

# Holotype HLA CE and Omixon HLA Twin CE

## Limitazioni note del prodotto

Version 30

Published on 05/04/2024

© Omixon Biocomputing Ltd.

All rights reserved. Do not distribute.

Website: <https://www.omixon.com>

Technical contact: [support@omixon.com](mailto:support@omixon.com)

Sales contact: [sales@omixon.com](mailto:sales@omixon.com)



Omixon Biocomputing Ltd.  
H-1117 Budapest,  
Kaposvár u. 14-18.,  
Hungary, EU



**Holotype HLA**



**Omixon HLA Twin**





# 1 Ambito di applicazione del presente documento

Il presente documento intende fornire un elenco completo delle limitazioni note del prodotto relative a Holotype HLA e Omixon HLA Twin. La versione attuale di questo documento è stata redatta in riferimento ai seguenti documenti:

- versioni 3.0 (RUO), 3.0.1 (RUO) del protocollo Holotype HLA e
- versioni 4.7.0 (RUO), 4.8.0 (RUO) e 4.8.1 (RUO) di Omixon HLA Twin con
- versioni 3.52.0\_9, and 3.53.0\_10. 3.50.0\_9, 3.51.0\_9, 3.52.0\_9 e 3.53.0\_10 di IMGT/HLA.

Se non specificato altrimenti, le limitazioni elencate interessano tutte le versioni di test, del software e del database che rientrano nell'ambito di applicazione del documento.

Per una panoramica delle versioni precedenti e delle modifiche di questo documento, vedere la sezione "Storico revisioni e modifiche".

Il presente documento intende fornire un elenco completo delle limitazioni note del prodotto relative a Holotype HLA CE e Omixon HLA Twin CE. La versione attuale di questo documento è stata redatta in riferimento ai seguenti documenti:

- versioni 3.0.1 (CE), 3.0.2 (CE) del protocollo Holotype HLA e
- versioni 4.8.0 (CE), 4.8.1 (CE) e 4.9.0 (CE) di Omixon HLA Twin con
- versioni 3.52.0\_9 e 3.53.0\_10 di IMGT/HLA.

Se non specificato altrimenti, le limitazioni elencate interessano tutte le versioni di test, del software e del database che rientrano nell'ambito di applicazione del documento.

Per una panoramica delle versioni precedenti e delle modifiche di questo documento, vedere la sezione "Storico revisioni e modifiche".

Il presente documento intende fornire un elenco completo delle limitazioni note del prodotto relative a OmniType e Omixon HLA Twin. La versione attuale di questo documento è stata redatta in riferimento ai seguenti documenti:

- versione 1 (RUO) di OmniType e
- versioni 4.7.0 (RUO), 4.8.0 (RUO) e 4.8.1 (RUO) di Omixon HLA Twin con
- versioni 3.50.0\_9, 3.51.0\_9, 3.52.0\_9 e 3.53.0\_10 di IMGT/HLA.

Se non specificato altrimenti, le limitazioni elencate interessano tutte le versioni del software e del database che rientrano nell'ambito di applicazione del documento.

Per una panoramica delle versioni precedenti e delle modifiche di questo documento, vedere la sezione "Storico revisioni e modifiche".

## 2 Panoramica delle limitazioni generiche del prodotto



## 2.1 Limitazioni specifiche di Holotype HLA

### 2.1.1 Risultati falsi positivi che interessano DRB3/DRB4 o DRB5

In casi molto rari è possibile osservare risultati falsi positivi per HLA-DRB3, HLA-DRB4 oppure per HLA-DRB5 con Omixon Holotype HLA.

#### 2.1.1.1 Nessun risultato riportato nonostante il consenso sia stato generato con successo (risolto in Omixon HLA Twin 4.8.0)

Di frequente, nessun risultato di genotipizzazione viene riportato con IMGT/HLA 3.49.0\_9 e versioni superiori in combinazione con le versioni di Omixon HLA Twin inferiori a 4.8.0. L'utilizzo delle versioni del database interessato in combinazione con qualsiasi versione del software precedente alla versione 4.8.0 è fortemente sconsigliato e non è supportato ufficialmente.

### 2.1.2 Limitazioni specifiche del saggio Holotype HLA versione protocollo 3.0

Utilizzando il protocollo Holotype HLA v3.0 dopo la fase di ligazione dell'adattatore, alcuni utenti potrebbero riscontrare la presenza di un precipitato bianco. Abbiamo osservato che questo precipitato è formato da una reazione incrociata di un composto presente nel mix Promega PCR a lungo raggio e uno nel Tampone Riparazione Estremità. In alcuni casi il precipitato potrebbe avere effetti limitati nella libreria finale, senza tuttavia condizionare i risultati della genotipizzazione. Per raccomandazioni su come gestire questo fenomeno, contattare [support@omixon.com](mailto:support@omixon.com)<sup>1</sup> oppure direttamente il ricercatore responsabile del campo di applicazione.

### 2.1.3 Ambiguità specifiche di Holotype HLA

Questa sezione contiene le ambiguità causate dal design del test Omixon Holotype HLA e le limitazioni tecnologiche del metodo NGS (ovvero la posizione e la sequenza dei siti dei primer e la distribuzione dei frammenti di varie dimensioni prodotta dal metodo di selezione delle dimensioni utilizzato nel protocollo).

