

Vzdělávání v oblasti forenzní genetiky reg. č. CZ.1.07/2.3.00/09.0080

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Mezinárodní doporučení pro analýzu Low Copy Number/ Low Template DNA

Zpracoval: Vlastimil Stenzl

Historie LCN/LTDNA

První pokusy:

Van Oorschot R. et al. (1997) DNA fingerprints from fingerprints
Findlay, I. et al. (1997) DNA fingerprints from single cells

Zavedení do „rutinní“ praxe - FSS
Gill. et al. (2000) A investigation of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Definice LCN/LTDNA

Forenzní analýza velmi nízkého obsahu DNA ve vzorku

LCN (low copy number) – metody jak zvýšit počet kopií
LTDNA – typ zkoumaného vzorku

Hranice spolehlivosti (100pg?)

Kvalita vzorku DNA – možnosti interpretace

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Hlavní rysy LCN/LTDNA

Nerovnováha píků
v heterozygotních lokusech

Dropout alel

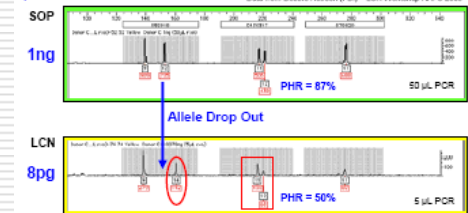
Dropin alel

Maskování reálných alel stutter píků

Všudypřítomné problémy spojené s kontaminací

Hlavní rysy LCN/LTDNA

Input DNA



Převzato – Butler -STRbase

esf Hlavní přístupy analýzy LCN/LTDNA

- Zvýšený počet cyklů v PCR (34?)
- Opakování amplifikace (2-3?)
- Použitá interpretace
 - minimální počet templátových úseků
 - stochastický efekt
 - kontinuální průběh signálu
 - kvantitativní hranice signálu

esf Stanovení limitů pro dropout

parametry:
Vědecké – kontinuální proces

Ekonomické a sociální
– musí nastavit nějaká autorita

T = LTDNA treshold (150) může být experimentálně ověřeno – ředící řada?
 LOD = detekční treshold (50)

P. Gill, et al., Forensic Sci. Int. Genet. (2009)

esf Stanovení pravděpodobnosti drop-out

Pachatel $G=AB$
 $Pr(D, h > T) \approx 0$
 $H_p \approx 0$
 $LR \approx 0$
 vyloučení

Stopa=B
 $Pr(D, h < T) \approx 1$
 $H_p \approx 1$
 $LR \gg 1$

esf Stanovení (pravděpodobnosti) drop-out

Zdrojem DNA je 1 donor.
 $LR=1/2fa$ pro homozygota
 $LR=1/2fab$ pro heterozygota

Gill et al. navrhuji počítat celkové LR s ohledem na pravděpodobnost, s jakou může dojít k dropoutu alely $p(D)$ – dá se stanovit experimentálně

X

Budowle et al. – dropout vychází z kvantity a kvality vzorku a nelze jej experimentálně měřit

Podobná situace je s pravděpodobností stutterů

esf Další faktory

- Vliv kvantifikace DNA – nepřesná na úrovni LCN/LTDNA
- Větší poměr píků při amplifikaci malého množství DNA
- Výskyt drop-in při výšce píků kolem T

esf Lze validovat LCN/LTDNA?

- Požadavek relevantnosti a spolehlivosti důkazu
 - Je prováděno empirické testování?
 - Je metoda publikována a recenzována?
 - Je známa chybovost?
 - Je metoda a teorie všeobecně přijímána vědeckou komunitou?

americké soudy: Frye, Kelly-Frye a Daubert standard

esf **Lze validovat LCN/LTDNA? – problém reprodukovatelnosti**

EVROPSKÁ UNIE

- Reprodukovatelnost je důležitý faktor spolehlivosti
- Kolik stejných výsledků je nutno při opakování experimentu provést, aby byl považován za spolehlivý?
- „V FSS je praxe provádět 2 opakování, v některých laboratořích v USA nejméně 3“
- Reálné problémy při soudním projednávání (THE QUEEN-v-SEAN HOEY - terrorist bombing in Omagh)

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

<http://www.xproexperts.co.uk/newsletters/feb08/R%20v%20Hoey.pdf>

esf Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.

EVROPSKÁ UNIE

- Laboratoře provádějící LCN/LTDNA analýzy by měly mít kontrolu nad sběrem stop z místa činu
- Společný problém – kontaminace, návaznost postupů
- Navržena dekontaminační opatření, která by měla být nastavena a kontrolována na národní úrovni (etylen oxid..)

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

esf Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.

EVROPSKÁ UNIE

- Všechny vzorky DNA, které budou využity v rámci důkazního řízení, musí být kvantifikovány
- Personál laboratoří i policejní (nebo jiné) orgány, účastníci se procesu sběru a zpracování vzorků, musí být proškoleny
- Všechny složky musí používat DNA-free spotřební materiál

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

esf Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.

