

Ejercicio GHEP-ISFG 2012

Resultados ADNmt



San Andres Islas-Colombia

5 de junio de 2012

manuel.crespillo@mju.es

RESULTADOS (Ejercicio Básico)

M1-M4

Analizar detalladamente

...522d 523d	3
...522d	2
...521d 522d	1

Muestra	Haplotipo consensuado	Discrepan
M1	153G 263G 315.1C 523d 524d 16291T 16519C (H2a2b)	8/41 (19,5%)
M2	93G 263G 315.1C 456T 513A 16304C 16519C (H5)	3/41 (7,3 %) +1
M3	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C (H2a2)	2/41(4,8 %)
M4	72C 263G 309.1C 315.1C 16298C 16301T (HV0)	3/41(7,3 %) +2

10 labs no lo reportan a pesar de editar desde 73

Región	Nº
HVSI+II	27 (65,9%)
HVSI+II+III	14 (34,1%)

Heteroplasmia + discrepancias puntuales en hotspot

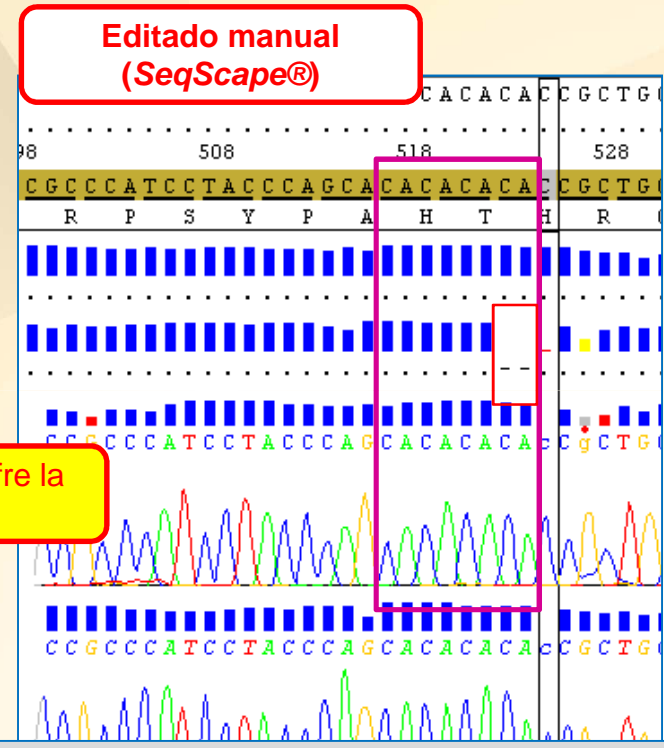
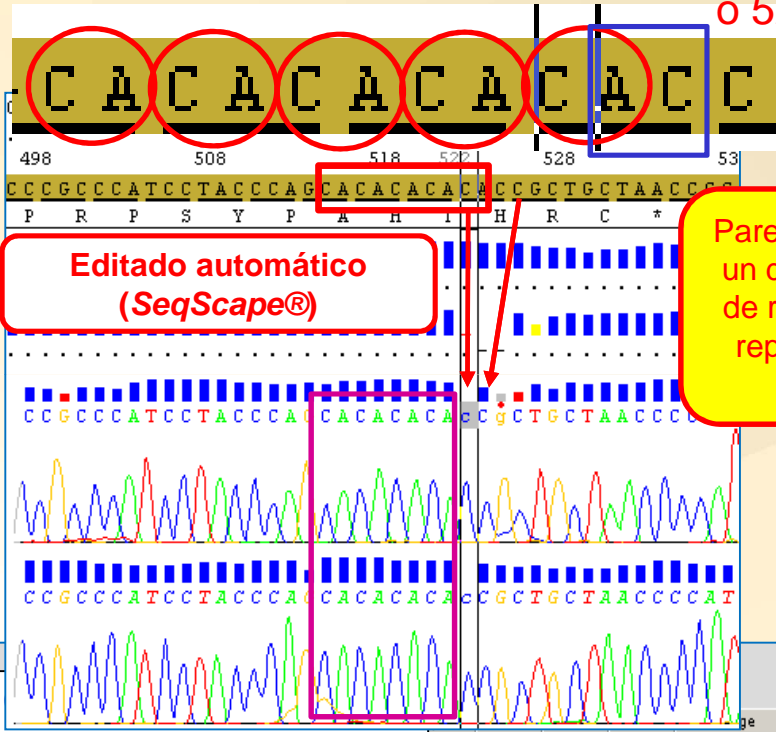
Un laboratorio es discrepante para todas las muestras y otro lab repite un error nomenclatura (ordenamiento de las discrepancias)



