

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Validação e implementação do *kit Quantifiler[®] Trio*
DNA Quantification em amostras forenses**

Nair Bebiana Mendonça Gouveia

Dissertação orientada pelo Mestre Pedro Brito e
pelo Prof. Doutor Manuel Carmo Gomes

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2015

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Validação e implementação do *kit Quantifiler[®] Trio*
DNA Quantification em amostras forenses**

Nair Bebiana Mendonça Gouveia

Dissertação orientada pelo Mestre Pedro Brito e
pelo Prof. Doutor Manuel Carmo Gomes

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2015

“O único lugar onde o sucesso vem
antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

Resumo

O perfil genético de cada indivíduo pode ser obtido através do estudo de vários marcadores polimórficos presentes no DNA nuclear, nomeadamente os STRs. Em Genética Forense, a quantidade de DNA pode variar consideravelmente entre diferentes amostras, factor que poderá comprometer a obtenção dos respetivos perfis genéticos.

Deste modo, torna-se indispensável determinar a quantidade de DNA presente nas amostras forenses através de uma metodologia de quantificação, recorrendo a alguns *kits* comerciais. Esta etapa permite avaliar se uma amostra pode ou não seguir para amplificação por PCR e, em caso afirmativo, qual o *kit* de amplificação e volume de DNA que devem ser utilizados, garantindo, assim, o sucesso dos resultados.

De todas as amostras analisadas no contexto forense, as degradadas constituem o maior desafio, devido à presença de DNA em quantidade e qualidade muitas vezes limitante. Para ultrapassar esse obstáculo, surgiu um novo *kit* de quantificação denominado *Quantifiler® Trio DNA Quantification*. Este *kit* apresenta características melhoradas comparativamente aos *kits* anteriores, possibilitando detetar quantidades de DNA mais reduzidas, bem como proporções de DNA masculino *versus* DNA feminino mais díspares em amostras de mistura. Como mais-valia, o *kit* permite avaliar o nível de degradação das amostras. Para esse efeito, deteta dois alvos localizados no DNA autossómico, um alvo de 80 pares de bases e um alvo de 214 pares de bases, sendo que a razão entre as concentrações destes dois alvos constitui o índice de degradação de cada amostra.

No Serviço de Genética e Biologia Forenses - Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., procedeu-se à validação interna do *kit Quantifiler® Trio*, com base no Procedimento Geral de Validação de Ensaios, documento elaborado pelo serviço que define todos os passos e estudos a realizar durante este processo. Para testar o desempenho do *kit* foram estudados os parâmetros de precisão, limiares analíticos, especificidade e contaminação. A par disso, foi igualmente avaliada a influência dos resultados de quantificação obtidos com o *kit* na determinação dos perfis genéticos de amostras de mistura com diferentes proporções, assim como de amostras com diferentes índices de degradação, recorrendo ao *kit* de amplificação *GlobalFiler®*.

Este estudo demonstrou uma grande precisão e sensibilidade do *kit Quantifiler® Trio*, associado à especificidade deste para o DNA humano. Por fim, a informação dada pelo índice de degradação revelou ser fundamental para prever o impacto que diferentes níveis de degradação poderão ter na obtenção de um perfil genético.

Palavras-chave: DNA nuclear; Quantificação; *Kit Quantifiler® Trio*; *Kit GlobalFiler®*

Abstract

The genetic profile of each individual can be obtained through the study of several polymorphic markers in the nuclear DNA, mainly the STRs. In Forensic Genetics, the amount of DNA can vary considerably among different samples, a factor which may interfere with the achievement of the respective genetic profiles.

Thus, it is essential to determine the amount of DNA present in forensic samples by a quantification methodology, using commercial kits. This step provides guidelines on whether or not a sample is suitable for PCR amplification and, if possible, which amplification kit and DNA volume should be used, therefore ensuring the success of the results.

In all samples analyzed in forensic context, degraded samples represent a major challenge, due to the presence of DNA in often compromised quantity and quality. To overcome this obstacle, a new quantification kit called Quantifiler® Trio DNA Quantification was developed. This kit has improved features when compared to previous kits used, making it possible to detect smaller amounts of DNA and proportions of male DNA versus female DNA more discrepant in mixture samples. In addition, the kit enables to evaluate the level of degradation of samples. For this purpose, it detects two targets located in the autosomal DNA, a target of 80 base pairs and another of 214 base pairs. The ratio between the concentrations of these two targets is referred to as the degradation index of each sample.

In the Forensics Genetic and Biology Service - Central Delegation of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P., the internal validation of Quantifiler® Trio kit was carried out, based on the General Procedure Testing Validation, a document developed in the service which defines all the steps and studies to be conducted during this process. The kit performance was tested based on the study of precision parameters, analytical thresholds, specificity and contamination. Furthermore, it was also evaluated the influence of the quantification results obtained with the Quantifiler® Trio kit in determining genetic profiles of mixture samples with different ratios, as well as samples with different levels of degradation, using the GlobalFiler® PCR Amplification kit.

This study demonstrated a high accuracy and sensitivity of the Quantifiler® Trio kit, along with its specificity for human DNA. Finally, the information provided by the degradation index was found to be essential to predict the impact that different levels of degradation may have on obtaining a genetic profile.

Keywords: Nuclear DNA; Quantification; Quantifiler® Trio kit; GlobalFiler® kit

Agradecimentos

O espaço limitado desta seção não me permite agradecer devidamente a todas as pessoas que contribuíram, direta e indiretamente, para a conclusão de mais uma etapa da minha formação académica.

Ao meu orientador Dr. Pedro Brito, pela orientação e apoio incondicionais, pelo entusiasmo e alegria contagiantes e pela amizade e motivação demonstradas em cada fase de elaboração da minha tese.

Ao meu orientador Prof. Doutor Manuel Carmo Gomes, pela sua disponibilidade no esclarecimento de dúvidas que surgiram ao longo do desenvolvimento da minha tese.

Ao Dr. António Amorim, por me ter proporcionado conhecer pessoas memoráveis neste ano de estágio, graças à minha mudança de Lisboa para Coimbra.

À coordenação do Mestrado de Biologia Molecular e Genética da Faculdade de Ciências de Lisboa, por me ter dado a oportunidade de avançar com este trabalho.

À Dr.^a Maria João Porto, por ter autorizado a realização da minha tese no Serviço de Genética e Biologia Forenses - Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., permitindo concretizar o meu sonho de trabalhar na área forense.

A todos os colaboradores do Serviço de Genética e Biologia Forenses - Delegação do Centro, Dr. Armando Serra, Dr.^a Filipa Balsa, Dr.^a Virgínia Lopes, Dr.^a Lisa Sampaio, Dr.^a Vanessa Bogas, Dr.^a Marta São Bento, Dr.^a Ana Margarida Bento e Dr.^a Patrícia Cunha, pela forma como me integraram e por todos os conhecimentos teóricos e práticos transmitidos.

À minha mãe, por todo o esforço e dedicação ao longo da minha vida. Todos os obrigados não serão suficientes para agradecer tudo o que fizeste e fazes por mim!

A toda a minha família, pelo vosso apoio e incentivo para que não desistisse do meu sonho, tornando mais curta a distância que nos separa!

A todos os meus amigos, por acreditarem em mim e por compreenderem a minha ausência em alguns momentos!

Por fim, quero dedicar este trabalho ao meu pai. Sei que onde estiveres, estás sempre comigo....

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Índice

Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
1 Introdução	1
1.1 Estudo do DNA nuclear em Genética Forense.....	1
1.2 Etapas da análise forense.....	2
1.2.1 Amostras degradadas	2
1.2.2 Amostras de mistura.....	3
1.3 Quantificação de DNA	3
1.3.1 Método de quantificação – PCR em tempo real.....	4
1.3.2 <i>Kit Quantifiler® Trio DNA Quantification</i>	5
1.4 Validação de ensaios.....	6
2 Objetivos	8
2.1 Objetivo Geral.....	8
2.2 Objetivos Específicos.....	8
3 Materiais e Métodos	9
3.1 Prevenção da contaminação.....	9
3.2 Procedimento experimental	9
3.2.1 Metodologia de quantificação – <i>Kit Quantifiler® Trio</i>	9
3.2.2 Metodologia de amplificação – <i>Kit GlobalFiler®</i>	11
3.3 Parâmetros estudados	12
3.3.1 <i>Kit Quantifiler® Trio</i> como ferramenta de orientação	13
4 Resultados e Discussão	15
4.1 Precisão.....	15
4.1.1 <i>Standards</i>	15
4.1.2 Controlos positivos internos.....	17
4.2 Limiares Analíticos.....	19
4.3 Especificidade.....	20
4.4 Contaminação.....	20
4.5 <i>Kit Quantifiler® Trio</i> como ferramenta de orientação.....	21
4.5.1 Amostras de mistura e o <i>kit</i> de amplificação <i>GlobalFiler®</i>	21
4.5.2 Falsos negativos obtidos com o <i>kit Quantifiler® Duo</i>	23
4.5.3 Índice de degradação	24
5 Conclusões	28

6 Referências Bibliográficas	30
7 Anexos	32
7.1 Anexo I – Artigo aceite para publicação	32

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da tecnologia de qPCR baseada na utilização de sondas <i>TaqMan®</i>	4
Figura 2. Intensidade de fluorescência <i>versus</i> número de ciclos de PCR. Fases da qPCR... 5	5
Figura 3. C_T <i>versus</i> logaritmo da concentração de DNA. Curva de calibração obtida com amostras de concentração definida (a,b,c,d,e).	5
Figura 4. Valores de C_T obtidos nas três corridas de quantificação para os cinco <i>standards</i> relativamente ao alvo SA.....	16
Figura 5. Curvas de calibração obtidas para cada uma das corridas de quantificação e curva de calibração obtida no conjunto das três corridas.	17

Índice de Tabelas

Tabela 1. Reagentes constituintes do <i>kit Quantifiler® Trio</i>	10
Tabela 2. Preparação das diluições em série a partir da solução <i>Quantifiler® THP DNA Standard</i> de 100 ng/ μ L.....	10
Tabela 3. Volumes necessários para cada reação de quantificação.....	11
Tabela 4. Parâmetros da corrida de quantificação.....	11
Tabela 5. Volumes necessários para cada reação de amplificação.....	12
Tabela 6. Programa de amplificação do <i>kit GlobalFiler®</i>	12
Tabela 7. Valores de C_T obtidos para o alvo SA nas três corridas de quantificação e respetivas médias e desvios padrão dos cinco <i>standards</i>	16
Tabela 8. Concentrações obtidas para os três controlos positivos internos nas três corridas de quantificação.	18
Tabela 9. Resultados de quantificação obtidos para os controlos e respetivas diluições com o <i>kit Quantifiler® Trio</i>	19
Tabela 10. Resultados de quantificação obtidos para as diferentes proporções M:F com o <i>kit Quantifiler® Trio</i>	20
Tabela 11. Resultados de quantificação e amplificação obtidos para as amostras de mistura com os <i>kits Quantifiler® Trio</i> e <i>GlobalFiler®</i> , respetivamente.....	22
Tabela 12. Comparação entre os resultados de quantificação obtidos com os <i>kits Quantifiler® Duo</i> e <i>Quantifiler® Trio</i> e o respetivo perfil genético masculino obtido com o <i>kit Yfiler®</i>	23
Tabela 13. Resultados de quantificação obtidos para os alvos SA e LA e respetivo cálculo do DI relativamente às amostras submetidas à luz UV.....	25
Tabela 14. Resultados de quantificação e amplificação obtidos para as amostras da rotina do SGBF – Delegação do Centro com os <i>kits Quantifiler® Trio</i> e <i>GlobalFiler®</i> , respetivamente.....	26

Lista de Abreviaturas

% – Percentagem

µL – microlitro

Alvo LA – *Large Autosomal Target*

Alvo SA – *Small Autosomal Target*

C_T – *Cycle Threshold*

CV – Coeficiente de variação

DI – Índice de degradação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FBI – *Federal Bureau of Investigation*

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

IPAC – Instituto Português de Acreditação

IPC – *Internal PCR Control*

Kit GlobalFiler[®] – Kit GlobalFiler[®] PCR Amplification

Kit Quantifiler[®] Duo – Kit Quantifiler[®] Duo DNA Quantification

Kit Quantifiler[®] Trio – Kit Quantifiler[®] Trio DNA Quantification

M:F – DNA masculino:DNA feminino

ng – nanograma

ng/µL – nanograma/microlitro

°C – graus

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Q – Molécula *quencher*

QAS – *Quality Assurance Standards*

qPCR – PCR em tempo real

R – Fluorocromo *reporter*

SGBF – Serviço de Genética e Biologia Forenses

Std. – *Standard*

STRs – *Short Tandem Repeats*

UV – Ultravioleta

VNTRs – *Variable Number of Tandem Repeats*

1 Introdução

1.1 Estudo do DNA nuclear em Genética Forense

O genoma humano, isto é, o conjunto de DNA de cada célula, engloba 22 pares de cromossomas autossómicos, um par de cromossomas sexuais e diversas moléculas de DNA mitocondrial. A informação genética está localizada essencialmente no núcleo de cada célula, designando-se por DNA nuclear (Goodwin *et al.*, 2007; Butler, 2009).

