



Ana Sofia Cabaço Boavida

# Validação de um *kit* de amplificação por PCR: *PowerPlex® Fusion 6C System*, Promega

Tese de mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

Maio de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Sofia Cabaço Boavida

**Validação de um *kit* de amplificação por PCR:  
*PowerPlex® Fusion 6C System*, Promega**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses, realizada sob orientação científica do Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves e da Mestre Lisa Andrade Sampaio

Maio de 2017

---

*“Learning is the only thing the mind  
never exhausts, never fears, and never  
regrets.”*

*Leonardo da Vinci*

---

## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves, coordenador do Mestrado e orientador, por todo o acompanhamento, disponibilidade e por me indicar o Serviço de Genética e Biologia Forenses da delegação do Centro do INMLCF para realizar este trabalho.

À Mestre Lisa Sampaio por ter aceite ser minha orientadora, e me integrar tão bem no Serviço, por todos os conhecimentos que me transmitiu e por todo o acompanhamento ao longo deste trabalho.

À Diretora do Serviço de Genética e Biologia Forenses da delegação do Centro do INMLCF, Dr.ª Maria João Porto, por ter permitido a realização deste trabalho no Serviço e me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar na área da Genética Forense e em ambiente profissional.

Um agradecimento especial à Doutora Vanessa Bogas e à Mestre Nair Gouveia por toda a ajuda, acompanhamento e apoio científico ao longo da realização deste trabalho. A todos os colaboradores do Serviço, Dr. Pedro Brito, Dr.ª Virgínia Lopes, Dr. Armando Serra, Dr.ª Marta São-Bento, Dr.ª Filipa Balsa, Dr.ª Ana Margarida Bento, Patrícia Cunha e Celeste Pato por me terem recebido tão bem e por estarem sempre disponíveis para me ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas.

À minha família, principalmente aos meus pais e à minha avó que ao longo de todo o meu percurso académico me apoiaram e fizeram com que todas as minhas conquistas estivessem mais perto de se realizar.

Ao Pedro Milho por toda a compreensão, ajuda, carinho, força e dedicação prestada ao longo deste trabalho.

Por fim, quero agradecer às minhas amigas Filipa e Rebeca que, mesmo estando distantes, sempre me apoiaram no caminho que escolhi.

Obrigada a todos!

## ÍNDICE

---

---

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas .....	iii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	v
Resumo .....	1
Abstract.....	2
<b>1. Introdução.....</b>	<b>3</b>
1.1. Princípios de Genética Forense: ADN e STRs.....	3
1.2. Amostras em contexto forense .....	5
1.3. Determinação de perfis genéticos .....	6
1.3.1. Extração de ADN .....	6
1.3.2. Quantificação de ADN extraído.....	6
1.3.3. Amplificação de ADN por PCR .....	7
1.3.4. Separação e Detecção do produto amplificado.....	8
1.4. Análise e interpretação de perfis genéticos .....	9
1.4.1. <i>Stutter</i> .....	9
1.4.2. Picos partidos .....	10
1.4.3. Picos extra .....	11
1.4.4. <i>Drop-out</i> .....	11
1.4.5. Microvariantes – Alelos <i>Off-Ladder</i> .....	12
1.4.6. ADN degradado.....	12
1.4.7. Misturas e contaminação .....	13
1.5. Prevenção da Contaminação.....	13
1.6. <i>Kits</i> de amplificação – o <i>kit PowerPlex Fusion® 6C System</i> , Promega .....	14
1.7. Validação de ensaios.....	16
<b>2. Justificação e Objetivos .....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>19</b>
3.1. Amostras .....	19
3.2. Colheita das Amostras .....	19
3.3. Metodologias de extração .....	19
3.3.1. Extração com tampão <i>Prep-n-Go™</i> .....	19

3.3.2. Extração pelo método de <i>Chelex® 100</i> .....	20
3.3.3. Extração automatizada em <i>AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System</i> com o <i>kit PrepFiler Express™</i> .....	20
3.4. Metodologia de quantificação – <i>Kit Quantifiler® Trio DNA Quantification</i> .....	21
3.5. Metodologia de amplificação – <i>Kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> .....	22
3.6. Parâmetros estudados .....	24
3.6.1. Avaliação Indireta .....	24
I - Estudo da especificidade .....	24
II – Limiares analíticos (RFU).....	24
III - Limiares analíticos (concentração) .....	25
IV - Precisão do método .....	25
V - Contaminação.....	25
3.6.2. Avaliação Direta .....	26
I - Comparação com métodos desenvolvidos .....	26
II - Calibração com recurso a padrões conhecidos ou materiais de referência certificados (MRC).....	28
III - Comparações inter-laboratoriais .....	29
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>30</b>
4.1. Avaliação Indireta .....	30
I - Estudo da Especificidade .....	30
II – Limiares Analíticos (RFU) .....	30
III - Limiares analíticos.....	31
IV - Precisão do método.....	33
V - Estudo da contaminação .....	34
4.2 Avaliação direta .....	37
I - Comparação com métodos desenvolvidos.....	37
II - Calibração com recurso a padrões conhecidos ou materiais de referência certificados (MRC).....	37
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>38</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Ligações existentes entre duas cadeias de ADN complementares. ....	3
Figura 2. Estrutura de um STR, exemplo de dois alelos do marcador D8S1179; os alelos são designados de acordo com o número de vezes que se repete a sequência, neste caso, “TCTA” .....	4
Figura 3. Representação esquemática da reação de amplificação por PCR.....	8
Figura 4. Formação de picos stutter com STRs dinucleotídicos (a); Formação de picos stutter com STRs tetranucleotídicos (b). ....	10
Figura 5. Picos partidos, 25% dos fragmentos amplificados não têm o nucleótido adicionado, extensão incompleta.....	10
Figura 6. Esquema representativo de possíveis resultados de amplificação: a) amplificação correta, alelos equilibrados; b) desequilíbrio alélico; c) drop-out alélico. .	11
Figura 7. Eletroferograma característico de uma amplificação com ADN degradado.....	12
Figura 8. <i>Kit comercial PowerPlex® Fusion 6C</i> , Promega, 27 marcadores e 6 canais de cor .....	15
Figura 9. <i>Locus</i> D2S441 para a amostra ChA nas diluições: a) 1:10 – concentração: 0.2001 ng/ $\mu$ L; b) 1:50 – concentração: 0.0255 ng/ $\mu$ L; c) 1:100 – concentração: 0.0230 ng/ $\mu$ L.	33
Figura 10. <i>Locus</i> D12S391 para a amostra ChB nas diluições: a) 1:10 – concentração: 0.0766 ng/ $\mu$ L; b) 1:50 – concentração: 0.0186 ng/ $\mu$ L; c) 1:100 – concentração: 0.0080 ng/ $\mu$ L. ....	34

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela I. Constituição do <i>kit Quantifiler® Trio</i> .....	21
Tabela II. Preparação de amostras para quantificação. ....	22
Tabela III. Constituição do <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> (Promega). ....	22
Tabela IV. Preparação das amostras para reação de amplificação por PCR. ....	23
Tabela V. Programa de amplificação do <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> .....	23
Tabela VI. Preparação de amostras para aplicação em sequenciador automático. ....	23
Tabela VII. Preparação de amostras para reação de amplificação por PCR, para um volume final de 12.5 $\mu$ L .....	26
Tabela VIII. Preparação de amostras para reação de amplificação direta por PCR, segundo o protocolo original. ....	27
Tabela IX. Programa de amplificação do <i>kit PowerPlex® Fusion 6C</i> na forma direta.....	27

Tabela X. Preparação de amostras para reação de amplificação direta por PCR, sem utilização do reagente <i>5X AmpSolution™</i> .....	27
Tabela XI. Tipagem do controlo positivo <i>007 Control DNA</i> . .....	28
Tabela XII. Tipagem do controlo positivo <i>9947A Control DNA</i> .....	29
Tabela XIII. Tipagem do controlo positivo <i>2800M Control DNA</i> .....	29
Tabela XIV. Resultados obtidos em amostras de diferentes espécies animais amplificadas para o <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> . .....	30
Tabela XV. Resultados obtidos para os quartis e amplitude interquartil de cada painel de cor e respetivos limiares analíticos. ....	30
Tabela XVI. Resultados obtidos em amostras de sangue, extraídas pelo método de <i>Chelex® 100</i> , quantificadas e posteriormente amplificadas para o <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina). ....	31
Tabela XVII. Resultados obtidos em amostras de saliva, extraídas por <i>Prep-n-Go™</i> , quantificadas e posteriormente amplificadas para o <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina). ....	32
Tabela XVIII. Resultados obtidos em amostras em forma de mancha de sangue, extraídas por <i>PrepFiler™</i> , quantificadas e posteriormente amplificadas para o <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina). ....	32
Tabela XIX. Resultados obtidos para as amostras A e C e mistura realizada nas diferentes proporções. Amostra A – saliva, extração por <i>Prep-n-Go™</i> , Amostra C – sangue, extração por <i>Chelex® 100</i> .....	35
Tabela XX. Resultados obtidos para todas as misturas analisadas, número de alelos identificados em cada perfil. Na proporção 1:1 foi sempre obtido um perfil de mistura completo. ....	36



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

µL - microlitro

ADN – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – dinucleótidos trifosfatados

ENFSI - *European Network of Forensic Science Institutes* - Rede Europeia de Institutos de Ciências Forenses

FBI – *Federal Bureau of Investigation*

GHEP-ISFG – Grupo de Línguas Espanhola e Portuguesa da *International Society for Forensic Sciences*

INMLCF – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

IPAC – Instituto Português de Acreditação, I.P.

ng - nanograma

ng/µL – concentração em nanogramas por microlitro

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

qPCR – quantificação por PCR em tempo real

RFU – Relative Fluorescent Units – Unidades relativas de fluorescência

SGBF-C – Serviço de Genética e Biologia Forenses, delegação do Centro

STRs – *Short Tandem Repeats*

SWGAM – *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*

UV - Ultravioleta

VNTRs – *Variable Number of Tandem Repeats*

°C – graus Celsius

## RESUMO

---

A análise de perfis genéticos pode ser efetuada através do estudo de ADN nuclear com recurso a vários marcadores polimórficos, nomeadamente *Short Tandem Repeats* (STRs). Os STRs correspondem a curtas sequências de 2 a 7 pares de bases que se repetem ao longo do genoma, permitindo, assim a discriminação entre indivíduos. Através da amplificação de ADN por PCR é possível gerar várias cópias de STRs específicos, para posterior análise dos perfis genéticos.

Para facilitar e rentabilizar os processos de amplificação de ADN, muitos laboratórios forenses recorrem a *kits* de amplificação por PCR. No entanto, para a aplicação de um *kit* no laboratório é necessário que o mesmo seja avaliado e validado de forma a determinar a sua eficácia e aplicabilidade na casuística forense.

Com este trabalho, pretendeu-se descrever os procedimentos e parâmetros utilizados para validar internamente o *kit* de amplificação por PCR *PowerPlex® Fusion 6C*, Promega, para posterior implementação na rotina laboratorial do Serviço de Genética e Biologia Forenses da delegação do Centro (SGBF-C) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF).

O *kit* de amplificação por PCR *PowerPlex® Fusion 6C System*, permite reações de PCR em *multiplex*, através da amplificação simultânea e posterior deteção por fluorescência, de 27 *loci*.

Para proceder à validação interna do *kit PowerPlex® Fusion 6C System* foram estudados diversos parâmetros de validação com recurso a amostras de sangue e saliva, colhidas, voluntariamente, a colaboradores do SGBF-C. O ADN das amostras foi extraído através das metodologias de extração de *Chelex® 100*, *Prep-n-Go™* e *PrepFiler™*, algumas amostras foram quantificadas com o *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification* e todas foram amplificadas com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*. Verificou-se a especificidade e a precisão do método e foram realizados estudos de análise de misturas e contaminação de amostras. Por fim, procedeu-se a alterações ao protocolo original de amplificação do *kit*, no sentido de otimizar a utilização do mesmo na rotina laboratorial do SGBF-C.

Este estudo permitiu caracterizar as principais limitações e vantagens do *kit PowerPlex® Fusion 6C System* para utilização no Laboratório e demonstrar internamente que o mesmo se encontra apto para ser utilizado no SGBF-C. As alterações, efetuadas de acordo com as especificidades do Laboratório, não inviabilizaram os resultados obtidos, contribuindo assim para demonstrar a robustez e a versatilidade do *kit* e, consequentemente, permitir a sua otimização e validação interna.

**Palavras-chave:** Validação, Short Tandem Repeats, PCR, *PowerPlex® Fusion 6C*;

## ABSTRACT

---

The analysis of genetic profiles can be done by studying the nuclear DNA through its variety of polymorphic markers, more specifically with Short Tandem Repeats (STRs). The STRs are short sequences that vary in length from 2 to 7 base pairs that repeat alongside the genome, allowing individual differentiation. Through the PCR amplification method, it is possible to generate several copies of specific STRs for posterior analysis of the genetic profiles.

To speed up and make the proceedings of DNA amplification easier, most forensic laboratories resort to PCR amplification kits, however, to use these kits in the laboratory it is necessary to evaluate and validate them in a way to determine its own efficiency and applicability in the forensic casuistic.

This work aimed at describing the proceedings and parameters used to validate internally the PCR amplification kit, PowerPlex® Fusion 6C by Promega, for posterior implementation in the laboratorial routine of the Forensic Genetic and Biology Service - Central branch (SGBF-C) of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences (INMLCF) in Coimbra, Portugal.

The PowerPlex® Fusion 6C System allows multiplex PCR reactions, through simultaneous amplification and posterior detection by fluorescence of 27 loci.

To proceed with the internal validation of the PowerPlex® Fusion 6C System kit several validation parameters were studied with samples of blood and saliva collected, voluntarily, to the employees of SGBF-C. DNA from the samples was extracted through the extraction methodologies of Chelex® 100, Prep-n-Go™ and PrepFiler™, some samples were quantified with the Quantifiler Trio DNA Quantification kit and all the samples were amplified with the PowerPlex® Fusion 6C System kit. The specificity and precision of the method were verified and analysis studies were also developed for mixtures and contamination of samples. Lastly, some changes to the amplification original protocol of the kit were made to optimize its use in the laboratorial routine of SGBF-C.

