

X Jornadas de Genética Forense
Azores, 12-13 Setiembre de 2005

Organizado por:



**Instituto de Patologia e Imunologia Molecular
da Universidade do Porto**

Boletín informativo nº 9

GEP-ISFG

Diciembre 2005

INDICE

- 1. Resumen del Ejercicio de Polimorfismos de ADN del año 2005**
Julia García-Hirschfeld – Unidad Garantía Calidad, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Madrid (España)

- 2. Resultados muestra forense**
María José Farfán – Sección de Biología, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Sevilla (España)

- 3. Resultados paternidad práctica**
Juan Antonio Luque – Sección de Biología, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Barcelona (España)

- 4. Resultados paternidad teórica**
Gloria Vallejo – Sección de Biología, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Madrid (España)

- 5. Resultados STRs autosómicos**
Elena Rivas – Laboratorio Biología – ADN Comisaría General de Policía Científica, Madrid (España)

- 6. Resultados Cromosoma Y**
María Brión y Ángel Carracedo – Instituto de Medicina Legal, Santiago de Compostela (España)

- 7. Resultados ADN mitocondrial**
Antonio Alonso – Sección de Biología, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Madrid (España)

- 8. Grupos de Trabajo del GEP-ISFG**

Oscar García – Vice-Presidente y Coordinador de los Grupos de Trabajo del GEP-ISFG

9. Informe de Tesorería

Iñaki Yurrebaso – Tesorero del GEP-ISFG

10. Informe de Secretaría

Leonor Gusmão – Secretaria del GEP-ISFG

11. Acta de la Asamblea General

Leonor Gusmão – Secretaria del GEP-ISFG

**EJERCICIO DE COLABORACIÓN PARA LA COMPARACIÓN DE
RESULTADOS DE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE ADN EN MANCHAS
DE SANGRE Y OTROS INDICIOS BIOLÓGICOS**

Julia García-Hirschfeld

Coordinadora del Control de Calidad de Polimorfismos ADN del GEP-ISFG

Unidad de Garantía de Calidad

Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses

Madrid

España

Este ejercicio que se realiza como una de las actividades del Grupo Español y Portugués de la ISFG (GEP-ISFG) ha sido organizado y coordinado por la Unidad de Garantía de Calidad del Departamento de Madrid del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.

Hace 12 años que se inició la organización anual de este ejercicio y desde el año 2003 se ha dividido en dos partes:

- Una Prueba de Paternidad que consiste en un ejercicio práctico y un cálculo estadístico sobre una paternidad teórica
- Una Prueba Forense.

Solo los laboratorios que lo solicitan expresamente realizan esta última prueba preparándose, por tanto, dos tipos de envíos diferentes, en función de que el laboratorio realice o no ambos tipos de ejercicios.

1. Muestras remitidas

2005 / Ejercicio de Paternidad

M1: sangre de hijo

M2: sangre de madre

M3: sangre de presunto padre 1

M4: sangre de presunto padre 2

2005 / Ejercicio forense

M5: mancha forense

M6: 2 fragmentos de cabellos

contaminados

(sólo para mtDNA)

2. Planteamiento

2005 / Paternidad

- **Paternidad práctica:** Se trata de un supuesto de Investigación Biológica de la Paternidad con muestras biológicas obtenidas de dos presuntos padres, la madre biológica y un hijo, según el código especificado en el recuadro. **Nota:** los presuntos padres son hermanos biológicos completos (de padre y de madre). NO se duda de la madre.
 - ◆ ¿Puede M3 ser padre de M1?
 - ◆ ¿Puede M4 ser padre de M1?

- **Paternidad teórica:** En un proceso de filiación, de impugnación de paternidad y de determinación de filiación, el padre legal **P1** ha fallecido y solo es posible realizar el estudio genético en las muestras aportadas por el padre en litigio, **P2**, el hijo **H** y su madre biológica **M**.

Dados los resultados de la tabla que se adjunta, calcule:

- 1) El índice de Paternidad **IP** total y parcial de P2 respecto de H asumiendo que M es la madre de H.
- 2) El índice de Paternidad **IP** total y parcial de P2 respecto de H asumiendo que M **es** la madre de H, con la consideración de que P2 y P1 son hermanos entre sí.

	P 2	M	H	Tasa mutación paterna	Alelo paterno silente	Poder de exclusión
TH01	8	8	8			
TPOX	6,10	8,9	6,8			
CSF1PO	8,9	8,9	9			
D3S1358	13	14,15	13,15			
VWA	15,18	14,19	15,19			

FGA	18	18, 23	23	0.0029	0.0002	0.7253
D5S818	11,14	11	11			
D13S317	9,10	7,10	10			
D7S820	7,9	9	7,9			

2005 / Ejercicio Forense

El individuo M1 sufre una agresión. En el laboratorio se reciben las muestras M5 y M6:

- Una mancha en el pantalón vaquero (M5) que llevaba la víctima en el momento de los hechos.
- Dos fragmentos de pelos recogidos de la ropa (M6) de uno de los presuntos agresores.

Información adicional: Se sospecha de los individuos M3 y M4 como presuntos autores de la agresión.

- ¿Puede la mancha encontrada en el vaquero (M5) pertenecer a M1, a M3 o a M4?
- ¿Puede el pelo encontrado en la ropa del presunto agresor (M6) pertenecer a M1, a M3 o M4?

Información adicional: El análisis morfológico de los pelos revela que se trata de fragmentos de cabello sin raíz, no cotejable, que se encuentra contaminado presuntamente de sangre. Interesa conocer la procedencia del pelo.

3. Antecedentes

2005 / Ejercicio de Paternidad

- El individuo de la muestra M1 es un varón hijo de la donante de la muestra M2.
- El individuo de la muestra M1 es hijo del donante de la muestra M3.
- El individuo de la muestra M4, es hermano de padre y de madre del individuo M 3, se excluye como padre del individuo de la muestra M1.

2005 / Ejercicio Forense

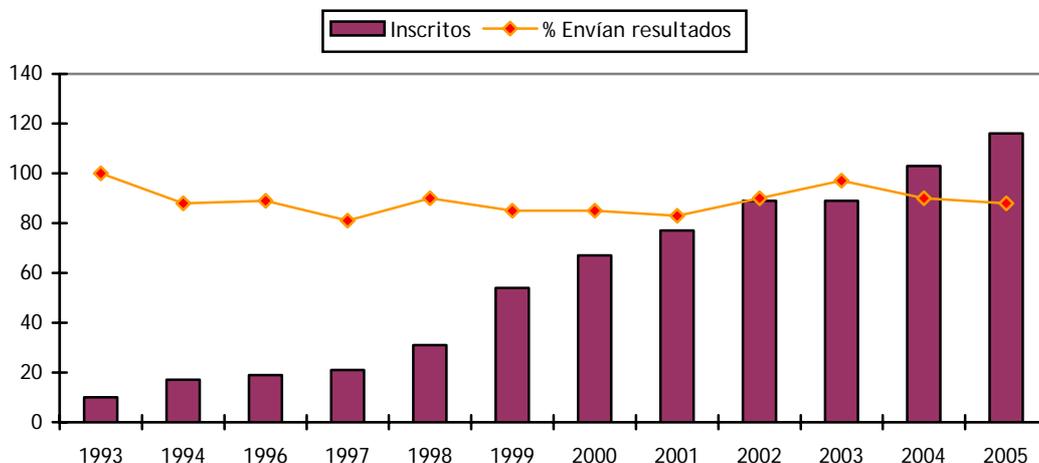
La muestra M5 consiste en 40 μ l de una mezcla de saliva del donante de la muestra M3 y sangre del donante de la muestra M4.

Se preparó una solución con 6 ml de sangre tomada a M4 y 2 ml de saliva recogida al donante de la muestra M3. Se agitó para homogeneizar y se aplicaron (40 μ l de esta mezcla) inmediatamente sobre unos recortes de tela vaquera previamente etiquetados.

La muestra M6 son cabellos recortados del donante de la muestra M1 contaminados con sangre del donante de la muestra M4.

4. Participación

El ejercicio lleva realizándose ya 12 años, a lo largo de los cuales se ha ido produciendo una incorporación constante de laboratorios de forma que cada año se incrementa el número de laboratorios inscritos (solicitan participar, son miembros del GEP-ISFG y se les envía muestra) así como el número de laboratorios que emite resultados, dado que ambos números no coinciden, en el presente ejercicio así como en años anteriores alrededor del 10 % de los laboratorios inscritos no remite resultados (ver gráfico).



En el Ejercicio 2005 estaban inscritos 116 laboratorios: 42 europeos (32 España, 8 Portugal, 1 Francia y 1 Suiza) y 74 americanos (19 Colombia, 19 Brasil, 18 Argentina, 5 Venezuela, 3 Ecuador y Uruguay, 2 Costa Rica, 1 Cuba, El Salvador, México, Perú y República Dominicana).

De estos laboratorios hay una distribución muy homogénea en cuanto al tipo de laboratorio que son, habiendo 55 laboratorios privados (mayoritariamente americanos, 41) mientras que 57 son públicos y 6 laboratorios no aportan esta información.

5. Resultados

De los 102 laboratorios que este año han enviado resultados, 100 de ellos participan con diferentes STRs, hasta un total de 80 sistemas. Hay 56 de estos laboratorios que analizan STRs de cromosoma Y. Los otros dos laboratorios, uno envía sólo datos de ADN mitocondrial y el otro exclusivamente datos de la paternidad teórica; 36 participan analizando ADN mitocondrial y 29 de ellos envían resultados correspondientes a la muestra de pelos.

64 laboratorios solicitan participar en la prueba forense y envían resultados un total de 56 laboratorios (87% de los que la reciben) habiendo especificado algún dato de los estudios preliminares realizados a las muestras forenses 30 de estos laboratorios.

De los 80 marcadores analizados por el conjunto de laboratorios, se obtiene consenso en 45 de ellos, el resto son sistemas generalmente analizados por uno o dos laboratorios (35 marcadores). Los sistemas más utilizados son los comprendidos en kits comerciales incluidos en Identifiler y PowerPlex 16 o en Y-plex.

La media del número de marcadores utilizados por laboratorio es de 22 ± 9 , con un máximo de 48 y un mínimo de 9 marcadores. Siendo mayoritaria la utilización de la Amelogenina como marcador de sexo, analizada en un total de 90 laboratorios; los marcadores utilizados por el mayor número de laboratorios,

98, han sido HUMTH01 y D16S539 como STRs autosómicos y los STRs de cromosoma Y más utilizados han sido DYS389 I, DYS390 y DYS393, con 56 laboratorios, igual al número total de laboratorios que utiliza este tipo de STRs.

Los marcadores en los que se ha obtenido consenso son los siguientes:

- FES/FPS, TH01, F13A01, VWA, TPOX, CSF1PO, FGA, F13B, LPL, ACTBP2(SE33), D1S1656, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, Penta D, Penta E (STRs autosómicos).
- DYS19, DYS385, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439 (GATA A4), GATA A10, DYS460 GATA A7.1, DYS 461 GATA A7.2, GATA C4 (DYS 635), GATA H4, DYS458, DYS456, DYS448 (STRs de cromosoma Y).
- Además de la Amelogenina y el HUMPRTB.

El nº de **laboratorios** con alguna discrepancia es de 30 para STRs, algunos son errores de transcripción, de menor relevancia, o ausencia de resultado en una o varias de las muestras para un marcador en el que aporta resultados para las muestras restantes. Si eliminamos estos tipos de errores o discrepancias quedan en sólo 15 laboratorios con discrepancias, uno de los cuales presenta estas discrepancias en 5 marcadores para más de una muestra. Hay 10 laboratorios que presentan discrepancia para un solo marcador en al menos una muestra.

El uso de STRs de cromosoma Y experimenta un constante crecimiento, aunque con menor número de marcadores totales (de los marcadores consensuados 19 frente a 24 autosómicos), siendo menor las discrepancias observadas en estos marcadores aunque no se debe olvidar que al ser este dato perteneciente a un haplotipo, un error puntual supone la adscripción a un haplotipo diferente, lo que constituye un error de mayor relevancia.

Además hay dos laboratorios que no presentando discordancia en los resultados de STRs presentan discrepancia solo en los resultados de ADN mitocondrial.

5.1. Resultados de la Muestra forense M5 (mancha en vaquero):

Realizan el estudio 56 laboratorios.

Ninguno detecta la presencia en la mezcla del componente minoritario, saliva perteneciente al individuo donante de la muestra M3. Todos los laboratorios detectan el componente mayoritario, sangre del donante de la muestra M4. Dado que estos individuos comparten línea materna y paterna, solo podía discriminarse la presencia de la mezcla en caso de obtener un resultado en STR autosómicos que evidenciara la presencia del componente minoritario.

Del total de laboratorios que dice realizar análisis preliminar en el estudio de la muestra forense, solo dos dicen haber hecho una prueba de detección de saliva, un laboratorio obtiene un resultado positivo y otro negativo. El resto de laboratorios confirma la existencia de sangre, algunos afirmando ser sangre humana.

Si bien estos resultados han de ser considerados como correctos pues están avalados por el 100% de los laboratorios, ponen en evidencia la dificultad que sigue representando en el análisis forense la mezcla de fluidos biológicos con contenido de ADN desequilibrado, como son la sangre y la saliva.

Hay varios laboratorios que indican que dado que los individuos donantes de M3 y M4 comparten tanto la línea materna como paterna, no se puede descartar la presencia de ambos en la muestra.

5.2. Resultados ADN Mitocondrial:

Un total de 36 laboratorios realizan estudios de ADN mitocondrial, 29 analizan la muestra de cabello (M6).

Un total de 29 laboratorios estudia el ADN Mitocondrial de la muestra forense (M5). Todos llegan a la conclusión correcta, a pesar de que un laboratorio tiene un resultado discordante en esta muestra, pero concluye correctamente, que la muestra pertenece a alguien relacionado matrilinealmente con los individuos donantes de M3 y M4, pero no a M1 o M2.

Número de laboratorios con resultados iguales a los consensuados

M1: 34 (de 35, 97%)

M2: 30 (de 31, 97%)

M3: 35 (de 36, 97%)

M4: 34 (de 35, 97%)

M5: 28 (de 29, 97%)

M6: 21 (de 29, 72%)

6. Conclusiones

6.1. Conclusiones paternidad práctica

Todos los laboratorios llegan a la conclusión correcta, es decir: No se puede excluir al donante de la muestra M3 como padre del menor donante de la muestra M 1, siendo la donante de la muestra M2 la madre. El presunto padre 2, donante de muestra M4, queda excluido como padre del menor por los siguientes marcadores: VWA, CSF1PO, D18S51, D2S1338, Penta E, F13A01, F13B y D12S391.

El donante de M4 se excluye por dichos marcadores en número variable según el total de marcadores analizados en cada laboratorio, habiendo laboratorios en los que se llega incluso a un número mayor de exclusiones (otros no consensuados CD4, MBPB y D18S970 por ser analizados en un bajo número de participantes). De 99 laboratorios que han contestado a la pregunta realizada sobre si los individuos de M3 o M4 pueden ser el padre biológico de M2, dan la contestación correcta 98 laboratorios (99%).

Hay sin embargo 1 laboratorio que llega a conclusión errónea, este laboratorio comenta tener problemas en su secuenciador y no haber conseguido datos de análisis fiable pero responde a la pregunta y de manera incorrecta. Un laboratorio dice excluir la paternidad de M4 sobre M1 por HUMPRTB.

Varios laboratorios ratifican la relación por vía materna entre los donantes de las muestras M1 y M2, basándose en los datos de STR autosómicos así como por análisis de ADN mitocondrial, aunque otros laboratorios, excluyen el estudio de ADN mitocondrial de la muestra perteneciente a la madre (M2) por considerarlo innecesario, puesto que se indica la existencia del vínculo madre-hijo en el planteamiento del supuesto.

Todos los laboratorios que analizan STRs de cromosoma Y confirman la relación patrilineal de los tres individuos del planteamiento propuesto: M1, M3 y M4 comparten el mismo haplotipo de STRs de cromosoma Y.

6.2. Conclusión muestra forense: mezcla

Ninguno de los laboratorios participantes detecta la presencia de la mezcla, avalados por los resultados obtenidos con los diferentes sistemas estudiados. Dado que en la composición de la mancha había muestra de dos individuos relacionados tanto patrilineal como matrilinealmente, solo podría haberse detectado en el análisis genético de STR autosómicos, pero la cantidad de ADN presente en los fluidos mezclados estaba tan desequilibrada que no ha sido posible ser detectada por ninguno de los laboratorios que la han analizado.

En los supuestos planteados en este Ejercicio, solo un valor de consenso (aportado por un 70 % de los laboratorios que emiten resultados, siempre que el 30 % restante no coincida en otro valor) establece qué resultado es el correcto; por ello, no se puede concluir que el supuesto forense haya sido mal resuelto por los laboratorios, sino que como consecuencia del desequilibrado contenido en ADN que poseen los fluidos elegidos, aún habiendo mezcla esta pasa desapercibida por los análisis.

6.3. Conclusión pelos:

A la pregunta de si el pelo encontrado en la ropa del presunto agresor (M6) pertenece a M1, a M3 o M4, contestan 29 laboratorios. 21 de ellos concluyen de forma correcta que no se puede excluir que el cabello pertenezca al donante de M1 o alguien relacionado matrilinealmente, y excluyen que pueda pertenecer a M3 y M4.

Respecto a esta muestra es interesante destacar que lo realmente significativo es el tratamiento previo a la extracción de ADN dando lugar a diferente tipo de resultado, de forma que resulta más probable obtener un haplotipo mezcla cuando se realiza una lisis total de la muestra enviada, mientras que si dicha muestra es lavada previamente a la extracción del ADN o se realiza una lisis diferencial se obtiene dos haplotipos separados (correspondientes a los dos contribuyentes a la muestra: M1 y M4).

6.4. Conclusión Paternidad teórica

Se daba como base de datos de referencia la del INT de Madrid, con el fin de unificar los resultados, no obstante el conjunto de datos es muy disperso. En el primer supuesto, participan 96 laboratorios y si bien existe un valor común de índice de paternidad parcial en muchos laboratorios para la mayoría de los marcadores, en el caso del marcador FGA (en el que se da la presencia de un alelo silente o una mutación) no se produce esta homogeneidad en los resultados. Como consecuencia, el Índice de Paternidad global presenta una gran dispersión.

En el segundo supuesto planteado (ver planteamiento en la primera página), participan menos laboratorios (n= 90) la interpretación de la pregunta planteada ha sido muy variada, aplicándose un gran número de fórmulas para la resolución de la paternidad, con lo que la dispersión en los resultados aportados se presenta no solo en el Índice de Paternidad global sino también en los Índices de Paternidad parciales para cada uno de los marcadores indicados.

Ver comentarios sobre este apartado en la presentación de Gloria Vallejo.

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA MUESTRA FORENSE EN EL
EJERCICIO COLABORATIVO GEP-ISFG 2005**

María José Farfán

Sección de Biología

Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses

Sevilla

España

De los 116 laboratorios inscritos en el ejercicio de este año, solo 65 (55 %) han recibido las muestras correspondientes al ejercicio forense. De éstos, 56 laboratorios (88 %) han emitido resultados para la muestra M5. El planteamiento del ejercicio forense fue el siguiente:

El individuo M1 sufre una agresión. Se sospecha de los individuos M3 y M4 como presuntos autores de la agresión. En el laboratorio se reciben las muestras M5 y M6:

- *M5: una mancha en el pantalón vaquero que llevaba la víctima en el momento de los hechos.*
- *M6: dos fragmentos de pelos recogidos de la ropa de uno de los presuntos agresores.*

Interesa saber:

- *¿Puede la mancha encontrada en el vaquero (M5) pertenecer a M1, a M3 o a M4?*
- *¿Puede el pelo encontrado en la ropa del presunto agresor (M6) pertenecer a M1, M3 o M4?*

En este apartado nos referiremos sólo a los resultados emitidos para la muestra forense M5, que consiste en 40 µl de una mezcla de saliva del donante de la muestra M3 y sangre del donante de la muestra M4. Para obtener esta muestra se preparó una solución con 6 ml de sangre tomada a M4 y 2 ml de saliva recogida al donante de la muestra M3. Se agitó para homogeneizar y se

aplicaron 40 µl de esta mezcla inmediatamente sobre los recortes previamente etiquetados de tela vaquera.

De los 56 laboratorios que emiten resultados para esta muestra, sólo 24 (43 %) realizan pruebas preliminares para determinar la naturaleza de la mancha (ver Tabla 1) investigando todos ellos la presencia de sangre con resultado positivo. No obstante, de ellos sólo 10 investigan también la posible presencia de semen, todos con resultado negativo, y únicamente 4 laboratorios investigan la presencia de saliva, obteniendo 2 de ellos un resultado negativo y los otros 2 laboratorios un resultado positivo. Sin embargo, sólo 1 laboratorio informa que la muestra M5 consiste en una mancha de sangre y saliva (ver Tabla 2).

Tabla 1. Distribución de los laboratorios según el tipo de fluido biológico investigado

Realizan pruebas para investigación de	Nº labs
Sólo sangre	14
Sangre y semen	6
Sangre, semen y saliva	4
Total	24

Tabla 2. Resultados emitidos en cuanto a la naturaleza de la muestra M5 en el apartado “Metodología para la investigación de la muestra M5”

	Nº labs
Sangre y saliva	1
Sangre	25*
Apariencia hemática	1
No especifican	3
No responden	26
Total	56

* 2 labs no hacen pruebas preliminares, pero contestan: "Sangre en tela" y "Mancha de sangre. Es visible a simple vista y deja residuo de hemoglobina en el agua de lavado".