EVROPSKÁ UNIE

- Úroveň proškolení v problematice zpracování LCN/LTDNA vzorků je různá, „FSS je považováno za standard“??

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

esf Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.

EVROPSKÁ UNIE

- Kvantifikační analýza v případě LCN/LTDNA vyžaduje test na přítomnost inhibitorů – pokud se neprovádí, mohou se konečné výsledky v laboratořích lišit
- „Regulační autorita“ by měla kvantifikaci LCN/LTDNA vyžadovat


OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost





esf Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.

EVROPSKÁ UNIE


- Je proces LCN/LTDNA dostatečně zvalidován?
- Co má být od tohoto validačního procesu očekáváno?
- Základem je ředící řada (dostatečné opakování experimentu) – robustní data (B. Budowle – „z principu LCN/LTDNA není reprodučibilní takže nemůže být ani robustní“ vs použití Baesovského přístupu)
- Stejně ≠ identické (výsledky PCR)





OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

 Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.


- LCN/LTDNA je přijímáno oficiálně (kromě Anglie) právními systémy v Holandsku (34 cyklů PCR), na Novém Zélandu, ve Švýcarsku, Španělsku, Itálii, Německu, v Bosně a Hercegovině
- Oficiálně je přijímána ENFSI a EDNAP – chybí ale zatím přesnější experimentální validační data





 Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.
– transfer materiálu


- Primární a sekundární transport
- Vliv vlastností povrchu
- Vliv vnějšího prostředí a času na stabilitu DNA u touch-DNA vzorků.





V závěru je shrnuto 21 doporučení pro práci s LCN/LTDNA

 Caddy B, Taylor GR, Linacre AMT (2008)
A review of the science of low template DNA analysis.


   





- LCN/LTDNA je často považována za všelék X reálná úspěšnost je zanedbatelná
- Chybí statistiky tzv. „pozitivních výsledků“

 **Comments on the review of low copy number testing**
Jason Gilder & Roger Koppl & Irving Kornfield & Dan Krane & Laurence Mueller & William Thompson


   





- Závěry studie jsou v rozporu s doporučeními v mnoha ohledech
- „Bez jednoznačných doporučení, jak výsledky interpretovat, není možné navrhnout, jak celý proces validovat“ – retrospektivně?
- Recenze vychází z dat laboratoří (soukromých), které poskytují výsledky právnímu systému – závěry vyznívají většinou kladně.
- S kritiky LCN/LTDNA shodně v otázce nepochopení závěrů na základě neexistence jasných limitů
- Rozpor v závěrech - LCN/LTDNA by nemělo být používáno v případech „zprošťování viny“ X jasný důvod použití v závěrech chybi
- Jisté záruky nabízí použití LCN/LTDNA pro **operativní účely** a tam, kde je možné **vyložit přítomnost jiného zdroje** biolog. materiálu (kostí, zubní kartáčky...)

 **Současný stav**


   

- Regionální rozpolcenost v názorech na LCN
- Soudy v ČR tuto problematiku neřeší
- Soudy ve světě potřebují odkazy na spolehlivé validace x odborné časopisy nemají zájem je uveřejňovat x dobře strážené know-how
- Doporučení mezinárodních organizací (SWGAM a ISFG) jsou někdy příliš obecná a ne vždy shodná

 **Kritérium chybovosti**





- Požadavek soudu na známé kvantitativní vyjádření chybovosti
- Různé složky chybovosti (např. výška píků, stáří případu, záměna vzorků)
- Způsoby zacházení se zkušební položkou před laboratorním zpracováním
- Interpretace – mohou být nereprodukovatelné výsledky spolehlivé? 3x PCR? Nutná rovnováha mezi cenou a účelností.
- J Forensic Sci. 2009 Jul;54(4):798-809. Epub 2009 May 26.
A perspective on errors, bias, and interpretation in the forensic sciences and direction for continuing advancement.



Laboratorní limity, které může validace ozřejmit soudům

- Kontaminace
 - gross kontaminace
 - dropin kontaminace
- Variabilita stutterů
- Četnost dropoutů a nerovnováha píků

Laboratorní riziko může být validací definováno
Otázka četnosti revalidace
Je žádoucí validace zveřejňovat?








Doporučení ISFG pro interpretaci LCN/LTDNA

- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J.
 An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA.
 Forensic Sci Int. 2000;112:17-40
- Navrženo na základě analýz nedegradované DNA z jednoho donora – v případě mixů (kontaminace) a degradované DNA jsou doporučení problematicky aplikovatelná

















Doporučení ISFG pro směsné vzorky/LCN/LTDNA

- Směsi by měly být hodnoceny pomocí LR, RMNE by nemělo být používáno v případě „nejednoznačných“ profilů
- Angl. alternativa
 - *major/minor varianta*
 - *možnost odečtení neznámého donora (maskování minor složky)*
- V případě LCN/LTDNA se týká především minor složky






Doporučení ISFG pro směsné vzorky/LCN/LTDNA

- I v případě, že právní systém nepoužívá LR jako interpretační metodu, měli by forenzní experti podporovat zlepšování standardů vědeckého usuzování v justici a LR prosazovat
- Pro LCN/LTDNA platí v plném rozsahu





Doporučení ISFG pro směsné vzorky/LCN/LTDNA

- LR je počítáno na základě metody Evett et al. a Weir et al. (základem je výška píků)
- Při eliminaci některých genotypů na základě výšky nebo plochy píků by se mělo vycházet z metody dle Clayton et al.

