

Validación y resultados preliminares del kit de AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Minifiler TM en el Laboratorio de Genética Forense de la DIJIN, Policía Nacional de Colombia*

Validation and preliminary results of kit AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Minifiler TM in the Laboratory of Forensic Genetics of DIJIN, National Police Colombia

Resumen

El laboratorio de la Dirección de Investigación Criminal e Interpol (DIJIN) de la Policía Nacional implementó la utilización del kit AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Minifiler TM PCR Amplification de AppliedBiosystems con el fin de ayudar en la resolución de casos donde se sospechara una gran fragmentación del ADN. Metodología: Se evaluaron las alturas de los picos de los controles utilizando dos termocicladores diferentes, dos analizadores genéticos ABI Prism310 $\text{\textcircled{R}}$ y empleando dos volúmenes finales de reacción de PCR. Se evaluó la sensibilidad utilizando muestras de concentraciones entre 0,1 ng/ μ L hasta 0,006 ng/ μ L y los datos fueron analizados con el software Genemapper ID v3.2. Se valoró la precisión y la reproducibilidad comparando 10 muestras donde se incluía sangre a diferentes concentraciones, saliva, prendas, evidencias traza, pelo, hueso y diente. Una vez realizada la validación se hicieron pruebas con muestras de 5 casos que habían presentado concentraciones bajas de ADN y amplificaciones parciales utilizando el kit AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifiler $\text{\textcircled{R}}$. Resultados y discusión: Se pudo verificar que la concentración ideal para el uso del kit AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Minifiler TM está en un rango entre 0,05 y 0,075 ng/ μ L de ADN. Se encontró que es posible obtener resultados en muestras con concentraciones de 0,02 ng/ μ L; cuando la concentración es inferior, los resultados no son reproducibles. En 4 muestras previamente genotipificadas con el kit AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifiler $\text{\textcircled{R}}$, se amplió el número de marcadores obtenidos en más del 48% con la utilización del kit AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Minifiler TM y se pudo llegar a la probabilidad exigida por la ley colombiana.

Palabras clave: ADN degradado. Mini STRs. Validación. Genética forense.

Abstract

The laboratory of the Bureau of Criminal Investigation and Interpol (DIJIN) of the National Police implemented the use of the kit AMPF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Minifiler TM PCR Amplification of AppliedBiosystems to assist in the resolution of cases where suspected large DNA fragmentation. Methods: We evaluated the peak heights of the controls using two different thermal cyclers, two ABI Prism 310 genetic analyzers $\text{\textcircled{R}}$ and using two final volumes of PCR reaction. Sensitivity was assessed using samples ranging from 0.1 ng/mL to 0.006 ng/mL and the data were analyzed using GeneMapper ID v3.2 software. We evaluated the accuracy and reproducibility compared 10 samples which included different concentrations of blood, saliva, brands, trace evidence, hair, bone and tooth. The validation tests were conducted on samples of 5 patients who had presented low concentrations of DNA and partial amplification using AMPF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ kit Identifiler $\text{\textcircled{R}}$. Results and discussion: It was noticed that the ideal concentration for the use of AMPF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ kit Minifiler TM is in a range between 0.05 and 0.075 ng/ μ L of DNA. It was found that results can be obtained in samples with concentrations of 0.02 ng/ μ L, where the concentration is lower, the results are not reproducible. In 4 samples previously genotyped with the kit AMPF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifiler $\text{\textcircled{R}}$, expanded the number of markers obtained in more than 48% using the kit AMPF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Minifiler TM and are able to reach the probability required by Colombian law.

Key words: Degraded DNA. Mini STRs. Validation. Forensic genetics.

ML. Acevedo
OL. Borda
BY. Bocanegra

Bacterióloga.
Laboratorio de
Genética Forense.
Dirección de
Investigación Criminal
e Interpol (DIJIN).
Policía Nacional de
Colombia.

Correspondencia:
Liliana Acevedo.
E-mail:
dijin.acrim-genetica@
policia.gov.co

*Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación Criminal e Interpol (DIJIN), Policía Nacional. No se encuentra ningún conflicto de intereses entre sus autores.

