

IN0056

Estado:Definitivo

Fecha Vigor: 17/10/2011

Rev.07

ACEPTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Índice:

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. DEFINICIONES
4. DESCRIPCIÓN DE LA INSTRUCCIÓN OPERATIVA
 - 4.1. MATERIALES
 - 4.1.1. REACTIVOS
 - 4.1.2. MATERIAL FUNGIBLE
 - 4.1.3. EQUIPAMIENTO
 - 4.2. PROCEDIMIENTO: INTERPRETACIÓN DE LAS MUESTRAS
 - 4.2.1. PROCEDIMIENTO PARA ABRIR UN PROYECTO EXISTENTE
 - 4.2.2. PROCEDIMIENTO PARA ABRIR UN NUEVO PROYECTO
 - 4.2.3. PROCEDIMIENTO A SEGUIR CUANDO SE TIENEN LAS MUESTRAS EN LA HOJA DE ANÁLISIS
 - 4.2.4. PROCEDIMIENTO PARA COMENZAR A ANALIZAR LAS MUESTRAS
 - 4.2.5. PROCEDIMIENTO PARA CAMBIAR MANUALMENTE LA ASIGNACIÓN AUTOMÁTICA DE UN ALELO, BORRAR UN PICO STUTTER, ETC.
 - 4.2.6. EXAMEN Y ACEPTACION DE DATOS. CRITERIOS DE RECHAZO
5. FORMATOS
6. REFERENCIAS
7. ANEXOS
8. HISTORIAL DE MODIFICACIONES

1.- Objeto:

Se define la sistemática a seguir para la correcta aplicación e interpretación de los resultados obtenidos en la fase de tipaje de los perfiles genéticos.

2.- Alcance:

El presente procedimiento afecta a todos los ensayos que realiza la Sección de Genética Forense de la UPC, en los cuales se obtiene un perfil genético mediante el secuenciador ABI 310 Genetic Analyzer (GF037 - GF038) (Applied Biosystems) ABI 3500 Genetic Analyzer (GF0XX) y con la utilización del programa informático Genemapper ID-X (Applied Biosystems).

3.- Definiciones:

No aplicable

4.- Descripción de la instrucción

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos

No aplicable

4.1.2. Material Fungible

No aplicable

4.1.3. Equipamiento

- BI 310 Genetic Analyzer (GF037 - GF038)
- ABI 3500 Genetic Analyzer (GF0XX)
- Programa informático GeneMapper ID-X (Applied Biosystems)

4.2. PROCEDIMIENTO: INTERPRETACIÓN DE LAS MUESTRAS

El programa informático "GeneMapper ID-X" debe ser abierto tras terminar las muestras su proceso

electroforético. Debemos tener en cuenta que para poder analizar los datos, es necesario correr en el proceso electroforético, al menos una vez la escalera alélica del kit usado para el secuenciador ABI 310 Genetic Analyzer y una vez cada 16 muestras par el secuenciador ABI 3500 Genetic Analyzer.

El programa utiliza una serie de paneles para interpretar los datos:

- **“Bin”**: Intervalo de tamaño en el que debe situarse un alelo.
- **“Marker”**: Marcador genético (locus).
- **“Panel”**: Conjunto de marcadores genéticos que se analizan juntos en una misma carrera. Puede asimilarse a kit comercial.
- **“Kit”**: Es una asociación de diferentes paneles.
- **“Binset”**: Agrupaciones de diferentes alelos que se repiten en diferentes kits.

4.2.1. PROCEDIMIENTO PARA ABRIR UN PROYECTO EXISTENTE

Ir a **“File / Open Project”** (o bien pinchar sobre el segundo icono de la barra de iconos) y se abrirá un cuadro en el que podremos buscar con la barra de la derecha o bien con el buscador si sabemos su nombre. Una vez que hayamos seleccionado el proyecto (estará en color azul) pinchar sobre el botón **“Open”**.