Para reseñar la importancia de la realización de pruebas preliminares encaminadas a determinar la naturaleza de las manchas analizadas en muestras procedentes de la casuística forense, mencionaremos algunas citas bibliográficas:

- *“Los caracteres macroscópicos de las manchas de sangre son insuficientes para diferenciarlas de falsas manchas que tienen la misma apariencia [...]. Es, pues, necesario someterlas a reacciones de identificación [...]”*. C. Simonin, “Medicina Legal Judicial” (1955).
- *“As stated, all red or brownish stains are not blood. The first task of the laboratory is to verify or exclude the hematologic origin of the stain, and a number of highly sensitive presumptive tests exist than can detect minute traces.”* G.T. Duncan y M.L. Tracey, "Introduction to Forensic Sciences", Ed. W.G. Eckert (1980).
- *“The identification of blood is the first and most important step in the examination of a suspected stain. Unless we are certain that a questioned stain is, in fact, a bloodstain, any further analysis will be meaningless.”* H.C. Lee "Forensic Science Handbook", Ed. R. Saferstein (1982).
- *“A menudo, el aspecto de una mancha es muy demostrativo de que está formada por sangre; otras veces su apariencia es menos clara. Tanto en un caso como en otro, la prueba de convicción debe ser confirmada en su naturaleza para que tenga valor.”* E. Villanueva, Medicina Legal y Toxicología, 6.^a ed. Gisbert Calabuig (2004).

En la Tabla 3 se relacionan las distintas técnicas utilizadas para la investigación de restos de sangre y los resultados obtenidos por los 24 laboratorios mencionados, en la Tabla 4 el equivalente para la investigación de restos de semen y en la Tabla 5 para saliva.

Tabla 3. Técnicas utilizadas para la investigación de restos de sangre en la muestra M5 y número de laboratorios que las usan. Resultado en todos los casos: **positivo**

Pruebas de orientación	19	Pruebas de certeza	6	Pruebas de especie	13
COLORIMETRÍA		CRISTALOGRAFÍA		INMUNOLOGÍA	
Bencidina (test de Adler)	9	Clorhidrato de hematina (Teichman)	4	Inmunocromatografía (Obti, Aba Card...)	7
Fenoltaleína (Kastle-Meyer)	4	Hemocromógeno (Takayama)	1	Test inhibición antiglobulina humana	3
Piramidón (Thevenon y Roland)	2			Inmunodifusión (Ouchterlony)	1
Verde leucomalaquita (Medinger)	1	MICROSCOPIA Y LUZ UV	1	Inmunoelectroforesis	1
Peroxtesmo	2			No especifican ("Inmunodetección")	1
No especifican ("Test de peroxidasa")	1				
QUIMIOLUMINISCENCIA					
Luminol	2				

Tabla 4. Distribución de los laboratorios según el tipo de pruebas realizadas para la investigación de restos de semen. Resultado en todos los casos: **negativo**

Investigación de restos de semen	Nº labs
Sólo fosfatasa ácida	2
Fosfatasa ácida + antígeno específico próstata	1
Fosf. ácida + antígeno específico próstata + microscopía	3
Solo antígeno específico próstata	2

Antígeno específico próstata + microscopía	2
Total	10

Tabla 5. Distribución de los laboratorios según el tipo de pruebas realizadas para la investigación de restos de saliva

Investigación de restos de saliva	Nº labs	Resultado
Amilasa	1	positivo
Amilasa	1	negativo
Amilasa y observación microscópica (células epiteliales)	1	positivo
Observación microscópica (células epiteliales)	1	negativo
Total	4	2 positivo 2 negativo

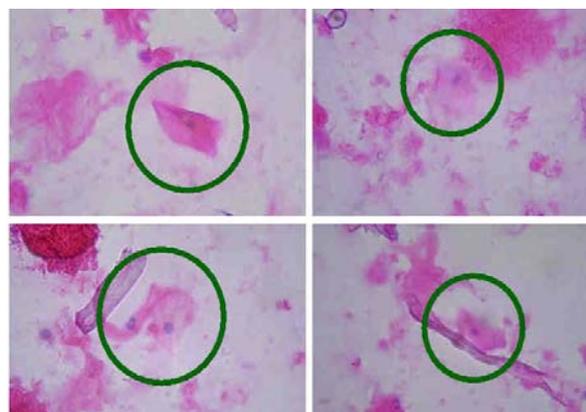
De los 4 laboratorios que investigaron la presencia de saliva, sólo dos detectaron su presencia en la muestra. En la Figura 1 se muestran dos imágenes, proporcionadas por el único laboratorio que contestó que la muestra M5 consistía en una mancha de sangre y saliva, en las que se observan resultados positivos en la muestra M5 tanto para amilasa (test Phadebas®) como para observación microscópica de células epiteliales.

Figura 1. Resultados positivos para la investigación de saliva en la muestra M5

a) Test de amilasa

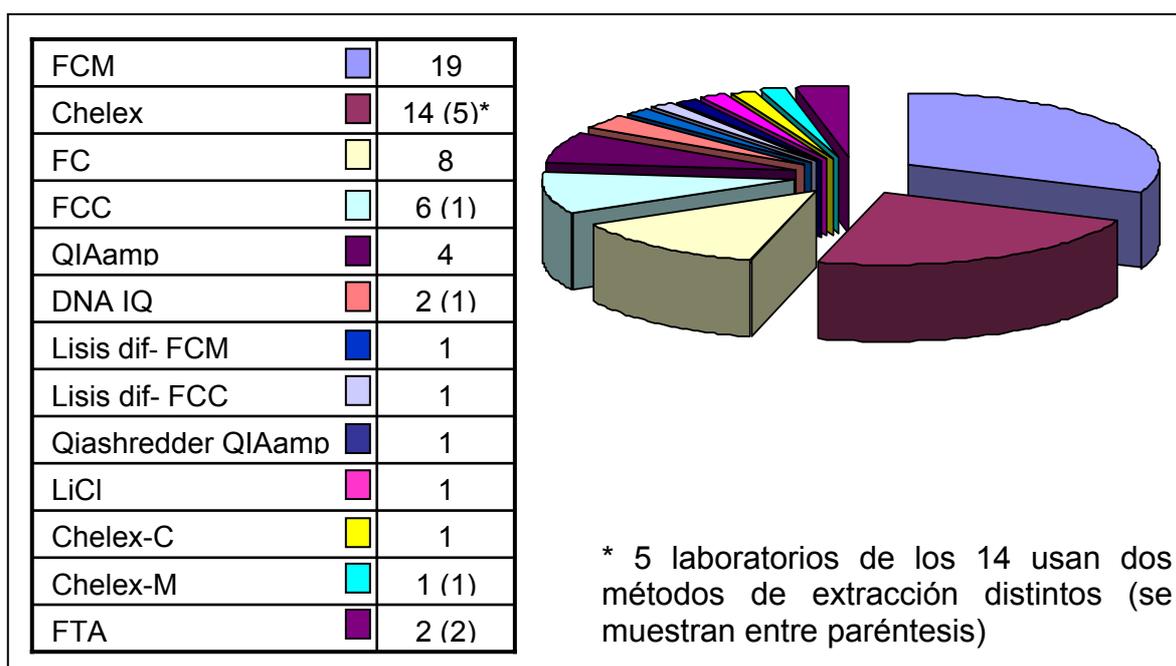


b) Visualización células epiteliales



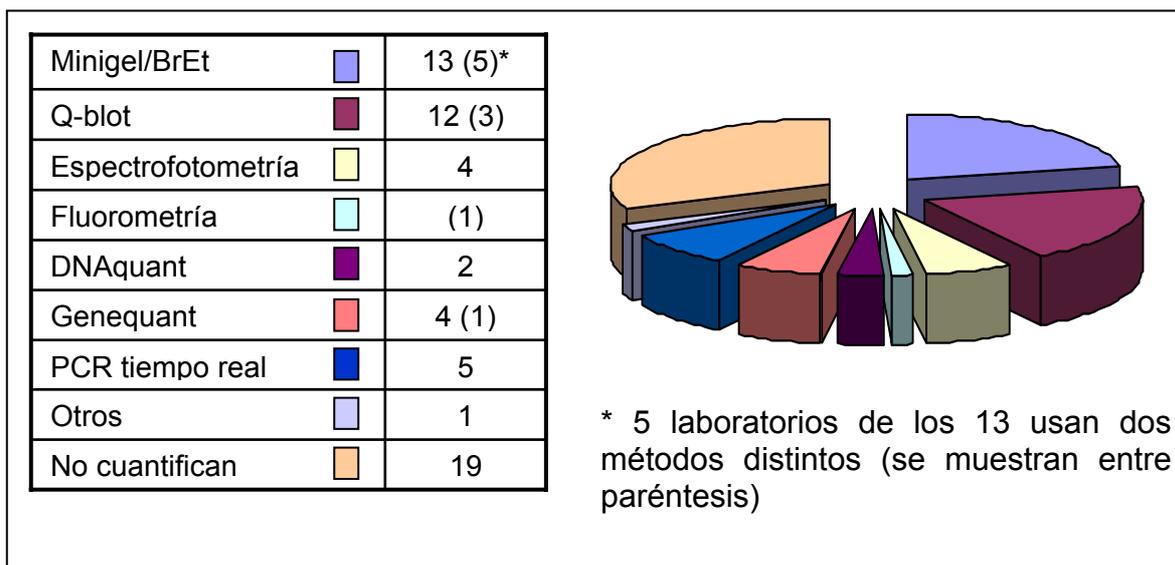
En cuanto a la extracción de ADN a partir de la muestra M5, la mayoría de los laboratorios utilizaron el método estándar de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, en muchos casos seguido de un paso de purificación/concentración en unidades Microcon[®] o Centricon[®] (Millipore Corp.). En la Figura 2 se muestra la distribución de laboratorios según el método de extracción de ADN empleado.

Figura 2. Métodos de extracción de ADN empleados



Respecto a los métodos utilizados para la cuantificación de ADN (ver Figura 3), 13 laboratorios informan del uso de minigel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, si bien esta técnica permite más una valoración cualitativa de la calidad y cantidad del ADN extraído que su cuantificación. La técnica de cuantificación propiamente dicha más utilizada fue la hibridación mediante *slot blot* con una sonda específica de ADN humano (Quantiblot[®]). Es llamativo que un tercio de los laboratorios no cuantifican el ADN antes de proceder a su amplificación.

Figura 3. Métodos de cuantificación de ADN empleados



En el ejercicio de este año se han obtenido en general muy buenos resultados para los STRs autosómicos. Como se disponía de los electroferogramas o copias de los geles, ha sido posible determinar en la mayoría de los casos el origen de las discrepancias detectadas. En la muestra forense se han detectado sólo 3 discrepancias en marcadores autosómicos: una deriva del uso de patrones alélicos de baja calidad (laboratorio 140298, Penta E: analizado en un equipo ALF con patrones alélicos propios), otra está causada por un error en la asignación alélica (laboratorio 140293, LPL: analizado mediante marcaje radiactivo con el monoplex de Promega) y una tercera que en principio puede parecer debida a un error de transcripción (el laboratorio 140276 informa 11,10 para CSF1PO [consenso 10,11]: analizado en un equipo ABI 3720 con el kit Identifier). No obstante, en este último caso se observa que el laboratorio aporta dos electroferogramas distintos para esta muestra y sorprendentemente con resultados diferentes, al menos para los sistemas marcados con FAM (azul), no correspondiendo los resultados informados a uno de ellos sino a una mezcla de ambos. Es decir, en uno de los electroferogramas se detectan para tres marcadores los alelos del resultado consenso y para el marcador D7S820 sólo el alelo 12 (consenso 11,12), sin embargo en el otro electroferograma, sí se detectan los alelos 11,12 para este marcador (de hecho, es lo que informa el

laboratorio), pero para los otros 3 marcadores sólo se detecta uno de los dos alelos del resultado consenso. En este sentido es conveniente reseñar de cara a futuros ejercicios la importancia de proporcionar sólo aquellos electroferogramas que se consideren significativos dando cuenta de cualquier posible observación que se considere de interés para el análisis e interpretación de los resultados informados.

A la pregunta **¿Puede la mancha encontrada en el vaquero (M5) pertenecer a M1, a M3 o a M4?** todos los laboratorios responde de forma unánime NO a M1 y M3 y SÍ a M4, excepto el laboratorio 140247 que contesta SÍ a M3, cuando si bien es verdad que los haplotipos de ADN mitocondrial de M5 y M3 coinciden, los perfiles genéticos de STRs autosómicos son diferentes.

En cuanto al apartado **Conclusiones y observaciones Muestra M5**, la mayoría de los laboratorios contestan con una frase del tipo:

		<i>es coincidente con</i>	
<i>El perfil genético/de ADN/alélico</i>		<i>es compatible con</i>	
<i>El genotipo</i>	<i>de M5</i>	<i>es idéntico a</i>	<i>M4.</i>
<i>El patrón genético</i>		<i>corresponde con</i>	
		<i>es el mismo que</i>	

Sin embargo, hay 5 laboratorios que responden “*La muestra M5 pertenece al individuo M4*”, un laboratorio contesta “*El donante de M5 es el mismo que el donante de M4*” y el más arriesgado responde: “*El perfil de la muestra M5 es idéntico, por tanto, compatible al obtenido en la muestra M4. Si la víctima del caso (M1) portaba el vaquero con mancha cuyo perfil genético corresponde a M4, entonces, **M4 está relacionado con el hecho criminal***”.

Hay 32 laboratorios de los 56 (62%) que hacen una valoración estadística de los resultados obtenidos, si bien cabe destacar que algunos laboratorios calculan una probabilidad *a posteriori* sin definir la probabilidad *a priori* y otros expresan erróneamente el significado de la razón de máxima verosimilitud (ej. lab 140265: “*Es x veces más probable que M5 pertenezca a M4 a que pertenezca a cualquier otro individuo al azar de la población*”, en vez de p. ej. “*La coincidencia de perfiles es x veces más probable si la evidencia proviene de M4, que si proviene de otro individuo cualquiera de la población*” [lab 140258]).

En resumen, podríamos terminar con las siguientes conclusiones:

- Menos de la mitad (24/56) de los laboratorios realizan análisis preliminares para determinar la naturaleza de la mancha. Sólo 4 laboratorios investigan la presencia de saliva.
- Sólo 1 laboratorio informa que la muestra M5 consiste en una mancha de sangre y saliva.
- Ningún laboratorio ha detectado mezcla en el análisis de STRs autosómicos (ver Anexo).
- Se ha detectado un número mínimo de discrepancias en todos los marcadores analizados.
- Se han observado algunas deficiencias en la valoración estadística de los resultados y en su expresión.

ANEXO

¿Por qué no se ha detectado la mezcla en el análisis de STRs autosómicos?

En un intento de explicar por qué ningún laboratorio ha detectado la mezcla de perfiles de STRs autosómicos, se recurrió a una simulación teórica de la situación.

Como mencionamos anteriormente la muestra M5 consiste en una mezcla de saliva y sangre de los donantes M3 y M4 en una proporción 1:3, respectivamente. Si consideramos un rendimiento de 1-10 μg ADN/mL de saliva y 20-40 μg ADN/mL de sangre, según refieren Lee & Ladd [1] para los fluidos líquidos, tras la extracción de ADN obtendríamos 10-100 ng de ADN de la saliva y 600-1200 ng de ADN de la sangre (considerando que se hiciera a partir de la totalidad de la mancha; para porciones de la mancha los resultados absolutos serían menores pero en cualquier caso la proporción entre ambos no variaría). Obviamente, hay muchas variables que intervienen en el rendimiento de la extracción de ADN de forma que no todos los métodos de extracción tienen el mismo rendimiento ni tampoco todos los laboratorios, aun usando el mismo método. En la tabla se refleja la proporción teórica de ADN procedente de saliva y sangre que obtendríamos en distintas situaciones en las que se considera un rendimiento mínimo, medio o máximo para cada uno de los dos fluidos.

Rendimiento saliva / sangre	ADN de saliva (ng)	ADN de sangre (ng)	Proporción ADN saliva / sangre
Mín / Mín	10	600	1:60
Mín / Máx	10	1200	1:120
Máx / Mín	100	600	1:6
Máx / Máx	100	1200	1:12
Medio / Medio	55	900	1:16

Considerando que en el análisis de STRs autosómicos, una mezcla de ADN se detecta cuando la proporción entre ambos componentes no es inferior a 1:20 [2, 3], tendríamos que en las dos situaciones planteadas en que el rendimiento de ADN extraído a partir de la saliva fuera mínimo, no sería posible detectar la mezcla (ver Tabla). No obstante, algunos autores sugieren que la proporción mínima detectable entre ambos componentes es 1:10 [3, 4, 5]; en ese caso sólo podría haberse detectado la mezcla en una situación de rendimiento máximo para la saliva y mínimo para la sangre.

Hay que tener en cuenta que muchos de los estudios de validación de STRs en cuanto a la detección de mezclas se han realizado generando artificialmente mezclas en distintas proporciones a partir de los extractos de ADN. Cuando se analizan muestras obtenidas mediante la mezcla de fluidos corporales, se ha observado que para una mezcla de saliva:sangre (como es el caso que nos ocupa) el perfil de la saliva se detecta cuando ambos fluidos se mezclan en una proporción de hasta 1:10 en volumen [5] por lo que teniendo en cuenta que la muestra M5 es una mezcla de saliva y sangre en una proporción 1:3, *a priori* hubiera sido esperable su detección. No obstante, otros autores han descrito que la detección del componente minoritario en una mezcla de sangre y saliva tiene su límite en una proporción 1:2 [6]; en este caso la muestra M5 estaría fuera del rango de detección.

Este planteamiento teórico se vio apoyado por una aproximación práctica llevada a cabo en el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses de Madrid en la que mediante PCR a tiempo real se cuantificó el ADN de distintos extractos obtenidos a partir de 100 µl de saliva del donante M3 o de 50 µl de sangre del donante M4, obteniéndose un rendimiento medio de 0,6 µg ADN/mL de saliva y 39µg ADN/mL de sangre. Estos valores equivalen a un rendimiento teórico mínimo a partir de la saliva y máximo para la sangre, siendo la proporción aproximada entre ambos componentes de 1:200, lo cual podría explicar por qué ningún laboratorio detectó la mezcla.

Bibliografía

- [1] H.C. Lee and C. Ladd (2001) *Preservation and collection of biological evidence*. Croatian Medical Journal 42:225-228
- [2] R.W. Cotton (1995) *DNA Analysis and maintaining focus in an extraordinary case*. Proceedings from the Sixth International Symposium on Human Identification, Madison, Wisconsin; Promega Corporation pp.112-115
- [3] T.R. Moretti, A.L. Baumstark, D.A. Defenbaugh, K.M. Keys, J.B. Smerick and B. Budowle (2001) *Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis*

of authentic and simulated forensic samples. Journal of Forensic Sciences 46:647-660

[4] Applied Biosystems (1998) *AmpFISTR Profiler Plus PCR Amplification Kit User's Manual.* Foster City, California

[5] C.L. Holt, M. Buoncristiani, J.M. Wallin, T. Nguyen, K.D. Lazaruk and P.S. Walsh (2002) *TWGDAM validation of AmpFISTR™ PCR amplification kits for forensic DNA casework.* Journal of Forensic Sciences 47:66-96

[6] E.N. Levedakou et al. (2002) Characterization and validation studies of powerPlex 2.1, a nine-locus short tandem repeat (STR) multiplex system and penta D monoplex. Journal of Forensic Sciences 47:757-772

EJERCICIO DE PATERNIDAD PRACTICA GEP-ISFG 2005

Juan Antonio Luque

Sección de Biología

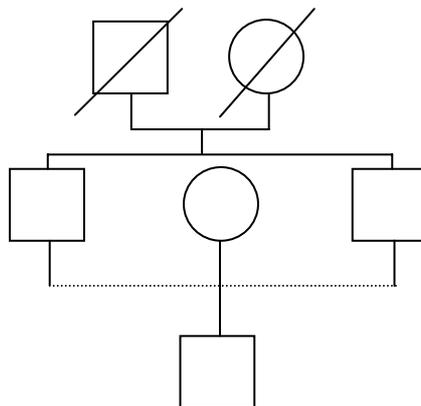
Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses

Barcelona

España

El ejercicio de este año consistía en cuatro muestras de sangre (sobre papel de filtro) de un hijo (M1), su madre indubitada (M2) y dos presuntos padres (M3 y M4). Se hace constancia en el formulario del ejercicio que M3 y M4 son hermanos biológicos completos (de padre y madre). Esta circunstancia, a priori supone una dificultad añadida, puesto que cabe esperar que un hermano del presunto padre biológico comparta más alelos con éste que si se tratara de un individuo al azar de la población, y por tanto la probabilidad de exclusión a priori disminuye considerablemente.

El esquema genético sería el siguiente:



Se pide indicar si el individuo M3 puede ser padre de M1 y si M4 puede ser padre de M1. El número y tipo de marcadores a usar se dejó a la discreción del laboratorio. Al igual que los últimos años, no se piden los resultados de los cálculos, ya que al ser las frecuencias y el número de marcadores diferentes, las comparaciones no se podían realizar adecuadamente, dejando ese aspecto para el ejercicio teórico en el que el número de marcadores y frecuencias son

los mismos para todos los participantes. Por último se pedía elaborar unas conclusiones.

