



Universidade de Aveiro  
2021

**JOANA MENESES  
FERREIRA**

**Perfis genéticos: transferências, persistências e misturas de DNA no *background* laboratorial**



Universidade de Aveiro  
2021

**JOANA MENESES  
FERREIRA**

**Perfis genéticos: transferências, persistências e misturas de DNA no *background* laboratorial**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

“O que adoro na Ciência é que à medida que se aprende não se obtêm realmente respostas. Só se obtêm perguntas melhores.”

John Green, *Mil Vezes Adeus*

## **o júri**

presidente

**Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves**

Investigadora Auxiliar em Regime Laboral, CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

arguente

**Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**

Professora Associada c/ Agregação, Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro

orientador

**Prof. Doutor Luís Manuel Souto de Miranda**

Professor Auxiliar em Regime Laboral, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

A todas as pessoas que permitiram que eu concretizasse o sonho de trabalhar na área de Biologia e Genética Forense, particularmente, aos colaboradores do SGBF-C por toda a ajuda e conhecimentos transmitidos, à Doutora Lisa Sampaio e, em especial, à Doutora Ana Margarida Bento por ter dedicado o seu tempo a acompanhar-me, orientar-me e ensinar-me.

Aos meus amigos por todo o apoio.

Aos meus pais, que sempre me deram a oportunidade de seguir o meu caminho para alcançar os meus objetivos. Obrigada.

## palavras-chave

DNA, transferência, contaminação, *background DNA*

## resumo

Atualmente é comum determinarem-se perfis genéticos a partir de amostras com quantidades reduzidas de DNA, devido ao grande avanço que a ciência e a tecnologia têm sofrido nas últimas décadas. Isto significa que um maior número de amostras podem ser caracterizadas geneticamente, nomeadamente amostras de *trace DNA*, nas quais não se sabe a origem do material biológico. Esta realidade traz precauções adicionais na interpretação dos perfis genéticos, visto que podem ocorrer transferências, persistências e misturas de DNA, que geram contaminação e mascaram os resultados obtidos.

A contaminação num cenário forense pode acontecer de muitas formas diferentes e via diferentes vetores, sendo talvez o mais preocupante a persistência de *background DNA* nos laboratórios forenses. Logo, é essencial ter medidas de mitigação da contaminação em laboratório e estratégias de monitorização da contaminação. Assim, este trabalho tem como objetivos avaliar a taxa de contaminação no SGBF-C, perceber quais as fontes da contaminação e como minimizá-la e, se possível, eliminá-la.

Para tal, fez-se colheita de amostras de *trace DNA* em diversos locais do SGBF-C, extraiu-se e quantificou-se o seu DNA e fez-se o perfil genético das amostras que revelaram contaminação. Por fim, foi feita uma descontaminação.

Segundo os resultados da quantificação, foram detetados níveis de *background DNA* reveladores de contaminação em 12,5 % dos locais amostrados. A localização desta contaminação demonstrou a existência de maior cuidado com a descontaminação e prevenção da contaminação dos locais onde existe manipulação direta das amostras. Os perfis obtidos para as amostras dos locais contaminados mostraram que a principal fonte de *background DNA* do laboratório são os colaboradores do Serviço, embora não seja possível atribuir inequivocamente o mecanismo de transferência do DNA contaminante. A descontaminação dos locais contaminados permitiu perceber que a realização de uma descontaminação apropriada impede a persistência do DNA e é eficaz na eliminação da contaminação.

Portanto, as medidas de prevenção da contaminação aplicadas no SGBF-C são adequadas para a minimização, e possível eliminação, da contaminação laboratorial, mas é necessário que sejam todas respeitadas e executadas corretamente para serem eficazes.

Para se chegar a uma atribuição evidente das fontes da contaminação laboratorial e melhores estratégias de eliminação da contaminação são necessários estudos futuros.

**keywords**

DNA, transfer, contamination, background DNA

**abstract**

Currently, it is common to determine genetic profiles from samples with reduced amounts of DNA, due to the great advances that science and technology have experienced in recent decades. This means that a greater number of samples can be genetically characterized, in particular trace DNA samples, in which the origin of the biological material is unknown.

This reality raises additional precautions in the interpretation of genetic profiles, given that the occurrence of transfers, persistence and mixtures of DNA can generate contamination and mask the results obtained.

Contamination in a forensic setting can happen in many different ways and via different vectors, perhaps the most worrisome being the persistence of background DNA in forensic laboratories. Therefore, it is essential to have contamination mitigation measures in the laboratory and contamination monitoring strategies. Thus, this work aims to evaluate the contamination rate in SGBF-C, identify the sources of contamination and how to minimize the contamination and, if possible, eliminate it.

In this way, trace DNA samples were collected from several locations in the SGBF-C, their DNA was extracted and quantified, and the samples that revealed contamination were profiled. Lastly, a decontamination was performed.

According to the quantification results, background DNA levels revealing contamination were detected in 12.5% of the sampled sites. The location of this contamination demonstrated the existence of greater concern with decontamination and prevention of contamination in places where there is direct handling of samples. The profiles obtained for the samples from the contaminated sites showed that the main source of background DNA in the laboratory are the employees of the Service, although it is not possible to clearly attribute the mechanism by which the contaminating DNA was transferred. Decontamination of contaminated sites allowed the realization that carrying out an appropriate decontamination prevents DNA persistence and is effective in eliminating contamination. Therefore, the contamination prevention measures applied in the SGBF-C are adequate for the minimization, and possible elimination, of laboratory contamination, but it is necessary to respect and correctly execute them all for them to be effective.

In order to reach a clear attribution of the sources of laboratory contamination and better contamination elimination strategies, further studies are needed.

## ÍNDICE

Índice .....	viii
Índice de Figuras .....	x
Índice de Tabelas .....	xi
Símbolos e abreviaturas.....	xii
Introdução.....	1
1. <i>Trace DNA</i> .....	1
2. Transferência de <i>trace DNA</i> .....	3
2.1 Mecanismos de transferência de DNA.....	3
2.1.1 Transferência direta .....	3
2.1.2 Transferência por aerossol.....	5
2.1.3 Transferência indireta.....	5
2.2 Fatores que influenciam a transferência de DNA .....	6
2.2.1 Fatores dependentes do material biológico .....	6
2.2.2 Fatores dependentes do indivíduo.....	7
2.2.3 Fatores dependentes do objeto/superfície.....	8
2.2.4 Fatores dependentes do contato .....	9
2.3 Relação entre quantidade de DNA e qualidade do perfil genético com a via de transferência do <i>trace DNA</i> .....	11
3. Persistência de <i>trace DNA</i> .....	12
3.1 Fatores que influenciam a persistência de DNA.....	12
3.1.1 Tempo.....	12
3.1.2 Tipo de substrato.....	12
3.1.3 Condições ambientais .....	13
3.1.4 Contatos adicionais .....	13
3.1.5 Acondicionamento e transporte .....	13
4. Misturas de <i>trace DNA</i> .....	14
5. <i>Background DNA</i> e contaminação .....	14
5.1 Contaminação no laboratório forense.....	15
6. Contaminação no SGBF-C.....	17
6.1 Prevenção da contaminação.....	17
6.2 Monitorização da contaminação .....	18
7. Perfis genéticos de <i>trace DNA</i> .....	18
7.1 Etapas para obter um perfil genético .....	19
7.1.1 Extração do DNA.....	19
7.1.2 Quantificação do DNA.....	19



7.1.3 Amplificação do DNA .....	20
7.1.4 Separação e detecção dos produtos amplificados .....	21
7.2 Interpretação de perfis de STRs .....	22
8. Objetivos .....	24
Materiais e métodos .....	25
1. Colheita das amostras .....	25
2. Extração de DNA .....	26
3. Quantificação de DNA .....	27
4. Amplificação de DNA .....	28
5. Eletroforese capilar / Separação e detecção de fragmentos de DNA .....	29
6. Análise e interpretação dos dados .....	30
7. Ações corretivas .....	30
Resultados e discussão .....	31
1. Determinação da quantidade de <i>background DNA</i> laboratorial .....	31
2. Caracterização genética das amostras dos locais contaminados .....	34
3. Determinação da quantidade de <i>background DNA</i> laboratorial após descontaminação .....	38
Conclusão .....	41
Referências bibliográficas .....	42
Apêndices .....	51
Apêndice I .....	51
Apêndice II .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática dos vários modos de transferência de DNA.....	4
<b>Figura 2.</b> Alguns locais de recolha de amostras de monitorização: a. <i>DNA Workstations</i> ; b. termociclador; c. centrífuga; d. <i>robot</i> de extração. Nos equipamentos laboratoriais (b, c, d) as zonas de recolha estão assinaladas com círculos vermelhos. ....	26
<b>Figura 3.</b> Pormenor do eletroferograma da amostra MONIT022. Em evidência encontra-se: a. alelos sexuais e b. 5 Alelos do marcador D8S1179.....	35
<b>Figura 4.</b> Pormenor do eletroferograma da amostra MONIT026 com a. um painel de marcadores STR compatível com um perfil singular e b. um painel de marcadores STR correspondente a um perfil de mistura. ....	36

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições do programa de amplificação para amostras de vestígios com o <i>GlobalFiler™ PCR Amplification kit</i> . .....	29
<b>Tabela 2.</b> Valores da quantificação de DNA, em ng/μL, nas amostras MONIT001 a MONIT056. As amostras com resultado positivo para a contaminação encontram-se a negrito. ....	32
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos perfis das amostras com resultado positivo para a contaminação e percentagem de identidade dos indivíduos com perfis identificados.....	35
<b>Tabela 4.</b> Valores da quantificação de DNA, em ng/μL, nas amostras com resultado positivo para a contaminação, inicialmente e após a descontaminação, e percentagem de redução da quantidade de DNA.....	38

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

bp – par de bases (do inglês *base pair*)

cm – centímetro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

dNTPs - Desoxinucleótidos Trifosfatados (do inglês *Deoxyribonucleoside triphosphate*)

DTT – Ditioneitol

°C – grau Celsius

h – hora

IPC – controlo interno de PCR

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

LCN – *Low Copy Number*

± – mais ou menos

µL – microlitro

M – molar

mM – milimolar

mL – mililitro

ng – nanograma

% – percentagem

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (do inglês *Real-Time PCR*)

RFU – Unidades de Fluorescência Relativa (do inglês *Relative Fluorescence Units*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

rpm – rotações por minuto

s – segundo

SGBF-C– Serviço de Genética e Biologia Forenses - Delegação do Centro

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

STR – *Short Tandem Repeats*

UV – Ultravioleta

## INTRODUÇÃO

Em genética forense, para identificar a quem pertence o material biológico presente em vestígios criminais ou cenas de crime faz-se a determinação do perfil genético de DNA (Ácido Desoxirribonucleico). Este teste forense do DNA surgiu demonstrado pela primeira vez num artigo de Alec Jeffreys e Peter Gill na revista *Nature* em 1985 [1]. A possibilidade de determinar perfis genéticos foi revolucionária para a ciência forense, e esta técnica é hoje em dia facilmente exequível e amplamente utilizada devido à existência e desenvolvimento de outras ferramentas, nomeadamente as técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e RT-PCR (PCR em Tempo Real) e a utilização de marcadores STR (*Short Tandem Repeats*) [2].

Com o avanço da ciência e da tecnologia, há uma constante otimização dos equipamentos e reagentes que têm atualmente sensibilidade e poder discriminativo grandes o suficiente para se obterem perfis genéticos a partir de amostras criminais com quantidades muito reduzidas de material biológico [3], ao invés do que acontecia inicialmente em que a análise era limitada a grandes manchas visíveis de pelo menos 1 cm de diâmetro que podiam ser associadas a uma fonte biológica, como sangue, sémen e saliva [4]. Estes desenvolvimentos permitiram, assim, que perfis genéticos fossem gerados a partir de uma grande variedade de amostras como manchas de sangue, zaragatoas bucais, cabelos, ossos, urina, manchas de sémen, zaragatoas vaginais, beatas de cigarro, superfícies, entre outros [2,5,6].

No entanto, a realidade atual traz precauções adicionais quando se interpretam estes perfis, uma vez que a fonte do perfil pode não ser relevante para o crime em investigação, dado que estes progressos fazem com que mais facilmente se detete DNA contaminante. Podem ocorrer transferências, persistências e misturas de DNA que mascaram os resultados obtidos e dificultam a sua interpretação [4].

### 1. *Trace DNA*

O termo *trace DNA* tem diferentes significados conforme o autor e o contexto em que é utilizado, já que é um termo amplo acerca do qual não existe consenso na comunidade científica. Porém, é importante que quando usado se clarifique qual a sua definição para não se tornar ambíguo, visto que o seu significado pode referir-se à quantidade de DNA, à qualidade do DNA, à origem do DNA, ou até mesmo à relevância deste DNA para o crime em si.

Segundo van Oorschot *et al.* [6] “as amostras de *trace DNA* podem ser definidas como qualquer amostra que esteja abaixo dos limiares recomendados em qualquer fase da análise, desde a detecção da amostra até à interpretação do perfil genético, não podendo ser definido por uma quantidade precisa de picogramas”. De acordo com Burrell *et al.* [7] “*trace DNA* refere-se a DNA de qualquer fonte presente em baixos níveis, geralmente colhida especulativamente sem detecção visual de uma mancha ou fluido corporal”. Estes são conceitos de *trace DNA* de uma perspectiva quantitativa, em que a quantidade de DNA pode não ser suficiente para se obter um perfil genético completo.

Nesta perspectiva quantitativa, *trace DNA* engloba ‘*low template*’ DNA [8] e ‘*low copy number*’ (LCN) DNA [9] quando na fase de amplificação existe pouco material biológico e é necessário aumentar o número de ciclos de amplificação, e ‘*low level*’ DNA quando na fase de interpretação do perfil genético a altura dos picos não atinge o limiar definido [6].

Contudo, numa perspectiva qualitativa, também se designa por *trace DNA* amostras nas quais não se conseguem obter perfis completos devido à degradação do DNA e/ou presença de inibidores das reações necessárias ao processo de caracterização genética, mesmo existindo uma quantidade de DNA que seria suficiente para tal [10].

Meakin e Jamison [11] definiram *trace DNA* como “somente DNA que não pode ser atribuído a um fluido corporal identificável”, ou seja, optaram por uma abordagem mais simples em que basta não se saber a origem do material biológico, independentemente da sua quantidade ou qualidade.

Peter Gill modificou a definição dada por van Oorschot *et al.* [6] tendo em consideração a relevância do perfil de *trace DNA* para o ato criminoso, definindo *trace DNA* como “qualquer amostra em que existe incerteza se está associada com o ato criminoso em si – sendo possível que a transferência tenha acontecido antes do ato criminoso (transferência inocente) ou depois do ato criminoso (transferência mediada pelo investigador)” [4].

É comum utilizar-se o termo *touch DNA* como sinónimo de *trace DNA*, porém, este é um pressuposto errado, dado que ao aplicar-se o termo *touch DNA* assume-se que o material genético colhido da superfície/objeto foi depositado via toque nessa superfície/objeto, quando na realidade geralmente este é um fator desconhecido [7]. Normalmente, o termo *touch DNA* emprega-se quando não se conhece a origem do DNA mas já se verificou que não é sêmen, sangue ou saliva, e por isso assume-se que serão células da pele ou glândulas associadas. Ainda assim, o uso do termo *trace DNA* é mais apropriado para situações em que não se conhece a origem nem a forma de deposição do DNA [10].

Nesta dissertação o termo *trace DNA* segue a definição dada por Meakin e Jamison [11], uma vez que não se sabe a origem nem a forma de transferência do material biológico recolhido.

## 2. Transferência de *trace DNA*

Os avanços tecnológicos que permitem que se façam perfis genéticos altamente discriminadores de forma relativamente rápida e acessível a partir de qualquer fonte de material biológico fazem com que atualmente se obtenham um maior número de perfis e muitas vezes perfis de misturas. Desta forma, há um grande número de cenários possíveis para explicar a forma como o DNA detetado foi depositado e transferido para a superfície/objeto do qual foi colhido [10]. Assim sendo, cada vez mais a questão é compreender como e quando é que o DNA chegou ao local de onde foi colhido, visto que a questão da identidade dos indivíduos a quem pertence o DNA detetado pode ser muito mais facilmente respondida [12].

Para responder a esta questão que ganha importância é necessário considerar os três mecanismos pelos quais o DNA pode ser transferido entre superfícies, objetos e/ou pessoas: transferência direta, transferência por aerossol e transferência indireta. Estes métodos de transferência não são mutuamente exclusivos (Figura 1D), podendo ocorrer mais que um em simultâneo ou em diferentes momentos [4].

É também relevante perceber que a obtenção de um perfil genético a partir de *trace DNA* não implica necessariamente que o seu dador tenha estado no local do crime, podendo classificar-se a transferência do DNA pela sua relevância relativamente ao ato criminoso em si – transferência ativa e transferência passiva. A transferência ativa, considerada relevante, está associada com a transferência direta de DNA durante o evento do crime [4], isto é, a transferência do DNA do autor do crime deu-se por contacto direto deste, durante o ato criminoso, com a superfície, objeto ou pessoa do qual o DNA foi colhido. A transferência passiva, considerada não relevante, advém do DNA detetado que não foi transferido durante o crime, este pode ser DNA previamente existente na cena do crime (*background DNA*) ou DNA proveniente de contaminações, por exemplo, por parte dos investigadores, por contaminações cruzadas entre diferentes itens ou no processamento em laboratório [4]. É igualmente importante referir que não é garantido que o perpetrador deposite DNA na cena do crime, podendo todo o DNA detetado ser de transferência passiva.

### 2.1 Mecanismos de transferência de DNA

#### 2.1.1 Transferência direta

A transferência direta (Figura 1A) implica o contacto direto entre a fonte do DNA e a superfície, objeto ou indivíduo onde o DNA é colhido [4]. A transferência direta é muitas vezes designada por transferência primária, sendo estes dois termos permutáveis [10].

Esta transferência de DNA pode ocorrer através do contato com roupa e acessórios aquando da sua utilização, do contato direto com fluídos corporais (p. ex. sangue, saliva, sémen) ou do toque em pessoas, objetos ou superfícies [10].

