



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA
CONTAMINACIÓN RESIDUAL EN
LA PRÁCTICA FORENSE:
ANÁLISIS DEL *BACKGROUND* GENÉTICO**

Tesis Doctoral. Luis Francisco Hombreiro Noriega (2018)

Directora Ana María González Tizón

Departamento de Biología

Universidade da Coruña

La Dra. ANA MARÍA GONZÁLEZ TIZÓN profesora contratada doctora del Departamento de Biología de la Universidade da Coruña

INFORMA:

que el licenciado Luis Hombreiro Noriega del programa de doctorado de Biotecnología Avanzada, ha realizado en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias el trabajo con el título *Estudio descriptivo de la contaminación residual en la práctica forense: análisis del background genético* bajo mi supervisión. Considerándolo finalizado permito su presentación y para que conste firmamos la presente en A Coruña a 18 de marzo de 2018.

VºBª de la Directora

Fdo. Ana Mª González Tizón

El Doctorando

Fdo. Luis Hombreiro Noriega

Agradecimientos.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a las personas e Instituciones que han colaborado de una u otra forma en el desarrollo de este trabajo:

En primer lugar, mi enorme agradecimiento a Ana y Andrés, por la oportunidad que me han brindado en la realización de este trabajo y en la consecución de un proyecto iniciado muchos años atrás. Su cercanía personal, a veces digital, unida al apoyo y la tutela científica que me han regalado desde la distancia ha sido clave para finalizar este proyecto

En segundo lugar, agradecer al Cuerpo Nacional de Policía el poder disfrutar de la época profesional más emocionante de mi vida, conjugando mi pasión por la biología con mi vocación de servicio a la sociedad.

En tercer lugar, agradecer a la Universidade da Coruña la colaboración prestada no sólo en este trabajo, sino en el devenir diario de mi profesión, siempre impulsando el conocimiento de la aplicación práctica de la genética forense en el mundo académico, siempre colaborando con los profesionales de mi Institución que, además de trabajar por y para la sociedad, también desean mostrar a la misma los logros y avances que hace la Policía, su Policía.

En cuarto lugar, dedicarle este esfuerzo a mi niño, Luis, deseando que algún día lea este trabajo y esperando transmitirle el amor incondicional hacia la ciencia y la firme creencia de que en la investigación científica está todo el poder de la naturaleza, tan sólo hay que aprender a manejarlo en beneficio de la sociedad.

Por último, y no por ello con menos valor, siempre existe un motivo que guía un trabajo, pero sobre todo existe un apoyo y una ayuda que permite realizarlo, y ese cariñoso, eterno y constante apoyo y aliento es el de Sofía, mi esposa, que no ha dudado ni un momento en empujar cada uno de los pasos que he dado en este camino.

A todos ellos, gracias, muchas gracias.

Luis Francisco Hombreiro Noriega

"La constancia vence con frecuencia al talento y al arte"

Cicerón

Índice

1. Introducción	9
1.1. La Genética Forense: Historia, desarrollo y regulación legal	11
1.1.1. Introducción a la Genética Forense	11
1.1.2. La PCR y los Microsatélites en la investigación criminal	13
1.1.3. <i>Kits multiplex</i> actuales	14
1.1.4. SNPs: breve descripción y utilidades	16
1.1.5. Estandarización y calidad	17
1.1.6. Análisis estadístico de los resultados	21
1.1.7. Bases de Datos en Genética Forense	24
1.1.8. Regulación legal y régimen jurídico de aplicación en España	27
1.2. La Práctica Forense	29
1.2.1. Actividades en la escena del crimen. La recogida de vestigios	29
1.2.1.1. Cuestiones previas al procesamiento de la escena del delito	29
1.2.1.2. El procesamiento de la escena del delito	31
1.2.1.3. Embalaje, custodia y remisión de efectos	32
1.2.2.- Protocolos de recogida de muestras	33
1.2.2.1. Recogida de indicios biológicos en el lugar de los hechos	33
1.2.2.2. Recogida de indicios biológicos sobre el cuerpo humano	35
1.2.3.- La cadena de custodia	36
1.2.4.- Secuencia de análisis en un Laboratorio de Genética Forense	37
1.2.5.- La interpretación de perfiles y su problemática	40
1.2.6.- Resultados obtenidos en la práctica forense. Las trazas biológicas por contacto	45
1.3. La contaminación	49
1.3.1. Definición y cuestiones previas	49
1.3.2. La contaminación previa al delito	50
1.3.3. La contaminación durante el procesado de la escena	51
1.3.4. La contaminación durante el análisis en el laboratorio	53
1.3.5. La transferencia de material genético en la práctica forense	55
1.3.6. Breve referencia a los casos antiguos	56
1.3.7. La evaluación estadística de la contaminación	56
1.3.8. El estudio de la contaminación genética. Situación actual	57
2. Objetivos	59
3. Material y Métodos	63
3.1 Instalaciones	65

3.2. Toma de muestras mediante frotis	65
3.3. Medidas de asepsia y prevención en las instalaciones	65
3.4. Procedimientos Técnicos de Análisis	66
3.4.1. PTA-1.: Inmunoensayo de detección de hemoglobina humana	66
3.4.2. PTA-2.: Inmunoensayo de detección del antígeno prostático	67
3.4.3. PTA-3.: Test de certeza de la presencia de espermatozoides	68
3.4.4. PTA-4.: Extracción orgánica y purificación de ADN por filtración	69
3.4.5. PTA-5.: Extracción diferencial de fracciones haploide y diploide en esperma	72
3.4.6. PTA-6: Extracción y purificación mecánica de ADN mediante robot	74
3.4.7. PTA-7.: Cuantificación de ADN nuclear	76
3.4.8. PTA-8.: Análisis de STRs	79
4. Diseño experimental y Resultados	99
Estudio A.: Detección de contaminación previa a la escena del delito	101
A.1.: El cuerpo humano como foco de contaminación o vector de transferencia secundaria de ADN	101
A.1.1.: Diseño experimental bajo condiciones de laboratorio	101
A.1.2.: Casuística real	104
A.2.: La persistencia de restos biológicos sobre elementos balísticos detonados y sin detonar	108
A.2.1.: Estudio de la persistencia de restos por fricción	109
A.2.2.: Estudio de la persistencia de restos por fricción en cartuchos sometidos a condiciones extremas de temperatura	110
A.3.: Estudio de restos biológicos sobre efectos antiguos	114
A.3.1. Estudio de los restos biológicos en colillas depositados 7 años antes de su recogida y análisis	115
A.3.2. Estudio de los restos biológicos obtenidos de uñas sometidas a condiciones extremas de conservación durante elevados períodos de tiempo antes de su recogida y envío a Laboratorio para su análisis.	116
A.3.3. Estudio de la persistencia de restos biológicos durante un elevado período de tiempo en condiciones experimentales sobre armas blancas utilizadas con violencia sobre superficies resistentes	119
A.3.4. Estudio de la persistencia de restos biológicos en condiciones experimentales sobre el teclado de una máquina de escribir tras un período de tiempo de diez años desde el depósito de los vestigios hasta su recogida y análisis	122

A.3.5. Estudio de la persistencia de restos biológicos en condiciones experimentales sobre el interior de los dediles de unos guantes tras un período de tiempo de seis años desde el depósito de los vestigios hasta su recogida y análisis	126
Estudio B.: En relación con la detección de contaminación durante el procesado de la escena del delito	128
B.1.: Resultados del estudio sobre contaminación residual	132
B.2.: Resultados del estudio de contaminación durante la manipulación de las evidencias. Evaluación de la transferencia de restos biológicos	138
Estudio C.: En relación con la detección de contaminación durante la marcha analítica en el Laboratorio de Genética Forense	156
5. Discusión	169
6. Conclusiones	187
7. Referencias bibliográficas	193
8. Listado de Tampones	211
9. Listado de acrónimos y abreviaturas	215
10. Listado de figuras y tablas	219

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La genética forense: historia, desarrollo y regulación legal

1.1.1. Introducción a la genética forense

La ciencia forense, de acuerdo con la *Forensic Science Society* del Reino Unido, se define como la aplicación de los conocimientos científicos a cuestiones legales.

El ADN humano cumple varios principios que le otorgan un gran valor en el ámbito procesal - penal, en primer lugar, *El Principio de Universalidad*, es decir, que todas las células de un organismo presentan el mismo genoma, pudiendo existir mutaciones somáticas como casos excepcionales, que podrían ser estimados en términos probabilísticos con una afectación insignificante. En segundo lugar, *El Principio de Diversidad*, ya que los diferentes individuos de una población presentan diferente genoma, con la salvedad de los gemelos univitelinos. En tercer lugar, *El Principio de Estabilidad*, que implica unas condiciones de estabilidad muy altas del material genético, en el organismo y en la transmisión genética entre generaciones, lo que resulta de crucial importancia en el estudio de las evidencias en criminalística.

El análisis de la variabilidad genética humana posibilitó la individualización de personas, aplicable entre otros campos, a las investigaciones criminales y judiciales, así como a la identificación de cadáveres.

En las dos últimas décadas, la genética forense se ha convertido en una prueba clave en múltiples procesos penales y civiles. Con su capacidad para confirmar o eliminar a un sospechoso, así como para determinar relaciones de parentesco, supone para el proceso penal y civil un nuevo y valioso medio para resolver delitos, identificar cadáveres y restos humanos y otras cuestiones de ámbito civil. En el ámbito puramente penal permite analizar estrategias delictivas e identificar autores, mejorando la gestión judicial y policial de los diferentes asuntos, dotando de más prestigio y seguridad a la Administración de Justicia en los diferentes países, sin obviar el notable impacto social y ético que supone su uso y el acceso al mismo.

En la historia de la ciencia hay descubrimientos que han supuesto avances sobre una evidencia o hipótesis previamente establecidas, de forma aditiva y ha habido cambios trascendentes que han supuesto una modificación total de los paradigmas científicos, que han implicado cambios radicales en los conceptos y en las organizaciones científicas.

En la historia de la genética molecular pueden citarse algunos de estos cambios disruptivos:

El primero, cuando James Watson y Francis Crick desarrollaron el modelo de estructura en doble hélice del ADN (Watson y Crick, 1953), iniciándose una nueva era en la genética.

El segundo, el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por el Kary Mullis, haciendo de la amplificación del material genético una de las técnicas científicas fundamentales (Mullis y Faloona, 1987). Desde sus primeras aplicaciones, la técnica de la PCR ha incrementado de forma drástica su especificidad, accediendo a la amplificación de regiones cada vez más pequeñas, concretas y específicas, así como su sensibilidad, disminuyendo la cantidad inicial de ADN requerida para el éxito de la reacción.

El descubrimiento de los polimorfismos hipervariables del ADN y su amplio abanico de aplicaciones fue otro cambio que modificó por completo las ciencias forenses, pudiendo afirmar que existió un antes y un después en la criminalística tras este hallazgo.

Los avances continuos en nuevas técnicas *multiplex* han permitido también la realización de la PCR en múltiples marcadores de forma simultánea, lo que ha reducido los tiempos empleados en la técnica y en la obtención de resultados (Gill *et al.*, 2006b).

El estudio de la variabilidad genética humana como medio de identificación se inició analizando antígenos eritrocitarios humanos (Hirschfeld y Hirschfeld, 1919) y posteriormente se estudiaron proteínas séricas, enzimas leucocitarias y eritrocitarias y del sistema HLA (antígenos leucocitarios).

En 1985 Sir Alec Jeffreys y su equipo (Jeffreys y Pena, 1993) describieron un método de identificación que denominaron *DNA fingerprinting* o huella genética. Tras resolver un problema de inmigración por medio de esta tecnología (Jeffreys *et al.*, 1985), fue aplicada en un tribunal británico en un caso de investigación biológica de la paternidad (Gill y Werret, 1987). En el año 1988 el Ministerio del Interior Británico, así como el de Asuntos Exteriores y *Commonwealth* ratificaron el uso de esta tecnología para la resolución de casos de inmigración en base al estudio de las relaciones familiares (Home Office London, 1988).

En los últimos treinta años se ha incrementado el número y la tipología de evidencias susceptibles de análisis por esta técnica, aumentando enormemente las tasas de éxito sobre el análisis de vestigios biológicos complejos.

1.1.2. La reacción en cadena de la polimerasa y los microsatélites en la investigación criminal

Alec Jeffreys, en 1985, definió con el término *DNA fingerprint* o huella genética el hallazgo de un patrón específico de repetición en el gen de la mioglobina que variaba entre individuos y que permitía identificarlos. Este fue un cambio disruptivo marcando el inicio de una nueva era en la identificación humana.

A medida que la genética molecular investigaba el genoma humano, se encontraban tramos cortos de ADN que eran diferentes de una persona a otra, descubriendo zonas polimórficas que variaban en la secuencia u orden de bases nitrogenadas. Estas variaciones de secuencia recibieron el nombre de polimorfismos. Las diferentes zonas en las que existían estos polimorfismos permitió clasificaciones ya superadas entre zonas codificantes y zonas no codificantes del genoma y entre polimorfismos de secuencia y de longitud.

El análisis detallado del genoma humano ha revelado numerosas categorías de secuencias de ADN no funcional o no expresivo, muchas de las cuales son diversas formas de ADN repetitivo. Una categoría importante de ADN repetitivo está constituida por el ADN repetido en tándem, formado por bloques que contienen una secuencia común de nucleótidos que se repiten uno a continuación de los otros un determinado número de veces. Estas secuencias están distribuidas a lo largo de todo el genoma y su polimorfismo es debido a cambios en el número de veces que se repite una secuencia núcleo o motivo de repetición (*core* o *repeat*).

Los polimorfismos de longitud se pueden clasificar en varios grupos dependiendo del tamaño del núcleo de repetición, definiendo los minisatélites o *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) si el núcleo está formado por más de siete pares de bases y los polimorfismos que más éxito han tenido en la Genética Forense, los microsatélites o *Short Tandem Repeats* (STR), caracterizados por un núcleo que contiene de dos a siete pares de bases y cuentan con alelos de un tamaño aproximado de 80 a 400 pares de bases. La variedad de alelos presentes en la población es tan grande que se puede obtener un alto grado de discriminación entre los individuos de una población cuando se examinan varios *loci* a la vez.

La sensibilidad de estos marcadores permite el análisis incluso en muestras con cierto grado de degradación, la estabilidad, la facilidad técnica en la determinación del tamaño de los alelos, la reproducibilidad y la posibilidad de realizar el análisis de varios marcadores en un sólo ensayo analítico son algunos de los parámetros que han hecho de los STRs los marcadores elegidos en la mayor parte de las aplicaciones de

la genética forense, fundamentalmente en las que requieren automatización y alimentación de bases de datos.

Unida a esta facilidad de análisis, otros criterios han permitido seleccionar los *loci* utilizados de forma estandarizada por los laboratorios de genética forense, tales como el elevado poder de discriminación, la ubicación cromosómica diferente para evitar grupos de ligamiento, la escasa o nula tendencia a la producción de *stutters*, los bajos índices de mutación y los rangos de longitud alélica entre 90 y 500 pares de bases (Gill *et al.*, 1994).

El desarrollo de la técnica de la PCR por el Kary Mullis, tuvo como resultado el análisis de los microsatélites por este sistema, lo que permitió obtener alelos discretos debido a su pequeño tamaño, pudiendo detectar hasta diferencias en un sólo par de bases, y facilitando la comparación de resultados entre laboratorios.

La PCR *multiplex* es una variante de PCR que consiste en la amplificación simultánea de varios loci de interés en una sola reacción mediante la utilización de varias parejas de *primers*. Desde la primera vez que fue descrita por Chamberlain *et al.*, (1988), este método se ha aplicado en múltiples áreas del análisis de ADN, como en el análisis de deleciones, mutaciones y polimorfismos, así como en ensayos cuantitativos y PCR de transcripción inversa. El primer *kit* comercial para genotipado de STRs en una única reacción fue comercializado a finales de los años 90.

En la década de los setenta los laboratorios de genética forense iniciaron la secuenciación del ADN con metodología manual en geles de acrilamida, desarrollándose en la década de los noventa las técnicas semiautomatizadas de secuenciación, que aportaron importantes ventajas al tipado de los marcadores microsatélites. Los productos de la PCR marcados con fluorocromos podían ser ya detectados mediante electroforesis capilar, realizando la lectura de los resultados con escáner de fluorescencia (Schumm *et al.*, 1997) y la interpretación de los mismos con *software* informático para la designación automática de los alelos, obteniendo el perfil genético de cada muestra.

1.1.3. Kits *multiplex* actuales

El uso de los marcadores STRs para el genotipado en laboratorios de genética forense está ampliamente extendido. Su elevado poder de discriminación e individualización, un análisis estadístico ampliamente estudiado y desarrollado, así como un alto grado de estandarización y su uso continuado en la alimentación de las bases de datos a nivel mundial, han hecho de los microsatélites los marcadores genómicos por excelencia en este campo.

Este hecho ha llevado a varias casas comerciales (tales como *Life Technologies - Applied Biosystems* y *Promega*) a desarrollar *kits* de amplificación a través de PCR *multiplex* perfeccionadas, altamente sensibles y que han incluido progresivamente un mayor número de marcadores.

En la última década los *kits* comerciales de amplificación de STRs se han caracterizado por disponer de los trece marcadores del sistema CODIS (*Combined DNA Index System*), como patrón estándar de amplificación *multiplex*. de forma progresiva se han incluido nuevos marcadores para aumentar las posibilidades analíticas en caso de muestras degradadas en las que alguno o algunos de los marcadores no tenían una amplificación positiva. En los últimos años se han introducido en las reacciones *multiplex* marcadores mini - STR, de muy pequeño tamaño, muy eficaces analíticamente en casos de alta degradación del material genético a amplificar.

Esta alta sensibilidad permitió también mejorar las analíticas de las muestras con una escasa cantidad de ADN molde, denominadas *Low Level DNA* (LLDNA) (Gill, 2001). De esta forma, se ha llegado a disponer un elevado número de marcadores en el genotipado que permiten el análisis de todo tipo de muestras complejas, aportando estudios estadísticos con frecuencias alélicas y poblacionales de una magnitud cada vez más alta, que permite presentar resultados más completos a los diferentes tribunales de justicia, órgano receptor final de este tipo de estudios de genética forense.

A finales del año 2012 y en el inicio de una nueva era en lo que se refiere a los *kits* comerciales de análisis de ADN con fines forenses, las casas fabricantes han creado reacciones *multiplex* de más de 20 marcadores, incluso llegando a 25 marcadores STRs. Estos sistemas globales de análisis, que incluyen todos los marcadores autosómicos útiles a nivel forense que han sido utilizados en los diferentes países, introducen también el análisis conjunto de algún marcador presente en cromosomas sexuales, tales como STRs específicos de cromosoma Y.

En resumen, estos sistemas pretenden paliar las deficiencias que pudiesen existir en los *kits* anteriores y por otro lado, hacen un ejercicio de estandarización global de marcadores analizados a nivel mundial que permite, actualmente, realizar cotejos entre laboratorios de muy diferentes países que podían, hasta la actualidad, analizar marcadores STR diferentes o bien con muy pocos marcadores en común.

Por un lado y dado el elevadísimo número de marcadores, este tipo de *kits* de análisis global permite obtener unas frecuencias de cada perfil genético de órdenes

muy superiores a los actuales en los cálculos estadísticos poblacionales. En segundo lugar, incluso en muestras degradadas o de bajo número de copias en las que algunos marcadores no amplifiquen, se sigue disponiendo de un gran número de STRs para la evaluación estadística y de individualización del perfil genético. En tercer lugar, algunos problemas puntuales de los análisis debidos a mutaciones en el marcador de sexo y que podían, en casos excepcionales, inducir a error en la asignación de sexo, son eliminados al introducir otros marcadores de sexo masculino específicamente a través de Y-STRs.

1.1.4. Polimorfismos de nucleótido único: breve descripción y utilidades

Los polimorfismos de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) son la forma más sencilla de polimorfismo genético ya que consisten en el cambio de un sólo nucleótido en el contexto de una secuencia genética (Symanen, 2001; Sánchez *et al.*, 2006). Se distribuyen de manera heterogénea en el genoma humano.

Si bien la estadística o rango de frecuencias que se obtiene de un SNP no es comparable al de un STR, utilizando una batería de al menos 50 marcadores podría obtenerse una frecuencia con valor totalmente identificativo de un perfil genético en la población (Gill, 2001), con la ventaja del poder de análisis en muestras forenses complejas, puesto que es improbable que la degradación de una muestra pueda afectar a componentes alélicos de un solo par de bases.

Se han descrito varios millones de SNPs distribuidos por todos los cromosomas humanos, estimándose que su frecuencia media, aunque con grandes variaciones según cromosomas y regiones dentro de ellos, es de 1 SNP cada 500-1000 nucleótidos. Es por ello que existe una gran cantidad, muy superior al número de STRs descritos en la actualidad con poder de discriminación forense. Este tipo de polimorfismo tiene una gran importancia biológica, ya que determinan la mayor parte de la variabilidad genética de los individuos, causando muchas de las diferencias fenotípicas de los mismos. Su mecanismo de formación pudiera tratarse de mutaciones puntuales acaecidas en diferentes momentos de la historia evolutiva de la especie y que en su momento fueron estabilizadas en el genoma humano por conferir algún tipo de ventaja adaptativa al medio en ese momento. Desde el punto de vista médico (genética clínica) también tienen una gran relevancia pues las diferentes alternativas de un determinado SNP pueden determinar, por ejemplo, diferente propensión a desarrollar una enfermedad, una mayor agresividad clínica de la misma o diferencias en la forma de responder al tratamiento.

Desde la perspectiva de la genética forense su estudio tiene especial interés porque, para muchos de ellos, las diferentes formas alternativas de los mismos aparecen con mucha mayor o menor frecuencia en las personas procedentes de determinadas regiones geográficas o con una ascendencia determinada. Por eso, su análisis puede ayudar a estimar probabilísticamente si una persona en estudio procede o no de un determinado origen geográfico y comparar esta información con la de las otras personas (Jorde *et al.*, 2000). Este tipo de características de origen biogeográfico también han sido descritas en estudios con STRs (Phillips, 2013) pero no tienen la eficiencia de los SNPs. Existen otros rasgos codificantes determinados por SNPs que pueden valorarse de forma porcentual.

Adicionalmente, tienen la ventaja de que, al ser estructuralmente tan sencillos (un solo nucleótido), suelen ser identificables incluso en situaciones en las que el ADN de la muestra está muy degradado.

Una última característica de gran importancia es su capacidad para estimar la probabilidad de la presencia de determinados rasgos físicos, tales como el color de pelo, el color de ojos y otros rasgos faciales y conductuales (Kanetsky *et al.*, 2002; Frudakis *et al.*, 2003; Sulem *et al.*, 2007; Beaumont *et al.*, 2008; Eiberg *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; 2010; 2012; Medland *et al.*, 2009; Valenzuela *et al.*, 2010; Paternoster *et al.*, 2012; Hombreiro 2015), si bien esta última opción de análisis supone el acceso a zonas informativas del ADN, cuestión que en la actualidad se está implementando en los estudios forenses de casos criminales pero que presenta en la actualidad una discusión ético - jurídica caracterizada por la falta de una legislación o regulación avanzada en nuestro país.

1.1.5. Estandarización y calidad

Debido al desarrollo de la genética forense, los esfuerzos de los laboratorios se han dirigido no sólo hacia la innovación metodológica sino hacia la estandarización, particularmente en EEUU y Europa.

La gestión de los controles de calidad exige la existencia de estándares acordados entre laboratorios forenses y su uso mejora y perfecciona, además, los sistemas metodológicos y de análisis de los resultados, tales como el conocimiento exacto de las tasas de mutación en marcadores concretos, la tasa de aparición de microvariantes alélicas, estimación de frecuencias poblacionales, etc.

Estos estándares pueden ser técnicos y de procedimiento. Los primeros incluyen el tipo de marcadores genéticos que deben de ser usados, su nomenclatura,

la metodología válida para su análisis, los métodos estadísticos utilizados para la valoración de la prueba, la elaboración del informe final y su comunicación.

Los estándares de procedimiento incluyen todos los que sean necesarios para una acreditación de laboratorios y entre ellos podemos destacar: la organización del laboratorio, el personal (su formación, entrenamiento específico, experiencia, responsabilidades, etc.), la documentación y control de las pruebas, los protocolos de laboratorio, el calibrado y mantenimiento de equipos, los controles externos e internos y la frecuencia de los mismos.

La Real Academia Española define la calidad como “*la propiedad o conjunto de propiedades inherentes a una cosa, que permiten apreciarla como igual, mejor o peor que las restantes de su especie*”. Pero más allá de definiciones, la calidad debe ser entendida como un proceso global que integra todo lo que se refiere al objetivo de excelencia al que debe tender el laboratorio en su conjunto.

El intercambio intensificado de información relativa a las pruebas forenses y la cada vez mayor utilización de pruebas de un estado miembro de la Unión Europea (UE) en los procesos judiciales de otro, ponen de relieve la necesidad de establecer normas comunes para los prestadores de servicios forenses. Actualmente, la información procedente de procedimientos forenses en un estado miembro puede dar lugar a dudas en otros acerca de la manera en que se ha tratado un dato, los métodos utilizados y la forma en la que los resultados han sido interpretados. Es por ello que particularmente importante introducir normas comunes para los prestadores de servicios forenses, lo que implica la necesidad de obtención de una acreditación para la prestación de dicho servicio, avanzando hacia un intercambio de información forense totalmente seguro y eficaz dentro de la Unión Europea o bien entre los estados o instituciones de que se trate.

Una de las primeras referencias normativas en este campo fue el artículo 6 de la recomendación 92 del Consejo de Europa sobre “*Acreditación de laboratorios e instituciones y control del análisis de ADN*”, la cual establece: “*El análisis de ADN es un procedimiento científico sofisticado que sólo debe de ser realizado en laboratorios que posean los medios y experiencia adecuados*” (1992).

La iniciativa del Reino de Suecia y del Reino de España, adoptada en 2008 y plasmada en la Decisión Marco 2009/905/JAI del Consejo de Europa de 30 de noviembre de 2009, sobre acreditación de prestadores de servicios forenses que llevan a cabo actividades de laboratorio supuso el compromiso para la implantación de

un sistema de calidad y la acreditación progresiva de sus especialidades en el ámbito de las ciencias forenses.

La documentación de un sistema de calidad está compuesta por:

- El manual de calidad, que define la política de calidad y es aprobada por la alta dirección de la entidad.
- Los procedimientos generales, que son documentos de tipo organizativo y operativo que concretan los aspectos contemplados en el manual.
- Los procedimientos específicos o de ensayo que son documentos de tipo técnico que explican cómo se llevan a cabo las actividades de tipo analítico.

Esta Decisión marco 2009/905/JAI establece unos plazos para acreditar las actividades analíticas llevadas a cabo por servicios forenses acreditados en un estado miembro de la UE y tiene como finalidad garantizar que los resultados de las mismas sean reconocidos por las autoridades responsables de la prevención, la detección y la investigación de infracciones penales en calidad de resultados tan fiables como los de las actividades de laboratorio realizadas por los prestadores de servicios forenses acreditados con arreglo a la norma EN ISO/IEC 17025 en cualquier otro estado miembro de la UE.

Dicha finalidad se logrará garantizando que los prestadores de servicios forenses que llevan a cabo actividades de laboratorio sean acreditados por un organismo de acreditación nacional, que certifique que las actividades de laboratorio cumplen la norma EN ISO/IEC 17025, siendo ese organismo en España la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

La Entidad Nacional de Acreditación, ENAC, es una Entidad tutelada por la Administración Pública, independiente y sin ánimo de lucro, cuya organización y procedimientos de actuación se ajustan en todo momento a los criterios y las normas establecidas en la Unión Europea, así como a las guías y criterios de acreditación adoptados internacionalmente. Mediante auditorías periódicas se realiza una minuciosa evaluación de todos aquellos factores que contribuyen a la obtención de resultados fiables:

- Formación, entrenamiento y experiencia del personal.
- Equipos apropiados, calibrados y mantenidos correctamente.
- Instalaciones adecuadas.
- Procedimientos para asegurar la calidad de los resultados.
- Métodos y procedimientos de ensayo validados.

- Trazabilidad de la medida a patrones nacionales o internacionales.
- Procedimientos apropiados para el registro de resultados y la emisión de informes.

Todos estos factores están recogidos en la norma ISO/IEC 17025, reconocida y utilizada para evaluar laboratorios de ensayo en todo el mundo, y usada por ENAC como referencia en sus acreditaciones.

La acreditación es una herramienta concebida para generar confianza, una declaración formal de la competencia técnica de un laboratorio para realizar las actividades incluidas en el alcance de la misma.

La norma de referencia que los laboratorios de genética forense deben cumplir en España y en la que tienen que basar su sistema de calidad es la UNE EN ISO/IEC 17025:2005. Esta norma, de reconocimiento internacional, tiene todos los requisitos que deben cumplir los laboratorios que quieren demostrar que tienen un sistema de gestión y que tienen competencia técnica para emitir resultados válidos y fiables. Esta norma es de reconocimiento internacional (ISO/IEC 17025:2005).

Los conceptos más destacables de la norma UNE EN ISO/IEC 17025:2005 son:

- La reproducibilidad hace referencia a que los estudios o análisis deben ser comparables, garantizando la objetividad de los análisis y de los resultados.
- La trazabilidad hace referencia a la conservación de los registros de tipo técnico y los registros de calidad. Los registros técnicos son una acumulación de datos resultante de la realización de los análisis o ensayos: formularios, hojas de trabajo, identidad de los responsables, fechas, informes, etc. Estos registros deben posibilitar que el análisis o ensayo se pueda repetir en condiciones lo más cercanas a las originales.
- La validación de los métodos de trabajo, que hace referencia a la exigencia de la validación de todos los métodos de ensayo, que no es más que la confirmación, a través del examen y de evidencias objetivas, de que el método es adecuado al fin pretendido. De esta manera el laboratorio dispone de información fehaciente sobre el servicio que realiza y todos sus parámetros, tales como sensibilidad de las técnicas, robustez de las mismas, límites de detección, eficiencia analítica, etc.

1.1.6. Análisis estadístico de los resultados

La valoración estadística de los resultados supuso una revolución conceptual en la genética forense, otro cambio disruptivo que implicaba el paso de una pericia forense basada en el conocimiento y la experiencia, que aplicaba modelos heurísticos en los que lo importante era la opinión del perito, a un modelo basado en datos, en el que es posible cuantificar tanto el umbral de certidumbre como el de incertidumbre sobre la propia prueba.

El concepto de probabilidad tuvo un gran desarrollo en los siglos XVI y XVII con los estudios de Pascal, Fermat, Huygens y Bernouilli. En el siglo XIX se introdujo el concepto empírico de probabilidad de un suceso, como el límite al que tiende la frecuencia relativa del suceso que se presenta, si la repetición de dicho suceso fuese indefinida.

Con el paso del tiempo el concepto de probabilidad se ha impuesto como una medida de verosimilitud sobre la ocurrencia de un suceso en determinadas condiciones, es decir, como el necesario estándar de medición de la incertidumbre con la que se presenta una prueba pericial ante un Tribunal de Justicia.

Los marcadores usados en la genética forense son independientes entre sí, no conforman grupos de ligamiento, por lo que la frecuencia de un perfil genético será el producto de las frecuencias de los genotipos de cada marcador. Por tanto, para calcular la frecuencia de un perfil genético se han de calcular previamente la frecuencia de cada genotipo.

Con los marcadores que se analizan actualmente las frecuencias que se obtienen de los perfiles genéticos son del orden de 1 entre trillones, 1 entre cuatrillones y en alguna ocasión se ha llegado a cifras más altas. En los análisis de perfiles genéticos realizados sobre evidencias biológicas, se estudia habitualmente la correspondencia o no con otro perfil analizado previamente, por lo que pueden darse dos situaciones: la no coincidencia o la coincidencia.

En el primero de los casos se puede decir que el perfil de la evidencia no corresponde con el segundo perfil con un margen de error prácticamente despreciable y que depende, en todo caso, de la seguridad analítica del laboratorio; de ahí la importancia del uso de estándares, de los controles de calidad y de los métodos de prevención. Cuando la respuesta es la coincidencia plena, los tribunales de justicia esperan de la genética forense conocer la probabilidad de esa coincidencia o lo que es lo mismo, el margen de certidumbre de la prueba.

La necesidad de la valoración probabilística de la coincidencia de alelos en los marcadores nace del presupuesto de que no puede hablarse en ningún caso de incriminación con seguridad absoluta.

El teorema de Bayes sirve para conocer las probabilidades finales de un suceso a partir de las probabilidades iniciales, dada cierta información o informaciones adicionales obtenidas. El método proporciona una forma adecuada de incorporar información previa de un suceso, además de permitir incorporar información posterior cuando ésta sea accesible. Es fundamental que el perito presente el resultado de la pericia en forma de esta proporción, puesto que circunscribe, además, su propia función.

Desde un punto de vista matemático - estadístico, tanto el cálculo de las frecuencias alélicas en diferentes poblaciones, como la correcta estimación de los valores *a priori* y la elección de la población de referencia son cuestiones que afectan de forma trascendental al análisis estadístico de los resultados de la pericia genética.

Desde un punto de vista jurídico - formal, la correcta interpretación de los resultados por el perito exige una correcta comunicación de la prueba al tribunal, partiendo de tres premisas fundamentales: la primera es que para calcular el valor de una prueba científica son necesarias al menos dos explicaciones para su ocurrencia; la segunda es que todas las posibles explicaciones deben ser evaluadas probabilísticamente bajo hipótesis alternativas; la tercera es una explicación verbal de la razón bayesiana de probabilidad o índice de verosimilitud o *likelihood ratio* (LR) que pueda ser comprensible por un tribunal.

La estandarización de los procedimientos analíticos llevados a cabo en los laboratorios de genética forense garantiza la fiabilidad y certeza sobre los resultados y las conclusiones que de ellos se derivan, existiendo varios organismos a nivel mundial que trabajan de forma continuada en la elaboración de guías y recomendaciones, estandarizando procedimientos, técnicas y otros múltiples aspectos que afectan a distintas fases del análisis genético (ISFG –*International Society for Forensic Genetics*, GEDNAP –*European DNA Working Group*–, ENFSI –*European Network Forensic Science Institutes*–, SWGDAM –*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*–, GHEP-ISFG –*Grupo de Habla Española y Portuguesa de la International Society for Forensic Genetics*–, CNUFADN –*Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN*–).

Los procedimientos de análisis estadístico e interpretación de perfiles complejos son algunos de los que exigen una mayor estandarización entre los diferentes servicios forenses, tanto a nivel europeo como internacional.

El análisis e interpretación de perfiles complejos y perfiles mezclas es una de las fases de la genética forense que genera más publicaciones científicas y suscita más debate.

En el año 2007 la Sociedad Internacional de Genética Forense planteó tres áreas de trabajo para mejorar y garantizar una interpretación uniforme de los perfiles mezcla y complejos: 1) abordar la implantación de sistemas de calidad en los laboratorios forenses según la norma ISO 17025, que derivará en una acreditación de los mismos; 2) mejorar la formación y cualificación del personal analista ; 3) el desarrollo de *software* informático que ayude a la comunidad forense en la evaluación estadística de los resultados.

La evaluación de perfiles mezcla ha sido y es uno de los estudios más complejos (Gill *et al.*, 2006; 2008a; Morling *et al.*, 2007; Scheneider *et al.*, 2009; Stringer *et al.*, 2009; Budowle *et al.*, 2009; Dror y Hampikian, 2011; Meulenbroek *et al.*, 2011; Benschop *et al.*, 2013; Butler *et al.*, 2013), debido a varios factores, tales como el desequilibrio entre alelos del mismo o diferentes contribuyentes, la presencia de artefactos de la amplificación o del genotipado que pudieran interpretarse erróneamente como productos alélicos y la ausencia de alelos por fenómenos estocásticos debidos, entre otras causas, a una alta degradación del ADN molde, en su totalidad o en partes. La evaluación de las mezclas forenses puede ser llevada a cabo mediante distintos tipos de parámetros estadísticos (Gill *et al.*, 2006): el cálculo del LR (*Likelihood Ratio* o coeficiente de verosimilitud), del RMNE (*Random Man Not Excluded* o probabilidad de inclusión) o del RMP (*Random Match Probability* o probabilidad de coincidencia al azar).

El LR, como ya se ha referido, es una derivación del teorema de Bayes que representa la proporción entre dos probabilidades o hipótesis mutuamente excluyentes del mismo evento. El RMNE determina la fracción de la población que sería excluida como contribuyente de un perfil mezcla. El RMP se definiría como la probabilidad de seleccionar al azar un individuo no relacionado de la población que pudiese ser contribuyente potencial al perfil mezcla hallado en la evidencia (Buckleton y Curran, 2008).

El desarrollo de herramientas informáticas ha experimentado un notable avance en los últimos años, existiendo una gran variedad de *software* accesible de forma libre (<http://www.cstl.nist.gov/strbase>; <http://www.isfg.org>). Algunos de ellos provienen del ámbito privado (DNAVIEW de C. Brenner, GeneMapper ID-X de Life

Technologies, Investigator IDproof Mixture de Qiagen o Geneproof Mixture de Qualitytype) y otras son de acceso libre (forensim o DNAMIX).

La ISFG, en sus últimas recomendaciones (Gill *et al.*, 2012) realiza una valoración del paquete informático Forensim, de acceso libre en internet (<http://forensim.r-forge.r-project.org/>), (Haned, 2012; Gill y Haned, 2013), sobre el que se están realizando múltiples estudios y validaciones en el ámbito de los laboratorios de Genética Forense.

1.1.7. Bases de datos en genética forense

La bioinformática en el área de la genética forense ha estado encaminada a la consecución de una premisa: *“la relación de las muestras anónimas con sus posibles donantes”*. El gran desarrollo de la informática en las últimas décadas ha sido casi paralelo a los avances en las técnicas de biología molecular, que han sabido adaptar estas herramientas informáticas en potentes armas tecnológicas en el ámbito procesal - penal y en la lucha contra el delito. El reto de aprovechar las nuevas técnicas científicas debe de conjugarse de forma obligada con la garantía de protección de los derechos fundamentales de las personas.

En el ámbito de una investigación procesal - penal, debe tenerse en cuenta que el acceso a datos genéticos afecta a la libertad personal. La *Resolución del Parlamento Europeo, de 16 de marzo de 1989, sobre los problemas éticos y jurídicos de la manipulación genética*, dispone que *“los análisis genéticos en los procedimientos judiciales sólo pueden realizarse con carácter excepcional y exclusivamente por orden judicial y en ámbitos estrechamente delimitados y que se puedan utilizar únicamente aquellas partes del análisis del genoma que revisten importancia para el caso y que no permitan ningún tipo de deducciones sobre la totalidad de la información hereditaria.”* Es decir, introduce unos límites en cuanto al uso del material genético, en lo referente a los fines y al tipo de material no informativo o no codificante al que el Derecho permite acceder.

Por otra parte, la *Recomendación 92 del Comité de Ministros del Consejo de Europa*, se refiere a la posibilidad de creación de estas bases de datos en los artículos 8 a 11, y remite a los estados miembros para su regulación. Esta Recomendación aceptaba el archivo de información genética sobre reos de delitos sexuales o similares en gravedad, pero no distinguía entre el material codificante y el no codificante, por lo que derivaba esta regulación a los estados miembros.

En estas regulaciones estatales ha de tenerse en cuenta que los elementos científicos del análisis genético, es decir, el progreso en la técnica, define los límites

jurídicos. Hoy en día un análisis de ADN puede mostrar características exclusivamente individualizadoras y también otra serie de características fenotípicas, pero se desconoce qué posibilidades permitirá la técnica en un futuro, de ahí la importancia de los límites legales, que sufrirán revisiones continuas en función de las posibilidades técnicas.

Respecto de la inclusión de datos genéticos en bases de datos, hay que diferenciar que el ADN no codificante, en terminología jurídica, es el que va a permitir identificar a una persona, individualizarla, mostrando su “huella genética” sin más datos, por ejemplo, sobre su salud o rasgos físicos. Este será el elemento jurídico esencial en la configuración de los límites de las bases de datos policiales, la circunscripción de la investigación a la búsqueda de la identidad.

Las bases de datos de ADN persiguen la resolución de casos criminales permitiendo la comparación automatizada de perfiles de ADN procedentes de la escena del crimen, de sospechosos o convictos y en ocasiones de las víctimas (De Gorgey, 1990; Buckleton *et al.*, 2009). Es indiscutible la utilidad de este tipo de bases de datos en todos los países en los que existen. En la actualidad hay numerosas bases de datos genéticas orientadas a la investigación criminal y entre todas ellas, la que tiene mayor capacidad de aplicación es el sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) desarrollado por el FBI (*Federal Bureau of Investigation*) de los Estados Unidos de América y de gran eficacia probada, que puede resumirse en que está diseñado para permitir la compatibilidad y el trabajo independiente de los laboratorios, el archivo de un número ingente de perfiles genéticos y el intercambio de datos en niveles local, estatal y nacional, con índices de tipo criminal y también de tipo civil para búsqueda de desaparecidos (Schneider y Martin, 2001).

Las bases de datos de ADN con fines civiles tienen como objetivo la identificación de los cadáveres y osamentas de origen desconocido. La posible identificación de los restos de los desaparecidos es un deber y una obligación no sólo legal, sino que forma parte de un acto humano y de responsabilidad social. El problema de las personas desaparecidas y de los cadáveres y osamentas no identificados es un problema universal, como también lo son algunas tipologías delictivas comunes en todos los países. La progresiva internacionalización de las búsquedas y cotejos genéticos entre diversos países permitirá una mayor eficiencia en lo que se refiere a la identificación de restos humanos, búsqueda de desaparecidos y la creación de una verdadera arma de lucha contra la delincuencia transnacional (Schuller *et al.*, 2001).

El proyecto Fénix, nacido de la colaboración de la Universidad de Granada y de la Guardia Civil en el año 1999, fue pionero en el mundo en la creación de una base de datos con fines de identificación de cadáveres. Constaba de dos bases de datos, la base de datos dubitada, compuesta por perfiles de ADN mitocondrial y nuclear obtenidos de los cadáveres que no han podido ser identificados por las técnicas médico-legales, antropológicas y odontológicas clásicas y la base de datos de referencia o indubitada, compuesta por ADN mitocondrial y nuclear obtenido de muestras biológicas de familiares genéticamente relacionados con la persona desaparecida y que han querido colaborar voluntariamente (Lorente Acosta, 2009; Hombreiro, 2014).

Posteriormente la Policía Nacional de España desarrolló una nueva base de datos de tipo civil, de nombre *Humanitas*, que sirvió como elemento de unificación de la anterior base de datos *Fenix*. Tras la Ley Orgánica 10/2007 (Etxeberría Guridi, 2001; BOE, 9 de octubre 2007), sólo existe una base de datos de estas características en España y es en ella donde se encuentran todos los datos, sea quien sea la institución policial o de justicia que se encargue del asunto en cuestión.

Posteriormente a España, en los Estados Unidos, el FBI (*Federal Bureau of Investigation*) puso en marcha un programa muy similar denominado *National DNA Database on Missing Persons*. En otros países se desarrollaron también similares sistemas informáticos. Existen igualmente otras bases de datos de personas desaparecidas no fallecidas que podrían aplicarse a menores, fundamentalmente recién nacidos, personas con trastornos de la personalidad y problemas de desarraigo, etc. En algunos países, la desaparición de menores con destino al tráfico de seres humanos y el secuestro de recién nacidos es un problema de enorme magnitud. La existencia de bases de datos internacionales intercambiando datos entre todos los países podría ser una herramienta de gran ayuda para la investigación y solución de este tipo de situaciones.

Existen múltiples parámetros a determinar en cuanto a qué datos pueden introducirse en la base de datos y cuáles de éstos deben cotejarse. Las legislaciones de cada país varían en determinados puntos e interpretaciones jurídicas que afectan a estas cuestiones. Otro punto importante es determinar qué laboratorios pueden generar perfiles de ADN que se incluyan en la base de datos (BOE, 26 de noviembre de 2003; BOE, 9 de octubre de 2007; Hombreiro, 2014).

El primer criterio es de calidad. Su extraordinaria importancia como requisito *sine qua non* se ha visto reflejada en algunas legislaciones como la española, que

exige a sus laboratorios forenses la aplicación de la norma ISO 17.025 y la acreditación por parte de un organismo evaluador externo.

El segundo aspecto importante de la gestión es conocer el funcionamiento del sistema informático. Generar resultados, o sea, analizar muestras de ADN de personas y de indicios criminales no significa controlar la base de datos, no significa gestionarla. En un país determinado, un laboratorio central puede gestionar la base de datos (laboratorio u organismo gestor), pero puede haber otros laboratorios en el país que se limiten a analizar muestras y enviar los resultados codificados al laboratorio gestor (laboratorios u organismos de análisis). Esto requiere una perfecta coordinación entre los diferentes laboratorios, que no es especialmente difícil, pero requiere una total y absoluta compatibilidad en todos los procesos y protocolos científicos y técnicos que conllevan el análisis: códigos compatibles en la identificación de las muestras (códigos de barras y marcadores alfanuméricos), técnicas de laboratorio similares, coordinación en cuanto a casos que se analizan.

Finalmente, las legislaciones modernas de todos los países desarrollados que cuentan con bases de datos de ADN, disocian los datos informatizados, es decir, el genotipo que identifica a una persona no estará nunca junto a su nombre, sino junto a un código de barras o de caracteres alfanuméricos que, realizada la consulta en otra base de datos, nos aclarará la identidad.

Dada la actual situación inestable en cuanto a la seguridad mundial, se han ido adoptando progresivamente toda una serie de medidas encaminadas a incrementar la cooperación internacional en la lucha contra el terrorismo y las formas graves de delincuencia organizada transnacional, y esto en la UE se ha traducido en un conjunto de convenios suscritos para reforzar el espacio de libertad, seguridad y justicia, siempre aplicables dentro del estricto marco de respeto de los derechos y libertades fundamentales de los europeos.

1.1.8. Regulación legal y régimen jurídico de aplicación en España

El requisito para el análisis de ADN de una muestra es que existan las disposiciones legales que así lo permitan. En el marco del derecho procesal – penal español y hasta la aprobación de la Ley Orgánica 15/2003, no existía en todo el ordenamiento jurídico ninguna ley que de forma expresa permitiese la realización de pruebas genéticas con fines de identificación criminal.

A través de esta ley se añadieron dos preceptos a la Ley de Enjuiciamiento Criminal, siendo el más importante el segundo párrafo añadido a su artículo 363, redactado en los siguientes términos: “*b) cuando se pusiera de manifiesto la existencia*

de huellas o vestigios cuyo análisis biológico pudiera contribuir al esclarecimiento del hecho investigado, el Juez de Instrucción adoptará u ordenará a la Policía Judicial o al médico forense que adopte las medidas necesarias para que la recogida, custodia y examen de aquellas muestras se verifique en condiciones que garanticen su autenticidad...”

Estos preceptos otorgaron cobertura legal a la recogida de evidencias en la escena de los delitos por parte de las unidades especializadas de la policía y por los médicos forenses. Es preciso entender esta modificación de la Ley de Enjuiciamiento Criminal como un mandato legal a los encargados de realizar esta función. Es obligación de estas unidades especializadas la recogida de vestigios que pudieran contribuir al esclarecimiento de los delitos.

Una obligación que resulta de crucial importancia en este artículo legal y que es motivo de estudio y discusión en el presente trabajo, es el que obliga a la adopción de las medidas necesarias para que la recogida, la custodia y examen de las muestras se verifique en condiciones que garanticen su autenticidad, lo que supone un mandato legal para evitar que las evidencias puedan ser modificadas, alteradas o contaminadas.

Posteriormente, la Ley Orgánica 10/2007 de 8 de octubre, en su Disposición Adicional Tercera, establece que *“para la investigación de los delitos enumerados en ... la policía judicial procederá a la toma de muestras y fluidos del sospechoso, detenido o imputado, así como del lugar del delito ...”*.

La Ley Orgánica 15/2003, de 25 de noviembre, vino a añadir a la Ley de Enjuiciamiento Criminal una disposición adicional tercera de acuerdo con la cual el Gobierno, a propuesta conjunta de los Ministerios de Justicia e Interior regularía mediante real decreto la estructura, composición, organización y funcionamiento de la Comisión Nacional para el uso forense del ADN.

El Real Decreto 1977/2008 de 28 de noviembre regula la composición y funciones de la Comisión Nacional para el uso forense del ADN (CNUFADN) (BOE, 11 de diciembre de 2008). De forma general, esa Ley establece que a dicho organismo le corresponden las funciones relacionadas con la acreditación relativa a estándares de calidad y normas reguladoras europeas (norma ISO 17.025), coordinación de los diferentes laboratorios e instituciones encargadas de las funciones a regular, la elaboración de protocolos oficiales y la determinación de las condiciones de seguridad de los laboratorios facultados para contrastar perfiles genéticos en la investigación y persecución de delitos y en la identificación de restos cadavéricos.

La Ley Orgánica 10/2007 de 8 de octubre, crea en su artículo primero la base de datos nacional de perfiles genéticos y remite a la CNUFADN para la acreditación de los laboratorios que realicen análisis de ADN y aporten perfiles genéticos a la base de datos policial. En base a esta regulación legal, todos los laboratorios españoles que pueden aportar perfiles genéticos a la base de datos tienen que estar acreditados, autorizados, coordinados y supervisados por este organismo.

En España existen seis unidades científicas con acceso a la base de datos y acreditación y autorización para aportar perfiles a la misma. Son el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, el Cuerpo Nacional de Policía, la Guardia Civil, la Ertzaintza, los Mossos d'Esquadra y la Policía Foral de Navarra. Ninguna otra institución o laboratorio, pública o privada, dispone de acceso a este archivo informático ni tiene capacidad para aportar perfiles al mismo. Esta delimitación de laboratorios de organismos públicos es un mandato legal de la propia Ley Orgánica 10/2007, que circunscribe estas funciones a las instituciones que en España trabajan en las distintas fases del proceso penal.

1.2. La práctica forense

1.2.1. Actividades en la escena del crimen. La recogida de vestigios

Todas las actividades realizadas en la escena del delito deben ser controladas y supervisadas por personal cualificado que haya sido entrenado de forma específica en la selección de muestras y en el mantenimiento de las medidas de prevención y asepsia, así como en el conocimiento exacto de las fuentes de contaminación, la evaluación de riesgos y la reducción al mínimo de estos en lo relativo a la recogida y manipulación de las evidencias.

En España, esta labor se realiza por los médicos forenses y por la policía judicial, existiendo en estas instituciones protocolos estrictos de trabajo y procesado de la escena de un crimen, que siguen las guías y recomendaciones de los diferentes organismos internacionales y nacionales reguladores de la práctica forense (GHEP - ISFG, 2000; GHEP - ISFG, 2007; BOE, 6 de febrero de 2009; BOE, 19 de mayo de 2010).

1.2.1.1. Cuestiones previas al procesamiento de la escena del delito

Existen unas normas básicas de prevención cuyo objetivo es preservar la escena del delito y la integridad de las evidencias que se recojan en ella y proteger al personal que realiza dicha recogida.

Respecto a la protección del personal que procesa la escena de un delito, siempre debe de asumirse que durante la manipulación de material biológico es preceptiva la protección ante posibles patógenos o agentes infecciosos, por lo que es preciso:

- El uso de guantes, mascarilla, batas, monos de trabajo u otro tipo de ropa protectora.
- La total prohibición del consumo de bebidas, comidas, tabacos, chicles, etc. en todos y cada uno de los procedimientos.
- Usar, en la medida de lo posible, material desechable y en caso de no serlo, extremar las medidas de asepsia y descontaminación.
- Es recomendable la vacunación de todo el personal en contacto con las evidencias biológicas a manipular, lo que se convierte casi en obligación para el personal que realiza la diligencia de autopsia.

Respecto a la preservación de la escena del delito han de tomarse una serie de medidas o precauciones básicas:

- Aislar lo más rápidamente posible la escena del crimen, restringiendo por completo el acceso a cualquier persona y/o fuente externa a la misma. Esta norma puede no ser cumplida debido a la posible intervención de servicios médicos de urgencia e incluso testigos presenciales de los hechos que hayan manipulado de forma involuntaria el escenario o a la propia víctima.
- Salvo circunstancia que lo impida, los indicios biológicos deben ser los primeros en ser recogidos.
- El uso de guantes, mascarillas, monos de trabajo y calzas de protección ha de ser estricto, debiendo cambiar los guantes con frecuencia y evitando en lo posible la manipulación directa de las muestras con las manos, aún protegidas.
- La comunicación verbal durante el procesado de la escena del delito debe de restringirse al mínimo, incluso utilizando mascarillas.
- Debe de restringirse al máximo el uso de teléfonos móviles y radios en la escena del delito y en caso de ser imprescindible su manipulación el cambio de guantes será obligado.
- Deben de evitarse los movimientos involuntarios tales como tocarse la cara, el pelo, manipulación de picaportes, interruptores de luz, plumas, papel, bolígrafos u otros objetos presentes en el lugar. En caso de ser obligadas estas manipulaciones, deberán de cambiarse los guantes.

- Utilizar material desechable siempre que sea posible o bien extremar las medidas de asepsia y descontaminación entre usos.
- No añadir a las muestras o evidencias ningún tipo de conservante, para minimizar los riesgos. En caso de sustancias líquidas, se deberá esperar a su secado antes del empaquetamiento.
- Empaquetar las evidencias por separado, intentando el empaquetamiento con el propio envase sin manipular la propia evidencia.

Existen múltiples riesgos que pueden afectar a la integridad de las evidencias biológicas recogidas en la escena del delito y por tanto, que pueden impedir, dificultar y alterar la posible obtención de perfiles genéticos a partir de los vestigios. Estos riesgos son, en ocasiones, inherentes a las muestras o al suceso criminal en sí mismo, así como a los procedimientos de recuperación vital de las víctimas por parte de los servicios de emergencias, pero también pueden incrementarse si no se cumplen forma estricta los protocolos. Estos riesgos derivados de una mala praxis pueden englobarse en cuatro grandes grupos:

- **Depósitos de material biológico humano** en el lugar de los hechos o en el cuerpo, ropas o efectos de la víctima con posterioridad a la comisión del delito. Este tipo de contaminación puede deberse en primer lugar a personas ajenas a la investigación, en el caso de no haber procedido a un aislamiento de la escena del delito, y en segundo lugar a la manipulación y empaquetado incorrecto de los indicios por parte de los especialistas.
- **Traslado de indicios biológicos.** Este tipo de suceso accidental puede cambiar la localización de un indicio o provocar su pérdida. Los indicios que sufren este problema con más frecuencia son los pelos.
- **Contaminación microbiana,** debida al desarrollo de microorganismos favorecido por la humedad y las altas temperaturas, así como por un mal empaquetamiento o medidas de conservación de las muestras inadecuadas.
- **Contaminación química,** debido a la presencia de compuestos que pueden dificultar los procedimientos analíticos en el laboratorio y comprometer el análisis de ADN.