O DNA nuclear é composto por regiões codificantes e não codificantes. As regiões codificantes ou genes contêm a informação necessária para que uma célula produza proteínas, representando aproximadamente 5% do DNA genómico total. Os restantes 95% correspondem às regiões não codificantes, sendo, maioritariamente, constituídas por sequências de DNA repetitivas. Estima-se que 99.7% do DNA nuclear seja igual entre indivíduos e que apenas exista uma diferença de 0.3%, sendo esta pequena fracção responsável por nos tornar indivíduos únicos com exceção dos gémeos monozigóticos (Jeffreys *et al.*, 1985; Butler, 2011).

A Genética Forense é a área do conhecimento que recorre ao estudo da molécula de DNA para analisar e interpretar evidências biológicas no âmbito criminal. No contexto forense, a análise do DNA incide exclusivamente no estudo das regiões não codificantes, uma vez que nestas ocorre a grande variabilidade entre indivíduos, possibilitando, assim, a discriminação genética individual. Estas sequências de DNA repetitivas são designadas por polimorfismos de DNA e encontram-se dispersas ao longo do genoma. Podem apresentar tamanhos variáveis, sendo classificadas de acordo com o comprimento da unidade de repetição como minissatélites e microssatélites. Os minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) são constituídos por 8 a 100 pares de bases por unidade de repetição. Por outro lado, os microssatélites ou STRs (*Short Tandem Repeats*) apresentam unidades de repetição curtas com 2 a 7 pares de bases. A pequena dimensão dos STRs em comparação com os VNTRs torna-os marcadores de eleição para fins de identificação genética humana, sendo as repetições tetranucleotídicas as mais utilizadas na área forense. O número de vezes que a sequência se repete origina formas alternativas denominadas alelos (Goodwin *et al.*, 2007; Butler, 2011).

O conjunto formado por diferentes STRs constitui um perfil genético, o qual representa as características hereditárias de um indivíduo. O perfil genético pode ser obtido através de uma reacção de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com recurso a vários kits comerciais como, por exemplo, o *GlobalFiler® PCR Amplification (Applied Biosystems)*. A PCR permite a produção exponencial de inúmeras cópias de uma sequência específica de

DNA num curto espaço de tempo, permitindo incrementar a quantidade de DNA necessária à obtenção de um perfil genético. O processo de amplificação por PCR envolve ciclos de aquecimento e arrefecimento, incluindo uma fase de desnaturação que possibilita a separação das duas cadeias de DNA; uma fase de *annealing*, na qual os *primers* se ligam às sequências alvo; e uma fase de extensão, onde a enzima *Taq* DNA polimerase promove a extensão da cadeia de DNA através da adição de nucleótidos, permitindo obter uma cópia exata do DNA molde (Butler, 2011).

1.2 Etapas da análise forense

A Genética Forense tem beneficiado com a descoberta da PCR desenvolvida por Kary Mullis, uma vez que sem a capacidade de fazer múltiplas cópias de moléculas de DNA, muitas amostras seriam impossíveis de analisar devido à presença de DNA em quantidades reduzidas (Kary Mullis *et al.*, 1986; Butler, 2011).

Uma amostra forense requer um processamento adequado para que seja garantido o sucesso da análise até à obtenção de um perfil genético. Após a colheita e preservação da amostra, o DNA é extraído das células, devendo ser determinada a quantidade de DNA através de uma metodologia de quantificação. Posteriormente, o DNA é amplificado por PCR, seguindo-se a separação e deteção dos fragmentos por um processo denominado eletroforese capilar. Por fim, os eletroferogramas são interpretados, definindo-se, assim, o perfil genético da amostra. Todas estas etapas da análise forense são importantes e o seu correto desempenho é fundamental. Não obstante, a quantidade de DNA pode variar consideravelmente entre diferentes amostras, fator que poderá comprometer a obtenção do perfil genético (Butler, 2011).

1.2.1 Amostras degradadas

As amostras recolhidas dos locais de crime podem estar sujeitas a diferentes fatores ambientais como radiação, calor, humidade, ar, entre outros, os quais contribuem para a fragmentação e degradação do DNA, dificultando, assim, a obtenção de um perfil genético. Esses fatores induzem alterações estruturais nas moléculas de DNA que vão interferir com a ligação dos *primers* e subsequente ação da polimerase, fazendo com que esta não consiga amplificar as sequências alvo de interesse. Para tentar ultrapassar o efeito da degradação, torna-se necessário utilizar *kits* de amplificação com mini-STRs incorporados como é o caso do *kit GlobalFiler®*. Dos 24 marcadores do *kit GlobalFiler®*, 10 correspondem a mini-STRs, sendo estes amplificados preferencialmente em amostras degradadas, devido às suas pequenas dimensões (Alaeddini *et al.*, 2010; Butler, 2011).

1.2.2 Amostras de mistura

As amostras de mistura provenientes de casos de agressões sexuais são, predominantemente, constituídas por quantidades ínfimas de DNA masculino mascaradas em grandes quantidades de DNA feminino, o que dificulta a análise relativa ao contribuinte minoritário. Através de uma metodologia de quantificação, é possível saber a proporção em que se encontram os contribuintes da mistura, permitindo, deste modo, eleger a metodologia de amplificação mais apropriada para garantir a obtenção do perfil genético do contribuinte minoritário masculino, dado que o perfil da vítima é quase sempre conhecido. Dependendo dos resultados de quantificação, poderá optar-se por um *kit* de amplificação destinado ao estudo de STRs autossómicos ou ser necessário recorrer a um *kit* específico para a análise de STRs do cromossoma Y (Butler, 2011; Ballantyne *et al.*, 2013).

1.3 Quantificação de DNA

A quantificação refere-se à determinação da quantidade de DNA presente numa amostra extraída. É um procedimento recomendado pelas normas de garantia da qualidade definidas pelo FBI (QAS, *Standard* 9.4), de modo a assegurar que a quantidade de DNA de uma amostra é suficiente para a subsequente amplificação por PCR e que o DNA extraído é especificamente humano (DNA Advisory Board, 2011).

A eficiência da amplificação depende da quantidade de DNA adicionada à reação de PCR. Com base nos resultados de quantificação, a quantidade de DNA pode ser ajustada para o intervalo de concentração ótima, no qual os *kits* de amplificação disponíveis no mercado apresentam uma maior tolerância, sendo aconselhado um *input* de 0.5 a 2 ng de DNA. Se for adicionado DNA em excesso na reação de PCR surgem artefactos que dificultam a interpretação dos resultados, tornando a análise mais complexa e demorada. Por outro lado, a adição de pouco DNA pode traduzir-se na perda significativa de alelos conhecida como *allele dropout*, não refletindo o perfil genético que seria esperado nas condições ideais. Um processo de seleção das amostras baseado na quantificação de DNA pode ser muito útil e rentável, pois permite escolher a abordagem mais apropriada para cada amostra, assim como economizar tempo e recursos com amostras comprometidas (Barbisin *et al.*, 2010; Butler, 2011).

Vários métodos de quantificação de DNA têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, sendo a PCR em tempo real (qPCR) mais utilizada atualmente em Genética Forense.

1.3.1 Método de quantificação – PCR em tempo real

A qPCR é uma técnica inicialmente descrita por Higuchi e colaboradores na década de 90, que permite monitorizar a acumulação do produto amplificado em tempo real, à medida que a reação de PCR progride, através da detecção de alterações de fluorescência a cada ciclo (Tilstone *et al.*, 2005; Butler, 2011).

A tecnologia mais comum para a realização da qPCR consiste na utilização de sondas *TaqMan®*, as quais hibridam especificamente com uma sequência de DNA de interesse, delimitada por dois *primers*, direto e reverso. Estas sondas apresentam um fluorocromo *reporter* (R) na extremidade 5' e uma molécula designada por *quencher* (Q) na extremidade 3'. No início da qPCR, as sondas permanecem intactas e a proximidade física entre R e Q resulta na supressão da fluorescência de R, devido à transferência de energia entre ambos. Ao longo da reação, a enzima *Taq* DNA polimerase vai hidrolisar todas as sondas que se encontrem hibridadas, por ação da sua atividade exonucleotídica. Essa hidrólise contribui para a separação espacial do fluorocromo R da molécula Q, resultando num aumento da fluorescência emitida por R, o qual é proporcional à quantidade de produto amplificado (Figura 1) (Butler, 2011; Quantifiler Trio, 2014).

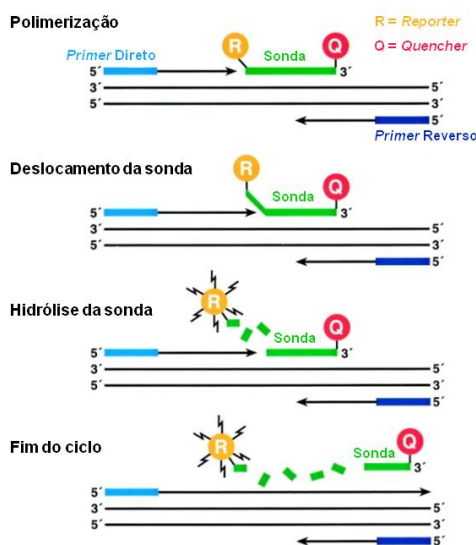


Figura 1. Representação esquemática da tecnologia de qPCR baseada na utilização de sondas *TaqMan®*. Adaptado de <http://www.isu.edu/mls/shields09wikis/parasitology.html>.

Existem três fases distintas que definem o processo de qPCR: exponencial, linear e *plateau*. Estas fases podem ser observadas num gráfico de intensidade de fluorescência *versus* número de ciclos de PCR (Figura 2). A fase exponencial é a mais aconselhada para o estudo da reação, pois prevê-se uma eficiência de aproximadamente 100%, devido à maior consistência da relação entre a quantidade de produto amplificado e o *input* de DNA inicial (Heid *et al.*, 1996; Butler, 2011).

O número de ciclos de PCR necessários para que a fluorescência da reação seja detectável, isto é, ultrapasse o limiar que separa a amplificação positiva do ruído de fundo designa-se por *cycle threshold* (C_T). Os valores de C_T são inversamente proporcionais à quantidade de DNA inicial de uma amostra, ou seja, um menor valor de C_T corresponde a uma maior quantidade de DNA inicial e vice-versa. Para atribuir a concentração de uma amostra desconhecida a partir do seu valor de C_T , deve ser criada uma curva de calibração baseada em amostras padrão de concentração definida. Esta curva é representada graficamente em função do logaritmo da concentração de DNA, evidenciando uma relação linear com declive negativo. Deste modo, a concentração inicial de qualquer amostra desconhecida pode ser determinada por comparação do seu valor de C_T relativamente a essa curva de calibração (Figura 3). Por fim, todos os ensaios de quantificação incluem um controlo interno designado IPC (*Internal PCR Control*), o qual consiste num fragmento sintético incorporado na reação, permitindo, desta forma, confirmar o correto funcionamento da mesma (Butler, 2011; Quantifiler Trio, 2014).

Atualmente, o instrumento mais utilizado para a realização da qPCR em Genética Forense é o *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, em associação com o *software* de análise dos resultados *HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2*.

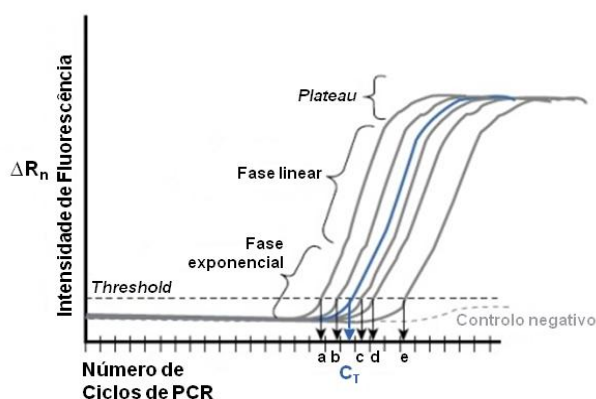


Figura 2. Intensidade de fluorescência versus número de ciclos de PCR. Fases da qPCR. Adaptado de Butler, 2011.