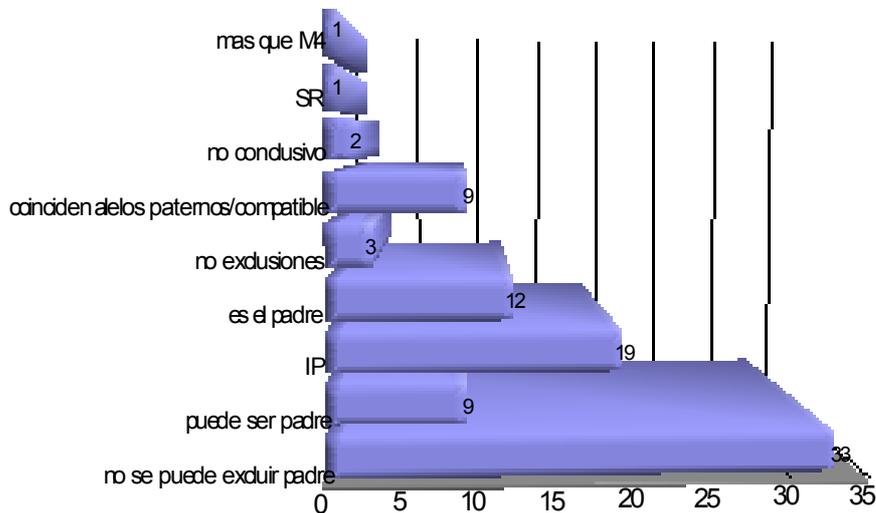
De los 116 participantes, 100 emiten resultados de marcadores de ADN nuclear autosómico. y de estos, 56 realizan además marcadores de cromosoma Y y 4 de cromosoma X. Noventa y nueve (99) laboratorios responden a la paternidad práctica. Sólo hay un laboratorio que emite los resultados erróneos, y que indica que ha tenido problemas con el secuenciador (de hecho, no tiene resultados completos, pero curiosamente, los que tiene no permiten excluir a ninguno de los presuntos padres, por lo que pensamos que puede tratarse de un error a la hora de rellenar el formulario). La tasa de error por tanto que tenemos es del **1,01%**. Siendo unos resultados aparentemente muy buenos aunque como veremos más adelante no son tan homogéneos en cuanto a los detalles. Curiosamente, incluso laboratorios con errores en los resultados de los marcadores, llegan a la conclusión correcta porque no afectan.

En las dos siguientes gráficas podemos ver las conclusiones emitidas por los laboratorios. Respecto a la muestra M3 podemos ver que los laboratorios son variados en cuanto a la forma de emitir sus conclusiones. El mayor grupo indica que no se puede excluir el padre (33), que puede ser el padre (9), o incluso afirman que es el padre(12). Otro grupo indica no la paternidad sino una comparación genética: coinciden los alelos paternos o es compatible o indican que no hay exclusiones, pero no valoran la paternidad como concepto, sino solamente el hecho biológico. Otro amplio grupo (19) únicamente expresa las conclusiones con el IP sin dar más explicación, es decir se limitan a dar el resultado del cálculo. Dos laboratorios indicaron que no era conclusivo, uno que no tuvo resultados y por último hubo un laboratorio que indicó que el M3 era más probable que el M4.

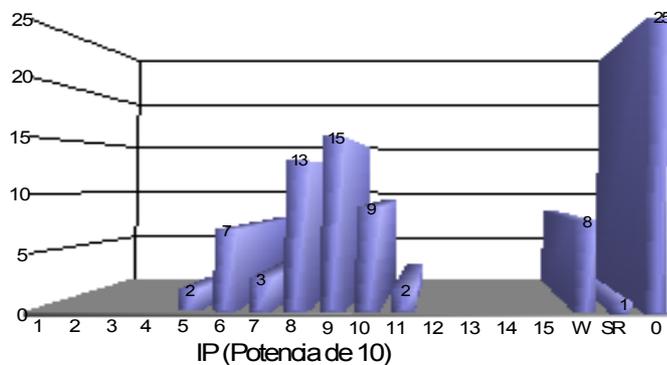
Aunque no se pedía, hubo varios que indicaron el resultado del cálculo, la mayoría en forma de IP (8 laboratorios indicaron la probabilidad de paternidad) con un rango entre 10^5 y 10^{11} variando principalmente debido al diferente número de marcadores utilizado y ligeramente por usar frecuencias diferentes.

La mayoría se agrupa en torno al valor de 10^9 que es el valor esperado para los kits de 15 marcadores (10^8 para los 13 marcadores del CODIS).

M3



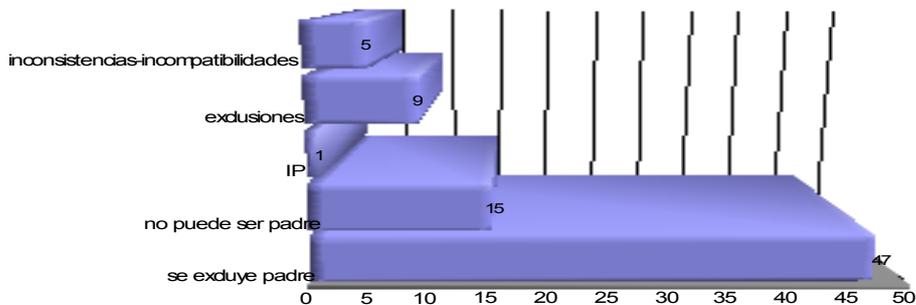
IP



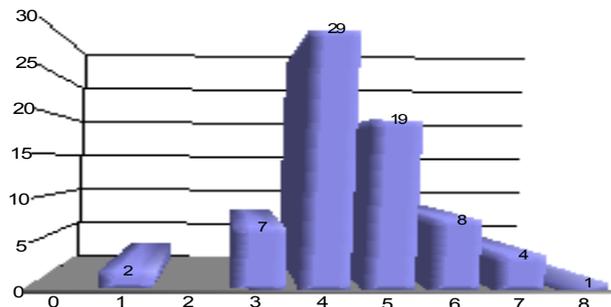
Respecto a la muestra M4 que presentaba varias incompatibilidades, la mayoría indicaron que se excluía el padre (47) o que no podía ser el padre (15). Al igual que antes algunos laboratorios sólo valoraron la comparación genética indicando las exclusiones ocurridas (9) o usando el término más correcto inconsistencias o incompatibilidades (5). Un laboratorio prefirió no establecer un punto absoluto en cuanto a la exclusión e indicó el resultado en forma de IP, obviamente menor que 1.

El número de incompatibilidades varió desde 1 hasta 8. La mayoría de los laboratorios encuentran 4 que aparecen si se usan los kits de 15 marcadores (3 para los 13 marcadores del CODIS). Hay 2 laboratorios que sólo encuentran una incompatibilidad, uno de ellos indica que tiene problemas y no obtiene resultados en todos los marcadores; el otro tan solo usa 9 marcadores usando una batería de marcadores insuficiente incluso para un caso normal, debiendo ampliar el número demarcadores si no quieren encontrarse desagradables sorpresas especialmente cuando no se dispone de madre. Curiosamente hay laboratorios también con 9 marcadores que tienen más incompatibilidades, incluso uno que con 8 marcadores consigue 5 incompatibilidades.

M4



Número de incompatibilidades



EJERCICIO DE PATERNIDAD TEORICA GEP-ISFG 2005

Gloria Vallejo

Sección de Biología

Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses

Madrid

España

INTRODUCCIÓN

El ejercicio teórico propuesto fue el siguiente:

En un proceso de filiación de impugnación de paternidad y de determinación de filiación, el padre legal **P1** ha fallecido y solo es posible realizar el estudio genético en las muestras aportadas por el padre en litigio **P2**, el hijo **H** y su madre biológica **M**.

Dados los resultados de la tabla que se adjunta, calcule:

1. El índice paternidad IP total y parcial P2 respecto de H asumiendo que M es la madre H.
2. El índice de paternidad IP total y parcial de P2 asumiendo que M es la madre de H con la consideración de que P2 y P1 son hermanos entre sí.

Se apporto una tabla con los fenotípicos del P2, M e H así como una tabla con las frecuencias alélicas de los marcadores utilizados (base de datos del INTCF de Madrid)

OBJETIVOS DEL EJERCICIO TEÓRICO

- **La Paternidad teórica 1** plantea el cálculo de un índice de paternidad enfrentándonos al reto de valorar la posibilidad de un **alelo nulo o silente**, lo que origina la aparente situación de homocigosis para alelos

distintos entre P. Padre P2 e hijo.

- **La Paternidad teórica 2** nos presenta un caso de **Relaciones Familiares**, donde se sabe que el padre alegado (P2) y el padre legal (P1), que ha fallecido, son hermanos de padre y madre. En este ejercicio se pretende conocer que hipótesis alternativas se considerarían en el cálculo del Índice de Paternidad y que conclusiones globales adoptarían los laboratorios participantes.

PARTICIPACIÓN

Laboratorios inscritos: 116.

Laboratorios que emiten resultados en el Ejercicio Paternidad teórica:

- Paternidad teórica 1 = 96
- Paternidad teórica 2 = 90

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Paternidad teórica 1

En general no se han detectado un número muy elevado de errores en el cálculo de los marcadores genéticos excepto en el sistema FGA que por su especial dificultad ha sido el marcador que ha presentado un mayor número de discrepancias entre los laboratorios participantes, estas serán presentadas más adelante y de forma independiente.

Los errores observados se han clasificado de la forma siguiente:

- Ficheros con errores de transcripción de datos por utilización de frecuencias alélicas equivocadas o por confusión con otro marcador: se han detectado 5 errores por confusión de frecuencias alélicas y 4 por confusión con otro marcador.
- Resultados con errores por puntuaciones incorrectas: se han comprobado 3 errores de puntuación.

- Errores en las operaciones numéricas con la utilización de formulas correctas o bien con la utilización de software: se han contabilizado 5 errores con utilización de programas informáticos y 9 errores en las operaciones numéricas manuales.
- Redondeos en los valores “X, Y, e IP parciales: se han comprobado 29 resultados de IP parciales con pequeñas desviaciones por redondeo en las operaciones numéricas.”

Intervalo de errores observados: 1 para el marcador THO1 hasta 9 para el marcador D3S1358.

El número de laboratorios que han cometido errores han sido 11 (11,45%).

En la tabla 1 se presentan los resultados genéticos y los algoritmos de cálculo correspondiente al Índice de Paternidad por sistema genético. Para la realización de estos cálculos se asumen las siguientes premisas:

- El P2 y la M no están relacionados genéticamente
- La población de referencia está en equilibrio Hardy-Weinberg
- No ocurren mutaciones
- La herencia es mendeliana con sistemas codominantes, excepto para el sistema FGA donde se tiene en cuenta la posibilidad de que el P2 e H posean alelos nulos y por tanto en los cálculos se incluyen sus posibles genotipos, considerando a P2 (18,18 o 18, alelo nulo) y H (23,23 o 23, alelo nulo).

La **X** representa la Probabilidad de la observación genética asumiendo que el P2 es el padre biológico y es igual a la frecuencia de que ese padre P2 sea así, multiplicado por la frecuencia de que esa madre M sea así, multiplicado por la probabilidad de que ese hijo H provenga de esa pareja.

La **Y** representa la Probabilidad de la observación genética asumiendo que el P2 No es el padre biológico y es igual a la frecuencia de que ese padre P2 sea así, multiplicado por la frecuencia de que esa madre M sea así, multiplicado por

la probabilidad de que ese hijo H provenga de esa madre M y el padre P2 es independiente del hijo H en esta situación.

Tabla 1. Resultados genéticos y los algoritmos de cálculo correspondiente al Índice de Paternidad de P2 por sistema genético para el ejercicio teórico 1

SISTEMA	P2	M	H	X	Y	IP2	Valor Referencia
TH01	8	8	8	$f8^2 \times f8^2 \times 1$	$f8^2 \times f8^2 \times f8$	$1 / f8$	7,3099
TPOX	6,10	8,9	6,8	$2f6f10 \times 2f8f9 \times \frac{1}{4}$	$2f6f10 \times 2f8f9 \times \frac{1}{2} \times f6$	$1 / 2f6$	135,1351
CSF1PO	8,9	8,9	9	$2f8f9 \times 2f8f9 \times \frac{1}{4}$	$2f8f9 \times 2f8f9 \times \frac{1}{2} \times f9$	$1 / 2f9$	34,4827
D3S1358	13	14,15	13,15	$f13^2 \times 2f14f15 \times \frac{1}{2}$	$f13^2 \times 2f14f15 \times \frac{1}{2} \times f13$	$1 / f13$	123,4568
VWA	15,18	14,19	15,19	$2f15f18 \times 2f14f19 \times \frac{1}{4}$	$2f15f18 \times 2f14f19 \times \frac{1}{2} \times f15$	$1 / 2f15$	3,8639
D5S818	11,14	11	11	$2f11f14 \times f11^2 \times \frac{1}{2}$	$2f11f14 \times f11^2 \times f11$	$1 / 2f11$	1,4824
D13S317	9,10	7,10	10	$2f9f10 \times 2fmin10 \times \frac{1}{4}$	$2f9f10 \times 2fmin10 \times \frac{1}{2} \times f10$	$1 / 2f10$	10,0604
D7S820	7,9	9	7,9	$2f7f9 \times f9^2 \times \frac{1}{2}$	$2f7f9 \times f9^2 \times f7$	$1 / 2f7$	27,6243
FGA	18,nulo	18,23	23,nulo	$2f18f0 \times 2f18f23 \times \frac{1}{4}$	$f18(f18+2f0) \times 2f18f23 \times \frac{1}{2} \times (f23+f0)$	$f0 / [(f18+2f0)(f23+f0)]$	0,0885
TOTAL							592.143.378

En el cálculo del sistema FGA se han comprobado un gran número de discrepancias, para exponer la gran variabilidad de resultados de forma sencilla se han clasificado de la siguiente manera:

- 52 laboratorios han incluido en su cálculo la posibilidad de un alelo nulo y por tanto introducen la formula $f_0/[(f_{18}+2f_0)(f_{23}+f_0)]$. Obteniendo IP2 parciales desde 0,08845 hasta 0,09. (2 laboratorios informan con error la formula de alelos nulos y por consiguiente la IP2 Total)

IP2 Total de 592×10^6

- 5 laboratorios han calculado el índice de paternidad total sin tener en cuenta este marcador, siguiendo las recomendaciones de la ISFG ante casos de exclusiones aisladas

IP2 Total valores comprendidos entre 6.704×10^6 , 6.694×10^6 hasta 6.6×10^6

- 8 laboratorios han considerado la posibilidad de una mutación paterna (hipótesis de que H reciba un alelo 23 por mutación desde P2) para el cálculo han utilizando diferentes modelos matemáticos (Brenner C, Ayres K, AABB, programas informáticos). Obteniendo IP2 parciales desde 0,0101 hasta 0,000001

IP2 Total valores comprendidos entre 592×10^6 hasta 127.852

- 8 laboratorios han considerado la posibilidad conjunta de alelo nulo y mutación paterna. Los algoritmos utilizados en la mutación han sido muy variables, algunos laboratorios han utilizado programas informáticos (diferentes versiones del programa Familias) Obteniendo IP2 parciales desde 0,05 hasta 0,1081

IP2 Total valores comprendidos entre 337×10^6 hasta 723×10^6

- 23 laboratorios han utilizado diferentes algoritmos de difícil clasificación o bien no se ha podido deducir el algoritmo utilizado Obteniendo IP2 parciales desde 0,00027 hasta 2.500

IP2 Total valores comprendidos entre $1,3 \times 10^6$ hasta 55×10^{12}

En la figura 1 se representa en forma de grafica los valores de IP2 Totales de 96 laboratorios, Se observan valores claramente discrepantes del valor dado como referencia, en la mayoría de los casos esta divergencia se debe a los resultados informados para el sistema HUMFGA. Además se comprueba que algunos resultados están claramente distanciados del valor de referencia en más de un orden de magnitud.

Laboratorios con IP2 totales 10 veces superiores al valor de referencia = 16 (16,6%)

Laboratorios con IP2 totales 10 veces inferiores al valor de referencia = 24 (25%)

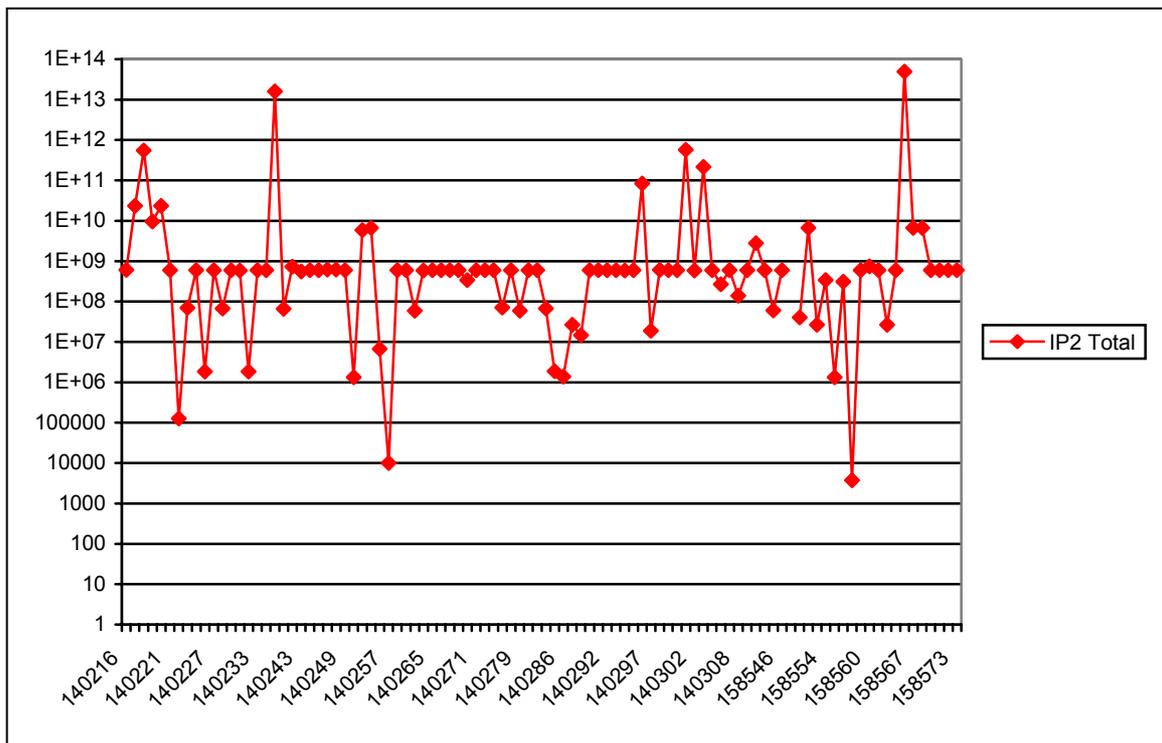


Figura 1. Representación logarítmica decimal de la dispersión de los valores de IP2 Totales aportados por los 96 Laboratorios participantes en el Ejercicio teórico 1.

El valor de referencia de IP2 Total = 592.143.378

Paternalidad teórica 2

En la paternidad teórica 2 los laboratorios participantes han introducido las siguientes hipótesis alternativas para el cálculo del índice de paternidad:

Grupo A.- 8 laboratorios calculan IP2, enfrentando las siguientes hipótesis

H0= P2 es el padre de H

H1= Otro hombre es el padre de H

$$IP2 \cong 600 \cdot 10^6$$

Grupo B.- 22 laboratorios calculan el índice de paternidad mediante la utilización de la conocida fórmula propuesta por J. W. Morris Índice Avuncular, ($\theta = 0,25$), y que nosotros denominaremos IP1 y enfrentan las siguientes hipótesis

H0= Un hermano de P2 es el padre de H

H1= Otro hombre es el padre de H

$$IP1 = IA = (1 - 2\theta AT) + 2 \theta AT IP2 \cong 40 \cdot 10^6$$

Grupo C.- 60 laboratorios calculan un Índice de paternidad enfrentando al Padre alegado P2 con un hermano del padre alegado, las hipótesis presentadas son

H0= P2 es el padre de H

H1= Un hermano P2 es el padre de H

$$LR = IP2/IP1$$

$$LR = IP2/IA = IP2 / (1 - 2\theta AT) + 2 \theta AT IP2 \cong 15$$

En la tabla 2 se exponen los algoritmos de cálculo correspondientes a los índices de paternidad por marcador genético para los grupos B y C. Los algoritmos de cálculo correspondientes al grupo A se han presentado en la tabla 1.

4 laboratorios han aportando simultáneamente diferentes índices de paternidad, incluso 3 de estos laboratorios han calculando los tres índices de paternidad anteriormente presentados.

Resaltamos la desigual manera de comunicar el valor de la prueba genética mediante el uso del Índice de Paternidad o Likelihood Ratio entre los participantes, máxime cuando se evalúa un caso tan controvertido como el presentado en el ejercicio teórico 2.

Así pues, 50 de los 90 Laboratorios (55,55%) en las conclusiones globales y/o observaciones han informado que:

- Los resultados obtenidos no permiten asegurar cual de los dos presuntos padres es el padre biológico. Se recomienda ampliar el análisis genético: Respuesta dada por 39 laboratorios (43,3%)
- El P1 puede ser el padre biológico del hijo H: Respuesta dada por 5 laboratorios (5,5%)
- El P2 puede ser el padre biológico del hijo H: Respuesta dada por 6 laboratorios (6,6%)

Estos laboratorios han aportado consideraciones de diferente naturaleza que han sido determinantes en la valoración de IP total y por tanto en la emisión de las conclusiones globales, se citan a continuación:

- El número tan limitado de marcadores analizados en el presente ejercicio
- La inconsistencia detectada para un solo marcador en el P2, exclusión de 2º orden
- Los padres cuestionados presentan consanguinidad

por contra, 40 de los 90 laboratorios (45,45%), han omitido en las conclusiones globales las consideraciones o comentarios aclaratorios que faciliten y permitan una mejor interpretación de la prueba biológica.

Ante situaciones tan complejas como la presentada en este ejercicio es importante informar que, es necesario aumentar el número de marcadores genéticos y recomendable el análisis genético del fallecido P1 mediante exhumación si es posible.

