

Étude de validation du Bluestar® Forensic

I. Matériels et matières utilisés

II. Résultats des tests

- 2.1. Détermination du seuil de sensibilité du kit Bluestar
- 2.2. Détermination de taches en fonction de leur volume
- 2.3. Détermination de la répétabilité de la manipulation
- 2.4. Détermination de la détection de sang et dépôts d'eau de Javel
- 2.5. Détermination de la détection du sang après lavage à l'eau de Javel

III. Résultats de génotypage



UFEG
Unité Fonctionnelle d'Empreintes Génétiques

I. Matériels et matières utilisés

Pulvérisateur :

- Pulvérisateur : Celui fournit dans la commande du 15 04 2003

Kit Bluestar :

- Solution test B (1 comprimé = 40 mL) fournis par M. Lefebvre-Despeaux le 03 10 2003
- Comprimés fournis par M. Lefebvre-Despeaux le 03 10 2003

II. Résultats des tests

1. Test n°1 : Détermination du seuil de sensibilité du kit Bluestar :

1.1. Enoncé des manipulations réalisées :

- Réalisation d'une gamme de dilution à partir d'un échantillon de sang pur conservé sur EDTA. Cette gamme s'étend de l'échantillon dilué au 1/2 à celui dilué au 1/1000 dans de l'eau stérile. Un prélèvement de 20 µL de chaque dilution permet la réalisation des dépôts sur un drap propre et sec. Ces dépôts sont ensuite séchés à l'air libre. Après séchage, la gamme est pulvérisée avec la solution de Bluestar, afin de pouvoir réaliser une lecture visuelle de la luminescence associée à chaque dilution.
- Cette gamme est réalisée simultanément par 2 personnes en deux lieux séparés, avec le même échantillon de sang pur, afin d'assurer la reproductibilité de la manipulation.

Paramètre variant : La concentration en sang du dépôt sur le drap.

1.2. Résultats du test n° 1 :

Un génotypage des 16 taches est réalisé (cf.paragraphe III pour les résultats de génotypage)

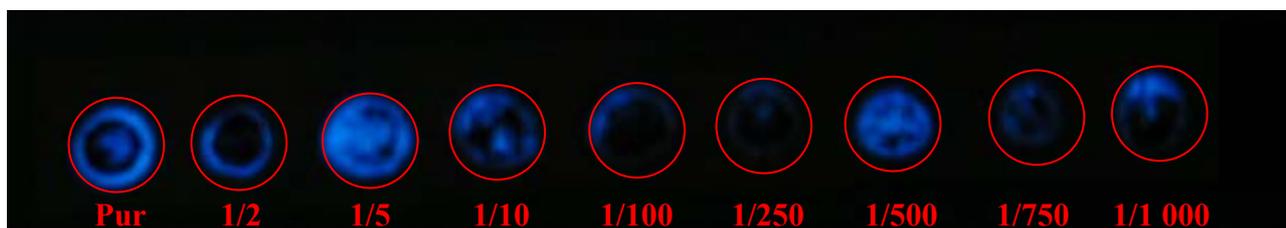
Dilutions 1	1 / 2	1 / 5	1 / 10	1 / 100	1 / 250	1 / 500	1 / 750	1 / 1000
Résultats	Visible à l'œil nu							

Dilutions 2	1 / 2	1 / 5	1 / 10	1 / 100	1 / 250	1 / 500	1 / 750	1 / 1000
Résultats	Visible à l'œil nu							

Photo n°1 : Gamme à la lumière du jour. La photographie présente la répartition des dépôts réalisés sur le drap. Cette photographie met en évidence l'évolution de la coloration des échantillons en fonction de la concentration en sang.



Photo n°2 : La solution de Bluestar est pulvérisée et la photographie est prise immédiatement (t_0).



1.3. Conclusion sur le test n°1 :

- La photographie n°1 permet d'observer la sensibilité jusqu'à une dilution au 1 / 1 000^{ème}.
- Les résultats obtenus avec cette nouvelle formule sont très intéressants, puisqu'ils permettent de mettre en évidence une intensité de chimioluminescence plus intense et une durée d'émission plus longue.
- Dans ces effets, aucun moyen visuel ne nous a permis d'évaluer de l'intensité de chimioluminescence hormis nos yeux. Dans ce contexte et avec réserves, nous pouvons cependant considérer l'intensité de 1/3 supérieure à l'intensité due à la précédente formulation.
- De plus, la détection visuelle de la tache est au moins de 10 minutes dans le cas de taches pures.
- Ces conclusions seront confirmées au point 3, par le test de répétabilité.