RESULTADOS (Ejercicio Básico)



Muestra	Haplotipo consensuado	Discrepan
M1	153G 263G 315.1C 523d 524d 750G 16291T 16519C (H2a2b)	8/41 (19,5%)



Parece más lógico que en un dinucleotido con *motif* de repetición CA, sea un repeat completo el que sufra la deleción

¿Que bloque CA sufre la deleción?

St	Sequence	Position	Variant	RefSeq	Gene	Description
58	CACACACACC	43	no	missens	P90S	
586791	263A>G	rCRS_HVII	263	1		
586791	315-316insC	rCRS_HVII	315	1	Ins	46 no frameshift insertion
586791	523-524delA C	rCRS_HVIII	523	2	Del	21(avg) no frameshift deletion

523d 524d (A y C respectivamente)

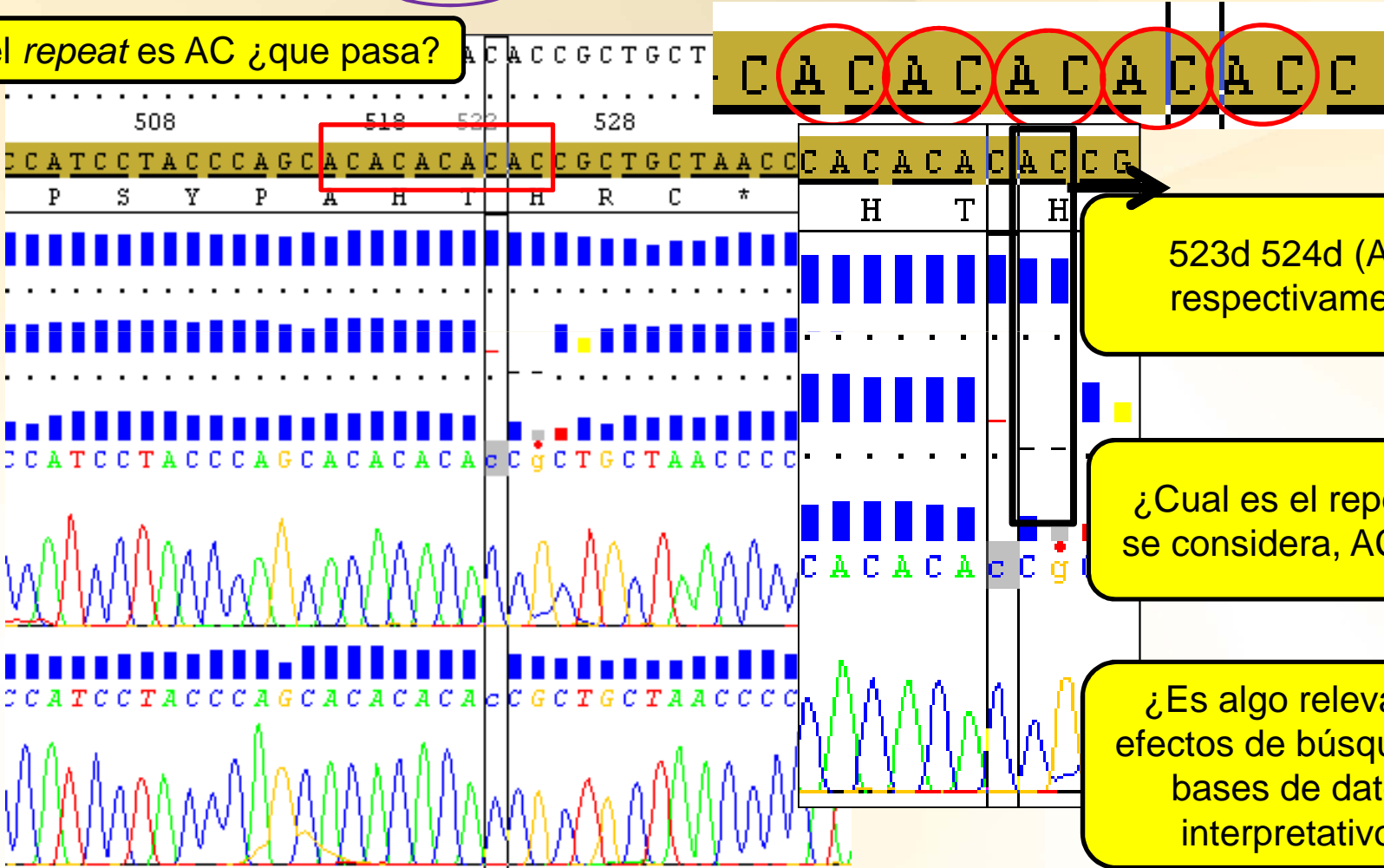
St	Sequence	Position	Variant	RefSeq	Gene	Description
594963	CACACACACC	rCRS				
594963	CACACACACC	rCRS				
594963	263A>G	rCRS_HVII	263	1	Sub	45 no missens T179A
594963	315-316insC	rCRS_HVII	315	1	Ins	44 no frameshift insertion
594963	522-523delC A	rCRS_HVIII	522	2	Del	21(avg) no frameshift deletion

