




Identificación de vestigios no-humanos: Fluido biológico y Especie animal GHEP 2015

Pilar Martínez Biology Service
National Institute of Toxicology & Forensic Science (ITCF)
José Echegaray 4-28232 Las Rozas de Madrid, Spain
plum.fernandez@justicia.es



GHEP 2015 M-9 Tela



Item M-9

1. 1mL **sangre** individuo 1
2. 1mL(±1s) **semen** individuo 2

Se dispensa 50 uL 1:1 (v/v)

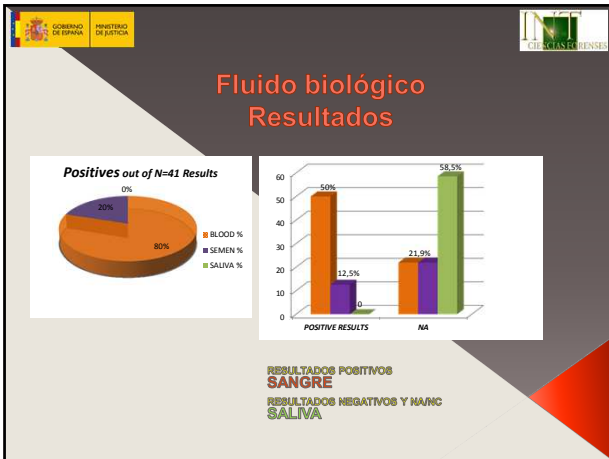


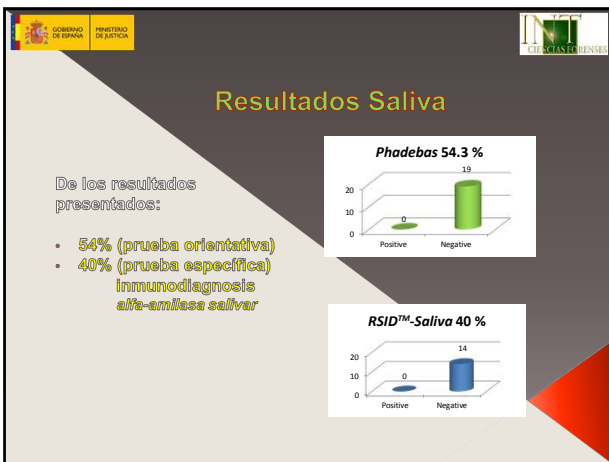
GHEP 2015 M-9 Tela

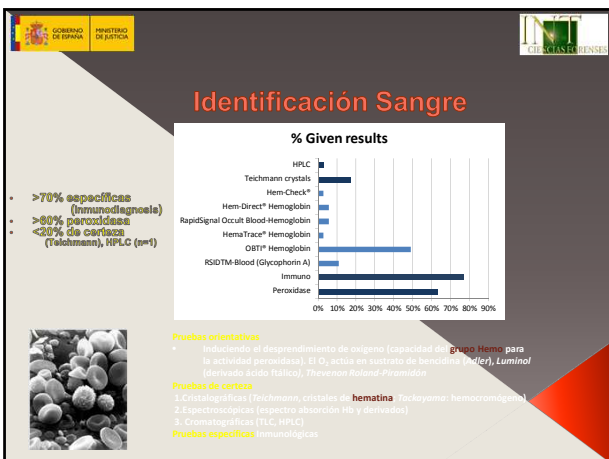
Objetivos

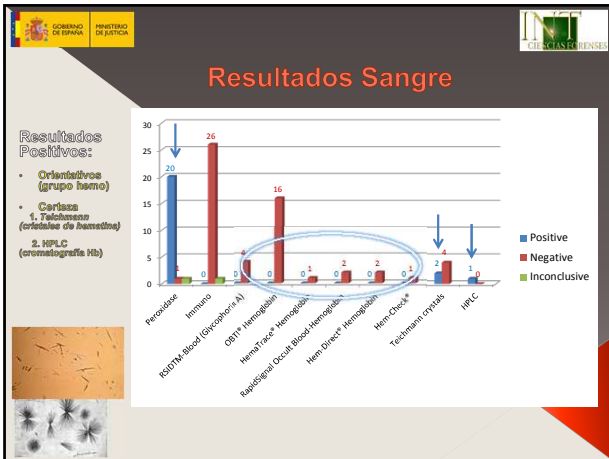
- ◆ Identificación de los fluidos biológicos de interés forense
- ◆ Identificación de especie animal