1.2.1.2. El procesamiento de la escena del delito

Durante el procesamiento de la escena del delito se observarán en todo caso los protocolos técnicos de recogida estandarizados en función de la naturaleza del vestigio o indicio, poniendo especial énfasis en:

- **La selección de los vestigios o muestras**, que tengan relación con la causa, para que la determinación analítica tenga interés en la investigación criminal.
- **La descripción completa y minuciosa del rastro**, vestigio o muestra, permitiendo su indubitada distinción, aun tratándose de cosa genérica. Esta descripción deberá constar en los escritos de remisión de los vestigios a los centros de análisis de ADN.
- **La descripción de los detalles de su recogida** (lugar, situación, procedencia, toma, etc) deberán coincidir y relacionarse con las actuaciones de investigación practicadas por la policía judicial y dirigidas por el juez instructor, lo que permitirá la relación de los vestigios con la causa y con quien los haya originado.

1.2.1.3. Embalaje, custodia y remisión de efectos

En lo relativo al embalaje de los vestigios, su custodia y envío a los laboratorios de análisis, deberá preservarse en todo momento la identidad e integridad de los mismos, cumpliéndose las siguientes condiciones:

- Cada muestra o vestigio será objeto de una individualización y embalaje de forma separada, para evitar su contaminación y asegurar su conservación de acuerdo a las normas técnicas para su envío, usando referencias para cada muestra que queden claramente marcadas o reflejadas en el envoltorio y que serán totalmente coincidentes con las referencias que consten en los escritos de remisión a los centros de análisis.
- Con la indicada separación entre sí, las diversas muestras relativas al mismo asunto podrán embalarse en un mismo paquete o envoltorio, que a su vez se distinguirá externamente con la referencia que corresponda al escrito en el que se documenta su remisión.
- El paquete o envoltorio llevará en lugar visible, el nombre del centro de análisis al que se remite el vestigio, habiendo sido comunicado este hecho a la autoridad judicial por medio de las actuaciones de la policía judicial.
- Cada paquete o envoltorio se precintará en los lugares que permitan una fácil apertura, con papel de precinto, que irá sellado con el sello de la unidad remitora, colocándose los sellos entre el precinto y el envoltorio de tal manera, que solo pudiesen reproducirse las mismas condiciones por quien disponga de ambos elementos, precinto y sello. En el escrito de remisión deberá referirse el número de precintos y sellos colocados, los cuales serán

objeto de comprobación, cuando se reciba el paquete o envoltorio por el laboratorio.

1.2.2. Protocolos de recogida de vestigios

Por parte de varios organismos internacionales se han desarrollado guías, recomendaciones y protocolos en lo que se refiere a la recogida y envío de muestras forenses, bien sea en la escena del delito, en personas individuales como muestras indubitadas, o en el propio cuerpo de la víctima. Estos estándares técnicos incluyen no sólo los procedimientos, sino también los criterios de elección de las muestras más adecuadas, los formularios de garantía de la cadena de custodia y las medidas científico - técnicas para asegurar la preservación y la integridad de las muestras.

De forma específica en España, los estándares técnicos establecidos por las sociedades científicas en genética forense, son las Guías y Recomendaciones del Grupo de Habla Española y Portuguesa (GHEP) de la Sociedad Internacional de Genética Forense (*ISFG: International Society of Forensic Genetics*). En un ámbito legal, los estándares científicos bajo los criterios jurídicos son establecidos por los grupos de trabajo (Comisión Técnica Permanente y Grupo Jurídico y Bioético) de la Comisión Nacional para el Uso Forense del (CNUFADN), organismo de referencia en el estudio y la regulación de los aspectos técnicos, científicos, legales y éticos que se derivan de la aplicación forense de los análisis de ADN tanto en el ámbito de la investigación criminal, como en los procedimientos de identificación de restos cadavéricos o de averiguación de personas desaparecidas en nuestro país.

1.2.2.1. Recogida de indicios biológicos en el lugar de los hechos

Si bien es difícil de recoger en un manual todos los tipos de soportes y evidencias sobre los que puedan existir depósitos de ADN que resulten potencialmente pruebas en un proceso penal, el Grupo de Habla Española y Portuguesa de la ISFG (GHEP - ISFG) estandarizó las evidencias y vestigios más frecuentes en la práctica forense (GHEP - ISFG, 2000), que pueden resumirse de la siguiente forma:

a) Indicios secos:

Manchas secas en muestras pequeñas y de fácil transporte, de forma general se recogerán individualmente con pinzas estériles y se introducirán en bolsas de papel o cajas de cartón. Muestras tales como colillas, chicles, sobres y sellos, armas blancas, llaves, monedas, joyas, billetes, papeles, cartones pequeños, bolígrafos, etc, son ejemplos de esta tipología de muestras.

Manchas secas en muestras grandes no transportables sobre superficies no absorbentes, tales como cristales, superficies metálicas o plásticas. Para su recogida se usarán bisturíes estériles para el raspado de la mancha o bien hisopos de algodón estériles impregnados en agua destilada para su recogida mediante frotamiento.

Manchas secas en muestras grandes no transportables sobre superficies absorbentes, tales como telas, tapicerías, alfombras, etc. Para su recogida se recortarán las manchas con bisturíes o tijeras estériles y se introducirán de forma individualizada en bolsas de papel.

b) Indicios húmedos:

En múltiples casos reales, los funcionarios encargados del procesamiento de la escena del delito se encuentran con ropas de vestir, ropas de cama, toallas, cortinas, tapicerías de vehículo, etc. Las muestras de sangre o esperma son las que generan este tipo de indicios más frecuentemente. Una vez recogidas en bolsas independientes deberán ser secadas sobre superficies estériles y en lugares protegidos, para posteriormente proceder como si fuesen indicios secos.

c) Indicios líquidos:

En ocasiones pueden encontrarse grandes cantidades de sangre o esperma en esta situación. En el caso de la sangre podrá recogerse mediante el uso de pipetas estériles de puntas desechables y tubos con anticoagulante tipo EDTA o bien la recogida mediante hisopos de algodón estériles. En el caso del esperma puede encontrarse bien en preservativos, que deberán de cerrarse para evitar el derrame de su contenido e introducir en frascos de plástico o bien, si hubiese escasa cantidad, podrá recogerse también mediante hisopos de algodón estériles.

d) Pelos:

Deben ser recogidos mediante pinzas estériles y de forma meticulosa introducirlos en sobres de papel o bolsas de papel pequeñas.

e) Restos cadavéricos:

Estará obviamente condicionada al tipo de restos, si están en buen estado de conservación o en estado de putrefacción, lo que determinará la selección de fragmentos de tejidos muscular de zonas bien conservadas, de vísceras, de músculo esquelético, de dientes, uñas, etc.

1.2.2.2. Recogida de indicios biológicos sobre el cuerpo humano

a) Recogida de indicios biológicos en el cuerpo de la víctima y/o sospechoso.

Los estándares científicos de recogida de vestigios biológicos en el cuerpo de la víctima y/o del imputado están recogidos en las siguientes guías o manuales:

- Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética. Grupo de Habla Española y Portuguesa de la Sociedad Internacional de Genética Forense (GHEP-ISFG, 2000)
- Orden JUS/1291/2010 de 13 de mayo por la que se aprueban las Normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (BOE, 19 de mayo de 2010).

Los fluidos y cualquier resto biológico depositado sobre el cuerpo de la víctima y/o imputado se recogen con hisopos estériles humedecidos ligeramente con agua destilada. Se debe limpiar el área completa presionando suavemente, si es posible con un solo hisopo o con el menor número posible de ellos e indicando el orden en el que se han utilizado los hisopos, ya que el utilizado en primer lugar tendrá más ADN foráneo.

Una vez examinadas las uñas y recogidos los pelos y/o fibras, se recorta el borde libre de cada una de las uñas, recogiendo por separado las uñas de ambas manos. Si las uñas no se pudiesen recortar, se pueden limpiar con hisopos estériles humedecidos ligeramente en agua destilada estéril.

Las agresiones sexuales son delitos concretos que requieren una recogida muy estandarizada de muestras corporales de la víctima. La selección de vestigios debe realizarse teniendo en cuenta los datos aportados por la víctima en cuanto al desarrollo del hecho criminal, así como las observaciones realizadas en el reconocimiento. Pueden diferenciarse varios tipos de muestras:

- Las tomas de muestra bucales para búsqueda de esperma en la boca.
- Las tomas de muestra sobre la superficie corporal para búsqueda de restos de esperma, saliva, mordeduras, sugilaciones, etc.
- Las tomas cervicales, vaginales, vulvares y anales mediante hisopos de algodón.
- Los lavados vaginales.

b) Recogida de indicios biológicos de referencia en personas vivas

Las muestras de referencia indubitadas son muestras biológicas de procedencia conocida que nos permiten establecer por comparación, la identidad de unos determinados restos humanos, la procedencia de un determinado vestigio biológico o una determinada relación de parentesco.

Los estándares científicos de recogida de muestras de referencia se deben realizar de acuerdo a lo establecido en las guías científicas referidas en este apartado, existiendo una normativa específica en el caso de las grandes catástrofes:

- Recomendaciones para la recogida y remisión de muestras con fines de identificación genética en grandes catástrofes. Grupo de Habla Española y Portuguesa de la sociedad Internacional de Genética Forense (GHEP-ISFG, 2007).
- Real Decreto 32/2009, de 6 de febrero de 2009. Protocolo nacional de actuación Médico-forense y de Policía Científica en sucesos con víctimas múltiples (BOE, 6 de febrero de 2009).

En dichas guías se establecen las recomendaciones para la selección y obtención de muestras de referencia en personas vivas, refiriendo como muestra preferible la toma de células epiteliales de mucosa bucal (saliva), aunque existen otros procedimientos, tales como la obtención de sangre mediante punción dactilar o venosa o incluso pelos con raíz.

Existen protocolos específicos de recogida de muestras para casos concretos, tales como restos fetales, líquido amniótico, o las recomendaciones sobre los estudios de identificación genética en casos de adopciones irregulares y sustracción de recién nacidos establecidas por la CNUFADN (Comisión Nacional para el uso Forense del ADN, 2012), así como normativas legales específicas para casos de extranjeros menores de edad solicitantes de asilo, que se encuentran acompañados por mayores de edad que afirman mantener relación de parentesco (BOE, 16 de octubre de 2014).

1.2.3. La cadena de custodia

La cadena de custodia es el procedimiento establecido en la Ley de Enjuiciamiento Criminal (BOE, 17 de septiembre de 1882) para mantener y documentar la historia cronológica de las muestras dubitadas e indubitadas, desde su recogida hasta su devolución, destrucción o conservación. Con ello se pretende garantizar la integridad y autenticidad de las muestras, acreditando que aquello que se

somete a valoración de un tribunal de justicia, es lo mismo que fue recogido y que no ha sido manipulado, sustituido o alterado.

La cadena de custodia queda reflejada mediante el uso de documentación específica, de formularios estandarizados, que deberán de acompañar a las muestras, en los que conste la investigación solicitada, los antecedentes y datos de interés sobre los hechos, lugar, fecha, personas implicadas, datos de las muestras, tipología, etc.

Cada paso que todos y cada uno de los vestigios cambia de lugar de depósito, de personal de custodia o manipulación, de personal o medio de traslado o transporte, debe de ser documentado estrictamente, firmando todo el personal que haya participado en cada fase.

La cadena de custodia abarca desde las medidas preventivas adoptadas en el aislamiento y análisis previo de la escena del crimen, incluye los protocolos de recogida de los indicios, el envío de las muestras a los Laboratorios de referencia, las manipulaciones y procedimientos llevados a cabo en ellos para su análisis y la conservación de las muestras hasta la presentación de las pruebas ante los tribunales de justicia.

1.2.4. Secuencia de análisis en un Laboratorio de Genética Forense

En un laboratorio de genética forense se pueden recibir todo tipo de muestras biológicas relacionadas con el ámbito judicial (procesal - penal o civil). En la terminología jurídica se distinguen dos tipos de muestras:

- Muestras dubitadas o evidencias, son restos biológicos cuyo donante es desconocido.
- Muestras indubitadas o de referencia, son restos biológicos cuyo donante es conocido.

La terminología "*DNA fingerprint*" o huella genética no es un equivalente al dactilograma, puesto que de la huella dactilar existen registros de identificación en la mayor parte de los países, no con fines de investigación penal, sino exclusivamente como método de identificación civil de los nacionales de un Estado. No existe, pues, un registro de identificación civil genético, por lo que sólo podrán identificarse las evidencias biológicas si se dispone de muestras de referencia para su cotejo.

Las evidencias más analizadas son: sangre (frecuentemente en forma de manchas sobre superficies absorbentes o no absorbentes), esperma (en forma de lavados o hisopos vaginales y anales o bien en forma de manchas sobre prendas de ropa de las víctimas), restos epiteliales arrastrados por la saliva (colillas, chicles,

sobres, sellos, recipientes de bebida y comida), pelos, restos epiteliales sobre múltiples superficies, uñas, tejidos, restos óseos y dentarios (éstos últimos utilizados habitualmente en la identificación de restos cadavéricos).

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, se describen y numeran los efectos recibidos, extremando las medidas de prevención durante su manipulación.

Antes de proceder a las técnicas de extracción del material genético, existen una serie de pasos previos o pruebas preliminares, que son básicamente de tres tipos:

- *Orientativas*: son técnicas muy rápidas y de bajo coste que ayudan a seleccionar las muestras a analizar, revelando la posible naturaleza de la mancha, pero sin aportar certeza sobre la misma. Sirven para descartar, pero no para concluir. La detección de la enzima peroxidasa de la sangre mediante el test de Adler o el test de la fosfatasa ácida para el esperma son ejemplo de este tipo de técnicas (Calabuig, 1983).
- *De certeza*: que determinan la tipología del resto biológico con seguridad. Son ejemplos de este tipo de pruebas en muestras de sangre la detección de hemoglobina mediante la prueba cristalográfica de los cristales de Teichmann (Calabuig, 1983), así como las pruebas inmunológicas con anticuerpos para la detección de hemoglobina (Hochmeister *et al.*, 1999); en el caso de las muestras de esperma, bien la visualización a microscopía óptica de espermatozoides con algún tipo de tinción o bien la detección del antígeno prostático p30 (Hochmeister *et al.*, 1997) nos permiten determinar con certeza si se trata de esperma. Existen pruebas de certeza puramente morfológicas como el examen microscópico en las muestras de pelos o el macroscópico en las muestras de uñas, restos óseos y dentarios.
- *Específicas*: nos permiten determinar el tipo de organismo al que pertenece el resto biológico. Una vez que hemos determinado el tipo de muestra que hemos de analizar, interesa saber si se trata de una muestra humana o no. Existen principalmente dos tipos de pruebas específicas: unas basadas reacciones antígeno-anticuerpo y otras basadas en el estudio de ciertas regiones del ADN, si bien, en cierto tipo de muestras (pelos, restos óseos) puede realizarse un estudio de las características morfológicas para determinar el tipo de organismo. En el caso de que nos encontremos ante una muestra de origen animal, normalmente los análisis terminarán en este punto a no ser que el objetivo sea precisamente determinar la especie (por ejemplo, en caso de delitos ecológicos y de caza furtiva). En el caso de muestras de

origen humano se procederá a realizar la segunda etapa del estudio destinada a individualizar la muestra mediante técnicas de ADN.

Para determinar a qué individuo pertenece una muestra biológica se recurre al estudio de parte de su ADN. La molécula de ADN se localiza dentro de las células que forman los diferentes tejidos de un individuo y para poder analizarla, previamente hay que aislarla separándola del resto de componentes celulares. A pesar de que en una primera fase se aísla la molécula completa, posteriormente sólo se amplifican ciertas regiones de ella, concretamente las zonas polimórficas (“marcadores”, “sistemas” o “loci” polimórficos) previamente seleccionadas.

La analítica de ADN se realiza en cuatro fases:

- a) *Extracción de ADN*: consiste en separar la molécula de ADN del resto de componentes celulares. Se trata de un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de la molécula. Existen gran cantidad de sustancias que pueden interferir en este proceso, bien de los propios reactivos utilizados durante la extracción o bien de los soportes en los que se encuentran situados las manchas biológicas. La duración y rendimiento de este proceso también depende en gran medida del tipo de resto biológico que se está analizando. Así, a partir de las muestras de sangre o de saliva el proceso de extracción es más rápido que a partir de un resto óseo o dentario donde el ADN es menos accesible.
- b) *Cuantificación de ADN*: una vez que hemos finalizado la extracción se realiza la cuantificación mediante PCR, amplificando algún gen específicamente humano, para saber qué cantidad de ADN hemos logrado aislar y en qué estado de degradación se encuentra.
- c) *Amplificación de ADN*: consiste en realizar copias de los fragmentos de ADN seleccionados mediante una PCR *multiplex*, para obtener una cantidad adecuada del material genético a estudiar.
- d) *Detección del producto amplificado o genotipado*: esta es la fase final del análisis molecular y es la que nos permite caracterizar y clasificar los fragmentos de ADN estudiados en cada muestra para diferenciar unas de otras.

Los análisis estandarizados en los laboratorios de genética forense estudian marcadores polimórficos repartidos por el conjunto de cromosomas del ADN nuclear, si bien en algunos estudios concretos pueden analizarse polimorfismos específicos del

cromosoma Y o del cromosoma X, e incluso pueden ser preceptivos análisis de polimorfismos de ADN mitocondrial.

Finalizado el estudio molecular propiamente dicho se procede al análisis de los resultados obtenidos. Es en este punto en el que se realiza el cotejo contra las muestras indubitadas o de referencia, en caso de existir éstas. Los cotejos pueden llevar, en el área de la criminalística, a concluir la coincidencia o no coincidencia de perfiles, en caso de perfiles únicos o la compatibilidad o no compatibilidad de un perfil contra una mezcla de perfiles. En el área del estudio de paternidades y parentescos, los cotejos permiten concluir compatibilidad o no compatibilidad con la hipótesis del parentesco estudiado.

En caso de no disponer de muestras de referencia para realizar los cotejos, los perfiles genéticos se introducen en sistemas automatizados o bases de datos para el intercambio de información en el marco legal de referencia.

Una vez finalizados los análisis y la interpretación de los resultados, se ha de redactar el informe pericial, en el que siguiendo el mandato de la Ley de Enjuiciamiento Criminal de España, constará de una parte de antecedentes, una parte técnica donde se describen las técnicas científicas utilizadas en el estudio, una parte de resultados y conclusiones y una última parte de observaciones y bibliografía de referencia, con la firma de los especialistas que realizaron los estudios y la interpretación de los mismos.

1.2.5. La interpretación de perfiles y su problemática

Los resultados obtenidos de la amplificación de fragmentos por medio de la técnica de la PCR deben de ser interpretados correctamente, determinando si pueden ser artefactos que no se correspondan con productos alélicos y asignando los valores de forma correcta. Durante la amplificación pueden surgir artefactos que interfieren en la clara interpretación de los resultados y, por lo tanto, en el genotipado de los alelos presentes en el ADN molde.

En una reacción *multiplex* la probabilidad de formación de dichos artefactos es mayor, por lo que debe tenerse en cuenta la necesidad de variación y optimización de algunos de los parámetros, como las condiciones cíclicas de la reacción y los componentes de la misma, con el fin de conseguir un rendimiento equilibrado en la amplificación simultánea de los loci escogidos.

En la interpretación de perfiles genéticos que se lleva a cabo tras la obtención de los resultados analíticos hay una serie de parámetros a tener en cuenta, siendo uno

de los principales la determinación de qué es un alelo. Para determinar un pico como un alelo real se usan varios criterios:

- Picos reproducibles con alturas superiores a 50 rfu.
- Escaso ruido en la línea base del electroferograma.
- Número de ciclos de la PCR según las recomendaciones del fabricante del *kit multiplex*.
- Tamaño del pico electroforético coincidente con el *ladder* alélico (+/- 0.5 pb)
- Diferencia clara con otro tipo de artefactos claramente identificables por su morfología, tamaño o posicionamiento.

Partiendo de los criterios establecidos para la determinación de alelos, pueden encontrarse en los electroferogramas otra serie de artefactos que pueden dificultar la interpretación. Los más frecuentes son:

a) Bandas tartamudas o *stutter*:

Mientras que por simple lógica la gran mayoría de los artefactos pueden ser excluidos y calificados como productos no alélicos, los *stutters* son productos alélicos que se diferencian estructuralmente del alelo asociado tan solo por una unidad de repetición, por lo que no pueden ser excluidos directamente (Hauge y Litt, 1993; Walsh *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 2009). Los productos *stutter* han sido descritos en la literatura científica desde que los primeros microsatélites fueron descubiertos. Puede definirse como la presencia en un electroferograma de picos más pequeños que el pico del alelo STR. Este artefacto es debido al deslizamiento de la enzima polimerasa durante la amplificación de la cadena molde. Aunque habitualmente los *stutters* aparecen en parejas, este dato no es necesariamente diagnóstico. Si un alelo tiene secuencias no consenso o parciales, entonces será más proclive a generar bandas tartamudas que el alelo que conste de repeticiones completas. Existen tanto los *stutter* + (una repetición más) (figura 1) como los *stutter* - (una repetición menos) (figura 2), siendo éstos últimos los más frecuentes.

Figura 1: formación de un *stutter* (+) y su representación electroforética

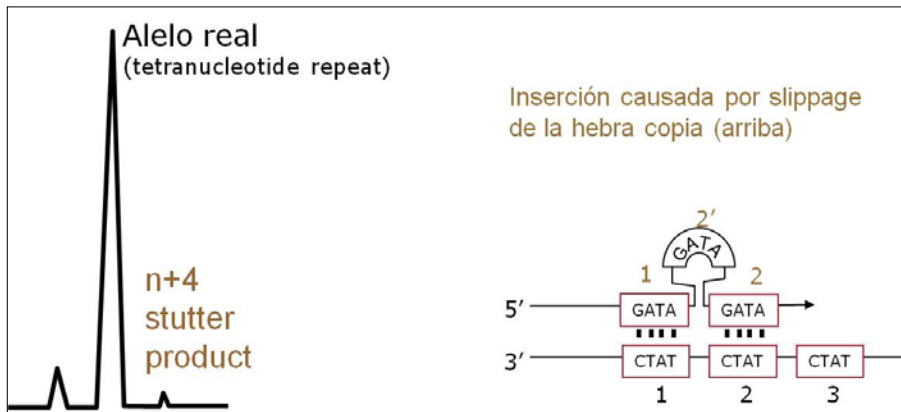
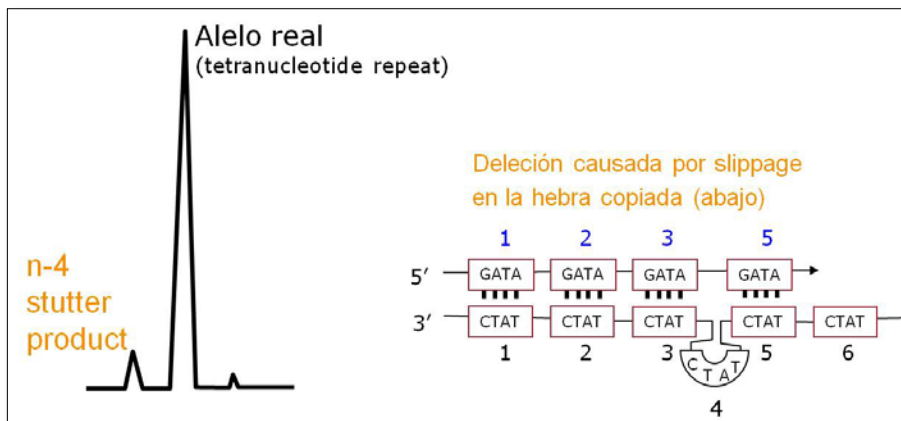


Figura 2: formación de un *stutter* (-) y su representación electroforética



b) Artefactos no específicos

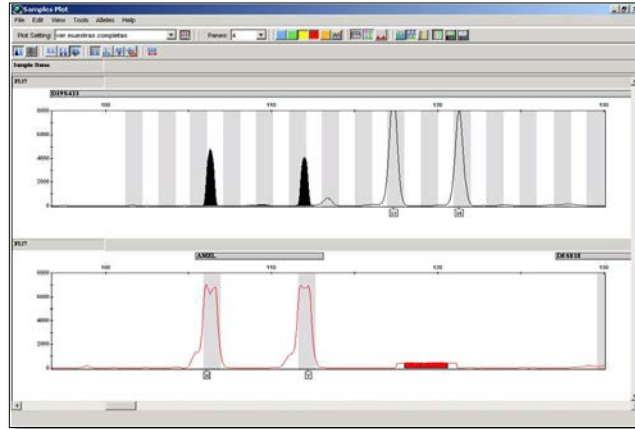
Estos se generan como resultado de la hibridación de los *primers* a fragmentos de ADN degradado o bacteriano. Son características típicas de estos artefactos el poseer área de pico baja, morfologías aberrantes, no encontrarse dentro del rango alélico del locus, proceder de muestras con ADN altamente degradado.

c) Pull-up

Son picos artefactuales debido a interacciones hardware/matriz, que se definen como un pico menor en una colorimetría de fluorescencia diferente y directamente por debajo de un pico alélico mayor ó picos pequeños en las calles adyacentes a un pico grande exactamente en la misma posición (Butler, 2001). Se han observado

habitualmente en muestras sobreamplificadas, con exceso de ADN, y necesitan ser diferenciados de los alelos verdaderos por medio de posición y morfología del pico (figura 3).

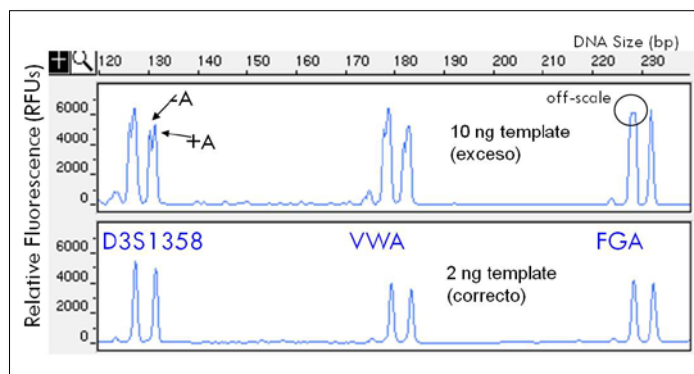
Figura 3: electroferograma con *pull - up*



d) Bandas “N” y “N+1”

La señal del alelo verdadero es conocida como pico “N”. La adición de una base extra por la enzima polimerasa al final del paso de elongación puede producir un producto PCR una base más larga que la longitud del alelo verdadero y esto es llamado pico “N+1” (figura 4). Esta adenilación incompleta puede generar problemas de interpretación (Clayton *et al.*, 1998).

Figura 4: electroferograma de adenilación incompleta "pico N+1"



e) Determinación de umbrales y fenómenos estocásticos

Existen una serie de parámetros que todo laboratorio de genética forense debe de definir, partiendo de estudios propios de validación. Los rangos de sensibilidad de cada instrumental, así como los diferentes reactivos utilizados pueden producir diferencias en la interpretación de los electroferogramas.

Los límites de detección, umbral de detección o umbral analítico permite determinar la altura o unidades de fluorescencia que tiene que tener un producto electroforético para ser considerado como alelo (Word, 2010; Puch-Solis *et al.*, 2011; Westen *et al.*, 2012). El umbral estocástico o de *drop - out* es otro factor a tener en cuenta, puesto que determina el rango de unidades de fluorescencia por debajo de las cuales pueden hallarse fenómenos de pérdidas alélicas. La determinación de estos umbrales está asociada a una estima de riesgo e influye decisivamente en la asignación alélica.

Es preciso tener en cuenta que la extracción de ADN no es totalmente eficaz, por lo que el análisis si partimos de una escasa cantidad de ADN puede verse comprometido. En muestras de buena calidad, los resultados obtenidos en el electroferograma son el reflejo del perfil genético real, mientras que en muestras críticas podemos obtener electroferogramas que no son exactamente el reflejo del perfil genético real.

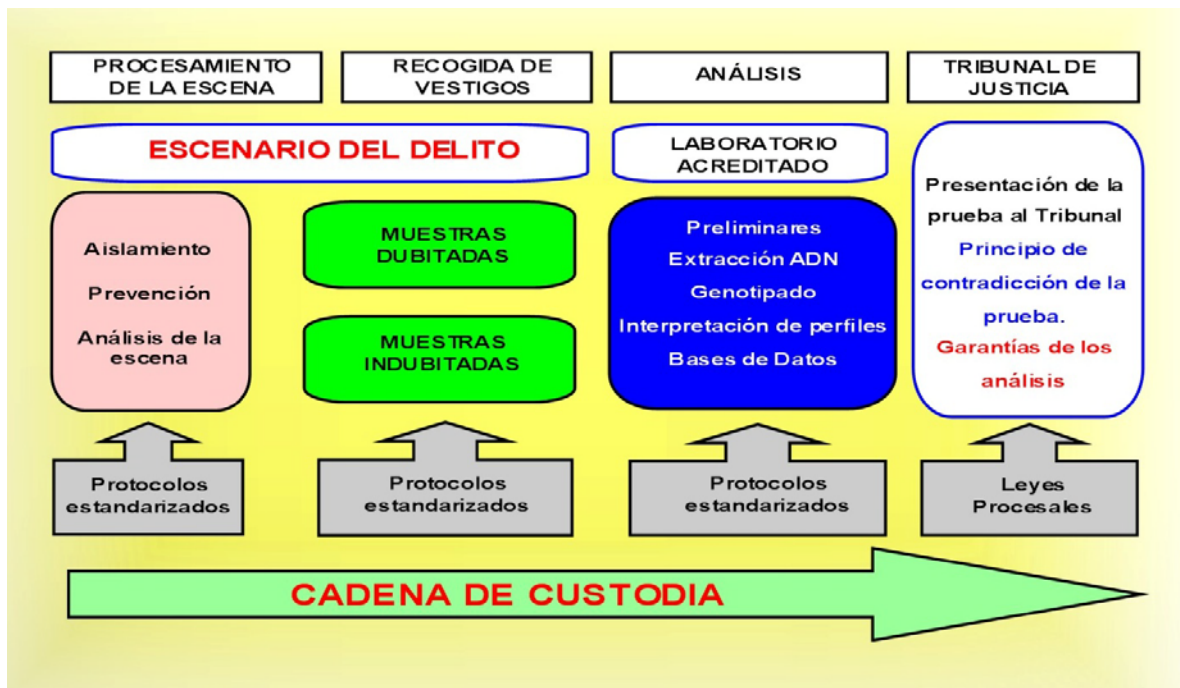
Este tipo de muestras LLDNA (*Low Level DNA*) sufren en gran medida los efectos estocásticos, que producen las siguientes alteraciones en los electroferogramas:

- *Drop-out* de loci, es la no observancia de alelos en un locus
- Desbalance de heterocigotos. En muestras de buena calidad el balance de heterocigotos es superior a un sesenta por ciento, es decir, ambos alelos amplifican con eficiencia similar. En muestras LLDNA, con escasa cantidad de ADN molde, pueden ocurrir diferencias en la amplificación que generarán diferencias en la altura de los dos alelos de un heterocigoto.
- *Drop-out* alélico: no se observa uno de los alelos en un heterocigoto (es el desbalance llevado al extremo).
- Aumento del tamaño de los *stutters*: el porcentaje (en altura o área) respecto al alelo real está incrementado.
- *Drop-in* alélico: observancia de uno o dos alelos extra de diferentes procedencias que no pertenecen al perfil genético.

- Diferencias entre duplicados de la misma muestra, debido a diferencias en el número de moléculas de partida en las alícuotas tomadas para los replicados o bien diferencias inducidas por el propio desarrollo de la PCR.

La complejidad aumenta cuando se trata de determinar los alelos presentes en una mezcla. En una aproximación biológica a la misma, existen una serie de pasos, tales como la identificación de una mezcla de perfiles genéticos como tal, la asignación alélica y la determinación del número de contribuyentes, la estima de la ratio con la que cada individuo contribuyó a la mezcla y la consideración de todas las combinaciones de genotipos posibles, comparando la mezcla con las muestras de referencia si las hubiere (figura 5). Posteriormente se realiza la aproximación matemática, en la que pueden encontrarse graves problemas de interpretación si se trata de muestras con escaso nivel de ADN que pudieran presentar fenómenos estocásticos (Gill *et al.*, 2008; 2009; 2012; Haned *et al.*, 2011; 2012; Mitchell *et al.*, 2011; Tvedebrink *et al.*, 2012; Benschop *et al.*, 2012; Gill y Haned H, 2013).

Figura 5: secuencia de trabajo en la práctica forense



1.2.6. Resultados obtenidos en la práctica forense. Las trazas biológicas por contacto

El altísimo poder de identificación e individualización humana del ADN nuclear obtenido de las evidencias forenses ha sido documentado y discutido en múltiples estudios científicos desde su primera aplicación a un caso criminal. El desarrollo de la sensibilidad de las técnicas de análisis de la huella genética en los últimos años ha

permitido no sólo analizar tejidos, fluidos o sustancias corporales de un donante humano, sino también lo que se ha denominado trazas biológicas de contacto (*–contact traces–*) o células epiteliales de descamación de los diferentes epitelios planos estratificados que componen las superficies internas y externas de los humanos.

Esta pérdida de células epiteliales también tiene lugar en el interior de conductos corporales, por lo que la búsqueda de trazas biológicas por parte de los investigadores debe de considerar también este punto en la evaluación previa del escenario de un delito. El análisis y procesamiento de la escena de un crimen por las unidades científicas especializadas ha de tener muy en cuenta la búsqueda y recogida de las trazas biológicas *–contact traces–* o restos biológicos depositados por contacto sobre diferentes superficies. El acto de manipulación de la escena para recoger las evidencias biológicas puede tener incluso más relevancia que la propia analítica posterior de ADN de las muestras en ella recogidas.

El uso de las reacciones *multiplex* de la PCR para el análisis de muestras forenses ha permitido obtener resultados positivos en el genotipado de múltiples vestigios biológicos, tales como colillas de cigarrillos, marcas de mordeduras (Sweet *et al.*, 1997; Sweet y Hildebrand, 1999), orina humana (Marqués Negredo *et al.*, 2012), así como en muestras de tipo *Low Level DNA* (Budowle *et al.*, 2009) sobre diferentes superficies.

Se han publicado múltiples estudios en los que se detalla la obtención de un perfil genético a partir de vestigios biológicos obtenidos sobre objetos manipulados. Estos resultados positivos han abierto un abanico de posibilidades en cuanto a la obtención de restos biológicos por contacto sobre múltiples superficies y efectos (Taroni y Aitken *et al.*, 1998; Lowe *et al.*, 2002; Wickenheiser, 2002; Rudin e Inman, 2002; Rutty, 2002; Van Oorschot *et al.*, 2003; Raymond. *et al.*, 2004; 2007; 2008; Phipps *et al.*, 2006; Hunter, 2010; Leemans *et al.*, 2016), incluyendo la superficie de la piel humana (Sweet *et al.*, 1997).

El éxito actual en la recogida de las trazas biológicas es altamente variable, condicionado por múltiples factores entre los que destacan los tiempos que median entre el depósito de las evidencias y su recogida, y entre ésta y el análisis de ADN, las características físicas y fisiológicas del donante, la superficie a la que se adhieren las células epiteliales y las condiciones ambientales de exposición de las muestras previas a su recogida por los equipos forenses encargados del procesamiento de la escena del delito.

Los restos biológicos por contacto se suelen producir por rozamiento de las distintas partes corporales con prendas de ropa, efectos, objetos e incluso otros epitelios, existiendo múltiples variaciones en lo referente a la cantidad de células en pérdida o descamación epitelial entre humanos. Si valoramos las diferencias fisiológicas entre los individuos podríamos definir la existencia de “*buenos*” y “*malos*” donantes, considerando que los primeros son aquellos en los que un simple roce de su piel deja suficiente ADN molde para obtener su perfil genético, debido a su gran pérdida de células epiteliales. Existen, por otro lado, aquellos humanos que por las características fisiológicas de su piel no producen suficiente descamación para obtener su perfil a través de este indicio biológico o bien se necesita mucho más rozamiento para obtener la misma cantidad de ADN molde que en el caso de los buenos donantes.

Este factor, si bien condiciona el análisis, resulta de difícil o imposible predicción en la casuística forense real, puesto que *a priori* es un valor desconocido que incluso en un mismo donante puede ser variable según el estado fisiológico (estados nerviosos alterados, sudoración excesiva) en el que se encuentre.

Es casi imposible que el autor de un delito no deje restos epiteliales u otras evidencias biológicas en el escenario del crimen. Aunque éstos utilicen medidas preventivas del tipo guantes, muchos de los elementos utilizados en el acto delictivo han sido llevados a la escena del delito por los propios autores, con su lógica manipulación previa sin guantes. Incluso delincuentes profesionales de bandas organizadas que utilizan guantes en todos sus actos y no los abandonan en el lugar, también tienen contacto previo al acto criminal con herramientas que sí abandonan en el lugar de los hechos (lanzas térmicas, cizallas, sierras radiales, etc.) por ser inviable su recuperación.

Las células epiteliales no se depositan única y exclusivamente durante el acto criminal, pueden depositarse previamente (en efectos que el delincuente posee antes del delito) o bien *a posteriori* (en efectos que el delincuente sustrae del escenario del delito o bien de la propia víctima). Esto implica de forma necesaria un análisis del presunto autor, en caso de que existiese algún detenido o imputado, y de los efectos y ropas que porta, puesto que las trazas por contacto de la/s víctimas también pudieran ser vestigios a buscar en los mismos.

Los estudios experimentales sobre esta materia concreta en genética forense han buscado como objetivo la determinación de la persistencia de los restos biológicos de trazas epiteliales de contacto a lo largo del tiempo, manteniendo un control

supervisor sobre factores como medio ambiental externo y tipología de las distintas superficies de adherencia, no obteniendo conclusiones que pudieran ser extensibles a todo tipo de muestras, superficies y condiciones. Existen estudios de laboratorio que, bajo condiciones controladas, determinan el límite de eficiencia en el análisis de este tipo de evidencias en torno a las seis semanas (Raymond *et al.*, 2008), si bien el aumento de la sensibilidad de los *kits* de amplificación, puede llegar a elevar drásticamente la detección de productos alélicos en muestras depositadas mucho tiempo antes.

En la casuística forense suele ser muy compleja la recogida de restos epiteliales, debido a la ausencia de control de factores ambientales (en algunos casos incluso desconocidos), las superficies de contacto no siempre son óptimas, las condiciones fisiológicas del presunto autor/es totalmente variables y desconocidas, pueden existir manipulaciones previas al propio delito que dificulten la valoración final de los resultados de ADN e incluso existiendo dichas trazas biológicas en determinados objetos y siendo eficiente su analítica, pueden derivar en interpretaciones complejas de resultados con escaso nivel de ADN (*Low Level DNA*), con frecuentes efectos estocásticos del tipo *stutters +*, *stutters -*, *drop in*, *drop out* y otros artefactos que dificultan la valoración pericial.

Otro factor que exige una importante evaluación por parte de los equipos forenses encargados de la recogida de evidencias del escenario de un delito es la contaminación de las muestras *Low Level DNA* por parte del propio personal encargado de su recogida. Cualquier factor no controlado y que sea potencialmente contaminante, como el uso de material de recogida o de protección no estéril o de varios usos, así como una metodología de trabajo que no incluya la prevención y esterilización continua de las herramientas de trabajo, pueden derivar en la contaminación de las evidencias y en la visualización de componentes alélicos que no correspondan a víctima ni agresor, sino que puedan provenir del componente humano que ha realizado la recogida de los restos. Este factor, que se tratará extensamente en el presente estudio, es más importante de evaluar en la casuística forense, puesto que ya existe de por sí una contaminación ambiental no controlada de la escena de un delito, por lo que las unidades especializadas que realizan la inspección y recogida de evidencias deben ser extremadamente rigurosas en este factor.

En la práctica forense, se ha comprobado la eficiencia en el análisis de restos epiteliales de un donante depositados por contacto sobre diferentes superficies en delitos de distinta tipología. Existen múltiples factores que pueden condicionar la eficiencia del análisis, tales como las propias condiciones ambientales de exposición

de los vestigios, el tiempo que media entre su depósito y su recogida por parte de las unidades especializadas, el tiempo que media entre su recogida y su análisis, la observancia estricta de las medidas de prevención y asepsia en la recogida de las evidencias y la propia analítica de ADN, en función de los métodos de amplificación utilizados y la sensibilidad de los mismos.

Los estudios publicados en la comunidad científica apoyan el enorme potencial de las trazas biológicas por contacto en los procesos judiciales, tanto como pruebas indirectas de apoyo, como corroboraciones periféricas del *iter criminis*, como por su condición de pruebas de cargo en muchos procesos (Taroni y Aitken, 1998).

El factor diferencial de todos los estudios radica en determinar los tiempos en los que la analítica de este tipo de huellas genéticas tiene un valor identificativo. En la mayor parte de los casos reales presentados la recogida de las muestras se realiza en las horas siguientes a la comisión del delito, no llegando en casi ningún caso a las 48 horas de margen temporal. Pero algunos resultados como los obtenidos en el presente estudio en casos reales condiciona el análisis preliminar de la escena del delito por parte de los especialistas en recogida de vestigios. En condiciones físico-ambientales óptimas de conservación de las muestras y sin manipulaciones externas previas, los márgenes temporales pueden ser altamente variables, por lo que no debería descartarse ningún vestigio en el análisis preliminar de la escena del delito.

Teniendo en cuenta la casuística real presentada en múltiples estudios y asemejándola a cuantas superficies y objetos se puedan encontrar en la escena de los delitos, deberían considerarse, por parte de las unidades encargadas de la recogida de vestigios, un análisis preliminar detallado de los objetos, superficies y zonas sobre las que pudieran existir trazas biológicas por contacto que contribuyesen al esclarecimiento del delito en cuestión, optando, en todo caso, por comprobar analíticamente si los restos biológicos se han conservado con eficiencia y valor identificativo o si, por el contrario, ya han perdido esa capacidad de discriminación genética.

1.3. La Contaminación

1.3.1. Definición y cuestiones previas

Cuando una evidencia es recogida del lugar de los hechos, ésta debe ser perfectamente identificada y aislada para evitar una posible contaminación biológica sobre la muestra. Dentro de la genética forense, para definir el concepto científico del

término contaminación y desde una perspectiva teórica, habría que tener en cuenta que cualquier depósito de ADN que no sea relevante para el crimen que se está investigando debería ser considerado como contaminación (Forensic Science Regulator, 2017).

Es un concepto amplio que incluye cualquier introducción de material biológico que contenga ADN sobre los objetos de estudio en cualquier momento de la práctica forense. Desde una perspectiva temporal esta contaminación podría haber sido depositada:

- En un momento previo al crimen.
- En el intervalo entre el crimen y el aseguramiento y aislamiento de la escena del delito.
- Durante el procesado de la escena por el equipo investigador.
- Durante su análisis en el laboratorio.

Esta recogida de restos biológicos suele ser muy compleja en la casuística forense, debido a la ausencia de control de factores ambientales, la diversidad de superficies de depósito de las células y las manipulaciones previas al propio delito que pudieran haber dejado restos no relacionados con los hechos a investigar.

Cualquier fragmento de ADN exógeno a la muestra que se introduzca por cualquier motivo ajeno al delito en el experimento será amplificado si lleva secuencias que pueden ser reconocidas por los *primers* en la PCR, con lo que se pueden obtener falsos positivos en los genotipos finales. El estudio y valoración de la posible contaminación es un punto crucial en el análisis e interpretación de las trazas biológicas recogidas en la escena de un delito. Dicha contaminación podría incluso encontrarse en cantidades mayores que el propio ADN objeto de búsqueda y estudio.

1.3.2. La contaminación previa al delito

En relación a los depósitos de ADN o contaminación previa al crimen, es preciso considerar que, bajo circunstancias normales, existe un *background* de DNA en cualquier superficie de cualquier escenario (Gill, 2001; Prinz *et al.*, 2006; Cooky Dixon, 2007; Toothman *et al.*, 2008; Forensic Science Regulator, 2015). Este ADN residual previo al crimen, junto con los posibles depósitos producidos entre el crimen y el aseguramiento de la escena, no pueden ser estrictamente controlados en la práctica real, por lo que se hace imprescindible la aplicación de métodos que detecten y cuantifiquen este tipo de contaminación, al efecto de minimizar su impacto lo más posible.

Estos métodos incluyen:

- Incrementar la realización de estudios para conocer la casuística real de aparición de estos depósitos y su persistencia en el tiempo, sobre todo tipo de superficies y en diferentes condiciones ambientales (Toothman *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2008; Dowlman *et al.*, 2010).
- Desarrollar métodos de recogida de muestras estrictamente dirigidos a las evidencias de interés para la investigación, minimizando la recogida de otro ADN residual.
- Obtener muestras de ADN de referencia de todos los individuos que pudieran estar en contacto de forma usual con las superficies en estudio, para poder realizar discriminación de sus perfiles genéticos una vez obtenidos los resultados de los análisis.
- Obtener una batería de muestras de la contaminación residual o *background* de ADN existente en la superficie de estudio, como apoyo a la interpretación de los resultados.

1.3.3. La contaminación durante el procesado de la escena

En relación a la posible contaminación de la escena del crimen por el personal encargado de la recogida de las muestras, puede ser controlada implementando procedimientos reglados para minimizar este riesgo (European Crime Scene Management Project, UK, 2000; ENFSI QCC, 2003; Standing Committee for Quality and Competence ENFSI QCC, 2003; Standing Committee for Quality and Competence ENFSI QCC, 2004; EA-ENFSI, 2008; Standing Committee for Quality and Competence ENFSI QCC, 2011; ISO/IEC 17020:2012; ENFSI Scenes of Crime Working Group, 2012; Forensic Science Regulator, 2017), que se han desarrollado en el anterior punto del presente trabajo.

Es preciso considerar que la mayor parte de estas contaminaciones se producen:

- Por la manipulación de objetos sin cambio de guantes entre ellos, provocando transferencias de restos biológicos entre superficies de evidencias.
- Por el mantenimiento de conversaciones sin uso de mascarillas, lo que provoca un riesgo de contaminación muy alto (Rutty *et al.*, 2003).

Pero no son las únicas causas de contaminación durante la práctica forense, han llegado incluso a describirse contaminaciones durante la realización de autopsias, debido a las transferencias primarias y secundarias de ADN (Rutty *et al.*, 2000;

Schwark *et al.*, 2012), aunque el concepto de transferencia requiere un desarrollo teórico específico.

Como mínimo, las medidas estándar de prevención de la contaminación en el procesado de la escena de un delito por los profesionales encargados de la recogida de evidencias, son:

- Restricción total de acceso de los investigadores a la escena del delito, únicamente los imprescindibles para la recogida de las evidencias.
- El uso de barreras para el contacto de los investigadores con las superficies en estudio, tales como guantes, mascarillas, monos de trabajo de plástico, calzas, etc.
- El cambio frecuente de guantes en los intervalos de recogida de evidencias.
- Evitar, en la medida de lo posible, la manipulación de los objetos susceptibles de ser depositarios de restos biológicos de interés.
- El uso de material estéril, siendo preferible el material tratado libre de DNA. Es de significar que se han detectado restos biológicos de ADN que persisten durante considerables períodos de tiempo en los pinceles utilizados para el revelado de huellas dactilares con reactivos físicos (Van Oorschot *et al.*, 2005; Proof *et al.*, 2006), por lo que no puede obviarse ningún instrumental de trabajo de este parámetro de asepsia y control *free-DNA*.
- Disponer de los perfiles genéticos de los investigadores que procesan la escena del crimen, incluidos si es posible en los programas informáticos de interpretación de resultados, al efecto de discriminar posibles contaminaciones o transferencias de ADN.
- Sería importante la creación de colecciones de muestras de casos reales detectadas en las diferentes escenas de los delitos, sobre múltiples superficies y condiciones de conservación, así como tiempos de exposición (van Oorschot *et al.*, 2003a; Goray *et al.*, 2010).

1.3.4. La contaminación durante la secuencia de análisis en el laboratorio

En relación a la posible contaminación en el laboratorio de análisis, puede tener lugar (1) por contaminación con ADN del personal del Laboratorio, (2) por transferencia entre muestras en el Laboratorio y (3) por contaminaciones en el material consumible utilizado. Existen varias fuentes potenciales de contaminación:

- Contaminación con ADN humano del personal del Laboratorio, que puede proceder del ambiente de trabajo o *background* genético de los espacios de trabajo o del propio instrumental y de los analistas y manipuladores de las evidencias (Poy y Van Oorschot, 2006).
- Contaminación con ADN humano por contaminación previa del material consumible utilizado (Gill *et al.*, 2010).
- Contaminación de ADN bacteriano o fúngico procedente de la muestra a analizar, que puede interferir en la reacción disminuyendo en el rendimiento de la misma, aunque no se produzca hibridación con los *primers* en la PCR por no ser ADN humano.
- Contaminación cruzada de unas muestras a otras durante la preparación de las mismas. Este tipo de contaminación por transferencia puede ser potencialmente peligroso cuando se procesa un gran número de muestras a la vez, que puede provocar pérdida de intensidad en la concentración.
- Contaminación *carry-over* de productos de amplificación. Esta es la fuente de contaminación más peligrosa y ocurre cuando un fragmento de ADN ya amplificado contamina a una muestra que todavía no ha sido amplificada. El producto PCR contaminante sirve como molde ideal para amplificaciones posteriores y se obtendrán resultados erróneos.

La contaminación en el laboratorio suele estar altamente controlada, mediante la implementación de mecanismos de asepsia y limpieza rutinarios, así como metodologías de trabajo estrictas que minimizan los riesgos, si bien se hace necesario un estudio específico sobre la eficiencia de tales medidas.

En lo referente a la contaminación en el material consumible utilizado se han descrito casos con niveles apreciables de contaminación genética ajena a las muestras en estudio procedente del material fungible. Es preciso referir el caso *del fantasma de Heilbronn*, en Alemania y Austria, en el que la contaminación durante la fabricación de los hisposos o torundas "estériles" que se vendieron a los diferentes servicios forenses de los países referidos, relacionaron más de 40 crímenes de forma

incorrecta (Time Magazine Online. Germany's Phantom Serial Killer: A DNA Blunder, 2009).

Este potencial riesgo de existencia inadvertida de contaminación sobre reactivos y consumibles durante su fabricación, combinado con las altas sensibilidades actuales de los métodos de detección y amplificación de ADN, podría incrementar de forma inasumible las interferencias en los análisis forenses.

Para prevenir este tipo de situaciones, diferentes instituciones forenses a nivel internacional, entre otros el Grupo Científico de Desarrollo de Métodos Analíticos de ADN (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods - SWGDAM -) y la Red Europea de Institutos de Ciencias Forenses (European Network of Forensic Science Institutes - ENFSI -) han desarrollado trabajos para establecer una postura única y unas recomendaciones para los fabricantes de consumibles utilizados en la práctica forense, siendo el cambio más importante la sustitución del concepto "estéril" por el de "DNA free" o libre de ADN (Sullivan *et al.*, 2004; Poy y Van Oorschost, 2006). De igual forma, la nueva norma ISO 18385, *Minimizing the risk of human DNA contamination in products used to collect, store and analyze biological material for forensic purposes*, publicada en 2016, avanza en el objeto de reglar la fabricación de estos consumibles y reactivos.

La relación de metodologías de trabajo que minimizan los riesgos en un laboratorio de genética forense, es:

- Uso de material fungible libre de ADN, no siendo suficiente que dicho material sea estéril.
- Limpieza frecuente de todas las superficies de trabajo del laboratorio.
- Buena praxis por todo el personal del laboratorio, desde los analistas hasta el personal de limpieza.
- Detección de los niveles de contaminación significativos y los lugares de depósito más frecuentes, al efecto de comunicación e información a todo el equipo técnico de analistas, tanto para focalizar más intensamente las labores de limpieza y esterilización, como para el trabajo diario de los especialistas, que tendrán especial cuidado en dichos lugares considerados de riesgo.
- Separación de las áreas de trabajo de examen preliminar, extracción de ADN, amplificación y genotipado, siendo de crucial importancia que el producto ya amplificado no se encuentre nunca en contacto con el producto sin amplificar.
- Uso de material específico y exclusivo del área de producto amplificado, tales como batas, bolígrafos, marcadores, material diverso de oficina, etc.

- Introducción de controles específicos de calidad, examinando doblemente las mismas muestras, en tiempos distintos, en lugares distintos y por diferente personal. Los procedimientos de extracción, amplificación y genotipado también deben ser desarrollados doblemente en los controles de calidad.
- Uso en cada analítica de controles negativos y controles de contaminación residual de las superficies de trabajo.
- Discriminación de los perfiles genéticos del personal del laboratorio en el *software* de interpretación de perfiles genéticos.

1.3.5. La transferencia de material genético durante la práctica forense

En los apartados anteriores se ha definido la contaminación en función de las fases de trabajo en la práctica forense, refiriendo en varios puntos la terminología transferencia de ADN, que puede ocurrir de forma transversal en cualquiera de las fases.

La transferencia de ADN es el mecanismo de contaminación, es decir, el depósito de ADN ajeno al delito directamente sobre los efectos o vestigios que se recogen por las unidades que procesan la escena del delito, o bien de forma indirecta sobre esos mismos vestigios, pero bien a partir del ADN existente en el lugar del delito o bien entre las propias evidencias y vestigios.

La transferencia primaria, a través del contacto entre los individuos y los objetos o superficies que son depósitos de ADN, ha sido descrita en múltiples artículos científicos (van Oorschot y Jones, 1997), teniendo su origen teórico en la célebre *Teoría de la Transferencia de vestigios de Edmond Locard* (Locard, 1930), "*Wherever he steps, whatever he touches, whatever he leaves, even unconsciously, will serve as a silent witness against him*", resumido en "*cualquier presencia o contacto en un lugar deja y se lleva vestigios, sean éstos visibles o no*".

La transferencia secundaria o indirecta también ha sido objeto de estudios científicos, demostrándose en la práctica forense que sustanciales niveles de material genético se transfieren de forma secundaria bajo determinadas condiciones (Lowe *et al.*, 2002; Goray *et al.*, 2010b; Wiegand *et al.*, 2011), habiendo sido reportada incluso entre muestras biológicas adheridas a tejidos o ropas en soluciones acuosas, al ser lavadas a mano o en máquina (Ladd *et al.*, 1999; Kamphausen *et al.*, 2015).

1.3.6. Breve referencia a los casos antiguos

La práctica forense demuestra que los restos biológicos existentes sobre diferentes superficies pueden ser detectados con valor identificativo incluso mucho tiempo después de su depósito. La evidencia empírica demuestra que existen múltiples factores que inciden en el resultado positivo o no de los análisis de restos biológicos antiguos, pudiendo obtenerse resultados positivos con valor identificativo en restos epiteliales con antigüedad incluso de años, radicando la clave de su utilidad en si son relevantes o no en relación al objetivo de su análisis, es decir, a si están relacionados o no con el delito a investigar.

