

Validação do Ensaio Investigator 26Plex QS nos Laboratórios do Porto do SGBF

Estudos preliminares

Paulo Magalhães¹
Benedita Ferreira-Silva²
António Amorim³

1- FMUP
2- INMLCF, Delegação Norte, SGBF
3- INMLCF, SGBF

SGBF-N

- O Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Norte é um serviço acreditado pelo IPAC – ISO/IEC 17025.
- Todos os reagentes e equipamentos devem ser devidamente validados, internamente, conforme o PG-SBGF-001.

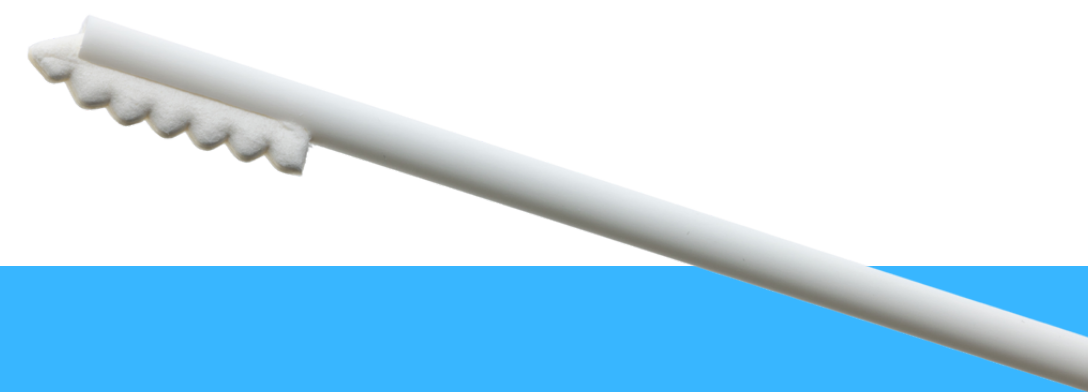
Investigator 26Plex QS

- Recentemente adquirido pelo serviço.
- Partilha 25 polimorfismos com o *PowerPlex® Fusion 6C* e 20 com *GlobalFiler™ Express*
- Possui 2 marcadores de qualidade
 - Eficácia da amplificação
 - Integridade da amostra
 - Presença de inibidores



Amostras utilizadas

- Em todos os ensaios foram utilizadas várias amostras de referência:
 - Zaragatoas bucais
 - Manchas de sangue
 - PrepFiler® e Prep-n-Go™
 - Amplificação direta

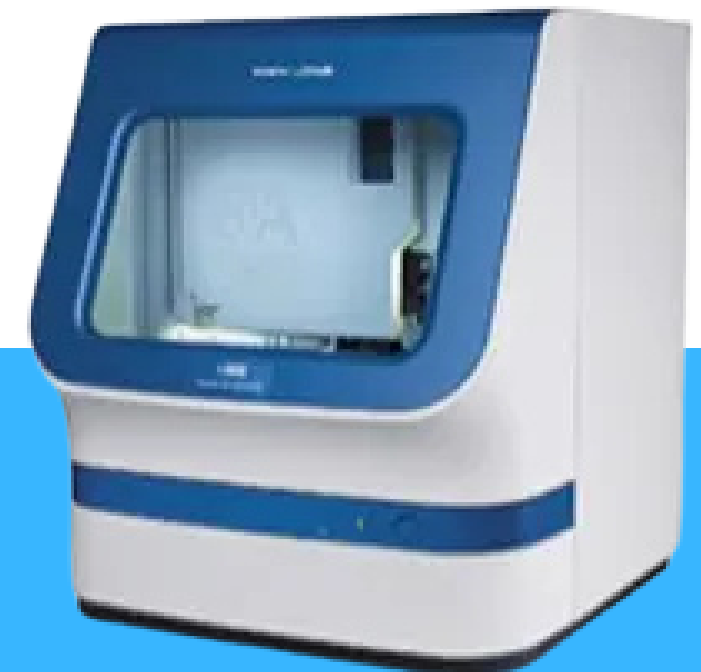


Limiares Analíticos

- Cálculo do valor do pico mais alto do ruído por fluorocromo.
- Valor de RFU a partir do qual alelos são considerados.
- Análise de 50 brancos de amplificação

