

2006 GEP-ISFG collaborative exercise on mtDNA: reflections about interpretation, artefacts, and DNA mixtures

L. Prieto^{a,*}, A. Alonso^b, C. Alves^c, M. Crespillo^d, M. Montesino^a, A. Picornell^e, A. Brehm^f,
J.L. Ramírez^g, M.R. Whittle^h, M.J. Anjosⁱ, I. Boschi^j, J. Buj^k, M. Cerezo^l, S. Cardoso^m,
R. Cicarelliⁿ, D. Comas^o, D. Corach^p, C. Doutremepuich^q, R.M. Espinheira^r,
I. Fernández-Fernández^s, S. Filippini^t, Julia Garcia-Hirschfeld^b, A. González^u, B. Heinrichs^v,
A. Hernández^w, F.P.N. Leite^x, R.P. Lizarazo^y, A.M. López-Parra^z, M. López-Soto^{a1},
J.A. Lorente^{a2}, B. Mechoso^{a3}, I. Navarro^{a4}, S. Pagano^{a5}, J.J. Pestano^{a6}, J. Puente^{a7},
E. Raimondi^{a8}, A. Rodríguez-Quesada^{a9}, M.F. Terra-Pinheiro^{a10},
L. Vidal-Rioja^{a11}, C. Vullo^{a12}, A. Salas^l

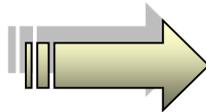
GEP-ISFG è uno studio collaborativo sul mtDNA

Lo scopo è aumentare la qualità e la standardizzazione dell'analisi mtDNA sia a livello tecnico che nell'interpretazione dei risultati.

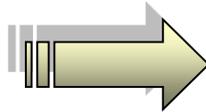
In questo studio sono stati analizzati 7 campioni:

- **M1-M4** campioni di sangue da un caso di maternità

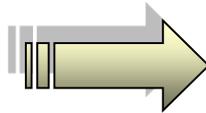
- **M5-M7** campioni forensi



M5 sangue



M6 saliva proveniente da M5 e da un donatore sconosciuto (50:50)



M7 capelli di donatore sconosciuto contaminati con saliva di M5

Number of participating laboratories in the mtDNA GEP-ISFG collaborative exercise of 2006-2007

Maternity case				Forensic case		
M1 (blood stain)	M2 (blood stain)	M3 (blood stain)	M4 (blood stain)	M5 (blood stain)	M6 (saliva mixture)	M7 (hair shaft contaminated with saliva)
36	36	40	36	36	26	33

ANALISI DEI CAMPIONI DI SANGUE (M1-M5)

Samples	Consensus haplotypes (16024–16365 and 73–340)	No. of laboratories/total laboratories (%)
M1–M2–M4	16188T 16311C 152C 263G 309.1C 315.1C	30/36 (83.3)
M3	93G 151T 263G 315.1C	33/40 (82.5)
M5	16051G 16189C 16270T 73G 146C 150T 263G 309.1C 315.1C	24/36 (66.7)

Il tasso di successo era moderato 77,5% a causa di errori in 4 laboratori (7, 9, 10, 12)

Lab ID	M1	M2	M3	M4	M5
7	16188T 16311C 152C 263G	16188T 16311C 152C 263G	16071C/T 93G 151T 263G	16188T 16311C 152C 263G	16051G 16189C 16720T 73G 92A 146C 150T 263G
9	16188T 16311C 152C 152C 263G				16189C 16270T 146C 150T 263G
Tasso di successo 77,5% → 88,2%					
10	16188T 16311C 152C 263G	16188T 16311C 152C 263G	93G 151T 263G	16188T 16311C 152C 263G	16051G 16189C 16270T 73G 146C 150T 263G
12	16188T 16311C 73N 152C 263G 309.1C 310N 311N 315.1C 320N	16188T 16311C 73N 152C 263G 309.1C 310N 311N 315.1C 320N	73N 93G 152T 263G 315.1C	16188T 16311C 73N 152C 263G 309.1C 310N 311N 315.1C 320N	16051G 16189T 16270T 73G 146Y 150C 263G 309.1C 315.1C 317N 320N

UTILIZZO DEL mtDNA NELLE TRACCE MISTE (M6-M7)

GEP-ISFG è stato il primo consorzio che ha utilizzato l'analisi del profilo di sequenziamento del mtDNA per studiare le tracce miste

Molti parametri influiscono sulla rilevazione di varianti nucleotidiche :

- i. tipo di tessuto che è presente nella miscela (n° di copie di mtDNA)
- ii. differenze nel contenuto del mtDNA tra i donatori
- iii. differenze nella quantità di fluidi di ogni donatore presenti nel campione
- iv. fattori tecnici che portano ad una errata interpretazione dei risultati

M5, unknown donor and M6 consensus haplotypes and out of consensus haplotypes reported for the M6 mixture

Donor	Haplotype
M5 donor	T 263G
Unknown donor	309.1C 315.1C
Consensus M6	H → 263G 315.1C
	16051R 16189Y 16270Y 73R 146Y 150Y 263G
	309.1C 315.1C

M6: 18/26 (69%) laboratori hanno riportato il corretto aplotipo

U5b →

I campioni di capelli sono spesso ricoperti da altri fluidi provenienti da differenti donatori, è importante uno studio morfologico antecedente all'analisi.