Los *kits multiplex* de PCR comercializados en la actualidad son altamente sensibles incluso para muestras muy escasas de ADN, las denominadas *LCN* o *Low Copy Number DNA traces* y es precisamente ese aumento de sensibilidad en las técnicas de análisis el que ha llevado, entre otras líneas de trabajo forense, a la reapertura de múltiples casos no resueltos (Law Officer, 2008), los denominados *cold cases*, en los que se analizan con técnicas actuales muestras recogidas hace años, incluso décadas, que han sido conservadas en archivos judiciales y/o policiales.

Estas muestras fueron recogidas en contextos muy diferentes a los actuales en cuanto a la metodología de trabajo, las condiciones de asepsia y prevención y los conocimientos de los investigadores de la escena del crimen sobre los tipos de vestigios biológicos que pudieran estar presentes en las diferentes superficies o sustratos. En múltiples casos fueron recogidas sin existir siquiera conocimiento del potencial individualizador del ADN ni de las aplicaciones prácticas actuales de la genética forense.

1.3.7. La evaluación estadística de la contaminación

Resumiendo, los apartados anteriores, los equipos forenses encargados de la recogida de evidencias en el escenario de un delito deben de tener en cuenta como factor de riesgo la contaminación de las muestras por el propio personal encargado de la recogida, manipulación y embalaje. En la fase de análisis deben de considerar, además de la contaminación por una *praxis* errónea, la posible presencia de depósitos residuales de ADN sobre las superficies de trabajo y material destinado a la manipulación de las evidencias (Roland A.H. *et al.*, 2014; Meaking *et al.*, 2013).

Este conjunto de circunstancias obliga a los investigadores de los equipos forenses a realizar la interpretación de las trazas o vestigios biológicos y los perfiles genéticos derivados de su análisis desde la asunción de la existencia de contaminación genética residual ajena al crimen. Cuanto más escasa sea la cantidad

de ADN de partida, más probabilidad existe de interferencia de productos alélicos ajenos al delito en la interpretación de los resultados. Una muestra tipo mezcla de perfiles genéticos puede contener ADN relacionado con el crimen, ADN del *background* de la propia escena del crimen y ADN procedente de contaminaciones posteriores a la escena del crimen, siendo por ello extremadamente difícil detectar cuál es el ADN relevante y discriminarlo durante la fase de análisis del resto.

Las últimas recomendaciones en cuanto a la interpretación de perfiles complejos remiten a los especialistas a considerar los fenómenos de *drop - in* y *drop - out* alélicos mediante estimas probabilísticas de este tipo de sucesos basados en estudios de validación que puedan ser representativos, así como al uso de *softwares* apropiados para el cálculo y consideración de estos posibles errores.

Dentro de estos programas informáticos, el *LR mix* es una nueva herramienta que permite la evaluación tanto de perfiles de buena calidad como perfiles *Low Level DNA*. Con este *software* se puede evaluar la evidencia en relación a múltiples variables, distinto número de contribuyentes, degradación de algunos componentes del perfil y de forma novedosa, se pueden tener en cuenta los eventos de *drop - out* y de *drop - in*.

Si bien las herramientas informáticas son muy útiles en el procesado de la información y en la evaluación estadística de la misma, es preciso considerar que deben de ser evaluados todos los factores que puedan afectar a la carga de la prueba y que el analista tiene la última palabra ante los tribunales de justicia, por lo que la interpretación correcta y la explicación y planteamiento de todas las variables que influyen en los análisis ante la Justicia es una obligación para los genetistas del área forense.

1.3.8. El estudio de la contaminación genética. Situación actual

Las técnicas analíticas actuales permiten analizar cantidades ínfimas de ADN, pero también incrementan la posibilidad de analizar pequeñas fuentes de ADN y efectos estocásticos propios de estas muestras *Low template* o *LLCN*, tales como *drop-in*, *drop-out*, etc. La posibilidad de la existencia de contaminaciones por transferencias secundarias o incluso terciarias de ADN es ahora el objeto de la mayor parte de la bibliografía científica revisada.

El desarrollo de tecnología en la electroforesis capilar y el uso de secuenciadores de última generación, han incrementado la sensibilidad en la detección de muestras de DNA obtenidas de forma rutinaria con una cantidad de ADN inicial muy pequeña. Las investigaciones para evaluar el riesgo de transferencia pasiva

se están empezando a desarrollar, existiendo algunos estudios que consideran al investigador del caso criminal como un vector de transferencia de trazas de ADN incluso a través de sus guantes (guantes de nitrilo), cuando mantienen contacto con diferentes superficies (metales, plásticos, etc.) (Fonnelop *et al.*, 2015).

Así pues, el uso de guantes estériles durante la inspección y procesado de la escena de un delito no implica que ya no exista una posible transferencia de material genético, sino que, en caso de no mantener la máxima de material de un solo uso, podría dar lugar a un vector de contaminación residual.

Todos estos novedosos estudios están dirigidos a comprobar la existencia de este *background* de ADN, a desarrollar los métodos para poder detectarlo y a implementar mecanismos para el tratamiento que se debe de llevar a cabo en caso positivo, la introducción de los datos en las Bases informatizadas de discriminación y cotejo de perfiles, así como los modelos matemático-estadísticos a utilizar para su evaluación y forma de presentar estos datos ante los tribunales de justicia (Verdon *et al.*, 2013; Cale *et al.*, 2015; Lapointe *et al.*, 2015; Mapes *et al.*, 2015; Breathnach *et al.*, 2016; Helmus *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

Se plantean los siguientes OBJETIVOS:

1.- En relación con la detección de contaminación previa a la escena del delito:

- Determinar la persistencia de restos biológicos sobre la piel de la propia víctima, conformando un *background* residual que puede convertir a la propia víctima en un medio de transferencia secundaria de ADN.
- Determinar la persistencia de restos biológicos sobre elementos balísticos, una evidencia muy frecuente en la práctica forense, sobre los que el tiempo de fricción o transferencia de restos ha sido muy escaso.
- Determinar la persistencia de restos biológicos sobre evidencias frecuentes en la práctica forense que hayan sido sometidas a condiciones extremas de conservación.
- Determinar la persistencia de restos biológicos antiguos en diferentes efectos por lo que podrían hallarse en la escena habiendo sido depositados con mucha antelación al suceso investigado y que sean totalmente ajenos a él.

2.- En relación con la detección de contaminación durante el procesado de la escena del delito:

- Determinar la posible existencia de contaminación en la práctica forense de recogida de muestras, su manipulación y envío a laboratorios de análisis.

3.- En relación con la detección de contaminación durante la marcha analítica en el laboratorio de genética forense:

- Determinar la posible existencia de un *background* de contaminación residual en diferentes superficies de trabajo e instrumental de un laboratorio.

4.- De forma transversal para todas las fases de trabajo en la práctica forense, se pretende plantear una serie de mecanismos para la detección de la contaminación y modificaciones en cuanto a los procedimientos a desarrollar, para minimizar su presencia y evaluar su influencia en los resultados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Instalaciones

Todos los análisis han sido realizados en un laboratorio de genética forense que ha implantado la norma ISO/UNE 17.025 y dispone de la acreditación ENAC desde el año 2011, tal y como se corrobora en el Anexo Técnico de Acreditación N° 816/LE1757 (Ensayos Forenses - Laboratorios de Ensayos), que puede consultarse de forma pública en la página web de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC - www.enac.es) - Laboratorio Territorial de ADN de la Jefatura Superior de Policía de Galicia - A Coruña.

La toma de muestras se ha realizado según las siguientes normas, que son protocolos de referencia en la práctica forense y que se recogen en el apartado de bibliografía:

- Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética del Grupo de Habla Española y Portuguesa de la Sociedad Internacional de Genética Forense (GHEP - ISFG).
- Orden del Ministerio de Justicia 1291/2010 de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.

3.2. Toma de muestras mediante frotis

La toma de muestras y de evidencias se realizó mediante torundas de algodón estériles impregnadas en agua Mili-Q autoclavada a 150°C y guantes estériles de un solo uso y el personal de recogida de las evidencias fue diferente al que realizó la preparación de las muestras, así como la recogida de las evidencias, y a su vez diferente del que realizó la extracción, purificación y análisis de DNA, con el objeto de detectar posibles contaminaciones de la muestra.

3.3. Medidas de asepsia y prevención en las instalaciones

Todas las superficies de trabajo en el laboratorio han sido limpiadas de forma diaria con lejía diluida al 15% en agua por personal de limpieza cuyos perfiles genéticos se encuentran grabados en la Base de Datos de Perfiles Genéticos creada y regulada por Ley Orgánica 10/2007 y referida en el apartado de *Introducción*, al objeto de detectar contaminaciones. De igual forma, se encuentran grabados en el programa *software* GeneMapper del secuenciador ABIPRISM 3130, al objeto de filtrar posibles contaminaciones.

Antes y después del desarrollo del trabajo técnico de los procedimientos de análisis, los especialistas limpian la superficie de trabajo mediante etanol 96° y sus perfiles también se encuentran grabados en los mismos sistemas informáticos, al objeto de detectar posibles contaminaciones.

3.4. Procedimientos Técnicos de Análisis

Los procedimientos analíticos llevados a cabo fueron los siguientes:

PTA-1 Inmunoensayo de detección de hemoglobina humana.

PTA-2 Inmunoensayo de detección del antígeno prostático

PTA-3 Test de certeza de la presencia de espermatozoides.

PTA-4 Extracción orgánica y purificación de ADN por filtración.

PTA-5 Extracción diferencial de fracciones haploide y diploide en esperma.

PTA-6 Extracción y purificación mecánica de ADN mediante robot.

PTA-7 Cuantificación de ADN nuclear

PTA-8 Análisis de STRs.

3.4.1. PTA-1 Inmunoensayo de detección de hemoglobina humana

3.4.1.1. Descripción del procedimiento

La detección de hemoglobina humana se lleva a cabo mediante la realización del test denominado Hexagon Obti™, de nombre y referencia comercial *HEXAGON OBTI-TEST (Immunochromatographic Rapid Test de Bluestar®, Ref:HU-829)* basado en una técnica inmunocromatográfica para la confirmación de la presencia de hemoglobina humana (subtipos HbA, HbA2, HbF y HbS) en manchas o fluidos biológicos.

Consta de un dispositivo con un área de carga de muestra (zona S) y una membrana, con dos zonas, llamadas T (zona de reacción) y C (zona de control), por la que avanza por capilaridad la muestra previamente diluida en un medio de transporte formado por un tampón con detergente.

El ensayo utiliza anticuerpos anti-hemoglobina humana monoclonales móviles conjugados con un colorante azul o rojo. Al incorporar la muestra que lleva hemoglobina humana, esta se unirá al anticuerpo formando un complejo antígeno - anticuerpo que migra por la membrana del dispositivo del test hasta la zona de reacción, donde se encuentran inmovilizados otros anticuerpos anti-hemoglobina humana policlonales.

Este complejo formado por anticuerpo-antígeno-anticuerpo quedará fijado en esta zona T de la membrana y será observado como una línea azul o roja formada por la concentración de las partículas de ese color unidas al primer anticuerpo, indicando la presencia de hemoglobina humana. Los anticuerpos antihemoglobina humana que no se han unido, continúan migrando por la membrana hasta la zona de control, donde se encuentran inmovilizados anticuerpos anti-Ig que se unirán a estos anticuerpos libres conjugados con las partículas azules o rojas, formando otra línea azul o roja en la zona C e indicando que el ensayo se ha desarrollado correctamente.

3.4.1.2. Procedimiento analítico

Se llevó a cabo siguiendo las instrucciones y protocolo del fabricante BLUESTAR® (Verification Report for HEXAGON OBTI) y de sus estudios de validación (Hochmeister et al, 1999).

3.4.1.3. Interpretación de resultados

- Si el test resulta positivo, aparecerán dos bandas azules o rojas (T y C) en el kit, lo que se interpreta como presencia de sangre humana en la muestra.
- Si es negativo, solo aparecerá una banda C, lo que se interpreta como ausencia de sangre humana en la muestra.
- Si la banda del control (C) no es detectable, el test no es válido y se debe usar un nuevo cassette.

3.4.2. PTA-2 Inmunoensayo de detección del antígeno prostático

3.4.2.1. Descripción del procedimiento

El antígeno prostático (PSA) es una glicoproteína intracelular (peso molecular de 34000 Dalton) sintetizada sólo por la próstata. El PSA es un componente del tejido prostático que está presente en hiperplasias benignas y malignas de próstata, en carcinoma prostático en metástasis, en fluido prostático y en fluido seminal. El nivel de PSA se eleva en el suero de pacientes con cáncer de próstata debido a la liberación del antígeno en el torrente circulatorio.

La prueba PSA RAPID TEST, de nombre y referencia comercial *PSA RAPID TEST (One Step PSA Rapid Test de BiogateLabs®, Referencia RTPS1312-1)* es un test rápido cualitativo para la detección del PSA humano (en forma libre o formando complejo con la α -1antiquimotripsina) en plasma, suero o sangre total. El método utiliza una combinación única de conjugado monoclonal unido a colorante (oro

coloidal) y anticuerpos monoclonales de ratón en fase sólida para identificar el PSA en las muestras con un alto grado de sensibilidad.

A medida que la muestra difunde a través de la membrana absorbente el anticuerpo monoclonal unido a oro coloidal se une al PSA, formando un complejo entre antígeno y anticuerpo. Este complejo se une al anticuerpo anti-PSA inmovilizado en la zona de reacción positiva y produce una banda rosada cuando la concentración de PSA es superior a 4 ng/ml. En ausencia de PSA, no se forma banda en la zona de reacción positiva. La muestra continúa difundiendo a lo largo de la membrana hacia la zona de control.

El conjugado no ligado se une a los reactivos que se encuentran en la zona de control formando una banda rosada, lo que indica el buen funcionamiento de la prueba.

3.4.2.2. Procedimiento analítico

Se llevó a cabo siguiendo las instrucciones y protocolos del fabricante BiogateLabs® (*One step rapid test for detection of human PSA*) y de sus estudios de validación (Kuriyama *et al.*, 1981; Liedtke and Batjer, 1984; Bagshawe, 1993; Hochmeister *et al.*, 1997).

3.4.2.3. Interpretación de resultados:

- Si el test resulta positivo aparecerán dos bandas color rosa.
- Si es negativo, solo aparecerá una banda color rosa.
- Si la línea del estándar interno no es detectable, el test no es válido y se debe usar un nuevo *kit*.

3.4.3. PTA-3 Test de certeza de la presencia de espermatozoides.

3.4.3.1. Descripción del procedimiento:

La prueba consiste en determinar, mediante su visualización al microscopio óptico, la presencia de espermatozoides en una muestra, previa tinción de la misma con eritrosina amoniacal.

3.4.3.2. Procedimiento analítico

Se diferencia según el tipo de muestra (Calabuig, 2004), extendiéndola en un portaobjetos de la siguiente manera:

A.1) Si se trata de lavados vaginales o muestras en estado líquido (fluidos de un preservativo, por ejemplo):

- Se extienden 2-4 μl sobre un portaobjetos y se deja secar a temperatura ambiente.

A.2) Si se trata de manchas en superficies absorbentes (distintos tejidos o papel, por ejemplo):

1. Se recorta una pequeña cantidad de tejido (aproximadamente 1mm^2), se pone sobre un portaobjetos, se deshilacha con agujas enmangadas y se añade una gota de agua Mili-Q.
2. Se deshilacha bien el tejido con dos agujas o lancetas o dos puntas de pipeta y se deja secar a temperatura ambiente.

A.3) Si se trata de manchas en superficies no absorbentes:

- Se pasa una torunda de algodón impregnada de agua destilada por la zona manchada y se recogen los restos, procediendo después del mismo modo que en el caso "b".

B) Se añaden con pipeta 10 μl de eritrosina amoniaca y se protege con un cubreobjetos.

C) Observando al microscopio óptico con el objetivo de 20 aumentos y confirmándolo con el objetivo de 40 aumentos, deben verse espermatozoides. Se visualiza campo por campo hasta evidenciar la presencia de espermatozoides.

3.4.4. PTA-4 Extracción orgánica y purificación de ADN por filtración

3.4.4.1. Descripción del procedimiento

Este procedimiento tiene como objetivo la rotura celular (lisis) y la posterior separación de los ácidos nucleicos de los restantes componentes celulares (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, etc.) en distintos tipos de muestras biológicas.

La denominada extracción orgánica (Sambrook *et al*, 1989; Köchl *et al*, 2005; Norén *et al*, 2013) se fundamenta en el empleo de sustancias de esta naturaleza para la extracción del ADN y es de aplicación general en los laboratorios de biología molecular, pero además resulta de uso preferente en el caso de muestras que por sus condiciones sugieran características limitantes en la cantidad o estado de conservación del ADN que se obtenga para la realización de posteriores análisis y por tanto consideradas muestras críticas.

Mediante la purificación, se pretende eliminar del extracto obtenido en el correspondiente proceso de extracción de ADN aquellos componentes que o bien por su carga iónica o por su tamaño, resulten indeseables por actuar como inhibidores en el proceso de amplificación. La eliminación de inhibidores de tamaño puede realizarse por filtración de la muestra utilizando tubos de filtración forzada por centrifugación de nombre comercial *Amicon® Ultra Centrifugal Filters* de la casa comercial *EMD Millipore®*.

3.4.4.2. Fases del procedimiento analítico

A) Preparación de las muestras

En el caso de muestras de sangre seca: recortar aproximadamente 0.3–0.5 cm² de mancha (dependiendo de la concentración aparente de la misma) o 3–4 escamas de sangre seca e introducir en un tubo de 1.5 ml rotulado con número de asunto y muestra.

En el caso de muestras de saliva o mucosa bucal: cortar aproximadamente 0.5 cm² de la mancha, media torunda de toma de muestra. Introducir en tubo de 1.5 ml rotulado con número de asunto y muestra.

En el caso de muestras de uñas para identificación cadavérica: se procederá a la retirada de todo el material superficial mediante sucesivos lavados con Agua Mili-Q y Etanol.

En el caso de los restos biológicos por contacto: se tomará muestra de la superficie de contacto mediante una torunda ligeramente impregnada en 1XSSC o en agua mili-Q o bien se recortará la mayor superficie posible de la zona de contacto. Introducir en un tubo de 1.5 ml rotulado con número de asunto y muestra.

Control negativo de extracción. Siempre se incorporará un control negativo de extracción (tubo de 1.5 ml sin muestra y con todos los reactivos utilizados en la preparación de muestras) a cada tanda de muestras para extraer. Se procesará como una muestra más, siguiendo los sucesivos pasos del proceso de extracción.

B) Extracción

Lisis celular mediante maceración, añadir:

- 200 a 800 µl de tampón de extracción (dependiendo del soporte, hasta que éste sea cubierto totalmente por el tampón).
- 10 a 40 µl de 10 mg/ml Proteinasa K.

- 10 a 40 μ l de 1M DTT (sólo en muestras de pelo y uñas).
- No añadir DTT si se trata de una lisis diferencial.
- Las cantidades son indicativas, en todo caso las muestras deben quedar cubiertas; si fuera preciso empujarlas con una punta de pipeta estéril.
- Incubar a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ toda la noche.

Traspaso del líquido de maceración a otro tubo de 1.5 ml

- Limpiar la base del de 1.5 ml de la muestra con etanol.
- Pinchar la base de cada de 1.5 ml con una aguja esterilizada e introducirlo en el nuevo.
- Centrifugar 3 minutos a 4,500 r.p.m.
- El blanco se trata de la misma manera: se transfiere el líquido a otro tubo que se trata.

Eliminación de impurezas en fase orgánica

- Añadir al tubo que contiene el macerado 200-400 μ l de F/Cl/I (25:24:1) y agitar hasta formar una emulsión lechosa (10 segundos).
- Centrifugar 3 minutos a 13.000 r.p.m.
- Traspasar la fase acuosa con punta de 100 o 200 μ l a otro de 1.5 ml.
- Procurar no tocar con la punta de pipeta la interfase que contiene las proteínas.
- Añadir 200-400 μ l de F/Cl/I y agitar hasta formar una emulsión lechosa (10 segundos).
- Centrifugar 3 minutos a 13.000 r.p.m.
- Repetir el paso por tercera vez si la fase inferior (fenólica) estuviera aún coloreada o la interfase fuera difusa. Cuando aquella sea transparente ya no se eliminarán más restos con el Fenol/Cloroformo/Isoamílico y se continúa con la aplicación del procedimiento de purificación del ADN que proceda.

C) Purificación

La purificación se puede realizar con distintos filtros siguiendo las instrucciones del fabricante de cada dispositivo de filtración. Pueden utilizarse membranas de diferente tamaño de poro según los requerimientos de cada tipo de muestra. En el

presente trabajo se han utilizado columnas de filtración por ultracentrifugación *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters*, membrana *PLHK Ultracel-PL*, con un límite de peso molecular de 100 kDa, de la casa comercial *EMD Millipore®*.

El protocolo general a seguir en todos los casos es el siguiente:

- Rotular los dispositivos de filtración a utilizar con número de asunto y muestra (control negativo incluido)
- Añadir 3,500-3,800 ml de TE 1X o agua Mili-Q autoclavada a la columna de filtración más el volumen de fase acuosa obtenida durante la extracción.
- Centrifugar a 2,000-2,500 rpm durante 10-20 minutos.
- Descartar el centrifugado.
- Repetir el proceso al menos dos veces, pudiendo realizarse las veces que se consideren necesarias según el tipo y estado de la muestra a purificar.
- Recuperar el ADN purificado suspendido en 40–100 µl. y transferir a un tubo de 1.5 ml debidamente rotulado con número de asunto y muestra.
- Seguidamente se cuantifica el ADN de este extracto por el correspondiente procedimiento específico y se valoran los resultados.

3.4.5. PTA-5 Extracción diferencial de fracciones haploide y diploide en células espermáticas

3.4.5.1. Descripción del procedimiento

Se trata del procedimiento clásico utilizado para extracción y purificación del ADN a partir de las células espermáticas en su alcance y dentro del cual se desarrolla una fase de extracción diferencial de aplicación para los casos en que se presentan mezclas de ambos tipos de células en la muestra de partida, basada en la posibilidad de realizar una primera lisis mediante la actividad enzimática de la *Proteinasa K* (en condiciones ideales de temperatura), la cual tan sólo es capaz de romper envolturas de células epiteliales (vaginales, anales etc.), quedando intactas las cabezas espermáticas, que son separadas del resto mediante centrifugación.

Finalmente puede realizarse una segunda lisis mediante la acción combinada de *Proteinasa K* y *DTT (Ditiotreitol 1M)*, por la cual y debido al efecto del agente reductor, se procede a romper los puentes disulfuro existentes en las envolturas que protegen el ADN en cada cabeza espermática.

Se obtiene así una fracción diploide (ADN de la 1ª lisis-células epiteliales) y una fracción masculina o haploide (ADN de la 2ª lisis-espermatozoides), las cuales se purifican independientemente (Gill *et al*, 1985; Wiegand *et al*, 1992).

3.4.5.2. Fases del procedimiento analítico

A) Examen y preparación de la muestra

- Una vez confirmada la presencia de espermatozoides mediante el PTA-3 referido en este apartado de Material y Métodos, si se trata de una torunda, se recorta entera la zona del algodón y se trocea. Si se trata de ropas o papel, se recorta y trocea la superficie de la mancha o una parte de esta (si su extensión fuera muy grande) que se considere tendrá suficientes espermatozoides para la obtención del ADN preciso. En casos en que la cantidad de espermatozoides sea muy escasa y se disponga de varias muestras de un mismo origen, por ejemplo, lavado y torunda vaginal de una víctima, se puede proceder a la unión de las mismas, en esta fase o en cualquiera de las siguientes. Estos trozos del soporte manchado se maceran en un tubo tipo falcon de 15 ml, cubriéndolos con agua destilada y agitando repetidas veces en un agitador de tubos hasta dejarlos durante toda la noche a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Al día siguiente trasvasar 1.5ml del líquido a un tubo de microcentrifuga (Eppendorf) y centrifugar de 3 a 6 min a 14,000 r.p.m. y retirar el sobrenadante dejando aproximadamente 50 μl con el pellet de células. Repetir esta operación hasta obtener todo el precipitado de la muestra inicial.
- En el caso de las muestras con soporte, una vez obtenido el precipitado, se pasa el soporte a un tubo Eppendorf y con una aguja enmangada, se pincha el fondo, colocándolo sobre el tubo que contiene el precipitado y se centrifuga 5 min a 4,500 r.p.m.
- En el caso de lavados vaginales, se centrifugan, se descarta el sobrenadante, se trasvasa el precipitado a tubos falcon, se le añaden 4ml de agua destilada y se procesa de igual forma que las manchas.

B) Extracción diferencial orgánica

- Añadir 400 μl de tampón de extracción más 20-40 μl de proteinasa K (20 mg/ml) al tubo Eppendorf e incubar 1-2 horas a $56\pm 5^{\circ}\text{C}$, dependiendo del número de células no espermáticas presentes en la muestra (generalmente, salvo que haya muy pocas células, unas 4-5 por campo, se dejan 2 horas, para tener la seguridad de que todas se rompan).

- Centrifugar 5 min a 14,000 r.p.m. y retirar el sobrenadante (ADN de la primera lisis celular-fracción femenina), dejando aproximadamente 50 µl con el *pellet* de espermatozoides. Este ADN se deja a temperatura ambiente hasta su purificación.
- Lavar el pellet de espermatozoides, con 200 µl de tampón de extracción 2-3 veces, se centrifuga y se descarta el sobrenadante.
- Volver a observar al microscopio óptico los espermatozoides según se define en el PTA-3 y anotar la cantidad y si quedan células acompañantes o no.
- En caso de visualizarse células epiteliales se vuelve a repetir el proceso desde el punto nº 1 de este apartado.
- Añadir 400µl de tampón de extracción + 20 µl Proteinasa K (20 mg/ml) + 20 µl de 1M DTT. Mezclar e incubar a 37±5°C toda la noche.
- Al conjunto de muestras se le añade un nuevo tubo Eppendorf consistente en un control negativo (sin muestra).

C) Purificación del ADN:

El ADN obtenido de ambas lisis celulares se purifica aplicando el procedimiento específico con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico definido en el PTA-04.

3.4.6. PTA-6.- Extracción y purificación mecánica de ADN

3.4.6.1. Descripción del procedimiento

Extraer y purificar mecánicamente, mediante el uso de una plataforma robótica “Maxwell® 16 Instrument (PROMEGA)”, el ADN de las muestras seleccionadas.

El método de extracción empleado es el *DNA IQTM System* de la casa Promega, una extracción y purificación que usa una resina con partículas magnéticas que proporcionan una fase sólida móvil que optimiza la captura, lavado y elución del material analizado. La plataforma robótica utiliza un tratamiento previo de las muestras (sólidas o líquidas), que posteriormente pasarán un proceso de purificación en sucesivos compartimentos dispuestos en unos cartuchos que contienen diversos reactivos. El ADN se fija a las partículas magnéticas y se realizan lavados sucesivos. Por último, se separa el ADN de las partículas en un tampón de elución.

El método de extracción del *DNA IQTM System* se lleva a cabo siguiendo los protocolos del fabricante (Maxwell® 16 instrument operating manual, 2008) con los siguientes pasos:

1. Macerado de la muestra.
2. Captura del ADN utilizando la resina magnética.
3. Lavado de la resina.
4. Elución del ADN de la resina.

3.4.6.2. Fases del procedimiento analítico

A) Maceración y lisis celular de las muestras:

- Para la maceración de las muestras se añaden 200 µl de tampón de extracción y 10 µl de proteinasa K, por cada muestra, en cabina de seguridad biológica y se introducen en un baño a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas tanto para muestras indubitadas como dubitadas.
- En caso de muestras de cabello, uñas o semen, se añade a la preparación 10 µl de DTT.
- Estas muestras se encuentran en tubos Eppendorf de 1.5 ml rotuladas con el número de cada muestra en formato de caracteres numéricos.

B) Añadido del tampón de lisis:

- Tras el período de maceración, se añade a la mezcla un volumen de 400 µl de tampón de lisis y a continuación se procede a su agitación mediante un agitador de tubos (la cantidad añadida siempre ha de ser el doble de la correspondiente al tampón de maceración o extracción, no debiendo superar la suma total 750 µl).

C) Separación del ADN y el tampón de lisis del soporte:

- Se separa el soporte de la muestra del tampón de Extracción con el ADN. Para ello se taladra el tubo de macerado con una aguja al rojo vivo que asegura su esterilidad y se introduce en otro tubo de iguales características, al que se trasvasa el líquido por centrifugación a 4,500 rpm durante 4 minutos.

D) Extracción y purificación:

- A partir de este punto los procedimientos se realizan con el robot *Maxwell®16* de la marca *Promega*, siguiendo los pasos especificados en el Manual de funcionamiento del propio instrumento y que se indican en la pantalla LCD del mismo.

3.4.7. PTA-7.- Cuantificación de ADN nuclear

3.4.7.1. Descripción del procedimiento:

Mediante la cuantificación se pretende determinar la cantidad total de ADN humano extraído de cada muestra con objeto de ajustar la concentración de los extractos para su posterior amplificación mediante PCR. También sirve para verificar la presencia de inhibidores en la muestra.

Se trata de un ensayo que combina la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa que tiene lugar durante la PCR con la emisión de fluorescencia por parte de una sonda que hibrida específicamente con una región específica del genoma nuclear humano que varía según el *Kit* utilizado.

El ensayo consiste en un par de *primers* específicos para ADN humano y una sonda *TaqMan® MGB* marcada con *FAM* para detectar la secuencia amplificada. Se emplea una sonda que hibrida específicamente con una región específica del gen hTERT- transcriptasa inversa de la telomerasa humana, de 62 pb.

Durante el ensayo existe un fluoróforo (*ROX®*) que no interviene en la reacción de amplificación, y que está a una concentración fija, que sirve para normalizar la emisión de fluorescencia.

Como control de calidad de la reacción de amplificación está el IPC (secuencia sintética de ADN no encontrada en la naturaleza) consiste en un templado de ADN, dos *primers* para amplificar esta secuencia y una sonda marcada con *VIC* para su detección. Este IPC permite distinguir entre verdaderos “negativos” y reacciones afectadas por la presencia de inhibidores o fallos propios del ensayo.

Durante la fase exponencial de la reacción de amplificación, la fluorescencia es detectada por el *software* SDS en un punto de comparación (*threshold* o umbral), determinado y validado por la casa comercial, en el que se cumple:

$$X = X_0 \cdot (1+E)^n$$

donde **X** es la concentración del producto amplificado en un ciclo determinado, **X₀** la concentración inicial de la muestra, **E** la eficiencia de la reacción y **n** el número del ciclo.

Se define **CT** como el número de ciclos que se necesita para llegar al *threshold* o umbral, dependiendo su valor de la concentración inicial y de la eficiencia.

Sustituyendo **n** por **CT** en la ecuación anterior, aplicando logaritmos, y resolviendo la ecuación:

$$CT = -[1/\log (1+E)].(\log X-\log X_0)$$

Si la eficiencia es del 100%, obtenemos un valor para **-[1/log (1+E)] de -3,32**, que es el valor teórico de la pendiente, estableciéndose un rango de tolerancia dependiendo del *kit* usado.

La emisión de fluorescencia es detectada por el *software*, que analiza, procesa y normaliza el dato bruto obtenido durante la reacción.

3.4.7.2. Fases del procedimiento analítico

A) Preparación de los estándares de cuantificación

La preparación de los *standards* de tamaño del 1 al 8 (de 50 ng/ml a 0.023 ng/ml) se realiza utilizando TE para la realización de las diluciones. Los pasos a seguir se detallan a continuación y se podrán realizar de modo manual o mediante plataforma robótica:

1. Preparar 8 tubos Eppendorf rotulados: Std1, Std2, Std3, Std4, Std5, Std6, Std7 y Std8 con la fecha del día de preparación.
2. Dispensar en el primer tubo 30 ml de TE y 20 ml en los siete restantes.
3. Agitar y dar un "spin" al tubo del standard de 200 ng/ml contenido en el kit y dispensar en el primer tubo (Std 1) 10 ml. (Dilución 1/4)
4. Agitar y dar un "spin" al tubo std 1, en caso de elaboración manual, o resuspender en caso de realización mediante plataforma robótica.
5. Transferir 10 ml del std 1 al tubo std 2 (dilución 1/3)
6. Repetir el paso 4 y 5 en los tubos sucesivos hasta llegar al std 8.
7. Mantener los estándares una vez preparados refrigerados en nevera entre 2-8°C.

B) Preparación de la mezcla de amplificación

La preparación de la mezcla de amplificación se realiza en cabina de seguridad biológica situada en el cuarto o zona de preparación de la PCR.

El valor a añadir resulta de multiplicar la cantidad de cada reactivo por la suma de las muestras a cuantificar, más diecisiete (16 destinados a 8 estándares de cuantificación por duplicado y 1 para el tampón de elución) y el margen de exceso que se determine por pérdidas en el pipeteo.

La cantidad total de Primer Mix y Reaction Mix se mezclan en tubos Eppendorf de 1.5 ml, y una vez homogeneizados se dispensa en la placa de 96 pocillos de tipo "óptico".

C) Dispensación de mezcla de amplificación, muestras, estándares y tampón de elución

Se dispensará por pocillo:

- 23 µl de la mezcla de Primer Mix y Reaction Mix en cada pocillo.
- 2 µl de muestra / 2µl de cada standard por duplicado / 2 µl de TE (control negativo).

D) Preparación de la placa para la reacción

Una vez finalizada la dispensación de reactivos, muestras, estándares y control negativo, se cubre la placa con la cubierta adhesiva, y se le da un "spin" o centrifugación instantánea en la centrífuga para placas, comprobando que las burbujas de aire han desaparecido y que no quedan gotas por las paredes.

E) Preparación de la PCR cuantitativa

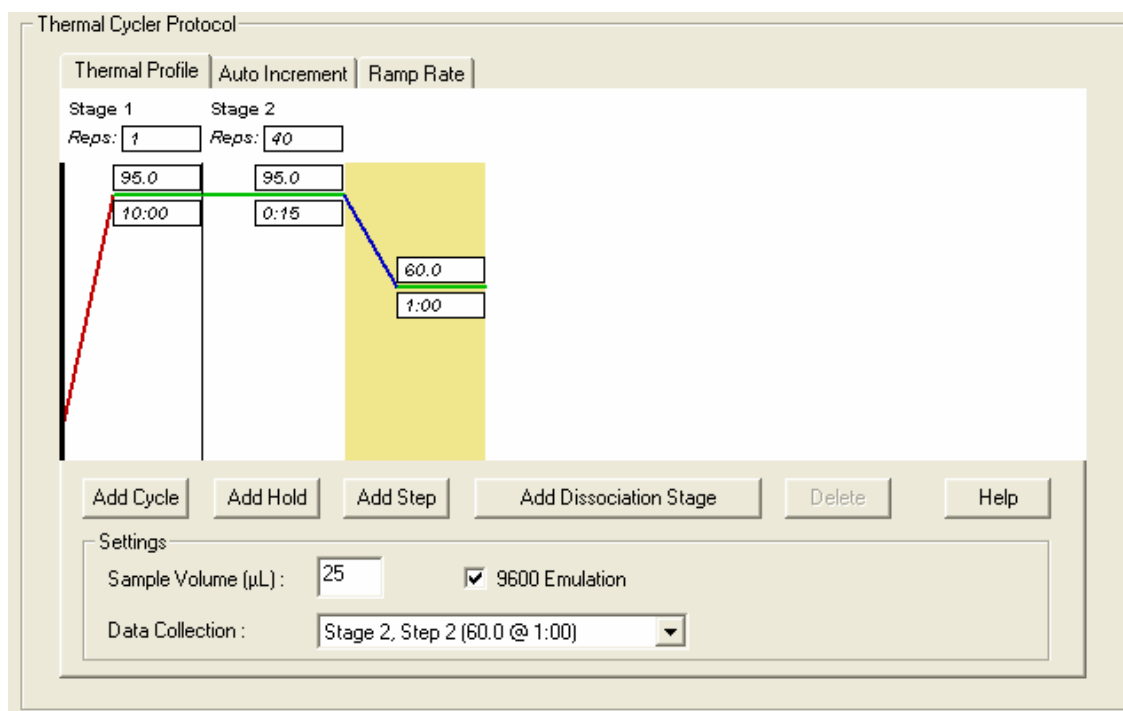
Se realiza en el equipo *7500 Real Time PCR System* de *Life Technologies - Applied Biosystems*, utilizando el *software* asociado al instrumento y siguiendo las condiciones y el protocolo del fabricante (figura 6).

3.4.7.3. Interpretación de los resultados

La cuantificación se considerará correcta siempre que los valores de pendiente obtenidos estén comprendidos entre los valores -2.9 a -3.3.

3.4.7.4. Referencias o Manuales del fabricante Life Technologies®

- Quantifiler kits User's Manual – Quantifiler Human DNA Quantification kit and Quantifiler Y Human male DNA Quantification kit.
- HID Real Time PCR Analysis *Software* v1.2

Figura 6: ciclo de amplificación

3.4.7.3. Interpretación de los resultados

La cuantificación se considerará correcta siempre que los valores de pendiente obtenidos estén comprendidos entre los valores -2.9 a -3.3.

3.4.7.4. Referencias o Manuales del fabricante Life Technologies®

- Quantifiler kits User's Manual – Quantifiler Human DNA Quantification kit and Quantifiler Y Human male DNA Quantification kit.
- HID Real Time PCR Analysis Software v1.2

3.4.8. PTA-8.- Análisis de STRs

3.4.8.1. Descripción del procedimiento:

Análisis de fragmentos de ADN mediante obtención de marcadores del tipo STR (*Short Tandem Repeats*) mediante electroforesis capilar de los extractos de ADN obtenidos en ensayos anteriores.

Dado que los extractos de ADN de las muestras suelen contener una cantidad escasa de ADN, es necesario realizar una amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la que se obtiene un número elevado de copias de los distintos marcadores genéticos del ADN original. De esta manera es posible realizar el tipado de los distintos marcadores STRs por separación de los fragmentos

de ADN obtenidos en la reacción de PCR mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ADN y posterior análisis con el programa informático Genemapper IDX.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realiza con *Kits* comerciales que permiten amplificar en una única reacción varios marcadores genéticos. Esta se prepara en la zona pre-PCR del laboratorio y se realiza en los termocicladores que se encuentran localizados en una habitación específica dentro de la zona pre-PCR.

Una vez finalizada la PCR, el producto amplificado se traslada a la zona post-PCR donde se prepara para la carga en el secuenciador. Finalizada la electroforesis capilar del conjunto de muestras cargadas, se procede al análisis con el programa Genemapper IDX, diseñado por la casa comercial anterior con el objeto de determinar el perfil genético de las muestras.

De forma general el procedimiento comprende los siguientes pasos, una vez extraído (por cualquiera de los procedimientos específicos de extracción) y cuantificado el ADN:

- 1.- Normalización de la concentración de ADN.
- 2.- Amplificación del producto normalizado.
- 3.- Preparación del producto amplificado para la inyección.
- 4.- Carga de los productos amplificados en el secuenciador.
- 5.- Análisis de los marcadores genéticos.

3.4.8.2. Instrumental, *Kits* utilizados y Reactivos

- Equipo termociclador GeneAmp® PCR System 9700 de la casa comercial Life Technologies - Applied Biosystems
- Analizador Genético *ABIPRISM 3130* de Life Technologies – Applied Biosystems con sets de 4 capilares.

Kits de amplificación:

Se describen los *kits* de amplificación utilizados, con la nomenclatura de los STR analizados por cada uno, significándose que se conservaron según instrucciones del fabricante, es decir, permanecieron congelados hasta su uso y una vez abiertos se mantuvieron todos sus componentes entre 2° y 8°C, excepto el tubo de AmpliTaq Gold DNA Polymerase que se mantuvo entre -15° y -30°C.

A) Kit AmpFISTR® Yfiler™

El *kit* de amplificación AmpFISTR® Yfiler™ amplifica en una única reacción PCR 16 marcadores STR del Cromosoma Y humano utilizando cuatro fluorocromos: 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo). Existe un quinto fluorocromo, el LIZ (naranja), utilizado para etiquetar el estándar de tamaño.

El análisis de fragmentos de ADN se realiza mediante obtención de los siguientes 17 Y-STR loci (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385 a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392 Y GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448).

B) Kit AmpFISTR® GlobalFiler™

El *kit* de amplificación AmpFISTR® GlobalFiler™ amplifica en una única reacción de PCR 24 marcadores utilizando seis fluorocromos: 6-FAM™, VIC®, NED™, TAZ™, SID™ y LIZ®.

El análisis de fragmentos de ADN se realiza mediante obtención de los siguientes 21 STRs autosómicos (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391 y D2S1338), el marcador de género Amelogenina, un STR Y DYS391 y un Y-indel.

C) Kit AmpFISTR® NGM SElect™

El *kit* de amplificación AmpFISTR® NGM SElect™ amplifica en una única reacción de PCR 16 marcadores más la amelogenina utilizando cuatro fluorocromos: 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo). Existe un quinto fluorocromo, el LIZ (naranja), utilizado para marcar el estándar de tamaño.

El análisis de fragmentos de ADN se realiza mediante obtención de los siguientes 16 STRs autosómicos (D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33) y el marcador de género Amelogenina.

D) Kit AmpFISTR® Identifiler Plus

El *kit* de amplificación AmpFISTR® Identifiler Plus amplifica en una única reacción de PCR 15 marcadores más la amelogenina utilizando cuatro fluorocromos: 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo). Existe un quinto fluorocromo, el LIZ (naranja), utilizado para marcar el estándar de tamaño.

Análisis de fragmentos de ADN mediante obtención de los siguientes 15 STRs autosómicos (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 y FGA) y el marcador de género Amelogenina.

Otros reactivos utilizados en el análisis de STRs son:

- Los estándares de tamaño, que variarán dependiendo del kit de amplificación utilizado y que se detallan posteriormente.
- Formamida HI-DI.
- tampón.
- Polímero POP4.
- Enzima Taq-polimerasa.
- Kits para la calibración espectral de los fluorocromos utilizados.

3.4.8.3. Fases del procedimiento analítico:

A) Normalización del ADN

Las concentraciones de ADN resultantes de la cuantificación se normalizan, a un valor adecuado, que se indica para cada *kit* en la validación/verificación correspondiente. Esta normalización requiere realizar los cálculos necesarios para diluir las muestras que estén demasiado concentradas.

B) Amplificación del ADN normalizado

La reacción de PCR se realiza en el termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* de la casa comercial *Life Technologies - Applied Biosystems* situado en una habitación específica de la zona pre-PCR, utilizando el programa de amplificación especificado en el manual de usuario de cada *kit* de amplificación.

C) Preparación del producto amplificado para la inyección.

En la cabina de seguridad biológica de la zona post-PCR se realiza manualmente la mezcla de formamida y estándar de tamaño, siguiendo las instrucciones del fabricante para cada kit de amplificación.

D) Preparación y carga del Secuenciador para la electroforesis capilar

El orden de carga, el módulo de carrera electroforética y el destino de los datos generados se especifica a través del programa informático *Data Collection*, proporcionado por el fabricante y perteneciente al *software* de trabajo.

E) Análisis de los resultados.

Los datos generados por el secuenciador ABI3130 y ABI3130XL son interpretados con el programa informático Genemapper® de la casa comercial Life Technologies - Applied Biosystems.

Los electroferogramas obtenidos del análisis de las muestras se entregan para su valoración a los expertos-analistas correspondientes. Serán ellos quienes decidan sobre los valores alélicos para cada marcador, como resultado final del ensayo. En su caso, harán constar en los registros primarios cualquier variación de criterios respecto a los establecidos.

Si bien en el presente trabajo se han interpretado valores alélicos complejos, procedentes de contaminación residual e incluso que pudieran ser picos artefactuales y no alelos, existen unos criterios básicos de interpretación y edición de resultados que se definen a continuación:

E.1) Criterios para interpretación de perfiles únicos

Se considerará perfil único todo aquel que presente un máximo de dos alelos por marcador y aquellos en los que sólo uno de los marcadores presente un máximo de tres alelos. Para que los picos obtenidos en los diferentes marcadores sean considerados como alelos, deberán tener la altura mínima establecida para cada *kit* en la determinación del umbral analítico o límite de detección, llevada a cabo en la validación/verificación. Este límite está establecido en 150 rfu (unidades de fluorescencia), si bien se significa que el propio objetivo del presente estudio es analizar componentes alélicos con valores de fluorescencia mucho menores, precisamente para describir la contaminación residual de ADN.

En los casos en que, por tratarse de una microvariante alélica, el *software* no asigne valor a un alelo, se le asignará el valor correspondiente teniendo en cuenta el número de pares de bases de que conste (número *repeats* completos. Número de bases del incompleto) y se hará constar en el electroferograma que se entregue al experto-analista.

Cuando aparezca una variante alélica que por exceso o por defecto se salga de los valores recogidos dentro del *ladder*, el alelo se denominará con el signo > ó < seguido del valor del último bin real. Esta indicación figurará en el electroferograma que se entregue al experto-analista.

En los casos de marcadores heterocigotos en los que se observe una desproporción en la que uno de los picos tenga una altura menor al 60% del otro, se

indicará con las letras NB en el alelo correspondiente al pico de menor tamaño. Esta indicación figurará en el electroferograma que se entregue al experto-analista, siendo éste quien valore si es necesario repetir la analítica o se da el resultado como aceptable. Se dejará constancia en el electroferograma de la decisión tomada y las razones que la motivan.

Se ha de tener en cuenta la presencia de artefactos en los electroferogramas y en el caso de ser eliminados por el analista encargado de la lectura, se le indicará al experto-analista en el electroferograma.

El criterio de actuación será:

- *STUTTERS*. En principio el *software* Genmapper IDX los reconoce como *stutters* y no como alelos cuando cumplen los requisitos de proporción de altura especificados en el archivo de *stutter* facilitado por las casas comerciales para cada kit o grupo de kits. En picos muy altos, debido a un exceso de señal, el *stutter* puede ser detectado por el software como un alelo. Se eliminarán en perfiles únicos.
- *PULL UPS*. Se producen principalmente cuando hay exceso de señal y se eliminarán en perfiles únicos cuando el tamaño en pares de bases del artefacto coincida con el alelo con exceso.
- ADICIÓN DE NUCLEÓTIDOS *NON TEMPLATE*. Al igual que los anteriores, se dan fundamentalmente cuando hay exceso de señal y son eliminados cuando estamos ante perfiles únicos que presenten una base menos que el pico +A y una relación de tamaño tal que no podamos considerar que se trate de un alelo.
- *ESPIGAS, BURBUJAS, RUIDOS*. El criterio utilizado para su eliminación es su morfología, dado que no se parecen a los picos reales, son más picudos y espigados o más anchos, y no reproductibles, por lo que no vuelven a aparecer en caso de repetirse la inyección.

E.2) Criterios para interpretación de perfiles mezcla

Se considerarán mezclas de perfiles genéticos aquellos electroferogramas que presenten en dos o más marcadores un número igual o mayor a tres alelos. En el informe se hará constar que se trata de una mezcla de perfiles.

En los casos en los que, debido a la desproporción de la altura de los alelos, y a juicio del experto-analista, se pueda diferenciar claramente el componente mayoritario de la mezcla, se podrá dar como resultado dicho componente mayoritario sin tener en

cuenta los alelos que forman el componente minoritario. Esta circunstancia deberá anotarse en los registros primarios.

Los requisitos mínimos establecidos para que los picos obtenidos en los diferentes marcadores sean considerados como alelos serán los mismos que los establecidos para los perfiles simples. Igualmente, los criterios establecidos para microvariantes y variantes alélicas serán los mismos que los indicados para los perfiles únicos.

En las mezclas de perfiles se deberá tener en cuenta la presencia de pérdidas alélicas y aparición de picos que no se corresponden con alelos. Esta circunstancia debe indicarse en los informes.

Para todas las valoraciones se deberá tener en cuenta el resultado de los estudios de validación de mezclas realizados por el laboratorio para cada *multiplex*.

La actuación ante posibles artefactos será la siguiente:

- **STUTTERS.** Se podrán eliminar por el experto-analista aquellos picos que superen el porcentaje establecido por el software Genmapper IDX teniendo en cuenta el número de picos presentes en un marcador y su situación, el número de componentes de la mezcla, y la desproporción entre la altura de los diferentes picos.
- **PULL UPS.** Se eliminarán cuando el tamaño en pares de bases del artefacto coincida con el alelo con exceso, aplicando los mismos criterios que para los **STUTTERS**.
- **ESPIGAS, BURBUJAS, RUIDOS.** El criterio utilizado para su eliminación es su morfología, dado que no se parecen a los picos reales, son más picudos y espigados o más anchos, y no reproducibles, por lo que no vuelven a aparecer en caso de repetirse la inyección.

E.3) Criterios a seguir ante resultados anómalos en los controles

- **Controles de amplificación (uno negativo y uno positivo).** Se puede establecer que la amplificación ha sido correcta cuando el control positivo de amplificación presente un electroferograma en el que todos los alelos cumplan los requisitos anteriores. Los valores deben corresponderse con los establecidos para cada Kit. Asimismo, el control negativo debe presentar un electroferograma plano. Si el resultado de los controles de amplificación no es el previsto, ésta se repetirá, salvo en aquellos casos en que, por no existir más muestra, no sea posible. En estos casos, se

comunicará por escrito al experto-analista y se hará constar de modo que quede registro asociado a las muestras afectadas.

- Controles de extracción. Son todos negativos, por lo que deberemos esperar electroferogramas planos. En el caso de que éste presente algún valor alélico se intentará determinar el origen de la contaminación, iniciando el proceso nuevamente, desde el punto anterior. De todo ello se dará cuenta por escrito al experto-analista y se hará constar de modo que quede registro asociado a las muestras afectadas.

A/ Kit AmpFISTR® Yfiler™

La tabla 2 muestra la denominación de los distintos marcadores, los valores alélicos incluidos en el *ladder* y por último el fluorocromo utilizado.

Tabla 2.- Marcadores, *ladder* alélico y fluorocromos

Denominación de los locus	Alelos incluidos en el <i>ladder</i> del kit YFiler	Fluorocromo
DYS456	13-18	6-FAM™
DYS389I	10-15	
DYS390	18-27	
DYS389II	24-34	
DYS458	14-20	VIC®
DYS19	10-19	
DYS385 a/b	7-25	
DYS393	8-16	NED™
DYS391	7-13	
DYS439	8-15	
DYS635	20-26	
DYS392	7-18	
Y GATA H4	8-13	PET®
DYS437	13-17	
DYS438	8-13	
DYS448	17-24	

Los *kits* permanecerán congelados hasta su uso y una vez abiertos se mantendrán todos sus componentes entre 2° y 8°C, excepto el tubo de AmpliTaq Gold DNA Polymerase que se tendrá entre -15° y -30°C.

La mezcla de amplificación contendrá por muestra 4.6 µl de de AmpFISTR® PCR Y Filer Reaction Mix, 2.5 µl de AmpFISTR Y Filer Primer Set y 0.4 µl de AmpliTaq

Gold® DNA Polymerase. De esta mezcla de amplificación se dispensarán 7.5 µl por 5 µl de muestra normalizada a una concentración entre 0.05 ng/µl y 0.5 ng/µl, salvo en los casos en los que el extracto obtenido tenga una concentración menor a la deseada, que se pasará sin normalizar

Para los controles se añadirán a parte de los 7.5 µl de la mezcla de amplificación:

- 5µl de AmpFISTR Control DNA 007 para el control positivo.
- 5µl de AmpFISTR® Control DNA 9947 para el negativo.

La programación del termociclador, será la descrita en la tabla 3, considerando que las temperaturas tienen una tolerancia de 1°C.

Tabla 3.- Programación del termociclador para el *Kit* AmpFISTR® Yfiler™

Paso inicial de incubación	Ciclo (30 ciclos)			Extensión final	Paso final
	desnaturalización	hibridación	extensión		
Temperatura constante	CICLO			Temperatura constante	Temperatura constante
95°C 11 minutos	94°C 1 minuto	61°C 1 minuto	72°C 1 minuto	60°C 80 minutos	4°C ∞

Para la preparación de la inyección en el secuenciador ABI 3130 se utilizarán los reactivos y volúmenes reflejados en la tabla 4.

Tabla 4.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *Kit* AmpFISTR® Yfiler™

Reactivo	Volumen por reacción	Reactivo	Volumen por reacción
GeneScan™-600 LIZ™ Size Standard v2.0	0.5 µl	GeneScan™-500 LIZ™ Size Standard	0.3 µl
Hi-Di™ Formamide	8.5 µl	Hi-Di™ Formamide	8.7 µl
AmpFISTR® Y Filer™ Allelic ladder.	1.0 µl	AmpFISTR® Y Filer™ Allelic ladder.	1.0 µl
Muestra amplificada	1.0 µl	Muestra amplificada	1.0 µl

El protocolo de inyección se muestra en la tabla 5.

Tabla 5.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *Kit AmpFISTR® Yfiler™*

Genetic Analyzer	Data Collection Software	Operating system	Run modules and conditions*
Applied Biosystems® 3130/3130xl	3.0	Windows® XP	<ul style="list-style-type: none"> HIDFragmentAnalysis36_POP4_1 Injection conditions: 3130 = 3 kV/5 sec 3130xl = 3 kV/10 sec Run conditions: 15 kV/1500 sec <ul style="list-style-type: none"> Dye Set G5

*References: Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Using Data Collection Software v3.0, Protocols for Processing AmpFISTR® Yfiler™ Amplification Kit PCR Products

B/ Kit AmpFISTR® GlobalFiler™

La tabla 6 muestra la denominación de los distintos marcadores, su localización en los cromosomas, los valores alélicos incluidos en el *ladder*, el fluorocromo utilizado y por último el resultado del control de amplificación para cada marcador.

Tabla 6.- Características técnicas del *Kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in allelic ladder	Dye label	DNA control 007
D3S1358	3p21.31	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	6-FAM™	15, 16
vWA	12p13.31	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		14, 16
D16S539	16q24.1	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		9, 10
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
TPOX	2p23-2per	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		8, 8
Y indel	Y	1, 2	VIC®	2
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y		X, Y

D8S1179	8q24.13	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		12, 13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		28, 31
D18S51	18q21.33	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		12, 15
DYS391	Y	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		11
D2S441	2p14	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17	NED™	14, 15
D19S433	19q12	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2, 19.2		14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		7, 9.3
FGA	4q28	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		24, 26
D22S1045	22q12.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	TAZ™	11, 16
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18		11, 11
D13S317	13q22-31	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11, 11
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		7, 12
SE33	6q14	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2,		17, 25.2

		21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37		
D10S1248	10q26.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	SID™	12, 15
D1S1656	1q42.2	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3		13, 16
D12S391	12p13.2	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		18, 19
D2S1338	2q35	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		20, 23

Es importante destacar que los fluorocromos unidos a los *primers* son muy sensibles a la luz, por lo que el tubo de AmpFISTR® GlobalFiler™ Primer Set hay que protegerlo de la luz cuando no se esté utilizando. También habrá que tomar esta medida con el producto amplificado y los tubos de AmpFISTR® GlobalFiler™ Allelic *ladder* y los estándares de tamaño GeneScan™-600 LIZ™ o GeneScan™-600 LIZ™ v2.0

Los *kits* permanecerán congelados hasta su uso y una vez abiertos se mantendrán todos sus componentes entre 2° y 8°C.

