



GRUPO DE HABLA ESPAÑOLA Y PORTUGUESA DE LA ISFG

GRUPO DE LÍNGUAS ESPANHOLA E PORTUGUESA DA ISFG

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA JUSTICIA Y RELACIONES CON LAS CORTES

Instituto Nacional de Toxicología
y Ciencias ForensesSERVICIO 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.eiadm@justicia.es

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

INSTRUÇÕES EXERCÍCIO EIADN-33 (2025)

1. ITENS ENVIADOS E INSTRUÇÕES PARA O SEU TRATAMENTO

EIADN-33 (2025) /MÓDULO DE PARENTESCO NÍVEL BÁSICO

- ◆ M1, M2, M3

EIADN-33 (2025) /MÓDULO FORENSE NÍVEL BÁSICO

- ◆ M4, M5

EIADN-33 (2025) /MÓDULO FORENSE

- ◆ M6, M7, M8
- ◆ M9 (para identificação não humana)

Itens de referência

O item M1 consiste numa mancha de sangue aplicada em meta de um cartão *Ahlstrom-Munksjö GenCollect (Forensic DNA Grade)* cumpre os requisitos ISO 18385).

O item M2 consiste numa mancha de sangue aplicada em meta de um cartão *Ahlstrom-Munksjö GenCollect (Forensic DNA Grade)* cumpre os requisitos ISO 18385).

O item M3 consiste numa mancha de sangue aplicada em meta de um cartão *Ahlstrom-Munksjö GenCollect (Forensic DNA Grade)* cumpre os requisitos ISO 18385).

Itens forenses

O item M4 consiste numa mancha forense aplicada num suporte.

O item M5* consiste em cabelo ou pêlo sem raiz.

Os itens M6, M7, M8 e M9 são manchas forenses aplicadas em diferentes suportes.

Tratamento

Os itens são preparados com fluidos biológicos ou cabelos/pêlos de voluntários presumivelmente saudáveis, De qualquer forma, devem ser tratados como material potencialmente infeccioso e devem ser manuseados com todas as precauções habituais de segurança para este tipo de item.

Estas precauções incluem:

- Usar luvas, máscara e bata durante todo o processo.
- De preferência em câmara de segurança biológica.

Precauções extremas foram tomadas para garantir a homogeneidade dos itens, no entanto os participantes devem realizar uma amostragem, tomando uma amostra representativa do item, assim como fariam num caso real.

*Precauções extremas foram tomadas para evitar a contaminação durante a amostragem e durante a preparação dos itens. * No caso de cabelo ou pêlos antes de proceder à sua extração, o laboratório deve eliminar a potencial contaminação da superfície, conforme estabelecido nos protocolos de extração deste tipo de item.*

Os dados das amostras entendem que se realizará das mesmas um uso anónimo e exclusivo para o Exercício de Intercomparação GHEP-ISFG e, adicionalmente, como material de referência e/ou controle de qualidade do laboratório, sendo analisadas por meio de técnicas de uso forense e sempre empregues para fins de identificação humana, analisando regiões não codificantes ou que não forneçam informações sensíveis sobre o dador.

2. INSTRUÇÕES PARA O PREENCHIMENTO E ENVIO DO FORMULÁRIO ELECTRÓNICO

ATENÇÃO: A coordenadora do exercício irá notificá-lo por e-mail quando o formulário electrónico estiver disponível na página do GHEP-ISFG: <https://ghep-isfg.org/pt/proficiency/>

É obrigatório enviar os resultados do exercício através desse formulário. Se algum laboratório tiver problemas em aceder ao formulário electrónico, entre **URGENTEMENTE** em contacto connosco (intcf.eiadm@justicia.es).

- O formulário pode ser acedido através do menu **Exercício de Intercomparação** e aceder ao **Formulário 2025**.
- Para aceder ao formulário electrónico deve utilizar as senhas (usuário e *password*) da pessoa que realizou a inscrição
- Após o preenchimento do formulário electrónico, reveja o seu conteúdo antes de enviá-lo. **Assine-o eletronicamente, envie para intcf.eiadm@justicia.es ou anexe-o na página web. Se o assinar manualmente**, imprima-o na íntegra (com todas as páginas, preenchidas ou não) e envie **por correio normal**.
- **Direcção postal de envio: Att: Koro Fernández. Servicio de Garantía de Calidad. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. C/José Echegaray, 4. 28232 Las Rozas. Madrid. Espanha.**
- Além disso, solicita-se o envio dos registos de análises que **devem ser submetidos através da página web.:** eletroferogramas (ou cópias de géis) e cálculos estatísticos realizados (manuais e/ou informatizados) para a avaliação dos resultados.
- **Data limite para envio dos resultados: 15 de Maio de 2025 às 22:00 GMT; não se permitirá o acesso ao formulário electrónico após esta data e hora.**