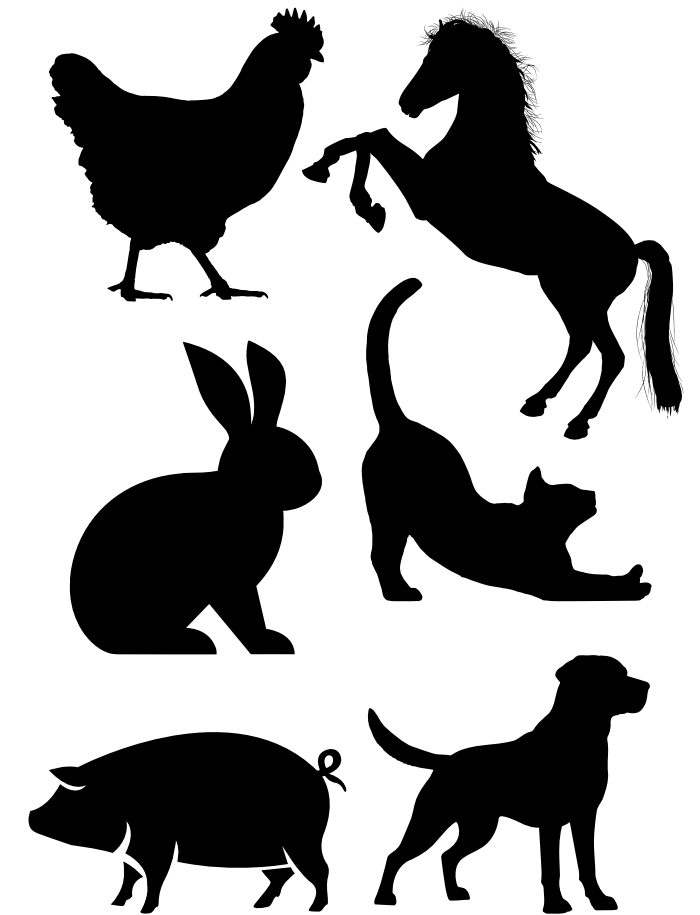


Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer



Especificidade

- Exclusividade do kit à amplificação de ADN humano.
- Foram analisadas 32 amostras
 - 2 amostras de coelho
 - 2 amostras de canino
 - 8 amostras de equino
 - 2 amostras de galinha
 - 8 amostras de suíno
 - 3 amostras de felino
 - 7 amostras de controlo de qualidade externo



Sensibilidade

- Determinação da concentração mínima de ADN a partir da qual é possível obter um perfil genético valorizável.
- Amplificações de amostras de diluições seriadas
 - 10ng/ μ L ○ 0,1ng/ μ L
 - 5ng/ μ L ○ 0,01ng/ μ L
 - 1ng/ μ L ○ 0,001ng/ μ L
 - 0,5ng/ μ L