522d 523d (C y A respectivamente)

RESULTADOS (Ejercicio Básico)

Muestra	Haplotipo consensuado	Discrepan
M1	153G 263G 315.1C 523d 524d 750G 16291T 16519C (H2a2b)	8/41 (19,5%)

Si el repeat es AC ¿que pasa?



523d 524d (A y C respectivamente)

¿Cual es el repeat que se considera, AC o CA?

¿Es algo relevante a efectos de búsqueda en bases de datos o interpretativos ?



RESULTADOS (Ejercicio Básico)



Muestra M5 (mezcla)

Constituyentes (2:1)	Haplotipo
Sangre (M5:GHEP 2004)	263G 309.1C 315.1C 16266T 16519C**
Semen (M2: 2012)	93G 263G 315.1C 456T 513A 16304C 16519C
Muestra	Haplotipo esperado
M5 (1ª fracción)	93R 263G 309.1C* 315.1C 456Y 513R 16266Y16304Y 16519** ¿C/Y?
M5 (2º fracción)	Nada o haplotipos con restos de contaminación de la 1ª fracción---

Sangre + Semen
(células y colas de espermatozoides)

Cabezas de espermatozoides (carecen de componente mitocondrial)

Muestra	¿Haplotipo consensuado?	N (%)
M5 (1ª fracción)	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 16266Y 16304Y 16519C	15/27(55,5 %) +7
M5 (2ª fracción)	93G 263G 315.1C 456T 513A 16304C 16519C	6/10 (60 %)

17 restantes (¿no analizan? ¿resultados no interpretables?. **DATO INTERESANTE**)

Todos los laboratorios que consensúan el resultado hacen lisis diferencial

M5 (1ª fracción)

