

# Optimisation des conditions de cycle PCR pour le kit VeriFiler Plus au CERBA : impact sur la qualité des profils ADN

Bapio Valérie Elvira Jean Téléphore BAZIE<sup>1,2\*</sup>,  
Abdou Azaque ZOURE<sup>1,2</sup>, Serge Théophile SOUBEIGA<sup>1,2</sup>,  
Abel Pégdwendé SORGHO<sup>1</sup>, Prosper BADO<sup>1</sup>, Touwendpoulimdé  
Isabelle KIENDREBEOGO<sup>1</sup>, Edwige Tampoubila YELEMKOURE<sup>1</sup>,  
Albert Théophane YONLI<sup>1</sup>, Florencia Wendkuuni DJIGMA<sup>1</sup>,  
Jacques SIMPORE<sup>1</sup>

## Résumé

Introduction : En début 2012, les premiers profils ADN ont été réalisés au CERBA à l'aide du KIT identiFiler Direct qui permettait d'analyser 16 marqueurs. Un peu près de 10 ans après, le nombre de marqueurs analysés est passé à 21. De nos jours dans nos laboratoires ce sont 25 marqueurs qui sont étudiés pour la détermination du profil génétique sur un plateau technique de dernière génération.

Méthode : La méthode actuelle a fait l'objet d'évaluation sur un échantillon de 20 prélèvements. L'objectif générale était d'évaluer la fiabilité de la méthode sur le plateau technique renforcé. La présente étude était transversale, elle a consisté à un prélèvement de sang et de salive sur chacun des 10 sujets volontaires ayant donné librement leur consentement. Les échantillons ont été testés suivant quatre protocoles différents par le nombre de cycles de la PCR multiplex. Les amplicons ont été séquencés à l'aide du Seqstudio de Applied Biosystems. Les données ont été analysées avec le logiciel GeneMapper.

Conclusion : Les protocoles de 25 ; 26 et 27 cycles ont permis d'obtenir de meilleurs résultats avec plus de 90% de profils parfaits. Cette approche pourrait permettre d'optimiser d'autre protocoles pour l'analyse de matrices de diverse nature.

**Mots clés** : Evaluation, profils ADN, Papier FTA, Ecouvillon

---

<sup>1</sup> Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA), 01 BP 364 Ouagadougou 01, Burkina Faso

<sup>2</sup> Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS/CNRST), Laboratoire de Recherche Biomédicale (LaReBio), 03 BP 7192 Ouagadougou 03 ; Burkina Faso

\***Auteur correspondant** : BAZIE Bapio Valérie E.J.T., Tél :+22671274783, [bazievalery@hotmail.fr](mailto:bazievalery@hotmail.fr), <https://orcid.org/0000-0002-6377-5669>

# Optimization Of PCR Cycle Conditions For The Verifiler Plus Kit At CERBA: Impact On DNA Profile Quality

## Abstract

**Introduction :** In early 2012, CERBA conducted its first DNA profiles using the identiFiler Direct KIT, capable of analyzing 16 markers. Nearly a decade later, this number increased to 21 markers. Today, our laboratories analyze 25 markers for genetic profiling using advanced technical platforms.

**Method:**The current method has been validated on 20 samples. The overall aim was to assess the reliability of the method on the enhanced technical platform. The present study was cross-sectional and involved taking blood and saliva samples from each of the 10 voluntary subjects who had freely given their consent. Samples were tested using four different multiplex PCR protocols. Amplicons were sequenced using Applied Biosystems Seqstudio. Data were analyzed using GeneMapper software.

**Conclusion:** Protocols of 25, 26 and 27 cycles produced the best results, with over 90% perfect profiles. This approach could be used to optimize other protocols for the analysis of different samples and matrices.

**Keywords:** Evaluation, DNA profiles, FTA paper, Swab

## Introduction

Au Burkina Faso, les processus courants d'identification des personnes s'appuient sur les documents identitaires et biométriques (1). Ces données s'avèrent très insuffisantes et voir souvent inappropriées quand il s'agit de restes de victimes de catastrophe, d'effondrement de bâtiments, d'éboulement de site d'orpaillage, d'inondation etc (2, 3). Il est alors nécessaire de faire recours à la génétique forensique pour l'établissement de profils génétiques des personnes disparues qui seront comparés contre des profils de référence provenant d'eux même ou de parents proches (4). En la matière, les scènes de crimes ou de catastrophes sont variées et n'offre pas de commodités idéales pour la collecte d'échantillons classiques tel que le sang ou les fluides biologiques pour la détermination du profil ADN. Ce contexte particulier impose l'usage de méthodes adéquates pour le traitement des matrices de scènes de crimes ou de catastrophes pour être des supports de traces biologiques. Toutefois avant qu'une méthode ne soit utilisée en routine pour le traitement d'une matrice dans les laboratoires de génétique médico-légale, elle devrait faire l'objet d'études d'évaluation analytique appropriées dans nos laboratoires afin de maîtriser ses limites dans le but de disposer de résultats fiables (5-7). En début 2012,