2. Test n°2 : Détermination de taches en fonction de leur volume

2.1. Enoncé des manipulations réalisées :

- Réalisation de deux gammes de volumes différents, afin de différencier les macro et les micro taches

Paramètre variant : Le volume de sang déposé.

2.2. Résultats du test n° 2 :

Un génotypage de 8 taches est réalisé (Tache d'une gamme) (cf.paragraphe III pour les résultats de génotypage)

Gamme 1	6 micro gouttes déposées séparément par zone de dépôt	3 micro gouttes superposées	0,5	1	2,5	5
Résultats	Visible à l'œil nu					
Gamme 2	6 micro gouttes déposées séparément par zone de dépôt	3 micro gouttes superposées	0,5	1	2,5	5
Résultats	Visible à l'œil nu					

Photo n°3 : Gamme à la lumière du jour. La photographie présente les dépôts réalisés sur le drap pour différents volumes de dépôts. Cette photographie permet de visualiser de très faibles dépôts. Ici, sur un tissu clair, alors qu'ils seraient invisibles à l'œil nu sur un tissu sombre.

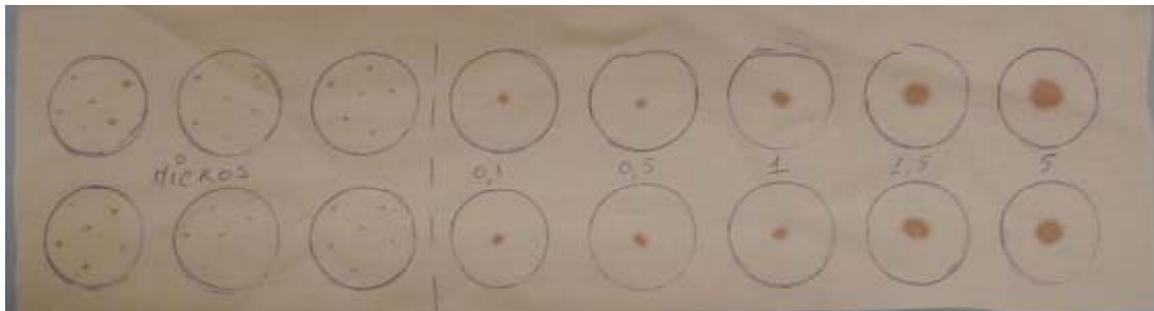
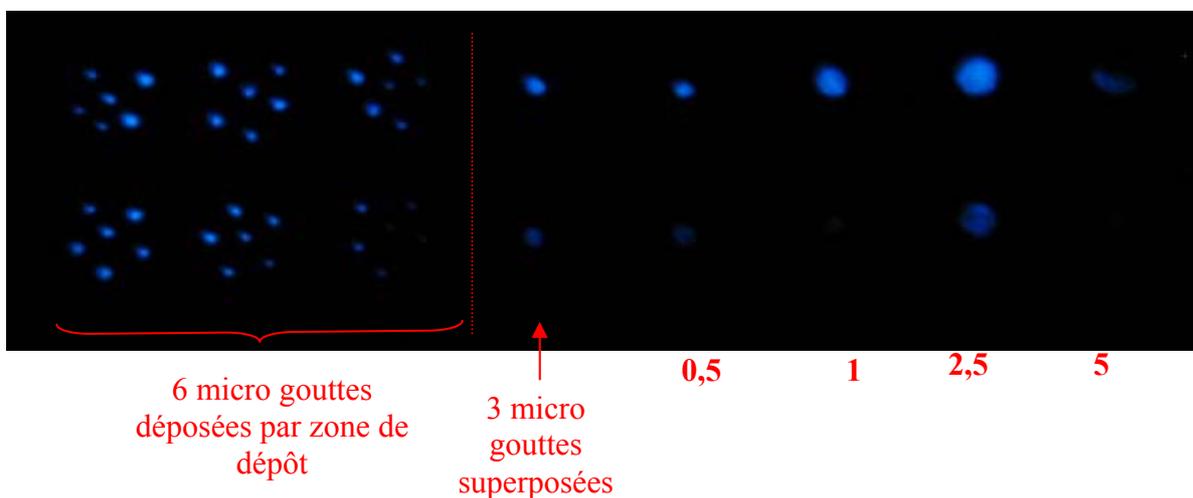


Photo n°4 : Dans le noir, la photographie parle d'elle-même, puisque les micro-taches sont clairement visibles et permettent de manière non ambiguë de mettre en évidence ces dernières.



