

Validação em genética forense: da necessidade à prática

Tatiana Pereira Gonzalez ^{a,*}, Mara Regina Netto Benetti ^a

^aInstituto-Geral de Perícias (RS), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: tatiana-gonzalez@igp.rs.gov.br.

Recebido em 27/10/2020; Revisado em 10/03/2021; Aceito em 22/07/2021

Resumo

Com a adoção de normas de qualidade nos laboratórios de genética forense, a Divisão de Genética Forense do IGP-RS observou a necessidade de estabelecer os procedimentos de validação e de verificação de seus métodos e insumos. Dessa forma, baseado em recomendações de entidades nacionais e internacionais, foi elaborado um documento que orienta quando e qual tipo de validação ou verificação deve ser realizado, como fazer o registro e sugere parâmetros a serem analisados em diferentes situações. Apresentamos, aqui, uma proposta de procedimento inicial que inclui orientações básicas para a validação de métodos e verificação de equipamentos comumente utilizados em laboratórios de genética forense. Este procedimento está sendo implantado na DGF-/IGP-RS para o desenvolvimento dos primeiros estudos de validação e verificação, representando um ponto de partida para o estabelecimento de uma cultura de garantia da qualidade através do uso de métodos e insumos comprovadamente adequados.

Palavras-Chave: qualidade, validação de método, genética forense, verificação, procedimento.

Abstract

With the adoption of quality assurance standards in forensic genetic laboratories, the Divisão de Genética Forense do IGP-RS acknowledged it was necessary to establish validation and verification procedures. Thus, based on recommendations from national and international entities, a standard operational procedure was created instructing when and what kind of validation or verification study should be carried out, how to register it and suggesting which parameters should be analyzed in different situations. Here, we present a proposal for an initial procedure that includes basic guidelines for the validation of methods and verification of equipment commonly used in forensic genetic laboratories. This procedure is being implemented at the -/IGP-RS for the development of the first validation and verification studies, and it represents a starting point for the establishment of a quality assurance culture through the use of proven fit to purpose methods and equipments.

Keywords: quality assurance; method validation; forensic genetics; verification, procedure.

1. INTRODUÇÃO

A genética forense vem tendo um papel crescente na resolução de crimes: avanços tecnológicos permitem que a análise de DNA forneça um grande volume de dados com alta complexidade, exigindo o desenvolvimento de ferramentas para interpretação desses resultados. O uso de bancos de dados como o Banco Nacional de Perfis Genéticos (BNPG), alimentado por perfis gerados pelos laboratórios da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG) e que realiza rotineiramente confrontos nacionais e internacionais com perfis originados de outros países e encaminhados pela INTERPOL [1], permite ainda que análises de diferentes laboratórios sejam utilizadas em conjunto na elucidação de

crimes. A necessidade de garantir que os resultados obtidos e compartilhados sejam confiáveis, portanto, cresce com a mesma intensidade. A validação de métodos e a gestão da qualidade são particularmente importantes nas ciências forenses em função do impacto que uma única análise ou comparação forense pode ter dentro do sistema judiciário [2]. Através da qualidade, um laboratório pode demonstrar sua competência técnica em fornecer resultados válidos e confiáveis [3]. A RIBPG exige requisitos de qualidade dos laboratórios participantes [4] desde 2014 [5] e a ISO/IEC 17025 [6] vem sendo adotada internacionalmente por laboratórios forenses como uma ferramenta eficiente para a garantia de resultados válidos.

A validação de métodos é procedimento recomendado pelo *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDM), pela *Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science* (OSAC) e pelo *European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI), consta no *Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories* utilizado pelo FBI [7] e é requisito da ABNT NBR ISO/IEC 17025 (item 7.2.2) [6]. A validação de um método é o processo através do qual um laboratório confirma, por exame e fornecimento de evidência objetiva, que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, bem como determina suas limitações [8]. Abrange o desenvolvimento de um novo método, a adequação de um método existente para o uso pretendido, quando um método validado que já está em uso sofre modificações,[6] e a validação interna [9], quando o laboratório demonstra que um método já estabelecido tem o desempenho esperado nas suas condições de operação. A ABNT NBR ISO/IEC 17025 [6] ainda apresenta o requisito 6.4.4, que exige que o laboratório verifique a conformidade de seus equipamentos antes que sejam colocados em uso. Dessa forma, instrumentos, softwares e reagentes utilizados pelo laboratório devem passar por uma verificação de desempenho a fim de evidenciar que satisfazem os requisitos especificados e que são comprovadamente adequados para o uso pretendido antes de sua introdução na rotina.

