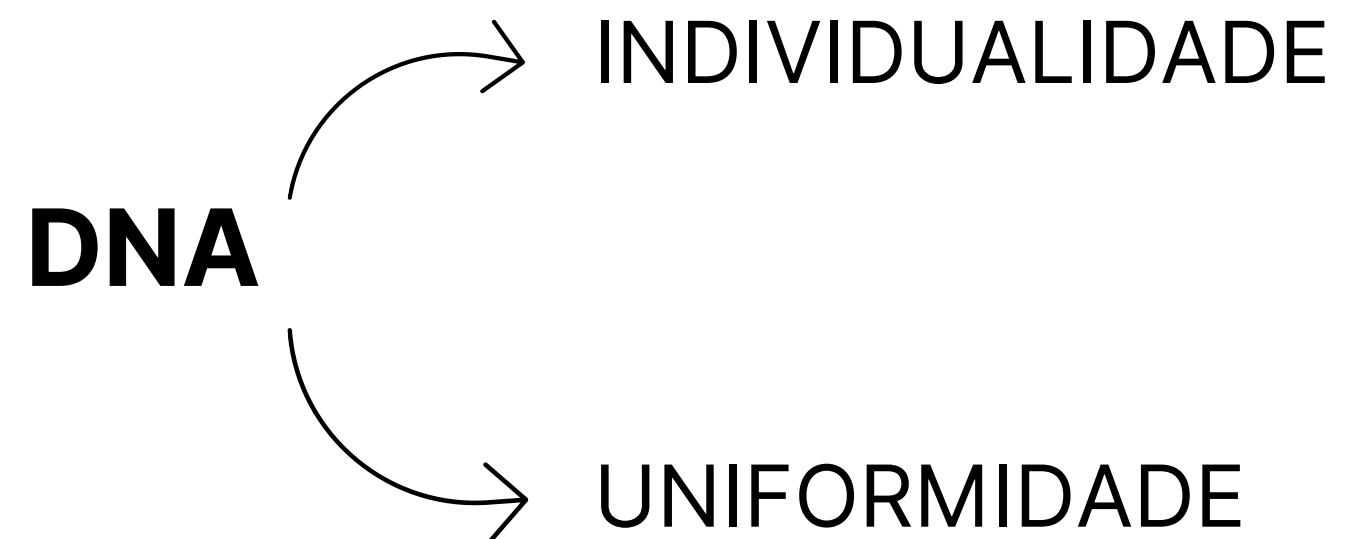


**ESTUDO
COMPARATIVO
E DE VALIDAÇÃO
DE ENSAIOS DE
QUANTIFICAÇÃO DE DNA,
TOTAL E FRAÇÃO MASCULINA,
EM AMOSTRAS FORENSES,
COM DIFERENTES METODOLOGIAS
E EQUIPAMENTOS**

MARIANA FEITEIRO
2024

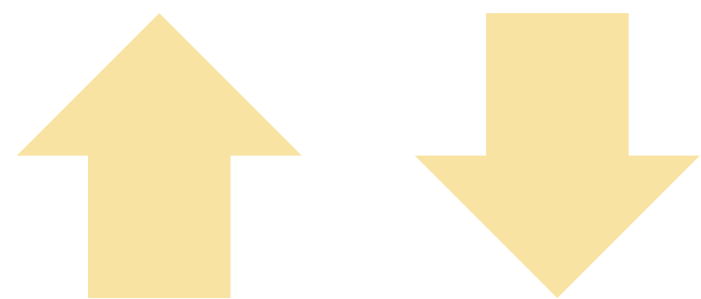
INTRODUÇÃO



TIPOS DE PERÍCIAS

- INVESTIGAÇÃO DE PARENTESCO
- IDENTIFICAÇÃO HUMANA
- CRIMINALÍSTICA BIOLÓGICA

**QUANTIDADE DE
DNA**



AMOSTRA



QUANTIFICAÇÃO DE DNA
Análise da quantidade e
qualidade de DNA presente
em cada amostra.