les premiers profils ADN ont été réalisés au CERBA à l'aide du KIT Identifiler Direct qui permettait d'analyser 16 marqueurs (8). Un peu près de 10 ans après, le nombre de marqueurs analysés est passé à 21 (9). De nos jours dans nos laboratoires ce sont 25 marqueurs qui sont étudiés pour la détermination du profil génétique sur un plateau technique de dernière génération.

La présente étude avait pour objectif d'optimiser le nombre de cycles de la PCR dans la méthode de détermination du profil ADN par le Kit VeriFiler™ Plus au CERBA, un centre de recherche biomoléculaire au Burkina Faso à partir de prélèvements de matrice de papier filtre FTA et d'écouvillon cotonneux.

## **I. Matériel et méthodes**

### **I.1. Echantillonnage et site de l'étude**

L'étude s'est déroulée dans le laboratoire de génétique moléculaire du Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA) qui dispose d'un plateau technique requis. Le protocole qui a été utilisé est celui décrit par le fabricant qui est assez simple à l'application dans les laboratoires médico-légaux. Les équipements utilisés étaient standardisés et certifiés HID. Les échantillons étaient constitués de 20 prélèvements d'écouvillons buccaux et de 05 prélèvements sanguins réalisés chez les personnes majeures consentantes dont l'anonymat a été requis. Trois contrôles négatifs et deux contrôles positifs ont été utilisés pour l'évaluation. Les prélèvements buccaux ont été réalisés à l'aide d'écouvillons stériles et les prélèvements sanguins à l'aide de papier FTA NUCLEIcard™ (10). Le sang des donneurs a été prélevé sur des tubes EDTA à partir desquels un dépôt de 20 µL a été fait sur le papier FTA. Les dépôts fraîchement réalisés sur le papier FTA étaient séchés sous le poste de sécurité microbiologique (PSM).

### **I.2. Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN à partir des écouvillons stériles et des papiers filtres FTA a été effectuée à l'aide du Kit d'extraction Prep-n-Go™ Buffer for buccal swabs (Applied Biosystems™). Quatre cent (400) µL de tampon Prep-n-Go™ étaient ajoutés à chaque tube échantillon et incubés à 56°C sous agitation pendant 20 minutes selon le protocole du fabricant. L'ADN extrait est conservé à -20°C pour la suite des analyses moléculaires.

Les prélèvements sanguins sur les papiers FTA n'ont pas nécessité d'extraction classique d'ADN. Les NUCLEICard™ contiennent des éléments chimiques qui permettent de libérer l'ADN et de le préserver de la dégradation microbienne. Pour la suite des analyses moléculaires, c'est juste un disque de diamètre 1,2 mm découpé avec l'instrument Harris Micro-Punch qui est introduit dans un milieu réactionnel de 25 µL (11).