4.2.2. PROCEDIMIENTO PARA ABRIR UN NUEVO PROYECTO

El procedimiento a seguir es:

- Ir a **“File / New Project”** (o bien pinchando sobre el primer icono de la barra de iconos).
- Añadir las muestras a analizar (**“File / Add samples to project”**) (o bien pinchando sobre el cuarto icono de la barra de iconos).
- Buscar las muestras que interesen ser analizadas (*My computer / Local disk (D:) / Applied Bio / 310 / Runs* para el secuenciador ABI 310 y (*My computer / ABSW&DATA (D:) / Applied Biosystems 3500 / Data / Runs* para el secuenciador ABI 3500) y seleccionar la carpeta con la fecha que nos interesa.
- Si se quiere añadir todas las muestras de la carpeta, pinchar una vez sobre la carpeta con lo cual se selecciona. Posteriormente pinchar el botón **“Add to list”** y **“Add”**.
- Si no desea añadir todas las muestras de la carpeta, pinchar sobre la cruz que está en un cuadrado pequeño al lado izquierdo de la carpeta, con lo cual se abren todas las muestras que están dentro de la carpeta. Pinchar sobre las muestras que nos interesen (si son más de una muestra, mantener apretada la tecla control) y, posteriormente, pinchar sobre los botones **“Add to list”** y **“Add”**.

4.2.3. PROCEDIMIENTO A SEGUIR CUANDO SE TIENEN LAS MUESTRAS EN LA HOJA DE ANÁLISIS

Aquí nos encontraremos con:

- **“Status”**: Un triángulo de color verde con una mano nos indica que esta muestra está aún sin analizar. Si esta celda está vacía indica que la muestra ya ha sido analizada.
- **“Sample name”**: Indica el nombre dado a la muestra en la lista de muestras.
- **“Sample type”**: Indica el tipo de muestra. Es obligatorio rellenar esta columna, para ello pinchar sobre **“None”** y seleccionar lo adecuado en el menú desplegable: **“Sample”** para las muestras, **“Allelic ladder”** para la escalera alélica, control positivo, (para esta muestra en la columna custom control seleccionaremos el adecuado), control negativo, etc.
- **“Specimen Category”**: (sólo si en *Table Settings*, se ha seleccionado *CODIS Export*) Categoría de la muestra, hace referencia a si la muestra es del padre alegado, madre alegada, hijo biológico, etc. Esta columna sólo debe ser rellanada para exportación de datos a CODIS.
- **“Analysis method”**: Pinchar sobre **“None”** y seleccionar **“HID_default”** (para el kit Identifiler y el kit Yfiler), **“Identifiler_Plus_AnalysisMethod”** (para el kit Identifiler plus), **“MiniFiler”** (para el kit MiniFiler) o **“NGMSelect_AnalysisMethod”** (para el kit NGMSelect) en el menú desplegable. Para expandirlo a todas las muestras, Pinchar en el encabezamiento de la columna y posteriormente ir **“Edit / Fill down”**.
- **Panel**: Pinchar sobre **“None”** y seleccionar **“AmpFLSTR_Panels_V1X”** (para el kit Identifiler y el kit Yfiler), **“AmpFLSTR_Identifiler_Plus_V1X”** (para el kit Identifiler plus), **“MiniFiler”** (para el kit MiniFiler) o **“NGMSelec_vBeta1X”** (para el kit NGMSelect). Para expandirlo a todas las muestras, pinchar en el encabezamiento de la columna y posteriormente ir **“Edit / Fill down”**.
- **“Size Standard”**: Pinchar sobre **“None”** y seleccionar en el menú desplegable **“CE_G5_HID-GS500”** cuando se usa el LIZ500 o **“GS600_LIZ_(80-400)”** cuando se usa el LIZ600. Para expandirlo a todas las

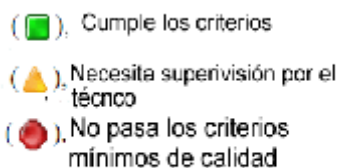
muestras, Pinchar en el encabezamiento de la columna y posteriormente ir *"Edit / Fill down"*.

- *"Matrix"*: Pinchar sobre *"None"* y seleccionar en el menú desplegable **deberá de seleccionar la matriz que esté en vigor**. Para expandirlo a todas las muestras, pinchar en el encabezamiento de la columna y posteriormente ir *"Edit / Fill down"*.
- *"Custom Control"*: En los controles positivos se debe rellenar esta columna, indicando el nombre del control positivo que se ha utilizado.

