



GRUPO DE HABLA ESPAÑOLA Y PORTUGUESA DE LA ISFG

GRUPO DE LÍNGUAS ESPANHOLA E PORTUGUESA DA ISFG

Instituto Nacional de Toxicología  
y Ciencias Forenses

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA JUSTICIA Y RELACIONES CON LAS CORTES  
SERVICIO DE GARANTÍA DE CALIDAD  
DEPARTAMENTO DE MADRID  
C/ José Echegaray nº 4 - 28232 Las Rozas de Madrid (Madrid)  
Tf. +34 91 7688919 Fax +34 91 5648654  
e-mail: intcf.eiadn@justicia.es

*\*As actividades marcadas não estão cobertas pela acreditação de ENAC*

## EXERCÍCIO DE INTERCOMPARAÇÃO

### “ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE DNA EM MANCHAS DE SANGUE E OUTRAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS”

NIVEL BÁSICO

EXERCÍCIO EIADN- 32 (2024)

DATA LIMITE: 15/05/2024

#### Itens enviados

##### 2024/Módulo de Parentesco

M1 a M3: itens de referência

##### 2024/Módulo Forense

M4: item forense desconhecido

M5: cabelo ou pêlo

Nº de selo

#### Abordagem proposta:

##### 2024/Módulo de Parentesco - Nível básico

###### Estudo prático de parentesco

- M1, M2, M3: itens de referência para análise genética.

###### Estudo teórico de parentesco

Solicita-se a resolução do caso teórico apresentado.

##### 2024/Módulo Forense - Nível básico

###### Estudo prático forense

- M4: item forense para análise genética.
- M5: cabelo ou pêlo para análise de DNA mitocondrial.
- ◆ Estabeleça a natureza do componente ou dos possíveis componentes do item M4.
- ◆ Poderia ter contribuído ao item M4 algum dos dadores dos itens de referência M1, M2, M3?

###### Estudo teórico forense

Solicita-se a resolução do caso teórico apresentado.

#### Metodologia a empregar

A investigação será realizada com os marcadores e métodos que o laboratório escolha e que habitualmente usa na rotina ou no ponto de entrar em rotina. Os itens devem ser tratados como amostras laboratoriais de rotina e, se possível, de forma cega.

O Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses é o titular da acreditação



## ÍNDICE

Pág.

---

<b>1. Metodologia</b>	
1.1. Extracção, purificação/concentração e quantificação de DNA	3
1.2. Metodologia STR	
1.2.1. Metodologia de kits multiplex	3
1.2.2. Outra metodologia para marcadores STR autossómicos e amelogenina	4
1.2.3. Outra metodologia para marcadores Y-STR	4
1.2.4. Outra metodologia para marcadores X-STR	4
1.3. Metodologia DNA mitocondrial	
1.3.1. Parâmetros de amplificação	4
1.3.2. Parâmetros de sequenciação e edição	5
1.4. Metodologia para identificação de fluídos no item M4	5
1.5. Outros aspectos da metodologia diferentes dos indicados nas tabelas anteriores	5
<b>2. Resultados estudos práticos</b>	
2.1. Resultados STR	
2.1.1. STR autossómicos e amelogenina	6
2.1.2. Y-STR	7
2.1.3. X-STR	8
2.2. Resultados de DNA mitocondrial	8
<b>3. Conclusões estudos práticos</b>	
3.1. Módulo de Parentesco	
3.1.1. Observações para os itens M1, M2 e M3	9
3.2. Módulo Forense	
3.2.1. Pergunta 1	9
3.2.2. Pergunta 2	9
3.2.3. Pergunta 3	9
3.2.4. Observações para os itens M4 e M5	9
<b>4. Estudos teóricos</b>	
4.1. Estudo teórico de Parentesco	10
4.2. Estudo teórico Forense	13
<b>5. Observações ao presente exercício</b>	17
<b>6. Sugestões para o próximo exercício</b>	17
<b>7. Compromissos do participante</b>	17
Data e assinatura do responsável	17
Pedido do certificado	17

**1. Metodologia** *Leia atentamente as instruções proporcionadas antes de preencher esta secção***1.1 Extracção, purificação/concentração e quantificação de DNA**

TABELA 1

Item	Lise diferencial (Sim ou Não)	Extracção Purificação/ Concentração (Código)	EP00 (Especificar)	Quantificação (Código)	C00 (Especificar)
M1					
M2					
M3					
M4					
M5					

Codificação no Anexo 2024

**1.2 Metodologia STR****1.2.1 Metodologia de kits multiplex**

TABELA 2A (Kits multiplex)

Se utiliza um kit não incluído na tabela, adicione-o nas últimas linhas.