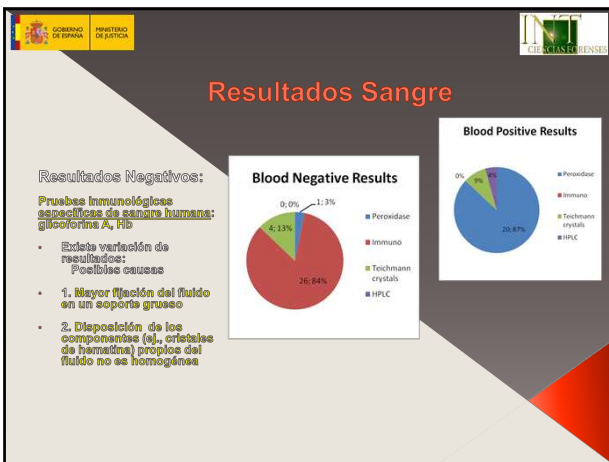


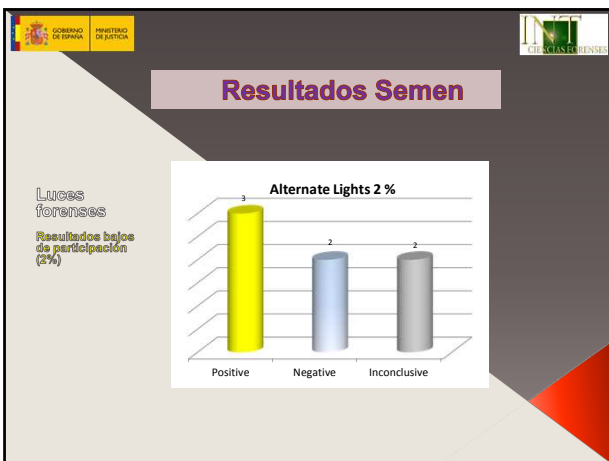














Conclusión fluidos biológicos

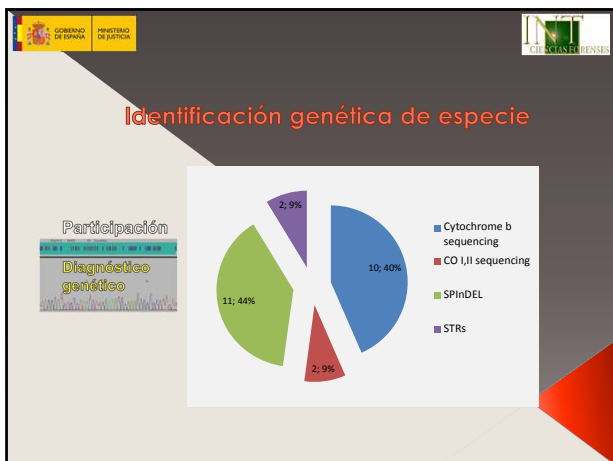
Existen escasos métodos confirmatorios de identificación de fluido biológico no-humano

Las pruebas específicas son para fluidos humanos

Las de certeza ej., -cristalográficas (sangre), visualización espermia- Si pueden identificar el tipo de fluido

Problemas en el laboratorio:

1. Elución del fluido desde el soporte (matriz)
2. El fluido biológico no se presenta homogéneo



Identificación genética de especie

No realizaron determinación de identificación genética no-humana N=13 laboratorios

"La muestra NO corresponde a sangre no humana, razón por la cual no fue sometida al análisis de ADN"

Recomendaciones
Lluch et al. (2011) Issues and Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigation. Forensic Science International: Genetics. doi:10.1016/j.fsigen.2010.10.017

Identificación genética de especie

Cytochrome b primers N=10

Secuenciación
Cyt b
CO I, II
D-Loop
otros

Primer Pair	Percentage
L14816/H15173	60%
L15026/H15173	10%
L15149/H15367	10%
NA	20%

Identificación genética de especie

El análisis de 1 ó 2 frag.del gen cytb permitió editar una única secuencia (a), 170 / 300 pb) cuya comparación mediante BLAST con las secuencias de NCBI ofreció concordancia completa con secuencia consenso de cytb de especie

Description	Max score	Total score	Query I	Subject	Accession
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1
Sus scrofa [9998] Cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	235	235	100%	100%	NC010981.1

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

Concordancia ?

The screenshot shows a BLAST search interface with a 'Tax BLAST Report' section. A table lists search results with columns for 'Accession', 'Description', 'Score', 'E-value', and 'Identical by position (%)'. One entry is highlighted with a red box.