Tabla 2: los algoritmos de cálculo correspondiente al Índice de Paternidad por sistema genético para el ejercicio teórico 2

SISTEMA	IP1	IP2 / IP1	Valor Referencia IP1	Valor Referencia IP2 / IP1
TH01	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/f_8 / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	4,155	1,7593
TPOX	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/2f_6 / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	68,0675	1,9853
CSF1PO	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/2f_9 / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	17,7413	1,9436
D3S1358	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/f_{13} / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	62,2284	1,9839
VWA	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/2f_{15} / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	2,432	1,5888
D5S818	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/2f_{11} / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	1,2412	1,1943
D13S317	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/2f_{10} / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	5,5302	1,8192
D7S820	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$1/2f_7 / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	14,3121	1,9301
FGA	$(1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	$f_0 / [(f_{18} + 2f_0) (f_{23} + f_0)] / (1-2\theta_{AT}) + 2\theta_{AT} IP2$	0,5442	0,1625

CONCLUSIONES

1. Sería recomendable la actualización de las Normas del GEP-ISFG en casos de exclusiones aisladas (por la 2º regla de Landsteiner) y establecer consenso en el cálculo con alelos nulos

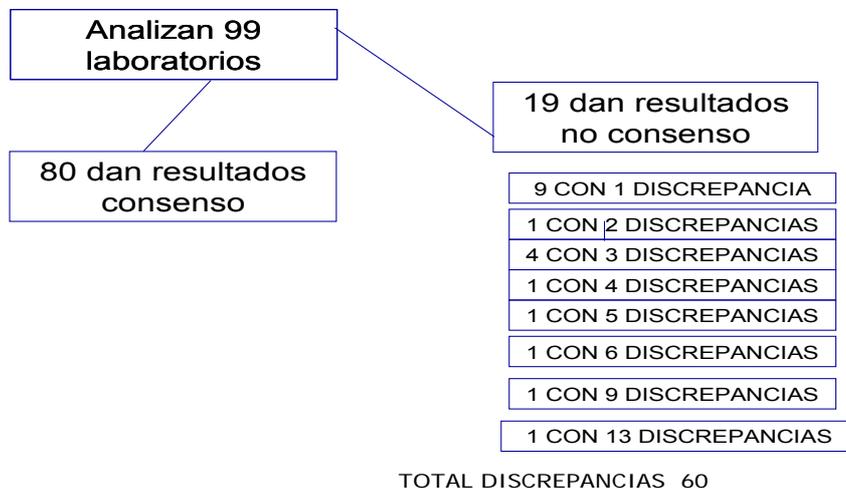
2. La implantación de cuestionarios informatizados más rígidos, evitaría errores humanos, principalmente de transcripción de datos y de puntuación, y facilitarían la homogenización de las respuestas así como el tratamiento de la información.
3. Los laboratorios deberían validar los programas informáticos que utilizan en los cálculos de las investigaciones de paternidad y realizar chequeos en la transcripción de resultados
4. Para facilitar la interpretación de los resultados, especialmente en las paternidades complejas, es conveniente aclarar el valor de Índice de Paternidad mediante las consideraciones oportunas e informar de la Probabilidad de Exclusión a Priori que posee el laboratorio para ese caso en concreto.

EJERCICIO COLABORATIVO GEP-ISFG 2005
DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE STRS AUTOSOMICOS

Elena Rivas San Martín
Laboratorio de ADN
Comisaría General de Policía Científica
Madrid
España

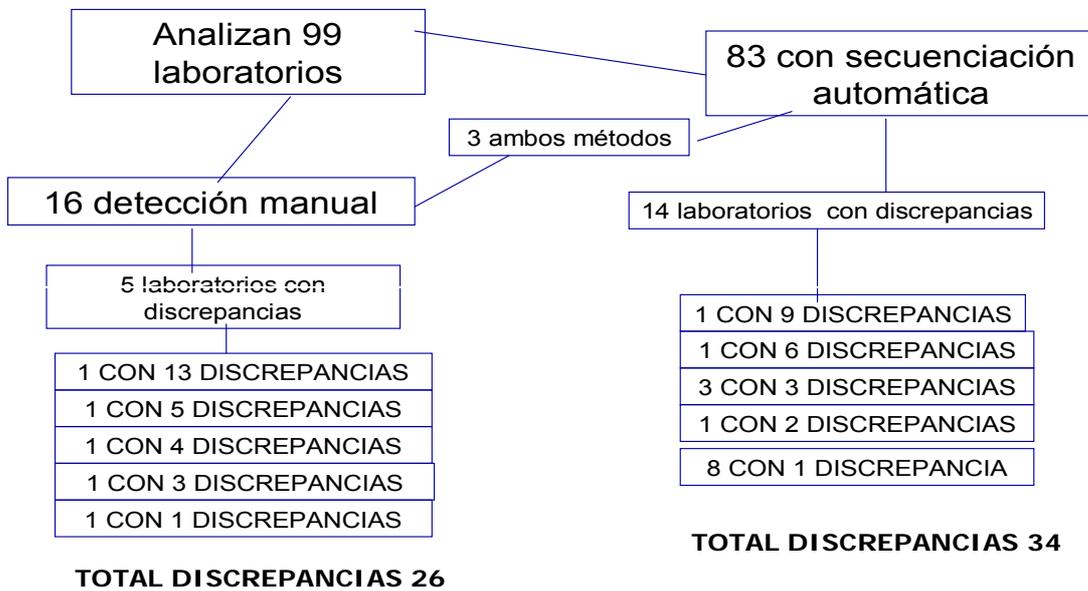
En este apartado del ejercicio colaborativo han participado 99 laboratorios, de los cuales 80 dan resultados consenso y 19 dan resultado no consenso, con un total de 60 discrepancias. (Ver Tabla 1)

Tabla 1. Resultados de los laboratorios participantes



Los laboratorios participantes han empleado para su estudio sistemas de secuenciación automática, en su mayoría el secuenciador *ABI310* de *Applied Biosystems*, y sistemas de detección manual, observándose que el mayor número de discrepancias se acumulan en los laboratorios que utilizan sistemas manuales de detección. Cabe destacar que casi la mitad de discrepancias se concentran en 5 laboratorios. Ver tabla 2.

Tabla 2.- Métodos de análisis



De los 19 laboratorios que dan resultado **no consenso**, 5 responden la paternidad y la muestra forense y 14 solo responden a la paternidad, luego el mayor número de discrepancias se concentra en los laboratorios que reportan resultados sólo para la paternidad. En ambos casos se emplean tanto medios de detección automática como manual (Ver tabla 3).

Tabla 3.- Distribución de resultados no consenso según laboratorios.



Para los sistemas consensuados, se han realizado un total de 8370 determinaciones. Los laboratorios que han empleado sistemas de detección manual han llevado a cabo 885 determinaciones con 26 discrepancias, siendo por tanto la tasa de discrepancia de un 2,93%. Los laboratorios que han empleado sistemas automatizados han realizado 7485 determinaciones de las cuales 34 son discrepantes, siendo la tasa de discrepancia, por lo tanto de 0,45%. Luego la tasa de **discrepancia global es del 0,71%**. Se pone de manifiesto aquí, que la mayor tasa de discrepancias se da en los laboratorios que emplean sistemas de detección manual (ver tabla 4).

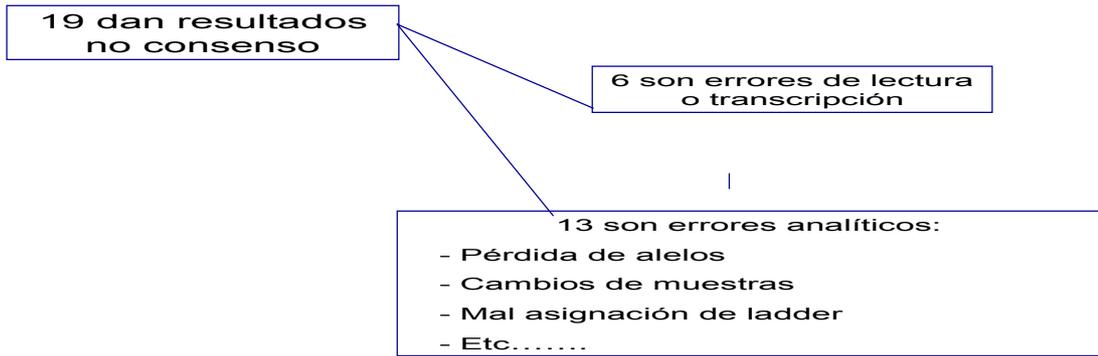
Tabla 4.- Tasas de discrepancias

	Determinaciones totales	Discrepancias	Tasa de discrepancia
MANUAL AUTOSOMICAS	885	26	2,93%
AUTOMÁTICOS AUTOSOMICAS	7485	34	0,45%

Tasa de discrepancia global 0,71 %

Entre las discrepancias más comunes de los laboratorios que emplean sistemas automatizados, caben destacar: No detectar alelos de mayor peso molecular, desplazamiento de alelos (un repeat más o uno menos), posibles errores de transcripción (electros bien) y cambio de muestras. En los laboratorios que emplean sistemas de detección manual las discrepancias más comunes se distribuyen entre geles con mala resolución, asignaciones alélicas erróneas, posibles errores de transcripción (geles bien) y cambio de muestras.

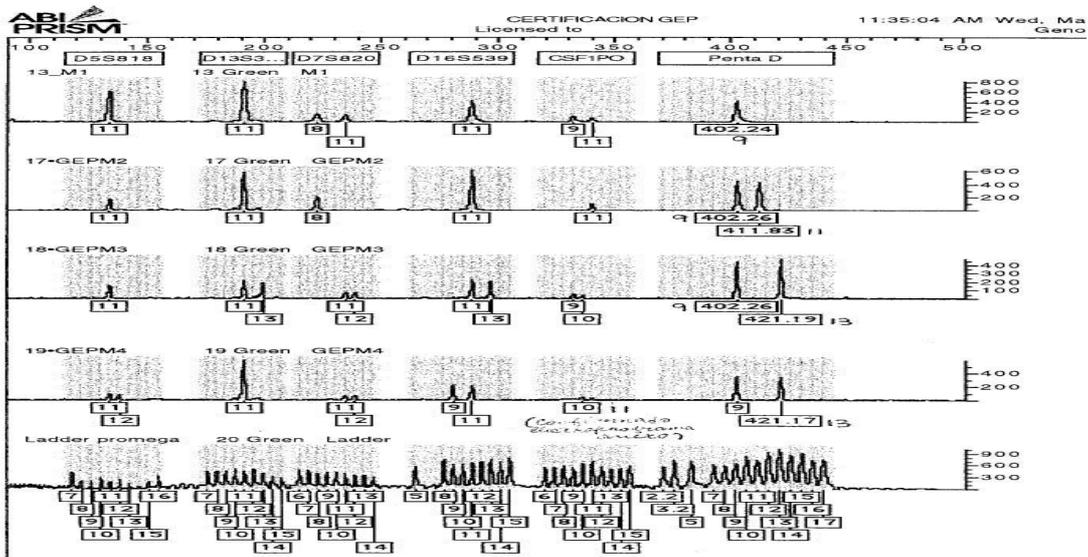
Tabla 5.- Distribución de las discrepancias más comunes



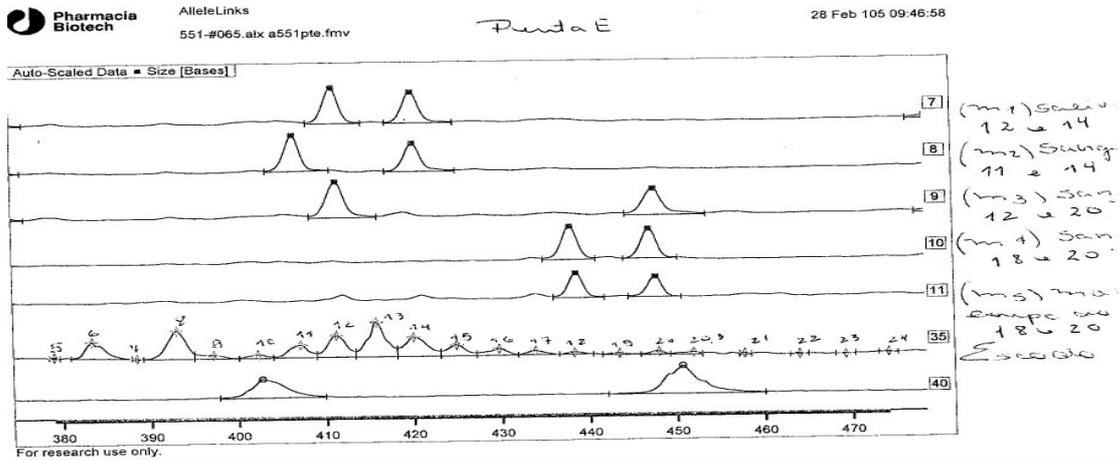
Como este año, los laboratorios estaban obligados a enviar los electroferogramas y geles relativos a los análisis realizados, se ha podido llevar a cabo un estudio más exhaustivo de los distintos errores cometidos por los laboratorios que han reportado resultados discrepantes.

Vamos a intentar resumir los errores más comunes que se han detectado mediante la documentación que han remitido los distintos laboratorios:

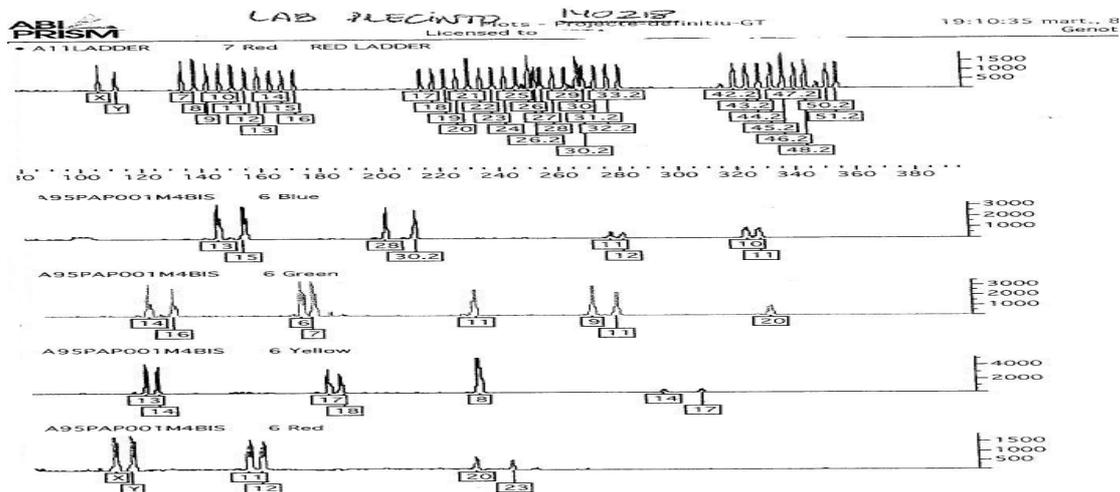
1.- Se ha detectado un gran número de discrepancias debido a errores **de transcripción** o bien “despistes” a la hora de leer los geles, ya que tanto los electros como los geles remitidos están correctos. Estos errores se dan tanto en laboratorios que utilizan sistemas automatizados como detección manual.



2.- Otro error que se ha puesto de manifiesto en varios laboratorios que emplean sistemas automatizados es el leer un repeat de más o de menos en las muestras. Estos laboratorios están empleando **escaleras alélicas** no comerciales.



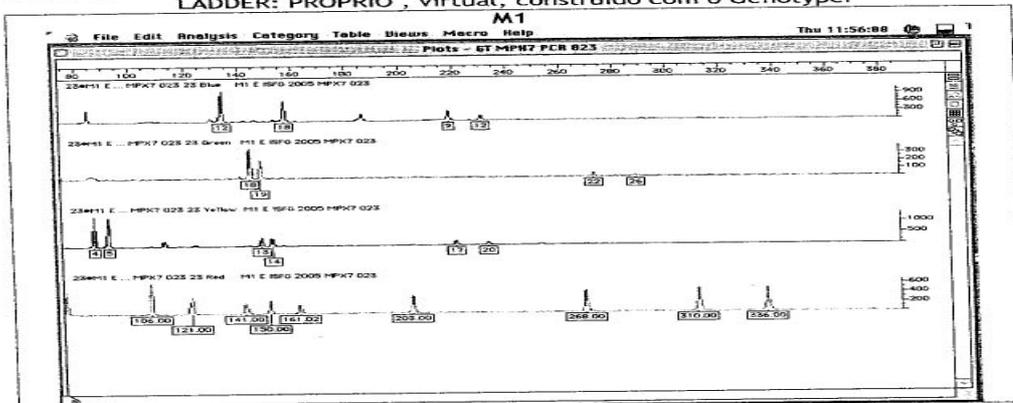
3.- Algunos laboratorios han sufrido **pérdida de alelos** o “drop out”. Algunos de estos laboratorios **no cuantifican las muestras**.



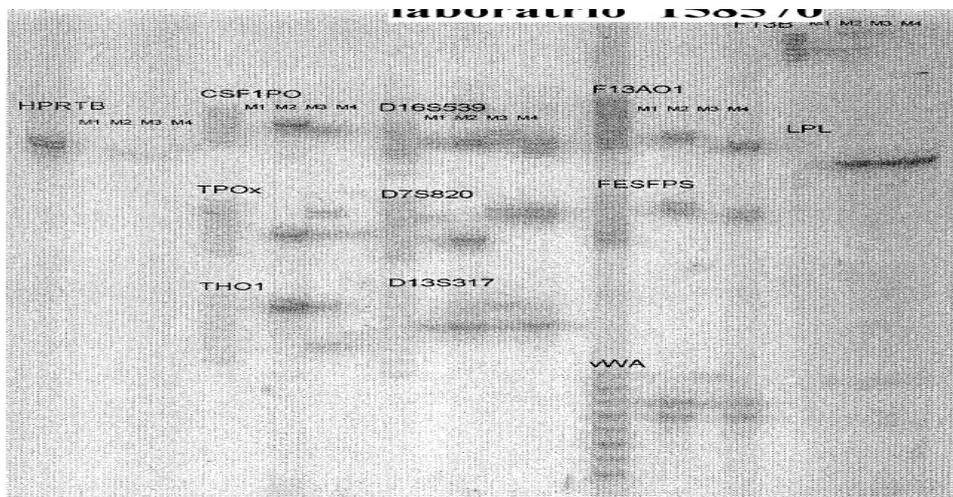
4.- Un laboratorio no ha detectado un alelo intermedio. Emplea también **escaleras alélicas propias**.

HEPTAPLEX: BLUE: D1S1656 / D19S253; GREEN: D8S1132 / D8S306; YELLOW: CD4 / D18S535 / D12S391

LADDER: PRÓPRIO, virtual, construído com o Genotyper



5.- Algunos laboratorios que usan sistemas de detección manual pierden bandas posiblemente por una mala resolución del gel y en muchos casos no cuantificar las muestras.



Posibles soluciones a todos estos problemas pueden ser: **chequear** los resultados por varias personas antes de reportar los datos, **una buena cuantificación** de las muestras, **emplear escaleras alélicas secuenciadas** o bien comerciales y en el caso de sistemas de detección manual hacer **geles con resolución**.

El tipo de error con el número de discrepancias se puede ver en la tabla que viene a continuación:

Tipo	Nº discrepancias	%
Perdida alelos	3	5%
Ganancia de alelos	1	1,6%
Un repeat mas	8	13,3%
Un repeat menos	6	10%
No detecta alelo intermedio	1	1,6%
Errores transcripción	17	28,3%
Otros	24	40%
Total	60	100%

Si hacemos una valoración respecto a los resultados del año anterior, podemos observar que han emitido resultados 9 laboratorios más que el año anterior y sin embargo la tasa de discrepancia global es menor. Hay que tener en cuenta que en el ejercicio de este año la muestra M5 no ha dado tantos problemas como en el ejercicio anterior que se trataba de una mezcla (en este ejercicio aunque se trataba en principio de una mezcla ningún laboratorio lo detectó).

	LABORATORIOS ANALIZA	SISTEMAS CONSENSUADOS	DISCREPANCIAS	TASA DISCREPANCIA GLOBAL
2004	90	26	63	1,1% 3,4% CON M5
2005	99	26	60	0,71% CON M5

A la vista de todo lo anterior podemos sacar unas **conclusiones** del ejercicio de este año que son muy parecidas a las de años anteriores:

- 1. Los resultados obtenidos son bastante buenos**
- 2. La mayor parte de las discrepancias observadas se concentran en un reducido número de laboratorios**
- 3. El uso de primers y escaleras alélicas propias, posiblemente no secuenciadas, da lugar a gran número de las discrepancias observadas**
- 4. La utilización de sistemas automáticos de detección, junto con el empleo de kit comerciales, hacen disminuir el número de errores en la analítica, hecho que se constata cada año al irse incorporando estas técnicas en los laboratorios.**

EJERCICIO COLABORATIVO GEP-ISFG 2005 CROMOSOMA Y

María Brión y Ángel Carracedo
Instituto de Medicina Legal
Santiago de Compostela
España

La participación de los laboratorios puede ser resumida de la siguiente forma:

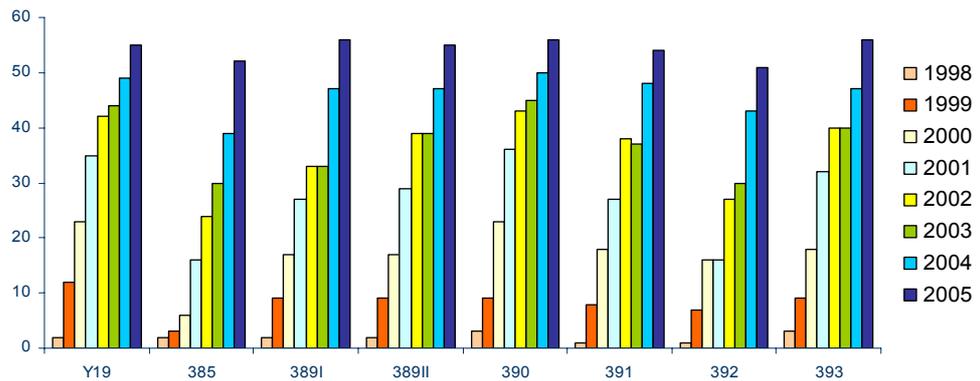
▪ N° laboratorios inscritos	116
▪ N° laboratorios que emiten resultados	102 (88%)
▪ N° laboratorios con resultados de mtDNA	36
▪ N° laboratorios con resultados de STR Y	56 (55%)
▪ con haplotipo mínimo	48

El número de laboratorios con resultados para los STRs del cromosoma Y aumentó ligeramente del año pasado a este (de 52 a 56) pero el porcentaje con respecto al total de laboratorios descendió un punto (de 56% a 55%). El número medio de marcadores analizados aumento a casi 12 STRs (de 10.6 a 11.96 este año) y el número total de genotipos, entendido como el sumatorio del nº de marcadores para cada laboratorio, subió de 551 a 669 genotipos.

