

Next Generation Sequencing: Tid til opgaveglidning?

AF:
CHRISTINA KJÆR



Lektor, ph.d. (bioanalytiker-uddannelsen på Københavns Professionshøjskole)

FILIFE G. VIEIRA



Seniorforsker, ph.d. (Center for Ancient Environmental Genomics, Globe Institute, Københavns Universitet)

Introduktion

Next Generation Sequencing (NGS) er en metode, der kan identificere rækkefølgen af basepar i DNA. NGS anvendes bl.a. til at identificere sygdomsrelaterede variationer i basesammensætning i patienters genomer via sammenligning med en reference. I de seneste år er der sket en betydelig stigning i antallet af NGS-baserede diagnostiske svar. Det Nationale Genom Center har fx et mål om at sekventere 60.000 helgenomer til udviklingen af personlig medicin (1). Per dags dato er godt 29.500 blevet sekventeret siden 2019 (1). Udviklingen reflekterer en generel tendens i sundhedsvæsenet, hvor en betydelig stigning i antallet af NGS-baserede diagnostiske svar ses fra bl.a. genetiske, patologiske, immunologiske og mikrobiologiske afdelinger.

I en klassisk NGS-arbejdsgang er bioanalytikere ansvarlige for alle laboratorierelaterede trin, bioinformatikere for dataanalyse og molekylærbiologer/læger for resultatfortolkning (fig. 1). Vi vil i denne artikel argumentere for, at bioanalytikere fremadrettet bør og kan varetage flere opgaver inden for NGS-dataanalyse og fortolkning. Derudover peger vi på nogle af de tiltag, vi mener er nødvendige, for at bioanalytikere får de nødvendige færdigheder til dataanalyse og fortolkning.

NGS-arbejdsgangen

NGS-arbejdsgangen involverer typisk fem nøgletrin (fig. 2):

1) Prøvehåndtering

DNA/RNA isoleres fra en biologisk prøve såsom celler eller væv. Der er flere metoder, men de grundlæggende trin involverer typisk cellelysning efterfulgt af oprensning ved hjælp af teknikker såsom "beads" eller søjler.

2) Biblioteksdannelse

I dette trin fragmenteres DNA, og adaptere liggeres til enderne af fragmenterne. Adapterne muliggør bl.a., at flere prøver kan blandes (multiplexing) i den samme analysekørsel.

3) Sekventering

De forberedte biblioteker overføres til sekventeringsmaskinens flowcelle, hvor de bliver parallelsekventeret. NGS-platforme bruger forskellige sekventeringsteknologier til at generere milliarder af korte DNA-sekvenser kaldet "reads". Den mest udbredte teknologi er udviklet af Illumina, der bruger fluorokrom-mærkede nukleotider. Hvert nukleotid har sin egen unikke fluorokromfarve, der bliver registreret i billeder.

4) Dataanalyse

En computer analyserer herefter billederne og oversætter lyssignalerne til filer med reads. Når sekventeringen er fuldført, behandles de rå reads gennem en række bioinformatiske analyser for at kortlægge dem til et referencegenom og identificere genetiske variationer ved at sammenligne de sekventerede data med referencegenomet (variantkald).