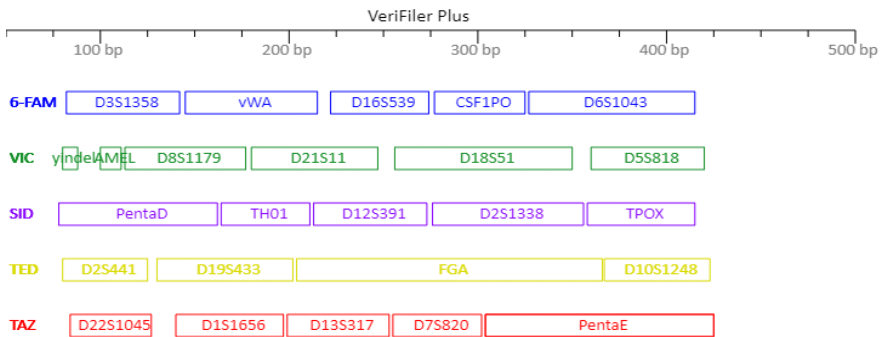
### **I.3. Amplification**

Une amplification multiplexe a été réalisée en utilisant le Kit VeriFiler™ Plus de Applied Biosystems™ qui détecte l'Amelogenin, le Y-indel et 23 marqueurs Short Tandem Repeat (STR) situés les chromosomes. Les études antérieures ont permis de valider ce Kit (12). Les primers utilisés étaient couplés à des Fluorochromes (figure 1). Le standard DS-37 MATRIX STD (DYE SET J6-T) utilisée comprenait cinq fluorochromes ; 6-FAM pour CSF1PO, D16S539, D3S1358, D6S1043 et vWA situés sur 5 chromosomes (3, 5, 6, 12 et 16) ; VIC pour AMEL, D18S51, D21S11, D5S818, D8S1179 et Y indel situé sur 5 chromosomes (5, 8, 18, 21 et Y) ; SID pour D12S391, D2S1338, PentaD, TH01 et TPOX situé sur 4 chromosomes (2, 11, 12, 21) ; TED pour D10S1248, D19S433, D2S441 et FGA situé sur 4 chromosomes (2,4,10,19) ; TAZ pour D13S317, D1S1656, D22S1045, D7S820 et Penta E situé sur 5 chromosomes (1,7, 13,15,22) (13).

L'amplification de l'ADN est réalisée dans un volume réactionnel total de 25 µL. Le mix d'amplification était composé de 5 µL de master mix ; 2,5 µL d'amorces ; 2 µL d'ADN et de l'eau grade biologie moléculaire (14). Un volume de 2 µL d'ADN extrait est ajouté au mix PCR pour l'amplification. L'amplification a été réalisée avec le thermocycleur HID VeritiPro™ de Applied Biosystems™. Le programme d'amplification comprenait une étape de dénaturation initiale à 96 °C pendant 1 minute ; suivi de cycles de (dénaturation à 94 °C pendant 10 secondes, hybridation d'amorces à 59 °C pendant 1 minute et extension à 72 °C pendant 30 secondes) variant entre 24 et 27 et d'une dernière étape finale d'extension à 60 °C pendant 20 minutes (14). L'évaluation a concerné l'optimisation du nombre de cycles et le type de matrice biologique. Tous les échantillons amplifiés ont été conservés à -20 °C à l'abri de la lumière jusqu'à l'étape du séquençage.

## I.4. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire a été réalisée à l'aide du séquenceur SeqStudio™ Genetic Analyzer HID (Applied Biosystems™) utilisant un polymère universelle (POP1) (14). Le milieu réactionnel était constitué de 9,6 µL HiDi Formamide et 0,4 µL de standard GENESCAN-600 LIZ SIZE STD V2.0. Le standard comprenait des références de taille qui variaient entre 60 et 600 bp (Figure 1).



**Figure 1** : Marqueurs couplés aux fluorochromes traceurs (13).

Une plaque de 96 puits a été utilisée pour la migration de l'électrophorèse dans l'analyseur d'ADN SeqStudio™ HID de Applied Biosystems™ validé scientifiquement (15). Un volume de 1µL de produit PCR ou de marqueur allélique était ajouté à 10µL de milieu réactionnel. Une étape de dénaturation de l'ADN était opérée juste avant le début de l'électrophorèse capillaire. Elle consistait à opérer un choc thermique à 96°C pendant 3 minutes dans le but d'avoir des monobrins d'ADN pour l'électrophorèse capillaire. Les paramètres de l'électrophorèse étaient de 5 à 10 secondes pour le temps d'injection et 13 kVolts pour la tension. L'analyseur d'ADN génère des fichiers séquences d'extension « .fsa ». Les fichiers séquences (.fsa) ont été analysés à l'aide du logiciel GeneMapper IDX. Ce logiciel assemble les séquences obtenues et les compare en utilisant les données de l'échelle allélique et du standard afin de générer les profils des allèles présents par marqueur dans chaque échantillon analysé. Chaque individu comporte dans son profil génétique et sur chaque marqueur analysé un allèle provenant de son père et l'autre de sa mère (8, 16). L'inclusion de l'amélogénine dans le kit VeriFiler™ Plus permet ainsi d'établir le profil des gonosomes et d'identifier le sexe de l'individu en question.