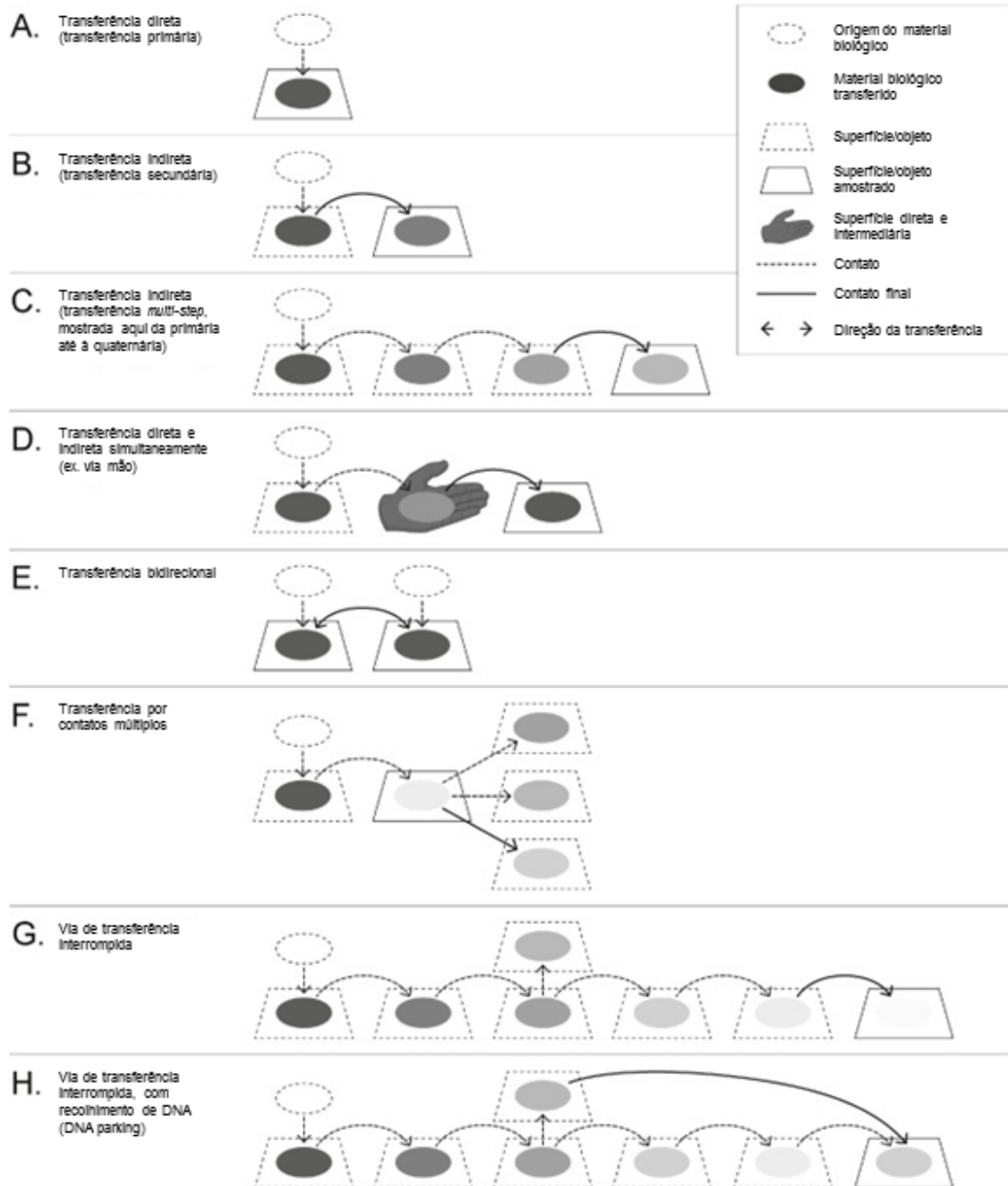


Figura 1. Representação esquemática dos vários modos de transferência de DNA [10].



### 2.1.2 Transferência por aerossol

Na transferência por aerossol não existe intermediário, sendo o DNA transferido pelo ar para o indivíduo, superfície ou objeto onde é colhido [4]. São exemplos desta transferência partículas de saliva libertadas por uma pessoa ao falar ou tossir [13–15], células da pele eliminadas para o meio ambiente e consequente DNA presente no pó doméstico [4] e flocos de aerossol produzidos aquando da perturbação de manchas visíveis de fluídos corporais encrustados [16]. O último exemplo representa uma perigosa forma de contaminação cruzada entre vestígios que se encontrem embalados juntos de forma folgada.

### 2.1.3 Transferência indireta

A transferência indireta (Figura 1B) acontece quando DNA depositado por transferência direta ou por aerossol é transferido novamente por meio de um intermediário para outra superfície, objeto ou indivíduo [4]. Na transferência indireta podem acontecer múltiplas transferências do mesmo depósito de DNA. Por este motivo quando se utiliza o termo transferência secundária para designar a transferência indireta deve-se clarificar o seu significado no contexto aplicado, já que estes termos não são permutáveis [10].

Pode considerar-se transferência secundária qualquer transferência de DNA ocorrida após a transferência direta, contudo transferência secundária pode significar apenas o primeiro passo intermediário de transferência após o depósito inicial de DNA [10,11]. Assim, quando existem vários passos intermediários de transferência considera-se uma via de transferência *multi-step* (Figura 1C), em que existe transferência terciária quando ocorrem dois passos intermediários, transferência quaternária quando ocorrem três passos, e por aí adiante. Dado que geralmente não se sabe o número de passos intermediários de transferência que ocorreram em cada caso, é preferível a utilização do termo transferência indireta em vez de transferência secundária, para não haver indução em erro [10].

Às diferentes formas possíveis de acontecer transferência indireta dão-se diferentes denominações. A transferência bidirecional (Figura 1E) acontece quando ocorre uma troca mútua de DNA entre duas superfícies (objetos ou indivíduos), ambas com DNA previamente depositado, ao entrarem em contato físico [10]. Um aperto de mão entre duas pessoas pode representar transferência bidirecional, podendo ser transferido DNA de cada indivíduo, mas também DNA exógeno presente nas mãos [17,18]. A transferência pode ser por múltiplos contatos com a superfície que tem o depósito original de DNA (Figura 1F), aqui é possível que a quantidade de DNA presente nesta superfície se torne indetetável uma vez que este é um depósito finito e após cada contato há uma redução da quantidade de DNA [10]. Se uma superfície envolvida numa transferência *multi-step* entrar em contato com outra que não esteja diretamente relacionada com via de transferência em causa dá-se uma interrupção da

via de transferência (Figura 1G), resultando em várias vias de transferência divergentes [10]. Quando nesta via interrompida se recolhe DNA que esteve temporariamente depositado num objeto e se deposita na superfície de interesse acontece '*DNA parking*' [17] (Figura 1H).

Desde a descoberta da transferência indireta de DNA [19] que esta tem sido alvo de grande interesse forense para perceber a sua relevância em cada caso e por que via ocorreu [20]. É possível detetar-se DNA em superfícies/objetos que nunca estiveram em contato com o dador do DNA após contato entre duas superfícies [20–23], partilha de objetos [24,25], apertos-de-mão [17,26,27], partilha da máquina de lavar roupa [28] ou partilha de espaços físicos [25,29–31].

É expectável que a quantidade de DNA presente no substrato final após múltiplos passos intermediários de transferência seja inferior à quantidade de DNA do depósito inicial, todavia a quantidade total de DNA colhido no substrato final pode ser semelhante ou superior à do primeiro substrato devido a variados fatores, tais como a presença de *background DNA* no substrato final [10].

No entanto não é garantido que um depósito de DNA, transferido por qualquer dos três mecanismos anteriormente apresentados ou por uma combinação destes, seja detetável ou passível de obtenção de um perfil genético valorizável uma vez que a transferência de DNA é afetada por diversas variáveis.

## **2.2 Fatores que influenciam a transferência de DNA**

A transferência de DNA pode ser um processo altamente complexo e influenciado por vários fatores difíceis de avaliar e quantificar [4]. Quando se analisam as possíveis vias de transferência de um vestígio é fundamental ter em consideração todos estes diferentes parâmetros. As variáveis que têm demonstrado influência na transferência dividem-se em quatro grupos: fatores dependentes do material biológico, fatores dependentes do indivíduo, fatores dependentes do objeto/superfície e fatores dependentes do contato [32]. Estes parâmetros associam-se de diferentes formas, o que se traduz em diferentes taxas de transferência alcançadas [10].

### **2.2.1 Fatores dependentes do material biológico**

A origem do material biológico e as condições em que este se encontra vão interferir com a quantidade e a qualidade do DNA transferido.

### **a. Origem do material biológico**

Diferentes tipos de material biológico que podem constituir um vestígio vão produzir diferentes quantidades de DNA. Amostras vestigiais de sangue ou saliva têm maior quantidade de células intatas, logo, mais DNA não degradado [33], do que amostras de contato com pele que apresentam essencialmente queratinócitos descamados, sem núcleo e, portanto, sem DNA [34–37]. Desta forma, o DNA transferido pelo contato com pele é majoritariamente DNA extracelular, parcialmente degradado, proveniente de células epiteliais apoptóticas [37], glândulas sebáceas [38] e glândulas sudoríparas [38,39], pelo que DNA destas amostras tem menor quantidade e qualidade do que de amostras de outros fluídos corporais (sangue, saliva, sêmen).

A parte do corpo tem influência na quantidade de DNA transferido em amostras compostas por células da pele, com mais DNA transferido de áreas da pele mais ricas em glândulas sebáceas do que com menos glândulas sebáceas [38,40], das pontas dos dedos do que das palmas das mãos [41], das mãos do que dos pés [42], entre outras.

### **b. Conteúdo em humidade do material biológico**

Materiais biológicos húmidos/líquidos, tal como sangue, saliva e sêmen, transferem mais rapidamente do que os respetivos depósitos secos [22,43]. O sangue seca relativamente rápido dependendo das condições ambientais [44–46], então a taxa de transferência após o depósito diminui exponencialmente até a mancha de sangue estar seca [47].

Depósitos de *touch DNA* transferem a taxas significativamente menores que depósitos de sangue e saliva, todavia a secagem tem pouco impacto no *touch DNA*, então para estes depósitos foram observadas taxas de transferência aumentadas, mas não necessariamente maiores quantidades totais de DNA, em comparação com líquidos biológicos secos [21].

Deste modo, é importante referir que o conteúdo em humidade da amostra no momento do contato poderá afetar a deteção do seu DNA [10].

## **2.2.2 Fatores dependentes do indivíduo**

As diversas características individuais assim como as rotinas de cada indivíduo exercem influência na transferência de DNA presente na pele humana.

### **a. Idade e sexo**

Nos adultos é difícil prever a taxa de transferência de DNA, no entanto os idosos (>70 anos) geralmente transferem quantidades reduzidas de DNA e indivíduos muito novos transferem grande quantidade de DNA, o que pode dever-se à elevada proliferação celular

nas crianças [48]. Em relação ao sexo, foi demonstrado que indivíduos masculinos tendem a transferir maiores quantidades de DNA que indivíduos femininos [23,49].

#### **b. Condição da pele**

Indivíduos com mãos muito secas [42], assim como os que apresentam patologias dérmicas (p. ex. dermatite atópica e psoríase), especialmente quando não controladas [50], têm uma maior libertação de células e, conseqüentemente, transferem mais DNA do que indivíduos saudáveis ou com mãos menos secas.

#### **c. Atividades prévias**

As atividades realizadas pelo indivíduo antes do momento da transferência de interesse afetam a quantidade de DNA transferido. Ações como lavar as mãos [51], usar luvas [52] ou tocar objetos sem DNA [24] reduzem significativamente a transferência de DNA. O oposto acontece quando se contata repetidamente com o mesmo objeto [17], se mexe no cabelo [49] ou se praticam atividades físicas que fazem transpirar [40]. Logo, qualquer atividade suscetível de remover ou adicionar material biológico à superfície primária que vai transferir o DNA (ex. mão) e o tempo que decorre desde que se realizou cada uma das atividades são fatores determinantes para o que será encontrado na amostra colhida [51,53].

#### **d. *Background DNA* do indivíduo**

É frequente detectar-se quantidades reduzidas de material biológico exógeno (não-próprio) na pele de um indivíduo [49]. Este *background DNA* é adquirido em contatos prévios e tipicamente provém de pessoas que partilham a casa ou local de trabalho com o indivíduo [54,55], podendo o DNA exógeno ser transferido juntamente com o DNA do próprio durante uma situação de contato [17,27,29,43]. A detecção do DNA alvo pode ser afetada pelo *background DNA* ao gerar perfis de mistura, embora geralmente este DNA seja um contribuinte menor para o vestígio [3].

Curiosamente, os indivíduos com maior propensão para depositar o seu próprio DNA parecem adquirir quantidades relativamente menores de DNA exógeno e vice-versa [52].

### **2.2.3 Fatores dependentes do objeto/superfície**

A quantidade e qualidade do DNA depositado, transferido e colhido de um objeto/superfície vão depender do tipo de substrato, ou seja, material e textura, e do *background DNA* presente no mesmo.

### **a. Tipo de substrato**

Relativamente ao DNA transferido diretamente através do contato com uma superfície, observou-se uma maior quantidade de DNA transferido para superfícies rugosas do que para superfícies lisas, obtendo-se maiores quantidades e perfis mais completos de DNA recolhido de madeira e tecido do que de vidro [11], metal ou plástico [21,22,56]. Também as superfícies porosas, como o algodão, colhem mais DNA do que superfícies não porosas, como o plástico [21,22,56].

Na transferência indireta foi demonstrado que um substrato primário não poroso permite uma maior transferência de DNA do que um substrato poroso, enquanto um substrato secundário poroso facilita a transferência a partir do substrato primário [21,22,24]. Logo, as diferenças físicas e químicas entre os substratos em contato vão ter um forte impacto na transferência e recuperação do DNA [10].

### **b. *Background DNA* do substrato**

As características do substrato podem ser alteradas pela presença de *background DNA*. O DNA que um objeto/superfície conseguirá adquirir e quanto estará disponível para ser transferido para outro objeto/superfície vai depender do tipo, quantidade e porção de tempo depositado do material biológico presente no mesmo (acumulado de contatos prévios) [3]. Além disto, o *background DNA* também interfere com a detetabilidade do DNA transferido, pois pode mascarar quantidades muito reduzidas de DNA transferido [25] ou pode aumentar a complexidade do perfil genético devido ao maior número de contribuintes [3].

## **2.2.4 Fatores dependentes do contato**

A transferência por contato direto parece ser a mais relevante via de transferência de DNA entre objetos e indivíduos, dado que a importância da transferência por aerossol para explicar a presença de DNA nos vestígios tem apresentado resultados contraditórios em diferentes estudos [13–15,29].

### **a. Natureza do contato**

A forma como o contato entre dois objetos ou um indivíduo e um objeto acontece influencia a quantidade de DNA transferido. Foi demonstrado que mais DNA é transferido quando o contato tem pressão com fricção do que quando é um contato passivo ou com pressão e sem fricção [21,22].

A natureza e intensidade do contato, em cenários de intenso e repetido manuseamento da superfície onde será recolhido o DNA, parece ter um maior impacto na transferência do DNA do que outros fatores (ex. condição da pele) [57–59].

Além disto, diferentes objetos vão ser manuseados de diferentes formas dependendo do seu tamanho, formato e propósito e objetos semelhantes podem ser manuseados de maneira distinta por pessoas diferentes. Logo, é importante ter consciência do impacto que estas diferenças terão na quantidade e qualidade de DNA transferido para cada parte de um objeto [10].

#### **b. Área de contato**

Em maiores áreas de contato há, geralmente, um maior potencial para transferência de DNA. Contudo, é necessário considerar a área de contato em conjunto com a área de amostragem, visto que uma maior quantidade de DNA transferida devido a uma maior área de contacto, apenas será detetada quando a área de amostragem for igualmente aumentada [60].

#### **c. Duração do contato**

É previsível que ocorra uma acumulação de DNA num objeto com maior frequência e duração de contato, tendo já sido demonstrado que há um aumento da quantidade de DNA transferido com o aumento do tempo de contato com um item [61,62].

Porém, outros estudos apontam para a pouca relevância que a duração do contato tem, observando que a maioria do DNA transferido o seria no contato inicial [56,63]. Assim, o mais provável é que a transferência de DNA durante o manuseamento ou utilização de um objeto seja determinada pela combinação do número de contatos e duração dos mesmos [32].

#### **d. Condições ambientais**

As diversas condições ambientais também têm influência na transferência de DNA. Foi já repetidamente demonstrado que a humidade pode aumentar drasticamente a transferência de DNA [22,40,43]. Os restantes parâmetros ambientais têm sido menos estudados, tendo já sido avaliado o impacto da temperatura em manchas de sangue, que afeta o tempo de secagem mas não afeta a taxa de transferência após a secagem destas [44].

### **2.3 Relação entre quantidade de DNA e qualidade do perfil genético com a via de transferência do *trace DNA***

De acordo com definição de *trace DNA* aplicada neste trabalho, não se sabe qual a origem celular específica (ex. células da pele, saliva) deste DNA. Então é necessária ainda mais informação para perceber como este DNA foi transferido para a superfície de onde foi colhido, para além de ter em consideração os possíveis fatores, apresentados acima, que afetaram a transferência. Por este motivo tem sido estudada qual a relação da quantidade de DNA e qualidade do perfil genético obtido com a via de transferência.

Atentando ao DNA transferido através de um único contato direto do objeto/superfície com as mãos foi demonstrado que a quantidade de DNA colhido varia consideravelmente, aproximadamente no intervalo de 0-170 ng, dependendo dos fatores envolvidos [19,21,23,50,64–66]. Relativamente à transferência direta de DNA pelo uso regular de objetos, foi possível recuperar mais uma vez quantidades muito dispersas de DNA, entre 0-75 ng [19,42,67,68]. Estes dados mostram que é impossível perceber pela quantidade de DNA detetada se este foi depositado na superfície por um único contato ou pelo uso regular.

Segundo o estudo de Goray *et al* [23], recuperaram-se sensivelmente 0-2 ng de DNA transferido indiretamente e 0-9 ng de DNA transferido diretamente no primeiro passo da transferência deste ensaio. Conforme os resultados deste estudo, não é possível estabelecer uma relação entre a quantidade de DNA recuperado e o mecanismo de transferência.