Fecha de recepción:
20.DIC.2010
Fecha de aceptación:
19.MAR.2011

Introducción

Las muestras que se remiten a los laboratorios de genética forense con el fin de realizar análisis tienden a ser de mala calidad por la baja concentración de ADN y/o la fragmentación del mismo, debido a las condiciones ambientales adversas a que son sometidas¹. La implementación de técnicas más sensibles que logren encontrar perfiles genéticos en muestras degradadas es mandatorio en los laboratorios modernos. Los mini Short Tandem Repeats (Mini STRs) utilizan primers que están más cerca al núcleo de la repetición, generando amplicones de menor tamaño². Esto hace que la probabilidad de amplificar un fragmento en el ADN degradado aumente de manera importante.

Con el objetivo de implementar esta nueva tecnología en el laboratorio de Genética Forense de la Dirección de Investigación Criminal e INTERPOL (DIJIN) de la Policía Nacional de Colombia se procedió a validar los parámetros críticos del kit AmpFℓSTR® Minifiler™ comparándolo con muestras procesadas previamente con el kit AmpFℓSTR® Identifiler®³.

Material y métodos

Análisis preliminar

Se realizó una evaluación preliminar que incluyó los siguientes parámetros:

- *Volumen de amplificación*: se procesaron las muestras de control positivo incluido en el kit y T10E0.1 como control negativo, siguiendo las cantidades y el protocolo designados en el manual del kit, utilizando como volumen final 25 μ l y modificando el volumen final a 12,5 μ l.
- *Termociclador*: los parámetros de amplificación fueron una incubación inicial a 95°C durante 11 minutos, 30 ciclos utilizando el termociclador 9700 Applied Biosystems y 31 ciclos con el termociclador 2720 Applied Biosystems, que incluyen denaturación a 94°C por 20 segundos, anillamiento a 59°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto, luego una extensión final durante 45 minutos a 60° C. El número de ciclos utilizado en el termociclador 2720 se aumentó en un ciclo a diferencia de lo sugerido en el kit.

- *Analizador genético*: se procesaron todas las muestras anteriores realizando corrido electroforético en dos analizadores genéticos ABI Prism310.

Se amplificaron las muestras de control positivo 007 incluido en el kit y T10E0.1 como control negativo, con volumen final 25 μ l y 12,5 μ l.

Lo anterior con el fin de comparar: 1. Perfiles obtenidos vs. perfiles esperados para todas las muestras analizadas; 2. Valor de altura en unidades de fluorescencia relativa (RFUs) para todos los alelos obtenidos en las muestras analizadas; 3. Comparar los resultados obtenidos a partir de las muestras amplificadas en dos termocicladores diferentes; 4. Resultados de perfiles genéticos y RFUs de todas las muestras corridas en los dos analizadores genéticos ABI Prism 310.

Para evaluar el desempeño del kit AmpFℓSTR® Minifiler™ se analizaron tres parámetros, teniendo en cuenta que se procesaron con un volumen final de 12,5 μ L, en el termociclador 9700, amplificación por duplicado y corrido en dos analizadores genéticos, inyectadas tres veces cada una, 5 segundos cada vez.

Sensibilidad

Fase pre-analítica: se tomó una muestra de ADN conocida (control 007 disponible en el kit), perteneciente a un individuo de sexo masculino previamente tipificado y verificado con los resultados suministrados en el manual del kit AmpFℓSTR® Minifiler™, de fábrica se indica su concentración de 0,1 ng/ μ l. Se prepararon diluciones seriadas entre: 0,006 y 0,10 ng/ μ l.

Fase analítica: las muestras una vez diluidas fueron amplificadas según lo establecido en las indicaciones del manual del kit, verificando el desempeño de la prueba mediante el uso de los controles establecidos. Todas las muestras se procesaron en dos equipos analizadores genéticos ABI Prism 310, se analizaron con el software Genemapper ID v3.2, con el fin de comparar los resultados obtenidos.

