

Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: O objetivo do trabalho foi comparar a performance de 2 painéis de preparo de biblioteca de sequenciamento de nova geração (NGS), um que utiliza barcodes moleculares (MBC) e o outro sem, no diagnóstico de neoplasias hematológicas, dentre as quais: leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásica, neoplasia mieloproliferativa, leucemia mielomonocítica crônica e leucemia mielomonocítica juvenil. Trata-se de 2 painéis comercialmente disponíveis, cujo desenho é baseado em genes e regiões com relevância clínica, que apresentam, e /ou estão frequentemente mutados em malignidades hematológicas, de acordo com a literatura científica, com foco em leucemia e desordens mieloproliferativas.

Material e métodos: Foram selecionadas 21 amostras com resultado prévio de um painel mieloide (A), para a validação de um novo painel com MBC (B). As 21 amostras foram destinadas a acurácia do teste e 5 delas também foram utilizadas para a reprodutibilidade sendo, 3 amostras em triplicata interensaio e 2 amostras em duplicata intraensaio. Para o preparo das bibliotecas foram utilizados 2 kits comerciais: kit A que contempla 54 genes e não possui barcodes moleculares e outro kit B de 75 genes que utiliza barcodes moleculares. Para o kit A também foi realizado em paralelo à amplificação dos genes TP53 e CEBPA, para complementação do teste. O sequenciamento das bibliotecas foi realizado na plataforma Nextseq 550 da Illumina. A análise dos dados e das variantes foram realizados em uma plataforma online do fabricante.

Resultados: As métricas gerais do sequenciamento de ambas as metodologias foram satisfatórias. Na acurácia 21/21 (100%) das amostras apresentaram resultados concordantes com os resultados prévios do kit A, onde 75/75 (100%) das variantes reportadas foram identificadas. Além das 75 variantes, outras 85 foram identificadas como verdadeiras pelo kit B e dessas 74/85 (87%) não foram reportadas na análise do kit A, sendo 38 sem cobertura, 30 strand bias, 5 de regiões sujas e 1 de baixa cobertura. As outras 11/85 (13%) variantes verdadeiras estavam presentes nas análises de ambos os kits, só não foram reportadas pois, eram variantes classificadas como benignas ou de significado incerto (VUS). **Discussão:** Os resultados indicam que o MBC é de extrema relevância em análise somática, aumentando a confiabilidade na identificação de variantes verdadeiras, além da melhor performance na uniformidade de cobertura dos genes, inclusive os genes ricos em CG como o caso do CEBPA, dispensando a adição de outros testes confirmatórios para esse gene. **Conclusão:** O kit com barcodes moleculares apresentou uma melhor performance e parece ser o mais indicado no diagnóstico de neoplasias hematológicas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.931>

OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO DO GENE TP53 PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

PM Oliveira, MS Basqueira, LB Lima, GS Oliveira, SEA Rosa, RS Reis, CN Silveira, NH Muto, MC Cervato, PV Campregher

Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: O objetivo do trabalho foi otimizar o procedimento técnico do exame sequenciamento somático do gene TP53 para menor tempo de processamento. A presença de mutações patogênicas em TP53 é um indicador de mau prognóstico em neoplasias hematológicas em geral. Além disso atualmente, existem tratamentos específicos, em casos de leucemia linfóide crônica, que estão indicados especificamente para pacientes portadores de mutações patogênicas em TP53.

Materiais e métodos: Para a otimização do tempo de processamento técnico do preparo de biblioteca para sequenciamento de nova geração (NGS) do gene TP53, foram realizadas algumas alterações na metodologia em rotina: A) substituição de reagentes de amplificação por um mix de amplificação pronto; B) diminuição do número de reações de amplificação de 07 para 03 reações cobrindo todas as porções codificantes e junções éxon-ínton do gene; C) substituição da visualização de bandas dos produtos de amplificação pela quantificação dos produtos por fluorimetria. O preparo de biblioteca foi realizado com o Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) de acordo com instruções do fabricante, e o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina, 300 ciclos paired-end. A análise bioinformática foi realizada com pipeline interno, desenvolvido e disponível na plataforma Varsomics. Para a validação das melhorias foram selecionadas 26 amostras com resultado prévio de sequenciamento do gene TP53 por NGS. Das 26 amostras: 20 foram destinadas a acurácia do teste e para a reprodutibilidade, 3 amostras em triplicata interensaio e 3 amostras em triplicata intraensaio. Para o teste de sensibilidade foram selecionadas 03 amostras, as quais foram misturadas em um pool diluindo a frequência alélica das variantes para um range de 2 a 15% e o pool foi testado 20 vezes para determinação do limite de detecção do teste.

Resultados: As alterações aplicadas na metodologia levaram a diminuição do tempo de processamento técnico: a) substituição do mix amplificação de 15 para 5 minutos; B) redução no número de reações de 30 pra 10 minutos; C) substituição do gel de agarose pela quantificação dos produtos por fluorimetria de 120 minutos por 10 minutos. Na acurácia 20/20 (100%) das amostras apresentaram resultados concordantes com os resultados prévios, sendo identificadas nessas amostras 100% das variantes esperadas. Os testes de reprodutibilidade intra e interensaio apresentaram 100% de correlação das variantes encontradas no gene TP53, reproduzidas em triplicata 3 intra e 3 interensaio. A sensibilidade ficou mantida em 5% de frequência alélica, considerando as 20 replicatas do pool. **Discussão:** Os dados da validação foram analisados para estudo de: acurácia, reprodutibilidade intraensaio, reprodutibilidade interensaio e sensibilidade para o teste de Sequenciamento do gene TP53. As alterações realizadas no método apresentaram mesma performance de qualidade em comparação com método anterior, com menor tempo de execução do teste. **Conclusão:** As otimizações aplicadas na técnica foram efetivas permitindo maior agilidade no processamento técnico da amostra para a identificação de variantes somáticas do gene TP53.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.932>