M5_1FRAC	93G 263G 315.1C 16266Y 16304Y	Falta 309.1C (HL)
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 750G 15884R 16266Y 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y	
M5_1FRAC	16266Y 16304Y 93R 263G 315.1C	Falta 309.1C (HL)
M5_1FRAC	98d 118C 120G 278G 331C 16266Y 16304Y	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 16266Y 16304Y	
M5_1FRAC	93R 263G 16266Y 16304Y	Falta 309.1C (HL)
M5_1FRAC	93R 263G 310Y 16266Y 16304Y	¿310 Y? (HL)
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 16266Y 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	93G/A 263G 309.1C/- 315.1C 16266T/C 16304T/C	
M5_1FRAC	93A/G 263G 309.1C 315.1C 16266T/C 16304T/C	
M5_1FRAC	263G 16266T	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 16304Y	Falta 16266Y
M5_1FRAC	93R 263G 315.1C 16266Y 16304Y	Falta 309.1C (HL)
M5_1FRAC	93R 263G 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y 16519C	Falta 309.1C (HL)
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 16266T 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16266T	Exclusivo SANGRE
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C/NI 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16266Y 16304Y	
M5_1FRAC	263G 315.1C 16266T 16304T/C 16519C	
M5_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16266T 16519C	Exclusivo SANGRE
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C=309(rCRS) 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 16226Y 16304Y 16519C	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C(HL) 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y	
M5_1FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C 16266Y 16304Y 16519C	

M5 (2ª fracción)

M5_2FRAC	93G 263G 315.1C 16266Y 16304Y	
M5_2FRAC	93G 263G 315.1C 456T 513A 750G 15884A 16304C 16519C	Exclusivo SEMEN
M5_2FRAC	93R 263G 309.1C 315.1C	
M5_2FRAC	93G 263G 315.1C	Exclusivo SEMEN
M5_2FRAC	93G 263G 315.1C 16304C 16519C	Exclusivo SEMEN
M5_2FRAC	93G 263G 315.1C 16304C	Exclusivo SEMEN
M5_2FRAC	93R 263G 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y 16519C	
M5_2FRAC	93A 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 16266T	
M5_2FRAC	93G 263G 315.1C 456T 513A 16304C 16519C	Exclusivo SEMEN
M5_2FRAC	93G 263G 315.1C 16304C 16519C	Exclusivo SEMEN

¿Presencia de espermatozoides completos en la 2ª fracción tras la 1ª lisis ?

Analysis of body fluid mixtures by mtDNA sequencing: An inter-laboratory study of the GEP-ISFG working group

M. Montesino et al./Forensic Science International 168 (2007) 42-56

Table 7
Comparison between results obtained in first and second DNA extracts

Result	First fraction	Second fraction
Female + male haplotypes	68	36
Female haplotype	84	58
Male haplotype	1	2
No amplification	0	16
Blurred sequence	3	27
Contamination	0	17

Muestra	Haplotipo consensuado	N (%)
M5 (1ª fracción)	93R 263G 309.1C 315.1C 456Y 513R 16266Y 16304Y 16519C	15/27(55,5 %) +7
M5 (2ª fracción)	93G 263G 315.1C 456T 513 ^a 16304C 16519C	6/10 (60%)

81,48 %



Muestra M6 (pelo-sin contaminante)

M6	rCRS	Solo editaHVS-I
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	No result	
M6	263G 309.1C 315.1C 16126C 16172C 16294T 16304C	
M6	263G 293C 315.1C rCRS	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G	
M6	150Y 263G 293Y 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 309.1C 315.1C 16519C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C	
M6	73G 263G 293C 315.1C	Variables en hotspot 73
M6	73A/G 263G 309.1C 309.2C 16519C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C	
M6	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C	

Muestra	Haplotipo consensuado	N (%)
M6	263G 293C 309.1C 315.1C 16519C	24/29 (82,7 %)

¿Puede el pelo M6 pertenecer a algunos de los donantes M1-M4?