Tendo em vista a necessidade de estabelecer uma rotina de trabalho que inclua estudos de validação, garantindo assim que métodos e equipamentos forneçam resultados válidos e confiáveis, a Divisão de Genética Forense elaborou um documento em seu Sistema de Gestão da Qualidade que orienta a execução de validações de seus métodos e verificações de seus insumos. Para isso, com base em normas e orientações internacionais, bem como em literatura científica, foi estabelecido um procedimento para a execução dos estudos de validação e de verificação. O presente artigo descreve a proposta de trabalho que está sendo adotada na Divisão de Genética Forense do IGP-RS para a gradual validação de seus métodos e insumos.

2. TIPOS DE ESTUDOS

2.1. Validação de métodos

Os métodos utilizados devem ser validados para uso forense. Quando o método for desenvolvido para esse fim, é esperado que a validação de desenvolvimento esteja publicada em periódico científico [9]. Quando um método tiver sido validado em outro laboratório forense, é esperado que o laboratório analise criticamente os registros para garantir que a validação realizada foi adequada [10]. Métodos já validados para uso forense devem ser validados internamente no laboratório. Métodos que sofram

alterações devem ser revalidados quando as alterações sugerirem impacto nos resultados.

2.2. Verificação de equipamentos e softwares

A Divisão de Genética Forense (DGF) classifica os equipamentos e softwares conforme seu impacto e importância nos ensaios. Quando a variação nas especificações e no desempenho pode impactar a validade dos resultados do ensaio, são chamados de equipamentos e softwares controlados e devem ser verificados antes do uso. Um equipamento ou software que tiver alta relevância em um ensaio específico deve ser validado dentro do método do ensaio.

2.3. Verificação de reagentes

De forma semelhante à utilizada para equipamentos e softwares, a DGF classifica os reagentes conforme sua importância nos ensaios. Reagentes que constituem o próprio método, como kits comerciais utilizados para extração, amplificação ou quantificação, por exemplo, são considerados reagentes críticos. Demais reagentes são avaliados caso a caso, visto que diferenças entre diferentes fornecedores podem, ou não, gerar impacto nos ensaios.

3. PROCEDIMENTOS

Conforme a ABNT NBR ISO/IEC 17025 (requisitos 7.2.1.5 e 7.2.2.4) [6], todo processo de validação e todo processo de verificação devem ser registrados. Assim, a DGF optou pelo uso de dois documentos de registro: um plano de estudo e um relatório de estudo. Devem ser armazenados também todos os registros técnicos gerados durante os ensaios realizados para o desenvolvimento do estudo. A única exceção é feita para equipamentos não controlados, que podem ter seu registro de verificação feito apenas através de um relatório. O quadro 1 lista as etapas do procedimento de validação/verificação, do planejamento à conclusão [3, 8, 9, 11, 12].

Quadro 1. Etapas dos procedimentos de validação e de verificação

1. Planejamento do estudo e elaboração do plano de estudo
 - Definir objetivo e escopo do método ou uso pretendido do equipamento/software.
 - Definir os requisitos do usuário: expectativas de resultado do método ou insumo; podem ser tanto obrigatórias quando desejáveis.
 - Definir os parâmetros de desempenho adequados para avaliar o atendimento aos requisitos.
 - Definir os critérios de aceitação para cada parâmetro de desempenho.
 - O estudo deve ser sempre suficientemente abrangente para avaliar se o método ou insumo é capaz de gerar resultados válidos para o escopo pretendido.