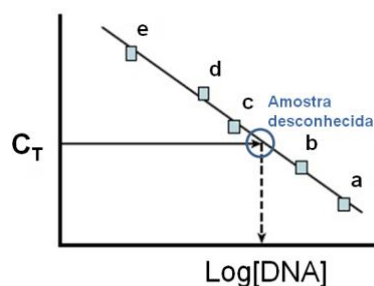


Figura 3. C_T versus logaritmo da concentração de DNA. Curva de calibração obtida com amostras de concentração definida (a,b,c,d,e). Adaptado de Butler, 2011.

1.3.2 *Kit Quantifiler® Trio DNA Quantification*

Os *kits* de quantificação atuais baseiam-se na técnica de qPCR e na utilização das sondas *TaqMan®*. Até há pouco tempo era utilizado o *kit Quantifiler® Duo DNA Quantification* na rotina do Serviço de Genética e Biologia Forenses (SGBF) – Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF), o qual permitia determinar a quantidade de DNA total e DNA masculino amplificáveis de uma dada amostra, bem como detetar a presença de possíveis inibidores da PCR (Quantifiler Duo, 2012).

Recentemente, surgiu um novo *kit* de quantificação denominado *Quantifiler® Trio DNA Quantification (Applied Biosystems)*, o qual apresenta características melhoradas comparativamente ao *kit Quantifiler® Duo*, permitindo detetar quantidades de DNA mais reduzidas, evidenciar proporções de DNA masculino *versus* DNA feminino mais discrepantes numa eventual mistura e ainda avaliar a integridade das amostras forenses, através da determinação do respetivo nível de degradação (Quantifiler Trio, 2014).

O *kit Quantifiler® Trio* deteta três alvos distintos, dois alvos no DNA autossómico e um alvo no cromossoma Y. O *kit* tem por base um sistema multicópia, ou seja, as sequências alvo consistem em múltiplas cópias dispersas nos cromossomas. Este sistema permite ultrapassar eventuais alterações presentes em algumas regiões dos cromossomas, contribuindo para uma maior sensibilidade deste *kit*. Os alvos autossómicos incluem um fragmento de 80 pares de bases designado *Small Autosomal Target (SA)* e um fragmento de 214 pares de bases chamado *Large Autosomal Target (LA)* (Quantifiler Trio, 2014).

Os resultados de quantificação obtidos para o alvo SA são utilizados para determinar a concentração de DNA total das amostras, orientando, assim, a fase subsequente da análise forense, enquanto os resultados referentes ao alvo LA são usados exclusivamente para avaliar o nível de degradação das amostras (Quantifiler Trio, 2014).

Como vantagem adicional, o *kit Quantifiler® Trio* apresenta também uma ferramenta designada por índice de degradação (DI). Através do cálculo da razão entre a concentração do alvo SA e a concentração do alvo LA, obtém-se uma indicação sobre o nível de degradação das amostras: $DI = \frac{\text{Concentração do alvo SA (ng/}\mu\text{L)}}{\text{Concentração do alvo LA (ng/}\mu\text{L)}}$. Devido ao seu maior tamanho, o alvo LA é mais suscetível à degradação, estando a sua quantidade diminuída em amostras degradadas, o que se traduz num aumento do DI (Quantifiler Trio, 2014).

Assim, é possível avaliar simultaneamente a quantidade e qualidade de uma dada amostra, o que possibilita prever *a priori* qual será o impacto de um determinado nível de degradação na obtenção de um perfil genético.

1.4 Validação de ensaios

A confiança nos resultados obtidos numa análise de DNA é um aspecto de extrema importância em Genética Forense. Os laboratórios afetos ao Serviço de Genética e Biologia Forenses do INMLCF, I.P. encontram-se acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) no âmbito da atividade laboral desenvolvida, de acordo com a norma internacional de referência NP EN ISO/IEC 17025 de 2005. Esta norma estabelece os requisitos de gestão e

requisitos técnicos para laboratórios de ensaio e calibração, sendo reconhecida e utilizada mundialmente como referência para a qualidade e acreditação dos laboratórios.

Um dos requisitos técnicos descritos é a validação dos métodos de ensaio efetuados no laboratório. Validar um procedimento de ensaio consiste em demonstrar que este é adequado para o fim a que se destina. Esta validação deverá ser realizada através de duas formas de avaliação: indireta e direta. A avaliação indireta tem como intuito evidenciar as características de desempenho relevantes para o ensaio, tendo em consideração o âmbito de aplicação previsto. Já a avaliação direta incide na comparação entre ensaios adaptados internamente e a metodologia original, recorrendo a padrões ou materiais de referência certificados, assim como a comparações interlaboratoriais (NP EN ISO/IEC 17025, 2005).

No SGBF – Delegação do Centro, a validação interna de ensaios é efetuada de acordo com o Procedimento Geral de Validação de Ensaios (PG-SGBF-C-001, 2014), no qual estão descritos todos os passos e estudos a realizar. Este documento foi desenvolvido especificamente para a validação do ensaio como um todo, desde a extração das amostras até à obtenção dos perfis genéticos. No entanto, a metodologia de quantificação não está abrangida nesse documento, sendo, por isso, imprescindível adaptar alguns dos critérios definidos para que possam ser compatíveis com a respetiva finalidade do método a validar.

Os parâmetros que serão analisados para a validação interna da quantificação com o *kit Quantifiler® Trio* inserem-se na avaliação indireta e incluem o estudo da precisão, dos limiares analíticos, da especificidade e da contaminação. Na avaliação destes parâmetros é fundamental ter em atenção que a metodologia de quantificação não fornece resultados exatos, mas sim aproximados, sendo que os valores de concentração de uma mesma amostra podem variar entre réplicas dentro de uma mesma corrida de quantificação e até entre corridas de quantificação diferentes.

A precisão define-se como a capacidade de um método fornecer resultados pouco variáveis e reprodutíveis entre diferentes utilizações. Os limiares analíticos referem-se aos valores mínimo e máximo entre os quais se consegue validar com confiança os resultados obtidos. A especificidade consiste na capacidade de um determinado método detetar exclusiva e inequivocamente DNA humano. Por fim, a contaminação define-se como a existência de DNA estranho na amostra a analisar, sendo avaliada pela presença de misturas de DNA provenientes de diferentes indivíduos (PG-SGBF-C-001, 2014).

2 Objetivos

Os resultados de quantificação são importantes para os procedimentos laboratoriais que se seguem na análise forense, dado que muitas vezes a qualidade e quantidade de DNA disponível pode comprometer a obtenção de um perfil genético.

Atualmente, ainda não existem muitas publicações sobre o *kit Quantifiler[®] Trio* e, por isso, torna-se indispensável compreender as suas características e limitações.

2.1 Objetivo Geral

- Validar internamente o *kit Quantifiler[®] Trio* para posterior implementação na rotina laboratorial do SGBF – Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. em amostras forenses.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a precisão do *kit Quantifiler[®] Trio*, através do estudo de *standards* e controlos positivos internos;
- Aferir a sensibilidade do *kit Quantifiler[®] Trio* com controlos positivos, através de uma série de diluições com concentrações reduzidas;
- Avaliar a capacidade do *kit Quantifiler[®] Trio* na deteção de diferentes proporções de DNA masculino *versus* DNA feminino em misturas efetuadas a partir de amostras de referência com concentrações conhecidas;
- Determinar a especificidade do *kit Quantifiler[®] Trio* com recurso a amostras de diferentes espécies de animais vertebrados e amostras de DNA humano;
- Testar o *kit Quantifiler[®] Trio* em amostras forenses previamente quantificadas com o *kit Quantifiler[®] Duo*;
- Averiguar a capacidade do *kit Quantifiler[®] Trio* na determinação do nível de degradação de diferentes amostras;
- Correlacionar os resultados de quantificação do *kit Quantifiler[®] Trio* com a qualidade dos perfis genéticos obtidos com o *kit* de amplificação *GlobalFiler[®]*.

3 Materiais e Métodos

Toda a componente prática deste trabalho foi realizada no SGBF – Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

3.1 Prevenção da contaminação

A análise laboratorial de amostras forenses requer um conjunto de medidas preventivas, capazes de evitar qualquer tipo de contaminação indesejada que possa afetar os resultados. Para tal, existe um documento no qual estão especificadas as normas que devem ser cumpridas no SGBF – Delegação do Centro (I-SGBF-C-014, 2014).

Um dos parâmetros prevê a descontaminação da sala, bancada de trabalho, *workstations*, materiais e/ou equipamentos com recurso à luz ultravioleta (UV) durante 10 a 20 minutos, antes e depois de qualquer procedimento laboratorial. Outro aspecto a considerar é o uso de roupa de trabalho exclusiva, nomeadamente bata, luvas e máscara descartáveis, sendo que não é permitida a circulação entre salas diferentes com a roupa de trabalho que está a ser utilizada numa determinada sala nem o transporte de materiais e/ou equipamentos. Além disso, é indispensável adicionar sempre um controlo negativo para monitorizar possíveis contaminações nas diferentes fases de análise. Por fim, devem ser registados todos os procedimentos realizados, bem como todos os reagentes, consumíveis e equipamentos utilizados em modelos próprios elaborados pelo serviço, facilitando, assim, a rastreabilidade de qualquer amostra (I-SGBF-C-014, 2014).

3.2 Procedimento experimental

No SGBF – Delegação do Centro são estudados dois tipos de amostras forenses: as amostras de referência ou seguras que correspondem a amostras devidamente identificadas e com quantidade de DNA considerável; e as amostras problema ou de vestígios que se referem a amostras com origem desconhecida e quantidade de DNA muitas vezes reduzida. Estes dois tipos de amostras são processados em salas separadas, a fim de prevenir contaminações cruzadas, garantindo, desta forma, a segurança dos resultados.

Devido às suas características, as amostras problema devem ser quantificadas no laboratório de pré-PCR correspondente, com vista a determinar se existe DNA em quantidade suficiente para a subsequente amplificação por PCR.

3.2.1 Metodologia de quantificação – *Kit Quantifiler® Trio*

A quantificação de DNA foi realizada com o *kit Quantifiler® Trio* (Tabela 1), de acordo com as recomendações do fabricante, descritas no manual de utilização (*Quantifiler Trio*,

2014). Todos os procedimentos foram desenvolvidos na sala de pré-PCR destinada às amostras problema.

Tabela 1. Reagentes constituintes do *kit Quantifiler® Trio*.

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

Para cada corrida de quantificação, é necessário criar previamente uma folha de planificação (*plate layout*) no *software* de análise dos resultados *HID Real-Time PCR Analysis Software*, a qual servirá como orientação durante a preparação da placa.

No início de uma reação de quantificação, devem ser preparadas diluições em série do *Quantifiler® THP DNA Standard*, cuja concentração é de 100 ng/μL. Em conformidade com esse procedimento, elaboram-se cinco *standards* de concentrações definidas a partir dessa solução inicial, os quais são utilizados para a obtenção de uma curva de calibração, variando os respectivos valores entre 50 e 0.005 ng/μL. Estas diluições são preparadas com o tampão *Quantifiler® THP DNA Dilution Buffer*, como descrito na Tabela 2. Cada um dos *standards* é estudado em duplicado, de modo a aumentar a precisão da curva de calibração.

Tabela 2. Preparação das diluições em série a partir da solução *Quantifiler® THP DNA Standard* de 100 ng/μL.

Standard (Std.)	Concentração (ng/μL)	Preparação	
		DNA	Tampão
Std. 1	50	10 μL <i>DNA Standard</i>	10 μL
Std. 2	5	10 μL Std. 1	90 μL
Std. 3	0.5	10 μL Std. 2	90 μL
Std. 4	0.05	10 μL Std. 3	90 μL
Std. 5	0.005	10 μL Std. 4	90 μL

Segue-se a elaboração da mistura composta pelos reagentes *Quantifiler® Trio Primer Mix* e *PCR Reaction Mix*, como apresentado na Tabela 3. Estes reagentes são agitados e centrifugados brevemente antes da sua utilização, sendo sempre consideradas reações adicionais na realização dos cálculos para prevenir perdas de volume durante a pipetagem. Depois, são dispensados 18 μL da mistura em cada poço da placa e adicionados 2 μL de cada amostra ou *standard* no poço respectivo, de acordo com o esquema da placa inicialmente definido, perfazendo, assim, um volume final de 20 μL por poço. A preparação e distribuição da mistura é realizada numa *workstation* exclusiva, do mesmo modo que as amostras são manuseadas numa *workstation* específica para a distribuição de DNA.