This study permitted the characterization of the principal limitations and advantages of the PowerPlex® Fusion 6C System when used in the Laboratory and demonstrate internally that its purpose is fit to use in SGBF-C. All the changes that were done were based in the original protocol and did not made it impossible to obtain results, contributing to demonstrate the robustness and versatility of the kit and consequently permitting its optimization and internal validation.

**Keywords:** Validation, Short Tandem Repeats, PCR, PowerPlex® Fusion 6C;

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PRINCÍPIOS DE GENÉTICA FORENSE: ADN E STRS

O ADN, ácido desoxirribonucleico, encontra-se no núcleo das células, designando-se mais frequentemente por ADN nuclear, existindo também nas mitocôndrias, ADN mitocondrial. De estrutura relativamente simples, esta molécula tem uma estrutura principal composta por uma pentose e um grupo fosfato à qual se liga uma base azotada nitrogenada que é variável entre um conjunto de quatro bases diferentes, a adenina, a timina, a citosina e a guanina. São estas quatro bases que, sob a forma de sequência codificam a informação genética contida no ADN.

A estrutura da molécula de ADN foi descoberta pela primeira vez em 1953, por Watson e Crick, que a descreveram como uma dupla cadeia com um arranjo helicoidal onde cada base apenas se liga, através de ligações de hidrogénio, à sua complementar, isto é, a adenina apenas se liga com a timina e a citosina apenas se liga com a guanina (Figura 1). Assim, sabendo uma das cadeias que constitui a molécula conseguimos definir a sua cadeia complementar (Watson *et al.*, 1953).



Figura 1. Ligações existentes entre duas cadeias de ADN complementares.

Adaptado de: <https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/central-dogma-transcription/a/nucleic-acids>

A informação genética, em sequência, organiza-se dentro do núcleo das células sob a forma de cromossomas, ADN em conjunto com proteínas protetoras, as histonas. Cada célula humana contém 22 pares de cromossomas autossómicos e 1 par de cromossomas sexuais, resultando assim num total de 46 cromossomas. A sequência completa de ADN presente em cada célula designa-se por genoma (Tjio, 1978).

O genoma pode ser dividido em diferentes categorias conforme a sua estrutura e função, existem assim regiões codificantes e regiões não codificantes. As regiões codificantes, os genes, regulam a síntese de proteínas e fazem parte de apenas 1.5% do genoma sendo que 23.5% do genoma é classificado como sequência génica, mas é responsável somente pela regulação genética (Goodwin *et al.*, 2011).

As regiões não codificantes fazem parte de 75% do genoma e são designadas por ADN extragénico, sendo grande parte deste material composto por ADN repetitivo que pode existir intercalado com os genes ou no interior de um gene.

A maior parte do nosso ADN é comum entre indivíduos, apenas uma pequena porção, 0.3%, é variável e altamente polimórfica. Nesta pequena porção de ADN não codificante e variável entre indivíduos existem sequências de ADN com unidades de repetição em *tandem* variáveis, mais especificamente os minissatélites – VNTRs –

*Variable Number of Tandem Repeats* e os microssatélites – STRs – *Short Tandem Repeats*, polimorfismos de estrutura semelhante, também designados por polimorfismos de comprimento. A variação genética individual caracteriza-se, assim, pela sequência da unidade de repetição e pelo número de vezes que essa sequência aparece repetida, resultando em alelos com diferentes comprimentos e consequentemente designados de forma distinta (Figura 2). O local onde se localiza um STR num cromossoma em particular é designado por *locus* (plural: *loci*) sendo os alelos as alternativas possíveis dentro de um mesmo *locus* (Butler, 2012).

Os STRs foram introduzidos na casuística forense em meados de 1990 constituindo atualmente a ferramenta de identificação genética principal em qualquer laboratório forense. Os STRs contêm unidades de repetição que variam entre 2 a 7 pares de bases (pb) em comprimento, sendo os mais usualmente utilizados na genética forense os que têm repetições com 4 a 5 pb (Butler, 2012; Goodwin *et al.*, 2011).

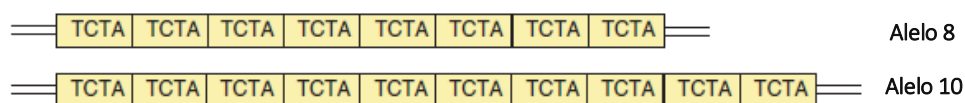


Figura 2. Estrutura de um STR, exemplo de dois alelos do marcador D8S1179; os alelos são designados de acordo com o número de vezes que se repete a sequência, neste caso, “TCTA”.

Adaptado de (Goodwin *et al.*, 2011)

Atualmente existem milhares de marcadores polimórficos caracterizados que podem ser utilizados para identificação genética; quanto maior for o número de marcadores analisados mais discriminante será o perfil genético.

Nos Estados Unidos, o laboratório do *Federal Bureau of Investigation* (FBI) estabeleceu um conjunto de STRs a incluir na base de dados nacional, designada por *Combined DNA Index System* (CODIS). Este conjunto conta com os *loci*: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 e D22S1045 (Hares, 2012).

Relativamente à situação da Europa, existe também um conjunto de *loci*, definido pela Rede Europeia de Institutos de Ciências Forenses (ENFSI), que funciona como o número mínimo de *loci* a determinar para o perfil ser inserido nas bases de dados europeias, este conjunto conta atualmente com 12 *loci* sendo eles: TH01, vWA, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179, D18S51, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 e D12S391 (The Council of the European Union, 2009).

A inserção destes conjuntos de *loci* específicos em bases de dados facilita a partilha de perfis entre as mesmas, promovendo assim a cooperação entre países para resolução de casos forenses.

## 1.2. AMOSTRAS EM CONTEXTO FORENSE

---

Para chegar ao perfil genético e obter os marcadores pretendidos para identificação genética é necessária a realização de várias etapas que vão desde a recolha de uma amostra biológica à análise do perfil genético obtido. Todos os procedimentos realizados em âmbito forense requerem cuidados adequados ao tipo de material que é processado de modo a que se possa obter ADN de qualidade e quantidade suficiente para proceder à sua análise e posterior obtenção do perfil genético (Butler, 2012).

Em Genética Forense existem dois tipos principais de amostra tendo em conta a sua proveniência: as amostras de referência e as amostras de vestígios. Diferentes classificações podem ser atribuídas consoante os critérios de processamento de amostras de cada Laboratório.

Uma amostra de referência é uma amostra que serve de referência a um determinado indivíduo, para determinação do seu perfil genético, sendo geralmente efetuada a sua colheita para fins de comparação. As amostras de referência são normalmente amostras biológicas de sangue e/ou saliva.

Uma amostra de vestígios é uma amostra proveniente de um local de crime ou uma amostra colhida em vítimas de crime. Este tipo de amostra é frequentemente associado a baixas quantidades de ADN podendo conter material genético de origem desconhecida. As amostras de vestígios podem ser amostras biológicas de sangue, saliva, fluídos sexuais, cabelos, tecidos moles, ossos, dentes, entre outros (Corte-Real *et al.*, 2015).

No SGBF-C estes dois tipos de amostras não são processados em conjunto, nem com recurso às mesmas metodologias de extração e a quantificação das amostras também depende do tipo de amostra. Para este efeito, separam-se as amostras em amostras seguras e amostras problema.

As amostras seguras são amostras recolhidas a indivíduos vivos ou cadáveres recentes sem que qualquer processo de decomposição tenha sido iniciado, para determinação do seu perfil genético, consideradas como amostras de referência. Estas amostras, se a colheita for bem efetuada e a amostra armazenada nas condições ideais, apresentam frequentemente quantidade e qualidade de ADN suficiente para a obtenção de um perfil genético completo.

As amostras problema são amostras recolhidas em objetos, indivíduos vivos e/ou cadáveres, cuja quantidade de ADN pode ser muito reduzida e o estado de degradação pode variar, incluindo-se aqui as amostras de vestígios.

Por vezes uma amostra de referência pode não ser considerada segura se a esta se encontrar associado algum tipo de decomposição inerente à própria amostra, devido ao mau armazenamento da amostra, a uma colheita mal efetuada, ou nos casos em que a amostra de referência é colhida a partir de objetos pessoais (Corte-Real *et al.*, 2015; Kobilinsky *et al.*, 2005).

A partir de uma amostra segura de um modo geral é possível obter um perfil genético completo, já de uma amostra problema pode nem sempre ser possível obter um perfil uma vez que estas amostras estão frequentemente sujeitas a fatores ambientais que promovem a sua degradação e a fragmentação do ADN (Alaeddini *et al.*, 2010).

### 1.3. DETERMINAÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS

---

A análise de uma amostra biológica começa com a extração de ADN, seguida da quantificação. Posteriormente, realiza-se a amplificação dos fragmentos de interesse e, por fim, a separação e deteção dos fragmentos. Deste processo resulta um eletroferograma com o perfil genético.

---

#### 1.3.1. EXTRAÇÃO DE ADN

---

A extração de ADN é a primeira fase para análise de uma amostra biológica e tem, como princípios base, a lise celular por forma a expor o ADN, a separação das moléculas de ADN do restante material celular e o seu isolamento para posterior amplificação.

No SGBF-C, diferentes metodologias de extração podem ser realizadas, com base no tipo de amostra e material biológico que se pretende analisar, sendo que para amostras seguras de saliva faz-se uma extração com tampão *Prep-n-Go™*, para amostras seguras de sangue é realizada uma extração pelo método de *Chelex® 100* e para amostras problema faz-se uma extração com o *kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction*, automatizada no equipamento *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System*.

Após a extração, as amostras problema são quantificadas, sendo todas as amostras, posteriormente, amplificadas. Resultados de quantificação podem determinar a não amplificação das respetivas amostras.

---

#### 1.3.2. QUANTIFICAÇÃO DE ADN EXTRAÍDO

---

A quantificação permite determinar a totalidade de ADN humano amplificável, presente numa amostra biológica e deve ser realizada, principalmente em amostras problema, amostras cuja quantidade é mais variável e por vezes muito reduzida, por forma a garantir que existe ADN amplificável suficiente para obtenção de um perfil genético.

Para auxiliar a realização desta etapa, existem *kits* de quantificação como por exemplo o *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification*. Este *kit* tem a vantagem de que permite quantificar simultaneamente a quantidade de ADN humano total e a quantidade de ADN humano de origem exclusivamente masculina numa amostra biológica, utilizando uma tecnologia de quantificação por PCR em tempo real (qPCR) (Applied Biosystems, 2017c).

A técnica de qPCR baseia-se na utilização de sondas que hibridizam com determinadas sequências de interesse do ADN, delimitadas por *primers*. Estas sondas encontram-se marcadas com um fluorocromo, molécula que emite fluorescência, e um *quencher*, molécula que absorve fluorescência.

De um modo geral, podem ocorrer duas situações: 1) quando não existe ADN amplificável, a sonda mantém-se intacta, resultando na absorção da fluorescência do fluorocromo pelo *quencher*; e 2) quando existe ADN amplificável, ocorre hibridização da

sonda com a sequência de ADN, na presença da enzima *Taq polimerase* o ADN é amplificado, o que provoca a clivagem da sonda resultando na emissão de fluorescência. Esta fluorescência é então medida por um sistema ótico, traduzindo a quantidade de ADN presente na amostra (Butler, 2012; Swango *et al.*, 2007).

A quantificação do produto amplificado realiza-se através da comparação com curvas de calibração. Estas curvas de calibração são realizadas no SGBF-C, através da preparação de diluições sucessivas de um *standard* com o tampão de diluição, incluídos no *kit* a utilizar. As curvas de calibração correlacionam a intensidade do sinal de fluorescência que é gerado durante a qPCR, com concentrações conhecidas de uma sequência idêntica à que se pretende quantificar (Applied Biosystems, 2017c).

---

### 1.3.3. AMPLIFICAÇÃO DE ADN POR PCR

---

Descrita no ano de 1985 por Kary Mullis, a reação de PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase, permite a obtenção de ADN em quantidade suficiente para deteção em eletroforese capilar, através da amplificação exponencial das moléculas de ADN presentes em cada amostra biológica em estudo. Sem a capacidade de amplificação de ADN por PCR, a maioria das amostras forenses seriam impossíveis de analisar (Butler, 2012; Mullis *et al.*, 1986).

A reação de PCR é um processo enzimático no qual uma região específica do ADN de interesse, ADN alvo, é replicada inúmeras vezes, de modo a que se obtenham muitas cópias de uma sequência particular. Este processo molecular envolve uma reação que contem além do ADN alvo, uma polimerase (normalmente utilizada a *Taq polimerase*), desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) e um conjunto de *primers* específicos que flanqueiam as regiões de interesse do ADN alvo orientando a polimerase para copiar essa região com a ajuda dos dNTPs (Butler, 2012; Chien *et al.*, 1976; Goodwin *et al.*, 2011).

Numa reação de PCR usual existem aproximadamente 30 ciclos de aquecimento e arrefecimento que se dividem em três etapas principais – desnaturação, hibridização e alongação. Estima-se, teoricamente, que no final de uma reação de PCR, com aproximadamente 30 ciclos, cerca de um bilião de cópias da sequência de ADN alvo terão sido produzidas.

De um modo geral, durante a desnaturação inicial a temperatura da reação é aumentada até  $\pm 95^{\circ}\text{C}$ , causando uma quebra nas ligações de hidrogénio das moléculas de ADN de cadeia dupla, resultando na sua separação em cadeias únicas para amplificação. De seguida na fase de hibridização a temperatura é reduzida até  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ , o que promove a ligação dos *primers* a cada cadeia, devendo estes começar a fazer a sua extensão em sentido oposto um do outro. Por fim, na etapa de extensão a temperatura é aumentada novamente, até  $\pm 72^{\circ}\text{C}$ , temperatura ideal para que a DNA polimerase e os *primers* que hibridizaram com as sequências anteriormente possam fazer a extensão da cadeia incorporando nucleótidos que são complementares à cadeia do ADN alvo (Figura 3) (Butler, 2012; Goodwin *et al.*, 2011).



