Sekvensrevolutionen i KITM:s tjänst

Magnus Jöud

Överläkare, MLA

Tf Enhetschef medicinsk stab

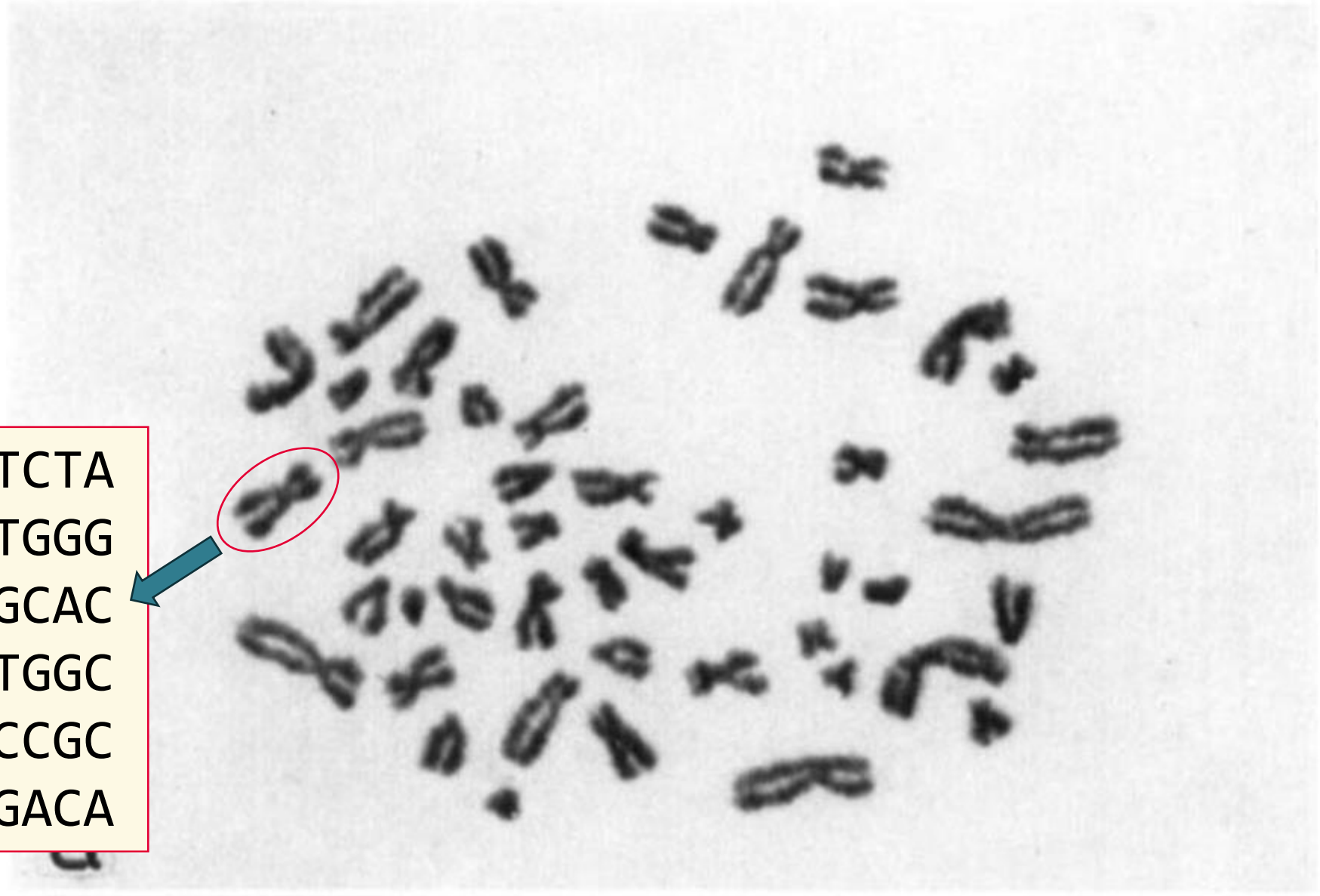
Klinisk immunologi och transfusionsmedicin

Exempel 1

- En man registreras som ny blodgivare
- Vid blodgruppering i rutin finner man svaga (ej godkända) reaktioner med anti-A
- Ett PCR-baserat kit för genomisk *ABO*-gruppering ger ingen förklaring till fynden
- Vid sekvensering av mannens *ABO*-gen med Sangermetodik finner man en ny variant som bedöms förklara fynden, varefter blodgrupp A fastställs

Sekvensering?