No contestan/especifican	4 labs
Puede pertenecer a M3	22 labs
No puede pertenecer a M3	4 labs

Buen consenso en los resultados



RESULTADOS

(Ejercicio Avanzado)



Muestra M8 (mezcla)

Constituyentes (8:1)	Haplotipo
Saliva (Donante no tipado)	263G 309.1C 315.1C 16519C
Semen (D4: GHEP2011)	72C 263G 309.1C 315.1C 16298C 16301T
Muestra	Haplotipo esperado
M8 (1ª fracción)	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y 16519CY
M8 (2º fracción)	Nada o haplotipos con restos de contaminación de la 1º fracción---

Saliva + Semen
(células y colas de espermatozoides)

Cabezas de espermatozoides (carecen de componente mitocondrial)

Muestra	Haplotipo consensuado	n (%)
M8 (1ª fracción)	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y 16519Y	10/19(52,67 %)
M8 (1ª fracción)	263G 309.1C 315.1C	5/19 (26,3 %)
M8 (2ª fracción)	No hay consenso	

Sólo emiten 7 labs la 2ª fracción



La lisis diferencial parece que no afecta en el resultado de las fracciones

M8 (1ª fracción)

	Haplotipo	LD
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C 750G 15904Y 16298Y 16301Y 16519Y	Si
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 309.2C 315.1C 16298Y 16301Y	Si
M8_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	No
M8_1FRAC	88G 278G 324d 325C 331C 333C 334G 16026G 16033T 16037G 16111Y 16223Y 16234Y 16290Y 16311Y	No
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y	Si
M8_1FRAC	263G 309.1C	Si
M8_1FRAC	no result	Si
M8_1FRAC	72T/C 263G 309.1C 315.1C 16298T/C 16301C/T	No
M8_1FRAC	263G	Si
M8_1FRAC	263G 309.1C 309.2C 315.1C 16298Y 16301Y	No
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y	No
M8_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16519C	Si
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 309.2C 315.1C 16298Y 16301Y 16519Y	Si
M8_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16519C	No
M8_1FRAC	263G 309.1C/309.2C 315.1C 16519C	No
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y	No
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y 16519Y	Si
M8_1FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y 16519Y	Si
M8_1FRAC	263G 309.1C 309.2C(HL) 315.1C 16298Y 16301Y	No

M8 (2ª fracción)

Resultados esperables tanto para 1ª fracción como para la 2ª

M8_2FRAC	72C 263G 309.1C 315.1C 750G 15904T 16298C 16301T
M8_2FRAC	263G 309.1C 315.1C
M8_2FRAC	263G 309.1C 315.1C???
M8_2FRAC	263G 309.1C 309.2C 315.1C
M8_2FRAC	263G 309.1C 315.1C 16519C
M8_2FRAC	263G 309.1C 315.1C 16301Y 16519Y
M8_2FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C 16298Y 16301Y 16519Y

Exclusivo semen
NO ESPERADO

Empleo de LD

Resultados ESPERADOS (mezcla/saliva)

¿Hay consenso?

RESULTADOS

(Ejercicio Avanzado)

M9 (pelo contaminado)

Muestra	Constituyentes	Haplotipo consensuado	Labs
M9 (1ª fracción-contaminante)	Sangre M2 (2005)	263G 309.1C 315.1C 16519C	17/19 (89,5%)
M9 (2ª fracción-pelo-)	M1 (2011)	153G 263G 315.1C 523d 524d * 16291T16519C	8/21 (52,6%) +3

La lisis diferencial parece que favorece una mejor separación de los componentes

Lisis Diferencial	Nº de labs	Consenso si	Consenso no
Si	12	7 (58,3%)	5 (41,6%)
No	8	3 (37,5%)	5 (62,5%)
¿?	1	-	-

M9 (1ª fracción –contaminante-)