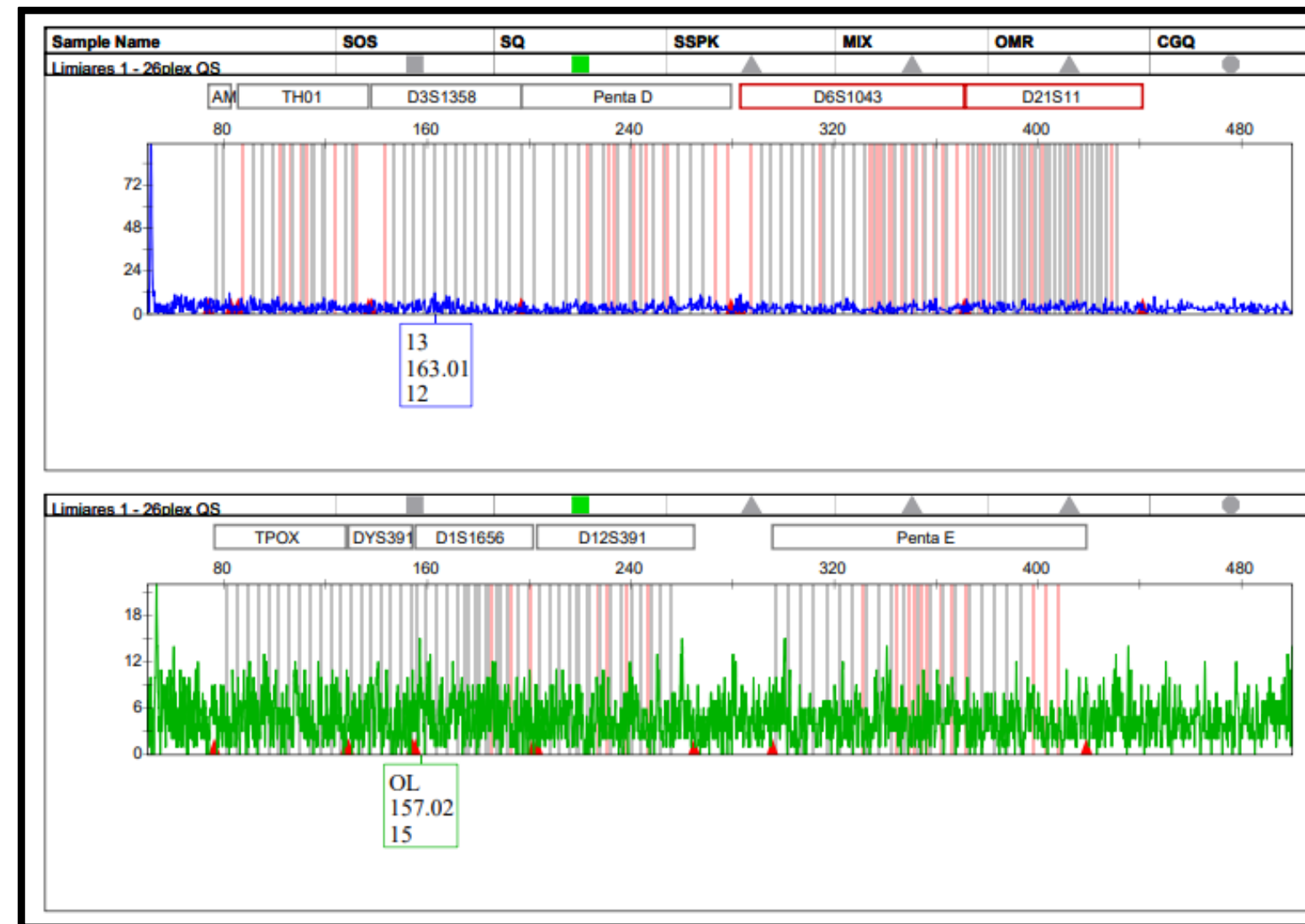
Condições de amplificação

- Gestão eficiente de reagentes e do tempo de execução.
- Análise de amostras com metade da quantidade final de reagentes de amplificação.
 - 25uL $\times$ 12,5uL
- Optimização do n° de ciclos no programa de amplificação
 - 27 ◦ 24