- Fastställande av DNA-sekvens
- Sekvensering kan ta fram ny kunskap som inte är låst till metoder som t.ex. PCR-baserade kit
- Användning inom KITM bl.a.
  - Immunbristutredningar
  - HLA-typning
  - Genotypning för blodgrupper
  - Chimerismbestämning efter SCT/organtransplantation



TTGGTCTCTA
TACTCCTGGG
GTTCTGGCAC
TGGCTCTGGC
CCATGACCGC
ACCCAAGACA

Joe Hin Tjio and Albert Levan. The chromosome number in man. Hereditas, vol. 42, pp. 1-6, 1956.

THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN

By *JOE HIN TJIO* and *ALBERT LEVAN*

ESTACION EXPERIMENTAL DE AULA DEI, ZARAGOZA, SPAIN, AND CANCER CHROMOSOME LABORATORY, INSTITUTE OF GENETICS, LUND, SWEDEN

WHILE staying last summer at the Sloan-Kettering Institute, New York, one of us tried out some modifications of HSU's technique (1952) on various human tissue cultures carried in serial *in vitro* cultivation at that institute. The results were promising inasmuch as some fairly satisfactory chromosome analyses were obtained in cultures both of tissues of normal origin and of tumours (LEVAN, 1956).

Later on both authors, working in cooperation at Lund, have tried still further to improve the technique. We had access to tissue cultures of human embryonic lung fibroblasts, grown in bovine amniotic fluid; these were very kindly supplied to us by Dr. RUNE GRUBB of the Virus Laboratory, Institute of Bacteriology, Lund. All cultures were primary explants taken from human embryos obtained after legal abortions. The embryos were 10—25 cm in length. The chromosomes were studied a few days after the *in vitro* explantation had been made.

In our opinion the hypotonic pre-treatment introduced by HSU, although a very significant improvement especially for spreading the

Generationer av sekvenseringsteknologier

- **Sanger-sekvensering**
- **Next-generation sequencing** eller *massively parallel sequencing (MPS)*
  - Illumina
- ***Long-readsekvensering*** (ibland *third-generation sequencing*)
  - Oxford Nanopore Technologies
  - PacBio
  - Sequencing by expansion (SBX; Roche)

Sanger-sekvensering

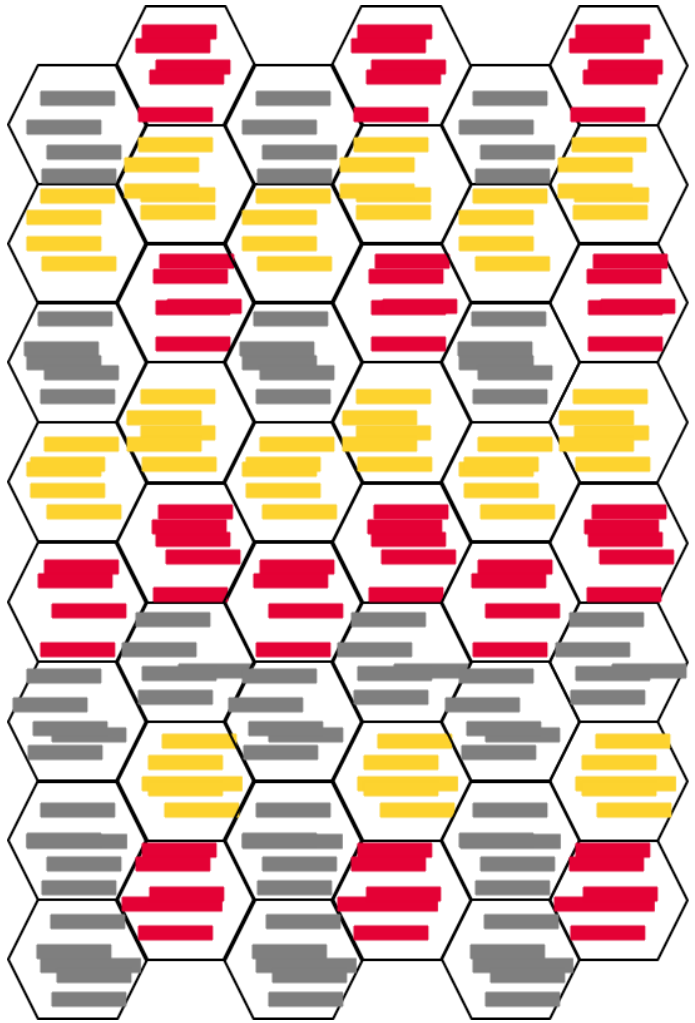
- Länge *golden standard*
- Låg kapacitet – ett prov i taget, en sekvens i taget

