

Fonseca, AA; Almeida, TF; Puga, RD.

DLE - Medicina Laboratorial

Introdução

Atualmente há um grande debate sobre as diretrizes de qualidade em relação aos testes que envolvem o sequenciamento de nova geração (Matthijs et al. 2016; Mattocks et al. 2010; Endrullat et al. 2016), e diversos laboratórios têm utilizado parâmetros internos de qualidade em relação à profundidade das bases de um sequenciamento (Lapin et al. 2016).

Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo estabelecer qual a porcentagem de cobertura e profundidade mínima para alcançar sensibilidades superiores a 98% em um painel de 10 genes, por sequenciamento de nova geração.

Material e Métodos

Foram analisados 40 indivíduos com 1 variante patogênica em um painel de 10 genes de distrofia muscular de cinturas e que obtiveram ao menos 98% da totalidade das bases do painel com profundidade de 20 vezes. Para todos os indivíduos foi feita uma amostragem da região exata das variantes patogênicas com sorteio de 0,1% a 100% dos fragmentos originais, com intervalos de 10%. A porcentagem de bases foi recalculada levando-se em consideração uma profundidade de 10x e 20x. Para cada porcentagem dos arquivos originais e a cada profundidade estabelecida foram feitas 1000 amostras aleatórias dos fragmentos para se obter a proporção de falsos negativos em cada situação.

Resultados e Conclusão

Os gráficos de distribuição de sensibilidade mostram uma tendência a uma menor probabilidade de um falso negativo a medida que aumenta a quantidade de fragmentos do painel como um todo, sendo bastante semelhante para o corte de 10 fragmentos quanto de 20. Entretanto, esta informação não avalia a probabilidade de um falso negativo em cada cenário. O gráfico de distribuição de falsos negativos por frequência mostra a porcentagem de fragmentos necessária para atingir uma probabilidade inferior a 1:1000 (0,1%) de ao acaso haver um falso negativo. É possível observar que para o corte de 10 fragmentos 13 variantes (32,5%) tiveram uma chance superior a 0,1% de serem falso negativo. O corte de 20x obteve probabilidade de 7,5% de um falso negativo superior a 0,1% com porcentagem de bases alvo cobertas entre 98-99%. Com este trabalho é possível concluir que uma porcentagem de profundidade de 98% a 20 traz uma chance de 7,5% de mais de 0,1% de falso negativo.

Referências

Matthijs G, Dierking A, Schmidtke J (2016) New EuroGentest/ESHG guidelines and a new clinical utility genecard format for NGS-based testing. *Eur J Hum Genet.* Jan;24(1).
Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, et al. (2010) A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet.* Dec;18(12).
Endrullat c, Glöckler J, Franke P, Frohme M (2016) Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Appl Transl Genom.* Jul 1;10
Lapin V, Mighion LC, da Silva CP, Cuperus Y et al. (2016) Regulating whole exome sequencing as a diagnostic test. *Hum Genet.* Jun;135(6):655-73.

Gráfico de distribuição de sensibilidade para 10x

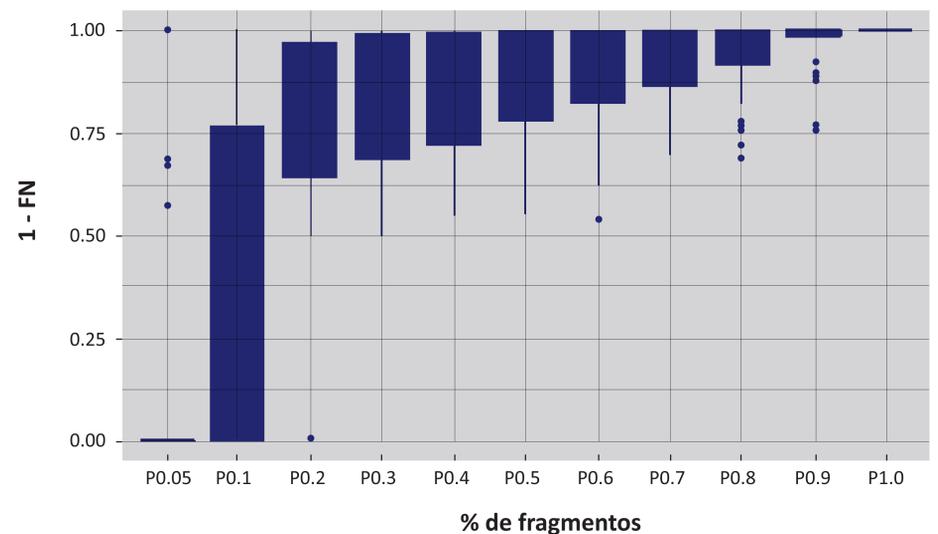
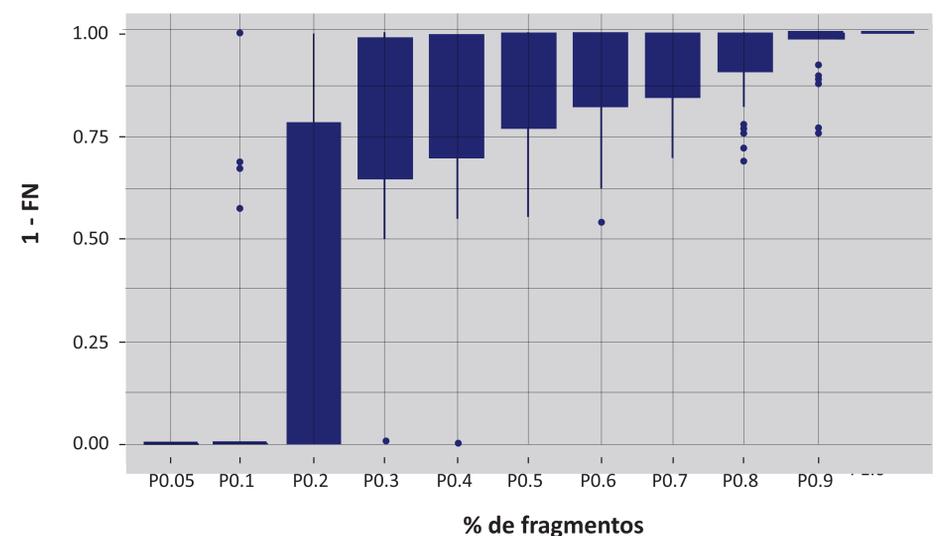


Gráfico de distribuição de sensibilidade para 20x



Distribuição de Falsos Negativos por frequência