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

Resultados positivos de identificación

1 COI / STRs inconcluyentes

Method	Positive identification N=24
Sequencing	92%
SPinDEL	100%
STRs	50%

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

N=41

Species	Count	Percentage
<i>Sus scrofa</i>	23	56%
<i>Phacochoerus africanus</i>	10	24%
NA	7	17%
No result	1	3%

Identificación genética de especie

Shortest sequence: **Sus scrofa var. domestica**



Identificación genética de especie

SPINDEL multiplex

Published online 4 October 2010

Nucleic Acids Research, 2010, Vol. 38, No. 22, e208
doi:10.1093/nar/gkq965

Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

Molecular Ecology Resources (2012) 12, 1190–1195 doi: 10.1111/j.1755-0998.12011

SPINDEL: a multifunctional workbench for species identification using insertion/deletion variants

JOÃO CARNEIRO*†, FILIPE PEREIRA* and ANTÓNIO AMORIM*†



Identificación genética de especie

Supplementary Table S6. General description of the seven SPINDEL hypervariable regions used in the eutherian profiling kit.

Localization	Hypervariable region	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Dye label	Nucleotide position of amplicon*
12S rRNA	AC	A_F1	CCCCAGGGAAACAGCAG		803-1279
		A_F2	CCCCAGGGACTCAGCAG		
		A_F3	CCCCAGGGATACAGCAG		
	BC	A_F4	CCCCAGGGAGACAGCAG		
		C_R1	GGTTTCTGGAAGATGGCGG	TET	
DE	B_F1	ACAATAGCTAAGCCCAACTG		1051-1279	
	B_F2	ACGATAGCTAAGCCCAACTG			
	C_R1	GGTTTCTGGAAGATGGCGG	TET		
12S rRNA-16S rRNA	FG	F_F1	GGTAAAGTACTGGAAGGTG		1569-1921
		F_F2	GGTAAAGTACTGGAAGGTG		
16S rRNA	HI	G_R1	TAGCTCTCTGGTTGGG	6-FAM	
		H_F1	GGCTAAAGAGCCCAACT		
	IK	H_F2	GGCTAAAGAGCCCAACT		2173-2507
		I_R1	TTT TTG GTA AAC AGG CCG GG	TET	
16S rRNA-16S rRNA-16S rRNA	LM	J_F1	GGCAGAGACTATGGAG	6-FAM	2716-2827
		K_R1	TCGAGGTGCCCCAAC		
16S rRNA-16S rRNA-16S rRNA-16S rRNA	LM	L_F1	GGTTTACGACTCGATGTTG	6-FAM	2975-3256
		M_R1	GCATTACCGGCTCTCTG		
		M_R2	GCAATTACCGGCTCTCTG		

*Numbered according to the human mtDNA reference sequence (Anderson et al. 1981. *Nature* 290:457)



Identificación genética de especie

Graphical representation of the six ribosomal RNA (rRNA) target regions in the mitochondrial DNA (mtDNA) amplified by multiplex PCR in the SPinDel profiling kit.

Identificación genética de especie

Schematic illustration of the strategy used in the species identification by the insertions/deletions (SPinDel) method

	AB	BC	CD
Species 1	176	101	119
Species 2	181	96	132
Species 3	204	101	130

Four conserved regions (green boxes) define three hypervariable domains (dotted brown lines). A section of the alignment is magnified to show the presence of multiple gaps in hypervariable regions. Each species is identified by a numeric profile resulting from the combination of lengths in hypervariable regions.

Pereira F, Carneiro J, Mathiasen R, van Aelst B, Pinto N, Quimbo L, Amorim A. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res.* 2010 Dec 30;38(22):e203.

Identificación genética de especie

Supplementary Table S4. Samples used in the development of the SPinDel profiling kit for identification of 30 eutherian species.

Species	n	Specimen	Origin/breed
Cat (<i>Felis catus</i>)	10	buccal swab	Portan (1), Siamese (1), calico (2), undetermined (6)
Cattle (<i>Bos taurus</i>)	10	liver	supermarket
Dog (<i>F. canis familiaris</i>)	10	blood	Dogo Argentino (4), Serra de Aires (3), mixed-breed dogs (3)
Goat (<i>Capra hircus</i>)	10	blood	Serrana (2), Serpentina (2), Bravia (2), Charroquina (2), Algaria (2)
Horse (<i>Equus caballus</i>)	2	blood	Iberian Peninsula
Human (<i>Homo sapiens</i>)	10	blood	Iberian Peninsula
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	10	liver	mixed strains
Pig (<i>Sus scrofa</i>)	12	blood, liver	supermarket (6), autochthonous Portuguese breeds (6)
Rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	10	blood, liver	domestic/supermarket (6), wild/Northern Portugal (4)
Sheep (<i>Ovis aries</i>)	10	blood, muscle	Montargana (2), Merino Pardo (2), Salsá (2), Campañica (2), Churra Algarvia (1), Churra de Terra Quente (1)