- Verificar se as características de desempenho dos equipamentos disponíveis estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo.
- Definir quais materiais serão utilizados (sejam materiais certificados ou amostras de referência), determinar a quantidade necessária de cada um para a execução de todos os ensaios planejados, bem como possíveis repetições de análises.
- Planejar os experimentos de forma a maximizar a obtenção de dados, incluindo o tratamento estatístico a ser utilizado, ou de que forma os dados serão analisados, e a ordem de análise dos parâmetros (alguns são mais informativos quando avaliados no início).

2. Revisão e aprovação do plano pela Gerência Técnica

3. Realização dos ensaios

4. Processamento dos dados

- Realizar a análise crítica dos resultados obtidos, considerando os critérios de aceitação.
- Concluir se o método é adequado ao uso pretendido.

5. Elaboração do relatório

6. Revisão e aprovação do relatório pela Gerência Técnica

7. Implementação ou reprovação do método ou insumo.

A avaliação quanto ao atendimento dos requisitos especificados é feita com o objetivo de definir se um método deve ser implementado da forma já existente, deve ser modificado (e eventualmente revalidado) ou mesmo não deve ser implementado. Da mesma forma, um equipamento ou software verificado deve ser avaliado quanto ao atendimento aos requisitos especificados com o objetivo de definir se devem ser utilizados totalmente, apenas para determinados procedimentos ou não utilizados. Ao final do processo, deve ser avaliado se algum documento instrutivo do Sistema de Gestão da Qualidade precisa ser revisado ou um novo documento precisa ser criado. É importante que o método seja implementado de maneira clara, minimizando a introdução de variação acidental, e os equipamentos e softwares possam ser utilizados corretamente; caso contrário, o desempenho real do método, equipamento ou software pode não corresponder àquele previsto nos dados de validação. Pode ser necessário um período de utilização monitorada do método, equipamento ou software, com objetivo de verificar que o desempenho observado é mantido quando aplicado a casuística e avaliar se são necessárias alterações nos documentos instrutivos relacionados.

4. PARÂMETROS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Métodos podem ser validados por comparação com outros métodos já estabelecidos [13, 14], utilizando materiais de referência certificados (aqueles cujas características foram determinadas por procedimentos técnicos validados e que são rastreáveis à ou acompanhados por certificado de um órgão certificador, como o National Institute of Standards and Technology - NIST)[7, 15] ou amostras conhecidas(material biológico cujas características do DNA são conhecidas)[9], ou ainda incluir ensaios sem material (geralmente chamados de brancos ou controles negativos)[16]. Podem ser criadas “amostras simuladas” com objetivo de mimetizar a variedade e complexidade comumente encontradas em amostras forenses (como degradação e mistura de material

genético de vários indivíduos, por exemplo) [17]. Quando possível e apropriado, vestígios reais podem ser utilizados para confirmar o desempenho do método [17]. A validação pode ocorrer ainda através da comparação com os parâmetros declarados na validação de desenvolvimento, no caso de uma validação interna, ou com os parâmetros conhecidos do método original, no caso de uma revalidação, por exemplo.

Vários parâmetros de desempenho podem ser avaliados em uma validação. Devem ser incluídos no estudo aqueles aplicáveis ao método em questão. Os seguintes parâmetros de desempenho são os mais comumente estudados, embora não sejam os únicos que possam ser abordados em uma validação [8]: Seletividade/Especificidade, Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Tendência/Recuperação, Precisão (repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade), Exatidão e Robustez. Estudos qualitativos, como observação de concordância de perfil genético, verificações de presença/ausência (de amplificação, de dropouts, de artefatos, etc) ou detecção de eventos de contaminação, também são utilizados para validações [9]. Os parâmetros de desempenho aqui citados seguem o Vocabulário Internacional de Metrologia [18-20], exceto quando informado o contrário.

4.1. Validação de métodos de triagem de material biológico

Os métodos de triagem são, geralmente, métodos qualitativos e que dependem da leitura do resultado feita por um analista – testes colorimétricos e imunocromatográficos são frequentes. Dessa forma, o estudo deve incluir a participação dos analistas como instrumentos de medição. É recomendado que os resultados sejam categorias nominais como, por exemplo, “positivo” e “negativo” [21], sendo que discordâncias entre diferentes analistas podem ser listadas como inconclusivos para fins de estudo. Os requisitos definidos para métodos de triagem devem corresponder ao seu uso no laboratório como exame presuntivo e, quando houver intenção ou possibilidade de uso do método de forma complementar a outro, isso pode ser levado em consideração na avaliação final do estudo.