Per ciascun locus è stato creato un allineamento di sequenze multiple contenente tutte le sequenze di alleli e le sequenze dei primer Holotype. Tale allineamento è stato poi tagliato per isolare la regione di interesse (rimuovendo i siti dei primer ed eventuali posizioni esterne ai siti dei primer). Le sequenze così ottenute sono state controllate per rilevare i duplicati esatti e le relazioni tra le sottosequenze; sono inoltre state registrate tutte le ambiguità a livello dei tre campi o a risoluzione più bassa o a qualsiasi risoluzione ma relative ad alleli con livelli di espressione non standard.

### 2.1.4 Ambiguità specifiche di OmniType

Questa sezione contiene le ambiguità causate dal design del test OmniType e le limitazioni tecnologiche del metodo NGS (ovvero la posizione e la sequenza dei siti dei primer e la distribuzione dei frammenti di varie dimensioni prodotta dal metodo di selezione delle dimensioni utilizzato nel protocollo).

Per ciascun locus è stato creato un allineamento di sequenze multiple contenente tutte le sequenze di alleli e le sequenze dei primer OmniType. Tale allineamento è stato poi tagliato per isolare la regione di interesse (rimuovendo i siti dei primer ed eventuali posizioni esterne ai siti dei primer). Le sequenze così ottenute sono state

---

<sup>1</sup> <mailto:support@omixon.com>



controllate per rilevare i duplicati esatti e le relazioni tra le sottosequenze; sono inoltre state registrate tutte le ambiguità a livello dei tre campi o a risoluzione più bassa o a qualsiasi risoluzione ma relative ad alleli con livelli di espressione non standard.

## 2.1.5 Ambiguità a livello del primo, nel secondo e nel terzo campo

**Linee guida per la refertazione:** Riportare come ambiguo

Ambiguous alleles		Affected IMGT/HLA version(s)	Level of ambiguity
<i>DPB1*01:01:01</i>	<i>DPB1*1484:01</i>	All*	1st field
<i>DPB1*02:01:02</i>	<i>DPB1*1315:01/</i> <i>DPB1*02:01:64</i>	All*	1st field/ 3rd field
<i>DPB1*04:01:01</i>	<i>DPB1*1300:01/</i> <i>DPB1*1321:01/</i> <i>DPB1*1322:01/</i> <i>DPB1*04:01:63/</i> <i>DPB1*1436:01/</i> <i>DPB1*1444:01Q</i>	All*/ All*/ All*/ All*/ All*/ All*	1st field/ 1st field/ 1st field/ 3rd field/ 1st field/ 1st field
<i>DPB1*04:02:01</i>	<i>DPB1*1346:01</i>	All*	1st field
<i>DPB1*05:01:01</i>	<i>DPB1*1273:01/</i> <i>DPB1*05:01:16</i>	All*	1st field/ 3rd field
<i>DPB1*13:01:01</i>	<i>DPB1*107:01</i>	All*	1st field
<i>DPB1*15:01:01</i>	<i>DPB1*1499:01</i>	v3.53.0_10	1st field
<i>DPB1*39:01:01</i>	<i>DPB1*39:01:02</i>	All*	3rd field
<i>DPB1*105:01:01</i>	<i>DPB1*665:01:01/</i> <i>DPB1*1072:01</i>	All*	1st field
<i>DPB1*296:01</i>	<i>DPB1*1286:01</i>	All*	1st field
<i>DPB1*584:01:01</i>	<i>DPB1*584:01:02</i>	All*	3rd field
<i>DRB1*01:01:01</i>	<i>DRB1*01:100/</i> <i>DRB1*01:01:35/</i> <i>DRB1*01:01:41/</i> <i>DRV1*01:144</i>	All*/ All*/ All*/ v3.53.0_10	2nd field/ 3rd field/ 3rd field



Ambiguous alleles		Affected IMGT/HLA version(s)	Level of ambiguity
<i>DRB1*03:01:01</i>	<i>DRB1*03:147/</i> <i>DRB1*03:01:31</i>	All*	2nd field/ 3rd field
<i>DRB1*04:04:01</i>	<i>DRB1*04:365</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*04:06:02</i>	<i>DRB1*04:354</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*07:01:01</i>	<i>DRB1*07:139/</i> <i>DRB1*07:151</i>	All*/ v3.53.0_10	2nd field
<i>DRB1*08:01:01</i>	<i>DRB1*08:105</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*09:01:02</i>	<i>DRB1*09:31:02</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*10:01:01</i>	<i>DRB1*10:38</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*12:01:01</i>	<i>DRB1*12:10</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*12:02:01</i>	<i>DRB1*12:101</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*13:01:01</i>	<i>DRB1*13:01:34</i>	All*	3rd field
<i>DRB1*14:25:01</i>	<i>DRB1*14:25:02</i>	All*	3rd field
<i>DRB1*14:54:01</i>	<i>DRB1*14:216/</i> <i>DRB1*14:243/</i> <i>DRB1*14:253</i>	All*/ All*/ All*	2nd field
<i>DRB1*15:01:01</i>	<i>DRB1*15:204</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*15:02:01</i>	<i>DRB1*15:140/</i> <i>DRB1*15:149</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*15:03:01</i>	<i>DRB1*15:185</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*15:07:01</i>	<i>DRB1*15:198</i>	All*	2nd field
<i>DRB1*16:02:01</i>	<i>DRB1*16:64</i>	All*	2nd field
<i>DRB3*01:01:02</i>	<i>DRB3*01:62:01/</i> <i>DRB3*01:01:16</i>	All*/ All*	2nd field/ 3rd field

