



Omixon Holotype HLA and Omixon HLA Twin

Známá omezení produktu

Version 8

Published on 08/26/2019

1 Zaměření tohoto dokumentu

Účelem tohoto dokumentu je poskytnout komplexní seznam známých omezení produktu Holotype HLA a Omixon HLA Twin. Aktuální verze tohoto dokumentu byla sestavena pomocí verzí Holotype HLA 1, 2.1 a 3.0 a verzí Omixon HLA Twin 3.0.0 (RUO), 3.1.0 (RUO), 3.1.1 (CE&RUO) a 3.1.3 (RUO) s verzemi IMGT/HLA 3.33.0_7, 3.34.0_8, 3.35.0_8 a 3.36.0_8. Pokud není uvedeno jinak, mají uvedená omezení vliv na všechny verze testů, softwaru a databází v rámci tohoto dokumentu.

Přehled předchozích verzí a změn tohoto dokumentu naleznete v části „Historie revizí a změn“.

2 Přehled známých omezení produktu

2.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

2.1.1 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 primerové sekvence Holotype 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.

2.1.2 Nejednoznačnosti prvního, druhého a třetího pole

Pokyny pro vykazování: Zpráva jako nejednoznačná

Nejednoznačnosti ovlivňující všechny verze Holotype HLA

| Nejednoznačné alely | | Ovlivněná(é) verze IMGT/HLA | Úroveň nejednoznačnosti |
|---------------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------|
| DPB1*13:01:01 | DPB1*107:01 | Vše ¹ | 1. pole |
| DPB1*105:01:01 | DPB1*665:01 | Vše ¹ | 1. pole |
| DPB1*584:01:01 | DPB1*584:01:02 | v3.35.0_8 v3.36.0_8 | 3. pole |
| DRB1*01:01:01 | DRB1*01:100 | v3.36.0_8 | 2. pole |
| DRB1*03:01:01 | DRB1*03:147 | v3.34.0_8 v3.35.0_8 v3.36.0_8 | 2. pole |
| DRB1*09:01:02 | DRB1*09:31 | Vše ¹ | 2. pole |
| DRB1*09:21 | DRB1*09:31 | Vše ¹ | 2. pole |

| Nejednoznačné alely | | Ovlivněná(é) verze IMGT/HLA | Úroveň nejednoznačnosti |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| DRB1*12:01:01 | DRB1*12:10 | Vše ¹ | 2. pole |
| DRB1*15:02:01 | DRB1*15:140/ DRB1*15:149 | Vše ¹ | 2. pole/ 2. pole |

¹ Vše: Ovlivněny jsou všechny verze databáze v rozsahu tohoto dokumentu.

Nejednoznačnosti ovlivňující pouze verzi Holotype HLA v1

Tyto nejednoznačnosti mohou být vyřešeny, jestliže se používají primery DQB1 souboru 1.

| Nejednoznačné alely | | Ovlivněná(é) verze IMGT/HLA | Úroveň nejednoznačnosti |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| DQB1*02:02:01 | DQB1*02:02:06 | v3.34.0_8 v3.35.0_8 v3.36.0_8 | 3. pole |
| DQB1*03:01:01 | DQB1*03:297/ DQB1*03:01:41 | Vše ¹ | 2. pole / 3. pole |
| DQB1*03:01:01 | DQB1*03:01:43 | v3.35.0_8 v3.36.0_8 | 3. pole |
| DQB1*03:02:01 | DQB1*03:289 | v3.34.0_8 v3.35.0_8 v3.36.0_8 | 2. pole |
| DQB1*05:01:01 | DQB1*05:01:33 | v3.36.0_8 | 3. pole |
| DQB1*06:01:01 | DQB1*06:01:15 | Vše ¹ | 3. pole |

¹ Vše: Ovlivněny jsou všechny verze databáze v rozsahu tohoto dokumentu.