### **I.5. Evaluation des seuils de sensibilité, de la répétabilité et de la reproductibilité**

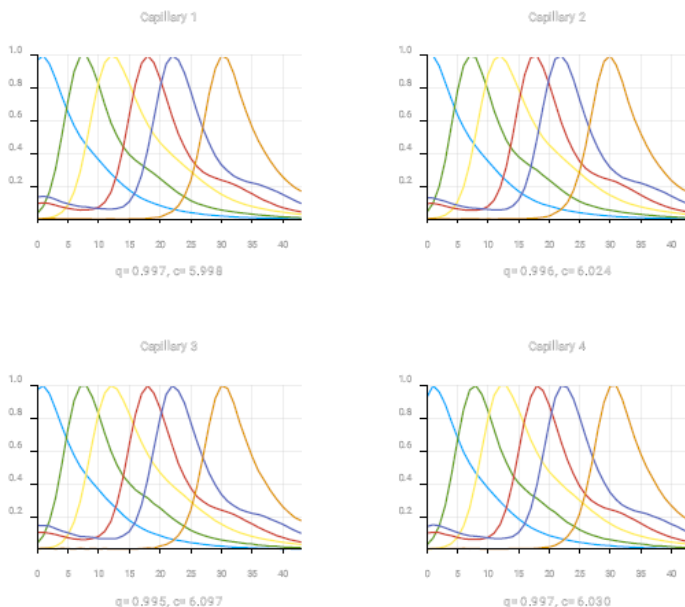
L'évaluation des seuils de détection, de la reproductibilité de la méthode a nécessité des contrôles négatifs et positifs. Les contrôles négatifs étaient constitués de papiers FTA ou d'écouvillons stériles vierges. Les paramètres des seuils de détection ont concerné la détermination des paramètres de limites de détection minimum (LDD) et de la quantification minimum (LDQ). Les contrôles négatifs passés en direct n'ont généré aucun profil, la fluorescence mesurée à blanc a été arrondie et majorée de plus 10 fois la déviation standard pour déterminer les valeurs de limites de détection minimales. Un contrôle positif (référence : DNA 007 positive control) et un marqueur allélique ont été utilisés pour l'interprétation des données et l'évaluation de la répétabilité et la reproductibilité.

### **I.6. Considérations éthiques**

Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité d'éthique institutionnel de l'hôpital Saint Camille/CERBA de Ouagadougou (HOSCO) dans sa délibération N° 2023-05-028 du 05 mai 2023. La confidentialité sur la gestion des données génétiques était de mise.

## **II. Résultats**

La Figure 2 présente les six (06) spectres de calibration des fluorochromes utilisés par le Kit VeriFiler™ Plus. Cette Calibration a été fait avec le standard Matrix DS 37 (J6-T). Les critères de qualité étaient très bons ( $q= 0,99$  et  $c=6$ ).



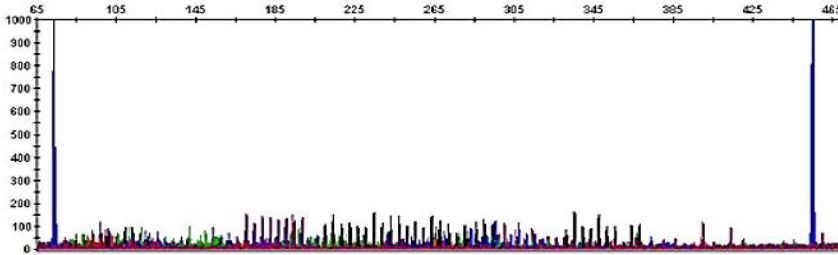
**Figure 2** : Résultats de la calibration spectrale des quatre (04) capillaires. Les protocoles de 25 ; 26 et 27 cycles ont permis d’obtenir de meilleures résultats avec plus de 90% de profils parfaits. Cette approche pourrait permettre de valider d’autres protocoles pour l’analyse d’échantillons et de matrices de diverse nature.

**Tableau I** : Limites seuils de détection des fluorochromes traceurs

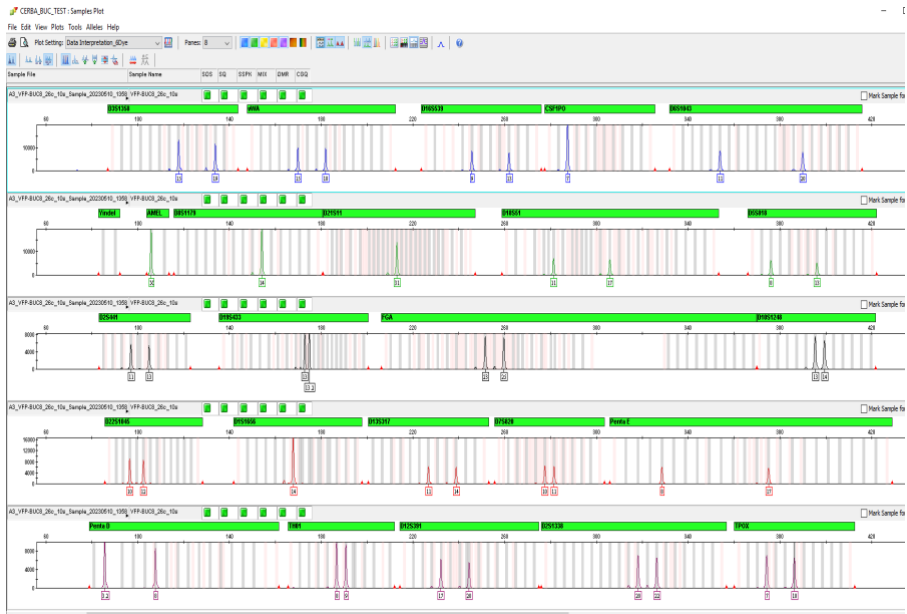
	Seuil minimal	Seuil par défaut de l’analyseur d’ADN
Bleu (6-FAM)	50	175
Vert (VIC)	50	175
Jaune (NED)	35	175
Rouge (TAZ)	40	175
Pourpre (SID)	55	175
Orange (LIZ)	35	175