Após se observar a grande variação na quantidade de DNA obtida nos estudos anteriores, é expectável uma variação na qualidade dos perfis obtidos. De facto verifica-se isto, existindo uma grande variabilidade na taxa de sucesso do processo para fazer o perfil genético quando o teor de DNA é inferior a 0,04 ng/mL [65] e na incerteza da obtenção de um perfil genético valorizável a partir de DNA colhido de objetos tocados [67]. Para além disto, já se observou que quando um objeto é tocado por vários indivíduos nem sempre o perfil mais forte, ou seja, o que tem melhor qualidade, é o que pertence ao último indivíduo que contactou como objeto [19,69]. Assim, não é possível utilizar a qualidade do perfil genético para estabelecer quem foi o último indivíduo a contactar com o objeto. Foi ainda demonstrado que não existe uma forte correlação entre um perfil completo ou parcial e a quantidade de DNA usado para tal (usando quantidades sub-ótimas) [50].

Relativamente ao DNA transferido indiretamente, os resultados obtidos são contraditórios. Em alguns casos o perfil maioritário e com melhor qualidade é da pessoa que contactou com o objeto (transferência direta) e noutros casos é da pessoa que não contactou com o objeto (transferência indireta) [51,69].

Assim sendo, considerando todos estes estudos, percebe-se que a qualidade dos perfis genéticos obtidos não tem qualquer relação com o mecanismo de transferência nem com a

quantidade de DNA depositado. Isto indica que a qualidade do perfil de DNA vai depender não só da quantidade de DNA usado para fazer o perfil, como também de fatores como a degradação do DNA e a presença de inibidores de qualquer fase do processo de caracterização genética [11].

Em conclusão, o DNA pode acabar em locais inesperados através de um número desconhecido de fatores, e do seu efeito relativo, envolvidos na transferência de DNA e não se pode utilizar nem a quantidade do DNA recolhido nem a qualidade do seu perfil genético para inferir a forma como foi transferido para a superfície, objeto ou indivíduo onde foi colhido.

### **3. Persistência de *trace DNA***

Após a transferência do DNA, é importante saber quanto tempo dura este depósito com qualidade e integridade. O tempo que o DNA consegue permanecer no objeto/superfície onde foi depositado, mantendo-se de forma que permita a sua análise, designa-se por persistência do DNA. A persistência é um aspeto determinante para que seja possível a posterior colheita e análise do DNA. Existem 5 principais fatores que afetam a persistência: o intervalo de tempo entre a deposição e a colheita; o tipo de substrato onde o DNA está depositado; as condições ambientais a que o material biológico é exposto; os contatos adicionais pós deposição do DNA de interesse; e acondicionamento e transporte dos vestígios.

#### **3.1 Fatores que influenciam a persistência de DNA**

##### **3.1.1 Tempo**

Ao longo do tempo o DNA depositado vai-se deteriorando e a qualidade do perfil genético obtido também reduz com o passar do tempo. Assim, quanto mais tempo passar entre a deposição e a transferência ou colheita do DNA menor a quantidade e integridade deste, dependendo também das condições concomitantes [70,71].

##### **3.1.2 Tipo de substrato**

O tipo de substrato no qual o DNA está depositado afeta a persistência deste. Um estudo de Goray *et al.* [21] mostrou que a quantidade de DNA recuperado de algodão reduz 50% quando há um intervalo de 24 h entre a deposição e a colheita, enquanto a quantidade de DNA recuperado de plástico foi semelhante independentemente de a colheita ter sido feita 60 s ou 24 h depois da deposição.



### **3.1.3 Condições ambientais**

Fatores ambientais como temperaturas elevadas [70,72], humidade [70,72] e irradiação com luz ultravioleta (UV) [72,73] induzem a degradação do DNA. Também a atividade microbiana favorecida por temperaturas altas e humidade leva a uma diminuição da persistência do DNA [70]. Quanto maior a exposição a estes fatores, mais o DNA é degradado.

O contato com água é outro fator determinante para a persistência do DNA. DNA numa quantidade muito reduzida vai ser levado pela água se for exposto a chuva durante tempo suficiente [74]. Quando há uma submersão do depósito de DNA, o tempo que demora até ser impossível obter um perfil genético completo é muito variável e dependente da composição, temperatura e tipo de água assim como do depósito em si [75,76].

### **3.1.4 Contatos adicionais**

Os contatos que possam ocorrer após a alegada transferência durante o crime vão alterar a composição do depósito de DNA e, conseqüentemente, a persistência do DNA de interesse. Foi observado que após o uso regular de um item por um segundo indivíduo existe uma redução da porção de DNA do primeiro indivíduo, contudo, não foi possível estabelecer uma clara correlação entre os períodos de tempo de uso e as proporções do indivíduo correspondente na mistura de perfis [57,62,63,77,78].

De forma semelhante, observou-se que não é possível saber qual o indivíduo que contactou pela última vez com um objeto através das composições dos perfis genéticos, quando um objeto é tocado consecutivamente por diversos indivíduos de forma semelhante e por períodos de tempo idênticos [24,79]. Quando existe contatos sucessivos na superfície com o *trace DNA*, o material biológico de interesse vai sendo removido durante as interações e, desta forma, diminuir após cada contato [3,17,24].

Se o depósito de DNA não sofrer mais nenhum tipo de contato após a transferência de interesse, é possível que retenha quantidade e qualidade suficiente para gerar um perfil genético completo passados vários anos, até décadas [71,77,80,81]. Isto vai depender das condições ambientais a que o material biológico estiver exposto.

### **3.1.5 Acondicionamento e transporte**

Deve-se considerar a forma como os itens foram embalados e transportados da cena de crime para o laboratório forense, dado já ter sido demonstrado que podem perder-se quantidades significativas de material biológico por transferência para a embalagem ou até para outras partes do item [16].

#### 4. Misturas de *trace DNA*

Um perfil genético com mais do que um contribuinte gera um perfil de mistura, ou seja, num único eletroferograma está representado DNA de vários indivíduos. Atualmente é comum amostras de *trace DNA* darem origem a estes perfis, devido ao aumento da sensibilidade dos equipamentos e/ou reagente utilizados [4,10].

O problema com as misturas de *trace DNA* é que o DNA presente pode ter diferentes origens e vias de transferência para os diferentes indivíduos, para além de que é possível que nem todos os contribuintes sejam relevantes para o evento do crime [3]. Assim, a existência de perfis de mistura não só dificulta a interpretação do perfil, como o perfil do indivíduo relevante para o caso pode ser mascarado pelos outros [4,10].

#### 5. *Background DNA* e contaminação

Foi já referido anteriormente que o *background DNA* pode afetar a transferência do material biológico alvo, afetando a quantidade e qualidade do DNA transferido e potencialmente prejudicando a deteção do DNA de interesse [3]. O termo '*background DNA*' pode ter diferentes significados [10]: 1) DNA presente na superfície previamente ao DNA de interesse ser depositado na superfície durante a ação de interesse; 2) DNA de fontes existentes numa amostra que não sejam da pessoa de interesse (POI); 3) DNA presente numa amostra proveniente de indivíduos desconhecidos. Nos dois últimos significados pode incluir-se DNA de outras fontes que seja depositado durante, antes e/ou após a ação de interesse, enquanto no primeiro significado o *background DNA* foi depositado antes da ação de interesse. Ao longo deste trabalho, o termo '*background DNA*' adota diferentes significados de acordo com o contexto em que é utilizado.

Objetos pessoais e objetos partilhados com uso regular terão mais *background DNA*, ao contrário do que acontece em superfícies pouco utilizadas. Este DNA pode ser de um único indivíduo, principalmente em objetos e espaços pessoais, ou de vários indivíduos [10]. O *background DNA* pode resultar de transferências diretas, indiretas e/ou por aerossol e pode manter-se indefinidamente intato num ambiente seco e imperturbável [71].

A distribuição do *background DNA* na cena de crime antes do ato criminoso representa o "ambiente natural" da cena de crime. Ao estabelecer a cena de crime após o ato criminoso, é importante perceber o que era a distribuição do DNA do "ambiente natural" e a distribuição de DNA proveniente do crime em si [4]. No entanto, distinguir o *background DNA* do DNA depositado durante a ação de interesse é desafiante, o que vai complicar a interpretação dos perfis gerados [10].

Esta contaminação por *background DNA* é inevitável e deve ser sempre considerada na investigação da cena do crime [4]. Portanto, é útil ter conhecimento dos níveis gerais de quantidade, qualidade e origem do *background DNA*, fazendo-se, em algumas situações, uma amostragem das zonas imediatamente adjacentes às dos vestígios, de forma a obter amostras de referência que representarão o *background DNA* presentes nas amostras de vestígios [10]. Têm sido reportados níveis detetáveis de *background DNA* numa grande variedade de amostras, desde objetos comuns [40] a diferentes ambientes [13,82], incluindo roupa [83,84], computadores [85] e corpos humanos [86,87].

Podemos então considerar como contaminação qualquer depósito de DNA que não seja imediatamente relevante para o crime em investigação. Para além da contaminação prévia ao crime, pode ainda ocorrer contaminação no intervalo de tempo entre o crime e o estabelecimento da cena de crime; durante a investigação da cena de crime; e/ou no laboratório forense. A contaminação que se dá entre o crime e o estabelecimento da cena de crime pode resultar de interações inocentes de indivíduos não relacionados com o crime [6].

Quando a contaminação acontece durante a investigação da cena de crime e/ou no laboratório forense, e a contaminação do local do crime e amostras de vestígios acontece devido aos investigadores, designa-se por 'contaminação mediada pelo investigador'. Este é um tipo de contaminação evitável, mas que não pode ser excluída como possível ao interpretar os perfis genéticos dos vestígios [4]. Neste tipo de contaminação os investigadores podem involuntariamente contaminar com o seu próprio DNA ou transferir inadvertidamente DNA, mesmo ao utilizar o material de proteção adequado, de uma parte da cena de crime para outra ou de um vestígio para outro (por exemplo, ao não trocar de luvas entre a análise de objetos) [30,56]. Também pode acontecer por transferência por aerossol entre vestígios embalados que sejam transportados juntos e não estejam devidamente acondicionados [4,16].

A contaminação num cenário forense pode acontecer de muitas formas diferentes e via diferentes vetores [10], sendo talvez o mais preocupante a persistência de *background DNA* nos laboratórios forenses [88,89], em equipamento científico [30,90], em salas de autópsia [86,91] e em postos de polícia [85], todos passíveis de entrar em contato com os vestígios, e, possivelmente, contaminá-los.

## **5.1 Contaminação no laboratório forense**

DNA celular, purificado e amplificado pode acumular-se em superfícies, materiais e equipamentos dos laboratórios forenses e pode ser transferido para as amostras de vestígios

[92]. A contaminação no laboratório forense inclui a contaminação de consumíveis (material e reagentes), como luvas [93], quer no processo de fabrico quer no próprio laboratório [94,95].

A existência de contaminação no ambiente laboratorial é um problema grave, dado que não só a presença de diferentes fontes de DNA na amostra geram perfis de mistura e dificultam a deteção do DNA alvo [3], como também é geralmente impossível distinguir entre DNA transferido durante o crime e DNA proveniente de contaminação [4]. O DNA contaminante pode aparecer como o perfil maioritário ou minoritário da mistura, pode nem ser detetado ou pode sobrepor-se totalmente ao DNA alvo [6]. Desta forma, podem implicar-se inocentes no evento do crime devido à contaminação de amostras, existindo já vários casos de grande destaque exemplificativos do impacto negativo da contaminação, tais como o 'caso Adam Scott' [4], o 'caso Farah Jama' [96] e o 'caso do Fantasma de Heilbronn' [97]. No 'caso Adam Scott' [4], existiu a contaminação de uma amostra de sémen (vestígio do caso a ser investigado) com uma amostra de saliva do Adam Scott (uma amostra de referência para outro caso) devido à reutilização de um recipiente de plástico descartável no laboratório, o que levou a que Adam Scott fosse detido por vários meses como suspeito de ofensa sexual até se descobrir que o sémen não era dele. Este caso é particularmente relevante para mostrar o quão importante é a implementação de medidas de mitigação da contaminação e procedimentos de monitorização desta mesma contaminação no laboratório forense.

De forma a prevenir a contaminação nos laboratórios devem implementar-se medidas de mitigação, como a utilização apropriada e substituição de roupa de proteção individual; utilização de consumíveis *DNA free* (sem DNA) certificados; material descartável ou esterilizado; treino eficaz e avaliação da competência dos trabalhadores; uso de procedimentos e regimes de limpeza eficazes e validados; e aplicação de procedimentos eficazes de monitorização de contaminação [14,81,98,99]. É essencial existir uma limpeza frequente e minuciosa das áreas de trabalho e uma descontaminação rotineira e rigorosa de todos os equipamentos e superfícies do laboratório para evitar transferência indireta de DNA contaminante para as amostras [6,92,98]. A ênfase dos procedimentos de prevenção de contaminação não deve estar na filtragem do ar do laboratório, uma vez que é improvável que o ar seja a fonte de contaminação do DNA [98].

Devem adotar-se medidas que permitam a deteção de incidentes de contaminação que ocorram, de forma que os perfis genéticos contaminados sejam interpretados de acordo com o contexto. Isto deve incluir controlos negativos de cada etapa do processamento das amostras e uma base de dados inclusiva de todos os que possam contactar as amostras e/ou estar nos espaços onde estas são examinadas ou armazenadas. Cada perfil gerado a partir de uma amostra é comparado contra esta base de dados eliminatória, permitindo avaliar se algum dos perfis nesta base está claramente presente no perfil gerado a partir da amostra em análise [99,100].

Sendo a contaminação uma questão crítica para a análise e interpretação de *trace DNA*, não é demais reforçar que estes procedimentos para a minimização da contaminação devem ser definidos, rigorosamente aplicados e monitorizados, e sempre que aconteça um episódio de contaminação este deve ser investigado de forma completa e transparente [101].

## 6. Contaminação no SGBF-C

O Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro (SGBF-C), pertencente ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF), é um Laboratório forense que trabalha tanto com amostras de vestígios como com amostras de referências. Tal como exposto acima, a contaminação em laboratórios forenses pode acontecer e tem graves consequências, logo o SGBF-C tem implementadas medidas de mitigação da contaminação e, ainda, um plano de monitorização da contaminação.

### 6.1 Prevenção da contaminação

No SGBF-C as medidas preventivas adotadas para evitar a contaminação exigem que todos os colaboradores utilizem máscara, bata e luvas descartáveis; que antes e depois de qualquer procedimento laboratorial seja feita uma descontaminação das salas e *DNA workstations* com luz UV; que após qualquer procedimento laboratorial a área de trabalho e *DNA workstations* sejam limpas com o descontaminante *DNA AWAY* e que o material utilizado seja esterilizado ou descartável e os consumíveis *DNA free*.

O processamento em separado de amostras de vestígios e de amostras de referência e o manterem-se as amostras amplificadas fisicamente separadas das não amplificadas são medidas importantes para evitar contaminação cruzada de amostras. Também as diferentes etapas do processamento das amostras são feitas em diferentes áreas de trabalho, ou seja, existe uma sala específica para cada etapa do processamento e tipo de amostra.

É ainda importante referir o Plano de Manutenção Preventiva Interna, cuja implementação reduz a probabilidade de contaminação. Este plano prevê a periodicidade da manutenção dos diversos equipamentos laboratoriais, sendo esta manutenção semestral para os termocicladores; trimestral para os termoagitadores, centrífugas e sequenciador; e mensal para os extratores, *DNA workstations* e equipamento de RT-PCR, para além de nos extratores e nas *DNA workstations* existir, inclusive, uma descontaminação sempre que se utilizam.

## 6.2 Monitorização da contaminação

Apesar da implementação de todas estas medidas preventivas da contaminação, a possibilidade de existir contaminação de DNA no laboratório não pode ser completamente descartada. Por este mesmo motivo é essencial que a contaminação laboratorial seja monitorizada.

No SGBF-C é feita anualmente uma monitorização da contaminação do laboratório para determinar os níveis de DNA prevalentes (*background DNA* laboratorial) e controlar a eficácia da descontaminação. Esta monitorização é feita através da mesma metodologia utilizada na rotina laboratorial ou com recurso a métodos tão sensíveis como os utilizados na rotina laboratorial. Para além da monitorização anual, se se detetar qualquer possível contaminação em amostras analisadas na rotina laboratorial, este procedimento de monitorização é realizado de imediato, para melhor interpretação da situação em causa [102].

Adicionalmente, todos os colaboradores (e até mesmo pessoas externas ao laboratório, que estejam presencialmente no Serviço por um determinado período de tempo) têm o seu perfil genético determinado, para comparação com os perfis das amostras analisadas na rotina laboratorial, e são realizados controlos negativos em todas as etapas de processamento da amostra, para se detetarem possíveis contaminações.

Faz-se ainda o registo de todos os materiais e consumíveis utilizados e de quem faz cada procedimento, indicando data e hora, para rastreamento em caso de contaminação.

## 7. Perfis genéticos de *trace DNA*

Depois de colhidas as amostras de *trace DNA*, são precisas várias etapas para se obter um perfil de DNA que permita fazer uma identificação genética. É importante que os procedimentos adotados em cada etapa sejam os mais adequados ao tipo de amostra, de forma a se conseguir um perfil genético com a melhor qualidade possível [2]. As etapas para obtenção de um perfil genético são: extração, quantificação, amplificação e separação e deteção dos produtos amplificados. Contudo, a parte mais crucial para se fazer uma identificação genética correta é a análise do perfil gerado, na forma de eletroferograma.

## 7.1 Etapas para obter um perfil genético

### 7.1.1 Extração do DNA

Para se construir um perfil genético é essencial ter DNA o mais puro possível e em quantidade suficiente que permita obter um perfil completo. Assim, a amostra depois de colhida, tem de ser processada até ficar apenas o DNA nas condições pretendidas. Este processamento começa com a extração do DNA presente na amostra. As amostras contêm várias moléculas para além do DNA, como proteínas e outros componentes celulares que protegem o DNA no ambiente celular, mas que podem inviabilizar a análise deste. Com o processo de extração do DNA pretende-se separar o material genético das proteínas e elementos celulares, de forma a maximizar a quantidade de DNA obtido e remover os inibidores da amplificação do DNA [2,5].

Existem diversas técnicas de extração de DNA: extração orgânica; extração com Chelex; extração de papel FTA; extração com sílica; e extração de fase sólida. O método de extração a utilizar depende de vários fatores, nomeadamente, o tipo de amostra e a quantidade de material genético que se prevê que a amostra contenha [2,5]. Contudo, qualquer que seja o método utilizado, existe sempre cinco passos básicos para extrair o DNA da amostra: 1) disrupção da estrutura celular, criando o lisado celular, 2) separação do DNA solúvel de resíduos celulares e outro material insolúvel, 3) ligação do DNA à matriz de purificação, 4) lavagem das proteínas e outros contaminantes presentes na matriz e 5) eluição do DNA puro [103].