Exempel 2

- Larm från nyföddhetsscreening: ett barn har fynd som talar för svår immunbrist
- Flödescytometriska fynd stöder resultat från screeningen
- Helgenomsekvensering med NGS-teknik av barn och föräldrar påvisar en *de novo*-mutation hos barnet i en kritisk gen
- Barnet genomgår framgångsrikt allogen SCT och botas därmed

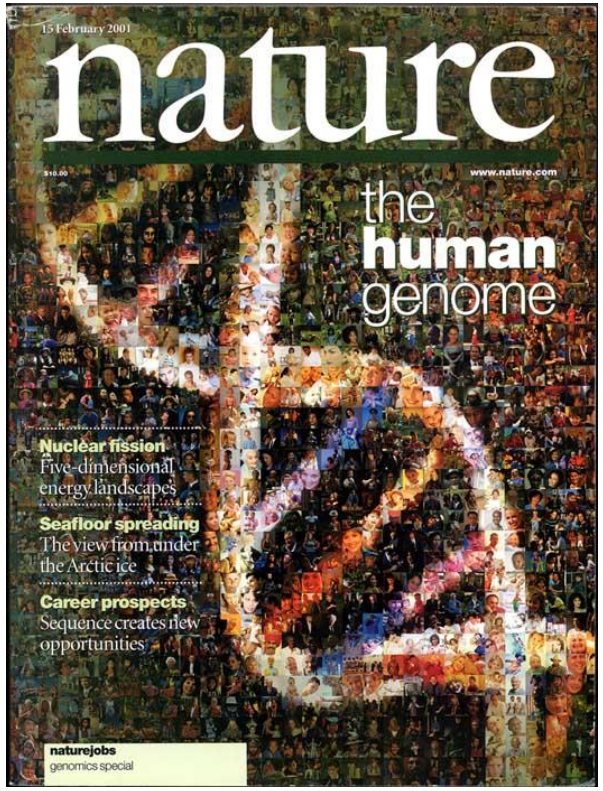
