

XI Jornadas de Genética Forense
Madrid, 1-2 Junio de 2006

Organizado por:

Dep. de Toxicología y Legislación Sanitaria
Universidad Complutense de Madrid
España

Boletín informativo nº 10

GEP-ISFG

Febrero 2007

INDICE

1. Resumen del Ejercicio de Polimorfismos de ADN del año 2006

Julia García-Hirschfeld – Unidad Garantía Calidad, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Madrid (España)

2. Resultados STRs autosómicos

María José Farfán – Sección de Biología, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Sevilla (España)

3. Resultados ADN mitocondrial

Lourdes Prieto y Marta Montesino – Laboratorio Biología–ADN, Comisaría General de Policía Científica, Madrid (España)

4. Resultados Cromosomas sexuales

Leonor Gusmão y António Amorim – IPATIMUP, Oporto (Portugal)

5. Resultados muestra forense

Daniel Corach – Servicio de Huellas Digitales Genéticas. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires (Argentina)

6. Resultados paternidad práctica

África Domínguez – Sección de Biología, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Sevilla (España)

7. Resultados paternidad teórica

Oscar García – Sección de Genética Forense, Área de Laboratorio Ertzaintza, Erandio, Bizkaia (España)

8. Ejercicio de interpretación de secuencias de ADN mitocondrial

Manuel Crespillo – Sección de Biología, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Barcelona (España)

9. Grupos de Trabajo del GEP-ISFG

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

10. Informe de Tesorería

Iñaki Yurrebaso – Tesorero 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

En este resumen se exponen los datos correspondientes al Ejercicio del año 2006 en su 13ª edición. Estos datos han sido expuestos en las XI Jornadas del Grupo Español y Portugués de Genética Forenses de la ISFG (GEP-ISFG) que tuvieron lugar en Madrid los días 1 y 2 de junio.

El ejercicio está dividido en dos partes: una Prueba de Paternidad, que consiste en un ejercicio práctico y un cálculo estadístico sobre una paternidad teórica, y, por otro lado, una Prueba Forense. Sólo 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. Además en este año se ha introducido la **novedad** de separar el ejercicio teórico de paternidad en dos partes: una más básica que se incluye en el certificado de participación (emitido con posterioridad a las Jornadas para aquellos laboratorios que lo solicitan); y otra consistente en un supuesto complejo de estudio de paternidad que no se incluye en el certificado, *Paper Challenge*, que se discutió en un Curso de Estadística realizado con anterioridad a las XI Jornadas.

1.- Ejercicio 2006

1.1.- Muestras enviadas

2006/ Ejercicio de Paternidad 2006/ Ejercicio Forense

M1: sangre de mujer

M2: sangre de mujer

M3: sangre de padre

M4: sangre de hija

M5: muestra de referencia

M6: mancha forense recibida en laboratorio

M7: muestra cabello (sólo para mtDNA; 2 fragmentos de cabello. Se trata de un duplicado, consiste en misma muestra)

1.1.1.- Ejercicio de Paternidad

Se remitieron cuatro manchas de sangre (M1-M4). Cada una contenía 100 µl de muestra. La sangre fue extraída a personas voluntarias sanas; tras la extracción, 100 µl fueron depositados en tarjetas de papel Whatman Bioscience (celulosa prensada) dejando secar las manchas al aire hasta el momento de introducirlas en los sobres de envío.

1.1.2.- Ejercicio Forense

Se remitieron seis manchas, cinco de ellas de sangre (M1-M5) y una mancha forense (M6), así como una muestra de cabello (M7: dos fragmentos de cabellos distintos del mismo donante, contaminados con saliva).

Las cuatro primeras manchas (M1-M4) son comunes al Ejercicio de Paternidad, que realizan todos los laboratorios que participan en el Ejercicio Forense.

La muestra de referencia del caso forense, M5, consistió en 75 µl de sangre que se depositaron en Tarjetas FTA, dejando secar las manchas al aire.

La mancha forense (M6) consistió en 80 µl de una mezcla de saliva preparada con 50% procedente de la donante de la muestra M5 y 50 % de saliva de un menor no relacionado genéticamente con ninguno de los otros donantes. Se aplicó la mezcla de saliva en tarjetas de papel Whatman Bioscience dejando secar las manchas al aire.

La muestra de cabello (M7) consistió en dos cabellos cortados a un menor del que no se aporta muestra de referencia y contaminados con saliva de la donante de M5.

1.2.- Planteamiento propuesto

1.2.1.- Ejercicio de Paternidad 2006

1.2.1.1.- Paternidad práctica

Se trata de un supuesto de Filiación en el que se solicita la investigación de la maternidad biológica de M1 y M2 con respecto a la recién nacida M4. Se dispone de muestra obtenida del padre biológico (M3) y de tres mujeres. Una de ellas (donante de M4) es hija del donante de M3 y de una de las otras dos mujeres. Siguiendo el código que se adjunta, determine cuál de las dos mujeres puede ser la madre biológica de la recién nacida (donante de M4):

- **M1:** Sangre de mujer
- **M2:** Sangre de mujer
- **M3:** Sangre de padre
- **M4:** Sangre de hija

¿Puede la mujer donante de M1 ser la madre biológica de M4 siendo M3 el padre?

¿Puede la mujer donante de M2 ser la madre biológica de M4 siendo M3 el padre?

1.2.1.2.- Paternidad teórica

Se trata de calcular una paternidad en la que **P** es el posible padre de **H** y **M** la madre de **H**. Dados los resultados de la tabla que se adjuntó (apartado 5.1 del formulario enviado) y usando las frecuencias alélicas que se adjuntaban (apartado 5.2), **calcule la probabilidad de la paternidad de P respecto de H.**

¿Qué conclusión presentaría en un informe pericial a la vista de los resultados obtenidos?

Además de este ejercicio se envía un Paper Challenge, no incluido en el certificado, para ser discutido en el Curso de Estadística que precede a las Jornadas de este año.

1.2.2.- Ejercicio Forense 2006

La donante de M5 denuncia una agresión. Se sospecha como responsable de la misma del individuo donante de la muestra M3. En el laboratorio se reciben las muestras M5, M6 y M7 según el código que se adjunta:

- **M5:** Muestra de referencia
- **M6:** Mancha forense recibida en el laboratorio
- **M7:** Muestra de cabello

1.2.2.1.- ¿Puede la mancha (M6) recibida en el laboratorio corresponderse con una mezcla? Establezca los posibles componentes de la misma. ¿Está presente el donante de M3? ¿está presente el donante de M5?

1.2.2.2.- ¿Puede el cabello enviado (M7) pertenecer al donante de M5? ¿Puede pertenecer al donante de M3?

1.3.- Antecedentes

1.3.1.- Ejercicio de Paternidad 2006

- La mujer donante de la muestra M1 **no** es la madre de la menor donante de la muestra M 4.
- La mujer donante de la muestra **M2 es la madre** de la menor donante de la muestra M4. Las donantes de M1 y M2 son hermanas de padre y madre.
- El donante de la M3 es un varón, padre de M4.
- La menor donante de M4 es hija los donantes de M2 y M3 y sobrina materna de la donante de M1.

1.3.2.- Ejercicio Forense 2006

- La muestra M5 es sangre indubitada de una mujer no relacionada genéticamente con el resto de participantes.
- La muestra M6 es una mezcla de saliva de la mujer donante de la muestra M5 y saliva de un varón menor. Estos individuos **no** están relacionados genéticamente entre sí ni con los donantes del ejercicio de paternidad.
- La muestra M7 se preparó con 5 ml de saliva procedente de la donante de M5 y cabellos cortados a un menor; se colocaron en una placa Petri y se dejó secar recubierta de papel de filtro. El menor donante del cabello es el mismo que el donante de la fracción de saliva de procedencia desconocida de la muestra M6.

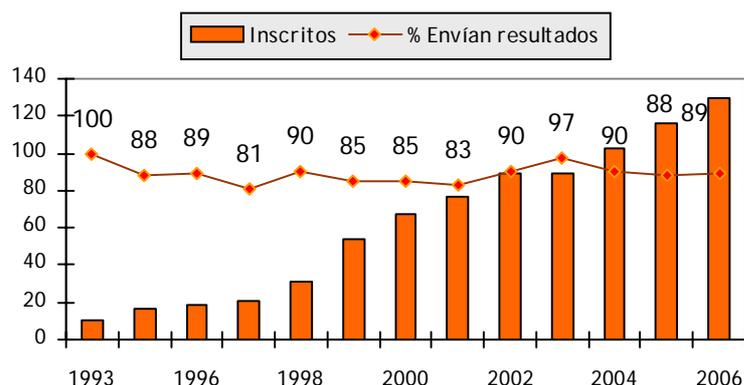
- El menor donante de cabello y de la saliva presente en la mezcla está relacionado matrilinealmente con los donantes de M3 y M4 del ejercicio del GEP-ISGF de 2005.
- El donante de la muestra M3 no está presente en la mancha forense (M6) ni en la muestra de cabello (M7).

1.4.- Participación

- Número laboratorios inscritos 130
- Número laboratorios que emiten resultados 115 (88%)
- Número laboratorios con resultados de ADN mitocondrial 40 (35%)
- Número laboratorios que aportan resultados para STR Y 61 (53%)
- Número laboratorios que reciben muestra forense (M6) 69 (53%)
- Número laboratorios con resultados para M6 55 (80%)
- Número laboratorios que analizan la muestra de cabello 33
- Número sistemas analizados por conjunto de laboratorios 99*
- Número de sistemas consensuados 50 (51%)

*: nótese la diferencia respecto a lo indicado en el informe preliminar, debido a problemas de nomenclatura

El ejercicio lleva realizándose ya 13 años, a lo largo de los cuales se ha ido produciendo una incorporación constante de laboratorios al grupo GEP-ISFG, de forma que cada año se incrementa el número de laboratorios inscritos (solicitan participar, son miembros del grupo y se les envía muestra) así como el número de



laboratorios que emite resultados. Como viene sucediendo en los últimos ejercicios, alrededor del 10 % de los laboratorios inscritos no remite resultados (ver gráfico).

De los 130 laboratorios inscritos en el Ejercicio 2006, 52 de ellos son europeos (37 España, 12 Portugal, 1 Francia, 1 Italia y 1 Suiza) y 78 americanos (17 Argentina, 22 Brasil, 1 Bolivia, 16 Colombia, 1 Costa Rica, 1 Cuba, 4 Ecuador, 1 El Salvador, 3 México, 1 Panamá, 1 Perú, 1 República Dominicana, 3 Uruguay y 6 Venezuela).

Hay 60 laboratorios privados (mayoritariamente americanos, 42) mientras que 59 son públicos (30 americanos) y 11 laboratorios de los que no se dispone de esta información.

En este Ejercicio se han inscrito 17 nuevos laboratorios que en su mayoría realizan solo Prueba de Paternidad (12, frente a 5 que realizan también el Ejercicio Forense), nueve de los cuales son europeos y los 8 restantes americanos.

2.- Aspectos metodológicos

El aspecto metodológico es uno de los más difíciles de evaluar de una manera objetiva, puesto que no se incluye en el certificado y además existe la posibilidad de aportar más de un procedimiento metodológico en un mismo laboratorio, por lo que la participación en estos apartados se realiza de una forma menos exhaustiva.

De los datos aportados por el conjunto de laboratorios se puede deducir que es el apartado en el que se produce más variabilidad en el relleno del formulario, de manera que la evaluación nos va a dar una idea aproximada del conjunto de participantes pero no un detalle real del procedimiento de análisis empleado por cada laboratorio en concreto.

Teniendo esto en cuenta, en conjunto se observa que se utiliza mayoritariamente Fenol-Cloroformo para la extracción de ADN con distintos procedimientos de lavado y concentración del extracto (38 laboratorios), seguido en número de usuarios por la

utilización de Chelex (27) y FTA Purification Reagent (25), así como con menor número de laboratorios, otros Kits comerciales de extracción (QiaMP, DNA IQ) en lo que se refiere a las muestras indubitadas; con semejante distribución para las muestras forenses. Dado que, en las instrucciones que acompañaban a las muestras no se advertía, de la contaminación presente en el cabello (muestra M7), solo dos laboratorios indican haber realizado lisis diferencial en esta muestra.

Se mantiene la mejora tecnológica continua en el conjunto de laboratorios participantes, tanto por el sistema de detección, como por el sistema de cuantificación, empleándose tecnología de PCR a tiempo real como método de cuantificación por un número creciente de participantes.

No obstante, sorprende el dato que se viene observando a lo largo de los años de un gran número de participantes que, o bien no lo especifican, o no utilizan ningún sistema de evaluación de la calidad del extracto de ADN previo al análisis genético del mismo. Hay 47 laboratorios que no indican nada en este apartado, 24 cuyo análisis incluye Minigel Agarosa/BrEt como manera de evaluar la calidad del ADN extraído. Igualmente hay 22 laboratorios que realizan este control con técnicas Fluorimétricas o Espectrofotométricas, mientras que ya son 14 laboratorios los que utilizan una tecnología de PCR a tiempo real para la cuantificación del ADN, lo cual supone un sistema de evaluación de la calidad y cantidad de ADN que permite evaluar si el extracto es adecuado para un análisis de ADN nuclear (o mitocondrial en algunos casos) así como ajustar la carga de ADN molde en las reacciones de PCR para el tipaje genético de marcadores polimórficos de una forma muy fiable.

Por otro lado, se observa en este ejercicio cierto crecimiento en el número de laboratorios que utilizan metodología manual, con Nitrato de Plata para el análisis genético; sorprendentemente del total de laboratorios recién incorporados (17) hay 3 que utilizan este tipo de detección.

En conjunto, 20 laboratorios emplean tecnología manual para algunos o la totalidad de

los marcadores que analizan (18 laboratorios con Nitrato de Plata, 1 con Marcaje Radioactivo, y 1 con Tinción SYBR Green I). Cuando la tecnología de detección empleada es automatizada, se realiza mayoritariamente con sistemas tipo ABI (en sus distintas versiones: 377, 310, 3100, 3100 Avant...)

3.- Resultados

De los 115 laboratorios que este año han enviado resultados, 114 participan con diferentes STRs, hasta un total de 99 sistemas. Hay 61 de estos laboratorios que analizan Y-STRs; 40 participan analizando además ADN mitocondrial y 33 de ellos envían resultados correspondientes a la muestra de cabello. Un laboratorio envía solo datos de la paternidad teórica.

Asimismo hay un laboratorio que solicitó participar pasado el plazo de inscripción por lo cual ha sido considerado sólo para intercambio de resultados, y otros dos laboratorios que habiendo solicitado participar, no remitieron los resultados en plazo y sus datos no han sido tenidos en cuenta ni en esta memoria ni en el análisis de los datos presentado en las Jornadas ni constan en la página web del grupo.

69 laboratorios solicitan participar en la prueba forense y envían resultados un total de 55 laboratorios (80% de los que la reciben) para la muestra M6, 26 de los cuales realizan además estudio del ADN mitocondrial en esta muestra. Además analizan la muestra M7 de cabello, 33 laboratorios (48% de los que la reciben).

El conjunto de laboratorios que envía resultados analiza un total de 99 marcadores y se obtiene consenso en 50 de ellos; el resto son sistemas generalmente analizados por uno o dos laboratorios (49 marcadores).

3.1.- Resultados consensuados

Los resultados consensuados se adjuntaban en tablas en el Informe de Resultados

que consta en la página web del grupo (ver 1. Datos Generales). Tal y como consta en dicho archivo, los marcadores en los que se ha obtenido consenso son los siguientes:

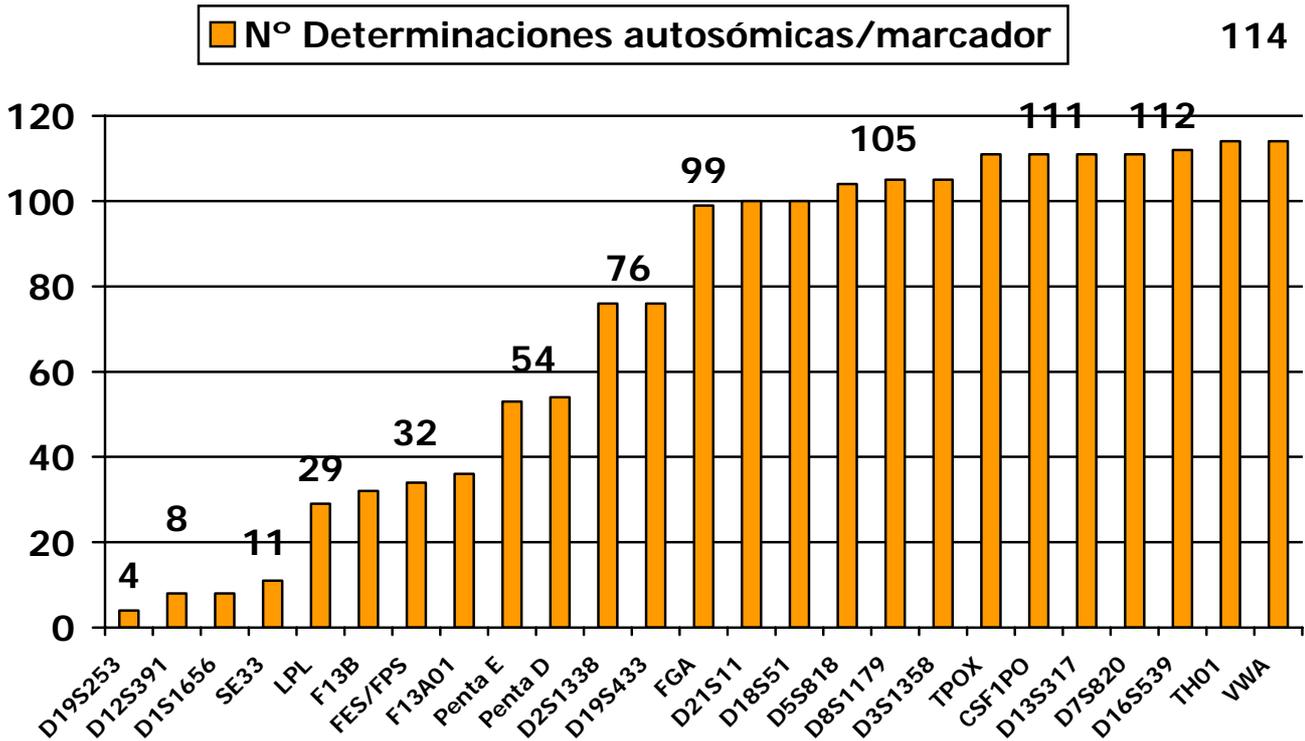
- FES/FPS, TH01, F13A01, VWA, TPOX, CSF1PO, FGA, F13B, LPL, SE33, D1S1656, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, Penta D y Penta E como STR autosómicos.
- DYS19, DYS385, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439 (GATA A4), GATA A10, DYS460 GATA A7.1, DYS461 GATA A7.2, GATA C4 (DYS635), GATA H4, DYS458, DYS 456 y DYS448 como Y-STRs.
- HPRTB, DXS7132, DXS7423, DXS8378 y GATA172D05 como X-STRs, además del marcador de sexo Amelogenina.

Los sistemas más utilizados son los comprendidos en kits comerciales: Identifiler y PowerPlex 16 o en Yplex; este año se observa un aumento del número de laboratorios que utilizan X-STRs, así como algunos que informan de la utilización de miniSTRs.

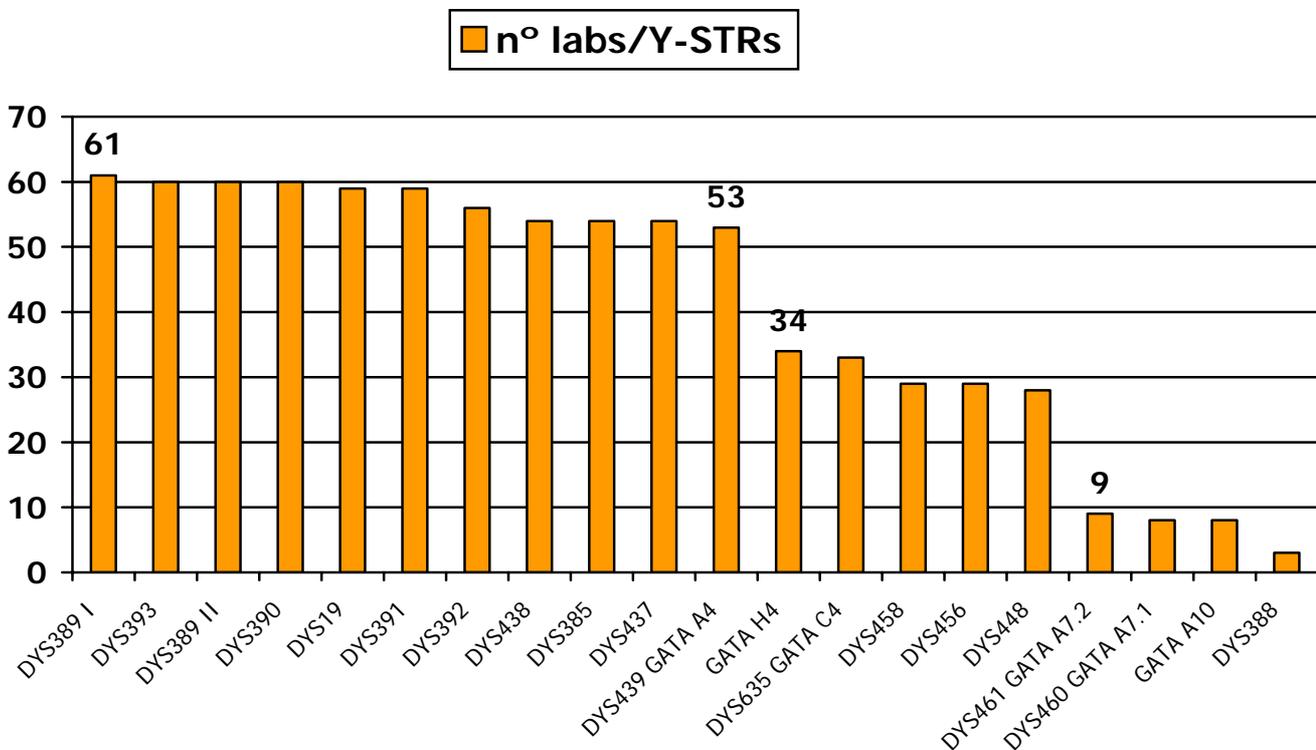
Por primera, vez el envío de resultados se ha dividido en tablas en función del tipo de STR que cada laboratorio analiza. Pasamos a detallar el número medio de marcadores analizados por laboratorio en función del tipo de marcador:

STR autosómicos:	16 ± 4 (rango 8-33)
Y-STRs:	16 ± 1 (rango 4-20)
X-STRs:	6 ± 3 (rango 1-12)

En el siguiente histograma se muestra el número de laboratorios que emplea cada marcador autosómico, observándose cómo los mayoritariamente utilizados son los contenidos en los kits comerciales ya comentados.