Antes del primer uso del *kit*, habrá que añadir un volumen determinado de Aditivo para Master Mix al tubo de Master Mix. Este volumen dependerá de las reacciones del *kit*:

- Para el kit de 200 reacciones se añadirá un volumen de 83 µl de aditivo de Master Mix
- Para el kit de 1000 reacciones se añadirá un volumen de 413 µl de aditivo de Master Mix.

Se usarán esto es 3.75 µl por muestra de master mix y 1.25 µl de primer set.

A éstos 5 µl añadiremos de 7.5 µl de extracto de ADN normalizado.

La programación del termociclador será la descrita en la tabla 7.

Tabla 7.- Programación del termociclador para el *kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Paso inicial de incubación	Ciclo (29 ciclos)		Extensión final	Paso final
	desnaturalización	hibridación/ extensión		
Temperatura constante	CICLO		Temperatura constante	Temperatura constante
95°C 1 minuto	94°C 10 segundos	59°C 90 segundos	60°C 10 minutos	4°C Más de 24 horas

Estas temperaturas tienen una tolerancia de 1°C. Para la preparación de la inyección, se utilizará por muestra los valores que se indican en la tabla 8.

Tabla 8.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Reactivo y muestra	Volumen por reacción
GeneScan™-600 LIZ™ v2.0	0.4 µl
Hi-Di™ Formamide	9.6 µl
AmpFISTR® GlobalFiler™ Allelic ladder	1.0 µl
Muestra amplificada	1.0 µl

El protocolo de inyección se muestra en la tabla 9.

Tabla 9.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Genetic Analyzer	Data Collection Software	Operating system	Run modules and conditions*
Applied Biosystems® 3130/3130xl	3.0	Windows® XP	<ul style="list-style-type: none"> HIDFragmentAnalysis36_POP4_1 Injection conditions: 3130 = 3 kV/5 sec 3130xl = 3 kV/10 sec Run conditions: 15 kV/1500 sec <ul style="list-style-type: none"> Dye Set J6

*References: Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Using Data Collection Software v3.0, Protocols for Processing AmpFISTR® GlobalFiler™ Amplification Kit PCR Products

C/ Kit AmpFISTR® NGM SElect™

El *kit* de amplificación AmpFISTR® NGM SElect™ amplifica en una única reacción de PCR 16 marcadores más la amelogenina utilizando cuatro fluorocromos: 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo). Existe un quinto fluorocromo, el LIZ (naranja), utilizado para marcar el estándar de tamaño.

La tabla 10 muestra la denominación de los distintos marcadores, su localización en los cromosomas, los valores alélicos incluidos en el *ladder*, el fluorocromo utilizado y por último el resultado del control de amplificación para cada marcador.

Tabla 10.- Características técnicas del *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in allelic ladder	Dye label	DNA control 007
D10S1248	10q26.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	6-FAM™	12, 15
vWA	12p13.31	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		14, 16
D16S539	16q24.1	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		9, 10
D2S1338	2q35	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		20, 23
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	VIC®	X, Y
D8S1179	8q24.13	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		12, 13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		28, 31
D18S51	18q21.33	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		12, 15
D22S1045	22q12.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	NED™	11, 16
D19S433	19q12	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2		14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		7, 9.3
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21,		24, 26

		22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		
D2S441	2p14	9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16	PET®	14, 15
D3S1358	3p21.31	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		15, 16
D1S1656	1q42.2	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3		13, 16
D12S391	12p13.2	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		18, 19
SE33	6q14	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37		17, 25.2

Es importante destacar que los fluorocromos unidos a los *primers* son muy sensibles a la luz, por lo que el tubo de AmpFISTR® NGM SElect™ Primer Set hay que protegerlo de la luz cuando no se esté utilizando. También habrá que tomar esta medida con el producto amplificado y los tubos de AmpFISTR® NGM SElect™ Allelic *ladder* y los estándares de tamaño GeneScan™-600 LIZ™ o GeneScan™-600 LIZ™ v2.0

Los *kits* permanecerán congelados hasta su uso y una vez abiertos se mantendrán todos sus componentes entre 2° y 8°C.

Para muestras normalizadas, la mezcla de amplificación contendrá por muestra 5 Ql de de AmpFISTR® NGM SElect™ Master Mix y 2.5 Ql de AmpFISTR® NGM SElect™ Primer Set por muestra. De esta mezcla de amplificación se dispensarán 7.5 µl y además 5 µl de muestra normalizada a una concentración entre 0.05 ng/µl y 0.5 ng/µl, que de forma estándar se ha validado en el Laboratorio de trabajo a

0.1 ng/μl. En los casos en los que el extracto obtenido tenga una concentración menor a la deseada, se pasará sin normalizar.

Para los controles se añadirán a parte de los 7.5 μl de la mezcla de amplificación, 5 μl de AmpFISTR® Control DNA 9947A para el control el control positivo y 5 μl de TE tampón para el negativo.

La programación del termociclador, GeneAmp® PCR System 9700, será la descrita en la tabla 11.

Tabla 11.- Programación del termociclador para el *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Paso inicial de incubación	Ciclo (29 ciclos)		Extensión final	Paso final
	desnaturalización	hibridación		
Temperatura constante	CICLO		Temperatura constante	Temperatura constante
95°C 11 minutos	94°C 20 segundos	59°C 3 minutos	60°C 10 minutos	4°C ∞

Para la preparación de la inyección se utilizará el protocolo descrito en la tabla 12.

Tabla 12.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Reactivo y muestra	Volumen por reacción
GeneScan™-600 LIZ™ v2.0 o GeneScan™-600 LIZ™	0.5 μl
Hi-Di™ Formamide	9.5 μl
AmpFISTR® NGM SElect™ Allelic ladder	1.0 μl
Muestra amplificada	1.0 μl

El protocolo de inyección se muestra en la tabla 13.

Tabla 13.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Genetic Analyzer	Data Collection Software	Operating system	Run modules and conditions*
Applied Biosystems® 3130/3130xl	3.0	Windows® XP	<ul style="list-style-type: none"> HIDFragmentAnalysis36_POP4_1 Injection conditions: 3130 = 3 kV/5 sec 3130xl = 3 kV/10 sec Run conditions: 15 kV/1650 sec <ul style="list-style-type: none"> Dye Set G5

*References: Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Using Data Collection Software v3.0, Protocols for Processing AmpFISTR® NGM SElect™ Amplification Kit PCR Products

D/ Kit AmpFISTR® Identifiler® Plus

El *kit* de amplificación AmpFISTR® Identifiler Plus amplifica en una única reacción de PCR 15 marcadores más la amelogenina utilizando cuatro fluorocromos: 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo). Existe un quinto fluorocromo, el LIZ (naranja), utilizado para marcar el estándar de tamaño.

La tabla 14 muestra la denominación de los distintos marcadores, su localización en los cromosomas, los valores alélicos incluidos en el *ladder*, el fluorocromo utilizado y por último el resultado del control de amplificación para cada marcador.

Tabla 14.- Características técnicas del *Kit AmpFISTR® Identifiler® Plus*

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in allelic ladder	Dye label	DNA control 007
D8S1179	8q24.13	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™	13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		8, 9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		19, 23
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™	14, 15

vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		15, 19
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET®	X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2 50.2, 51.2		23, 24

Es importante destacar que los fluorocromos unidos a los *primers* son muy sensibles a la luz, por lo que el tubo de AmpFISTR Identifiler Plus Primer Set hay que protegerlo de la luz cuando no se esté utilizando. También habrá que tomar esta medida con el producto amplificado y los tubos de AmpFISTR® Identifiler Plus Allelic *ladder* y GeneScan™- 500 LIZ™.

Los *kits* permanecerán congelados hasta su uso y una vez abiertos se mantendrán todos sus componentes entre 2° y 8°C. La mezcla de amplificación contendrá por muestra 5 µl de de AmpFISTR® Identifiler® Plus Master Mix y 2.5 µl de AmpFISTR® Identifiler® Plus Primer Set. De esta mezcla de amplificación se dispensarán 7.5 µl por 5 µl de muestra normalizada a una concentración entre 0.05 ng/µl y 0.5 ng/µl, salvo en los casos en los que el extracto obtenido tenga una concentración menor a la deseada, que se pasará sin normalizar.

La programación del termociclador, GeneAmp® PCR System 9700, será la descrita en la tabla 15, habiendo sido utilizada en el presente trabajo la programación de 28 ciclos, con una tolerancia de 1°C en las temperaturas:

Tabla 15.- Programación del termociclador para el *Kit AmpFISTR® Identifiler® Plus*

Paso inicial de incubación	Ciclo (28 o 29 ciclos)		Extensión final	Paso final
	desnaturalización	hibridación/Extensión		
Temperatura constante	CICLO		Temperatura constante	Temperatura constante
95°C 11 minutos	94°C 20 segundos	59°C 3 minutos	60°C 10 minutos	4°C ∞

Para la preparación de la inyección se utilizarán los volúmenes y reactivos que se muestran en la tabla 16:

Tabla 16.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® Identifiler® Plus*

Reactivo y muestra	Volumen por reacción
GeneScan™-500 LIZ™	0.3 µl
Hi-Di™ Formamide	8.7 µl
<i>AmpFISTR® Identifiler® Plus Allelic ladder</i>	1.0 µl
Muestra amplificada	1.0 µl

El protocolo de inyección en el secuenciador ABI 3130 se muestra en la tabla 17:

Tabla 17.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® Identifiler® Plus*

Genetic Analyzer	Data Collection Software	Operating system	Run modules and conditions
Applied Biosystems® 3130/3130xl	3.0	Windows® XP	<ul style="list-style-type: none"> HIDFragmentAnalysis36_POP4_1 Injection conditions: 3130 = 1.2 kV/12 sec 3130xl = 1.2 kV/12 sec Run conditions: 15 kV/1500 sec <ul style="list-style-type: none"> Dye Set G5

References: Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Using Data Collection Software v3.0, Protocols for Processing AmpFISTR® Identifiler® Plus Amplification Kit PCR Products

3.4.8.4. Referencias o Manuales del fabricante:

- AmpFIStr Yfiler PCR Amplification *kit* User's manual.
- Quick Reference Globalfiler PCR Amplification *Kit*-PCR Setup.
- Quick Reference Globalfiler PCR Amplification *Kit*-PCR Amplification and CE
- AmpFIStr Identifiler PCR Amplification *kit* User's manual.
- AmpFISTR® NGM SElect™ PCR Amplification *Kit* User's manual.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

ESTUDIO A

Detección de contaminación previa a la escena del delito

A.1. El cuerpo humano como foco de contaminación o vector de transferencia secundaria de ADN

El objetivo es comprobar la existencia de restos biológicos que hayan sido depositados sobre la piel de la propia víctima, pudiendo ser de autor de la agresión o bien conformando un *background* residual que puede convertir a la propia víctima en un medio de transferencia secundaria de ADN. El estudio consta de dos partes, una experimental bajo condiciones controladas de laboratorio y otra de casuística real, con contacto entre agresor y víctima.

A.1.1. Diseño experimental bajo condiciones de laboratorio

Como sujetos de estudio se seleccionaron cuatro parejas varón - mujer (A, B, C, D) en el que el varón actuó como agresor y la piel de la mujer fue la superficie de depósito de los restos biológicos por contacto. Todos los sujetos aportaron su muestra indubitada de ADN, que fue tomada mediante frotis bucal con torunda de algodón estéril.

Se simuló un estrangulamiento mediante agarre y fricción continuada durante un minuto aproximadamente por parte del varón hacia la mujer en cada pareja. La superficie de agarre, fricción y contacto es el brazo, en su mitad entre el codo y la muñeca, tanto en la cara anterior como en la posterior.

Se realizó la toma de muestra en los dos brazos, izquierdo y derecho, en dos tiempos de control: 15 minutos (brazo izquierdo) y 60 minutos (brazo derecho). El material utilizado en los frotis de recogida de evidencias fueron torundas de algodón estériles impregnadas en agua Mili-Q autoclavada a 150°C y guantes estériles de un solo uso y el personal de recogida de las evidencias fue diferente en los casos de las cuatro parejas y en los dos tiempos de control y a su vez diferente del que realizó los análisis de extracción, purificación y análisis de DNA, con el objeto de simular las condiciones óptimas de trabajo. Se utilizaron dos *kits* de amplificación diferentes, para comprobar los resultados en los marcadores STR comunes y garantizar la reproducibilidad del estudio.

Los procedimientos técnicos de análisis fueron PTA-4, PTA - 7 y PTA-8 (con los *kits* de análisis *Kit AmpFISTR® Identifiler Plus™* y *Kit AmpFISTR® NGM SElect™*).

El umbral mínimo de fluorescencia para la consideración de un pico como alelo se establece en 150 rfu sin impedir la valoración técnica de picos por debajo de ese umbral.

Resultados A.1.1.

Los resultados obtenidos de los sujetos y casos analizados en estos experimentos se reflejan en la tabla 18.

Tabla 18.- Valores de cuantificación de ADN de las muestras del estudio A.1.1.

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		
Mezclas dubitadas obtenidas en frotis sobre brazos de víctima		
Muestra	Qf (15 minutos) (ng/μl)	Qf 60 minutos (ng/μl)
Mezcla pareja A	0.0526	0.0377
Mezcla pareja B	0.0887	0.0497
Mezcla pareja C	0.0751	0.0831
Mezcla pareja D	0.0846	0.0728
Muestras indubitadas de referencia - Agresor		
Muestra	Qf (ng/μl)	
Agresor A	17.3000	
Agresor B	6.8000	
Agresor C	8.1400	
Agresor D	19.2000	
Muestras indubitadas de referencia - Víctima		
Muestra	Qf (ng/μl)	
Víctima A	8.1000	
Víctima B	7.1000	
Víctima C	5.4700	
Víctima D	26.5000	

Los electroferogramas correspondientes a los estudios de las parejas A y B se muestran en las figuras 7 a 13, en ellos se muestran picos claros en alguno de los diferentes loci analizados.

Estudio experimental en pareja A

Figura 7: electroferograma de varón agresor en pareja A

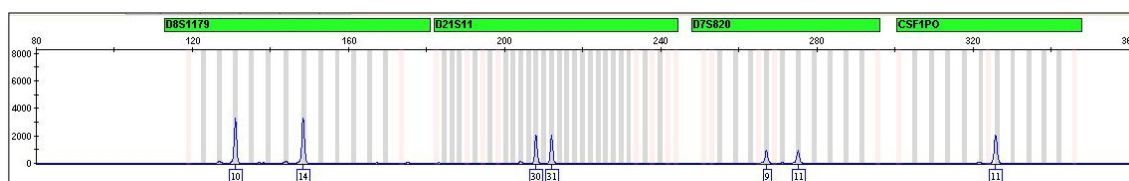


Figura 8: electroferograma de mujer víctima en pareja A

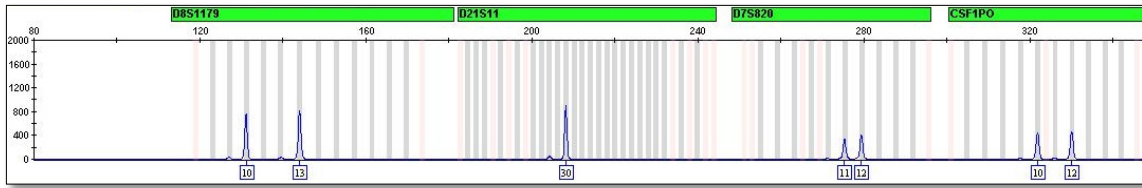
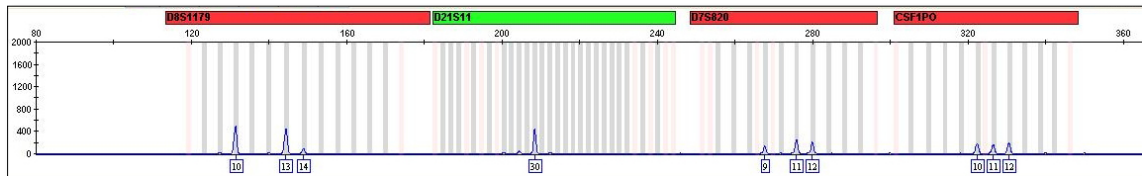


Figura 9: electroferograma de frotis de restos biológicos sobre epitelio del brazo de mujer víctima en pareja A (tiempo: 60 minutos)



Estudio experimental en pareja B

Figura 10: electroferograma de varón agresor en pareja B

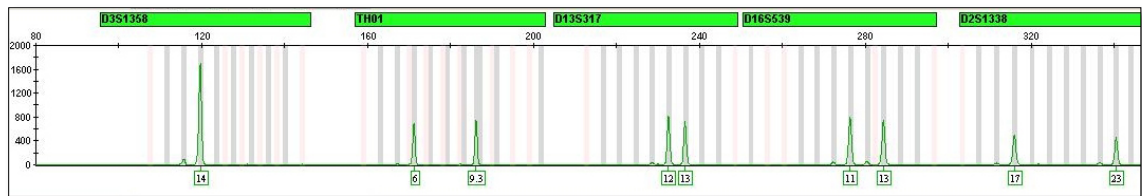


Figura 11: electroferograma de mujer víctima en pareja B

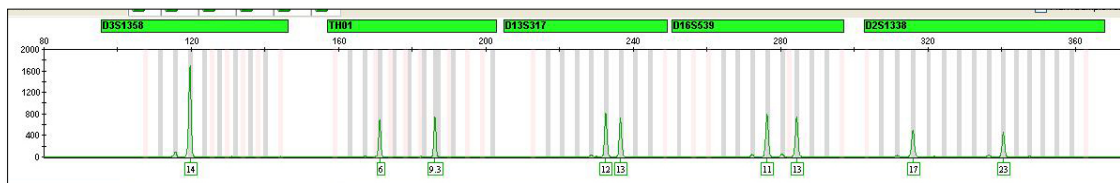


Figura 12: electroferograma de frotis de restos biológicos sobre epitelio del brazo de mujer víctima en pareja B (tiempo: 60 minutos), amplificada con el *kit* AmpFISTR® Identifiler Plus™

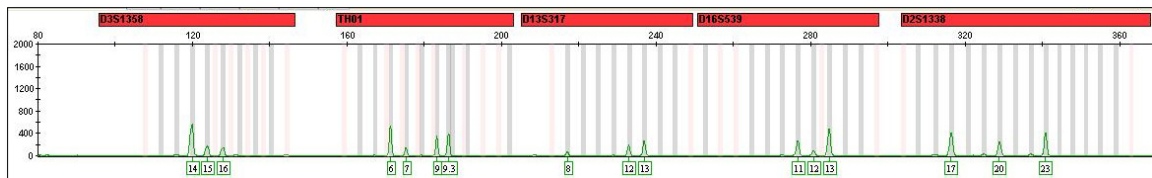
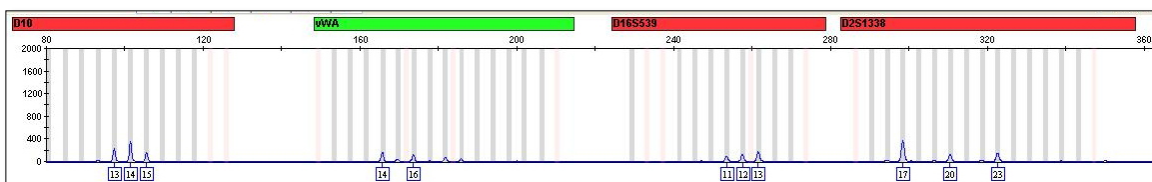


Figura 13: electroferograma de frotis de restos biológicos sobre epitelio del brazo de mujer víctima en pareja B (60 minutos), amplificada con el *Kit* AmpFISTR® NGM Select™



A.1.2. Casuística real

Sujetos de estudio y situación. Tras un caso real de agresión sexual en el que medió contacto físico entre agresor (varón) y víctima (mujer) se tomaron varias muestras dubitadas sobre el cuerpo de la víctima. Dicha recogida se practicó por personal médico – forense del Instituto de Medicina Legal de Galicia (IMELGA) durante la exploración facultativa de la víctima en aproximadamente una hora y cuarenta y cinco minutos después de la agresión.

La toma de muestra se realizó mediante el uso de torundas de algodón y guantes estériles de un solo uso.

Tipología de las muestras de referencia. Se dispuso de muestras indubitadas de víctima y sospechoso, consistentes en frotis de epitelio bucal indubitado.

Tipología de las muestras dubitadas. Se dispuso de una muestra de frotis vaginal de la víctima con componente espermático del agresor. Se tomaron también frotis de restos biológicos por contacto sobre la cara interior de los muslos de la víctima, mediante torundas estériles y guantes de un solo uso.

Se realizaron pruebas preliminares PTA-2 y PTA-3 de orientación y certeza de la presencia de esperma, ambas con resultado positivo. En el caso de la muestra vaginal de la víctima, con componente espermático, se realizó una extracción diferencial PTA-5, con objeto de aislar el perfil genético de la fracción haploide de la muestra.

Los procedimientos técnicos de análisis fueron PTA-4 y PTA-5, PTA - 7 y PTA-8 (con el *kit* de análisis AmpFISTR® Identifier Plus™).

El umbral mínimo de fluorescencia para la consideración de un pico como alelo se establece en 150 rfu sin impedir la valoración técnica de picos por debajo de ese umbral.

Resultados A.1.2.

Los resultados obtenidos de los sujetos y casos analizados en estos experimentos se reflejan en la tabla 19.

Tabla 19.- Valores de cuantificación de ADN de las muestras del estudio del caso real.

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN	
Muestras de referencia indubitadas de agresor y víctima	
Muestra	Qf (ng/μl)
Agresor	18.5000
Víctima	12.5200
Muestras dubitadas recogidas por médico forense	
Muestra	Qf 105 minutos (ng/μl)
Frotis vaginal 2n	0.2070
Frotis muslo	0.1810

Los electroferogramas correspondientes a los estudios de las parejas A y B se muestran en las figuras 14 a 18, en ellos se muestran picos claros en alguno de los diferentes loci analizados.

Figura 14: electroferograma del autor condenado por el delito

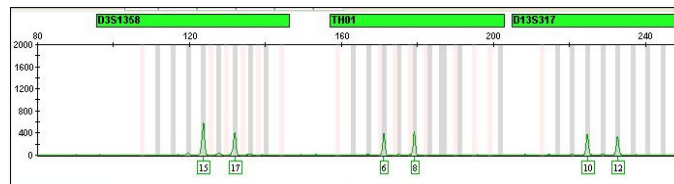


Figura 15: electroferograma de la víctima del delito

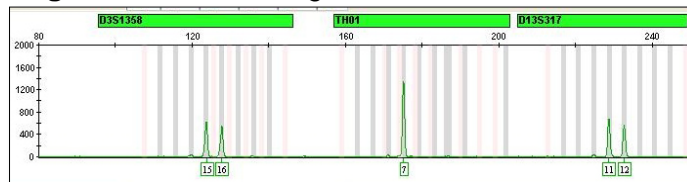


Figura 16: electroferograma de la fracción haploide masculina, obtenida por lisis diferencial de la muestra vaginal

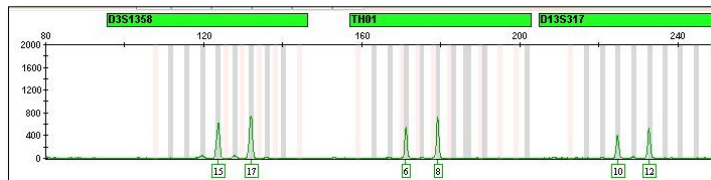


Figura 17: electroferograma del frotis de restos biológicos tomado sobre el muslo derecho de la víctima

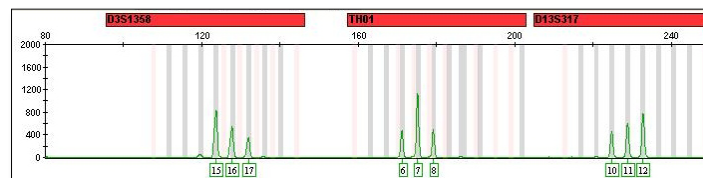
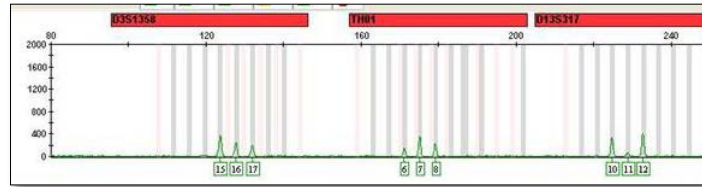


Figura 18: electroferograma del frotis vaginal de la víctima



Descripción de los resultados del Estudio A1 (A.1.1 y A.1.2)

Como se puede observar en las tablas 18 y 19, los valores de cuantificación son correctos y esperados en el caso de las muestras indubitadas, con una buena concentración de ADN derivada de una gran cantidad de ADN en el depósito y una alta eficiencia en la extracción. Difiere en relación con las muestras dubitadas, con valores mucho más bajos que, al tratarse de trazas epiteliales por contacto, son también esperados.

No se observan diferencias significativas entre las cuantificaciones de los frotis realizados a diferente tiempo (15 y 60 minutos respectivamente) sobre la piel de la víctima.

En el caso real pueden compararse los valores de la mezcla de la víctima procedente del lavado vaginal tras la violación y la muestra de trazas epiteliales tomada sobre epitelios de las piernas de la víctima, con unos valores muy similares de cuantificación.

En los electroferogramas del estudio experimental se observa la existencia de mezclas de perfiles con ambos componentes agresor - víctima, que actúan como contribuyentes de la muestra problema. En muchos de los marcadores analizados se puede observar que el perfil genético del agresor es, como era de esperar, el componente minoritario de la mezcla.

En todo caso, los valores de los alelos detectados se encuentran por encima del límite de detección estimado de 150 rfu. En la valoración de los fenómenos estocásticos que pueden ocurrir en estos casos de mezclas podemos considerar en el electroferograma de la mezcla sobre el brazo de la víctima A (60 minutos) (figura 9) el marcador D21S11, en el que uno de los alelos (31) correspondiente al donante agresor no es detectado en el electroferograma. En los otros tres marcadores se pueden observar mezclas de los dos componentes indubitados, apreciándose en los

marcadores D8S1179 y D7S820 un claro componente minoritario que corresponde al donante agresor A.

En el caso de la pareja B se muestran los electroferogramas de unos marcadores diferentes, comparando el agresor de la pareja B, su víctima y la muestra mezcla de epiteliales por contacto tomada a los 60 minutos. Se puede observar como existe una mezcla con ambos componentes indubitados, que actúan como contribuyentes de la muestra problema. Se comprueba que el componente minoritario de la mezcla coincide casi plenamente con el agresor, dato esperado por el diseño experimental.

En algunos marcadores, tales como D3S1358 y D16S539, es evidente la contribución minoritaria del perfil del donante agresor en la mezcla de trazas biológicas por contacto.

Para comprobar la reproducibilidad de los resultados se valoran los datos obtenidos con el *kit* identifiler plus y el *kit* NGMSelect, pudiendo observarse que en los dos marcadores coincidentes (D2S1338 y D16S539) en la línea de muestra los resultados son similares, si bien en NGMSe no es sencillo distinguir los componentes mayoritario y minoritario, pero el resultado es claramente reproducible con dos *kits* de amplificación diferentes.

En relación con el estudio A.1.2, correspondiente a casuística real, en los electroferogramas presentados se comparan los marcadores estudiados del perfil genético del autor confeso y condenado por sentencia firme de la agresión con el perfil genético de la víctima, con la mezcla de epiteliales por contacto tomada en la cara interna de los muslos de la víctima, comparada con la mezcla de células diploides obtenida del lavado vaginal de la víctima, en la que hay componente espermático y también comparado con la fracción masculina de esta última muestra obtenida por extracción diferencial de los componentes haploide y diploide de la misma.

Estas muestras, que fueron tomadas casi dos horas después de la comisión del delito, aportan unos resultados correctos de asignación alélica por parte del *software*, apreciándose en las muestras analizadas un alto valor identificativo.

El estudio comparado de los datos presentados permite afirmar que el mismo perfil del sospechoso se repite en la fracción masculina del lavado vaginal de la víctima y que la mezcla originada por la víctima y el sospechoso se correspondería fielmente con la mezcla evidenciada en la fracción diploide del lavado vaginal, así como con la mezcla de epiteliales sobre los muslos de la víctima. Incluso los valores de unidades de fluorescencia e intensidad de la señal electroforética son mejores en la

muestra de trazas epiteliales de contacto, lo que indica el alto poder de discriminación y eficiencia de este tipo de muestra.

A.2. La persistencia de restos biológicos sobre elementos balísticos detonados y sin detonar

El objetivo es determinar la existencia, persistencia en el tiempo y potencial eficiencia en la recogida de restos biológicos sobre elementos balísticos, una evidencia muy frecuente en la práctica forense, cuya recogida en la escena del delito tiene la peculiaridad de que el estudio tradicional que se ha realizado sobre estas evidencias es de tipo descriptivo (munición y arma) y mecánico (estudio de las lesiones de disparo sobre el culote de la vaina y sobre el proyectil) (figura 19). Se pretende comprobar si podría ser preceptivo otro estudio sobre este tipo de elementos. El estudio se divide en dos partes, por un lado determinar la persistencia de los restos sobre elementos balísticos sin percutir y por otro lado, comprobar si es eficiente la obtención de restos biológicos sobre los proyectiles percutidos y detonados, que han sido sometidos a condiciones extremas de temperatura.

Figura 19: arma, munición y cargador utilizados en el estudio A.2.1 y A.2.2



Los procedimientos técnicos de análisis fueron PTA-4, PTA - 7 y PTA-8 (con el *kit* de análisis AmpFISTR® Identifiler Plus™ y AmpFISTR® NGM SElect™).

Si bien el umbral mínimo de fluorescencia para la consideración de un pico como alelo se establece en 150 rfu en el Laboratorio en el que se llevaron a cabo los análisis, en este caso se valoran todos los picos observados en el electroferograma, puesto que el propio objetivo del estudio es comprobar si existen picos de alturas muy

inferiores a los umbrales que pudieran encontrarse en otro tipo de muestras de perfil mayoritario y que pudieran proceder de contaminación residual, modificando la valoración de perfiles único a perfiles mezcla o bien dificultando la valoración de los perfiles.

A.2.1. Estudio de la persistencia de restos por fricción

En este primer estudio se analizaron cartuchos que han sido sometidos a una fricción fuerte, pero durante un tiempo mínimo, para su introducción en el cargador o alimentador del arma. Este tiempo, como máximo de 5 segundos, permite evaluar hasta qué punto pueden existir depósitos de restos biológicos en la escena del delito, aunque se trate de manipulaciones mínimas que pudieran no considerarse como relevantes por parte de los especialistas que procesan la escena del delito, en el momento de la evaluación preliminar de la misma.

Este estudio sobre elementos balísticos, que se realizó bajo condiciones experimentales consta del análisis de seis proyectiles del calibre 9 mm corto sin detonar que fueron introducidos en un cargador de pistola de la marca STAR, modelo D-1922 (figura 19), 48 horas antes de la toma de la muestra. La fricción que se ejerce sobre el proyectil para vencer la resistencia del muelle alimentador puede considerarse como fuerte, pero el tiempo oscila entre 2 y 5 segundos.

Se disponía, a modo de muestras de referencia, del perfil genético del varón donante. Las muestras dubitadas se recogieron mediante frotis con torundas de algodón estériles impregnadas en agua mili-Q.

Resultados A.2.1.

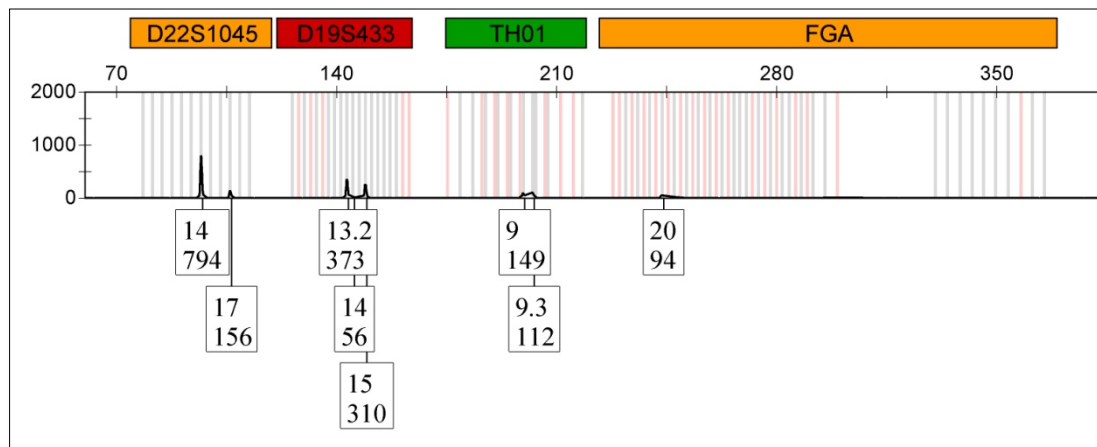
Los resultados obtenidos de las muestras de proyectiles analizados en estos experimentos se reflejan en la tabla 20.

Tabla 20.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.2.1

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		PERFIL GENÉTICO
Frotis de la superficie del proyectil 48 horas después del depósito de restos		Amplificación +/-
Muestra	Qf (ng/μl)	
Proyectil 1	0.0000	NEGATIVO
Proyectil 2	0.0026	NEGATIVO
Proyectil 3	0.0278	POSITIVO
Proyectil 4	0.0013	NEGATIVO
Proyectil 5	0.0000	NEGATIVO
Proyectil 6	0.0003	NEGATIVO

El electroferograma correspondiente a alguno de los loci analizados a partir del DNA obtenido en el proyectil 3 se muestran en la figura 20.

Figura 20: electroferograma del frotis sobre la superficie del proyectil 3



A.2.2. Estudio de la persistencia de restos por fricción en cartuchos sometidos a condiciones extremas de temperatura

En este segundo estudio se analizaron seis cartuchos que fueron sometidos a igual manipulación que el estudio anterior, es decir, una fricción fuerte, pero durante un tiempo mínimo, para su introducción en el cargador o alimentador del arma.

Sin mediar tiempo fueron detonadas con una pistola semiautomática de la marca STAR, modelo D-1922 en condiciones de seguridad en una galería de tiro, y recogidas por personal especializado según protocolo de las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad. Se introdujeron en sobre de papel sin manipulación externa, mediante el uso de torundas estériles que se introdujeron por la abertura de la vaina.

Posteriormente se remitieron al Laboratorio de Genética Forense, para la práctica de frotis con torundas de algodón estériles impregnadas en agua mili-Q sobre la superficie de las vainas ya detonadas.

Tras la detonación, la temperatura que adquiere la pólvora puede llegar a alcanzar valores de 250°C en el interior de la misma, por lo que la superficie exterior de la vaina está sometida a unas condiciones extremas de temperatura. El tiempo en el que ocurren todos estos fenómenos de percusión, ignición, deflagración y recorrido de la bala por el ánima del cañón de la pistola utilizada es de unos 3 a 8 milisegundos, por lo que la duración de estas condiciones extremas es mínima. Las concentraciones

de ADN obtenidas en las diferentes vainas, así como la amplificación positiva o negativa del perfil genético se muestran en la tabla 21.

Tabla 21.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.2.2

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		PERFIL GENÉTICO
Frotis de la superficie de la vaina 15 minutos después de la detonación.		Amplificación +/-
Muestra	Qf (ng/μl)	
vaina 1	0.0020	NEGATIVO
vaina 2	0.0170	POSITIVO
vaina 3	0.0000	NEGATIVO
vaina 4	0.0010	NEGATIVO
vaina 5	0.0100	POSITIVO
vaina 6	0.0000	NEGATIVO

Se analizaron los perfiles genéticos de los ADN obtenidos en el experimento anterior. Los electroferogramas correspondientes de la vaina 2 (figuras 21 y 22) y 5 (figuras 23 y 24) muestran picos claros para la identificación alélica. Además, se determinó el perfil genético del donante voluntario que había manipulado las vainas. Electroferogramas de frotis bucal se muestran en la figura 25. En base a estos perfiles se estableció un genotipo de marcadores STR para el cotejo positivo del donante de las muestras (tabla 22).

Figura 21: electroferograma A del frotis sobre la superficie de la vaina 2

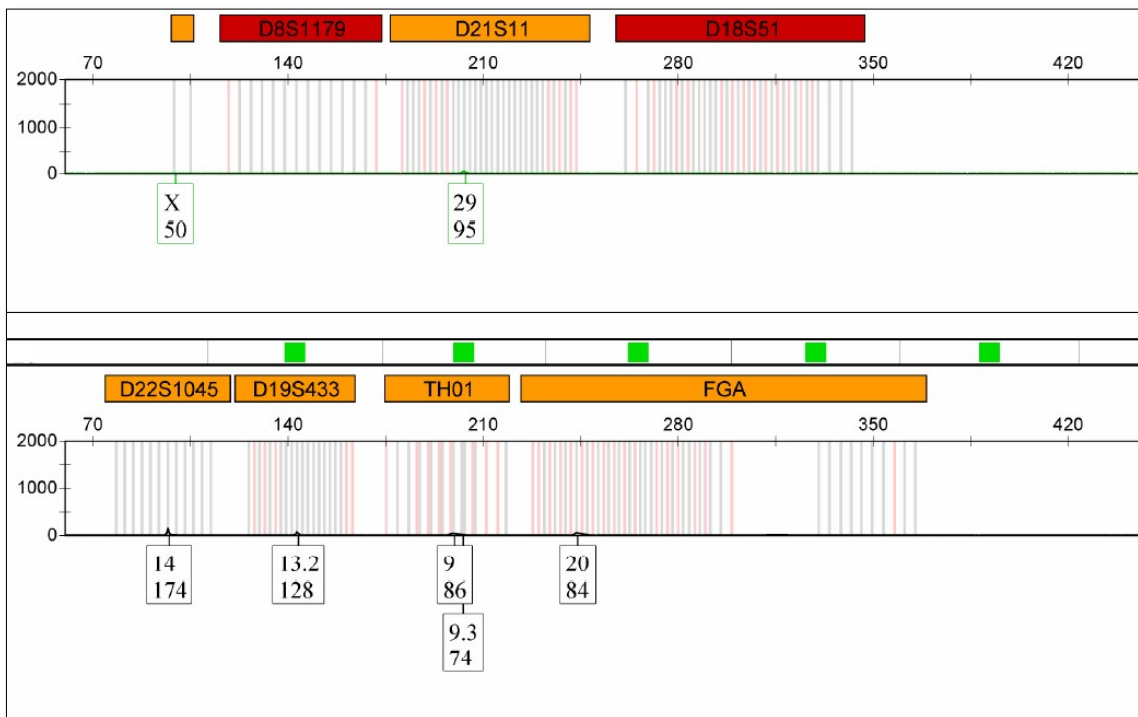


Figura 22: electroferograma B del frotis sobre la superficie de la vaina 2

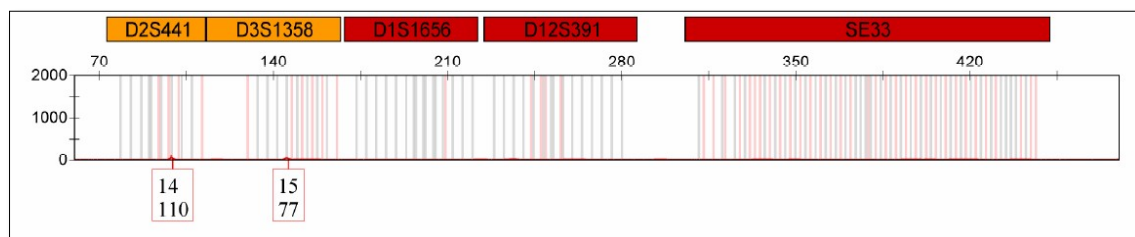


Figura 23: electroferograma A del frotis sobre la superficie de la vaina 5

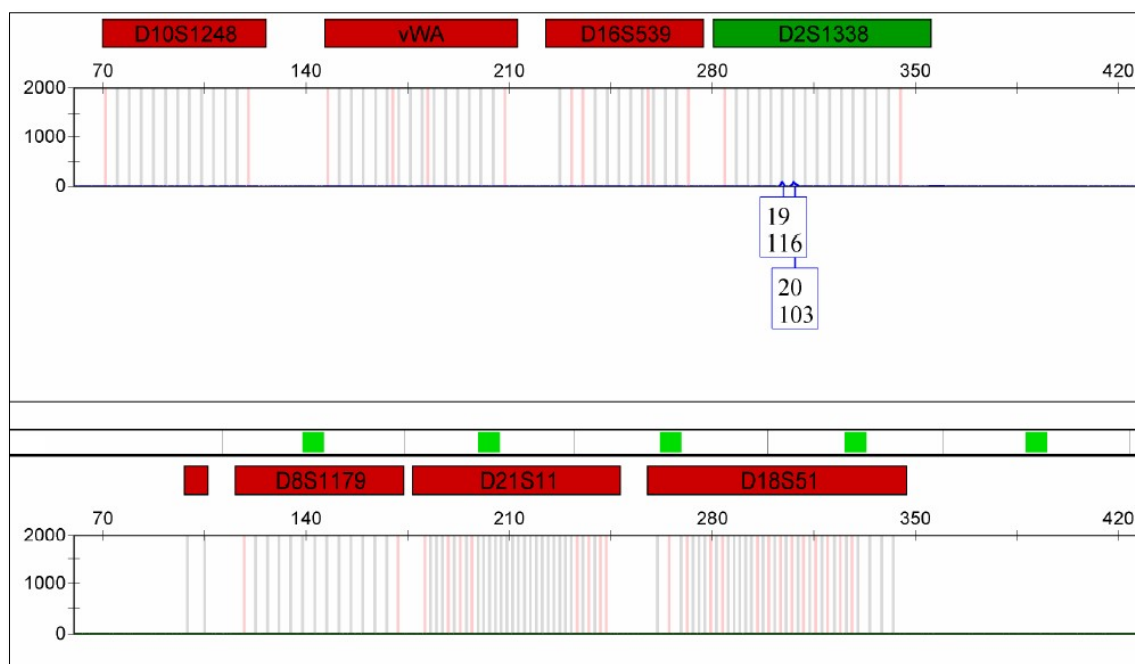


Figura 24: electroferograma B del frotis sobre la superficie de la vaina 5

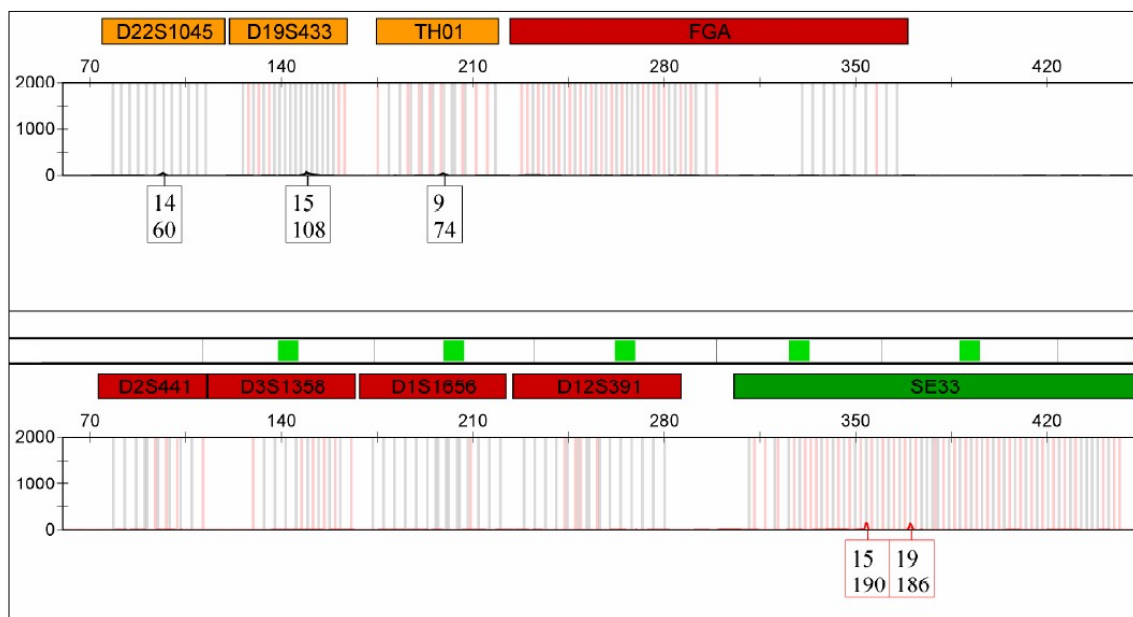


Figura 25: electroferograma parcial del frotis bucal indubitado del donante A

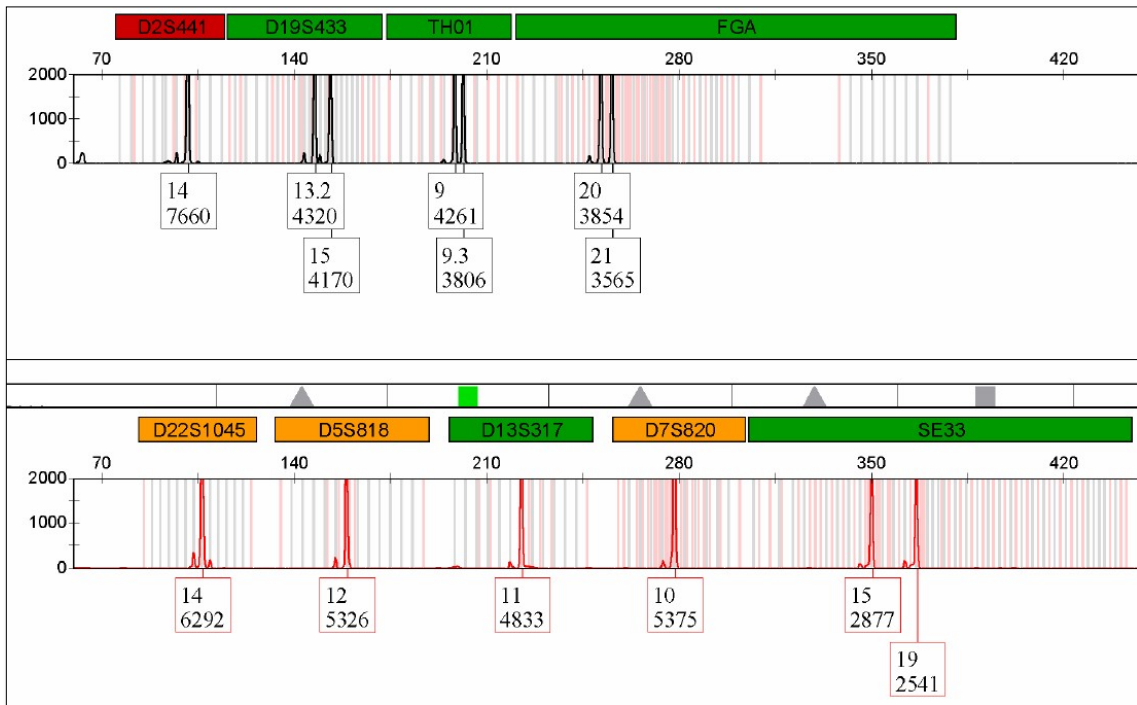


Tabla 22.- Marcadores STR con posible cotejo positivo del donante A. Estudio A.2.2

Perfil genético del Donante para los marcadores con resultado positivo						
Donante A	D2S1338	D21S11	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358
	19-20	29-32.2	13.2-15	9-9.3	14-14	15-18
	D22S1045	SE33				
	14-14	15-19				

Descripción de los resultados del estudio A.2 (A.2.1 y A.2.2)

En el estudio A.2.1 (determinación de persistencia con fricción mínima) solo uno de las seis muestras (frotis sobre los proyectiles) analizadas, obtuvo un valor de cuantificación significativo (0.0278 ng/μl), resultando un electroferograma de muy difícil interpretación, con intensidad de fluorescencia muy baja, por debajo de los límites de asignación alélica en muchos marcadores.

Incluso en las muestras con niveles de cuantificación residuales o inexistentes se procedió a la amplificación PTA-8, con electroferogramas negativos como consta en la tabla de resultados.

En este diseño experimental, el donante era conocido y los marcadores que se muestran en las imágenes de la muestra dubitada y el perfil del donante son coincidentes en las asignaciones alélicas. El resultado aporta muestras de muy bajo nivel de ADN y difícil o no concluyente interpretación, pero que pueden llegar a aportar datos importantes si se cuenta con un perfil de presunto donante para comparar.

En la figura 20 pueden observarse alelos por encima e incluso muy por encima del umbral de 150 rfu, en concreto en el marcador D22S1045 (alelos 14 y 17) y en el marcador D19S433 (alelos 13.2 y 15). Incluso en el marcador TH01 se encuentra casi en el límite del umbral el alelo 9 (valor de rfu: 149).

Los picos alélicos observados que superan el umbral de fluorescencia tienen valor identificativo y en el resto de los casos podrían dificultar la interpretación de mezclas.

En el estudio A.2.2 (determinación de persistencia de restos en proyectiles detonados sometidos a condiciones extremas de temperatura durante tiempos mínimos) se puede comprobar que los valores de cuantificación de las muestras son insignificantes. Incluso con estos valores se procedió al amplificado y lectura del electroferograma, pudiendo observar como los picos alélicos no superan el umbral mínimo de 150 rfu en casi todos los casos. Sin embargo, puede observarse una coincidencia con el perfil del donante, lo que lleva a considerar que la persistencia de restos sí que es positiva.

Es significativo el valor del marcador SE33 (figura 24: vaina 5), con dos alelos 15 (*rfu: 190*) y 19 (*rfu:186*) por encima del umbral y con valor identificativo, coincidentes plenamente con el perfil del donante en ese marcador.

A.3. Estudio de restos biológicos sobre efectos antiguos

El estudio, que se divide en cuatro apartados, dos de tipo experimental y dos de casuística real, tiene como objetivo determinar la persistencia de restos biológicos antiguos en diferentes efectos y superficies y si de ellos se pueden obtener perfiles genéticos de los donantes o bien si pueden generar un *background* residual de ADN. Pueden hallarse múltiples vestigios en la escena de los delitos que hayan sido depositados con mucha antelación al suceso investigado y que sin embargo puedan aportar perfiles genéticos parciales o completos que dificulten la interpretación o incluso que generen conclusiones erróneas, por lo que sería un factor que debe ser tenido muy en cuenta por los investigadores y por los analistas.

Los procedimientos técnicos de análisis fueron PTA-4 y PTA-6, PTA - 7 y PTA-8 (con el *kit* de análisis AmpFISTR® Identifiler Plus™, *Kit* AmpFISTR® Yfiler™ y AmpFISTR® NGM SElect™).

El umbral mínimo de fluorescencia para la consideración de un pico como alelo se establece en 150 rfu sin impedir la valoración técnica de picos por debajo de ese umbral.

A.3.1. Estudio de los restos biológicos en colillas depositados 7 años antes de su recogida y análisis

Varias colillas consumidas total o parcialmente fueron recogidas durante el procesado de un vehículo que se había encontrado en lugar cerrado y aislado durante un período algo superior a los siete años. En este caso se presentan los resultados de las muestras dubitadas, no existiendo a priori muestras de referencia. El interés de estos depósitos se encuentra en la posibilidad de encontrar perfiles únicos y completos, con intensidad suficiente y estado de degradación mínimo, con capacidad identificativa, pero que hayan sido depositados mucho tiempo antes del suceso investigado.

Resultados del estudio A.3.1.

Las concentraciones de ADN obtenidas de algunas de las colillas se muestran en la tabla 23. A partir de ellas se obtuvieron unos perfiles genéticos de los que en la figura 26 se muestran alguno de los electroferogramas.

Tabla 23.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.1

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		PERFIL GENÉTICO
Macerado de la boquilla troceada		Amplificación +/-
Muestra	Qf (ng/μl)	
Colilla cigarrillo A	1.51	POSITIVO
Colilla cigarro puro B	0.532	POSITIVO

Figura 26: electroferograma de la colilla de cigarrillo A. Estudio A.3.1

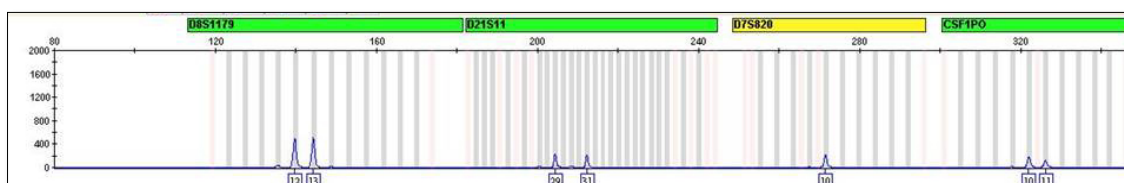
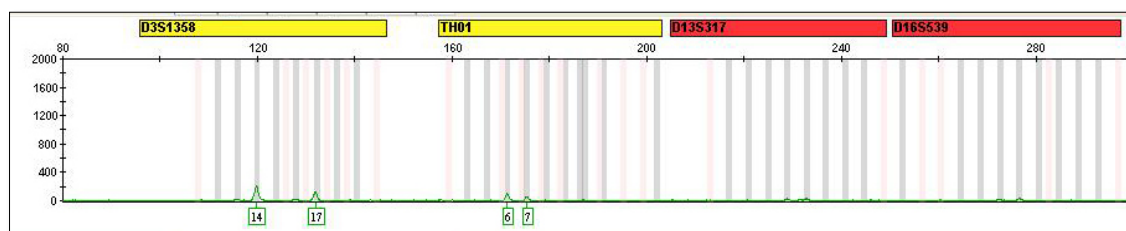


Figura 27: electroferograma de la colilla del cigarro - puro B. Estudio A.3.1



Descripción de los resultados del estudio A.3.1.

Los datos de cuantificación son claramente significativos y los electroferogramas son perfiles claramente identificativos. En el eje de la X se muestran las intensidades de fluorescencia, encontrándose la mayor parte de los alelos por encima de los valores de 150 rfu.

En la figura 27 se observa una escasa señal electroforética en algunos marcadores, pero en casi todos los componentes alélicos por encima del umbral de detección. La degradación de ADN en los marcadores de mayor número de pares de bases es lógica si se considera el factor temporal.

A.3.2. Estudio de los restos biológicos obtenidos de uñas sometidas a condiciones extremas de conservación durante elevados períodos de tiempo antes de su recogida y envío a laboratorio para su análisis

Por las condiciones en las que desapareció el donante se concluye que el resto humano permaneció en sumersión gran parte de los 24 meses, protegido por un calcetín y un zapato, pero en un estado de degradación total. La muestra (B) sirve como ejemplo de restos de uñas que soportan condiciones de exposición muy adversas, e incluso así pueden conservar su capacidad para proteger el ADN que contienen en condiciones de maceración o cocción, estas uñas fueron recogidas de un cadáver en avanzado estado de descomposición y sometidas a un proceso de cocción (figura 28). Las uñas son un vestigio que puede encontrarse fácilmente en una vivienda, durante el procesado de la escena del delito, en ocasiones en ceniceros, en contacto con colillas o bien en contacto con otros efectos, tales como cortauñas, tijeras, etc., que pudieran recogerse para su analítica. El tiempo transcurrido y el estado de degradación, pudieran ofrecer dudas sobre su eficiencia en una primera evaluación de la escena y de los vestigios a recoger.