Ambiguous alleles		Affected IMGT/HLA version(s)	Level of ambiguity
DRB3*02:02:01	DRB3*02:144/ DRB3*02:167/ DRB3*02:168/ DRB3*02:188/ DRB3*02:189/ DRB3*02:193/ DRB3*02:02:34/ DRB3*02:02:35	All*/ All*/ All*/ All*/ All*/ v3.53.0_10/ All*/ All*	2nd field/ 2nd field/ 2nd field/ 2nd field/ 2nd field/ 2nd field/ 3rd field/ 3rd field
DRB4*01:01:01	DRB4*01:01:11/ DRB4*01:156/ DRB4*01:168	v3.53.0_10 All*/ All*	3rd field/ 2nd field/ 2nd field
DRB4*01:03:01	DRB4*01:134	All*	2nd field
DRB5*01:01:01	DRB5*01:126	All*	2nd field

\*All: sono interessate tutte le versioni del database che rientrano nell'ambito di questo documento.

Gli alleli ambigui in corsivo devono essere sistematicamente segnalati come ambigui da Omixon HLA Twin 4.9.0 in poi (indipendentemente dalla presenza di mismatch intronici), mentre con le versioni precedenti del software questi alleli vengono esclusi nel caso in cui vengano rilevati mismatch intronici.

## 2.1.6 Ambiguità che influenzano l'espressione

**Linee guida per la segnalazione:** Gli alleli a bassa espressione sono riportati come risultato del secondo campo.

### 2.1.6.1 Gruppi di alleli ambigui

Comunemente riportato con tutti:

- HLA-A\*02:01:01:01/**02:01:01:02L**/  
02:01:01:16/02:01:01:50/02:01:01:150/02:01:01:159/02:01:01:206/02:01:01:245
- HLA-B\*39:01:01:03/**39:01:01:02L**/39:01:01:05/39:01:01:09/39:01:01:15/39:01:01:16/39:01:01:17/  
39:01:01:23/39:01:01:26/39:01:01:27/39:01:01:28/39:01:01:29
- HLA-DPA1\***03:05:01:01Q**/**03:05:01:02Q**
- HLA-DPB1\*04:01:01/04:01:63/1321:01/1322:01/1436:01/**1444:01Q**<sup>4</sup>
- HLA-DPB1\*1373:01/**1442:01N**<sup>4</sup>

Segnalato solo in rari casi con Omixon HLA Twin 4.9.0 e versioni successive:

- HLA-DPB1\*01:01:01/01:01:07/417:01:01/1050:01:01/1151:01/**1332:01N**/**1325:01N**<sup>3</sup>/1443:01/1484:01
- HLA-DQB1\*03:01/**03:01:01:21N**<sup>2</sup>/03:19/03:29/03:191/**03:276N**/  
03:297/03:309:02/03:312/03:377/03:419/03:431/**03:358N**<sup>1</sup>/03:454/03:45/03:483/03:497/03:508

<sup>1</sup> L'ambiguità è presente con IMGT/HLA 3.36.0\_8 e successivi. HLA-DQB1\*03:358N contiene una delezione nell'esone 3, che causa un frameshift e uno stop prematuro nel codone 191 (fonte: <http://hla.alleles.org/alleles/>)



[nulls.html](#), data di accesso: 16-lug-2019). Al 16-lug-2019, questo allele è stato osservato in due campioni biologici di origine etnica sconosciuta da un singolo laboratorio. Al momento della creazione di questo documento non erano disponibili informazioni pubbliche sulle sequenze di origine di questo allele. Sulla base delle informazioni disponibili in IMGT/HLA 3.36.0, questo allele non può essere distinto dal software dagli altri alleli elencati nei gruppi di alleli ambigui, ma può essere escluso dal confronto manuale delle sequenze alleliche nel browser genico. Si noti che non tutti gli alleli elencati sono segnalati come ambigui in tutti i casi.

<sup>2</sup> DQB1\*03:01:01:21N è stato aggiunto in IMGT/HLA 3.47.0. Si noti che questo allele può essere distinto dagli alleli DRB1\*03 normalmente espressi, ma non può essere distinto da DQB1\*03:358N.

<sup>3</sup> L'allele è stato aggiunto in IMGT/HLA 3.49.0.

<sup>4</sup> L'allele è stato aggiunto in IMGT/HLA 3.51.0.

### 2.1.7 Ambiguità Cis/Trans

Le ambiguità Cis/Trans (cioè chiamate alleliche ambigue in cui le diverse coppie alleliche differiscono solo per la fase cis/trans) possono avere molteplici cause. La maggior parte di queste ambiguità viene segnalata a causa dei limiti della tecnologia e del database IMGT/HLA.