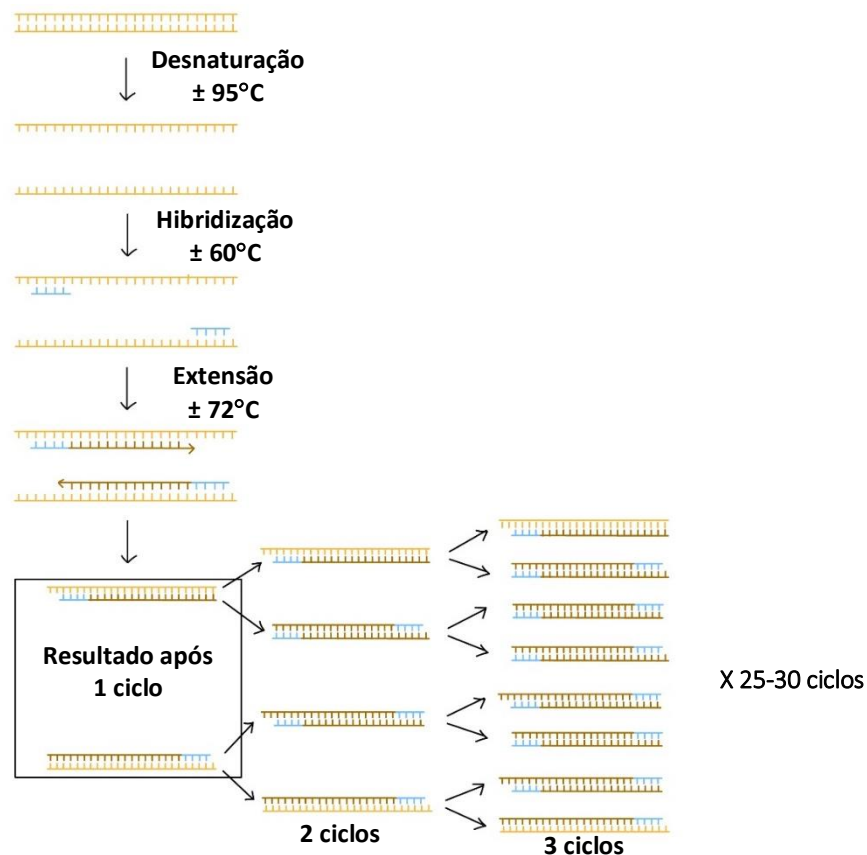


Figura 3. Representação esquemática da reação de amplificação por PCR.

Adaptado de: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

Através da reação de PCR é possível amplificar *loci* múltiplos numa só reação, PCR em *multiplex*, o que nos dá a capacidade de caracterizar vários *loci* em conjunto (Edwards *et al.*, 1994). Esta capacidade de caracterizar vários *loci* em conjunto pode também ser aumentada através do uso de sistemas de marcação por fluorocromos, permitindo a distinção de *loci* de tamanhos (pb) semelhantes através de diferentes marcações. Os *primers* que hibridizam com as sequências de interesse durante a reação de amplificação por PCR são marcados com fluorocromos de diferentes cores, permitindo a sua deteção através da fluorescência que emitem; o eletroferograma que se obtém no final encontra-se organizado por painéis de cor de acordo com o sistema utilizado.

#### 1.3.4. SEPARAÇÃO E DETEÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Após a amplificação dos fragmentos de ADN, utilizando técnicas de PCR, estes têm de ser separados e detetados. Este procedimento é realizado em sequenciadores automáticos.

Os fragmentos amplificados são separados através de eletroforese capilar de acordo com o seu tamanho. As amostras são injetadas no capilar e por meio da ação de um campo elétrico migram através de um polímero. Os fragmentos mais pequenos são os primeiros a migrar e a ser posteriormente detetados (Butler, 2010).

No decurso da eletroforese, os fluorocromos (utilizados na amplificação) presentes nos fragmentos são excitados por um laser de árgon e emitem fluorescência. Esta fluorescência emitida é convertida num sinal eletrónico, proporcional à quantidade de luz emitida e ao número de fluorocromos presentes. Os sinais são posteriormente medidos por *software* apropriado, em unidades relativas de fluorescência (RFU) dando origem aos picos que vemos num eletroferograma.

A informação recolhida é analisada por comparação com um *standard* interno, que funciona como uma espécie de régua, e os fragmentos são organizados por pares de base e divididos em painéis de cor, consoante a leitura da fluorescência. Posteriormente é feita a comparação com o *ladder* alélico, uma mistura artificial de fragmentos que contém os alelos mais comuns presentes na população humana para os diferentes STRs a analisar. O *ladder* faz a genotipagem da amostra, isto é, designa cada alelo em cada marcador analisado e, no final, obtém-se o eletroferograma (Butler, 2012; Moretti *et al.*, 2001).

Antes da análise dos eletroferogramas, em cada Laboratório e dependendo das suas especificações, deve ser definido um limiar analítico (LA), em unidades relativas de fluorescência (RFU), a partir do qual qualquer pico obtido é realmente um produto de PCR. Todos os picos com valores abaixo deste limiar não devem ser considerados como alelos, sendo resultado da própria eletroforese. (Bregu *et al.*, 2013; SWGDAM, 2010).

---

## 1.4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS

---

Após a realização de todas as etapas que levam à obtenção de um perfil genético, é necessário fazer a análise do mesmo e verificar se o perfil obtido se encontra com qualidade, completo ou incompleto.

As técnicas utilizadas para obtenção de perfis genéticos são cada vez mais sensíveis aumentando assim a probabilidade de obtenção de um perfil genético completo, no entanto aumenta-se igualmente a probabilidade do aparecimento de material inespecífico, artefactos, que podem dificultar a análise do perfil genético.

Os artefactos podem estar relacionados com as técnicas utilizadas, com os equipamentos ou até mesmo com a própria amostra (Butler, 2005; Timken *et al.*, 2014).

---

### 1.4.1. STUTTER

---

Durante a amplificação é comum ocorrer a formação de fragmentos que podem ser uma unidade de repetição maior ou menor que o verdadeiro alelo, sendo os últimos os mais frequentes. Estes fragmentos são designados de **picos *stutter*** e ocorrem devido a um deslizamento da ADN polimerase durante a reação de amplificação. Mesmo que o perfil tenha qualidade e no geral se encontre bem amplificado a probabilidade de existirem *stutters* é considerável, no entanto estes picos *stutter* são, na maioria das vezes, facilmente identificáveis pois no geral não correspondem a mais do que 15% da altura do verdadeiro alelo sendo demasiado pequenos para serem valorizados ou identificados como verdadeiros alelos. Apesar de cada *kit* de amplificação recomendar um limiar de *stutter* a ser considerado, o mesmo deve ser, posteriormente, calculado por cada Laboratório.

A formação de picos *stutter* é dependente também do tipo de STR analisado, sendo que STRs com 2 a 3 unidades de repetição têm maior percentagem de formação de *stutter* associada. Já os STRs com 4 a 5 unidades de repetição apresentam uma percentagem muito menor, sendo por isso os mais utilizados para identificação genética (Figura 5).

A formação de *stutters* e o seu tamanho, aumenta também quando se utilizam quantidades de ADN elevadas para amplificação ou quando o número de ciclos da PCR é superior ao recomendado. Estes picos dificultam a interpretação do perfil genético uma vez que poderão ser confundidos com verdadeiros alelos por terem um tamanho superior a 15% do verdadeiro alelo (Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 1996).

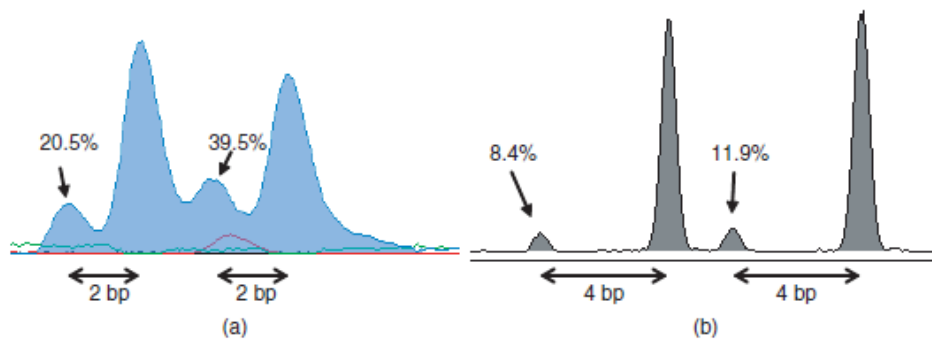


Figura 4. Formação de picos *stutter* com STRs dinucleotídicos (a); Formação de picos *stutter* com STRs tetranucleotídicos (b).

Adaptado de (Goodwin *et al.*, 2011)

#### 1.4.2. PICOS PARTIDOS

Na última etapa da reação de amplificação por PCR, durante a extensão, a polimerase faz a extensão de todos os fragmentos amplificados com um nucleótido que não depende do ADN alvo utilizado como molde, 85% das vezes é adicionada uma adenina ao fim de cada fragmento (A+), no entanto, se houver fragmentos que não tenham esta adição (A-) gera-se um **pico partido** (Figura 6). Geralmente estes picos partidos ocorrem quando existe excesso de ADN na reação de amplificação, podendo este efeito ser minimizado aumentando o tempo de extensão para 45 a 60 min para que a polimerase tenha mais tempo para fazer a extensão de todos os fragmentos.

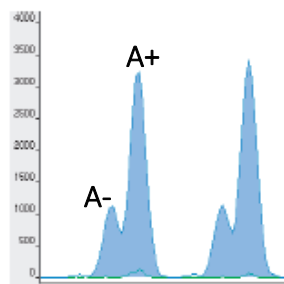


Figura 5. Picos partidos, 25% dos fragmentos amplificados não têm o nucleótido adicionado, extensão incompleta.

Adaptado de (Goodwin *et al.*, 2011)

Os picos partidos podem levar à incorreta atribuição de alelos no perfil genético, no entanto estes picos não devem ser interpretados como verdadeiros alelos pois não apresentam a mesma altura que o alelo verdadeiro e são visíveis ao longo de todo o eletroferograma indicando que o perfil não se encontra bem amplificado (Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2011).

---

#### 1.4.3. PICOS EXTRA

---

Durante a fase de detecção do produto amplificado é utilizada uma matriz, para calibração espectral, que elimina a sobreposição de cores que é gerada no final da eletroforese, dando origem aos diferentes painéis de cor que vemos num eletroferograma. Quando esta matriz não se encontra bem calibrada podem ocorrer **passagens de cor** que resultam em *pull-ups*, picos extra que não correspondem a alelos verdadeiros e aparecem em todos os painéis de cor. Estas passagens de cor podem também ocorrer se houver excesso de ADN, originando um perfil sobrecarregado, no entanto como estes picos aparecem no mesmo local em todos os painéis de cor podem distinguir-se dos verdadeiros alelos (Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2011).

**Picos de corrente elétrica** podem também ser originados quando se amplificam quantidades elevadas de ADN. A morfologia destes picos permite distingui-los de um verdadeiro alelo pois são mais pontiagudos e estreitos, aparecendo em todos os painéis de cor, no mesmo sítio e com a mesma intensidade (Butler, 2010).

---

#### 1.4.4. DROP-OUT

---

Quando existem quantidades baixas de ADN pode ocorrer uma amplificação desigual dos alelos de um *locus* heterozigótico, originando um desequilíbrio. Isto acontece devido à amplificação preferencial de um dos alelos em detrimento do outro (Figura 6b).

Além deste desequilíbrio pode também ocorrer a não amplificação de um dos alelos do *locus* resultando num **drop-out alélico** (Figura 6c). Nestas situações, em termos de interpretação resulta que o perfil aparenta ser homozigótico num *locus* que na verdade é heterozigótico. (Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2011).

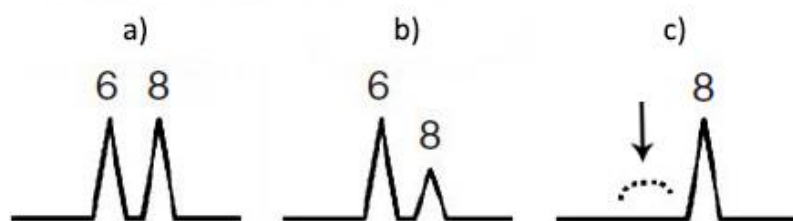


Figura 6. Esquema representativo de possíveis resultados de amplificação: a) amplificação correta, alelos equilibrados; b) desequilíbrio alélico; c) *drop-out* alélico.

Adaptado de (Butler, 2005)

#### 1.4.5. MICROVARIANTES – ALELOS OFF-LADDER

Na população humana são, por vezes, encontrados alelos raros que diferem dos alelos mais comuns para os marcadores analisados apenas por mais ou menos um par de bases, sendo assim designados por alelos microvariantes. As variações nestes alelos podem resultar de inserções, deleções ou trocas de nucleótidos.

Uma vez que os alelos microvariantes não têm o mesmo tamanho (pb) que os alelos mais comuns presentes num determinado *ladder* alélico, normalmente, não são designados, aparecendo no eletroferograma como OL (*Off-Ladder*). Em termos de interpretação, estes alelos não apresentam problemas pois não comprometem o perfil obtido (Butler, 2005).

#### 1.4.6. ADN DEGRADADO

A exposição do ADN a fatores ambientais como a humidade, radiação, variações de temperatura, entre outros, contribui para a sua degradação. A molécula de ADN sofre alterações estruturais e fragmentação, o que dificulta a amplificação por PCR principalmente quando são comprometidas as regiões de ligação dos *primers*, podendo resultar na não amplificação de um ou mais marcadores - *drop-out* (Alaeddini *et al.*, 2010).

Um perfil genético obtido a partir de ADN degradado apresenta uma diminuição da altura dos picos (RFU) à medida que o tamanho dos marcadores (pb) aumenta ao longo do eletroferograma, resultado da amplificação preferencial dos marcadores mais pequenos. O perfil genético é difícil de interpretar uma vez que se encontra desequilibrado, poderá estar incompleto ou apresentar *locus* aparentemente homocigóticos, resultantes do *drop-out* alélico, que na verdade seriam heterocigóticos (Goodwin *et al.*, 2011).