5) Resultatfortolkning

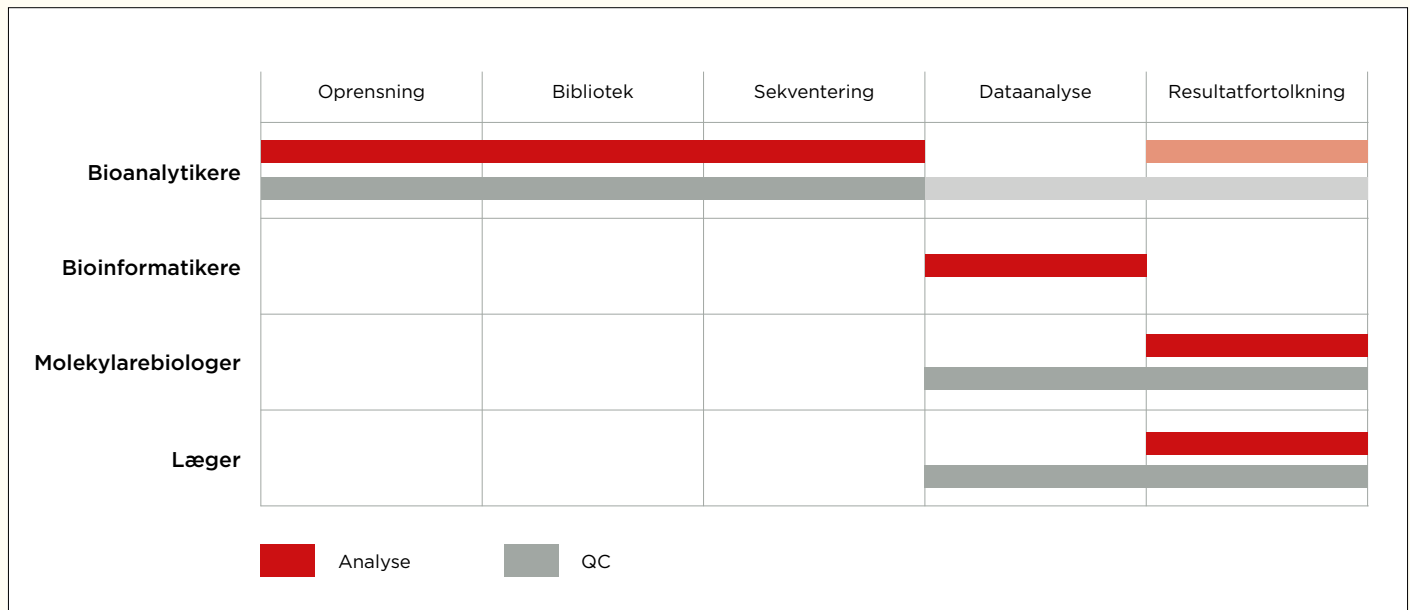
De identificerede genetiske varianter er anoteret (forsynet) med information om deres funktionelle betydning såsom deres placering i gener, potentielle indvirkning på proteinfunktion, og om varianten er associeret med forårsagelse af sygdom.

Kan NGS-arbejdsgangen optimeres?

Når en sekventering er afsluttet, genereres der automatisk kvalitetsrapporter (punkt 4). Ved tvivlsspørgsmål spørger bioinformatikeren/molekylærbiologen/lægen ofte ind til bioanalytikerens arbejdsgang. For mange svar findes nemlig i de første tre trin i NGS-arbejdsgangen. Hvis der for eksempel ikke er genereret nok sekventeringsdata, kan bioanalytikeren hurtigt vurdere, hvilke trin der kan/skal gentages:

Fig. 1

Klassisk NGS-arbejdsgang



- Hvis alle prøver har sparsomme data, kan det skyldes et problem med sekventeringsmaskinen. I disse tilfælde kan bioanalytikeren resekventere prøverne (trin 3), hvis der er mere biblioteksmateriale tilbage.
- Hvis det kun er en enkelt prøve, der har sparsomme data, kan det skyldes forkerte adaptore. Hvis der er DNA tilbage, kan bioanalytikeren lave et nyt bibliotek (trin 2) og resekventere.
- For visse prøvetyper er sparsomme data forventeligt. DNA fra formalinfixeret og paraffinindstøbt væv er fx ofte ødelagt (2, 3, 4).
- Multiplexing (trin 2) kan give problemer, hvis de poolede prøver som udgangspunkt ikke har samme DNA-koncentration (ikke normaliseret pool). Det medfører en skæv fordeling i mængden af data. Prøver med høj DNA-koncentration genererer megen data, og prøver med lav DNA-koncentration genererer få. I disse tilfælde kan bioanalytikeren lave en ny pool, hvor koncentrationen af DNA i de multiplexede prøver er mere ensartet (normaliseret), inden der resekventeres.

I alle disse tilfælde er mængden af prøvemateriale altid en begrænsende faktor, og her er det igen bioanalytikeren, der ved, hvor meget materiale der er tilbage fra hvert trin.

Essentiell viden, som er nødvendig ved både fejlfinding og beslutninger, som fx hvorvidt der skal resekventeres og i så fald fra hvilket trin i NGS-arbejdsgangen, ligger altså meget ofte hos bioanalytikerne. De ved, hvilke præanalytiske faktorer der kan tænkes at have påvirket prøveresultaterne. Fx hvor meget DNA der var

oprenset, og hvor fragmenteret det var. Derfor giver det god mening, at bioanalytikerne som udgangspunkt inkluderes i aflæsning og analyse af data (trin 4 og 5). Dette er et tiltag, som også optimerer arbejdsgangen og sparer tid. Det er dog klart, at der findes mere komplekse situationer, hvor det kræver en bioinformatisk eller molekylærbiologisk baggrund at nå frem til det rette svar.