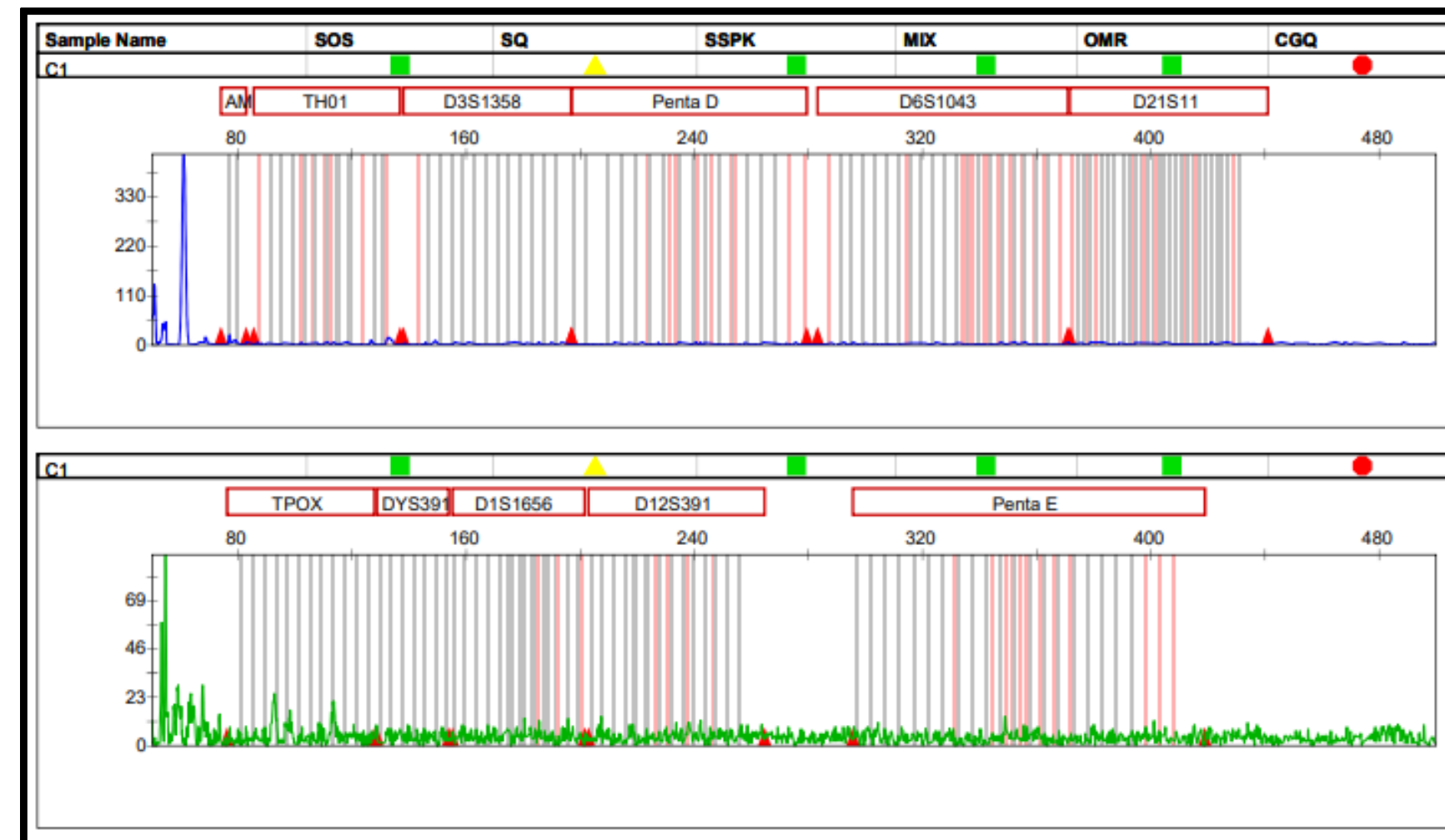
Reprodutibilidade e Repetibilidade

- Avaliação da precisão do *kit* com base em 2 estudos diferentes.
 - O mesmo grupo de amostras amplificadas e analisadas em 3 dias distintos.
 - O mesmo grupo de amostras amplificadas e analisadas por colaboradores diferentes.