Légende : L’unité de fluorescence relative (UFR) est utilisée dans l’analyse ADN pour détecter la fluorescence émise par les fluorochromes utilisés comme traceurs dans le tableau I. En se basant sur les résultats du

Tableau I, le seuil de détection de l'analyseur d'ADN par défaut a été fixé à 175 UFR (Figure 3). Tout pic détecté en dessous de cette valeur seuil n'est pas considéré ni étiqueté. Les valeurs des contrôles négatifs et des bruits de fond sont de ce ordre de grandeur.

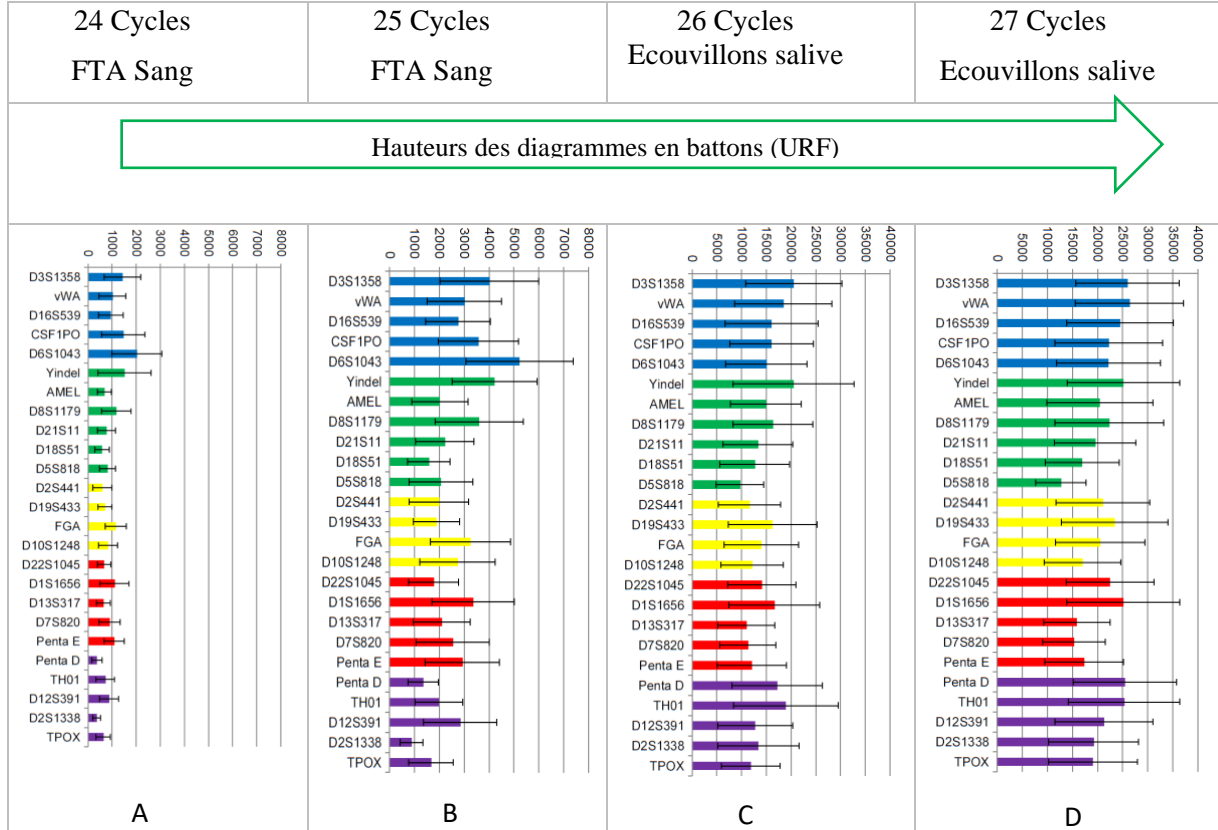


**Figure 3 :** Electrophorègramme des données brutes avec LDQ (175UFR)



**Figure 4 :** Capture d'écran des pics correspondant aux allèles des 25 marqueurs STR du Verifiler

Les 23 marqueurs en dehors de Y-indel et de l'amelogenin comportent majoritairement des allèles à l'état hétérozygote ou homozygote pour la minorité.