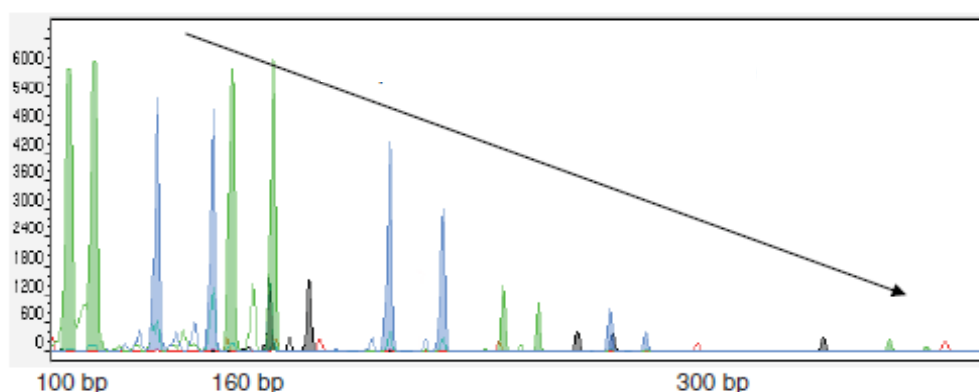


Figura 7. Eletroferograma característico de uma amplificação com ADN degradado.

Adaptado de (Goodwin *et al.*, 2011)

---

### 1.4.7. MISTURAS E CONTAMINAÇÃO

---

Um dos grandes desafios para a análise de perfis de ADN são as amostras de mistura. Este tipo de amostra surge quando existe uma contribuição biológica numa amostra de dois ou mais indivíduos. Além da necessidade de ter amostras de referência de contribuintes da mistura para posterior comparação dos perfis, a interpretação do perfil de mistura em si pode revelar-se muito complexa (Corte-Real *et al.*, 2015).

Um perfil de mistura é normalmente detetado quando se observam no perfil genético mais do que dois alelos por marcador, sendo que no caso de uma mistura com dois contribuintes o número máximo de alelos por marcador será quatro. Um dos primeiros desafios é determinar quais os alelos que pertencem a cada contribuinte sendo que por vezes o mesmo alelo pode ser comum a ambos os contribuintes. É assim por isso importante dispor de um maior número de marcadores a analisar para que haja maior capacidade de discriminação. Outra das limitações nestas amostras é a proporção em que cada contribuinte está presente na amostra, sendo muito mais fácil interpretar o perfil de mistura se os dois contribuintes estiverem presentes em quantidades similares. Nos casos em que há desproporção entre os contribuintes da amostra, o contribuinte minoritário pode por vezes não ser detetado ou apresentar um perfil incompleto. Neste tipo de amostras, os picos *stutter* dificultam muito a interpretação do perfil pois podem ser facilmente confundidos com alelos do perfil minoritário (Butler, 2015; Corte-Real *et al.*, 2015; Kobilinsky *et al.*, 2005).

Tal como as amostras de mistura, a contaminação é também um problema para a análise de perfis genéticos. Uma amostra pode ser contaminada por ADN presente no ambiente que a rodeia, através de contaminação cruzada aquando do processamento de amostras ou contaminada pelo próprio operador da amostra. A contaminação de um perfil genético pode levar a um resultado inconclusivo ou de exclusão, ao comparar a amostra contaminada com a amostra do suspeito ou vítima, o que pode resultar numa decisão injusta, quer a favor do suspeito ou contra a vítima.

A contaminação de amostras pelo operador pode ser reduzida através de práticas de prevenção da contaminação, no entanto, o perfil genético dos colaboradores de um Laboratório deve estar sempre inserido numa base de dados do Laboratório, para que se possa fazer a exclusão de eventuais contaminações (Gill *et al.*, 2004).

---

### 1.5. PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO

---

Como referido anteriormente, a contaminação é uma das maiores limitações na análise de ADN, tanto para a obtenção de perfis válidos como na interpretação de resultados, pelo que devem ser tomadas algumas precauções aquando do manuseamento de amostras.

No SGBF-C existem salas separadas fisicamente para realizar os diferentes procedimentos, duas salas de extração e duas salas de pré-PCR uma para amostras seguras e outra para amostras problema, e uma sala para quantificação, amplificação e posterior deteção do produto amplificado. Esta separação física ajuda também a prevenir a contaminação cruzada entre tipos de amostra e a contaminação entre reagentes dos diferentes procedimentos realizados. As amostras devem seguir sempre uma linha

unidirecional passando pelas salas de extração, quantificação e/ou pré-PCR e por fim, a sala de PCR e produto amplificado sendo que o produto amplificado nunca pode retomar à sala de pré-PCR (Corte-Real *et al.*, 2015).

Também uma prevenção inicial da contaminação deve ser feita pelo operador antes de iniciar qualquer procedimento. Cada sala a utilizar deve ser descontaminada, ligando o UV durante cerca de 10 a 20 minutos para que a sala, as bancadas, as *DNA Workstation*, os materiais e equipamentos a utilizar sejam descontaminados. Além do UV, cada operador deve utilizar bata própria, luvas e máscara, exclusivas de cada sala para que se evite ao máximo a contaminação cruzada.

Em todas as fases de extração, quantificação, amplificação e deteção do produto amplificado está prevista a utilização de controlos negativos para que se possa descartar ou não a hipótese de ter havido contaminação em algum dos procedimentos. Da mesma forma, devem também ser utilizados controlos positivos destinados a confirmar que o método está a produzir os resultados esperados (Butler, 2012).

Todos os equipamentos utilizados, técnicas, materiais e reagentes devem ser registados nas folhas de registo de cada procedimento. Este registo garante a rastreabilidade das amostras e dos procedimentos efetuados, bem como o auxílio ao controlo de reagentes e consumíveis.

## 1.6. KITS DE AMPLIFICAÇÃO – O KIT POWERPLEX FUSION® 6C SYSTEM, PROMEGA

---

A reação de amplificação por PCR tornou-se mais simples com o aparecimento dos primeiros *kits* comerciais de amplificação que contêm todos os reagentes necessários para a sua realização, requerendo apenas que a amostra (ADN alvo) seja adicionada à mistura (Butler, 2012).

O primeiro *kit* comercial disponível, capaz de fazer amplificação em *multiplex* de STRs, foi lançado pela Promega Corporation em 1994; este *kit* continha apenas os *loci* CSF1PO, TPOX e TH01 e era conhecido como CTT triplex. Sendo o único *kit* disponível, apesar do seu baixo poder de identificação, era bastante utilizado devido ao baixo custo associado (Butler, 2012).

Atualmente, existem inúmeros *kits* de amplificação que se adaptam à rotina forense de qualquer Laboratório. No SGBF-C, os *kits* de amplificação são selecionados de acordo com o seu poder de discriminação, sensibilidade e número de marcadores compatíveis com o CODIS e ESS. O Laboratório utiliza *kits* de diferentes casas comerciais como a ThermoFisher Scientific e a Promega Corporation. Para garantir a integridade dos resultados, sempre que possível, a análise das amostras é realizada com dois *kits* de diferentes casas comerciais, para validar os resultados. Esta análise é, atualmente, realizada através dos *kits* *GlobalFiler™ PCR Amplification* (Applied Biosystems, 2017b) e *PowerPlex® 16HS System* (Promega, 2016a).

Recentemente, foi incluído na gama de *kits* do laboratório o *kit* *PowerPlex Fusion® 6C System* da Promega (Figura 8). Este *kit* utiliza um sistema de marcação de 6 fluorocromos, permitindo assim uma maior capacidade de distinção de fragmentos numa só reação. Este *kit* permite a amplificação e deteção por fluorescência dos 20 *loci*



autossómicos incluídos no CODIS (CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045), bem como da Amelogenina, para identificação do género. Os *loci* Penta D, Penta E e SE33 estão também incluídos por forma a aumentar o poder de discriminação e permitir a pesquisa em bases de dados que incluem perfis com estes *loci*. Por fim, contem 3 marcadores específicos do cromossoma Y, DYS391, DYS570 e DYS576, permitindo a atribuição alélica num total de 27 marcadores (Promega, 2016b). Esta extensão de marcadores satisfaz as recomendações tanto do CODIS como do ESS.

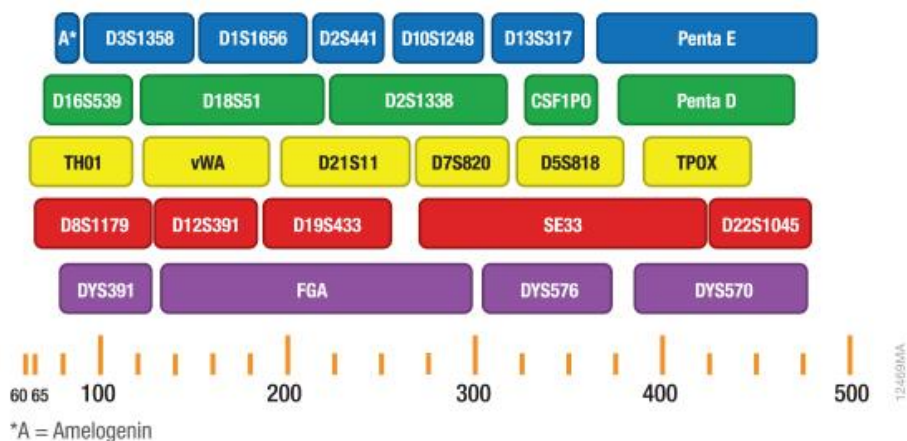


Figura 8. Kit comercial PowerPlex® Fusion 6C, Promega, 27 marcadores e 6 canais de cor

Adaptado de: <https://worldwide.promega.com/products/genetic-identity/str-amplification/powerplex-fusion-str-kits/?tabset0=1>

O facto de possuir 3 Y-STRs é uma vantagem para a análise do perfil genético pois estes marcadores são específicos do cromossoma Y e frequentemente importantes em perfis de mistura masculino/feminino uma vez que, caso existam, podem ser os únicos marcadores detetáveis pertencentes exclusivamente ao contribuinte masculino (Gill *et al.*, 2001).

O *kit* de amplificação por PCR *PowerPlex® 16HS* é atualmente utilizado no laboratório do SGBF-C para amplificação de amostras seguras. Este *kit* contém um sistema de 4 fluorocromos e permite a atribuição alélica num total de 16 marcadores, não estando incluídos todos os marcadores obrigatórios para inserção do perfil numa base de dados segundo o CODIS ou ESS. Assim este *kit* será substituído pelo *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, após a validação, para amplificação de amostras seguras e problema, uma vez que contém todos os marcadores obrigatórios a ser inseridos em bases de dados.

Quando necessária a amplificação de amostras com dois *kits*, serão utilizados preferencialmente os *kits GlobalFiler™ PCR Amplification* e *PowerPlex® Fusion 6C System*. Os dois terão em comum um total de 23 STRs, 3 Y-STRs, 1YIndel e a Amelogenina.

O *kit GlobalFiler™ PCR Amplification*, não apresenta muitas diferenças relativamente ao *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, no entanto, apenas amplifica 24 marcadores; simultaneamente, não contém os dois marcadores altamente polimórficos Penta D e Penta E e os dois marcadores específicos do cromossoma Y, DYS570 e DYS576 que aumentam o poder de discriminação (Applied Biosystems, 2017b; Promega, 2016b).



## 1.7. VALIDAÇÃO DE ENSAIOS

---

No âmbito da genética e biologia forenses são analisados dados provenientes de procedimentos laboratoriais que podem implicar o envolvimento num processo judicial ou uma decisão judicial, pelo que todos os procedimentos devem ser elaborados com precaução, tornando-se imprescindíveis controlos da qualidade dos resultados, dos procedimentos utilizados e da formação dos profissionais.

Assim, surgem os conceitos de Garantia de Qualidade e Controlo de Qualidade. A Garantia de Qualidade reflete-se na garantia de que todos os resultados serão fornecidos com confiança e satisfazem determinados parâmetros de qualidade, já o Controlo de Qualidade aplica-se à rotina laboratorial, incluindo os seus procedimentos, instruções técnicas e instruções de equipamentos efetuados por forma a preencher os requisitos de qualidade (Butler, 2012; Goodwin *et al.*, 2011).

O Laboratório do SGBF-C do INMLCF pertence, desde 2013, ao conjunto de laboratórios acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) no âmbito da atividade laboral que desenvolve, de acordo com a norma internacional de referência NP EN ISO/IEC 17025:2005 - "*Requisitos Gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*". Esta norma apresenta linhas de orientação destinadas a promover as boas práticas laboratoriais, uma melhor qualificação dos profissionais e a adoção de sistemas de gestão e qualidade; especifica também os requisitos gerais para a competência em realizar ensaios.

O facto de o laboratório ser acreditado pelo IPAC, tem algumas vantagens, uma vez que possui referenciais de acreditação internacionais permitindo assim o reconhecimento externo das creditações concedidas. A acreditação segundo a norma prevê alguns requisitos de gestão que passam pelo controlo de documentos, controlo de trabalho de ensaio não conforme (NC), ações corretivas e preventivas, organização do laboratório, a adoção de um sistema de gestão que inclui o manual de qualidade e a política de qualidade; e requisitos técnicos que englobam o pessoal, colaboradores, métodos de ensaio e validação de métodos, equipamento, rastreabilidade das medições, garantia da qualidade dos resultados de ensaio, entre outros (NP EN ISO/IEC 17025, 2005).

Neste âmbito, surge assim a necessidade de validar procedimentos, técnicas, ensaios e equipamentos, conforme as características e o fluxo de trabalho do laboratório. A validação tem como objetivos a uniformização dos métodos e critérios utilizados, para demonstrar que um determinado procedimento tem as características necessárias para obtenção de resultados válidos, que cumprem os requisitos de qualidade e que o novo procedimento é adequado ao fim a que se destina. Quando se pretende fazer a validação de um determinado procedimento, este deve ser descrito e caracterizado para que qualquer colaborador com a preparação adequada o possa executar (Butler, 2012).

No SGBF-C, existe um documento designado "Procedimento Geral – Validação de Ensaios" (PG-SGBF-C-001, 2014) onde são estabelecidos os requisitos mínimos para a validação interna de um novo método de análise de ADN. Este procedimento segue as orientações do *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDM), um grupo de vários cientistas que representam os laboratórios forenses nos Estados Unidos e

Canadá, que publicou *guidelines* de validação para métodos de análise de ADN (SWGDM, 2012).

No procedimento do SGBF-C são abordadas as etapas de validação, a seleção do método e os parâmetros a validar. Em termos de parâmetros, deve ser executada uma avaliação indireta: 1) *Especificidade*; 2) *Limites Analíticos*; 3) *Precisão do Método e Contaminação*; e uma avaliação direta: 1) *Comparação com métodos desenvolvidos*; 2) *Comparações interlaboratoriais* e 3) *Calibração com recurso a materiais de referência certificados (MRC)*.

