Evaluierung des NGS-Turbo Kits für HLA-Typisierungen bei Organtransplantationen

Jeta Alidemi, BMA 21-24

Biomedizinische Analytikerin HF

1. Zusammenfassung

Am Zentrum für Labormedizin (ZLM) werden zwei HLA-Typisierungs-Methoden eingesetzt: eine schnelle Methode für niedrigauflösende Ergebnisse in drei Stunden und eine hochauflösende Methode in drei Tagen. Zur Verbesserung der Ergebnisse und für den Einsatz im Pikettdienst wird die neue NGS-Turbo Methode von Oxford Nanopore Technologies (ONT) getestet. Der Analyseprozess umfasst das MinION-Gerät, NGS-Turbo Amp Kit und NGS-Turbo Prep Kit und dauert vier Stunden. Die Methode liefert hochauflösende Ergebnisse durch die NGS-MinKNOW und NGSengine-Turbo Software. Vergleiche zeigten signifikante Unterschiede zu den bisherigen SSP-PCR- und SBS-Methoden, insbesondere in nicht kodierten HLA-Regionen, teilweise bedingt durch Software-Programmierung. Eine Umfrage unter Pikettdienst-Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen bestätigte die Eignung der NGS-Turbo Methode für den Pikettdienst.

2. Einleitung

Am Zentrum für Labormedizin (ZLM) der Universität Bern werden HLA-Typisierungen mittels SSP-PCR und SBS-Methode durchgeführt. SSP-PCR-Kits von LinkSeq und das QuantStudio6-Gerät bieten schnelle, niedrigauflösende Ergebnisse in drei Stunden und werden für Notfalltypisierungen genutzt. Die NGS-Methode mit dem iSeq-Gerät und AllType FASTplex Kits liefert hochauflösende Typisierungen bis zum vierten Feld, benötigt jedoch etwa drei Tage zur Analyse (D. Schärer, persönliche Kommunikation, 27.11.2023)

Während der Diplomarbeit wurde das MinION-Gerät von Oxford Nanopore Technologies mit der Nanopore-Sequenzierung und dem R10 FlowCell getestet. Die Ergebnisse wurden mit der NGSengine-Software Version 1.1 verglichen (Alidemi, 2024)

Das HLA-System, welches humane Leukozyten-Antigene in Klasse I und II umfasst, ist entscheidend für die Immunerkennung und Transplantationsmedizin. Die Analyse der 11 HLA-Loci (HLA-A, -B, -C, -DQA, -DQB, -DRB1, -DRB345, -DPA, -DPB) ist essenziell für die Vermeidung von Abstossungsreaktionen bei Organtransplantationen [1]

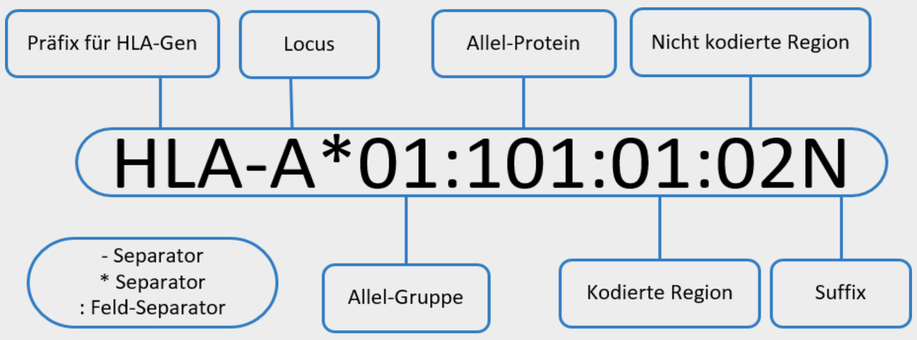


Abb. 1: HLA-Nomenklatur (Alidemi, 2023a)