Tabela 3. Volumes necessários para cada reação de quantificação.

Componentes da reação	Volume
<i>Quantifiler® Trio Primer Mix</i>	8 µL
<i>Quantifiler® THP PCR Reaction Mix</i>	10 µL
DNA	2 µL

No SGBF – Delegação do Centro como parte integrante do procedimento interno da metodologia de quantificação, são sempre adicionados três controlos positivos¹ de concentrações diferentes a cada corrida de quantificação: 0.1, 10 e 40 ng/µL.

Preparada a placa, esta é selada com uma película transparente denominada *Optical Adhesive Cover* por intermédio de um utensílio apropriado, a fim de evitar qualquer rugosidade que possa interferir com a medição da fluorescência. Finalmente, centrifuga-se a placa para retirar eventuais bolhas e, em seguida, introduzimo-la no equipamento *7500 Real-Time PCR*. A corrida de quantificação engloba 40 ciclos de PCR, processando-se como mencionado na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros da corrida de quantificação.

40 ciclos		
95°C 2 minutos	95°C 9 segundos	60°C 30 segundos

Terminada a corrida de quantificação, os resultados são analisados com recurso ao *software* de análise, o qual gera as curvas de calibração e calcula a quantidade de DNA presente em cada amostra.

3.2.2 Metodologia de amplificação – *Kit GlobalFiler®*

A amplificação de DNA foi realizada com o *kit GlobalFiler®*, segundo as especificações descritas no respetivo manual de utilização (GlobalFiler, 2014). Tal como na quantificação, os procedimentos decorreram na sala de pré-PCR das amostras problema.

Este *kit* de amplificação é um dos mais utilizados no SGBF – Delegação do Centro, devido ao seu grande poder de discriminação conferido pelos seus 24 marcadores e, por esse motivo, foi o *kit* escolhido para amplificar as amostras em estudo.

Primeiramente, é preparada a mistura constituída pelos reagentes *GlobalFiler® Master Mix* e *Primer Set*, como descrito na Tabela 5, sendo distribuídos 10 µL da mistura em cada tubo, previamente identificado com o número da amostra. Através dos resultados de

¹ Os controlos de 0.1 e 10 ng/µL estão presentes em diversos *kits* de amplificação. Já o controlo de 40 ng/µL tem de ser preparado a partir de uma solução mais concentrada, uma vez que não existem controlos com essa concentração no serviço.

quantificação, é definida a quantidade de DNA que deve ser adicionada à reação de amplificação, de modo a perfazer um *input* de 1 ng até um volume máximo de 15 µL num total de 25 µL. Quando não é adicionado esse volume total de DNA, ajusta-se o volume com tampão *low TE* (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0).

Tabela 5. Volumes necessários para cada reação de amplificação.

Componentes da reação	Volume
<i>GlobalFiler® Master Mix</i>	7.5 µL
<i>GlobalFiler® Primer Set</i>	2.5 µL

Após a preparação, as amostras são colocadas no equipamento *Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems)*, no qual ocorre a reação de amplificação por PCR. O respetivo programa de amplificação encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6. Programa de amplificação do *kit GlobalFiler®*.

29 ciclos				
Incubação inicial	Desnaturação	<i>Annealing</i>	Extensão final	<i>Hold</i>
95°C 1 minuto	94°C 10 segundos	59°C 90 segundos	60°C 10 minutos	4°C ∞

Terminada a amplificação, as amostras são aplicadas no sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, onde os produtos amplificados são separados e detetados através de um processo de eletroforese capilar. Como resultado, surgem eletroferogramas que são analisados com recurso ao *software GeneMapper® ID-X v1.4*, obtendo-se, assim, os perfis genéticos.

3.3 Parâmetros estudados

Os parâmetros estudados para a validação interna da quantificação de DNA com o *kit Quantifiler® Trio* englobam a precisão, limiares analíticos, especificidade e contaminação. Na avaliação destes parâmetros foram considerados os resultados obtidos para o alvo SA, os quais representam a quantificação do DNA total. Para o parâmetro da contaminação foram ainda considerados os resultados obtidos para o alvo do cromossoma Y, referente à quantificação do DNA masculino.

A avaliação da precisão do *kit Quantifiler® Trio* foi efetuada de dois modos diferentes: através da análise dos valores de C_T obtidos para os cinco *standards* utilizados na criação da curva de calibração e através do estudo da reprodutibilidade dos três controlos positivos

internos de 0.1, 10 e 40 ng/μL. Para tal, foram estudadas três corridas de quantificação realizadas em três dias diferentes.

Como já anteriormente referido, cada *standard* é aplicado em duplicado, obtendo-se, assim, seis valores de C_T para cada *standard* no conjunto das três corridas de quantificação. Os valores de C_T foram registados e as médias e desvios padrão calculados para cada um dos cinco *standards*. Relativamente aos controlos positivos, estes foram quantificados em triplicado, totalizando, deste modo, nove valores de concentração para cada controlo.

Para estudar os limiares analíticos foram utilizados seis controlos positivos com concentrações de 0.1, 2 e 10 ng/μL. Para cada controlo foram realizadas quatro diluições em série até um valor mínimo de aproximadamente 0.005 ng/μL, concentração que corresponde ao menor ponto da curva de calibração, permitindo, desta forma, avaliar a sensibilidade do *kit* na determinação de concentrações de DNA mais reduzidas.

A especificidade do método foi analisada com recurso ao estudo de dez amostras de diferentes espécies de animais vertebrados: duas amostras de *Canis lupus familiaris* (nome vulgar – cão); quatro amostras de *Equus caballus* (nome vulgar – cavalo); e quatro amostras de *Sus scrofa domesticus* (nome vulgar – porco). Em conjunto com estas amostras, estudaram-se amostras de origem humana, de modo a comprovar a capacidade do *kit Quantifiler® Trio* na identificação específica de DNA humano.

O parâmetro da contaminação foi avaliado através de misturas preparadas a partir de uma amostra masculina e uma amostra feminina, ambas de concentração conhecida. Para tal, foram elaboradas diferentes proporções de DNA masculino:DNA feminino (M:F), a fim de testar a capacidade do *kit Quantifiler® Trio* em discriminar os dois contribuintes nessas proporções: 1:0, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 0:1. Em todas as proporções, a concentração da amostra masculina foi constante, ao passo que a concentração da amostra feminina aumentou progressivamente, mimetizando, desta forma, misturas forenses reais, nas quais o contribuinte minoritário é, frequentemente, masculino.

3.3.1 *Kit Quantifiler® Trio* como ferramenta de orientação

Além dos parâmetros anteriores foram também estudados outros critérios, tendo em conta o facto do *kit Quantifiler® Trio* ser uma importante ferramenta de orientação para as fases seguintes da análise forense. Através dos resultados de quantificação, é possível definir qual o *kit* de amplificação mais apropriado para uma amostra, assim como determinar o volume a utilizar para perfazer o *input* de DNA recomendado para cada *kit* comercial.

Para verificar a influência de diferentes proporções M:F na obtenção do perfil genético de mistura, recorreu-se à amplificação com o *kit GlobalFiler®*. Selecionaram-se duas amostras de concentração conhecida, uma masculina e uma feminina. A partir destas, foram preparadas alíquotas com uma concentração final de 1 ng/μL, as quais foram utilizadas para a elaboração de diferentes misturas, definindo como contribuinte minoritário a fração masculina: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:40 e 1:50. Depois, estas proporções foram quantificadas com o *kit Quantifiler® Trio* e, seguidamente, foram amplificadas com base nas quantidades de DNA total e DNA masculino, ajustando os volumes para o *input* de 1 ng de DNA. O principal objetivo consistiu em avaliar a partir de que proporção M:F não é possível detetar um perfil genético masculino para os STRs autossómicos, tornando-se necessária uma análise de STRs do cromossoma Y com *kits* de amplificação específicos.

Foram também estudadas amostras previamente quantificadas com o *kit Quantifiler® Duo*, cujos resultados de quantificação não foram concordantes com os perfis genéticos obtidos. Dentro desse grupo, inserem-se seis amostras de mistura definidas como falsos negativos, nas quais não tinha sido detetado DNA masculino, mas que ao serem amplificadas com um *kit* específico para os STRs do cromossoma Y, *kit Yfiler®*, revelaram a presença de um perfil genético masculino. Uma vez que o *kit Quantifiler® Trio* apresenta uma maior sensibilidade, estas amostras foram testadas na perspetiva de alcançar resultados coerentes com os perfis genéticos anteriormente obtidos.

Por fim, foi analisado o parâmetro adicional presente no *kit Quantifiler® Trio* designado por índice de degradação, através do estudo de amostras submetidas à luz UV e de amostras da rotina laboratorial do SGBF – Delegação do Centro.

Em primeiro lugar, foram selecionadas amostras de sangue e saliva, previamente extraídas e de concentração conhecida. Seguidamente, prepararam-se cinco alíquotas de cada uma das amostras, as quais foram submetidas à luz UV² durante diferentes intervalos de tempo numa câmara apropriada (5, 10, 15, 20 e 25 minutos), com o propósito de simular artificialmente a degradação das mesmas. Com este estudo, pretende-se verificar a capacidade do *kit Quantifiler® Trio* em detetar diferentes níveis de degradação.

A par disso, foram igualmente estudadas amostras da rotina do SGBF – Delegação do Centro, as quais foram separadas em dois grupos distintos: amostras com concentrações semelhantes e índices de degradação diferentes *versus* amostras com concentrações diferentes e índices de degradação semelhantes. Posteriormente, estas foram amplificadas com o *kit GlobalFiler®*, de modo a averiguar qual o impacto que diferentes índices de degradação poderão ter na qualidade dos perfis genéticos obtidos.

² Esta luz UV é utilizada na descontaminação das *workstations*, emitindo num comprimento de onda de 253.7 nanómetros (UV-C), o qual possibilita a eliminação eficaz de todo o tipo de fontes que possam contaminar as amostras.

4 Resultados e Discussão

O principal objetivo deste trabalho consiste na validação interna do *kit Quantifiler® Trio* para posterior implementação na rotina laboratorial do SGBF – Delegação do Centro do INMLCF, I.P. Para cumprir esses requisitos, estudaram-se os parâmetros de precisão, limiares analíticos, especificidade e contaminação.

A etapa da quantificação permite orientar se uma dada amostra pode ou não seguir para amplificação por PCR e, em caso afirmativo, qual o *kit* de amplificação e volume de DNA que devem ser utilizados. Assim, torna-se igualmente relevante avaliar a influência da análise dos resultados de quantificação obtidos com o *kit Quantifiler® Trio* na determinação dos perfis genéticos de amostras de mistura com diferentes proporções M:F, bem como de amostras comprometidas em termos de quantidade e/ou qualidade de DNA.

4.1 Precisão

A precisão do *kit Quantifiler® Trio* foi avaliada através da análise dos valores de C_T obtidos para os cinco *standards* utilizados na criação da curva de calibração e por meio do estudo dos três controlos positivos internos de 0.1, 10 e 40 ng/ μ L. Neste parâmetro foram estudadas três corridas de quantificação independentes, realizadas em três dias diferentes.

4.1.1 Standards

Para cada corrida de quantificação foram preparadas diluições em série a partir da solução *Quantifiler® THP DNA Standard* de 100 ng/ μ L, obtendo-se cinco *standards* com concentrações de 50, 5, 0.5, 0.05 e 0.005 ng/ μ L. Cada *standard* foi quantificado em duplicado em cada corrida, perfazendo um total de seis valores de C_T no conjunto das três corridas analisadas. Apenas foram registados os valores de C_T obtidos para o alvo SA, uma vez que este alvo corresponde à quantificação do DNA total.

Os valores de C_T , assim como as respetivas médias e desvios padrão para os cinco *standards* encontram-se apresentados na Tabela 7 e na Figura 4. Para cada um dos *standards* existem dois valores de C_T em cada corrida de quantificação: C_T 1 e C_T 2 para a corrida 1; C_T 3 e C_T 4 para a corrida 2; e, finalmente, C_T 5 e C_T 6 para a corrida 3.