Antes da comercialização de um novo *kit*, é geralmente feita uma validação do mesmo sendo a validação interna efetuada a partir desta, tendo como base o procedimento original fornecido. É feita uma verificação inicial de que o método funciona, no Laboratório, de acordo com o procedimento original, sendo posteriormente efetuadas alterações ao protocolo e a sua otimização, se aplicável, de acordo com as características do laboratório; as alterações efetuadas são também validadas (ENFSI, 2010).

## 2. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS

---

Os *kits* de amplificação por PCR são utilizados na maioria dos laboratórios forenses, um pouco por todo o mundo. Os resultados provenientes da amplificação com um determinado *kit* influenciam a obtenção de perfis genéticos, ferramenta indispensável para identificação genética, pelo que é importante compreender as características e possíveis limitações inerentes aos *kits* de amplificação aquando da sua utilização no laboratório.

Cada *kit* possui as suas características tal como cada laboratório possui as suas condições, assim torna-se imprescindível avaliar a aptidão do *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, no SGBF-C.

A validação interna de um determinado procedimento é importante porque permite avaliar a segurança, robustez e reprodutibilidade dos resultados, bem como a integridade dos reagentes, equipamentos e protocolos envolvidos, neste caso, no processo de determinação de perfis genéticos de ADN, frequentemente importantes como prova a ser utilizada em processos judiciais.

O *kit* a validar é, atualmente, aceite pela comunidade forense internacional para identificação de perfis genéticos humanos e a sua validação permite demonstrar internamente, através de evidências objetivas, que a sua utilização é adequada ao fim a que se destina.

A comunidade forense e a comunidade em geral, beneficiam sempre com a validação de um procedimento, pois só assim podem ser garantidos os melhores resultados.

### 2.1. OBJETIVO GERAL

---

Descrever os procedimentos e parâmetros utilizados para validar internamente o *kit* de amplificação por PCR *PowerPlex® Fusion 6C System*, Promega, para posterior implementação na rotina laboratorial do SGBF-C do INMLCF.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

1. Verificar a compatibilidade do *kit* com as restantes metodologias de extração e quantificação em utilização no laboratório do SGBF-C;
2. Garantir a especificidade do *kit* para caracterização de ADN humano;
3. Definir os limites de deteção ideais para as amostras da rotina laboratorial;
4. Avaliar a robustez e sensibilidade do *kit*;
5. Avaliar a precisão e capacidade de resolução alélica do *kit*;
6. Testar o *kit* em amostras forenses (misturas, contaminações, amostras degradadas...);
7. Verificar a possibilidade de alterações intrínsecas ao laboratório.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

A componente prática deste trabalho foi realizada no Serviço de Genética e Biologia Forenses – delegação do Centro do INMLCF.

#### 3.1. AMOSTRAS

---

Para a realização do presente trabalho foram colhidas, voluntariamente, amostras de sangue e saliva no SGBF-C, aos colaboradores do serviço. Foram também utilizadas algumas amostras da rotina para validação do *kit* de amplificação por PCR *PowerPlex® Fusion 6C System* da Promega. Nenhuma das amostras foi colhida ou utilizada sem consentimento prévio e a sua utilização no decorrer dos procedimentos laboratoriais foi sempre feita através de códigos de amostra de modo a garantir a anonimização. As amostras não foram utilizadas para qualquer outro fim além do previsto.

#### 3.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS

---

Foram colhidas amostras de sangue e saliva em forma de mancha e zaragatoas bucais. As manchas de saliva foram efetuadas com o auxílio de zaragatoas bucais (4N6 *FLOQSwabs™ Regular*, COPAN™ Flock Technologies) fazendo uma raspagem da mucosa bucal. De seguida foi impregnado o conteúdo num papel FTA para mancha de saliva (*Indicating FTA® Mini Card*, Whatman™) de modo a formar uma pequena mancha.

As manchas de sangue foram efetuadas com auxílio de uma lanceta, dispositivo de punção estéril para uso único (*Accu-Chek® Safe T-Pro® Plus*) sob uma ligeira punção no dedo e de seguida foi impregnado um papel FTA para mancha de sangue (*Human ID Bloodstain Card*, Whatman™) de modo a formar uma pequena mancha.

Por fim as amostras de saliva foram colhidas com auxílio de zaragatoas bucais (*Whatman® FTA® Omni Swab*) fazendo uma raspagem da mucosa bucal.

#### 3.3. METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO

---

##### 3.3.1. EXTRAÇÃO COM TAMPÃO *PREP-N-GO™*

---

A técnica de extração de ADN com o tampão *Prep-n-Go™* é tipicamente utilizada em amostras de saliva, nomeadamente em forma de zaragatoa bucal. Este tampão foi otimizado para reduzir as etapas de extração permitindo assim a amplificação praticamente direta de amostras. A conjugação do tampão *Prep-n-Go™* com temperaturas na ordem dos 90°C promove a lise celular com consequente libertação do ADN e desnaturação das proteínas, protegendo o ADN da degradação (Applied Biosystems, 2015).

Colocou-se um pequeno fragmento da zaragatoa no interior de tubos de *ependorf* de 1.5mL, adicionando a cada um 100µL de tampão *Prep-n-Go™* + 100µL de H<sub>2</sub>O nuclease-free.

As amostras foram colocadas num banho, a 90°C, durante 20 min para ocorrer a lise celular e libertação do ADN. No final, a amostra ficou à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos.

---

### 3.3.2. EXTRAÇÃO PELO MÉTODO DE CHELEX® 100

---

Esta metodologia é tipicamente utilizada para extração de amostras de sangue, nomeadamente manchas de sangue; realizou-se conforme o protocolo descrito por (Walsh *et al.*, 1991). Esta metodologia utiliza uma solução com propriedades captadoras de iões metálicos, a solução resinosa de *Chelex® 100*, que protege o ADN da ação das desoxirribonucleases, impedito a sua degradação.

Assim, cortaram-se as manchas (2 *punchs* com o alicate) para dentro de tubos *ependorf* de 1,5mL, limpando sempre o alicate entre cada amostra (fazendo 2 a 3 *punchs* em papel de mancha limpo). Adicionou-se 1mL de H<sub>2</sub>O *nuclease-free* a cada tubo *ependorf* e deixou-se à temperatura ambiente, durante 30 min, para a eluição do conteúdo da mancha na água.

Após os 30 min os tubos foram centrifugados cerca de 3 minutos (1000-15000 x g).

Com o auxílio de pipetas de *Pasteur* retirou-se o sobrenadante, eliminando-o, deixando apenas no tubo cerca de 30µL. Adicionou-se 170µL da solução *Chelex®* a 5%, aos tubos que contêm as amostras, verificando sempre se existem esferas da resina na ponta antes de adicionar a solução no tubo.

Colocaram-se os tubos no banho, a 56°C, durante 30 min. Decorrido este tempo agitaram-se os tubos no *vortex* a alta velocidade.

Por fim, fez-se uma pequena perfuração na tampa dos tubos e sujeitaram-se os mesmos à ebulição em banho seco cerca de 8 minutos; os tubos foram centrifugados, 3 min (1000-15000 x g).

---

### 3.3.3. EXTRAÇÃO AUTOMATIZADA EM AUTOMATE EXPRESS™ FORENSIC DNA EXTRACTION SYSTEM COM O KIT PREPFILER EXPRESS™

---

Esta metodologia de extração é utilizada para amostras problema e permite a extração de ADN a partir de variados tipos de suporte. O princípio base desta metodologia conjuga a lise celular promovida pelo tampão de lise, juntamente com a ligação da molécula de ADN a um substrato magnético, remoção de potenciais inibidores da PCR e eluição da molécula de ADN purificada e concentrada.

A extração foi realizada com recurso ao *kit PrepFiler Express™*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems, 2017b), e automatizada no equipamento *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System*.

As amostras foram colocadas em colunas *LySep™ Filter Column* e elaborou-se a solução de lise (500µL *PrepFiler™ Lysis Buffer* + 5µL DTT (1M) por amostra) num tubo *Falcon®*. Posteriormente, colocou-se em cada coluna 500µL desta mistura e incubaram-

se as amostras durante 40 min, à temperatura de 70°C, com agitação, no *termomixer*. Durante o período de incubação, preparou-se o equipamento *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* de acordo com as instruções do manual do equipamento (Applied Biosystems, 2017a).

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas 2min a 1000 x g para que o lisado desça através da coluna para o fundo do tubo, ficando assim o suporte da amostra (zaragatoa, papel de mancha...) na coluna e o líquido do lisado no fundo do tubo. Os tubos contendo o lisado foram colocados no equipamento e procedeu-se à extração, que tem duração de aproximadamente 1h.

As amostras passaram por uma série de procedimentos automáticos realizados pelo equipamento, envolvendo: 1) a mistura do lisado com partículas magnéticas e outros reagentes, para subsequente **ligação de ADN às partículas magnéticas**; 2) a separação das partículas magnéticas que contêm ADN do lisado com tampões de lavagem, de modo a remover possíveis inibidores; 3) e por fim, a **eluição do ADN concentrado e purificado** com o tampão de eluição.

### 3.4. METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO – KIT QUANTIFILER® TRIO DNA QUANTIFICATION

A quantificação de ADN foi realizada com o *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification* (Tabela I), de acordo com o protocolo original do fabricante (Applied Biosystems, 2017c).

Tabela I. Constituição do *kit Quantifiler® Trio*.

<b>Reagentes do kit Quantifiler® Trio</b>	• <i>Quantifiler® THP PCR Reaction Mix</i>
	• <i>Quantifiler® Trio Primer Mix</i>
	• <i>Quantifiler® THP DNA Dilution Buffer</i>
	• <i>Quantifiler® THP DNA Standard</i>

Além da curva de calibração, em todas as reações de quantificação, foram utilizados, em duplicado, controlos positivos com diferentes concentrações, nomeadamente 0.1ng/μL, 10ng/μL e 40ng/μL, que permitiram verificar os resultados de quantificação obtidos.

Para a preparação das amostras, procedeu-se então à elaboração de uma mistura com os reagentes *Quantifiler® Trio Primer Mix* e *Quantifiler® Trio PCR Reaction Mix* de acordo com os valores indicados na Tabela II, considerando sempre reações extra para minimizar eventuais erros de pipetagem, sendo posteriormente dispensados 18μL por poço da placa (*Optical 96-Well Reaction Plate*) para quantificação.

Foram adicionados 2μL das amostras e dos controlos positivos nos poços respetivos, perfazendo assim um volume final de 20μL por poço. A organização das amostras foi definida previamente num esquema de placa, feito a partir do *software HID Real-Time PCR Analysis Software* (Applied Biosystems, 2016).

Tabela II. Preparação de amostras para quantificação.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>Quantifiler® Trio Primer Mix</i>	8 µL
<i>Quantifiler® Trio PCR Reaction Mix</i>	10 µL
ADN	2.0 µL
<b>Volume final</b>	<b>20 µL</b>

A placa foi selada com uma película adesiva (*Optical Adhesive Film*) e com o auxílio de um utensílio apropriado, para evitar qualquer rugosidade que possa interferir com a leitura da fluorescência.

Por fim, colocou-se a placa no equipamento *7500 Real-Time PCR System*.

### 3.5. METODOLOGIA DE AMPLIFICAÇÃO – *KIT POWERPLEX® FUSION 6C SYSTEM*

A amplificação de ADN, a partir de amostras extraídas, foi realizada com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, Promega (Tabela III), de acordo com as recomendações do fabricante descritas no manual de utilização (Promega, 2016b).

Tabela III. Constituição do *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega).

Reagentes do <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i>	<b>Reagentes de Pré-Amplificação</b>
	• <i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix</i>
	• <i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>
	• <i>2800M Control DNA, 10ng/µL</i>
	• <i>Water, Amplification Grade</i>
	<b>Reagentes de Pós-Amplificação</b>
• <i>PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix</i>	
• <i>WEN Internal Lane Standard 500</i>	

Preparou-se uma mistura constituída pelos reagentes *PowerPlex® Fusion 6C Master Mix* e *Primer Pair Mix*, com base na Tabela IV, considerando sempre reações extra para minimizar eventuais erros de pipetagem, misturou-se no *vortex* e centrifugou-se a mistura. Distribuíram-se 10µL da mistura por tubos de PCR previamente identificados com o nome, metodologia e data da amostra.

De seguida, adicionou-se a amostra (ADN), cujo o volume pode ser variável:

1. Em amostras seguras, sem quantificação prévia, colocou-se 1µL de amostra;
2. Em amostras problema colocou-se entre 1 a 15µL, consoante os resultados de quantificação;
  - Quando o volume da amostra a colocar não atingiu os 15µL o restante volume foi ajustado com a água incluída no *kit (Water, Amplification Grade)*, de modo a manter constante o volume final da reação.

Tabela IV. Preparação das amostras para reação de amplificação por PCR.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix</i>	5.0 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	5.0 µL
Amostra (ADN)	Até 15 µL
<i>Water, Amplification Grade</i>	Ajustar até perfazer o volume final
<b>Volume final</b>	<b>25 µL</b>

Além das amostras, foram preparados sempre, controlos da reação:

1. Controlo Negativo - 10µL da mistura + 15µL de *Water, Amplification Grade*;
2. Controlo Positivo - 10µL da mistura + 1µL de *2800M Control DNA*, 10ng/µL + 14µL de *Water, Amplification Grade*;

Por fim, colocaram-se as amostras num termociclador (*e.g. Veriti 96-Well Thermal Cycler*, AB), no qual decorreu a reação de amplificação por PCR. O respetivo programa de amplificação utilizado encontra-se descrito na Tabela V.

Tabela V. Programa de amplificação do *kit PowerPlex® Fusion 6C System*.

Incubação Inicial	29 ciclos			Extensão Final	Hold
	Desnaturação	Hibridização			
96°C 1 minuto	96°C 5 segundos	60°C 1 minuto		60°C 10 minutos	4°C ∞

No final da amplificação, preparam-se as amostras para aplicação em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, 2010).