Figura 28: fotografía de la muestra A (uña de pie humano) previa al proceso de maceración del PTA-4. Estudio A.3.2

Resultados del estudio A.3.2.

Las concentraciones de ADN de las muestras analizadas se reflejan en la tabla 24 así como la capacidad de inferir un perfil genético.

Tabla 24.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.2

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		PERFIL GENÉTICO
Macerado de la uña troceada		Amplificación +/-
Muestra	Qf (ng/μl)	
A: uña sumersión	0.0263	POSITIVO
B: uña cocción	0.0402	POSITIVO

A partir de los ADN obtenidos de las uñas se procedió a amplificar en ADN para determinar el genotipo. Electroferogramas correspondientes a dichos análisis se muestran en las figuras 29 a 31.

Figura 29: electroferograma de STRs autosómicos de la muestra A. Estudio A.3.2

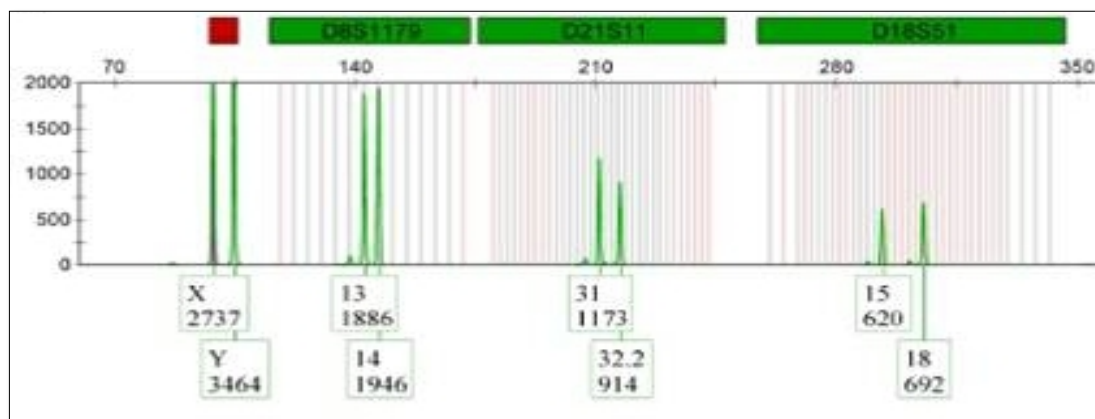


Figura 30: electroferograma de STRs de cromosoma Y de la muestra A. Estudio A.3.2

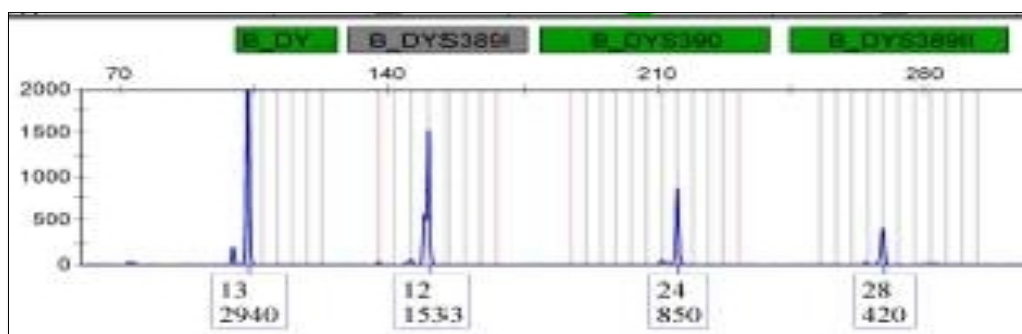
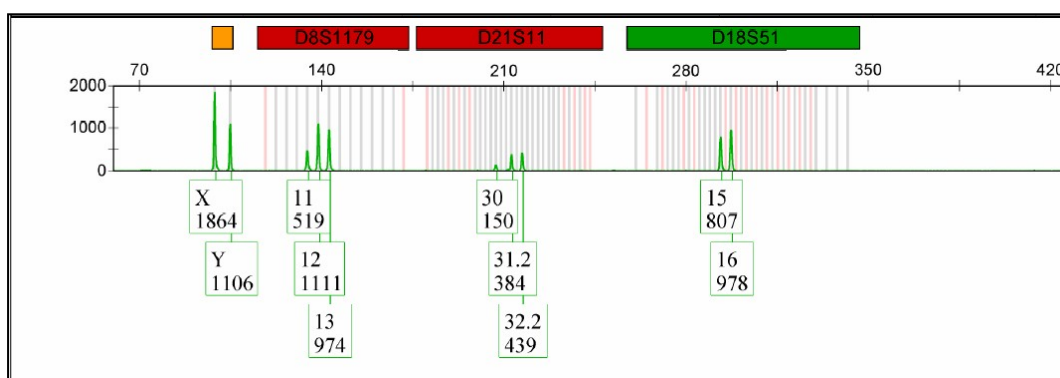


Figura 31: electroferograma de STRs autosómicos de la muestra B. Estudio A.3.2



Descripción de los resultados del estudio A.3.2:

En la figura 28 (muestra A) puede observarse el mal estado de la uña del pie, ofreciendo mucha dificultad a la manipulación con pinzas y material de laboratorio. En las figuras 29 y 30 se muestran los electroferogramas obtenidos de las amplificaciones de marcadores de cromosoma Y y de marcadores autosómicos respectivamente, con una lectura correcta por encima de los umbrales de fluorescencia y una asignación alélica correcta en todos los marcadores. La figura 31 (muestra B) se interpreta en el mismo sentido, por lo que la persistencia de restos biológicos en este tipo de muestras es altísima y el resultado electroforético es potencialmente identificativo.

A.3.3. Estudio de la persistencia de restos biológicos durante un elevado período de tiempo en condiciones experimentales sobre armas blancas utilizadas con violencia sobre superficies resistentes

En el presente estudio se estudiaron dieciséis armas blancas, con mango de diferente material, forma y textura, utilizadas de forma individual por dos donantes varones conocidos, de los que se disponía de muestra indubitada de referencia.

Todas las armas utilizadas, catorce cuchillos, una navaja de apertura manual y un abrecartas utilizado como punzón, fueron sometidos a limpieza exhaustiva con lejía diluida en agua mili - Q de forma previa al experimento.

Las ocho muestras de cada donante (SERIES 1 y 3 con Donante A y Series 2 y 4 con Donante B) fueron recogidas ocho meses después del depósito de los restos biológicos, mediante frotis con torunda de algodón estéril impregnada en agua mili-Q. Durante este período de tiempo fueron conservadas en armario cerrado a temperatura ambiente, sin ningún tipo de manipulación.

Este estudio pretende comprobar si la fricción estimada del uso de un arma en un hecho delictivo puede generar depósitos que permanezcan durante largo tiempo en condiciones de conservación estándar y si los perfiles genéticos obtenidos, que debieran ser únicos por ser la condición experimental impuesta, tienen valor identificativo, y poner este hecho en relación con el estado de la escena de un delito, que no ha sido sometido a ningún tipo de limpieza previa y en el que el *background* residual de ADN puede no sólo ser estimado como contaminación, sino como perfiles con valor identificativo.

En el tratamiento de las muestras de forma individual, los niveles de cuantificación de ADN podrían no ser suficientes para la amplificación y genotipado de las muestras, siguiendo en la práctica forense un criterio restrictivo. En el presente estudio, se procedió al genotipado de la muestra independientemente de su nivel de cuantificación, puesto que se pretende evaluar si podría estar presente como contaminación o *background* residual que afectase a muestras que por su alta cantidad de ADN, sí fuesen seleccionadas para su amplificación y genotipado.

Resultados del estudio A.3.3.

Para la presenta prueba se realizó el diseño experimental que se muestra en la figura 32. Los valores de ADN obtenidos de los diferentes mangos, así como la

posibilidad de realizar un perfil genético a partir de los mismos se reflejan en la tabla 25.

Figura 32: diseño experimental del Estudio A.3.3

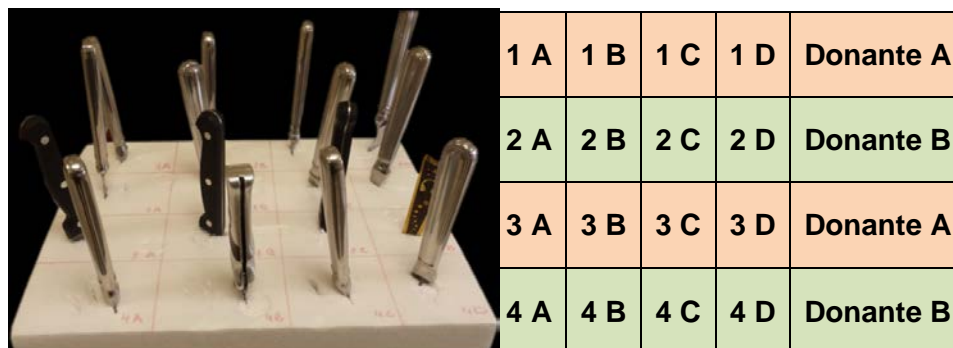


Tabla 25.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.3

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		PERFIL GENÉTICO
Frotis de la superficie del mango de las armas blancas		Amplificación +/-
Muestra	Qf (ng/μl)	
1 A	0.0523	POSITIVO
1 B	0.0000	NEGATIVO
1 C	0.0390	POSITIVO
1 D	0.0016	NEGATIVO
2 A	0.0002	NEGATIVO
2 B	0.0000	NEGATIVO
2 C	0.0000	NEGATIVO
2 D	0.0054	NEGATIVO
3 A	0.1890	POSITIVO
3 B	0.0036	NEGATIVO
3 C	0.0000	NEGATIVO
3 D	0.0003	NEGATIVO
4 A	0.0014	NEGATIVO
4 B	0.0229	POSITIVO
4 C	0.0000	NEGATIVO
4 D	0.0086	NEGATIVO

En las figuras 33 a 36 se muestran algunos de los electroferogramas realizados a partir de las muestras, mientras que en la tabla 26 se reflejan los perfiles genéticos de los donantes asociados a dichos electroferogramas.

Figura 33: electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 1 A. Estudio A.3.3

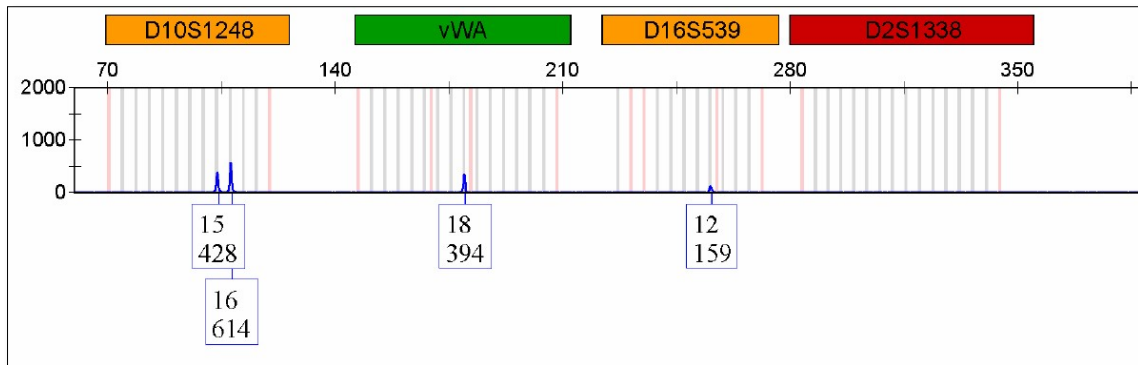


Figura 34: electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 1 C. Estudio A.3.3

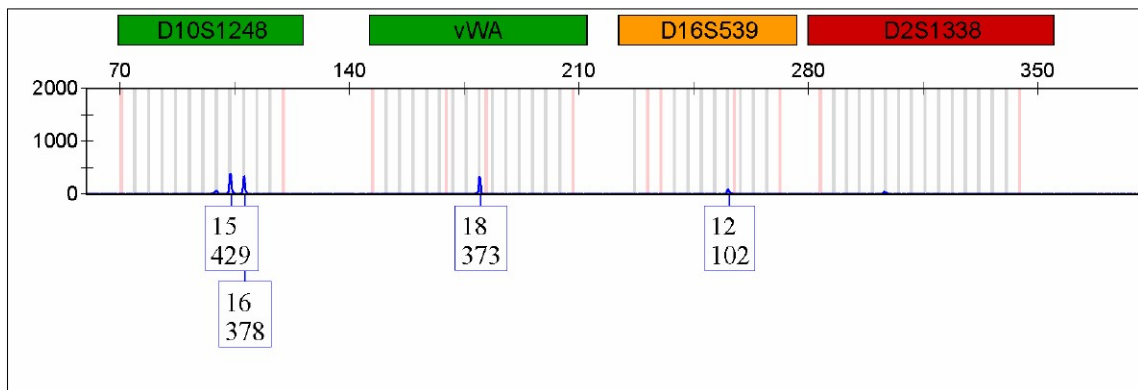


Figura 35: electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 3 A. Estudio A.3.3

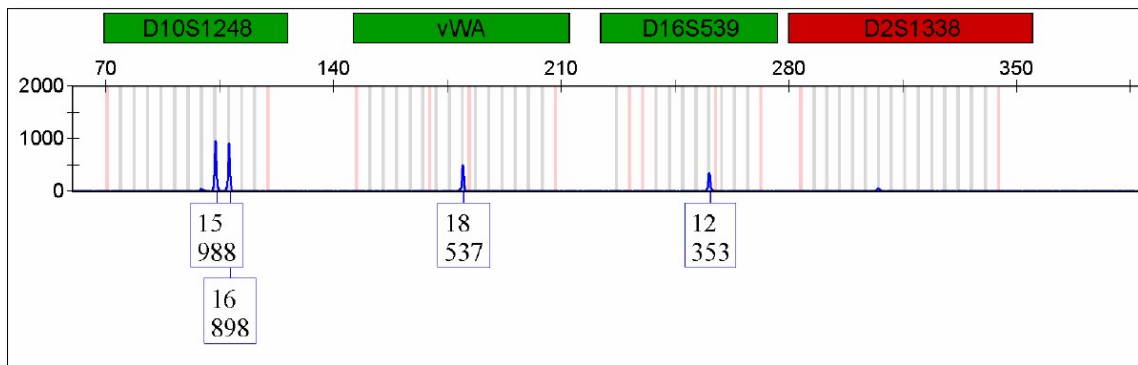
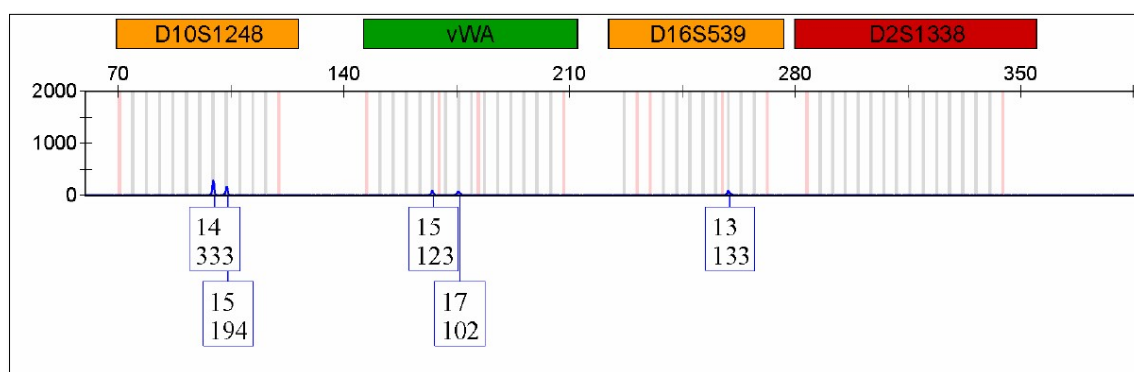


Figura 36: electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 4 B. Estudio A.3.3**Tabla 26.-** perfiles genéticos de los donantes del estudio A.3.3 en los marcadores presentados

Perfiles genéticos de donantes para los marcadores en estudio				
	D10S1248	vWA	D16S539	D2S1338
Donante A	15-16	18-18	12-12	19-20
Donante B	14-15	15 - 17	13-13	17-23

Descripción de los resultados del estudio A.3.3.

Los datos de cuantificación son significativos en las cuatro muestras positivas y los electroferogramas son perfiles claramente identificativos, con asignaciones alélicas correctas por parte del *software* y no observando fenómenos estocásticos que pudieran inducir a error en la asignación de los alelos, encontrándose la mayor parte de ellos por encima de los valores de 150 rfu.

Las muestras 1A (figura 33), 1 C (figura 34) y 3 A (figura 35) tienen un perfil coincidente con el donante A, mientras que la muestra 4 B (figura 36) tiene un perfil coincidente con el donante B.

En todas las muestras se pueden observar fenómenos estocásticos de *drop-out* en los marcadores con mayor número de pares de bases.

A.3.4. Estudio de la persistencia de restos biológicos en condiciones experimentales sobre el teclado de una máquina de escribir tras un período de tiempo de diez años desde el depósito de los vestigios hasta su recogida y análisis

En el presente estudio se utilizó una máquina de escribir de la marca OLYMPIA, modelo CARINA 3, que había permanecido en su maletín, cerrado y en un

armario sin acceso ni manipulación (figura 37). El donante, un varón de perfil conocido, fue el único usuario de la máquina, que quedó cerrada y guardada en su maletín durante un período de diez años.

Figura 37: imagen de la máquina de escribir utilizada en el estudio A.3.4



Las muestras dubitadas fueron tomadas mediante frotis del teclado de la máquina y de la palanca de retorno de carro con una única torunda de algodón estéril impregnada en agua mili-Q.

En el tratamiento de las muestras de forma individual, los niveles de cuantificación de ADN podrían no ser suficientes para la amplificación y genotipado de las muestras, siguiendo un criterio restrictivo. En el presente estudio, se procedió al genotipado de la muestra independientemente de su nivel de cuantificación, puesto que se pretende evaluar si podría estar presente como contaminación o background residual que afectase a muestras que, por su alta cantidad de ADN, sí fuesen seleccionadas para su amplificación y genotipado.

Este estudio pretende comprobar si unos depósitos de restos biológicos sobre un efecto de esta tipología pueden persistir durante un período de tiempo tan amplio y mantener su poder identificativo. La implicación de un resultado positivo en relación con la escena de un delito, puede inducir a valoraciones muy restrictivas de los efectos a recoger, debido al potencial *background* residual de ADN ajeno al delito en sí que pudiera existir.

Resultados del estudio A.3.4.

Los valores de las concentraciones de ADN (tabla 27) y los electroferogramas obtenidos a partir de los ADN de dichas muestras (figuras a 41), permitieron establecer el perfil genético que figura en la tabla 28.

Tabla 27.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.4

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		PERFIL GENÉTICO
Frotis del teclado y de la palanca de retorno de carro		Amplificación +/-
Muestra	Qf (ng/μl)	
Maq 1	0.0527	POSITIVO

Figura 38: electroferograma 1 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4

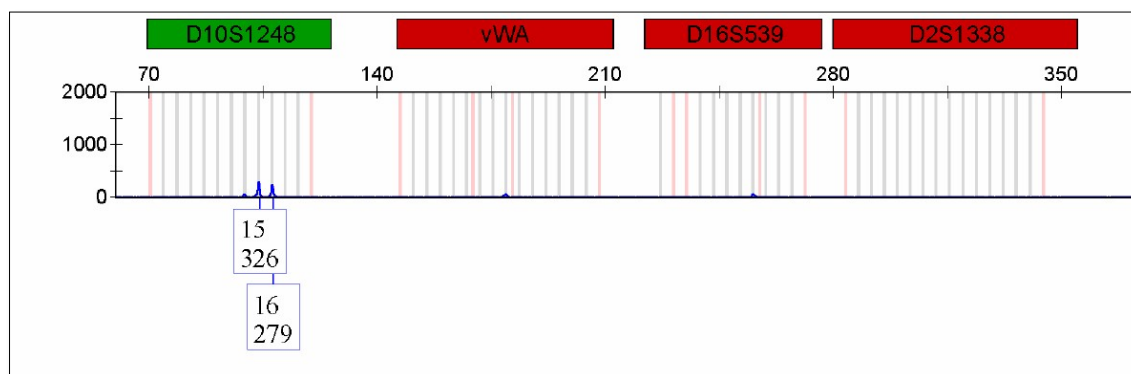


Figura 39: electroferograma 2 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4

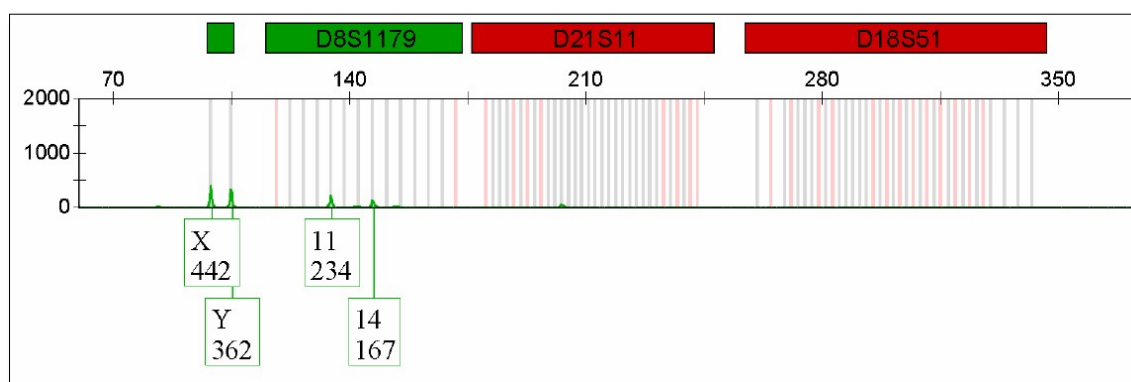


Figura 40: electroferograma 3 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4

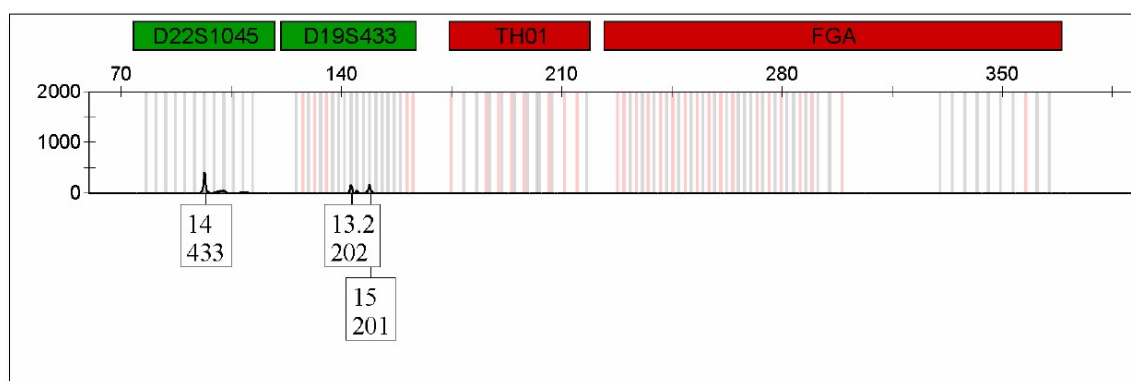


Figura 41: electroferograma 4 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4

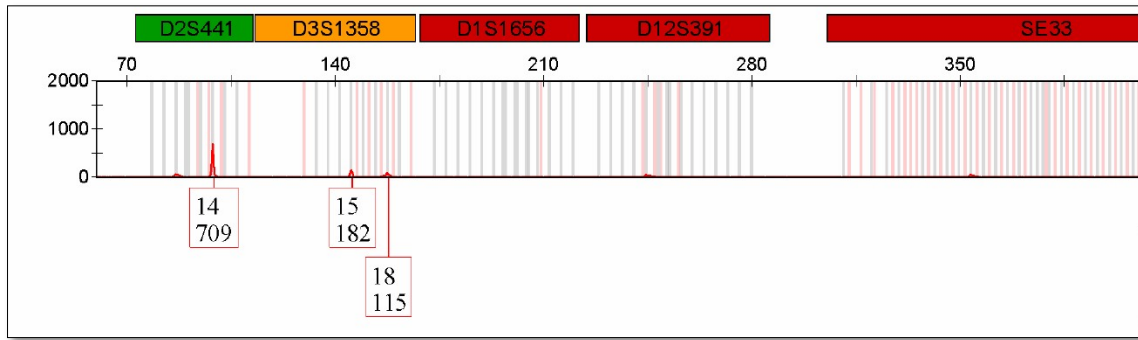


Tabla 28.- Perfil genético del donante del estudio A.3.4

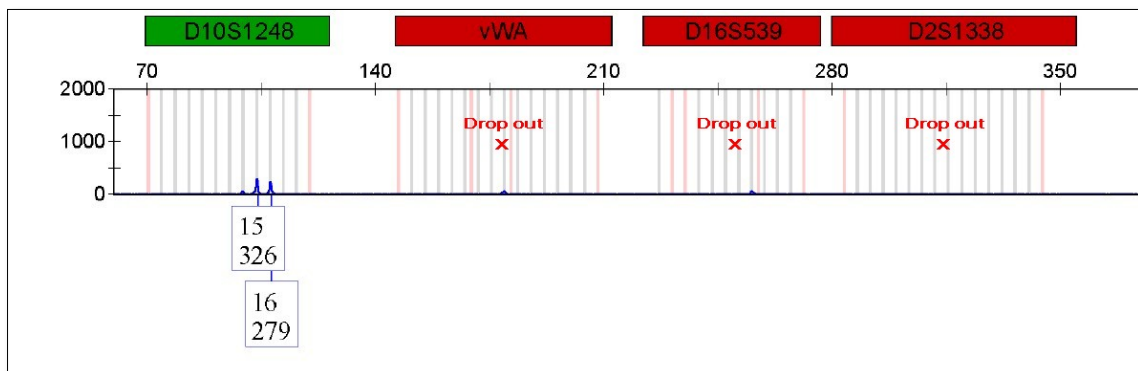
Perfil genético del Donante para los marcadores con resultado positivo						
	D10S1248	D8S1179	D22S1045	D19S433	D2S441	D3S1358
Donante A	15-16	11-14	14-14	13.2-15	14-14	15-18

Descripción de los resultados del estudio A.3.4:

El dato de cuantificación es significativo y los electroferogramas, si bien en su conjunto no aportan un perfil genético, analizados marcador por marcador sí que definen STRs con valor identificativo, con lecturas de fluorescencia por encima del umbral.

Se observa un claro patrón de degradación en los marcadores con mayor número de pares de bases (figura 38), en los que se observan fenómenos muy marcados de *drop-out alélico* (figura 42).

Figura 42: detalle de drop out alélico en marcadores del electroferograma de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4



La coincidencia de los marcadores con una amplificación positiva con el perfil genético del donante es un dato de gran importancia por el tiempo transcurrido desde el depósito hasta el análisis de la muestra, lo que demuestra la persistencia de restos biológicos en largos períodos temporales.

A.3.5. Estudio de la persistencia de restos biológicos en condiciones experimentales sobre el interior de los dediles de unos guantes tras un período de tiempo de seis años desde el depósito de los vestigios hasta su recogida y análisis

En el presente estudio se utilizaron dos guantes derecho e izquierdo de un mismo juego que habían permanecido en una bolsa de plástico dentro de un trastero en condiciones estándar de conservación durante un período de seis años.

Las muestras dubitadas fueron tomadas mediante frotis del interior de los dediles de los guantes, mediante dos torundas de algodón estéril impregnadas en agua mili-Q. Se generaron dos muestras, sobre guante derecho e izquierdo respectivamente.

Este estudio pretende comprobar si unos depósitos de restos biológicos sobre efectos de esta tipología, una muestra muy frecuente en la práctica forense, pueden persistir durante un período de tiempo tan amplio y mantener su poder identificativo.

Resultados del estudio A.3.5.

Las concentraciones de ADN obtenidas de algunas de los guantes se muestran en la tabla 29. A partir de ellos se obtuvieron unos perfiles genéticos de los que en la figura 43 a 45 se muestran alguno de los electroferogramas.

Tabla 29.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.5

VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN		PERFIL GENÉTICO
Frotis del interior de los dediles		Amplificación +/-
Muestra	Qf (ng/μl)	
Guante izquierdo	0.05278	POSITIVO
Guante derecho	0.0505	POSITIVO

Figura 43: electroferograma 1 de la muestra del guante derecho. Estudio A.3.5

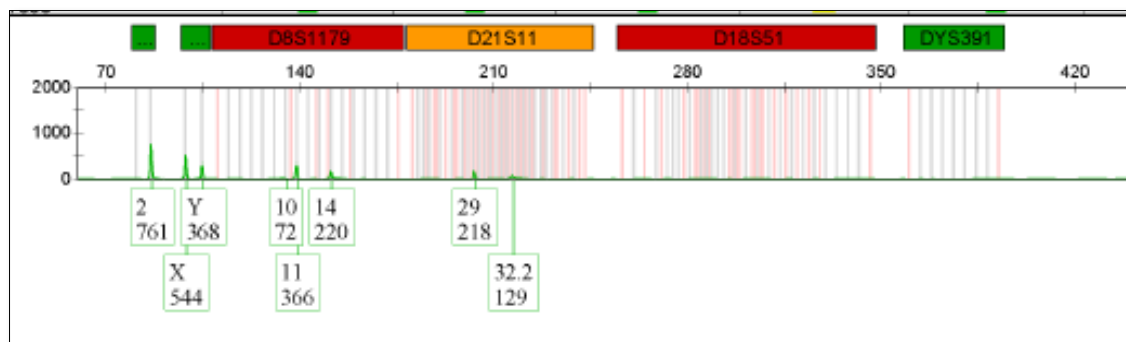


Figura 44: electroferograma 2 de la muestra del guante derecho. Estudio A.3.5

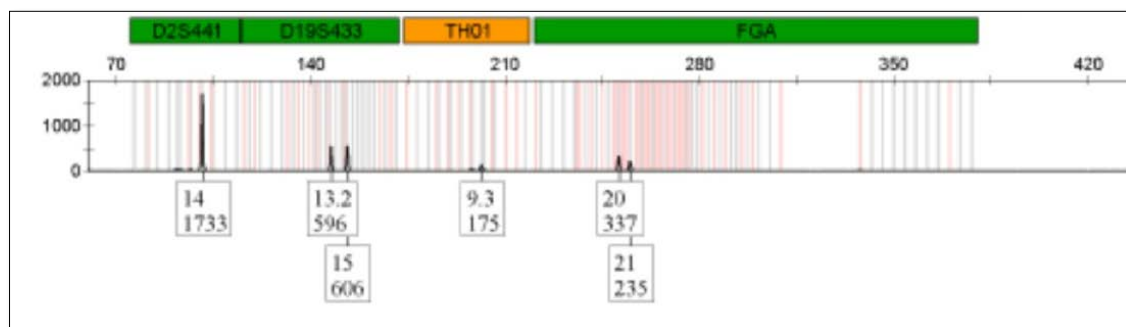
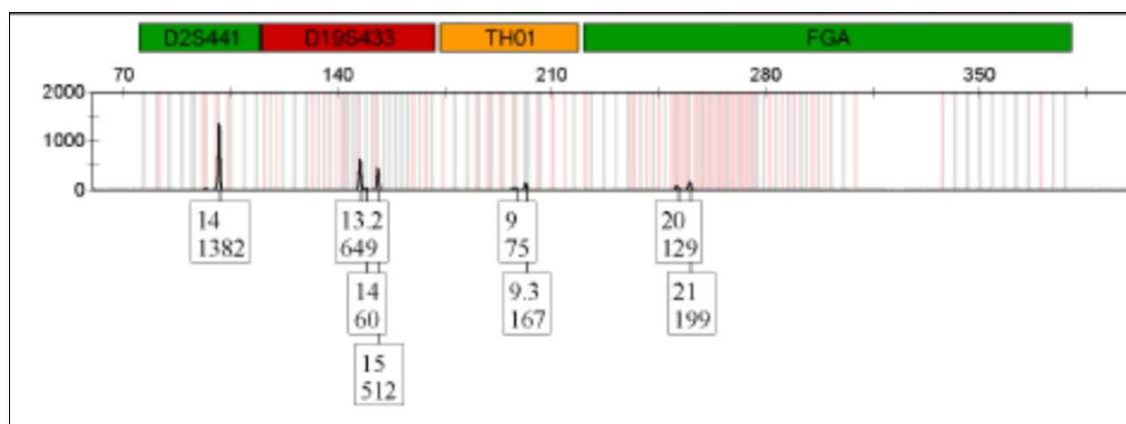


Figura 45: electroferograma 1 de la muestra del guante izquierdo. Estudio A.3.5



Descripción de los resultados del estudio A.3.5.

Los datos de cuantificación son significativos en las dos muestras y los electroferogramas aportan un perfil genético que podría tener valor identificativo. Analizando marcador a marcador, los STRs con menor número de pares de bases presentan alelos con lecturas de fluorescencia muy por encima del umbral, lo que permite una clara asignación alélica, sirva como ejemplo el marcador D2S441 de la muestra del guante izquierdo (figura 45).

Se observa un claro patrón de degradación en los marcadores con mayor número de pares de bases, en los que se observan algunos fenómenos muy marcados de *drop-out alélico* en los marcadores D18S51 y DYS391 (figura 43).

ESTUDIO B

En relación con la detección de contaminación durante el procesado de la escena del delito

En el estudio se pretende evaluar tres factores que afectan al procesado de la escena de un delito y a la recogida de las muestras:

- **Evaluación de la metodología de recogida, manipulación y embalaje de evidencias.** Se trata de someter a una evaluación crítica la práctica rutinaria de los equipos forenses, según una metodología de trabajo bajo procedimientos reglados.
- **Evaluación de la posible presencia de contaminación residual de ADN en las superficies y material de trabajo de dichas unidades.** Las muestras y evidencias recogidas están habitualmente en contacto con dichas superficies de los diferentes laboratorios o salas de autopsias durante el procesado y embalaje.
- **Evaluación de la dificultad o facilidad en la contaminación y en la transferencia de ADN entre muestras o entre donante y muestras.** En este estudio se sometió a determinadas muestras a un contacto forzado en condiciones de humedad para facilitar la transferencia primaria de restos biológicos. Además, para evaluar la transferencia accidental por parte de los forenses del staff técnico, se plantearon tres metodologías de trabajo, dos de ellas incluyendo prácticas erróneas o inadecuadas, sin salvaguardar las medidas de prevención, asepsia y protección de las evidencias.

Todos los vestigios biológicos fueron analizados por personal diferente a los equipos forenses y que no mantuvieron ningún tipo de contacto. Los equipos forenses, pertenecientes a las Subdirecciones Territoriales del Instituto de Medicina Legal de cuatro provincias distintas de Galicia, estuvieron constituidos de la forma que se muestra en la tabla 29.

Tabla 29.- Composición de los equipos forenses del estudio B.

COMPOSICIÓN DE LOS EQUIPOS FORENSES	
Equipos Forenses y adscripción territorial	Composición del Staff Técnico de manipulación de las evidencias
EQUIPO FORENSE A IMELGA LUGO	3 Varones 1 Mujer
EQUIPO FORENSE B IMELGA SANTIAGO	2 Varones
EQUIPO FORENSE C IMELGA OURENSE	1 Varón
EQUIPO FORENSE D IMELGA PONTEVEDRA	1 Varón 1 Mujer

Como factor de control de contaminación, no existió presencia física de ninguno de los forenses que participó en el presente estudio en las instalaciones del laboratorio de genética forense que realizó las analíticas e interpretó los resultados, al menos en los dos años anteriores al mismo, lo que permite descartar el *background* de sus perfiles genéticos en las instalaciones del Laboratorio y los posibles carryover que produjesen contaminaciones de las muestras. Dichas contaminaciones por los perfiles genéticos de referencia de los forenses, en caso de existir, tendrían obligatoriamente que proceder del manipulado de las mismas en la fase de recogida.

Para este estudio se plantearon tres metodologías de trabajo que fueron definidas como:

Metodología 1: incluyendo en ella los procedimientos y prácticas que se llevan a cabo de forma rutinaria por cada equipo forense. Este modo, que podría definirse como correcto, define la forma de trabajar normal que desarrollan durante su práctica profesional y pretende evaluar los riesgos de contaminación casual por errores no observados o casuales.

Metodología 2: incluyendo en ella los procedimientos y prácticas rutinarios, pero obviando medidas estandarizadas de asepsia y prevención, tales como el procesado y recogida de las muestras con ausencia de guantes y mascarillas durante la manipulación de los vestigios y el uso de material sin esterilizar.

Metodología 3: incluyendo en ella, además de la mala praxis de la metodología 2, comportamientos de extrema negligencia durante el trabajo rutinario, tales como toser o estornudar encima de las muestras o en su presencia, mantener conversaciones encima de las muestras o durante su manipulación sin medidas de prevención, etc.

Como muestras indubitadas de referencia se tomaron frotis de cavidad bucal de todos los miembros de los equipos forenses.

En relación a las muestras dubitadas, los donantes de dichas muestras fueron dos varones y una mujer, que se referirán como:

- Varón Donante 1 (V1)
- Varón Donante 2 (V2)
- Mujer Donante 1 (M1)

En el estudio se incluye una matriz amplia de muestras dubitadas que resulta representativa de la práctica profesional habitual (Tabla 30: Matriz de Muestras), incluyendo, entre otras, sangre seca, epiteliales sobre colillas, epiteliales sobre guantes y esperma sobre tejidos.

Las muestras fueron remitidas a los equipos forenses embaladas y sin conocimiento por parte de éstos de la tipología, naturaleza y otras circunstancias relacionadas, así como la presencia o no de material genético, su estado de degradación o los posibles donantes y su sexo.

Por parte de los equipos forenses, una vez recibidas las muestras y referenciadas según su propio sistema de registro, se procedió a su manipulado, estudio preliminar y embalaje según la metodología indicada.

Con el objetivo de forzar la transferencia primaria de restos biológicos, el estudio planteaba a los equipos forenses el contacto deliberado de algunas de las muestras enviadas con tejidos, en condiciones únicamente de contacto o bien de contacto con humedad. De esta forma, algunas de las muestras de sangre y esperma fueron sometidas a contacto durante toda una noche en condiciones de alta humedad provocada vertiendo una cantidad de agua para empapar los tejidos en contacto. Este objetivo se llevó a cabo con las tres metodologías de trabajo descritas.

Se recogieron también frotis de las superficies de trabajo de los laboratorios de los equipos forenses y del material de trabajo o de oficina presente en dichas salas, a modo de controles de contaminación residual o background de ADN en las salas de manipulado y procesado de los vestigios.

En el Laboratorio se realizaron sobre los vestigios pruebas preliminares de determinación de origen y especie, previas al proceso de extracción de ADN. En concreto se llevaron a cabo los Procedimientos Técnicos de Análisis PTA-1, PTA-2, PTA-3, PTA-4, PTA-5, PTA-6, PTA-8 y PTA-9.

En los casos que fue positiva la determinación de esperma humano mediante la inmunodetección del antígeno específico de próstata (PTA-2), se realizó la observación de espermatozoides a microscopía óptica mediante tinción con eritrosina amoniaca (PTA-3). En todos los casos con PTA-2 positivo se procedió a la separación de las fracciones haploide y diploide, para su estudio por separado (PTA-5).

Tabla 30.- Matriz de muestras del estudio B.

MATRIZ DE MUESTRAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL			
Muestra	Tipología biológica	Soporte	Manipulación a realizar por parte de los equipos forenses
M1	Sangre V1	Torunda	Embalaje
M2	Epiteliales M1	Colilla	Embalaje
M3	Epiteliales V2	Bolígrafo	Embalaje
M4	Epiteliales V1	Guante de látex	Embalaje
M5	Epiteliales V1	Guante de látex	Embalaje
M6	Sangre V1	Papel	Por parte del forense se depositó sobre tejido textil (camiseta) y se mantuvo en contacto durante 48 horas. Posteriormente se recoge el tejido textil para remisión al Laboratorio.
M7	Sangre V1	Papel	Por parte del forense se depositó sobre tejido textil (camiseta) y se mantuvo en contacto durante 48 horas en condiciones de alta humedad, para favorecer la posible transferencia primaria. Posteriormente se recoge el tejido textil para remisión al Laboratorio
M8	Esperma V1	Fragmento de tela	Por parte del forense se depositó sobre tejido textil (camiseta) y se mantuvo en contacto durante 48 horas. Posteriormente se recoge el tejido textil para remisión al Laboratorio.
M9	Esperma V1	Fragmento de tela	Por parte del forense se depositó sobre tejido textil (camiseta) y se mantuvo en contacto durante 48 horas en condiciones de alta humedad, para favorecer la posible transferencia primaria. Posteriormente se recoge el tejido textil para remisión al Laboratorio.

Posteriormente se realizó la cuantificación de ADN (PTA-7) y el genotipado de las muestras (PTA-8) con el *kit* de análisis AmpFISTR® Identifier Plus™ y AmpFISTR® NGM SElect™, teniendo como límite primario de detección la cantidad de *150 unidades de fluorescencia (rfu)* en el *software* de análisis de perfiles.

En el tratamiento de las muestras de forma individual, los niveles de cuantificación de ADN podrían no ser suficientes para la amplificación y genotipado de las muestras, siguiendo un criterio restrictivo (0.1 ng/μl). En el presente estudio, se procedió al genotipado de la muestra independientemente de su nivel de cuantificación, puesto que se pretende evaluar si podría estar presente como contaminación o *background* residual que afectase a muestras que, por su alta cantidad de ADN, sí fuesen seleccionadas para su amplificación y genotipado.

Los resultados se presentan por cada equipo forense, relacionando los tres métodos, los niveles de cuantificación de ADN y los resultados obtenidos y esperados si no existiese contaminación sobre las muestras.

B.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO SOBRE CONTAMINACIÓN RESIDUAL.

Equipo Forense A

La concentración de ADN de la muestra obtenida de la mesa de trabajo se refleja en la tabla 31 así como el análisis del resultado.

Tabla 31.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense A.

EQUIPO FORENSE A			
Muestras de control de contaminación residual			
Muestra	Cantidad ADN (ng/μl)	Resultado obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación
Frotis de la superficie de la meseta de trabajo	0.0135	Perfil genético residual de varón	NEGATIVO

A partir de los ADN obtenidos se procedió a amplificar en ADN para determinar el genotipo. Electroferogramas correspondientes a dichos análisis se muestran en la figura 46, mientras que el perfil genético asociado se refleja en la tabla 32.

Figura 46: electroferograma de la muestra de contaminación residual del Equipo Forense A.

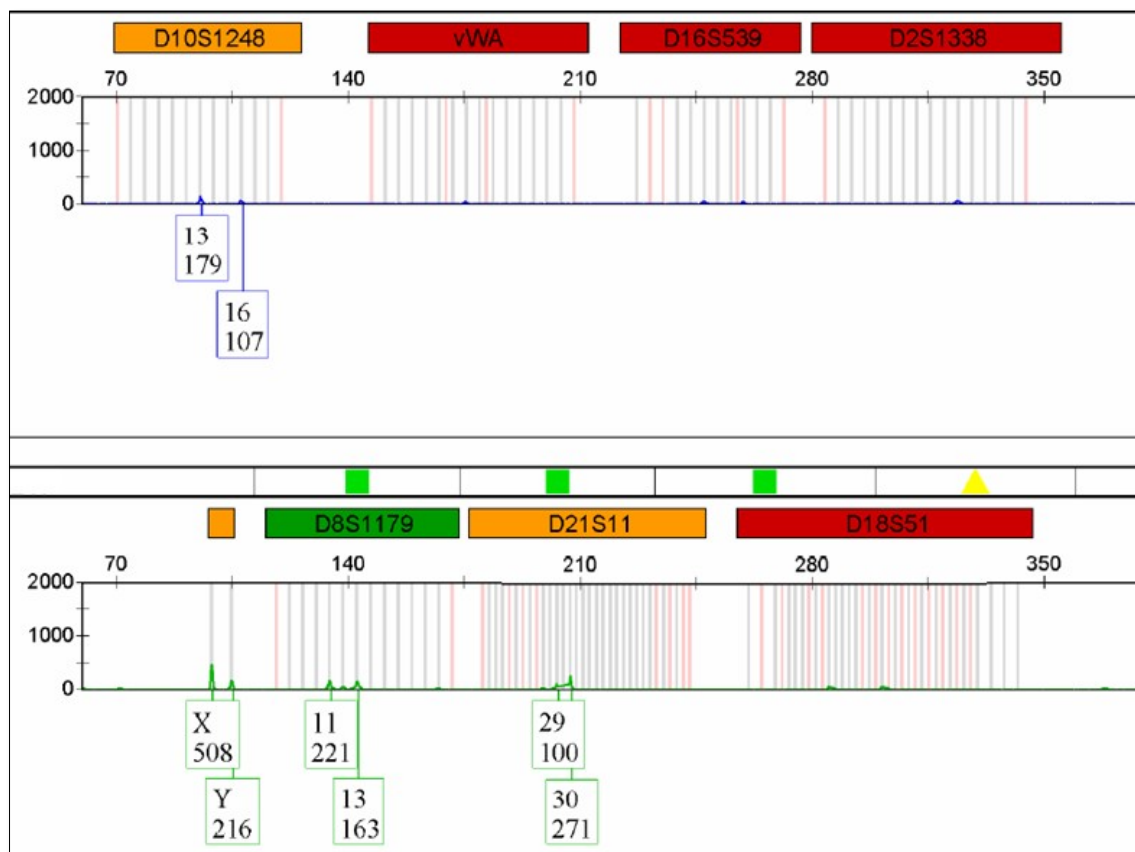


Tabla 32.- Perfil genético de los STRs con resultado positivo del varón del equipo forense A

Perfil genético del varón del Staff técnico del Equipo Forense A			
	D10S1248	D8S1179	D21S11
Varón del Staff Técnico A	13-16	11-13	28-30

Descripción de los resultados de la muestra de contaminación residual en la mesa de trabajo del equipo forense A (figura 46). Se pueden observar picos electroforéticos de escasa altura, que en algún caso pueden superar las 150 rfu. Podrían producir errores de lectura o de interpretación en caso de mezclas y en el caso de los marcadores de Amelogenina (X,Y) llevarían inexorablemente a errores de interpretación, dadas las alturas de los picos alélicos observados (X: 508 rfu; Y: 216 rfu). Es de significar que el perfil observado es coincidente en casi todos los marcadores con el perfil del forense varón A (tabla 32), por lo que existe una clara contaminación residual por transferencia primaria por parte de dicho donante, que forma parte del staff técnico del equipo forense A.

Equipo Forense B

La concentración de ADN de la muestra obtenida de la mesa de trabajo se refleja en la tabla 33 así como el análisis del resultado.

Tabla 33.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense B.

EQUIPO FORENSE B			
Muestras de control de contaminación residual			
Muestra	Cantidad ADN (ng/μl)	Resultado obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación
Frotis de la superficie de la meseta de trabajo	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO

Descripción de los resultados de la muestra de contaminación residual en la mesa de trabajo del equipo forense B. No se obtiene resultado alguno ni en la cuantificación de ADN ni obviamente en la obtención de perfil genético, lo que indica una ausencia total de contaminación residual en la superficie de trabajo y manipulación de muestras.

Equipo Forense C

La concentración de ADN de la muestra obtenida de la mesa de trabajo se refleja en la tabla 34 así como el análisis del resultado.

Tabla 34.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense C.

EQUIPO FORENSE C			
Muestras de control de contaminación residual			
Muestra	Cantidad ADN (ng/μl)	Resultado obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación
Bolígrafo de uso común en sala de examen de muestras	0.6314	Perfil genético de varón	NEGATIVO
Frotis de la superficie de la meseta de trabajo	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO

A partir de los ADN obtenidos se procedió a amplificar en ADN para determinar el genotipo. Electroferogramas correspondientes a dichos análisis se muestran en la figura 47, mientras que el perfil genético asociado se refleja en la tabla 35.

Figura 47: electroferograma de la muestra de contaminación residual del Equipo Forense C

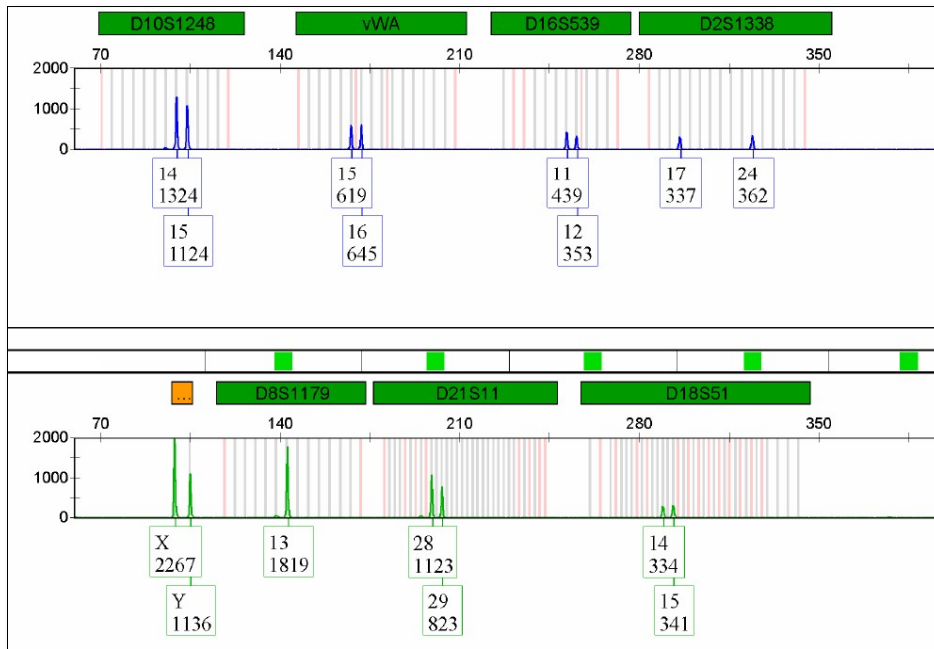


Tabla 35.- Perfil genético de los STRs con resultado positivo del varón del equipo forense C.

Perfil genético del varón del Staff técnico del Equipo Forense C						
Varón del Staff técnico C	D10S1248	vWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11
	14-15	15-16	11-12	17-24	13-13	28-29
	D18S51					
	14-15					

Descripción de los resultados de la muestra de contaminación residual (bolígrafo usado en la mesa de trabajo) del equipo forense C (Figura 47). Se observa un claro perfil genético que se corresponde con el perfil genético del forense varón C (tabla 35), lo que implica un claro foco de contaminación en el material usado en la mesa de trabajo y manipulación de las muestras forenses.

Equipo Forense D

La concentración de ADN de la muestra obtenida de la mesa de trabajo se refleja en la tabla 36 así como el análisis del resultado.

Tabla 36.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense D.

EQUIPO FORENSE D			
Muestras de control de contaminación residual			
Muestra	Cantidad ADN (ng/μl)	Resultado obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación
Bolígrafo de uso común en sala de examen de muestras	0.031910	Perfil genético residual	NEGATIVO
Frotis de la superficie de la meseta de trabajo	0.003892	NEGATIVO	NEGATIVO

A partir de los ADN obtenidos se procedió a amplificar en ADN para determinar el genotipo. Electroferogramas correspondientes a dichos análisis se muestran en la figura 48, mientras que el perfil genético asociado se refleja en la tabla 37.

Figura 48: electroferograma de la muestra de contaminación residual del Equipo Forense D

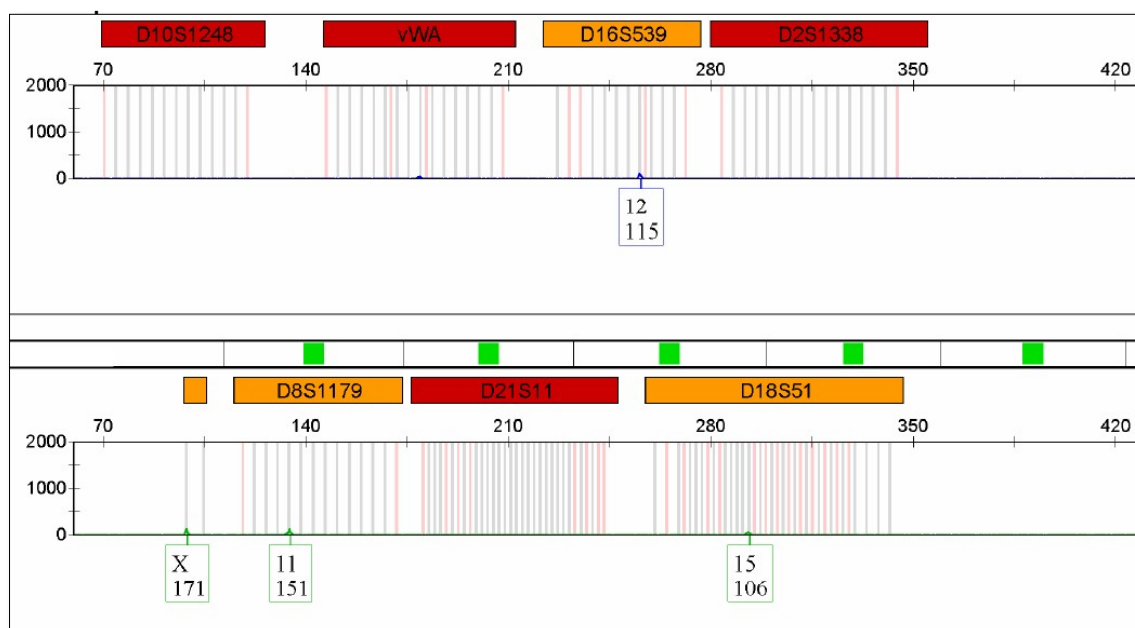
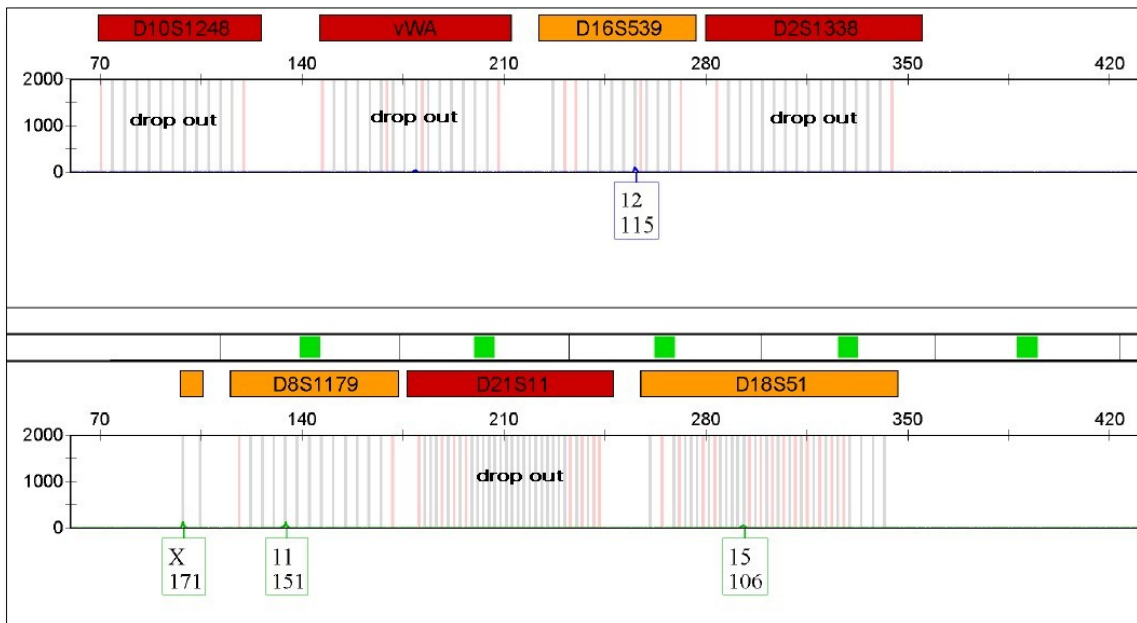


Tabla 37.- Perfil genético de los STRs con resultado positivo de la mujer del equipo forense D.