Multiplex	Indicar 'SIM' se foi utilizado	Detecção (Código)	D00 (Especificar)
FFFL (Promega)			
PowerPlex 16/16 HS (Promega)			
PowerPlex ESI 16 (Promega)			
PowerPlex ESX 16 (Promega)			
PowerPlex ESI 17 (Promega)			
PowerPlex ESX 17 (Promega)			
PowerPlex 18D (Promega)			
Profiler Plus (AB)			
SGM Plus (AB)			
Identifiler (AB)			
Identifiler Plus (AB)			
Identifiler Direct (AB)			
NGM (AB)			
NGM SElect (AB)			
MiniFiler (AB)			
Investigator ESSplex (Qiagen)			
Investigator ESSplex SE (Qiagen)			
Investigator IDplex (Qiagen)			
YFiler (AB)			
PowerPlex Y (Promega)			
Argus X-8 (Biotype)			
Investigator Argus X-12 (Qiagen)			
XSTR-Decaplex GHEP (Gusmão)			
PowerPlex CS7 (Promega)			
Profiler (AB)			
Investigator Argus Y-12 (Qiagen)			
SEfiler (AB)			
PowerPlex 23Y (Promega)			
PowerPlex Fusion System (Promega)			

Multiplex	Indicar 'SIM' se foi utilizado	Detecção (Código)	D00 (Especificar)
Global Filer (AB)			
PowerPlex 21 (Promega)			
Investigator 24plex QS (Qiagen)			
PowerPlex Fusion 6C System (Promega)			
Verifiler (AB)			
YFiler plus (AB)			
Investigator ESSplex plus (Qiagen)			
Investigator ESSplex Plus SE(Qiagen)			
Investigator IDplex Plus (Qiagen)			
Investigator HDplex (Qiagen)			
Investigator Argus X-12 QS (Qiagen)			

Codificação no Anexo 2024

**1.2.2 Outra metodologia para marcadores STR autossômicos e amelogenina****TABELA 2B**

No caso de não usar kits multiplex ou usar marcadores STR autossômicos adicionais, indique o número de marcadores e os *primers* usados, bem como o método de detecção.

Número de marcadores	Primer/Ladder (código)	PL00 (Especificar)	Detecção (Código)	D00 (Especificar)

Codificação no Anexo 2024

**1.2.3 Outra metodologia para marcadores Y-STR****TABELA 2C**

No caso de não usar kits multiplex ou usar marcadores Y-STR adicionais, indique o número de marcadores e os *primers* usados, bem como o método de detecção.

Número de marcadores	Primer/Ladder (código)	PL00 (Especificar)	Detecção (Código)	D00 (Especificar)

Codificação no Anexo 2024

**1.2.4 Outra metodologia para marcadores X-STR****TABELA 2D**

No caso de não usar kits multiplex ou usar marcadores X-STR adicionais, indique o número de marcadores e os *primers* usados, bem como o método de detecção.

Número de marcadores	Primer/Ladder (código)	PL00 (Especificar)	Detecção (Código)	D00 (Especificar)

Codificação no Anexo 2024

**1.3 Metodologia DNA mitocondrial****1.3.1 Parâmetros de amplificação****TABELA 3**

Indique o par de *primers* em cada campo, nomeando-os de acordo com a cadeia (L ou H) e posição em 3' (Ex: L15997/H00619).