Para aplicação, foi preparada uma nova mistura contendo *WEN ILS 500* e *Hi-Di Formamide*, conforme descrito na Tabela VI, considerando mais uma vez reações extra para prevenir eventuais erros de pipetagem; distribuíram-se 10µL desta mistura pelos poços de uma placa de 96 poços. Foi adicionado 1µL de amostra amplificada por poço respetivo e após as amostras colocou-se no poço seguinte, 1µL de *PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix*.

Tabela VI. Preparação de amostras para aplicação em sequenciador automático.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>WEN Internal Lane Standard 500</i>	0.5 µL
<i>Hi-Di™ Formamide</i>	9.5 µL
Amostra (produto amplificado)	1 µL
<b>Volume final</b>	<b>11 µL</b>



No final, colocou-se a septa a tapar a placa, centrifugou-se e, durante 3 min, desnaturou-se em equipamento próprio a 95°C.

A placa foi colocada no sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer*, onde foi selecionado um tempo de injeção das amostras de 15 segundos. Por fim, obtiveram-se os eletroferogramas, que foram posteriormente analisados com recurso ao *software GeneMapper® ID-X v1.4* (Applied Biosystems, 2012).

## 3.6. PARÂMETROS ESTUDADOS

---

### 3.6.1. AVALIAÇÃO INDIRETA

---

#### I - ESTUDO DA ESPECIFICIDADE

Para comprovar que o *kit* apenas amplifica material genético de origem humana, foram selecionadas 9 amostras (manchas de sangue) de diferentes espécies animais pertencentes às famílias *Canidae*, *Equidae* e *Suidae*. As amostras foram extraídas no equipamento *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* com recurso ao *kit PrepFiler™ Express*, sendo posteriormente amplificadas com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, aplicadas e detetadas em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer*, do qual se obtiveram os respetivos eletroferogramas.

#### II – LIMIARES ANALÍTICOS (RFU)

Por forma a avaliar qual o limiar analítico do método, em unidades relativas de fluorescência (RFU), foram elaborados 16 brancos de eletroforese contendo apenas a mistura para aplicação (0.5 µL WEN ILS 500 + 9.5µL *Hi-Di Formamide*, por amostra), que foram posteriormente distribuídos em duas colunas (16 poços) de uma placa de 96 poços e aplicados em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer*. Feita uma primeira injeção de cada fila, foram feitas mais três re-injeções, alternadamente, de cada fila perfazendo assim um total de 8 injeções, totalizando 64 amostras.

Após a obtenção dos eletroferogramas foi registado o valor em RFU do pico mais alto do ruído de fundo, resultando em diferentes valores para diferentes canais de cor. Os dados foram organizados numa folha de cálculo, por canal de cor e por ordem crescente de valor, eliminaram-se os valores atípicos (*outliers*) e foram calculados os quartis (Q1 e Q3) e amplitude interquartil (IQR) para cada canal de cor.

Utilizando a fórmula de validação proposta pelo Serviço de Biologia do Instituto Nacional de Toxicologia e Ciências Forenses de Barcelona, presente nas recomendações do Grupo de Línguas Espanhola e Portuguesa da *International Society for Forensic Sciences*, calcularam-se os limiares analíticos (LA) para cada canal de cor, excluindo-se o canal do *standard* interno (GHEP-ISFG, 2010).

$$LA = Q3 + 3 \times (IQR)$$

### III - LIMIARES ANALÍTICOS (CONCENTRAÇÃO)

Para definir qual o limiar analítico, em ng/μL, a partir do qual se obtém perfis genéticos completos, foram selecionadas 9 amostras de diferentes materiais biológicos, sangue e saliva, as quais foram extraídas através dos diferentes métodos de extração:

- 3 amostras de saliva extraídas com tampão *Prep-n-Go™*;
- 3 amostras, em forma de mancha de sangue, extraídas pelo método de *Chelex® 100*;
- 3 amostras, em forma de mancha de sangue, extraídas no equipamento *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* com recurso ao *kit PrepFiler™ Express*.

As amostras foram quantificadas com o *kit Quantifiler Trio® DNA Quantification* e diluídas para uma concentração final de aproximadamente 1ng/μL. A partir destas amostras foram depois preparadas diluições seriadas nas proporções de 1:10, 1:50 e 1:100, posteriormente, as amostras diluídas foram também quantificadas.

Todas as amostras e posteriores diluições foram amplificadas com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* e aplicadas em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer* seguindo o protocolo para obtenção dos eletroferogramas.

### IV - PRECISÃO DO MÉTODO

Neste parâmetro procedeu-se à comparação de *ladders* alélicos; foram impressos todos os *ladders* de todas as eletroforeses feitas, durante o processo de validação, e os mesmos foram analisados e validados.

Devido à existência de duas amostras que continham alelos que diferem entre si em apenas um ou dois pares de bases, foi também possível estudar a capacidade de separação / resolução alélica através destas amostras para os marcadores **D2S441** com os alelos 11.3 e 12 e **D12S391** com os alelos 18.3 e 19.

Estas amostras foram utilizadas nos ensaios *III- Limiares* e *V- Contaminação*, pelo que foi possível avaliar estes marcadores em amostras diluídas e em amostras de mistura.

### V - CONTAMINAÇÃO

Foram selecionadas 5 amostras de sangue e saliva, previamente extraídas pelas metodologias de extração descritas.

Em seguida combinaram-se as amostras iniciais num total de 10 misturas diferentes entre si e realizadas em triplicado para diferentes proporções (1:10, 1:1, 10:1) totalizando 30 amostras.

Estas amostras foram depois amplificadas com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, aplicadas em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer* e obtidos os respetivos eletroferogramas.

Este parâmetro foi também estudado com a aplicação de controlos negativos (brancos de amostra) em cada aplicação feita em sequenciador automático. A aplicação de controlos negativos é sempre feita em todas as etapas desde a extração, amplificação e aplicação, deste modo há um controlo da contaminação ao longo de todo o procedimento.

### 3.6.2. AVALIAÇÃO DIRETA

#### I - COMPARAÇÃO COM MÉTODOS DESENVOLVIDOS

Neste parâmetro foram efetuadas algumas alterações ao protocolo original fornecido pelo fabricante por forma a demonstrar se as alterações efetuadas inviabilizam ou não a obtenção de perfis genéticos.

Foi também testada a metodologia de amplificação direta de acordo com o protocolo original e feitas algumas alterações.

##### 1. Redução de Volume

Foram analisadas 24 amostras seguras, da rotina do SGBF-C, sob a forma de zaragoas bucais previamente extraídas com tampão *Prep-n-Go™*. As amostras foram amplificadas por PCR utilizando o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* para um volume final de 25µL (protocolo original recomendado, descrito acima na Tabela IV) e para um volume final de 12.5µL (protocolo adaptado descrito na Tabela VII). A deteção foi realizada em sequenciador automático *3500 Genetic Analyser*, seguida da análise das amostras com *GeneMapper® ID-X Software v1.4*.

Tabela VII. Preparação de amostras para reação de amplificação por PCR, para um volume final de 12.5µL.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>Water, Amplification Grade</i>	Ajustar até perfazer o volume final
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix</i>	2.5 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	2.5 µL
ADN	Até 7.5 µL
<b>Volume final</b>	<b>12.5µL</b>

##### 2. Alteração do número de ciclos

Foram analisadas as mesmas amostras do ponto anterior com redução do volume final para 12.5µL (Tabela VII) mas em conjunto com a redução também do número de ciclos do programa de amplificação, anteriormente de 29 ciclos, para 26 e 27 ciclos, por forma a definir qual destes poderia obter melhores resultados. O restante procedimento, até à obtenção dos eletroferogramas, foi efetuado sem alterações.

### 3. Amplificação Direta

O *kit PowerPlex® Fusion 6C System* permite ainda a amplificação por PCR na forma direta através de manchas de sangue e saliva. Esta opção foi também testada no SGBF-C de acordo com o protocolo original do fabricante (Promega, 2016b). A amplificação na forma direta não requer uma extração prévia da amostra pelo que apenas foi preparada uma mistura conforme descrito na Tabela VIII e adicionado um *punch* de 1.2mm, retirado a partir da mancha de sangue ou saliva, com o auxílio de um *puncher*, a cada tubo de amplificação.

Para este procedimento foram amplificadas diretamente 24 amostras, na forma de mancha, segundo o programa descrito na Tabela IX, recomendado pelo fabricante.

Tabela VIII. Preparação de amostras para reação de amplificação direta por PCR, segundo o protocolo original.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>Water, Amplification Grade</i>	5.0 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix</i>	2.5 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	2.5 µL
<i>5X AmpSolution™ Reagent</i>	2.5 µL
ADN	1 <i>punch</i> de 1.2mm
<b>Volume final</b>	<b>12.5µL</b>

Tabela IX. Programa de amplificação do *kit PowerPlex® Fusion 6C* na forma direta

Incubação Inicial	25 ciclos			Hold
	Desnaturação	Hibridização	Extensão Final	
96°C 1 minuto	96°C 5 segundos	60°C 1 minuto	60°C 10 minutos	4°C ∞

Foi também testada uma alteração na preparação da mistura para amplificação direta, optando-se por retirar o reagente *5X AmpSolution™* e utilizar apenas *Water, Amplification grade* para compensar o restante volume. As mesmas 24 amostras foram amplificadas seguindo o protocolo adaptado que se encontra descrito na Tabela X.

Tabela X. Preparação de amostras para reação de amplificação direta por PCR, sem utilização do reagente *5X AmpSolution™*.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>Water, Amplification Grade</i>	7.5 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix</i>	2.5 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	2.5 µL
ADN	1 <i>punch</i> de 1.2mm
<b>Volume final</b>	<b>12.5µL</b>

As amostras amplificadas com o protocolo original e adaptado foram então aplicadas em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer* e obtidos os eletroferogramas.

Ao protocolo original, para amplificação direta, foram também feitas alterações no sentido de uniformizar as metodologias de amplificação a partir de produto extraído e na forma direta, para amostras seguras. Assim, as mesmas 24 amostras (manchas de sangue e saliva) foram preparadas de acordo com a Tabela X, e amplificadas na forma direta, com aumento do número de ciclos, anteriormente de 25 ciclos, para 26 e 27 e a diminuição do tamanho do punch para 0.5mm, anteriormente de 1.2mm. O restante procedimento, até à obtenção dos eletroferogramas foi efetuado sem alterações.

## II - CALIBRAÇÃO COM RECURSO A PADRÕES CONHECIDOS OU MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS (MRC)

Os controlos incluídos em *kits* de amplificação por PCR são soluções artificiais que contêm uma linha celular masculina, concentração e tipagem conhecidas; uma vez que apenas se pretendem obter resultados qualitativos, isto é, perfis genéticos, estes controlos podem ser utilizados como material de referência, para calibração dos resultados.

Foram então amplificados os controlos *007 Control DNA* com concentração 2ng/μL, *9947A Control DNA* com concentrações 2ng/μL e 10ng/μL e *2800M Control DNA* com concentração 10ng/μL. Nas Tabelas XI, XII e XIII encontram-se as tipagens de cada controlo, respetivamente. Posteriormente, os controlos foram diluídos para uma concentração final de 1ng/μL e os mesmos foram amplificados com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* de acordo com o protocolo adaptado, para um volume final de 12.5μL, e aplicados em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer*.

Tabela XI. Tipagem do controlo positivo *007 Control DNA*.

Amelogenina	D3S1358	D1S1656	D2S441	D10S1248	D13S317	Penta E
XY	15, 16	13, 16	14, 15	12, 15	11	7, 12
D16S539	D18S51	D2S1338	CSF1PO	Penta D	TH01	vWA
9, 10	12, 15	20, 23	11, 12	11, 12	7, 9.3	14, 16
D21S11	D7S820	D5S818	TPOX	D8S1179	D12S391	D19S433
28, 31	7, 12	11	8	12, 13	18, 19	14, 15
SE33	D22S1045	DYS391	FGA	DYS576	DYS570	
17, 25.2	11, 16	11	24, 26	19	17	

Tabela XII. Tipagem do controlo positivo *9947A Control DNA*.

Amelogenina	D3S1358	D1S1656	D2S441	D10S1248	D13S317	Penta E
XX	14, 15	18.3	10, 14	13, 15	11	12, 13
D16S539	D18S51	D2S1338	CSF1PO	Penta D	TH01	vWA
11, 12	15, 19	19, 23	10, 12	12	8, 9.3	17, 18
D21S11	D7S820	D5S818	TPOX	D8S1179	D12S391	D19S433
30	10, 11	11	8	13	18, 20	14, 15
SE33	D22S1045	DYS391	FGA	DYS576	DYS570	
19, 29.2	11, 14	-	23, 24	-	-	

Tabela XIII. Tipagem do controlo positivo *2800M Control DNA*.

Amelogenina	D3S1358	D1S1656	D2S441	D10S1248	D13S317	Penta E
XY	17, 18	12, 13	10, 14	13, 15	9, 11	7, 14
D16S539	D18S51	D2S1338	CSF1PO	Penta D	TH01	vWA
9, 13	16, 18	22, 25	12	12, 13	6, 9.3	16, 19
D21S11	D7S820	D5S818	TPOX	D8S1179	D12S391	D19S433
29, 31.2	8, 11	12	11	14, 15	18, 23	13, 14
SE33	D22S1045	DYS391	FGA	DYS576	DYS570	
15, 16	16	10	20, 23	18	17	

### III - COMPARAÇÕES INTER-LABORATORIAIS

Este parâmetro encontra-se também contemplado no documento interno do SGBF-C, para Validação de Ensaios (PG-SGBF-C-001, 2014).

Desde 2000 que o laboratório participa em exercícios de colaboração para comparação de resultados e análise de polimorfismos de ADN em manchas de sangue e outras amostras biológicas. O exercício, compreende um caso prático de identificação de parentescos, outro teórico e um caso prático forense, sendo desenvolvido pela equipa do GHEP-ISFG. Este exercício de controlo de qualidade, através da obtenção de resultados consenso entre os vários participantes, permite ao SGBF-C garantir resultados corretos, relativamente aos procedimentos laboratoriais utilizados na rotina laboratorial, bem como garantir os resultados da validação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. AVALIAÇÃO INDIRETA

#### I - ESTUDO DA ESPECIFICIDADE

Das 9 amostras amplificadas, após análise dos eletroferogramas verificou-se que para o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* não foram obtidos perfis genéticos para nenhuma das espécies analisadas (Tabela XIV), no entanto em alguns marcadores, relativos a algumas amostras, foram identificados alguns picos.