Perfil genético de la mujer del Staff técnico del Equipo Forense D			
Mujer del Staff técnico D	D16S539	D8S1179	D18S51
	10-12	11-13	15-15

Descripción de los resultados de la muestra de contaminación residual del equipo forense D (bolígrafo utilizado en el área de manipulación de las muestras) (figura 48). Se puede apreciar la existencia de picos electroforéticos de escasa altura, pero que pudieran provocar dificultades en la interpretación de perfiles complejos de muestras LCN o perfiles mezcla. Los picos alélicos observados son coincidentes con el perfil genético de la Forense Mujer D (tabla 37), aunque hay fenómenos de *drop-out alélico* en varios marcadores STRs debido a la escasa señal electroforética (figura 49). Supone un foco de contaminación en el área de manipulación de las muestras.

Figura 49.- drop out en la muestra de contaminación residual del Equipo Forense D



B.2. MANIPULACIÓN DE LAS EVIDENCIAS. EVALUACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE RESTOS BIOLÓGICOS

Resultados del Equipo Forense A según diferentes metodologías de trabajo

Las concentraciones de ADN obtenidas de las diferentes muestras del equipo forense A en base a la metodología de trabajo 1 se muestran en la tabla 38.

Tabla 38.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense A bajo la metodología de trabajo 1.

EQUIPO FORENSE A Metodología 1 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	1.1563	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		1.9441	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.8695	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.175885	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		1.32013	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 – No ED	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 + PTA-2 -	0.001194	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 - PTA-3 - PTA-6	0.0002352	Varón Residual	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 - PTA-3 - PTA-6	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO

Descripción del resultado de la muestra M8 (esperma sobre tela en contacto primario con otro tejido textil) bajo metodología de trabajo 1 del equipo forense A. Sólo se observa un valor diferente al esperado en la muestra número 8, en la que se ha obtenido un perfil genético residual procedente de un varón, cuyo electroferograma (figura 50). Se pueden observar picos electroforéticos de muy escasa altura, que difícilmente podrían alterar una lectura de perfiles en condiciones normales, pero que

es preciso remarcar puesto que los picos observados se corresponden con algunos de los alelos que presenta de forma indubitada el donante de esperma varón 1 (tabla 39), lo que indica que se ha producido una transferencia primaria del perfil genético del donante tras las 48 horas de contacto en ausencia de humedad.

Figura 50: electroferograma de la muestra M8 de la metodología 1 del equipo forense A

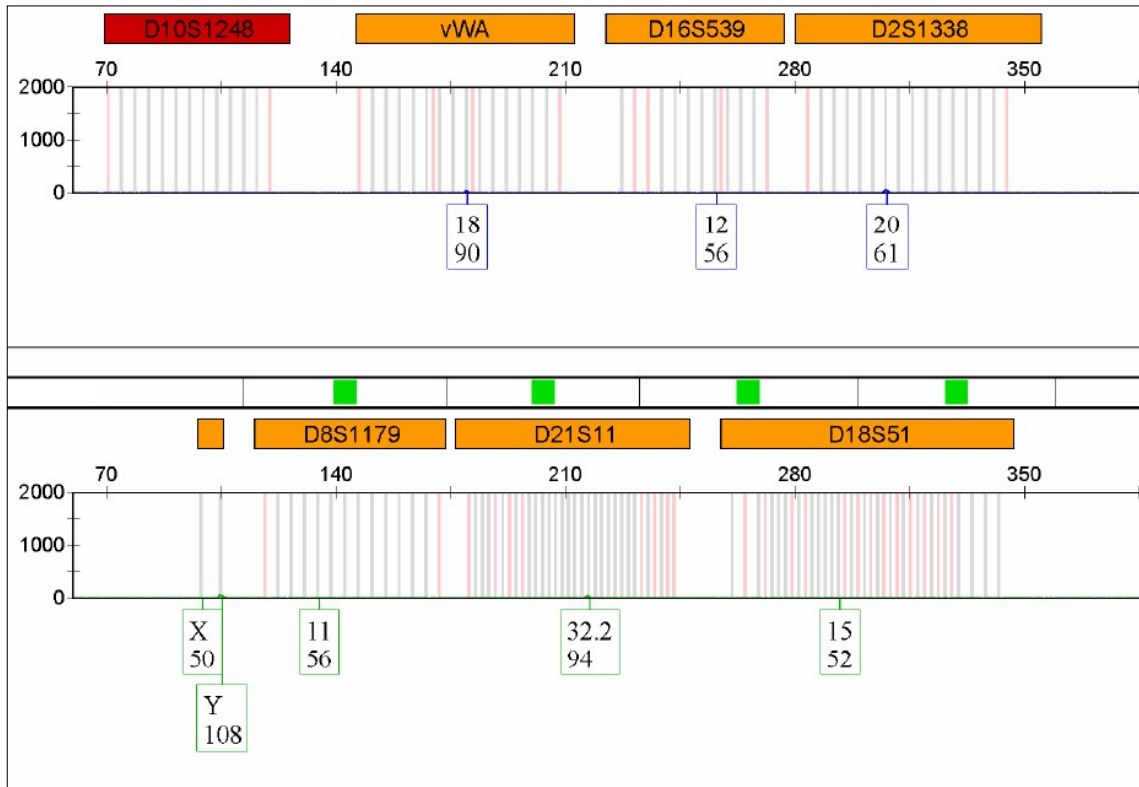


Tabla 39.- Perfil genético para los marcadores positivos del donante V1. Estudio B

Perfil genético del Donante V1 para los marcadores con resultado positivo						
Donante	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51
V1	18-18	12-12	19-20	11-14	29-32.2	15-16

Las concentraciones de ADN obtenidas de las diferentes fuentes del equipo forense A en base a la metodología 2 se muestran en la tabla 40 en la que se encontraron unos valores similares a los esperados.

Tabla 40.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense A bajo la metodología de trabajo 2.

EQUIPO FORENSE A				
Metodología 2 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	0.7215	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.9453	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.2916	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.114567	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.01832	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 - PTA-2 -	0.006392	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 +	0.0000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 + PTA -3 - PTA-5	(1ª lisis) 0.0 (2ª lisis) 0.0	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 + PTA-3 - PTA-5	(1ª lisis) 0.0 (2ª lisis) 0.0	NEGATIVO	NEGATIVO

Las concentraciones de ADN obtenidas de las diferentes fuentes del equipo forense A en base a la metodología 3 se muestran en la tabla 41. Existen dos resultados que no se corresponden con lo esperado, en concreto la muestra número 1 (sangre) en la que se ha obtenido una mezcla de perfiles genéticos y la muestra número 6 (sangre en papel) en la que se ha obtenido un perfil genético residual procedente de un varón (figura 51). Además del perfil genético del donante de la muestra de sangre, se pueden observar picos electroforéticos de muy escasa altura, sin que sea posible hablar de contribuyente minoritario, que son coincidentes con el perfil genético que se muestra en la tabla 42 del forense varón A (*alelos 12 y 13 en el marcador D81179 y pico alélico 30 en marcador D21S11*). En este caso, con un método de trabajo particularmente proclive a la contaminación primaria por manipulación, se observa y detecta dicha contaminación, pero en ningún caso puede

llegar a producir una interpretación errónea sobre una muestra de esta tipología. Sangre de un solo donante ofrece un perfil genético único con una alta cantidad de ADN, por lo que cualquier tipo de contaminación residual por transferencia primaria del tipo manipulación no ofrecería ninguna duda en la labor de interpretación del perfil genético, aunque sí estaría presente.

Tabla 41.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense A bajo la metodología de trabajo 3.

EQUIPO FORENSE A				
Metodología 3 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	0.11997	Mezcla de perfiles genéticos	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.8547	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.1769	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.039815	Perfil residual de varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.086644	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.002338	Perfil genético de varón residual	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA -2 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO

Figura 51: electroferograma de la muestra M1 de la metodología 3 del equipo forense A

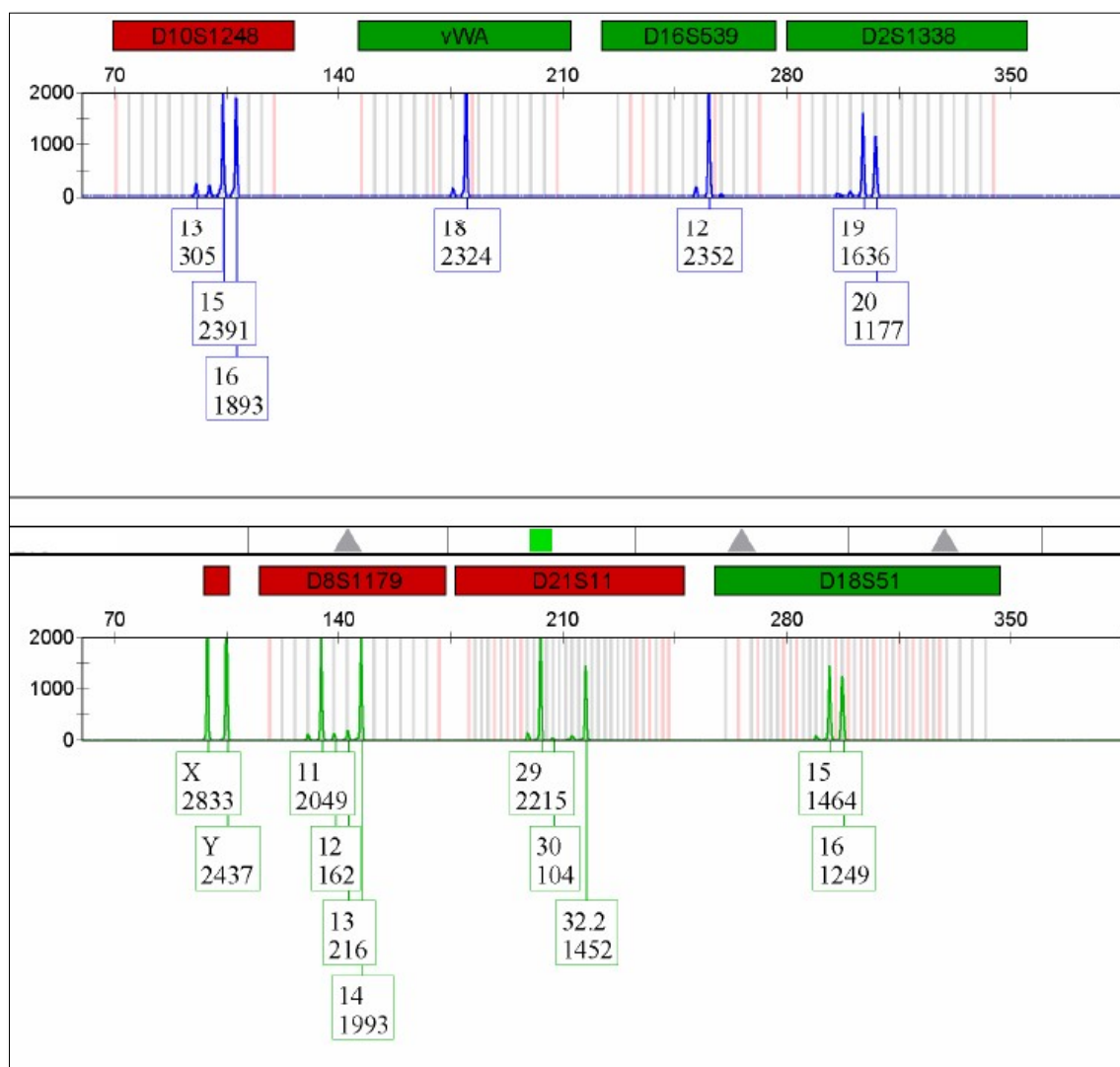


Tabla 42.- Perfiles genéticos del donante V1 y del Varón del Equipo Forense A en los marcadores en los que se observan valores alélicos no esperados.

Perfil genético del varón del Staff técnico del Equipo Forense A y del donante de la muestra M1			
	D10S1248	D8S1179	D21S11
Varón del Staff Técnico A	13-16	11-13	28-30
Donante V1	15-16	11-14	29-32.2

Descripción de los resultados de la muestra M6 (sangre de varón donante 1 en contacto con tejido textil durante 48 horas) bajo la metodología de trabajo 3 del equipo forense A (figura 52). Se pueden observar picos electroforéticos de muy escasa altura, que con niveles de 150 rfu como umbral de detección no alterarían la interpretación de la muestra. En este caso es una muestra cuyo resultado esperado sería negativo, por lo que sí tiene importancia la detección de picos alélicos que son coincidentes con el

perfil genético que se muestra en la tabla 43 del varón donante 1 (perfil genético de la sangre), por lo que sí que ha existido una transferencia primaria de ADN por contacto.

Figura 52: electroferograma de la muestra M6 de la metodología 3 del equipo forense A

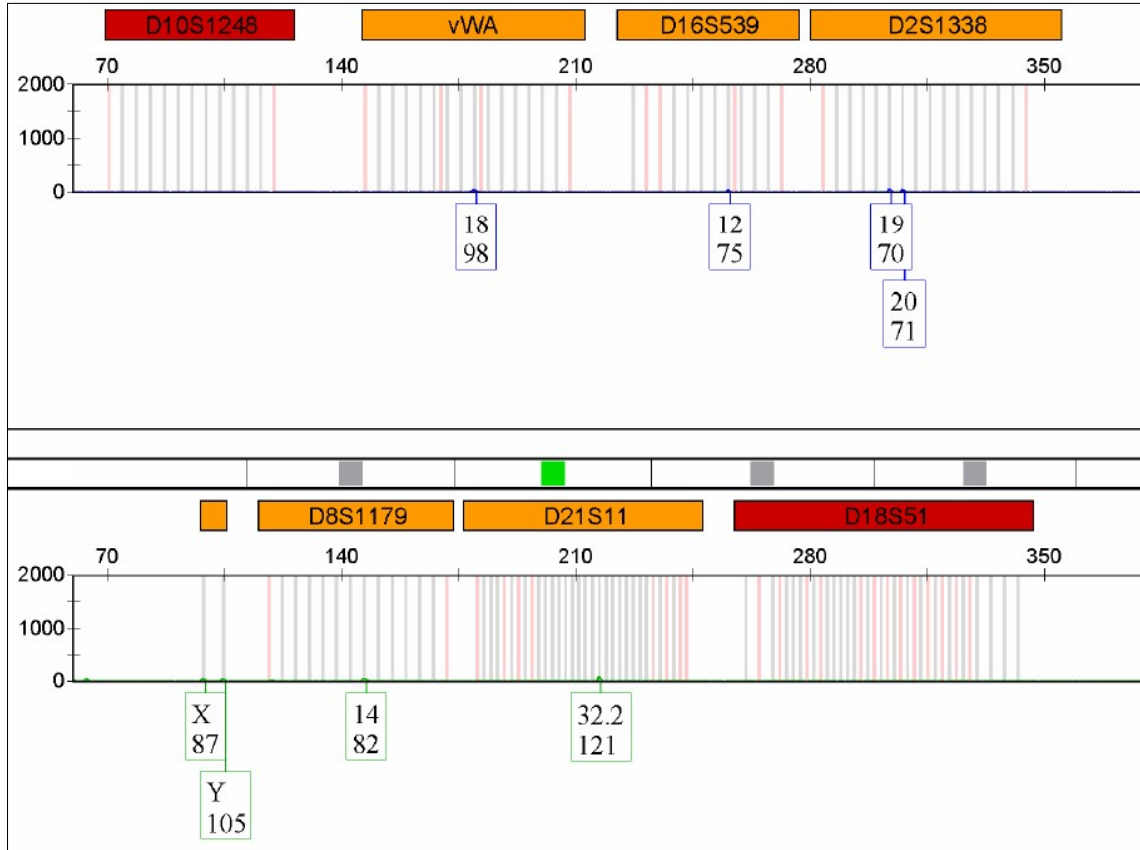


Tabla 43.- Perfil genético del donante V1 para los marcadores en estudio.

	Perfil genético del Donante V1 para los marcadores con resultado positivo					
Donante	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51
V1	18-18	12-12	19-20	11-14	29-32.2	15-16

Resultados del Equipo Forense B según diferentes metodologías de trabajo

Todos los resultados obtenidos concuerdan con los valores esperados, descritos en la tabla 44.

Tabla 44.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense B bajo la metodología de trabajo 1.

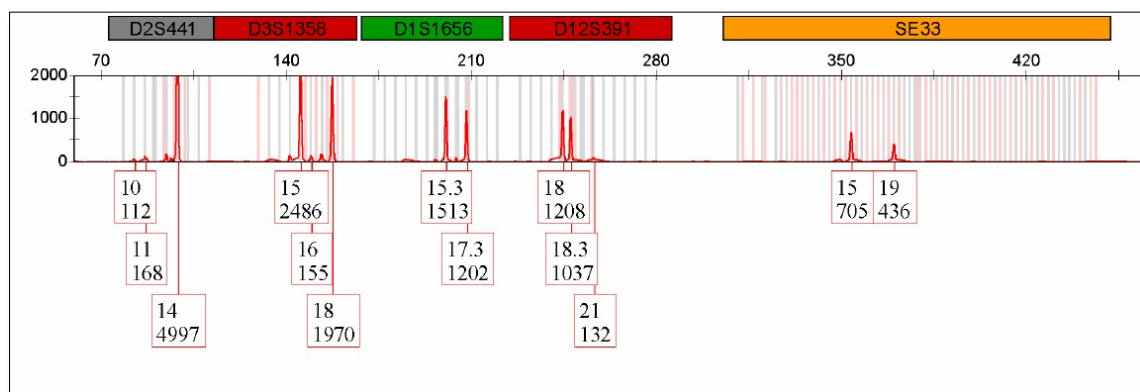
EQUIPO FORENSE B				
Metodología 1 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	2.6876	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.94828	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.343661	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.010467	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.045983	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 +	0.001226	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.002114	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 + PTA-5	(1ª lisis)0.000 (2ª lisis)0.000	NEGATIVO	NEGATIVO

Los resultados del equipo forense B en base a la metodología de trabajo 2 se muestran en la tabla 45. El resultado de la muestra número 4 (restos epiteliales en guante) no es coincidente con el valor esperado, apreciándose valores alélicos que muestran una posible mezcla en dos marcadores STRs (figura 53). Tan sólo pueden apreciarse en algunos marcadores (*D2S441* y *D12391*) picos alélicos que no se corresponden con el perfil del varón donante 1 ni tampoco con el perfil genético del staff técnico del equipo forense. Alguno de dichos picos electroforéticos supera los 150 rfu, es decir, se encuentra por encima del límite de detección, por lo que un método incorrecto sin medidas de precaución permite observar componentes alélicos ajenos a la muestra en estudio, si bien en ningún caso dificultan la interpretación del perfil mayoritario en el caso presentado.

Tabla 45.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense B bajo la metodología de trabajo 2.

EQUIPO FORENSE B Metodología 2 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	1.090058	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.79462	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		1.925564	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.143041	Varón donante 1 con posible mezcla en dos marcadores	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.022446	V residual	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 +	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 + PTA-3 - PTA-5	(1ª lisis)0.000 (2ª lisis) 0.004234	NEGATIVO	NEGATIVO

Figura 53: electroferograma de la muestra M4 de la metodología 2 del equipo forense B



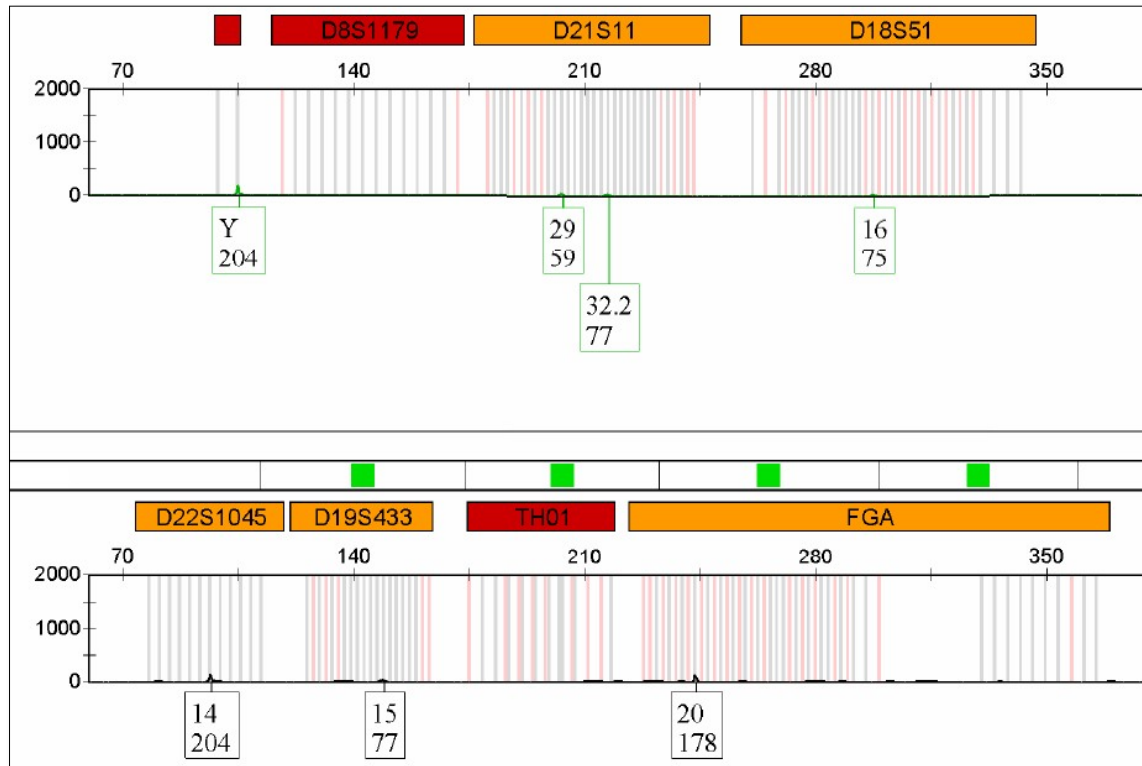
Los resultados del equipo forense B en base a la metodología de trabajo 3 se muestran en la tabla 46. El resultado de la muestra número 8 (esperma sobre tejido textil) no es coincidente con el valor esperado, apreciándose un perfil genético residual procedente de un varón que se muestra en la figura 54. Los picos electroforéticos

observados se corresponden con el perfil genético del varón donante 1 y que serían esperables en caso de existir una transferencia primaria por contacto. La intensidad de los picos medida en rfu es muy baja y se encuentra muy por debajo de los límites de validez aceptables. En el presente caso no existe ninguna mezcla sobre la que pudiesen efectuar un problema en la interpretación, pero no se puede descartar que dicha transferencia primaria no pueda provocar una dificultad en la interpretación de perfiles mezcla en los que los picos electroforéticos ajenos a los perfiles que debieran hallarse puedan ser considerados como componentes alélicos presentes en los vestigios.

Tabla 46.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense B bajo la metodología de trabajo 3.

EQUIPO FORENSE B				
Metodología 3 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	0.675512	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		1.10801	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.594559	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.042522	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.064501	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.001094	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 +	0.007975	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.012946	Perfil genético de varón donante 1 residual	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.003828	NEGATIVO	NEGATIVO

Figura 54: electroferograma de la muestra M8 de la metodología 3 del equipo forense B



Resultados del Equipo Forense C según diferentes metodologías de trabajo

Los resultados del equipo forense C en base a la metodología de trabajo 1 se muestran en la tabla 47. Se han obtenido tres resultados que no son coincidentes con lo esperado: el resultado de la muestra número 3 (restos epiteliales sobre bolígrafo) no es coincidente con el valor esperado, apreciándose componentes alélicos residuales; el resultado de la muestra número 4 (restos epiteliales en guante) es negativo, cuando era esperable la obtención del perfil genético del donante; en la muestra número 5 (restos epiteliales en guante) se obtienen también componentes alélicos residuales. Sin embargo, todos los resultados concuerdan con lo esperado, salvo en las muestras M-3, M-4 y M-5, en las que no se ha obtenido perfil genético (figuras 55 y 56), bien por no existencia de suficiente depósito de ADN, bien por una deficiente analítica. Los escasos picos alélicos se corresponden con el donante esperado.

Tabla 47.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense C bajo la metodología de trabajo 1.

EQUIPO FORENSE C				
Metodología 1 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	0.0784	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.1062	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.0013	Componentes alélicos residuales	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.000	NEGATIVO	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.0063	Componentes alélicos residuales	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 +	0.0023	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.0125	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 + PTA-3 - PTA-5	(1ª lisis)0.000 (2ª lisis)0.008506	NEGATIVO	NEGATIVO

Figura 55: electroferograma de la muestra M3 de la metodología 1 del equipo forense C

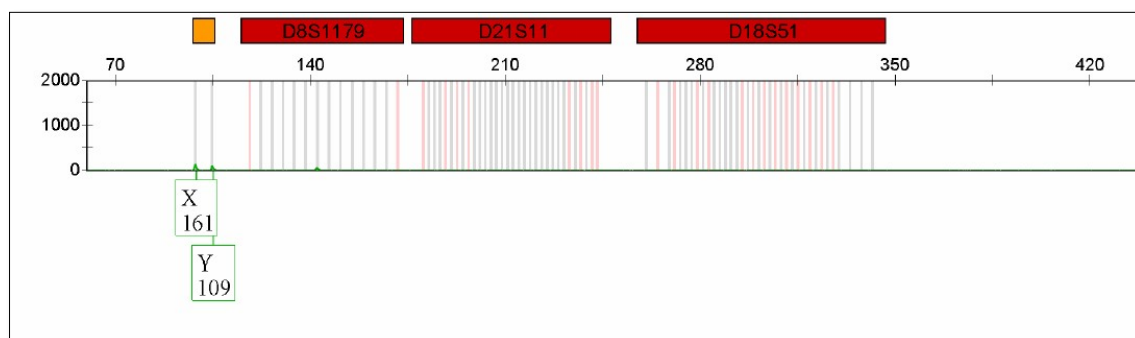
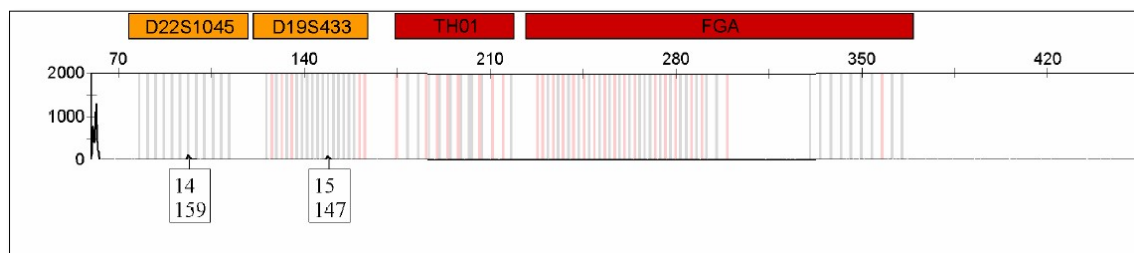


Figura 56: electroferograma de la muestra M5 de la metodología 1 del equipo forense C



Los resultados del equipo forense C en base a la metodología de trabajo 2 se muestran en la tabla 48. Las muestras número 1 (sangre), número 4 (restos epiteliales en guante), número 5 (restos epiteliales en guante), número 6 (sangre en papel) y número 9 (esperma sobre tejido textil) aportan resultados que no son acordes con lo esperado. En el caso de las muestras M-4 y M-5 no se obtiene ningún perfil genético con una negativa cuantificación de ADN.

En el análisis de la muestra M-1 (sangre en torunda), se obtienen escasos picos alélicos residuales (figura 57) que se corresponden con el donante esperado, varón V1 (tabla 49).

En el análisis de la muestra M6 (sangre en papel en contacto con tejido textil durante 48 h) bajo metodología de trabajo 2 del equipo forense C (figura 58), se observa una mínima contaminación residual en algunos marcadores, ésta es debida a la transferencia por contacto entre los vestigios, puesto que se corresponden los picos alélicos observados con el perfil genético del donante varón 1 (tabla 49). No se aprecia ningún componente alélico procedente de otro donante, aun siendo el método de trabajo incorrecto y estando sometidas a manipulación carente de medidas de prevención y asepsia.

Mediante el análisis de la muestra M9 (esperma sobre tela en contacto con tejido textil durante 48 horas en condiciones de humedad) bajo metodología de trabajo 2 del equipo forense C (figura 59), se pretende estudiar la posible transferencia por contacto del esperma del donante varón 1 a otro tejido textil en condiciones de alta humedad durante 48 horas. Puede apreciarse claramente dicha transferencia, siendo el perfil observado coincidente con el perfil del donante varón 1 (tabla 49).

Tabla 48.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense C bajo la metodología de trabajo 2.

EQUIPO FORENSE C Metodología 2 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	0.019	Componentes alélicos residuales	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.0779	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.0147	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.000	NEGATIVO	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.000	NEGATIVO	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 +	0.0033	Componentes alélicos residuales	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1+	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.0183	Varón donante 1	NEGATIVO

Figura 57: electroferograma de la muestra M1 de la metodología 2 del equipo forense C

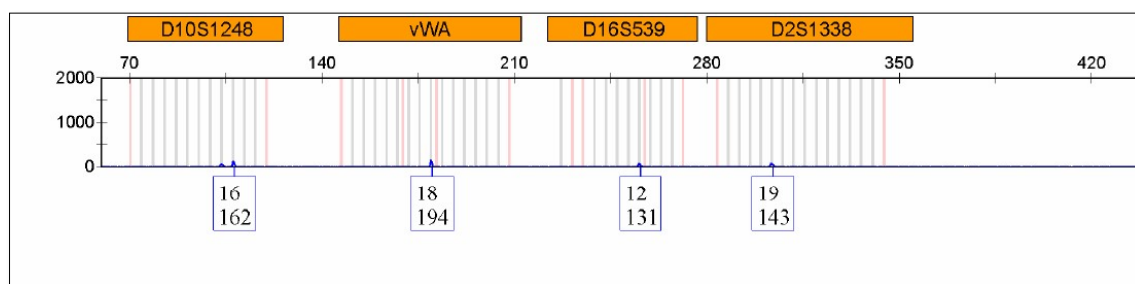


Figura 58: electroferograma de la muestra M6 de la metodología 2 del equipo forense C

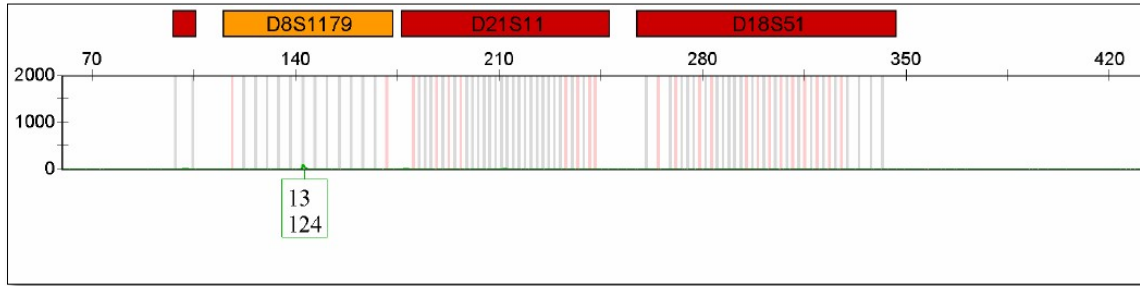


Figura 59: electroferograma de la muestra M9 de la metodología 2 del equipo forense C

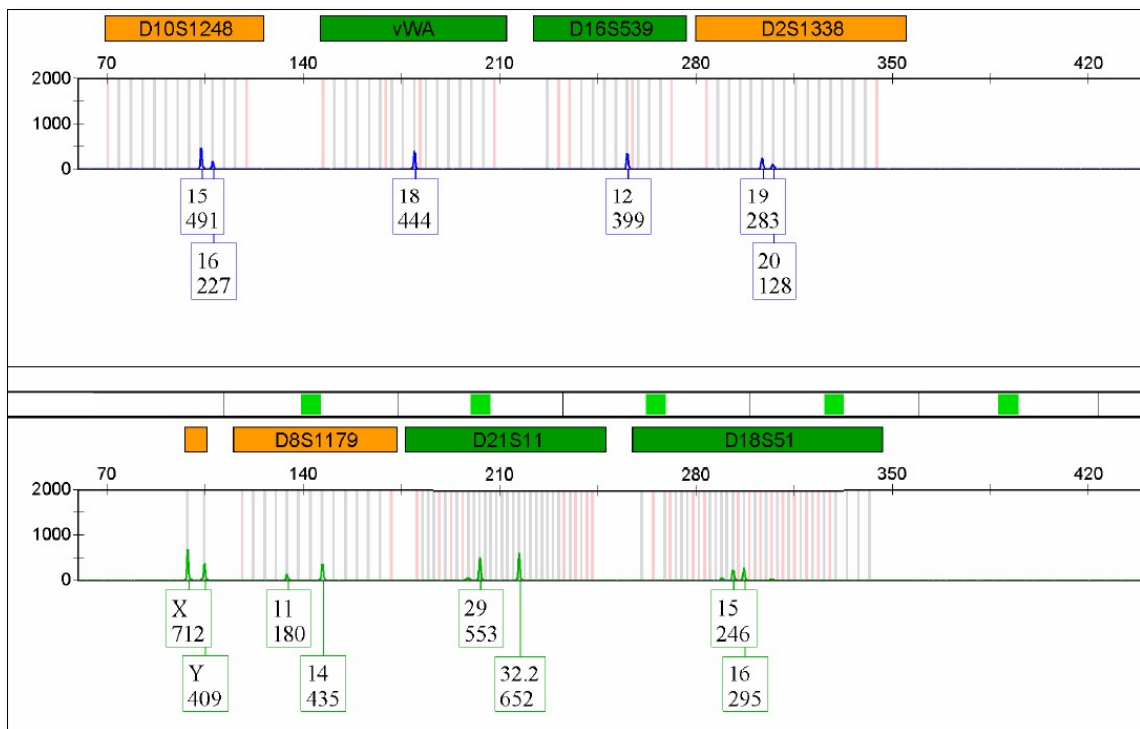


Tabla 49.- Perfil genético del varón donante 1 para los marcadores estudiados.

		Perfil genético del Donante V1 para los marcadores con resultado positivo					
Donante V1		VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51
		18-18	12-12	19-20	11-14	29-32.2	15-16
		D10S1248					
		15-16					

Los análisis del equipo forense C en base a la metodología de trabajo 3 mostraron que estos concuerdan con los valores esperados, descritos en la tabla 50.

Tabla 50.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense C bajo la metodología de trabajo 3.

EQUIPO FORENSE C				
Metodología 3 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	0.0168	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.0385	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.0175	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.0068	NEGATIVO	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.000	NEGATIVO	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 +	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.0022	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.0048	NEGATIVO	NEGATIVO

Resultados del Equipo Forense D según diferentes metodologías de trabajo

Los análisis del equipo forense D en base a la metodología de trabajo 1 (tabla 51) son acordes con los valores esperados.

Los análisis del equipo forense D en base a la metodología de trabajo 2 (tabla 51) son acordes con los valores esperados, ya que la muestra M4 (restos epiteliales en guante) no evidencia ningún perfil genético, mientras que el resto de los resultados concuerdan con lo esperado.

Tabla 51.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense D bajo la metodología de trabajo 1.

EQUIPO FORENSE D				
Metodología 1 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	0.8183	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		2.12733	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		2.2773	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.0774	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.1907	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.002	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.0033	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO

En los análisis del equipo forense D en base a la metodología de trabajo 3 (tabla 53) se observa que de la muestra número 8 (esperma sobre tejido textil) se han obtenido componentes alélicos residuales, siendo este resultado no coincidente con lo esperado (figura 60). Si bien existe una transferencia por contacto primario, los picos alélicos son de muy escasa calidad y altura electroforética y no producirían errores en la interpretación de perfiles genéticos únicos. En caso de mezclas o de perfiles *Low Copy Number* sí podría darse alguna dificultad de interpretación (tabla 54).

Tabla 52.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense D bajo la metodología de trabajo 2.

EQUIPO FORENSE D Metodología 2 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	1.678366	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		0.96982	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		1.54426	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.00971	NEGATIVO	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.20355	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.003655	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO

Figura 60: electroferograma de la muestra M8 de la metodología 3 del equipo forense D

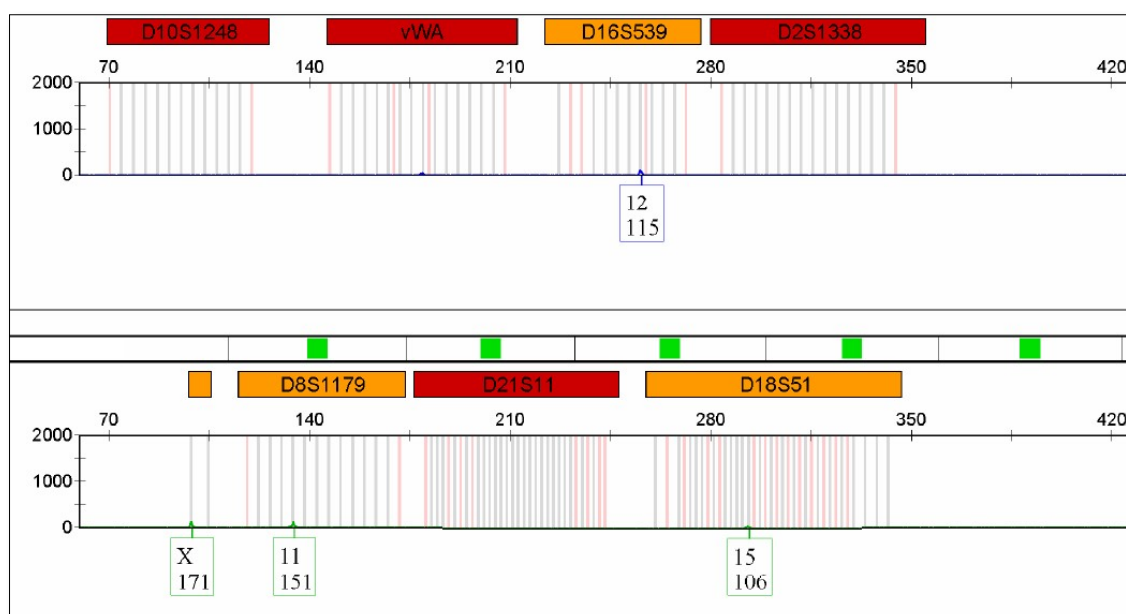


Tabla 53.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense D bajo la metodología de trabajo 3.

EQUIPO FORENSE D				
Metodología 3 de manipulación de evidencias				
Muestras Tipología Y donante	Pruebas preliminares	Cantidad ADN (ng/μl)	Perfil genético obtenido	Resultado esperado en ausencia de contaminación y en ausencia de transferencia por contacto
Muestra 1 (sangre)	PTA-1 +	2.29787	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 2 (epiteliales colilla)		1.032995	Mujer donante 1	Mujer donante 1
Muestra 3 (epiteliales bolígrafo)		0.6984	Varón donante 2	Varón donante 2
Muestra 4 (epiteliales guante)		0.01564	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 5 (epiteliales guante)		0.278535	Varón donante 1	Varón donante 1
Muestra 6 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.003488	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 7 (sangre en papel)	PTA-1 -	0.000	NEGATIVO	NEGATIVO
Muestra 8 (esperma en tela)	PTA-2 + PTA-3 -	0.005857	Componentes alélicos residuales	NEGATIVO
Muestra 9 (esperma en tela)	PTA-2 -	0.006343	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabla 54.- Perfil genético del varón donante 1 para los marcadores estudiados.

Perfil genético del Donante V1 para los marcadores con resultado positivo						
Donante V1	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51
	18-18	12-12	19-20	11-14	29-32.2	15-16
	D10S1248					
	15-16					

ESTUDIO C

En relación con la detección de contaminación durante la marcha analítica en el Laboratorio de Genética Forense

Este estudio pretende determinar la posible existencia de un *background* de contaminación residual en diferentes superficies de trabajo de un laboratorio, tales como superficies o mesas de procesado y manipulación de las muestras, material de oficina, material de grabación audiovisual, teclados de equipos informáticos, bordes de sillas de trabajo, manillas de puertas, paredes interiores e interior de los pocillos de las centrífugas utilizadas en las diferentes fases de análisis, etc.

De esta forma se pretende evaluar la eficiencia de los sistemas de limpieza y asepsia en el laboratorio, así como la posible transferencia secundaria de material genético por los propios analistas, detectando posibles focos de depósito de ADN y su influencia en los resultados finales, con especial incidencia en si suponen un problema o no para la interpretación de los perfiles.

Como muestras de referencia indubitadas se dispone previamente de todos los perfiles genéticos del staff técnico, administrativo y de personal auxiliar que desempeña su labor profesional en el laboratorio.

Como muestras dubitadas se tomaron de forma aleatoria, por parte de todos los analistas del laboratorio forense, muestras de control de contaminación residual consistentes en frotis mediante torundas de algodón estériles impregnadas en agua mili - Q de posibles depósitos de restos biológicos en diferentes superficies de uso común (matriz de muestras tabla 55). Todas las muestras fueron incluidas en el procesado de los asuntos, con la misma consideración que las muestras *blanco* de cada serie de extracción.

En el tratamiento de las muestras de forma individual, los niveles de cuantificación de ADN podrían no ser suficientes para la amplificación y genotipado de las muestras, siguiendo un criterio restrictivo. En el presente estudio, se procedió al genotipado de la muestra independientemente de su nivel de cuantificación, puesto que se pretende evaluar si podría estar presente como contaminación o *background* residual que afectase a muestras que, por su alta cantidad de ADN, sí fuesen seleccionadas para su amplificación y genotipado.

Tabla 55.- Matriz de muestras del estudio C.

TIPOLOGÍA DE LAS MUESTRAS Y VALORES DE CUANTIFICACIÓN DE ADN			PERFIL GENÉTICO
Contaminación residual sobre diferentes superficies y efectos del Laboratorio de Genética Forense			Amplificación +/-
Muestra	Tipología de la muestra	Qf (ng/μl)	
C-1	Frotis sobre superficie de recipiente de desechos de bencidina	0.00000	NEGATIVO
C-2	Frotis sobre superficie de recipiente de residuos biológicos	0.00321	NEGATIVO
C-3	Frotis sobre material de oficina en meseta de trabajo (bolígrafo, regla, cinta adhesiva)	0.0167	POSITIVO
C-4	Frotis sobre teclado de ordenador situado en una sala de manipulación de muestras	0.388	POSITIVO
C-5	Frotis en el interior de los pocillos de centrífuga 1 de una sala de extracción del Laboratorio	0.0156	POSITIVO
C-6	Frotis en el interior de los pocillos de centrífuga 2 de una sala de extracción del Laboratorio	0.00937	POSITIVO
C-7	Frotis en el interior de los pocillos de centrífuga 3 de una sala de extracción del Laboratorio	0.0143	POSITIVO
C-8	Frotis sobre superficie de cámara fotográfica Nikon D90 de uso rutinario en la sala de examen preliminar de muestras del Laboratorio	0.272	POSITIVO
C-9	Frotis sobre mesa central de la sala de examen preliminar de muestras del Laboratorio, tomado previamente al inicio del trabajo diario	0.0000	NEGATIVO
C10	Frotis sobre las manillas interiores de las dos puertas de la sala de examen preliminar de muestras del Laboratorio	0.0000	NEGATIVO
C-11	Frotis sobre el borde superior del respaldo de una de las sillas de la sala de examen preliminar de muestras del Laboratorio	0.00324	NEGATIVO
C-12	Frotis sobre el suelo de la sala de la sala de examen preliminar de muestras	0.0000	NEGATIVO
C-13	Frotis sobre mandos manuales del microscopio óptico de la sala de examen preliminar de muestras del Laboratorio	0.0028	NEGATIVO
C-14	Frotis sobre el borde superior del respaldo de una de las sillas de una de las salas de extracción del Laboratorio	0.0187	POSITIVO
C-15	Frotis sobre el teclado y el ratón del equipo informático de la sala de examen preliminar de muestras del Laboratorio	0.0639	POSITIVO
C-16	Frotis sobre interruptor de la luz de la sala de examen preliminar de muestras del Laboratorio	0.00867	POSITIVO

Resultados de la muestra C-3 (figuras 61 y 62): frotis sobre material de oficina de uso habitual en la meseta de trabajo y manipulación de muestras (bolígrafo, regla, cinta adhesiva). Como puede observarse en los electroferogramas existen puntos del laboratorio con resultados de contaminación residual altos en intensidad de fluorescencia o lo que es lo mismo, en cantidad inicial de ADN molde o restos biológicos.

Figura 61: electroferograma A de la muestra C-3 del Estudio C

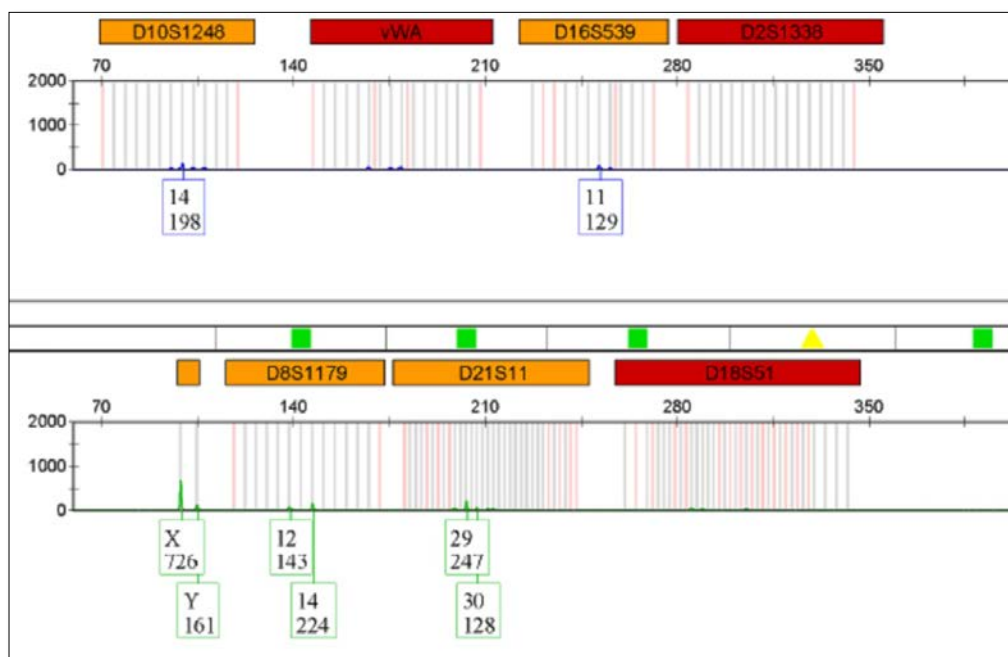
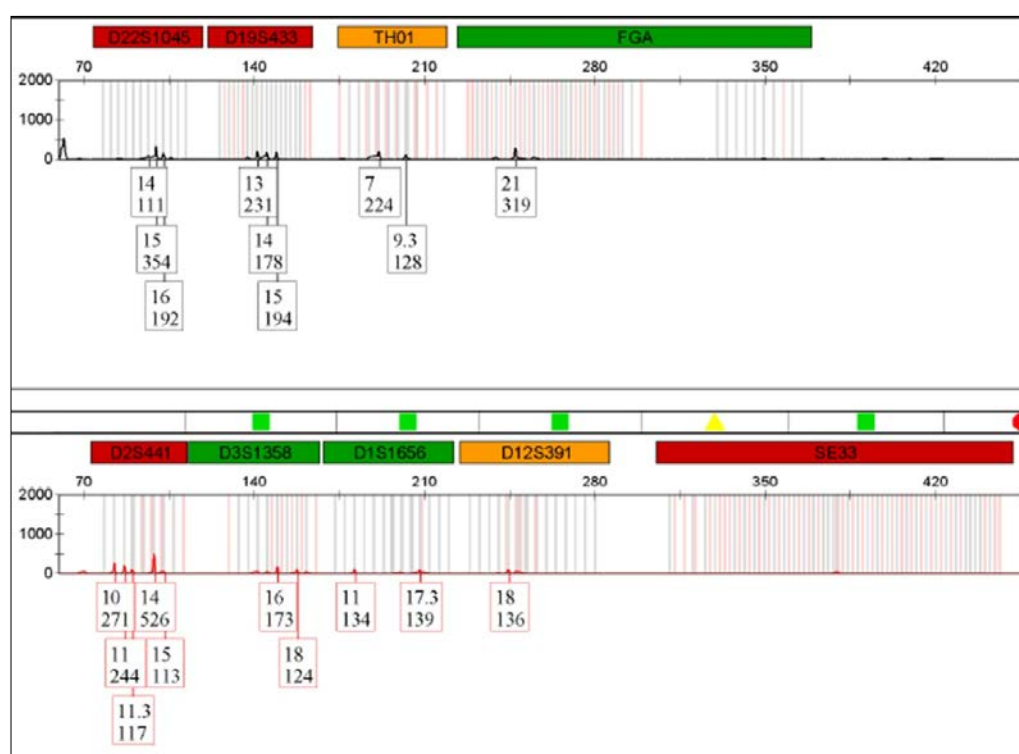


Figura 62: electroferograma B de la muestra C-3 del Estudio C



Resultados de la muestra C-4 (figuras 63 y 64): frotis sobre teclado de ordenador situado en una sala de manipulación de muestras. En este caso los puntos del laboratorio con resultados de contaminación residual altísimos en intensidad de fluorescencia presentan picos electroforéticos con intensidades de fluorescencia muy por encima del umbral de 150 rfu.