2.3. Conclusions sur le test n°2 :

- La visualisation de taches ne dépend pas du volume de celle-ci, mais plutôt de la réaction du sang avec le Bluestar. En effet, avec cette nouvelle formulation, la réaction étant plus intense en chimioluminescence et plus longue, cela permet une recherche plus précise des différentes taches et ainsi augmente la probabilité de détection de celles-ci quelque soit le volume de sang déposé (de manière intentionnelle ou non).

3. Test n°3 : Détermination de la répétabilité de la manipulation

3.1. Enoncé des manipulations réalisées :

- Réalisation de 10 taches (20 μ L) de sang pur pour pouvoir tester de la répétabilité de la détection par le Bluestar.

Paramètre variant : La pulvérisation du Bluestar sur le tissu

3.2. Résultats du test n° 3 :

Un génotypage des 10 taches est réalisé, afin de servir de témoin positif (cf. paragraphe III pour les résultats de génotypage)

Photo n°5 : Visualisation de la gamme de répétabilité à la lumière du jour



Photo n°6 : Visualisation de la gamme de répétabilité dans le noir



3.3. Conclusions:

- Les taches, après pulvérisation de la solution de Bluestar, présentent des émissions similaires (intensité et durée de chimioluminescence). L'intensité est nettement plus importante que lors des précédents tests réalisés avec la première formule. Cette intensité n'a pas été évaluée par notre unité, mais objectivement semble être d'un tiers supérieure à la précédente. Pour la durée de la chimioluminescence, nous avons clairement constaté que la luminescence pouvait durer en moyenne 5 à 10 minutes pour les taches pures. Constatations préalablement réalisées dans le test 1.
- Pour pouvoir évaluer de manière plus scientifique l'intensité de luminescence et la durée de luminescence, il serait intéressant de faire des tests supplémentaires.

4. Test n°4 : Détermination de la détection du sang et dépôts d'eau de Javel

4.1. Enoncé des manipulations réalisées :

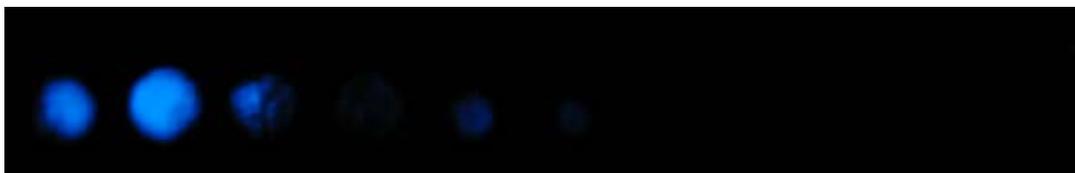
- Réalisation de 9 spots (20 µL) de sang pur + autant d'eau de Javel
- 1 tache avec seulement de l'eau de javel

Paramètre variant : La présence d'eau de Javel

4.2. Résultats du test n° 4 :

Un génotypage des 10 taches est réalisé (cf.paragraphe III pour les résultats de génotypage)

Photo n°7 : Visualisation de la gamme dans le noir



4.3. Conclusions:

- Seules les taches avec le sang ont été visualisées au Bluestar.
- L'eau de Javel qui était un faux positif flagrant, mais distinguable du sang avec la précédente formulation apparaît maintenant de façon tellement faible, qu'il ne fait aucun doute sur sa distinction par rapport au sang.
- De ce fait, l'eau de Javel reste un faux positif, mais avec une ampleur totalement différente vis à vis des précédents essais.

5. Test n°5 : Détermination de la détection du sang après lavage à l'eau de Javel

5.1. Enoncé des manipulations réalisées :

- Réalisation de 21 spots (20 µL) de sang pur + un volume et une concentration donnés d'eau de Javel
- 3 taches avec seulement de l'eau de javel
- Lorsque les taches de sang sont sèches, les dépôts d'eau de javel ont lieu. Lorsque le tout est sec, le tissu est lavé en machine à laver le linge et séché sur un tancarville. Seulement, après ces traitements les tests de Bluestar sont réalisés.