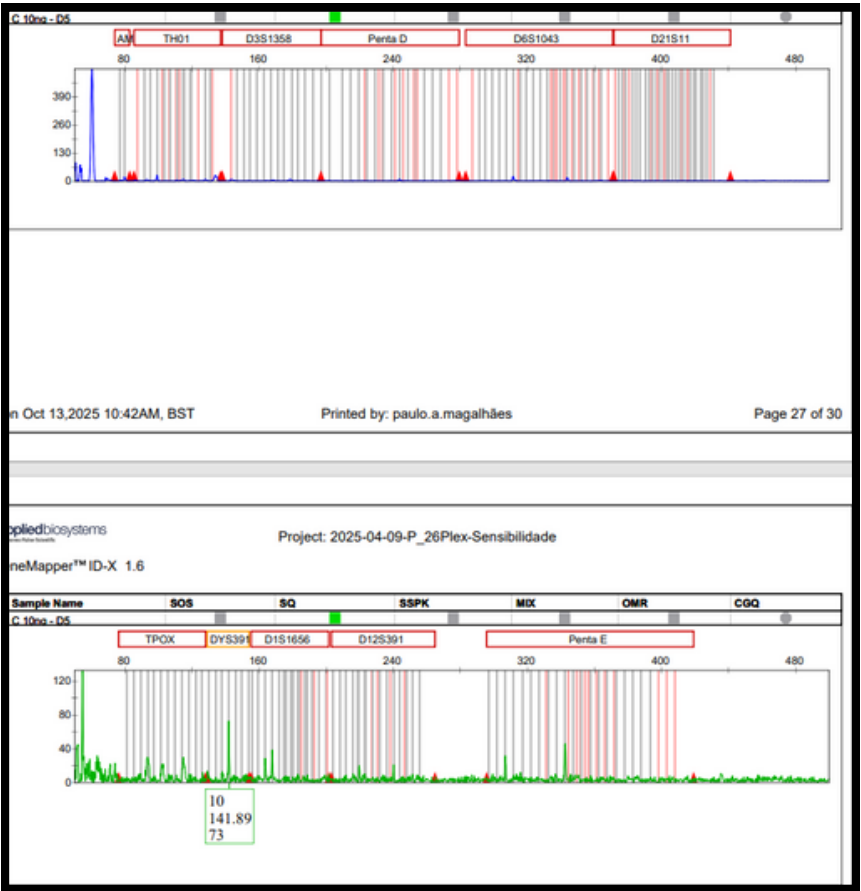
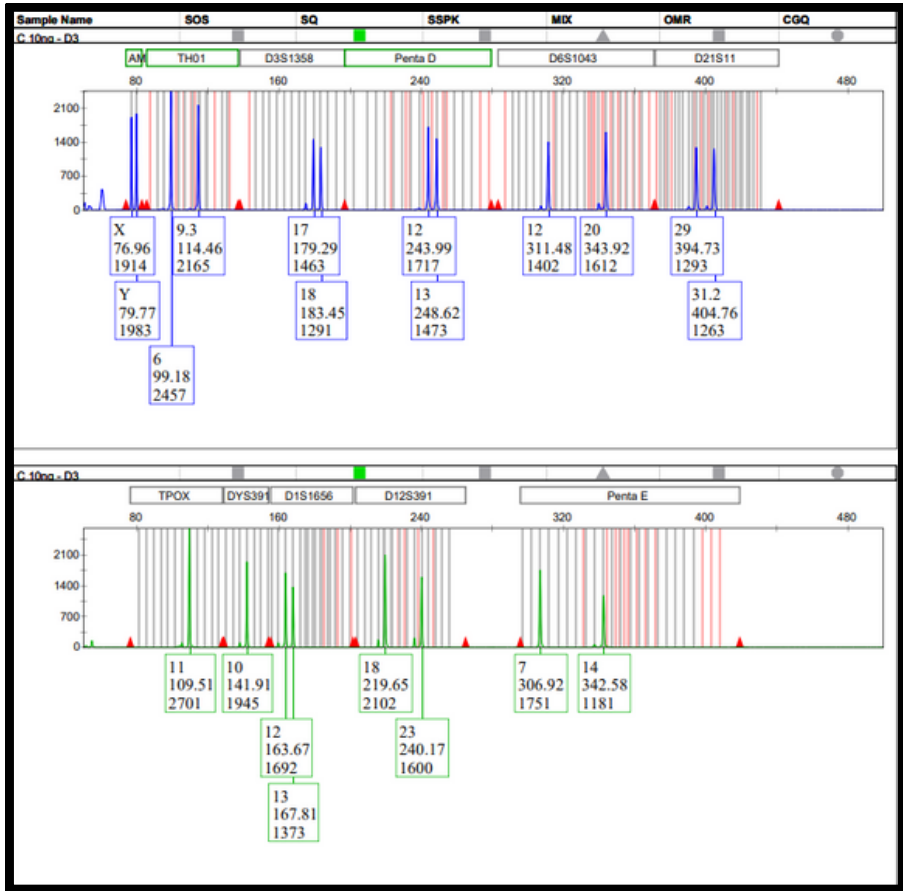
Limiares analíticos