FATORES EXTERNOS

DEGRADAÇÃO

MISTURA DE DNA

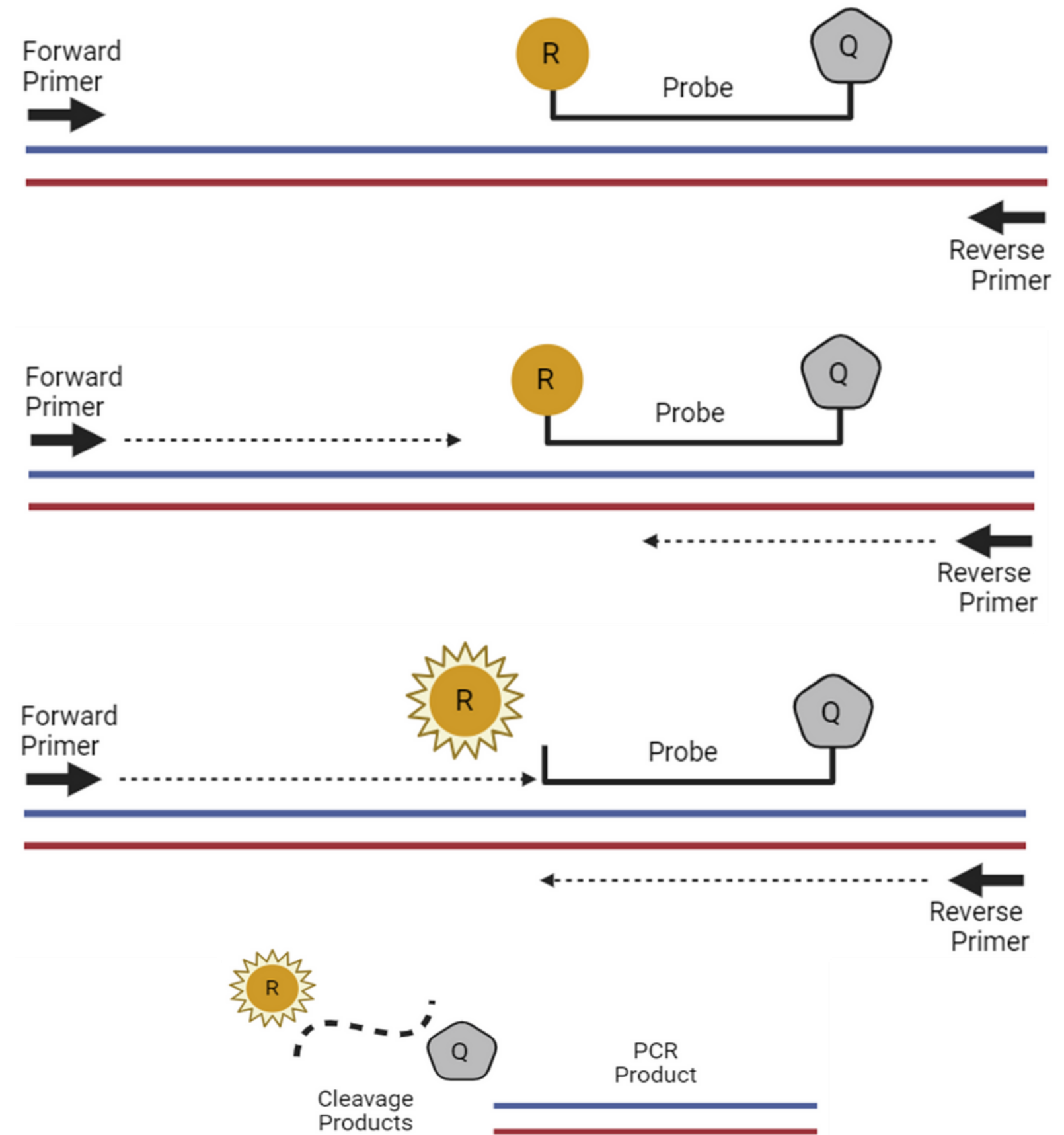


QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qPCR)



SONDAS TAQMAN®

Figura 1 - Esquema representativo da técnica de qPCR com sondas TaqMan®.