**Figure 5** : résultats d'évaluation des cycles d'amplification PCR du sang sur papiers FTA et des écouvillons de salive.

Légende : A : rendement de 50% de profils génétiques parfaits avec des URF maximales de 2000 ; B : rendement de 90% de profils génétiques parfaits avec des URF maximales de plus de 5000 ; C et D : rendement de 100% de profils génétiques parfaits avec des URF de plus de 20000. Ces résultats montrent que pour les FTA-sang la PCR de 25 cycles est meilleure et celles de 26 et 27 cycles conviennent mieux aux écouvillons de salive.

### **III. Discussion**

La présente étude avait pour objectif d'évaluer la méthode de détermination du profil ADN dans le contexte de notre laboratoire de génétique moléculaire au Burkina Faso à partir de prélèvements de matrice de papier filtre et d'écouvillon cotonneux. L'optimisation d'une méthode permet de déterminer les caractéristiques qui lui sont propres et de garantir la fiabilité du résultat selon les lignes directrices du Groupe Scientifique de Travail sur les Méthode d'Analyse de l'ADN (SWGAM) et du fabricant (14, 17, 18). Dans notre étude nous avons procédé à la calibration spectrale avec un standard avant de déterminer la limite de détection (LDD) et la limite de quantification (LDQ) (Figure 3). Le KIT standard matrix DS-37 (J6-T) a été utilisé pour la calibration spectrale. Le KiT DS-37 (J6-T) comprend des fragments d'ADN marqués par six (06) traceurs fluorochromes (J6-T). Il est utilisé pour effectuer la calibration spectrale nécessaire au traitement des échantillons de fragments d'ADN analysés dans les mêmes conditions. Le SeqStudio Hi-Di comprend quatre (04) capillaires servant à l'électrophorèse. Le logiciel de collecte de données du SeqStudio Hi-Di utilise une matrice multi-composante pour analyser automatiquement les 6 échantillons différents marqués par un colorant fluorescent dans un seul capillaire. L'opération de la calibration spectrale n'est pas nécessaire à chaque analyse ; Une fois passée et validée selon les critères d'acceptation du fabricant, elle est appliquée automatiquement aux échantillons analysés dans les même conditions (19). La LDD correspondait à la plus petite concentration détectable avec une incertitude acceptable et la LDQ était la plus petite concentration quantifiable avec une incertitude acceptable (20, 21).

Ainsi, la LDQ la plus petite majorée de 10 fois la déviation standard dans notre étude était de 34,12 et 33,11 RFU pour les fluorochromes (Jaune (NED) et Orange (LIZ) et la plus grande de 54.36 RFU pour le Pourpre (SID). Ces valeurs ont été arrondie par excès au multiple de 5 le plus proche pour correspondre à 35 RFU comme seuil minimal de

détection pour les fluorochromes (Jaune (NED) et Orange (LIZ) et 55 RFU pour le Pourpre (SID) (Tableau I). La faible valeur de la marge montrerait la capacité de l'analyseur à détecter des concentrations extrêmement faibles de l'ordre d'une paire de base « 1bp » (14, 22). Cette force de détection aurait aussi le désavantage d'influencer la spécificité (23). En suivant les lignes directrices du fabricant le seuil par défaut de l'analyseur a été augmenté de 20% au-dessus du seuil minimum soit à 175 RFU pour tous les fluorochromes. A ce seuil de 175 RFU, tout pic enregistré en dessous serait le fait de l'émission spectrale des fluorochromes eux même ou des bruits de fond lorsque l'analyseur d'ADN et le Verifiler Plus sont utilisés en mode directe (Figure 4) (14). La sensibilité analytique du kit VeriFiler Plus permet d'amplifier de très faibles concentration d'ADN de l'ordre de 8 pg d'ADN, avec un taux moyen de succès de 50 % d'allèles attendus (24). Les profils ADN complets peuvent être obtenus avec une concentration de 63 pg d'ADN. Le VerifilerPlus est spécifique à l'ADN humain, il amplifie spécifiquement 23 marqueurs humains d'identification parmi des mélanges et deux marqueurs spécifiques au sexe. Les 23 loci STR autosomiques sont ceux qui sont essentiels à l'identification individuelle et répondant aux exigences des bases de données du CODIS. Leur reproductibilité dans différent contexte témoigne de leur stabilité (25, 26). Dans notre étude l'optimisation des cycles PCR de 24 à 27 sur les matrices de papier FTA-Sang et d'écouvillon de salive a permis d'observer que tous les marqueurs étaient présents lors de la lecture sur l'analyseur d'ADN (Figure4). Ceci démontrerait que toute matrice ou support collecté sur une scène de crime et qui aurait des propriétés physiques similaires au papier FTA ou à l'écouvillon serait une indice que la plateforme du CERBA pourrait prendre en charge pour les profils génétiques (27). L'une des limites des supports sur les scènes de crimes résiderait sur la concentration faible de produits biologiques et la présence de facteurs inhibiteurs (22). Comme démontré précédemment, le Verifiler Plus réduirait ces limites en relevant les défis dans les situations de faible concentration d'ADN, comme le cas des traces biologiques (26). Dans notre contexte la gamme de la concentration a été évaluée en faisant varié le volume de l'ADN extrait entre 2 et 17,5  $\mu$ L dans un volume réactionnel total de 25 $\mu$ L. L'eau grade biologie moléculaire a été en complément à chaque fois en plus du tampon d'amplification. En variant le nombre de cycles dans le sens croissant, on a observé une amélioration de la présence et de l'intensité des pics de manière répétée et reproductible pour chaque marqueur étudié (Figure5). L'absence de certains marqueurs dans les profils dit