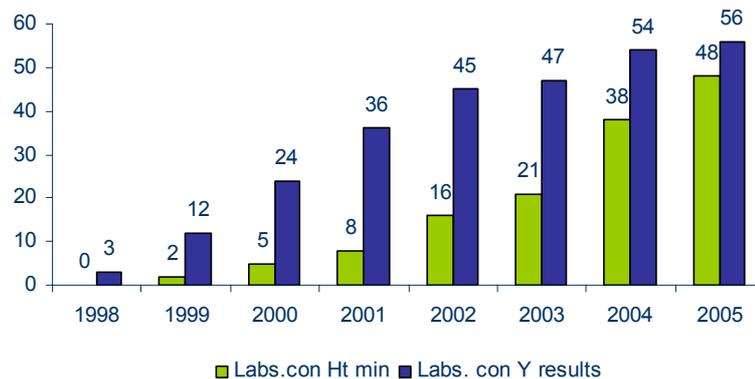
Si nos fijamos en la evolución anual (Fig. 1), el número de laboratorios que emiten resultados del Y aumenta progresivamente, pero sin embargo, la proporción de laboratorios que emiten resultados del Y con respecto al total de laboratorios que emiten resultados, aumentó progresivamente hasta el año 2001, pero a partir de aquí se estabilizó.



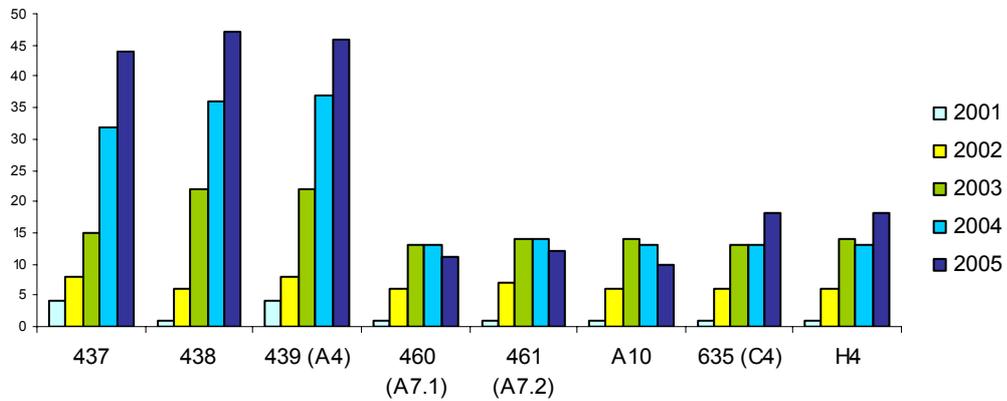
Con respecto a la utilización de cada uno de los STRs, todos los loci incluidos en el haplotipo mínimo vieron incrementada su utilización (Fig. 2).



Además, cada vez son más el número de laboratorios que analizan el haplotipo mínimo (Fig. 3), llegando en este año a representar el 86% de los laboratorios que emiten resultados del Y.

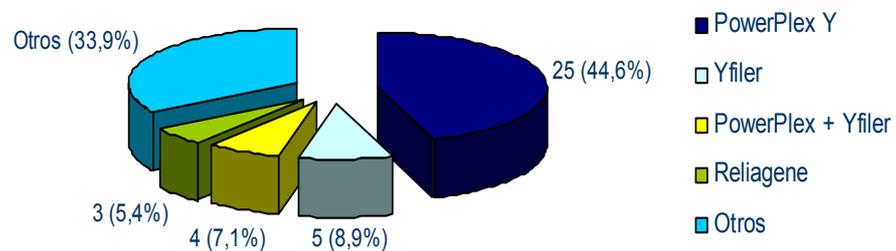


En lo que respecta a otros loci STRs no incluidos en el haplotipo mínimo, se analizaron los 8 loci incluidos en el ejercicio colaborativo llevado a cabo por el GEP (Fig 4), y cabe señalar el gran aumento detectado en los tres loci incluidos en el kit Powerplex Y de Promega (DYS437, DYS438, DYS439).



El aumento de utilización de los marcadores DYS635 y GATA H4 también fue ligeramente superior al resto, probablemente debido a que están incluidos en el kit Yfiler de Applied Biosystems.

En cuanto a la metodología de PCR (Fig. 5), la técnica más utilizada fue el kit PowerPlex de Promega, que lo utilizaron un total de 29 laboratorios que representan más de la mitad de los laboratorios que emitieron resultados para el cromosoma Y. El 16% de los laboratorios utilizó el kit Yfiler que salió muy recientemente al mercado.



Análisis de los errores

En las siguientes tablas se presentan los errores de genotipado que han aparecido en el control realizado este año, y los errores que aparecieron en años anteriores con la intención de comprobar la evolución.

En la tabla 1 se presentan el número de genotipos realizados cada año y el porcentaje de errores cometidos, para los STRs del haplotipo mínimo.

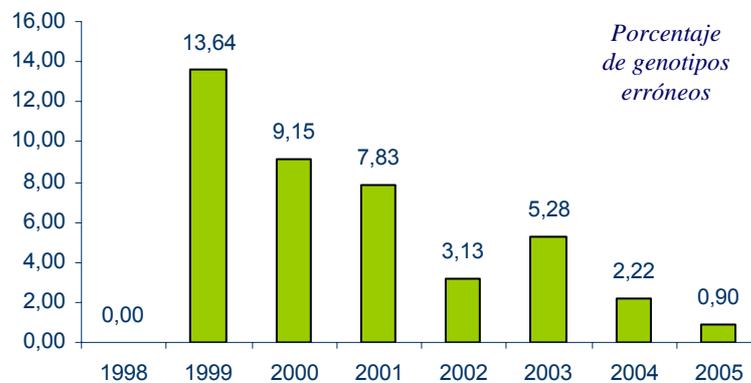
		Y19	385	389I	389II	390	391	392	393	Total
1998	nº genotipos	2	2	2	2	3	1	1	3	6
	nº errores	-	-	-	-	0	-	-	0	0
1999	nº genotipos	12*	3	9	9	9*	8	7	9	66
	nº errores	3	0	0	2	2	1	0	1	9 (13.6%)
2000	nº genotipos	23	6	17	17	23	18	16	18	142
	nº errores	0	1	0	5	1	1	1	4	13 (9.2%)
2001	nº genotipos	35	16	27	29	36	27	16	32	218
	nº errores	1	1	1	5	1	1	3	3	16 (7.3%)
2002	nº genotipos	42	24	33	39	43	38	27	40	290
	nº errores	0	1	1	3	0	1	2	1	10 (3.2%)
2003	nº genotipos	44	30	33	39	45	37	30	40	301
	nº errores	2	1	6*	8*	0	1	0	4	22 (7.3%)
2004	nº genotipos	49	39	47	47	50	48	43	47	369
	nº errores	0	2	2	3	0	0	3	1	11 (3.0%)
2005	nº genotipos	55	52	56	55	56	54	51	56	435
	nº errores	0	0	2	1	1	1	0	0	5 (1,1%)

En la tabla 2 se presentan los mismos datos para los otros STRs analizados.

		437	438	439	460	461	A10	635	H4	458	456	448	Total
2001	nº genotipos	4	1	4	1	1	1	1	1				12
	nº errores	1	-	1	-	-	-	-	-				2 (16.7%)
2002	nº genotipos	8	6	8	6	7	6	6	6				61
	nº errores	1	0	0	0	0	0	0	0				1 (1.6%)
2003	nº genotipos	15	22	22	13	14	14	13	14				135
	nº errores	0	0	0	1	0	0	0	0				1 (0.74%)
2004	nº genotipos	32	36	37	13	14	13	13	13				171
	nº errores	0	0	1	0	0	0	0	0				1(0.58%)
2005	nº genotipos	43	46	45	11	10	10	18	18	9	9	9	228
	nº errores	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1(0,4%)

Como vemos, este año únicamente se han producido 6 errores de tipado, de los cuales 5 se cometen en los loci del haplotipo mínimo, que son los más comúnmente utilizados, y únicamente 1 se comete en los otros loci, concretamente en el GATA A10. A pesar de que los loci del haplotipo mínimo llevan más tiempo siendo utilizados y de que los laboratorios ya han adquirido una experiencia en su análisis, el porcentaje de error en los loci de más reciente incorporación ha sido inferior todos los años, excepto el primer año en que se comenzó su análisis. Muy posiblemente esto sea debido a la realización previa de los controles del Y del GEP-ISFG, y a que la mayoría de los laboratorios que tipan estos sistemas lo hacen con kits comerciales, mientras que en los STRs del haplotipo mínimo existe más variación.

Como vemos en la siguiente figura (Fig. 6) la tasa de error continúa descendiendo año tras año, pero a pesar de la disminución 6 de los 56 laboratorios con resultados (10,7%) presentan al menos un error.



Cuando nos fijamos en el sistema de detección empleado para ver como se distribuyen los errores, comprobamos que tres de ellos ocurren en laboratorios que utilizan el secuenciador ABI 310 y otros tres ocurren en laboratorios que utilizan la tinción de plata (tabla 3).

Detección	N° de laboratorios			N° de genotipos			N° de errores		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
ABI310	18	20	25	199	231	311	2	5	3
ABI377	5	8	4	52	93	45	0	0	0
Plata	10	10	6	52	88	71	6	2	3
ABI3100	3	6	11	43	65	136	0	0	0
ALF	5	4	4	37	30	35	5	3	0
ALF/ABI3100	-	1	-	-	16	-	-	-	0
ABI310/ABI377	1	-	-	16	-	-	0	-	0
ABI310/ABI3100	-	-	3	-	-	43	-	-	0
FMBIO/Prata	1	-	-	8	-	-	0	-	0
FMBIO II	1	2	1	6	12	8	1	1	0
Radioactiva	1	1	-	3	5	-	0	1	0
Megabase	-	-	1	-	-	11	-	-	0

En la siguiente tabla se presenta cada uno de los errores cometidos junto con la tecnología empleada por cada laboratorio.

Lab.	Marcador		Primers	Detección	Ladder
140216	389II	30 (29)	Kayser et al 1997	ABI310	Propio sin secuenciar
140246	A10	17 (15)	Propios	Nitrato de Plata	Propio
140247	Ht min	M2	Mentype Argus Y-MH, Biotype	ABI310	Mentype Argus Y-MH, Biotype
140249	389I	14 (13)	Gusmão et al 1999	ABI310	Gusmão et al 1999
140262	390 391	11 (25) 25 (11)	Kayser et al 1997	Nitrato de Plata	Ejercicio GEP
158550	389I	10 (13)	Kayser et al 1997	Nitrato de plata	Muestras control

Los laboratorios 140216 y 140249 asignaron un alelo equivocado en el DYS389II y el DYS389I respectivamente, probablemente debido a una mala asignación del ladder. El laboratorio 140246 asignó dos repeticiones más al alelo del A10, probablemente debido a l sistema de detección que emplearon, el nitrato de plata, o debido a los primers y ladders que no especificaron. Estos tres laboratorios deberían comprobar sus resultados con muestras control como las del ejercicio colaborativo del GEP-ISFG

(disponibles a través de los responsables del grupo de trabajo del cromosoma Y).

El laboratorio 158550 continua utilizando la nomenclatura antigua del DYS389, debe sumarle tres unidades de repetición. A pesar de que esta nomenclatura no se utiliza en las bases de datos desde el año 2000, este error se viene repitiendo año tras año en el control de calidad.

El laboratorio 140262 cometió un error de escritura al transcribir los datos a la tabla, intercambió los alelos del DYS391 y el DYS390. Al chequear los electroferogramas se comprobó que la asignación alélica era correcta. El error del laboratorio 140247 parece similar, ya que reportan resultados de cromosoma Y a la muestra M2 que es femenina, pero probablemente debido a un error en la transcripción de los datos a la tabla ya que los electroferogramas de esta muestra no son enviados.

El caso del marcador GATA H4 merece especial atención, 8 laboratorios reportaron un alelo 28 y 10 laboratorios reportaron un alelo 10. Como vemos en la siguiente tabla actualmente existen dos nomenclaturas que se están utilizando, la descrita por Gusmão et al. (2002) y la empleada por Applied Biosystems en su nuevo kit Yfiler.

Gusmão et al. 2002

**P1.....(agat)₄ctat(agat)₂(aggt)₃(agat)₈-
₁₃agaatggatagattagatggatga(atag)₄atac(atag)₂P2
(8-13) + 4+1+2+3+4+1+2 = (8-13) + 17 = 25 -30 repeats**

AmpF/STR Yfiler (Applied Biosystems)

**P1.....(taga)₈₋₁₃atggatagatta(gatc)₂aa(tag a)₄.....P2
8 -13 repeats**

La nomenclatura recomendada en el kit de Applied Biosystems únicamente considera los repeats variables, mientras que la de Gusmão et al. también considera los 17 repeats flanqueantes. Además de estos 17 repeats de

diferencia, la secuencia de la unidad repetitiva que considera cada nomenclatura es distinta lo cual provoca una diferencia de otro repeat más.

Las recomendaciones actuales sobre la nomenclatura a emplear en los STRs del cromosoma Y (Gusmão et al. 2005) están a favor de la inclusión de todas las unidades repetitivas en la nomenclatura, por lo tanto, sería de gran interés que todos utilizásemos la misma nomenclatura.

Referencias

- Gusmão L, Gonzalez-Neira A, Alves C, Lareu M, Costa S, Amorim A, Carracedo A. Chimpanzee homologous of human Y specific STRs. A comparative study and a proposal for nomenclature. *Forensic Sci Int.* 2002, 126(2):129-36.
- Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 2005 (in press).

EJERCICIO COLABORATIVO GEP-ISFG 2005 ADN MITOCONDRIAL

Antonio Alonso

Sección de Biología

Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses

Madrid

España

1. El Supuesto, las Muestras y la Información de Referencia

El individuo M1 sufre una agresión. En el laboratorio se reciben las muestras M5 (una mancha en el pantalón vaquero que llevaba la víctima en el momento de los hechos) y M6 (dos fragmentos de pelos recogidos de la ropa de uno de los presuntos agresores).

Se pregunta:

(1) ¿Puede la mancha encontrada en el vaquero (M5) pertenecer a M1, a M3 o a M4?

(2) ¿Puede el pelo encontrado en la ropa del presunto agresor (M6) pertenecer a M1, a M3 o M4?

Información adicional: Se sospecha de los individuos M3 y M4 como presuntos autores de la agresión. El análisis morfológico de los pelos revela que se trata de fragmentos de cabello sin raíz, no cotejable, que se encuentra contaminado presuntamente de sangre. Interesa conocer la procedencia del pelo.

Muestras de Referencia	
M1 (SALIVA)	73G, 185A, 263G, 295T, 315.1C, 16069T, 16126C
M2 (SANGRE)	73G, 185A, 263G, 295T, 315.1C, 16069T, 16126C
M3 (SANGRE)	263G, 315.1C
M4 (SANGRE)	263G, 315.1C

Muestras Forenses	
M5 (Mancha)	Sangre M4 + Saliva M3
M6 (Pelo)	Cabellos M1 + Sangre M4

2. Datos de Participación

	Año 2002	Año 2003	Año 2004	Año 2005
Nº Lab. que Remiten mtDNA en M. Referencia	23	27	34	36
Nº Lab. que Remiten mtDNA en M. de Pelos	15	19	26	29

3. Metodología

Se presentan los métodos de extracción utilizados en las diferentes muestras del ejercicio (mancha de referencia, mancha forense y pelo contaminado)

Muestras Referencia (M1 – M4)		Mancha (M5)		Pelo Contaminado (M6)	
METODO DE EXTRACCION	Nº LAB. (%)	METODO DE EXTRACCION	Nº LAB. (%)	METODO DE EXTRACCION	Nº LAB. (%)
D. Prot/FC	10 (28%)	D. Prot/FC/M100	14 (44%)	D. Prot/FC/C100 M100	14 (47%)
Chelex	8 (22%)	Chelex	7 (22%)	D. Prot/FC	5 (17%)
D. Prot/FC/M100	7 (19%)	D. Prot/FC	4 (13%)	L.Diferencial/FC/C100 M100	4 (13%)
D. Prot/FC/C100	4 (11%)	QIAamp	3 (9%)	Chelex	3 (10%)
QIAamp	4 (11%)	D. Prot/FC/C100	2 (6%)	Chelex / C100 M100	2 (7%)
FTA Purif.	3 (8%)	Chelex / C100	1 (3%)	DNA IQ	1 (3%)
		DNA IQ	1 (3%)		

En las siguientes tablas se muestran los primers, el tipo de química de secuenciación y el tipo de Secuenciador utilizado en el análisis de las regiones HV1 y HV2.

SECUENCIA PRIMERS	Nº LAB. (%)	QUIMICA SECUENCIACION	Nº LAB. (%)	DETECCION	Nº LAB. (%)
Wilson et al.	21 (58%)	Biodve (AB)	30 (83%)	ABI 310	16 (44%)
Vigilant et al.	7 (19%)	dRodamina (AB)	6 (17%)	ABI 3100	11 (31%)
Otros	8 (22%)			ABI 377	6 (17%)
				ABI 3730	1 (3%)
				VISIBLE GENETICS	1 (3%)
				MegaBACE	1 (3%)

De forma todavía minoritaria algunos laboratorios presentan datos de secuenciación de HV3, SNPs de regiones codificantes mediante *single primer extension* y de cuantificación de ADN mitocondrial mediante sistemas de real time PCR.

4. Resultados

4.1. Muestras de referencia y mancha forense

En general existe una gran calidad en los electroferogramas analizados, salvo una puntual excepción. Se obtiene en cualquier caso un consenso del 100% de todos los laboratorios participantes en el análisis de las muestras de referencia y de la mancha forense, detectándose solo un error de nomenclatura en un laboratorio que reporta las sustituciones 185G y 295C (que realmente son posiciones CRS y no discrepancias, y por tanto no reportables).

4.2. Muestra de pelo contaminado con sangre

En el análisis del pelo contaminado con sangre se observa mayor heterogeneidad en los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios como consecuencia de la influencia de la contaminación de sangre. Dicha influencia es especialmente patente en aquellos laboratorios (n = 17) que no

utilizan (o no reportan) ningún tipo de tratamiento de lavado previa a la extracción de ADN del pelo. Cinco de estos laboratorios detectan solamente el haplotipo de la sangre contaminante y no el haplotipo del pelo y concluyen erróneamente que el pelo puede ser de M3 o M4.

Mejores resultados son obtenidos por los laboratorios que realizan un lavado previo de los pelos y en especial por aquellos que utilizan un sistema de lisis diferencial que permite obtener de forma secuencial el ADN de la contaminación de sangre (fracción de la primer lisis) y el ADN constitutivo del pelo (fracción de la segunda lisis).

Resultados de ADN en la muestra M6 (fragmento de tallo contaminado con sangre)

Laboratorios que No especifican Ningún Tratamiento (17)		Laboratorios que especifican Algún Lavado (8)		Laboratorios que especifican Lisis Diferencial (5)	
PELO =M1	10	PELO =M1	5	PELO =M1	4
PELO =M1+ CONT M3 0 M4	2	PELO =M1+ CONT M3 0 M4	2	PELO =M1+ CONT M3 0 M4	0
PELO = M3 0 M4	5	PELO = M3 0 M4	1	PELO = M3 0 M4	1*

4.3. Bases de datos y significación

Sólo 5 laboratorios reportan búsqueda en base de datos para valorar la ocurrencia del haplotipo encontrado en el pelo. Las bases de datos utilizadas fueron tres bases de datos locales (N = 505, 419 ó 175) y la *mtDNA population database* <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2002/miller1.htm>

**Sesión de Presentaciones de los Grupos de Trabajo del GEP-ISFG
durante las X Jornadas de Genética Forense
Azores Setiembre 2005**

(Resumen de la Sesión realizado por Oscar García coordinador de los GT del GEP-ISFG)

En esta sesión de trabajo se realizó un repaso de la actividad de los distintos grupos de trabajo, con un detenimiento especial en los documentos, actividades e iniciativas realizadas durante el periodo entre congresos (2004-2005).

**GT sobre recogida de muestras con fines de identificación genética
(Coordinadora: Lourdes Fernández de Simón)**

Lourdes Fernández de Simón informa en la sesión sobre la actividad del grupo durante el periodo 2004-2005, que por distintas razones ha sido poco fructífera.