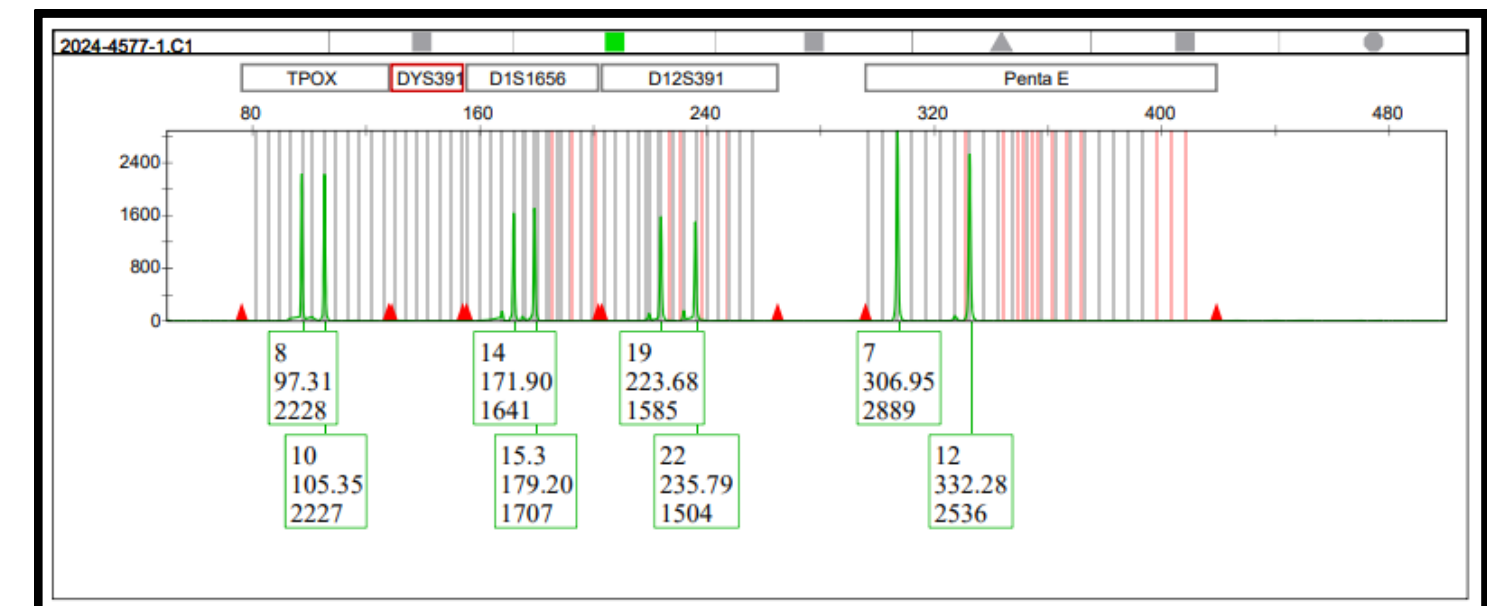
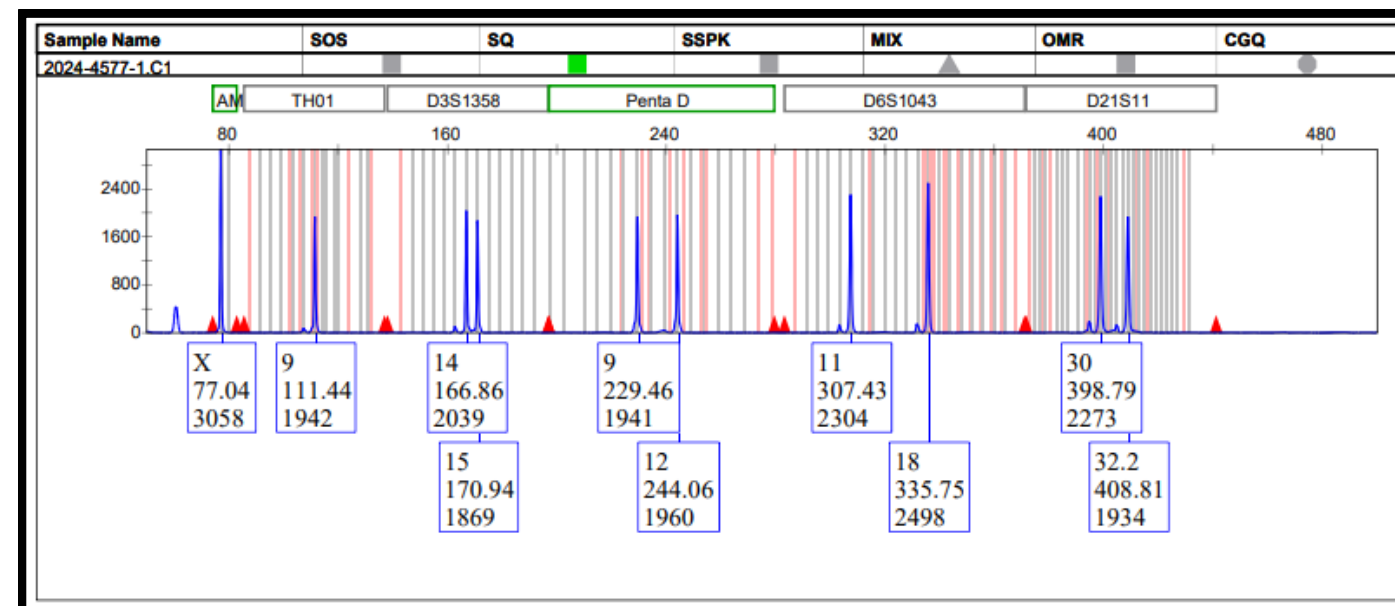
Especificidade