Atualmente, em genética forense utiliza-se frequentemente para amostras de *trace DNA* a extração de fase sólida automatizada, na qual o DNA se liga a partículas magnéticas com polímeros incorporados. Estas partículas magnéticas ficam “presas” a um íman, e as lavagens para retirar os componentes que não interessam acontecem de forma automática. Por fim, o DNA deixa de estar ligado às partículas e fica-se com o DNA puro em solução. No entanto, antes da ligação do DNA às partículas magnéticas, é fundamental ocorrer a lise celular, para tal é comum utilizarem-se detergentes, como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), e sais caotrópicos, como o tiocianato de guanidina, que destabilizam a membrana e a sua estrutura proteica. Também se utiliza ditioneitol (DTT), um agente redutor, e Proteinase K que ajuda na digestão das proteínas celulares [104].

### 7.1.2 Quantificação do DNA

Depois do DNA estar isolado, é necessário saber qual a quantidade e qualidade deste antes de prosseguir na sua análise, de forma a garantir resultados ótimos, uma vez que DNA em excesso ou a menos pode levar, respetivamente, à formação de múltiplos artefactos ou à perda de alelos no eletroferograma. A reação de amplificação por PCR pode não resultar

devido à presença de inibidores da reação, DNA muito degradado e/ou DNA em quantidade insuficiente. Portanto, a determinação da quantidade de DNA humano numa amostra tem como objetivo perceber se existe material genético em quantidade e qualidade suficiente para se proceder à análise de STRs e, caso exista, qual quantidade de amostra se deve utilizar para uma amplificação eficaz [2].

Desta forma, a quantificação de DNA pode fazer-se por diferentes métodos, sendo que a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) uma das mais utilizadas em amostras de *trace DNA*. Esta técnica baseia-se na existência de *primers* específicos para DNA humano, e para DNA masculino, e em sondas marcadas com fluorescência. As sondas são marcadas com dois fluorocromos que emitem fluorescência a diferentes comprimentos de onda e são complementares com uma sequência localizada entre as regiões de acoplamento dos *primers*, hibridizando com a região de interesse do DNA. Na extremidade 5' da sonda está o fluorocromo '*reporter*' e na extremidade 3' está o fluorocromo '*quencher*'. Quando a sonda se mantém intata, os dois fluorocromos continuam próximos e esta proximidade impede a emissão de fluorescência do *reporter* devido à transferência de energia entre os dois fluorocromos. Durante a polimerização, a enzima *Taq* polimerase promove a clivagem entre o *reporter* e a sonda, o *reporter* fica liberto da ação supressora do *quencher* e emite fluorescência. À medida que mais produtos da PCR são gerados, mais fluorocromos são libertados e maior será a emissão de fluorescência. Esta fluorescência é medida por um equipamento e é proporcional à quantidade de DNA presente na amostra [2,5].

### 7.1.3 Amplificação do DNA

Após a quantificação do DNA, fica a saber-se qual a quantidade ideal de amostra a utilizar na amplificação. A amplificação do DNA é feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR), que tem como objetivo a obtenção de DNA em quantidade suficiente para a deteção em eletroforese capilar. A reação de PCR é um processo enzimático no qual uma região específica do DNA é replicada exponencialmente e, para tal, o DNA tem de ser sujeito a repetidos ciclos de aquecimento e arrefecimento [2].

O essencial para a reação de PCR é, para além do DNA alvo que vai ser amplificado, dois *primers* específicos para cada sequência de interesse, dNTPs (desoxinucleótidos trifosfatados), cloreto de magnésio, uma solução-tampão e uma DNA polimerase termoestável, como a *Taq* polimerase. Os ciclos de aquecimento e arrefecimento dividem-se em três fases - desnaturação, *annealing* e extensão. Na fase de desnaturação a reação é sujeita a uma temperatura de 94 °C que causa a desnaturação da cadeia dupla de DNA em duas cadeias simples. De seguida diminui-se a temperatura para valores entre 50 °C e 65 °C, ocorrendo a fase de *annealing*, na qual os *primers* se ligam às sequências alvo do DNA. Por último, a temperatura é aumentada para 72 °C, temperatura ótima para a *Taq* polimerase



incorporar os nucleótidos (dNTPs) fazendo a extensão do *primers* e, desta forma, criar cadeias complementares ao DNA alvo [5,104].

#### **7.1.4 Separação e detecção dos produtos amplificados**

Uma vez obtidos os fragmentos de DNA de interesse amplificados, é necessário distinguir as várias moléculas de DNA e, portanto, separá-las por tamanho para que possam ser analisadas. Esta separação geralmente acontece por eletroforese, sendo a eletroforese capilar em sequenciador automático a mais utilizada em genética forense. A técnica de eletroforese capilar baseia-se nas diferentes velocidades de migração dos fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, através de um polímero. Ou seja, o polímero dentro do capilar separa os fragmentos de DNA de acordo com o seu peso molecular, sendo que os fragmentos menores se movimentam mais facilmente no polímero e, por isso, migram mais rapidamente que os fragmentos maiores e chegam primeiro ao detetor [2,104].

Nos sequenciadores automáticos, os passos de injeção, separação e detecção são completamente automatizados e podem ser analisadas várias amostras em simultâneo. Depois de colocada no sequenciador, a amostra é transferida para o capilar através de uma injeção eletrocínética. De seguida, uma voltagem constante é aplicada no capilar e os fragmentos de DNA, carregados negativamente, migram através de um polímero viscoso no sentido do elétrodo positivo (ânodo). Os fragmentos são assim separados à medida que uns migram mais rápido do que outros e são detetados quando passam por uma janela de detecção, devido à emissão de fluorescência. Os fragmentos de DNA emitem fluorescência porque lhes foram adicionados fluorocromos durante a amplificação, que ao passarem pelo detetor são excitados por um laser. O equipamento deteta a fluorescência e converte-a em sinais eletrónicos, que vão dar origem aos picos constituintes de um eletroferograma, medidos em unidades relativas de fluorescência (RFU) [2,104].

Esta técnica de eletroforese capilar tem a característica de necessitar de pouco material genético, o que é uma vantagem na área da Genética Forense onde muitas vezes as amostras têm quantidades muito reduzidas de DNA. Na mistura injetada no capilar, para além do DNA amplificado, adiciona-se formamida, que atua como agente desnaturante, mantendo as cadeias complementares de DNA separadas, e ainda ajuda a reduzir os níveis de sais, auxiliando o processo de injeção [101].

Para que seja possível que o *software* associado ao sequenciador construa o perfil genético, é ainda necessário usar *size standard* e *allelic ladder*. O *size standard* é adicionado às amostras injetadas, tendo os seus fragmentos de DNA tamanho conhecido e estando marcados com cor diferente do DNA amplificado. O *size standard* migra juntamente com o DNA amplificado e permite que o *software* faça uma curva de calibração através da qual se determina o tamanho de cada fragmento de DNA amplificado em pares de bases (bp). O

*allelic ladder* é uma mistura dos alelos mais comuns, usados em genética forense, para cada *locus* e é corrido em separado das amostras. Comparando os picos gerados nas amostras com os do *allelic ladder* é possível atribuir os alelos respectivos a cada amostra, originando o eletroferograma [5].

## 7.2 Interpretação de perfis de STRs

De forma a interpretar corretamente um perfil genético é imprescindível perceber-se o que está representado neste. Um perfil genético obtido por eletroforese capilar apresenta vários picos, que representam os diferentes alelos presentes na amostra. Estes picos estão distribuídos ao longo do eixo das abcissas conforme o tamanho do alelo em pares de bases (bp) e têm diferentes alturas de acordo com a intensidade de fluorescência, em RFU, que apresentam [2].

Os alelos do eletroferograma são alelos de STRs (*Short Tandem Repeats*). O polimorfismo mais utilizado na identificação genética humana são os STRs, que são regiões não codificantes do DNA constituídas por unidades de repetição de 2 a 7 bp de comprimento. Os STRs são marcadores genéticos muito populares porque são muito frequentes e bem distribuídos ao longo do genoma, têm um elevado grau de polimorfismo (número de repetições dos STRs varia muitíssimo entre indivíduos), logo têm um grande poder discriminativo, e são facilmente amplificados por PCR e analisados. Na área de Genética Forense os STRs mais utilizados são os tetranucleótidos (repetições de 4 bp). Os STRs podem ser autossômicos ou sexuais, dependendo dos cromossomas onde se localizam e, normalmente, utilizam-se os STRs autossômicos para a identificação individual, se for necessário mais informação recorre-se aos STRs sexuais [2,105].

A partir do perfil genético obtém-se o genótipo do(s) indivíduo(s), contudo ao analisar o perfil da amostra é fundamental ter em conta possíveis artefactos. Para começar são definidos quais os alelos considerados válidos através dos limiares analítico e estocástico, em RFU, com picos acima do limiar estocástico a ser considerados alelos válidos, picos entre os limiares analítico e estocástico podem ou não ser alelos válidos e picos abaixo do limiar analítico considerados ruído. Dois dos artefactos mais preocupantes são os picos *pull-up* e o *dropout* alélico. Os picos *pull-up* são causados por uma falha do *software* em discriminar as diferentes cores dos marcadores fluorescentes atribuídas aos diferentes alelos. Neste caso, um pico observado num marcador (p. ex. azul) é registado pelo sensor de outro marcador diferente (p. ex. verde), e gera um segundo pico neste outro marcador (verde) que não é um verdadeiro alelo. Contudo, geralmente estes picos *pull-up* têm altura suficiente para serem considerados válidos e podem não ser reconhecidos como artefactos, dando origem a um

genótipo diferente do verdadeiro. O *dropout* alélico é quando um alelo particular tem a sua amplificação por PCR falhada, logo o alelo desaparece totalmente do eletroferograma, o que acontece sobretudo em amostras degradadas [2].

Se a amostra de DNA estiver muito degradada ou ocorrer inibição da PCR, pode acontecer adquirir-se apenas um perfil parcial de STRs. Nestas situações habitualmente são os alelos maiores que desaparecem, o que dificulta a interpretação do perfil genético [2].

Portanto, considera-se um perfil de DNA com elevada qualidade quando todos os *loci* apresentam alelos, ou seja, um perfil completo tem maior qualidade que um perfil parcial, e quando a altura dos picos é elevada, visto que há mais confiança que todo o DNA presente na amostra foi detetado e considera-se que o número de contribuintes para o perfil foi corretamente atribuído [11]. Este último ponto é fulcral, uma vez que é comum em casos forenses as amostras terem misturas de DNA de dois ou mais indivíduos, o que dificulta a identificação do perfil relevante. A interpretação de misturas de DNA é particularmente desafiante em amostras de *low template DNA*, onde podem desaparecer alelos (*dropout* alélico) ou onde alelos não relacionados com o crime são amplificados (*dropin* alélico) [4].

Ao interpretar um perfil genético obtido a partir de amostras de *trace DNA*, este deve ser interpretadas no contexto de possível contaminação, especialmente amostras de misturas que podem ter *background DNA*, DNA relacionado com o crime e DNA proveniente de contaminação pós-crime [6]. Outro dos problemas do *trace DNA* é o facto de não ser possível identificar o tipo de células ou fluido biológico que o originaram, logo quando existem misturas de DNA, este material genético pode ter diferentes origens. Saber qual a origem do material biológico pode auxiliar na interpretação dos perfis gerados a partir das amostras, já que informa sobre a probabilidade do DNA ser transferido, persistir e ser recolhido, ajudando a perceber a relevância de cada perfil para o caso criminal. Todavia, associar um tipo de células específico a um indivíduo específico numa amostra com misturas é muito complexo, principalmente se não existirem células exclusivas de um sexo ou vários dos contribuintes para o perfil forem do mesmo sexo [10]. Existem testes presuntivos que não são definitivos e, atualmente, existem já metodologias baseadas em RNA que permitem identificar a origem biológica do DNA, ainda assim esta associação com o perfil de *trace DNA* não é implícita [4].

Desta forma, uma amostra de *trace DNA* é mais difícil de associar à atividade do crime, devido à falta de contexto, pois o *trace DNA* pode ter qualquer origem e ser sujeito a quaisquer fenómenos de transferência e persistência de DNA desconhecidos, os quais não é ainda possível prever pela quantidade e qualidade do DNA. Estes desafios fazem com que seja necessário especial atenção e cuidado aquando da interpretação dos resultados obtidos com este tipo de amostras [32].

## 8. Objetivos

A presença de *background DNA* e a contaminação em laboratórios forenses são uma realidade que deve ser evitada a todo o custo. Para isso, é necessário saber-se por que mecanismos acontece a transferência do DNA contaminante e qual a sua origem, para desenvolver estratégias de combate à contaminação. É igualmente pertinente perceber como a persistência deste *background DNA* é afetada.

Por conseguinte, os objetivos deste trabalho desenvolvido no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro (SGBF-C), através da realização da monitorização anual da contaminação, são:

- avaliar a taxa de contaminação dos laboratórios no SGBF-C;
- perceber quais as fontes da contaminação;
- deduzir que mecanismos de transferência originam contaminação laboratorial;
- verificar se os procedimentos preventivos da contaminação adotados são eficazes;
- perceber como minimizar e, se possível, eliminar, a contaminação no SGBF-C.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no SGBF-C e todas as amostras foram processadas em conformidade com os protocolos adotados pelo SGBF-C do INMLCF para amostras de vestígios, utilizando a mesma metodologia que é utilizada na rotina laboratorial, conforme indicado no procedimento operacional para a monitorização da contaminação [102].

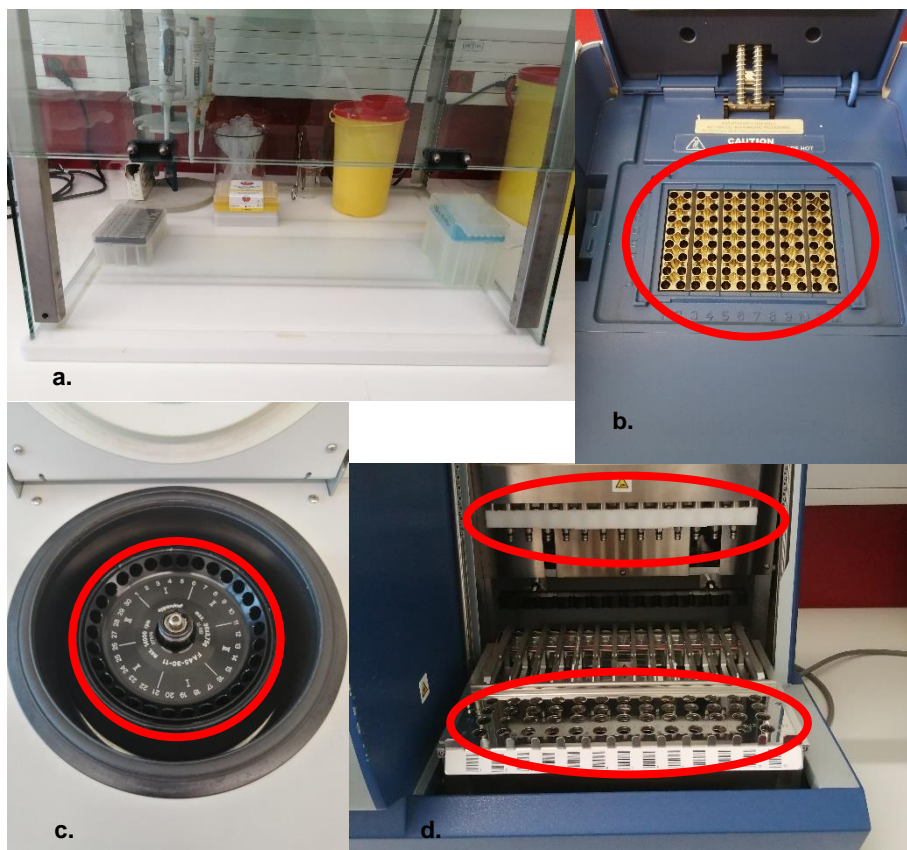
Ao longo de toda a metodologia aplicada foi feito um controlo de qualidade, através da utilização de controlos negativos na fase de colheita de amostras e de controlos positivos e negativos em todas as etapas de processamento das amostras (extração, quantificação e amplificação do DNA). Os controlos negativos foram constituídos apenas pelos reagentes utilizados em cada fase do processamento. Assim, estes controlos permitiram avaliar se não existiram contaminações durante os procedimentos. Os controlos positivos foram constituídos pelos reagentes utilizados em cada fase aos quais foi adicionado uma amostra com quantidade de DNA e/ou perfil genético conhecidos. Estes controlos funcionaram como controlos internos de qualidade, validando a metodologia utilizada.

### 1. Colheita das amostras

De acordo com o procedimento do SGBF-C [102] para a monitorização da contaminação, selecionaram-se os locais – bancadas de trabalho, *DNA workstations* e equipamentos (*robots* de extração, pipetadores automáticos, termocicladores, centrífugas) – para recolha de amostras de monitorização (Figura 2). Teve-se em conta as especificidades de cada superfície/equipamento e privilegiou-se onde ocorre maior manipulação de amostras e, especialmente, onde ocorre manipulação de produto amplificado. Listaram-se os 56 locais selecionados e atribuiu-se a designação de MONITxxx a cada um, substituindo os xxx pelo número correspondente de cada local – MONIT001 a MONIT056.

Colheram-se as amostras com uma zaragatoa (*Rayon swab with plastic stick sterile disposable – Goodwood Medical Care®*), estéril e levemente humedecida com água *nuclease-free*, para cada local. De seguida cortou-se a haste e colocou-se a zaragatoa em si numa *LySep™ Filter Column* acoplada a um *Sample Tube* (componentes do *kit* de extração), devidamente identificadas. Por último, realizou-se o controlo negativo, utilizando uma zaragatoa estéril e a água utilizada para efetuar a monitorização.

Amostras e controlo foram armazenados a  $-25\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$  até posterior utilização.



**Figura 2.** Alguns locais de recolha de amostras de monitorização: **a.** *DNA Workstations*; **b.** termociclador; **c.** centrífuga; **d.** *robot* de extração. Nos equipamentos laboratoriais (b, c, d) as zonas de recolha estão assinaladas com círculos vermelhos.

## 2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com recurso a dois kits comerciais de extração diferentes (por questões de disponibilidade), mas com procedimentos muito semelhantes.