É sugerida que a sensibilidade do teste seja avaliada utilizando amostras de mais de uma fonte. A especificidade, robustez e tendência podem ser analisadas verificando a possibilidade de reação cruzada com material biológico oriundo de outras espécies animais, com outros fluidos corporais humanos, investigando se diferentes suportes e embalagens podem interferir de alguma forma no resultado, ou mesmo se diferentes condições em que os vestígios podem ser encontrados apresentam interferência no método (por exemplo, vestígios podem apresentar sujidades diversas e serem encontrados enterrados ou

mergulhados em lagos e rios). A precisão pode ser estudada quanto à repetibilidade e quanto à reprodutibilidade [22] e é recomendado realizar a análise por categoria de resultado [23], uma vez que resultados claramente positivos ou negativos costumam gerar uma maior concordância do que aqueles próximos ao limite de detecção. Os termos especificidade e sensibilidade são também utilizados para métodos qualitativos como a probabilidade de obtenção de um resultado negativo quando a substância não está presente e a probabilidade de obtenção de um resultado positivo quando a substância está presente na amostra, respectivamente e, nesse caso, podem ser calculadas através das taxas de erros falsos positivos e falsos negativos [21, 24]. As taxas de falsos positivos e de falsos negativos podem ser usadas ainda para avaliar a eficiência e abordar a confiabilidade do método de uma forma ampla [11]. Neste estudo, ainda pode ser verificado se há alguma caracterização de tipo de amostra que resulta inconclusiva: por exemplo, amostras com baixa quantidade do material biológico alvo, ou oriundas de vestígios com alguma característica específica, que, quando geram dúvidas no resultado de forma recorrente, podem ser descritas como uma limitação do método. Um estudo de correlação com o resultado da análise de DNA é um complemento bastante útil para a definição de rotina de análise: verificar se há existência de uma correlação das categorias de resultados e a quantidade de DNA extraída, uma vez que em métodos de triagem são detectados outros componentes biológicos, sendo interessante avaliar se há a ocorrência de linearidade, caso exista correlação, além da avaliação da qualidade do perfil genético obtido.

4.2. Validação de métodos de extração de DNA

É sugerida a validação por comparação com método já validado em uso no laboratório, e/ou com os dados gerados pelo desenvolvedor. É esperado que o método em avaliação seja capaz de extrair quantidades de DNA comparáveis ao método já validado e que os perfis tenham qualidade semelhante ou melhor [13]. O estudo deve incluir os tipos de amostras comumente analisadas e quaisquer tipos novos que pretendam ser utilizados com o método em avaliação. É recomendada a avaliação de, pelo menos, os seguintes parâmetros [13]: repetibilidade (5 replicatas de uma amostra), reprodutibilidade (5 replicatas extraídas em outro momento por outro analista), sensibilidade/limite de detecção (5 diluições seriadas em triplicata – onde pode ser avaliada a quantidade de DNA obtida, comparando entre as replicatas e com o método já validado). É interessante avaliar também se há influência do tipo de suporte onde está o material biológico e utilizar diferentes tipos celulares (por exemplo, sangue, epitélio, sêmen).

4.3. Validação de métodos de quantificação de DNA

Embora seja ideal utilizar material de referência certificado, qualquer DNA padrão comercial de características conhecidas pode ser utilizado (neste caso, os resultados serão sempre em referência ao DNA padrão comercial utilizado) [13]. Quando um sistema de quantificação for trocado, deve ser comparado com o sistema já validado a fim de verificar se os métodos de amplificação e análise devem ser modificados [13]. É recomendada a avaliação de, pelo menos, os seguintes parâmetros [13]: repetibilidade e reprodutibilidade (5 replicatas do DNA padrão processadas por duas vezes por analistas diferentes, por exemplo), sensibilidade/limite de detecção (5 diluições seriadas em triplicata), relação entre o sistema de quantificação e os sistemas de amplificação em uso (relação entre não quantificação e ausência de perfil genético). É interessante avaliar ainda a sensibilidade do sistema para presença de inibidores e DNA degradado e a detecção de proporção em misturas de DNA de origem masculina e feminina (quando o kit apresenta essa possibilidade). Os dados gerados durante a validação serão utilizados para estabelecer os parâmetros de aceitação da validade do ensaio e a faixa de concentração de DNA onde são obtidos perfis genéticos passíveis de comparação, válidos e de boa qualidade.