NGS-teknologier

- Många reaktioner, samtidigt

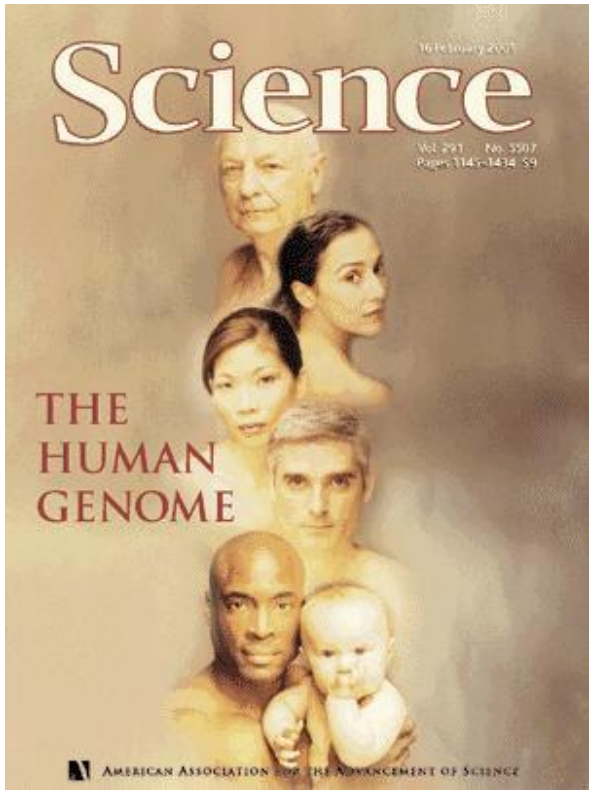


The human genome project

Publicerat 2001:
$3 000 000 000 och 15 års Sangersekvensering

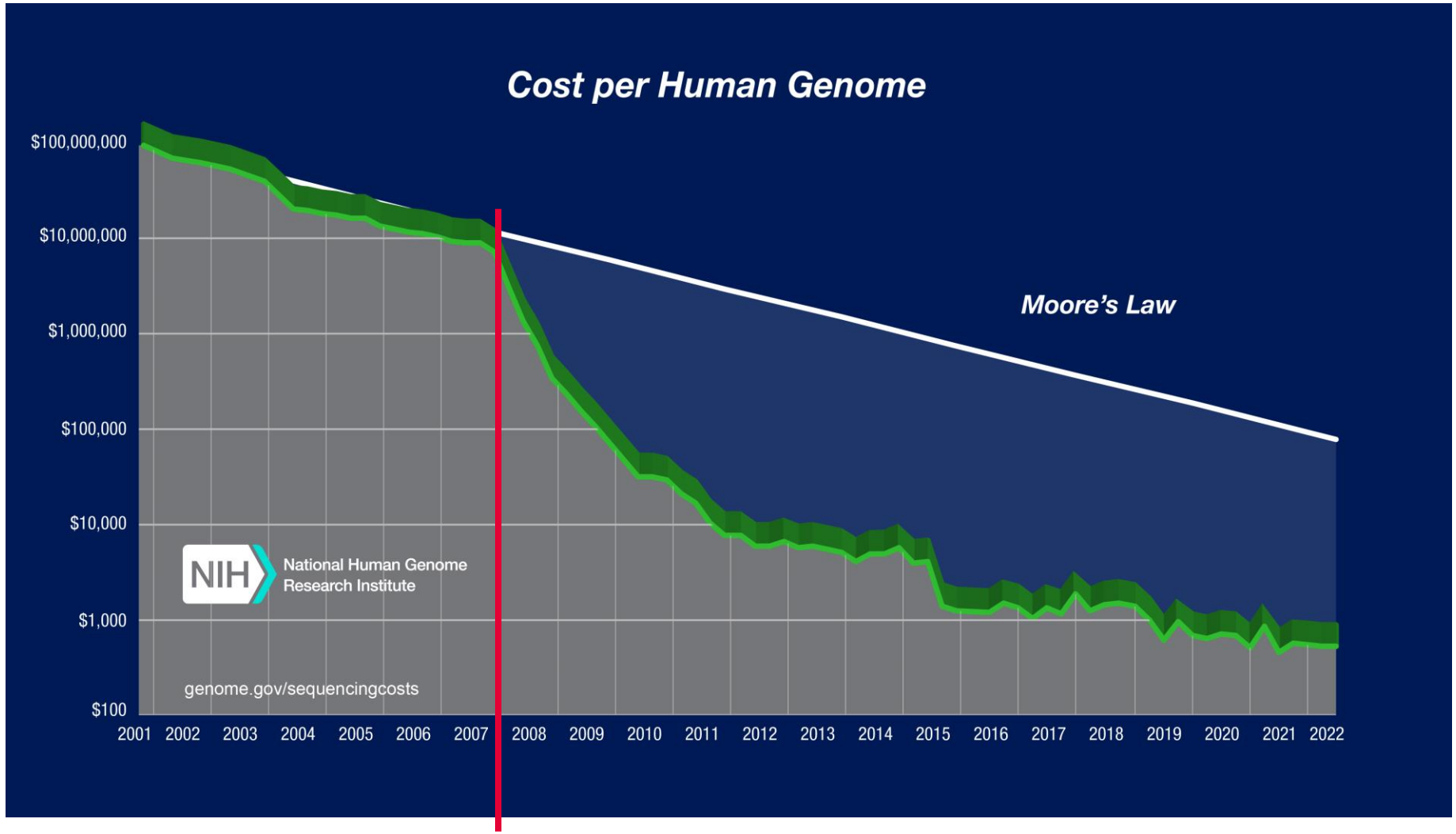


NIH



Celera genomics

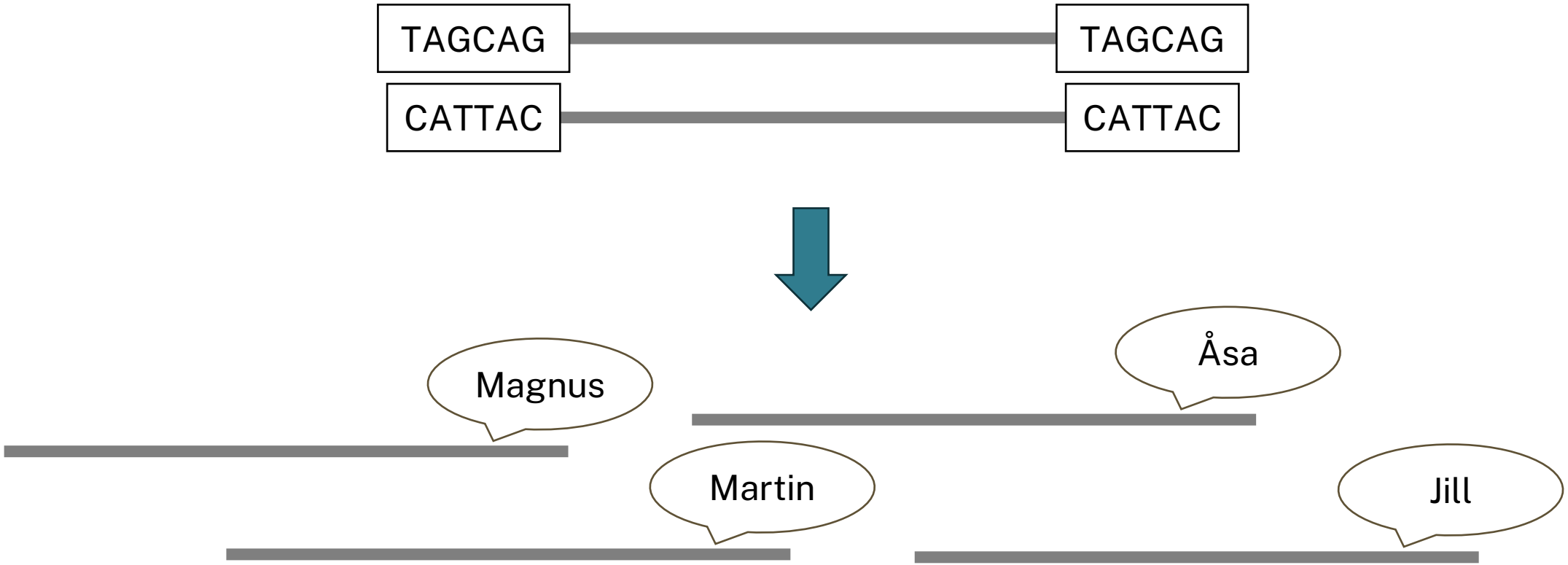
NGS-metoder introduceras



NGS

- Valfritt fragment sekvenseras – behöver inte vara känd sekvens
