

Validação do Investigator Argus Y-28 QS(Qiagen) - Estudo comparativo em amostras de referência

Henrique Costa⁴, Heloísa Afonso Costa¹, António Amorim^{1,2,4,5}, Cláudia Vieira da Silva^{1,2,3}

1-Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Sul, Serviço de Genética e Biologia Forenses

2-Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

3-Cespu-Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário

4-Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

5-REQUIMTE, Laboratório Associado FCT

INTRODUÇÃO

O cromossoma Y desempenha um papel essencial na genética forense, especialmente em contextos de agressão sexual, investigação de relações de parentesco e quando o perfil de ADN autossómico não é suficientemente informativo [1].

É necessário desenvolver kits que nos permitam estudar STRs do cromossoma Y e para aplicar esses mesmos kits à rotina laboratorial é preciso que se realizem estudos de validação para verificar se estes se encontram dentro dos parâmetros de qualidade exigidos.

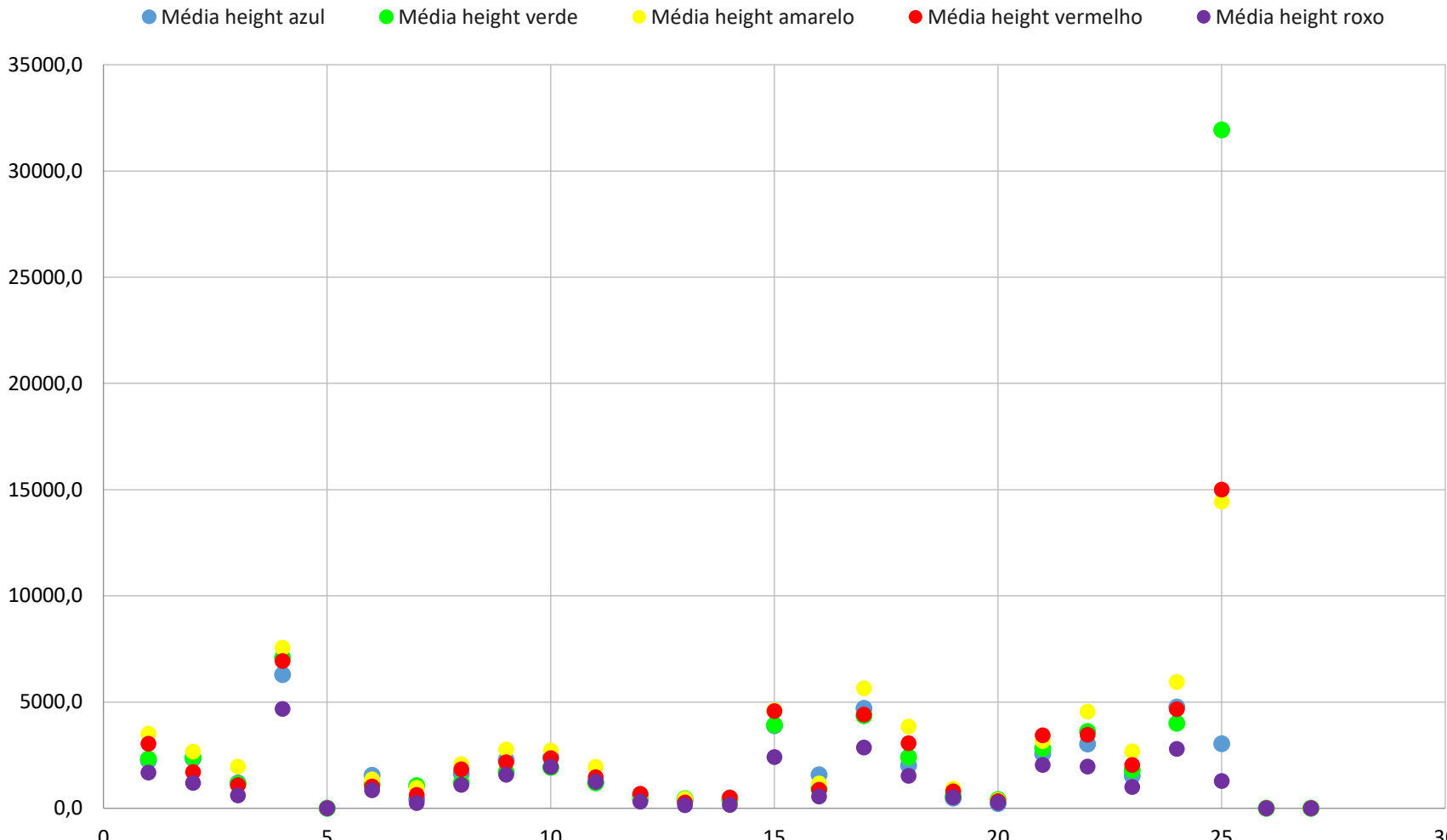
O kit Investigator®Argus Y-28 QS (QIAGEN), foi especialmente desenvolvido para análise de STRs do cromossoma Y. Este kit amplifica em simultâneo 28 loci, incluindo seis marcadores com taxa de mutação rápida (DYS449, DYS481, DYS570, DYS576, DYS518 e DYS627), e um sistema de controlo de qualidade interno (QS1 e QS2), que permite detetar possíveis inibidores da PCR e avaliar o nível de degradação do ADN [2].