Los marcadores TH01 y VWA son analizados por **todos** los laboratorios que emiten resultados de STR autosómicos (n=114); todos los laboratorios que analizan Y-STRs emplean DYS389 I, DYS390 y DYS393 (n=61); y como ya se ha comentado, se observa un importante crecimiento en el número de laboratorios que analizan X-STRs aunque para algunos de los marcadores con una participación muy baja. Se ha obtenido consenso en 7 de ellos (para algunas muestras). La Amelogenina como marcador de sexo es analizada en un total de 91 laboratorios. En los siguientes histogramas se puede apreciar el número de laboratorios que utiliza cada marcador Y-STRs de los consensuados.



El nº de **laboratorios** con alguna discrepancia es de 55 para STRs. Algunas 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. Es interesante resaltar que se sigue observando una mayor producción de discordancias en los laboratorios que emplean tecnología manual comparado con los que emplean detección automática. En la tabla 1 se detalla el recuento de determinaciones totales autosómicas así como la influencia de la sistemática de detección en el número de discordancias detectadas en el presente ejercicio. Puede verse cómo el conjunto de determinaciones autosómicas analizadas con detección manual da lugar a casi tres veces más discordancias que las determinaciones realizadas automáticamente (4'654 % para detección manual frente a 1'61 %).

Tabla 1

Nº determinaciones autosómicas		Detec. manual	Detec. automática
Nº determinaciones	9110	1098	8012
Nº discordancias	174	45	129
%	1.91	4.654	1.61

El uso de Y-STRs se mantiene en constante crecimiento, siendo menor las discrepancias observadas en estos marcadores (ver tabla 4) pero con el inconveniente añadido de que los errores implican una incorrecta adjudicación del haplotipo. Se ha detectado que en estos marcadores siguen produciéndose problemas de nomenclatura que, en algunos casos, dificultan la obtención del consenso, lo que sucede con GATA H4 (referencia 1 en Bibliografía).

Respecto a los X-STRs se viene observando un progresivo crecimiento en los laboratorios que utilizan estos sistemas, con la particularidad de que el resultado consensuado no se corresponde con el dato correcto. Este hecho es especialmente evidente para el marcador HPRTB. En la tabla de los resultados consensuados se informa del tipaje que obtiene esta consideración, pero paradójicamente no es el correcto, dado que existe bibliografía (referencias 2 y 3 en Bibliografía) que respalda como correcto el resultado aportado por una minoría de participantes, que sería el que se adjunta a continuación:

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
HPRTB	12/13	13	12	12/13	13/14	13/14

El análisis detallado de las discordancias observadas en cada uno de los apartados de que consta el ejercicio son analizados en más profundidad por los expertos que presentaron en las Jornadas el resultado de su interpretación. En esta memoria será incluido también el estudio realizado por cada uno de ellos (ver más adelante).

3.1.1.- Resultados de Ejercicio de Paternidad

3.1.1.1.- Ejercicio de Paternidad Práctica

Realizan el estudio 114 laboratorios. Cada uno de los laboratorios participantes tiene la libertad de emplear las técnicas y marcadores genéticos que use de rutina en su práctica habitual. Por este motivo hay un gran número de marcadores analizados por el conjunto de laboratorios, tanto STR autosómicos como Y-STRs (en el caso de Paternidad de este año, al ser la menor una mujer, no aportaba información al ejercicio), como algunos laboratorios X-STRs.

A la pregunta planteada de si la mujer donante de M1 puede ser la madre biológica de la menor o si puede ser la mujer donante de M2, contestan 112 laboratorios. **Todos contestan correctamente**, es decir, se excluye a la mujer donante de la muestra M1 como madre de la menor donante de M4; no se puede excluir a la donante de M2 como madre de la menor, y no se dudaba del padre donante de M3.

Hay por tanto dos laboratorios que habiendo participado en el análisis de las muestras no dan información sobre la pregunta planteada.

La exclusión de la maternidad se fundamentaba en la incompatibilidad genética detectada entre ambas mujeres (M1 y M4) habiéndose detectado en 7 marcadores autosómicos consensuados (VWA, CSF1PO, D18S51, D2S1338, Penta E y F13A01), y en 1 X-STR consensuado además de otros marcadores que, aunque no alcancen suficiente número de laboratorios utilizándolos, evidencian la incompatibilidad en otros 8 marcadores autosómicos (de los 30 que no consensuan).

La donante de M1 se excluye por dichos marcadores en número variable según el total de marcadores analizados en cada laboratorio. **Todos** los laboratorios

(112) que han contestado a la pregunta realizada sobre si las donantes de M1 o M2 pueden ser la madre biológica de M4, dan la contestación correcta también en este apartado, es decir, se **excluye a M1 como posible madre de la menor**.

8 laboratorios analizan Y-STRs a pesar de que en el planteamiento propuesto este tipo de estudios no aportaba ningún dato a la resolución de la paternidad planteada, pero dado que el donante de M3 se indicaba como implicado en el caso forense, ha podido ser empleado por los laboratorios como control interno.

3.1.1.2.- Ejercicio de Paternidad Teórica

Se trataba de calcular una paternidad en la que **P** es el posible padre de **H** y **M** la madre de **H**.

Dados los resultados de la tabla que se adjuntaban en el formulario enviado y usando las frecuencias alélicas que se adjuntaban, se debía **calcular la probabilidad de la paternidad de P respecto de H**.

Han aportado resultados un total de 114 laboratorios. Los datos consensuados constan también en el resumen del ejercicio publicado en la página web, sin incluir los datos de X e Y como consenso, pues la estrategia utilizada depende de cada laboratorio; solo se supone consenso en el dato de IP parcial y de IP total.

Para este ejercicio teórico, de los 114 laboratorios que han participado hay 22 laboratorios que presentan alguna discrepancia o diferencia con respecto al valor que se ha considerado consensuado.

Los datos son analizados con mayor profundidad en el apartado correspondiente analizado por Oscar García, Vicepresidente del GEP-ISFG,

que propuso este ejercicio.

3.1.2.-Resultados Ejercicio Forense 2006

El ejercicio forense consiste en dos muestras dubitadas (M6 y M7) que habían de compararse con otras dos muestras indubitadas (M3 y M5, esta última no relacionada con el supuesto de maternidad).

3.1.2.1.- Resultados de la Muestra forense M 6 (mancha forense)

En este apartado se comentan los resultados referentes a la muestra dubitada M6 (tomando como muestras de referencia a M3 y M5). Como ya se ha expuesto, realizan el estudio 55 laboratorios. **Todos** los que analizan esta muestra M6 describen la existencia en la mancha de más de un componente. Todos los laboratorios participantes descartan la presencia de M3.

Respecto a la pregunta planteada en el formulario de si puede estar presente M5, **todos** los que contestan a la pregunta **indican que está presente el donante de M5** excepto un laboratorio que excluye la presencia de este componente.

Del total de laboratorios que dice realizar análisis preliminar en el estudio de la muestra forense, 15 detectan la presencia de saliva por diferentes técnicas (amilasa positiva por distintos test, Phadebas, visualización de células epiteliales, etc.). Hay por el contrario tres laboratorios que indican no detectar saliva tras varios análisis preliminares.

Otros analisis preliminares fueron también realizados por los laboratorios para la detección de otros fluidos biológicos (semen, sangre, orina) en su mayoría negativos excepto en dos laboratorios: uno que detectó la presencia de sangre de naturaleza humana y otro que detectó una cabeza de espermatozoide, lo

que le sugirió que la mezcla contuviera semen.

En los resultados del genotipado de los marcadores autosómicos para M6 se comenten un gran número de discordancias (124 para STRs autosómicos, de 878 determinaciones, ver tabla 3). De los 55 laboratorios con resultados, 35 presentan alguna discordancia, bien en los resultados aportados para marcadores STRs o en ADN mitocondrial, aunque algunas son puntuales o errores de transcripción, otras evidencian una mala calidad en el análisis de este tipo de muestras, contaminación de muestras, defectos en la extracción, pérdida alélica, etc. En la revisión de los datos discordantes se han supervisado gran número de registros y se confirma la baja calidad de los mismos.

Hay 11 labs con una sola discordancia en M6, en ocho de los cuales es la única discordancia observada en el conjunto de resultados aportado por el laboratorio.

Es especialmente significativo lo que sucede en el caso del marcador D21S11 para esta muestra:

- √ 19 laboratorios tienen discordancia en esta muestra para este marcador.
- √ En un 26 % de ellos es su único error
- √ Se considera que el valor consenso es 28,30 (aportado por 32 de los laboratorios, 63%, que participan en este marcador para esta muestra), ya que se conoce el tipaje de la muestra indubitada M5 para este marcador (30) así como el del donante de la saliva dubitada que compone la mezcla (28,30).
- √ Hay 12 laboratorios que informan de un tipaje común: 28,29,30, que difiere del resultado considerado como consenso.

Si realizamos un recuento del número de determinaciones realizadas para los marcadores autosómicos consensuados y la distribución de discordancias

obtenida podemos ver hasta un 14'14 % de discordancia para el análisis de la muestra M6 (ver tabla 3):

Tabla 3

	M3	M5	M6
Nº determinaciones autosómicas	878	878	878
Nº discordancias	3	4	124
%	0'34	0'46	14'14

Estos datos referidos exclusivamente a los resultados de marcadores autosómicos implicados en el ejercicio forense, es decir, si hacemos un recuento del total de determinaciones realizadas para las tres muestras del ejercicio forense (sin tener en cuenta datos de aquellos laboratorios que analizan la M3 como parte de su participación exclusivamente en el ejercicio de paternidad) muestran una gran incidencia de discordancias en la muestra forense (M6: mezcla de salivas de M5 y un donante desconocido).

La mayoría de discordancias se producen por la pérdida alélica correspondiente a la fracción minoritaria de la mezcla, pero también se han detectado otro tipo de errores, que dan idea de una mala extracción, errores de transcripción, contaminación de muestras, etc. Aún así hay un importante grupo de laboratorios que obtienen todos los alelos en todos los marcadores que analizan para la muestra M6, 20 laboratorios de los 55 que dan resultados para esta muestra (36 %) y si tenemos en cuenta los 11 que solo tienen pérdida alélica para un solo marcador serían 56 % de los participantes.

Menor incidencia tiene en conjunto de datos, las discordancias de los marcadores Y-STRs (ver tabla 4) si bien la repercusión práctica de los errores cometidos en estos marcadores afecta solo a este ejercicio, dado que el caso

práctico de paternidad, como ya se ha visto, implica la participación de un solo varón. Conocer el haplotipo de Y-STR de la muestra M3 (padre de la menor) no contribuye en este ejercicio a la resolución del planteamiento propuesto. No es posible obtener una conclusión clara en lo que se refiere a X-STRs debido a la irregular e insuficiente participación en esta muestra.

Tabla 4

	M 3	M 6
Nº determinaciones Y-STRs	633	646
Nº discordancias	8	11
%	1'26	1'7

3.1.2.2.- Resultados de la Muestra forense M 7 (muestra de cabello):

La **muestra forense M7** se envía para ser analizada exclusivamente por ADN mitocondrial (ver más adelante 3.1.3.- *Resultados de ADN mitocondrial*).

A la pregunta de si el cabello encontrado (M7) pertenece a M5, contestan 31 laboratorios (aunque son 33 los laboratorios que envían datos correspondientes al análisis genético de esta muestra). 28 de ellos concluyen de forma correcta que se puede excluir que el cabello pertenezca a la donante de M5 o alguien relacionado matrilinealmente.

Cuando se pregunta si el cabello encontrado puede pertenecer a M3, responden 32 laboratorios de los que 30 excluyen que pueda pertenecer a M3 y dos indican una respuesta que parece diferir de los resultados del análisis de ADN mitocondrial que realizan.

3.1.3.- Resultados ADN Mitocondrial

Un total de 40 laboratorios realizan estudios de ADN mitocondrial. De ellos 33 analizan la muestra de cabello (M7) y 26 laboratorios estudian el ADN mitocondrial de la muestra forense (M6). En este caso, al tratarse, como en ejercicios anteriores, de una mezcla es muy difícil determinar cual es el resultado consenso (ver datos de consenso en el resumen de la página).

Nº de laboratorios con resultados iguales a los consensuados

M 1:	30 de 36 (83 %)
M 2:	30 de 35 (86 %)
M 3:	33 de 40 (82 %)
M 4:	30 de 36 (83 %)
M 5:	26 de 36 (72 %)
M 6:	23 de 26 (88 %)
M 7:	27 de 33 (81 %)

El número de laboratorios con discrepancia para los resultados de ADN mitocondrial es de 16, la mayoría de los cuales ya presentaban discrepancias en los análisis de STRs. El análisis de ADN mitocondrial, como ocurre en los Y-STRs, da lugar a la generación de un haplotipo determinado; por lo tanto, presentar un resultado discordante en una de las regiones analizadas (bien sea HVI, HVII o HVIII) daría lugar a una discordancia en el haplotipo asignado. No obstante, en la evaluación actual de los datos se consideran las regiones analizadas por separado, de forma que un laboratorio puede tener correctamente analizado y generado el resultado para HVI pero no para HVII.

Este hecho, al igual que sucede en los resultado de los marcadores Y-STRs, será revisado para futuros ejercicios y los correspondientes certificados de participación.

Parece recalculable que en las muestras de referencia los resultados obtenidos indiquen un importante grado de discordancia (cercano al 20 %), en proporción semejante al de los resultados obtenidos en las muestras forenses, lo que es especialmente sorprendente en la muestra M5 (25 % de discordancia) que consistía en una muestra indubitada, y, al igual que en las muestras indubitadas del ejercicio de paternidad, de sangre.

Se observa un mayor porcentaje de concordancia en el análisis de la muestra forense M6. El número de laboratorios participante en la **muestra M6** es inferior al que analiza la muestra de cabello ya que algunos laboratorios indican en el formulario que no realizan de manera habitual el estudio de ADN mitocondrial en las mezclas; si bien también hay algún laboratorio que indica no realizarlo en su rutina habitual, habiéndolo efectuado sólo a modo de control para este ejercicio.

Para la muestra M7, de cabellos, hay una mayor incidencia de discordancias en el haplotipo observado por el conjunto de laboratorios, encontrándose hasta 6 laboratorios con discordancia en esta muestra.

4.- Conclusiones

4.1.- Conclusiones paternidad práctica

Todos los laboratorios participantes contestan correctamente a la resolución de la paternidad, que en realidad se trataba de una maternidad.

Cuando se producen discordancias en los resultados de genotipado, éstos no dan lugar a problemas en la resolución del supuesto, por lo que la relevancia de las discordancias son puntuales y no afectan a la capacidad del laboratorio para resolver el ejercicio planteado. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la importancia de estas discordancias.

Hay muchos laboratorios que no aportan el dato del análisis estadístico, desconocemos si la razón de no aportar este dato se debe a que no sería posible llegar a un consenso en el dato numérico cuando cada laboratorio utiliza diferentes frecuencias alélicas o si los laboratorios no aportan en su casuística este dato.

Asimismo, es importante recalcar ciertas interpretaciones del tipo: *'la madre biológica de M4 es M2'* como todo comentario en las observaciones al supuesto.

4.2.- Conclusión ejercicio forense

4.2.1.- Conclusión muestra forense (M6, mezcla)

Todos los laboratorios participantes detectan la presencia de la mezcla, avalados por los resultados obtenidos con los diferentes sistemas estudiados.

En la composición de la mancha había muestra de dos individuos no relacionados genéticamente, pero sólo se aportaba la muestra de referencia del componente mayoritario, con lo que se desconocía el componente minoritario. Este hecho puede haber dado lugar a que los laboratorios no informen de los alelos minoritarios, ya que no eran compatibles con el donante de M3 (que se informaba como posible sospechoso), no habrían repercutido en la valoración del supuesto planteado, sólo indican la exclusión del sospechoso.

Se preguntaba si en el supuesto de que la muestra estuviera formada por una mezcla, era compatible con el donante de M3. **Todos** los laboratorios participantes **descartan la presencia del donante de M3** en la mezcla, lo que es correcto.

No obstante, estos resultados pueden denotar una baja capacidad del laboratorio para detectar componentes minoritarios en casos de mezclas; las técnicas analíticas actuales (ver referencia 4 en Bibliografía) permiten la detección de los alelos derivados de una mezcla hasta en proporciones de 1:10, y aunque

desconocemos la proporción de las correspondientes fracciones de la mezcla enviada, hay suficiente número de participantes que detectan todos los alelos componentes de la misma.

Asimismo, por la proporción inicial de fluidos con la que fue preparada la mezcla (50 % de cada componente), aunque en el caso de la saliva se producen muchas variaciones en la cantidad de ADN que contiene la muestra, parece que los laboratorios que trabajan en genética forense debieran tener capacidad de detectar los dos componentes de la mezcla, como ha sucedido en un grupo de participantes (20 laboratorios informan de todos los alelos para todos los marcadores en la muestra M6).

4.2.2.- Conclusión muestra de cabello (M7):

Un elevado número de laboratorios informan correctamente a la pregunta planteada referente a la muestra de cabello.

En el ejercicio del año 2005 se envió una muestra de cabello contaminada y este hecho se anunciaba en el formulario. Como se pudo concluir de los resultados de ese ejercicio (ver referencia 5 en Bibliografía), existía una estrecha relación entre el procedimiento de extracción empleado y la obtención de un perfil mezcla o dos componentes diferenciados, de forma que aquellos laboratorios que empleaban la lisis diferencial como manera de extraer el ADN del cabello aportado, tenían más probabilidad de obtener dos perfiles diferenciados.

En el presente ejercicio, no se informó en el formulario de la contaminación que recubría a la muestra de cabello, para tratar de analizar si los laboratorios realizaban un proceso de lavado o de lisis diferencial previo al análisis de ADN mitocondrial. Para nuestra sorpresa, los laboratorios no indican haber realizado este proceso. Aún así, el porcentaje de acierto o coincidencia con el haplotipo consensuado es superior al 75% de los participantes.

4.3.- Conclusión paternidad teórica

Se daba como base de datos de referencia la del INTCF de Madrid con el fin de unificar los resultados. No obstante el conjunto de datos que coinciden con el consenso es amplio aunque sigue observándose un alto número de laboratorios con datos muy dispersos.

Participan 114 laboratorios y, si bien existe un valor común de índice de paternidad parcial en muchos laboratorios y para la mayoría de los marcadores hay algunos datos discordantes. Como consecuencia, el índice de paternidad global presenta una gran dispersión.

Se observan datos de laboratorios en los que la IP parcial aportada no coincide con la razón entre los datos de X e Y que adjuntaron en la tabla, lo que hace sospechar de un error de transcripción, copia de datos...

En la presentación de este apartado que se realizó durante las Jornadas, se explicó una aproximación estadística al análisis de los resultados aportados por los laboratorios. Sin embargo, no es el tratamiento más razonable. Ese tipo de análisis se realiza un simple cálculo de la media y la desviación estándar de los datos recibidos. Se presentó este análisis (y consta así en la presentación que la coordinadora realizó en las jornadas) para tener una idea de la distribución de los datos conjuntos, aún cuando no parece el tratamiento más adecuado para este tipo de estudios ya que es importante tener en consideración la estrategia utilizada por cada laboratorio. En el resumen que Oscar García realiza de este apartado se presenta un detalle de cada uno de las discordancias detectadas, lo que, a la vista de los datos recibidos, es un tratamiento más adecuado de los mismos.

En cualquier caso, estamos lejos de tener baja incidencia de discordancias aún cuando se aportan los datos de frecuencias a emplear, lo que justifica que en el grupo y a través del ejercicio se sigan planteando ejemplos simples que puedan

favorecer una respuesta concordante en el conjunto de participantes sin perjuicio de que se planteen casos más complejos en ejercicios tipo *Paper Challenge* como se ha realizado por primera vez en el presente ejercicio.

En el segundo supuesto teórico planteado *Paper Challenge*, participan menos laboratorios (n=76), por distintas razones. Bien por no incluirse en el certificado (participación voluntaria), por no haber detectado en los avisos enviados que el ejercicio de la página web tenía un supuesto no incluido en el formato enviado con las muestras, o por el grado de complejidad que implicaba el supuesto.

La interpretación de las preguntas planteadas 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. Estos datos han sido comentados ampliamente por expertos en el Curso de Estadística que precedió a las Jornadas.

5.- Bibliografía

1. Gusmao et al. 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* 157: 187-97 (2006).
2. Zarrabeitia et al. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome *Forensic Sci Int* 129: 85 (2002)
3. Huang et al. Linkage of the gene for an X-linked mental retardation disorder to a hypervariable (AGAT)_n repeat motif within the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) locus (Xq26). *Am J Hum Genet* 49: 1312-1319 (1991)
4. Gill et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int* 160: 90-101 (2006)
5. García-Hirschfeld et al. 2004-2005 GEP proficiency testing programs: special

emphasis on the interlaboratory analysis of mixed stains. ICS 1288: 855-857
(2006)

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE STRS AUTOSÓMICOS EN EL EJERCICIO
COLABORATIVO GEP-ISFG 2006**

María José Farfán

Sección de Biología

Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses

Sevilla

España

En este ejercicio se han analizado un total de 99 marcadores de ADN nuclear que incluyen 98 STRs y un marcador de sexo (amelogenina). De entre todos ellos se obtuvieron resultados consensuados para 49 STRs y la amelogenina (ver Tabla 1).

Tabla 1. Marcadores de ADN nuclear analizados y consensuados

Marcadores	Analizados	Consensuados
STRs	98	49
Autosómicos	54	24
Crom. Y	25	19
Crom. X	19	6
Amelogenina	1	1
Total	99	50

Como se viene observando en los años anteriores, el mayor porcentaje de sistemas consensuados respecto del total analizados se ha observado en los STRs del cromosoma Y (76%, 19/25), mientras que para los STRs autosómicos se han obtenido resultados consensuados para un 44% de los sistemas analizados (24/54). Hay que tener en cuenta que uno de los requisitos para considerar un sistema como consensuado es que haya sido analizado al menos por 5 laboratorios y en este

ejercicio ha habido 23 STRs autosómicos que han sido analizados únicamente por un único laboratorio (seis laboratorios son los responsables de este dato), 5 por dos laboratorios, uno por tres laboratorios y otro por cuatro laboratorios.

Conviene recordar que en la asamblea del GEP-ISFG de 2004 se decidió que los sistemas no consensuados no serían analizados ni incluidos en el informe final de resultados, lo cual supuso que se redujera de 50 (en 2004) a 16 (en 2005) el número de sistemas no consensuados, con un aumento de sólo 2 marcadores consensuados. En este ejercicio se ha observado un nuevo repunte del número de sistemas no consensuados (30), permaneciendo idéntico el número de sistemas consensuados. De los 14 sistemas nuevos respecto de 2005 que no han logrado consenso, 12 han sido analizados únicamente por un único laboratorio y 2 por dos laboratorios, siendo en total cinco laboratorios los que han emitido resultados para estos marcadores.