« partiel » pourrait s'expliquer par la présence de certains facteurs comme les inhibiteurs. Le KIT Verifiler Plus comporte un système de contrôle de qualité interne qui garantit des résultats fiables, en confirmant la validité des résultats négatifs et en distinguant les échantillons dégradés de ceux contenant des inhibiteurs de l'amplification (28). Cependant dans notre cas, l'influence des inhibiteurs aurait été minimisée parce que l'amélioration du nombre de cycle par matrice utilisé a permis d'améliorer le résultat (22, 29). Nous avons aussi, comparé les génotypes obtenus dans notre étude pour les contrôles positifs de l'ADN de contrôle 007 amplifiés sur chaque plaque au génotypes attendus figurant dans le guide de l'utilisateur du kit d'amplification PCR VeriFiler Plus. La concordance a été observée pour tous les contrôles positifs, cela démontre la reproductibilité du génotype précédemment typé par un autre laboratoire.

Ces résultats obtenus dans notre étude ont pu démontrer que les critères étudiés peuvent être approfondis afin d'élargir l'étude des profils ADN sur d'autre gamme de matrices possibles.

## **Conclusion**

Cette étude a permis d'optimiser scientifiquement au Burkina Faso une méthode de détermination possible du profil ADN à partir de matrice assimilable au papier FTA et à l'écouvillon.

Pour la matrice papier FTA, la méthode comportant la PCR de 25 cycles était meilleure et pour la matrice écouvillon buccal, les méthodes comportant les PCRs de 26 ou 27 cycles étaient bonnes; Ces résultats montrent qu'il y a des possibilités d'évaluation d'autres types de matrices collectées sur les scènes de crimes. Ils pourront donc servir à renforcer les capacités techniques et opérationnelles des services de police scientifique et technique au Burkina Faso. Malgré la robustesse du KIT, les facteurs environnementaux restent un défi et peuvent avoir un impact sur les performances du KIT à détecter l'ADN des Traces. L'évaluation et la validation continue dans divers contextes médico-légaux restent cruciales pour maintenir son efficacité.

## **Déclaration de divulgation**

Aucune déclaration.

## Remerciements

Nous remercions nos collaborateurs techniques, Mohamed CHENAOUI et Mehdi MAHIR qui nous ont accompagné pour la mise en œuvre technique de la présente étude.

## Financement

Le financement de cette étude a été assuré par le Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA).

## Références bibliographiques

- 1.Faso PNdB. CARTE NATIONALE D'IDENTITÉ BURKINABÈ. Ministère de la sécurité. 2024.
- 2.l'Homme CdRslEelDd. Burkina Faso: Un éboulement sur un site d'orpaillage fait 8 morts et plusieurs blessés. Faszine (Burkina Faso). 2016 19 Avr 2016.
- 3.Sten Hagberg LK, Sidy Barry, Yacouba Cissao, Siaka Gnessi, Amado Kaboré, Bintou Koné et Mariatou Zongo. Sécurité par le bas. Perceptions et perspectives citoyennes des défis de sécurité au Burkina Faso. *Anthropologie & développement*. 2019( 2019,):p. 237-40.
- 4.Florence Bellivier & Christine Noiville. Les empreintes génétiques *Lex electronica* 2017:99-112.
- 5.Grappin R. Guide pour l'évaluation des méthodes d'analyses de routine. *Le Lait*. 1976;56(559\_560):608-21 %8 1976.
- 6.Lachimie.fr. Validation d'une méthode d'analyse 2008 [cited 2024 15/072024]. Available from: <https://www.lachimie.fr/analytique/validation-methode.php>.
- 7.Peter MS. Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International*. 2007;165(2):238-43.
- 8.Millogo M, Soubeiga ST, Bazie BVJT, Zohoncon TM, Ouattara AK, Yonli AT, et al. Disputed paternity presumption in Burkina Faso: determination of the biological fathers of children using ABO-rhesus/hemoglobin electrophoresis and STR assays. 2021;19(1):130.
- 9.Télesphore BBVEJ, Soumaïla S, Mahoukèdè` ZT, Ahmadou T, Prosper B, Téophile SS, et al. Molecular Diagnosis of Sexual Differentiation Disorders in Burkina Faso. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2024:1-15.