- Miljarder nukleotider
- Prov från *flera* patient och *flera* områden (t.ex. olika gener) samtidigt

Barcoding – flera prover analyseras samtidigt

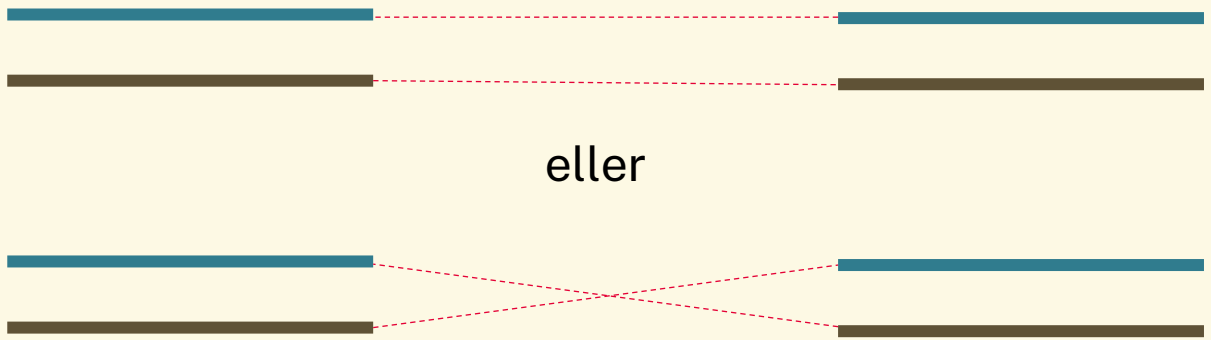


Utmaningar med nya metoder

- Mer data än vad människan kan tolka
- Problemen skjuts från att generera data till att tolka data
- Datorstöd (filtrering, tolkning) är nödvändigt