Em todas as corridas de quantificação, verifica-se que à medida que diminui a concentração de DNA dos *standards*, maior é o valor de C_T . Para o *standard* 1 (50 ng/ μ L), o valor de C_T ronda os 22, enquanto o valor de C_T para o *standard* 5 (0.005 ng/ μ L) é aproximadamente 35. Tais resultados demonstram que os valores de C_T são inversamente proporcionais à concentração de DNA dos *standards*.

Dentro da mesma corrida, é possível constatar que as oscilações nos valores de C_T para cada *standard* são pouco significativas, revelando, assim, uma elevada consistência. Na corrida 2 é perceptível um pequeno aumento nos valores de C_T comparativamente às corridas 1 e 3 sem, no entanto, comprometer os resultados.

No conjunto total das três corridas de quantificação, observa-se a presença de pequenas variações nos valores médios de C_T de cada *standard*, as quais se refletem em baixos desvios padrão. No caso dos *standards* 4 e 5, os desvios padrão são ligeiramente superiores aos dos *standards* 1, 2 e 3, variabilidade essa que pode estar associada à existência de uma baixa concentração de DNA nestas diluições.

Tabela 7. Valores de C_T obtidos para o alvo SA nas três corridas de quantificação e respectivas médias e desvios padrão dos cinco *standards*.

Standard (ng/ μ L)	Corrida 1			Corrida 2			Corrida 3			Total	
	C_T 1	C_T 2	Média C_T	C_T 3	C_T 4	Média C_T	C_T 5	C_T 6	Média C_T	Média C_T	Desvio padrão
Std.1 50 ng/ μ L	22.03	21.96	22.00	22.61	22.73	22.67	21.86	21.96	21.91	22.19	0.38
Std.2 5 ng/ μ L	25.49	25.37	25.43	25.95	25.76	25.86	25.14	25.09	25.12	25.47	0.34
Std.3 0.5 ng/ μ L	28.74	28.59	28.67	29.22	29.13	29.18	28.30	28.39	28.35	28.73	0.38
Std.4 0.05 ng/ μ L	31.86	31.77	31.82	32.43	32.34	32.39	31.35	31.43	31.39	31.86	0.45
Std.5 0.005 ng/ μ L	35.31	35.12	35.22	35.65	35.29	35.47	34.36	34.36	34.36	35.02	0.54

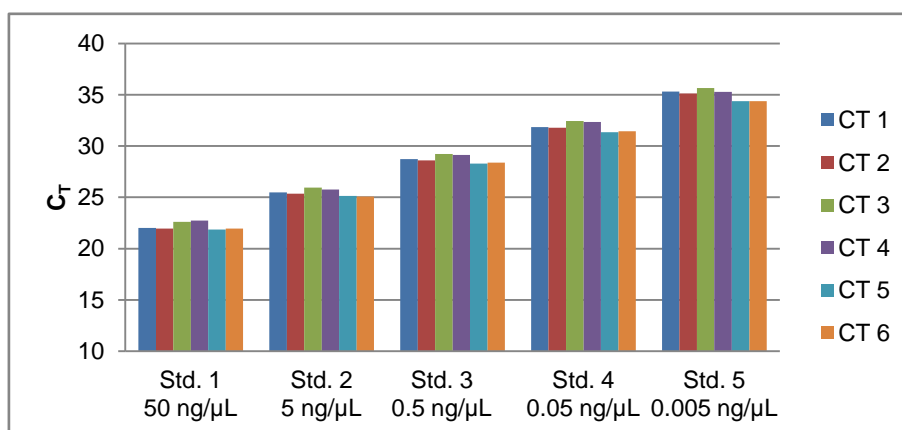


Figura 4. Valores de C_T obtidos nas três corridas de quantificação para os cinco *standards* relativamente ao alvo SA.

Na Figura 5 estão representadas as curvas de calibração obtidas em cada uma das corridas de quantificação, assim como a curva de calibração obtida no conjunto das três corridas, traçadas em função do logaritmo da concentração de DNA dos *standards*.

Para desenhar as curvas de calibração de cada corrida de quantificação foram utilizados os valores médios de C_T obtidos para cada *standard*. Já para a curva de calibração resultante do conjunto das três corridas, consideraram-se os valores médios de C_T totais obtidos para cada um dos cinco *standards*.

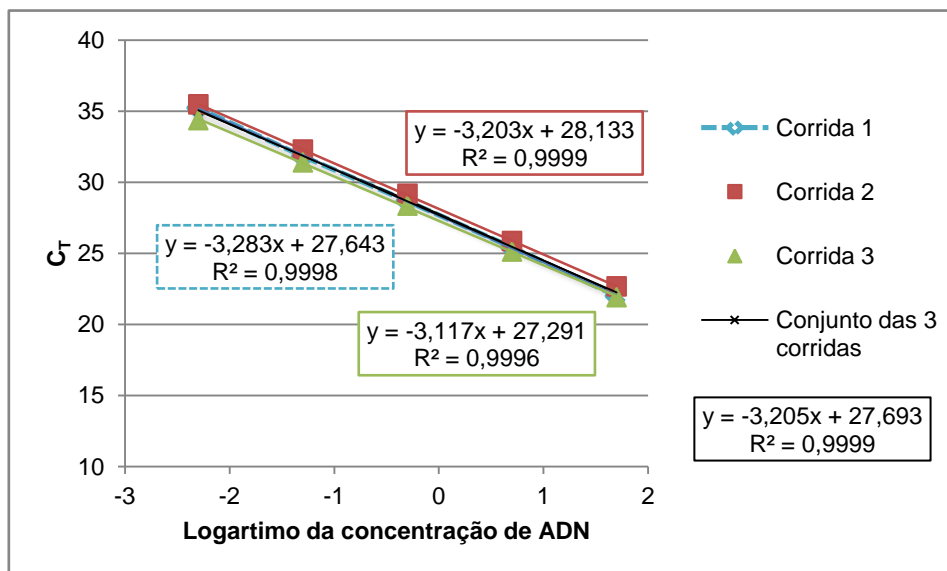


Figura 5. Curvas de calibração obtidas para cada uma das corridas de quantificação e curva de calibração obtida no conjunto das três corridas.

Todas as curvas de calibração demonstram uma relação linear com declive negativo, traduzindo a associação inversamente proporcional entre os valores de C_T e o logaritmo da concentração de DNA dos *standards*. A curva de calibração referente ao conjunto das três corridas assemelha-se às curvas de calibração individuais, paralelas umas às outras, sendo ligeiramente sobreponível à da corrida 1.

Além disso, é visível um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0.999 em todas as curvas de calibração, o que evidencia uma estreita proximidade entre a linha de regressão linear e os valores de C_T de cada *standard*.

A precisão e reprodutibilidade do *kit Quantifiler® Trio* é, desta forma, comprovada em dias diferentes, através da consistência dos valores de C_T obtidos para cada *standard* nas três corridas de quantificação.

4.1.2 Controlos positivos internos

As concentrações obtidas para os três controlos positivos internos nas três corridas de quantificação estão discriminadas na Tabela 8.

Para comparação com os valores de concentração teóricos esperados foram usados os valores de concentração obtidos para o alvo SA, de acordo com as recomendações do fabricante (Quantifiler Trio, 2014). No conjunto das três corridas foram obtidos nove valores de concentração para cada controlo, uma vez que estes foram quantificados em triplicado.

Tabela 8. Concentrações obtidas para os três controlos positivos internos nas três corridas de quantificação.

Controlo	Concentrações obtidas Corrida 1 (ng/μL)			Média Corrida 1	Concentrações obtidas Corrida 2 (ng/μL)			Média Corrida 2	Concentrações obtidas Corrida 3 (ng/μL)			Média Corrida 3	Média Total	Desvio Padrão	CV (%)
0.1 ng/μL	0.073	0.051	0.078	0.067	0.090	0.099	0.111	0.100	0.069	0.092	0.107	0.089	0.086	0.019	22.1
10 ng/μL	12.297	12.927	12.263	12.496	12.690	12.304	9.225	11.406	16.502	14.626	13.171	14.766	12.889	1.959	15.2
40 ng/μL	51.727	46.311	58.126	52.055	58.611	59.276	58.950	58.946	63.654	58.171	45.460	55.762	55.587	6.283	11.3

Através da avaliação individual de cada corrida de quantificação, é possível observar que as concentrações obtidas para os controlos de 10 e 40 ng/μL encontram-se mais afastadas do respetivo valor de concentração teórico esperado, ao passo que as concentrações obtidas para o controlo de 0.1 ng/μL estão mais próximas do esperado. Estas variações podem estar associadas a erros de pipetagem, os quais podem contribuir para que numa dada pipetagem possa estar mais ou menos DNA disponível.

Na análise global das três corridas de quantificação, verifica-se um aumento do valor do coeficiente de variação (CV) com a diminuição da concentração dos controlos. Deste modo, constata-se uma maior variabilidade nos resultados obtidos para os controlos com concentração inferiores.

Comparando os coeficientes de variação dos três controlos positivos internos, conclui-se que os valores de concentração obtidos para os controlos de 10 e 40 ng/μL apresentam uma maior homogeneidade, refletindo-se em coeficientes de variação mais baixos (CV<20%). Relativamente ao controlo de 0.1 ng/μL, observa-se uma maior variabilidade entre os valores de concentração obtidos no conjunto das três corridas de quantificação, facto comprovado pelo respetivo coeficiente de variação (CV=22.1%).

Apesar de ser detetada alguma variabilidade nos valores de concentração obtidos para os três controlos, é possível constatar a reprodutibilidade do método dentro da mesma corrida, permitindo, assim, validar internamente cada corrida de quantificação.

4.2 Limiares Analíticos

No estudo dos limiares analíticos foram utilizados seis controlos positivos com concentrações de 0.1, 2 e 10 ng/μL. Para cada controlo foram realizadas quatro diluições sucessivas (Dil-1, Dil-2, Dil-3 e Dil-4) até um valor mínimo de aproximadamente 0.005 ng/μL. Com este estudo, pretende-se avaliar a capacidade do *kit Quantifiler® Trio* em determinar concentrações de DNA muito reduzidas e, por conseguinte, efetuar uma comparação com os respetivos valores de concentração teóricos esperados.

Relativamente aos controlos de 0.1 ng/μL (controlos 1 e 2), prepararam-se diluições com as concentrações de 0.05, 0.025, 0.0125 e 0.00625 ng/μL. Para os controlos de 2 ng/μL (controlos 3 e 4) e 10 ng/μL (controlos 5 e 6) foram elaboradas diluições com concentrações de 0.2, 0.02, 0.01 e 0.005 ng/μL. Os controlos e as respetivas diluições foram quantificados, de acordo com as especificações mencionadas no manual do *kit* (Quantifiler Trio, 2014). Os resultados de quantificação obtidos para o alvo SA são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados de quantificação obtidos para os controlos e respetivas diluições com o *kit Quantifiler® Trio*.

Controlo	Concentração esperada (ng/μl)	Concentração obtida (ng/μl)	Controlo	Concentração esperada (ng/μl)	Concentração obtida (ng/μl)
Controlo 1	0.1	0.0863	Controlo 2	0.1	0.0728
Controlo 1 Dil-1	0.05	0.0433	Controlo 2 Dil-1	0.05	0.0306
Controlo 1 Dil-2	0.025	0.0178	Controlo 2 Dil-2	0.025	0.0159
Controlo 1 Dil-3	0.0125	0.0098	Controlo 2 Dil-3	0.0125	0.0095
Controlo 1 Dil-4	0.00625	0.0049	Controlo 2 Dil-4	0.00625	0.0063
Controlo 3	2	1.6023	Controlo 4	2	2.8847
Controlo 3 Dil-1	0.2	0.1504	Controlo 4 Dil-1	0.2	0.1477
Controlo 3 Dil-2	0.02	0.0136	Controlo 4 Dil-2	0.02	0.0128
Controlo 3 Dil-3	0.01	0.0080	Controlo 4 Dil-3	0.01	0.0052
Controlo 3 Dil-4	0.005	0.0036	Controlo 4 Dil-4	0.005	0.0030
Controlo 5	10	7.6326	Controlo 6	10	8.8824
Controlo 5 Dil-1	0.2	0.1372	Controlo 6 Dil-1	0.2	0.1122
Controlo 5 Dil-2	0.02	0.0131	Controlo 6 Dil-2	0.02	0.0133
Controlo 5 Dil-3	0.01	0.0064	Controlo 6 Dil-3	0.01	0.0092
Controlo 5 Dil-4	0.005	0.0038	Controlo 6 Dil-4	0.005	0.0028

De um modo geral, verifica-se que as concentrações obtidas para os controlos e respetivas diluições estão muito próximas das concentrações teóricas esperadas. Apenas alguns dos valores se encontram ligeiramente mais díspares, facto que pode estar relacionado com erros de pipetagem durante a preparação das diluições. Para além disso, devemos ter em conta que a metodologia de quantificação não fornece resultados exatos, mas sim resultados aproximados.