Figura 63: electroferograma A de la muestra C-4 del Estudio C

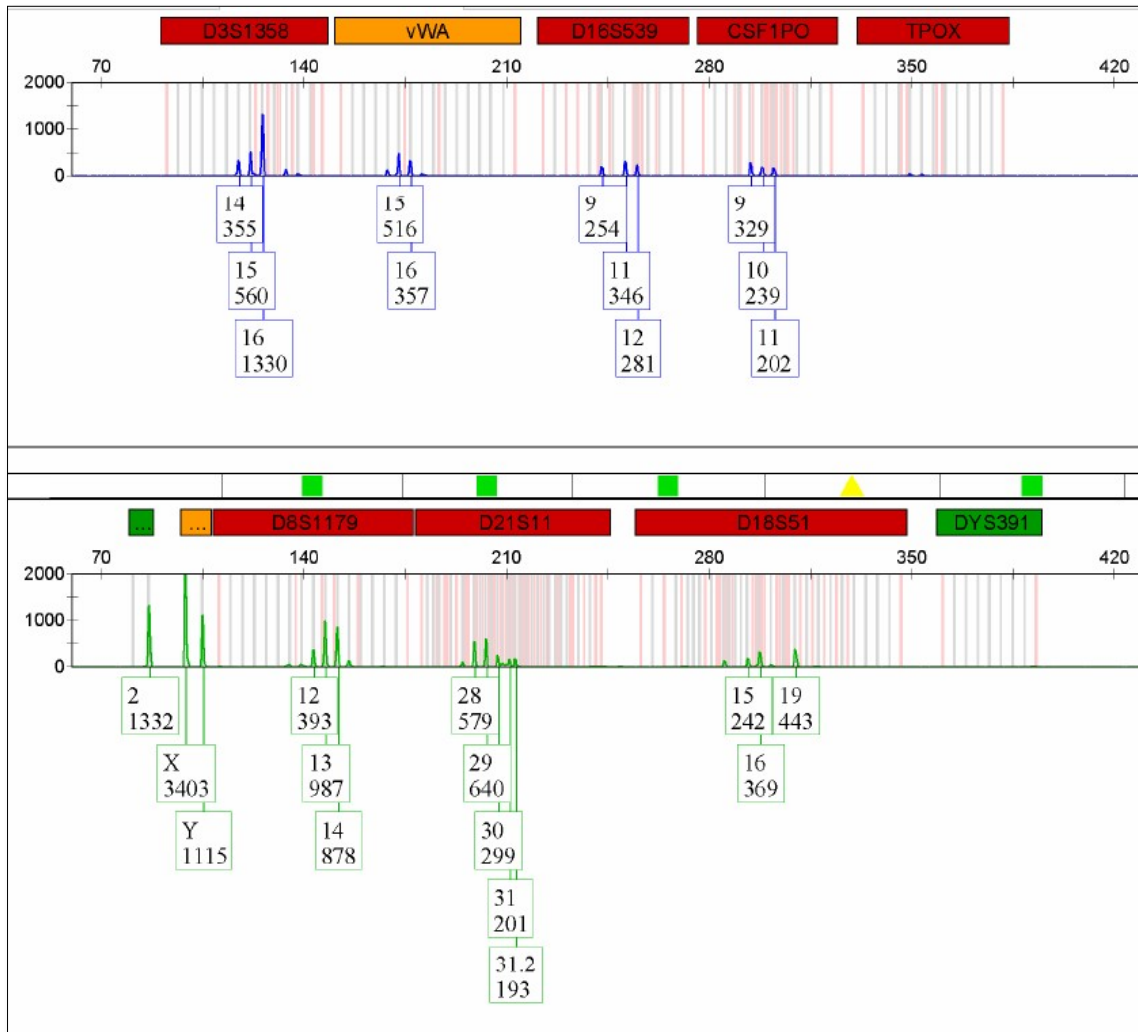
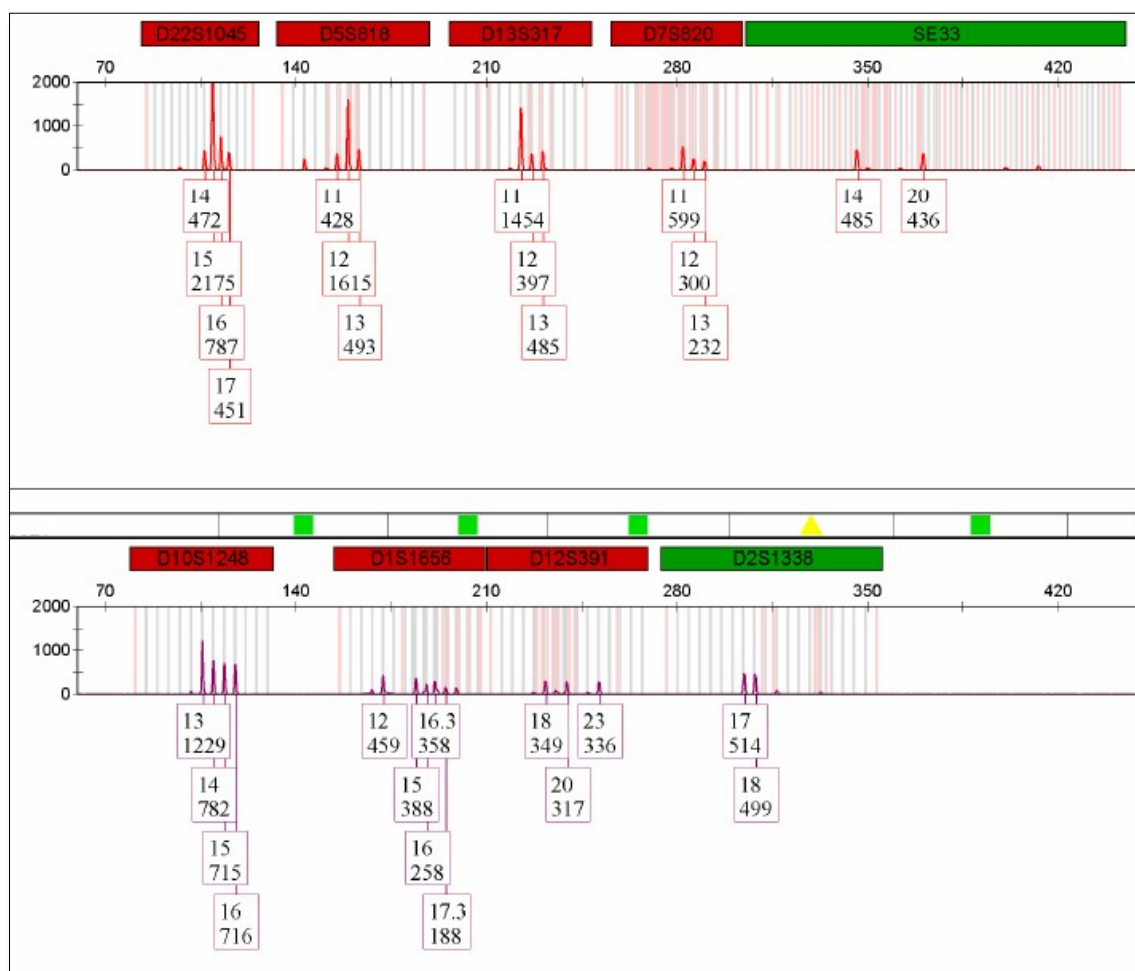
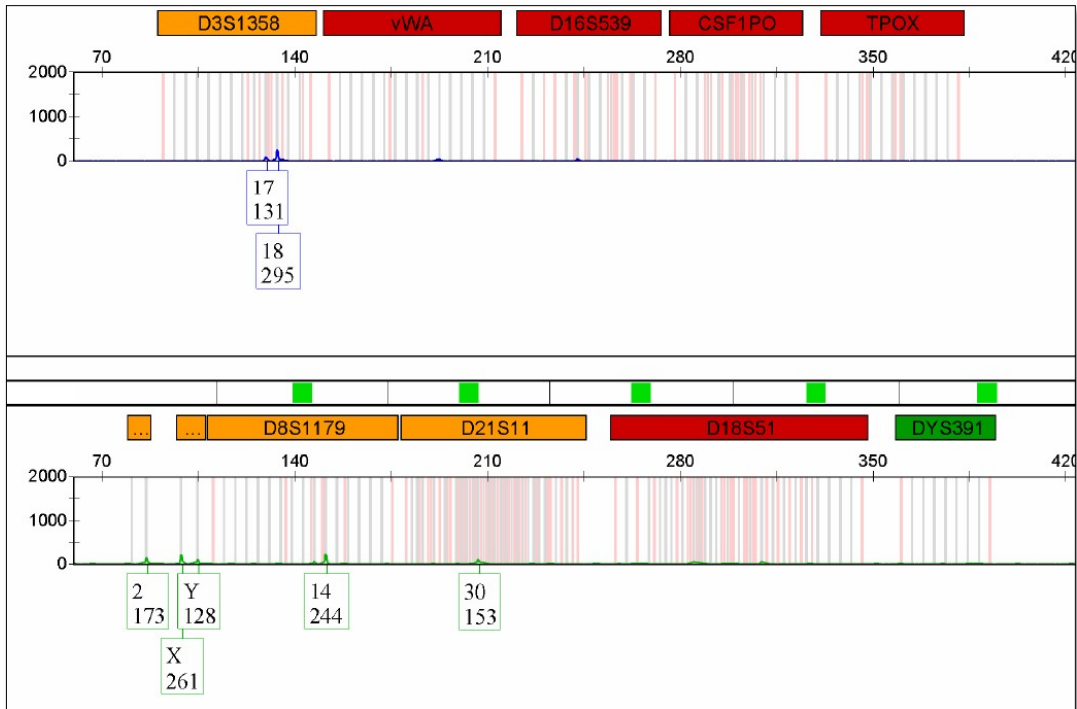


Figura 64: electroferograma B de la muestra C-4 del Estudio C



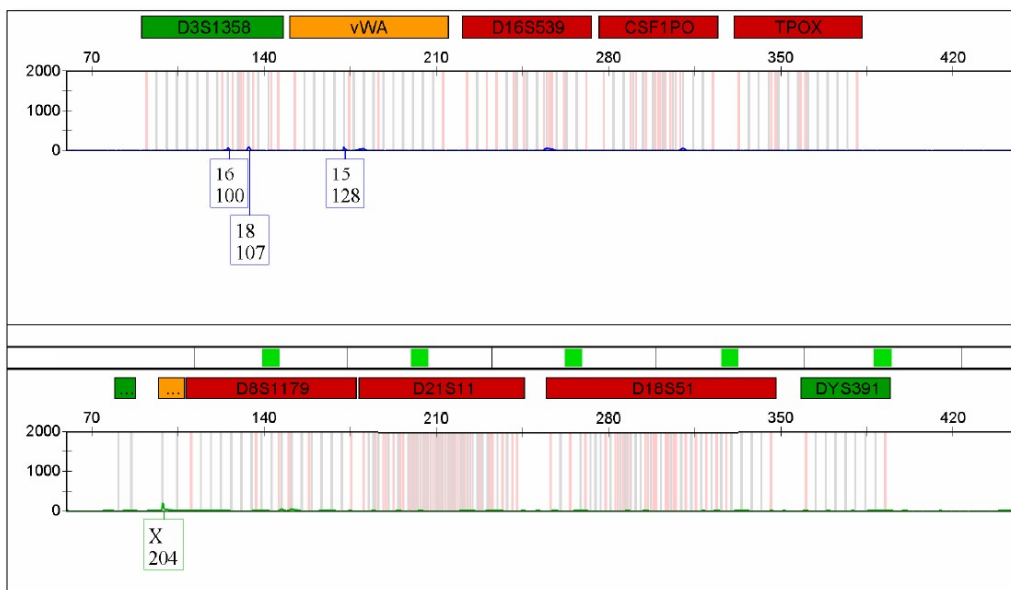
Resultados de la muestra C-5 (figura 65): frotis en el interior de los pocillos de centrifugadora 1 en una sala de extracción del laboratorio, también en este caso existe contaminación residual.

Figura 65: electroferograma de la muestra C-5 del Estudio C



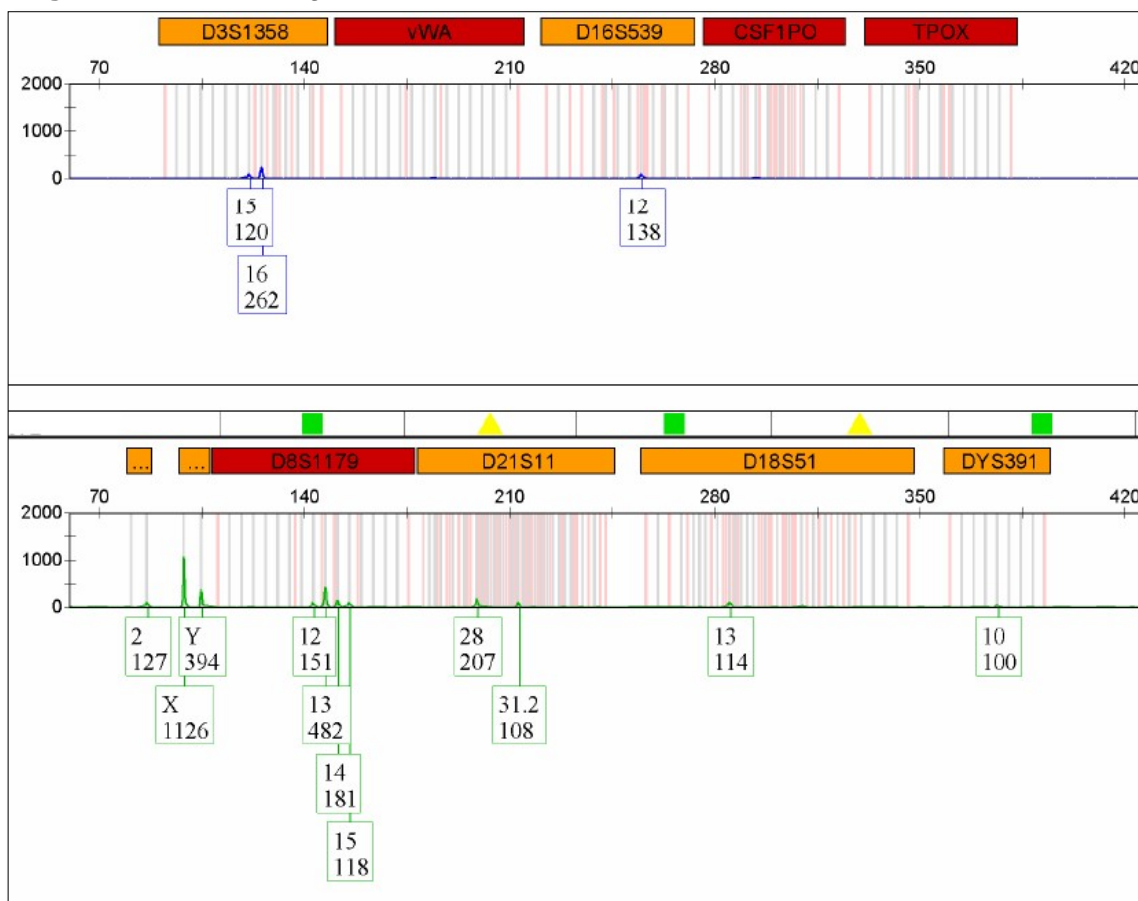
Resultados de la muestra C-6 (figura 66): frotis en el interior de los pocillos de centrifugadora 2 en una sala de extracción del laboratorio, también en este caso existe contaminación residual.

Figura 66: electroferograma de la muestra C-6 del Estudio C



Resultados de la muestra C-7 (figura 67): frotis en el interior de los pocillos de centrifugadora 3 en una sala de extracción del laboratorio. De nuevo en este caso también en este caso existe contaminación residual.

Figura 67: electroferograma de la muestra C-7 del Estudio C



Resultados de la muestra C-8 (figuras 68, 69 y 70): frotis sobre la superficie de cámara fotográfica Nikon D90 de uso habitual en la sala de examen de muestras del laboratorio. Como puede observarse en los electroferogramas la contaminación residual es altísima en intensidad de fluorescencia o lo que es lo mismo, en cantidad inicial de ADN molde o restos biológicos, con intensidades de fluorescencia muy por encima del umbral de 150 rfu.

Figura 68: electroferograma A de la muestra C-8 del Estudio C

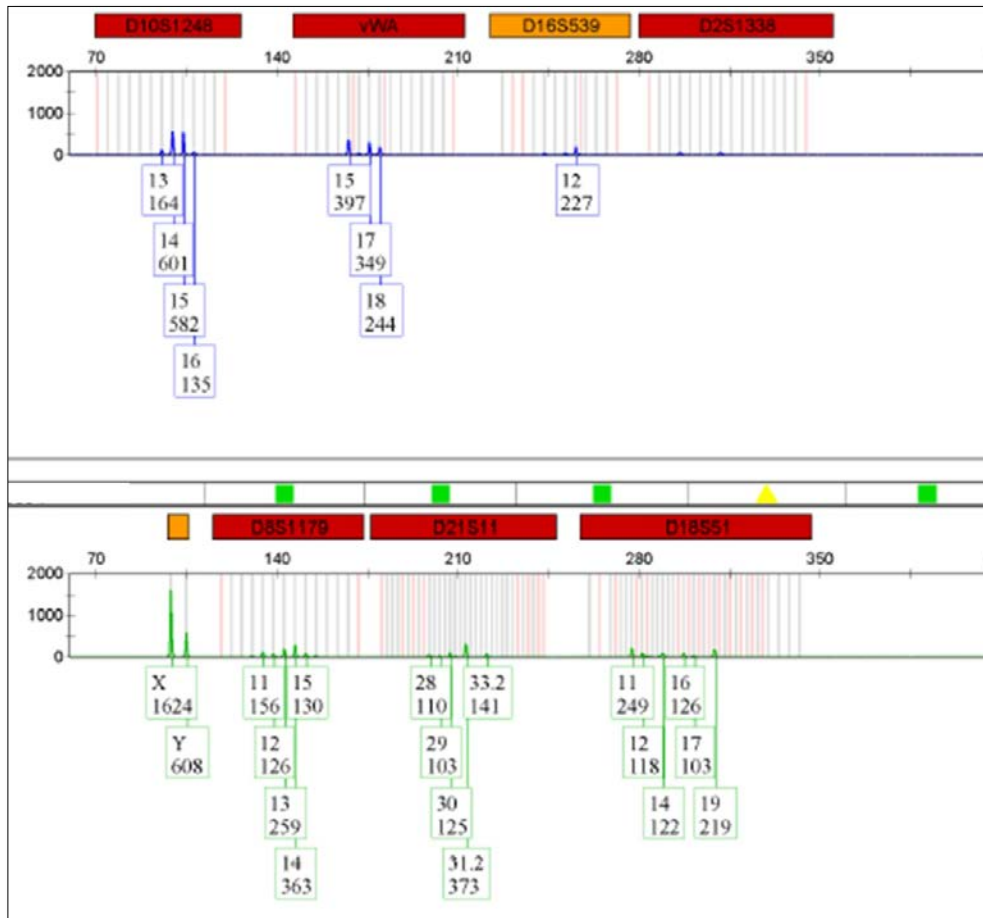


Figura 69: electroferograma B de la muestra C-8 del Estudio C

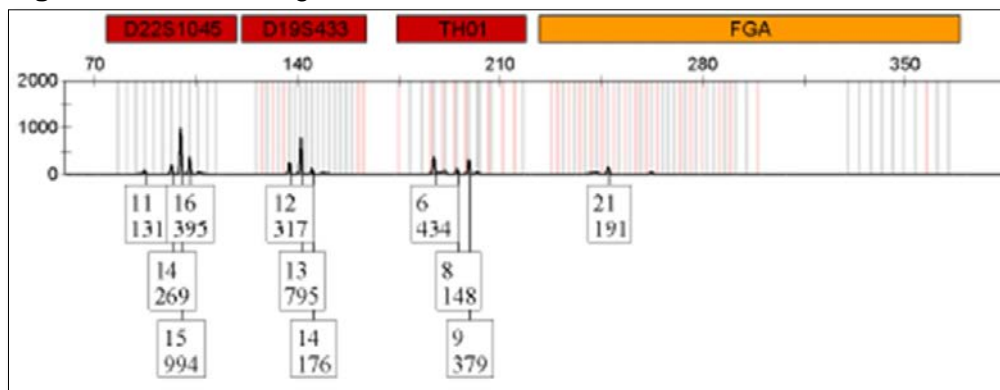
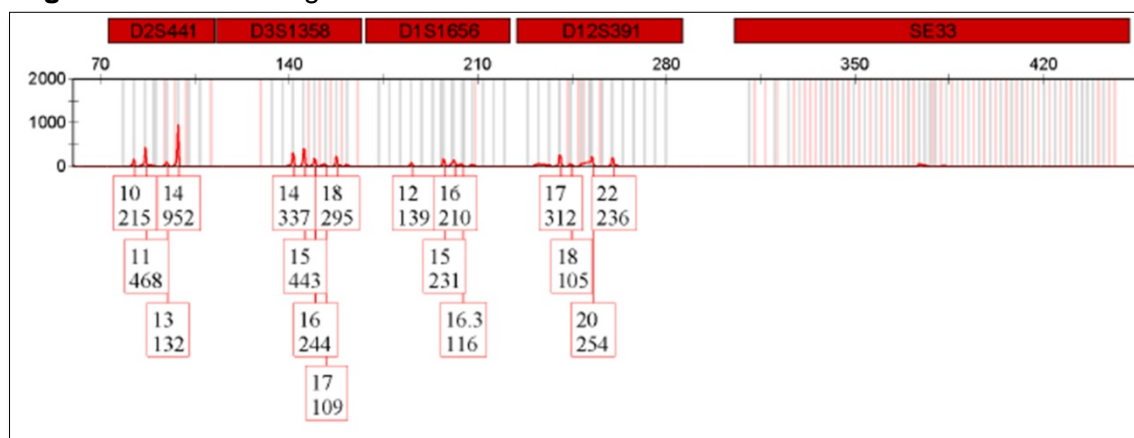


Figura 70: electroferograma C de la muestra C-8 del Estudio C



Resultados de la muestra C-14 (figura 71): frotis sobre la parte superior del respaldo de una de las sillas de una sala de extracción del laboratorio. También es el caso de las sillas existe contaminación.

Resultados de la muestra C-15 (figuras 72, 73 y 74): frotis sobre la superficie del teclado y del ratón del equipo informático de la sala de examen preliminar de muestras del laboratorio. también en este caso existe contaminación residual. Como puede observarse en los electroferogramas el material informático es un punto de contaminación muy elevado con elevados picos de fluorescencia.

Figura 71: electroferograma de la muestra C-14 del Estudio C

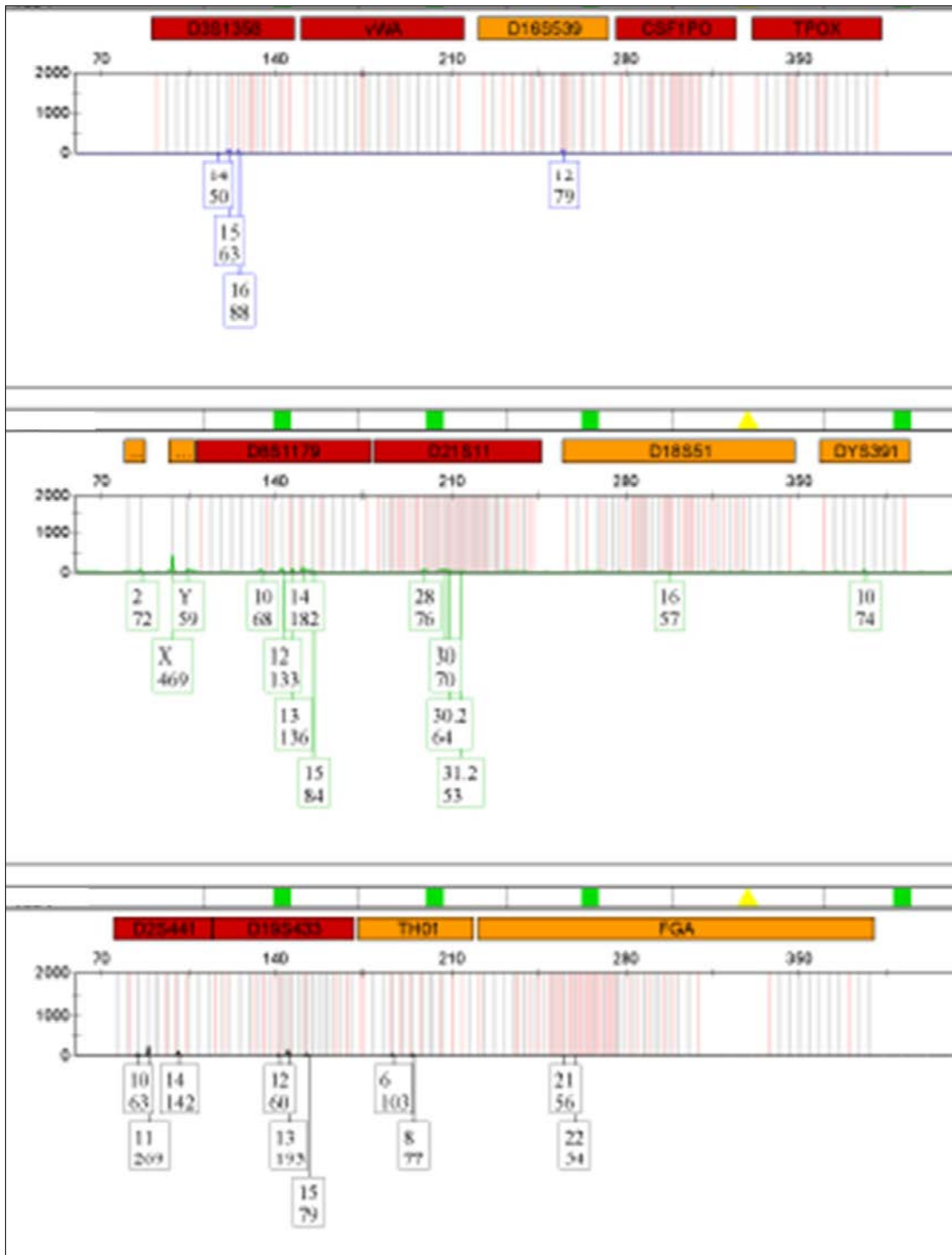


Figura 72: electroferograma A de la muestra C-15 del Estudio C

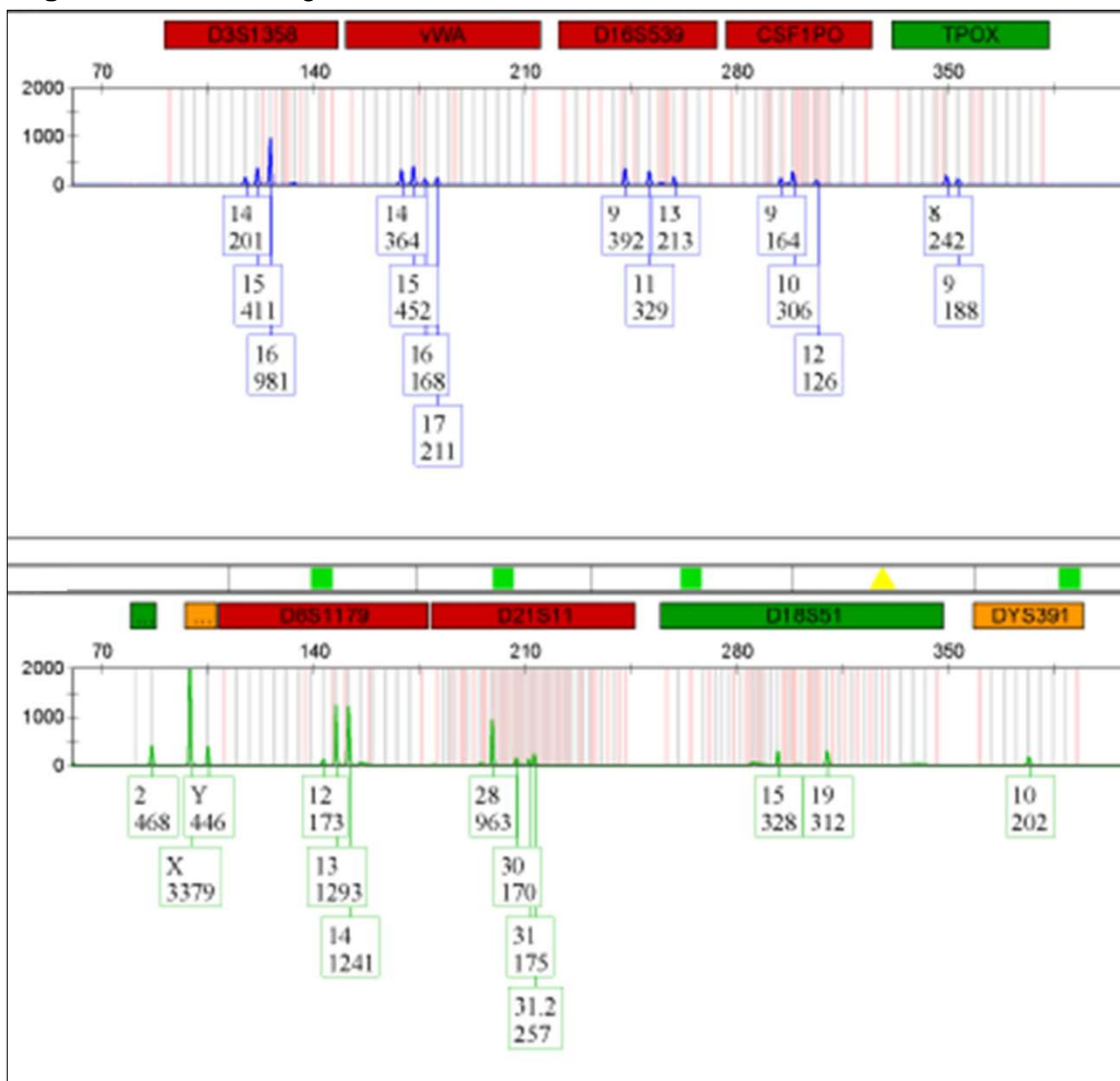


Figura 73: electroferograma B de la muestra C-15 del Estudio C

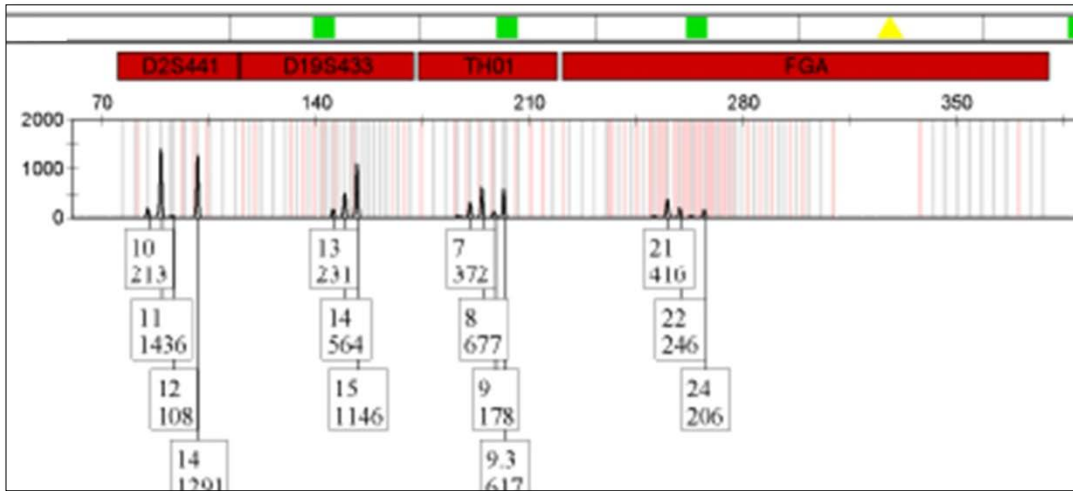
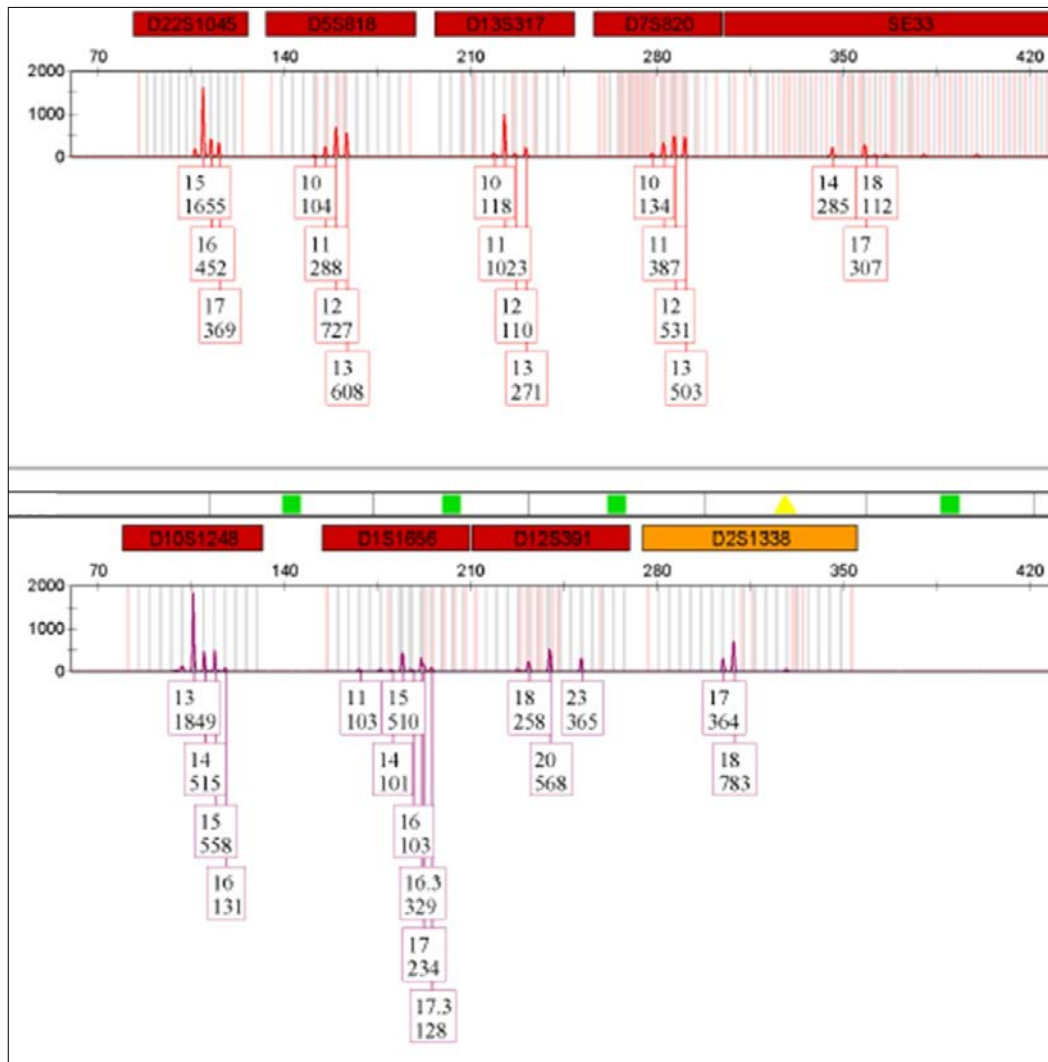


Figura 74: electroferograma C de la muestra C-15 del Estudio C



Resultados de la muestra C-16 (figuras 75 y 76): frotis sobre el interruptor de la luz de la sala de examen preliminar de muestras del laboratorio. La contaminación de los interruptores es baja, pero puede afectar a las muestras.

Figura 75: electroferograma A de la muestra C-16 del Estudio C

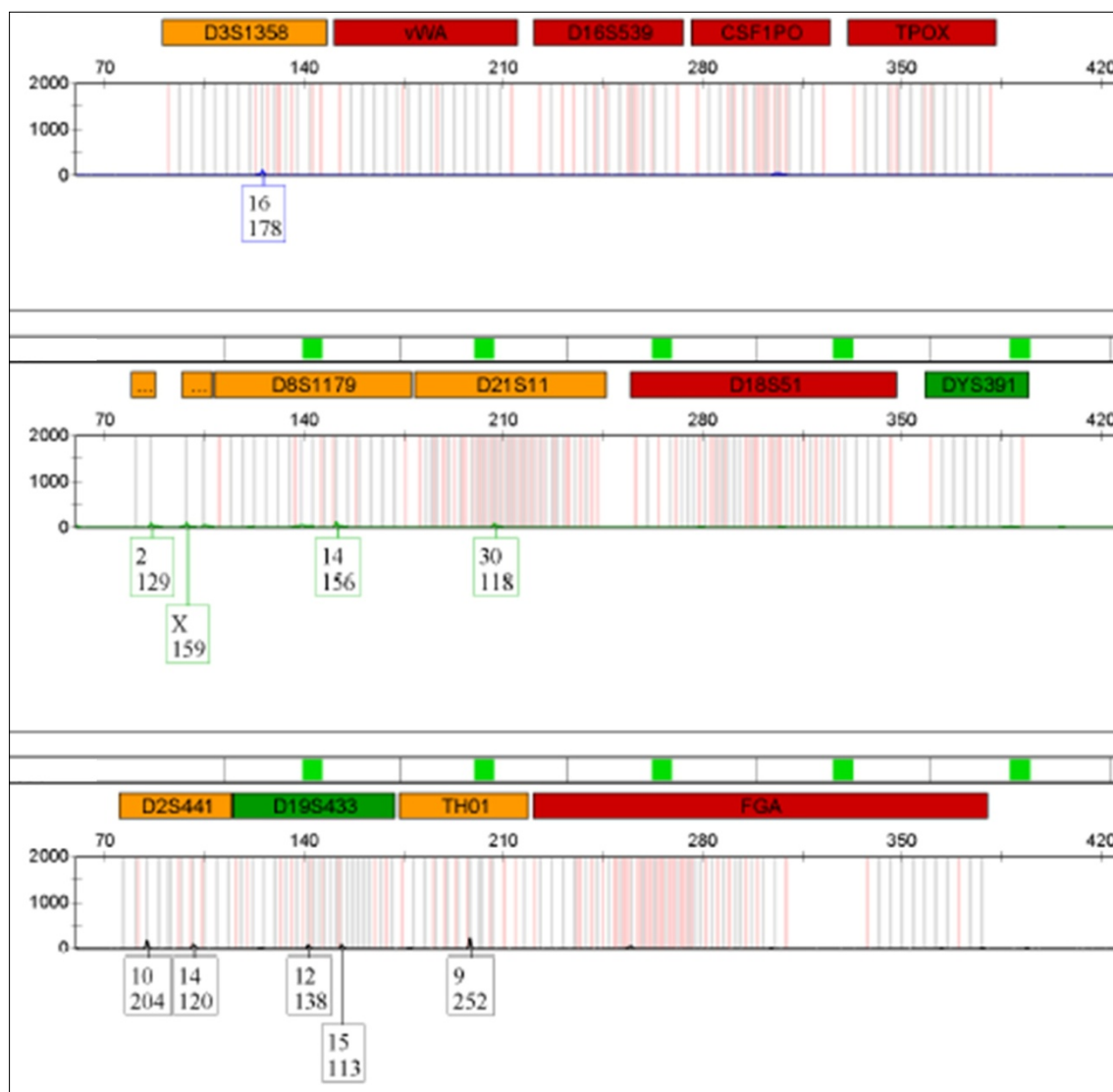
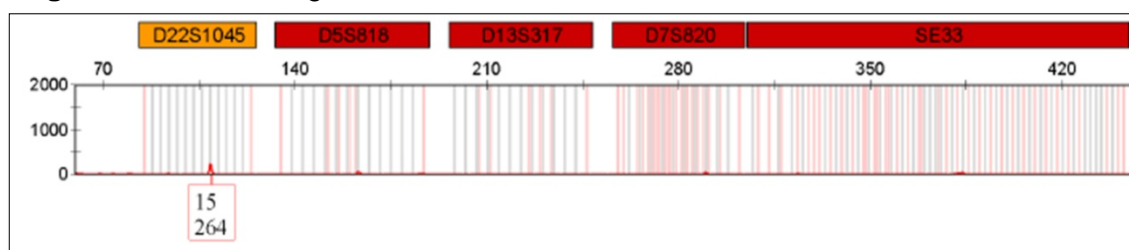


Figura 76: electroferograma B de la muestra C-16 del Estudio C



5. DISCUSIÓN

En los últimos años son múltiples los estudios científicos en el ámbito de la criminalística y las ciencias forenses sobre de los depósitos de ADN que, siendo ajenos a un delito, se encuentran presentes durante todas las fases de la investigación científica, conformando depósitos residuales de restos biológicos cuya detección y discriminación es crucial para el correcto desarrollo del proceso penal (Lapointe *et al.*, 2015; Pickrahn *et al.* 2017).

Se han desarrollado códigos y prácticas de conducta, en algunos países incluso protocolos de trabajo para evitar la contaminación genética tanto en la recogida de las evidencias como en la eliminación de las posibles transferencias en las bases de datos por la inclusión de los perfiles genéticos del *staff* (Forensic Science Regulator, Codes of Practice and Conduct - Protocol, 2017), con el objetivo final de un desarrollo sin errores del proceso penal.

Es precisamente ese correcto desarrollo del proceso penal una exigencia estricta en una sociedad técnica y científicamente desarrollada, considerando que cualquier error judicial basado en una interpretación errónea de una prueba científica es un fracaso inasumible por el sistema de justicia penal y de forma general, por la sociedad.

Los errores acaecidos en los procesos judiciales han sido atribuidos tradicionalmente a situaciones únicas, a errores puntuales tales como el referido *caso del fantasma de Heilbronn* (Time Magazine Online. Germany's Phantom Serial Killer: A DNA Blunder, 2009), pero habitualmente no han sido seguidos de un período de reflexión a todos los niveles del sistema de justicia penal, una revisión profunda no sólo de los métodos de obtención de pruebas o de su análisis, sino también de la interpretación jurídica de las mismas (Pascali y Prinz, 2012; Fonnelop *et al.*, 2016; Gill, 2016).

El comentado *caso del fantasma de Heilbronn* fue uno de los factores que ha provocado la elaboración y publicación de la norma ISO 18385 (ISO/IEC 18385:2016), cuyo propósito es minimizar el riesgo de contaminación genética en los productos y material fungible utilizados para la recogida, almacenaje y análisis de las evidencias biológicas en casos forenses, que es el ejemplo más evidente de la implementación de normas y protocolos para

solucionar los problemas detectados pero es también un ejemplo que nos indica que no se realiza una reflexión profunda sobre todo el sistema en cuanto a la posible contaminación o existencia de ADN ajeno al delito por diferentes causas.

En esa reflexión o revisión, deberían plantearse preguntas tales como si se puede identificar la práctica defectuosa que conduce a la formación de juicios o convicciones erróneas por parte de los juzgadores y qué se puede hacer para prevenir la recurrencia de esos errores en el futuro (Gill, 2014; FBI National Press Release, 2015).

La reflexión de cómo mejorar la interacción de jueces, investigadores y científicos debería acompañar de forma inexorable y constante al proceso penal, añadiendo la siempre compleja revisión de casos que pudieran haber sido juzgados bajo errores de metodología o sesgos de interpretación científica o jurídica (Gill, 2016).

El conjunto de investigadores, científicos y juzgadores deben de asumir que cuando se ha cometido un error y éste ha sido detectado, considerarlo exclusivamente como un error puntual genera no sólo más errores sino también se evita la posibilidad de mejorar o corregir la metodología de trabajo. Por cada error involuntario que se detecte, hay muchos que pueden no ser detectados y que tienden a ser repetidos en serie en diferentes procedimientos penales.

La repetición de esas metodologías presuntamente erróneas o con fallos de procedimiento puede, incluso de forma contraria a sus fines, aumentar la credibilidad en esas prácticas y dotar de un refuerzo adicional a los participantes en los procesos penales (Gill, 2016).

Múltiples estudios realizados han evidenciado la existencia de depósitos de ADN ajenos al delito, teniendo en cuenta que cualquier resto o traza de ADN que no sea relevante para el crimen que se está investigando debería ser considerado como contaminación (Forensic Science Regulator, 2015).

Se ha puesto de manifiesto que existen depósitos de ADN o contaminación previa al crimen, por lo que es preciso para los forenses que realicen el procesado de la escena del delito considerar que, bajo circunstancias normales, existe un *background* genético en cualquier superficie

de cualquier escenario (Gill, 2001a; Prinz *et al.*, 2006; Cook *et al.*, 2007; Toothman *et al.*, 2008; Forensic Science Regulator, 2015).

De igual forma, se ha puesto de manifiesto que pueden darse fenómenos de transferencia de material genético durante el procesado de la escena del delito, llegando a elaborarse procedimientos y normas para minimizar los riesgos de esta contaminación (European Crime Scene Management Project, UK, 2000; ENFSI QCC, 2003; Standing Committee for Quality and Competence ENFSI QCC, 2003; Standing Committee for Quality and Competence ENFSI QCC, 2004; EA-ENFSI, 2008; Standing Committee for Quality and Competence ENFSI QCC, 2011; ISO/IEC 17020:2012; ENFSI Scenes of Crime Working Group, 2012; Forensic Science Regulator, 2017). El conocimiento de la existencia de estos depósitos de ADN ajenos al delito, implica por una parte la necesidad de adoptar metodologías de trabajo estrictas que prevengan o minimicen en lo posible la recogida de este componente genético y por otro, el conocimiento por parte de los investigadores forenses de los puntos de contaminación más frecuentes.

Una vez terminada la fase analítica en los laboratorios de genética forense, una formación y entrenamiento continuo adecuados pueden permitir realizar interpretaciones correctas de los resultados en casos de muestras complejas por su escaso nivel de ADN o bien en caso de mezclas de perfiles genéticos en las que se observen fenómenos estocásticos que dificulten su valoración.

En los últimos años se han realizado estudios dirigidos no sólo a comprobar la existencia del *background* de ADN en la escena del delito y en el material destinado a recoger las evidencias, sino a desarrollar los métodos para poder detectarlo y a implementar mecanismos para el tratamiento que se debe de llevar a cabo en caso de detección positiva, así como la introducción de los datos en los *softwares* de discriminación y cotejo de perfiles. En el apartado de la valoración de los resultados, se han desarrollado modelos matemático-estadísticos que permiten realizar una evaluación que considere todos los factores y establezca una forma de presentar estos datos ante los tribunales de justicia (Verdon *et al.*, 2013; Cale *et al.*, 2015; Lapointe *et al.*, 2015; Mapes *et al.*, 2015; Breathnach *et al.*, 2016; Helmus *et al.*, 2016).

Sin embargo, no existen referencias en cuanto a la búsqueda de focos de contaminación en los propios laboratorios de análisis genético, siendo uno de los objetivos del presente trabajo. El uso del término "*contaminación*" es, desde una perspectiva jurídica tradicional, arriesgado para un laboratorio de análisis genético. El propio término requiere, por un lado, de una definición que no es la que podría entenderse por parte de los componentes de los tribunales de justicia y de las partes acusadora y defensora personadas en el procedimiento y por otro lado, de la explicación de que la existencia de depósitos de ADN ajenos al delito en diferentes superficies no sólo es obvia y normal, sino que no condiciona por sí misma el procesado y análisis de las muestras.

La búsqueda de los focos o depósitos de ADN en los laboratorios forenses es un estudio que, si bien sería estrictamente necesario, no suele realizarse de forma rutinaria en ningún laboratorio forense y en los que se realiza, no suele derivar en acciones correctivas y mucho menos en publicaciones o comunicaciones públicas o directamente a los tribunales de justicia en los propios informes periciales de análisis de las evidencias que hayan podido estar expuestas a esos focos de contaminación o depósitos de ADN ajenos a las muestras.

La explicación a esta ausencia de estudios en los propios laboratorios, así como la ausencia de esta información en los propios informes periciales es que la interpretación de esa contaminación por parte del tribunal, así como de las partes, sea en el sentido de invalidar la prueba pericial. Pero es función de los científicos que realizan los análisis buscar esos focos de contaminación y posteriormente explicar con la máxima transparencia qué significado tienen y qué incidencia pueden tener en la analítica, pudiendo ser ésta ninguna, detallando de igual forma qué metodologías o procedimientos se llevan a cabo para comprobar que las evidencias no son afectadas.

Este planteamiento de estudio de los errores como hechos puntuales con elaboración de metodologías de corrección de los mismos permite a los sistemas de calidad implantados en los laboratorios dotar de una herramienta de auditoría y certificación de los trabajos ante los tribunales de justicia, en concreto en España la institución que supervisa el control de calidad y

certificaciones de todos los laboratorios oficiales pertenece al propio Ministerio de Justicia, la Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN (Real decreto 1977/2008, de 28 de noviembre), dotando a los informes periciales de un carácter de *cuasi* infalibilidad técnica y científica, sometidos ya solamente al principio de contradicción en la vista oral en un ámbito que ya pertenece al Derecho.

En este planteamiento podemos encontrar que, si bien es avanzado en cuanto a reforzar el necesario concepto de infalibilidad de la justicia penal y las decisiones judiciales, no abarca la complejidad del problema, puesto que descuida muchas cuestiones previas en relación a la propia recogida de las evidencias, al procesado de las mismas y a su análisis llevadas a cabo por los investigadores, fuerzas y cuerpos de seguridad y servicios forenses.

En suma, se tiende a dividir en compartimentos estancos el proceso penal, con diferentes funciones llevadas a cabo de forma casi aislada por diferentes instituciones, cuando en realidad es un conjunto de procesos interrelacionados e interdependientes que deberían estar sometidos al examen permanente del método científico, asumiendo que los errores son posibles y por ello deben ser estudiados permanentemente de forma crítica y rigurosa.

Es precisamente en este terreno de discusión en el que se enmarca la consideración jurídica de la evidencia genética, en el sentido de confundir en muchas ocasiones la identidad del perfil de ADN con la actividad de su transferencia. Los restos o trazas de ADN son definidos como cualquier muestra donde hay incertidumbre de que pueda ser asociado con el evento del crimen mismo, de modo que es posible que la transferencia de ADN pueda haber ocurrido antes del evento del crimen (depósito por parte de un inocente) o después del evento del crimen (depósito por parte del investigador), incluyendo en los investigadores a los analistas de las diferentes evidencias en los correspondientes laboratorios (Fonnelop *et al.*, 2016; Buckingham *et al.*, 2018).

Para no confundir la identidad del perfil genético y la actividad mediante la que se transfirió el perfil de ADN para convertirse en evidencia en el proceso penal deben de plantearse dos cuestiones. En primer lugar, si dicha evidencia

respalda una coincidencia con el acusado y en segundo lugar el cómo se transfirió esa evidencia.

El presente trabajo se basa en la premisa de que el análisis de ADN sólo responde a la primera pregunta y en ningún caso puede servir para inferir relaciones entre la evidencia y la respuesta a la segunda pregunta, ya que además de la transferencia primaria (contacto directo con un objeto o persona), pueden existir respuestas alternativas, tales como la transferencia secundaria, también denominada indirecta o debida a contacto con inocente, o incluso debida a una contaminación en los laboratorios de análisis.

Partiendo de un concepto amplio del proceso penal y desde una perspectiva crítica con todos los procedimientos, se planteó como objetivo de este trabajo describir la contaminación residual presente en las distintas fases de la práctica forense, desde el depósito de material genético en la escena de un delito en un momento previo al crimen (*crime scene DNA background*) y su persistencia en el tiempo, pasando por las posibles contaminaciones primarias y secundarias que suceden durante el procesado de la escena del delito, provocadas de forma involuntaria por los propios especialistas encargados de la Inspección Ocular y recogida de vestigios (*crime scene DNA contamination*), hasta la contaminación que puede producirse en los laboratorios de análisis genético, tanto por el manipulado de los vestigios por los analistas, como por la propia contaminación residual presente en las instalaciones (*laboratory DNA background*).

En relación con los depósitos de restos biológicos en la escena de un crimen, previos a la comisión del mismo y ajenos al asunto y sus participantes, se estudió un amplio abanico de muestras muy frecuentes en la práctica policial y forense, que permite afirmar que existen depósitos de ADN en la mayor parte de superficies y que, en muchos casos, tienen la suficiente intensidad como para lograr identificar e individualizar perfiles y, en consecuencia, producir contaminaciones que serían de difícil interpretación o que podrían llevar a conclusiones totalmente erróneas.

Se ha demostrado como pueden hallarse depósitos de ADN en superficies que han estado conservadas en condiciones estándar durante

largos períodos de tiempo, llegando incluso a 10 años entre el depósito de los restos y su analítica. Además, en muchos de estos casos los resultados analíticos permiten individualizar perfiles genéticos con valor identificativo.

Puede afirmarse que aún en el caso de no obtener patrones identificativos de ADN, existirá con total seguridad un componente residual de ADN sobre la mayor parte de superficies, objetos o vestigios. Este componente, al que denominamos *background*, debe de ser considerado e incluso recogido por los especialistas que procesan la escena del delito, así como analizado en las fases posteriores para su uso en la valoración final de los resultados, como elemento de discriminación.

El caso de los depósitos de ADN sobre la superficie de elementos balísticos demuestra dos cuestiones: la primera es que no es necesario un alto tiempo de manipulación o fricción de los efectos para obtener trazas de ADN por contacto con valor identificativo; la segunda es que, incluso con tiempos de manipulación mínimos y con unas condiciones de exposición extremas, pueden seguir detectándose estos depósitos.

En el caso de los elementos balísticos los tiempos que mediaron entre el depósito y el análisis fueron muy pequeños, circunscribiendo este experimento al suceso del crimen en sí mismo si se realiza una inferencia a un caso real, o bien a los momentos inmediatamente anteriores o posteriores. Se precisarían estudios más amplios con diferentes tiempos, depósitos, donantes y condiciones de exposición para poder obtener parámetros estadísticos que permitiesen indicar, aún en forma de hipótesis y no de conclusión, la pertenencia del resto biológico a un momento o margen temporal concreto, teniendo como epicentro el suceso criminal.

Las armas blancas y contundentes pueden ser consideradas como la muestra por excelencia durante la práctica forense en los casos de homicidio o asesinato. El estudio experimental planteado demuestra la conservación de algunos depósitos en márgenes temporales muy altos, de ocho meses.

Pero desde una perspectiva policial, judicial y científica, debe de considerarse que esa tipología de depósito está presente en esas "armas blancas" (cuchillos, navajas, abrecartas, etc) o "armas contundentes" (martillos,

bates de béisbol, etc) de forma habitual en la rutina diaria de cualquier vivienda o profesión.

Los cuchillos de una vivienda que se estén utilizando en la vida normal de la misma, pueden tener lógicamente un *background* de DNA y es precisamente la detección y discriminación de ese *background* lo que debe de considerarse un objetivo prioritario por parte de los investigadores policiales y judiciales, tanto desde la perspectiva de la investigación técnica como desde la investigación analítica y de interpretación científica.

Particularmente novedosos son los depósitos de ADN ajeno sobre la piel de la víctima, lo que nos dirige a la consideración de la propia víctima como vector de contaminación o transferencia de ADN. Los estudios experimentales y de casos reales presentados muestran con gran claridad depósitos de restos biológicos sobre la piel de las víctimas que permiten individualizar perfiles genéticos o evidenciar mezclas con escasos fenómenos estocásticos. Esta demostración empírica ha de llevar a los investigadores a valorar si estos restos proceden o no del autor del hecho o del hecho en sí mismo.

Esta transferencia primaria de restos del agresor a la víctima debe de ser evaluada en el conjunto del acto criminal, de los momentos previos y también posteriores. En lo referente a la investigación de un delito deben de valorarse todas las hipótesis y todas y cada una de las explicaciones posibles a cada evidencia empírica hallada.

Los restos presentes en la piel de una víctima de agresión sexual deben de ser considerados en el contexto de la investigación policial y judicial, valorando si antes del delito la víctima ha podido tener contacto consentido, lo que dificultaría la relación directa entre el perfil encontrado sobre la víctima y el hecho delictivo.

Los actos posteriores al hecho delictivo (limpiarse, cubrirse con ropa que entra en contacto con la zona de la piel en la que se encuentran los depósitos, manipulaciones del personal de atención sanitaria previa al estudio facultativo del médico forense, etc) deben de ser conocidos y descritos en el acta que se levante sobre la inspección ocular y recogida de vestigios, puesto que pueden condicionar la interpretación judicial de los resultados.

De igual forma, los estudios realizados demuestran que la piel humana puede ser un vector de contaminación por transferencia secundaria, es decir, que hipotéticamente el DNA depositado sobre la víctima podría no ser del agresor, sino que podría ser de un contacto previo del agresor con otro donante.

Del conjunto de muestras analizadas en el Estudio A se puede concluir que los restos biológicos pueden conservarse con eficiencia analítica durante largos períodos de tiempo, incluso de años. Si un agresor manipula un objeto con un alto depósito de ADN antes del delito, puede convertirse en un vector de contaminación secundaria al entrar en contacto o fricción con la víctima.

Estos estudios no deben llevar a cuestionar la utilidad de la genética forense como prueba en un delito, pero sí que obligan a una valoración conjunta de los datos existentes, no sólo científicos, sino de los hechos probados.

Dado que los *kits* de amplificación avanzan de forma rápida hacia una mayor sensibilidad y eficiencia analítica, es probable que lo que ahora se observa en los electroferogramas como un perfil residual o *background*, pueda llegar a ser amplificado en niveles óptimos de lectura, por lo que sería preciso que la comunidad científica y los diferentes servicios forenses realizaran estudios más amplios sobre los tiempos de depósito y la pérdida de eficiencia de los análisis en función del tiempo y condiciones de exposición de las muestras, con el objetivo de tener datos probabilísticos con un amplio muestrario que permitan inferir si los depósitos de ADN han podido o no conservarse en las muestras estudiadas desde el depósito en el momento del crimen, o si pudiesen proceder de momentos muy anteriores en el tiempo.

Si bien la valoración conjunta de los datos del crimen corresponde a los Tribunales de Justicia, el analista genético no puede ni debe obviar estos datos de la investigación policial, sino tenerlos en cuenta. No se trata de condicionar el análisis, ni siquiera de valorar estadísticamente la posible contaminación, sino de tener en cuenta que las identificaciones de perfiles que se consideran habitualmente como agresores o culpables, pueden proceder de otros depósitos no relacionados con el delito.

Esta última máxima, ese espíritu crítico que no es sino el método científico, debe de guiar su declaración ante los Tribunales de Justicia, exponiendo la prueba pericial desde un punto de vista estrictamente matemático – estadístico y, en suma, científico, sin condicionar las hipótesis sobre la presunta participación o no del acusado.

El estudio B está en relación con los trabajos reales de recogida y manipulación de muestras por parte los funcionarios que deben de procesar la escena de un delito, pretendiendo evaluar si la metodología de trabajo por parte de cuatro equipos forenses podía generar algún tipo de contaminación en un conjunto de muestras cuya principal característica era la procedencia de un sólo donante y la alta cantidad de depósito de ADN teórico que en ellas se contenía.