E' raccomandato lavare il campione prima di effettuare l'estrazione del DNA, per rimuovere possibili agenti contaminanti.

Donor	Haplotype
Consensus M7	263G 315.1C
Hair donor	263G 315.1C
Saliva donor	16051G 16189C 16270T 73G 146C 150T 263G 309.1C 315.1C

M7: 26/33 (78%) hanno riportato l'aplotipo consenso

1 laboratorio è riuscito a separare l'aplotipo proveniente dai capelli con quello della saliva

6 laboratori hanno riportato l'aplotipo non-consenso

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- ❖ Alcuni laboratori riportano solamente il match o i mismatch tra il campione di riferimento e il campione da analizzare, evitando ogni tipo di interpretazione statistica.
- ❖ Al contrario, altri laboratori riportano i risultati ottenuti, come il n° di match o le frequenze degli aplotipi, in specifici database (principalmente SWGDAM, EMPOP).
- ❖ Anche l'interpretazione delle differenze nucleotidiche tra aplotipi è diversa: alcuni laboratori considerano 2 aplotipi differenti se presentano 2 o più differenze nelle posizioni nucleotidiche (tasso di mutazione mitocondriale).
- ❖ In alcuni casi quando risulta difficile dare un risultato di esclusione/inclusione è necessario estendere l'analisi dei frammenti di mtDNA.

CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI IN RELAZIONE ALLA METODOLOGIA

1-Quantizzazione del mtDNA contenuto nei campioni analizzati:

- Il risultato influisce sulla scelta della strategia migliore per l'analisi a posteriori
- Valutare la quantità di mtDNA per la PCR
- Importante per rilevare contaminazioni (soprattutto in campioni con poco DNA)
- Alcuni protocolli di quantizzazione danno informazioni sulla presenza di inibitori della PCR
- Degradazione mtDNA

2-Visualizzazione prodotti di PCR prima della reazione di sequenziamento:

- Migliorare la reazione di estensione
- Riduzione artefatti nell'elettroferogramma

CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI IN RELAZIONE ALLA METODOLOGIA

3-**Scelta dei frammenti** da analizzare del **mtDNA**:

- Ristretta ai classici HVS-I e HVS-II (in alcuni casi è limitativa)
- Analisi più ampia per aumentare il potere di discriminazione del mtDNA
- Ricerca di polimorfismi informativi per un aplogruppo
- Analisi SNPs regioni codificanti

4-Analisi dei fluidi misti con **markers genetici non mitocondriali**:

- Markers autosomici più informativi
- Utilizzo dei miniSTRs

COME EVITARE GLI ERRORI

Type of error	Cause	Number of times
Position omitted	Clerical error	10
	Poor quality electropherograms/only one electropherogram per region	8
	Undetermined (no electros available)	14
Incorrect position reported	Phantom mutation	6
	Poor quality electropherograms	6
Typing error	Confusion	6
Nomenclature	-	2
Unresolved bases (Ns)	Poor purification	2
	Poor quality electros	2
	Length heteroplasmy and only one strand sequenced	3
Different haplotype	Unwashed hair (not decontaminated)	2
M6 mixture not detected	Poor quality electropherograms	1
	Undetermined (no electros available)	1
Mixed bases not reported	Poor quality electros	4

COME EVITARE GLI ERRORI

1-Per leggere interamente entrambi i filamenti L e H delle regioni HVS-I (16189) e HVS-II (310), in presenza di eteroplasmia, è necessario l'uso di primers interni per il sequenziamento.

La % di successo per M1-M2-M3 e M4 (30/36) è superiore rispetto a M5 (24/36), questo può essere spiegato per la presenza T16189C nel campione 5 che produce un instabile uno stretch di poly-C.

2-Errori nella lettura in automatico degli elettroferogrammi (l'estremità 5')

3- Errori di documentazione e di nomenclatura:

per correggere tali errori gli aplotipi dovrebbero essere controllati da 2 analisti in modo indipendente.

4- Controllo di qualità a posteriori:

1. Verificare se il polimorfismo osservato nell'aplotipo è riportato in letteratura o in qualche database.
2. Confrontare un aplotipo dal punto di vista filogenetico potrebbe aiutare a rilevare errori comuni e contaminazioni.

SCOPO del GEP-ISFG CONSORTIUM

Le conoscenze acquisite riguardano le più comuni cause di errori e aiutano a prevenire gli errori più comuni nei laboratori con maggior esperienza

- ✓ Bassa qualità degli elettroferogrammi (estremità 5' e 3')
- ✓ Errori nell'interpretazione dei risultati
- ✓ Errori di trascrizione dei risultati
- ✓ Problemi di contaminazione

**IMPORTANZA DELL'APPROCCIO SPERIMENTALE
E DEI PROTOCOLLI UTILIZZATI**