**Linee guida per la segnalazione:** Spetta al singolo laboratorio decidere se segnalare l'ambiguità utilizzando i gruppi G o se segnalare le coppie alleliche specifiche che sono ambigue.

## 2.2 Elenco delle limitazioni note per Omixon HLA Twin

### 2.2.1 Limiti noti dell'algorithmo di genotipizzazione consensuale

#### 2.2.1.1 Introduzione

Tutte le limitazioni elencate di seguito si basano su osservazioni riportate dai clienti di Omixon o effettuate durante la validazione interna e i test di regressione.

#### 2.2.1.2 False novità chiamate

Raramente, HLA Twin può segnalare all'utente finale false novità. Si noti che la stragrande maggioranza di queste false novità può essere eliminata con l'ispezione manuale dei risultati in Omixon HLA Twin da parte di un utente esperto.

In alcuni casi molto rari, viene riportato un nuovo allele, anche se è disponibile un allele senza mismatch esonici.

#### 2.2.1.3 Segnalato un mismatch dell'esone invece di un nuovo allele

In casi molto rari, al posto di un nuovo allele viene riportata una migliore corrispondenza con un mismatch esonico.

#### 2.2.1.4 L'ambiguità non è riportata per gli alleli nuovi.

Per impostazione predefinita, l'algorithmo di genotipizzazione consensuale riporta un solo allele nuovo. In casi molto rari, possono essere identificati più alleli nuovi ugualmente probabili, ma solo una di queste opzioni viene chiamata dall'algorithmo.

#### 2.2.1.5 Indel lungo non trovato

In alcuni casi, le inserzioni o le delezioni di lunga durata non sono segnalate da Omixon HLA Twin.



### 2.2.1.6 Allele nullo chiamato al posto di un nuovo allele

In alcuni casi, invece di un allele nuovo, viene riportato un allele nullo non ambiguo. I casi noti riguardano i seguenti alleli (ma non solo):

- HLA-DQB1\*03:276N/\*03:358N/\*03:338N chiamato al posto di HLA-DQB1\*03:01:01:XX novel.

### 2.2.1.7 Allele nullo riportato come ambiguo insieme all'allele normalmente espresso

In alcuni casi, gli alleli nulli che differiscono dagli alleli normalmente espressi nelle delezioni sono segnalati come ambigui insieme all'allele normalmente espresso. Si noti che queste ambiguità possono essere risolte ispezionando manualmente il risultato nel browser genico.

### 2.2.1.8 Falsi errori di phasing

In rari casi, le sequenze di consenso sono sfasate in modo errato.

#### 2.2.1.8.1 Identificazione di sequenze consensus non correttamente fasate

Si può sospettare un'errata fasatura cis/trans se si osservano una o più delle seguenti caratteristiche:

- Vengono segnalati due alleli nuovi all'interno di una singola coppia di best match.
- Vengono riportati un allele nuovo e un allele parzialmente definito.
- Sono riportati uno o due alleli rari.
- Sono presenti diverse posizioni nuove.

Se si sospetta una sfasatura errata, si consiglia all'utente di controllare i risultati dell'algoritmo di genotipizzazione statistica.

### 2.2.1.9 Ambiguità cis/trans dovuta a una non efficiente phasing.

In alcuni rari casi, vengono segnalate ambiguità a livello di secondo o terzo campo a causa di un phasing inefficiente. In questi casi, si suggerisce una nuova analisi dei loci interessati con un maggior numero di letture.

### 2.2.1.10 Ambiguità non riportata (Corretta in Omixon HLA Twin 4.9.0)

Per design, l'algoritmo riporta gli alleli con il minor numero di mismatch esonici e intronici rispetto alla sequenza di consenso. Per i geni con copertura parziale, raramente può accadere che l'allele corretto venga segnalato solo come allele residuo, in quanto presenta un numero di mismatch intronici superiore a quello dell'allele meglio corrispondente nella regione coperta dall'amplicone.

In alcuni rari casi:

- Le ambiguità cis/trans a livello di gruppo G non sono sempre riportate per HLA-DPB1.
- Le seguenti ambiguità comuni non sono sempre riportate (alleli riportati/**alleli non riportati**):
  - HLA-DPB1\*1072:01/**DPB1\*105:01**
  - HLA-DRB1 - DRB1\*12:10/**DRB1\*12:01:01**, DRB1\*15:140/DRB1\*15:149/**DRB1\*15:02**, DRB1\*03:147/**DRB1\*03:01:01**, DRB1\*14:216/DRB1\*14:243/**DRB1\*14:54**
  - HLA-DQB1- DQB1\*03:276N/**DQB1\*03:01**.

## 2.2.2 Limiti noti dell'algoritmo di genotipizzazione statistica

A causa dell'elevata somiglianza delle sequenze exon di alcuni alleli, l'algoritmo di genotipizzazione statistica riporta in alcuni casi alleli errati.



## 2.2.3 Altre limitazioni

È stata identificata una limitazione nella versione 4.8.0 della soluzione Twin Server - Client. Quando si tenta di aprire 48 risultati o più utilizzando la funzione "Visualizza risultati", l'applicazione Client può visualizzare un messaggio di errore di rete irrecuperabile. (Questo problema è stato risolto in Omixon HLA Twin 4.8.1).