Para los 24 STRs autosómicos consensuados, a cuyo estudio nos ceñiremos en adelante, se han contabilizado un total de 9110 determinaciones entre las que se han observado 174 discrepancias (1,9%). No obstante, si no se considera la muestra M6, ya que al tratarse de una mancha con mezcla de saliva de dos personas presenta una problemática particular, la tasa de discrepancia se reduce al 0,6% (50 discrepancias en 8233 determinaciones), ligeramente inferior a la observada en los dos años anteriores para las muestras en las que no se detectó mezcla (0,7% en 2005 y 0,8% en 2004).

Como ya se ha adelantado, la muestra para la que se observó una mayor tasa de discrepancias fue M6 (14%) debido principalmente a las dificultades inherentes al análisis de STRs autosómicos en una mezcla. No obstante, aunque considerablemente elevada, esta tasa es marcadamente inferior a la observada para STRs autosómicos en la muestra M6 del ejercicio de 2004 (27%), que también consistía en una mezcla, si bien era más compleja al tratarse de saliva y semen.

Tabla 2. Número de determinaciones y % de discrepancias para los marcadores consensuados

Muestra	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Total
Nº determinaciones	1812	1814	1812	1812	983	877	9110
Nº discrepancias	9	11	12	14	4	124	174
% discrepancias	0,5	0,6	0,7	0,8	0,4	14,1	1,9

De los 114 laboratorios que emitieron resultados, 52 (46%) presentaron discrepancias en los resultados, aunque el porcentaje se reduce a un 20% si se excluye de este cálculo la muestra M6. De los 59 laboratorios que no analizaron la muestra M6, el 27% (16/59) emitió algún resultado discrepante, frente al 65% (36/55) de los laboratorios que incluyeron el análisis de la muestra M6. De estos 36 laboratorios, 29 sólo registraron discrepancias en M6 y tan sólo 1 no emitió ningún resultado discrepante para M6, que claramente ha sido la fuente principal de las discordancias observadas en este ejercicio.

Dadas las particularidades de la muestra forense M6 y que los resultados para esta muestra se han analizado con más profundidad en un apartado específico, en adelante nos referiremos al conjunto de datos obtenidos para los STRs autosómicos **excluyendo la muestra M6.**

De los 114 laboratorios, hay 23 que emiten resultados discrepantes. Cabe destacar que la mitad de las discrepancias se concentran en 6 laboratorios (ver Tabla 3), hecho que se viene observando de forma repetida en las ediciones anteriores del ejercicio.

Tabla 3. Número de discrepancias por laboratorios sin considerar muestra M6.

Nº discrepancias	Nº labs	Nº total discr.	
0	91	0	
1	12	12	
2	2	4	} 17 labs } 25 discrep. (50%)
3	3	9	
4	5	20	
5	1	5	} 6 labs } 25 discrep. (50%)
TOTAL	114	50	

Las 50 discrepancias detectadas en los 24 STRs autosómicos consensuados se distribuyen según se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Distribución de las discrepancias en STRs autosómicos consensuados.

Marcador	Nº det.	Nº discr.	% discr.	Marcador	Nº det.	Nº discr.	% discr.
D1S1656	36	6	16,7	D8S1179	477	2	0,4
F13A01	151	8	5,3	CSF1PO	502	2	0,4
SE33	54	2	3,7	TH01	515	2	0,4
LPL	128	2	1,6	D7S820	502	1	0,2
D13S317	502	6	1,2	VWA	515	1	0,2
D2S1338	350	3	0,9	D18S51	456	0	0,0
D16S539	507	4	0,8	FGA	453	0	0,0
FES/FPS	151	1	0,7	D21S11	452	0	0,0
D3S1358	477	3	0,6	Penta D	248	0	0,0
TPOX	502	3	0,6	Penta E	244	0	0,0
D19S433	350	2	0,6	F13B	142	0	0,0
D5S818	473	2	0,4	D12S391	37	0	0,0

El sistema para el que se detectó una mayor tasa de discrepancia fue D1S1656, debido a que dos laboratorios de los ocho que analizaron este marcador no detectaron alelos intermedios presentes en tres de las muestras analizadas. No obstante, en términos absolutos, el sistema para el que se detectó un mayor número

de discrepancias fue F13A01 para el que, curiosamente, los dos laboratorios responsables de las 8 discrepancias observadas emitieron exactamente los mismos resultados para las muestras M1 a M4, discordantes en una unidad de repetición por debajo del resultado consenso. Tan sólo en 7 de los 24 STRs autosómicos consensuados no se registró ningún resultado discordante. La tasa de discrepancia registrada para los sistemas del CODIS fue del 0,4%, ligeramente inferior a la global (0,6%).

De las 50 discrepancias observadas, 6 se debieron a errores de transcripción del resultado obtenido al formulario final, otras 6 a la no detección de alelos intermedios en el marcador D1S1656, 5 consisten en la asignación como alelo de artefactos de la amplificación y detección tales como bandas *stutter* o picos *pull-up*, 17 se originaron por una asignación de alelo errónea respecto del patrón alélico utilizado, 1 se originó por una incorrecta asignación del tamaño de los fragmentos de ADN detectados y 15 son de naturaleza desconocida, ya que para 2 de ellas no constan en los registros enviados resultados para las muestras con resultados discrepantes y para las 13 restantes no se han enviado los correspondientes registros (geles o electroferogramas).

En cuanto a la metodología empleada cabe destacar que el método de extracción de ADN más utilizado (39/113 labs) fue el convencional con fenol/cloroformo, bien seguido de precipitación con etanol o bien de concentración/purificación con columnas Centricon o Microcon, y a continuación le siguen la extracción con Chelex (29/113) y el método FTA (25/113), seguidos por otros, principalmente basados en el uso de columnas de extracción de diversas casas comerciales.

Llama la atención que 61 laboratorios, de los 113 que informan de la metodología empleada, no cuantifican ADN, si bien 22 de ellos realizan electroforesis de ADN en gel de agarosa para comprobar su calidad. El método de cuantificación más empleado es el basado en espectrofotometría, observándose un aumento respecto de años

anteriores de los laboratorios que utilizan la cuantificación mediante PCR a tiempo real como método de cuantificación de ADN nuclear y algún laboratorio lo usa también para cuantificación de ADN mitocondrial.

Para la amplificación de ADN la mayoría de los laboratorios utilizan kits comerciales, en su mayoría multiplex, siendo el kit AmpF/STR[®] Identifiler™ (Applied Biosystems) el más ampliamente usado (65/113 labs) bien de forma exclusiva o bien combinado con otros kits o *primers* propios, seguido por el kit PowerPlex[®] 16 System (Promega), utilizado sola o conjuntamente con otros por 43 de los 113 laboratorios. Sólo 7 laboratorios usan exclusivamente *primers* y *ladders* propios.

La mayoría de los laboratorios (94/113) hacen uso de detección automatizada, frente a una minoría (19/113) que lo hace mediante detección manual, principalmente electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con plata. Los equipos automatizados más ampliamente usados fueron los de *Applied Biosystems*, destacando entre ellos el ABI310. La tasa de discrepancia es considerablemente mayor en los sistemas detectados con tinción con plata frente a los detectados de forma automatizada.

En resumen, de lo expuesto se pueden extraer las siguientes

CONCLUSIONES

- La tasa de discrepancia observada en los 24 STRs autosómicos consensuados fue del 1,9%, si bien excluyendo del cálculo a la mancha forense en la que se observó una tasa de discrepancia del 14%, la tasa observada para las muestras de referencia fue del 0,6%.

- Excluyendo la mancha forense, 6 laboratorios son responsables del 50% de las discrepancias.

- Se ha podido determinar el origen de las 35 discrepancias (de 50) de las que se dispone de registro electroforético:
 - 17: asignación alélica errónea (4 en ABI310!!)
 - 6: errores de transcripción
 - 6: no detección alelos intermedios
 - 5: artefactos (*stutter, pull-up...*)
 - 1: asignación tamaño errónea (en ABI310!!)

- La tasa de discrepancia es mayor en marcadores analizados con *primers/ladder* propios y detección con plata.

RECOMENDACIONES

- Comprobar concordancia resultados finales/registros

- Cuantificar ADN, en caso necesario diluir

- Usar patrones alélicos de calidad

- En geles, extremar precauciones en asignación alélica

- En sistemas automáticos, SIEMPRE:
 - Revisar estándar interno de tamaño
 - Respetar umbral detección
 - Diluir en caso de saturación de señal
 - Analizar con *ladder* “cercano” a muestra problema
 - Evitar modificaciones “manuales”

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL EN EL EJERCICIO
COLABORATIVO GEP-ISFG 2006**

Lourdes Prieto y Marta Montesino

Laboratorio de ADN

Comisaría General de Policía Científica

Madrid

España

1.- ANTECEDENTES

Como bien sabéis, la Unidad de Garantía de Calidad del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (Delegación de Madrid) nos propuso este año el análisis de siete muestras denominadas M1 a M7. Las muestras M1 a M4 formaban parte del ejercicio de paternidad (maternidad en este caso) y consistían en cuatro manchas de sangre correspondientes a dos presuntas madres (M1 y M2), un padre (M3) y una hija (M4).

Las muestras M5 a M7 formaban parte del ejercicio forense y consistían en una muestra de referencia procedente de una víctima y consistente en una mancha de sangre (M5), y dos muestras dubitadas consistentes en una mancha incolora (M6) y una muestra de pelos (M7). Se cuestionaba en este ejercicio si M6 pudiese ser una mezcla, si en la misma pudiese haber participado M3, si pudiera haber participado M5 y, finalmente, si M7 pudiera proceder del donante de M5.

Tras el envío de los resultados por parte de todos los laboratorios, se nos informó, en cuanto al ejercicio de maternidad, que era la donante de M2 la madre real de M4, si bien, la donante de M1 era hermana de M2, por lo que los estudios de ADNmt no permiten descartar o incluir a una de las dos como madre de la donante de M4 (ambas poseen el mismo haplotipo coincidente con el evidenciado en M4).

Por otro lado, respecto al ejercicio forense, la muestra M6 consistía en una mezcla de salivas de M5 (mujer no relacionada genéticamente con los anteriores donantes M1-M4) y de un varón del cual no se ha proporcionado muestra indubitada. Por su parte, la muestra M7 consistía en dos fragmentos de pelo del varón anteriormente referenciado impregnados en saliva de la donante de M5. Por tanto, teóricamente, en M6 y M7 se debería detectar la misma mezcla de haplotipos mitocondriales, pero profundizaremos más sobre este tema posteriormente (Figura 1).

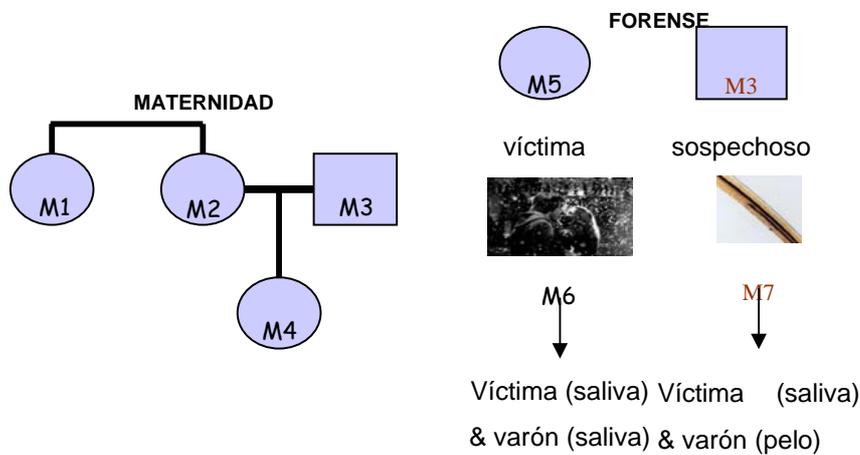


Figura 1.- Antecedentes: muestras analizadas en ejercicio de maternidad y ejercicio forense

2.- PARTICIPANTES

Afortunadamente el nivel de participación en el análisis de ADN mitocondrial aumenta con cada ejercicio colaborativo. Antonio Alonso nos mostraba el año pasado, centrándose en el ejercicio forense, el incremento desde el año 2002 hasta el 2005. Este año se han vuelto a superar las participaciones: en el análisis de las muestras M1, M2, M4 y M5 participaron 36 laboratorios (uno de ellos sólo para intercambiar resultados); en el análisis de la muestra M3 participaron 40 laboratorios (uno de ellos sólo para intercambiar resultados); en el

análisis de M6 participaron 26 laboratorios (tres de ellos sólo para intercambiar resultados) y, finalmente, en el análisis de M7 participaron 33 laboratorios (cinco de ellos sólo para intercambiar resultados). como podemos observar en la figura 2.

A. Alonso 2005	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

AÑO 2006						
MATERNIDAD				FORENSE		
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
36 (-1)	36 (-1)	40 (-1)	36 (-1)	36 (-1)	26 (-3)	33 (-5)

Figura 2.- Participantes en el análisis de ADNmt en los años 2002 a 2005 (cuadro superior) y participación detallada en el ejercicio del año 2006 (cuadro inferior). Entre paréntesis se especifica el número de labs que sólo aportaron resultados para intercambio de datos

3.- METODOLOGÍA

Cómo en otros años, en este ejercicio hemos podido comprobar que no existe una relación directa entre la metodología utilizada y los resultados obtenidos; es decir, con tecnologías diferentes se obtienen resultados consenso. Sólo destacar tres puntos en este apartado:

- (i) la extracción de ADN mediante lisis diferencial en la muestra de pelo M7 fue realizada por dos laboratorios (si bien otros laboratorios proceden a una

- “descontaminación” previa a la extracción);
- (ii) el escaso uso de la PCR cuantitativa específica para ADNmt (sólo un laboratorio la utiliza)
 - (iii) el elevado número de ciclos utilizado durante la amplificación en todas las muestras (muchos laboratorios utilizan 36 ciclos en muestras de referencia).

Por último destacar que la mayoría de laboratorios editan las secuencias mitocondriales entre las posiciones 16024-16365 y 73-340, quedando mucha información de la región control sin estudiar.

4.- RESULTADOS

4.1.- Haplotipos consenso

Mostramos en la tabla 1 los haplotipos consenso obtenidos en cada muestra, así como el número de laboratorios que lo informaron respecto del total de laboratorios participantes en el control. No hemos tenido en cuenta los laboratorios que sólo participaron para intercambiar datos.

Muestras	Haplotipo consenso (16024-16365 & 73-340)	Labs/total labs	%
M1, M2 y M4	16188T 16311C 152C 263G 309.1C 315.1C	30/35	85,7
M3	93G 151T 263G 315.1C	33/39	84,6
M5	16051G 16189C 16270T 73G 146C 150T 263G 309.1C 315.1C	24/35	68,6
M6	16051R 16189Y 16270Y 73R 146Y 150Y 263G 309.1C 315.1C	15/23	65,2
M7	263G 315.1C	23/28	82,1

Tabla 1.- Haplotipos consenso.

Mencionar también que hay dos laboratorios que editan una región mucho más amplia del D-Loop mitocondrial: el laboratorio 5183 edita las posiciones 16024-16365 y 72-576 y el laboratorio 5052 que edita las posiciones 16024-16569 y 1-577, es decir, la región control completa. Nos parece muy interesante pues la tendencia de muchos laboratorios europeos con gran experiencia en análisis de ADNmt es ampliar la región de análisis con el fin de alcanzar mayores niveles de discriminación.

4.2.- Causas de discrepancias

Para no hacer demasiado extensos este resumen hemos agrupado las principales causas de las discrepancias detectadas. Muchas de ellas son repetitivas y se producen en todas las muestras que analiza el laboratorio en cuestión, hecho que hace que el porcentaje de consenso alcanzado no sea demasiado alto. Sin embargo, sólo con una acción correctora en estos laboratorios que cometen errores repetitivos, el nivel de consenso en el ejercicio mejoraría muchísimo.

4.2.1.- Mutaciones fantasma

Se trata de artefactos sistemáticos que se generan durante el propio proceso de secuenciación y aparecen en todos los electros, dando lugar a que todas las muestras que se analizan presenten una determinada posición polimórfica que en realidad no existe. Ya en la bibliografía tenemos unos cuantos ejemplos de estudios poblacionales que muestran este problema (para una revisión ver Bandelt et al, 2002), así como, en el campo clínico, estudios de enfermedades en pacientes que parecen mostrar una mutación en común a la cual se le atribuye precisamente ser la causante de la enfermedad.

Un claro ejemplo de mutación fantasma se muestra en los resultados del laboratorio 4356, en el cual todas las muestras que analiza (M1, M2, M3, M4, M5 y M7) presentan polimorfismo en la posición T16469G. Consultados los electros de este laboratorio pudimos observar dos tipos de errores: por un lado la asignación automática de bases es errónea (falta una A en 16468 producida por la poca definición de un doble pico AA que el software

reconoce sólo como una A) y por otro la conversión de lectura de hebra reversa a hebra directa es también errónea pues la base complementaria a A es T y no G (ver figura 3). Este laboratorio sólo secuencia una de las hebras, posiblemente con el electro de hebra directa se podría haber solventado el error. Es también importante revisar visualmente la lectura automática de los electros incluso aunque a lo largo de todo el electro la asignación automática no muestre ambigüedad alguna.

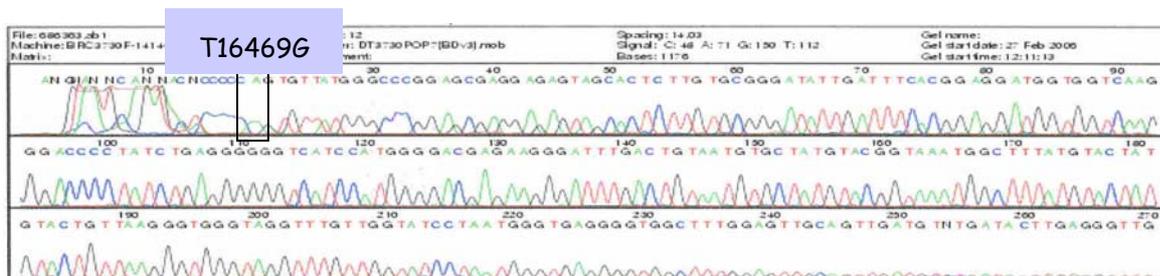


Figura 3.- Electroferograma de hebra reversa que muestra el error en la asignación automática de una de las bases. Las posiciones 16468 y 16469 son AA en CRS. La lectura automática sólo muestra una A en lugar de dos por la poca resolución del electro en su inicio. Además la asignación de estas posiciones en hebra directa debería ser TT, en ningún caso G.

4.2.2.- Malas purificaciones

Tan importante como la secuenciación es la purificación del producto secuenciado para eliminar los ddNTPs marcados no incorporados, pues éstos tienen cierta movilidad electroforética que puede afectar a la lectura correcta de la secuencia. El laboratorio 4376 presenta claramente un error de este tipo, pues todos sus electros muestran picos artefactuales entre las bases 50 y 60, lo cual produce diferentes errores en la lectura dependiendo de la muestra estudiada. Así, en M5 informan un polimorfismo 92A que no existe realmente (ver Figura 4). Revisando los electros de M6 podemos observar igualmente los artefactos a la misma altura, lo cual produce igualmente la aparición de 92A, si bien, por debajo del pico artefactual de A se puede distinguir claramente la base correcta

(G, coincidente con CRS).

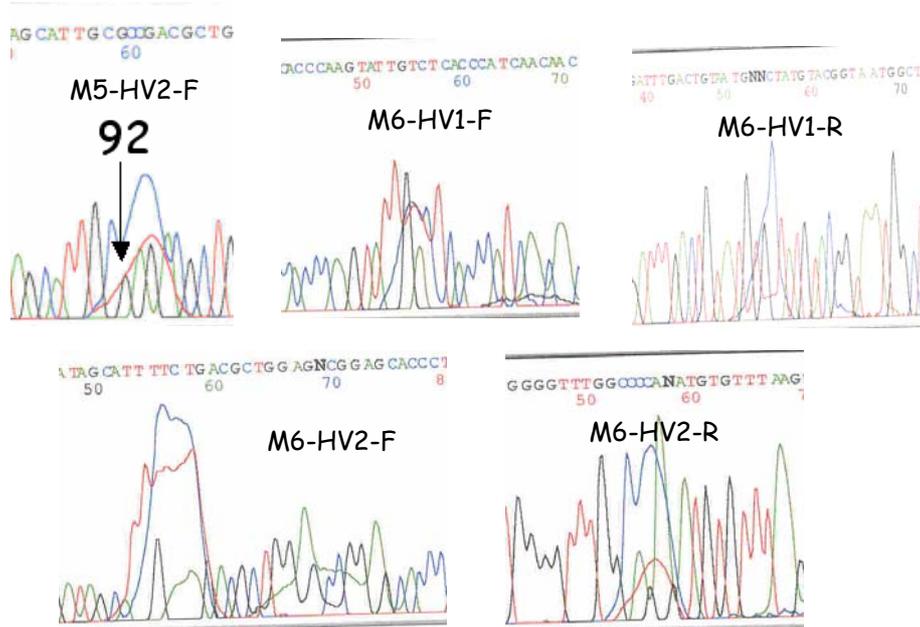


Figura 4.- Electroferogramas con artefactos de purificación que impiden la adecuada lectura de los nucleótidos reales

4.2.3.- Electros de mala calidad

Es muy importante que los electros no presenten ruido de fondo ni indeterminaciones si se pretende informar un haplotipo. En los casos en los que no se consigan electros con un mínimo de calidad no se debe reportar ningún resultado pues con mucha probabilidad se cometerán errores de genotipado. Encontramos un claro ejemplo en los electroferogramas aportados por los laboratorios 4357 y 4376 (ver figura 5).

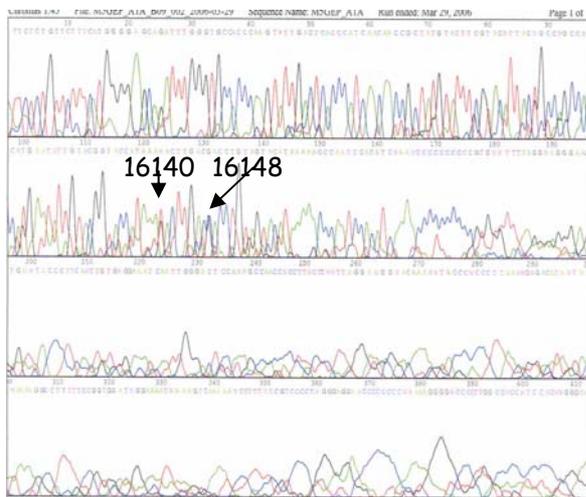


Figura 5.- Este electro pertenece a un laboratorio que informa el haplotipo HV1 16051G 16140N 16148N en la muestra de referencia M5. Utiliza primers A1+B1+A4, pero sus electros tienen baja calidad y por ello no alcanza el consenso

4.2.4.- Haplotipos incompletos

Para valorar este tipo de errores se han tenido en cuenta las posiciones editadas por cada laboratorio según consta en la tabla Metodología de ADN mitocondrial.