M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	153G 263G 315.1C	DISCREPANTE
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16519C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16519C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16519C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	Nomenclatura FALTA."1"
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C 16519C	
M9_1FRAC	263G 309.1C 315.1C	

M9 (2ª fracción -pelo-)

M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 16291T 16354Y	Heteroplasmia	Si LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C Del522 Del528 16291T	Nomenclatura	SI LD
M9_2FRAC	72Y 263G 309.1C 315.1C		SI LD
M9_2FRAC	146Y 153R 263G 315.1C		¿?
M9_2FRAC	no result		SI LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 16291T		NO LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 16291T		NO LD
M9_2FRAC	153G/A 263G 309.1C/T310C/T 315.1C 16291C/T		NO LD
M9_2FRAC	263G 309.1C 315.1C		NO LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 16291T		SI LD
M9_2FRAC	-		SI LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 16291T		SI LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 523d 524d 16291T 16519C		NO LD
M9_2FRAC	263G 309.1C 315.1C		No LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 523D 524D 16291T 16519C		SI LD
M9_2FRAC	263G 309.1C 315.1C		NO LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 522delC 523delA 16291T	Nomenclatura	SI LD
M9_2FRAC	263G 309.1C 315.1C		SI LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 16291T		SI LD
M9_2FRAC	153G 263G 315.1C 523delA 524delC 16291T 16519C		SI LD
M9_2FRAC	153R 263G 309.1C(HL) 315.1C 16291Y		NO LD

M1-M4 (Ejercicio Básico)

- Buenos resultados: Errores fácilmente evitables (transcripción / nomenclatura).
 - Dobles revisiones/Doble edición
 - Chequeo filogenético
 - Volcado de datos automático
- En referencia a M1 (región HVSI) **NO SIEMPRE EL RESULTADO CONSENSUADO ES EL CORRECTO, puede haber otras opciones.**

M5 (Mezcla 2:1)

- Interpretación de mezclas (ADNmt) no está aconsejado en la casuística forense con las técnicas de secuenciación actualmente disponibles. Descenso sensible en la participación de los laboratorios (41- >27)
- Muestras en las que se compromete la reproducibilidad y repetitividad de los resultados (aparición de heteroplasmas en alguno de los componentes, la química de secuenciación, la proporción de los contribuyentes, la naturaleza de los fluidos constituyentes...)
- Resultados no esperados (2ª fracción). **¿IDEAS que expliquen el resultado ?**
- En referencia a M5 (2ª fracción) En ocasiones, **TAMPOCO EL RESULTADO CONSENSUADO ES EL VALOR ESPERADO.**

M8 (Mezcla 8:1)