Este kit apresenta grande robustez, sensibilidade e precisão para ser usado em casos de agressão sexual, onde frequentemente se trabalha com misturas de ADN masculino e feminino ou ainda discriminar entre vários contribuintes masculinos em casos de violação múltipla [3].

O objetivo deste trabalho consiste no estudo comparativo dos métodos de extração de ADN por Chelex 100® e Prep-n-Go™ (Applied Biosystems) em manchas de sangue e zaragatoas bucais. No que diz respeito às manchas de sangue pretende-se determinar a eficácia da amplificação direta. Para a concretização deste objetivo foram selecionadas 25 amostras de sangue e 25 amostras de saliva em zaragatoa bucais.

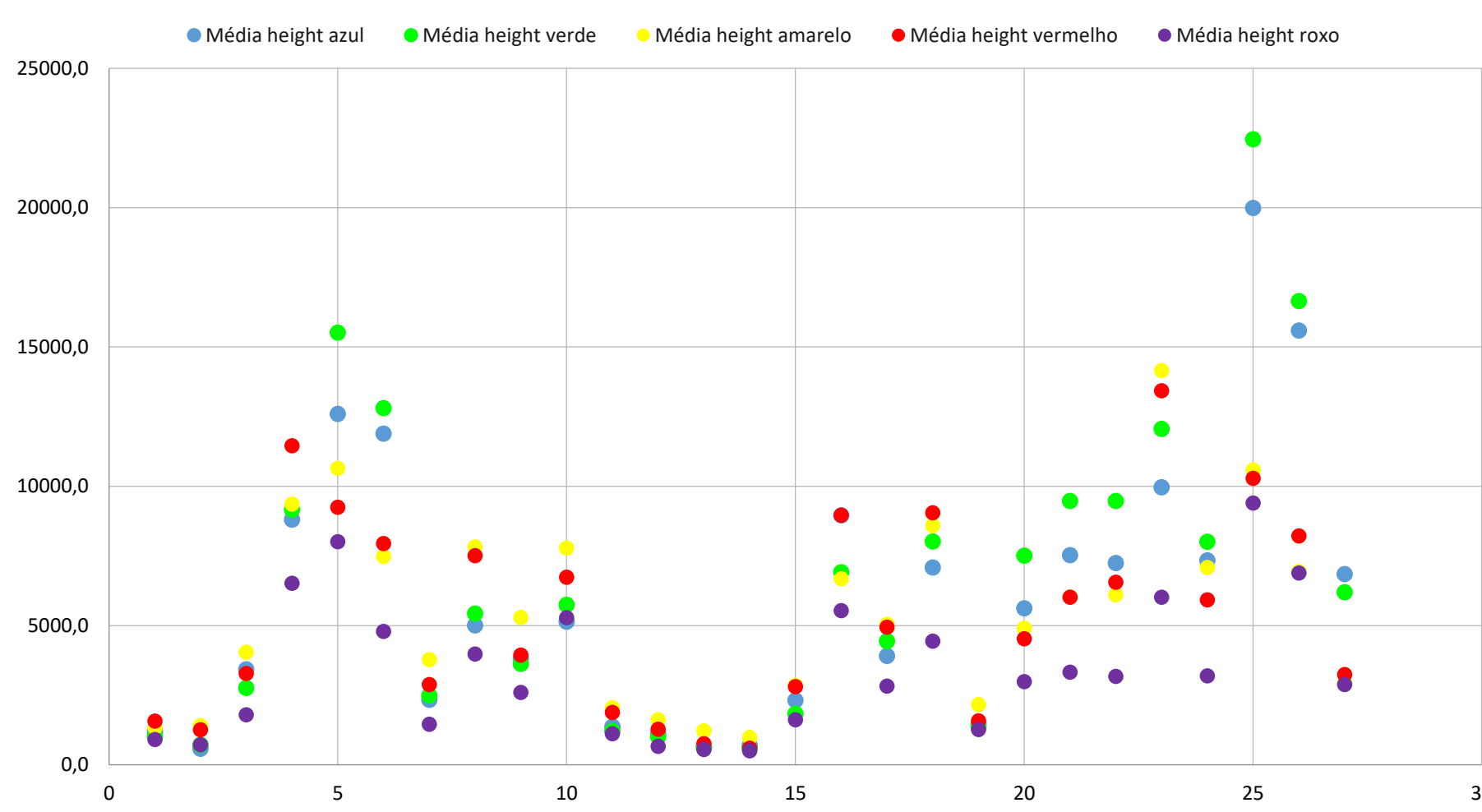
RESULTADOS

Gráfico A: Zaragatoas Bucais- Extração Chelex



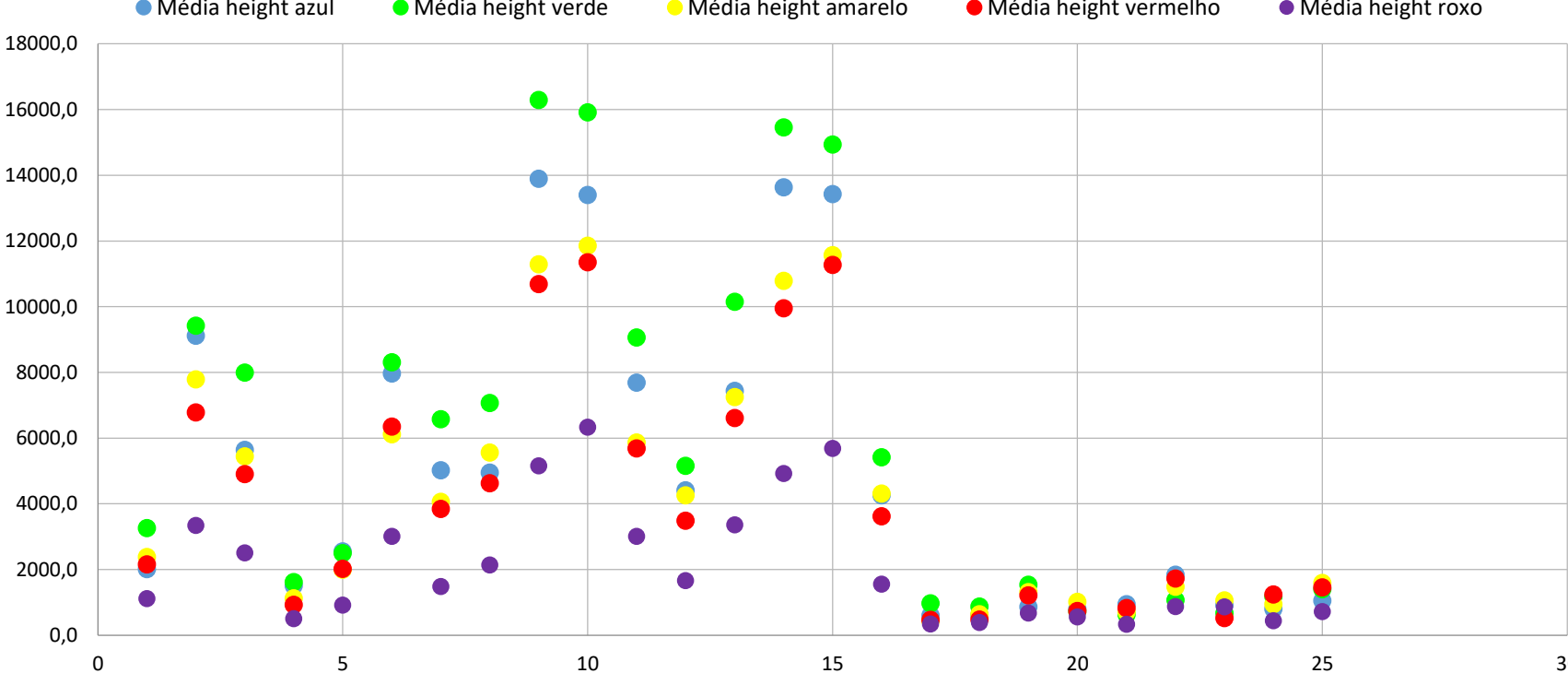
	F. Azul	F. Verde	F. Amarelo	F. Vermelho	F. Roxo
Mín.	220,6	367,0	385,6	265,0	138,6
Máx.	6287,8	31928,0	14430,5	15002,0	4679,2
Média	2115,4	3297,6	3178,2	2762,6	1370,2
Mediana	1821,5	1746,2	2667,8	1939,0	1219,6
D. Padrão	1530,2	6174,8	3000,8	3041,4	1053,8