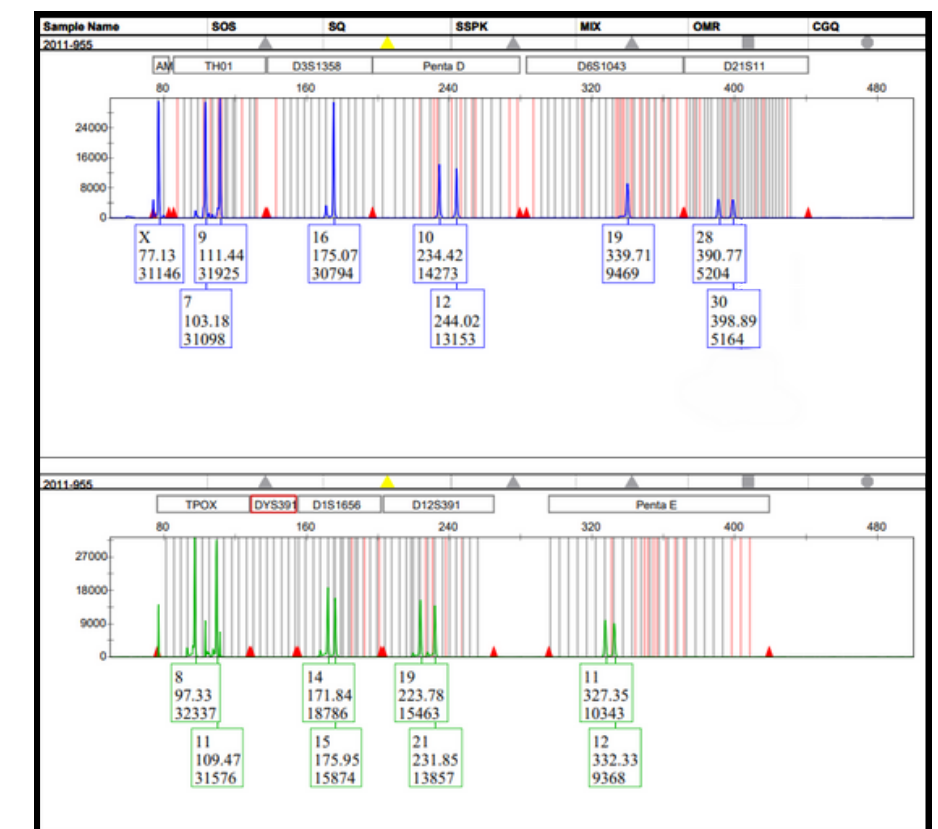
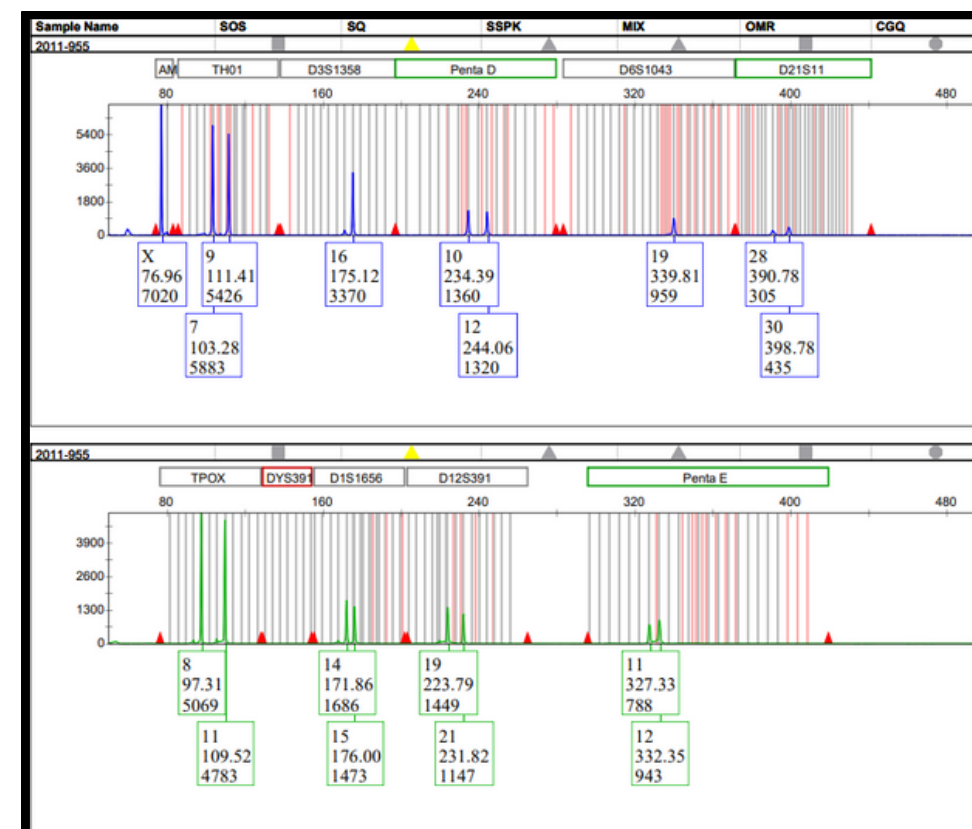
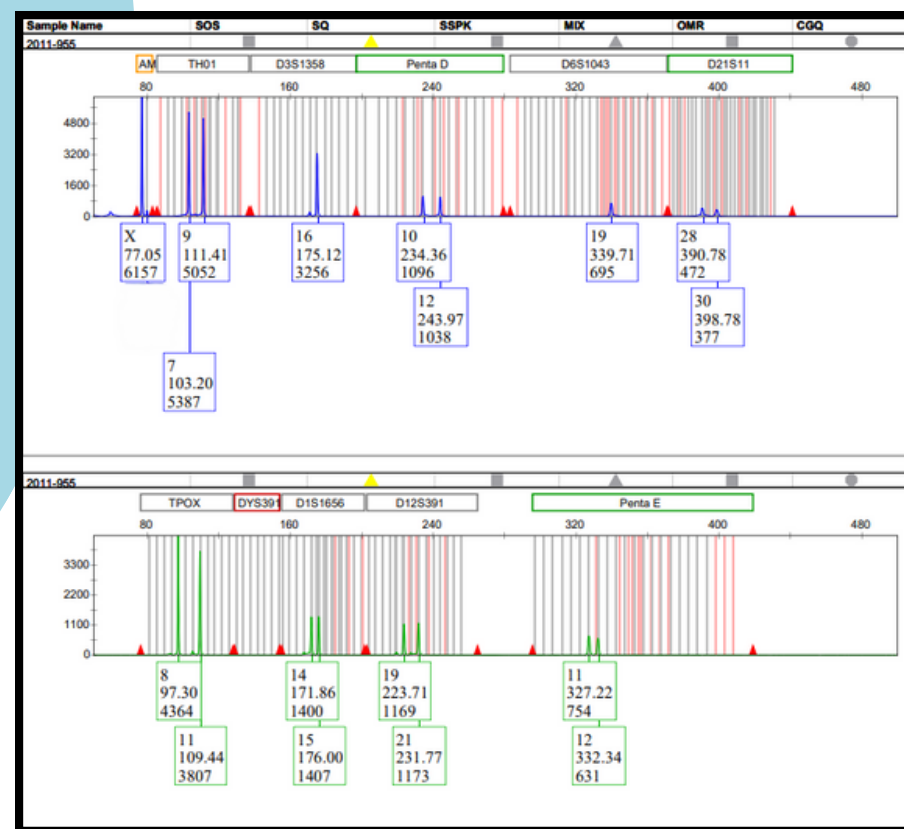
Sensibilidade



Condições de amplificação



Reprodutibilidade e Repetibilidade



Conclusão

- Otimização do Investigator 26Plex QS nas amostras referência.
- Pretende-se extender esta otimização às amostras problema.
- Avaliação dos restantes parâmetros como análise de contaminação e presença de inibidores em amostras de referência, determinação de limiares de heterozigotia.

Perspetivas futuras

- Espera-se assim, ao finalizar a validação, ter uma alternativa para a análise de amostras no SGBF-N.



Obrigado