		(1 : 1)	(1 : 2)	(1 : 3)	(1 : 1)	(1 : 2)	(1 : 2)	Pulvérisa- tion
		Javel à 9,6%			Javel à 0,48 %			
Gamme 1	Javel seul	20 µL Sang + 20 µL de javel	20 µL Sang + 40 µL de javel	20 µL Sang + 60 µL de javel	20 µL Sang + 20 µL de javel	20 µL Sang + 40 µL de javel	20 µL Sang + 60 µL de javel	20 µL Sang + pulvérisat°
Gamme 2	Javel seul	20 µL Sang + 20 µL de javel	20 µL Sang + 40 µL de javel	20 µL Sang + 60 µL de javel	20 µL Sang + 20 µL de javel	20 µL Sang + 40 µL de javel	20 µL Sang + 60 µL de javel	20 µL Sang + pulvérisat°
Gamme 3	Javel seul	20 µL Sang + 20 µL de javel	20 µL Sang + 40 µL de javel	20 µL Sang + 60 µL de javel	20 µL Sang + 20 µL de javel	20 µL Sang + 40 µL de javel	20 µL Sang + 60 µL de javel	20 µL Sang + pulvérisat°

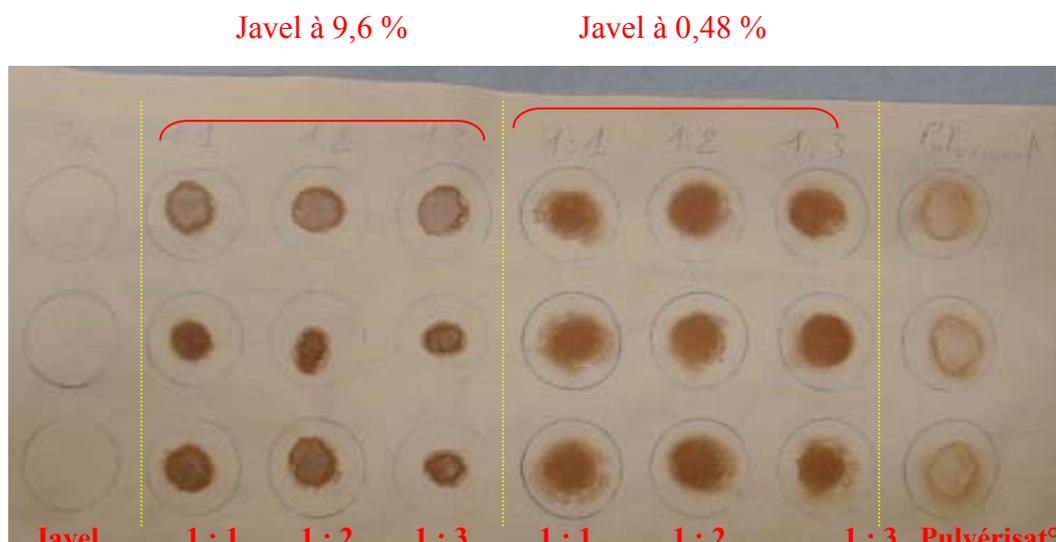
- (1 : 1) : 1 volume de sang + 1 volume d'eau de javel
 (1 : 2) : 1 volume de sang + 2 volumes d'eau de javel
 (1 : 3) : 1 volume de sang + 3 volumes d'eau de javel