Gráfico B: Zaragatoas Bucais- Extração Prep-n-Go



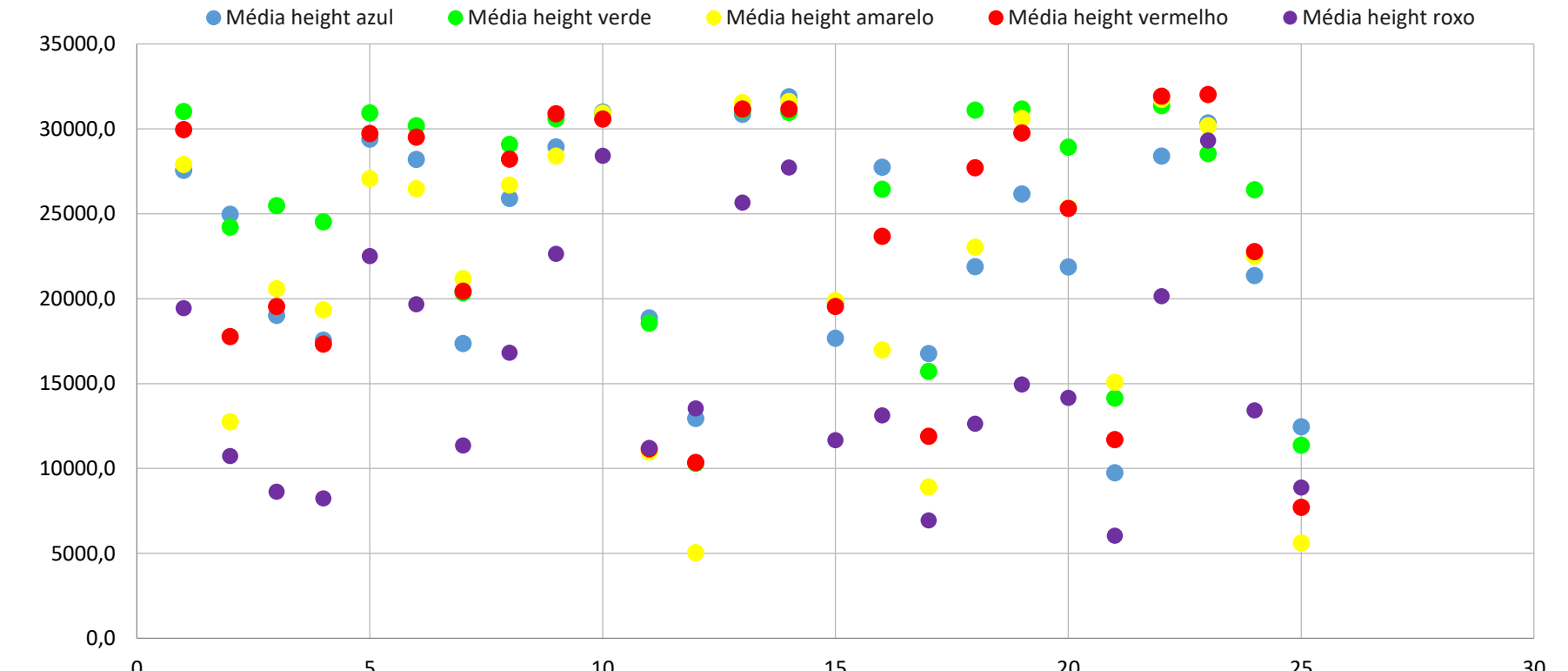
	F. Azul	F. Verde	F. Amarelo	F. Vermelho	F. Roxo
Mín.	579,8	580,2	988,0	599,2	503,4
Máx.	19983,3	22453,8	14155,2	13422,8	9395,6
Média	6015,8	6557,2	5513,2	5400,1	3422,2
Mediana	5134,3	5740,2	5291,7	4942,6	2984,3
D. Padrão	4810,8	5522,9	3347,6	3517,5	2399,8