2.1.3 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/**02:01:01:02L**/02:01:01:16/02:01:01:50
- HLA-B*39:01:01:03/**39:01:01:02L**/39:01:01:05/39:01:01:09
- HLA-DQB1*03:01:01/03:19:01/03:01:41/03:01:43/**03:276N¹/03:358N²**

¹ Nejednoznačnost je přítomná u verzí testu IMGT/HLA 3.32.0_5 v2 a v3, ale neovlivňuje databáze IMGT/HLA v3.33.0 a vyšší. Holotype HLA v1 je ovlivněn všemi databázovými verzemi vyššími než 3.31.0.

² Nejednoznačnost je přítomná u verzí testu IMGT/HLA 3.36.0_8 a vyšší. HLA-DQB1*03:358N obsahuje delecii v exonu 3, která způsobuje posun rámce a předčasné zastavení v kodonu 191 (zdroj: <http://hla.alleles.org/alleles/nulls.html>, datum přístupu: 16. července 2019). K 16. červenci 2019 byla tato alela pozorována ve dvou biologických vzorcích neznámého etnického původu jedinou laboratoří. V době tvorby tohoto dokumentu nebyla pro tuto alelu veřejně dostupná žádná informace o zdrojových sekvencích. Na základě informací dostupných v IMGT/HLA 3.36.0 nemůže být tato alela odlišena od jiných alel uvedených ve skupinách nejednoznačných alel. Vezměte na vědomí, že ne všechny uvedené alely jsou ve všech případech vykázané jako nejednoznačné.

2.1.4 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.

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

2.2 Seznam známých omezení pro Omixon HLA Twin

2.2.1 Známá 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.

2.2.2 Nejednoznačnost není vykazována pro nové alely

Na základě konstrukce je konsensuálním algoritmem genotypizace vykázána pouze jediná nová alela. Ve velmi ojedinělých případech lze identifikovat více stejně pravděpodobných nových alel, ale pouze jedna z těchto možností je algoritmem vyhodnocena.

Nové INDELY byly opomenuty

Ve výjimečných případech přístroj Omixon HLA Twin nové INDELY nevykáže.

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 vykázány dvě nové alely v rámci jediného páru s nejlepší shodou.
- Je vykázána jedna nová alela a jedna částečně definovaná alela.
- Je vykázána 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 vykázány nejednoznačnosti druhé nebo třetí úrovně. V těchto případech se doporučuje provést opakovanou analýzu ovlivněných lokusů s více odečty.

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

| Režim selhání | Opravená verze | Ovlivněná(é) verze softwaru |
|---|----------------|-----------------------------|
| V některých vzácných případech není vykázán žádný signál alely, i když byla úspěšně generována shodná sekvence. | Twin 3.1.1 | Twin 3.0.0 Twin 3.1.0 |

2.2.4 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 | Opravená verze | 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 |

3 Známá omezení produktu HLA-A

3.1 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

3.1.1 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

4 Známá omezení produktu HLA-B

4.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

4.1.1 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 |

4.2 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

4.2.1 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 a informace o aminokyselinách mohou být v důsledku nekonzistencí v databázi nesprávné:

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

4.2.2 Známá omezení statistického algoritmu genotypizace (Statistical Genotyping Algorithm)

Některé alely HLA-B se špatně vyvolávají v důsledku přítomnosti shodné exonové sekvence v HLA-C

Skupina alel HLA-B (několik alel HLA-B*44 a HLA-B*47:04) má sekvenci exonu 2 identickou s HLA-C*16:85. Kvůli této podobnosti mohou být tyto alely statistickým algoritmem genotypizace chybně vyhodnoceny.

5 Známá omezení produktu HLA-C

5.1 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

5.1.1 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

6 Známá omezení produktu HLA-DPB1

6.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

6.1.1 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 |

6.2 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

6.2.1 Známá omezení konsensuálního algoritmu genotypizace

Nejednoznačnost není vykazována.

V některých vzácných případech nejsou cis/trans nejednoznačnosti na úrovni G-skupiny vykazány.

7 Známá omezení produktu HLA-DQB1

7.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

7.1.1 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 vykazána (bude vynechána).

| Alely s nízkým zesílením | Náhrada v HLA Twin | Rozlišení detekce |
|--------------------------|--------------------|-------------------|
| DQB1*03 | ANO | ANO ¹ |

¹ Návrh založený na nerovnováze vazby (Linkage Disequilibrium = LD) s DQA1

7.1.2 Alely, které nejsou amplifikovány

DQB1*03:276N – vzhledem k dlouhé delecii, která pokrývá místo 5' amplifikačního primeru, není tato alela amplifikována.