Hay una serie de laboratorios que sorprendentemente presentan electros de muy buena calidad pero no informan posiciones polimórficas que son evidentes en sus resultados analíticos. Tal es el caso del laboratorio 4367, al cual le falta el polimorfismo T16311C en M1, M2 y M4. Este polimorfismo está presente en todos sus electros de hebra directa y reversa. Igualmente ocurre con el laboratorio 4376, que omite las inserciones en el stretch de poliC de HV2 (posiciones 303-315), pero que están claras en sus electros directo y reverso de M1, M2 y M4. Estas omisiones claramente pueden deberse a “despistes” y pueden tener una fácil solución simplemente poniendo más atención, sobre todo en el segundo caso, pues la inserción 315.1C aparece en la mayoría de las secuencias.

Pero existe otro grupo de laboratorios que informa secuencias incompletas por una causa bien distinta. La muestra M5 presentaba un polimorfismo T16189C que produce un largo stretch de poliC. Debido a variaciones entre las moléculas en el número de residuos C se genera en esta zona una heteroplasmia de longitud que hace inviable el análisis a partir de este punto, pues los electros que se obtienen son ilegibles desde el mencionado stretch. La única forma de resolver los polimorfismos más allá de 16189 es utilizando primer reverso en combinación con primers internos para tener una doble lectura de cada posición. Los laboratorios 4355, 5173 y 5198 no usan esta combinación de primers y por ello omiten por ejemplo el polimorfismo en la posición 16270. El laboratorio 5184 también comete este error pero no envía electros. Y finalmente, el laboratorio 5187 también reporta secuencias incompletas a pesar de realizar el análisis de secuencia con varios primers que le

permitirían una lectura correcta.

4.2.5.- Errores tipográficos

Entre otros podemos destacar el laboratorio 5189, que reporta el polimorfismo 16189T en lugar del 16188T. La posición 16189 presenta un residuo de T en CRS, por lo tanto no se trata de un polimorfismo. Creemos que este es simplemente un error tipográfico (los electros son correctos) debido a que es mucho más frecuente la mutación en 16189 (de T a C) que en 16188 (el hombre es un animal de costumbres y eso a veces nos juega malas pasadas...).

4.3.- Comentarios respecto a las mezclas

Hemos observado algunos de los errores descritos anteriormente en el análisis de M6, pero hay muchos laboratorios que han reportado la mezcla perfecta. Sin embargo, dada la complejidad del análisis y ya que muchos laboratorios no analizan mezclas mediante secuenciación de ADNmt, los resultados no se tendrán en cuenta a la hora de emitir los certificados.

De forma general podemos decir que hemos alcanzado mayor grado de consenso en las muestras de sangre (M1 a M5) que en las muestras dubitadas M6 y M7. Creemos que esto se debe a dos motivos principalmente: por un lado el análisis de pelos (M7) es más problemático que el análisis de otros tipos de tejidos por las diferencias en contenido de ADN, si bien los laboratorios que se dedican a la práctica forense de rutina deben ofrecer buenos resultados igualmente. Por otro lado, ambas muestras M6 y M7 consistían en mezclas de ADN proporcionado por dos donantes. Ya vimos en el ejercicio de análisis de ADNmt en mezclas que publicamos recientemente lo problemático del asunto pues, por un lado, la secuenciación no es siempre resolutive e influyen muchos parámetros en el nivel de detección de las variantes en las posiciones nucleotídicas en las que debe de detectarse una mezcla. Además influyen los tejidos o fluidos involucrados y los propios donantes, por la disparidad en ambos casos en el contenido mitocondrial.

Sin embargo, en la muestra M7 (pelo impregnado en saliva) existía la posibilidad de separar la posible mezcla bien procediendo a sucesivos lavados de los fragmentos de pelo o realizando una extracción diferencial. Es fundamental pensar en todas las posibilidades antes de iniciar el análisis de una muestra forense y la experiencia nos dice que podemos incurrir en una falsa exclusión si sólo detectamos uno de los haplotipos. En la rutina forense nos encontramos pelos contaminados de forma habitual, bien con sangre (si se han encontrado por ejemplo en la mano ensangrentada de una víctima o en un arma homicida ensangrentada) o bien con flujo vaginal (si por ejemplo un vello de un sospechoso fue hallado en la vagina de la víctima). Por tanto, debemos tener presente que este tipo de muestras debe analizarse con extremo cuidado y tenemos que pensar siempre en una posible contaminación aunque no la evidenciamos a simple vista o en el microscopio.

4.4.- Interpretación de los resultados obtenidos

En este apartado destacaremos que hay un error inexplicable: la interpretación contraria al resultado obtenido en el análisis. A la pregunta ¿puede el pelo enviado (M7) pertenecer al donante de M5?, los laboratorios 5184, 5201 y 5202 contestan “SI” y el haplotipo que obtienen en M7 no coincide con el que obtienen en M5. Este es sólo un ejemplo, aunque hay más (Véase los laboratorios 4355 y 5053).

Pero fuera de estos inexplicables errores sí nos gustaría hacer referencia a una tendencia que hemos observado y que pone de manifiesto unos conceptos erróneos acerca del genoma mitocondrial: el hecho de pensar en el ADNmt como si fuera ADN nuclear. Esta costumbre tendencia se aprecia en tres hechos fundamentales:

- (i) el considerar los polimorfismos por separado (como si cada posición polimórfica fuera sistema o marcador),
- (ii) considerar HVS1 y HVS2 como dos marcadores independientes
- (iii) considerar la secuencia de referencia como si fuera una muestra más del caso en estudio. No hemos de olvidar que todo el genoma mitocondrial debe considerarse

como un único marcador que llamaremos haplotipo. Y la secuencia de referencia únicamente sirve para la nomenclatura

Como ejemplo del primer caso podemos destacar la frase:

“En el análisis de ADNmt el fragmento HVI de M5 mostró 3 cambios de los cuales sólo el correspondiente al sitio 16469 es coincidente con M7; en el fragmento HVII M5 posee 3 cambios de los cuales sólo el del sitio 263 coincide con M7. El fragmento HVI de M3 tiene 1 sólo cambio en el sitio 16469 el cual es coincidente con M7; en el fragmento HVII M3 posee 2 cambios de los cuales sólo el correspondiente al sitio 263 coincide con M7”.

Como ejemplo del segundo caso tenemos esta otra:

“El haplotipo de la región HVI de la muestra M7 coincide con el de la muestra M3 mas no con el de la muestra M5. El haplotipo de la región HVII de la muestra M7 es diferente al haplotipo de la región HVII encontrado en las muestras M3 y M5”.

Y finalmente, como ejemplo del tercer caso nos encontramos:

“Debido a que es la muestra de sangre (M3) la que presenta el mayor número de variaciones en su secuencia, respecto de la secuencia de Anderson y no al contrario (que podría hacer pensar en mutaciones debido a la diferente fuente de la muestra, pelo, que además presenta mayor tasa de mutaciones que la sangre), es posible excluir al individuo M3 o a otro individuo con el que comparta el mismo origen matrilineal como donante del pelo (M7)”.

Por otro lado, sigue pesando mucho el número de polimorfismos diferentes entre unas muestras y otras para decidir si dos haplotipos pueden considerarse coincidentes o no. Desgraciadamente, el genoma mitocondrial es complejo por una serie de motivos como la variabilidad de las tasas de mutación entre nucleótidos (hay posiciones con gran tendencia a sufrir mutación, como la 152, mientras que otras posiciones son mucho más estables) o

la posibilidad de mutaciones entre tejidos del mismo individuo. Por ello, no se puede simplificar a la hora de interpretar y es peligroso fijar un número de diferencias para considerar que dos muestras son distintas. Tradicionalmente se decía que dos diferencias eran suficientes para decidir que dos muestras procedían de dos individuos diferentes, pero la bibliografía nos ha demostrado que las cosas no son tan sencillas y que debemos tener en cuenta no sólo el número de diferencias sino qué posiciones son las implicadas, qué tejidos estamos comparando, si la comparación se realiza entre tejidos de un mismo individuo o entre dos individuos presuntamente relacionados por vía materna, etc.

En el ejercicio ha quedado reflejado claramente que aún no dominamos este tema. Como ejemplo pondremos los comentarios de dos laboratorios en el caso de valorar dos haplotipos que difieren en dos posiciones:

No excluyen:

*“Apesar de se observarem **duas diferenças** entre o perfil de mtDNA de M3 e o de M7, não se pode excluir como dador de M7 o indivíduo dador de M3, dado que se trata da comparação de perfis obtidos a partir de dois materiais biológicos distintos”.*

Excluyen:

*“Tanto M3 como M5 podem ser excluídos como doadores da amostra M7 pois apresentam **2 ou mais** polimorfismos que os diferem de M7 (FBI. Guidelines for mitochondrial DNA (mtDNA) nucleotide sequence interpretation. Forensic Science Communication, 2003)”.*

En cualquier caso, si los resultados obtenidos no nos permiten realizar una valoración de confianza lo mejor es buscar más evidencias que corroboren la exclusión o la inclusión mediante el análisis de otras regiones del D-Loop o de nucleótidos variables en región codificante.

5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados del ejercicio de este año son similares a los de otros años. Seguimos cometiendo prácticamente los mismos errores y algunos de ellos tienen fácil solución pues sólo requieren un poco más de atención y cuidado. No debemos desanimarnos, debemos seguir adelante y pedir ayuda sin dudar si en algún momento la necesitamos, pues es este uno de los principales fines del GEP-ISFG, el intercambio de información y el apoyo constante.

En cuanto a la metodología quisiéramos insistir en dos puntos: la escasez del uso de la cuantificación específica de ADNmt y la necesidad de ampliar la región D-Loop analizada. La cuantificación de ADNmt nos permite controlar de forma más precisa el proceso de análisis (imprescindible en la práctica forense), nos ayuda a decidir cómo desarrollar el análisis (PCRs en sub-fragmentos, regiones completas), nos permite ajustar la cantidad de ADN molde de partida en las PCRs (importante sobre todo en reacciones multiplex), nos informa de la cantidad de ADN disponible evitando que malgastemos ADN (si éste es escaso) en análisis que pueden evitarse y nos auxilia en la clasificación de las muestras para evitar contaminaciones (se debe evitar procesar muestras con alto contenido en ADN en paralelo con muestras con bajo contenido, independientemente de si se trata de muestras dubitadas o indubitadas). En la bibliografía encontramos estupendos ejemplos de cómo llevar a cabo la cuantificación de ADNmt, incluso para obtener información no sólo sobre la cantidad de ADN sino sobre el estado de degradación del mismo, como el publicado por Alonso et al (2004).

También debemos hacer un esfuerzo en intentar ampliar la región D-Loop en estudio. HVS1 y HVS2 se quedan un poco cortas para discriminar sobre todo entre ciertos haplotipos muy frecuentes. La tendencia es analizar D-Loop completo lo cual no supone un gran esfuerzo en muestras de buena calidad. Se puede realizar una amplificación completa en una sola reacción con primers que anillen en los extremos de D-Loop y luego proceder a la secuenciación de, por ejemplo, HVS1 en primer lugar. Si con este análisis es suficiente para discriminar entre dos muestras no tendríamos que seguir analizando. En muestras

degradadas no podemos llevar a cabo esta estrategia y el análisis de la región control completa puede ser más tediosa, pero puede ser muy útil. Entre los nucleótidos 1-72 y 16365-16569 hay unos 60 sitios polimórficos conocidos y entre 341 y 574 otros 77 sitios (según mtDB) que nos estamos perdiendo si sólo analizamos HVS1 y HVS2. En este ejercicio, la secuencia consenso obtenida en el pelo M7 fue 263G 315.1C, el haplotipo más frecuente en europeos. No se dio el caso de que este haplotipo coincidiera con el de otra muestra del ejercicio, pero imaginarnos que una de las muestras de referencia tuviera el mismo haplotipo (como nos pasa en los casos reales frecuentemente); desde un punto de vista estadístico, podríamos valorar con poca fuerza esta coincidencia. Uno de los laboratorios participantes estudió D-Loop completo y detectó un polimorfismo en T16519C (una posición de gran valor discriminatorio dentro de la región control), hecho que podría aportar más luz en la comparación de dos muestras. Así que os animamos a ampliar la región analizada para alcanzar mayor poder de discriminación. Además podemos seguir aumentando el poder de discriminación mediante el análisis de SNPs en región codificante (Quintans et al. 2004, Vallne et al. 2004, Álvarez-Iglesias et al 2006).

En cuanto a los resultados, hay una serie de errores importantes que podemos superar si seguimos las siguientes pautas primordiales:

- a) Secuenciar SIEMPRE ambas hebras L y H, y en el caso de heteroplasmia de longitud que nos impida disponer de una doble lectura de cada nucleótido utilizar también primers internos para corroborar los sitios polimórficos. El consenso alcanzado en las muestras M1, M2 y M4 (85,7%) y en M3 (84,6%) es claramente superior al alcanzado en M5 (68,6), siendo todas las muestras, manchas de sangre lo suficientemente abundantes para no tener problemas en la analítica. Esto se debe únicamente a que M5 presenta un polimorfismo T16189C que produce un largo stretch heteroplásmico de residuos de poli-C que impide la lectura correcta a partir de esta zona. El hecho de que muchos laboratorios no utilicen aún primers reverso e internos ha producido este bajo porcentaje de consenso en esta muestra. Nuestros análisis no pueden ser correctos o no dependiendo del haplotipo que presente la muestra en estudio.

- b) Revisar SIEMPRE los electros, sin fiarse de la lectura automática, sobre todo en los inicios del electroferograma que es donde se acumulan más errores. Poner especial atención en posiciones que presentan polimorfismo con relativa frecuencia como la posición 73. En el caso de que no se vean claras, modificar la edición, es decir, informar con cada haplotipo las posiciones editadas para cada muestra si es necesario. La edición puede variar, y si en una muestra no logramos ver un polimorfismo con claridad en ambas hebras siempre podemos editar desde posiciones posteriores.

- c) Realizar SIEMPRE un “control de calidad” a las secuencias antes de informar un haplotipo.

Os recomendamos que sigáis los siguientes pasos en el control de calidad de las secuencias:

- 1.- Comprobar que los polimorfismos obtenidos en vuestras secuencias están descritos en la bibliografía. Podéis hacer una consulta rápida en estas tres webs: mtDB (www.genpat.uu.se/mtDB), Mitomap (www.mitomap.org) y DNA Concordance (www.bioanth.cam.ac.uk/mtDNA). Estos sitios web no tienen ni mucho menos todas las posiciones polimórficas del genoma mitocondrial, pero quizá tengan las más frecuentes. El hecho de encontrar una posición no descrita en la muestra de análisis no invalida ni mucho menos nuestro estudio, siempre que observemos con claridad el polimorfismo en ambas hebras y hayamos descartado otras fuentes de error. Pero por propia experiencia esta herramienta nos ha servido para detectar errores del tipo “base shift” (cambio en el marco de lectura, cuando el haplotipo presenta por ejemplo una inserción y sin darnos cuenta la lectura automática no la considera como tal y se pierde el marco de lectura a partir de ese punto).

- 2.- En caso de heteroplasmia de secuencia comprobar si la posición implicada es un “hot spot” (con tendencia a la mutación). Bandelt et al. (2002) nos proporciona un

listado de posibles posiciones hot spot en HVS1 y Malyarchuk et al. (2002) en HVS2. Si la heteroplasmia aparece en una posición muy estable o en varias posiciones a lo largo del electro debemos pensar siempre en una mezcla o en una contaminación.

3.- Chequear si el haplotipo obtenido tiene sentido filogenético intentando asignar el haplogrupo. Esta práctica (además de ser de lo más entretenida) evita errores del tipo “sample mix-up”, es decir, informar un haplotipo mezclando el haplotipo HVS1 de una muestra y el HVS2 de otra distinta, pero también puede evitar olvidos. Tenemos un claro ejemplo en este ejercicio; un laboratorio informó el haplotipo 16051G 16270T 146C 150T 263G en M5, omitiendo el polimorfismo 73G. Si se hubiera intentado asignar el haplogrupo a este haplotipo (en este caso el HG más probable es U), el laboratorio se hubiera dado cuenta enseguida de que le falta esta posición, hubiera podido revisar sus electros y verificar que efectivamente 73 es base polimórfica. El análisis filogenético no nos soluciona todos los casos porque hay haplotipos HVS1-HVS2 muy poco informativos en cuanto al haplogrupo, pero además de evitar los errores expuestos, permite que nos familiaricemos con ciertas posiciones nucleotídicas específicas de haplogrupo. El problema es que la información se encuentra muy repartida en múltiples artículos y puede ser tedioso llegar al conocimiento profundo de la filogenia, pero sí nos podemos apoyar en algunas publicaciones como:

- a) Para poblaciones europeas: Richards et al. (2000). y Finnilä et al. (2001). Ambos papers están un poco anticuados, pero menos es nada.
- b) Para poblaciones nativo-americanas: Bandelt et al (2003) y Kong et al (2006).
- c) Para poblaciones africanas: Salas et al (2002) y Torroni et al (2006)

6.- BIBLIOGRAFÍA

Alonso A, Martín P, Albarrán C, García P, García O, Fernández de Simón L, García-

Hirschfeld J, Sancho M, de la Rúa C, Fernández-Piqueras J. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci. Int.* (2004) 139:141–149.

Álvarez-Iglesias V, Jaime JC, Carracedo Á, Salas A. (2006). Coding region mitochondrial DNA SNPs: targeting the East Asian and Native American haplogroups. *Forensic Sci. Int.*, in press.

Bandelt HJ, Quintana-Murci L, Salas A, Macaulay V (2002). The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1150-1160.

Bandelt HJ, Herrnstadt C, Yao YG, Kong QP, Kivisil T, Rengo C, Scozzari R, Richards M, Villems R, Macaulay V, Howell N, Torroni A, Zhang YP (2003). Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Ann Hum Genet.* 67(Pt 6): 512-24.

Finnilä S, Lehtonen MS and Majamaa K (2001). Phylogenetic network of European mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 68:1475–1484.

Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, Wang CY, Zhong L, Zhu CL, Wu SF, Torroni A and Zhang YP (2006). Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol. 15, No. 13: 2076-86.

Malyarchuk BA, Rogozin IB, Berikov VB, Derenko MV (2002). Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum Genet.* 111(1): 46-53.

Quintans B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. (2004). Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int.* 140(2-3):251-7.

Richards M, Macaulay V et al. (2000). Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1251–1276.

Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sánchez-Diz P, Macaulay V, Carracedo A. (2002). The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet.* 71(5):1082-111.

Torrioni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ (2006). Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet.* 22(6):339-45.

Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM and Parsons TJ. (2004) A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome, *Int J Legal Med* 118: 147-157.

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CROMOSOMAS SEXUALES EN EL EJERCICIO
COLABORATIVO GEP-ISFG 2006**

Leonor Gusmão y António Amorim

IPATIMUP

Oporto

Portugal

A participação dos laboratórios pode ser resumida da seguinte forma:

▪ N° laboratórios inscritos	130
▪ N° labs que emitem resultados	116

1. Marcadores do cromossoma Y

▪ N° labs que emitem resultados STR Y	61 (53%)
▪ Destes, com haplótipo mínimo	55 (90%)
▪ N° total de marcadores	24
▪ N° de marcadores consensuados	19 (79%)

Verifica-se que, desde 2001, a percentagem de laboratórios a emitir resultados para STRs do cromossoma Y tem-se mantido acima dos 50%, não apresentando, desde então, uma tendência para aumentar. Este ano houve, no entanto, um novo aumento do número médio de marcadores por laboratório sendo que 90% dos laboratórios apresentam resultados para o haplótipo mínimo. Isto deve-se em parte a que a maioria dos laboratórios usa os kits comerciais Powerplex Y da empresa Promega e/ou o Y Filer da Applied Biosystems.

Dos 24 marcadores para os quais foram apresentados resultados foi possível obter um resultado consensual num total de 19. Quanto aos STRs DYS435, DYS436 e DYS462, DYS464 apenas 1 laboratório apresenta resultados para estes

marcadores, e 2 laboratórios enviaram resultados para o DYS388. Sendo assim, à semelhança de anos anteriores, este ano também não foi possível estabelecer um resultado consensual para nenhum deles.

Para 6 dos marcadores (DYS19, DYS389 I, DYS390, DYS392, DYS438 e DYS456) não foram encontrados erros de tipagem num número total de 58 a 107 tipagens por marcador.

Análise de erros

TABELA 1. Y-STRs: Resumo dos resultados obtidos fora do consenso

Código	Marcador	Muestra_3	Muestra_6	Consenso (M3 e M6)	
4355	DYS437	13/15	16	15	14
4357	DYS439	11	11	11	12
4358	DYS393	11	13	13	13
5189	DYS389 II	16	16	30	30
5198	DYS385	11/14	12	11/14	12/14
5202	GATAH4	27	26	28	27
5208	DYS389 II	30	30/31	30	30
5208	DYS437	15	14/15	15	14
5208	DYS448	19	18/19	19	18
5208	DYS458	18	16/17	18	16
5208	DYS635	23	23/24	23	24
5208	GATAH4	12	11/12	12	11
158533	DYS391	10/11	10/11	11	11
158533	DYS393	12/13	12/13	13	13
158533	DYS458	17/18	16	18	16
158533	GATAH4	30		12/28	11/27
158533	DYS448	19	19	19	18

Analisando individualmente os resultados para cada um dos marcadores, verifica-se

que:

- Para o **DYS385**, existe um laboratório que denomina este STR como DYS385A/B. De acordo com as recomendações da ISFG [Gusmão *et al.* FSI 157 (2006) 187-197], dado que foi utilizado o kit Yfiler cujos *primers* incluídos não permitem a discriminação de ambos os *loci* A e B, esta designação é incorrecta. Além disso, existe um laboratório que apenas detecta um dos alelos da amostra 6.

- Para o **DYS389 II**, há um laboratório que utiliza nomenclatura distinta à que é geralmente utilizada em forense, subtraindo o número de repetições encontradas no *locus* DYS389 I ao total das observadas no DYS389 II.

Também para este marcador, um segundo laboratório reporta a presença de um *alelo* adicional, sendo a contaminação da amostra 6 a causa mais provável deste erro. A presença de alelos adicionais na amostra 6 é também reportada por este mesmo laboratório em outros 5 Y-STRs (**DYS437, DYS448, DYS458, DYS635 e GATA H4**)

- Outros possíveis erros por contaminação são encontrados num segundo laboratório, o qual apresenta erros de tipagem em 5 marcadores (**DYS391, DYS393, DYS458, GATA H4 e DYS448**). No caso deste laboratório, também são detectados alelos adicionais nas 2 amostras tipadas.