### **a. *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction kit***

Na extração de DNA com recurso ao *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction kit* (*ThermoFisher Scientific – Applied Biosystems®*) [106,107], começou por se preparar a solução de lise, misturando 500  $\mu$ L de *Lysis Buffer* e 5  $\mu$ L de DTT (ditiotreitól) (1M) por amostra e controlos. Adicionaram-se 500  $\mu$ L de solução de lise em cada amostra e controlo (armazenadas nas *LySep™ Filter Column* acoplada a um *Sample Tube*) e colocaram-se estas a incubar no termoagitador (*HLC BioTech, MKR13*) a 70 °C durante 40 minutos, com agitação de 750 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (*Eppendorf AG, Centrifuge 5417R*) a 10000 rpm durante 2 minutos.

Por fim, separou-se a coluna (*LySep™ Filter Column*) com a zaragatoa do tubo com a amostra (*Sample Tube*), sendo a coluna descartada e o tubo colocado no *robot* de extração *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems®)*. No *robot* já estavam colocados os reagentes (em *cartridges*) e pontas necessários para a realização das últimas etapas da extração de DNA: (1) ligação das moléculas de DNA a partículas magnéticas; (2) lavagens para remoção de potenciais inibidores; e (3) eluição do DNA concentrado e purificado. Selecionou-se o programa adequado ao *kit* utilizado e após a corrida recolheram-se os tubos de eluição com o DNA. Estas amostras foram guardadas a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **b. *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction kit***

Na extração de DNA com recurso ao *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction kit (ThermoFisher Scientific – Applied Biosystems®)* [106,107], começou por se preparar a solução de lise, misturando 220  $\mu\text{L}$  de *Lysis Buffer*, 3  $\mu\text{L}$  de DTT (ditiotreitól) (1M) e 7  $\mu\text{L}$  de proteinase K por amostra e controlos. Adicionaram-se 230  $\mu\text{L}$  de solução de lise em cada amostra e controlo (armazenadas nas *LySep™ Filter Column* acoplada a um *Sample Tube*) e colocaram-se estas a incubar no termoagitador (*HLC BioTech, MKR13*) a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos, com agitação de 750 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (*Eppendorf AG, Centrifuge 5417R*) a 10000 rpm durante 90 segundos.

Por fim, separou-se a coluna (*LySep™ Filter Column*) com a zaragatoa do tubo com a amostra (*Sample Tube*), sendo a coluna descartada e o tubo colocado no *robot* de extração *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems®)*. No *robot* já estavam colocados os reagentes (em *cartridges*) e pontas necessários para a realização das últimas etapas da extração de DNA: (1) ligação das moléculas de DNA a partículas magnéticas; (2) lavagens para remoção de potenciais inibidores; e (3) eluição do DNA concentrado e purificado. Selecionou-se o programa adequado ao *kit* utilizado e após a corrida recolheram-se os tubos de eluição com o DNA. Estas amostras foram guardadas a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3. Quantificação de DNA**

A quantificação de DNA foi feita através da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) utilizando o *Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit (ThermoFisher Scientific – Applied Biosystems®)* [108,109]. Este *kit* permite quantificar o DNA humano total e o DNA humano de origem exclusivamente masculina, e ainda informa sobre o índice de degradação da amostra e a possível presença de inibidores da PCR.

Inicialmente colocaram-se 10 µL de *Reaction Mix* e 8 µL de *Primer Mix* em cada poço da placa *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate* (*ThermoFisher Scientific – Applied Biosystems®*) correspondente a uma amostra ou controlo. Adicionaram-se 2 µL de amostra (ou controlo positivo) em cada poço respetivo e selou-se a placa com *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (*ThermoFisher Scientific – Applied Biosystems®*). Por último, colocou-se a placa no equipamento *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems®*) que, associado ao *software HID Real-Time PCR Analysis* (*Applied Biosystems®*), permitiu que se determinasse a quantidade de DNA presente em cada amostra extraída. Após a quantificação, voltou-se a armazenar as amostras extraídas a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nesta fase, analisaram-se os resultados e apenas as amostras com resultado positivo, definido por uma quantidade de DNA humano total igual ou superior a 0,01 ng/µL (segundo os critérios definidos no SGBF-C [102]), avançaram para as fases seguintes de processamento das amostras.

#### 4. Amplificação de DNA

A amplificação das moléculas de DNA das amostras foi feita usando o *GlobalFiler™ PCR Amplification kit* (*ThermoFisher Scientific – Applied Biosystems®*) [110,111] que permite amplificar 21 STRs autossómicos (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338), a amelogenina (marcador determinante do sexo) e ainda, no cromossoma Y, caso exista, 1 Y-STR (DYS391) e 1 marcador polimórfico de inserção/deleção (Y indel). O *kit GlobalFiler™* utiliza um sistema de 6 fluorocromos (6-FAM™, VIC™, NED™, TAZ™, SID™ e LIZ™), permitindo a deteção automática de fragmentos de DNA.

Primeiro identificou-se um tubo de PCR - *Multiply®-Pro cup 0,2 mL, PP* (*Sarstedt®*) - para cada amostra e controlos. Depois preparou-se uma mistura composta por 7,5 µL de *Master Mix* e 2,5µL de *Primer Set* por cada tubo de PCR e distribuíram-se 10 µL desta mistura em cada tubo. De seguida, adicionou-se 1 a 15 µL de amostra, consoante os resultados da quantificação, ao tubo correspondente. Nos tubos de PCR onde foi necessário adicionou-se *Low TE buffer* – 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 – (*PanReac AppliChem®*), de forma a perfazer um volume final de 25 µL em todos os tubos.

No fim, colocaram-se os tubos de PCR no termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems®*), selecionando o programa adequado ao *kit* e ao tipo de amostras (neste caso, amostras de vestígios) (Tabela 1).



**Tabela 1.** Condições do programa de amplificação para amostras de vestígios com o *GlobalFiler™ PCR Amplification kit* [111].

Passo inicial	29 ciclos		Extensão final	Último passo
	Desnaturação	Annealing/Extensão		
95 °C 1 minuto	94 °C 10 segundos	59 °C 90 segundos	60 °C 10 minutos	4 °C ∞

Terminado este procedimento as amostras extraídas foram novamente armazenadas a  $-25\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$ . As amostras amplificadas foram armazenadas à parte a  $-21\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$ .

## 5. Eletroforese capilar / Separação e detecção de fragmentos de DNA

A separação dos fragmentos de DNA de acordo com o seu tamanho e detecção destes foi feita por eletroforese capilar [112]. Preparou-se inicialmente uma mistura contendo 9,5 µL de *Hi-Di™ Formamide* (ThermoFisher – Applied Biosystems®) e 0,5 µL de *GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0* (ThermoFisher – Applied Biosystems®) por cada poço da placa que levou material amplificado (amostras, controlos e *Allelic Lader*). De seguida distribuíram-se, na placa, 10 µL desta mistura e, posteriormente, adicionou-se 1 µL de cada amostra e controlos amplificados no poço respetivo, e 1 µL de *Allelic Ladder* no último poço contendo mistura.

Finalmente, selou-se a placa com a *septa* e colocou-se num termociclador (*Applied Biosystems®, GeneAmp®, PCR System 2700*) a 95 °C durante 3 minutos. Após isto, a placa foi encerrada nos suportes e inserida no sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems® x Hitachi®*), onde no seu *software* (*3500 Series Data Collection Software 2*) se selecionou o programa a utilizar, de acordo com o *kit* utilizado, e o tempo de injeção desejado (10 segundos).

Os resultados foram analisados com recurso ao *software GeneMapper™ ID-X*, versão 1.6 (*Applied Biosystems®*), com o limiar analítico definido em 70 RFU (unidades de fluorescência relativa) e o limiar estocástico definido em 200 RFU.

## **6. Análise e interpretação dos dados**

Os eletroferogramas obtidos foram analisados e interpretados de acordo com os procedimentos de validação de perfis genéticos usados no SGBF-C [113], excluindo picos atribuídos a artefactos.

Os perfis obtidos a partir das amostras foram comparados com a base de dados onde estão os perfis de todos os colaboradores do SGBF-C e outras pessoas que tenham estado no Serviço. Desta forma identificaram-se os indivíduos representados em cada amostra, quando possível, e classificaram-se os perfis.

## **7. Ações corretivas**

Comunicaram-se os resultados positivos obtidos na quantificação de DNA à Responsável da Qualidade do SGBF-C e à Diretora de Serviço, e estas amostras foram amplificadas e determinado o seu perfil genético (tal como descrito acima).

Consequentemente, descontaminaram-se com *DNA AWAY (Thermo Scientific™)* os locais correspondentes às amostras com resultado positivo e recomeçou-se o processo de monitorização de acordo com todas as etapas já descritas – colheita [102], extração [107], quantificação [109], (amplificação [111] e eletroforese [112], se necessário) – até o resultado ser negativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho fez-se a monitorização da contaminação do SGBF-C do INMLCF através da colheita de DNA, em diversos locais do Laboratório, e quantificação deste. Fez-se o perfil genético das amostras que relevaram contaminação. Depois de compreender a contaminação existente, procedeu-se à ação corretiva de descontaminação e fez-se nova monitorização dos níveis de DNA prevalentes.

As amostras provenientes da monitorização, embora não sejam amostras colhidas numa cena de crime, são consideradas amostras de *trace DNA*, dado que não se sabe a origem do material biológico, ou seja, qual o tipo de fluído corporal/células que estão presentes nas amostras. Como tal, também a via pela qual o DNA foi transferido para o local onde foi colhido e a persistência deste nesse local são desconhecidas.

### 1. Determinação da quantidade de *background DNA* laboratorial

Foram colhidas 56 amostras para monitorização dos níveis prevalentes de DNA no SGBF-C. Estas 56 amostras foram processadas (extração e quantificação de DNA) para se determinar a quantidade de DNA presente no *background DNA* laboratorial. Todos os controlos negativos e positivos realizados nas etapas de processamento das amostras até à quantificação do DNA produziram resultados adequados.

A quantidade de DNA presente em cada uma das amostras foi determinada através do *kit Quantifiler™ Trio*, que também informa sobre a degradação da amostra e a presença de inibidores. As amostras com valores mais baixos de DNA apresentaram maior índice de degradação e todas as amplificações das amostras ocorreram sem falhas, não sendo detetados inibidores da reação de PCR, uma vez que a amplificação do IPC (controlo interno de PCR) – sequência de nucleótidos sintética presente nos reagentes do *kit* – decorreu sem problemas.

Apesar das 56 amostras não terem sido todas extraídas com o mesmo *kit*, os resultados são apresentados todos em conjunto sem especificar com qual dos *kits* (*PrepFiler Express™* ou *PrepFiler Express BTA™*) se extraiu cada uma, porque os resultados são comparáveis entre os dois e seriam semelhantes para as amostras utilizadas. Pode fazer-se esta união dos resultados devido à elevada semelhança da metodologia de ambos, em que apenas difere a adição de um reagente extra (Proteinase K) à reação de lise, que é para ajudar em amostras complicadas (p. ex. ossos, unhas). Contudo, como as amostras em estudo são de DNA livre ou células presentes em superfícies e objetos, a lise completa já se dá sem a adição da

Proteinase K, logo a inclusão deste reagente não faz diferença para o resultado final da extração destas amostras.

**Tabela 2.** Valores da quantificação de DNA, em ng/μL, nas amostras MONIT001 a MONIT056. As amostras com resultado positivo para a contaminação encontram-se a **negrito**.

<b>Amostra</b>	<b>Quantidade de DNA (ng/μl)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Quantidade de DNA (ng/μl)</b>
MONIT001	0,0005	MONIT029	0,0002
MONIT002	0,0029	MONIT030	0,0002
MONIT003	0,0027	MONIT031	-
<b>MONIT004</b>	<b>0,0246</b>	MONIT032	0,0004
MONIT005	0,0092	MONIT033	-
MONIT006	0,0009	MONIT034	0,0001
<b>MONIT007</b>	<b>0,0273</b>	MONIT035	-
<b>MONIT008</b>	<b>0,0451</b>	MONIT036	0,0017
MONIT009	0,0022	MONIT037	0,0005
MONIT010	0,0058	MONIT038	0,0001
MONIT011	0,0037	MONIT039	0,0001
<b>MONIT012</b>	<b>0,3812</b>	MONIT040	0,0002
MONIT013	0,0031	MONIT041	0,0002
MONIT014	0,0005	MONIT042	0,0003
MONIT015	0,0041	MONIT043	0,0004
MONIT016	-	MONIT044	0,0006
MONIT017	0,0003	MONIT045	0,0002
MONIT018	0,0009	MONIT046	-
MONIT019	0,0028	MONIT047	0,0001
MONIT020	-	MONIT048	0,0001
<b>MONIT021</b>	<b>0,0170</b>	MONIT049	0,0034
<b>MONIT022</b>	<b>0,0329</b>	MONIT050	0,0011
MONIT023	-	MONIT051	-
MONIT024	0,0026	MONIT052	0,0002
MONIT025	0,0017	MONIT053	0,0002
<b>MONIT026</b>	<b>0,0140</b>	MONIT054	-
MONIT027	0,0074	MONIT055	0,0002
MONIT028	-	MONIT056	-

Nesta monitorização, amostras com quantidade de DNA igual ou superior a 0,01 ng/μL foram consideradas como tendo resultado positivo para a contaminação. Das 56 amostras quantificadas (Tabela 2), 7 (12,5%) tiveram resultado positivo e 49 (87,5%) tiveram resultado negativo para a contaminação, nas quais 11 (19,6%) não tiveram DNA detetável. A presença de quantidades detetáveis de DNA no *background* laboratorial está de acordo com o expectável [88,89].

Todas as amostras com resultado positivo correspondem a zonas de bancada onde as amostras não são diretamente manipuladas, estando sempre protegidas nos tubos fechados. A amostra MONIT012, que foi a que apresentou maior quantidade de DNA com 0,3812 ng/μL, é de uma zona da bancada onde não são manipuladas amostras utilizadas para determinar perfis genéticos de DNA. As restantes 6 amostras com resultado positivo correspondem a zonas de bancada onde as amostras manipuladas vão ser caracterizadas geneticamente. Contudo, todas estas 7 amostras são de locais onde acontecem as fases iniciais do processamento das amostras, apenas até à fase de extração do DNA.

Todas as amostras sem DNA detetável correspondem a equipamentos ou *DNA workstations*. Em 24 amostras de equipamentos laboratoriais obtiveram-se valores de quantificação compreendidos entre 0 e 0,0041 ng/μL de DNA e em 12 amostras de *DNA workstations* obtiveram-se valores de quantificação compreendidos entre 0 e 0,0027 ng/μL de DNA.

Estes resultados demonstram que existe um maior cuidado com a descontaminação e prevenção da contaminação dos locais onde existe uma manipulação direta das amostras, nomeadamente nas *DNA workstations* e nos equipamentos. Aliás, nas zonas onde as amostras manipuladas não vão ser caracterizadas geneticamente existe um descuido ainda maior do que nas outras zonas, como se vê pela diferença na quantidade de DNA detetado nas amostras MONIT012, 0,3812 ng/μL, e MONIT008, a que apresenta o segundo valor mais alto de contaminação 0,0451 ng/μL. Adicionalmente, mostra-se haver maior preocupação com a possibilidade de contaminação quando as amostras já se encontram na forma de DNA extraído, dado que a contaminação foi apenas detetada em locais utilizados até à fase de extração do DNA.

O Plano de Manutenção Preventiva Interna parece funcionar, uma vez que a aplicação deste, associado ao facto dos equipamentos e *DNA workstations* estarem sempre fechados quando não estão em utilização, resultar em níveis tão baixos de DNA prevalente que chegam a não ser detetáveis. Pelo contrário, as bancadas não estão incluídas neste Plano e estão sempre expostas ao ar. Assim, aparenta existir maior persistência de DNA em locais que estão sujeitos a menos manutenção, o que está de acordo com o já reportado para situações em que se o depósito de DNA não sofrer perturbações retém quantidade e

qualidade durante mais tempo [71,77], embora seja preciso ter em conta que estas situações dizem respeito a cenas de crimes.

O mecanismo pelo qual o DNA foi transferido para os locais onde foi colhido não se pode inferir pelas quantidades de DNA detetadas, de acordo com o estudo de Goray *et al* [23]. Como alternativa, pode olhar-se para as medidas de mitigação da contaminação adotadas no SGBF-C e tentar perceber quais as que poderão não estar a ser cumpridas e, conseqüentemente, potenciar a contaminação. Das medidas preventivas apresentadas anteriormente, as que poderão ter falhado são 1) a utilização do equipamento de proteção individual, do qual os colaboradores podem não ter feito um uso correto; 2) a descontaminação com luz *UV* antes e depois da realização de um procedimento laboratorial, que pode não ter sido por tempo suficiente; 3) a limpeza da área de trabalho com o descontaminante *DNA AWAY*, que pode não ter sido feita corretamente; e/ou 4) o material utilizado não estar esterilizado e livre de DNA. O insucesso 1 leva a que ocorra transferência de DNA por parte do indivíduo, por exemplo, devido a mexer com as luvas no cabelo ou na pele transpirada, atividades que favorecem a transferência de DNA [40, 49], e depois na superfície e o insucesso 4 também promove a transferência de DNA que possa estar no material laboratorial para as superfícies quando contata com elas. As falhas 2 e 3 favorecem a persistência do DNA nas superfícies, depois de este estar depositado.

Ainda assim, com estes resultados é difícil saber quais destas suposições serão acertadas. É necessário fazer a amplificação de todas as amostras que apresentaram resultado positivo para se obter perfis genéticos que permitam deduzir quais as possíveis fontes de contaminação, que mecanismos de transferência aconteceram e como foi afetada a persistência do DNA.