Pares de <i>primers</i> de amplificação					Nº de ciclos
Item	Forward/Reverse	Forward/Reverse	Forward/Reverse	Forward/Reverse	
M1-M3					
M4					
M5					



**2. Resultados estudos práticos:**

*Leia atentamente as instruções enviadas para preencher as tabelas de resultados, e as bases de participação para conhecer o estabelecimento dos valores atribuídos e a avaliação dos resultados <https://ghep-isfg.org/pt/proficiency/participation>*

**2.1 Resultados STR**

**TODOS OS PARTICIPANTES DEVEM PREENCHER OBRIGATORIAMENTE A COLUNA DOS ALELOS TOTAIS DETECTADOS INDEPENDENTEMENTE DO SISTEMA DE EXTRACÇÃO QUE UTILIZEM.** As colunas da 1ª e 2ª fracção são adicionais e opcionais, caso o laboratório tenha realizado a lise diferencial e queira indicar o seu resultado.

**2.1.1 STR autossómicos e amelogenina**

TABELA 6A

MÓDULO DE PARENTESCO				MÓDULO FORENSE		
MARCADOR	M1	M2	M3	M4		
				Alelos totais detectados Ex: 9-11-15-17	1ª fracção Ex: 9-17	2ª fracção Ex: 11-15
AMEL						
D8S1179						
D21S11						
D7S820						
CSF1PO						
D3S1358						
TH01						
D13S317						
D16S539						
D2S1338						
D19S433						
vWA						
TPOX						
D18S51						
D5S818						
FGA						
Penta D						
Penta E						
D10S1248						
D22S1045						
D2S441						
D1S1656						
D12S391						
SE33						
FES/FPS						
F13A01						
F13B						
LPL						
Penta C						
D6S1043						

## 2.1.2 Y-STR

TABELA 6B

MÓDULO DE PARENTESCO				MÓDULO FORENSE		
MARCADOR	M1	M2	M3	M4		
				Alelos totais detectados Ex: 13-15	1ª fracção Ex: 15	2ª fracção Ex: 13
DYS456						
DYS389 I						
DYS390						
DYS389 II						
DYS458						
DYS19						
DYS385						
DYS393						
DYS391						
DYS439 (GATA A4)						
DYS635 (GATA C4)						
DYS392						
GATAH4						
DYS437						
DYS438						
DYS448						
DYS460 (GATA A7.1)						
DYS461 (GATA A7.2)						
GATAA10						
DYS388						
DYS576						
DYS481						
DYS549						
DYS533						
DYS570						
DYS643						
DYS627						
DYS518						
DYS449						
DYF387S1						

## 2.1.3 X-STR

TABELA 6C

MÓDULO DE PARENTESCO				MÓDULO FORENSE		
MARCADOR	M1	M2	M3	M4		
				Alelos totais detectados Ex: 12-15-17-20	1ª fracção Ex:12-15	2ª fracção Ex:17-20
HPRTB						
DXS8378						
DXS9898						
DXS7133						
GATA31E08						
GATA172D05						
DXS7423						
DXS6809						
DXS7132						
DXS9902						
DXS6789						
DXS10103						
DXS10134						
DXS10074						
DXS10101						
DXS10135						
DXS10146						
DXS10079						
DXS10148						

## 2.2 Resultados de DNA mitocondrial

Na Tabela 7A, indique as posições inicial e final das regiões editadas e na Tabela 7B, informe os haplótipos seguindo a ordem solicitada nas instruções.

TABELA 7A

ITENS	REGIÕES EDITADAS	
<b>MÓDULO PARENTESCO</b>		
M1		
M2		
M3		
<b>MÓDULO FORENSE</b>		
M4	1ª fracção	
	2ª fracção	
Cabelo ou pêlo M5		

TABELA 7B

ITENS		HAPLÓTIPO
<b>MÓDULO PARENTESCO</b>		
M1		
M2		
M3		
<b>MÓDULO FORENSE</b>		
M4	1ª fracção	
	2ª fracção	
Cabelo ou pêlo M5		

### 3. Conclusões estudos práticos

#### 3.1 Módulo de Parentesco

##### 3.1.1 \*Observações relativas aos itens M1, M2 y M3

Indique os comentários e observações que deseja fazer em relação aos itens analisados. Relembra-se que apenas é solicitada a análise genética dos itens de referência M1 a M3; não é necessário investigar relações de parentesco entre eles.