Doporučení ISFG pro směsné vzorky/LCN/LTDNA

- Pravděpodobnost důkazu za předpokladu platnosti Hp nebo Hd
- Pokud jsou minor alely nerozlišitelné od stutterů, měly by být zahrnuty do hodnocení, i pokud nepodporují Hp
- Každá laboratoř by měla mít zvalidované hodnoty stutterů u jednotlivých lokusů

Validity of Low Copy Number Typing and Applications to Forensic Science
Bruce Budowle, Arthur, J. Eisenberg, Angela van Daal

Co je nutné zvažovat při práci s LCN/LTDNA

- ☐ Školení a vzdělávání
- ☐ Manipulace a sběr stop
- ☐ Důvody použití LCN/LTDNA (zpravodajství, kosti)
- ☐ Spolehlivost dostupných LCN/LTDNA metod
- ☐ Opakování analýz
- ☐ Interpretace a meze nejistoty
- ☐ Přítomnost kontaminace ve spotřebních materiálech
- ☐ Psaní protokolů a zpráv (měli by být zmíněny limity LCN/LTDNA)
- ☐ Validační experimenty
- ☐ Robustní a spolehlivá kvantifikační metoda (Quantifiler nebo multicopy?)
- ☐ Zvážení použití jiných metod (miniplexy, mtDNA, SNP)
- ☐ Dekontaminační opatření - Comparison of the Effects of Sterilisation Techniques on Subsequent DNA Profiling, International Journal of Legal Medicine, Volume:122, Issue:1, 2008, 29-33.

Možnosti zvýšení citlivosti LCN/LTDNA

- ☐ Zvýšení počtu PCR cyklů
- ☐ Nested PCR
- ☐ Redukce objemu PCR
- ☐ Celogenomová amplifikace (Whole genome amplification)
- ☐ Zesílení fluorescenčního signálu
- ☐ Použití čistějšího formamidu pro CE
- ☐ Post-PCR clean-up k odstranění iontů
- ☐ Zvýšení času nástřiku vzorku

Doporučení ohledně low copy number/low template DNA

problém	Doporučení V. Stenzl
definice	Analyza velmi malého množství DNA především latentních biologických stop a degradovaného biolog. materiálu (dále označováno low template - LTDNA)
Analyza LCN začíná již mimo místo tr. činu	LTDNA musí být vnímáno jako komplexní problém postupující všemi částmi důkazního řízení
Odpovídající společný materiál	K odběru latentních biologických stop pro LTDNA je nutné používat odpovídající spotřební materiál
Ochrana před kontaminováním stop	Při odběru latentních biologických stop musí pracovník používat maximální ochranu (ochrana hlavy, rouška, jednorázový oblek, rukavice)
Stav laboratoře	Vzorkování latentních biologických stop pro LTDNA smí být prováděno pouze v laboratoři s kontrolovaným monitoringem prostředí
Izolace DNA	Izolaci vzorků LTDNA je nutné provádět zásadně odděleně od izolace standardních stop a srovnávacích materiálů
Kontrola izolace	Spolehlivost izolačního procesu LTDNA vzorků je nutné zajistit vložením pozitivní a negativní kontroly (platí i pro high copy DNA)

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Doporučení ohledně low copy number/low template DNA

kvantifikace	Laboratoř musí při zpracování LTDNA vzorků používat účinnou kvantifikační metodu
validace	Laboratoř musí při zpracování LTDNA vzorků vycházet z vlastního validačního studiu, která stanoví limity detekce v závislosti na kvantifikaci vzorku, analýzu stuterů pro jednotlivé lokusy, dropout threshold, a nerovnováhu alel heterozygotů. Validační experiment vychází z řady vzorku o známé koncentraci
Limity detekce	Laboratoř musí vést záznamy o pravidelné kalibraci a údržbě přístrojů. Pokud vyprší lhůta kalibrace přístroje, nesmí být pro analýzu LTDNA vzorků používán
amplifikace	Celkový objem izolátu je nutné rozdělit na 3 díly a provést až 3 nezávislé PCR. Pro reportování alel při LTDNA analýze je nutné tuto alelu zachytit alespoň 2x, při zachování limitů detekce
interpretace	LTDNA profily by měly být hodnoceny pomocí LR, pokud není detekován stochastický efekt a nebo jsou stanoveny $p(C)$, $p(D)$ a $p(S)$ z relevantní validační studie a dále je znám počet kontributorů a jejich DNA profil, jinak je nutno vycházet z konsenzálního profilu a postupovat podle RMP nebo RMNE

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.