Através destes resultados, é possível observar a elevada sensibilidade do *kit Quantifiler® Trio* na deteção de concentrações de DNA muito reduzidas.

4.3 Especificidade

Como expetável, não foi possível obter quantificação para nenhuma das espécies animais analisadas, observando-se apenas a amplificação do controlo interno IPC, o que demonstra que a reação de quantificação decorreu dentro da normalidade. Ao invés, todas as amostras humanas foram quantificadas, comprovando, assim, a especificidade do *kit Quantifiler® Trio* para quantificar única e exclusivamente DNA humano.

4.4 Contaminação

Em todas as proporções M:F estudadas, a concentração da amostra masculina foi de 0.01 ng/μL, enquanto a concentração da amostra feminina foi aumentando de forma progressiva, a fim de testar a capacidade do *kit Quantifiler® Trio* em discriminar os dois contribuintes em diferentes proporções. O propósito desta abordagem foi simular o que acontece nas amostras de mistura provenientes de casos de agressões sexuais, nas quais o contribuinte minoritário masculino se encontra em pequena concentração. Nas proporções 1:0 e 0:1 foi adicionado 0.01 ng/μL de DNA masculino e DNA feminino, respetivamente. Os resultados para as proporções M:F encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados de quantificação obtidos para as diferentes proporções M:F com o *kit Quantifiler® Trio*.

Proporção M:F	Concentrações esperadas		Concentrações obtidas			Proporção M:F obtida
	DNA masculino (ng/μL)	DNA feminino (ng/μL)	DNA total (ng/μL)	DNA masculino (ng/μL)	DNA feminino (ng/μL)	
1:0	0.01	---	0.0113	0.0091	---	---
1:1	0.01	0.01	0.0216	0.0112	0.0104	1:0.93
1:10	0.01	0.1	0.0860	0.0124	0.0736	1:5.93
1:100	0.01	1	0.8962	0.0163	0.8799	1:54.03
1:1000	0.01	10	10.0003	0.0123	9.9907	1:810.97
1:2000	0.01	20	25.1736	0.0132	25.1604	1:1901.53
1:4000	0.01	40	51.8344	0.0152	51.8192	1:3408.25
0:1	---	0.01	0.0106	---	0.0106	---

As concentrações de DNA total e DNA masculino provêm dos resultados de quantificação obtidos para o alvo SA e para o alvo do cromossoma Y, respetivamente. Já a concentração de DNA feminino é obtida por aproximação, através da subtração da concentração de DNA masculino à concentração de DNA total.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que as concentrações de DNA masculino se mantêm constantes e próximas de 0.01 ng/μL em todas as misturas, o que está em plena concordância com as concentrações teóricas esperadas. Quanto ao DNA feminino, é evidente o aumento da concentração em todas as misturas, observando-se uma grande semelhança entre os valores obtidos e os valores teóricos, excetuando as proporções 1:2000 e 1:4000, nas quais a concentração se encontra ligeiramente acima do esperado. Relativamente às proporções M:F obtidas, observa-se que estas são inferiores às proporções M:F esperadas para todas as misturas.

Estes resultados revelam que o *kit Quantifiler[®] Trio* tem a capacidade de quantificar concentrações distintas de DNA masculino *versus* DNA feminino em misturas com diferentes proporções M:F.

4.5 *Kit Quantifiler[®] Trio* como ferramenta de orientação

Os resultados obtidos com os *kits* de quantificação constituem uma importante ferramenta de orientação para a fase subsequente da amplificação por PCR. Através desses resultados, é possível definir qual o *kit* de amplificação mais adequado para o estudo de uma dada amostra, assim como determinar o volume de amostra a utilizar consoante o *input* de DNA recomendado para cada *kit*.

4.5.1 Amostras de mistura e o *kit* de amplificação *GlobalFiler[®]*

Com o intuito de verificar a influência de diferentes proporções M:F na obtenção do perfil genético de mistura, recorreu-se à amplificação com o *kit GlobalFiler[®]*, a fim de avaliar a partir de que proporção M:F não é possível individualizar um perfil genético masculino para os STRs autossómicos.

Para tal, foram estudadas diferentes proporções M:F elaboradas a partir de duas amostras de concentração conhecida, sendo definido como contribuinte minoritário a fração masculina: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:40 e 1:50. De acordo com os resultados do *kit Quantifiler[®] Trio*, as proporções foram amplificadas com o *kit GlobalFiler[®]*, tendo por base as quantidades de DNA total e DNA masculino.

A Tabela 11 integra os resultados de quantificação e amplificação obtidos para as amostras de misturas com os *kits Quantifiler[®] Trio* e *GlobalFiler[®]*, respetivamente.

Tabela 11. Resultados de quantificação e amplificação obtidos para as amostras de mistura com os kits *Quantifiler® Trio* e *GlobalFiler®*, respectivamente.

Proporção M:F	<i>Kit Quantifiler® Trio</i>				<i>Kit GlobalFiler®</i>			
	DNA total (ng/μL)	DNA masculino (ng/μL)	DNA feminino (ng/μL)	Proporção M:F obtida	Perfil genético feminino		Perfil genético masculino	
					Abordagem DNA total	Abordagem DNA masculino	Abordagem DNA total	Abordagem DNA masculino
1:1	0.9887	0.5247	0.4640	1:0.88	Completo	Completo	Completo	Completo
1:2	1.0563	0.3690	0.6873	1:1.86	Completo	Completo	Completo	Completo
1:5	1.0492	0.1762	0.8730	1:4.96	Completo	Completo	19/24	Completo
1:10	1.0941	0.0955	0.9986	1:10.46	Completo	Completo	13/24	Completo
1:15	1.0835	0.0577	1.0258	1:17.79	Completo	Completo	---	19/24
1:20	1.0380	0.0465	0.9915	1:21.33	Completo	Completo	---	14/24
1:40	0.6743	0.0191	0.6552	1:34.22	Completo	Completo	---	---
1:50	0.8881	0.0157	0.8724	1:55.43	Completo	Completo	---	---

Nota: Quando o perfil genético de um dado contribuinte não está completo surge referenciado como número de marcadores completos/número de marcadores totais do *kit GlobalFiler®*.

Por interpretação dos resultados de quantificação, verifica-se que a concentração de DNA total obtida é coincidente com a concentração esperada de 1 ng/μL, excetuando nas proporções 1:40 e 1:50, nas quais o valor de concentração se encontra ligeiramente abaixo. Como previsto, em todas as misturas é visível a diminuição progressiva da concentração de DNA masculino com o aumento da proporção M:F, sendo ainda possível constatar uma grande concordância entre as proporções M:F obtidas e as teóricas esperadas.

A amplificação com *kits* específicos para os STRs autossômicos, como é o caso do *kit GlobalFiler®*, é sempre feita com base nos resultados de quantificação obtidos para o DNA total, sendo essa a primeira abordagem definida para o estudo destas proporções. Analisando os resultados de amplificação referentes a essa abordagem, observa-se que em todas as proporções existe um perfil feminino completo, enquanto a partir da proporção 1:10 já não é possível obter um perfil masculino.

Contudo, os resultados obtidos para o contribuinte minoritário masculino ficaram aquém das expectativas e, por isso, decidiu-se também amplificar as amostras com base na quantificação obtida para o DNA masculino ao invés do DNA total, de modo a otimizar os resultados da fração masculina e registar eventuais diferenças entre as duas abordagens. Desta forma, as amostras foram amplificadas com diferentes volumes até um *input* de 1 ng de DNA masculino, sendo que a partir da proporção 1:15 (inclusive) foi utilizado o volume máximo admitido para o *kit GlobalFiler®*.

Tal como na abordagem inicial, foi possível obter um perfil feminino completo em todas as proporções, verificando-se, no entanto, algumas diferenças relativamente ao perfil do contribuinte minoritário masculino. Ao contrário dos resultados anteriores, nesta segunda abordagem obtém-se um perfil masculino até à proporção 1:20.

Nas duas abordagens estudadas, observa-se a ausência do perfil genético masculino à medida que aumenta a proporção M:F, o que é coerente com a diminuição da quantidade de DNA masculino presente nas amostras. Todavia, os resultados para o contribuinte minoritário foram consideravelmente melhores com a abordagem baseada na quantidade de DNA masculino, uma vez que foi possível potenciar a fração masculina sem que isso afetasse a análise do perfil global de mistura. Deste modo, conclui-se que até à proporção 1:20 (inclusive) é recomendada a amplificação com o *kit GlobalFiler®*, ao passo que a partir da proporção 1:20 será necessário recorrer à análise de STRs do cromossoma Y com *kits* de amplificação específicos.

4.5.2 Falsos negativos obtidos com o *kit Quantifiler® Duo*

Amostras de mistura anteriormente quantificadas com o *kit Quantifiler® Duo* evidenciaram discrepâncias entre os resultados de quantificação e os respetivos perfis genéticos obtidos, constituindo, assim, falsos negativos. Nestas seis amostras não tinha sido detetado DNA masculino através da quantificação com o *kit Quantifiler® Duo*, contudo, observou-se um perfil genético masculino aquando da amplificação com o *kit Yfiler®*. Sabendo que o *kit Quantifiler® Trio* apresenta uma sensibilidade superior ao *kit Quantifiler® Duo*, quantificaram-se novamente essas amostras, a fim de alcançar resultados de quantificação coerentes que possam explicar o aparecimento desses perfis masculinos. Na Tabela 12 estão os resultados obtidos com o *kit Quantifiler® Trio*.

Tabela 12. Comparação entre os resultados de quantificação obtidos com os *kits Quantifiler® Duo* e *Quantifiler® Trio* e o respetivo perfil genético masculino obtido com o *kit Yfiler®*.

Amostra	<i>Kit Quantifiler® Duo</i>	<i>Kit Quantifiler® Trio</i>	<i>Kit Yfiler®</i>
	DNA masculino (ng/μL)	DNA masculino (ng/μL)	Perfil genético
A	---	0.0154	15/16
B	---	0.0122	16/16
C	---	0.0123	16/16
D	---	0.0077	16/16
E	---	0.0042	12/16
F	---	0.0099	14/16

Comparando os resultados de quantificação, verifica-se que foi possível detetar DNA masculino nas seis amostras com o *kit Quantifiler® Trio*, o que demonstra a sua elevada sensibilidade perante concentrações de DNA reduzidas.

Estudos comprovam que é possível obter um perfil genético em amostras cujo valor de quantificação seja próximo ou igual a zero, visto que o *kit* de quantificação pode não encontrar alvos suficientes para amplificar, em consequência da concentração de DNA reduzida presente nas amostras (Cupples *et al.*, 2009). É de salientar ainda que as reações de quantificação incluem apenas 2 µL de DNA, enquanto o volume de DNA recomendado para o *kit* de amplificação *Yfiler®* pode ir até 10 µL. Esta diferença de volume possibilita a adição de até cinco vezes mais quantidade de DNA na reação de amplificação em detrimento da reação de quantificação. Isto pode justificar a ausência de resultados com o *kit Quantifiler® Duo*, pois este *kit* deteta um único alvo no cromossoma Y e, estando o DNA masculino presente em pouca quantidade nas amostras, a eficiência da reação de quantificação poderá não ser suficiente para a deteção do mesmo.

Já o *kit Quantifiler® Trio* baseia-se num sistema multicópia, isto é, deteta vários alvos dispersos no cromossoma Y, sendo que esta diferença contribui para que o *kit Quantifiler® Trio* seja capaz de amplificar até mesmo quantidades diminutas de DNA masculino, algo que não tinha sido possível com o *kit Quantifiler® Duo*.