- Para o **DYS393**, um laboratório reporta 11 em vez de 13 repetições na amostra 3, apresentando, no entanto, o resultado correcto para a amostra 6. Este erro não poderá ser explicado pela falta de utilização de *ladders* ou de amostras de referência (dado que uma das amostras está bem tipada). É possível que se trate de um erro de transcrição ou de um deficiente alinhamento do *size standard*. A ausência de electroforegramas não permitiu a confirmação de nenhuma das hipóteses.

- No caso do **DYS439**, o único resultado fora do consenso deveu-se a um erro de transcrição, cuja tipagem correcta foi confirmada pela análise do electroforegrama enviado.

- O maior número de resultados fora do consenso foi encontrado para o **GATA H4**. O mesmo se observou o ano passado, tendo-se demonstrando tratar de um problema de nomenclatura. Assim sendo, este marcador está incluído no kit Yfiler (AB) com uma nomenclatura diferente da que se tem vindo a usar, nomeadamente nos exercícios colaborativos do GEP [Sánchez-Diz *et al.* FSI 135 (2003) 158-162; Gusmão *et al.* FSI 135 (2003) 150-157]. Seis dos laboratórios participantes utilizam a nomenclatura correcta de acordo com as recomendações da ISFG [Gusmão *et al.* FSI 157 (2006) 187-197] cuja conversão com respeito à nomenclatura utilizada no Y filer foi recentemente publicada [Mulero *et al.* JFS 51 (2006) 694].

Da análise da tabela 1, verifica-se que houve uma elevada percentagem de erros. Num total de 1422 tipagens foram encontrados 21 erros (1,5%). É no entanto de salientar o facto de 13 dos erros encontrados se concentrarem em apenas 2 laboratórios, sendo que a percentagem de erros dos restantes é de apenas 0,6% (menor que a do ano passado) e verifica-se ainda que dos 8 erros encontrados somente 3 (0,4%) se devem a questões técnicas.

2. Marcadores do cromossoma X

▪ Nº labs que emitem resultados STR X	11 (9,5%)
▪ Nº total de marcadores	19
▪ Nº de marcadores consensuados	6 (31,6%)
▪ M5: 3 marcadores	
▪ M6: 2 marcadores	

À semelhança do que aconteceu no início da utilização de marcadores do

cromossoma Y, devido à falta de *ladders*, amostras controle e kits comerciais permitindo uma fácil uniformização dos marcadores e nomenclaturas utilizados, observou-se uma baixa percentagem de X-STRs para os quais foi possível encontrar um resultado consensual (somente em 6 num total de 19 com resultados).

Análise de erros

TABELA 2. X-STRs: Resumo dos resultados obtidos fora do consenso (na tabela a vermelho)

Código	Marcador	M1	M2	M3	M4	M5	M6
140282	DXS101	22/25	22/25	19	19/22		
4356	DXS7423	13	12/13	12	12	13	
4356	DXS101	21/24	21/24	18	18/21	24/27	
4356	DXS8378	11	11/13	14	11/14	10/11	10/11
158533	GATA172D05	245	245	245	245	245	245
158533	HPRTB	278/285	282	277	278/285	281/285	281/285
158533	DXS7132	139	139	142	138/142	147	148/187
158533	DXS101	202/209	202/209	187/193	192/202	208/220	208
158533	DXS7423	190	185/189	187	186	190	190
158533	DXS8377	230/242	227/242	203/207	207/227	241/246	240/246

Analisando individualmente os resultados para cada um dos marcadores, verifica-se que:

- Para o **HPRTB**, existem 3 laboratórios que tipam as amostras com um repeat mais. Este resultado pode ser explicado pelo facto de este marcador ter sido inicialmente descrito por Edelman et al. [FSI 124(2001) 215-218] com a estrutura (AGAT)_n e, mais tarde por Zarrabeitia *et al.* [FSI (2002) 85-89] como (TCTA)_n. Por análise da sequência, e de acordo com as recomendações da ISFG, verifica-se

que a nomenclatura correcta é a descrita por Zarrabeitia *et al.* [FSI (2002) 85-89]. Na base de dados **Forensic ChrX research** (<http://www.chrx-str.org>) é esta última que é utilizada. No entanto, as amostras de referência estão mal tipadas, possuindo um repeat menos do que se observa por sequenciação. Por este motivo, pode-se considerar que o resultado correcto não corresponde ao consensuado.

- Em relação aos erros obtidos no **DXS101**, por análise do electroforegrama enviado, é possível confirmar que existe um deficiente alinhamento do size standard. Este problema poderá afectar a análise de qualquer STR (e não especificamente este) sendo que o laboratório deverá informar-se de como utilizar o size standard de uma forma correcta.

Um segundo laboratório também apresenta erros para este sistema assim como em mais 2 marcadores (**DXS7423 e DXS8378**). No DXS7423 existe um erro sistemático: todas as tipagens nesse sistema são reportadas com menos duas repetições relativamente ao consensual, recomendando-se a utilização de *ladders* ou de amostras de referência. No caso dos outros 2 marcadores, os erros não podem ser explicados pela falta de utilização de *ladders* ou de amostras de referência (dado que há alelos/amostras bem tipados). É possível que se trate de um erro de transcrição ou de um deficiente alinhamento do *size standard*. A ausência de electroforegramas não permitiu a confirmação de nenhuma das hipóteses.

Da análise da tabela 2, verifica-se que houve uma elevada percentagem de erros (20,6%). Num total de 218 tipagens foram encontrados 45 erros. Tal como verificado para os resultados de Y-STRs, 41 dos erros encontrados concentram-se em apenas 2 laboratórios, sendo que a percentagem de erros dos restantes é de apenas 1,8%. A percentagem de laboratórios que apresentam erros é também elevada (3 em 11 laboratórios; correspondendo 27,3%).

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA MUESTRA FORENSE EN EL EJERCICIO
COLABORATIVO GEP-ISFG 2006**

Daniel Corach

Servicio de Huellas Digitales Genéticas

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Argentina

Descripción del Ejercicio

Se remitieron seis manchas, cinco de ellas de sangre (M1 - M5) y una mancha forense (M6) así como una muestra de cabello (M7: dos fragmentos de cabellos distintos del mismo donante contaminados con saliva). Las cuatro primeras manchas (M1 - M4) son comunes al Ejercicio de Paternidad, que realizan todos los laboratorios que participan en el Ejercicio Forense.

La muestra de referencia del caso forense, M5, consistió en 75 µl de sangre que se depositaron en Tarjetas FTA, dejando secar las manchas al aire.

La mancha forense (M6) consistió en 80 µl de una mezcla de saliva preparada con un 50 % procedente de la donante de la muestra M5 y un 50 % de saliva de un menor no relacionado genéticamente con ninguno de los otros donantes. Se aplicó la mezcla de saliva en tarjetas de papel Whatman Bioscience dejando secar las manchas al aire.

La muestra de cabello (M7) consistió en dos cabellos cortados a un menor del que no se aporta muestra de referencia y contaminados con saliva de la donante de M5.

Descripción del caso hipotético planteado en el marco del Ejercicio Forense 2006

La donante de M5 denuncia una agresión. Se sospecha, como responsable de la misma, del individuo donante de la muestra M3. Los laboratorios recibieron las muestras M5, M6 y M7 con los siguientes códigos:

- M5**: Muestra de referencia
- M6**: Mancha forense recibida en el laboratorio
- M7**: Muestra de cabello

Interrogantes Planteados

- 1.- ¿Puede la mancha (M6) recibida en el laboratorio corresponderse con una mezcla? Establezca los posibles componentes de la misma. ¿Está presente el donante de M3?, ¿está presente el donante de M5?
- 2.- ¿Puede el cabello enviado (M7) pertenecer al donante de M5? ¿Puede pertenecer al donante de M3?

Participación

Número de laboratorios que informan resultados para la muestra forense (M6) 55 (80% de los que la reciben)

Número de laboratorios que analizan la muestra de cabello 34 (27%).

Número de sistemas totales analizados por el conjunto de laboratorios 99

Número de sistemas consensuados 50 (51%)

Definición de resultados consensuados

Consenso: se exige que participen, al menos, cinco laboratorios y que el 70 % de los resultados sean coincidentes (siempre que el 30 % restante no coincida en otro valor).

Descripción del Caso Analizado

- M5 muestra de sangre indubitada de la víctima.
- M6 mezcla de saliva aportada por M5 y un varón. Ninguno de ambos donantes han contribuido con las restantes muestras del ejercicio de paternidad.
- M7 cabellos cortados sobre los que se dejó secar una muestra de saliva aportada por M5. El donante del pelo es también el donante de la muestra de saliva de M6.
- M3 (sospechoso) no se halla ni en M6 ni en M7

Descripción de la Mezcla Experimental M6

La mancha forense (M6) consistió en 80 µl de una mezcla de saliva preparada con 50 % procedente de la donante de la muestra M5 y 50 % de saliva de un menor no relacionado genéticamente con ninguno de los otros donantes. Se aplicó la mezcla de saliva en tarjetas de papel Whatman Bioscience dejando secar las manchas al aire.

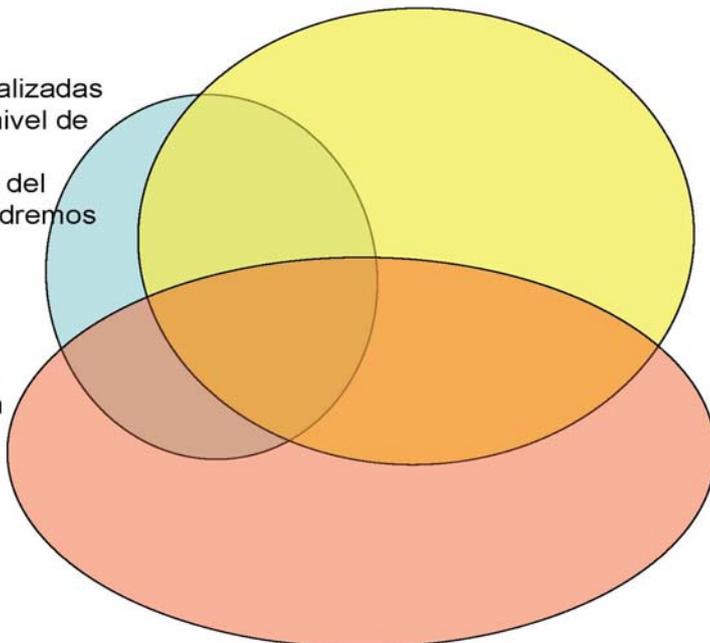
Mezclas

Las muestras de mezclas analizadas en casos reales exhiben un nivel de complejidad mayor.

Dependiendo de la selección del material a ser analizado tendremos

- 1 Donante
- 2 Donantes
- 3 Donantes

En consecuencia no siempre
La repetición de la extracción
Brinda idénticos resultados.



En la investigación propuesta para el caso forense del ejercicio 2006, la mezcla sometida a estudio estaba constituida por una combinación homogénea de fluidos biológicos de dos donantes, situación que permite asegurar total reproducibilidad de los resultados.

Se enumeran y describen las metodologías empleadas en el análisis de la Muestra Forense.

- Técnicas Presuntivas
- Extracción
- Cuantificación
- Detección

Técnicas Presuntivas

20 Laboratorios informan resultados para pruebas previas.

9 Informan presencia de saliva o células epiteliales, semen negativo y sangre negativo.

1 informa sangre (+), semen (+)

1 informa semen (-), saliva (-)

1 informa sangre (+), semen (-)

1 informa semen (+)

Extracción

Los procedimientos de extracción más frecuentemente empleados fueron los basados en las técnicas convencionales que incluyen el empleo de proteasas (proteínasa K), agentes caotrópicos (Sodio DodecilSulfato-SDS) y la resina de intercambio Chelex. En menor medida se emplearon para la extracción de ADN a partir de la muestra forense kits comerciales como Qiamp y IQ.

Cuantificación

Sólo 37 de los 55 laboratorios que informan resultados para la muestra M6 realizan estudios de cuantificación de ADN, representando el 67,27% de los mismos. Entre estos, las técnicas de cuantificación más difundidas la constituyen las basadas en reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), seguidas por la evaluación más subjetiva basada en geles de agarosa y tinción con BrEth, sistemas de hibridación humano-específico, espectro y fluorometría.

Detección

Los procedimientos de detección de los amplicones se basan en forma mayoritaria en el empleo de plataformas automatizadas, restringiéndose el número de laboratorios que emplean métodos manuales a 4 (7,3%) de los 55 que informan datos para M6.

Resultados

Inconsistencias Detectadas en M6

Solo 19 de los 55 laboratorios (34,55%) que informan resultados se encuentran en consenso, los 36 restantes informan entre 1 y 12 resultados no concordantes. Debe señalarse además que la mayor parte de los laboratorios informan una (12 laboratorios) ó 2 (9 laboratorios) inconsistencias.

Descripción de los resultados analizados para aquellos marcadores más comúnmente empleados.

La mayor parte de los laboratorios que informan resultados inconsistentes para los

marcadores D21S11 (18 laboratorios) y CSF1PO (11 laboratorios), los demás marcadores exhibieron una frecuencia de error relativamente menor.

Resumen de los laboratorios fuera de consenso para cada marcador, sólo se consideraron los marcadores más frecuentemente empleados.

Muy brevemente describimos las discrepancias detectadas en cada marcador:

D13S317

Este marcador es informado por 51 laboratorios, de los cuales 48 aportan datos consensuados (9/11/12/13). Cuatro informan sólo tres de los cuatro alelos presentes en el consenso (9/11/12) y uno informa sólo dos alelos 9/12. Bajo rendimiento en las extracciones o inadecuada cuantificación del ADN extraído podrían, en parte explicar estos resultados fuera de consenso.

TPOX

Un total de 54 laboratorios informan este marcador, de ellos, 48 dan como resultado un genotipo consensuado (8/9/11), en tanto que 5 laboratorios informan un perfil genético compuesto por sólo dos de los tres alelos (8/11) y uno informa un perfil compuesto por cuatro alelos (8/9/10/11). Como en el caso del marcador previamente comentado, la detección de un número menor de alelos podría vincularse con una ineficiente extracción de ADN o bien una inadecuada cuantificación de la muestra que será el templado de la reacción de amplificación. Por otro lado, la detección de un número mayor de alelos respecto de los informados en forma consensuada podría atribuirse a la interpretación inadecuada de los perfiles genéticos producidos por el secuenciador y eventualmente a la falta de ajuste de los programas empleados (Genotyper/GeneMapper).

D16S539

Este marcador fue informado por 52 laboratorios, de los cuales 46 informan un perfil consensuado (11/12/13). De los seis laboratorios fuera de consenso cuatro diferentes situaciones fueron detectadas. Tres laboratorios informan un perfil reducido a sólo dos de los tres alelos del consenso (11/12), atribuible a la falta de rendimiento de extracción o baja sensibilidad del equipo o cuantificación incorrecta. Los tres laboratorios restantes informan tres situaciones distintas. Uno de ellos sólo informa el alelo 12, sugiriendo baja sensibilidad, rendimiento de extracción pobre, inadecuada interpretación de los electroferogramas o incorrecta cuantificación de la muestra. Los otros dos en cambio informan un número mayor de alelos que el consenso (9/11/12/13) y (9/10/11/12/13), atribuible a corridas electroforéticas de escasa calidad y/o inadecuada interpretación de los resultados.

D8S1179

Este marcador fue informado por 43 laboratorios de los cuales 37 obtienen un perfil consensuado constituido por el alelo 13. Los seis laboratorios restantes informan perfiles constituidos por un número mayor de alelos que los informados en forma consensuada. Un total de cinco situaciones diferentes se informan, coincidiendo sólo dos en sus resultados que describen el perfil como 12/13/14, otro laboratorio informa otro perfil de tres alelos 9/12/13, en tanto que otros tres laboratorios informan perfiles de dos alelos, aunque diferentes 12/13, 13/14 y 11/13. Estos resultados discordantes podrían emerger una interpretación incorrecta o bien del empleo inadecuado de los programas de análisis que conducen a interpretaciones en fuera de consenso.

D7S820

Cincuenta y dos laboratorios informan este marcador, de ellos 46 presentan resultados consensuados describiendo un perfil compuesto por los alelos 9/10/13. De los seis laboratorios fuera de consenso para este marcador, cuatro coinciden

en el perfil 10/13, en tanto que otro laboratorio informa un perfil de dos alelos 9/10, diferente al anterior y por último el laboratorio restante informa un perfil de un solo alelo: 10.

VWA

De los 55 laboratorios que informan VWA, 48 describen un perfil consensuado constituido por los alelos 16/17/19/20. Los otros siete describen cuatro perfiles diferentes, en todos los casos con un número de alelos menor que los informados en forma consensuada. Tres laboratorios informan el perfil 16/17/19, dos informan el perfil 16/19 y los dos restantes los perfiles 15/16/19 y 16/19/20.

FGA

De los 51 laboratorios que informan este marcador, 44 lo hacen en forma consensuada describiendo un perfil constituido por los siguientes alelos 22/23/24/25. Como en el caso anterior, los restantes laboratorios describen perfiles con un menor número de alelos que los presentes en el perfil descrito en forma consensuada. De los siete laboratorios fuera de consenso para FGA cuatro informan el perfil 22/23/24, dos laboratorios el perfil 22/24 y uno el perfil 22/24/25. El componente mayoritario 22/24, es detectado por la totalidad de los laboratorios 51/51, en tanto que el perfil 23/25 es detectado en forma parcial por los laboratorios fuera de consenso.

D18S517

Como en el caso anterior, este marcador es informado por 51 laboratorios y en forma consensuada por 44 laboratorios que informan el perfil 12/15/17. Los siete laboratorios fuera de consenso informan un número menor de alelos. Cinco de ellos el perfil constituido por sólo un alelo: 12, y los otros dos laboratorios informan un perfil constituido por dos alelos: 12/17. De manera semejante a lo descrito para

FGA, en este marcador todos los laboratorios informan el alelo mayoritario 12, en tanto que el genotipo minoritario es detectado en forma parcial o no detectado en absoluto. Si bien una de las posibles causas que permitirían explicar estas situaciones sería la recuperación insuficiente de material de partida a partir de las evidencias analizadas o su falta de cuantificación, también podríamos sugerir como posible explicación a estas faltas de consenso al uso inadecuado de primers, es decir el empleo de diluciones de primers que pueden conducir a la obtención de perfiles parciales.

Penta E

Este marcador, informado mayoritariamente por los usuarios de PowerPlex 16, fue informado por sólo 32 laboratorios, de los que 24 coinciden en el perfil obtenido constituido por la combinación alélica 11/12/14/18. Los perfiles informados por los ocho laboratorios fuera de consenso se agrupan de acuerdo con dos perfiles informados. Un grupo de seis laboratorios informa un perfil constituido por la combinación alélica 11/12/14, en tanto que el otro grupo constituido por dos laboratorios informa el perfil 12/14/18. Como en los casos anteriormente comentados el componente mayoritario 12/14 es detectado por la totalidad de los laboratorios, en tanto que el minoritario es detectado en forma parcial en aquellos laboratorios fuera de consenso. La explicación dada en los casos anteriores es válida para este.

D2S1338

Este marcador, empleado por 42 laboratorios, fue informado en forma consensuada por 33, informando el perfil 17/18/26. Los nueve laboratorios fuera de consenso informan tres perfiles diferentes: siete de ellos el perfil 17/18, uno el perfil 15/17/18 que incluye un alelo ausente en el consenso y otro laboratorio que informa 15/18/25/26, con dos alelos ausentes en el consenso. La aparición de alelos podría estar determinada por un uso inadecuado de los marcadores

internos (LIZ, ILS, etc.).

CSF1PO

Este marcador fue informado por 55 laboratorios, de los cuales 44 detectaron resultados consensuados consistentes en un perfil constituido por la combinación alélica 9/10/11/12. Los once laboratorios que informaron resultados fuera de consenso describen perfiles genéticos parciales respecto del consenso, no detectándose alelos adicionales. Los laboratorios informan cuatro tipos de perfiles diferentes, de acuerdo con la siguiente descripción: cinco laboratorios informan el perfil parcial 11/12, cuatro el perfil parcial 10/11/12 y los otros dos los perfiles 9/10/11 y 9/11/12. La interpretación de los resultados es semejante a la presentada para los casos anteriores.

D21S11

Es uno de los marcadores genéticos de uso forense con mayor poder discriminativo ya que presenta un elevado número de alelos. Este marcador fue informado por 51 laboratorios para la muestra forense, pero sólo coincidieron en el perfil detectado, constituido por los alelos 28/30, 33 laboratorios. Los 18 laboratorios cuyos resultados se apartaron del consenso informaron tres perfiles diferentes: 12 laboratorios informaron el perfil 28/29/30, cinco el perfil 30 y uno el perfil 28/29/30/32.2/33.2. La asignación de un alelo ausente en el consenso, podría interpretarse como la imposibilidad de detectar una banda espúrea, artificial (stutter), por falta de asignación en el programa analítico (Genotyper/Gene Mapper), en tanto que los laboratorios que informan un solo alelo podría deberse a problemas de cantidad de templado, concentración de primers, extracciones ineficientes o falta de cuantificación o cuantificación incorrecta. El laboratorio que informa 5 alelos probablemente deberá revisar meticulosamente tanto los aspectos técnicos de obtención de material, amplificación de marcadores, separación electroforética e interpretación de resultados.

Cromosoma Y

59 Laboratorios informan marcadores de cromosoma Y para M3 y 47 para M6. Los marcadores DYS19, DYS389 I, DYS390, DYS392, DYS438, DYS456 fueron informados por todos los laboratorios que los emplean en forma consensuada, tanto para la muestra forense M6 como la M3, mientras que los marcadores DYS385, DYS389 II, DYS391, DYS393, DYS437, DYS439, GATAA4, DYS448, DYS458 fueron informados en forma no consensuada por un laboratorio; sólo DYS389 II, DYS393 y DYS448 fueron informados fuera de consenso por dos laboratorios. La gran concordancia de los resultados informados para los marcadores de cromosoma Y refleja el intenso trabajo realizado por el Grupo de Marcadores Sexuales del GEP-ISFG.