Gráfico C: Manchas de sangue- Extração Chelex



	F. Azul	F. Verde	F. Amarelo	F. Vermelho	F. Roxo
Mín.	597,5	627,4	427,7	464,6	324,2
Máx.	13893,7	16284,6	11855,8	11348,2	6329,6
Média	7245,6	8456,0	6141,8	5906,4	3326,9
Mediana	4257,7	5155,0	4055,2	3477,2	1481,8
D. Padrão	4527,2	5245,1	3726,9	3537,5	1789,5

Gráfico D: Manchas de sangue- Amplificação Direta



	F. Azul	F. Verde	F. Amarelo	F. Vermelho	F. Roxo
Mín.	9742,3	10309,5	5033,3	7717,5	6041,6
Máx.	31870,2	31360,0	31723,3	32005,4	29297,6
Média	20806,3	20834,8	18378,3	19861,5	17669,6
Mediana	24962,0	28531,6	23022,2	25308,6	13540,0
D. Padrão	6356,2	6619,0	8188,1	7803,2	6825,7

MATERIAL E MÉTODOS

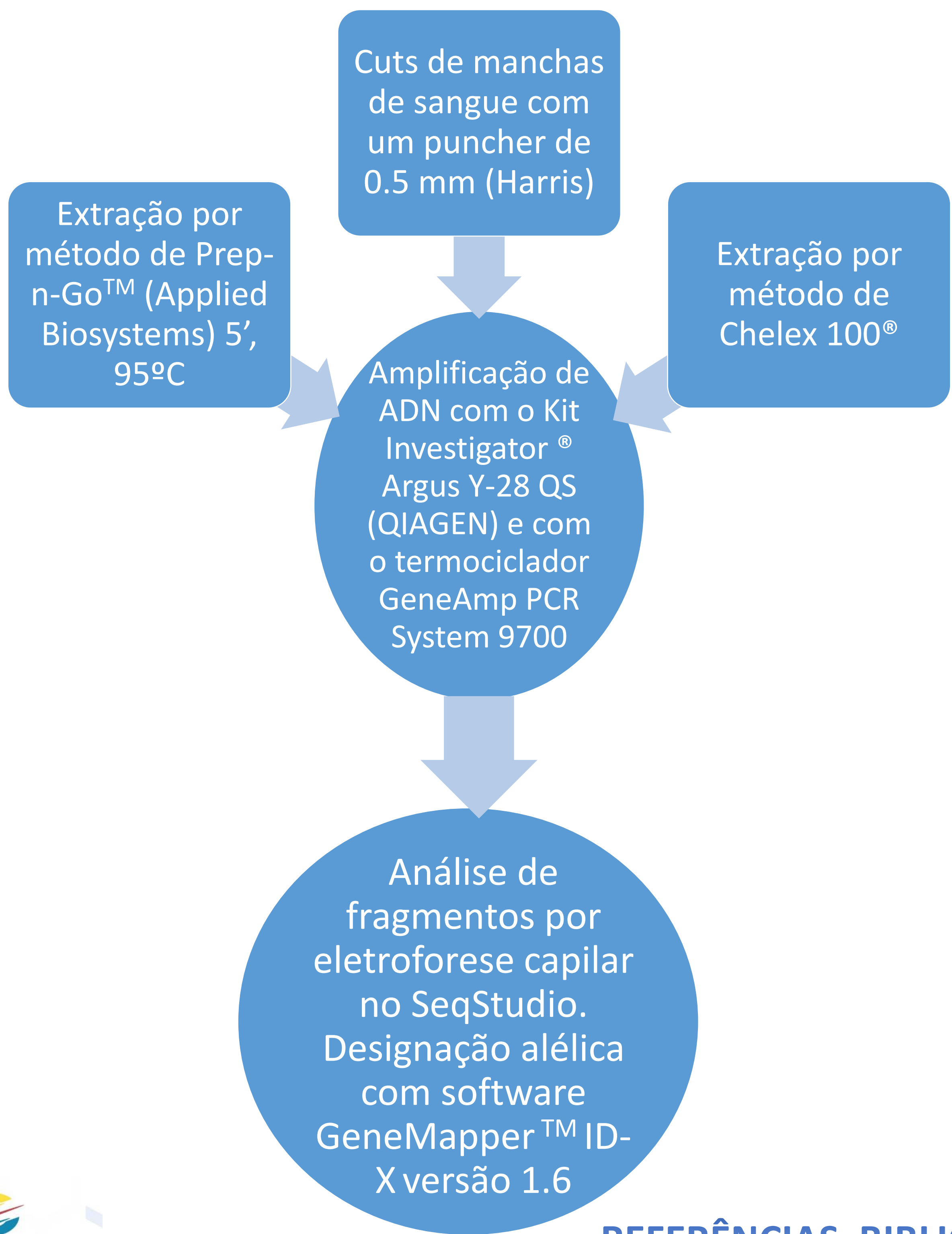
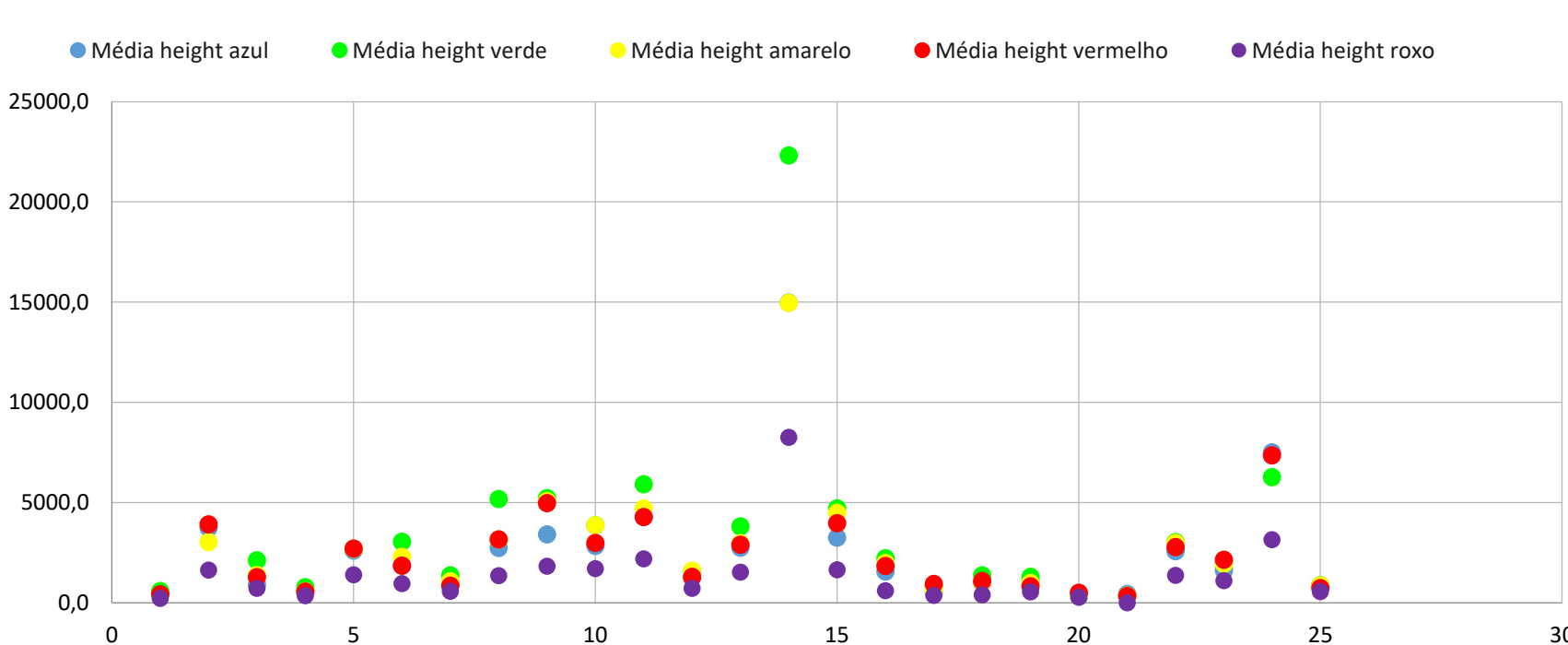