4.5.3 Índice de degradação

O *kit Quantifiler® Trio* permite calcular o índice de degradação das amostras, ferramenta inexistente nos *kits* anteriormente utilizados no SGBF – Delegação do Centro. Este DI representa a razão entre as concentrações dos alvos SA e LA. Como já mencionado, os resultados do alvo SA traduzem a concentração de DNA total, enquanto os resultados do alvo LA contribuem para a determinação do nível de degradação. O primeiro alvo a manifestar alterações quando uma amostra está degradada é o LA, devido à maior suscetibilidade conferida pelo seu tamanho.

Para estudar a relevância deste novo parâmetro foram analisadas amostras submetidas à luz UV e amostras da rotina laboratorial do SGBF – Delegação do Centro.

4.5.3.1 Amostras submetidas à luz UV

Duas amostras de sangue (A e B) e duas amostras de saliva (C e D) foram submetidas à luz UV durante diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 20 e 25 minutos), com o intuito de simular a degradação das mesmas. A absorção da luz UV pelo DNA induz

alterações estruturais nas moléculas que vão interferir com a ligação dos *primers* e subsequente ação da polimerase, fazendo com que esta não consiga amplificar as sequências alvo de interesse. Deste modo, pretende-se verificar a capacidade do *kit Quantifiler® Trio* em detetar essa degradação artificial.

Na Tabela 13 encontram-se os resultados de quantificação obtidos para os alvos SA e LA, bem como o cálculo do respetivo DI.

Tabela 13. Resultados de quantificação obtidos para os alvos SA e LA e respetivo cálculo do DI relativamente às amostras submetidas à luz UV.

	<i>Kit Quantifiler® Trio</i>			
	Tempo de exposição ao UV (minutos)	Concentração Alvo SA (ng/μL)	Concentração Alvo LA (ng/μL)	DI
Amostra A	0	1.3963	1.5420	0.9055
	5	0.6907	0.5276	1.3091
	10	0.6390	0.2506	2.5499
	15	0.5526	0.1010	5.4713
	20	0.5113	0.0538	9.5037
	25	0.4471	0.0470	9.5128
Amostra B	0	1.5035	1.4547	1.0335
	5	0.8294	0.5686	1.4587
	10	0.6288	0.2549	2.4668
	15	0.4268	0.1249	3.4171
	20	0.3804	0.0509	7.4735
	25	0.4180	0.0395	10.5823
Amostra C	0	1.0720	0.9574	1.1197
	5	0.9380	0.5356	1.7513
	10	0.7131	0.2103	3.3909
	15	0.5810	0.0702	8.2764
	20	0.4923	0.0278	17.7086
	25	0.3746	0.0199	18.8241
Amostra D	0	1.8600	1.5446	1.2042
	5	0.9720	0.4655	2.0881
	10	0.9293	0.2157	4.3083
	15	0.7634	0.1189	6.4205
	20	0.6792	0.0470	14.4511
	25	0.5127	0.0150	34.1800

Nota: O tempo de 0 minutos corresponde à ausência de exposição à luz UV.

Analisando os resultados, verifica-se que o valor de DI aumenta com o tempo de exposição à luz UV em todas as amostras. Estes resultados correspondem ao esperado, pois uma maior exposição à luz UV traduz-se num maior número de alterações estruturais do DNA, induzidas pela maior quantidade de radiação absorvida.

Numa perspetiva geral, é possível observar que as concentrações dos dois alvos autossómicos SA e LA diminuem progressivamente com a exposição à luz UV. Dos 0 para os 5 minutos de exposição à luz UV, é evidente uma redução significativa da concentração

dos dois alvos. A partir dos 5 minutos, observa-se igualmente a diminuição da concentração, no entanto, com pequenas alterações para o alvo SA. Para o alvo LA, a diminuição é bastante mais acentuada, uma vez que as alterações estruturais presentes no DNA afetam primeiramente as sequências de maiores dimensões.

Os resultados obtidos com o *kit Quantifiler® Trio* permitiram constatar que o aumento do tempo de exposição à luz UV se traduziu efetivamente na degradação das amostras de sangue e saliva, facto comprovado com a diminuição pronunciada da concentração do alvo LA, associado ao aumento progressivo do valor de DI. Estes resultados evidenciam, desta forma, a capacidade do *kit* em detetar diferentes níveis de degradação.

4.5.3.2 Amostras da rotina laboratorial do SGBF – Delegação do Centro

De modo a averiguar o impacto de diferentes índices de degradação na qualidade dos perfis genéticos obtidos com recurso ao *kit GlobalFiler®*, estudaram-se amostras da rotina laboratorial do SGBF – Delegação do Centro, previamente quantificadas com o *kit Quantifiler® Trio*. Estas amostras foram separadas em dois grupos distintos: amostras com concentrações semelhantes e DI diferentes (amostras A a F) *versus* amostras com concentrações diferentes e DI semelhantes (amostras G a J). Todas as amostras foram amplificadas com o volume máximo admitido para o *kit GlobalFiler®*, dado que apresentam quantidades de DNA inferiores a 1 ng. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados de quantificação e amplificação obtidos para as amostras da rotina do SGBF – Delegação do Centro com os *kits Quantifiler® Trio* e *GlobalFiler®*, respetivamente.

Amostras	<i>Kit Quantifiler® Trio</i>		<i>Kit GlobalFiler®</i>
	DNA total (ng/μL)	DI	Perfil genético
A	0.0356	2.3012	Completo
B	0.0346	14.5539	15/24
C	0.0128	1.0668	Completo
D	0.0172	14.6870	15/24
E	0.0240	2.1259	Completo
F	0.0223	11.5330	8/24
G	0.0405	7.4144	13/24
H	0.0873	6.9828	21/24
I	0.2094	Indeterminado	12/24
J	0.0290	Indeterminado	6/24

As amostras A e B apresentam concentrações muito próximas, mas têm DI diferentes, sendo o DI da amostra A inferior ao da amostra B. Estas diferenças no DI refletem-se nos respetivos perfis genéticos, pois apenas foi possível obter um perfil completo para a amostra A. Relativamente às amostras C e D, os resultados obtidos são análogos aos das amostras A e B, observando-se um perfil completo para a amostra C, ou seja, aquela que apresenta um DI mais baixo. Por fim, as amostras E e F possuem resultados idênticos aos anteriores, novamente com a amostra de menor DI a revelar um perfil completo. Estes resultados demonstram a influência do DI na obtenção de um perfil genético, uma vez que a qualidade do perfil diminui com o aumento do DI.

As amostras G e H apresentam DI muito próximos, mas concentrações diferentes, sendo que a amostra H tem o dobro da concentração da amostra G. Estas diferenças na concentração influenciam os resultados, verificando-se um perfil quase completo para a amostra H, enquanto o perfil da amostra G se revelou bastante mais incompleto. Por outro lado, a amostra J apresenta uma concentração sete vezes inferior à da amostra I, possuindo ambas um DI indeterminado. Este DI reflete a ausência de quantificação do alvo LA, sendo sinónimo da presença de extrema degradação nas amostras. Tal como no exemplo anterior, a amostra mais concentrada apresentou um perfil menos incompleto.

Através dos resultados obtidos, foi possível conferir a importância de olhar não só para a concentração de DNA, mas também para o valor de DI. Para uma mesma concentração, um maior DI traduz-se na diminuição da qualidade do perfil genético. Já para um mesmo valor de DI, amostras mais concentradas possibilitam a obtenção de um perfil mais completo. O parâmetro do DI pode, então, ser utilizado para prever a qualidade de um dado perfil genético, permitindo aferir a quantidade de DNA que deve ser adicionada na reação de amplificação, de modo a tentar ultrapassar o efeito da degradação.

5 Conclusões

Os resultados de quantificação são determinantes para as etapas seguintes da análise forense, uma vez que a qualidade e quantidade de DNA disponível pode comprometer a obtenção de um perfil genético.

No SGBF – Delegação do Centro do INMLCF, I.P., foram realizados os estudos conducentes à validação interna do *kit Quantifiler® Trio*, tendo como base as orientações definidas no Procedimento Geral de Validação de Ensaio (PG-SGBF-C-001, 2014). Os parâmetros estudados para a validação desta metodologia foram os seguintes: precisão, limiares analíticos, especificidade e contaminação.

No parâmetro da precisão foram avaliados *standards* e controlos positivos internos. O estudo dos cinco *standards* indicou uma consistência nos valores de C_T obtidos para cada *standard* nas três corridas de quantificação, realizadas em diferentes dias, o que demonstra a elevada precisão do *kit Quantifiler® Trio*. Relativamente aos três controlos positivos internos, os valores de concentração obtidos permitiram constatar a reprodutibilidade do método dentro da mesma corrida de quantificação.

O estudo dos limiares analíticos comprovou a elevada sensibilidade do *kit Quantifiler® Trio* na deteção de concentrações de DNA muito reduzidas, revelando ainda uma grande proximidade entre os valores obtidos e os teóricos esperados para os controlos e respetivas diluições.

Na avaliação da especificidade, não se verificou quantificação para nenhuma das espécies animais analisadas, obtendo-se apenas resultados positivos para as amostras humanas testadas. Desta forma, foi confirmada a especificidade do *kit Quantifiler® Trio* para o DNA humano.

Relativamente ao parâmetro da contaminação, observou-se que o *kit Quantifiler® Trio* conseguiu determinar concentrações distintas de DNA masculino *versus* DNA feminino em misturas com diferentes proporções M:F, nas quais a concentração do contribuinte minoritário era muito reduzida comparativamente ao contribuinte maioritário.

Além destes parâmetros foram igualmente estudados outros critérios, considerando a importância do *kit Quantifiler® Trio* como ferramenta de orientação na fase da amplificação por PCR. Para tal, avaliou-se a influência dos resultados obtidos com o *kit* na determinação dos perfis genéticos de amostras de mistura com diferentes proporções M:F, bem como de amostras comprometidas em termos de quantidade e qualidade de DNA, recorrendo ao *kit*

de amplificação *GlobalFiler®*. Por fim, foram também analisadas amostras de mistura previamente definidas como falsos negativos através da quantificação com o *kit Quantifiler® Duo*, as quais evidenciaram a presença de um perfil genético masculino aquando da amplificação com *kits* específicos para os STRs do cromossoma Y.

Nas amostras de mistura amplificadas com o *kit GlobalFiler®*, verificou-se a ausência do perfil genético masculino com o aumento da proporção M:F. Nas duas abordagens estudadas, os melhores resultados foram obtidos com a abordagem baseada nos resultados de quantificação do DNA masculino, concluindo-se que até à proporção 1:20 (inclusive) é possível individualizar um perfil masculino para os STRs autossómicos com recurso ao *kit GlobalFiler®*. A partir desta proporção, apenas é possível obter um perfil masculino através de *kits* de amplificação específicos para os STRs do cromossoma Y.

Os falsos negativos anteriormente obtidos com o *kit Quantifiler® Duo* revelaram resultados positivos com o *kit Quantifiler® Trio*, sendo detetado DNA masculino em todas as amostras em estudo. Estes resultados podem ser explicados devido ao sistema multicópia do *kit Quantifiler® Trio*, o qual possibilita a deteção de vários alvos dispersos no cromossoma Y, aumentando, assim, a probabilidade de amplificar até mesmo quantidades reduzidas de DNA masculino.

Posteriormente, estudaram-se amostras degradadas artificialmente com luz UV e amostras da rotina do SGBF – Delegação do Centro, com o intuito de avaliar o parâmetro do índice de degradação. Nas amostras submetidas à luz UV, verificou-se que o valor de DI aumentou com a exposição à luz UV, traduzindo-se numa diminuição progressiva da concentração do alvo LA. Já para as amostras de rotina, foi possível constatar diferenças entre os dois grupos. Para as amostras com concentrações semelhantes e DI diferentes, observou-se que para uma mesma concentração, um DI superior resultou numa menor qualidade do perfil genético obtido. No caso das amostras com concentrações diferentes e DI semelhantes, foi possível determinar que para um mesmo DI, amostras com concentração mais elevada permitiram obter um perfil mais completo. Estes resultados demonstram a influência que o índice de degradação tem na previsão da qualidade de um dado perfil genético, refletindo a importância da análise deste parâmetro aquando da tomada de decisão sobre os procedimentos seguintes a efetuar.

Assim, todos os resultados obtidos permitiram validar internamente o *kit Quantifiler® Trio*, estando este *kit* atualmente implementado na rotina laboratorial do SGBF – Delegação do Centro do INMLCF, I.P.