Flaskehalsproblematikken

Ud over at det giver faglig mening, at bioanalytikere inkluderes i en større del af processen, imødekommer det også udfordringen med stigningen i antallet af NGS-baserede prøvesvar (5, 6). Det danske sundhedsvæsens ønske om udvikling af personlig medicin tager fx udgangspunkt i karakteristik af den enkelte borgers særlige sammensætning af gener, og af Sundhedsministeriets nationale strategi for personlig medicin (7) fremgår det bl.a.:

“Fokus for strategien er, at personlig medicin skal komme patienterne til gode. I løbet af 2021 vil den nationale infrastruktur blive taget i brug, og en række patientgrupper vil blive tilbudt helgenomsekventering som en del af patientbehandlingen. Det skal bidrage til bedre diagnosticering og bedre behandling.”

Kombinationen af, at NGS benyttes til udvikling af personlig medicin, og den generelle stigning i antallet af NGS-baserede diagnostiske svar medfører en flaskehalsproblematik (6, 8). For at dæmme op for problemstillingen vil det være en fordel at lade bioanalytikerne bidrage til en hurtigere og mere optimeret arbejdsgang. Den sidste kliniske fortolkning skal altid

Fig. 1

Figuren illustrerer en klassisk NGS-arbejdsgang, hvor bioanalytikere er ansvarlige for alle laboratorierelaterede trin, bioinformatikere for dataanalyse og molekylærbiologer/læger for resultatfortolkning.