Gráfico E: Manchas de sangue- Extração Prep-n-Go



	F. Azul	F. Verde	F. Amarelo	F. Vermelho	F. Roxo
Mín.	309,5	336,5	344,5	345,3	229,7
Máx.	14978,7	22311,8	14968,8	14820,0	8253,0
Média	7644,1	11324,2	7656,7	7582,7	4241,3
Mediana	1625,2	2219,2	1987,2	1855,4	1035,8
D. Padrão	2991,4	4245,2	2963,0	2979,7	1591,7

Gráficos A a E: Média das alturas (RFUs) por fluorocromo (F.) e por amostra biológica obtidos em diferentes métodos de extração. Nas tabelas estão discriminados os resultados estatísticos obtidos:

A- Zaragatoas Bucais- Extração Chelex 100®

B-Zaragatoas Bucais- Extração Prep-n-Go™ (Applied Biosystems)

C- Manchas de sangue- Extração Chelex 100®

D- Manchas de sangue- Amplificação Direta

E-Manchas de sangue- Extração Prep-n-Go™(Applied Biosystems)

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, podemos concluir o seguinte:

- Relativamente às zaragatoas bucais o método de extração que permite a obtenção de melhores resultados é o de Prep-N-Go™. Esta conclusão tem como base os valores das alturas dos picos (RFUs) obtidos nos diferentes fluorocromos, em ambos os métodos de extração.
- No que diz respeito às manchas de sangue, a amplificação direta apresentou melhores resultados, ainda que, algumas amostras tenham sido repetidas devido a excesso de ADN. Quando comparados os métodos de extração por Prep-n-Go™ e Chelex 100®, concluímos que o método de extração por Prep-N-Go™ apresenta melhores resultados, à semelhança do que foi observado nas zaragatoas bucais.
- Assim, o método de Prep-N-Go™ aplicado em zaragatoas bucais e manchas de sangue e a amplificação direta são os métodos adequados para aplicação deste kit nas amostras de referência estudadas neste Serviço.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kayser M. *Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview*. Hum Genet. 2017 May;136(5):621-635
- QIAGEN. *Investigator Argus Y-28 QS Handbook*. QIAGEN, 2021.
- Hu, Na et al. *Current developments in forensic interpretation of mixed DNA samples (Review)*. BIOMEDICAL REPORTS 2: 309-316, 2014