6 Referências Bibliográficas

Alaeddini, R., Walsh, S.J., Abbas, A.: Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - A review. *Forensic Science International: Genetics*. 2010; 4: 148 –157.

Applied Biosystems (2010). Manual do 7500 Real-Time PCR System. Disponível em https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocument/s/cms_050329.pdf.

Applied Biosystems (2012). Manual do kit Quantifiler® Duo DNA Quantification. Disponível em https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4391294_Quantifiler_Duo_UG.pdf.

Applied Biosystems (2014). Manual do kit GlobalFile® PCR Amplification. Disponível em <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4477604.pdf>.

Applied Biosystems (2014). Manual do kit Quantifiler® Trio DNA Quantification. Disponível em <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4485354.pdf>.

Applied Biosystems (2014). Manual do software de análise dos resultados HID Real-Time PCR Analysis Software Version 1.2. Disponível em http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0009819_HID_PCRAalysisSoftware_UG.pdf.

Ballantyne, J., Hanson, E., Green, R., Holt, A., Mulero, J.: Enhancing the sexual assault workflow: Testing of next generation DNA assessment and Y-STR systems. *Forensic Science International: Genetics*. 2013; 4: 228 –229.

Barbisin, M., Fang, R., O’Shea, C.E., Calandro, L.M., Furtado, M.R., Shewale, J.G.: Developmental validation of the Quantifiler® Duo DNA Quantification kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples. *Journal of Forensic Sciences*. 2009; 54(2): 305–319.

Barbisin, M., Shewale, J.G.: Assessment of DNA extracted from forensic samples prior to genotyping. *Forensic Science Review*. 2010; 22: 199–214.

Barbisin, M., Fang, R., Furtado, M.R., Shewale, J.G.: Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit: A Guiding Tool for Short Tandem Repeat Genotyping of Forensic Samples. *Journal of Forensic Research*. 2011; 2(2): 1–11.

Butler, J.M. (2009). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. 1ª Edição, Elsevier Academic Press.

Butler, J.M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. 1ª Edição, Elsevier Academic Press.

Butler, J.M. (2014). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. 1ª Edição, Elsevier Academic Press.

Cupples, C.M., Champagne, J.R., Lewis, K.E., Cruz, T.D.: STR profiles from DNA samples with “undetected” or low Quantifiler™ results. *Journal of Forensic Sciences*. 2009; 54(1): 103–107.

Federal Bureau of Investigation (2011). *Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories*. Disponível em <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/qas-standards-for-forensic-dna-testing-laboratories-effective-9-1-2011>.

Goodwin, W. et al. (2007). *An Introduction to Forensic Genetics*. 1ª Edição, Wiley.

Green, R.L., Roinestad, I.C., Boland, C., Hennessy, L.K.: Developmental validation of the Quantifiler™ Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. *Journal of Forensic Sciences*. 2005; 50(4): 1–17.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996; 6(10): 986-994.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L.: Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature*. 1985; 316: 76 –79.

Liu, J. Y.: Direct qPCR quantification using the Quantifiler® Trio DNA quantification kit. *Forensic Science International: Genetics*. 2014; 13: 10 –19.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 1986; 51: 263–273.

NP EN ISSO/IEC 17025 (2005). *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*. Disponível em <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/ogc001.pdf>.

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods - SWGDAM (2012). *Validation Guidelines for DNA Analysis Methods*. Disponível em http://swgdam.org/SWGDAM_Validation_Guidelines_APPROVED_Dec_2012.pdf.

Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., Delegação do Centro (2014). *Instrução: Prevenção da Contaminação na fase pré-PCR* (I-SGBF-C-014).

Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., Delegação do Centro (2014). *Procedimento Geral: Validação de Ensaios* (PG-SGBF-C-001).

Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., Delegação do Centro (2014). *Procedimento Operacional: Amplificação de DNA por PCR com GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* (PO-SGBF-C-012).

Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., Delegação do Centro (2015). *Instrução Técnica: Preparação de amostras para quantificação em tempo real* (IT-SGBF-C-015).

Tilstone et al. (2005). *DNA Analyst Training by National Forensic Science Technology Center*. Disponível em http://projects.nfstc.org/pdi/Subject00/pdi_s00.htm.

Vernarecci, S., Ottaviani, E., Agostino, A., Mei, E., Calandro, L., Montagna, P.: Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: A matter of degradation. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 16: 77 –85.

7.1 Anexo I – Artigo aceite para publicação

G Model
FSIGSS 1007 No. of Pages 2

ARTICLE IN PRESS

Forensic Science International: Genetics Supplement Series xxx (2015) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

Validation of Quantifiler® Trio DNA Quantification kit in forensic samples

N. Gouveia^{a,b}, P. Brito^{a,c}, A. Serra^a, F. Balsa^{a,c}, L. Andrade^{a,c}, M. São Bento^{a,c}, P. Cunha^a, V. Bogas^{a,c}, V. Lopes^{a,c}, M.J. Porto^{a,c,*}^a Forensics Genetic and Biology Service, Central Delegation, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P., Coimbra, Portugal^b Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal^c CENCIFOR, Forensic Sciences Centre, Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2015

Accepted 7 September 2015

Available online xxx

Keywords:

Quantifiler Trio

Sensitivity

Mixture samples

Degraded samples

ABSTRACT

The new quantification kit known as Quantifiler® Trio is introduced as more robust and sensitive compared to the Quantifiler® Duo, providing additional information in the analysis of forensic samples. Validation studies were designed to evaluate the sensitivity of the Quantifiler® Trio kit and its performance with mixture and degraded samples.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Forensic samples often have low quantity and/or degraded DNA, may contain PCR inhibitors and, particularly in sexual assault samples, a high quantity of female DNA compared to male DNA. These factors can make it difficult to decide whether to continue with autosomal STR analysis, which STR kit to use and how much DNA to add to the reaction [1,2]. The Quantifiler® Trio DNA Quantification kit helps overcome these obstacles through enhanced targets that have been designed to determine the quantity of DNA in highly compromised forensic samples, enabling to assess the level of DNA degradation through a new degradation index functionality which was not possible to achieve with the Quantifiler® Duo [3].

The aim of this study is to test the sensitivity of the Quantifiler® Trio kit and its performance with mixture and degraded samples.

2. Materials and methods

The standard curve was generated through tenfold serial dilutions with the 5 standard concentrations ranging from 50 ng/μL to 0.005 ng/μL.

The sensitivity of the Quantifiler® Trio was tested using serial dilutions of 6 DNA controls to obtain concentrations up to a minimum value of 0.005 ng/μL, which represent the smallest point of the standard curve.

In order to test the detection limit of minor contributor, mixture samples containing 1 ng/μL of male DNA and 1 ng/μL of female DNA were prepared. The ratio of male to female DNA was 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:40 and 1:50.

Casework samples were studied to evaluate the impact of different levels of degradation on genetic profiles determined.

All of the samples were quantified according to the manufacturer's instructions on the 7500 Real-Time PCR System and analyzed using the HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2. GlobalFiler® PCR Amplification kit was used in amplified samples, normalized to a standard concentration of around 1 ng/μL.

3. Results

DNA quantities obtained with the Quantifiler® Trio were very similar to the expected quantities for both controls and dilutions (Table 1).

Results for the mixture samples are summarized in Table 2. The measured male to female DNA ratio was very close to the expected values for all ratios tested. Amplification results showed that it was possible to obtain a complete female profile in all ratios, whereas a male profile was not visible from a ratio greater than 1:20.

* Corresponding author. Fax: +351239826132.

E-mail address: mariajoao.porto@dcinml.mj.pt (M.J. Porto).<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.010>

1875-1768/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Table 1
Quantification results of controls and respective dilutions obtained with Quantifiler® Trio.

Samples	Expected quantity (ng/μL)	Measured quantity (ng/μL)	Samples	Expected quantity (ng/μL)	Measured quantity (ng/μL)
Control 1	10	7.6326	Control 2	10	8.8824
Control 1 Dil-1	0.2	0.1372	Control 2 Dil-1	0.2	0.1122
Control 1 Dil-2	0.02	0.0131	Control 2 Dil-2	0.02	0.0133
Control 1 Dil-3	0.01	0.0064	Control 2 Dil-3	0.01	0.0092
Control 1 Dil-4	0.005	0.0038	Control 2 Dil-4	0.005	0.0028
Control 3	0.1	0.0863	Control 4	0.1	0.0728
Control 3 Dil-1	0.05	0.0433	Control 4 Dil-1	0.05	0.0261
Control 3 Dil-2	0.025	0.0178	Control 4 Dil-2	0.025	0.0128
Control 3 Dil-3	0.0125	0.0071	Control 4 Dil-3	0.0125	0.0071
Control 3 Dil-4	0.00625	0.0026	Control 4 Dil-4	0.00625	0.0063
Control 5	2	1.6023	Control 6	2	2.8847
Control 5 Dil-1	0.2	0.1504	Control 6 Dil-1	0.2	0.1477
Control 5 Dil-2	0.02	0.0136	Control 6 Dil-2	0.02	0.0127
Control 5 Dil-3	0.01	0.0080	Control 6 Dil-3	0.01	0.0052
Control 5 Dil-4	0.005	0.0036	Control 6 Dil-4	0.005	0.0029

Table 2
Quantification and amplification results of mixture samples obtained with Quantifiler® Trio and GlobalFiler® kits, respectively. The concentration of female DNA can be approximated by subtracting the male DNA concentration from the human DNA concentration.

Expected M:F ratio	Quantifiler® Trio Kit			Measured M:F ratio	GlobalFiler® Kit	
	Human DNA (ng/μL)	Male DNA (ng/μL)	Female DNA (ng/μL)		Female profile	Male profile
1:1	0.9887	0.5247	0.4640	1:0.88	Complete	Complete
1:2	1.0563	0.3690	0.6873	1:1.86	Complete	Complete
1:5	1.0492	0.1762	0.8730	1:4.96	Complete	Complete
1:10	1.0941	0.0955	0.9986	1:10.46	Complete	23/24
1:15	1.0835	0.0577	1.0258	1:17.79	Complete	19/24
1:20	1.0380	0.0465	0.9915	1:21.33	Complete	14/24
1:40	0.6743	0.0191	0.6552	1:34.22	Complete	–
1:50	0.8881	0.0157	0.8724	1:55.43	Complete	–

Table 3
Quantification and amplification results of casework samples obtained with Quantifiler® Trio and GlobalFiler® kits, respectively. (a – Degradation index was not calculated due to a significant degradation of the samples.)

Samples	Quantifiler® Trio Kit		GlobalFiler® Kit
	Human DNA (ng/μL)	Degradation Index	Profile
A	0.0356	2.3012	Complete
B	0.0346	14.5539	15/24
C	0.0128	1.0668	Complete
D	0.0172	14.6870	15/24
E	0.0240	2.1259	Complete
F	0.0223	11.5330	8/24
G	0.0405	7.4144	13/24
H	0.0873	6.9828	21/24
I	0.2094	a	12/24
J	0.0290	a	6/24

Table 3 contains results for the casework samples. Samples A and B, C and D, E and F have similar concentrations but different degradation index, while samples G and H have different concentrations but similar level of degradation. For a similar concentration, a higher degradation index resulted in a lower quality of genetic profile. On the other hand, more concentrated samples allowed a more complete profile where the level of degradation was similar. Finally, samples I and J are an example of the impact of extreme degradation in obtaining genetic profiles.

4. Discussion and conclusion

Sensitivity studies showed that the DNA quantities obtained with Quantifiler® Trio were very similar to the expected quantities for each control and dilution. The measured male to female ratios were in agreement with the expected ratios revealing the ability of the Quantifiler® Trio to detect small quantities of male DNA in the presence of high amounts of female DNA. Furthermore, it was possible to conclude that a male profile was not visible from a ratio greater than 1:20 and so Y-STR analysis is recommended in these samples. Also, the results demonstrated that the degradation index information can be used to adjust the quantity of DNA in PCR and predict the quality of the expected profiles.

All of these results showed that Quantifiler® Trio is more informative and sensitive in comparison with Quantifiler® Duo.

Conflict of interest

None.

References

- [1] J. Liu, Direct qPCR quantification using the Quantifiler® Trio DNA quantification kit, *Forensic Sci. Int. Genet.* 13 (2014) 10–19.
- [2] S. Vernarecci, et al., Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: a matter of degradation, *Forensic Science International: Genetics* 16 (2015) 77–85.
- [3] Applied Biosystems, Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit User Guide, Life Technologies, 2014.