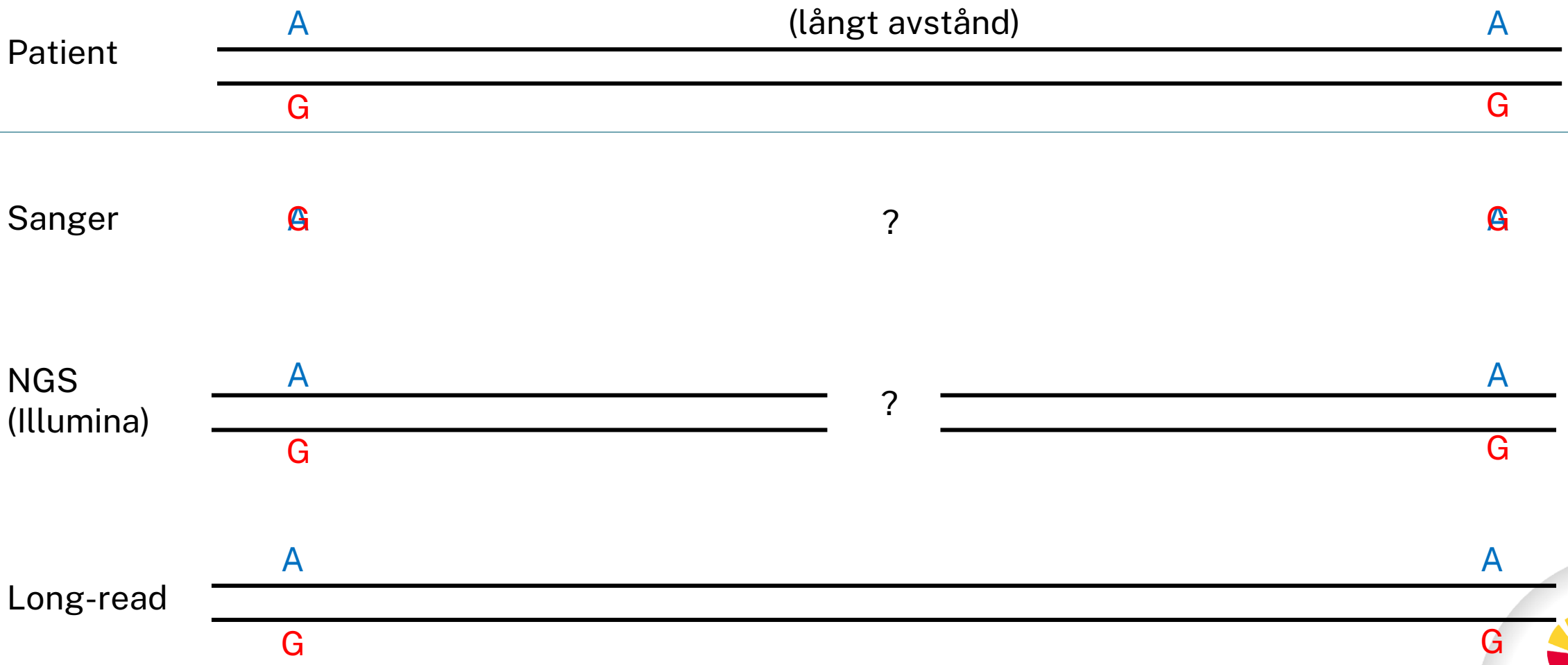
Exempel 3

- Transplantationslab använder redan en NGS-baserad metod för HLA-typning men får ibland inga konklusiva resultat pga. cis/trans-problem