FAGLIG

Fig. 2

Illustration af NGS-arbejdsgangen

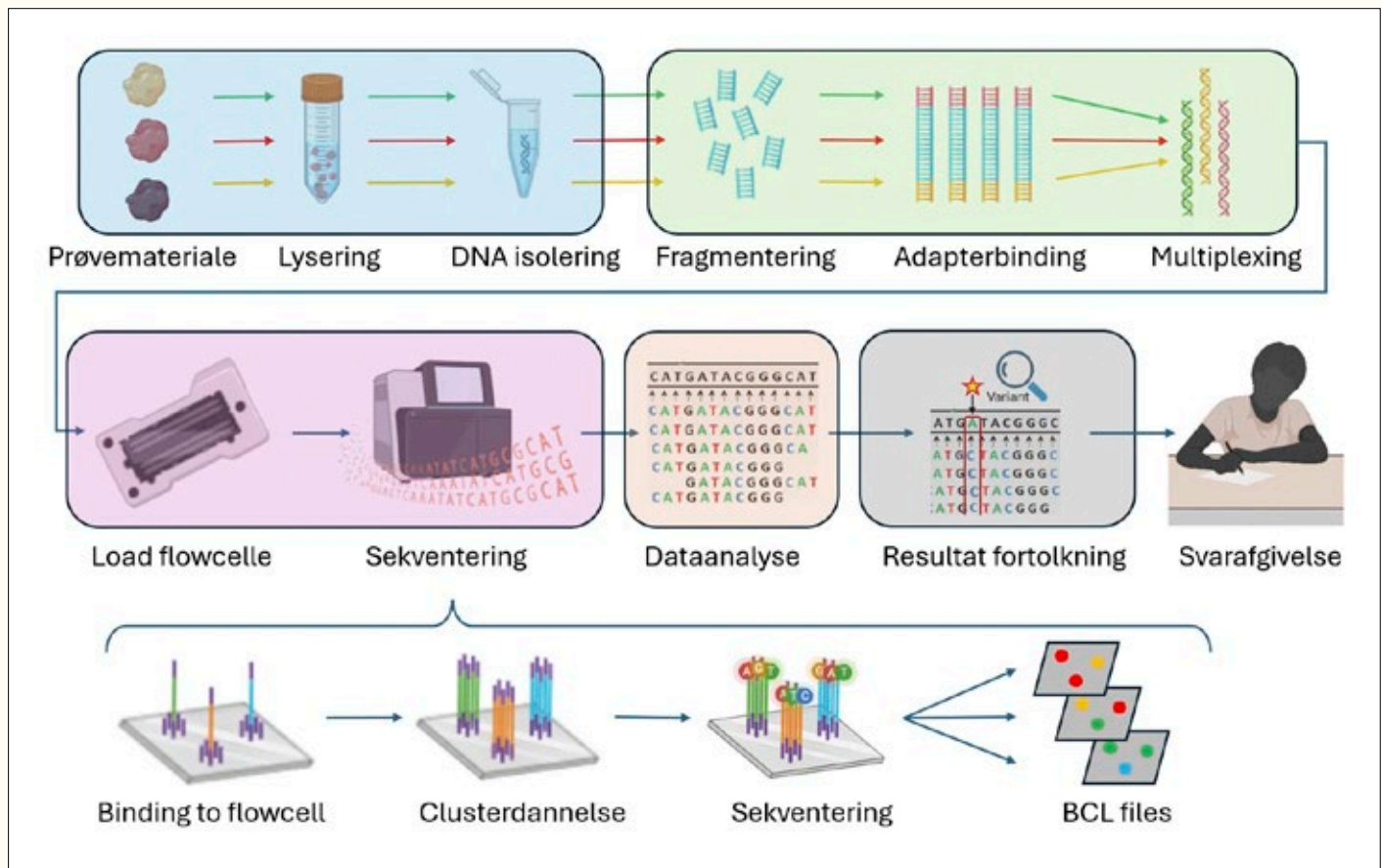


Fig. 2

De farvede bokse repræsenterer de fem overordnede trin: blå boks: prøvehåndtering; grøn boks: biblioteksdannelse; lyserød boks: sekventering, herunder sekventeringens individuelle trin 1) multiplexede DNA-fragmenter binder til flowcellen, 2) clusterdannelse, 3) sekventering med fluorescensmærkede nukleotider, 4) fluorescenssignalerne og deres placering på flowcellen affotograferes og gemmes som en 'binary base call'-fil (BCL) hver gang et nyt nukleotid bygges på DNA fragmenterne; orange boks: dataanalyse; grå boks: resultatfortolkning. For uddybning se i brødteksten.

ligge hos molekylærbiologen/lægen, men også her kunne bioanalytikerne fx stå for de mindre komplekse analysesvar eller udføre foreløbige resultatfortolkninger (screening) (9).

Vores budskab er klart: I et trængt sundhedsvæsen så lad bioanalytikerne løfte den indledende kvalitetssikring og fortolkning af NGS-data, og lad bioinformatikere, molekylærbiologer og læger koncentrere sig om deres kerneopgaver. I vores øjne vil alle vinde på dette. For når ressourcerne i det diagnostiske sundhedsvæsen benyttes relevant, stiger de ansattes arbejdsglæde. Økonomisk er det også mere rentabelt, og i sidste ende er det til gavn for patienterne, der er i aktuell diagnostisk udredning.

Sådan kan bioanalytikere blive værdifulde samarbejdspartnere

Men hvordan når vi så derhen? Hvordan sikrer vi, at kvalitetsvurdering og fortolkning af NGS-data bliver en del af bioanalytikerens professionelle kompetencer, så bioanalytikeren bliver det naturlige valg, når opgaverne skal fordeles mellem faggrupperne?

Opgaveglidning kan lykkes, hvis klinikken på nationalt plan tilbydes og kan finansiere kompetencegivende diplomateruddannelse, og bioanalytikeruddannelserne udvikler sig tilsvarende. Sidstnævnte kræver, at skolernes undervisere har et professionsrettet fokus baseret på tæt samarbejde med praksis, som løbende udvikles og justeres i det faglige indhold i relation til NGS-dataanalyse og fortolkning. Afledt af dette bliver det naturligt at spørge, hvor mange af landets bioanalytikeruddannelser der underviser i stoffet? Og hvad der p.t. findes af relevante kompetencegivende efteruddannelsesforløb?

• Udvikling af bioanalytikeruddannelsen

I 2022 eksisterede en arbejdsgruppe, som på tværs af landets seks bioanalytikeruddannelser arbejdede hen imod at udvikle et fælles valgfag i personlig medicin. Desværre kunne uddannelseslederne ikke skaffe ressourcer til understøttelse af opgaven.

Et tilbud til alle landets studerende på 7. semester er valgfaget "Diagnostic Genomics" (under Bioanalytisk udviklingsarbejde) udbudt

“I et trængt sundhedsvæsen så lad bioanalytikerne løfte den indledende kvalitetssikring og fortolkning af NGS-data, og lad bioinformatikere, molekylærbiologer og læger koncentrere sig om deres kerneopgaver.”