TABELAS 1 a 4

- Na **Tabela 1**, indique em cada campo um único método de extracção / purificação / concentração e quantificação de DNA.
- No caso de indicar em algum campo 'Outro', especifique o método na coluna correspondente 'Especificar'.
- Nas **Tabelas 3 e 4**, entende-se que os mesmos procedimentos são utilizados para todos os itens de referência, bem como para as duas fracções do mesmo item questionado. Se desejar fazer algum comentário adicional a detalhes das tabelas anteriores, indique-o na secção 1.5 (nível básico) ou na secção 1.6 (nível avançado).

TABELA 5

- Preencha esta secção caso participe no Módulo Forense.
- **É obrigatório** completar esta secção para que a natureza dos fluidos dos itens forenses seja avaliada no certificado, detalhando a metodologia utilizada para a análise da natureza dos mesmos. **No entanto, a avaliação será realizada sobre os resultados reportados no ponto 3.2.1 (nível básico) ou no ponto 3.1.1 (nível avançado).**

TABELA 6

- **Lembre-se de que é obrigatória a participação com um mínimo de 12 STRs autossómicos (pelo menos 7 STRs do CODIS).**
- Antes de adicionar um novo marcador, confirme se ele **já** não está contemplado na tabela correspondente. Os campos em branco serão usados unicamente para colocar os marcadores que **não existam** nas tabelas.
- **Indique os alelos separados por um hífen - e sem espaços em branco;** no caso de homozigóticos, indicar apenas um alelo. Exemplos: X-Y X 14-15.
- **Os alelos devem ser informados do menor para o maior. No caso dos alelos microvariantes**, designe-os indicando o número de repetições completas seguido de um ponto e o número de bases da repetição incompleta. Exemplo: 9.1-11.
- Apenas um máximo de dois alelos pode ser incluído nas colunas correspondentes aos itens M1, M2 e M3. Os item M4, M6, M7 e M8 podem ser uma mistura e, portanto, é possível incluir mais do que dois alelos. Em todas as colunas, os alelos têm de ser escritos do menor para o maior.
- **No caso dos dados correspondentes à análise de STRs do cromossoma Y, serão aceites tanto a nomenclatura proposta pela ISFG como a nomenclatura proposta pelo NIST.**
- **Em M4, M6, M7 ou M8, é obrigatório preencher a coluna sombreada com todos os alelos totais detectados. Exemplo: (9-11-15-17), independentemente do método de extracção utilizado. A avaliação será realizada sobre os resultados reportados nesta coluna.**
- **No caso de também efectuar a lise diferencial, pode especificar os alelos obtidos em cada fracção na coluna correspondente (primeira fracção / segunda fracção).** A segunda fracção é entendida como a fracção espermática.

TABELA 7

- **Lembre-se que se exige a edição de, pelo menos, as regiões HV1 e HV2**
- Indique as posições inicial e final das regiões editadas (por exemplo, 73-340/16024-16365). No entanto, serão avaliados no certificado os haplótipos obtidos a partir da edição da região HV1 entre as posições 16024-16365, a região HV2 entre 73-340 e a região HV3 entre 438-574.
- Informe os haplótipos de acordo com as diferenças em relação à rCRS segundo a nomenclatura médica (Ex.: A263G -325.1C A523DEL T16217C) ou forense (Ex.: 263G 325.1C 523DEL 16217C), começando com o **nucleótido de menor número** (isto é, partindo da região HV2) sem deixar espaço entre a posição e a base e separando as diferenças em relação à rCRS **com um espaço e sem vírgulas**.
- **ATENÇÃO:** Preste especial atenção à nomenclatura de inserções e deleções.
- Se para M4, M5, M6, M7 ou M8, realiza uma lise diferencial, indique os haplótipos de cada fracção na linha correspondente; no caso de lise total, coloque o haplótipo obtido na primeira linha.
- Observações e conclusões dos resultados de DNA mitocondrial: indique qualquer outro resultado ou dados não reflectidos que deseje incluir, referenciando o item (por exemplo, uso de outro *primer*).