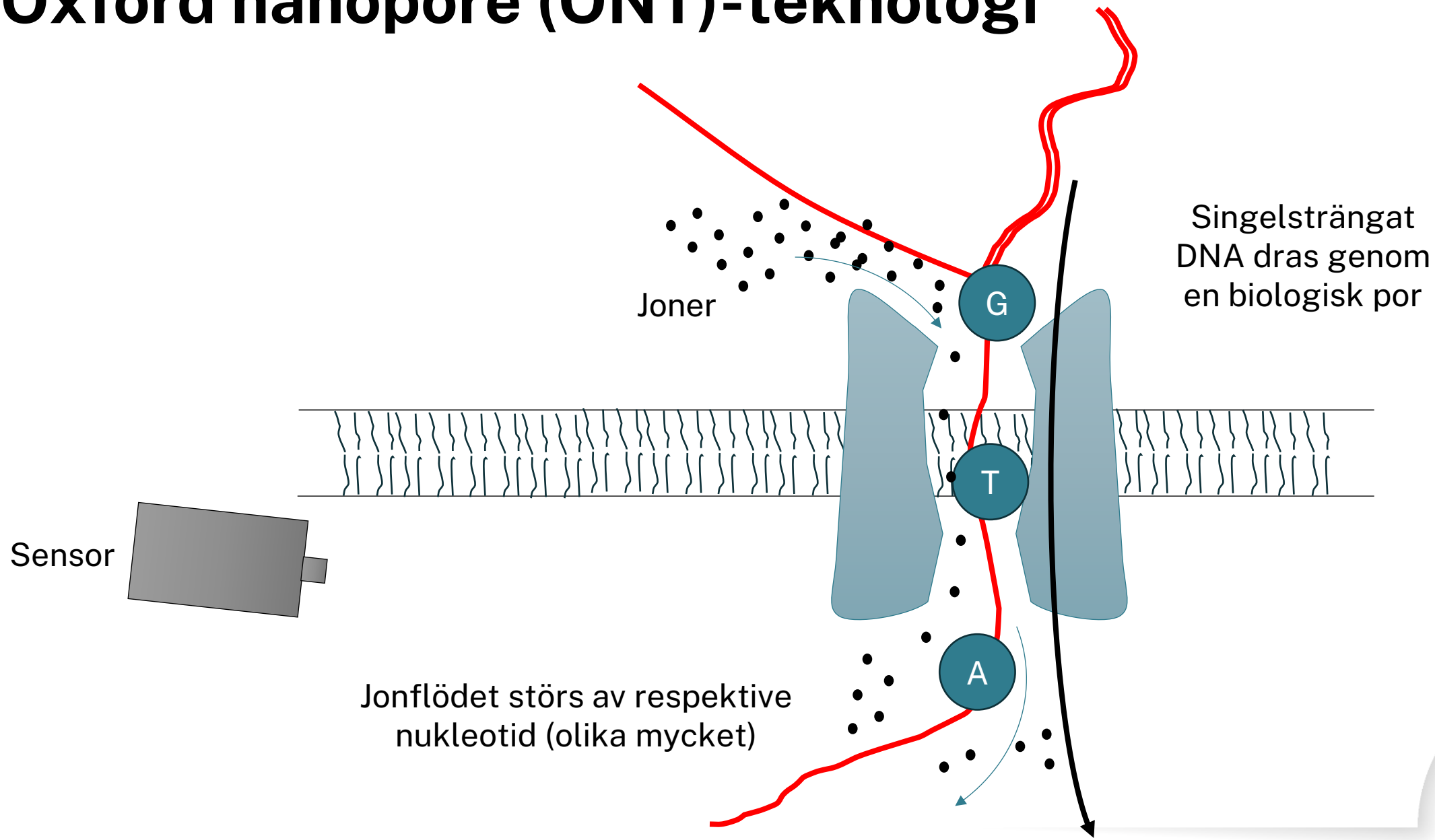


- En typningsmetod med långa läsningar (reads), ONT, introduceras och hela gener sekvenseras nu i ett enda fragment