Para el periodo 2005-2006 se realizan las siguientes propuestas:

Propuestas realizadas por la responsable del documento de Custodia y Postcustodia de muestras

Redacción de un informe con las conclusiones de las encuestas enviadas a los distintos laboratorios, en el que se valorara la situación actual con respecto a la custodia y post-custodia de las muestras originales y los extractos de ADN generados a partir de dichas muestras.

Valoración de las cuestiones éticas que afectan a este tema, en colaboración con el GT de bioética.

Contactar con Laboratorios del Grupo acreditados para conocer los requisitos de las entidades acreditadoras en relación a la custodia de muestras.

Propuesta realizada por la Coordinadora

Elaboración de un documento sobre “Recogida de muestras en casos de identificación genética humana en grandes catástrofes”.

GT de cromosoma Y

(Coordinadores: Leonor Gusmao y Antonio Amorim)

Ao longo do último ano, concluiu-se o estudo de colaboração para avaliação de taxas de mutação em Y-STRs, coordenado por este grupo de trabalho, em colaboração com o Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela e com o Instituto de Toxicologia de Madrid. Os resultados obtidos foram divulgados através:

1. Comunicação oral apresentada no “IV International Forensic Y-User Workshop”, Novembro 18-20, Berlim, Alemanha:

Gusmão L, Sánchez-Diz P, Martín P, Zarrabeitia MT, Whittle MR, Carvalho M, Bozzo WR, Farfán MJ, Prieto L, Góes ACS, Palacio O, Pinheiro MF, Alonso C, Builes JJ, Borjas-Fajardo L, Di Lonardo AM, Corach D, Vidal-Rioja L, Vieira da Silva CI, Carvalho EF, Alonso A, Carracedo A, Amorim A (2004) GEP-ISFG collaborative studies on Y chromosome STR loci: methods, population data and mutation rates. IV International Forensic Y-User Workshop. Haploid DNA markers in Forensic Genetics.

2. Artigo para publicação na revista Human Mutation:

Gusmão L, Sánchez-Diz P, Calafell F, Martín P, Alonso CA, Álvarez-Fernández F, Alves C, Borjas-Fajardo L, Bozzo WR, Bravo ML, Builes JJ, Capilla J, Carvalho M, Castillo C, Catanesi CI, Corach D, Di Lonardo AM, Espinheira R, Fagundes de Carvalho E, Farfán MJ, Figueiredo HP, Gomes I, Lojo MM, Marino M, Pinheiro MF, Pontes ML, Prieto V, Ramos-Luis E, Riancho JA, Souza Góes AC, Santapa OA, Sumita DR, Vallejo G, Vidal Rioja L, Vide MC, Vieira da Silva CI, Whittle MR, Zabala W, Zarrabeitia MT, Alonso A, Carracedo A, Amorim A (2005) Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites. *Human Mutation* 26(6): 520-528.

3. Disponibilização dos resultados online, pelo seu envio para a base de dados YHRD - Y Haplotype Reference Database – www.yhrd.org.

Durante as últimas Jornadas do GEP-ISFG, realizadas nos Açores, foi discutida a possibilidade de se dar continuidade a este trabalho, pela incorporação de novos dados, tanto de novos dados dos laboratórios que já participam como por parte de novos laboratórios. O objectivo deste trabalho será o de se ir actualizando os valores de taxas de mutação, com o aumento de dados disponíveis. A incorporação de novos resultados será semelhante ao que já se tinha estabelecido anteriormente:

- Envio dos resultados da análise de pares pai/filho respeitantes a um mínimo de 100 pares pai/filho (por laboratório) cuja probabilidade de

paternidade (previamente determinada pela análise de marcadores autossómicos) seja superior a 99,99%.

- Sempre que for detectada uma mutação, as amostras (pai/filho) deverão ser enviadas para um segundo laboratório participante para confirmação dos resultados.
- Estas amostras deverão ainda ser analisadas por sequenciação.

Actualmente, para o cromossoma Y, existem disponíveis bases de dados facilmente consultáveis, informação metodológica (assim como kit comerciais para amplificação em multiplex). Por este motivo, foi proposto que se alargasse o âmbito deste grupo de trabalho ao estudo de marcadores do cromossoma X, o que foi discutido durante a reunião, tendo-se aprovado que a partir de agora o grupo de trabalho em cromossoma Y passa a designar-se por Grupo de trabalho em cromossomas sexuais.

GT de Genética Forense no-Humana

(Coordinadores: António Amorim y José J. Pestano)

Foi distribuído aos membros do GEP, um inquérito destinado a avaliar o grau de interesse, presente ou futuro, nesta área no seio do GEP. Os resultados foram resumidamente os seguintes:

1. *O laboratório está interessado em participar em trabalhos sobre genética forense não-humana no âmbito do ISFG-GEP?*

Sim: 14 / Não: 6

2. *Já trabalha em Genética Forense Não-Humana (Sim/Não)?*

Sim: 11 / Não: 11

3. *Que espécies?*

Separam-se por “/” as respostas de cada laboratório:

animales superiores/ Animales / Equinos, Bovinos / Insectos / Javali, veado, corso / Bovinos y equinos / Bos, Sus scrofa / Felinos, Caninos, Bovinos e Equinos / Cavalos, Bovinos e ovelhas / domésticas / Canis, Capra, Ovis, Candida, Aspergillus

4. *Quais os marcadores genéticos?*

Separam-se por “/” as respostas de cada laboratório:

mtDNA: HV & Cytb, DNA ribosómico: ITS1 & ITS2 / ADN mitcondrial (citocromo b) / Kit Comercial Promega Stockmarks de 17 STR's / Citocromo b e Citocromoxidase I e II / Microsatélites e mtDNA / Bovinos: TGLA122, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, NRA023, ETH3, ETH225, TH225, BM1824; Equinos: kit Stockmarks / Citocromo b / Equinos: VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425; Bovinos: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824; Caninos: Pez 1, FHC 2054, FHC2010, PEZ 5, PEZ 20, PEZ 12, PEZ 3, PEZ 6, PEZ 8, FHC2079 / Str's profile para registro de raça / Citocromo B / mtDNA Stockmarks Novos marcadores

5. *Que tipo de investigação está a ser realizada?*

Separam-se por “/” as respostas de cada laboratório:

Identificación setas tóxicas / Identificación de bacterias patógenas / diagnosticos de enfermedades infecciosas por PCR / Identificación de especies animales / Frecuencias alelicas, relaciones filogeneticas, distancias, etc / Entomologia Médico-legal / Estudo da diversidade genética das espécies; acções pontuais em gen. Forense animal / Establecimiento de filiaciones y individuaciones geneticas (en periodo de prueba) / Identificação de espécies animais em casos diversos, como o abigeato e outros / Será oferecida

paternidade Bovina e Equina / Secuenciación y comparación com GenBank / Diagnóstico espécie e estirpe, Parentescos, Identificação, Rastreio de produtos alimentares

6. *Está interessado na inclusão no exercício de controlo de qualidade coordenado pelo ISFG-GEP de espécies não humanas (Sim/Não)?*

Sim: 14 / Não: 6

7. *Está interessado em colaborar em projectos de investigação em não humanos tais como recolha de amostras de raças autóctones, descrição da sua diversidade genética e criação de bases de dados?*

Sim: 16 / Não: 5

8. *Outras sugestões:*

Separam-se por “/” as respostas de cada laboratório:

Poderiam ser listados os marcadores mais comumente utilizados pois estamos tendo dificuldade em encontrar os marcadores multiplex para raças de horses, bovines and sheep / Não pretendemos trabalhar com kits comerciais muito caros e sem muita qualidade.

Em resumo, destacando as respostas mais relevantes para orientação futura do GT, salientamos:

- grande proporção de laboratórios que estão interessados (ou mesmo já trabalham) em outras espécies
- grande proporção de laboratórios que estão interessados em trabalhos de cooperação, incluindo exercícios de controle de qualidade

Face a estes resultados, sugerimos que no próximo ano, se possa incluir no exercício anual, a título experimental, e com pagamento diferenciado, a análise de materiais biológicos não humanos.

Por pedido de escusa de Luísa Pereira, que foi substituída, passando os Coordenadores deste grupo a ser: António Amorim (aamorim@ipatimup.pt)

José J. Pestano Brito (jpestano@dbbf.ulpgc.es).

GT de ADN mitocondrial

(Coordinadores: Lourdes Prieto, Marta Montesino, Manuel Crespillo y Antonio Salas)

El grupo de ADNmt del GEP-ISFG está trabajando intensamente. Este año ha sido muy productivo gracias al esfuerzo de todos vosotros. Podemos resumir el trabajo que se ha venido realizando en tres puntos fundamentales:

1. El apoyo técnico a laboratorios pertenecientes al GEP-ISFG que han solicitado ayuda: hemos recibido más de 30 e-mails y llamadas telefónicas referentes tanto a cuestiones técnicas como interpretativas relacionadas con el análisis de ADNmt en la casuística forense. Nuestra intención ha sido contestar a los problemas planteados con la mayor rapidez y de la mejor forma posible. Esperamos y deseamos que esta actividad se mantenga, pues pensamos que esto hace que el grupo avance.
2. Presentación de los resultados de ADNmt de los ejercicios de calidad del GEP-ISFG: después de la reunión de Manaos, se presentaron los resultados del ejercicio 2004 en el International Y-User Workshop "Haploid DNA markers in forensic genetics" celebrado en Berlín, del 18 al 20 de Noviembre de 2004. Si queréis más información sobre este punto podéis encontrarla en la web del GEP-ISFG (http://www.gep-isfg.org/ISFG/Grupos_de_trabajo/ADN_mitocondrial/informes.php).

Por otro lado, se va a publicar próximamente en Forensic Science Internacional y ya está disponible "on line" desde el 21 de octubre el artículo coordinado por M. Crespillo referente a este mismo ejercicio de control de calidad de mitocondrial: **Results of the 2003–2004 GEP-ISFG collaborative study on mitochondrial DNA: Focus on the mtDNA profile of a mixed semen-saliva stain.** Manuel Crespillo, Miguel R. Paredes,

Lourdes Prieto, Marta Montesino, Antonio Salas, Cristina Albarran, Álvarez-Iglesias V, Antonio Amorin, Gemma Berniell-Lee, Antonio Brehm *et al.*

En la reunión de Azores, Antonio Alonso presentó los resultados del ejercicio 2005. Podéis obtener información sobre su discusión en el apartado dedicado a ADNmt de este boletín.

3. Realización de un ejercicio colaborativo (14 laboratorios) sobre el análisis de ADNmt en mezclas forenses: el trabajo se presentó oralmente en el último congreso de la ISFG en Azores y pronto estará preparado para enviarlo a alguna revista con el fin de intentar su publicación. Mientras tanto, os proporcionamos el resumen que enviamos a la ISFG para el Progress in Forensic Genetics 11.

¡Muchas gracias a todos por vuestro interés y por hacer que el grupo funcione!

Analysis of mtDNA mixtures from different fluids: an inter-laboratory study

Montesino M^a, Salas A^b, Crespillo M^c, Albarrán C^d, Alonso A^d, Álvarez-Iglesias V^b, Cano JA^e, Carbalho M^f, Corach D^g, Cruz C^h, Di Lonardo Aⁱ, Espinheira R^h, Farfán MJ^j, Filippini Sⁱ, Garcia-Hirschfeld J^d, Hernández A^k, Lima G^l, López-Cubría CM^e, López-Soto M^j, Pagano S^m, Paredes M^c, Pinheiro MF^l, Sala A^g, Sónora S^m, Sumita DRⁿ, Vide MC^f, Whittle MRⁿ, Zurita A^k, Prieto L^a

^aPolicía Científica, Madrid-Spain; ^bUnidad de Genética, Instituto de Medicina Legal, Univ. de Santiago de Compostela, Spain; ^cInstituto de Toxicología y C.C. Forenses de Barcelona, Spain; ^dInstituto de Toxicología y C.C. Forenses de Madrid, Spain; ^eDirección General de la Guardia Civil; ^fInstituto de Medicina Legal de Coimbra, Portugal; ^gServicio de Huellas Digitales Genéticas, Universidad de Buenos Aires-Argentina; ^hBanco Nacional de Datos Genéticos, Buenos Aires-Argentina; ⁱInstituto de Medicina Legal de Lisboa, Portugal; ^jInstituto de Toxicología y C.C. Forenses de Sevilla, Spain; ^kInstituto de Toxicología y C.C. Forenses de Canarias, Spain; ^lDirección Nacional de Policía Técnica, Uruguay; ^mInstituto de Medicina Legal de Porto, Portugal; ⁿGenomic Engenharia Molecular Ltda, São Paulo-Brasil.

Abstract. The mitochondrial DNA (mtDNA) working group of the GEP-ISFG carried out an interlaboratory exercise consisting of the study of mixture stains (saliva/semen and blood/semen) in order to investigate the behaviour of these common forensic samples when analysing their mtDNA using standard sequencing methodology. All labs extracted the DNA by preferential lysis and amplified and sequenced the first hypervariable region I (HVS-I). The results showed high consensus between labs for the first fraction of the lysis but not for the second one. We also observed differences between mixtures prepared from different donors and different body fluids. The present study has important consequences for the analysis and interpretation of mtDNA mixtures.

1. Introduction

The analysis of mixed stains is a routine practice in forensic casework, mainly related to sexual assault cases. These analyses are commonly performed using preferential lyses followed by nuclear STRs typing. However, in a number of cases, it could be interesting to know the mtDNA haplotypes that contributed to the mixture (e.g. degraded reference samples, exclusion of a maternal relationship between the victim and suspect in rape cases). Theoretically, when a preferential lysis is performed, the sperm mtDNA remain in the first fraction while the sperm nuclei are expected to remain in the second one [1]. On the other hand, the number of mtDNA copies varies depending on the type of tissue [2]. This fact could deeply influence the detection of minor components in unbalanced mixtures. In order to evaluate the influence of some parameters that may affect the study of a mixture by mtDNA sequencing analysis, the mtDNA working group of the GEP-ISFG carried out an inter-laboratory exercise consisting of the analysis of saliva/semen and blood/semen mixtures.

2. Materials and Methods

We have studied mixtures from three semen donors and three female saliva/blood donors. The stains were prepared as shown in Table 1 and subsequently sent to the fourteen participating labs. No *a priori* information was provided concerning either the mitochondrial haplotypes of contributors or the dilutions of semen. Each lab used their routine methodologies to carry out preferential lyses, cell count, nuclear or mtDNA quantification, HVS1-PCR and automated sequencing.

Mixture	Haplogroups	Female saliva + semen mixtures (Set 1)	Female blood + semen mixtures (Set 2)
1	Female T2	50 µl saliva + 50 µl pure semen	50 µl blood + 50 µl pure semen
	Male H	50 µl saliva + 50 µl semen 1/10 50 µl saliva + 50 µl semen 1/20	50 µl blood + 50 µl semen 1/10 50 µl blood + 50 µl semen 1/20
2	Female K	50 µl saliva + 50 µl pure semen	50 µl blood + 50 µl pure semen
	Male H	50 µl saliva + 50 µl semen 1/10 50 µl saliva + 50 µl semen 1/20	50 µl blood + 50 µl semen 1/10 50 µl blood + 50 µl semen 1/20
3	Female H	50 µl saliva + 50 µl pure semen	50 µl blood + 50 µl pure semen
	Male J2	50 µl saliva + 50 µl semen 1/10 50 µl saliva + 50 µl semen 1/20	50 µl blood + 50 µl semen 1/10 50 µl blood + 50 µl semen 1/20

Table 1.- Samples analysed in this inter-laboratory study.

3. Results

3.1 Comparing the first and second fractions

First fraction: most of the participants reported a mixture of male and female mtDNA haplotypes for the undiluted semen stains. The male component became less obvious in proportion to the degree of the semen dilutions, although the loss of signal was not uniform throughout all the nucleotide positions. Most labs detected only the female component in mixtures where the semen was diluted 1/10 or 1/20 (Fig. 1).

Second fraction: results were more diverse and ambiguous. Some labs did not obtain any amplicon or obtained partial or blurred electropherograms (inconclusive in Fig. 1); moreover, contamination problems were also reported by several labs (inconclusive in Fig. 1). This could be due to the fact that very small amounts of mtDNA remain in this fraction, and contamination is more likely to occur.

3.2 Comparing tissues

We did not find differences between saliva/undiluted semen and blood/undiluted semen mixtures, since most labs reported the female/male mixture. However, when comparing the samples prepared with 1/10 diluted semen, the female haplotype was mostly detected in blood/semen stains whereas a mixture of haplotypes was detected in half of the saliva/semen stains (Fig. 2, left). Therefore, it seems that the number of mtDNA copies (per volume) in blood could be higher than in saliva.

3.3 Comparing the donors

The results obtained in mixture-1 and 3 (Table 1) were similar, but very different to the ones in mixture-2. In the 1/10 semen dilution samples, most labs detected both male and female haplotypes in mixture-1 and 3, but all labs reported only the female haplotype in mixture-2 (Fig. 2, right). Therefore, our results suggest that different donors contribute with different mtDNA content.

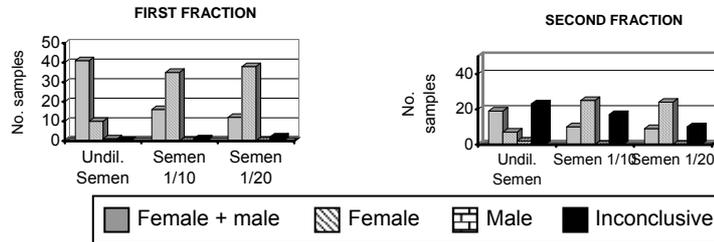


Fig. 1.- Haplotype results in first and second fractions.

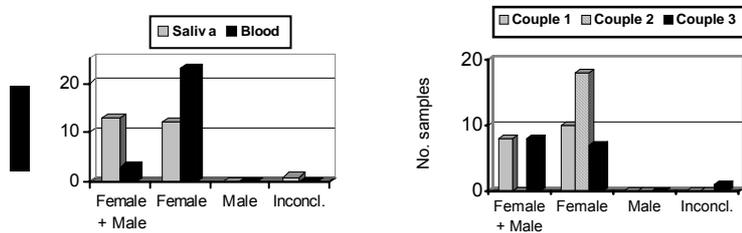


Fig. 2.- First fraction results in 1/10 semen dilution samples: comparing fluids (left) and donors (right).

4. Conclusion

The analysis of mixtures of body fluids by mtDNA-sequencing technology should be performed with special care. Several variables should be taken into account for interpretation: the types of body fluids involved in the mixture, the risk of contamination mainly in the second fractions, the loss of signal in some nucleotide positions (but not in others), and the fact that differences in mtDNA content between donors are also possible. We also advance that phylogenetic interpretation of the DNA mixtures could play an important role to detect loss of particular diagnostic variants in the mtDNA profile of the contributors.

References

- [1] P Gill, A. J. Jeffreys, D. J. Werret. Nature 318 (1985) 577-579.
- [2] L.Cavelier, A. Johanninsson, U. Gyllensten. Exp. Cell Res. 259 (2000) 79-85.

GT de Estadística en Genética Forense

(Coordinador: Angel Carracedo)

Estándares

Se discutió la necesidad de estándares en algunos problemas concretos. Mientras esos estándares no estén definidos habrá problemas en las pruebas

de suficiencia (control de calidad del GEP-ISFG) en casos complejos y no se podrá certificar por lo que el control de calidad debe estar circunscrito a problemas bioestadísticos en los que los estándares estén claros. Se propone la realización de problemas más complicados como ejercicios colaborativos (“paper challenges”) para ser debatidos durante las reuniones del GEP-ISFG.

Se informó de los avances de comisiones del GEP-ISFG en estadística. Está en marcha una Paternity Testing Commission sobre problemas de estadística en pruebas de paternidad (incluyendo problemas de alelos nulos y silentes, subestructura, mutación, etc). El coordinador de esta Comisión es Niels Morling y el representante del GEP-ISFG es Juan Antonio Luque. Los trabajos de esta comisión esperan ser concluidos a mediados del 2006.

Se constituyó también la Comisión de DNA de la ISFG para discutir el problema de interpretación de mezclas y low copy number. El coordinador de comisión es Peter Gill. El representante del GEP-ISFG es Antonio Amorim. Los trabajos de esta comisión están muy avanzados y esperamos finalizarlos en tres meses.

Formación y cursos

Juan Antonio Luque y Oscar García continuarán con la introducción de ejemplos en la red.

Se procurará reactivar los seminarios itinerantes sobre estadística (Cristina Albarrán, Juan Antonio Luque, Oscar García y Angel Carracedo). Coincidiendo con el Congreso Venezolano de Genética (30 de noviembre de 2005) habrá un curso de estadística.

La última semana de junio se realizará como todos los años un curso de estadística en Santiago de Compostela al que están invitados todos los miembros del GEP-ISFG.

Se discutió también la posibilidad de un curso on-line que será estudiada por los miembros de este grupo de trabajo.

GT de Bioética en Genética Forense

(Coordinador: Joaquín Gamero)

Cuestiones tratadas:

1. Necesidad de una nueva composición del grupo de trabajo

El coordinador del grupo de Bioética (Joaquín J. Gamero Lucas), traslada a los miembros presentes, la necesidad, ante la imposibilidad por motivos profesionales, de colaborar en las actividades del citado grupo, por parte de un número importante de miembros que integran el citado grupo de BIOÉTICA, de llevar a cabo una nueva composición del mismo. La citada composición, continúa el citado coordinador, debiera ser variable -siempre que lo considere oportuno la asamblea general del GEP-, atendiendo a los diferentes temas que se aborden y en beneficio de la agilidad y eficiencia de las actividades que en él se desarrollen, así como del interés que determinadas cuestiones puede suscitar en los miembros del GRUPO ESPAÑOL Y PORTUGUÉS DE LA ISFG y bajo la tutela del coordinador del grupo de Bioética.