## **2. Caracterização genética das amostras dos locais contaminados**

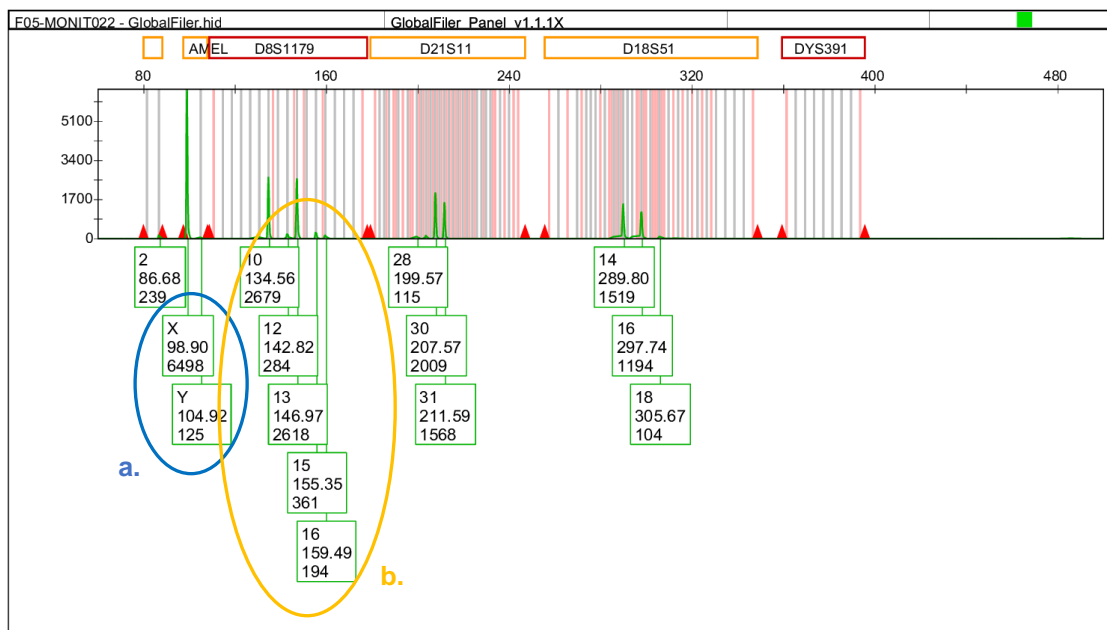
As 7 amostras que apresentaram resultado positivo para a contaminação foram amplificadas e sujeitas a eletroforese capilar, de forma a se obterem os seus perfis genéticos. Todos os controlos negativos e positivos realizados nestas etapas do processamento das amostras produziram resultados adequados.

Uma vez analisados e interpretados os 7 eletroferogramas das amostras amplificadas procedeu-se à classificação dos perfis (Tabela 3). Todos são perfis de mistura, dado que no mínimo todos os perfis tiveram 6 marcadores de STRs com mais de 2 alelos e um perfil singular só pode ter 1 ou 2 alelos por STR. Ainda assim, foi possível em 3 perfis identificar correspondência com 1 único indivíduo, com diferentes percentagens de identidade, e em 1 perfil fazer correspondência com 2 indivíduos, mais uma vez com diferentes percentagens de

identidade. Os restantes 3 perfis apresentaram misturas complexas e, por isso, não valorizáveis para a identificação genética de nenhum indivíduo em particular. A percentagem de identidade corresponde à quantidade de alelos do perfil de referência do indivíduo identificado que estão representados no perfil da amostra.

**Tabela 3.** Classificação dos perfis das amostras com resultado positivo para a contaminação e percentagem de identidade dos indivíduos com perfis identificados.

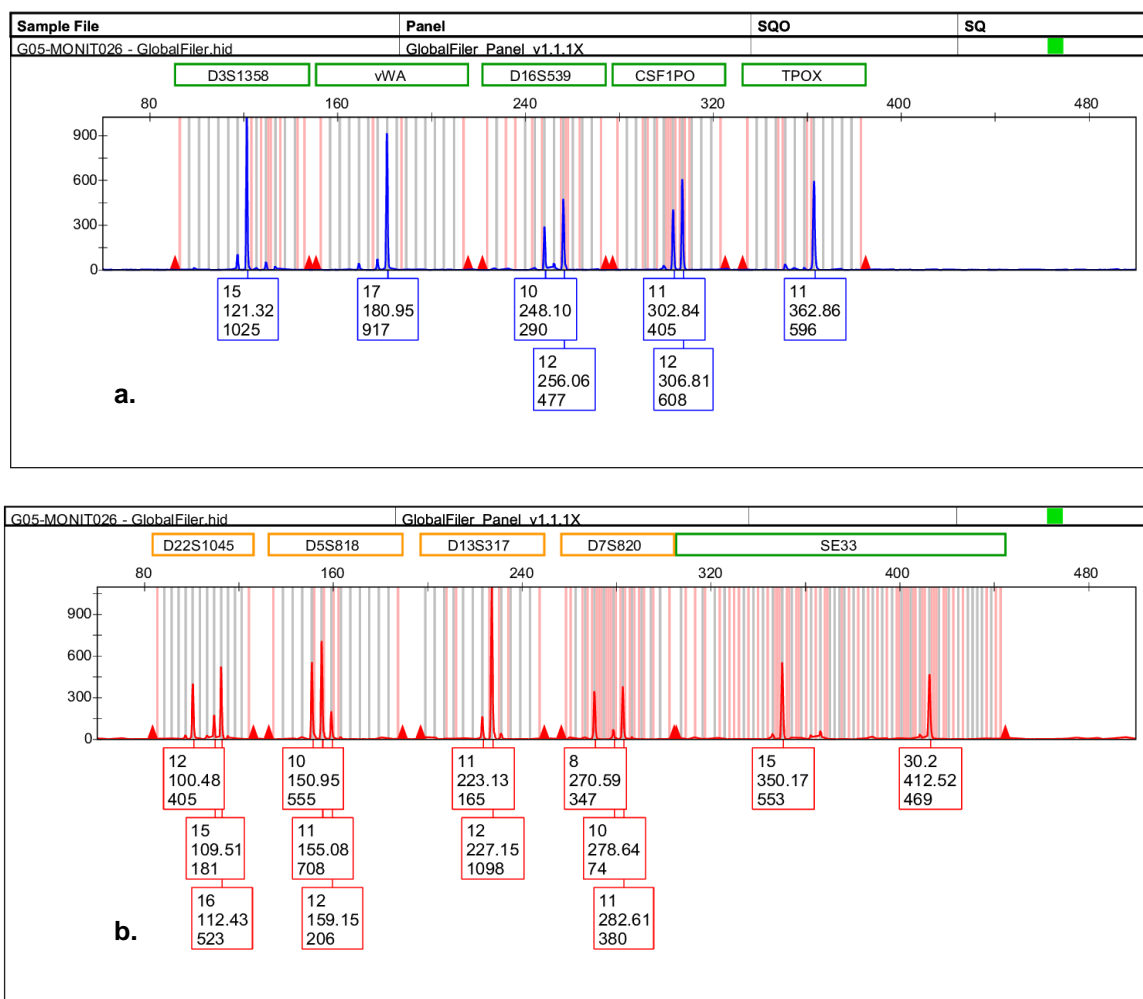
Amostra	Classificação do perfil	% identidade	
MONIT004	Mistura	Complexa	
MONIT007		Complexa	
MONIT008		Complexa	
MONIT012		Com 1 perfil identificado	100,0
MONIT021		Com 1 perfil identificado	81,1
MONIT022		Com 2 perfis identificados	94,2 e 100,0
MONIT026		Com 1 perfil identificado	100,0



**Figura 3.** Pormenor do eletroferograma da amostra MONIT022. Em evidência encontra-se: **a.** alelos sexuais e **b.** 5 Alelos do marcador D8S1179.

Na amostra MONIT022, onde se identificaram 2 indivíduos, existe ainda a presença de DNA proveniente de outros contribuintes, uma vez que um perfil genético com mistura de dois contribuintes terá no máximo 4 alelos por STR e neste perfil três STRs têm 5 ou 6 alelos (Figura 3b). Nesta amostra foi detetado DNA masculino (0,0015 ng/μL) e o cromossoma Y (Figura 3a), mas os 2 indivíduos identificados são do sexo feminino, logo faz sentido que exista mais algum contribuinte para o perfil e que este seja do sexo masculino.

Nos perfis das amostras MONIT012 (Apêndice I), MONIT021 e MONIT026, nos quais se identificou 1 indivíduo, tal foi possível porque em vários STRs o número de alelos detetados são compatíveis com um perfil singular (Figura 4a). Contudo, noutros STRs o número de alelos foi superior a dois e, assim, o perfil é de mistura (Figura 4b).



**Figura 4.** Pormenor do eletroferograma da amostra MONIT026 com **a.** um painel de marcadores STR compatível com um perfil singular e **b.** um painel de marcadores STR correspondente a um perfil de mistura.



Os perfis das amostras MONIT004 (Apêndice II), MONIT007 e MONIT008 foram consideradas misturas complexas, porque os seus perfis têm entre 2 e 7 alelos por STR. Isto faz com que muitos indivíduos possam ser representados pelo eletroferograma de cada amostra, mas torna impossível validar estes resultados por causa da elevada complexidade de interpretação.

O facto de nas misturas pouco complexas em que se conseguiram distinguir perfis valorizáveis, ter sido possível identificar realmente a quem pertenciam esses perfis e estes serem de colaboradores do SGBF-C foi positivo, posto que isso significa que se existisse contaminação das amostras da rotina laboratorial seria provável que esta fosse descoberta aquando da comparação com a base de dados dos perfis dos colaboradores e outras pessoas que frequentem o Serviço. Este resultado vem reforçar a importância da existência de base de dados desta natureza num laboratório forense.

Mais uma vez, não é possível inferir pela qualidade do perfil genético qual o mecanismo de transferência do DNA para os locais onde foi colhido, de acordo com os estudos referidos acima [51,69]. Porém, após a caracterização genética de cada amostra é possível tirar-se mais algumas conclusões em relação à origem do DNA e sua transferência nas amostras com perfis identificados (amostras em que se identificou 1 ou 2 indivíduos). Dado que todos os perfis identificados corresponderam ao componente maioritário da mistura e foram atribuídos a colaboradores do SGBF-C, pode dizer-se que a principal fonte de *background DNA* laboratorial são os colaboradores. No que respeita ao mecanismo de transferência, terá sido fundamentalmente transferência indireta, já que a utilização de luvas e bata descartável faz com que as mãos e roupa que poderão entrar em contato direto com a superfície e transferir DNA estejam protegidas, logo o que pode acontecer é uma transferência primária de DNA para a bata ou luvas (p. ex. ao tocar na pele) que é a seguir transferido de forma secundária para a superfície. Pode também ter acontecido de alguma forma transferência direta, por descuido do colaborador ou esquecimento da colocação do equipamento de proteção individual. A ocorrência de transferência por aerossol é muito pouco provável, visto que acontece essencialmente pela libertação de partículas pela boca ou nariz e atualmente é sempre obrigatório a utilização de máscara dentro das instalações do SGBF-C, independentemente de se estar a realizar algum procedimento laboratorial ou não. As células da pele libertadas para o ar terão também apenas uma contribuição reduzida, enquanto transferência por aerossol, para o DNA detetado, já que a roupa de proteção individual cobre a maioria da pele exposta que poderia libertar células.

Relativamente às amostras com misturas complexas, esta complexidade de mistura de DNA sem nenhum perfil maioritário indica que será já de algum acumular de DNA ao longo do tempo, e, portanto, impossível perceber qual o tipo de transferência de DNA da qual resultou. Estas 3 amostras revelam um problema maior do que as outras na contaminação laboratorial,

porque se o *background DNA* detetado nestas misturas complexas contaminar amostras da rotina laboratorial pode acontecer que o perfil de interesse fique completamente mascarado por estes contaminantes. Contudo, se a amostra da rotina em análise tiver uma quantidade muito elevada de DNA, pode dar-se uma amplificação preferencial do DNA da amostra e, desta forma, o DNA alvo é detetado e o DNA contaminante desaparece do perfil.

Com estes resultados ficou a perceber-se melhor quais as fontes de contaminação, mas é importante compreender se uma descontaminação correta pode de facto eliminar DNA prevalente em superfícies. Para além disso, é importante que a contaminação detetada seja eliminada e, por isso, procedeu-se à descontaminação dos locais que apresentaram contaminação.

### 3. Determinação da quantidade de *background DNA* laboratorial após descontaminação

Os locais referentes às amostras com resultado positivo para a contaminação foram descontaminados com *DNA AWAY* e foram novamente colhidas amostras, das quais se extraiu e quantificou o DNA. Todos os controlos negativos e positivos realizados nestas etapas, assim como o controlo interno da amplificação (IPC), produziram resultados adequados.

**Tabela 4.** Valores da quantificação de DNA, em ng/μL, nas amostras com resultado positivo para a contaminação, inicialmente e após a descontaminação, e percentagem de redução da quantidade de DNA.

Amostra	Quantidade de DNA (ng/μl)		% redução
	Inicial	Após descontaminação	
MONIT004	0,0246	-	100,0
MONIT007	0,0273	0,0006	97,9
MONIT008	0,0451	0,0017	96,3
MONIT012	0,3812	0,0001	99,9
MONIT021	0,0170	-	100,0
MONIT022	0,0329	0,0002	99,4
MONIT026	0,0140	0,0006	96,0

Foi quantificado o DNA de 7 amostras (Tabela 4) e todas (100%) obtiveram resultado negativo para a contaminação (quantidade de DNA inferior a 0,01 ng/μL), das quais 2 (28,6%) não tiveram DNA detetável. Comparando os valores da quantidade de DNA detetado inicialmente e os valores depois da ação corretiva de descontaminação, percebe-se que existiu uma redução entre 96,0 % e 100,0 % na quantidade de DNA detetado. Como todas as amostras tiveram resultado negativo considerou-se o Laboratório como descontaminado e não se procedeu a mais ampliações e determinações de perfis.

Estes resultados mostram que uma limpeza correta com o descontaminante *DNA AWAY* efetivamente elimina praticamente todo ou mesmo todo o *background DNA*, funcionando igualmente bem independentemente da quantidade inicial de DNA, sendo que o DNA detetado após a descontaminação não atinge valores altos o suficiente para se considerar existir contaminação. Logo, uma descontaminação adequada das superfícies diminui drasticamente a persistência do DNA.

Posto tudo isto, conclui-se que as principais razões para a existência de *background DNA* laboratorial, e consequente contaminação do SGBF-C, são a transferência de DNA por parte dos próprios colaboradores e uma descontaminação incorreta das superfícies.

Todavia, à luz do conhecimento atual, os procedimentos preventivos da contaminação adotados no SGBF-C são eficazes, não sendo necessárias mais medidas, visto que ao executar as medidas já existentes de maneira apropriada não existiu contaminação das amostras (como provado pelos resultados apropriados nos controlos negativos de todas as etapas de processamento das amostras) e eliminou-se o *background DNA* que poderia vir a contaminar as amostras da rotina laboratorial. O que é preciso é respeitar estas medidas e executá-las de forma adequada, com redobrada atenção para as medidas já existentes que estão a falhar. Ou seja, no futuro deve ter-se especial cuidado quando se utiliza equipamento de proteção individual, utilizando-o adequadamente e mudá-lo frequentemente, para não fazer deste um vetor de transferência indireta, e fazer sempre uma descontaminação correta dos equipamentos e superfícies, quer com a luz *UV* quer com o *DNA AWAY*, para que o DNA não persista nas superfícies caso seja depositado.

O continuo avanço da ciência e tecnologia leva a que apareçam metodologias de análise de DNA cada vez mais sensíveis e discriminadoras. Logo, o problema da deteção da contaminação vai agravar-se no futuro.

Assim, é essencial continuar a estudar a relação entre a quantidade de DNA e qualidade do perfil genético com o mecanismo de transferência, para que seja possível atribuir inequivocamente quais as fontes da contaminação laboratorial, de forma a desenvolver novas e melhores medidas de mitigação da contaminação. Para isso, é ainda fundamental ganhar-se conhecimento sobre a origem do material biológico presente nas amostras de *trace DNA*,

sobretudo quando existem misturas, o que implica o desenvolvimento de técnicas que permitam adquirir esta informação sem destruir ou esgotar o material genético presente na amostra. A elaboração de métodos de interpretação de misturas complexas também seria importante para que se distinguíssem todos os contribuintes de DNA para um perfil genético e qual a contribuição relativa de cada um.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliou-se a contaminação existente no SGBF-C, através da quantificação dos níveis de *background DNA* presentes no Laboratório e caracterização genética das amostras dos locais contaminados.

Considerando os resultados da quantificação do DNA, confirmou-se a existência de contaminação laboratorial em 12,5% das amostras analisadas. A localização e tipo de superfícies de onde estas amostras com elevado nível de *background DNA* foram colhidas revelou existir maior preocupação com a prevenção da contaminação e a descontaminação nos locais onde as amostras são manipuladas diretamente e, particularmente, após o DNA ter sido extraído. Isto mostrou ainda que o DNA tem maior persistência em locais que estão sujeitos a menos manutenção.

Em relação aos perfis genéticos obtidos, todos apresentaram misturas de DNA de diversos contribuintes. Identificaram-se colaboradores do SGBF-C como sendo os contribuintes para as misturas pouco complexas, as únicas possíveis de analisar. Assim, concluiu-se que a principal fonte de contaminação no Serviço são os colaboradores, que transferem o seu próprio DNA direta ou indiretamente para as superfícies.

A descontaminação com *DNA AWAY* permitiu perceber que uma descontaminação adequada das superfícies impede a persistência do DNA e elimina quase completamente o *background DNA* existente, para níveis não preocupantes.

Logo, as causas fundamentais para a existência de *background DNA* laboratorial, e, portanto, contaminação no SGBF-C, são a transferência de DNA por parte dos próprios colaboradores e uma descontaminação desadequada das superfícies.

Todos estes resultados sugerem que as medidas implementadas no SGBF-C para a mitigação da contaminação são eficazes, desde que corretamente aplicadas, viabilizando a eliminação da contaminação.