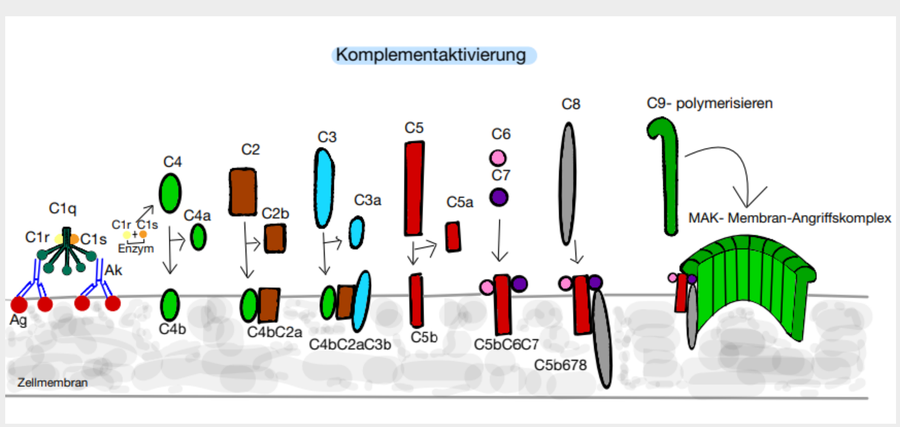


Abb. 2: Die Komplementaktivierung des klassischen Wegs bis zum MAK-Bildung (Alidemi, 2024b)

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel dieser Diplomarbeit war, die generierte Ergebnisse mit der NGS-Turbo Methode mit den derzeit verwendeten Methoden zu vergleichen.

Fragestellung: Liefert das NGS-Turbo Kit in Kombination mit Oxford Nanopore Technologies vergleichbare Resultate zur aktuell verwendeten SSP-PCR-Methode und SBS-Methode?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Die NGS-Turbo Methode verwendet die Nanopore-Technologie von Oxford Nanopore, bei der die DNA-Sequenz durch ein winziges Loch (Nanopore) in einer Membran gelesen wird [2]. Das kompakte MinION-Gerät und die R10 FlowCell ermöglichen die präzise Detektion der DNA-Sequenzen. Die NGSengine Software analysiert die Sequenzierungsdaten, während die MinKNOW-Software die Datenüberwachung übernimmt [2]. Während des Tests wurden 12 Proben mit dem MinION-Gerät analysiert, darunter Proben unterschiedlichen Alters und gefrorene Proben. Die Analyse dauerte insgesamt 4 Stunden. Alle Proben lieferten gute DNA-Elutionen, unabhängig vom Alter. Die Ergebnisse wurden mit der NGSengine Software 1.1 ausgewertet und mit den Ergebnissen der derzeitigen Methoden verglichen.

5. Ergebnisse/ Resultate

Die Ergebnisse wurden in Tabellen und Kreisdiagrammen mit Übereinstimmungen und Abweichungen dargestellt.



Abb. 3 Überstimmung der HLA-Genotyp zwischen den SSP-PCR- und SBS-Methode mit der NGS-Turbo Methode (Alidemi, 2024c)

6. Diskussion / Schlussfolgerung

Die Fragestellung wurde erfolgreich beantwortet, wobei mehrere Ursachen für Diskrepanzen beim Vergleich der NGS-Turbo-Methode mit der SSP-PCR- und SBS-Methode identifiziert wurden. Das AllType FASTplex Kit konnte nur bestimmte Allele identifizieren, während die NGS-Turbo-Methode längere Basenpaare las, was zu mehr Diskrepanzen im vierten Feld führte. Stromschwankungen und fehlerhafte Nukleotidzuordnungen trugen ebenfalls zu SNP-Unterschieden bei. Der Vergleich zeigt, dass das NGS-Turbo Kit in Kombination mit der Nanopore-Technologie gute, vergleichbare Ergebnisse liefert, obwohl Verbesserungen in den nicht-kodierenden Regionen erforderlich sind. Die Optimierung der Software und Berücksichtigung wiederholender Basen könnten Diskrepanzen reduzieren und die Typisierung präzisieren.

Aktuell wird die NGS-Turbo Methode im Pikettdienst nicht verwendet, da die Software teuer und komplex ist. Technisch bietet die Methode jedoch vielversprechende hochauflösende Ergebnisse. Die Firma Omixon testet präzisere Kits, die jedoch zu lange dauern. Mit weiteren Verbesserungen in Software und Hardware könnte die NGS-Turbo Methode künftig eine bedeutendere Rolle in der HLA-Typisierung spielen und die Patientenversorgung verbessern.

Referenzen

[1] Lothar, T. (2012). Labor und Diagnose, Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 8. Auflage, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH.
[2] Oxford Nanopore Technologies. (o. J.). Oxford Nanopore Technologies. Abgerufen 8. Januar 2024, von https://nanoporetech.com

Abbildungen

Abb. 1 Alidemi, J. (2023a) HLA-Nomenklatur. Medi.
Abb. 2 Alidemi, J (2024b) Die Komplementaktivierung des klassischen Wegs bis zum MAK-Bildung. Medi.
Abb. 3 Alidemi, J (2024c) Kreisdiagramme von der Kategorisierung der HLA-Genotypen und die Diskrepanzen der vier Felder. Medi