Calculo Estadístico

- 11 Laboratorios usan LR. Los resultados son variables en función del número de marcadores y de las bases de datos usadas.
- El resto no efectúan estimación estadística, solo plantean el resultado en forma descriptiva.
- 1 laboratorio responde en forma incorrecta la pregunta de si M5 contribuye a M6 (5202) y otro no responde (5058)

Como se podrían explicar las causas de las faltas de consenso de los resultados emitidos? Para ello centraremos la atención en el en el marcador que fue informado con mayor grado de discrepancias con respecto al consenso (D21S11)

Ninguna de estas causas puede ser considerada

1. Característica inherente a la muestra
2. Contaminación con muestra exógena, para un solo marcador

3. Posible degradación parcial de la muestra y alta sensibilidad del D21S11 a la degradación

Causas Considerables

1. Extracción ineficiente, bajo rendimiento
2. ¿Falta de cuantificación y generación de resultados artificiales?
3. Dilución de primers que determina la disminución de la cantidad de producto
4. Contaminación de primers
5. Falta de aplicación de criterios y recomendaciones disponibles en la bibliografía
6. Inadecuado uso del equipamiento y de los programas de análisis

Consideración Final

Debemos asumir la gran importancia de nuestro trabajo científico y técnico, por lo que debemos, en la medida de lo posible, incrementar nuestra capacidad de obtención de resultados reproducibles, de efectuar los cálculos estadísticos adecuados y de emitir informes adecuadamente redactados que reflejan la calidad de la investigación realizada. Los resultados, geles, electroferogramas, etc. deben ser acordes con nuestro trabajo pericial y deben poder ser exhibidos para poder confirmar los informes redactados, al ser solicitados por las autoridades judiciales y/o policiales que los requieran.

Bibliografía Recomendada

- **DNA analysis from mixed biological materials** A. Barbarob, P. Cormacia. *Forensic Science International* 146S (2004) S123–S125
- **Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling** T.M. Clayton, J.P. Whitaker, R. Sparkes, P. Gill. *Forensic Science*

International 91 (1998) 55–70

- **Interpretation of simple mixtures of when artefacts such as stutters are present - with special reference to multiplex STRs used by the Forensic Science Service** P. Gill , B. Sparkes , J.S. Buckleton. *Forensic Science International* 95 (1998) 213–224
- **DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures.** P. Gill, C.H. Brenner, J.S. Buckleton, A. Carracedo, M. Krawczak, W.R. Mayr, N. Morling, M. Prinz, P.M. Schneider, B.S. Weir. *Forensic Science International* (in press)

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA PATERNIDAD PRACTICA EN EL EJERCICIO COLABORATIVO GEP-ISFG 2006

África Domínguez Rodríguez

Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses

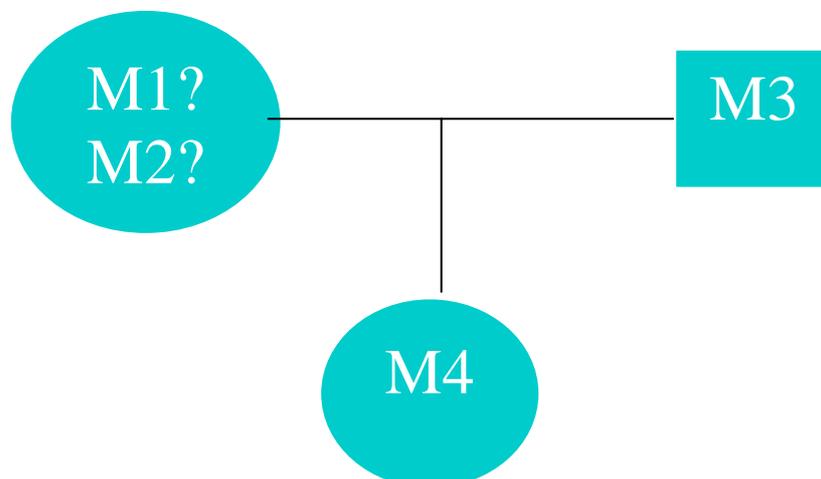
Sevilla

España

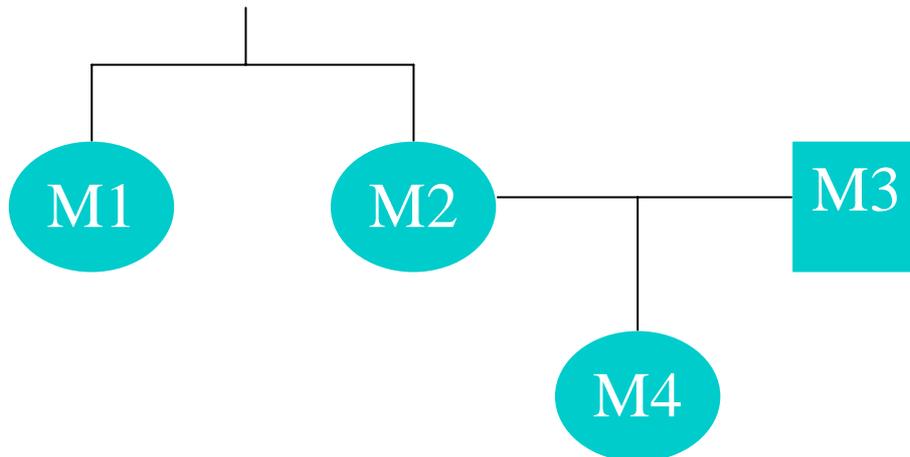
El ejercicio de colaboración para la comparación de resultados de análisis de polimorfismos de ADN en manchas de sangre y otras muestras biológicas del año 2006 del Grupo Español-Portugués perteneciente al International Society For Forensic Genetics (GEP-ISFG) ha contado con la participación de 130 laboratorios de los que 112 (86 %) emiten resultados para la paternidad práctica.

PLANTEAMIENTO

En dicho ejercicio se planteaba un caso de filiación práctica en la que se solicitaba la investigación de una maternidad, en la que se pide determinar cuál de las dos mujeres donantes M1 y M2 es la madre biológica de la recién nacida donante de M4, dando al padre biológico donante de M3 como cierto. Para ello, disponemos de muestras de sangre sobre papel de filtro de los 4 individuos implicados. El esquema genético planteado es:



La situación real es la que sigue:



- La mujer donante de M1 no es la madre biológica de M4
- La mujer donante de M2 es la madre biológica de M4
- Tal como se dijo, el varón donante de M3 es el padre biológico de M4
- Las mujeres M1 y M2 son hermanas de padre y madre, por lo que M4 es sobrina materna de M1. El hecho de que las dos mujeres que se disputan la maternidad sean hermanas biológicas supone que *a priori* compartan más alelos que dos individuos no relacionados por lo que la probabilidad de exclusión se podría reducir.

Las preguntas que textualmente se plantearon en el ejercicio fueron:

- ¿Puede la mujer donante de M1 ser la madre biológica de M4, siendo M3 el padre?
- ¿Puede la mujer donante de M2 ser la madre biológica de M4, siendo M3 el padre?

El total, los 112 laboratorios, respondieron correctamente a ambas preguntas, es decir: no a la primera y sí a la segunda, y la mayoría de los participantes, 107 aportaron además conclusiones y/o observaciones. Estos resultados son muy buenos (ningún laboratorio fuera de consenso) si bien no son tan homogéneos en los detalles como veremos a continuación.

El número y tipo de marcadores a utilizar se dejó a la elección del laboratorio, al igual que en años anteriores no se solicitaba ningún cálculo estadístico para apoyar las afirmaciones emitidas ya que al variar los marcadores empleados y las frecuencias alélicas usadas no es posible realizar una comparativa adecuada, dejando ésta para la paternidad teórica.

STRs AUTOSÓMICOS EMPLEADOS

De los 112 laboratorios:

- 37 (33 %): emplean el kit comercial Identifiler
- 30 (26.8 %): Identifiler más otros (Power Plex 16, FFv multiplex, etc.)
- 19 (17 %): varios (STRs multiplex y/o sistemas propios)
- 14 (12.5 %): Power Plex 16
- 9 (8 %): Power Plex 16 más otros (STRs multiplex y/o sistemas propios)
- 2 (1.8 %): SGM plus
- 1 (0.9 %): Profiler Plus más Cofiler

La gran mayoría de los laboratorios se decantaron por el uso de los kits comerciales, de ellos el más empleado es el Identifiler (60 % de los participantes), tan solo 7 laboratorios no utilizaron ningún kit comercial. De este uso se generaron 24 marcadores en consenso y 30 fuera de él.

TABLA DE MARCADORES AUTOSÓMICOS USADOS

■ CONSENSO: 24

- ◆ FESFPS, TH01, F13A01, VWA, TPOX, CSF1PO, FGA, F13B, LPL, SE33, D1S1656, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, Penta D, Penta E

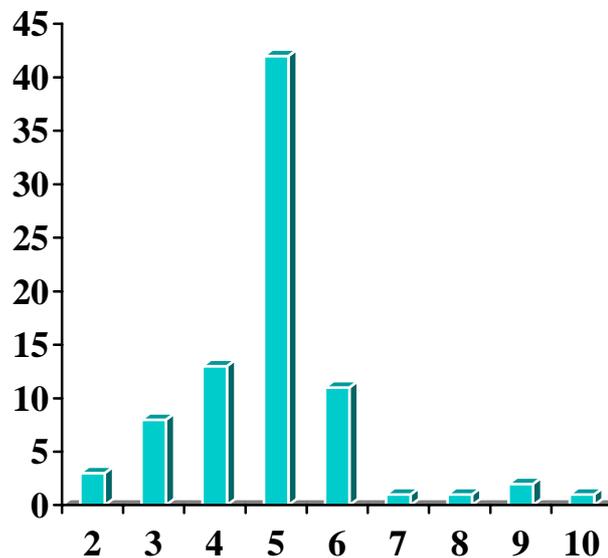
■ FUERA DE CONSENSO: 30

- ◆ CD4, D10S1237, D10S1248, D10S2325, D12S1090, D14S1434, D17S1290, D18S535, D19S253, D1S1677, D1S533, D20S480, D20S85, D22S1045, D2S441, D3S1744, D4S2364, D4S2639, D6S1056, D6S2439, D8S1132, D8S306, D8S639, D9S1118, D9S304, DHFRP2, FABP, MBPB, Penta B, REN4

A continuación se analizan las conclusiones emitidas por los laboratorios participantes. Se presenta en primer lugar la valoración de las conclusiones emitidas para la maternidad del trío M1-M3-M4, trío falso y posteriormente las emitidas para el trío verdadero M2-M3-M4.

CONCLUSIONES EMITIDAS RESPECTO AL TRÍO M1-M2-M4

De los 112 laboratorios que responden a las preguntas de la paternidad práctica, 25 (21.4 %) bien no dicen nada acerca de la posible maternidad de M1 en las conclusiones o bien la excluyen como madre pero no dicen nada acerca del número de marcadores o cuáles son los que apoyan esta exclusión. El resto, 82 laboratorios, indican el número de incompatibilidades genéticas que detectan y la mayoría indican qué loci son los responsables de la exclusión. En el siguiente gráfico se muestran cuantas incompatibilidades genéticas encontraron los laboratorios para este trío:



Dentro de los 24 marcadores consenso generados, 7 loci detectaban incompatibilidades genéticas para el trío M1-M3-M4: VWA, TPOX, F13B, D1S1656, D18S51, D19S433 y el D21S11 y dentro de los 31 marcadores fuera de consenso fueron 9 con los que detectaban inconsistencias: D10S1448, D14S1434, D19S253, D1S1677, D1S533, D22S1045, D4S2364, D4S2639 y el MBPB.

ANÁLISIS DE LAS INCOMPATIBILIDADES GENÉTICAS DETECTADAS

Los tres laboratorios que detectaron 2 incompatibilidades analizaron 8 y 10 loci; éste número de marcadores analizados para obtener una exclusión fue insuficiente, aunque más correcto sería tener en cuenta el tipo de marcador y la filiación que se está analizando en concreto, puesto que para este trío el uso del kit SGM plus con 9 marcadores autosómicos más amelogenina sirve para detectar 4 incompatibilidades genéticas, es decir el éxito en la exclusión depende del azar y del poder de discriminación de los marcadores elegidos más que el número de éstos.

42 laboratorios detectan 5 incompatibilidades; 13 laboratorios detectan 4; 11 detectan 6; 8 detectan 3; 3 detectan 2 y 5 laboratorios detectan entre 7 y 10 incompatibilidades. El 80 % de los participantes detectan entre 4 y 6 incompatibilidades, fácilmente explicable porque con el kit Identifiler se pueden detectar 5 inconsistencias y con el Power Plex 16 se pueden detectar 4.

Los 11 laboratorios que detectan 6 incompatibilidades analizan un número de marcadores que oscila entre 17 y 29.

El laboratorio que detecta 7 incompatibilidades (5054) analiza 23 marcadores autosómicos y 6 ligados al cromosoma X.

El laboratorio que detecta 8 incompatibilidades (5175) analiza 23 marcadores autosómicos.

Los 2 laboratorios que detectan 9 incompatibilidades, el 5185 y el 158537, analizan 19 y 20 loci autosómicos respectivamente y ambos 4 STRs ligados a cromosoma X.

El laboratorio que detecta 10 incompatibilidades, el 140282, analiza 33 loci autosómicos.

Sin embargo, se detectan discrepancias entre el número de inconsistencias que ciertos laboratorios pueden detectar y las que realmente informan, no se puede saber si ha ocurrido un error de transcripción de los datos o bien que realmente no las han detectado. A continuación se muestran algunos ejemplos:

- Lab. 5175: analiza 23 marcadores autosómicos y no informa de la incompatibilidad generada por el marcador D21S11 del Identifiler.
- Lab 5059: analiza 19 loci, informa de 5 inconsistencias, no detecta la generada por el marcador HUMF13B.
- Lab. 158535: analiza los 15 marcadores del Identifiler, informa de 3 inconsistencias, no detecta las generadas por los loci D19S433 y D21S11.

CLASIFICACIÓN DE LAS EXCLUSIONES

De los 107 laboratorios que aportaron datos acerca de las exclusiones, tan solo 4 las clasificaron en exclusiones de primer orden y de segundo orden. Así, el laboratorio 4364 (SGM plus) informó de 3 exclusiones de 1er orden y 1 de 2º orden, el lab. 4371 (IDFL + 4 STRs más) informó de 5 exclusiones, 4 de ellas de primer orden no pronunciándose acerca de la quinta exclusión y por último los laboratorios 4376 y 158513 (ambos IDFL) informan de 5 exclusiones de primer orden.

A pesar de no ser muy empleado por los laboratorios sería interesante recordar en qué consisten las exclusiones de primer orden y las de segundo para unificar criterios (*).

Las exclusiones de primer orden surgen cuando el supuesto hijo posee un alelo ausente en la presunta madre y en el padre o cuando en el supuesto hijo no se detecta ninguno de los alelos que están presentes en la presunta madre en heterocigosis de ésta y/o del hijo.

Las exclusiones de segundo orden surgen cuando el supuesto hijo y la presunta madre son homocigotos para alelos distintos, este hecho puede

deberse a diversas circunstancias, bien por que realmente no sea el hijo o bien a eventos genéticos que produzcan una aparente incompatibilidad, por ej. mutaciones silentes.

MARCADORES	M1	M3	M4	
VWA	14/16	17/19	17/19	1er orden
D18S51	12/17	13/17	13/15	1er orden
D19S433	13/14	13/16	16	1er orden
D21S11	29/32.2	31/33.2	31/33.2	1er orden
TPOX	8/9	8/11	11/12	1er orden

(*) tomado de un curso impartido por D. Juan Antonio Luque, INTCF de Barcelona.

DISCREPANCIAS CON EL TIPADO CONSENSO PARA EL TRÍO M1-M3-M4

Se han contabilizado 46 discrepancias con el tipado consenso para los cuatro individuos que intervienen en la maternidad práctica, de las que 35 afectan a un miembro del trío M1-M3-M4. Estas 46 discrepancias se concentran en 19 laboratorios, la mayoría de ellos solamente muestran discrepancias en un solo marcador, tan solo 4 laboratorios muestran discrepancias en dos marcadores.

A ninguno de los 19 laboratorios que presentan estas discrepancias, les afectan a su conclusión de descartar a M1 como madre de M4 siendo M3 el padre, sin embargo en cuatro laboratorios generan una nueva incompatibilidad con la madre M1 (lab. 5196 discrepancia en D7S820, lab. 158533 en D3S1358 y el lab. 158542 en D8S1139) e incluso con el padre cierto M3 (lab. 158537, la discrepancia en TH01). En el siguiente gráfico se muestra el tipado consenso para los tres individuos en los marcadores indicados y se muestran las discrepancias entre paréntesis.

MARCADORES	M1	M3	M4
D7S820	10/12	9/12	9/12 (9/11)
D3S1358	15/18	15	15 (14/15)

D8S1179	12/14	12/13 (12/14)	12/13 ()
TH01	6/8	7	6/7 (4/6)

Por último, respecto a este trío, ningún laboratorio calcula el índice de maternidad (IM) considerando las incompatibilidades como mutaciones, tan solo dos laboratorios indican que la LR tendría un valor de cero.

CONCLUSIONES EMITIDAS RESPECTO DEL TRÍO M2-M3-M4

Los 112 laboratorios (100 %) afirmaron que M2 puede ser la madre biológica de M4 siendo M3 el padre biológico. De los 107 laboratorios que aportan conclusiones y observaciones:

- 32 laboratorios no indican ningún resultado de la valoración estadística en la que deberían basarse para apoyar su afirmación. Emplean frases como las siguientes:
 - o “No puede excluirse la relación madre-hija”. “No existe incompatibilidad genética para una relación madre-hija”. “En todos los marcadores analizados, los alelos maternos de M4 coinciden con los alelos presentes en M2”
 - o Hay cuatro laboratorios que emplean frases como: “la madre biológica de M2 es M4” o “el trío M2-M3-M4 es compatible en todos los marcadores analizados, de manera que puede concluirse que M2 y M3 son padres biológicos de M4”. Una de las conclusiones que pudieron extraerse del curso de estadística previo a estas Jornadas fue la necesidad de descartar el uso de los predicados verbales para explicar una probabilidad (LR o IP) cuánto más importante esta necesidad cuando ni siquiera se hace una valoración estadística en la que basarse.

- 75 laboratorios (70 %) aportan resultados de valoración estadística acerca del trío M2-M3-M4. De ellos, 57 laboratorios (76 %) indican el índice de maternidad total o acumulada (IM) y la probabilidad de

maternidad (W), 3 laboratorios (4 %) solo indican el IM y 15 laboratorios (20 %) solo indican la W.

Recordemos las recomendaciones que a este respecto hace la ISFG:

Si se calcula el peso de la evidencia, éste debe estar basado en principios de probabilidad, como el IP (Índice de Paternidad), o el IM (Índice de Maternidad) en nuestro caso. Si se emplean solo otros valores, como la W, deben indicarse las premisas y las asunciones que se toman para realizar el cálculo, por ejemplo: si hay algún parental que se dé como cierto, o la probabilidad *a priori* que se asume.

De los 75 laboratorios que aportan la valoración estadística, 61 no especifican la probabilidad *a priori*, 12 indican que dicha probabilidad es de 1/2 (la madre M2 tiene la misma probabilidad de ser la madre cierta como de no serlo) y 2 laboratorios indicaron que esta probabilidad era de 1/3, puesto que consideraban como posible madre a M1, a M2 o cualquier otra mujer de la población, probabilidad bastante extraña puesto que previamente ya ha descartado a M1 como posible madre de M4.

En cuanto a la referencia al parental indubitado, de los 107 laboratorios que aportan conclusiones y/o observaciones, 65 laboratorios (65 %) no especifican esta presunción, 41 laboratorios (38 %) sí lo hacen y 1 laboratorio parece poner en duda el hecho de que M3 sea el padre cierto de M4 puesto que calcula un IP para M3 dando como cierta a la presunta madre M2.

En cuanto al uso de los predicados verbales de los 75 laboratorios que aportan la valoración estadística 60 no traducen el cálculo a ningún predicado verbal, 14 lo traducen al predicado verbal de Hummel de “maternidad prácticamente probada” y 1 laboratorio usa la expresión “se puede afirmar la maternidad de M2 sobre M4 más allá de cualquier duda razonable”.

VALORACIÓN ESTADÍSTICA DEL TRÍO M2-M3-M4

Los valores del índice de maternidad calculados fueron en general muy categóricos para afirmar la maternidad de M2 sobre M4 dando a M3 como cierto, ya que el valor mínimo aceptable para el $IM = 10.000$, lo que da una probabilidad de maternidad $W = 99,99 \%$, se calcularon valores de IM entre 10 millones y más de 1 billón. De hecho, más del 50 % de los valores de IM aportados se encontraban entre 1.000 y 100.000 millones. Tan solo 2 laboratorios se encontraban en el límite admisible, uno de ellos por debajo, lo explicaba por problemas en el tipado que le obligó a realizar los cálculos con un número bajo de marcadores.

Todos los laboratorios (a excepción del último indicado) presentaban valores de probabilidad de maternidad superiores al 99,99 %, de hecho, el 60 % informaban de valores de W con entre 6 y 8 decimales llegando incluso hasta once “nueves” decimales.

Resaltar la importancia de poner todos los decimales que se obtienen, sobre todo si sólo se diera el valor de la W, por ejemplo, dos de los laboratorios que obtuvieron mayores valores de IM, superiores al billón, indican sin embargo valores de W de 99,99 y 99,9999, cuando el valor que le correspondería sería: 99,999999999999.

DISCREPANCIAS CON EL TIPADO CONSENSO PARA EL TRÍO M2-M3-M4

Entre las 46 discrepancias antes contabilizadas, 37 afectan a un miembro del trío M2-M3-M4, de todas ellas 3 no alteran el IM parcial para el marcador, puesto que afectan al alelo que el parental heterocigoto no transmite al hijo. La mayoría, 30 discrepancias, sí alteran el valor del IM parcial, bien porque modifique la probabilidad de ceder el alelo obligado al hijo (al transformar un heterocigoto en homocigoto o viceversa) o porque al cambiar los alelos cambien lógicamente las frecuencias alélicas.

Hay 4 discrepancias que en este trío verdadero provocan incompatibilidades genéticas:

LOCUS	M2	M3	M4	
TPOX	8/12 (8/11)	8/11 (8/10)	11/12 (10/12)	Incompatibilidad con madre M2
TH01	6/8	7	6/7 (4/6)	Incompatibilidad con padre M3

Si no se tratara de un error de transcripción de los datos, en ambos casos los dos laboratorios deberían haber indicado la incompatibilidad detectada, si no han contado con ese marcador para hacer el cálculo del trío o si sí lo han contado, se debería indicar qué fórmula han empleado en el cálculo.

STRs LIGADOS AL CROMOSOMA X

De los 107 laboratorios que aportan conclusiones y observaciones a este ejercicio, tan solo 19 (aprox. 18 %) emplean STRs ligados al cromosoma X, lo que genera 6 STRs consensuados cuyo uso varía entre los laboratorios:

- 15 laboratorios usan el marcador HPRTB
- 10 usan DXS7423
- 7 usan DXS101
- 6 usan DXS8378
- 5 usan DXS7132
- 5 usan GATA172D05

Y solo 3 laboratorios (4356, 5054 y 158583) introducen algún comentario sobre su uso en las conclusiones, para confirmar la exclusión de M1 y para incluir a M2 en la maternidad respecto a M4, para afirmar la posible hermanidad entre M1 y M2.