Long-readsekvensering löser cis/trans-problem



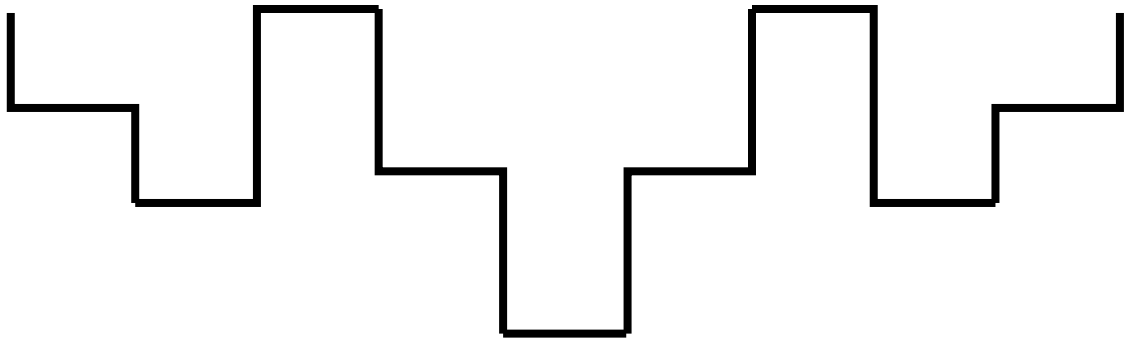
Oxford nanopore (ONT)-teknologi



Avläsning

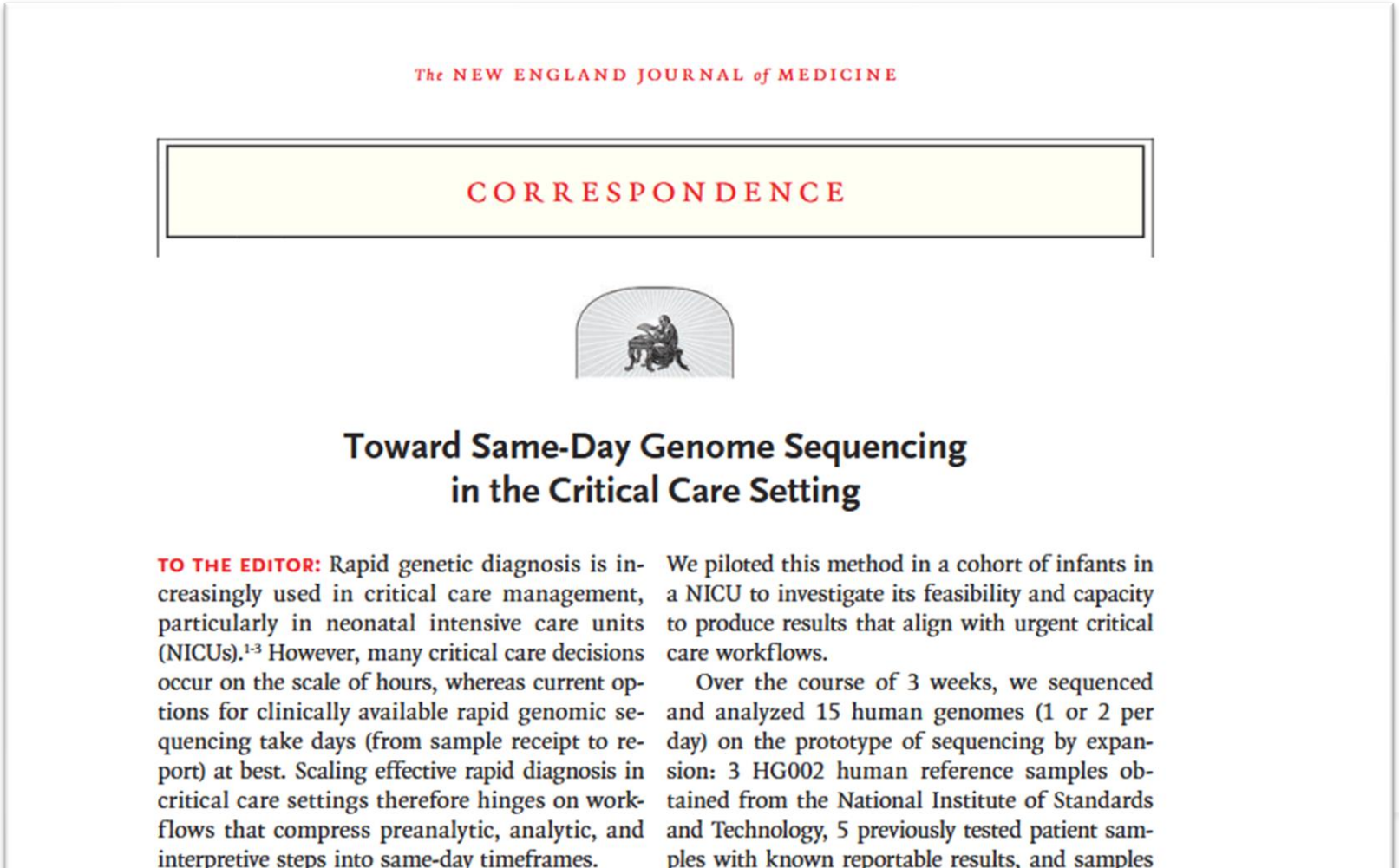
Varje nukleotid stör jonflödet men olika mycket – kan avläsas som störningar i en konstant ström

”Squiggle”



Sequencing by expansion (SBX)

- Variant på nanoporekonceptet med högre sekvenskvalitet



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

CORRESPONDENCE

Toward Same-Day Genome Sequencing in the Critical Care Setting

TO THE EDITOR: Rapid genetic diagnosis is increasingly used in critical care management, particularly in neonatal intensive care units (NICUs).[1-3] However, many critical care decisions occur on the scale of hours, whereas current options for clinically available rapid genomic sequencing take days (from sample receipt to report) at best. Scaling effective rapid diagnosis in critical care settings therefore hinges on workflows that compress preanalytic, analytic, and interpretive steps into same-day timeframes.

We piloted this method in a cohort of infants in a NICU to investigate its feasibility and capacity to produce results that align with urgent critical care workflows.

Over the course of 3 weeks, we sequenced and analyzed 15 human genomes (1 or 2 per day) on the prototype of sequencing by expansion: 3 HG002 human reference samples obtained from the National Institute of Standards and Technology, 5 previously tested patient samples with known reportable results, and samples

Wojcik MH et al.
N Engl J Med.
2025 Nov 20;
393(20):2063–5.

Hur kan vi använda olika metoder framöver?

- Sanger – referensändamål, äldre väletablerade flöden
- NGS (t.ex. Illumina) – arbetshäst framöver, för majoriteten av tillämpningar
- Long-readsekvensering – för områden med hög variabilitet, t.ex. *HLA*, *ABO*, *RHD*/*RHCE* (rutin och/eller referens)

Metoder för sekvensering

	Sanger	NGS (Illumina)	Long-read (ONT/SBX)
Kapacitet	Låg	Hög	Hög
Sekvenskvalitet	Hög (golden standard?)	Hög	Mellan-hög (SBX)
Tid till resultat	Timmar-dagar	Dag-dagar	Realtid möjligt
Fasning	Går ej utan separata PCR	Ja	Ja
Läsningslängd	-	Kort	Lång (varierar)
Påvisar långa deletioner	Nja (manuellt)	Nja	Ja
Användning	Referenslab	T.ex. helgenom, HLA-typning i rutin, riktade paneler som storskalig genotypning av blodgivare	HLA-typning, referensändamål för t.ex. *ABO*, *RHD*/*RHCE*?