2. El consentimiento para la realización de pruebas de paternidad

Seguidamente, el coordinador del grupo, pasa a describir, como se ha pretendido abordar el tema que en su momento el grupo Español y Portugués le asignó (EL CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE PATERNIDAD). En este sentido, se señala, que el esquema que podría abarcar las diferentes ópticas o visiones posibles, desde las cuales se podría analizar con mayor claridad la cuestión citada, se encontraría determinado por:

- Una óptica de la BIOÉTICA
- La lectura que sobre el tema desplegara el DERECHO
- La propia experiencia de los LABORATORIOS PRIVADOS

No obstante, continúa la intervención del coordinador del grupo de bioética, la exposición que se llevara a cabo en estas Jornadas, no cabe duda, quedaría inevitablemente mermada, dada la imposibilidad de conocer la experiencia y criterios que sobre el tema en cuestión, pudieran aportar los laboratorios de Genética Forense, que por motivos de agenda de trabajo les ha sido imposible participar. Atendiendo, a las circunstancias aludidas, las exposiciones que se desarrollarán a continuación atenderán, de un lado, a un criterio legislativo, cuyo desarrollo recaerá en la figura de la Dra. Margarita Guillén y de otro, a un ámbito Bioético que expondrá este mismo coordinador del grupo de Bioética. Si bien, esperamos que durante la discusión que se establezca, respecto de las cuestiones tratadas, los diferentes representantes de los laboratorios privados expongan un esbozo sobre los criterios que sobre el tema del consentimiento puedan tener los citados laboratorios.

Finalmente, antes de iniciar el resumen sobre EL CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE PATERNIDAD, se ha de señalar, que cualquier exposición que se llevase a cabo, se alejaría de la realidad, si no nos asesorásemos respecto de los problemas que viven el colectivo de laboratorios que desarrollan parte de su actividad en este particular campo (las pruebas de paternidad), por este motivo, quisiéramos agradecer desde estas líneas, la información recibida de diferentes compañeros del Grupo Español y Portugués, concretamente de: Francisco Corte-Real, Conceção Vide, Joao Anjos, Mónica Carballo, Maviki Lareu, Nidia Modesti, Rogério Nogueira, Helena Geada, Dora Méndez, Alejandro Ruiz Trevisan, Lennie Pineda, Pilar Sanz, Yolanda Torres, José Andradas y Elena Rivas.

Resumen sobre generalidades del CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE PATERNIDAD

La información obtenida de los análisis genéticos puede dar lugar a consecuencias discriminatorias en áreas tales como la de sanidad, seguros, ámbito laboral, así como también en la propia vida familiar y social. Entre los

derechos que pueden verse afectados, cabe señalar, el derecho a la intimidad, la libertad, el derecho a la igualdad y no-discriminación.

Dada la naturaleza y las características específicas de los datos genéticos, así como del impacto que puede tener su utilización sobre la vida de las personas y de los miembros de su familia, es importante determinar los objetivos que pueden justificar el tratamiento del tipo de la información que venimos tratando.

Recientemente un Grupo de trabajo la Directiva 95/46/CE (2004), ha dirigido su atención sobre cinco ámbitos concretos, en relación con el uso inadecuado de la información obtenida de los datos genéticos, tales ámbitos se concretan en: Asistencia sanitaria / tratamiento médico, Empleo, Seguros, Investigación Médica y Científica e Identificación.

Identificación

Desde el punto de vista de la protección de datos, especial mención merece la información genética empleada con fines de identificación en las pruebas destinadas a determinar la existencia de vínculos familiares. En la mayoría de los casos, la realización de este tipo de pruebas se encuentra amparada por la decisión de un tribunal en un procedimiento civil y se somete al consentimiento explícito de las partes implicadas.

No obstante, en los últimos años se viene observando una verdadera proliferación de ofertas en Internet de pruebas genéticas destinadas especialmente a establecer la paternidad. Se trata de la comercialización de una tecnología que se viene haciendo desde hace años en los laboratorios de Genética Forense y que ahora como consecuencia del fenómeno de la oferta y la demanda se ha convenido en llamar «pruebas genéticas destinadas al público» o «pruebas genéticas a domicilio». Estos servicios son publicados en Internet y las muestras necesarias pueden tomarse sin el conocimiento del interesado y, por lo tanto, sin haber dado su consentimiento.

De acuerdo con lo señalado, no se nos oculta la necesidad de adoptar normas precisas destinadas a limitar la facilidad con la que se puede obtener el material genético, sin que la persona interesada lo sepa (y haya dado su consentimiento) y pueda utilizarse para realizar pruebas de paternidad o cualquier otro tipo de análisis.

Por este motivo, toda normativa relativa a los datos genéticos debe incluir el estatuto jurídico de las muestras de ADN, utilizadas para obtener la información de las características que venimos comentando. Entre las cuestiones que deberían ser abordadas, conviene, en particular, hacer hincapié en que la gestión, esto es en que el proceso de extracción, tratamiento, análisis, almacenaje, proceso de anonimización y destrucción de tales muestras debe someterse a la aplicación de una amplia gama de derechos del interesado.

Solicitud de pruebas de ADN por particulares: Cuestiones ético-legales

Margarita Guillén. Doctora en Derecho

1. Introducción

El problema que genera el análisis del ADN trasciende en ocasiones a la estricta órbita personal convirtiéndose en un problema de gran incidencia social en el cual lo legal y lo ético se entremezclan. Las biotecnologías presentan implicaciones éticas, jurídicas y sociales que sólo pueden ser abordadas desde planteamientos interdisciplinarios, y su regulación requiere previamente información rigurosa sobre los presupuestos fácticos reales. La legislación además se pospone en muchos casos ante el temor a nefastos efectos que puede llegar a producir, ya que el entusiasmo por las innovaciones tecnológicas y avances científicos hace olvidar a menudo que éstos no son éticamente neutrales, pues su aplicación puede producir transformaciones que afectan seriamente a los derechos fundamentales. El caso paradigmático se materializa en las posibilidades que brinda el estudio del ADN.

Como también sabemos de modo claro las posibilidades que brinda la prueba de ADN como material identificador se agrupa en tres grandes grupos:

- a) La identificación de vestigios biológicos de interés criminal
- b) La investigación biológica de la paternidad y/o maternidad en distintos supuestos
- c) Identificación de restos cadavéricos

Estos análisis se emplean sobre todo como medio probatorio o de identificación ante los tribunales. Estamos, por tanto, más acostumbrados a abordar la problemática que todas estas pruebas plantean desde un punto de vista judicial. A través de un proceso judicial se solicita un análisis que siempre será con alguno de los fines enumerados.

Este planteamiento cambia si pensamos en análisis pedidos por particulares directamente a los laboratorios.. En estos supuestos lo más frecuente es que a nivel personal se trate de averiguar la paternidad “real” propia o ajena (maridos “desconfiados”, madres “no seguras” o hijos mayores de edad que no desean presentar un procedimiento judicial y que quieren tener un conocimiento “privado de su filiación biológica”...y también supuestos en que se trate de averiguar paternidades y relaciones personales de terceros con todo tipo de intereses, incluso económicos).

En nuestro país no existe, en principio, regulación legal alguna sobre los análisis de ADN que puede llevar a cabo un laboratorio a instancia de un particular. Mientras en las pruebas judiciales es el órgano judicial que solicita el análisis quien debe establecer la extensión del mismo, en las pruebas extrajudiciales los requisitos de las mismas dependen de lo que establezca cada laboratorio. Sin embargo, los laboratorios si están sometidos a la regulación general en materia de intimidad, de patria potestad y de consentimiento informado y estos aspectos como pasamos a continuación a desarrollar aparecen afectados en las pruebas solicitadas por un particular.

2. Concepto de intimidad

Debemos, a la hora de determinar que es lo que los laboratorios deben ofrecer y que deben rechazar, reflexionar sobre conceptos como intimidad... No existe un concepto jurídico determinado para la intimidad genética, pero sí sobre la intimidad en general, que engloba aquella.

El derecho a la intimidad es un derecho fundamental establecido en el artículo 18 de nuestra Constitución. De un modo genérico podemos considerar la intimidad como la esfera en la que tenemos la facultad de excluir a terceros. Esta "exclusión de ajenos" viene condicionada por nuestro Tribunal Constitucional en una aplicación del principio de proporcionalidad, cuando establece que "un límite de cada derecho es respetar el derecho de los demás" (STC 2/82 de 29 de enero).

No vamos a entrar a abordar la cuestión del potencial informativo que puede conllevar el análisis del ADN como vulneración de la intimidad. A nivel doctrinal jurídico esta discusión sigue vigente, no así a nivel científico en la que entre otros motivos por criterios prácticos en los que se lleva a cabo el análisis se utilicen únicamente marcadores o loci cuyos alelos no van asociados a ningún tipo de información fenotípica¹. Esto que viene siendo así en el día a día de los laboratorios debe hacerse constar en los informes o en los cuestionarios que se adjuntan con la solicitud de la práctica de la prueba.

En relación con estos datos debe defenderse que respecto a las muestras, cuyo análisis puede dar lugar a una mayor información que la meramente identificadora, se asuman y adopten, en su caso, garantías de protección semejantes a las que suelen propugnarse en relación con otras pruebas corporales y con otros datos de carácter personal, como es la confidencialidad sobre esos datos, y en principio su no-utilización para fines distintos de los que fueron autorizados o para los que se consintió su obtención.

¹ Carracedo, A., "La huella genética", *Genética Humana. Fundamentos para...*cit. págs. 295 y ss.

Se puede tomar como premisa que si bien el derecho a la privacidad y el derecho a la intimidad están muy relacionados, no se trata de conceptos sinónimos². Podemos afirmar que el derecho a la intimidad sería una manifestación más específica o concreta de un derecho general a la privacidad.

La intimidad personal debe ser considerada como “el reducto más privado de la vida del individuo”³, incluyendo “aquellos extremos más personales de su propia vida”. La privacidad, incluiría aspectos más amplios, como la imagen o la propia identidad.

Si acogemos esta distinción, debemos considerar el derecho a la privacidad, no sólo como una libertad negativa, “right to be let alone” (derecho a ser “dejado en paz”), sino como una libertad positiva, como un derecho de autocontrol por parte del titular, de los datos que le afectan⁴.

No se cuestiona por aquellos que acogen la distinción, que el artículo 18.1 de la Constitución recoge, de este modo tanto un genérico, el derecho a la privacidad y más específicamente, un derecho a la intimidad, alcanzando ambos el rango de derecho fundamental con las consecuencias legislativas que conlleva (STS 13 de marzo de 1989 y STC 207/96).

En materia de solicitud de pruebas privadas no tendremos la problemática de la ingerencia en la intimidad respecto a la intervención corporal pues en general se referirán a pruebas sobre material genético propio (en el caso de filiación) o de disponibilidad por el solicitante (con los matices que ulteriormente estudiaremos) y por tanto no habrá una oposición a la toma de la muestra, pero el problema se extenderá al supuesto en que nos soliciten un análisis de un

² Esta posición no puede considerarse unánime. Un gran sector doctrinal identifica privacidad e intimidad o al menos, no refleja específicamente la diferencia: Perez Luño, A., “La intimidad como derecho fundamental” en *Derechos Humanos, Estado de Derecho y Constitución*, ed. Tecnos, Madrid, 1984, págs. 316 y ss.

³ Espín, E., “Los derechos de la esfera personal”, *Derecho Constitucional*, Vol I, vva. ed. Tirant lo Blanch, Valencia, 1991, pág. 181.

⁴ Aparisi Miralles, A., *El Proyecto Genoma Humano. Algunas reflexiones sobre sus relaciones con el derecho*. Ed. Tirant lo Blanch. pág. 128.

tercero que desconoce esa toma o se pretenda información que atañe a la privacidad de un tercero.

Se ha venido a propugnar por la doctrina que dentro del derecho a la intimidad tenemos el derecho a **la autodeterminación informativa** que surge con especial fuerza cuando nos planteamos el tratamiento automatizado de datos, pero en definitiva se deriva, de la idea de decidir por uno mismo cuándo y dentro de qué límites procede evaluar situaciones referentes a la propia vida, la facultad del individuo de decidir básicamente sobre el conocimiento y difusión de sus datos personales con lo que cabría concluir que incluso el análisis del ADN en cuanto que permite la identificación, incidiría en la intimidad personal en este aspecto pues vulnera la intimidad cualquier disponibilidad sobre nuestros datos personales incluso los meros datos identificativos.

Esta idea no es una mera disquisición personal en distintos países de nuestro entorno se empieza a asumir esa posible vulneración de la intimidad en las pruebas extrajudiciales.

3. La situación en Francia y Alemania

En Francia, curiosamente mucho antes que el establecimiento de una ley sobre bases de datos o sobre la propia pericia, se promulgó una ley que prohibió expresamente las pruebas identificadoras de ADN fuera de cualquier procedimiento judicial.

Con anterioridad a la promulgación de la legislación francesa sobre la prueba de ADN y a la vista del debate que empezaba a suscitarse, se emitió por el Comité Consultivo Nacional de Ética para las Ciencias de la Vida y de la Salud, el Dictamen de 15 de diciembre de 1989 sobre la difusión de las técnicas de identificación mediante el análisis del ADN.

En este dictamen se suscitan las cuestiones más importantes que plantean estas técnicas de identificación y se recomienda:

- Que las pruebas de identificación por análisis de ADN sean restringidas a ciertos laboratorios especialmente acreditados en razón de su

competencia y de una cualificación otorgada tras unos controles de calidad

- Que la realización de las pruebas no pueda tenerse en cuenta más que en decisiones judiciales.
- Que únicamente los laboratorios acreditados pueden ser considerados como expertos por los Tribunales⁵.

La *Commission Justice Pénale et droits de l'homme* para la reforma de ciertos aspectos penales y procesales, se manifestó acerca de la posibilidad y la necesidad de una reglamentación específica en materia de huellas genéticas como prueba científica en la justicia penal en cuanto afectan la libertad individual y a la integridad corporal.

El uso de análisis genéticos en Francia se reguló por la Ley 1994-653 de 29 de julio, por Ley nº 96-452, del 28 de mayo 1996 y por Ley 98-468 de 17 de junio de 1998. Estas leyes afectaron a distintas disposiciones legales francesas: al Código de Salud Pública de 1953, al Código Civil y al Código Penal fundamentalmente, que tras la reforma quedan afectados en algunos de sus artículos.

Así el Código de Salud Pública establece:

Art. 145-15

1. El examen de las características genéticas de una persona o su identificación por huellas genéticas, cuando no se realice en el marco de un procedimiento judicial, no podrá realizarse más que con fines médicos o de investigación científica y después de haber otorgado su consentimiento.

La Ley nº 94-653 del 29 de julio 1994, implicó la introducción de reformas del Código Penal, introduciendo una importante novedad en materia de tipificación penal sancionándose una serie de conductas relacionadas con identificaciones

⁵ Comité Consultivo Nacional Francés de Ética para las Ciencias de la Vida. "Avis sur l'évolution des pratiques d'assistance médicale á la procréation", *Journal International of Bioethics*, vol. 6, núm. 1, 1995.

genéticas llevadas a cabo con fines distintos de los legalmente previstos, en lo referido a las pruebas extrajudiciales tenemos:

Art.226-28.

1. El hecho de investigar la identificación de una persona por sus huellas genéticas con fines ni médicos ni científicos o que no sean resultado de diligencias de investigación o instrucción en el marco de un procedimiento judicial, se castigará con un año de prisión y 100.000 FF de multa.

2. Se castigará con las mismas penas el hecho de divulgar informaciones relativas a la identificación de alguien por sus huellas genéticas o proceder a la identificación de una persona por sus huellas genéticas, sin ser titular de la autorización prevista en el artículo 145-16 de Código de la Salud Pública.

En relación a las identificaciones genéticas en el procedimiento judicial de filiación el Art. 16-11 del Código Civil francés establece:

1. La identificación de una persona por sus huellas genéticas no podrá investigarse sino en el marco de diligencias de investigación o instrucción, dentro de un procedimiento judicial o con fines médicos o de investigación científica.

2. En materia civil, sólo podrá efectuarse esta identificación para cumplir un mandato del Juez competente en una acción tendente a aclarar una relación de filiación litigiosa, o para establecer o retirar pensiones, y deberá contarse con el previo y expreso consentimiento de la persona.

3. Cuando la identificación se efectúe con fines médicos o de investigación científica, debe contarse previamente con el consentimiento de la persona.

Art. 16-12

Las únicas personas habilitadas para proceder a las identificaciones por huellas genéticas son quienes hayan sido autorizadas de acuerdo con las condiciones requeridas mediante Decreto del Consejo de Estado. Para efectuarlo dentro del

marco de un procedimiento judicial, tales personas deberán además estar inscritas en la lista de peritos judiciales.

En este sentido existe una Comisión de autorización para la realización de pruebas periciales.

El Decreto nº 97-109, del 6 de febrero de 1997, regula de modo detallado las condiciones requeridas con el fin de autorizar a las personas habilitadas para proceder a identificaciones por huellas genéticas, en el marco de procedimientos judiciales⁶.

La comisión que depende del Ministerio de Justicia emite una autorización para proceder a identificaciones por huellas genéticas en el curso de un procedimiento judicial para un período de cinco años renovables. Esta autorización se concede a personas con una serie de titulaciones y deberán justificar, además trabajos o experiencia de nivel suficiente en las actividades de aplicación de la Biología Molecular. Art.4. La autorización prevista en el artículo 3 no podrá concederse sino a personas físicas o jurídicas inscritas en una de las listas establecidas en virtud del artículo 2 de la ley de 29 de junio de 1971 citada, referente a los peritos judiciales y al artículo 157 del Código de Procedimiento Penal.

La conservación de la autorización, así como su eventual renovación se subordinan a la participación de los titulares de la autorización a un control de calidad organizado por la Agencia del Medicamento, controles que se realizarán al menos dos veces al año enviando a la Comisión las memorias sobre control de calidad, que deben incluir un resumen que contenga especialmente las recomendaciones que permitirán mejorar la calidad de los análisis.

Se establecen igualmente unas Condiciones relativas a los laboratorios donde se efectúa la identificación de las personas por sus huellas genéticas.

⁶ Publicado en el Boletín Oficial de la República Francesa de 9 de Febrero de 1997

La autorización se retira por la Comisión en caso de llevar a cabo identificaciones que no sean las que la ley permite. Así como Negativa de la persona autorizada a someterse a los controles periódicos de calidad previstos en el artículo 7, u obtener de los mismos resultados insuficientes, o no comunicar a la Comisión las evaluaciones resultantes de los controles de calidad.

Realización de labores de identificación por huellas genéticas por personas o en situaciones que no se ajusten a las condiciones que se comunicaron a la Comisión y que justificaron la concesión de la autorización, su continuidad y su renovación.

Se comunicará también al Fiscal General del Tribunal del Apelación cuando la persona afectada se halle inscrita en el listado nacional de peritos.

Si bien es cierto que Francia ha sido y es en su legislación de los resultados más garantistas no debemos pensar que es una tendencia aislada. El Tribunal Federal Alemán ha invalidado con fecha 12 de enero de 2005 en dos procedimientos de filiación 227/03 y 60/03 dos análisis efectuados fuera del marco procesal dos pericias llevadas a cabo extrajudicialmente. Existe un anteproyecto de ley que ha suscitado un importante debate sobre la posibilidad de sancionar penalmente los análisis genéticos llevados a cabo sin el consentimiento del afectado. Concretamente se plantean los tests genéticos de filiación sin consentimiento de la madre. En este anteproyecto se prevé castigar no solo al solicitante de la prueba sino también a los laboratorios que realicen dichos tests. En el debate se plantea la necesidad de llegar a una normativa supranacional dada la facilidad de burlar estas limitaciones solicitando estas pruebas por medio de “kits on line” en otros países.

4. La situación en nuestro país

Nuestro Código Penal no establece, específicamente, una penalización de la vulneración de la intimidad genética, al contrario de lo que hace el Código Penal francés.

El Título X del Libro II del Código Penal se refiere a “Delitos contra la intimidad, el derecho a la propia imagen y la inviolabilidad del domicilio”. Dentro de dicho título en el Capítulo I relativo al “Descubrimiento y revelación de secretos” el artículo 197 establece:

1. El que para descubrir los secretos o vulnerar la intimidad de otro, sin su consentimiento, se apodere de sus papeles, cartas, mensajes de correo electrónico o cualesquiera otros documentos o efectos personales o intercepte sus telecomunicaciones o utilice artificios técnicos de escucha transmisión grabación o reproducción del sonido o de la imagen, o de cualquier otra señal de comunicación, será castigado con las penas de prisión de uno a cuatro años y multa de doce a veinticuatro meses.

2. Las mismas penas se impondrán al que sin estar autorizado se apodere, utilice o modifique, en perjuicio de tercero datos reservados de carácter personal o familiar de otro que se hallen registrados en ficheros o soportes informáticos, electrónicos o telemáticos, o en cualquier otro tipo de archivo o registro público o privado. Iguales penas se impondrán a quien sin estar autorizado, acceda por cualquier medio a los mismos y a quien los altere o utilice en perjuicio del titular de los datos de un tercero.

(...)

Respecto a lo establecido en el artículo 197 y 198 se pretende una exhaustividad en cuanto enumeradores de formas o medios de vulneración de los derechos que pretenden proteger, y no consiguen su propósito en tanto en cuanto no se produce ninguna referencia a las pruebas genéticas, cuando en el año 1995 ya estaban lo suficientemente desarrolladas como para contemplarlas.