--

#### 3.2 Módulo Forense

##### 3.2.1 Estabeleça a natureza do componente ou possíveis componentes do item M4.

Componentes (marque com um X o componente ou componentes detectados)

	Sangue	Sémen	Saliva
M4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

##### 3.2.2 Indique o número mínimo de contribuintes detectados no item M4.

	1	2	3
M4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

##### 3.2.3 Poderia ter contribuído para o item M4 algum dos dadores dos itens de referência M1, M2, M3?

	M1	M2	M3
M4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

##### 3.2.4 \*Observações relativas aos itens M4 e M5.

--

#### 4. Estudos Teóricos

**Leia atentamente as instruções enviadas para preencher as tabelas de resultados, e as bases de participação para conhecer o estabelecimento dos valores atribuídos e a avaliação dos resultados <https://ghep-isfg.org/pt/proficiency/participation>**

##### Para a resolução dos estudos teóricos (parentesco e forense) assume-se que:

- a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não há necessidade de fazer correcções pela existência de sub-estruturação populacional ( $teta=0$ ).
- a taxa de alelos silenciosos e a taxa de mutação é 0.
- correcção drop in, drop out= 0

Os cálculos devem ser efectuados recorrendo à tabela "*Frequências alélicas 2024*" fornecida.

#### 4.1 Estudo teórico de Parentesco

##### 4.1.1 Exposição do problema

Um casal de idosos: José e María, após a morte do seu único filho, Carlos, tentam manter a relação com o seu único neto, Raúl, filho de Carlos e Juana. Juana recusa, alegando que Raúl não era filho biológico de Carlos. Os avós e a mãe concordam em realizar um teste de parentesco biológico para conhecer a realidade biológica e agir em conformidade.

Estão disponíveis os perfis genéticos de José e María, de Juana e do suposto neto Raúl.

- o O casal de idosos será considerado como tendo apenas um filho. O perfil genético do seu filho Carlos não está disponível dado que foi cremado.
- o Não há dúvida de que Raúl é filho biológico de Juana.

Marcadores	JOSÉ	MARÍA	JUANA	RAUL
D8S1179	14	14	14	14
D21S11	28	28-30	28-30	28-30
D7S820	9-10	9-10	11-12	9-11
CSF1PO	10	11	11-12	10-12
D3S1358	14	15-16	16	16
TH01	7-8	8-9	9.3	8-9.3
D13S317	11-12	13	11-12	11-12
D16S539	9-10	11-12	13	12-13
D2S1338	19	19	20	19-20
D19S433	13	13-14	13-14	13
VWA	16-17	16-17	16-17	16-17
TPOX	8	11	8-11	11
D18S51	12	13-14	15-16	12-16
D5S818	11-12	12-13	12-13	12-13
FGA	20-21	22	23	22-23
D10S1248	13-14	15-16	14-15	14
D1S1656	12	12	12-15	12-15
D22S1045	15	15-16	15-16	16

Marcadores	JOSÉ	MARÍA	JUANA	RAUL
D2S441	10-11	10-11	14	11-14
D12S391	18	19	18-19	18-19
Penta D	9	11-12	12-13	12
Penta E	11-12	12-13	11-13	13
SE33	17-18	19	20-22.2	18-20
D6S1043	11-19	12-18	12	12

#### 4.1.2 Índice de parentesco

Calcular o índice de parentesco considerando as seguintes hipóteses:

H0	O filho de José e María (Carlos), é o pai biológico de Raúl, tendo em conta que Juana é a mãe biológica
H1	Outro indivíduo retirado ao acaso da população e geneticamente não relacionado com os anteriores é o pai biológico de Raúl, tendo em conta que Juana é a mãe biológica.

Indique os Índices de parentesco parciais e o IP total na Tabela 8.