4.2.4. PROCEDIMIENTO PARA COMENZAR A ANALIZAR LAS MUESTRAS

Para analizar las muestras pinchar sobre el botón *"Analyze"* (botón verde en la barra de iconos) o bien ir a *"Analysis / Analyze"* dando un nombre al proyecto en curso y lo guardándolo. Observar que tras el proceso en la columna *"Status"* los iconos han desaparecido, a no ser que alguna de las muestras por falta de calidad no haya podido ser analizada.

Revisión de los datos del análisis



Al finalizar el análisis se obtiene una pantalla con tres pestañas, Samples, Analysis Summary y Genotypes.

En la pestaña Analysis Summary nos encontramos con cuatro grupos de información, en el primero nos indica el número de muestras que se han analizado. En el segundo, software revisa la calidad de las escaleras alélicas y nos indicará si han pasado los valores de calidad o no. En el tercero analiza los controles positivos y negativos y en el último todas las muestras.

Si clicamos sobre los números en azul nos vincula con las muestras. Si se obtiene al menos un ladder un control positivo y un control negativo que hayan pasado los criterios de calidad, aquellas muestras que cumplen los criterios de calidad no necesitarán de una revisión más detallada por el técnico y se podrán imprimir o exportar a CODIS según corresponda.

En las muestras que no pasen los criterios de calidad, en la pestaña muestras, en el desplegable Plot settings, seleccionaremos Data interpretation para revisar los perfiles y Traditional Genotype Plot para imprimir el perfil.

El significado de las columnas que observamos a nivel de calidad de la muestra es:

- *"SOS (Sample Off-scale)"*: Indica que alguno de los marcadores tiene exceso de fluorescencia.
- *SSPPK (Sample Spike)"*: Indica que alguno de los marcadores tiene pico spike.
- *MIX*: Indica que es una muestra potencialmente mezcla.
- *OMR (Outside Marker Range)"*: Indica que alguno de los alelos buscados está entre dos marcadores.
- *CGQ (Composite Genotype Quality)"*. Indica la calidad general del perfil.
- *"SFNF (Sample file not found)"*: Normalmente está con una bandera verde.
- *"SQ (Sizing quality)"*: Nos indica la calidad en la asignación de los tamaños en el estándar de tamaños.

Si todo ha ido bien debe aparecer una banderita verde, si aparece un triángulo amarillo indica que se debe chequear la asignación de los tamaños y si aparece una bandera roja, indica que no ha pasado el control y que hay una asignación incorrecta de algún pico en el estándar o que han coincidido menos de tres picos al hacer los cálculos.

El significado de las columnas que observamos a nivel de marcador de la muestra es:

- *OS (Off-scale)"*: Indica el marcador tiene exceso de fluorescencia.
- *BIN (Out of Bin Allele)"*: Indica el marcador tiene un pico fuera de los bins.
- *PHR (Peak Height Ratio)"*: Indica el balance entre los alelos de los heterocigotos.
- *MPH (Max Peak Height)"*: Indica si alguno de los alelos excede el máximo.
- *LPH (Low Peak Height)"*: Indica si alguno de los alelos está por debajo del mínimo, diferencia heterocigotos de homocigotos.

determinar si estos picos fuera de escala se corresponden con alelos verdaderos o no, debe confirmarse mediante la repetición de la amplificación y proceso electroforético.