Tabela XIV. Resultados obtidos em amostras de diferentes espécies animais amplificadas para o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*.

Amostras	Cavalo 1	Cavalo 2	Cavalo 3	Cavalo 4	Suíno 2	Suíno 4	Suíno 8	Canídeo 1	Canídeo 2
<i>PowerPlex® Fusion 6C</i>	OK alguns picos	OK	OK	OK	OK	OK alguns picos	OK alguns picos	OK	OK

OK: ausência de amplificação em qualquer um dos marcadores analisados.

#### II – LIMIARES ANALÍTICOS (RFU)

Das 64 amostras analisadas, foram retiradas 4 dos cálculos por conterem valores muito discrepantes (*outliers*), perfazendo um total de 60 amostras. A Tabela XV sumariza os valores do primeiro (Q1) e terceiro quartis (Q3) de cada canal de cor (azul, verde, amarelo, vermelho e roxo), a amplitude interquartil (IQR) dos mesmos e os valores obtidos para o cálculo dos Limiares Analíticos (LA). Os valores de LA foram calculados segundo a fórmula de validação do GHEP-ISFG.

$$LA = Q3 + 3 \times (IQR)$$

Tabela XV. Resultados obtidos para os quartis e amplitude interquartil de cada painel de cor e respectivos limiares analíticos.

	AZUL	VERDE	AMARELO	VERMELHO	ROXO
Q1=	10,5	23	57	21	53
Q3=	14	31	74	27,5	66,5
IQR=	3,5	8	17	6,5	13,5
LA=	24,5	55	<u>125</u>	47	107

Os valores de LA gerados são diferentes para cada canal de cor, no entanto pretende-se definir um limiar para utilizar em todos os canais, o valor a utilizar seria o de 125 RFU, correspondente ao canal de cor amarelo, uma vez que é o valor mais alto apresentado.

Os valores de LA podem também ser calculados segundo outras fórmulas, no entanto optou-se por utilizar a fórmula proposta pelo GHEP-ISFG por aproximação ao efetuado com os restantes *kits* utilizados no SGBF-C. Assim, uma vez que a definição deste valor é flexível, foi decidido aproximar o valor obtido para 120 RFU, numa medida ainda mais conservadora, de modo a aumentar a garantia de identificar todos os alelos presentes nas amostras.

### III - LIMIARES ANALÍTICOS

Para as amostras analisadas não foi possível obter consistência nos resultados obtidos. Variações inerentes ao tipo de amostra e ao método de extração utilizado podem justificar a dificuldade em definir uma relação entre os resultados obtidos. Os resultados de quantificação e o número de marcadores presentes nos eletroferogramas obtidos através da análise das amostras encontram-se nas Tabelas XVI, XVII e XVIII. Uma vez que o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* contém 3 marcadores alélicos exclusivos do cromossoma Y, nas amostras com perfil genético feminino apenas irão ser contabilizados os marcadores comuns a ambos os géneros (24), e nas amostras com perfil genético masculino serão contabilizados todos os marcadores (27).

Tabela XVI. Resultados obtidos em amostras de sangue, extraídas pelo método de *Chelex® 100*, quantificadas e posteriormente amplificadas para o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina).

Amostra	Quantificação (ng/μL)	Resultados 15"	Resultados 40"
ChA	1.2587	24/24	-
ChA 1:10	0.2001	24/24	-
ChA 1:50	0.0255	24/24	-
ChA 1:100	0.0230	24/24	-
ChB	0.8094	24/24	-
ChB 1:10	0.0766	24/24	-
ChB 1:50	0.0186	24/24	-
ChB 1:100	0.0080	24/24	-
ChC	0.8794	24/24	-
ChC 1:10	0.0813	24/24	-
ChC 1:50	0.0157	24/24	-
ChC 1:100	0.0074	21/24	24/24

Após a análise da Tabela XVI, é possível verificar que foi possível obter um perfil **completo** até concentrações de **0.0080 ng/μL**.

Para concentrações de ADN abaixo de **0.0074 ng/μL** a deteção dos marcadores pode ficar comprometida. Contudo aumentando o tempo de injeção para **40s**, foi possível obter um perfil **completo dessa mesma amostra**.



Tabela XVII. Resultados obtidos em amostras de saliva, extraídas por *Prep-n-Go™*, quantificadas e posteriormente amplificadas para o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina).

Amostra	Quantificação (ng/μL)	Resultados 15"	Resultados 40"
PgA	0.7227	27/27	-
PgA 1:10	0.0974	27/27	-
PgA 1:50	0.0167	26/27	27/27
PgA 1:100	0.0077	22/27	27/27
PgB	1.2884	24/24	-
PgB 1:10	0.0889	24/24	-
PgB 1:50	0.0164	22/24	24/24
PgB 1:100	0.0073	17/24	23/24
PgC	0.9519	24/24	-
PgC 1:10	0.0757	24/24	-
PgC 1:50	0.0133	22/24	24/24
PgC 1:100	0.0069	15/24	22/24

Após a análise da Tabela XVII, é possível verificar que foi possível obter um perfil **completo** até à proporção 1:10 (inclusive), para concentrações de **0.0757 ng/μL**.

Para concentrações de ADN abaixo de **0.0167ng/μL**, a deteção dos marcadores pode ficar comprometida, a partir da proporção 1:50. Contudo, aumentando o tempo de injeção para **40s**, foi possível obter um perfil **completo** para todas as amostras com exceção das amostras PgB 1:100 PgC 1:100.

Tabela XVIII. Resultados obtidos em amostras em forma de mancha de sangue, extraídas por *PrepFiler™*, quantificadas e posteriormente amplificadas para o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina).

Amostra	Quantificação (ng/μL)	Resultados 15"	Resultados 40"
ContA	0.8125	24/24	-
ContA 1:10	0.0874	24/24	-
ContA 1:50	0.0175	19/24	24/24
ContA 1:100	0.0060	6/24	15/24
ContB	1.3537	24/24	-
ContB 1:10	0.1113	24/24	-
ContB 1:50	0.0245	18/24	23/24
ContB 1:100	0.0119	10/24	23/24
ContC	1.5033	27/27	-
ContC 1:10	0.1290	27/27	-
ContC 1:50	0.0244	26/27	27/27
ContC 1:100	0.0103	20/27	26/27

Após a análise da Tabela XVIII, é possível verificar que foi possível obter um perfil **completo** até à proporção 1:10 (inclusive). Para concentrações de ADN abaixo de **0.0245 ng/μL** a detecção dos marcadores pode ficar comprometida, a partir da proporção 1:50. Aumentando o tempo de injeção para **40s**, foi possível obter um perfil completo apenas para uma das amostras.

#### IV - PRECISÃO DO MÉTODO

Este parâmetro foi avaliado com base nos resultados de precisão dos *ladders* alélicos aplicados em cada eletroforese elaborada durante o processo de validação. Após a separação e detecção de 18 *ladders* verificou-se que todos eles apresentam claramente todos os alelos corretamente atribuídos e bem definidos com alturas consideráveis e valorizáveis garantindo assim a precisão do método e a validade dos resultados.

Nas seguintes imagens são apresentados painéis de eletroferogramas das amostras que contêm o *locus* **D2S441** com os alelos 11.3 e 12 (Figura 9) e o *locus* **D12S391** com os alelos 18.3 e 19 (Figura 10). As amostras apresentadas estão diluídas nas proporções 1:10 (Figuras 9a e 10a), 1:50 (Figuras 9b e 10b) e 1:100 (Figuras 9c e 10c).

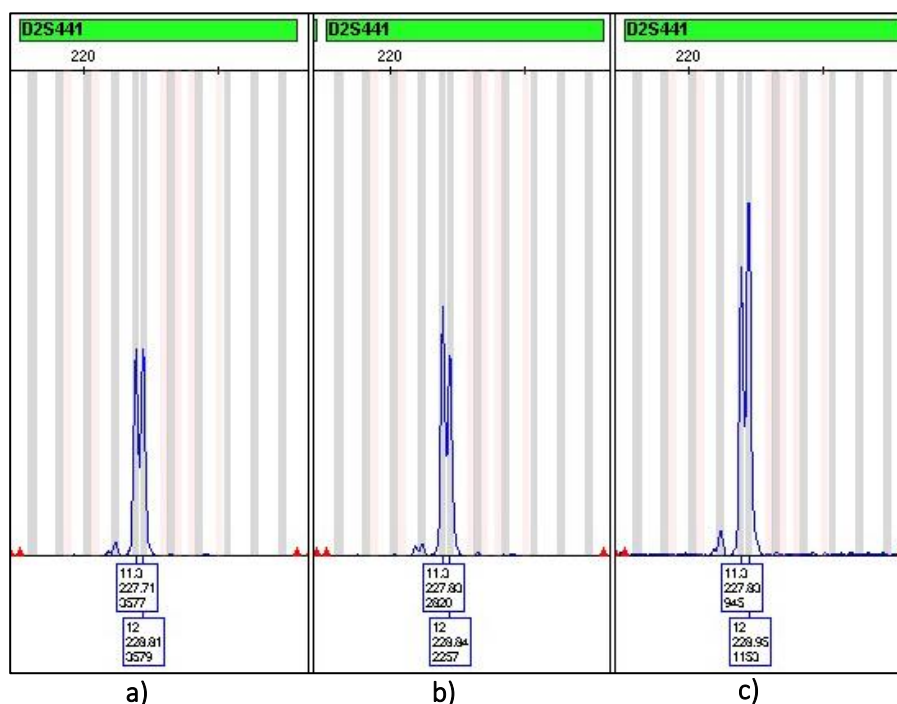


Figura 9. *Locus* D2S441 para a amostra ChA nas diluições: a) 1:10 – concentração: 0.2001 ng/μL; b) 1:50 – concentração: 0.0255 ng/μL; c) 1:100 – concentração: 0.0230 ng/μL.

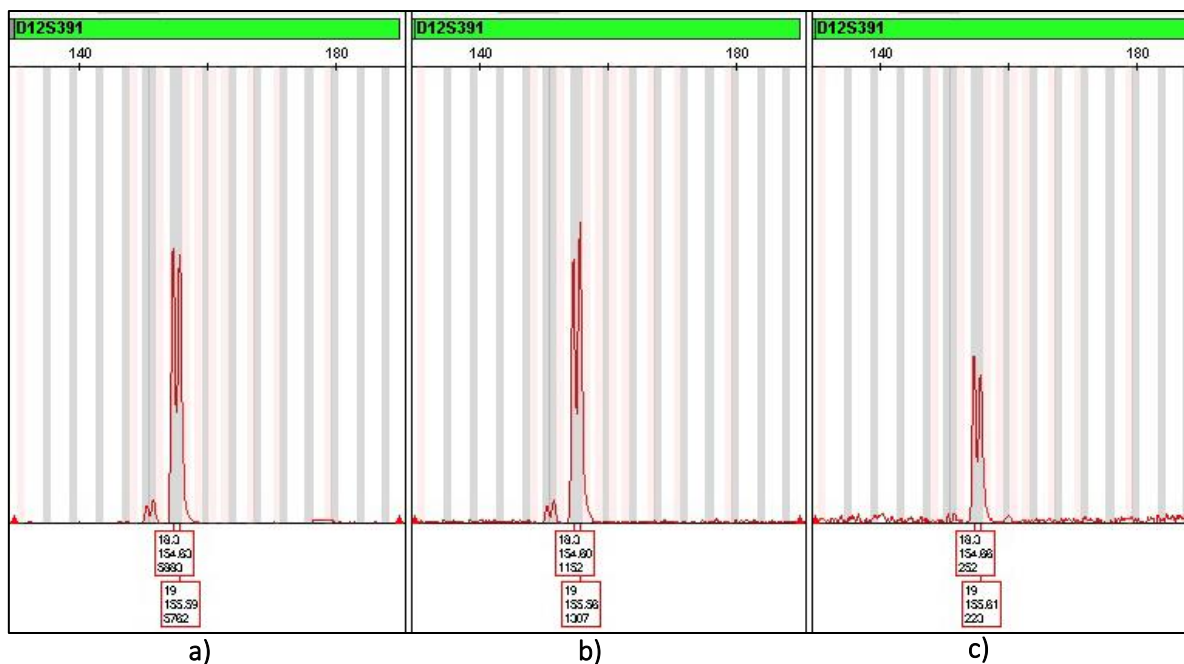


Figura 10. *Locus* D12S391 para a amostra ChB nas diluições: a) 1:10 – concentração: 0.0766 ng/μL; b) 1:50 – concentração: 0.0186 ng/μL; c) 1:100 – concentração: 0.0080 ng/μL.

Da observação das Figuras 9 e 10 podemos constatar que, mesmo a baixas concentrações de ADN, a amplificação com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* permite-nos obter uma separação clara dos alelos. Foi também possível verificar a separação destes alelos nas amostras de misturas realizadas onde foram utilizadas estas duas amostras.

## V - ESTUDO DA CONTAMINAÇÃO

Dos resultados obtidos, para o *kit PowerPlex® Fusion 6C*, e nas concentrações teóricas produzidas, verificou-se que as misturas são detetadas, apesar de algumas amostras não apresentarem o perfil completo. Nas amostras em que ambos os constituintes se encontravam na mesma proporção (1:1) foi possível obter, sempre, um perfil de mistura completo. Na Tabela XIX encontra-se um dos perfis de mistura analisados.

Tabela XIX. Resultados obtidos para as amostras A e C e mistura realizada nas diferentes proporções. Amostra A – saliva, extração por *Prep-n-Go™*, Amostra C – sangue, extração por *Chelex® 100*.

