

AVALIAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO: NXTYPE® e ALLTYPE® ONE LAMBDA PARA TIPIFICAÇÃO HLA

Matilde Romero, Vinícius Navega Stelet, Christina Nogueira, Eliana Abdelhay
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

INTRODUÇÃO

O sequenciamento de nova geração (NGS) tem sido um importante instrumento para determinar o elevado polimorfismo dos genes do Sistema HLA. A tecnologia empregada pela plataforma IonS5 (Thermo), que utiliza microchips com sensores que detectam alterações de pH para identificar incorporação de bases pela DNA polimerase, tornou essa metodologia mais simples e acessível aos laboratórios.

OBJETIVOS

Avaliar a acurácia e a confiabilidade dos resultados de tipificação HLA através dos protocolos NxType® e AllType® empregados na plataforma IonS5, bem como sua capacidade de resolver ambiguidades.

MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionadas 128 amostras de DNA e testadas em dois protocolos comerciais para tipificação HLA, sendo: 32 amostras testadas para nove genes no kit NxType® e 96 amostras testadas para 11 genes no kit AllType®, utilizando a plataforma IonS5 conforme orientações do fabricante. Foram analisadas as leituras geradas no software Type Stream Visual (v.1.1, OneLambda) e avaliadas a acurácia dos resultados obtidos comparando-os com as tipificações anteriormente determinadas pela metodologia de Sanger (SeCore, Thermo) para os genes HLA-A, B, C, DRB1 e DQB1. As medidas de qualidade uniformidade e balanço alélico foram utilizadas para determinar a confiabilidade das tipificações sendo não-conformes os resultados com uniformidade maior que 1 e/ou balanço alélico menor que 0,3.

RESULTADO

Um total de 1.075 alelos foi identificado nas 128 amostras. As tipificações por NGS foram concordantes em 100% dos resultados obtidos pelo método Sanger, resolvendo diversas ambiguidades mais comuns desta metodologia, porém algumas ambiguidades persistiram. Conforme a Tabela 1, foram identificadas três ambiguidades em HLA-DRB1 relacionadas a variações no Exon 1. Além disso, ambiguidades de fase foram identificadas nos dois protocolos NxType® e AllType®, sendo 4 em Classe I (HLA-A e -B) e 5 em HLA-DPB1.