4.4. Validação de métodos de amplificação de DNA e de genotipagem

Os parâmetros recomendados para a validação interna de sistemas de amplificação são, pelo menos, dependendo do escopo de utilização do sistema [13]: repetibilidade (5 replicatas da mesma amostra), reprodutibilidade (5 replicatas processadas em outro momento por outro analista) e sensibilidade/limite de detecção (5 diluições seriadas em triplicata). Além disso, é recomendado realizar uma análise de mistura [9] (triplicatas de diferentes razões de mistura de forma a incluir as situações mais frequentemente encontradas no laboratório), verificar o balanço entre picos (tanto entre alelos de heterozigotos, quanto entre alelos de todo o perfil), calcular a razão de stutter, identificar a presença de artefatos, conhecidos ou não, e realizar estudos de concordância de perfil genético (utilizando amostras de perfil conhecido ou avaliar a exatidão utilizando materiais de referência certificados). É interessante ainda verificar a sensibilidade à presença de inibidores, DNA degradado e misturas de DNA masculino e feminino. Para este estudo, recomenda-se a utilização de perfis cujos loci sejam heterozigotos e oriundos de mais de uma fonte. Quaisquer alterações no uso em relação àquelas determinadas pelo fabricante devem ser avaliadas e, se necessário, validadas. Os dados gerados durante a validação serão utilizados para estabelecer os parâmetros

de análise, tais como: limiar de detecção, limiar analítico, limiar estocástico, PHR(razão entre picos do heterozigoto).

5. PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE EQUIPAMENTOS E SOFTWARES

5.1. Equipamentos controlados

Equipamentos controlados são submetidos a uma verificação de desempenho antes de serem inseridos na rotina a fim de demonstrar que o equipamento apresenta o funcionamento exigido de acordo com o uso que tem no laboratório. Por exemplo, um bloco de aquecimento pode ter sua temperatura de utilização conferida através do uso de um termômetro certificado. Já para equipamentos que apresentam funcionamento mais complexo, passa a ser necessário avaliar alguns dos parâmetros de desempenho listados para as validações bem como, possivelmente, utilizar um método do laboratório para obter os dados. Por exemplo, para um termociclador – onde não apenas a temperatura atingida, mas também a velocidade de alteração da temperatura e uma possível diferença entre as posições dos tubos podem interferir no resultado – é recomendado um estudo de precisão, através de repetibilidade e reprodutibilidade, onde um método de amplificação em uso no laboratório será utilizado como ferramenta para obtenção de dados. O tipo de verificação e sua abrangência são determinados pelo nível de impacto que as características passíveis de variação entre equipamentos equivalentes possam ter nos métodos em que os mesmos são utilizados.

5.1.1. Verificação de equipamentos de automação

É recomendado incluir, pelo menos, os parâmetros de reprodutibilidade e de repetibilidade na verificação de equipamentos de automação [13]. Cabe ainda avaliar a homogeneidade do procedimento na placa (ou outro suporte usado), a rastreabilidade das amostras (se não há trocas) e se não há contaminação cruzada [13]. As recomendações são válidas independentemente da etapa de análise em que o equipamento será utilizado no laboratório.

5.1.2. Verificação de equipamentos de amplificação

Novos equipamentos podem ser verificados por comparação com os equipamentos já em uso no laboratório. Espera-se obter perfis genéticos de qualidade semelhante ou melhores. Os parâmetros recomendados são [13]: sensibilidade/limite de detecção (triplicata de diluição seriada), repetibilidade (triplicatas da mesma amostra distribuídas no bloco de aquecimento), reprodutibilidade (3 repetições da mesma amplificação usada no teste de sensibilidade). Também é recomendado

avaliar a homogeneidade do bloco de aquecimento (por verificação de temperatura ou comparação das replicatas) e taxas de drop out.