Precisión

Fase pre-analítica: se tomaron muestras previamente procesadas en el laboratorio, aplicando los métodos de extracción según los tipos de muestra, cuantificados y amplificados usando el kit AmpFℓSTR® Identifiler™. Se incluyeron manchas de sangre, manchas de saliva, muestras de evidencia

traza (células epiteliales), pelo, hueso y diente, con diferentes concentraciones; se tomó un volumen total de 12,5 μl para la reacción de PCR (Tabla 1).

Fase analítica: todas las muestras se amplificaron según lo establecido en el manual del kit, en dos amplificaciones diferentes, verificando el desempeño de las pruebas mediante el uso de los controles establecidos.

Reproducibilidad

Fase pre-analítica: se tomaron muestras previamente procesadas en el laboratorio, aplicando los métodos de extracción según el tipo de muestra. Éstas fueron cuantificadas con el kit Quantifiler $^{\text{TM}}$ y amplificadas usando el kit AmpF ℓ STR \circledR Identifiler $^{\text{TM}}$. Se incluyeron manchas de sangre, manchas de saliva, muestras de evidencia traza, pelo, hueso y diente, con diferentes concentraciones según puede verse en la Tabla 1.

Fase analítica: cada una de las muestras fue procesada y analizada según el manual del kit, verificando el desempeño de la prueba mediante el uso de los controles establecidos e inyectadas en los analizadores genéticos tres veces para evaluar la reproducibilidad de los resultados.

Evaluación de muestras analizadas previamente con el kit AmpF ℓ STR \circledR Identifiler $^{\text{TM}}$ y su comparación con el kit AmpF ℓ STR \circledR Minifiler $^{\text{TM}}$

Se tomaron 4 muestras de restos óseos que el laboratorio había genotipificado utilizando el kit AmpF ℓ STR \circledR Identifiler $^{\text{TM}}$ y se tipificaron con el kit Minifiler en las condiciones descritas previamente. Se evaluó el número de sistemas que amplificaron con AmpF ℓ STR \circledR Minifiler $^{\text{TM}}$, el porcentaje de los sistemas que amplificaron por cada kit, los sistemas que amplificaron en Minifiler y no en Identifiler, el porcentaje de sistemas en los que se obtuvo resultado utilizando ambos kits y los resultados finales obtenidos en cada caso.

Resultados

Análisis preliminares y sensibilidad

- Electroforesis en ABI Prism 310 Serie 679, análisis con software Genemapper ID v3.2 (muestra: control positivo).

Para las muestras amplificadas con una concentración 0,025 ng/ μl , 0,05 ng/ μl y 0,1 ng/ μl en el termociclador 9700 se obtuvieron los resultados esperados. Para las muestras amplificadas con una concentración 0,006 ng/ μl y 0,012 ng/ μl en el termociclador 9700 se obtuvieron los resultados esperados, con excepción de los sistemas D21S11 y D16S539 en los cuales se amplificaron productos no deseados y los sistemas D7S820, D21S11, D18S51 y Amelogenina en los cuales se observó pérdida alélica. Este hecho sugiere que no se deben procesar muestras con una concentración por debajo de 0,02 ng/ μl .

Los alelos de las muestras amplificadas con una concentración 0,025 ng/ μl , 0,05 ng/ μl y 0,1 ng/ μl en el termociclador 9700 presentaron un valor de RFUs superior al exigido para el análisis. Los alelos de las muestras amplificadas con una concentración de 0,025 ng/ μl , en los marcadores D21S11 y FGA, mostraron desequilibrio alélico significativo, en el cual el primer alelo supera en altura más del doble al segundo. Los alelos de las muestras amplificadas con una concentración 0,006 ng/ μl y 0,012 ng/ μl en el termociclador 9700 presentaron un valor de RFU superior al exigido para el análisis, sin embargo en los STRs D21S11 y D16S539 se observan productos no deseados con valores de RFU altos y los sistemas D7S820, D21S11, D18S51 y Amelogenina en los cuales no se observaron los resultados esperados.