	1,4	1,7	1,5	1,5	1,6	1,0
<i>Sus scrofa</i> (Pig)						
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	1,2	1,0	1,1	1,5	1,5	1,4
<i>Bos taurus</i> (Cattle)	1,1	1,6	1,0	1,4	1,1	1,4

Carneiro J, Pereira F, Amorim A. *Mol Biol Biotechnol.* 2012; 23(6):1190-5.
 Pereira F, Carneiro J, Mathiasen R, van Aelst B, Pinto N, Quimbo L, Amorim A. *Nucleic Acids Res.* 2010 Dec 30;38(22):e203.
 Spanish and Portuguese Speaking Working Group of the International Society for Animal Genetics (ISAG-SP-PT) <http://www.ggp-ibp.org/comissao-sabaha/leitorico-cobabovino-gpib-ibp-82569e4e4e4e>

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

Applied Biosystems GeneAmp 2015-03-11-SPINDEL

The reference SPINDel profiles for the species:

Species	Markers	SPID2716	SPID1350	SPID639	SPID1051	SPID2975	SPID2777
el acervo (Fig)		14	17	13	13	16	10

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

SPINDel

Camero J, Pereira F, Amorim A. Mol Ecol Resour. 2012;12(8):1190-6.
 Pereira F, Camero J, Monteiro R, van Aach B, Pinto N, Guimão L, Amorim A. Hered. Andis Res. 2010;2(2):77-80.
 Spanish and Portuguese Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics (GEP-SP-D) <http://www.gep-82.org/portugueses-instituto-forense-como-convivo-gp-82>

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

STRs identification: Descripción del número de alelos identificados en distintas poblaciones para cada marcador microsatélite

Marker	Populations	1	2	3	4	5
SW1370		5	4	10	7	10
SW1824		5	3	8	6	10
SW1891		7	3	8	5	10
SW1904		7	4	9	8	12
SW21		4	4	4	4	9
SW2194		4	7	10	9	11
SW2519		4	2	7	4	11
SW2527		5	5	9	7	10
SW818		5	7	9	6	12
SW81829		5	6	9	8	12

Estudio intraespecífico, STRs tetraméricos. Individualización.

Linacre et al. 2011, Forensic Science International: Genetics, doi:10.1016/j.fsig.2010.10.017

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

Locus	Fluorescent label	Size (bp)	Sequence of primers (5'-3')*
SW24	FAM	19	F: CTT TGG GTG GAG TGT GTG C R: ATC CAA ATG CTG CAA GCG
SW936	HEX	21	F: TCT GGA GCT AGC ATA AGT GCC R: GTG CAA GTA CAC ATG CAG GG
S0355	HEX	26	F: TCT GGC TCC TAC ACT CCT TCT TGA TG R: GTT TGG GTG GGT GCT GAA AAA TAG GA
SW72	NED	18	F: ATC AGA ACA GTG CGC CGT R: TTT GAA AAT GGG GIG TTT CC

Forensic Science International: Genetics
Volume 9, March 2014, Pages 12-19
(8): 307-314.

Establishing a DNA identification system for pigs (*Sus scrofa*) using a multiplex STR amplification

Yu-Chih Lin^a, Hsing-Mei Hsieh^b, James Chun-I. Lee^c, Chung-Ting Hsiao^d, Der-Yuh Lin^e, Adrian Linacre^f, Li-Chin Tsai^g

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Identificación genética de especie

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

Int J Legal Med (2010) 124:277-285
DOI 10.1007/s00414-009-0196-z

TECHNICAL NOTE

Int J Legal Med, 2014, Jan;128(1):11-8. doi: 10.1007/s00414-013-0857-0. Epub 2013 Apr 24

Modular real-time PCR screening assay for common European animal families.

Nauw J¹, Lutz-Bonengel S, Sängler T, Schlauderer N, Schmidt U.
Jan Pomorski · Marta Lók · Wiesław Bogdanowicz

- Escena del crimen (especies domésticas)
- Tráfico de especies exóticas
- Dipteros (análisis PMI)
- Problema alimentario
- Microbiología forense

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

Gracias por su colaboración

DE TOXICOLOGÍA Y CIENCIAS FOREN