Estudos teóricos

- Siga as instruções específicas detalhadas nas secções correspondentes do formulário e use todas as informações fornecidas para a resolução dos supostos teóricos.
- Para uma melhor gestão do formulário, é disponibilizado um menu descendente com o nome de diferentes softwares, embora nem todos sejam, necessariamente, aplicáveis na resolução de cada caso específico.
- Para os cálculos estatísticos referentes a STRs autossómicos, use sempre as frequências alélicas indicadas na tabela do Anexo.
- **ATENÇÃO:** Nas Tabelas 8 e 10 e em outras secções onde são solicitadas as estimativas de frequências, LR ou equivalentes, efectue as operações com todas as casas decimais, mas no formulário, coloque os valores com 4 casas decimais separadas do número inteiro com uma vírgula, aplicando arredondamento e notação científica (formato Excel). Ex. 4,56735 seria indicado como 4,5674E+00; 0,123456 seria indicado como 1,2346E-01.

TODOS OS COMENTÁRIOS E OBSERVAÇÕES FEITOS NAS SECÇÕES CONCEBIDAS PARA ESTE FIM, SERÃO PUBLICADOS NO RELATÓRIO FINAL, PELO QUE SE RECOMENDA A NÃO FORNECER QUALQUER DADO QUE POSSA COMPROMETER O ANONIMATO DO LABORATÓRIO.

3. INSTRUÇÕES PARA O ENVIO DOS REGISTOS DE ANÁLISE: ELECTROFEROGRAMAS (OU GÉIS) E CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

É obrigatório o envio dos registos finais, **devidamente identificados**, dos perfis genéticos de STRs, das sequências de mtDNA e dos cálculos estatísticos, de acordo com as seguintes instruções:

3.1 Sistemas automáticos. Marcadores STR (autossómicos, X e Y)

Os electroferogramas de cada um dos itens deverão ser enviados para **todos os marcadores** para os quais os resultados são emitidos. **Lembre-se de que a participação com um mínimo de 12 STRs autossómicos é obrigatória (pelo menos 7 STRs do CODIS)**. Cada electroferograma deverá ser identificado com o **código do item** e o **número do selo** (que identificará o laboratório). Se identificar os electroferogramas com o nome do laboratório e não com o número do selo, entende-se que está a renunciar a confidencialidade. Os seguintes dados também devem estar contidos nos electroferogramas:

- **Atribuição alélica**
- **Altura** (em RFU) dos picos
- **Tamanho em pares de bases (pb)**.

Para aqueles alelos não incluídos nos *ladders* alélicos (fora do *ladder*), o tamanho deverá ser atribuído (em pb).

Deverão também ser enviados os electroferogramas dos *ladders* utilizados na análise.

No caso dos sistemas ABI, recomenda-se imprimir os electroferogramas gerados com *Genemapper* ou *Genotyper*.

O envio pode realizar-se através da página web (arquivos pdf)

3.2 Sistemas manuais. Marcadores STR (autossómicos, X e Y)

No caso de sistemas de detecção manual por coloração com nitrato de prata, é necessário enviar uma cópia da imagem do gel bem identificada com o **código do item**, o **número do selo** (como identificação do laboratório), o **nome de cada um dos marcadores** e a **atribuição alélica**.

3.3 Sequências de DNA mitocondrial

Devem ser enviadas preferencialmente as sequências dos *primers forward e reverse* alinhadas em relação à sequência de referência e usando a notação numérica da rCRS (Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet. 1999 Oct;23(2):147). **Na falta destas**, deverão ser enviados os electroferogramas gerados para cada um dos *primers* utilizados (*forward* e *reverse*) em cada um dos itens. Cada electroferograma deverá estar identificado com o **código do item**, o **número do selo** (que identificará o laboratório) e o **primer usado**.

Os registos deverão estar a cores. O envio pode realizar através da página web (arquivos pdf)

3.4 Cálculos estatísticos dos exercícios teóricos

Os registos gerados durante o uso de programas informáticos deverão ser enviados ou, se o cálculo for feito manualmente, as fórmulas utilizadas deverão ser enviadas, para a realização de todos os cálculos estatísticos solicitados nos estudos teóricos e desafios teóricos. Cada registo deve ser identificado com o **número do selo** (como identificação do laboratório) e o **estudo teórico** correspondente.

O envio pode realizar-se através da página web (arquivos pdf)

Para qualquer dúvida ou esclarecimento, não hesite em nos contactar: intcf.eiadn@justicia.es

- ◆ LEMBRE-SE de que é necessário enviar o formulário preenchido devidamente assinado, todos os dados originais (electroferogramas, géis), bem como uma cópia dos registos dos cálculos estatísticos obtidos manualmente ou através de programas informáticos, para poder receber o certificado de participação no exercício.

PARA QUALQUER DÚVIDA SOBRE A AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS CONSULTE AS BASES DE PARTICIPAÇÃO NA PÁGINA WEB
<https://ghep-isfg.org/pt-pt/control-pt/bases-de-participacion/>