

O efeito de inibidores na amplificação de STRs autossômicos pelo kit Investigator® 26Plex QS

^{1,2} P. Cardoso, ¹ A. Serra, ¹ V. Bogas, ¹ F. Balsa, ¹ V. Lopes, ¹ M.J. Porto, ^{1,3,4,5} A. Amorim, ^{2,6} F. Corte Real, ⁷ P. Brito

¹ Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Centro, Serviço de Genética e Biologia Forenses, Coimbra, Portugal

² Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

³ Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Laboratório de Virologia e de Análises Clínicas e Forenses, Coimbra, Portugal

⁴ Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

⁵ REQUIMTE, Laboratório Associado FCT, Portugal

⁶ Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Coimbra, Portugal

⁷ Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Unidade de Base de Dados de Perfis de ADN, Coimbra, Portugal

INTRODUÇÃO

O material genético colhido em processos de criminalística biológica e de investigação genética de cadáveres e/ou restos cadavéricos encontra-se frequentemente exposto ao meio ambiente e/ou a diferentes inibidores, levando a uma ineficiente amplificação dos STRs.

De entre os inibidores mais frequentemente encontrados em amostras problema incluem-se: etanol, índigo-carmim, solo argiloso, solo humoso e folhagem. Os mecanismos de ação destes inibidores contemplam uma ineficiente lise celular que impossibilita a ação da Taq polimerase e da extensão da cadeia nucleotídica. Consequentemente, verifica-se uma amplificação preferencial de alelos de menor dimensão e a ocorrência de *drop-out* alélico.

O presente trabalho teve como intuito avaliar o desempenho do kit Investigator® 26plex QS na presença de amostras inibidas, aferindo a capacidade deste produzir resultados válidos e interpretáveis na presença dos inibidores supramencionados

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Prepararam-se amostras simuladas a diferentes proporções Inibidor vs ADN → 1:10, 1:1 e 10:1.

- Para a conceção das soluções de inibidores utilizou-se solução stock de **etanol a 70%** e prepararam-se ainda soluções de



Índigo-carmim

Folhagem

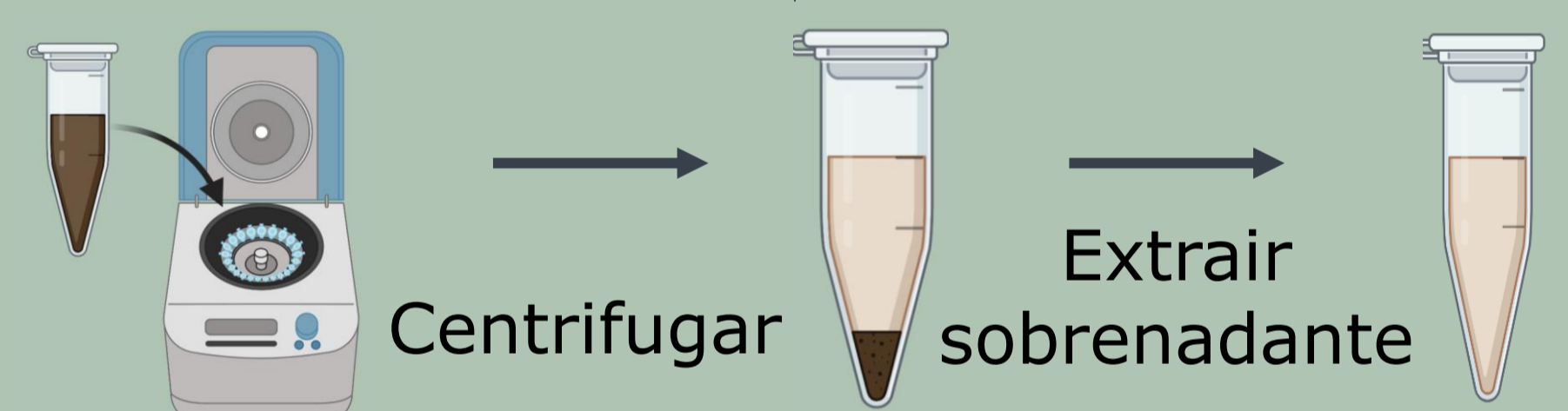
Solo humoso

Solo argiloso

A partir de produto a 466,36 g/mol preparou-se uma solução a 12mM com água *nuclease free*

1g de cada inibidor foi adicionado a aproximadamente 2mL de água *nuclease free* e macerado, para a obtenção de uma mistura homogénea

1g + 2 mL



- Após a obtenção de cada solução inibitória prepararam-se amostras simuladas pela adição de ADN controlo nas proporções adequadas.

- Estas amostras foram introduzidas num lote de amostras não contaminadas e amplificadas

2. Avaliação dos controlos de qualidade (QS1 e QS2)

- QS1 e QS2 → controlos presentes no kit Investigator® 26Plex QS, têm como objetivo auxiliar a interpretação de um eletroferograma.

