

Desenvolvimento do Smart qPCR NIPT

Deteção da trissomia 21 por PCR quantitativo em tempo-real

Objetivos

Os métodos de análise atualmente utilizados nos testes pré-natais não invasivos (NIPT) baseiam-se, fundamentalmente, na sequenciação de nova geração (NGS). Esta metodologia tem custos elevados dificultando a sua integração na prática clínica e, consequentemente, o acesso de médicos e pacientes a estes testes. O presente documento descreve os resultados obtidos num estudo cego de validação, no que respeita à precisão de uma nova metodologia baseada em PCR quantitativo em tempo real. Com o Smart qPCR pretendemos disponibilizar um método inovador que seja mais acessível e mais rápido.

Métodos

A nova metodologia deteta diferenças no padrão de metilação entre o ADN materno e o ADN fetal. Estas diferenças ocorrem em regiões específicas de determinados genes, nas quais o ADN materno está hipometilado e o ADN fetal está hipermetilado. Assim, estas regiões são utilizadas como biomarcadores de ADN para a determinação da Trissomia 21 no feto (Fig. 1 e 2). Após os estudos iniciais de validação com 1500 amostras foi realizado um estudo de validação cego, com uma entidade independente, para determinar a *performance* clínica desta nova metodologia utilizando, para tal, amostras de sangue periférico de mulheres grávidas (gestações singulares, exclusivamente). Após o isolamento do ADN livre utilizando a plataforma de extração automatizada QIASymphony, efetuou-se a digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação, seguida de um PCR multiplex quantitativo. Os dados do PCR foram avaliados com o software PrenaTest DAP.plus (com certificação CE).

Os resultados obtidos por qPCR foram comparados com os obtidos pelo Prenatest baseado em NGS.

Resultados

Os resultados das 966 amostras testadas demonstram uma proporção de concordância positiva (sensibilidade) de 100% (limite inferior IC 95%= 91,8%; n = 35/35) e proporção de concordância negativa (especificidade) de 100% (n=931/931). O valor preditivo negativo do qPCR e da Sequenciação de Nova Geração foi de 100% (limite inferior IC 95% = 99,68). A fração fetal média foi de 8,1%. A metodologia de qPCR apresentou resultados fiáveis em 54 amostras com percentagem de ADN

fetal menor que 4%, sendo a concentração mínima exigida igual a 2,4%.

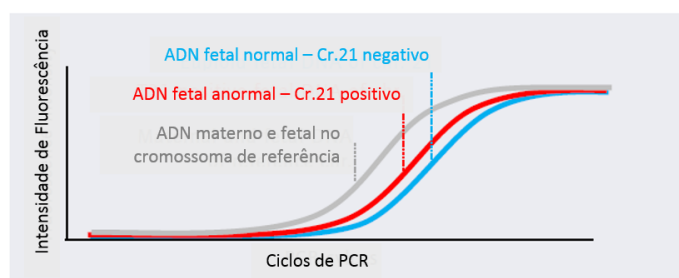


Fig.1: Metilação específica na região de referência e na região alvo (Cr.21)

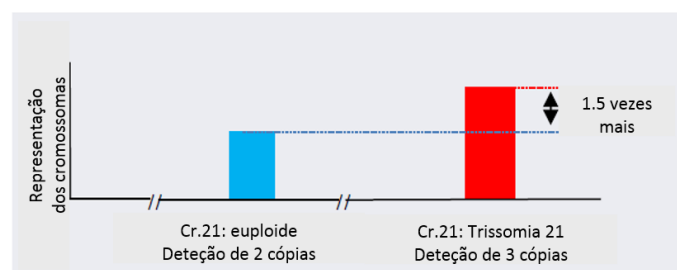


Fig.2: Quantificação relativa

Conclusão

Os resultados obtidos sugerem que o PCR quantitativo é um método robusto e fiável que pode ser utilizado na prática clínica, seguindo as recomendações das sociedades médicas internacionais. A nova metodologia tem um custo significativamente menor permitindo, ainda, a diminuição do tempo de resposta. Ao contrário dos NIPT atualmente disponíveis que exigem, pelo menos, 4% de ADN fetal na amostra, o qPCR pode ser realizado em amostras em que a percentagem de ADN fetal é menor (no mínimo, 2,4%). Em resumo, o Smart qPCR tem potencial para se tornar a metodologia de referência a nível global sendo recomendado a todas as grávidas, independentemente da sua idade e risco. Encontram-se já a ser realizados estudos que visam incluir a determinação das trissomias 18 e 13 por esta mesma metodologia.

Referências

- [1] Dados internos do laboratório LifeCodexx AG (recolhidos entre agosto de 2012 e setembro de 2016)
- [2] ACOG 2015; ESHG/ASHG 2015; ACMG 2016; ISPD 2015; Austrian-German-Swiss Recommendations for NIPT 2016; disponível em: www.lifecodexx.com/en/for_physicians/download_center