Christina Kjær og Filipe G. Vieira

af bioanalytikeruddannelsen i København (10). Det er et tougersforløb ud af en samlet periode på seks ugers valgfrit forløb. “Diagnostic Genomics” er udviklet for at sikre, at de studerende opnår en god forståelse af, hvad dataanalyseopgaven og kvalitetssikring indebærer, samt datas kobling til praksis ud fra procedurer, som anvendes til NGS. Derudover er sigtet, at de studerende lærer nye fagtermer, som de kan anvende i mødet med andre faggrupper ude i praksis. Det er vores ambition at vække de studerendes interesse for emnet, at udfordre deres syn på rammerne for deres egen profession, og at skærpe deres lyst til at arbejde med NGS og ikke mindst kvalitetssikring og fortolkning af data, når de er færdiguddannede.

• Udbud af efter- og videreuddannelse

Udbuddet af efter- og videreuddannelse på området er sparsomt. På Københavns Professionshøjskole udbydes diplomkurset “Molekylærgenetiske data – håndtering, kvalitetssikring og vurdering” (9). Kurset har til formål at “styrke kompetencer til at indgå i et fagligt og tværfagligt samarbejde om håndtering, kvalitetssikring og vurdering af molekylærgenetiske data med henblik på diagnostik og behandling”. Da kurset kræver delvis fysisk fremmøde, udgør geografien en udfordring for deltagelse. Tilsvarende diplomuddannelser udbudt af landets øvrige uddannelsesinstitutioner er derfor

ønskværdigt. Til efter- og videreuddannelse er økonomi dog en velkendt udfordring. Kurser udvikles og udbydes kun, hvis de efterspørges af klinikken, og de enkelte afdelingers udfordring med at finansiere medarbejderfravær og kursusgebyrer er en begrænsende faktor. Fonde kan søges til formålet, men ansøgninger koster tid og penge for afdelingerne, og bevilning garanteres jo ikke.

• dbio

dbio’s udbudte kursus “Udvidet molekylærbiologi” (11) er delvis relevant, men med kun to dages varighed vil kursisternes forståelse og mulighed for tilegnelse af egentlige kompetencer være begrænset. dbio bør gå forrest med at varetage professionens interesser på området, og her synes udvikling af et målrettet kursus at være et oplagt tiltag. At understøtte eksisterende processer eller initiere og koordinere nye i klinikken og på uddannelsesområdet på tværs af landet kunne være et andet. Begge tiltag kan i vores øjne understøtte dbio’s varetagelse af professionens interesser i den regionale og nationale politiske dialog på området.

Som forlængelse af denne artikel planlægger vi en opfølgende faglig artikel, hvori vi vil gå i dybden med udvalgte eksempler på kvalitetssikring og fortolkning af NGS-data. ■

REFERENCER:

1. Mindst 60.000 danske patienter får tilbudt en genetisk undersøgelse. 24.06.2021. [06.05.2024]. Tilgængelig her: rb.gy/a387gd
2. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 2015; 61:64-71. [PubMed] [Google Scholar]
3. Hoffman EA, Frey BL, Smith LM et al. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem* 2015; 290:26404-11.
4. Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D et al. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: a valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank* 2013; 11:101-6.
5. Danske Bioanalytikere. Bioanalytiker i beta [Internet]. 2019. Tilgængelig her: rb.gy/m964fq
6. Referat fra det Nationale Genom Centers tiende møde i Forsknings- og Infrastrukturudvalget. 26.08.2020. [Internet]. Tilgængelig her: rb.gy/qzav17
7. Sundhedsministeriets nationale strategi for personlig medicin 2021-2022. [Internet]. Tilgængelig her: rb.gy/wcxzri
8. Danske Bioanalytikere. Fremtiden byder på mere skærm og mindre laboratorie til bioanalytikere. 05.07.2019. [Internet]. Tilgængelig her: rb.gy/jd987j
9. Molekylærgenetiske data – håndtering, kvalitetssikring og vurdering. 06.05.2024. Tilgængelig her: rb.gy/p1ael0
10. Bioanalytisk udviklingsarbejde. [06.05.2024]. Tilgængelig her: rb.gy/lcq3ia
11. Udvidet molekylærbiologi. [06.05.2024]. Tilgængelig her: rb.gy/urbalg