7.1.3 Nízké zesílení pro primery sady 1 Holotype HLA v1

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

8 Známá omezení produktu HLA-DRB1

8.1 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.

8.2 Omezení specifické pro Holotype HLA

8.2.1 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 |

8.2.2 Nízké zesílení

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

8.3 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

8.3.1 Známá omezení konsensuálního algoritmu genotypizace

Nejednoznačnost druhého pole je v některých případech nezjištěna

| Výsledek vyvolaný Twin | Správný výsledek |
|-------------------------|--|
| DRB1*12:10 | DRB1*12:10/ DRB1*12:01:01 |
| DRB1*15:140/DRB1*15:149 | DRB1*15:140/DRB1*15:149/ DRB1*15:02 |

8.3.2 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

9 Známá omezení produktu HLA-DRB3

9.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

9.1.1 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 |

9.2 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

9.2.1 Známá omezení konsensuálního algoritmu genotypizace

- V některých velmi vzácných případech je HLA-DRB3*02:02 nesprávně pojmenováno jako HLA-DRB3*02:24.

10 Známá omezení produktu HLA-DRB4

10.1 Omezení specifické pro Holotype HLA

10.1.1 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.

10.1.2 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.

10.2 Omezení specifická pro Omixon HLA Twin

10.2.1 Známá omezení konsensuálního algoritmu genotypizace

Nejednoznačnost není vykazována.

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

11 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, Gabriella 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, Gabriella 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, Gabriella 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, Gabriella 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.</p> <p>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.</p> <p>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, Gabriella Adlovits |
| v6 | 26. března 2019 | Krisztina Rigó | <p>Omezení týkající se databáze IMGT/HLA byly aktualizovány tak, aby odpovídaly IMGT/HLA v3.32.0_7, v3.33.0_7 a v3.34.0_8.</p> <p>Sekce omezení softwaru byla rozšířena tak, aby odpovídala následující verzi softwaru: Twin 3.1.3.</p> <p>Informace týkající se softwaru a verzí IMGT/HLA starších než 12+1 měsíců byly odstraněny. Ovlivněné verze: Omixon HLA Twin 2.5.0, IMGT/HLA v3.30.0_5 a v3.31.0_5.</p> <p>Verze produktů ovlivněné nejednoznačností DQB1*03:276N byly opraveny a aktualizovány.</p> <p>Specifické příklady byly odstraněny z části nejednoznačností HLA-DPB1 Cis/Trans.</p> <p>Další drobné změny a aktualizace.</p> | Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits |
| v7 | 26. dubna 2019 | Krisztina Rigó | <p>Omezení týkající se databáze IMGT/HLA byly aktualizovány tak, aby odpovídaly IMGT/HLA 3.35.0_8.</p> <p>Byla aktualizována omezení statistického algoritmu genotypizace způsobená identickými oblastmi sekvencí na různých lokusech.</p> <p>Byla aktualizována omezení konsenzuálního algoritmu genotypizace týkající se nových INDELů.</p> <p>Byla upravena struktura části „Nejednoznačnosti prvního, druhého a třetího pole“.</p> | Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabriella Adlovits |



| Verze | Datum odsouhlasení | Autor | Přehled změn | Schválil |
|-------|--------------------|----------------|--|--|
| v8 | 19. července 2019 | Krisztina Rigó | <p>Omezení týkající se databáze IMGT/HLA byly aktualizovány tak, aby odpovídaly IMGT/HLA 3.36.0_8.</p> <p>Informace týkající se softwaru a verzí IMGT/HLA starších než 12+1 měsíců byly odstraněny. Ovlivněné verze: Omixon HLA Twin 2.5.1, IMGT/HLA 3.32.0_5, 3.32.0_7.</p> <p>Bylo přidáno omezení konsenzuálního algoritmu genotypizace ovlivňující HLA-DRB3.</p> | Efithymia Melista, Gergely Tölgyesi, Gabiella Adlovits |