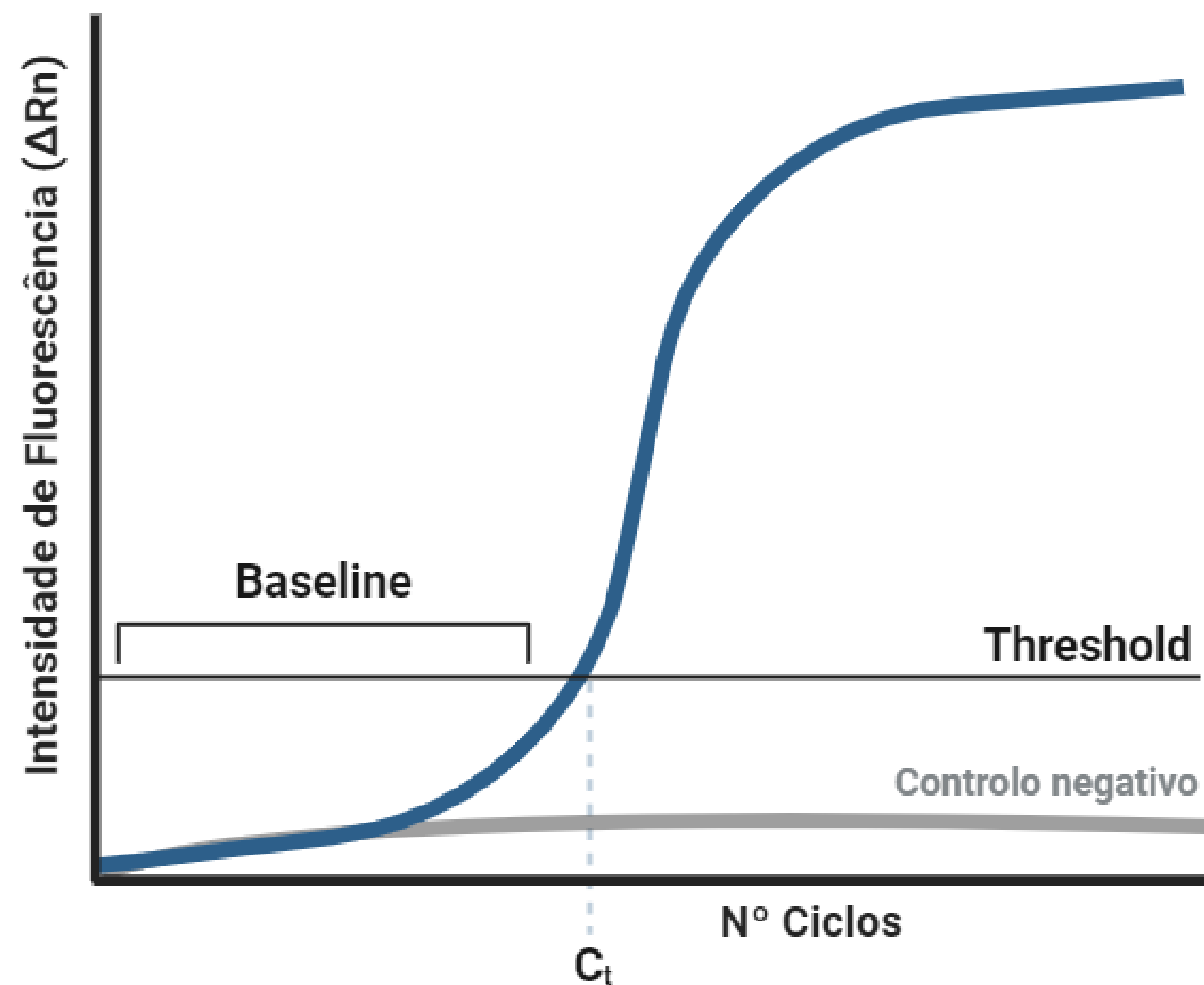


Figura 2 - Representação gráfica do ciclo threshold de uma amostra.