ADN MITOCONDRIAL

De los 107 laboratorios que aportan conclusiones y observaciones a este ejercicio, 12 (el 11 %), hacen referencia en este apartado de la paternidad práctica al estudio de ADN mitocondrial entre las dos madres alegadas M1 y M2 y la supuesta hija M4. En general hacen referencia a que el haplotipo

mitocondrial obtenido para las tres o para las dos posibles madres es el mismo, por lo que no se puede descartar que procedan de la misma línea materna y que por tanto éste estudio no es útil para saber cuál de las dos es la madre de M4. Uno de los laboratorios además calcula la LR (LR= 1/probabilidad de coincidencia en la población de referencia) en 828,5.

ÍNDICE DE HERMANIDAD

Hay dos laboratorios (5054 y 5208) que calculan éste índice entre M1 y M2.

- 5054: analiza 22 loci autosómicos y calcula un IH= 13.422
- 5208: analiza 17 loci autosómicos y calcula un IH= 17.668

CONCLUSIONES

1ª.- En este Ejercicio del 2006 han participado 130 laboratorios, de los que 112 (86 %) emiten resultados para la Paternidad Práctica. El 100 % responden según consenso a las preguntas planteadas acerca de la investigación de la maternidad.

2ª.- La gran mayoría de los laboratorios participantes usan kits comerciales de STRs autosómicos (el 60 % usan al menos el kit Identifiler) generando 24 marcadores consensuados y 30 fuera de consenso. Tan solo el 18 % de los laboratorios participantes usan STRs autosómicos ligados al cromosoma X.

3ª.- El 61 % de los laboratorios no especifican la premisa necesaria de considerar a M3 como padre indubitado en la redacción de sus conclusiones.

4ª.- Respecto del trío falso M1-M3-M4:

- 107 laboratorios (80 %) informan entre 3 y 10 incompatibilidades entre M1, la madre alegada y la recién nacida M4 (el 80 % de éstos entre 4 y 6).
- 19 laboratorios (18 %) presentan 46 discrepancias con el tipado

consenso para los cuatro individuos implicados en esta filiación, de las que 35 afectan a un miembro de este trío, de ellas, 3 aumentan las incompatibilidades con M1 y 1 genera una incompatibilidad con el padre cierto M4, en ningún caso alteran la conclusión del laboratorio acerca de este trío.

5ª.- Respecto del trío verdadero M2-M3-M4:

- El 70 % de los laboratorios emiten una valoración estadística en la que basan su conclusión de la posible maternidad de M2 respecto a M4 siendo M3 el padre.
- El 61% no especifican la paternidad *a priori* asumida, lo cual va en contra de las recomendaciones de la ISFG.
- El 61 % aciertan al no traducir el resultado de la LR a ningún predicado verbal.
- Todos los valores de IM aportados son superiores al mínimo aceptable (IM= 10.000 y W= 99,99 %) de hecho más del 50% dan un valor de IM entre 1.000 y 100.000 millones.
- De las 46 discrepancias antes vistas, 37 afectan a éste trío, 3 no afectan al IM, 30 afectan a la IM parcial del marcador implicado y 4 (11 %) introducen dos incompatibilidades, una con la madre M2 y otra con el padre M3.

EJERCICIO DE PATERNIDAD TEORICA GEP-ISFG 2006 EN EL EJERCICIO COLABORATIVO GEP-ISFG 2006

Oscar García

Sección de Genética Forense

Área de Laboratorio Ertzaintza

Erandio, Bizkaia

España

En años anteriores los diferentes ejercicios de paternidad teórica propuestos en los diversos ejercicios colaborativos del GEP-ISFG fueron relativamente complejos, tanto en sus planteamientos como en diferentes aspectos de los mismos (posibilidad de utilizar frecuencias alélicas mínimas, presencia de alelos nulos, presencia de mutaciones paternas y/o maternas, etc.). Como consecuencia de ello resultaba muy difícil consensuar un valor aceptable para usarlo como valor de referencia a la hora de emitir un certificado por parte de la Coordinadora del ejercicio.

Para intentar paliar este problema, se propuso que el ejercicio de paternidad teórica que figurara en los próximos ejercicios fuera relativamente sencillo y se propuso, también, la inclusión de un “paper challenge” optativo de mayor dificultad.

En cuanto al ejercicio de paternidad teórica que nos ocupa, se trataba de calcular una paternidad en la que **P** es el posible padre de **H** y **M** es la madre de **H**. Se trataría de una paternidad convencional (posible padre, madre e hijo), no habría mutaciones y/o alelos nulos entre los datos suministrados y no sería necesario usar frecuencias alélicas mínimas.

Se aportó una tabla con los datos fenotípicos del P, M e H, así como una tabla con las frecuencias alélicas de los marcadores utilizados (base de datos del INTCF de Madrid) y se debía calcular la **probabilidad de paternidad de P**

respecto de H.

El ejercicio propuesto fue el siguiente:

	P	H	M
Amelogenina	X/Y	X/X	X/X
TH01	8/8	8/9.3	9.3/9.3
TPOX	8/11	8/11	8/8
CSF1PO	10/12	10/12	10/12
D3S1358	15/16	16/16	16/17
VWA	17/17	17/17	17/17
FGA	22/23	21/22	21/22
D5S818	11/12	11/11	11/11
D13S317	13/13	12/13	12/14
D7S820	8/9	8/9	8/10
D8S1179	13/14	13/13	13/14
D21S11	29/31.2	28/29	28/30
D18S51	15/15	15/16	15/16
D16S539	12/12	12/12	12/13

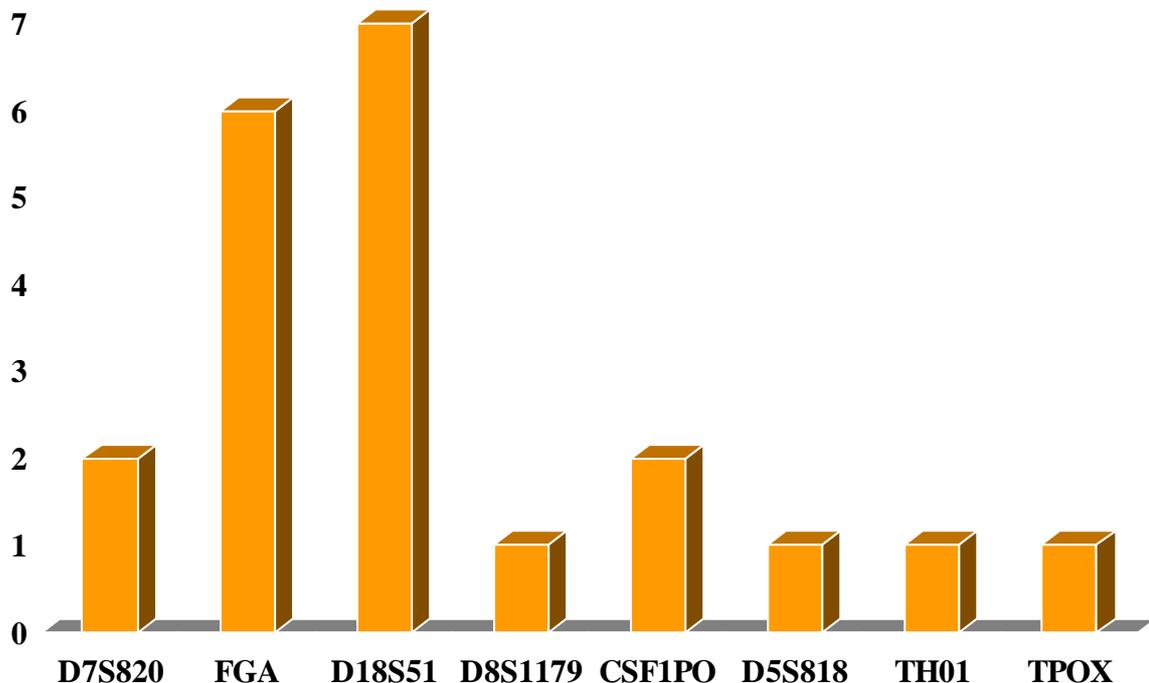
De un total de 116 laboratorios participantes en el control de ADN del año 2006, en este apartado de la resolución de la paternidad práctica participaron 114 laboratorios.

En cuanto a los resultados obtenidos podemos destacar:

- De las 1482 determinaciones a calcular (13 marcadores por 114 laboratorios), sólo se ha observado 44 determinaciones erróneas, lo que representa un 0'03 %
- El excepcional resultado anterior contrasta con que esas

determinaciones erróneas se han observado en 22 laboratorios participantes de un total de 114, lo que representa un 19'3 % de laboratorios que cometen algún error. Si consideramos que el caso propuesto es el ejemplo más sencillo posible de cálculo estadístico de una paternidad, el valor del 19'3 % de laboratorios con algún error es una cifra excepcionalmente alta.

A continuación se presenta una distribución de los errores en la aplicación de la fórmula en función de los marcadores genéticos:

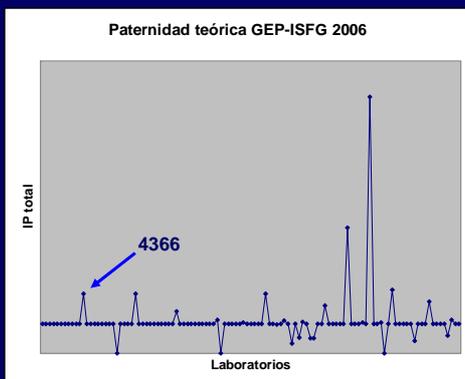


■ Error claro en fórmula

Como puede verse, el mayor número de errores observado se da en los marcadores FGA y D18S51 que son aquellos marcadores donde el tipaje genético del hijo y de la madre son iguales y además son heterocigotos.

A continuación se presentan los errores observados en los 22 laboratorios. Se puede observar un gráfico que nos presenta la desviación del valor obtenido de IP total de dicho laboratorio frente al valor consenso. En azul puede observarse el error o errores detectados así como una sencilla explicación a los mismos.

Laboratorio 4366



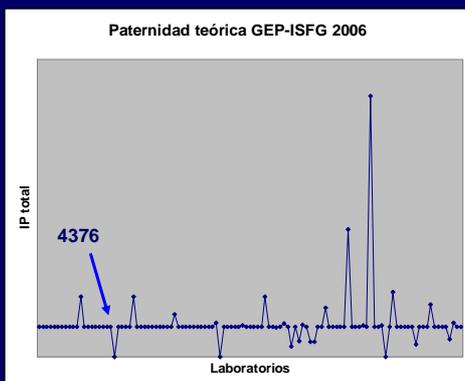
H	M	PP
8 / 9	8 / 10	8 / 9

~~1/frec 9~~

1/2frec 9

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	1	0,5548	1,8025
CSF1PO	1	0,6062	1,6496
D3S1358	1	0,4784	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	1	0,671	1,4903
D5S818	1	0,6746	1,4824
D13S317	1	0,113	8,8496
D7S820	1	0,1259	7,9428
D8S1179	1	0,6126	1,6324
D21S11	1	0,4406	2,2696
D18S51	1	0,3197	3,1279
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL		911792	
W		0,9999989	

Laboratorio 4376



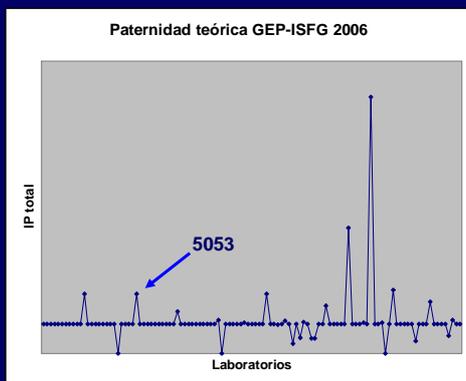
CSF1PO: IP incorrecto.
Toma Y de TPOX

IP total incorrecto

W incorrecta

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	1	0,6062	3,6049
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,3355	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	1	0,113	8,8495
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,3063	1,6323
D21S11	0,5	0,2203	2,2696
D18S51	1	0,3197	3,1275
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL		390,625	
W		99,99781	

Laboratorio 5053



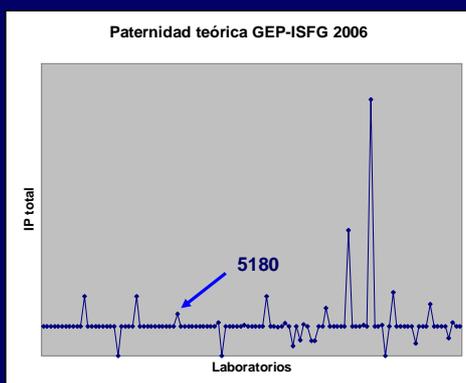
H	M	PP
10 / 12	10 / 12	10 / 12

0,5/0,5(frec10+frec12)

Bien X Bien Y ~~Mal X/Y~~

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	0,5	0,3031	3,2992
D3S1358	0,25	0,1196	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,1677	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	0,5	0,0565	8,8495
D7S820	0,25	0,0629	3,9714
D8S1179	0,25	0,1531	1,6323
D21S11	0,25	0,1105	2,2696
D18S51	0,5	0,1598	3,1279
D16S539	0,5	0,1553	3,2185
IP TOTAL		911791,66	
W		99,9998903	

Laboratorio 5180



~~0,0056~~ 0,0565

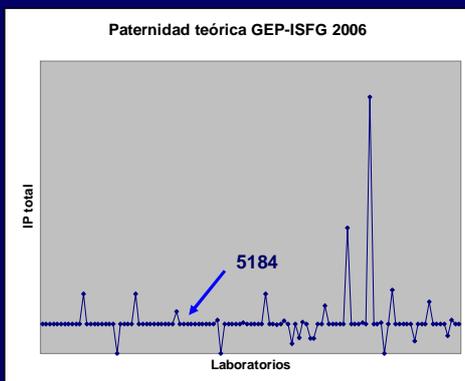
H	M	PP
12 / 12	12 / 13	12 / 12

0,5/0,5(~~frec13+frec14~~)

0,5/0,5frec 12

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	0,5	0,3031	1,6496
D3S1358	0,25	0,1196	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,1678	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	0,5	0,0056	8,8495
D7S820	0,25	0,063	3,9714
D8S1179	0,25	0,1532	1,6323
D21S11	0,25	0,1102	2,2696
D18S51	0,5	0,1599	3,1279
D16S539	0,5	0,1103	4,533
IP TOTAL		642098	
W		99,9998443	

Laboratorio 5184



FGA: Mal X/Y

~~0,5/0,5(frec21+frec22)~~

~~0,25/0,5(frec21+frec22)~~

D18S51

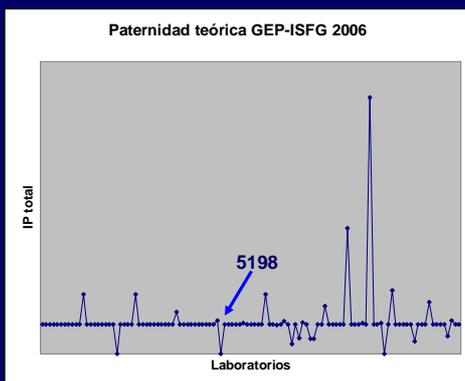
~~1/0,5(frec15+frec16)~~

1/(frec15+frec16)

Bien IP total y W

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	0,5	0,3031	1,6496
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,1677	0,7385
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	1	0,113	8,8495
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,25	0,1532	1,6323
D21S11	0,5	0,3063	1,6323
D18S51	1	0,1598	6,2578
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	451996,7754		
W	99,9998		

Laboratorio 5198



FGA

~~0,5/frec22~~

~~0,5/(frec21+frec22)~~

D18S51

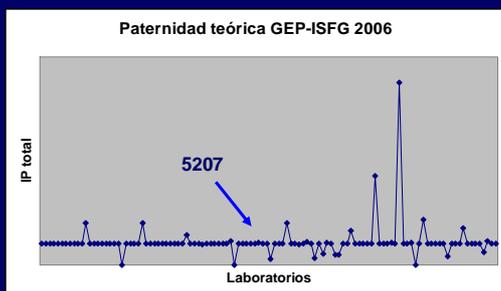
~~1/frec15~~

1/(frec15+frec16)

W en vez de IP

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	0,8797
TPOX	0,5	0,2774	0,6432
CSF1PO	1	0,6062	0,6226
D3S1358	0,5	0,2392	0,6764
VWA	1	0,2886	0,776
FGA	0,5	0,17	0,7463
D5S818	0,5	0,3373	0,5971
D13S317	1	0,113	0,8995
D7S820	0,5	0,1259	0,7988
D8S1179	0,5	0,3063	0,6201
D21S11	0,5	0,2203	0,6941
D18S51	1	0,1489	0,8704
D16S539	1	0,3107	0,7629
IP TOTAL	0,999999482		
W	99,99994823		

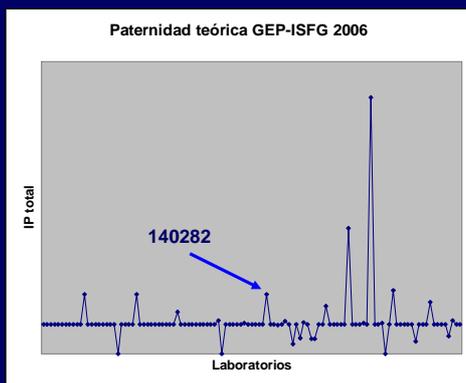
Laboratorio 5207



TH01
~~1/frec9.3~~
 1/frec8
 TPOX
~~0,5/frec8~~
 0,5/frec11

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,2620	3,8168
TPOX	0,5	0,5043	0,9915
CSF1PO	1	0,6062	1,6496
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,4650
FGA	0,5	0,3355	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	1	0,1130	8,8496
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,3063	1,6324
D21S11	0,5	0,2203	2,2696
D18S51	1	0,3197	3,1279
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	130938		
W	99,999		

Laboratorio 140282

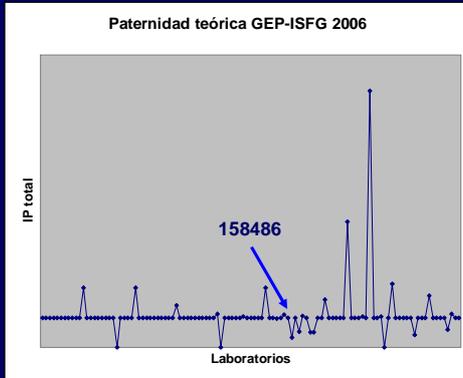


H	M	PP
13 / 13	13 / 14	13 / 14

~~0,5/0,5frec13~~
 0,25/0,5frec13

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8025
CSF1PO	0,5	0,3031	1,6496
D3S1358	0,25	0,1196	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,1678	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	0,5	0,0565	8,8496
D7S820	0,25	0,063	3,9714
D8S1179	0,5	0,1532	3,2648
D21S11	0,25	0,1102	2,2696
D18S51	0,5	0,1599	3,1279
D16S539	0,5	0,1554	3,2185
IP TOTAL	911791,6591		
W	99,99989		

Laboratorio 158486



D5S818: frec12 por frec11

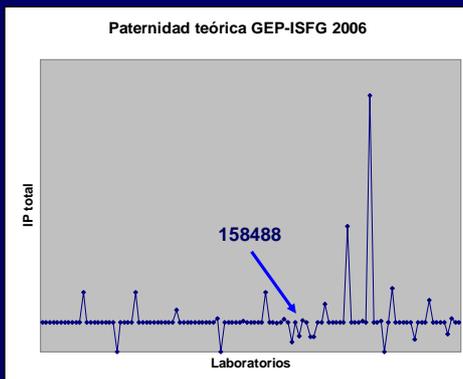
~~0,5/frec12~~ 0,5/frec11

D13S317: frec12 por frec13

~~1/frec12~~ 1/frec13

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8025
CSF1PO	1	0,6062	1,6496
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,3355	1,4903
D5S818	0,5	0,3879	1,289
D13S317	1	0,292	3,4247
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,1532	3,2648
D21S11	0,5	0,2203	2,2696
D18S51	1	0,3197	3,1279
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	153411,4494		
W	99,99934816		

Laboratorio 158488



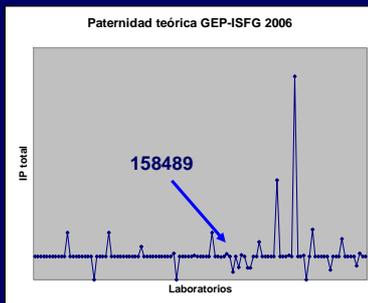
D3S1358: frec16 de VWA por frec16 de D3S1358 (contiguos en la tabla)

D18S51

~~0,5/(frec15+frec16)~~ 1/(frec15+frec16)

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8025
CSF1PO	1	0,6062	1,6496
D3S1358	0,5	0,2254	2,2183
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,3355	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	1	0,113	8,8496
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,3063	1,6324
D21S11	0,5	0,2203	2,2696
D18S51	0,5	0,3197	1,564
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	241903,9095		
W	99,9996		

Laboratorio 158489



CSF1PO: Mal X/Y

~~0,5/frec10~~

1/(frec10+frec12)

FGA: Mal X/Y

~~0,5/frec22~~

0,5/(frec21+frec22)

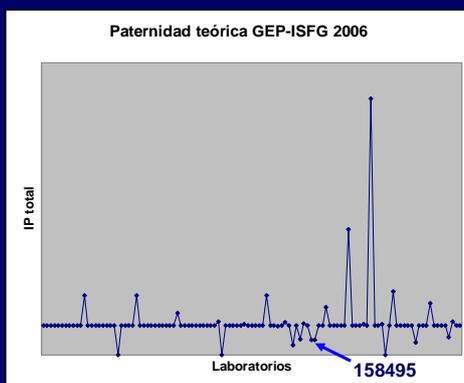
D18S51: Mal X/Y

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8025
CSF1PO	0,5	0,2756	1,663
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,17	1,4706
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	1	0,13	8,8496
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,3063	1,6329
D21S11	0,5	0,2203	2,2696
D18S51	1	0,1489	3,358
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	487036		
W	99,9997		

~~1/frec15~~

1/(frec15+frec16)

Laboratorio 158495



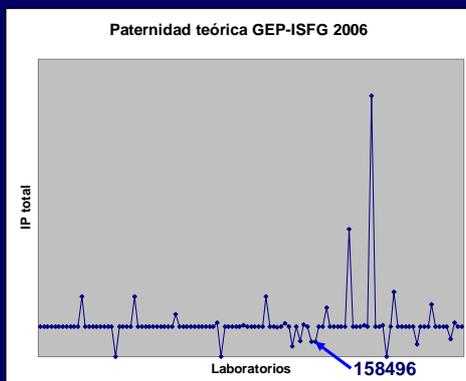
H	M	PP
11 / 11	11 / 11	11 / 12

~~0,5/2frec11~~

0,5/frec 11

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8025
CSF1PO	0,5	0,3031	1,6496
D3S1358	0,25	0,1196	2,0903
VWA	2	0,5772	3,465
FGA	0,25	0,1677	1,4903
D5S818	0,5	0,6746	0,7412
D13S317	0,5	0,0565	8,8496
D7S820	0,25	0,0629	3,9746
D8S1179	0,25	0,1531	1,6329
D21S11	0,25	0,1101	2,2707
D18S51	0,5	0,1598	3,1289
D16S539	0,5	0,1553	3,2196
IP TOTAL	228520,3283		
W	99,9996		