5.1.3. Verificação de equipamentos de eletroforese para análise de STR

Novos equipamentos podem ser verificados por comparação com os equipamentos já em uso no laboratório. Espera-se que a sensibilidade seja, pelo menos, igual ao equipamento já em uso e a menor concentração que gera perfil genético completo no novo equipamento, seguindo os procedimentos vigentes no laboratório, seja igual ou menor. É recomendado incluir, pelo menos, os seguintes parâmetros [13]: repetibilidade (5 replicatas), reprodutibilidade (5 replicatas processadas em momentos diferentes), sensibilidade/limite de detecção (5 diluições seriadas em triplicata), precisão (posição dos alelos em número de pares de bases em relação à escada alélica). Além disso, é recomendado realizar uma análise de mistura (triplicatas de diferentes razões de mistura de forma a incluir as situações mais frequentemente encontradas no laboratório), verificar o balanço entre picos (tanto entre alelos de heterozigotos, quanto entre alelos de todo o perfil), calcular a razão de stutter, identificar a presença de artefatos, conhecidos ou não, e realizar estudos de concordância de perfil genético (utilizando amostras de perfil conhecido).

5.2. Softwares controlados

Os softwares controlados incluem aqueles que são componentes de instrumentos, softwares para análise e interpretação de dados genéticos e softwares utilizados para estatística forense [7]. Ferramentas criadas dentro de softwares comerciais (por exemplo, uma macro criada em editor de planilhas) podem ser também submetidas à verificação, sem necessidade da avaliação do software completo. A verificação é feita em softwares novos, em novos módulos de softwares já em uso e quando modificações forem feitas pelo fabricante, na medida em que apresentarem possibilidade de impacto nos resultados. Softwares têm seu desempenho verificado através de testes funcionais (quanto a sua performance na aplicação pretendida) e de confiança (quanto a sua operacionalidade dentro do laboratório – sua compatibilidade com sistema operacional, rede, demais softwares, usuários, etc) nas máquinas em que serão utilizados [7]. Entre os testes funcionais, pode ser feita a inserção de dados inválidos, incorretos e corretos, onde se espera que o software apresente a resposta apropriada a cada tipo de dado inserido (por exemplo, mensagens de erro para dados inválidos, identificação do dado incorreto e resultado adequado para dados corretos) [25]. Os testes funcionais podem ser executados pelos desenvolvedores ou por

terceiros e é, então, recomendado que o laboratório avalie a verificação apresentada quando a sua adequação. É recomendado que seja verificada a geração de registros e a segurança de sua integridade. Para softwares de análise/interpretação de perfis de DNA, é recomendado incluir também, conforme aplicável, estudos de precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade [7]; para softwares utilizados para cálculos estatísticos, é recomendado incluir estudos de precisão e exatidão [7]. Além disso, é importante elaborar documentos instrutivos que delimitem o escopo de uso dos softwares a partir dos resultados obtidos, bem como, quando necessário, a fonte das frequências alélicas populacionais que serão utilizadas. Softwares que são componentes de instrumentos, ou seja, são utilizados para operação de equipamentos, são verificados em conjunto com o equipamento.

5.3. Equipamentos e softwares não controlados

Os equipamentos e softwares não controlados também passam por verificação de desempenho antes de serem inseridos na rotina, embora a verificação de seu funcionamento seja feita de forma simplificada, através de inspeção visual, observando se apresentam as características descritas pelo fabricante quanto à funcionalidade e operação. Podem ser feitas simulações de procedimentos comumente realizados no laboratório, com objetivo de atestar que o equipamento ou software pode ser colocado em uso, e deve ser verificado que especificações oferecidas pelo fabricante são atendidas (por exemplo, se a voltagem está correta, se valores máximos e mínimos de faixa de uso estão de fato disponíveis para seleção de uso, se todas as funcionalidades descritas estão acessíveis para uso e podem ser selecionadas, etc). Como exemplos, um agitador que tenha duas velocidades deve funcionar em ambos os ajustes e uma workstation que possua opção de luz UV deve ter essa funcionalidade operante.