Utilize notação científica (formato Excel) aplicando arredondamento com 4 casas decimais . Ex. 1,2346E-01

**TABELA 8**

Marcadores	IP
D8S1179	
D21S11	
D7S820	
CSF1PO	
D3S1358	
TH01	
D13S317	
D16S539	
D2S1338	
D19S433	
VWA	
TPOX	
D18S51	
D5S818	
FGA	
D10S1248	
D1S1656	
D22S1045	
D2S441	
D12S391	
Penta D	
Penta E	

Marcadores	IP
SE33	
D6S1043	
IP TOTAL	

#### 4.1.3- Programa(s) informático(s) utilizados para os cálculos estatísticos.

Programa	Versão	Observações (outros programas, comentários, etc)
Famílias		
DNA view		
PatPCR		
BDGen		
PatCan		
Genética Forense Final		
Software próprio <sup>1</sup>		
Outros <sup>1</sup>		

<sup>1</sup>Se não encontra o programa informático na tabela, escolha "Outros" e indique-o nas "Observações"

#### 4.1.4 Cálculo manual. Fórmulas utilizadas

No caso do seu laboratório ter realizado todos os cálculos manualmente, indique as fórmulas utilizadas na **Tabela 9**

**TABELA 9**

Marcadores	IP
D8S1179	
D21S11	
D7S820	
CSF1PO	
D3S1358	
TH01	
D13S317	
D16S539	
D2S1338	
D19S433	
VWA	
TPOX	
D18S51	
D5S818	
FGA	
D10S1248	
D1S1656	

Marcadores	IP
D22S1045	
D2S441	
D12S391	
Penta D	
Penta E	
SE33	
D6S1043	
IP TOTAL	

#### 4.1.5 \* Conclusões e observações sobre o estudo teórico de parentesco.

## 4.2 Estudo teórico Forense.

### 4.2.1 Exposição do problema

Numa discoteca, uma jovem (Carlota), em determinado momento da noite, sente-se tonta e desorientada. Quando se recupera, ela está numa ambulância a caminho do hospital. Ela lembra-se vagamente de estar cercada por um grupo de jovens e de se mexer porque um deles tentava beijá-la. No hospital, são colhidas várias amostras corporais e no esfregaço obtido do pescoço é obtida uma mistura de perfis genéticos de pelo menos duas pessoas.

Os seguranças da discoteca identificam os supostos agressores, que ficam detidos até à chegada da polícia.

Estão disponíveis os perfis genéticos dos supostos agressores que são irmãos. Uma amostra de referência também é colhida à vítima.

- Pretende-se saber se o perfil genético de algum dos indivíduos é compatível com a mistura de perfis genéticos obtida.

Marcadores	Irmão 1	Irmão 2	Carlota	Esfregaço do pescoço
D3S1358	15 - 17	14 - 17	15 - 17	14 - 15 - 17
vWA	15 - 16	15 - 17	16 - 17	15 - 16 - 17
D16S539	9 - 11	9 - 11	11 - 12	9 - 11 - 12
CSF1PO	10 - 12	11 - 12	12 - 13	11 - 12 - 13
D6S1043	18 - 20	18 - 20	19 - 20	18 - 19 - 20
D8S1179	15 - 16	15	11 - 12	11 - 12 - 15
D21S11	29	29 - 30	30 - 31	29 - 30 - 31
D18S51	13 - 14	13 - 16	14 - 15	13 - 14 - 15 - 16
D5S818	12	11 - 12	11 - 12	11 - 12
D2S441	10 - 15	11 - 15	14	11 - 14 - 15
D19S433	14	14 - 15	14 - 15	14 - 15
FGA	19 - 21	19 - 24	19 - 21	19 - 21 - 24
D10S1248	16	14 - 16	14 - 16	14 - 16
D22S1045	11 - 16	11 - 15	16	11 - 15 - 16

Marcadores	Irmão 1	Irmão 2	Carlota	Esfregaço do pescoço
D1S1656	14 - 15	12 - 15	12 - 14	12 - 14 - 15
D13S317	9	9 - 11	10 - 13	9 - 10 - 11 - 13
D7S820	8 - 9	8 - 9	11 - 12	8 - 9 - 11 - 12
PENTA E	7 - 11	11 - 12	7 - 13	7 - 11 - 12 - 13
PENTA D	9 - 13	9 - 13	10 - 11	9 - 10 - 11 - 13
TH01	6 - 7	6	7	6 - 7
D12S391	18 - 19.3	18	18.3 - 19.3	18 - 18.3 - 19.3
D2S1338	18 - 23	18 - 23	17 - 19	17 - 18 - 19 - 23
TPOX	11	8 - 11	8 - 11	8 - 11
AMELOGENINA	X - Y	X - Y	X	X - Y