10. Inc TFS. NUCLEIC-CARD™ matrix, 1 spot: Thermo Fisher Scientific; 2024 [Available from: <https://www.thermofisher.com>].
11. Technologies L. VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit USER GUIDE. ThermoFisher Scientific. 2020;A35495(MAN0017493):8-149.
12. Green R, Elliott JL, Norona W, Go F, Nguyen VT, Ge J, et al. Developmental validation of VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit: A 6-dye multiplex assay designed for casework samples. *Forensic Science International: Genetics*. 2021;53:102494.
13. Group AG. NIST Short Tandem Repeat DNA Internet Database: National Institute of Standards and Technology; 2024 [Available from: <https://strbase.nist.gov/>].
14. Technologies L. SeqStudio™ Genetic Analyzer Instrument and Software USER GUIDE. ThermoFisher Scientific. 2022(MAN0018646):12-263.
15. Giulia Soldati ST, Chiara Saccardo, Francesco Ausania, Domenico De Leo. Internal validation study to assess the SeqStudio™ for human identification's performance. *International Journal of Legal Medicine* 2023;137971–80.
16. Zeye MMJ, Ouedraogo SY, Millogo M, Djigma FW, Zoure AA, Zeba M, et al. Forensic DNA database and criminal investigation in the Sahel region: a need to update the national security policy? *Forensic Sciences Research*. 2024;9(2).
17. VIAL J. Définition de la validation de méthode et outils associés. In: l'ESPCI LEeCad, editor. *Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique: Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI*; 2006.
18. Methods SWGoDA. Validation guidelines for DNA analysis methods. . SWGDAM, Washington, DC2016.
19. Appliedbiosystems. Multi-Capillary DS-37 Matrix Standard (Dye Set J6-T). In: SCIENTIFIC TF, editor. 2016. p. 1-2.
20. Artur W, Edward V. Receiver operating characteristic-curve limits of detection. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2014;100:70-7.

21. Magdalena B, Adam S, Danuta B. Over a century of detection and quantification capabilities in analytical chemistry – Historical overview and trends. *Talanta*. 2014;129:606-16.
22. Technologies L. Improve interpretation results from bone samples. ThermoFisher Scientific. 2020(COL24377 0920):1-6.
23. Bertrand D, Fluss J, Billard C, Ziegler JC. Efficacité, sensibilité, spécificité : comparaison de différents tests de lecture. *L'Année psychologique*. 2010;110(2):299-320.
24. Tay JW, Murakami JA, Cooper PL, Rye MS. Sensitivity and baseline noise of three new generation forensic autosomal STR kits: PowerPlex® Fusion, VeriFiler™ Plus and Investigator® 24plex QS. *Forensic Science International: Reports*. 2019;1:100049.
25. Green R, Elliott JL, Norona W, Go F, Nguyen VT, Ge J, et al. Developmental validation of VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit: A 6-dye multiplex assay designed for casework samples. *Forensic Science International Genetics*. 2021;53:102494.
26. Janaahi NA, Ghafri RA, Qamar SA. Forensic evaluation of VeriFiler™ Plus 6-dye chemistry kit composed of 23 loci with casework samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2019;7(1):892-6.
27. Frédéric O, Daniela M, Ilinca I, Thibault M, Bluma GB, Mark AW. L'usage de papier buvard de type « FTA <sup>TM</sup> Classic » pour la détection et le génotypage du VIH chez des hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes à Montréal (Québec, Canada). 2011;15(6):395-400.
28. Zhong C, Green R, Norona W, Mulero J, Eardley R, Ge J, et al. Applied Biosystems VeriFiler Plus PCR Amplification Kit with internal quality control system provides confident answers with challenging forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2019;7(1):441-3.
29. Stevanovitch A. L'identification individuelle à partir d'ADN et d'ossements : les dessous du travail de la police scientifique. *Corps*. 2019;17(1):199-207.