- Electroforesis en ABI Prism 310 Serie 595, análisis con software Genemapper ID v3.2

Los alelos de las muestras amplificadas con una concentración 0,025 ng/ μl , 0,05 ng/ μl y 0,1 ng/ μl en el

Tipo de muestra	Cantidad para PCR	Cuantificación
Mancha de sangre	2,5 μl	0,03 ng/ μl
Mancha de sangre	2,5 μl	0,048 ng/ μl
Mancha de sangre	5,0 μl	0,0007 ng/ μl
Mancha de saliva	1,0 μl	0,77 ng/ μl . Esta muestra se diluyó 1/10. Queda a 0,077 ng/ μl .
Evidencia traza en prenda de vestir	2,5 μl	0,028 ng/ μl
Evidencia traza en objetos	5,0 μl	0,00137 ng/ μl
Evidencia traza en objetos	5,0 μl	0,00153 ng/ μl
Pelo	2,5 μl	158,16 ng/ μl . Esta muestra se diluyó 1/1000. Queda a 0,158 ng/ μl
Hueso	5,0 μl	0,004 ng/ μl
Diente	3,0 μl	No hay datos
Control positivo	2,5 μl	0,05 ng/ μl
Control negativo	5,0 μl	Sin ADN

Tabla 1.
Muestras escogidas para realizar el análisis de precisión.

termociclador 9700 presentaron un valor de RFU superior al exigido para el análisis. Los alelos de las muestras amplificadas con una concentración 0,025 ng/ul, en los marcadores D21S11 y FGA, mostraron desequilibrio alélico significativo, en el cual el primer alelo supera en altura más del doble al segundo. Los alelos de las muestras amplificadas con una concentración 0,006 ng/ul y 0,012 ng/ul mostraron un comportamiento similar al encontrado en el análisis del equipo anterior.

teniendo en cuenta los obtenidos previamente al amplificarlas con el kit AmpF ℓ STR ® Identifiler ™ , los resultados de las dos PCR, realizando la inyección por triplicado y en dos equipos diferentes.

Comparación de muestras analizadas previamente con el kit Identifiler y su resultado con el kit Minifiler

En la Tabla 2 se evidencia como el kit Minifiler, en las 4 muestras, amplificó los 9 sistemas (100%) mientras que el Identifiler en el mejor de los casos amplificó 10 (62.5%). El análisis por Minifiler muestra como en los 4 casos se pudo entregar un resultado concluyente a la autoridad que lo solicitó.

Resultados del análisis de precisión y reproducibilidad

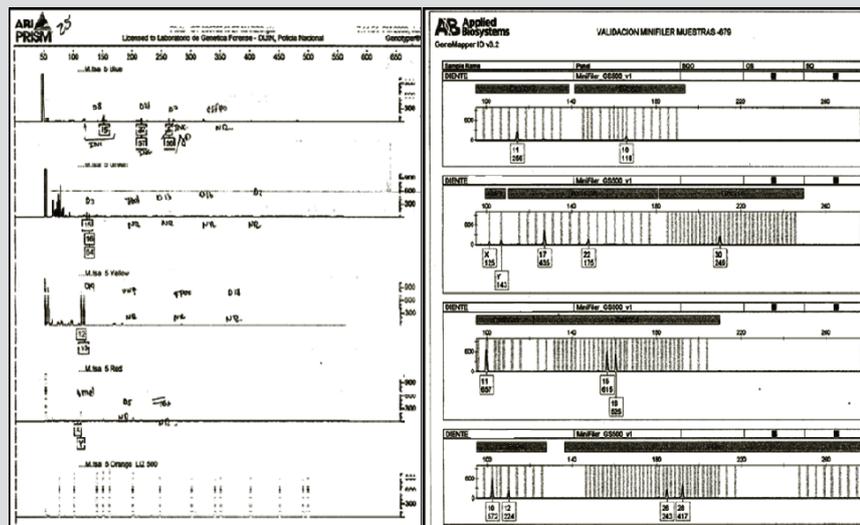
Los resultados para las muestras de evidencias trazas, hueso y diente produjeron un resultado idéntico

Tabla 2.
Comparación de los resultados de los kit Identifiler y Minifiler.