- No deben aparecer alelos fuera de su tamaño estimado. En caso de que aparecieran, y con la finalidad de determinar si estos alelos se corresponden con microvariantes alélicas o no, debe confirmarse mediante la repetición de la amplificación y proceso electroforético.
- El desbalance alélico observado no debe ser mayor del 50 % en el caso de que no nos encontráramos ante un perfil genético mezcla. En caso contrario, y si este hecho se observa en varios marcadores genéticos, debe confirmarse mediante la repetición de la amplificación y proceso electroforético.
- La altura de pico debe ser de 50 rfus en heterocigotos y de 100 rfus en homocigotos. En caso contrario, debe repetirse el proceso electroforético y si no fuera posible obtener dichos valores se hará constar en el informe pericial la obtención de picos por debajo del umbral mínimo establecido por este laboratorio.
- El posible "pull-up" no debe ser mayor que el tamaño menor de pico anteriormente considerado. En caso contrario, debe repetirse el proceso electroforético.
- No deben aparecer más de dos alelos por locus al analizar STRs autosómicos (en el caso de STRs del cromosoma Y no deberían aparecer más de un alelo por locus, con la excepción de DYS385). En caso de que aparecieran, y no nos encontráramos ante un perfil genético mezcla, esta situación debe confirmarse mediante la repetición de la amplificación.
- La anchura del pico no debe ser mayor de 1'5 pares de bases. En caso contrario, debe repetirse el proceso electroforético.
- Los resultados observados tras analizar la escalera alélica, el control positivo y el control negativo deben ser idénticos a los resultados esperados de los mismos.

Como consecuencia de todo lo expuesto con anterioridad nos podemos encontrar ante diversas situaciones en el caso de que no se cumplan en su totalidad los criterios para la aceptación de los resultados obtenidos:

- Si el número de marcadores genéticos en los que no se obtienen resultados satisfactorios, siguiendo las indicaciones anteriores, fuera tal que el perfil obtenido no tuviera, al menos, un número mayor o igual de 8 loci en el caso de marcadores autosómicos y 10 loci en el caso de marcadores de cromosoma Y, dicho perfil genético sería descartado. En este caso, debería repetirse o bien el proceso electroforético, o bien proceder a una nueva amplificación y/o una nueva extracción de la muestra objeto de análisis (si hubiera muestra sobrante). Si realizadas las repeticiones descritas no se obtuviera un perfil aceptable el resultado del análisis se daría como negativo.
- En caso contrario, el perfil genético sería aceptado para su posible inclusión en la base de datos y sería reportado en el informe pericial, haciendo constar en dicho informe los marcadores genéticos en los que no se hubieran obtenido resultados satisfactorios siguiendo los criterios de aceptación y rechazo marcados en la presente instrucción

Los resultados se registran en el formato [FM0112](#) "Control de tipaje e interpretación de resultados".

5.- Formatos:

Código	Denominación
FM0112	Control de tipaje e interpretación de resultados

6.- Referencias:

7.- Anexos:

GeneMapper ID software Versión 3.2. Human identification analysis. User guide (Applied Biosystems).

8.- Historial de modificaciones:

Nº revisión

Descripción de la modificación

Fecha modif.

Nº Revisión	Descripción de la modificación	Fecha modif.

00	Edición inicial	22/12/2006
01	Ampliar fundamentos	14/03/2008
02	En el apartado 4.2.6 se incluyen criterios de selección de un perfil genético completo e incompleto y la forma de reportar estos	07/07/2008
03	En apartado 4.2.3 Procedimiento... incluir datos Minifiler y modificar Julio 07 por Julio 08 En el apartado 4.2.6 Examen... incluir datos Minifiler e Yfiler Introducción de la relación de instrucciones y cambio de ubicación de las referencias.	14/04/2009
04	En apartado 4.2.6 se incluyen criterios de rechazo específicos	07/07/2009
05	Adaptar el procedimiento a la nueva estructura del Departamento de Interior creada por el Decreto 471/2009, de 28 de agosto, sobre estructura orgánica y funcional del Departamento de Interior.	23/02/2010
06	Adaptar el procedimiento al cambio software, debido a que se ha cambiado Genemapper ID versión 3.2 por el Genemapper ID-X	07/06/2011
07	Adaptar el procedimiento a la nueva estructura del Departamento de Interior creada por orden de 17 de junio de 2011 sobre estructura orgánica y funcional del Departamento de Interior.	04/10/2011

Elaborado:**Revisado:****Aprobado:**

Jefe de la Sección de Genética Forense

Jefe/a de la Ertzaintza

Viceconsejera/Viceconsejero de Seguridad

Fecha:**Fecha:****Fecha:**

04/10/2011

13/10/2011

14/10/2011

