 Kendte produktbegrænsninger for HLA-A

4.1 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

4.1.1 Kendte begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

Kendte forkerte meldinger af den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

På grund af ligheden af exonsekvenserne i nogle af allelparrene rapporterer den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme i nogle tilfælde alleler for følgende allelgrupper forkert:

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

5 Kendte produktbegrænsninger for HLA-B

5.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

5.1.1 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

5.2 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

5.2.1 Kendte begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen

Forkert konsensussekvens på grund af ineffektiv registrering af krydsmapning

- 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 sjældne tilfælde alleler fra følgende allelgruppe blive meldt forkert:

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

5.2.2 Kendte begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

HLA-B*44:02:01 og HLA-B*44:03:01 meldes forkert på grund af tilstedeværelse af en identisk exon-sekvens i HLA-C

Statistisk genotypebestemmelsesresultat	Korrekt resultat
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 Kendte produktbegrænsninger for HLA-C

6.1 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

6.1.1 Kendte begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

Almindelige forkerte meldinger af den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

På grund af ligheden af exonsekvenserne i nogle af allelparrene rapporterer den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme i nogle tilfælde alleler for følgende allelgrupper forkert:

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

7 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DPB1

7.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

7.1.1 Lav eller mislykket amplificering for HLA-DPB1 i DP-multiplex

Fejlmodus	Berørt analyseversion
I nogle tilfælde viser HLA-DPB1 lav amplificering eller amplificeres ikke	Holotype HLA v1 – 11 locuskonfiguration

7.1.2 Cis/Trans-ambiguiteter

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.

Alleler med ambiguitet		Årsag til ambiguitet
DPB1*02:01:02+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01+ DPB1*416:01	Manglende fase mellem exon 2, intron 2 (hvis relevant) og exon 3
DPB1*03:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*351:01+ DPB1*463:01	Manglende fase mellem exon 2 og 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*04:02:01	DPB1*105:01 / DPB1*665:01 + DPB1*126:01	Manglende fase mellem exon 2 og 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*13:01:01 (DPB1*107:01)	DPB1*133:01+ DPB1*350:01	Manglende fase mellem exon 2 og 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*14:01:01	DPB1*350:01+ DPB1*651:01	Manglende fase mellem exon 2 og 3
DPB1*04:02:01+ DPB1*17:01:01	DPB1*105:01+ DPB1*460:01	Manglende fase mellem exon 2, intron 2 (hvis relevant) og exon 3
DPB1*04:01:01+ DPB1*463:01	DPB1*105:01+ DPB1*350:01	Manglende fase mellem exon 2 og 3
DPB1*05:01+ DPB1*13:01	DPB1*135:01+ DPB1*519:01	Manglende fase mellem exon 2 og 4

7.2 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

7.2.1 Kendte begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen

Ambiguitet ikke rapporteret

Resultat meldt af Twin	Korrekt resultat
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

8 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DQB1

8.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

8.1.1 Alleler, som kan vise lav amplificering

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

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

¹ Forslag baseret på koblingsuligevægt (LD) med DQA1

8.1.2 Lav amplificering for set 1-primere for Holotype HLA v1

I nogle tilfælde viser det ampikon, der produceres af set 1-primere for Holotype HLA v1, lav amplificering.

9 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DRB1

9.1 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 forventes sporadiske alleldropouts.

9.2 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

9.2.1 Non-specifik amplificering

Fejlmodus	Mulige virkninger	Berørte analyseversion(er)
I sjældne tilfælde kan der observeres et yderligere ampikon i anden halvdel af genet (fra intron 4 til og med 3'UTR).	Hvis det aspecifikke ampikon kun er til stede for et af allelerne, kan der rapporteres falske uoverensstemmelser for intron 4.	v1

9.2.2 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.

9.3 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

9.3.1 Kendte begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen

HLA-DRB1*12:01-ambiguitet udelades i nogle tilfælde

Resultat meldt af Twin	Korrekt resultat
DRB1*12:10	DRB1*12:10/DRB1*12:01:01

9.3.2 Kendte begrænsninger for den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

Almindelige forkerte meldinger af den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme

På grund af ligheden af exonsekvenserne i nogle af allelparrene rapporterer den statistiske genotypebestemmelsesalgoritme i nogle tilfælde alleler forkert eller rapporterer slet ikke ambiguiteter for følgende allelgrupper:

- 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 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DRB3

10.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

10.1.1 Non-specifik amplificering

Fejlmodus	Mulige virkninger	Berørte analyseversion(er)
I sjældne tilfælde kan der observeres et yderligere ampikon i anden halvdel af genet (fra intron 4 til og med 3'UTR).	Hvis det aspecifikke ampikon kun er til stede for et af allelerne, kan der rapporteres falske uoverensstemmelser for intron 4.	v1

11 Kendte produktbegrænsninger for HLA-DRB4

11.1 Holotype HLA-specifikke begrænsninger

11.1.1 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 koblingsuligevægt af Omixon HLA Twin.

11.1.2 Andre analyserelaterede begrænsninger

Falsk positive koncentrationsmålinger for HLA-DRB4

Der kan observeres høje ampikonkoncentrationer 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.

11.2 Omixon HLA Twin-specifikke begrænsninger

11.2.1 Kendte begrænsninger for konsensusgenotypebestemmelsesalgoritmen

Ambiguitet ikke rapporteret

Resultat meldt af Twin	Korrekt resultat
DRB4*01:02N	DRB4*01:02N/DRB4*01:03N
DRB4*01:01:01:01	DRB4*01:01:01:01/DRB4*01:03N