5.4. Orientações para reagentes

Reagentes são as soluções comerciais e aquelas preparadas dentro do laboratório, incluindo os kits comerciais fechados, de composição conhecida ou não. Reagentes novos são avaliados durante a validação dos métodos dos quais fazem parte. Se reagentes críticos ou considerados importantes dentro de um método (ou seja, se suas características individuais podem influenciar o resultado) sofrerem alteração, o método será revalidado – como, por exemplo, um novo kit de quantificação ou reagente cuja composição não seja divulgada pelo fabricante. Reagentes críticos passam ainda por verificação de cada lote recebido antes de serem disponibilizados para uso na rotina, enquanto os demais reagentes são avaliados de forma indireta durante a rotina nas verificações dos métodos do qual participam (uso de controles positivos e

negativos nos ensaios). Reagentes que não sejam considerados críticos e cujas características individuais não variem de forma a influenciar o resultado de um método não são verificados antes do uso no laboratório – como exemplo, diferentes fornecedores de uma solução de composição conhecida.

6. CONCLUSÕES

As formas de averiguação dos parâmetros recomendados para cada estudo não se restringem aos exemplos aqui citados, uma vez que existem opções diversas para o mesmo fim. O documento elaborado para uso na Divisão de Genética Forense não pretende abordar todas as técnicas aplicáveis às validações e às verificações, cabendo sempre ao responsável pela execução de um estudo buscar a abordagem mais adequada. Além disso, foi incluso no procedimento da DGF um anexo com conceitos metrológicos, a fim de facilitar a compreensão dos parâmetros avaliados durante os estudos de validação e de verificação (não reproduzido aqui, mas disponível se solicitado às autoras). O conteúdo reproduzido neste artigo almeja ser apenas um ponto de partida para os laboratórios forenses que ainda não têm procedimentos de validação estabelecidos em seus Sistemas de Gestão da Qualidade, bem como estimular o debate dos métodos que podem ser utilizados para os estudos de validação e verificação dentro da genética forense. Recentemente, vem sendo proposto que os estudos de validação sejam colaborativos [26], visto que são estudos trabalhosos que consomem tempo e recursos. A colaboração entre laboratórios forenses permitiria a redução de investimento redundante, a disseminação de boas práticas e a oportunidade de combinação de conhecimento, elevando a qualidade dos estudos realizados. Assim, a publicação dos dados e resultados dos estudos é valiosa, permitindo o crescimento conjunto dos laboratórios da RIBPG, especialmente considerando o frequente uso de métodos e equipamentos idênticos e a variação de disponibilidade de recursos e a experiência de cada unidade. Com um propósito semelhante, a ASCLD (*American Society of Crime Laboratory Directors*) criou recentemente um repositório online onde podem ser disponibilizadas validações realizadas por laboratórios forenses e universidades, buscando reduzir repetições desnecessárias de estudos e beneficiar toda a comunidade forense [27]. A publicação de estudos de validação também aumenta a transparência e o acesso à confiabilidade associada às análises forenses, bem como aumenta a qualidade científica dos estudos, permitindo a ação dos mecanismos de autocorreção da ciência [28]. A publicação do procedimento adotado pela Divisão de Genética Forense neste artigo, portanto, vai ao encontro das características inerentes do método científico, buscando o aperfeiçoamento e a análise crítica constantes

aos procedimentos propostos, visando sempre garantir a obtenção de resultados válidos.

AGRADECIMENTOS

As autoras gostariam de agradecer às oportunidades de aprendizados oferecidas pela SENASP (Secretaria Nacional de Segurança Pública) e pela RIBPG, pelo apoio recebido no Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, inclusive na divulgação do material desenvolvido internamente, e pelo intenso e permanente diálogo que as autoras mantêm com os colegas de todos os laboratórios forenses brasileiros, indispensável para o aprofundamento dos conhecimentos na gestão da qualidade.

