

Padronização da Detecção de InsAlu por NGS: Critérios de Qualidade e Confirmação Ortogonal

HENRIQUE DE CAMPOS REIS GALVÃO; EDUARDO DA CÁS; EDENIR INÊZ PALMERO; MIREILLE CAROLINE SILVA DE MIRANDA GOMES; GISLAINE DOS SANTOS PEREIRA; ANA CAROLINA VAQUEIRO FIGUEIREDO; RAFAELA REGINA CARDOSO; DANIELA DE OLIVEIRA FRANCISCO; BEATRIZ CETALLE SCHIAVO; THALIANE BURANELLO; THEREZA TAYLANNE SOUZA LOUREIRO CAVALCANTI; FELIPE ARISTIDES SIMÃO NETO; GUILHERME LOPES YAMAMOTO; CRISTOVAM SCAPULATEMPO-NETO.

DASA Genômica

INTRODUÇÃO

A detecção de inserções Alu (InsAlu) em genes de relevância clínica é um desafio técnico em laboratórios de diagnóstico molecular, devido à natureza repetitiva dessas variantes e à necessidade de confirmação robusta, sendo especialmente relevante para a população portuguesa devido a uma InsAlu recorrente na população¹. A integração de métodos de NGS com validação por MLPA ou Sanger é fundamental para garantir a acurácia diagnóstica, sendo os critérios de qualidade essenciais para padronização e confiabilidade dos resultados.

OBJETIVO

Descrever a experiência de um laboratório de referência na detecção e confirmação de InsAlu no gene *BRCA2* por NGS, com validação por MLPA ou Sanger, e apresentar um fluxograma de critérios de qualidade para CNVs, com ênfase em fração alélica, número de split reads e variação de cobertura.

METODOLOGIA

Foi realizada análise retrospectiva de 24 casos de InsAlu detectados por NGS, no período de dois anos, em painéis clínicos, todos submetidos à confirmação ortogonal por MLPA ou Sanger. O fluxo analítico incluiu detecção inicial por NGS, aplicação de critérios de qualidade para detecção e confirmação obrigatória para todos os casos, conforme parâmetros definidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 24 casos de InsAlu detectados por NGS foram confirmados por MLPA ou Sanger, demonstrando 100% de concordância entre as metodologias. A maioria dos eventos (87,5%) foi confirmada por MLPA, e todos apresentaram ≥ 10 split reads. A VAF média no NGS foi de 26,6%, com variação de 20,9% a 34,3% (SD 3,6%). Houve forte correlação positiva entre VAF e variação percentual de cobertura na região da inserção (Spearman's $\rho = 0,872$; $p < 0,001$), sugerindo que o impacto da inserção no mapeamento local é proporcional à sua representatividade alélica (**Fig. 1**). A variação de cobertura pode ser interpretada como medida indireta do número de *soft-clipped reads*, uma vez que inserções Alu frequentemente geram desalinhamentos parciais dos reads na região-alvo. Por outro lado, não se observou correlação significativa entre a cobertura da região (antes ou depois da inserção) e a VAF ou variação de cobertura, indicando que a profundidade de cobertura, dentro da faixa observada (555x a 1965x), não impactou a detecção das inserções. No entanto, não é possível garantir a detecção em regiões com cobertura significativamente mais baixa, como em exoma ou genoma.

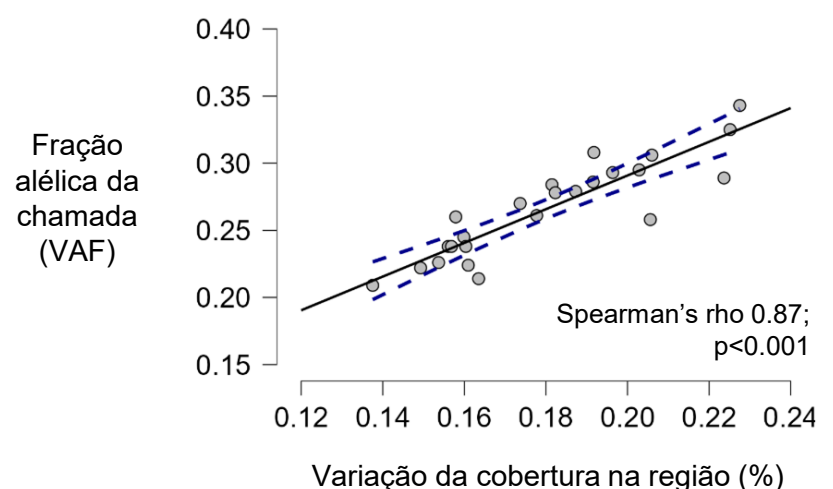


Fig. 1: Scatter plot com correlação de Spearman entre VAF e variação de cobertura

Em 8,3% dos casos (2/24), além da InsAlu no gene *BRCA2*, foram identificadas variantes patogênicas adicionais: uma no gene *PALB2* e outra no *CHEK2*. A ausência de detecção da InsAlu poderia ter levado ao subdimensionamento do risco oncológico familiar

O fluxograma adotado (**Fig. 2**) definiu que eventos com VAF $\geq 30\%$ ou ≥ 10 split reads não necessitam de confirmação adicional. Já casos com VAF entre 5% e 30% ou com 1 a 10 split reads são submetidos à confirmação obrigatória por MLPA. A aplicação sistemática desses critérios reduziu falsos positivos, priorizou variantes clinicamente relevantes e otimizou o uso dos recursos laboratoriais.

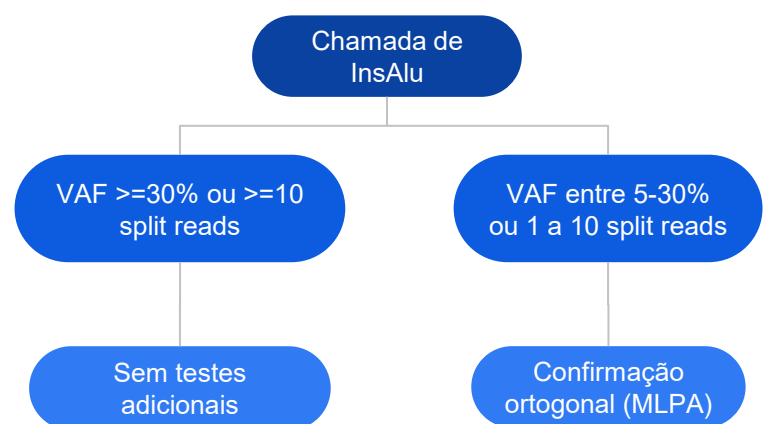


Fig. 2: Fluxograma para confirmação ortogonal

CONCLUSÃO

A estratégia integrada de detecção de InsAlu por NGS, seguida de confirmação por MLPA ou Sanger quando indicada, mostrou-se altamente eficaz e reprodutível, com 100% de concordância nos casos analisados. A aplicação sistemática de critérios de qualidade baseados em fração alélica e número de split reads é fundamental para garantir a robustez do diagnóstico molecular, servindo como referência para laboratórios que buscam excelência na análise de variantes de difícil detecção.