	Amostra A + C				
	XY <sub>A</sub> saliva	XX <sub>C</sub> sangue	1XY <sub>A</sub> :10XX <sub>C</sub> saliva/sangue	1XY <sub>A</sub> :1XX <sub>C</sub> saliva/sangue	10XY <sub>A</sub> :1XX <sub>C</sub> saliva/sangue
AMEL.	XY	XX	XY	XY	XY
D3S1358	15, 16	15, 17	15, 16, 17	15, 16, 17	15, 16, 17
D1S1656	15	17.3, 18.3	15, 17.3, 18.3	15, 17.3, 18.3	15, 17.3, 18.3
D2S441	11.3, 13	14, 15	14, 15, <b>11.3</b> , 13	11.3, 13, 14, 15,	11.3, 13, 14, 15
D10S1248	13, 16	14, 15	13, 14, 15, <b>16</b>	13, 14, 15, 16	13, 14, 15, 16
D13S317	13	11	11, 13	11, 13	11, 13
Penta E	5, 10	12, 16	5, <b>10</b> , 12, 16	5, 10, 12, 16	5, 10, <b>12, 16</b>
D16S539	9, 11	11, 13	9, 11, 13	9, 11, 13	9, 11, 13
D18S51	14, 16	13, 16	13, <b>14</b> , 16	13, 14, 16	13, 14, 16
D2S1338	17, 24	17, 23	17, 23, <b>24</b>	17, 23, 24	17, 23, 24
CSF1PO	10, 11	10, 11	10, 11	10, 11	10, 11
Penta D	2.2, 13	2.2, 14	2.2, 13, 14	2.2, 13, 14	2.2, 13, 14
TH01	9, 9.3	6, 9.3	6, 9, 9.3	6, 9, 9.3	6, 9, 9.3
vWA	14, 17	17	<b>14</b> , 17	14, 17	14, 17
D21S11	28, 30	28, 30	28, 30	28, 30	28, 30
D7S820	11	7, 10	7, 10, 11	7, 10, 11	7, 10, 11
D5S818	11	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12
TPOX	8, 11	8	<b>8, 11</b>	8, 11	8, 11
D8S1179	12, 14	14, 15	12, 14, 15	12, 14, 15	12, 14, 15
D12S391	21	18.3, 19	18.3, 19, 21	18.3, 19, 21	18.3, 19, 21
D19S433	13	14, 15	13, 14, 15	13, 14, 15	13, 14, 15
SE33	13, 18	14, 17	<b>13</b> , 14, 17	13, 14, 17, 18	13, 14, 17, 18
D22S1045	16	16	16	16	16
DYS391	10	.	10	10	10
FGA	19, 24	22, 23	19, 22, 23, 24	19, 22, 23, 24	19, 22, 23, 24
DYS576	17	.	17	17	17
DYS570	20	.	20	20	20

(1). Os alelos indicados a vermelho não se encontravam presentes numa primeira injeção, com 15s; aumentando o tempo de injeção para 40s, foi possível verificar a sua presença;

Da análise de todas as misturas efetuadas, sumarizou-se na Tabela XX o número total de alelos identificados no perfil de mistura de acordo com as diferentes proporções estudadas.

Tabela XX. Resultados obtidos para todas as misturas analisadas, número de alelos identificados em cada perfil. Na proporção 1:1 foi sempre obtido um perfil de mistura completo.

Amostras	Proporção		
	1:10	1:1	10:1
XY <sub>A</sub> + XX <sub>B</sub>	69	72	72
XY <sub>A</sub> + XX <sub>C</sub>	68	69	69
XY <sub>A</sub> + XX <sub>D</sub>	66	70	70
XY <sub>A</sub> + XY <sub>E</sub>	74	76	76
XX <sub>B</sub> + XX <sub>C</sub>	66	66	65
XX <sub>B</sub> + XX <sub>D</sub>	61	67	67
XX <sub>B</sub> + XY <sub>E</sub>	66	70	70
XX <sub>C</sub> + XX <sub>D</sub>	68	70	70
XX <sub>C</sub> + XY <sub>E</sub>	69	70	70
XX <sub>D</sub> + XY <sub>E</sub>	78	78	75

Os resultados obtidos revelam que a obtenção de um perfil de mistura completo pode ser dependente do tipo de amostra, da sua concentração na mistura e do método de extração utilizado. Com exceção da proporção 1:1 onde foi possível obter sempre um perfil de mistura completo, nas restantes proporções não foi possível determinar uma relação constante entre os resultados obtidos e as diferentes proporções preparadas.

Nas amostras de mistura que apresentaram perfis mais incompletos verificou-se que o aumento do tempo de injeção de 15s para 40s permitiu identificar alguns dos alelos correspondentes ao perfil genético do contribuinte minoritário, inicialmente em falta.

O aumento do tempo de injeção para 40s em amostras de mistura deve ser efetuado com precaução, uma vez que pode traduzir-se no aumento da quantidade de material inespecífico que não corresponde ao perfil genético propriamente dito. Todos os alelos presentes na mistura devem ser cuidadosamente analisados para que não sejam erradamente confundidos com artefactos resultantes da amplificação e/ou aplicação. Os artefactos podem existir, mas, normalmente, a sua morfologia e/ou altura não é valorizável para o perfil de mistura, conseguindo-se distinguir com clareza os picos que devem ser valorizados como alelos verdadeiros (Budowle *et al.*, 2001).

Relativamente ao estudo dos controlos negativos, em todos os controlos aplicados não foi identificado qualquer perfil genético nem qualquer outro tipo de contaminação.

## 4.2 AVALIAÇÃO DIRETA

---

### I - COMPARAÇÃO COM MÉTODOS DESENVOLVIDOS

---

#### 1. Redução de volume:

Após a obtenção dos eletroferogramas das amostras com 25µL e com 12.5µL verificou-se que, para as amostras analisadas, os resultados obtidos são os mesmos, para ambos os volumes finais, sempre com alelos válidos.

#### 2. Alteração do número de ciclos:

Após a obtenção dos eletroferogramas das amostras amplificadas com 26 e 27 ciclos verificou-se que, para as amostras analisadas os resultados obtidos são idênticos. No entanto com 27 ciclos algumas amostras aparecem ainda com algum excesso de amplificação, o que acontecia também com 29 ciclos. Nas ampliações realizadas com 26 ciclos foram obtidos melhores resultados e perfis mais equilibrados.

#### 3. Amplificação direta:

Relativamente ao protocolo recomendado para amplificação direta de amostras (em forma de mancha) de sangue e saliva, com *punch* de 1.2mm e 25 ciclos de PCR, constatou-se o correto funcionamento desta metodologia nas condições do Laboratório, tendo sido sempre obtidos perfis genéticos com alelos válidos. A alteração efetuada na preparação da mistura para amplificação, em que não foi utilizado o reagente *5X AmpSolution™* revelou exatamente os mesmos resultados, comprovando assim o correto funcionamento da metodologia, utilizando apenas *Water Amplification Grade*. Esta alteração não compromete o desempenho do método.

Relativamente à alteração do número de ciclos, para 26 e 27 e diminuição do tamanho do *punch* para 0.5mm, os resultados obtidos foram idênticos, constatando-se que em ampliações realizadas com 26 ciclos são obtidos melhores resultados, resultando em perfis mais equilibrados.

---

### II - CALIBRAÇÃO COM RECURSO A PADRÕES CONHECIDOS OU MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS (MRC)

---

Após a obtenção dos eletroferogramas foi possível observar que todos os controles obtiveram a tipagem esperada, tendo sido sempre obtidos resultados válidos. Estes resultados vêm assim reforçar o correto funcionamento da metodologia adaptada para um volume final de 12.5µL, para amplificação de amostras seguras.

## 5. CONCLUSÕES

---

A amplificação por PCR é uma das fases mais importantes do processo realizado para obtenção de perfis genéticos. Sem a capacidade de produção de milhares de cópias de uma sequência de interesse de ADN seria impensável obter perfis tão completos e com a qualidade que as metodologias hoje em dia permitem, sendo conseqüentemente muito importante que todos os parâmetros estejam bem avaliados e validados.

Com a realização deste trabalho foi possível validar o ensaio Amplificação de ADN por PCR com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, e através de evidências objetivas comprovar que é adequado ao fim a que se destina.

1. Não foi detetada qualquer incompatibilidade com as restantes metodologias de extração e quantificação em utilização no SGBF-C;
2. Foi possível verificar a **especificidade** do *kit* uma vez que o mesmo não permite a caracterização de ADN não humano;
3. Da avaliação dos brancos de eletroforese para o cálculo do **limiar analítico (RFU)**, foi possível estabelecer o valor de **120 RFU**, como o valor a partir do qual é possível identificar e distinguir um pico que pode ou não ser designado como alelo, do ruído de fundo; este limiar é um dos parâmetros mais importantes para a validação uma vez que todo o procedimento de validação foi realizado tendo como base este valor de limiar analítico (RFU);
4. Apesar de não existir uma consistência nos resultados apresentados para o **limiar analítico (concentração)**, a obtenção de um perfil genético é possível para concentrações abaixo das recomendadas pelo fabricante (0.5ng/μL – 1ng/μL), o que revela a robustez e sensibilidade do *kit*. De um modo geral, para todas as amostras analisadas, é possível obter um **perfil completo** a partir de uma concentração de **0.1ng/μL**;
5. Através do estudo da **precisão do método**, ficou comprovado que o *kit* apresenta grande capacidade de resolução alélica, garantindo assim a precisão necessária para obtenção de perfis genéticos;
6. A amplificação realizada com o *kit* **permite identificar perfis de mistura**, ainda que em amostras com proporções desiguais o perfil do contribuinte minoritário possa não estar completo. O método permite **distinguir** entre amostras **contaminadas e não contaminadas**;
7. As **alterações** efetuadas ao longo do processo de validação, que resultaram na alteração do protocolo original, **não inviabilizam**, de modo algum, a obtenção de resultados. Estas mesmas alterações, permitiram avaliar a robustez do *kit* na determinação de perfis genéticos, confirmando assim que o mesmo funciona dentro de uma ampla gama de valores que pode ser ajustada e adaptada a cada laboratório e condições do mesmo.

O *kit PowerPlex® Fusion 6C System* encontra-se assim bem caracterizado, otimizado e validado para o Laboratório do SGBF-C podendo ser utilizado com segurança para análise de perfis genéticos em amostras seguras e problema. Da realização deste trabalho resultou a elaboração do protocolo interno: Amplificação de ADN por PCR com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (PO-SGBF-C-015).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Alaeddini, R., Walsh, S. J., Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA--a review. *Forensic Sci Int Genet*, 4(3), 148-157.
- Applied Biosystems. (2010). Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide.
- Applied Biosystems. (2012). GeneMapper® ID-X Software Version 1.4.
- Applied Biosystems. (2015). Swab substrates: prepare reactions - sample lysate *in: AmpFISTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit* User guide; Part Number: 4415125 (pp. 23).
- Applied Biosystems. (2016). HID Real-Time PCR Analysis Software.
- Applied Biosystems. (2017a). *AutoMate Express™ Instrument - User Guide for use with: PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit.*
- Applied Biosystems. (2017b). *PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits for use with: AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System.*
- Applied Biosystems. (2017c). Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits - User Guide.
- Bregu, J., Conklin, D., Coronado, E., Terrill, M., Cotton, R. W., Grgicak, C. M. (2013). Analytical thresholds and sensitivity: establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *J Forensic Sci*, 58(1), 120-129.
- Budowle, B., Hobson, D., Smerick, J. B., Smith, J. (2001). *Low Copy Number - Consideration and Caution*. Promega, ed. Proceedings of the Twelfth International Symposium on Human Identification.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA Typing - Biology, Technology, and Genetics of STR markers* (2ª ed.). Elsevier.
- Butler, J. M. (2010). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Academic Press, Elsevier.
- Butler, J. M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press, Elsevier.
- Butler, J. M. (2015). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. Academic Press, Elsevier.
- Chien, A., Edgar, D. B., Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, 127(3), 1550-1557.
- Corte-Real, F., Vieira, D. N. (2015). *Princípios de Genética Forense*. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Edwards, M. C., Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl*, 3(4), S65-75.
- ENFSI. (2010). Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process. [Online] Available at [http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/minimum\\_validation\\_guidelines\\_in\\_dna\\_profiling\\_-\\_v2010\\_0.pdf](http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/minimum_validation_guidelines_in_dna_profiling_-_v2010_0.pdf) [Accessed 15-12-2016]
- GHEP-ISFG. (2010). Recomendaciones de la Comisión de Trabajo de Mezclas del GHEP-ISFG (GHEPMIX) *Criterios mínimos recomendados para la Aceptación y Evaluación de Perfiles Mezcla*: INTCF-Barcelona Servicio de Biología.
- Gill, P., Brenner, C., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Jobling, M. A., *et al.* (2001). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics:



- recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci Int*, 124(1), 5-10.
- Gill, P., Kirkham, A. (2004). Development of a simulation model to assess the impact of contamination in casework using STRs. *J Forensic Sci*, 49(3), 485-491.
- Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2011). *An Introduction to Forensic Genetics* (2<sup>a</sup> ed.). Wiley-Blackwell.
- Hares, D. R. (2012). Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci Int Genet*, 6(1), e52-54.
- Kobilinsky, L., Liotti, T., F., Oeser-Sweat, J. (2005). *DNA: Forensic and Legal Applications*. John Wiley & Sons, Inc.
- Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A., Keys, K. M., Brown, A. L., Budowle, B. (2001). Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *J Forensic Sci*, 46(3), 661-676.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.
- NP EN ISO/IEC 17025. (2005). Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- PG-SGBF-C-001. (2014). *Validação de Ensaio*. Serviço de Genética e Biologia Forenses - delegação do Centro.
- Promega. (2016a). *PowerPlex® 16HS System - Technical Manual*.
- Promega. (2016b). *PowerPlex® Fusion 6C System - Technical Manual*.
- Swango, K. L., Hudlow, W. R., Timken, M. D., Buoncristiani, M. R. (2007). Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Sci Int*, 170(1), 35-45.
- SWGDM. (2010). SWGDM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. [Online] Available at [http://www.forensicdna.com/assets/swgdam\\_2010.pdf](http://www.forensicdna.com/assets/swgdam_2010.pdf) [Accessed 15-12-2016]
- SWGDM. (2012). SWGDM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods.
- The Council of the European Union. (2009). Council Resolution of 30 November 2009 on the exchange of DNA analysis results (2009/C 296/01) [Online] Available at [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009G1205\(01\)](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009G1205(01)) [Accessed 09-03-2017]
- Timken, M. D., Klein, S. B., Buoncristiani, M. R. (2014). Stochastic sampling effects in STR typing: Implications for analysis and interpretation. *Forensic Sci Int Genet*, 11, 195-204.
- Tjio, J. H. (1978). The chromosome number of man. *Am J Obstet Gynecol*, 130(6), 723-724.
- Walsh, P. S., Fildes, N. J., Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res*, 24(14), 2807-2812.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.
- Watson, J. D., Crick, F. H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18, 123-131.