REFERÊNCIAS

- [1] Brasil, Ministério da Justiça e Segurança Pública. *XII Relatório da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos*. Brasil (2020). Retirado em 28/07/2020, de: <http://www.justica.gov.br/sua-seguranca/seguranca-publica/ribpg>
- [2] Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science. *Human Factors in Validation and Performance Testing of Forensic Science*. OSAC Technical Series 0004 (2020). Retirado em 29/09/2020, de: www.nist.gov
- [3] Forensic Science Regulator. *Guidance – Validation. FSR-G-201, Issue 2*(2020).
- [4] Brasil, Ministério da Justiça e Segurança Pública. *Resolução nº 12 - requisitos técnicos para a realização de auditorias nos laboratórios e bancos que compõem a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos*. Brasil (2019). Retirado em 28/07/2020, de: <http://www.justica.gov.br/sua-seguranca/seguranca-publica/ribpg>
- [5] Brasil, Ministério da Justiça e Segurança Pública. *Resolução nº 5 - requisitos técnicos para a realização de auditorias nos laboratórios e bancos que compõem a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos*. Brasil (2014). Retirado em 21/10/2020, de: <http://www.justica.gov.br/sua-seguranca/seguranca-publica/ribpg>
- [6] Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017- Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro (2017).
- [7] Federal Bureau of Investigation. *Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories* (2020).
- [8] INMETRO. *DOG-CGCRE-008 Rev. No 08. Orientação sobre validação de métodos analíticos*. (2020).
- [9] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. *SWGDM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods*. (2016). Retirado em 14/07/2020, de: www.swgdam.org.
- [10] INMETRO. *NIT-DICLA-075 Rev. No 02. Aplicações da ABNT NBR ISO/IEC 17025 Para Laboratórios de Criminalística (Projeto Piloto)* (2019).
- [11] European Network of Forensic Science Institutes. *Guidelines for the single laboratory – Validation of Instrumental and Human Based Methods in Forensic Science* (2014).
- [12] B. Magnusson U. Örnemark (eds.) *EurachemGuide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed. (2014). Retirado em 28/07/2020, de: www.eurachem.org.
- [13] European Network of Forensic Science Institutes. *Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process* (2010).
- [14] J. Pum. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem* **90**: 215-281 (2019).
- [15] International Laboratory Accreditation Cooperation. *ILAC-G19:08/2014 – Modules in a Forensic Science Process* (2014).
- [16] V. Barwick (ed.), *Planning and Reporting Method Validation Studies – Supplement to Eurachem Guide on the Fitness for Purpose of Analytical Methods* (2019). Retirado em 28/07/2020, de: www.eurachem.org.
- [17] Forensic Science Regulator. *Codes of Practice and Conduct. FSR-C-100, Issue 5*(2020).
- [18] INMETRO. *VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados*, 1ª Edição Luso Brasileira, Duque de Caxias, Inmetro(2012).
- [19] Bureau International des Poids et Mesures. *VIM – International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms*, 3rd Ed. (2008).
- [20] V.J. Barwick e E. Prichard (eds.) *Eurachemguide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3*(2011). Retirado em 28/07/2020, de: www.eurachem.org.
- [21] S. Ellison e T. Fearn. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *TrendsAnalytChem***24**: 468-476 (2005).
- [22] F.M. Albano e M.T.R. Rodriguez. *Validação e Garantia da Qualidade em Ensaio Laboratoriais*. Rede Metrológica RS. Porto Alegre. 2ª edição (2015).

- [23] United Nations Office on Drugs and Crime. *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. Vienna (2009).
- [24] M. Valcárcel et al. *Metrology of Qualitative Chemical Analysis. Report of European Commission*. BCR Information, Chemical Analysis. (2002). Retirado em 08/07/2020, de: op.europa.eu.
- [25] Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science. *Best Practice Recommendation for Validation of Forensic DNA Software*. ASB Standard XXX, 1st Ed. (2018). Retirado em 29/09/2020, de: www.nist.gov
- [26] R. Wickenheiser e L. Farrell. Collaborative versus traditional method validation approach: Discussion and business case. *Forensic Sci. Int. Synergy* 2: 230-237. (2020).
- [27] American Society of Crime Laboratory Directors. *Validation and Evaluation Repository*. Acessado em 16/10/2020: www.ascl.org/validation-evaluation-repository/
- [28] J. M. Chin, G . Ribeiro e A. Rairden. Open forensic science. *J. Law Biosci.*6: 255-288 (2019).