En cualquier caso, si bien el artículo 197 y 198 podría aceptar una interpretación protectora de las posibles vulneraciones de la intimidad en materia de análisis genéticos, lo cierto es que no dejarían de ser interpretaciones en cierto modo ampliatorias de la letra del precepto por lo que se compatibilizan mal con los principios de derecho penal que exigen una interpretación restrictiva de la norma penal. No se ha planteado hasta ahora

denuncia por posible vulneración de la intimidad ante los Tribunales a través de estos artículos.

Evidentemente no existe una norma expresa (sería discutible desde un punto de vista doctrinal) que impida a los laboratorios realizar pruebas de ADN solicitadas por particulares. Ello no impide que los laboratorios tengan la obligación de preservar la intimidad tanto de los solicitantes como de terceros. Los laboratorios podrán en principio por tanto llevar a cabo una serie de pruebas debiendo garantizar que las personas que lo solicitan consienten debidamente a la prueba que se realiza o que tienen disponibilidad sobre la muestra que aportan. La casuística es muy prolija. En cualquier caso habrá desde la posición del laboratorio de tratar de garantizar la no ingerencia en la intimidad de las personas que no hayan renunciado voluntariamente a la misma.

4.1 La situación de las pruebas extrajudiciales

El hecho de que una conducta no sea delictiva no significa que esté permitida. Hay que plantearse qué conductas se pueden considerar contrarias a la intimidad de las personas y no sólo esto sino la necesidad de prestar el consentimiento informado por parte de todos los implicados, el cumplimiento de los deberes de la patria potestad conjunta en el caso de menores sobre los que se trata de averiguar la filiación y la ampliación de derechos como el de conocer la paternidad o la filiación, derechos reales pero no absolutos y no siempre ejercitables a costa de la intimidad de terceros sin el control judicial.

Como requisito mínimo sea cual fuera la prueba solicitada creo que no se deben llevar a cabo pruebas solicitadas por un anónimo. Este supuesto no es rebuscado: existen distintas páginas web que dan la posibilidad que se envíe un kit desde un apartado de correos a otro apartado de correos. Es decir el laboratorio admite que alguien no identificado remita dos muestras para por ejemplo averiguar si corresponden al mismo individuo o si existe paternidad. Garantizando así según publicitan de modo absoluto la confidencialidad y privacidad del solicitante (del solicitante desde luego, pero no del titular de las muestras ...).

Una primera premisa sería por tanto la identificación veraz del solicitante. En la solicitud de lo que se pide deberán figurar sus datos personales (DNI, pasaporte y fotocopia del mismo) y la solicitud deberá ir firmada. Aún cuando se realice la toma de muestras de modo personal se deberá llevar a cabo esta identificación.

En materia de averiguación de la filiación existen cuatro posibles solicitantes:

- Padre “legal”
- Madre
- Hijo
- Tercero, posible padre

En ocasiones se asevera, que en este caso bastará el consentimiento de uno de los titulares de la patria potestad. No debemos olvidar que la patria potestad se ejerce de modo conjunto por ambos progenitores conforme al artículo 154 del Código Civil y que en caso de desacuerdo en materias de trascendencia para el hijo los progenitores acudirán al Juez. Nuestro Código Civil también prevé la posibilidad de que en algún asunto el padre o la madre tenga un interés opuesto al de sus hijos en cuyo caso por el juzgado se le nombrará un defensor que lo represente en juicio y fuera de él. Hay que tener en cuenta que la averiguación de la filiación de modo extrajudicial puede estar afectando no sólo los intereses del otro progenitor o del que figure en el Registro Civil como tal sino también los intereses del hijo menor.

La regulación de la patria potestad nos hace reflexionar sobre la importancia de la concurrencia del consentimiento de padre y madre.

De tal forma de que si trata de confirmar una paternidad formalmente declarada se requerirá la plena identificación de que los padres figuran como tales (certificado de nacimiento del menor, libro de familia y DNI de ambos), se deberá prestar consentimiento informado por escrito de ambos y declarar que ninguno de ellos está privado de la patria potestad.

En los “kits on line” se hará igualmente de esta forma aunque es evidente que es mucho mas garantista que la toma de muestras se lleve a cabo en un laboratorio (bien el que realiza las pruebas u otro del grupo). Otra forma de garantizar la procedencia es que se cumplimente el kit ante notario.

En caso de ser un tercero que no figura inscrito formalmente como progenitor e debe consentir por los que figuren como tales (posible padre no matrimonial). Todo ello partiendo de la base de que se considere que no existen intereses contrapuestos con el hijo menor sobre el que en definitiva se está averiguando la filiación. En las pruebas extrajudiciales nada garantiza que ese hijo vaya a tener conocimiento del resultado de las pruebas con los derechos que puede conllevar.

Otras cuestiones a plantear es que si no solicitan los laboratorios los certificados de nacimiento en los que figura inscrito la madre y el padre “legales” podemos estar amparando investigaciones sobre identificación de madres biológicas de niños dados en adopción o incluso el de los individuos que hubieran aportado su material genético para la procreación y que tienen derecho al anonimato. Los laboratorios que no adopten una serie de garantías pueden estar auspiciando estas investigaciones que en muchos casos son ilegales. No basta además incluir una cláusula, como encontramos en la “publicidad” de muchos laboratorios en los que se trata de evitar responsabilidades. Así es frecuente leer cláusulas como:

“IMPORTANTE La Realización de la prueba sobre muestras obtenidos por medios distintos del hisopo. Ej. Pelos con raíz, sellos tiene un coste adicional de 52 euros pro muestra”

Es evidente que se plantean la posibilidad de recibir muestras sin el conocimiento de un tercero pues sino no tendría sentido esta puntualización.

Después de especificar todos los posibles modos de remisión y práctica del análisis es habitual que se advierta:

“Si se desea que la prueba pueda tener validez judicial las personas implicadas deben ponerse en contacto o nuestro laboratorio donde se les informará sobre la toma y envío de las muestras”.

Es evidente que los laboratorios que incluyen esta cláusula son conscientes de que las pruebas tal y como las realizan no tendrían validez judicial.

Un último ejemplo:

“El abajo firmante, mayor de edad, declara:

- 1. Que es una de las personas implicadas en la prueba de paternidad y por lo tanto donante de una de las muestras*
- 2. Que cuenta con el permiso o capacidad legal para la toma de muestra de la otra u otras personas implicadas en la prueba, conociendo las implicaciones penales en las que pudiera incurrir de acuerdo a la legislación vigente en cada país, referente al derecho a la intimidad de las personas*
- 3. Que realiza la prueba con un fin informativo personal, haciendo uso de su derecho a conocer cuales son sus padres o sus hijos biológicos”.*

Después de las reflexiones hechas entiendo que estas cláusulas que además mal aguantan cualquier envite jurídico únicamente salvaguardarían un posible derecho de repetición contra el solicitante pero nunca exoneraría de responsabilidad frente a terceros cuyos derechos hubieran sido vulnerados, bien porque realmente sea una de las personas implicadas, o bien porque el permiso que un tercero declara no exista o bien porque el fin con que se realizó la prueba no fue realmente el de conocer cual son su padres o hijos biológicos, derecho que por otra parte no es absoluto, puede estar contrapuesto al derecho de terceros y desde luego no es disponible, (yo conozco una determinada filiación propia o ajena o “la no- filiación” y con esta información, ya veré lo que haré).

Los ejemplos son múltiples, no hay más que darse una vuelta por la red para ver la variada oferta de servicios e informaciones que podemos alcanzar. Es cierto que en muchos casos no son laboratorios de la península si bien ofertan el modo de recogida en la misma a través de apartados de correos.

Sería conveniente establecer unos estándares éticos de mínimos, una recomendación de actuación en estos casos a los laboratorios del GEP-ISFG que realizan pruebas extrajudiciales. Entendemos que sería conveniente partir de la identificación de todos los sometidos al análisis, la identificación de los que ostenten la patria potestad en caso de filiación, la identificación de los menores y en todo caso el consentimiento informado de los mayores de edad.

Los estándares éticos darían lugar a una homogeneidad deseable si bien es cierto que existe un elemento desmotivador como es la facilidad por parte de los particulares de saltarse esos estándares acudiendo a laboratorios que o bien no formen parte de la GEP-ISFG o bien no estén en la península. Este argumento sin embargo también es aplicable a los elementos científicos y sin embargo ello no impidió que estén en vigor una serie de estándares que conllevan la calidad y fiabilidad de los análisis aunque hoy por hoy los tribunales y el legislador siga sin exigir prácticamente ningún requisito a cumplir por los laboratorios para poder presentar una prueba en juicio. Mucho tendrían que agradecer los órganos judiciales y el justiciable en definitiva, a la existencia de estos estándares y estos controles de calidad que hace que en la mayoría de los casos las pruebas que llegan a los tribunales sean de alto nivel científico aunque legalmente nada obligue a ello. Sería deseable en la misma línea por tanto también la vigencia de estándares éticos para la realización de pruebas solicitadas directamente por los particulares ante los laboratorios.

Informe de Tesorería

Iñaki Yurrebaso

Tesorero del GEP-ISFG

BALANCE ECONÓMICO DEL GEP EN EL PERIODO QUE VA DESDE EL 1 DE MAYO DE 2004 HASTA EL 30 DE AGOSTO DE 2005

CAPITAL TOTAL AL INICIO DEL PERIODO	17.051,38 €
CAPITAL TOTAL AL FINAL DEL PERIODO	13.681,62 €
BALANCE TOTAL AL FINAL DEL PERIODO	-3.369,76 €

1. BALANCE DE CUENTAS BANCARIAS EN EL PERIODO

MES	GASTOS		OTROS	INGRESOS		Balance
	GESTION BANCARIA			CUOTAS SOCIO Y CONTROL		
	Cajamadrid	B.B.K		Cajamadrid	B.B.K	
may-04	30,60 €		2.194,00 € ¹	858,99 €		-1.365,61 €
jun-04	12,37 €		1.721,94 € ²	783,17 €		-951,14 €
jul-04	12,34 €		708,92 € ¹	34,00 €		-687,26 €
ago-04	23,53 €		100,00 € ³	877,15 €		753,62 €
sep-04	17,51 €		149,78 € ²	618,97 €		451,68 €
oct-04	26,95 €		43,44 € ⁴	415,00 €		344,61 €
nov-04	18,34 €		300,00 € ³	641,30 €		322,96 €
dic-04	5,10 €		14,01 € ²	487,00 €		467,89 €
ene-05	30,00 €		3.512,40 € ²	836,02 €		-2.706,38 €
feb-05	41,33 €		5.872,04 € ⁵	802,01 €		-5.111,36 €
mar-05	11,79 €			1.035,50 €		1.023,71 €
abr-05	12,48 €		219,62 € ⁶	1.020,50 €		788,40 €
may-05	15,81 €			385,00 €		369,19 €
jun-05	45,69 €	13,55 €	1.000,00€ ⁷	1.336,00 €	1.421,00 €	1.697,76 €

DESGLOSE DE GASTOS DE CAJA

1. Correos 99.57€
2. Tela para realizar el control 5.40€
3. Etiquetas para sobres 4.80€
4. Prueba de página web 17€
5. Folios 25.88€
6. Lápiz de memoria 20.88€
7. Sobres 6.61€

3. PAGINA WEB PARA PAGOS.

Se recuerda a los socios que en la web se encuentran las diferentes formas de pago tanto para las cuotas de socio como para el pago del ejercicio colaborativo.

http://www.gep-isfg.org/ISFG/Control_de_calidad/formas_pago.php

Informe de Secretaría

Leonor Gusmão
Secretaria del GEP-ISFG

Desde o dia 4 de Junho de 2004, foram aceites no grupo 28 novos sócios filiados em 18 novos laboratórios dos seguintes países:

Brasil - 3
Colômbia - 1
Equador - 2
Espanha - 6
Suiça - 1
México - 1
Portugal - 1
USA - 1
Venezuela - 2

Actualmente, o número total de sócios pertencentes ao GEP-ISFG é de 372, distribuídos por 146 laboratórios de 21 países diferentes:

Argentina - 19
Bolívia - 2
Brasil - 23
Colômbia - 18
Costa Rica - 2
Cuba - 1
Equador - 4
El Salvador - 1
Espanha - 43
França - 1
Honduras - 1
México - 3

Panamá - 1

Paraguai - 1

Peru - 3

Portugal - 10

Republica Dominicana - 1

Suiça - 1

Uruguai - 3

USA - 1

Venezuela - 7

ACTA DA ASSEMBLEIA GERAL GEP-ISFG

Leonor Gusmão
Secretária do GEP-ISFG

Numero de sócios presentes no inicio da mesma: 40

Laboratórios participantes

- Instituto Nacional de Toxicologia y Ciencias Forenses de Madrid. Espanha
- Instituto Nacional de Toxicología. Departamento de Barcelona. Espanha
- Laboratori Analitic de la DGSC. Departament d'Interior. Generalitat de Catalunya. Espanha
- Lab. Investigacion de Paternidade, UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- Laboratorio Genomik CA. Maracay, Venezuela
- Laboratorio Investigacion de Paternidade, UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, Brasil
- Unidad de ADN. Sección de Bioquímica. Dpto. Ciencias Forenses. Poder Judicial de Costa Rica. San Joaquín de Flores, Costa Rica
- Laboratorio de Análisis Clínicos y Moleculares. LACYM S.A. San José, Costa Rica
- Instituto Nacional de Toxicología. Departamento de Sevilla. España
- Unidad de Polimorfismos Genéticos, IDEA. Caracas, Venezuela
- Comisaría General Policía Científica. Madrid, Espanha
- Laboratorio de Policía Científica. Lisboa, Portugal
- ABI Expert Training Center. São Paulo, Brasil
- Laboratorio de Genética e Identificación Forense. Univ. Zaragoza, Espanha
- Laboratorio de Genética. Instituto Anatómico Forense. Facultad de Medicina. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Espanha
- Genomic Engenharia Molecular Ltda. São Paulo, Brasil
- Laboratorio de Biología Forense. Dpto. de Toxicología y Legislación Sanitaria. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Espanha
- IPATIMUP. Porto, Portugal
- Laboratório de DNA forense. Departamento de Polícia Técnica. Bahia, Brasil
- Servicio de Biología Forense. Instituto de Medicina Legal. Coimbra, Portugal

- Instituto de Medicina Legal de Valencia. Espanha
- Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá, Colombia
- Laboratorio de Genética Humana. Quito, Equador
- Laboratorio Biomolecular. Cuenca, Equador
- Dpto. de Medicina Legal. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. Espanha
- Policia Científica de la Ertzaintza. Espanha.

No dia treze de Setembro de dois mil e cinco, em Ponta Delgada (Açores, Portugal), realizou-se a Assembleia Geral dos associados do grupo, com a presença de 40 sócios no início da mesma.

Abre a sessão o **Presidente do GEP** agradecendo a todos os participantes das X Jornadas de Genética Forense, especialmente à responsável pela organização do último controlo de qualidade e aos responsáveis pela apresentação e discussão dos resultados do mesmo. Agradece ainda à FCT – Fundação para a Ciência e a tecnologia e patrocinadores Bioportugal e Applied Biosystems, pelo seu apoio à realização das presentes jornadas.

Seguidamente toma a palavra a **Secretaria do GEP** informando que, desde o dia 4 de Junho de 2004, foram aceites no grupo 28 novos sócios filiados em 18 novos laboratórios dos seguintes países: Brasil - 3; Colômbia – 1; Equador – 2; Espanha – 6; Suíça – 1; México – 1; Portugal – 1; USA – 1; Venezuela – 2. Actualmente, o número total de sócios pertencentes ao GEP-ISFG é de 372, distribuídos por 146 laboratórios de 21 países diferentes: Argentina – 19; Bolívia – 2; Brasil – 23; Colômbia – 18; Costa Rica – 2; Cuba – 1; Equador – 4; El Salvador – 1; Espanha – 43; França – 1; Honduras – 1; México – 3; Panamá – 1; Paraguai – 1; Peru – 3; Portugal – 10; Republica Dominicana – 1; Suíça – 1; Uruguai – 3; USA – 1 e Venezuela – 7.

Intervém o **Vice-Presidente do GEP** chamando a atenção para o facto de, após consulta da lista de sócios da ISFG, ter verificado que:

- Um elevado número de sócios do GEP não se encontra nessa mesma lista;

- Existem sócios da ISFG pertencentes a países de língua Espanhola e Portuguesa que não são sócios do GEP;
- Alguns sócios do GEP, aparecem com 2 números diferentes de sócio.

De forma a tentar resolver a irregularidade a que se refere a primeira alínea, decidiu-se que, na admissão de novos sócios, deve requerer-se o envio de cópia de aceitação da inscrição, com indicação do respectivo número de sócio, da ISFG. O mesmo deverá ser requerido a todos os sócios do GEP que não constem na base de dados da ISFG, alertando-se para a obrigatoriedade de se ser sócio da ISFG para poder pertencer ao GEP.

Toma a palavra o **Tesoureiro do GEP** para informar sobre a gestão económica, durante o período de 1 de Maio de 2004 a 30 de Agosto de 2005, detalhando que o total de gastos foi de 17 154,16 euros e de ingressos 13 364,54 euros, com um balanço negativo de 3 789,62 euros. O capital total no final deste período é de 13 681,62 euros.

O tesoureiro recorda ainda que estão indicadas na pagina web as diferentes formas de pagamento, tanto para as quotas de sócio como para a participação no exercício colaborativo.

Retoma a palavra o **Vice-Presidente** para apresentar a nova página web do grupo e comentar que já se encontra activada a nova plataforma de pagamento online através de cartão de crédito. Refere a necessidade de se fazer a tradução do conteúdo da página ao Português e Inglês e pede a ajuda de voluntários. António Amorim e Martin Whittle oferecem-se para levar a cabo esta tarefa.

È discutida a necessidade de se encontrar um novo coordenador para o grupo de trabalho em Paternidades. Após diversas opiniões, decide-se mediante votação, extinguir o grupo de trabalho em paternidades, passando as suas funções a estar integradas no grupo de estatística. O resultado da votação é de 40 votos a favor, 0 contra e 0 abstenções.

António Amorim pede a substituição de Luísa Pereira na coordenação do grupo de trabalho em genética não humana, por pedido de escusa da mesma. É votada a proposta de que os Coordenadores deste grupo passem a ser António Amorim e José J. Pestano Brito, com o resultado de 40 votos a favor, 0 contra e 0 abstenções.

Os coordenadores do grupo de trabalho em cromosoma Y propõem que se alargue o âmbito deste grupo de trabalho ao estudo de marcadores do cromossoma X, proposta esta que é aprovada por unanimidade dos presentes. São feitas duas propostas para uma nova designação deste grupo de trabalho:

Proposta A - Grupo de trabalho em cromossomas sexuais;

Proposta B - Grupo de trabalho em cromossoma XY.

Foi aprovado que a partir de agora este grupo de trabalho passa a designar-se por “Grupo de trabalho em cromossomas sexuais”, tendo a proposta A obtido 28 votos, a proposta B dez, e duas abstenções.

Tendo-se tratado o tema do aumento, para o próximo ano, das quotas de sócio e de participação no controle de qualidade, por votação, estando todos os presentes a favor e, não tendo havido votos contra nem abstenções, foi aprovado:

- Não aumentar a quota de sócio, mantendo-se esta em 17 euros;
- Aumentar a quota de participação no controle de qualidade, sendo este de 125 euros para aqueles laboratórios interessados apenas em participar em paternidade e 150 euros para aqueles que participam em paternidade e forense.

Seguidamente, foram discutidos os prazos limite de pagamento das quotas.

No que respeita à quota de sócio no GEP-ISFG, foi proposto suspender todos os sócios com mais de 2 anos de quotas em atraso e, no caso daqueles que

pretendessem retomar a sua actividade no grupo, deveriam pagar o valor correspondente a dois anos de atraso. A proposta acima referida foi votada, tendo sido aprovada com 38 votos a favor, dois contra e zero abstenções.

No que respeita o pagamento da quota de participação no controle de qualidade, propôs-se estabelecer o dia 31 de Março do ano a que respeita o controle, como data limite para o pagamento da respectiva quota, sendo que os resultados dos laboratórios que não tiverem pago a quota no prazo estimado, não serão aceites, bem como não será emitido o respectivo certificado de participação. Além disso, em cada ano, a participação dos laboratórios no controle de qualidade está condicionada à regularização de todas as dívidas pendentes, até 31 de Outubro do ano anterior ao que respeita o exercício. As propostas acima referidas foram votadas, tendo sido aprovadas com 40 votos a favor, zero contra e zero abstenções.

Retoma a palavra o **Presidente** para discutir o tema da realização das próximas jornadas do GEP-ISFG. Eduardo Arroyo propõe-se organizá-las em Madrid, durante a primeira semana de Junho, proposta esta que é votada e aprovada com 40 votos a favor, zero contra e zero abstenções.

Relativamente à análise dos resultados do exercício colaborativo, e no sentido de melhorar e incentivar as medidas de correcção dos erros detectados, deliberou-se o seguinte: Quando os especialistas encarregados pelo coordenador do exercício detectarem falhas graves devem comunicá-las, acompanhadas das sugestões de medidas correctoras, ao presidente do GEP, que delas dará conhecimento ao coordenador. Este, por sua vez, informará os laboratórios por forma a que se possa verificar, através dos resultados do exercício de ano seguinte, se foram postas em prática as medidas sugeridas.

Face à complexidade de análise dos resultados do exercício teórico, foi sugerido à coordenadora do exercício do próximo ano que se proceda à formulação de um exercício teórico envolvendo um parentesco simples e sem complicações de

tratamento formal e um “paper challenge” envolvendo situações mais complexas. Apenas os resultados do primeiro serão incluídos no certificado a emitir.

Não havendo mais temas a tratar, o Presidente dá por finalizada a Assembleia Geral