Paramètre variant : Le volume et la concentration d'eau de Javel

5.2. Résultats du test n° 5 :

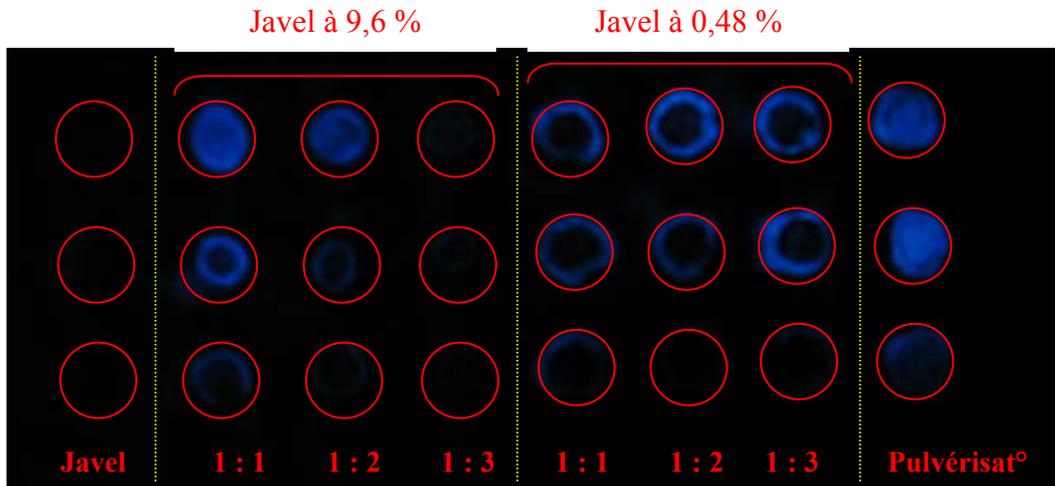
Un génotypage des 24 taches est réalisé (cf.paragraphe III pour les résultats de génotypage)

Photo n°8 : Visualisation de la série de tests à l'eau de Javel. Cette photographie présente le tissu dans son état après lavage en machine à laver le linge (cycle à 40°C – cycle quotidien avec lessive liquide classique)



Ces tests ont été réalisés pour notre laboratoire, afin de corroborer certains résultats antérieurs. Ils n'ont pas été réalisés spécifiquement pour tester cette formule, mais ils apportent des éléments supplémentaires pour cette étude.

Photo n°9 : Visualisation de la série de tests à l'eau de Javel



5.3. Conclusions:

- La photographie n°9 montre clairement l'absence de faux positifs gênant la lecture. Par contre, il est clair que la présence ou non de sang conditionne la chimiluminescence.
- L'eau de Javel fixe le matériel biologique au tissu et par conséquent permet une visualisation à l'œil après lavage en machine à laver le linge des taches rouges dues au sang.
-

III. Résultats de génotypage

Tableau n°1 :

NSD : No Size Data

- : le logiciel n'indique pas No size data, mais ne donne aucun résultat exploitable

A : Amélogénine

	Désignation du prélèvement	Résultats de quantification	Intensité de l'A	Nb de systèmes sans l'A	Remarques
	Témoin positif	> 0	2111	10	
1	Test de répétabilité : sang pur	> 0	774	10	Les 10 systèmes sont exploitables, il n'y a aucune influence du Bluestar sur la détection de sang par le procédé de génotypage
2	Test de répétabilité : sang pur	> 0	771	10	
3	Test de répétabilité : sang pur	< 0	2285	10	
4	Test de répétabilité : sang pur	> 0	5985	10	
5	Test de répétabilité : sang pur	> 0	559	10	
6	Test de répétabilité : sang pur	> 0	2331	10	
7	Test de répétabilité : sang pur	> 0	80	4	
8	Test de répétabilité : sang pur	> 0	798	10	
9	Test de répétabilité : sang pur	> 0	1021	10	
10	Test de répétabilité : sang pur	> 0	537	10	