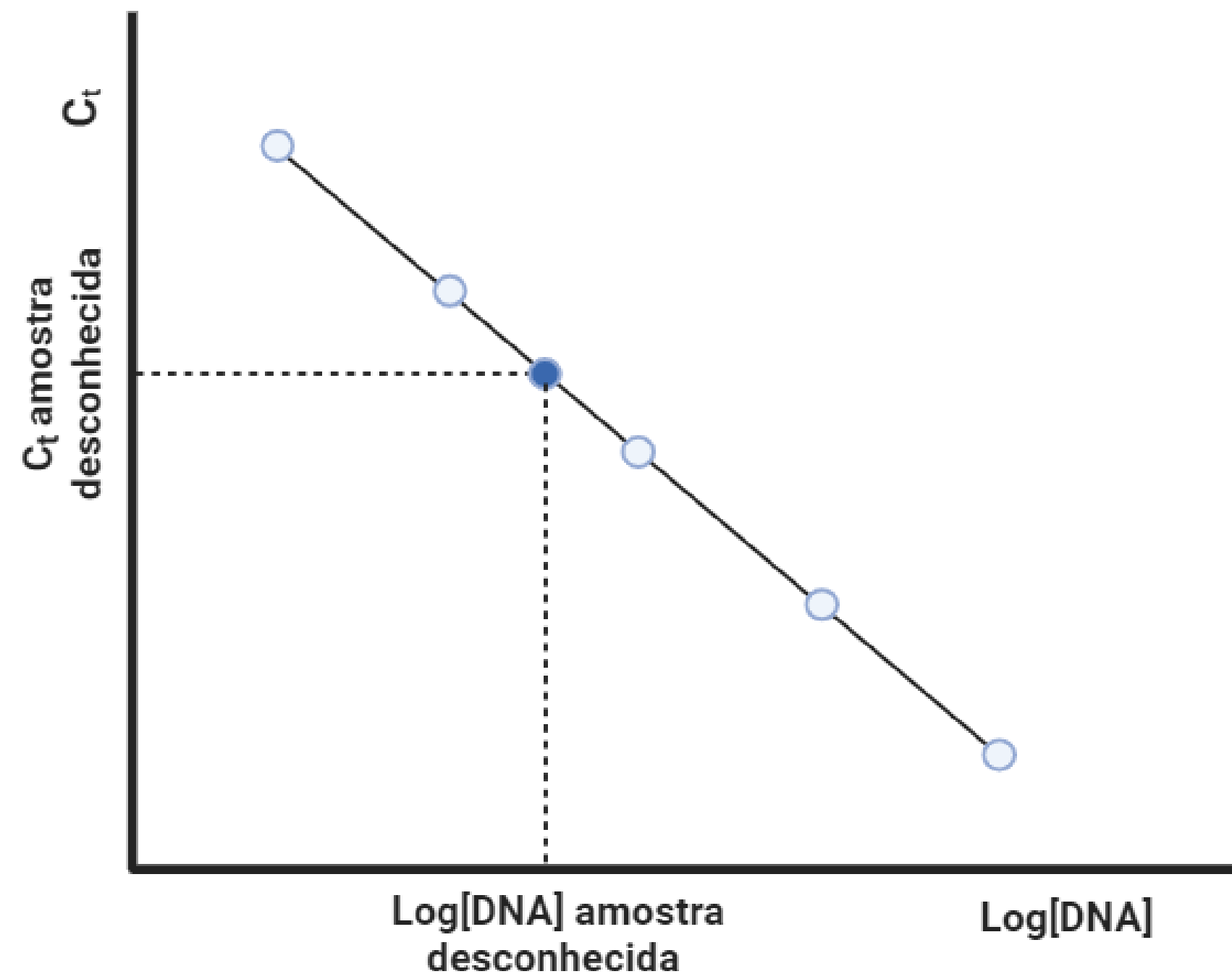


Figura 3 - Representação gráfica da quantificação hipotética de uma amostra desconhecida através da reta de calibração.