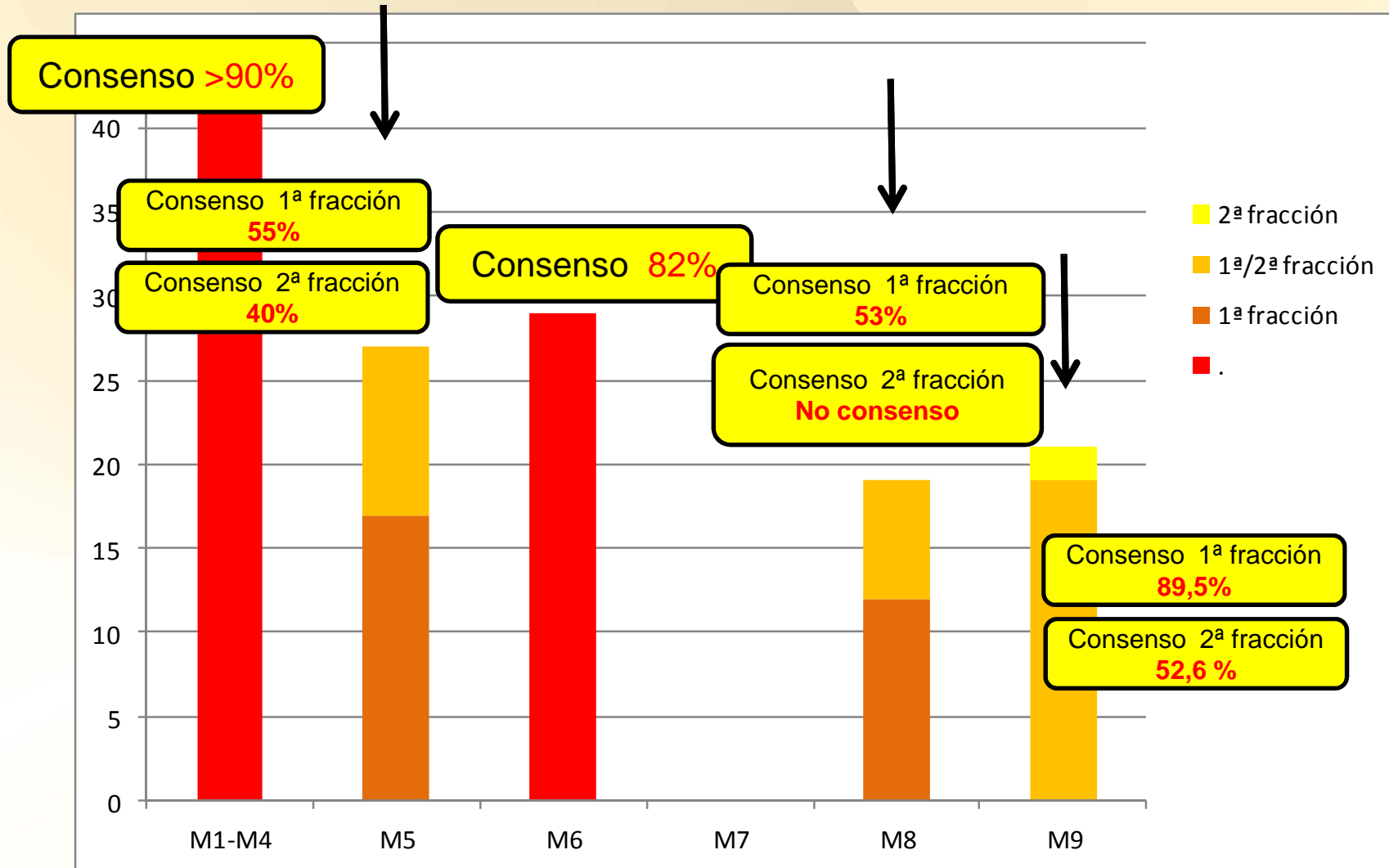
- De nuevo difícil establecer un resultado consenso y por otra parte resultados no consensuados (fracción 1-saliva-) son explicables y correctos
- Las muestras M5 y M8 nos muestran un distinto comportamiento ante el análisis de ADNmt (ambas con semen como contribuyente). La concentración de los contribuyentes resulta determinante en el resultado de ambas fracciones.

M9 (pelo contaminado)

- Los resultados apuntan a una mejor separación del componente contaminante al emplear la lisis diferencial.



Participación y consenso



Conclusión Final respecto al análisis de ADNmt en mezclas

- Especial precaución en la interpretación de resultados de ADNmt procedentes de mezcla. Valorar su empleo en la casuística forense. Distintos autores desaconsejan su uso .
- Históricamente (ejercicios del GHEP) se ha puesto de manifiesto su dificultad para consensuar resultados.

CREO QUE NOS SIRVEN PARA APRENDER SOBRE SU ESPECIAL DIFULTAD INTERPRETATIVA Y SU DIFICIL ESTANDARIZACIÓN. HABRÍA QUE REPLANTEARSE EL INCLUIR ESTE TIPO DE ANALÍTICA , AL MENOS, EN EL EJERCICIO BÁSICO.