In alcuni rari casi in cui gli alleli segnalati presentano differenze di lunghezza significative in alcune regioni del gene, le tracce di sequenza nel browser dei geni possono essere allineate in modo errato e vengono visualizzate lacune non necessarie. Questo problema non influisce sulla chiamata allelica o sui valori calcolati per le metriche QC. La visualizzazione separata degli alleli può eliminare questo difetto di visualizzazione.

La segnalazione dell'ambiguità nella schermata dei risultati dell'analisi potrebbe non essere ottimale nei casi in cui gli alleli sono duplicati su entrambi i cromosomi a causa dell'ordinamento degli alleli a coppie.

Si noti che quando si utilizza la procedura guidata di assegnazione massiva/Bulk assignment nella barra degli strumenti Assegnazione allele e si seleziona l'opzione "Assegna solo risultati non ambigui", c'è una limitazione nei casi di genotipi DRB3/4/5. I risultati ambigui possono ancora essere assegnati perché lo stato omozigote o emizigote di questi genotipi si basa sull'aplotipo DRB1, che non viene considerato in questa funzione.

Per i nuovi alleli, la traccia degli aminoacidi non funziona correttamente nelle versioni 4.8.0 e 4.8.1 di Omixon HLA Twin.

## 3 Limitazioni note del prodotto per HLA-B

### 3.1 Limitazioni specifiche di Holotype HLA

### 3.2 Limitazioni specifiche di OmniType

#### 3.2.1 Alleli che possono risultare poco amplificati

Una bassa amplificazione significa che il conteggio di read generato per un allele non è sufficiente per la genotipizzazione. In casi estremi, l'allele può non essere riportato affatto (dropout).

Alleli a bassa amplificazione	Compensazione in HLA Twin	Risoluzione rilevabile
B*51:01:02	Sì	Sì

### 3.3 Limitazioni specifiche per Omixon HLA Twin

#### 3.3.1 Limitazioni note dell'algorithmo di genotipizzazione con sequenza consenso

##### 3.3.1.1 Sequenza di consenso errata a causa dell'inefficiente rilevamento della mappatura incrociata

- In alcuni casi estremamente rari, a causa di una parziale perdita di consenso vengono segnalati risultati ambigui all'avvio del consenso.
- Molto raramente vengono riportate false scoperte a causa di una sequenza di consenso errata in prossimità dell'avvio del consenso.

##### 3.3.1.2 HLA-B\*15:01 identificato scorrettamente

In casi molto rari, è possibile osservare errori nell'identificazione degli alleli appartenenti ai seguenti gruppi di alleli e le informazioni sugli aminoacidi possono essere scorrette a causa di incongruenze nel database:



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

### 3.3.2 Limitazioni note dell'algoritmo di genotipizzazione statistica

#### 3.3.2.1 Alcuni alleli HLA-B sono identificati scorrettamente per via della presenza di una sequenza di esoni identica in HLA-C

Un gruppo di alleli HLA-B (diversi alleli HLA-B\*44 e HLA-B\*47:04) presenta una sequenza dell'esone 2 identica ad HLA-C\*16:85. A causa di questa somiglianza, tali alleli possono essere identificati scorrettamente dall'algoritmo di genotipizzazione statistica.

## 4 Limitazioni note del prodotto per HLA-DQA1

### 4.1 Limitazioni specifiche per Omixon HLA Twin

#### 4.1.1 Limitazioni note dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso

##### 4.1.1.1 Errata ricostruzione degli aplotipi

Risultato identificato da Twin	Risultato corretto	Chimica di sequenziamento	Numero di casi
DQA1*05:01:01:02#1+	DQA1*05:01+	2x150	1
DQA1*05:05:01:03#1	DQA1*05:05		

## 5 Limitazioni note del prodotto per HLA-DQB1

### 5.1 Limitazioni specifiche di OmniType

#### 5.1.1 Alleli che possono risultare poco amplificati

È possibile osservare un moderato sbilanciamento allelico per gli alleli nel gruppo di alleli HLA-DQB1\*02. In alcuni casi rari, è possibile osservare uno sbilanciamento allelico elevato. In casi molto rari, l'allele potrebbe non essere riportato affatto (dropout).

### 5.2 Limitazioni specifiche di Holotype HLA

#### 5.2.1 Alleli che possono risultare poco amplificati

Alleli a bassa amplificazione	Compensazione in HLA Twin	Risoluzione rilevabile
DQB1*03	Sì	Sì <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Suggerimento basato sul disequilibrio di associazione (LD) con DQA1

#### 5.2.2 Alleli che non sono amplificati

DQB1\*03:276N – a causa di una lunga delezione che copre il sito del primer di amplificazione dell'estremità 5' questo allele non viene amplificato.



## 6 Limitazioni note del prodotto per HLA-DRB1

### 6.1 Limitazioni tecnologiche

È possibile osservare un moderato sbilanciamento allelico per gli alleli con sequenze significativamente più lunghe della media (ad esempio alcuni alleli HLA-DRB1\*04). In alcuni casi rari, è possibile osservare uno sbilanciamento allelico elevato. In casi molto rari, in casi rari, si può verificare un dropout allelico.