#### 4.2.2 Valor de LR

Indique na **Tabela 10** os índices parciais da razão de verosimilhança (LR), bem como o LR total, com base nas seguintes hipóteses:

<b>H0</b>	A jovem (Carlota) e o indivíduo não excluído contribuíram para a mistura de perfis genéticos obtida.
<b>H1</b>	A jovem e um desconhecido tomado ao acaso da população e geneticamente não aparentado com os anteriores contribuíram para a mistura.

**TABELA 10**

Use notação científica (formato Excel). aplicando arredondamento com 4 casas decimais Ex. 1,2346E-01

Marcadores	LR
D3S1358	
vWA	
D16S539	
CSF1PO	
D6S1043	
D8S1179	
D21S11	
D18S51	
D5S818	
D2S441	
D19S433	
FGA	
D10S1248	
D22S1045	
D1S1656	
D13S317	

Marcadores	LR
D7S820	
PENTA E	
PENTA D	
TH01	
D12S391	
D2S1338	
TPOX	
LR Total	

#### 4.2.3 Programa(s) informático(s) utilizados para os cálculos estatísticos.

Programa	Versão	Observações (outros programas, comentários, etc.)
LRmix Studio		
LR mezcla v inteligente		
EuroForMix		
DNAMix		
Genética Forense Final		
Software próprio		
DNA View		
Outros <sup>2</sup>		

<sup>2</sup>Se não encontra o programa informático na tabela, escolha "Outros" e indique-o nas "Observações"

#### 4.2.4 Cálculo manual. Fórmulas utilizadas

No caso de ter efectuado os cálculos unicamente de forma manual, indique as fórmulas utilizadas na Tabela 11.

TABELA 11

Marcadores	LR
D3S1358	
vWA	
D16S539	
CSF1PO	
D6S1043	
D8S1179	
D21S11	
D18S51	
D5S818	
D2S441	
D19S433	
FGA	
D10S1248	

Marcadores	LR
D22S1045	
D1S1656	
D13S317	
D7S820	
PENTA E	
PENTA D	
TH01	
D12S391	
D2S1338	
TPOX	
LR Total	

#### 4.2.5 \* Conclusões

Emita uma conclusão sobre os resultados obtidos.

--

**5. Observações ao presente exercício**

--

**6. Sugestões para o próximo exercício**

--

**7. Compromissos do participante**

As análises, tanto na obtenção dos resultados como no seu tratamento estatístico, foram realizadas nas instalações pertencentes ao laboratório inscrito e pelos seus técnicos/peritos, por meio de procedimentos de trabalho similares aos observados em amostras de rotina e foram adoptadas as medidas apropriadas de Higiene e Segurança. **De acordo com o consentimento dado pelos dadores, o laboratório compromete-se a analisar os itens de forma anónima para o Exercício de Intercomparação do INTCFM/GHEP-ISFG e adicionalmente utilizá-los como material de referência e/ou controle de qualidade laboratorial, seja com as técnicas requeridas no Exercício ou com outras de uso forense, mas em qualquer caso sempre para fins de identificação humana, analisando regiões não codificantes ou que não fornecem informações sensíveis do dador: doenças, patologias ou outro tipo de informação genética que possa violar sua privacidade.**

Nome do responsável

Data e assinatura

**QUER RECEBER O CERTIFICADO DE AVALIAÇÃO?**

<b>Módulo de Parentesco (Nível Básico) (Sim/Não)</b>	<b>Módulo Forense (Nível Básico) (Sim/Não)</b>

ESCOLHA O IDIOMA DO CERTIFICADO ESPANHOL INGLÊS AMBOS 

Nota.- Para receber o certificado de avaliação é obrigatório o envio deste formulário assinado.