Sendo que na presença de inibição:

→ QS1 será preferencialmente amplificando e

→ QS2 ou apresentará um tamanho reduzido

ou não será amplificado

- Comparação do comportamento de QS1 e QS2 em eletroferogramas de 15 amostras inibidas e 24 amostras de grupos controlo

RESULTADOS

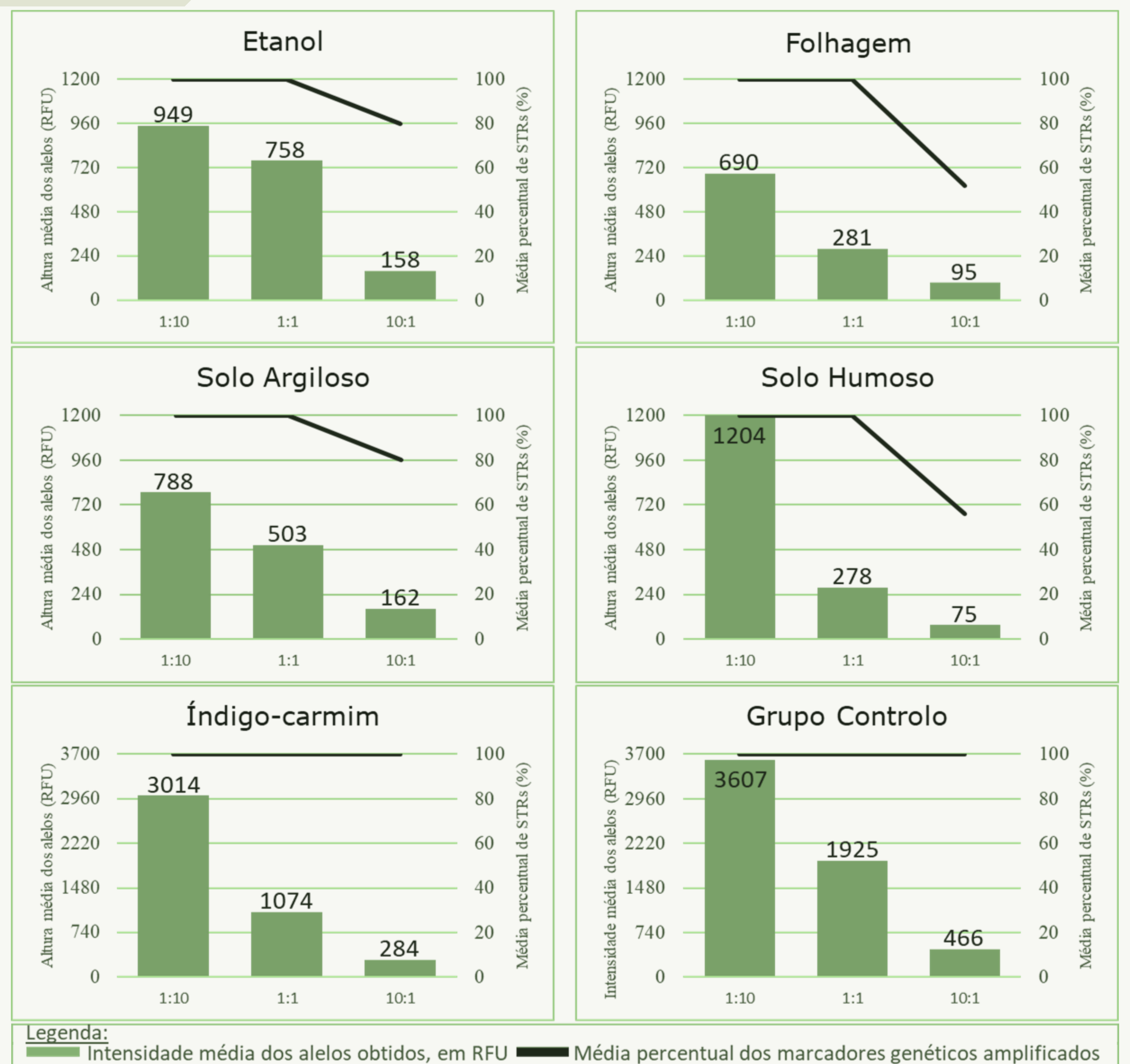


Imagem I: Efeitos de inibidores a diferentes proporções em amostras simuladas.

• Em todas as soluções para as proporções 1:10 e 1:1 → foi possível obter perfis genéticos completos com elevada intensidade de fluorescência

• Para concentrações elevadas de inibidor - em que o input máximo de ADN era 0,1 ng → redução abrupta na performance do kit de amplificação com *drop-out* alélico dos STRs de maior tamanho → em todos os inibidores exceto para o índigo-carmim que apresentou resultados similares aos do grupo controlo.

• Através deste ensaio verificou-se que os controlos de qualidade inclusos no kit da Qiagen não permitiram aferir a presença de inibidores nas amostras, observando-se resultados similares entre as amostras simuladas e as do grupo controlo.

Conclusão

❖ Atendendo que o procedimento de extração de ADN remove uma quantidade elevada de material exógeno de uma amostra biológica, a concentração de inibidores aquando da amplificação presumivelmente será mais reduzida que a presente nas soluções preparadas. Por conseguinte, os resultados deste trabalho demonstram que este kit de amplificação permite a obtenção de um perfil genético válido e robusto.

❖ Uma vez que neste ensaio a informação proveniente dos controlos de qualidade não foi a expectável, estudos com uma amostragem mais elevada deveriam ser realizados de forma a clarificar a pertinência do uso de controlos de qualidade e as inferências que se podem retirar da sua análise.

REFERÊNCIAS

Butler, J. M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. San Diego: Elsevier Academic Press.
 Butler, J. M. (2005). *Fundamentals of Forensic DNA Typing - Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. San Diego: Elsevier Academic Press.
 QIAGEN. (2021). *Investigator® 26plex QS Handbook: For multiplex amplification of the CODIS core loci, the European standard set of loci, plus Penta D, Penta E, D6S1043, DYS391, and Amelogenin*. Hilden.