### 6.2 Limitazioni specifiche di OmniType

### 6.3 Limitazioni specifiche di Holotype HLA

#### 6.3.1 Bassa amplificazione

In alcuni casi, è possibile osservare uno sbilanciamento allelico moderato o elevato per gli alleli HLA-DRB1\*07. In casi rari, è possibile che l'allele non venga riportato affatto (dropout).

## 7 Limitazioni note del prodotto per HLA-DRB4

### 7.1 Limitazioni specifiche di Holotype HLA

### 7.2 Limitazioni specifiche di OmniType

#### 7.2.1 Alleli che non sono amplificati

DRB4\*03:01N: a causa di una lunga delezione che copre il sito del primer di amplificazione 5', questo allele non viene amplificato.

#### 7.2.2 Alleli che possono risultare poco amplificati

Una bassa amplificazione significa che il conteggio di read generato per un allele non è sufficiente per la genotipizzazione. In casi estremi, l'allele può non essere riportato affatto (dropout). Una bassa amplificazione e il dropout dell'allele sono stati osservati frequentemente per HLA-DRB4\*01:01. In casi rari, sono stati riportati dropout per gli alleli HLA-DRB4\*01:03. In entrambi i casi, la presenza dell'allele viene suggerita da Omixon HLA Twin in base al disequilibrio di associazione.

#### 7.2.3 Altre limitazioni correlate al saggio

##### 7.2.3.1 Risultato falso positivo delle misurazioni della concentrazione per HLA-DRB4

È possibile osservare alte concentrazioni di ampliconi in alcuni campioni anche se:

- il soggetto non presenta una copia del gene HLA-DRB4 oppure
- il soggetto presenta una o due copie del gene HLA-DRB4, ma l'amplificazione non è andata a buon fine.

## 7.3 Limitazioni specifiche per Omixon HLA Twin

### 7.3.1 Limitazioni note dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso

#### 7.3.1.1 L'ambiguità non è riportata



<b>Risultato identificato da Twin</b>	<b>Risultato corretto</b>
DRB4*01:01:01:01	DRB4*01:01:01:01/DRB4*03:01N




## 8 Storico revisioni e modifiche

Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v1	05 Oct 2020	Versione iniziale del documento
v2	12 Jan 2022	<p>Sono state aggiornate le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA affinché corrispondessero alle versioni del software e del database IMGT/HLA attualmente supportate.</p> <p>È stata aggiunta una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso che interessa gli alleli nuovi in cui la posizione nuova è presente all'interno di una delezione di un allele nullo simile all'allele nuovo.</p> <p>Sono state aggiunte due limitazioni che interessano Omixon HLA Twin 4.4.0 (la genotipizzazione automatizzata</p>




Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
		non è funzionale, il Gene Browser genera un errore per alcune scoperte). Sono stati aggiunti problemi di amplificazione relativi ad alcuni gruppi HLA-DQA1 e HLA-DQB1.




Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v3	 20 Mar 2023	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse.</p> <p>Le limitazioni sono state aggiornate in riferimento alle seguenti versioni del database IMGT/HLA: 3.48.0_9, 3.49.0_9, 3.50.0_9 e 3.51.0_9.</p> <p>Le sezioni delle limitazioni del software sono state estese per includere informazioni relative alle seguenti versioni del software: versioni 4.6.0 (RUO), 4.7.0 (RUO) e 4.8.0 (RUO) di Omixon HLA Twin</p>




Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v4	 25 May 2023	<p>Sono state rimosse le informazioni sulle versioni del software e di IMGT/HLA più vecchie di 12+1 mesi. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.48.0_9, Omixon HLA Twin 4.6.0 RUO</p> <p>L'ambito di applicazione del documento è stato ampliato con Omixon HLA Twin 4.8.1.</p>







Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v5	 03 Aug 2023	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate per corrispondere a IMGT/HLA 3.52.0_9. Sono state apportate alcune correzioni nella tabella delle ambiguità (è stato corretto DRB1*12:101, sono state aggiunte le ambiguità DRB1*04 e sono state apportate altre correzioni minori). Sono state apportate modifiche minori alla formulazione per le seguenti limitazioni: Sfasatura errata, Ambiguità non segnalata</p>

Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v1	 05 Jul 2017	Limitazioni algoritmiche raccolte. Documento unito al documento sulle limitazioni specifiche di Holotype HLA.



Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v2	 31 Jan 2018	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alle versioni di IMGT/HLA v3.28.0 e v3.29.0.1.</p> <p>La sezione sulle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alle seguenti versioni del software: Twin 2.1.3, Twin 2.1.4 e Twin 2.5.0.</p>
v3	 04 Jul 2018	<p>Sono stati aggiunti ulteriori casi relativi alla ricostruzione degli aptotipi. È stata aggiunta una guida breve per identificare i casi di ricostruzione degli aptotipi errata.</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione IMGT/HLA v3.30.0.</p> <p>La sezione sulle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alle seguenti versioni del software: Twin 2.5.1 e Twin 3.0.0.</p>
v4	 19 Oct 2018	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA v3.31.0.</p> <p>La sezione delle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alle seguenti versioni del software: Twin 3.1.0 e Twin 3.1.1.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: Omixon HLA Twin 2.1.3 e 2.1.4, IMGT/HLA 3.28.0_4.</p> <p>Rimossi alcuni esempi relativi a casi in cui risulta impossibile provare la specificità degli alleli.</p> <p>Aggiunte ulteriori limitazioni dell'algoritmo di genotipizzazione statistica.</p>
v5	 14 Jan 2019	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA v3.32.0.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versione interessata: IMGT/HLA 3.29.0.1_5.</p> <p>Le sezioni relative alle limitazioni del saggio sono state estese per includere la seguente versione del saggio: Holotype HLA v3.0.</p> <p>La formattazione della sezione "Ambiguità relative all'espressione" è stata modificata ed è stato aggiunto un nuovo caso.</p> <p>È stato aggiunto un nuovo caso nella sezione "Ambiguità Cis/Trans" di HLA-DPB1.</p> <p>Sono stati effettuati ulteriori modifiche e aggiornamenti minori.</p>



Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v6	26 Mar 2019	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alle versioni di IMGT/HLA 3.32.0_7, 3.33.0_7 e 3.34.0_8.</p> <p>La sezione delle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Twin 3.1.3.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: Omixon HLA Twin 2.5.0, IMGT/HLA 3.30.0_5 e 3.31.0_5.</p> <p>Le versioni del prodotto interessate dall'ambiguità di DQB1*03:276N sono state corrette e aggiornate.</p> <p>Esempi specifici sono stati rimossi dalla sezione sulle ambiguità Cis/Trans di HLA-DPB1.</p> <p>Sono stati effettuati ulteriori modifiche e aggiornamenti minori.</p>
v7	26 Apr 2019	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.35.0_8.</p> <p>È stata aggiornata una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione statistica causata da sequenze di regioni identiche in loci diversi.</p> <p>È stata aggiornata una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso relativa a nuove sequenze di inserzione e delezione.</p> <p>La sezione "Ambiguità a livello del primo, del secondo e del terzo campo" è stata riorganizzata.</p>
v8	19 Jul 2019	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.36.0_8.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: Omixon HLA Twin 2.5.1, IMGT/HLA 3.32.0_5, 3.32.0_7.</p> <p>È stata aggiunta una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso che interessa HLA-DRB3.</p>
v9	08 Aug 2019	<p>La sezione delle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Omixon HLA Twin 4.0.0</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versione interessata: Omixon HLA Twin 3.0.0</p> <p>È stata aggiunta una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso che interessa HLA-DRB1.</p>








Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v10	 16 Oct 2019	La sezione delle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Omixon HLA Twin 4.0.1.
v11	 19 Nov 2019	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.37.0_8.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: Omixon HLA Twin 3.1.0, IMGT/HLA 3.33.0_7.</p> <p>Le limitazioni dell'algoritmo di genotipizzazione statistica e le limitazioni relative all'ambiguità dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso sono state riorganizzate.</p>
v12	 07 Jan 2020	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.38.0_8.</p> <p>La sezione delle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Twin 4.1.0.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.34.0_8.</p>
v13	 26 Mar 2020	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.38.0_9.</p> <p>La sezione delle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Twin 4.2.0.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.35.0_8.</p> <p>È stata aggiunta una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso che interessa le versioni recenti di IMGT/HLA.</p> <p>La sezione relativa alle limitazioni del saggio è stata estesa per includere il problema del falso positivo specifico dei loci DRB3/4/5 che si verifica in casi sporadici e il fenomeno specifico del flusso di lavoro del saggio 3.0 del "precipitato bianco" e la relativa gestione suggerita.</p>



Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v14	 01 Jul 2020	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.36.0_8, Omixon HLA Twin versioni 3.1.1 e 3.1.3.</p> <p>Le limitazioni relative al database relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione IMGT/HLA 3.39.0_9.</p> <p>La sezione delle limitazioni del software è stata estesa per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Twin 4.2.2.</p> <p>Le informazioni relative a Holotype HLA v1 sono state rimosse poiché la versione di questo saggio non è più supportata.</p>
v15	 07 Aug 2020	<p>Le sezioni delle limitazioni del software sono state estese per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Twin 4.3.0.</p> <p>Sono state aggiunte delle limitazioni che interessano le versioni 4.1.0, 4.2.0 e 4.2.2 di Twin.</p>
v16	 05 Oct 2020	<p>Le informazioni relative alle versioni del software che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versione interessata: Omixon HLA Twin 4.0.0.</p>
v17	 14 Jan 2021	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versione interessata: Omixon HLA Twin 4.0.1, IMGT/HLA 3.37.0_8, 3.38.0_8 e 3.38.0_9.</p> <p>Le sezioni delle limitazioni del software sono state estese per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Omixon HLA Twin 4.4.0 (CE&amp;RUO).</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alle versioni IMGT/HLA 3.40.0_9, 3.41.2_9 e 3.42.0_9, inclusa la compatibilità della versione limitata con Omixon HLA Twin.</p> <p>È stata aggiunta una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso che interessa gli alleli nuovi in cui la posizione nuova è presente all'interno di una delezione in un allele nullo simile all'allele nuovo.</p>





Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v18	 02 Mar 2021	<p>Le informazioni relative alle versioni del software che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versione interessata: Omixon HLA Twin 4.1.0.</p> <p>Le sezioni delle limitazioni del software sono state estese per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Omixon HLA Twin 4.4.1 (CE&amp;RUO).</p> <p>Sono state aggiunte due limitazioni che interessano Omixon HLA Twin 4.4.0 (la genotipizzazione automatizzata non è funzionale, il Gene Browser (esploratore dei geni) genera un errore per alcune scoperte).</p>
v19	 07 Jun 2021	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: Omixon HLA Twin 4.1.0, Omixon HLA Twin 4.2.0, IMGT/HLA 3.39.0_9 e IMGT/HLA 3.40.0_9.</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.43.0_9.</p>
v20	 16 Nov 2021	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: Omixon HLA Twin 4.2.2, Omixon HLA Twin 4.3.0, IMGT/HLA 3.41.2_9.</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.44.1_9.</p> <p>Le informazioni relative alle versioni 2.1 (RUO&amp;CE) e 2.2 (RUO) del protocollo Holotype sono state rimosse dal documento in quanto la produzione di queste versioni del prodotto è stata interrotta.</p>
v21	 12 Jan 2022	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.42.0_9.</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.45.1_9.</p>
v22	 07 Mar 2022	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.43.0_9 e Omixon HLA Twin 4.4.0 (CE&amp;RUO).</p> <p>Le sezioni delle limitazioni del software sono state estese per includere informazioni relative alla seguente versione del software: Omixon HLA Twin 4.6.0 (CE&amp;RUO).</p>



Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v23	30 Jun 2022	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.44.1_9 e Omixon HLA Twin 4.4.1 (CE&amp;RUO).</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alle versioni di IMGT/HLA 3.46.0_9 e 3.47.0_9.</p> <p>L'ambito di applicazione del documento è stato ampliato con il protocollo Holotype HLA versione 3.0.2 (CE&amp;RUO).</p>
v24	14 Oct 2022	<p>L'ambito di applicazione del documento è stato ampliato con Omixon HLA Twin 4.7.0 (RUO).</p>
v25	06 Dec 2022	<p>Aggiornamenti marginali all'ambito di applicazione del documento (distinzione più chiara tra prodotti CE e RUO).</p> <p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.45.1_9, IMGT/HLA 3.46.0_9.</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alla versione di IMGT/HLA 3.48.0_9.</p>
v26	17 Mar 2023	<p>Le informazioni relative alle versioni del software e di IMGT/HLA che risalgono a oltre 12+1 mesi sono state rimosse. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.47.0_9.</p> <p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate in riferimento alle versioni di IMGT/HLA 3.49.0_9, IMGT/HLA 3.50.0_9 e IMGT/HLA 3.51.0_9.</p> <p>L'ambito di applicazione del documento è stato ampliato con Omixon HLA Twin 4.8.0.</p> <p>Sono state aggiunte limitazioni secondarie dell'algoritmo di genotipizzazione con sequenza consenso e dell'interfaccia utente.</p>
v27	25 May 2023	<p>Sono state rimosse le informazioni sulle versioni del software e di IMGT/HLA più vecchie di 12+1 mesi. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.48.0_9, Omixon HLA Twin 4.6.0 CE</p> <p>Sono state rimosse le informazioni relative al software e alle versioni di IMGT/HLA più vecchie di 12+1 mesi. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.48.0_9, Omixon HLA Twin 4.6.0 RUO</p> <p>Il campo di applicazione del documento è stato esteso con Omixon HLA Twin 4.8.1.</p>



Versione	Data di approvazione	Sommario delle modifiche
v28	 03 Aug 2023	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate per corrispondere a IMGT/HLA 3.52.0_9.</p> <p>Sono state apportate alcune correzioni nella tabella delle ambiguità (è stato corretto DRB1*12:101, sono state aggiunte le ambiguità DRB1*04 e sono state apportate altre correzioni minori).</p> <p>Sono state apportate modifiche minori alla formulazione per le seguenti limitazioni: Sfasatura errata, Ambiguità non segnalata</p>
v29	 22 Nov 2023	<p>Le limitazioni relative al database IMGT/HLA sono state aggiornate per corrispondere a IMGT/HLA 3.53.0_10.</p> <p>Sono state rimosse le informazioni sulle versioni del software e di IMGT/HLA più vecchie di 12+1 mesi. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.49.0_9</p> <p>È stata aggiunta una limitazione dell'algoritmo di genotipizzazione del consenso (segnalazione di ambiguità dell'allele nullo non intrinseco).</p> <p>È stata aggiunta una limitazione della traccia aminoacidica che riguarda gli alleli nuovi.</p>
v30	 28 Mar 2024	<p>Sono state rimosse le informazioni sulle versioni del software e dell'IMGT/HLA più vecchie di 12+1 mesi. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.50.0_9, IMGT/HLA 3.51.0_9 e Omixon HLA Twin 4.7.0 RUO</p> <p>Sono state rimosse le informazioni sulle versioni del software e di IMGT/HLA più vecchie di 12+1 mesi. Versioni interessate: IMGT/HLA 3.50.0_9, IMGT/HLA 3.51.0_9</p> <p>L'ambito di applicazione del documento è stato ampliato con Omixon HLA Twin 4.9.0.</p>