Además de la metodología considerada correcta a juicio de cada equipo forense (que incluye sus procedimientos estandarizados y la aplicación práctica rutinaria en función de los medios e instalaciones, así como los errores involuntarios que puedan cometerse), estos implementaron otras dos metodologías incorrectas, en las que se pretendía forzar la aparición de contaminaciones por transferencia directa o indirecta y de esa forma conocer el grado de facilidad con el que podría ocurrir un fenómeno de este tipo sin que fuese detectado.

Por otra parte, se pretendía comprobar la existencia de *background* residual de ADN en las salas de trabajo de los equipos forenses y en el material utilizado durante las labores de manipulación y etiquetado de las muestras y los rangos de cantidad de ADN en los que se encontraba dicha contaminación, así como su posible interferencia en la interpretación de los perfiles genéticos.

En lo referente al contacto entre prendas en condiciones de alta humedad y la posible transferencia de fluidos, concretamente esperma y sangre, los datos de las pruebas preliminares fueron positivos, indicando la presencia de sangre y esperma, en concreto de hemoglobina y proteína p30, por lo que en las 48 horas de contacto en alta humedad sí ocurrieron fenómenos de transferencia por contacto o transferencia primaria.

Estos depósitos aportaron resultados de cuantificación y de amplificación de ADN en muchos casos negativos, y que en alguna de las muestras pudieron transferir muy escasa cantidad de ADN, que en ningún caso interferiría la interpretación clara del perfil del donante, en este experimento de tipo donante conocido para facilitar la discriminación de la contaminación.

Así pues, la transferencia de fluido en condiciones de alta humedad puede ser factible, si bien no puede afirmarse que suponga una contaminación segura del tejido de depósito y mucho menos en condiciones de lograr una identificación genética o una dificultad en la interpretación de los resultados.

El estudio de los electroferogramas de este estudio permite detectar picos alélicos con alturas superiores a 150 unidades de fluorescencia, lo que implica que, en caso de muestras complejas con escasa cantidad de ADN, sin donante conocido, tanto de perfiles individuales como de mezclas, podrían alterar gravemente el resultado observado y conducir a errores en la interpretación de los perfiles.

Este punto resulta de crucial importancia para los analistas de los laboratorios de genética forense cuando trabajan con muestras en condiciones *Low Copy Number (LCN)* y sin donante conocido, puesto que deben realizar interpretaciones de los resultados desde una perspectiva estrictamente conservadora y siempre en el contexto de la posible contaminación de las muestras. La interpretación de este tipo de muestras *LCN* y su presentación ante los tribunales de justicia es quizás uno de los puntos más controvertidos de los sistemas forenses de análisis de ADN en la actualidad, lo que exige una alta capacitación técnica por parte de los expertos analistas y la consideración de más factores que los derivados del propio análisis.

En lo referente a la mala *praxis* en el manipulado de las muestras y la posible contaminación por el personal de los equipos forenses, de forma general no se puede apreciar una contaminación genética del staff técnico que manipula las muestras, ni de tipo primario por contacto durante las labores de manipulado ni por *background* residual de su propio ADN en sus salas de trabajo.

Incluso en la metodología de trabajo muy incorrecta, en la que no se incluyen medidas de prevención y se fuerza la ocurrencia de la contaminación, no han podido apreciarse de forma significativa picos alélicos que pudiesen haber dificultado la interpretación de los perfiles genéticos con donantes conocidos y depósitos con alta cantidad de ADN.

La presencia de ADN detectada y amplificada no ha aportado contribuyentes ajenos a lo esperado en cantidades apreciables, todos los componentes alélicos ajenos podrían ser descartados sin dificultad como picos artefactuales, por lo que se puede concluir que resulta difícil obtener una contaminación residual por mala praxis en muestras de la tipología empleada en la matriz del presente trabajo.

El tercer punto de estudio se centraba en el análisis de muestras del material de trabajo propio de las instalaciones de cada unidad de manipulación de evidencias. En este caso, sí que se ha apreciado la existencia de cantidades residuales de ADN en el material de oficina (bolígrafos) y mesetas de trabajo de los equipos forenses que han participado, observando en alguno de los casos altas o muy altas cantidades de ADN que suponen focos de contaminación por transferencia directa con altísima probabilidad.

Se trata de circunstancias puntuales y con cantidades que demuestran la existencia de *background* residual de ADN, que debieran ser conocidas por los miembros de los equipos forenses.

Sólo se detectó en uno de los casos, concretamente en la muestra M1 bajo metodología 3 del equipo forense A, una transferencia de componentes alélicos del forense varón A hacia la muestra, sangre humana en soporte de torunda de algodón, si bien las cantidades eran tan escasas que no dificultaría en ningún caso la lectura del perfil mayoritario, pero sí obligaría a los analistas a informar sobre la presencia de una mezcla forense, cuando la muestra era claramente sangre.

Además, y como ya se ha referido, hay una gran diferencia entre los estudios con donante conocido o sospechoso/acusado y aquellos estudios en los que se desconoce por completo el donante o contribuyente. En el resto de

los resultados no se detectó en ningún caso contaminaciones de ADN de las muestras en estudio con los perfiles genéticos de los manipuladores.

Puede concluirse que la contaminación de muestras o evidencias por mala *praxis* o contacto por manipulación indebida es altamente improbable en el abanico de muestras utilizado, con grandes cantidades de ADN y con perfiles individualizados.

De igual forma, debemos concluir que la contaminación residual existente en las instalaciones de trabajo y material de oficina utilizado de las unidades manipuladores de las evidencias es, de forma general, escasa y en ningún caso ha afectado a ninguna analítica del presente estudio en el sentido de interferir en la interpretación de los resultados analíticos, si bien es de crucial importancia conocer su existencia y puntos de depósito habituales, así como la posibilidad de su existencia a los efectos de controlar su limpieza y esterilización así como el conocimiento de estos depósitos por parte del personal técnico.

En resumen, es posible pero poco probable que suceda la contaminación, y en caso de ocurrir, es muy difícil que afecte a las conclusiones finales de la pericia.

En el estudio C se pretende comprobar la existencia de contaminación residual de ADN en diferentes superficies de un laboratorio de genética forense que cumple con unas estrictas medidas de asepsia. Frecuentemente se tiende a pensar que la limpieza estricta supone una seguridad total en cuanto a la ausencia de contaminación. Como se puede comprobar existen superficies como el respaldo de una silla, el teclado de un ordenador o el ratón del mismo, una cámara de fotos que se usa para fotografiar los vestigios estudiados, etc, que pueden acumular gran cantidad de ADN.

La manipulación rutinaria de estos elementos por los analistas tiene ese riesgo y para minimizarlo existen las metodologías de trabajo de los especialistas, consistentes en limpieza con etanol o cambio de guantes cada vez que se manipula una superficie mientras se trabaja con un vestigio (cada vez que se mueve el respaldo de la silla, o que se toman apuntes en el PC sobre los métodos de recogida de vestigios, etc).

La existencia de estos focos de contaminación no es en sí misma peligrosa, siempre que una vez detectados, se ponga en conocimiento de todo el *staff* técnico y se introduzcan esos datos en las bases de datos de perfiles genéticos que permiten discriminar, además de los perfiles del *staff*, los perfiles de contaminación evidenciados.

Se trata, por una parte, de detectar los focos de contaminación para incidir en su asepsia y también extremar las medidas de precaución en cuanto a su manipulación y uso y, por otra parte, de considerar las contaminaciones como perfiles del *staff* técnico o auxiliar del laboratorio, a fin de discriminarlas en las interpretaciones finales de los resultados.

Es de significar que los datos sobre contaminación residual en laboratorio son aplicables también a la escena de un delito, con el condicionante de que en el laboratorio se llevan a cabo procedimientos de limpieza exhaustiva que a buen seguro no se realizan en las escenas de los delitos.

En resumen, se trata de asumir la existencia de dicha contaminación en diferentes fases de la instrucción en el proceso penal. Desde la transferencia de ADN provocada por contaminaciones en el material utilizado en la recogida de las muestras, la contaminación provocada por la manipulación de la escena del crimen, durante la autopsia, la contaminación producida por el embalaje y envío de las evidencias e incluso la contaminación producida por los propios analistas en el laboratorio y en sus instalaciones.

La contaminación es por tanto un elemento que acompaña a las evidencias y que, en vez de considerar como posible su eliminación, debe de considerarse como objetivo irrenunciable su detección y discriminación en las interpretaciones.

Y es en ese punto en el que radica el principal problema, en el de la asunción de la contaminación como un elemento más del estudio policial, científico y jurídico de las evidencias en el proceso penal.

La mayor parte de las medidas aplicadas en este ámbito han sido dirigidas a la inclusión de los perfiles genéticos del *staff* en las bases de datos de perfiles, para poder discriminarlos, pero resulta difícil de asumir que no

exista ninguna obligación legal de hacerlo. No se encuentra en el marco legal regulador referencia alguna a los perfiles genéticos de los funcionarios que trabajan en las diferentes fases y por tanto, no existe ningún protocolo ni norma que obligue a todos los funcionarios a aportar este perfil genético al sistema informático a los efectos de discriminación y cotejo.

Abundando en el problema de la ausencia de regulación legal, no existe en las auditorías de calidad ni en la acreditación ENAC ningún aspecto que haga referencia a la contaminación o depósitos de ADN en las instalaciones del laboratorio, simplemente no se considera ni se evalúa.

La novedosa Instrucción de la Dirección Adjunta Operativa de la Policía Nacional de 14 de junio de 2016 sobre normas básicas de actuación ante la comisión de delitos violentos es la primera norma que hace referencia a la obligación de aportar los perfiles genéticos y otros elementos identificativos para el curso de la investigación, de forma textual "*...si los miembros de Policía Científica lo estiman necesario para realizar cotejos con las muestras recogidas y vestigios hallados en el lugar del delito, todos los funcionarios que accedan al lugar de los hechos deberán aportar sus impresiones dactilares y las muestras biológicas o biométricas que sean necesarias. El personal de otros Cuerpos o Instituciones también será oportunamente requerido para ello, si fuera preciso para el normal desarrollo de la investigación*".

Pero es preciso puntualizar que esta instrucción, si bien utiliza el imperativo para reflejar la obligación de aportar los datos o muestras requeridos para el curso de la investigación, no tiene respaldo legal de ninguna norma de rango superior y, dado que el acceso a datos identificativos de las personas tiene obligatoriamente que estar regulado por una norma con rango de ley así como su inclusión en los sistemas informáticos, en la práctica no supone una obligación real ya no sólo para los miembros de la Policía Nacional, que cumplen la instrucción interna, sino para el resto de los actuantes en el procesado de la escena del delito, la autopsia y los análisis de las muestras, a los cuales no afecta una orden o instrucción de una institución diferente. Requerir para obtener las muestras biológicas al resto de participantes no supone que tengan obligación alguna de hacerlo.

En resumen, en ningún caso se ha afrontado la problemática desde una perspectiva amplia, en la que se incluyan mecanismos de prevención basados en la premisa de que la contaminación no sólo es posible, sino que es segura su existencia y por tanto, deben incluirse metodologías de trabajo que eviten en la medida de lo posible su existencia en niveles inadecuados y sobre todo, su interferencia en la interpretación científica de los resultados del análisis y en el condicionamiento sobre la interpretación jurídica de los mismos por parte del tribunal que juzga el hecho.

6.CONCLUSIONES

A modo de conclusiones finales del estudio, resulta de crucial importancia para los investigadores implicados en el procesado, manipulación y análisis de los vestigios de la escena de un delito, sí como en los encargados de la interpretación de los resultados, tener en cuenta las siguientes consideraciones:

PRIMERA:

En cuanto al análisis preliminar de la escena de un delito, habría que incluir un conocimiento exhaustivo de los sucesos ocurridos en márgenes temporales anteriores y posteriores al delito, al efecto de estimar la posible existencia de restos biológicos no procedentes del propio hecho delictivo.

SEGUNDA:

Toma de muestras de *background* residual de ADN en la escena del delito, a modo de controles negativos para los análisis y su interpretación, en concreto sobre las superficies de recogida de vestigios que se hayan seleccionado, a modo de controles negativos para los análisis y su interpretación.

TERCERA:

Toma de muestras de *background* residual de las salas de trabajo y manipulado de muestras en los Institutos de Medicina Legal y en los Laboratorios de análisis genético, así como del material utilizado, a modo de controles negativos para los análisis y su interpretación.

CUARTA:

Toma de muestras de referencia de los perfiles genéticos de todo el staff técnico que trabaje en contacto con las muestras y también en contacto con las salas o material de trabajo, incluyendo a los servicios de limpieza y mantenimiento de las mismas, así como al personal de recogida de las muestras y a todo el personal que de forma eventual u ocasional pudiese haber estado en contacto con la escena del delito antes, durante o después del mismo.

QUINTA:

Durante el procesado de las muestras en los Laboratorios de Genética Forense, deberían de introducirse, a modo de controles negativos de extracción y de forma rutinaria, tomas de muestra de background residual de diferentes superficies que se encuentren en contacto frecuente con los analistas y con las muestras o vestigios.

SEXTA:

Todos los datos obtenidos de estas muestras de background deberán ser informados al staff técnico y también a los especialistas que procesan las escenas de los delitos, a modo de informes técnicos, para conocimiento de los principales focos de contaminación, así como para mejorar metodologías de trabajo ya existentes o implementar controles extraordinarios en los casos que se estimen.

SÉPTIMA:

Por parte de los organismos internacionales en este ámbito deberían de introducirse obligatoriamente, en el marco de los ejercicios de intercomparación de resultados entre Laboratorios, controles de contaminación residual, para estimar las problemáticas concretas de los Laboratorios. Con todos los resultados obtenidos, la Comunidad Forense debería de realizar estudios estadísticos que permitiesen tener una valoración probabilística del grado de afectación de los resultados emitidos debido a esta contaminación residual.

OCTAVA:

Introducción de los perfiles genéticos de referencia, así como de las muestras de background, en las bases de datos de ADN en calidad de Staff técnico, al objeto de poder discriminar contaminaciones que no pudieran ser detectadas en ninguna de las fases previas.

NOVENA:

Incluir en los Informes Periciales de resultados de ADN y en las declaraciones ante los Tribunales de Justicia los datos obtenidos sobre la contaminación residual de los asuntos juzgados, para su valoración por parte de la Justicia al igual que el resto de elementos de prueba.

DÉCIMA:

A modo de recomendación futura y a medida que los *kits* de amplificación sean más sensibles, es previsible que se detecte con mayor intensidad la presencia de *background* de ADN, por lo que deberían de desarrollarse módulos específicos en los programas informáticos de valoración estadística de resultados para la consideración de estos datos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bagshawe, KD 1993. Tumor Markers. *British Journal of Cancer* 48: 167-175.
- Balthazard, V 1945. *Manual de Medicina Legal*. Editorial Salvat. 6ª edición, Barcelona, España.
- Beaumont KA, Shekar SN, Cook AL, Duffy DL & Sturm RA 2008. Red hair is the null phenotype of MC1R. *Human Mutation* 29: E88–E94.
- Benschop C, Haned H, de Blaeij TJ, Meulenbroek AJ & Sijen T 2012. Assessment of mock cases involving complex low template DNA mixtures: A descriptive study. *Forensic Science International Genetics* 6: 697–707.
- Benschop C, Haned H & Sijen T 2013. Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures. *International Journal of Legal Medicine* 127: 11–23.
- Breathnach M, Williams L, McKenna L & Moore E 2016. Probability of detection of DNA deposited by habitual wearer and/or the second individual who touched the garment. *Forensic Science International Genetics* 20: 53-60.
- Buckingham AK, Harvey ML & van Oorschot RA 2008. The origin of unknown source DNA from touched objects. *Forensic Science International Genetics* 25: 26-33.
- Buckleton J, Bright JA & Walsh SJ 2009. Short Communication Database crime to crime match rate calculation. *Forensic Science International Genetics* 3: 200-201.
- Buckleton J & Curran JA 2008. A discussion of the merits of random man not excluded and likelihood ratios. *Forensic Science International Genetics* 2: 343-348.
- Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttmann JC & McClure DL 2009. Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. *Journal of Forensic Sciences* 54: 810-821.
- Butler JM 2001. Commonly used short tandem repeat markers, Biology of STRs: stutter products, non-template additio, microvariants, null alleles and mutation rates, additional DNA markers: amelogenin, Y-chromosome STRs, mtDNA, SNPs, Alu repeats. En: Butler JM (ed), *Forensic DNA typing*, Academic Press, San Diego, USA.
- Butler JM, Coble MD, Cotton RW, Heidebrecht BJ & Word CJ 2013. *DNA Analyst Training on Mixture Interpretation*. National Institute of Standards and

Technology (NIST). URL: <http://www.nist.gov/oles/forensics/dna-analyst-training-on-mixtureinterpretation.cfm>

Calabuig JA 1983. Medicina Legal y Toxicológica. Publicaciones Médicas y Científicas, Valencia.

Calabuig JA 2004. Medicina Legal y Toxicología. Editorial Masson. 6ª Edición. Barcelona.

Cale CM, Earll ME, Latham KE & Bush GL 2015. Could Secondary DNA Transfer Falsely Place Someone at the Scene of a Crime? Journal of Forensic Sciences 61: 196-203.

Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Jguyen PN & Caskey CT 1988. Delection screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Research 16: 11141 - 11156.

Clayton TM, Whitaker JP, Sparkes R & Gill P 1998. Analysis and Interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. Forensic Science International 91: 55-70.

Codes of Practice and Conduct for Forensic Science Providers and Practitioners in the Criminal Justice System 2015. Forensic Science Regulator. London: Home Office.

Cook O & Dixon L 2007. The prevalence of mixed DNA profiles in fingernail samples taken from individuals in the general population. Forensic Science International Genetics 1: 62-68.

De Georgey A 1990. The Advent of DNA Databanks: Implications for Information Privacy. American Journal of Law and Medicine 16: 383-392.

Decisión Marco 2009/905/JAI del Consejo de Europa de 30 de noviembre de 2009, sobre sobre acreditación de prestadores de servicios forenses que llevan a cabo actividades de laboratorio. Diario Oficial de la Unión Europea 9/12/2009.

Dowlman EA, Martin NC, Foy MJ, Lochner T & Neocleous T 2010. The prevalence of mixed DNA profiles on fingernail swabs. Science Justice 50: 64-71.

Dror IE & Hampikian G 2011. Subjectivity and bias in forensic DNA mixture interpretation. Science & Justice 51: 204-208.

EA-ENFSI 2008. Guidance for the implementation of ISO/IEC 17020 in the field of crime scene investigation. EA-5/03.

- ENSFI QCC 2003. Standing Committee for Quality and Competence. Guidance on the Production of Best Practice Manuals within. Standing Committee for Quality and Competence.
- ENSFI QCC 2004. Standing Committee for Quality and Competence. Performance Based Standards for Forensic Science Practitioners, Standing Committee for Quality and Competence.
- ENSFI 2011. Standing Committee for Quality and Competence. Guidance on the Assessment of Competence for Forensic Practitioners. Standing Committee for Quality and Competence.
- ENFSI 2012. Scenes of Crime Working Group. Scenes of Crime Examination Best Practice Manual Diciembre.
- Eiberg H, Troelsen J, Nielsen M, Mikkelsen A, Mengel-From J, Kjaer KW & Hansen L 2008. Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. *Human Genetics* 123: 177–187.
- Etxeberría Guridi JF 2001. Reflexiones acerca del Borrador de Anteproyecto de la Ley Reguladora de las Bases de ADN. *Revista de Derecho y Genoma Humano* 14: 60.
- European Crime Scene Management Projeet 2000. Manual, produced as part of the European Crime Scene Management Project Good Practice, UK.
- FBI Testimony on Microscopic Hair Analysis Contained Errors in at Least 90 Percent of Cases in Ongoing Review 2015. The FBI Federal Bureau of Investigation National Press Release, <https://www.fbi.gov/news/pressrel/press-releases/fbi-testimony-on-microscopic-hair-analysis-contained-errors-in-at-least-90-percent-of-cases-in-ongoing-review>.
- Fonneløp AE, Egeland T & Gill P 2015. Secondary and subsequent DNA transfer during criminal investigation. *Forensic Science International Genetics* 17: 155-162.
- Fonneløp AE, Johannessen H, Egeland T & Gill P 2016. Contamination during criminal investigation: detecting police contamination and secondary DNA transfer from evidence bags. *Forensic Science International Genetics* 23: 121-129.

- The Forensic Science Regulator annual report 2014 - 2015; <https://www.gov.uk/government/publications/forensic-science-regulator-annual-report-2015>
- Forensic Science Regulator 2017. Codes of Practice and Conduct - Protocol: DNA contamination detection - the management and use of staff elimination DNA databases. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/355995/DNAcontaminationDetection.pdf. (accessed 20.5.2017).
- Frudakis T, Thomas M, Gaskin Z, Venkateswarlu K, Chandra KS, Ginjupalli S, Gunturi S, Natrajan S, Ponnuswamy VK & Ponnuswamy KN 2003. Sequences associated with human iris pigmentation. *Genetics* 165: 2071–2083.
- GEP-ISFG 2000. Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética. Grupo Español Portugués de la Sociedad Internacional Genética Forense Madeira 2/06/2000. <http://www.gep-isfg.org/es/publicaciones/guias-recomendaciones-ghep-isfg.html>.
- GEP-ISFG 2007. Recomendaciones para la recogida y remisión de muestras con fines de identificación genética en grandes catástrofes. Grupo Español Portugués de la Sociedad Internacional Genética Forense, 20/07/07. <http://www.gep-isfg.org/es/publicaciones/guias-recomendaciones-ghep-isfg.html>.
- Gill P 2001. Application of low copy number DNA profiling. *Croatian Medical Journal* 42: 229-32.
- Gill P 2001. An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine* April 2001, Volume 114: Tissue 4-5, pp: 204–210.
- Gill P 2014. *Misleading DNA Evidence: Reasons for Miscarriages of Justice*, Elsevier, London, FBI Testimony on.
- Gill P 2016. Analysis and implications of the miscarriages of justice of Amanda Knox and Raffaele Sollecito. *Forensic Science International Genetics* 23: 9-18.
- Gill P, Fereday L, Morling N, Schenider P (2006 b) New multiplexes for Europe - Amendments and clarification of strategic development. *Forensic Science International*, doi: 10.1016/j.forsciint.2005.11.025.
- Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM & Weir BS 2006. DNA commission of the International

- Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International* 160: 90–101.
- Gill P, Brown RM, Fairley M, Lee L, Smyth M, Simpson N, Irwin B, Dunlop J, Greenhalgh M, Way K, Westacott EJ, Ferguson SJ, Ford LV, Clayton T, Guinness J; Technical UK DNA working group 2008a. DNA working group on mixture interpretation for the NDNAD and for court going purposes. *Forensic Science International* 2: 76-82.
- Gill P, Curran J, Neumann C, Kirkham A, Clayton T, Whitaker J & Lambert J 2008b. Interpretation of complex DNA profiles using empirical models and a method to measure their robustness. *Forensic Science International* 2: 91–103.
- Gill P, Gusmão L, Haned H, Mayr WR, Morling N, Parson W, Prieto L, Prinz M, Schneider H, Schneider PM & Weir BS 2012. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. *Forensic Science International Genetics* 6: 679–688.
- Gill P & Haned H 2013. A new methodological framework to interpret complex DNA profiles using likelihood ratios. *Forensic Science International Genetics* 7: 251-263.
- Gill P, Jeffreys AJ & Werret DJ 1985. Forensics applications of DNA fingerprints. *Nature* 318: 577-579.
- Gill P, Kimpton CP, Urquhart A, Oldroyd N, Millican ES, Watson SK & Downes TJ 1995. Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework - a strategy for the future. *Electrophoresis*, 16: 1543-1552.
- Gill P, Puch-Solis R & Curran J 2009. The low-template-DNA (stochastic) threshold- its determination relative to risk analysis for national DNA databases. *Forensic Science International Genetics* 3: 104–111.
- Gill P, Rowlands D, Tully GG, Bastisch I, Staples T & Scott P 2010. Manufacturer contamination of disposable plastic – ware and other reagents – an agreed position statement by ENFSI, SWGDAM and BSAG. *Forensic Science International Genetics* 4: 269-270.
- Gill P & Werret DJ 1987. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Science International* 35: 145-148.

- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N & Bucleton J 2001. An investigation of rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Science International* 112: 17-40.
- Goray M, Eken E, Mitchell RJ & van Oorschot RA 2010a. Investigation of secondary DNA transfer of skin cells under controlled test conditions. *Legal Medicine* 12: 117-120.
- Goray M, Eken E, Mitchell RJ & van Oorschot RA 2010b. Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions. *Forensic Science International Genetics* 4: 62-67.
- Han J, Kraft P, Nan H, Guo Q, Chen C, Qureshi A, Hankinson SE, Hu FB, Duffy DL, Zhao ZZ, Martin NG, Montgomery GW, Hayward NK, Thomas G, Hoover RN, Chanock S & Hunter DJ 2008. A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet* 4(5):e1000074.
- Haned H, Egeland T, Pontier D, Pene D & Gill P 2011. Estimating drop-out probabilities in forensic DNA samples: a simulation approach to evaluate different models, . *Forensic Science International Genetics* 5: 525–531.
- Haned H, Slooten K & Gill P 2012. Exploratory data analysis for the interpretation of low template DNA mixtures. *Forensic Science International Genetics* 6: 762–774.
- Hauge XY & Litt M 1993. A study of the origin of "shadow bands" seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Human Molecular Genetics* 2: 411-415.
- Helmus J, Bajanowski T & Poetsch M 2016. DNA transfer-a never ending story. A study on scenarios involving a second person as carrier. *International Journal of Legal Medicine* 130: 121-125.
- Hirschfeld L & Hirschfeld H 1919. Serological differences between the blood of different races. The result of researches on the Macedonian front. *Lancet* ii: 675-679.
- Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M, Schmidt L, Cordier A & Dirnhofer R 1999. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *Journal for Sciences* 44: 597-602.

- Hochmeister M, Rudin O, Borer UV, Kratzer A, Gehrig C & Dirnhofer R 1997. Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane test for the forensic identification of semen fluid. *Journal for Sciences* 44: 1057-1060.
- Hombreiro L 2015. Predicción de rasgos físicos, médicos, conductuales y de origen biogeográfico. *Gen-T* septiembre 2015: 109-118.
- Hombreiro L 2014. La Base de Datos Nacional de Perfiles Genéticos: Regulación, funcionamiento y operatividad. *Boletín Gallego de Medicina Legal y Forense* nº 20 (enero 2014): 33-41.
- Home Office 1988. DNA Profiling in immigration casework. Report of a pilot trial by the Home Office and Foreign and Commonwealth Office. 1988, *Home Office, London*.
- Hunter P 2010. Anything you touch may be used against you. *Embo Reports* 11: 424-427.
- Instrucción de la Dirección Adjunta Operativa de la Dirección General de la Policía de 14 de junio de 2016 sobre normas básicas de actuación ante la comisión de delitos violentos.
- ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ISO/IEC 17020: 2012. Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection. NB this is to be replaced by 17020:2012.
- ISO/IEC 18385: 2016. Minimizing the risk of human DNA contamination in products used to collect, store and analyze biological material for forensic purposes: Requirements.
- Jeffreys AJ, Brookfield JFY & Smeoneff R 1985. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 818- 819.
- Jeffreys AJ & Pena SDJ 1993. Brief introduction to human DNA fingerprinting. En: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ (eds) *DNA fingerprinting. State of Science*. Birkhäuser Verlag, Basel. Pp: 1-20.
- Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ, Dixon ME, Ricker CE, Seielstad MT & Batzer MA 2000. The distribution of human genetic diversity: A comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. *American Journal of Human Genetics* 66: 979–988.

- Kamphausen T, BirgitFandel S, Gutmann JS, Bajanowski T & Poetsch M 2015. Everything clean? Transfer of DNA traces between textiles in the washtub. *International Journal of Legal Medicine* 29: 709-714.
- Kanetsky PA, Swoyer J, Panossian S, Holmes R, Guerry D & Rebbeck TR 2002. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *American Journal of Human Genetics* 70: 770–775
- Köchel S, Niederstätter H & Parson W 2005. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. In: forensic DNA typing protocols. *Methods in Molecular Biology* Vol. 297. Edited by Angel Carracedo. Human Press. Pp: 13-29.
- Kuriyama M, Wang MC, Lee CL, Papsidero LD, Killian CS, Inaj H, Slack NH, Nishiura T, Murphy GP & Chu TM 1981. Use of human prostate specific antigen in monitoring cancer. *Cancer Research* 41: 3874-3876.
- Ladd C, Adamowicz MS, Bourke MT, Scherczinger CA & Lee HC 1999. A systematic analysis of secondary DNA transfer. *Journal of Forensic Sciences* 44: 1270-1272.
- Lapointe M, Rogic A, Bourgoïn S, Jolicoeur C & Séguin D 2015. Leading-edge forensic DNA analyses and the necessity of including crime scene investigators, police officers and technicians in a DNA elimination database. *Forensic Science International Genetics* 19: 50-55.
- Law Officer 2008. Using DNA to Solve Cold Cases 2008. Modern forensics can aid your investigation, Fri, Jul 11.
- Leemans P, Vandeput A, Vanderheyden N, Cassiman J-J & Decorte R 2016. Evaluation of methodology for the isolation and analysis of LCN-DNA before and after dactyloscopic enhancement of fingerprints. *International Congress Series* 1288: 583-585.
- Ley Orgánica 15/2003, de 25 de noviembre, por la que se modifica la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. BOE núm. 283, de 26 de noviembre de 2003, pp: 41842-41875.
- Ley Orgánica 10/2007 de 8 de octubre reguladora de la base de datos policial sobre identificadores obtenidos a partir del ADN. Boletín Oficial del Estado de 9 de octubre de 2007

- Liedtke RL & Batjer JD 1984. Measurement of prostate specific antigen by radioimmunoassay. *Clinical Chemistry* 30: 649-652.
- Liu F, van der Lijn F, Schurmann C, Zhu G, Chakravarty MM, Hysi PG, Wollstein A, Lao O, de Bruijne M, Ikram MA, van der Lugt A, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Hofman A, Niessen WJ, Homuth G, de Zuberay G, McMahon KL, Thompson PM, Daboul A, Puls R, Hegenscheid K, Bevan L, Pausova Z, Medland SE, Montgomery GW, Wright MJ, Wickiing C, Boehringer S, Spector TD, Paus T, Martin NG, Biffar R & Kayser M 2012. A genome-wide association study identifies five loci influencing facial morphology in Europeans. *PLoS Genet* 8: e1002932.
- Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens AC & Kayser M 2009. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Current Biology* 19: R192–193.
- Liu F, Wollstein A, Hysi PG, Ankra-Badu GA, Spector TD, Park D, Zhu G, Larsson M, Duffy DL, Montgomery GW, Mackey DA, Walsh S, Lao O, Hofman A, Rivadeneira F, Vingerling JR, Uitterlinden AG, Martin NG, Hammond CJ & Kayser M 2010. Digital quantification of human eye color highlights genetic association of three new loci. *PLoS Genet* 6: e1000934.
- Locard E 1930. The analysis of dust traces. Part I. *The American Journal of Police Science* 1: 276-298.
- Lorente Acosta, JA 2009. Identificación genética criminal: importancia médico legal de las bases de datos de ADN. en ROMEO CASABONA, C.M. (Dir.): Bases de datos de perfiles de ADN y criminalidad, ob.cit.,p. 5.
- Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G & Gill P 2002. The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Science International* 129: 25-34.
- Mapes AA, Kloosterman AD & de Poot CJ 2015. DNA in the Criminal Justice System: The DNA Success Story in Perspective. *Journal of Forensic Sciences* 60: 851-856.
- Marqués Negredo ML, Álvarez-Maldonado Paramés T, Villa Rodríguez L, García Tejerina R, Sanz Zamarro M & Coca Menchero S 2016. Perfiles genéticos en muestras de orina en identificación sanitaria militar. *Sanidad Militar* 68: 79-86.
- Meakin G & Jamieson A 2013. DNA transfer: review and implications for casework. *Forensic Science International Genetics* 7:434-443.

- Medland SE, Nyholt DR, Painter JN, McEvoy BP, McRae AF, Zhu G, Gordon SD, Ferreira MA, Wright MJ, Henders AK, Campbell MJ, Duffy DL, Hansell NK, Macgregor S, Slutske WS, Heath AC, Montgomery GW & Martin NG 2009. Common variants in the trichohyalin gene are associated with straight hair in Europeans. *American Journal of Human Genetics* 85: 750–755.
- Meulenbroek AJ, Sijen T, Benschop CCG & Kloosterman AD 2011. A practical model to explain results of comparative DNA testing in court. *Forensic Science International Genetics Supplement Series 3*: e325–e326.
- Mitchell AA, Tamariz J, O'Connell K, Ducasse N, Prinz M & Caragine T 2011. Likelihood ratio statistics for DNA mixtures allowing for drop-out and drop-in. *Forensic Science International Genetics Supplement Series 3*: e240–e241.
- Morling N, Bastisch I, Gill P & Schneider MP 2007. Interpretation of DNA mixtures—European consensus on principles. *Forensic Science International Genetics Supplement Series 1*: 291–292.
- Mullis KB & Faloona FA 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Norén L, Hedell R, Ansell R and Hedman J 2013. Purification of crime scene DNA extracts using centrifugal filter devices. *Investigative Genetics* 4: 8.
- Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. BOE 19/05/2010.
- Pascali V & Prinz M 2012. Highlights of the conference 'The hidden side of DNA profiles: artifacts, errors and uncertain evidence', *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 6*: 775–777.
- Paternoster L, Zhurov AI, Toma AM, Kemp JP, St Pourcain B, Timpson NJ, McMahon G, McArdle W, Ring SM, Smith GD, Richmond S & Evans DM 2012. Genome-wide association study of three-dimensional facial morphology identifies a variant in PAX3 associated with nation position. *American Journal of Human Genetics* 90: 478–485.
- Phillips C, Kind S, Fernandez-Formoso L, Gelabert-Besada M, Carracedo A, Lareu MV 2013. Global population variability in Promega PowerPlex CS7, D6S1043, and Penta B STRs. *International Journal of Legal Medicine* 127: 901-906.

- Phipps M & Petricevic SF 2006. The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Science International* 168: 162-168.
- Pickrahn I, Kreindl G, Muller E, Dunkelmann B, Zahrer W, Cemper-Kiesslich J & Neuhuber F 2017. Contamination incidents in the pre-analytical phase of forensic DNA analysis in Austria - Statistics of 17 years. *Forensic Science International: Genetics* 31: 12-18.
- Poy AL & Van Oorschot RAH 2006. Trace DNA presence, origin and transfer within a forensic biology laboratory and its potential effect on casework. *Journal of Forensic Identification* 56: 558-576.
- Prinz M, Schiffner L, Sebestyén JA, Bajda E, Tamariz J, Shaler RC, Baum H & Caragine T 2006. Maximization of STR DNA typing success for touched objects. *International Congress Series* 1288: 651 – 653.
- Proff C, Schmitt C, Schneider PM, Foerster G & Rothschild MA 2006. Experiments on the DNA contamination risk via latent fingerprint brushes. *International Congress Series* 1288: 601-603.
- Protocolo del fabricante BiogateLabs® One Step PSA Rapid Test for detection of human prostate specific antigen (PSA) in Human Serum, Plasma.
- Protocolo del fabricante BLUESTAR® Verification Report for HEXAGON OBTI (Test for confirming the presence of human blood traces).
- Puch-Solis R, Kirkham AJ, Gill P, Read J, Watson S & Drew D 2011. Practical determination of the low template DNA threshold. *Forensic Science International Genetics*. 5: 422-427.
- Raymond JJ, van Oorschot RA, Gunn PR, Walsh SJ & Roux C 2009. New South Wales Police Forensic Services Group. University of Technology, Sydney. Trace Evidence Characteristics of DNA: A Preliminary Investigation of the Persistence of DNA at Crime Scenes. *Forensic Science International: Genetics* 4: 26-33.
- Raymond JJ, Walsh SJ, Van Oorschot RA, Gunn P, Evans L & Roux C 2007. Assessing trace DNA evidence from a residential burglary: Abundance, transfer and persistence. In: 22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics; Copenhagen, Denmark.
- Raymond JJ, Walsh SJ, Van Oorschot RA, Gunn P & Roux C 2004. Trace DNA: An underutilised resource or Pandora's box? A Review of the use of Trace DNA

Analysis in the Investigation of Volume Crime. *Journal of Forensic Identification* 54: 668-686.

Raymond JJ, Walsh SJ, van Oorschot RAH, Gunn PR, Evans L & Roux C 2008. Assessing trace DNA evidence from a residential burglary: abundance, transfer and persistence. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1: 442- 443.

Real Decreto 1977/2008, de 28 de noviembre, por el que se regula la composición y funciones de la Comisión Nacional para el uso forense del ADN. *Boletín Oficial del Estado* de 11 de diciembre de 2008.

Real Decreto 32/2009, de 16 de enero, por el que se aprueba el Protocolo nacional de actuación Médico forense y de Policía Científica en sucesos con víctimas múltiples. *BOE* 06/02/2009

Real decreto de 14 de septiembre de 1882 por el que se aprueba la Ley de Enjuiciamiento Criminal. *BOE* núm. 260, de 17/09/1882, con entrada en vigor el 03/01/1883.

Recomendación 92, 1992. Recomendación del Comité de Ministros del Consejo de Europa a los Estados Miembros, sobre la utilización del análisis de ácido desoxirribonucleico (ADN) dentro del marco de la Administración de Justicia Penal.

Roland A.H. van Oorschot, Genna Glavich, R. John Mitchell. Persistence of DNA deposited by the original user on objects after subsequent use by a second person. *Forensic Science International: Genetics*, January 2014, Vol. 8, Issue 1, p210 - 225.

Rudin N & Inman K 2002. Biological evidence as trace evidence: the forensic science of DNA typing. *CAC News* 4th Qtr: 19–21.

Rutty GN 2000. Human DNA contamination of mortuaries: does it matter? *The Journal of Pathology* 190: 410-411.

Rutty GN 2002. An investigation into the transfer and survivability of human DNA following simulated manual strangulation with consideration of the problem of third party contamination. *International Journal of Legal Medicine* 116: 170-173.

Rutty GN, Hopwood A & Tucker V 2003. The effectiveness of protective clothing in the reduction of potential DNA contamination of the scene crime. *International Journal of Legal Medicine* 117: 170-174.

- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis, T 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory manual* Vol. 1, 2, y 3, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A & Morling N 2006. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 27: 1713–1724.
- Schneider PM, Fimmers R, Keil W, Molsberger G, Patzelt D, Pflug W, Rothämel T, Schmitter H, Schneider H & Brinkman B 2009. The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. *International Journal of Legal Medicine* 123: 1–5.
- Schneider PM & Martin PD 2001. Criminal DNA databases: the European situation, *Forensic Science International* 119: 232-238
- Schuller W, Fareday L & Scheithauer R 2001. *Manual de INTERPOL sobre el intercambio y la utilización de datos relativos al ADN - Recomendaciones del grupo de expertos en ADN de INTERPOL*. OIPC-INTERPOL (ed.), Lyon, France.
- Schumm JW, Lins AM, Micka KA, Sprecher CJ, Rabbach DR & Bacher JW 1997. Automated fluorescent detection of STR multiplexes - Development of the GenePrint™ PowerPlex™ and FFFL multiplexes for forensic and paternity applications. *Proceedings from the first European Symposium on human identification 1996*. Toulouse: Promega; 90-104.
- Schwark T, Poetsch M, Preusse-Prange A, Kamphausen T, von Wurmb-Schwark N 2012. Phantoms in the mortuary – DNA transfer during autopsies. *Forensic Science International: Genetics* 216: 121-126.
- Stringer P, Scheffer JW, Scott P, Lee J, Goetz R, Ientile V, Eckhoff C, Turbett G, Carroll D & Harbison A 2009. Interpretation of DNA mixtures—Australian and New Zealand consensus on principles. *Forensic Science International: Genetics* 3: 144-145.
- Sturm RA, Duffy DL, Zhao ZZ, Leite FP, Stark MS, Hayward NK, Martin NG & Montgomery GW 2008. A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue- brown eye color. *American Journal of Human Genetics* 82: 424–431.
- Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, Manolescu A, Karason A, Palsson A, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Steinberg

- S, Palsson S, Jonasson F, Sigurgeirsson B, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Benediktsdottir KR, Aben KK, Kiemeny LA, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U & Stefansson K 2007. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics* 39: 1443–1452.
- Sullivan K, Johnson P, Rowlands D & Allen H 2004. New developments and challenges in the use of the UK database: addressing the issue of contaminated consumables. *Forensic Science International* 146 (suppl): S175 – S176.
- Sweet DJ & Hildebrand D 1999. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report. *International Journal of Legal Medicine* 112: 201-203.
- Sweet D, Lorente M, Lorente J, Valenzuela A & Villaneuva E 1997. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of Forensic Sciences* 42: 320–322.
- Syanen AC 2001. Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews* 2: 930-942.
- Taroni F & Aitken CG 1998. Probabilistic reasoning in the law. Part 2: Assessment of probabilities and explanation of the value of trace evidence other than DNA. *Science and Justice* 38: 179-188.
- Time Magazine Online. Germany's Phantom Serial Killer: A DNA Blunder, 2009 <http://www.time.com/time/world/article/0,8599,1888126,00.html>
- Toothman MH, Kester KM, Champagne J, Cruz TD, Street WS & Brown BL 2008. Characterisation of human DNA in environmental samples. *Forensic Sciences International* 178: 7-15.
- Tvedebrink T, Eriksen PS, Asplund M, Mogensen HS & Morling N 2012. Allelic dropout probabilities estimated by logistic regression—further considerations and practical implementation, *Forensic Sciences International: Genetics* 6: 263–267.
- Valenzuela RK, Henderson MS, Walsh MH, Garrison NA, Kelch JT, Cohen- Barak O, Erickson DT, Meaney JF, Walsh BJ, Cheng KC, Ito S, Wakamatsu K, Frudakis T, Thomas M & Brilliant MH 2010. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *Journal of Forensic Sciences* 55: 315–322.
- Van Oorschot RAH & Jones MK 1997. DNA Fingerprints from fingerprints. *Nature* 387: 767.
- Van Oorschot RAH, Ballantyne KN & Mitchell RJ 2010. Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics* 1: 14.

- Van Oorschot RAH, Phelan DG, Furlong S, Scarfo GM, Holding NL & Cummins MJ 2003. Are you collecting all the available DNA from touched objects? International Congress Series, Progress in Forensic Genetics 9: 803–807.
- Van Oorschot RAH, Treadwell S, Beaurepaire J, Holding NL & Mitchell RJ 2005. Beware of the possibility of fingerprinting techniques transferring DNA. Journal of Forensic Sciences 50: 1417-1422.
- Verdon TJ, Mitchell RJ & van Oorschot RAH 2013. The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency, Forensic Science International: Genetics 7: 167-175.
- Walsh PS, Fildes NJ & Reynolds R 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. Nucleotide Acids Research 24: 2807.
- Watson JD & Crick HC 1953. Molecular structure of nucleic acids. A structure of deoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737-738.
- Westen AA, Grol LJW, Hartevelde J, Matai AS, de Knijff P & Sijen T 2012. Assessment of the stochastic threshold, back- and forward stutter filters and low template techniques for NGM. Forensic Science International: Genetics 6: 708-715.
- Wickensheiser RA 2002. Trace DNA: A review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. Journal of Forensic Sciences 47: 442-450.
- Wiegand P, Heimbold C, Klein R, Immel U, Stiller D & Klintschar M 2011. Transfer of biological stains from different surfaces. International Journal of Legal Medicine 125: 727-731.
- Wiegand P, Schürenkamp M & Schütte U 1992. DNA extraction from mixtures of body fluid using preferential lysis. International Journal of Legal Medicine 104: 359-360.
- Word CJ 2010. Peak Height Ratios. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>

8. LISTADO DE TAMPONES

20X SSC: 3M Cloruro sódico + 0.3M Citrato Trisódico dihidratado

1 x TE: Tris/HCl 1M pH 8 + EDTA 0,5M

Buffer de extracción 1: Tris 0,01M + EDTA Na₂ 0,01M + NaCl 0,1M + 20% SDS pH 8.0

Buffer de extracción 2: Tris-HCl, pH 7.5 + EDTA 0.5M + NaCl 5M + SDS 20 %

Eritrosina amoniacal: 2 g de eritrosina en 100 ml de NH₃

9. LISTADO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

CNUFADN: Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN

CODIS: Combined DNA Index System

DTT: Ditiotreitól

EA-ENFSI: Standing Committee for Quality and Competence

ENAC: Entidad Nacional de Acreditación de España

ENFSI: European Network Forensic Science Institutes

ENFSI QCC: Standing Committee for Quality and Competence

FBI: Federal Bureau of Investigation de los Estados Unidos de América

F/CI/I: Fenol / cloroformo / alcohol isoamílico

OCN - INTERPOL: Oficina Central Nacional de Interpol

GEDNAP: European DNA Working Group

GHEP: Grupo de Habla Española y Portuguesa de la Sociedad Internacional de Genética Forense

GHEP-ISFG: Grupo de Habla Española y Portuguesa de la International Society for Forensic Genetics

ISFG: International Society of Forensic Genetics

LLDNA: Low Level DNA

LR: índice de verosimilitud o likelihood ratio

RMNE: Random Man Not Excluded o probabilidad de inclusión

RMP: Random Match Probability o probabilidad de coincidencia al azar

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms

STR: microsatélites o Short Tandem Repeats

SWGAM: Scientific Working Group on DNA Analysis Methods

VNTR: minisatélites o Variable Number of Tandem Repeats

10. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

8.1. LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: formación de un *stutter* (+) y su representación electroforética

Figura 2: formación de un *stutter* (-) y su representación electroforética

Figura 3: electroferograma con *pull - up*

Figura 4: electroferograma de adenilación incompleta "*pico N+1*"

Figura 5: secuencia de trabajo en la práctica forense

Figura 6: ciclo de amplificación

Figura 7: electroferograma de varón agresor en pareja A

Figura 8: electroferograma de mujer víctima en pareja A

Figura 9: electroferograma de frotis de restos biológicos sobre epitelio del brazo de mujer víctima en pareja A (tiempo: 60 minutos)

Figura 10: electroferograma de varón agresor en pareja B

Figura 11: electroferograma de mujer víctima en pareja B

Figura 12: electroferograma de frotis de restos biológicos sobre epitelio del brazo de mujer víctima en pareja B (tiempo: 60 minutos), amplificada con el *kit AmpFISTR® Identifiler Plus™*

Figura 13: electroferograma de frotis de restos biológicos sobre epitelio del brazo de mujer víctima en pareja B (60 minutos), amplificada con el *Kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Figura 14: electroferograma del autor condenado por el delito

Figura 15: electroferograma de la víctima del delito

Figura 16: electroferograma de la fracción haploide masculina, obtenida por lisis diferencial de la muestra vaginal

Figura 17: electroferograma del frotis de restos biológicos tomado sobre el muslo derecho de la víctima

Figura 18: electroferograma del frotis vaginal de la víctima

Figura 19: arma, munición y cargador utilizados en el estudio A.2.1 y A.2.2

Figura 20: electroferograma del frotis sobre la superficie del proyectil 3

Figura 21: electroferograma A del frotis sobre la superficie de la vaina 2

Figura 22: electroferograma B del frotis sobre la superficie de la vaina 2

- Figura 23:** electroferograma A del frotis sobre la superficie de la vaina 5
- Figura 24:** electroferograma B del frotis sobre la superficie de la vaina 5
- Figura 25:** electroferograma parcial del frotis bucal indubitado del donante A
- Figura 26:** electroferograma de la colilla de cigarrillo A. Estudio A.3.1
- Figura 27:** electroferograma de la colilla del cigarro - puro B. Estudio A.3.1
- Figura 28:** fotografía de la muestra A (uña de pie humano) previa al proceso de maceración del PTA-4. Estudio A.3.2
- Figura 29:** electroferograma de STRs autosómicos de la muestra A. Estudio A.3.2
- Figura 30:** electroferograma de STRs de cromosoma Y de la muestra A. Estudio A.3.2
- Figura 31:** electroferograma de STRs autosómicos de la muestra B. Estudio A.3.2
- Figura 32:** diseño experimental del Estudio A.3.3
- Figura 33:** electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 1 A. Estudio A.3.3
- Figura 34:** electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 1 C. Estudio A.3.3
- Figura 35:** electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 3 A. Estudio A.3.3
- Figura 36:** electroferograma de STRs autosómicos de la muestra 4 B. Estudio A.3.3
- Figura 37:** imagen de la máquina de escribir utilizada en el estudio A.3.4
- Figura 38:** electroferograma 1 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4
- Figura 39:** electroferograma 2 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4
- Figura 40:** electroferograma 3 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4
- Figura 41:** electroferograma 4 de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4
- Figura 42:** detalle de drop out alélico en marcadores del electroferograma de la muestra Maq 1. Estudio A.3.4
- Figura 43:** electroferograma 1 de la muestra del guante derecho. Estudio A.3.5
- Figura 44:** electroferograma 2 de la muestra del guante derecho. Estudio A.3.5
- Figura 45:** electroferograma 1 de la muestra del guante izquierdo. Estudio A.3.5
- Figura 46:** electroferograma de la muestra de contaminación residual del Equipo Forense A
- Figura 47:** electroferograma de la muestra de contaminación residual del Equipo Forense C

Figura 48: electroferograma de la muestra de contaminación residual del Equipo Forense D

Figura 49.- drop out en la muestra de contaminación residual del Equipo Forense D

Figura 50: electroferograma de la muestra M8 de la metodología 1 del equipo forense A

Figura 51: electroferograma de la muestra M1 de la metodología 3 del equipo forense A

Figura 52: electroferograma de la muestra M6 de la metodología 3 del equipo forense A

Figura 53: electroferograma de la muestra M4 de la metodología 2 del equipo forense B

Figura 54: electroferograma de la muestra M8 de la metodología 3 del equipo forense B

Figura 55: electroferograma de la muestra M3 de la metodología 1 del equipo forense C

Figura 56: electroferograma de la muestra M5 de la metodología 1 del equipo forense C

Figura 57: electroferograma de la muestra M1 de la metodología 2 del equipo forense C

Figura 58: electroferograma de la muestra M6 de la metodología 2 del equipo forense C

Figura 59: electroferograma de la muestra M9 de la metodología 2 del equipo forense C

Figura 60: electroferograma de la muestra M8 de la metodología 3 del equipo forense D

Figura 61: electroferograma A de la muestra C-3 del Estudio C

Figura 62: electroferograma B de la muestra C-3 del Estudio C

Figura 63: electroferograma A de la muestra C-4 del Estudio C

Figura 64: electroferograma B de la muestra C-4 del Estudio C

Figura 65: electroferograma de la muestra C-5 del Estudio C

Figura 66: electroferograma A de la muestra C-6 del Estudio C

Figura 67: electroferograma de la muestra C-7 del Estudio C

Figura 68: electroferograma A de la muestra C-8 del Estudio C

Figura 69: electroferograma B de la muestra C-8 del Estudio C

Figura 70: electroferograma C de la muestra C-8 del Estudio C

Figura 71: electroferograma de la muestra C-14 del Estudio C

Figura 72: electroferograma A de la muestra C-15 del Estudio C

Figura 73: electroferograma B de la muestra C-15 del Estudio C

Figura 74: electroferograma C de la muestra C-15 del Estudio C

Figura 75: electroferograma A de la muestra C-16 del Estudio C

Figura 76: electroferograma B de la muestra C-16 del Estudio C

8.2. LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.- Reactivos utilizados en el PTA - 4

Tabla 2.- Marcadores, ladder alélico y fluorocromos

Tabla 3.- Programación del termociclador para el *Kit AmpFISTR® Yfiler™*

Tabla 4.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *Kit AmpFISTR® Yfiler™*

Tabla 5.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *Kit AmpFISTR® Yfiler™*

Tabla 6.- Datos del *Kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Tabla 7.- Programación del termociclador para el *kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Tabla 8.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Tabla 9.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® GlobalFiler™*

Tabla 10.- Datos del *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Tabla 11.- Programación del termociclador para el *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Tabla 12.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Tabla 13.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® NGM SElect™*

Tabla 14.- Datos del *Kit AmpFISTR® Identifiler Plus*

Tabla 15.- Programación del termociclador para el *Kit AmpFISTR® Identifiler Plus*

Tabla 16.- Preparación de la inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® Identifiler® Plus*

Tabla 17.- Protocolo de inyección en ABI 3130 para el *kit AmpFISTR® Identifiler® Plus*

Tabla 18.- Valores de cuantificación de ADN de las muestras del estudio A.1.1

Tabla 19.- Valores de cuantificación de ADN de las muestras del estudio A.1.2

Tabla 20.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.2.1

Tabla 21.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.2.2

Tabla 22.- Marcadores STR con posible cotejo positivo del donante A. Estudio A.2.2

Tabla 23.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.1

Tabla 24.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.2

Tabla 25.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.3

Tabla 26.- Perfiles genéticos de los donantes del estudio A.3.3 en los marcadores presentados

Tabla 27.- Perfil genético del donante del estudio A.3.4

Tabla 28.- Valores de cuantificación de ADN y genotipado de las muestras del estudio A.3.4

Tabla 29.- Composición de los equipos forenses del estudio B.

Tabla 30.- Matriz de muestras del estudio B.

Tabla 31.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense A.

Tabla 32.- Perfil genético de los STRs con resultado positivo del varón del equipo forense A

Tabla 33.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense B.

Tabla 34.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense C.

Tabla 35.- Perfil genético de los STRs con resultado positivo del varón del equipo forense C.

Tabla 36.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras del Equipo Forense D.

Tabla 37.- Perfil genético de los STRs con resultado positivo de la mujer del equipo forense D.

Tabla 38.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense A bajo la metodología de trabajo 1.

Tabla 39.- Perfil genético para los marcadores positivos del donante V1. Estudio B

Tabla 40.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense A bajo la metodología de trabajo 2.

Tabla 41.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense A bajo la metodología de trabajo 3.

Tabla 42.- Perfiles genéticos del donante V1 y del Varón del Equipo Forense A en los marcadores en los que se observan valores alélicos no esperados.

Tabla 43.- Perfil genético del donante V1 para los marcadores en estudio.

Tabla 44.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense B bajo la metodología de trabajo 1.

Tabla 45.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense B bajo la metodología de trabajo 2.

Tabla 46.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense B bajo la metodología de trabajo 3.

Tabla 47.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense C bajo la metodología de trabajo 1.

Tabla 48.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense C bajo la metodología de trabajo 2.

Tabla 49.- Perfil genético del varón donante 1 para los marcadores estudiados.

Tabla 50.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense C bajo la metodología de trabajo 3.

Tabla 51.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense D bajo la metodología de trabajo 1.

Tabla 52.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense D bajo la metodología de trabajo 2.

Tabla 53.- Valores de cuantificación y genotipado de las muestras matriz del Equipo Forense D bajo la metodología de trabajo 3.

Tabla 54.- Perfil genético del varón donante 1 para los marcadores estudiados.