No futuro, para que o combate à contaminação laboratorial seja mais eficiente, são necessários mais estudos que permitam atribuir mecanismos de transferência e origem do material biológico a amostras de *trace DNA*, assim como metodologias que permitam analisar perfis de misturas de DNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gill, P., Jeffreys, A.J., and Werrett, D.J. (1985) Forensic application of DNA 'fingerprints.' *Nature*, **318**, 577–579.
2. Butler, J.M. (2010) *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, 1ª Edição. Academic Press/Elsevier.
3. Lehmann, V.J., Mitchell, R.J., Ballantyne, K.N., and Van Oorschot, R.A.H. (2015) Following the transfer of DNA: How does the presence of background DNA affect the transfer and detection of a target source of DNA? *Forensic Sci. Int. Genet.*, **19**, 68–75.
4. Gill, P. (2014) *Misleading DNA Evidence: Reasons for Miscarriages of Justice*, 1ª Edição. Academic Press/Elsevier.
5. Goodwin, W., Linacre, A., and Hadi, S. (2011) *An Introduction to Forensic Genetics*, 2ª Edição. Wiley-Blackwell.
6. van Oorschot, R.A.H., Ballantyne, K.N., and Mitchell, R.J. (2010) Forensic trace DNA: A review. *Investig. Genet.*, **1** (1), 14.
7. Burrill, J., Daniel, B., and Frascione, N. (2019) A review of trace “Touch DNA” deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **39** (November 2018), 8–18.
8. Balding, D.J., and Buckleton, J. (2009) Interpreting low template DNA profiles. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **4** (1), 1–10.
9. Gill, P. (2001) Application of low copy number DNA profiling. *Croat. Med. J.*, **42** (3), 229–232.
10. van Oorschot, R.A.H., Szkuta, B., Meakin, G.E., Kokshoorn, B., and Goray, M. (2019) DNA transfer in forensic science: A review. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **38**, 140–166.
11. Meakin, G., and Jamieson, A. (2013) DNA transfer: Review and implications for casework. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **7** (4), 434–443.
12. Taroni, F., Biedermann, A., Vuille, J., and Morling, N. (2013) Whose DNA is this? How relevant a question? (a note for forensic scientists). *Forensic Sci. Int. Genet.*, **7** (4), 467–470.
13. Port, N.J., Bowyer, V.L., Graham, E.A.M., Batuwangala, M.S., and Rutty, G.N. (2005) How long does it take a static speaking individual to contaminate the immediate environment? *Forensic Sci. Med. Path.*, **2**, 157–164.
14. Rutty, G.N., Hopwood, A., and Tucker, V. (2003) The effectiveness of protective

- clothing in the reduction of potential DNA contamination of the scene of crime. *Int. J. Legal Med.*, **117**, 170–174.
15. Finnebraaten, M., Granér, T., and Hoff-Olsen, P. (2008) May a speaking individual contaminate the routine DNA laboratory? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **1**, 421–422.
  16. Goray, M., van Oorschot, R., and Mitchell, J. (2012) DNA transfer within forensic exhibit packaging: potential for DNA loss and relocation. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **6**, 158–166.
  17. Szkuta, B., Ballantyne, K.N.K.N., Oorschot, R.A.H. van, and Van Oorschot, R.A.H. (2017) Transfer and persistence of DNA on the hands and the influence of activities performed. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **28**, 10–20.
  18. Szkuta, B., Ballantyne, K.N., Kokshoorn, B., and Oorschot, R.A.H. van (2018) Transfer and persistence of non-self DNA on hands over time: using empirical data to evaluate DNA evidence given activity level propositions. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **33**, 84–97.
  19. Oorschot, R. Van, and Jones, M.K. (1997) DNA fingerprints from fingerprints. *Nature*, **387**, 767.
  20. Lehmann, V.J., Mitchell, R.J., Ballantyne, K.N., and Oorschot, R.A.H. van (2013) Following the transfer of DNA: how far can it go? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **4** (1), e53–e54.
  21. Goray, M., Mitchell, R.J., and Oorschot, R.A.H. van (2010) Investigation of secondary DNA transfer of skin cells under controlled test conditions. *Leg. Med.*, **12** (3), 117–120.
  22. Goray, M., Eken, E., Mitchell, R.J., and Oorschot, R.A.H. van (2010) Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **4** (2), 62–67.
  23. Goray, M., Mitchell, R.J., and Oorschot, R.A.H. van (2012) Evaluation of multiple transfer of DNA using mock case scenarios. *Leg. Med.*, **14** (1), 40–46.
  24. Buckingham, A.K., Harvey, M.L., and Oorschot, R.A.H. van (2016) The origin of unknown source DNA from touched objects. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **25**, 26–33.
  25. Goray, M., and Van Oorschot, R.A.H. (2015) The complexities of DNA transfer during a social setting. *Leg. Med.*, **17** (2), 82–91.
  26. Cale, C.M., Earll, M.E., Latham, K.E., and Bush, G.L. (2016) Could secondary DNA transfer falsely place someone at the scene of a crime? *J. Forensic Sci.*, **61** (1), 196–203.

27. Meakin, G.E., Butcher, E. V., van Oorschot, R.A.H., and Morgan, R.M. (2017) Trace DNA evidence dynamics: An investigation into the deposition and persistence of directly- and indirectly-transferred DNA on regularly-used knives. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **29**, 38–47.
28. Voskoboinik, L., Amiel, M., Reshef, A., Gafny, R., and Barash, M. (2018) Laundry in a washing machine as a mediator of secondary and tertiary DNA transfer. *Int. J. Legal Med.*, **132** (2), 373–378.
29. Fonnøløp, A.E., Ramse, M., Egeland, T., and Gill, P. (2017) The implications of shedder status and background DNA on direct and secondary transfer in an attack scenario. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **29**, 48–60.
30. Szkuta, B., Harvey, M.L., Ballantyne, K.N., and Van Oorschot, R.A.H. (2015) DNA transfer by examination tools - A risk for forensic casework? *Forensic Sci. Int. Genet.*, **16**, 246–254.
31. Fonnøløp, A.E., Johannessen, H., Egeland, T., and Gill, P. (2016) Contamination during criminal investigation: Detecting police contamination and secondary DNA transfer from evidence bags. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **23**, 121–129.
32. Gosch, A., and Courts, C. (2019) On DNA transfer: The lack and difficulty of systematic research and how to do it better. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **40**, 24–36.
33. Sun, F., and Reichenberger, E.J. (2014) Saliva as a source of genomic DNA for genetic studies: review of current methods and applications. *Oral Heal. Dent. Manag.*, **13** (2), 217–222.
34. Balogh, M.K., Burger, J., Bender, K.S., Schneider, P.M., and Alt, K.W. (2003) Fingerprints from fingerprints. *Int. Congr. Ser.*, **1239**, 953–957.
35. Stanciu, C.E., Philpott, M.K., Kwon, Y.J., Bustamante, E.E., and Ehrhardt, C.J. (2015) Optical characterization of epidermal cells and their relationship to DNA recovery from touch samples. *F1000Research*, **4**.
36. Kita, T., Yamaguchi, H., Yokoyama, M., and Tanaka, T. (2008) Morphological study of fragmented DNA on touched objects. *Forensic Sci. Int.*, **3**, 32–36.
37. Alessandrini, F., Cecati, M., Pesaresi, M., Turchi, C., Carle, F., and Tagliabracci, A. (2003) Fingerprints as evidence for a genetic profile: morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing. *J. For. Sci.*, **48** (3), 586–592.
38. Zoppis, S., Muciaccia, B., D'Alessio, A., Ziparo, E., Vecchiotti, C., and Filippini, A. (2014) DNA fingerprinting secondary transfer from different skin areas: morphological and genetic studies. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **11**, 137–143.



39. Quinones, I., and Daniel, B. (2012) Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **6** (1), 26–30.
40. Berge, M. van den, Ozcanhan, G., Zijlstra, S., Lindenberg, A., and Sijen, T. (2016) Prevalence of human cell material: DNA and RNA profiling of public and private objects and after activity scenarios. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **21**, 81–89.
41. Oleiwi, A.A., Morris, M.R., Schmerer, W.M., and Sutton, R. (2015) The relative DNA-shedding propensity of the palm and finger surfaces. *Sci. Justice*, **55** (5), 329–334.
42. Bright, J.A., and Petricevic, S.F. (2004) Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Sci. Int.*, **145** (1), 7–12.
43. Warshauer, D.H., Marshall, P., Kelley, S., King, J., and Budowle, B. (2012) An evaluation of the transfer of saliva-derived DNA. *Int. J. Leg. Med.*, **126** (6), 851–861.
44. Oorschot, R.A.H. van, McArdle, R., Goodwin, W.H., and Ballantyne, K.N. (2014) DNA transfer: the role of temperature and drying time. *Leg. Med.*, **16** (3), 161–163.
45. Laan, N., Smith, F., Nicloux, C., and Brutin, D. (2016) Morphology of drying blood pools. *Forensic Sci. Int.*, **267**, 104–109.
46. Ramsthaler, F., Schmidt, P., Bux, R., Potente, S., Kaiser, C., and Kettner, M. (2012) Drying properties of bloodstains on common indoor surfaces. *Int. J. Leg. Med.*, **126** (5), 739–746.
47. Oorschot, R.A.H. van, Glavich, G., and Mitchell, R.J. (2014) Persistence of DNA deposited by the original user on objects after subsequent use by a second person. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **8** (1), 219–225.
48. Poetsch, M., Bajanowski, T., and Kamphausen, T. (2013) Influence of an individual's age on the amount and interpretability of DNA left on touched items. *Int. J. Leg. Med.*, **127** (6), 1093–1096.
49. Lacerenza, D., Aneli, S., Omedei, M., Gino, S., Pasino, S., Berchiolla, P., and Robino, C. (2016) A molecular exploration of human DNA/RNA co-extracted from the palmar surface of the hands and fingers. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **22**, 44–53.
50. Kamphausen, T., Schadendorf, D., Wurmb-Schwark, N. von, Bajanowski, T., and Poetsch, M. (2012) Good shedder or bad shedder—the influence of skin diseases on forensic DNA analysis from epithelial abrasions. *Int. J. Leg. Med.*, **126** (1), 179–183.
51. Lowe, A., Murray, C., Whitaker, J., Tully, G., and Gill, P. (2002) The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals

- to inert surfaces. *Forensic Sci. Int.*, **129** (1), 25–34.
52. Goray, M., Fowler, S., Szkuta, B., and Oorschot, R. van (2016) Shedder status-An analysis of self and non-self DNA in multiple handprints deposited by the same individuals over time. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **23**, 190–196.
  53. Oorschot, R.A.H. van, McColl, D.L., Alderton, J.E., Harvey, M.L., Mitchell, R.J., and Szkuta, B. (2015) Activities between activities of focus - relevant when assessing DNA transfer probabilities. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **5**, e75–e77.
  54. Polley, D., Mickiewicz, P., Vaughn, M., Miller, T., Warburton, R., Komonski, D., Kantautas, C., Reid, B., Frappier, R., and Newman, J. (2006) Investigation of DNA recovery from firearms and cartridge cases. *Can. Soc. For. Sci. J.*, **39** (4), 1–12.
  55. Bowman, Z.E., Mosse, K.S.A., Sungaila, A.M., Oorschot, R.A.H. van, and Hartman, D. (2018) Detection of offender DNA following skin-to-skin contact with a victim. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **37**, 252–259.
  56. Fonnelløp, A.E., Egeland, T., and Gill, P. (2015) Secondary and subsequent DNA transfer during criminal investigation. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **17**, 155–162.
  57. Pfeifer, C.M., and Wiegand, P. (2017) Persistence of touch DNA on burglary-related tools. *Int. J. Leg. Med.*, **131** (4), 941–953.
  58. Tobias, S.H.A., Jacques, G.S., Morgan, R.M., and Meakin, G.E. (2017) The effect of pressure on DNA deposition by touch. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **6**, e12–e14.
  59. Wiegand, P., Bajanowski, T., and Brinkmann, B. (1993) DNA typing of debris from fingernails. *Int. J. Leg. Med.*, **106** (2), 81–83.
  60. Dziak, R., Peneder, A., Buetter, A., and Hageman, C. (2018) Trace DNA sampling success from evidence items commonly encountered in forensic casework. *J. For. Sci.*, **63** (3), 835–841.
  61. Tsai, L.C., Lee, J.C., Lin, Y., Lai, P.-Y., and Hsieh, H.-M. (2010) STR genotyping of skin residues inside gloves. *Forensic Sci. J.*, **9** (1), 1–8.
  62. Oldoni, F., Castella, V., and Hall, D. (2016) Shedding light on the relative DNA contribution of two persons handling the same object. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **24**, 148–157.
  63. Poetsch, M., Pfeifer, M., Konrad, H., Bajanowski, T., and Helmus, J. (2018) Impact of several wearers on the persistence of DNA on clothes-a study with experimental scenarios. *Int. J. Leg. Med.*, **131** (1), 117–123.
  64. Daly, D.J., Murphy, C., and McDermott, S.D. (2012) The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **6**, 41–46.

65. Sewell, J., Quinones, I., Ames, C., Multaney, B., Curtis, S., Seeboruth, H., Moore, S., and Daniel, B. (2008) Recovery of DNA and fingerprints from touched documents. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **2**, 281–285.
66. Raymond, J.J., Walsh, S.J., van Oorschot, R.A.H., Gunn, P.R., Evans, L., and Roux, C. (2008) Assessing trace DNA evidence from a residential burglary: Abundance, transfer and persistence. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **1** (1), 442–443.
67. Ladd, C., Adamowicz, M.S., Bourke, M.T., Scherezinger, C.A., and Lee, H.C. (1999) A systematic analysis of secondary DNA transfer. *J. Forensic Sci.*, **44** (6), 1270–1272.
68. Petricevic, S.F., Bright, J.-A., and Cockerton, S.L. (2006) DNA profiling of trace DNA recovered from bedding. *Forensic Sci. Int.*, **159**, 21–26.
69. Farmen, R.K., Jaghø, R., Cortez, P., and Frøyland, E.S. (2008) Assessment of individual shedder status and implication for secondary DNA transfer. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **1**, 415–417.
70. Dissing, J., Sondervang, A., and Lund, S. (2010) Exploring the limits for the survival of DNA in blood stains. *J. Forensic Leg. Med.*, **17** (7), 392–396.
71. Raymond, J.J., Oorschot, R.A.H. van, Gunn, P.R., Walsh, S., and Roux, C. (2009) Trace evidence characteristics of DNA: a preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **4**, 26–33.
72. Harteveld, J., Lindenbergh, A., and Sijen, T. (2013) RNA cell typing and DNA profiling of mixed samples: Can cell types and donors be associated? *Sci. Justice*, **53** (3), 261–269.
73. Hall, A., and Ballantyne, J. (2004) Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications. *Anal. Bioanal. Chem.*, **380** (1), 72–83.
74. Mcleish, K., Ferguson, S., Gannicliffe, C., Campbell, S., Thomson, P.I.T., and Webster, L.M.I. (2018) Profiling in wildlife crime: recovery of human DNA deposited outside. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **35**, 65–69.
75. Helmus, J., Zorell, S., Bajanowski, T., and Poetsch, M. (2018) Persistence of DNA on clothes after exposure to water for different time periods—a study on bathtub, pond, and river. *Int. J. Leg. Med.*, **132** (1), 99–106.
76. Frippiat, C., Gastaldi, A., and Grunderbeeck, S. van (2017) Persistence of immersed blood and hair DNA: a preliminary study based on casework. *J. Forensic Leg. Med.*, **51**, 1–8.
77. Raymond, J.J., Oorschot, R.A.H. van, Walsh, S.J., Roux, C., and Gunn, P.R.

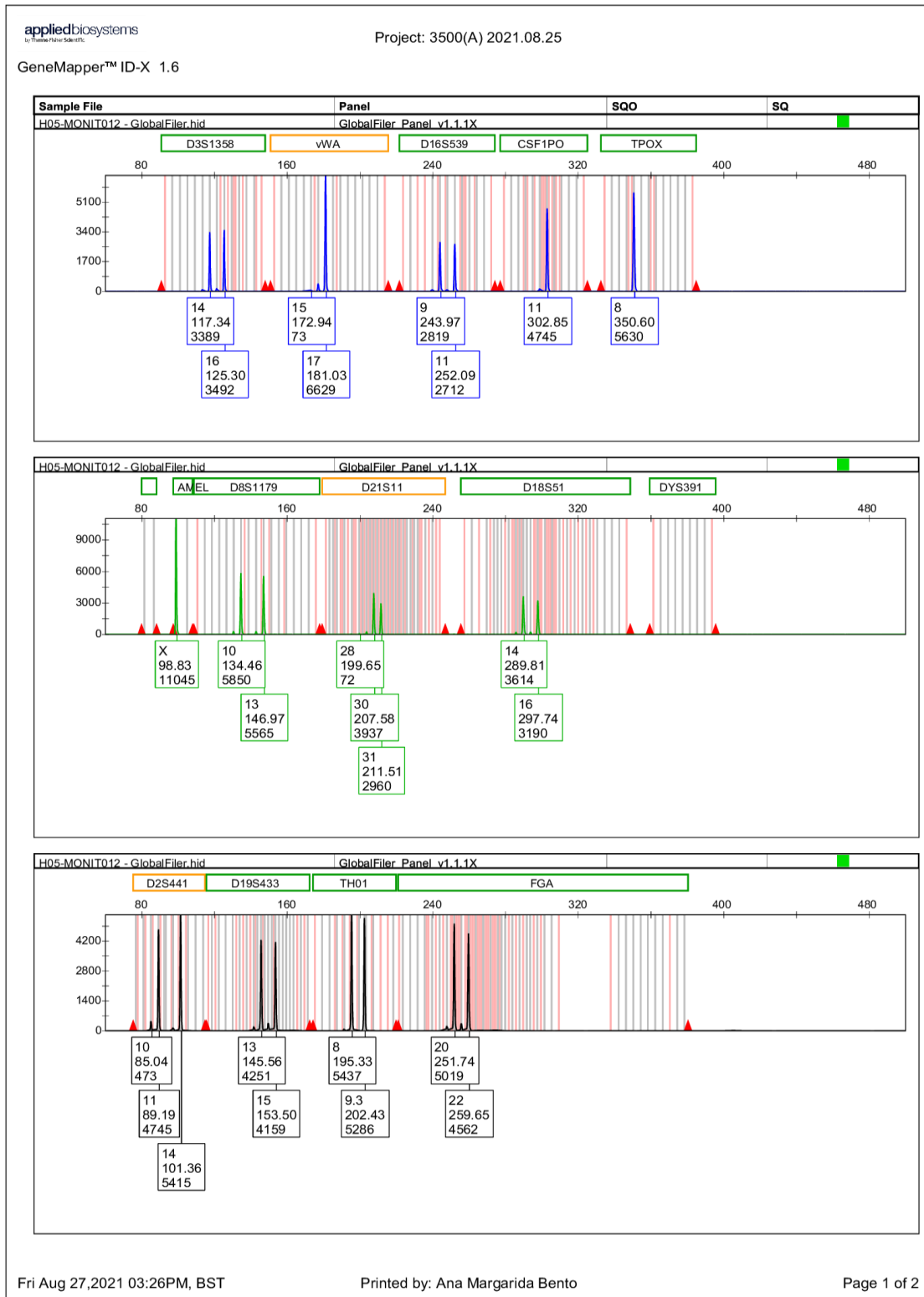
- (2009) Trace DNA and street robbery: a criminalistic approach to DNA evidence. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **2** (1), 544–546.
78. Oldoni, F., Castella, V., and Hall, D. (2015) Exploring the relative DNA contribution of first and second object's users on mock touch DNA mixtures. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **5**, e300–e301.
  79. Balogh, M.K., Burger, J., Bender, K., Schneider, P.M., and Alt, K.W. (2003) STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Sci. Int.*, **137** (2–3), 188–195.
  80. Schneider, H., Sommerer, T., Rand, S., and Wiegand, P. (2011) Hot flakes in cold cases. *Int. J. Leg. Med.*, **125** (4), 543–548.
  81. Oorschot, R.A.H. van, Szkuta, B., Verdon, T.J., Mitchell, R.J., and Ballantyne, K.N. (2016) Trace DNA profiling in missing persons investigations, in *Handbook of Missing Persons* (eds. Morewitz, S.J., and Colls, C.S.), Springer International Publishing, pp. 353–363.
  82. Toothman, M.H., Kester, K.M., Champagne, J., Cruz, T.D., IV, W.S.S., and Brown, B.L. (2008) Characterization of human DNA in environmental samples. *Forensic Sci. Int.*, **178** (1), 7–15.
  83. Breathnach, M., Williams, L., McKenna, L., and Moore, E. (2016) Probability of detection of DNA deposited by habitual wearer and/or the second individual who touched the garment. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **20**, 53–60.
  84. Noël, S., Lagacé, K., Rogic, A., Granger, D., Bourgoin, S., Jolicoeur, C., and Séguin, D. (2016) DNA transfer during laundering may yield complete genetic profiles. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **23**, 240–247.
  85. Fonnæløp, A.E., Johannessen, H., and Gill, P. (2015) Persistence and secondary transfer of DNA from previous users of equipment. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **5**, e191–e192.
  86. Schwark, T., Poetsch, M., Preusse-Prange, A., Kamphausen, T., and Wurmb-Schwark, N. von (2012) Phantoms in the mortuary—DNA transfer during autopsies. *Forensic Sci. Int.*, **216** (1–3), 121–126.
  87. Cook, O., and Dixon, L. (2007) The prevalence of mixed DNA profiles in fingernail samples taken from individuals in the general population. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **1** (1), 62–68.
  88. Ballantyne, K.N., Poy, A.L., and Oorschot, R.A. van (2013) Environmental DNA monitoring: beware of the transition to more sensitive typing methodologies. *Aust. J. Forensic Sci.*, **45** (3), 323–340.