VALIDAÇÃO

**DEMONSTRAR E
CONFIRMAR A
ADEQUAÇÃO DO
MÉTODO NA EXECUÇÃO
DE ATIVIDADES
TÉCNICAS ESPECÍFICAS**

INDIRETAMENTE

ESPECIFICIDADE

SENSIBILIDADE

REPETIBILIDADE

REPRODUTIBILIDADE

**MISTURA DNA FEMININO
E MASCULINO**

AMOSTRAS REAIS

DIRETAMENTE

VALIDAÇÃO INDIRETA

- **Quantifiler Trio + QuantStudio 5**
- **Investigator Quantiplex + Opus 96**

VALIDAÇÃO DIRETA

- **Quantifiler Trio + Opus 96**
- **Investigator Quantiplex + QuantStudio 5**



QUANTIFILER™ TRIO DNA QUANTIFICATION KIT



**SMALL AUTOSOMAL
TARGET**

80 pb

**LARGE AUTOSOMAL
TARGET**

214 pb

Y TARGET

75 pb

INVESTIGATOR QUANTIPLEX PRO KIT



91 pb

353 pb

81 pb

QUANTSTUDIO™ 5 REAL-TIME PCR SYSTEM FOR HUMAN IDENTIFICATION

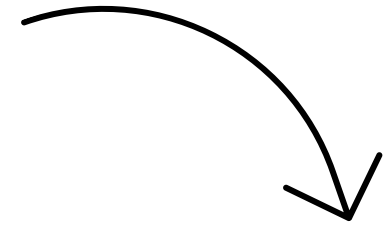
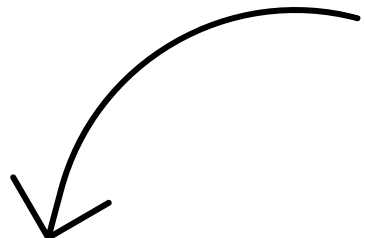


CFX OPUS 96 REAL-TIME PCR SYSTEM



MÉTODOS E MATERIAIS

QUANTIFILER™ TRIO



QUANTSTUDIO™ 5



CFX OPUS 96



	Passo 1	Passo 2	Passo 3
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Duração	2 minutos	9 segundos	30 segundos
x40 ciclos			

MÉTODOS E MATERIAIS

INVESTIGATOR QUANTIPLEX

QUANTSTUDIO™ 5



CFX OPUS 96



	Passo 1	Passo 2	Passo 3
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Duração	3 minutos	5 segundos	35 segundos
40 ciclos			

VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

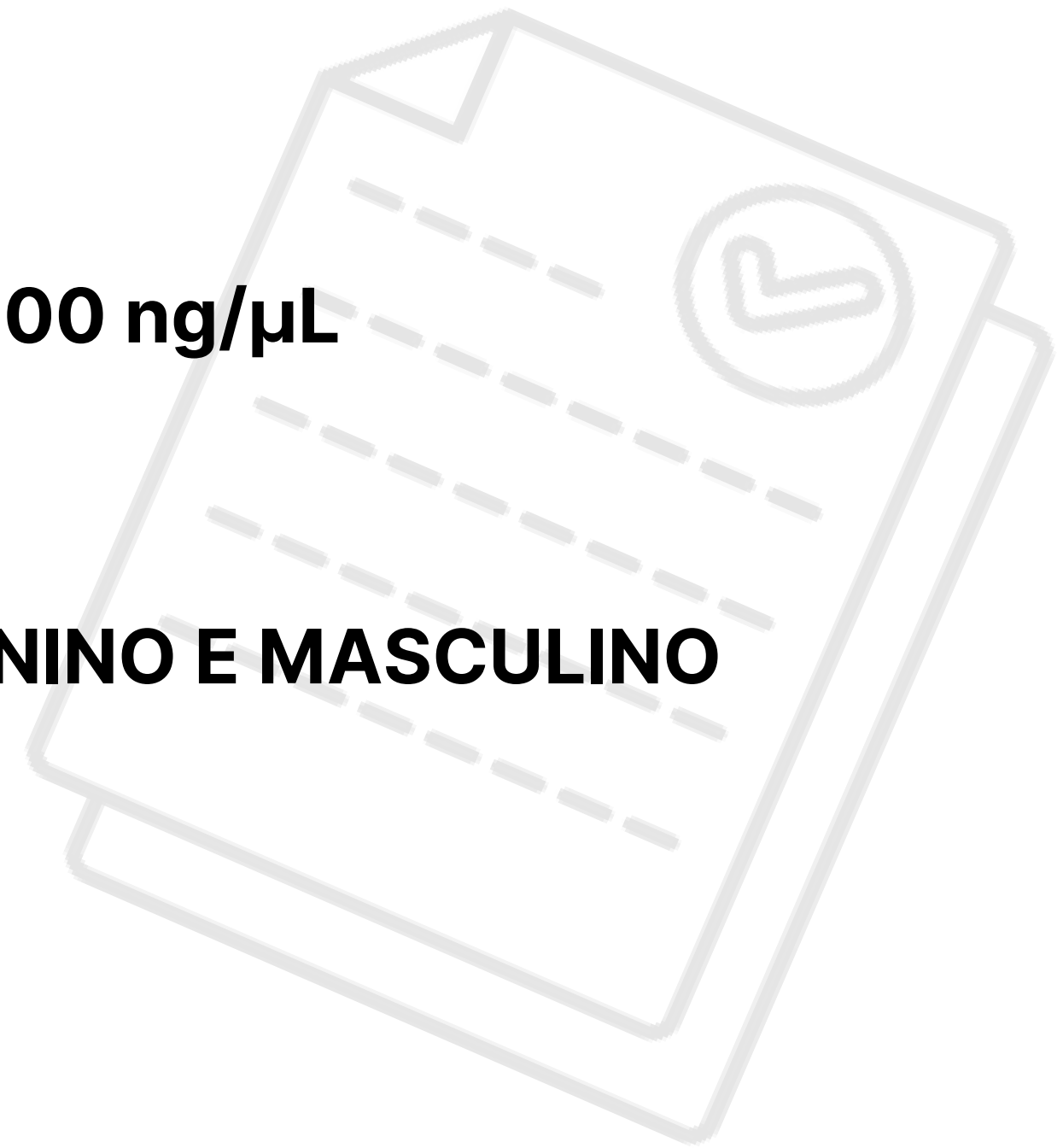
➤ **AMOSTRAS ANIMAIS**

➤ **AMOSTRAS CONTROLO** → **ENTRE 0,1 E 100 ng/μL**

└─ **AMOSTRAS DILUÍDAS**

└─ **AMOSTRAS DE MISTURA DE DNA FEMININO E MASCULINO**

➤ **AMOSTRAS REAIS**



QUANTIFILER TRIO + QUANTSTUDIO 5

VALIDADO

ESPECIFICIDADE ✓

SENSIBILIDADE ✓

REPETIBILIDADE ✓

REPRODUTIBILIDADE ✓

MISTURA DNA FEMININO E MASCULINO ✓

AMOSTRAS REAIS ✓



INVESTIGATOR QUANTIPLEX + OPUS 96

EM ANÁLISE

ESPECIFICIDADE ✓

SENSIBILIDADE ✓

(REGIÃO-ALVO AUTOSSÔMICA)

REPETIBILIDADE ✓

(EXCETO AMOSTRAS FORA DO LIMITE MÁXIMO DA RETA DE CALIBRAÇÃO)

REPRODUTIBILIDADE ✓

(EXCETO AMOSTRAS FORA DO LIMITE MÁXIMO DA RETA DE CALIBRAÇÃO)

MISTURA DNA FEMININO E MASCULINO

EM ANÁLISE

AMOSTRAS REAIS

INVESTIGATOR QUANTIPLEX + OPUS 96

SENSIBILIDADE

	Diluições	Concentração Esperada (ng/μL)		Concentração Obtida (ng/μL)	
		SA	Y	SA	Y
Controlo A	stock	2	2	2,2544	1,98878
	D1	0,5	0,5	0,5305	0,3323
	D2	0,05	0,05	0,04545	0,02866
	D3	0,005	0,005	0,004123	0,001747
	D4	0,0025	0,0025	0,001892	0,000903

	Concentração Esperada (ng/μL)		Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
	SA	Y	SA	Y	SA	Y	SA	Y
Controlo B	100	100	126,90	127,70	106,0218	104,501	84,2	77,5
			151,10	106,30	104,5335	103,7015	108,4	94,61
	Média corrida(ng/μL)		139,00	117,00	105,2777	104,1013	96,3	86,055

REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Legenda: SA – região alvo autossômica *small*, Y – região alvo masculina

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS

INVESTIGATOR QUANTIPLEX + OPUS 96



ÍNDICE DE DEGRADAÇÃO



QUANTIFILER TRIO + QUANTSTUDIO 5



INTRODUÇÃO

OBJETIVOS

MATERIAIS
MÉTODOS

RESULTADOS CONCLUSÃO

Quantifiler Trio + QuantStudio 5

VALIDADO

Investigator Quantiplex + Opus 96

EM ANÁLISE

PRÓXIMOS PASSOS...

**Validação direta dos métodos Quantifiler Trio + Opus 96
e Investigator Quantiplex + Quantstudio 5**



22^o CONGRESSO NACIONAL
DE MEDICINA LEGAL E CIÊNCIAS FORENSES

U LISBOA



**AGRADEÇO A
VOSSA ATENÇÃO!**