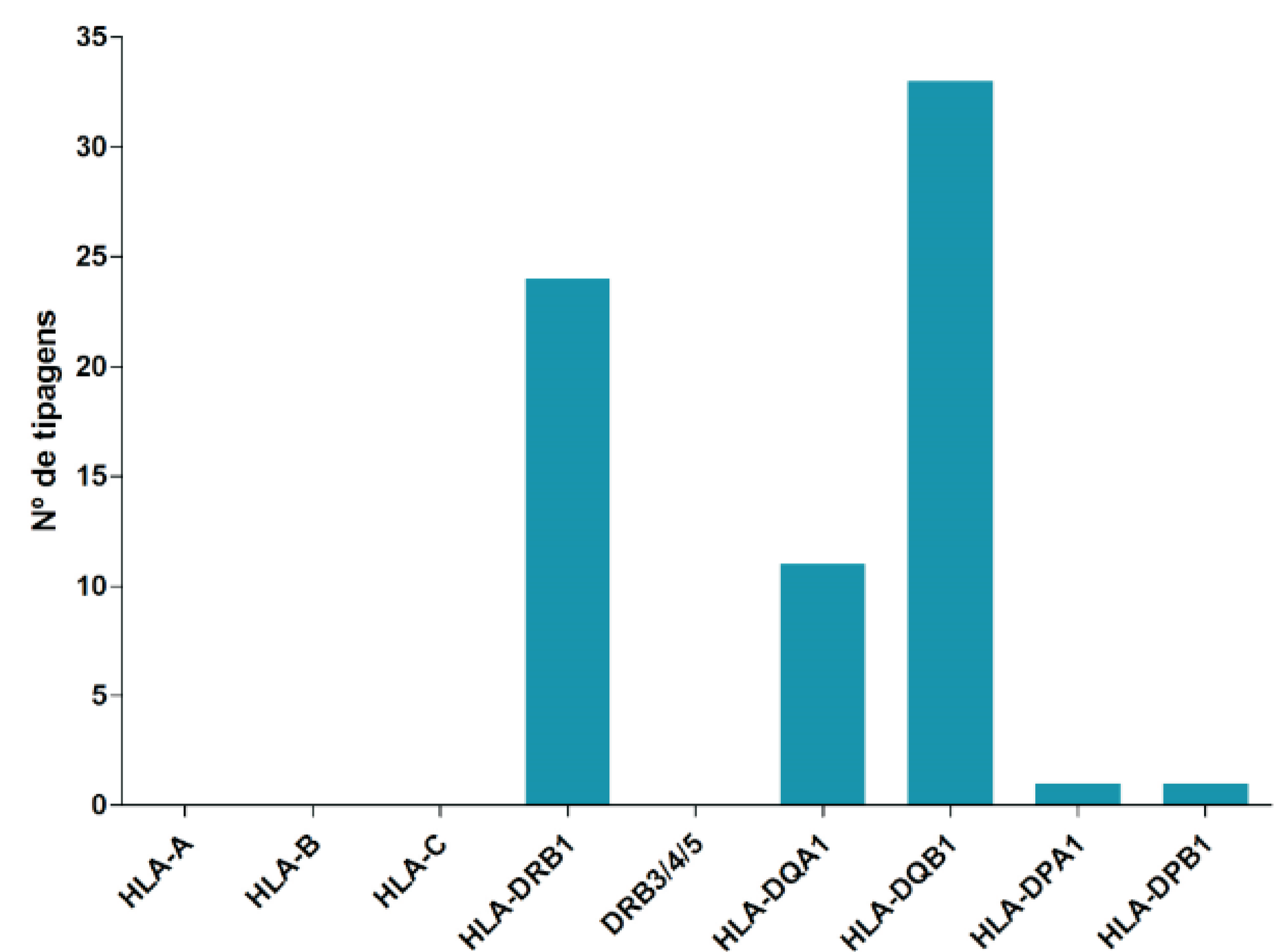
Quanto aos parâmetros de qualidade, 6,5% das tipificações (70/1075) apresentaram desbalanço alélico, sendo 47% (33/70) dos casos encontrados em HLA-DQB1, 34% (24/70) em HLA-DRB1, 16% (11/70) em HLA-DQA1 e 3% (2/70) para HLA-DPA1 e DPB1, Gráfico 1. Nenhuma tipagem apresentou uniformidade fora dos parâmetros de normalidade.

Tabela 1. Distribuição das ambiguidades encontradas para os protocolos NxType e Alltype

Motivo	Locus	Tipagem	Protocolo
Ambiguidade de Fase	A	68:01/68:02 ou 68:27/68:39	AllType
		35:08/58:01 ou 35:01/58:22	AllType
Ambiguidade de Fase	B	35:01/58:34 ou 35:03/58:01 ¹	NxType
		51:01/52:19 ou 51:08/52:01	NxType
		09:01/13:02 ou 09:31 / 13:02	AllType
Não cobertura do éxon 1	DRB1	12:01/16:02 ou 12:10/16:02	AllType
		11:01/15:02 ou 11:01/15:140	AllType
		02:01/14:01 ou 461:01/651:01 352:01/651:01	AllType
Ambiguidade de Fase	DPB1	03:01/650:01 ou 10:01/104:01	AllType
		04:01/04:02 ou 105:01/126:01	AllType
		04:01/13:01 ou 04:01/107:01	AllType
		02:01/04:02 ou 105:01/416:01	AllType

¹A combinação de alelos B*35:03/B*58:01 foi resolvida no kit AllType®

Gráfico 1: Distribuição da frequência de tipagens com desbalanço alélico



CONCLUSÃO

As tipificações obtidas apresentaram alto nível de acurácia e confiabilidade, com algumas ressalvas para os genes HLA de classe II que apresentaram alguns casos de desbalanço alélico. Porém, a ausência de cobertura de alguns éxons e a restrição no tamanho do fragmento sequenciado pela plataforma IonS5 ainda levam a ocorrência de ambiguidades de tipagem. A inclusão de iniciadores para a região do exon 1 de Classe II e o aumento no tamanho da leitura podem permitir a solução das ambiguidades persistentes.