NA: no aplica;
IM: índice de maternidad;
PP: probabilidad de paternidad;
IH: índice de hermandad;
PH: probabilidad de hermandad.

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
	#	% de los sistemas del kit	#	% de los sistemas del kit	#	% de los sistemas del kit	#	% de los sistemas del kit
Sistemas que amplificaron con Identifiler	2	12,5%	10	62,5%	4	25,0%	2	12,5%
Sistemas que amplificaron con Minifiler	9	100%	9	100%	9	100%	9	100%
Sistemas que amplificaron con Minifiler y no con Identifiler	8	NA	6	NA	8	NA	9	NA
Sistemas con resultados	10	62,5%	16	100%	12	75,0%	11	68,8%
Resultado posterior a la aplicación del kit Minifiler	Se identificó la madre del NN IM: 16,313 PP 99,9939%		Se identificó un perfil completo para incluir en la base de datos CODIS		Se identificó un perfil completo para incluir en la base de datos CODIS		Se identificó un hermano IH: 13*171,454 PH: 99,99992%	

Figura 1.
Electroferogramas generados con el kit Identifiler (A) y Minifiler (B) para una muestra de diente.



Comparación de los resultados entre los dos kits utilizados

En la Figura 1 se presentan los electroferogramas generados con ambos kits donde se observa la aparición de resultados en varios sistemas al utilizar el kit Minifiler con alturas de pico mucho mayores que las generadas por el kit Identifiler.

Discusión

La casa comercial en su manual del kit Minifiler sugiere para el proceso de amplificación la aplicación de este método en caso de contar con muestras degradadas, inhibidas o de baja concentración; la concentración ideal para su aplicación está en el rango entre 0,05 y 0,075 ng/ul de ADN, lo cual se pudo verificar en los ensayos realizados. Sin embargo, de acuerdo con los análisis realizados es posible obtener un perfil completo con muestras cuya concentración de ADN es de 0,025 ng/μl. En caso de tener muestras con ADN escaso es posible obtener resultados con muestras cuya concentración es de por lo menos 0,02 ng/ul⁴. Resultados de ADN con muestras cuya

concentración es inferior no son reproducibles, por lo tanto no se debe realizar su amplificación. Siempre se deben confirmar los resultados realizando la amplificación por duplicado con el fin de verificar que los alelos sean reproducibles, con valores de RFU de 100 y poder reportarlos en el informe pericial. Además se debe mezclar previamente el ADN con el fin que la muestra sea homogénea y recolectarla utilizando pipetas automáticas calibradas y verificadas, cambiando de punta.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta validación, las muestras procesadas utilizando el kit Comercial Minifiler, bajo las condiciones descritas de concentración, amplificación y análisis, mostraron resultados precisos y reproducibles en el 100% en las muestras analizadas. Sin embargo, si la concentración es inferior o superior a la determinada anteriormente, los resultados varían en algunos alelos.

La comparación entre los resultados de Identifiler y Minifiler en muestras de restos óseos analizados muestra como el kit Minifiler es más eficiente en su rendimiento. En los casos mostrados, llega a resolver el caso en su totalidad obteniendo perfiles más completos⁵.

Bibliografía

1. Coble MD, Butler JM. Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 2005;50(1):43-53.
2. Butler JM, Shen Y, McCord BR. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 2003;48:1054-64.
3. Luce C, Montpetit S, Gangitano D, O'Donnell P. Validation of the AMPFISTRMiniFiler PCR amplification kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci.* 2009;54(5):1046-54.
4. Hughes-Stamm S, Ashton K, van Daal A. Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. *Int J Legal Med.* 2010 Apr 24. [Epub ahead of print].
5. Alenizi MA, Goodwin W, Hadi S, Alenizi HH, Altamar KA, Alsikel MS. Concordance between the AmpFISTRMiniFiler and AmpFISTRIdentifiler PCR amplification kits in the Kuwaiti population. *J Forensic Sci.* 2009;54(2):350-2.