11	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	1206	10	Les 10 systèmes sont exploitables, il n'y a aucune influence du Javel. La détection de sang par le procédé de génotypage n'est pas remise en question par l'utilisation de ce produit
12	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	669	10	
13	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	719	10	
14	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	2083	10	
15	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	1677	10	
16	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	1375	10	
17	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	2534	10	
18	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	2115	10	
19	Sang + Javel (1 : 1)	> 0	1455	10	
20	Javel seule	< 0	NSD	NSD	
21	Test volume : micro tache	< 0	193	5	
22	Témoin négatif		-	-	
23	Test volume : micro tache	< 0	101	2	Seule la quantité d'ADN affecte le génotypage
24	Test volume : micro tache	< 0	103	1	
25	Test volume : micro tache	< 0	-	1	
26	Test volume : micro tache	< 0	94	2	
27	Test volume : micro tache	< 0	91	2	
28	Test volume : micro tache – 0,1	< 0	268	6	
29	Test volume : micro tache – 0,1	< 0	287	10	
30	Test volume : micro tache – 0,5	< 0	154	6	
31	Test volume : micro tache – 0,5	< 0	315	9	
32	Test volume : micro tache – 1	< 0	480	10	
33	Test volume : micro tache – 1	< 0	493	10	
34	Test volume : micro tache – 2,5	< 0	1242	10	
35	Test volume : micro tache – 2,5	< 0	721	10	
36	Test volume : micro tache – 5	< 0	1546	10	
37	Test volume : micro tache – 5	< 0	NSD	-	
38	Témoin SEB (37)	< 0	NSD	NSD	
39	Test de dilution : Pur	> 0	-	-	Seule la quantité d'ADN affecte le génotypage
40	Test de dilution : 1/2	< 0	1453	10	
41	Test de dilution : 1/5	< 0	169	5	
42	Test de dilution : 1/10	< 0	NSD	NSD	
43	Test de dilution : 1/100	< 0	NSD	NSD	
44	Témoin négatif		-	-	
45	Test de dilution : 1/250	< 0	NSD	NSD	Seule la quantité d'ADN affecte le génotypage
46	Test de dilution : 1/500	< 0	86	2	
47	Test de dilution : 1/750	< 0	NSD	NSD	
48	Test de dilution : 1/1000	< 0	NSD	NSD	
49	Test de dilution : Pur	< 0	1655	10	
50	Test de dilution : 1/2	< 0	359	9	
51	Test de dilution : 1/5	< 0	255	10	
52	Test de dilution : 1/10	< 0	398	9	
53	Test de dilution : 1/100	< 0	87	3	

54	Test de dilution : 1/250	< 0	-	1	Seule la quantité d'ADN affecte le génotypage
55	Test de dilution : 1/500	< 0	NSD	NSD	
56	Test de dilution : 1/750	> 0	NSD	NSD	
57	Test de dilution : 1/1000	> 0	NSD	NSD	
58	Test Javel : pur	< 0	89	-	Pas d'ADN
59	Test Javel : pur	< 0	NSD	NSD	
60	Test Javel : pur	< 0	-	-	
61	Test Javel : (1 : 1) à 9,6 %	< 0	2757	8	L'eau de Javel ne perturbe pas la détection de l'ADN et il n'y a pas d'interactions de celle-ci avec le Bluestar
62	Test Javel : (1 : 1) à 9,6 %	> 0	7170	9	
63	Test Javel : (1 : 1) à 9,6 %	> 0	4572	9	
64	Test Javel : (1 : 2) à 9,6 %	> 0	3012	10	
65	Test Javel : (1 : 2) à 9,6 %	> 0	4025	7	
66	Test Javel : (1 : 2) à 9,6 %	> 0	4697	8	
67	Test Javel : (1 : 3) à 9,6 %	< 0	2107	10	
68	Test Javel : (1 : 3) à 9,6 %	> 0	5519	9	
69	Test Javel : (1 : 3) à 9,6 %	> 0	5642	10	
70	Témoin SEB (68)	< 0	NSD	NSD	
71	Test Javel : (1 : 1) à 0,48 %	< 0	5667	10	L'eau de Javel ne perturbe pas la détection de l'ADN et il n'y a pas d'interactions de celle-ci avec le Bluestar
72	Test Javel : (1 : 1) à 0,48 %	> 0	5466	10	
73	Test Javel : (1 : 1) à 0,48 %	> 0	164	10	
74	Test Javel : (1 : 2) à 0,48 %	> 0	6810	10	
75	Test Javel : (1 : 2) à 0,48 %	> 0	7166	10	
76	Test Javel : (1 : 2) à 0,48 %	> 0	7242	10	
77	Test Javel : (1 : 3) à 0,48 %	> 0	5892	10	
78	Test Javel : (1 : 3) à 0,48 %	> 0	7157	10	
79	Test Javel : (1 : 3) à 0,48 %	> 0	7413	10	
80	Test Javel : pulvérisat° à 0,48 %	> 0	4778	10	
81	Test Javel : pulvérisat° à 0,48 %	< 0	3831	9	
82	Test Javel : pulvérisat° à 0,48 %	< 0	2381	9	
83	Témoin négatif	< 0	-		

3.1. Conclusion :

Le Bluestar n'affecte en rien la détection de l'ADN par génotypage.
Seul le manque d'ADN (du à une dilution) ne permet pas une détection du sang par le Bluestar.

Action	Intervenant	Date	Visa
Rédaction	BA - SRO	09 11 2003	
Vérification	SRO	12 11 2003	
Approbation	OP	12 11 2003	