89. Taylor, D., Abarno, D., Rowe, E., and Rask-Nielsen, L. (2016) Observations of DNA transfer within an operational forensic biology laboratory. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **23**, 33–49.
90. Poy, A., and Oorschot, R.A.H. van (2006) Beware; gloves and equipment used during the examination of exhibits are potential vectors for transfer of DNA-containing material. *Int. Congr. Ser.*, **1288** (April), 556–558.
91. Rutty, G.N., Watson, S., and Davison, J. (2000) DNA contamination of mortuary instruments and work surfaces: a significant problem in forensic practice? *Int. J. Leg. Med.*, **114** (1–2), 56–60.
92. AL, P., and RA, van O. (2006) Trace DNA Presence, Origin, and Transfer within a Forensic Biology Laboratory and its Potential Effect on Casework. *J. Forensic Identif.*, **56**, 558–576.
93. Daniel, R., and Oorschot, R.A. van (2011) An investigation of the presence of DNA on unused laboratory gloves. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **3** (1), e45–e46.
94. Gill, P., Rowlands, D., Tully, G., Bastisch, I., Staples, T., and Scott, P. (2010) Manufacturer contamination of disposable plastic-ware and other reagents—An agreed position statement by ENFSI, SWGDAM and BSAG. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **4** (4), 269–270.
95. Sullivan, K., Johnson, P., Rowlands, D., and Allen, H. (2004) New developments and challenges in the use of the UK DNA database: addressing the issue of contaminated consumables. *Forensic Sci. Int.*, **146** (Suppl), S175–S176.
96. Vincente, F.H.R. (2010) Inquiry into the circumstances that led to the conviction of Mr Farah Abdulkadir Jama.
97. Paterson, T. (2009) DNA Blunder Creates Phantom Serial Killer. Disponível em: [www.independent.co.uk/news/world/europe/dna-blunder-creates-phantom-serial-killer-1655375.html](http://www.independent.co.uk/news/world/europe/dna-blunder-creates-phantom-serial-killer-1655375.html). (Acedido: 03-Out-2021)
98. Vandewoestyne, M., Hoofstat, D. Van, Groote, S. De, Thuyne, N. Van, Haerinck, S., Nieuwerburgh, F. Van, and Deforce, D. (2011) Sources of DNA Contamination and Decontamination Procedures in the Forensic Laboratory. *J. Forensic Res.*, **s2** (01), 2–4.
99. Oorschot, R.A.H. van, Found, B., and Ballantyne, K.N. (2015) Considerations relating to the components of a laboratory DNA contamination minimisation monitoring (DCMM) Program. *Forensic Sci. Policy Manag.*, **6** (3–4), 91–105.
100. Lapointe, M., Rogic, A., Bourgoin, S., Jolicoeur, C., and Séguin, D. (2015) Leading-edge forensic DNA analyses and the necessity of including crime scene

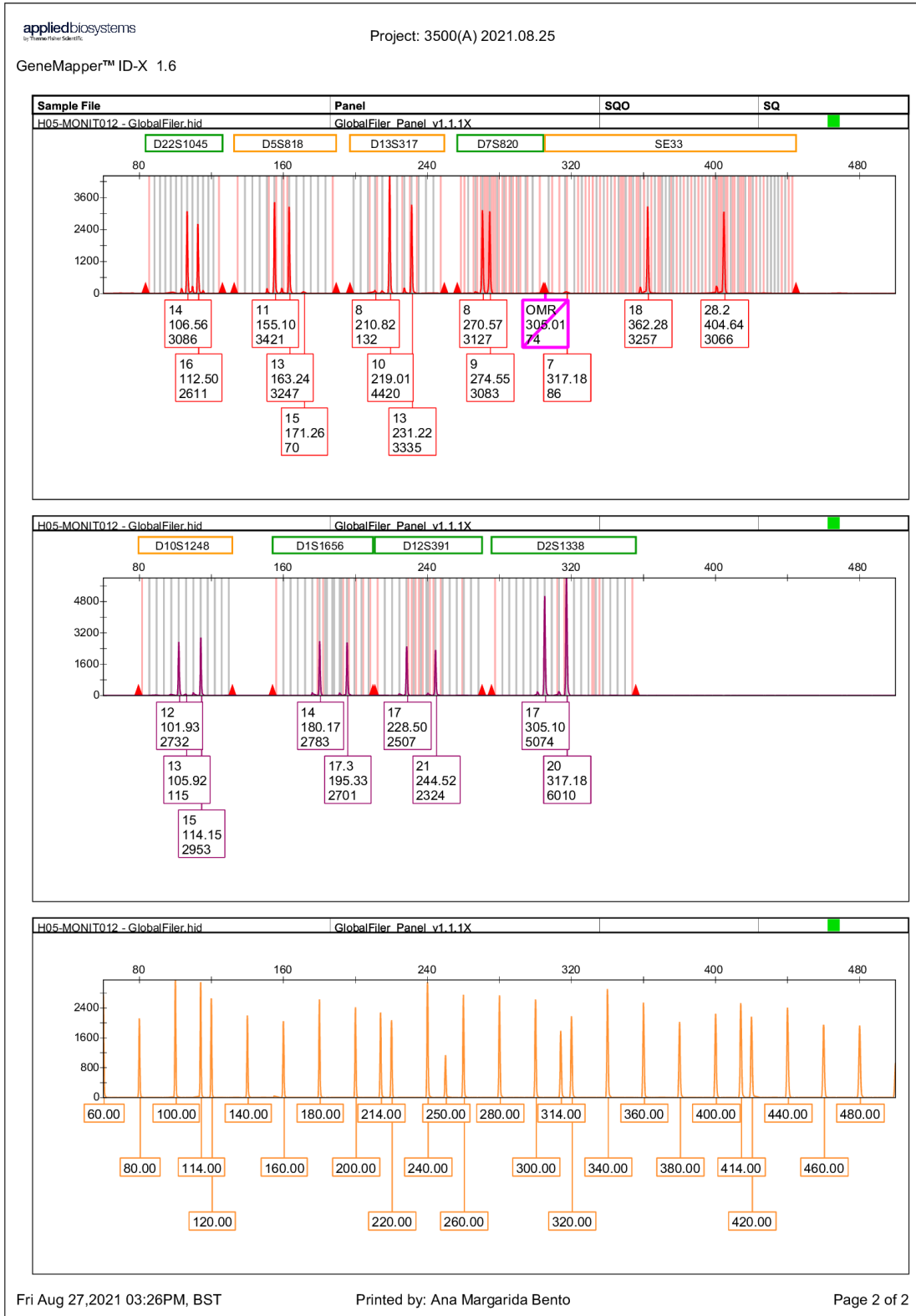
- investigators, police officers and technicians in a DNA elimination database. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **19**, 50–55.
101. Ansell, R. (2013) Internal quality control in forensic DNA analysis. *Accredit. Qual. Assur.*, **18** (4), 279–289.
  102. SGBF-C do INMLCF – Procedimento Operacional: Monitorização da contaminação (PO-SGBF-C-011). Coimbra, Portugal: 2018.
  103. DNA Purification. Disponível em: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>. (Acedido: 01-Out-2021)
  104. Butler, J.M. (2011) *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, 1ª Edição. Academic Press.
  105. Pinheiro, M. de F.T. (2010) *Genética Forense*, 1ª Edição. Edições Universidade Fernando Pessoa.
  106. APPLIED BIOSYSTEMS® – User Guide: PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits. Waltham, Massachusetts, USA: 2010.
  107. SGBF-C do INMLCF – Instrução Técnica: Extração de ADN de amostras problema de sangue, saliva, sémen e/ou outros fluidos biológicos não determinados (mancha e/ou zaragatoa) – AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (IT-SGBF-C-014). Coimbra, Portugal: 2020.
  108. APPLIED BIOSYSTEMS® – User Guide: Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits. Waltham, Massachusetts, USA: 2017.
  109. SGBF-C DO INMLCF – Instrução Técnica: Preparação de amostras para quantificação em tempo real (IT-SGBF-C-015). Coimbra, Portugal: 2020.
  110. APPLIED BIOSYSTEMS® – User Guide: GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit. Waltham, Massachusetts, USA: 2016.
  111. SGBF-C DO INMLCF – Procedimento Operacional: Amplificação de ADN por PCR com GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (PO-SGBF-C-012). Coimbra, Portugal: 2020.
  112. SGBF-C DO INMLCF – Instrução Técnica: Preparação de amostras para aplicação no sequenciador automático 3500 Genetic Analyser (IT-SGBF-C-005). Coimbra, Portugal: 2020.
  113. SGBF-C DO INMLCF – Relatório de Validação: Validação de perfis genéticos (RVSGBF-C-006). Coimbra, Portugal: 2019.

# APÊNDICES

**Apêndice I** – Eletroferograma obtido para a amostra MONIT012. O pico considerado artefacto (OMR – *outsider marker range*) encontra-se traçado.

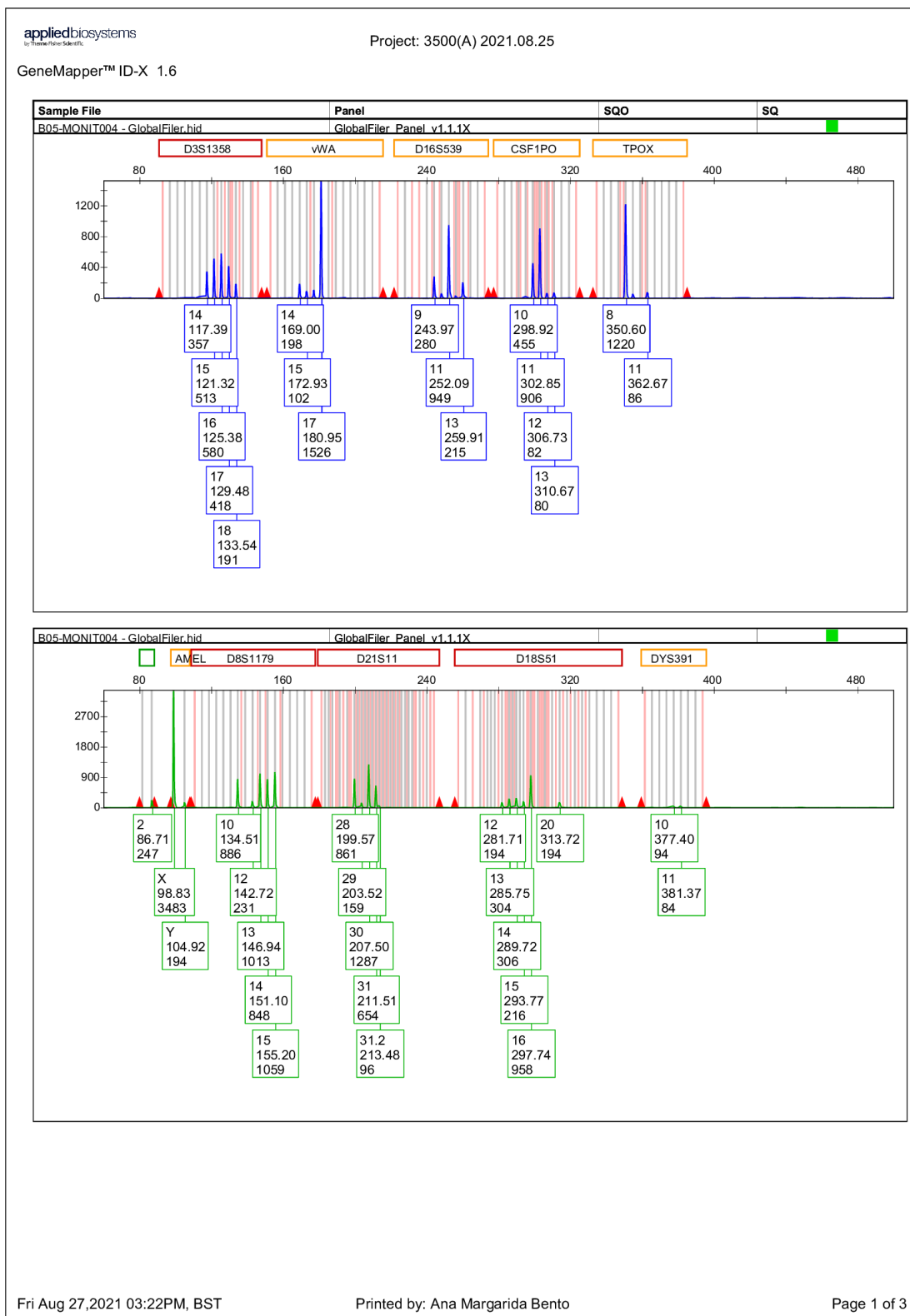


(continuação do Apêndice I)

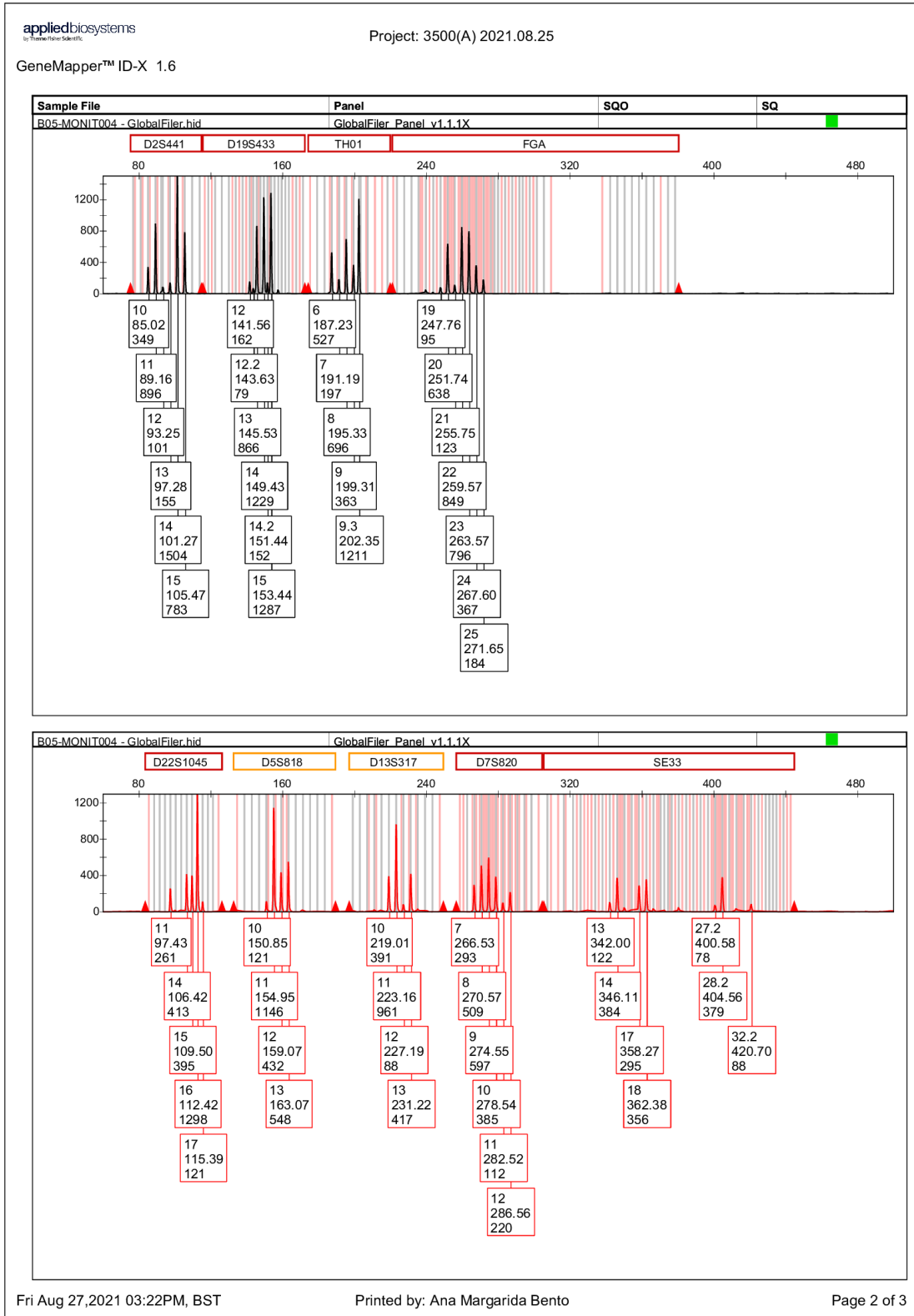




Apêndice II – Eletroferograma obtido para a amostra MONIT004.



(continuação do Apêndice II)



(continuação do Apêndice II)