Laboratorio 158496



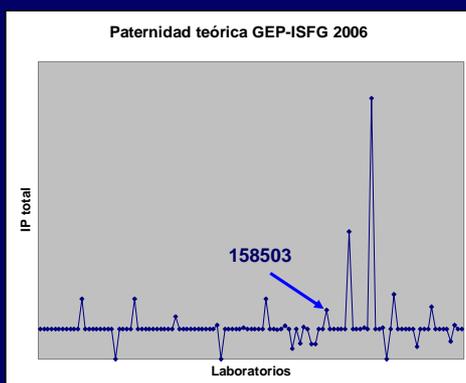
H	M	PP
10 / 12	10 / 12	10 / 12

~~0,25/0,5(frec10+frec12)~~

0,5/0,5(frec10+frec12)

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	0,25	0,3031	0,8248
D3S1358	0,25	0,1196	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,1678	1,4899
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	0,5	0,0565	8,8496
D7S820	0,25	0,063	3,9683
D8S1179	0,25	0,1532	1,6319
D21S11	0,25	0,1105	2,2686
D18S51	0,5	0,1599	3,127
D16S539	0,5	0,1554	3,2175
IP TOTAL	227377,2156		
W	99,9996		

Laboratorio 158503



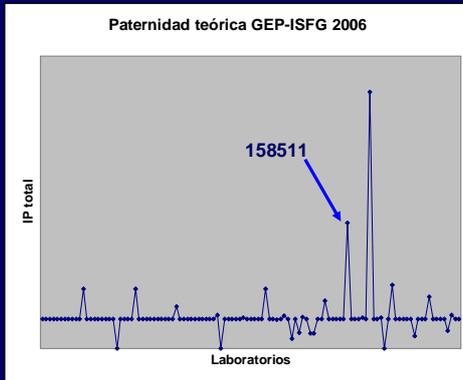
X es IP

Y es IP acumulado

IP es W acumulado

Marcador	X	Y	IP
TH01	8,0645	8,0645	0,8896
TPOX	1,7182	13,8564	0,9326
CSF1PO	1,6977	23,5255	0,9592
D3S1358	1,9841	46,6739	0,979
VWA	3,6496	170,341	0,9941
FGA	1,4492	246,8581	0,9959
D5S818	1,5243	376,362	0,9973
D13S317	8,7719	3300,7414	0,9996
D7S820	4,0322	13309,2494	0,9999
D8S1179	1,7543	23348,4162	0,9999
D21S11	2,3041	53797,0857	0,9999
D18S51	3,4364	184868,305	0,9999
D16S539	4	739473,221	0,9999
IP TOTAL	739473,2212		
W	99,999		

Laboratorio 158511



FGA

~~$0,5/frec22$~~

$0,5/(frec21+frec22)$

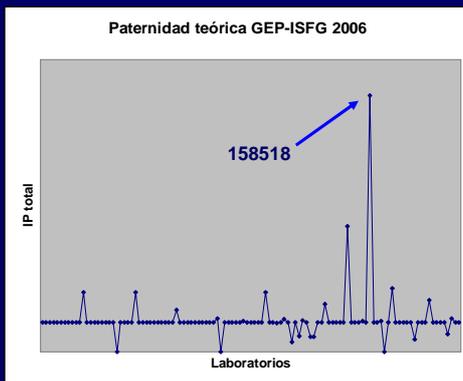
D18S51

~~$1/frec15$~~

$1/(frec15+frec16)$

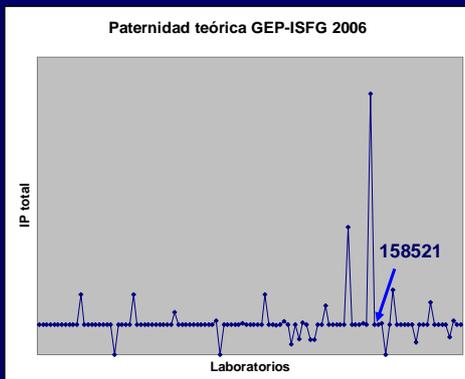
Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	1	0,6062	1,6496
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,17	2,9411
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	1	0,113	8,8495
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,3063	1,6323
D21S11	0,5	0,2203	2,2696
D18S51	1	0,1489	6,7159
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	1931383		
W	99,99994		

Laboratorio 158518



Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,0716	13,95
TPOX	0,5	0,2797	1,787
CSF1PO	0,25	0,0911	2,743
D3S1358	0,25	0,0572	4,369
VWA	1	0,0832	12,007
FGA	0,125	0,0281	4,443
D5S818	0,5	0,1137	4,394
D13S317	0,25	0,0329	7,576
D7S820	0,25	0,0437	5,709
D8S1179	0,25	0,0938	2,664
D21S11	0,25	0,053	4,716
D18S51	0,25	0,0254	9,83
D16S539	0,5	0,0965	5,179
IP TOTAL	1936649433		
W	99,99999995		

Laboratorio 158521



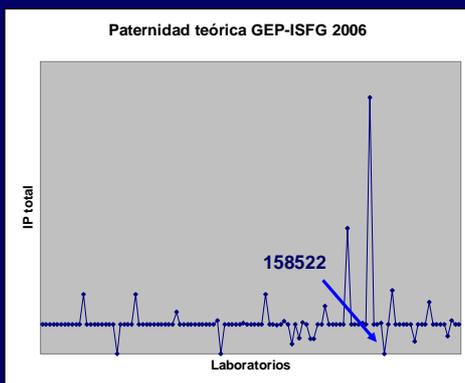
H	M	PP
15 / 16	15 / 16	15 / 15

~~0,5/frec15~~

0,5/0,5(frec15+frec16)

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	0,1515	0,0911	1,633
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,17	1,4705
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	1	0,113	8,8495
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,3063	1,6323
D21S11	0,5	0,2203	2,2686
D18S51	0,5	0,1489	3,3579
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	477963,5054		
W	99,9998		

Laboratorio 158522



FGA

~~1/(frec21+frec22)~~

0,5/(frec21+frec22)

D18S51

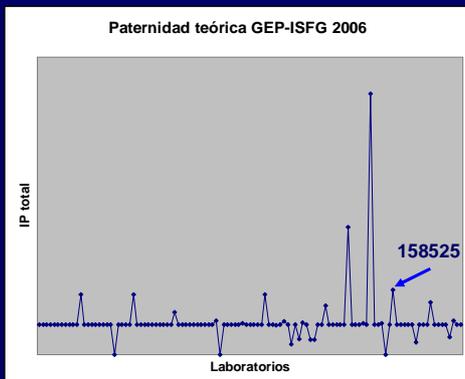
~~1/0,5(frec15+frec16)~~

1/(frec15+frec16)

Mal IP total

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8025
CSF1PO	0,25	0,1516	1,6496
D3S1358	0,25	0,1196	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,0839	2,9806
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	0,5	0,0565	8,8496
D7S820	0,25	0,063	3,9714
D8S1179	0,25	0,1532	1,6323
D21S11	0,25	0,1102	2,2696
D18S51	0,5	0,0799	6,2559
D16S539	0,5	0,1554	3,2185
IP TOTAL	3886,37		
W	99,974276		

Laboratorio 158525



~~0,3031~~

0,1196

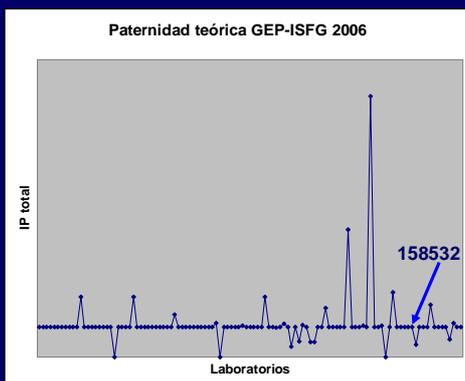
H	M	PP
21 / 22	21 / 22	22 / 23

~~0,25/0,5(frec22+frec23)~~

0,25/0,5(frec21+frec22)

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	0,5	0,3031	1,6496
D3S1358	0,25	0,3031	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,1565	3,1969
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	0,5	0,0565	8,8495
D7S820	0,25	0,063	3,9714
D8S1179	0,25	0,1532	1,6324
D21S11	0,5	0,1102	2,2696
D18S51	0,5	0,1599	3,1279
D16S539	0,5	0,1554	3,2185
IP TOTAL		977829,03	
W		99,9998977	

Laboratorio 158532



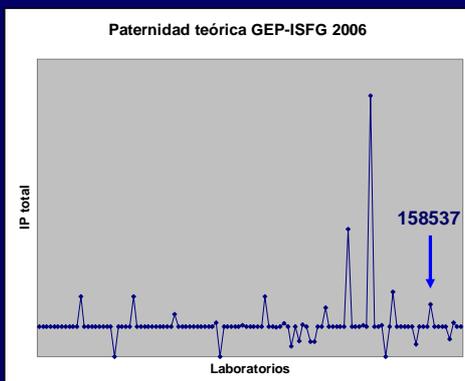
H	M	PP
8 / 9	8 / 10	8 / 9

~~0,5/(frec8+frec9)~~

0,5/frec9

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8024
CSF1PO	1	0,6062	1,6496
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,3355	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	1	0,113	8,8495
D7S820	0,5	0,2998	1,6678
D8S1179	0,5	0,3063	1,6323
D21S11	0,5	0,2204	2,2696
D18S51	1	0,3197	3,1279
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL		191430,2691	
W		99,99948	

Laboratorio 158537

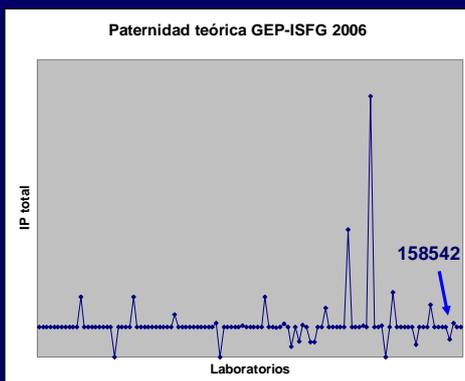


FGA: valor X (Y) no correcto

IPs parciales son correctos, pero IP total no (incluso considerando error de FGA)

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,1368	7,3099
TPOX	0,5	0,2774	1,8025
CSF1PO	0,5	0,3031	1,6496
D3S1358	0,5	0,2392	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,5	0,1678	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4824
D13S317	1	0,113	8,8496
D7S820	0,5	0,1259	3,9714
D8S1179	0,5	0,3063	1,6324
D21S11	0,5	0,2203	2,2696
D18S51	0,5	0,1599	3,1279
D16S539	1	0,3107	3,2185
IP TOTAL	792683,3841		
W	0,999998738		

Laboratorio 158542



H	M	PP
8 / 9.3	9.3 / 9.3	8 / 8

~~1/frec6~~

No hay alelo 6

1/frec8

Marcador	X	Y	IP
TH01	1	0,2298	4,3516
TPOX	0,5	0,2774	1,8022
CSF1PO	0,5	0,3031	1,6496
D3S1358	0,25	0,1199	2,0903
VWA	1	0,2886	3,465
FGA	0,25	0,1678	1,4903
D5S818	0,5	0,3373	1,4823
D13S317	0,5	0,0565	8,8449
D7S820	0,25	0,063	3,9714
D8S1179	0,25	0,1532	1,6324
D21S11	0,25	0,1102	2,2696
D18S51	0,5	0,1599	3,1279
D16S539	0,5	0,1554	3,2185
IP TOTAL	271395		
W	99,9996315		

Posibles acciones correctoras a implementar por parte de laboratorios con errores

A continuación se presentan diversas sugerencias que probablemente minimizarán los errores anteriormente detectados:

1. Los cálculos estadísticos pueden ser realizados por dos personas entrenadas y diferentes del mismo laboratorio
2. En aquellos casos donde sólo hubiera una persona entrenada, los cálculos pueden ser efectuados manualmente y con algún programa específico es estadística para cálculo de paternidades (el programa Familias es una excelente herramienta que puede ser descargada gratis de Internet)
3. Necesidad de formación de uno o varios miembros del laboratorio
4. Consulta a expertos en la materia

EJERCICIO DE INTERPRETACIÓN DE SECUENCIAS DE ADNmt

Manuel Crespillo

Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses

Barcelona

España

PRESENTACION Y OBJETIVOS

Durante los últimos años el ejercicio anual del grupo nos ha mostrado como la calidad de los resultados del análisis de ADNmt, entendida esta calidad en término de consenso de resultados, ha aumentado de forma progresiva año tras año. Sin embargo, desconocemos si este consenso también existe cuando se trata de abordar la fase interpretativa de resultados. El ejercicio que se planteaba desde el grupo de trabajo de ADNmt tenía como finalidad testar como los laboratorios interpretábamos unos determinados resultados en un determinado escenario, y así poder definir si existían aspectos sobre los que trabajar para poder mejorar la pericia.

Objetivos del ejercicio:

1. Conocer, ante escenarios de “cierta complejidad”, como se aborda la faceta interpretativa por parte de los laboratorios
2. Intercambiar información sobre aspectos meramente interpretativos.
 - Valoración estadística de coincidencias
 - Criterios de aceptación de posiciones heteroplásticas
 - Criterios de interpretación
 - Nomenclatura

PLANTEAMIENTO

A principios de Enero se realizó la presentación del ejercicio ante el grupo, en

la página del GEP-ISFG, solicitando a los laboratorios interesados que lo comuniquen para remitirles un formulario de participación (donde se recogen datos básicos del laboratorio: nombre, persona de contacto, nº de teléfono, nº de fax...).

Para evitar la variabilidad que ocasiona el analizar muestras en laboratorios diferentes, se cargan en la página los archivos electrónicos con los electroferogramas de las muestras implicadas en los diferentes supuestos y para su apertura se les proporciona a los participantes una clave. Se establece un periodo de dos meses para la realización del ejercicio. Junto al formulario que se proporciona a los participantes, además de incluir los supuestos se solicita cierta información que pensábamos podría ayudar a interpretar ciertos datos: Empleo análisis de ADNmt en casuística forense, programa empleado para editar, tratamiento estadístico de coincidencias (método empleado, ¿bases de datos?...).

En referencia a los supuestos, indicar que se trataba de tres supuestos de cierta “complejidad” donde el único análisis posible era el estudio de ADNmt. Dichos supuestos incluían una serie de muestras reales cuyos resultados hacían que la interpretación y emisión de conclusiones fuera algo complejo.

SUPUESTOS

Ejercicio 1

Se ha producido el asesinato de una chica y tras realizar el análisis medico-legal pertinente el médico forense remite al laboratorio un pelo localizado en la falda de la víctima (M1.1) y 2 pelos encontrados en la cavidad vaginal (M2.1 y M3.1). Asimismo se remiten al laboratorio saliva como única muestra de referencia tanto de la víctima (M4.1) como de dos sospechosos (M5.1 y M6.1). Se nos solicita por parte del juez instructor descartar o no a los sospechosos como posibles donantes de los cabellos.

Ejercicio 2

Se requiere llevar a cabo la identificación de unos restos óseos de una antigüedad aproximada de entre 40 y 50 años. Tres familias (familias 1, 2 y 3) reclaman el parentesco y para ello contamos como únicos familiares de referencia parientes no directos vinculados por vía materna.

En el laboratorio se recibe un fémur (muestra 4.2) como única muestra dubitada y por parte de las familias se aporta muestra de saliva de parientes emparentados por vía materna. Describimos como muestra 1.2 la aportada por la familia 1, muestra 2.2 la perteneciente a la familia 2 y muestra 3.2 la donada por la familia 3. Se solicita asignar a alguna de las tres familias los restos óseos exhumados.

Ejercicio 3

Tras cometerse un atraco la policía recupera del lugar de los hechos un pasamontañas, una vez en el laboratorio sólo se pueden recuperar del mismo una serie de pelos que describimos como M1.3 (pelo1), M2.3 (pelo2), M3.3 (pelo3), M4.3 (pelo4) y M5.3 (pelo5). Transcurrido el tiempo se remite también muestra indubitada de dos sospechosos: Sospechoso 1 (muestra M6.3) y Sospechoso 2 (muestra M7.3). Se requiere determinar si alguno de los pelos recuperados del pasamontañas puede pertenecer a alguno de los sospechosos.

PARTICIPACION y OTROS DATOS

1. La tabla adjunta indica la ***participación*** de los laboratorios en el ejercicio distribuidos por países.

Nº lab solicitan	Nº lab emiten resultados
40	27

Países	Nº
Argentina	4
Brasil	3
Colombia	1
Costa Rica	1
España	13
Portugal	5
Total	27

2. No todos los laboratorios llevan a cabo una *valoración estadística* cuando aparece una coincidencia entre muestra dubitada e indubitada (17/27). Asimismo, el método y las bases de datos empleadas para llevar a cabo dicha valoración también muestra una gran variabilidad. En referencia a las bases de datos poblacionales quizás sea reseñable indicar un par de aspectos: en primer lugar la falta de criterio respecto al grupo poblacional que se emplea cuando realizamos consultas en las bases de datos y en segundo lugar indicar que la mayor parte de los laboratorios participantes emplean la base de datos FBI (SWGDM).

Valoración estadística	
Si	No
17	10

Método	
Balding & Nichols	10
Holland et al	1
Counting method	6
Base de datos	
FBI	10
Propia	5
Otras	2

¿Criterios para aceptar heteroplasmas?	
Si	No
25	2

3. Dos laboratorios no emplean ***criterios para aceptar una heteroplasmia.***

El resto coincide en que se deben cumplirse tres requisitos:

- Doble lectura (forward y reverse)
- Ruido de fondo inexistente o de muy baja intensidad
- El pico minoritario debe tener un área del pico superior oscilante entre 10% y 40%. En nuestra opinión, quizás sean unas diferencias bastante amplias

EJERCICIO 1:

RESULTADOS

Las tablas de resultados mostraran el consensuado por un mayor número de laboratorios

Muestras	Resultados	%
M1-1 (pelo dubitado)	16185T, 16209C, 16223T, 16327T 73G, 146C, 150T, 152C, 189G, 195C, 200G, 207A, 263G, 309.1C, 315.1C	97%
M2-1(pelo dubitado)	16298Y, 16362Y 72C*, 195Y, 198Y, 263G HL	55%
M3-1(pelo dubitado)	16298Y 72C*, 73R, 195Y, 198Y, 263G HL	28%
M4-1(víctima)	16298C 72C*, 195C, 198T, 263G, 309.1C, 315.1C	100%
M5-1(sospechoso 1)	16185T, 16209C, 16223T, 16327T 73G, 146C, 150T, 152C, 189G, 195C, 200G, 207A, 263G, 309.1C, 315.1C	97%
M6-1(sospechoso 2)	16362C 239C, 263G, 315.1C	97%

* Solo es editada esta base por algunos laboratorios (13/27). Esta base no ha sido considerada para emitir el resultado consensuado.

Los laboratorios emiten resultados altamente consensuados (97-100%) para las muestras indubitadas así como para la muestra de pelo M1-1, muestra ésta que no presenta un perfil mezclado. Sin embargo resulta bastante más complicado consensuar un resultado para las muestras de pelo dubitado M2-1 y M3-1, cuyo haplotipo son producto de una clara mezcla de secuencias. Ambos pelos además presentaban una heteroplasmia de longitud en el tracto poliCs de HVR2 que dificultaba la lectura “forward” a partir de ese punto hasta el final e igualmente hacía difícil la lectura en dirección reversa.

Existe una gran diversidad de resultados cuando los laboratorios intentan emitir un resultado para dichas muestras (ver pdf en www.gep-isfg.org).

CONCLUSIONES

En contestación a la pregunta planteada “¿Podemos descartar a los sospechosos como propietarios de alguno/s de los cabellos?”

En referencia al primero de ellos, **pelo M1.1** la totalidad de los laboratorios respondieron indicando que NO SE PUEDE EXCLUIR que dicho cabello proceda de M5.1 (SOSPECHOSO 1) o cualquier familiar emparentado con él por vía materna. Lógicamente, todos los laboratorios excluyen al SOSPECHOSO 2.

Sin embargo, cuando los laboratorios valoraban la procedencia de los otros dos **pelos M2.1 y M3.1** (claramente contaminados). Seis laboratorios deciden no emitir ninguna conclusión a la vista de los resultados “parciales”, y proponen alternativas de análisis.

Respecto a los 21 laboratorios que emiten conclusiones se distribuye de la siguiente forma para el pelo **M2.1**:

- EXCLUYE SOSPECHOSO 1 pero dejan INCONCLUSO su opinión respecto al SOSPECHOSO 2 (6 laboratorios). Aparentemente el pelo M2.1 puede ser el resultante de las secuencias de víctima y sospechoso 2, sin embargo aparece una posición “adicional” en sospechoso 2 (239C) que no se observa en el pelo. En base a esta circunstancia estos laboratorios emiten su conclusión respecto a SOSPECHOSO 2
- EXCLUYE SOSPECHOSO 1 y al SOSPECHOSO 2 (12 laboratorios). Muchos de estos laboratorios (9 laboratorios) editan la posición 72. En el pelo se observa 72C lo cual indicaría que tanto el sospechoso 2 como la víctima presentarían en dicha ubicación una citosina. Esto solo ocurre en la víctima y no en sospechoso 2
- EXCLUYE SOSPECHOSO 1 y no al SOSPECHOSO 2 (3 laboratorios)

Para el pelo **M3.1**:

- EXCLUYE SOSPECHOSO 1 y al SOSPECHOSO 2 (18 laboratorios). En base a numerosas posiciones donde coexisten bases en el pelo, y que no aparecen ni en la víctima ni en ninguno de los sospechosos
- EXCLUYE SOSPECHOSO 1 pero dejan INCONCLUSO su opinión respecto al SOSPECHOSO 2 (3 laboratorios)

EJERCICIO 2:

RESULTADOS

Muestras	Resultados	%
M1-2 (familia 1)	263G, 309.1C, 309.2C, 315.1C (*HL)	96
M2-2 (familia 2)	16298C, 72C , 263G, 315.1C	100
M3-2 (familia 3)	16304C, 263G, 309.1C, 309.2 C, 315.1C (*HL)	96
M4-2 (hueso)	185A, 263G, 315.1C	100

Se observa bastante uniformidad en referencia a los resultados que los laboratorios informan. En referencia a las muestras M2-2 (familia 2) y M4-2 (huesos) se alcanza un 100 % de consenso en el resultado. En las otras dos muestras, M1-2 y M3-2, la aparición de una heteroplasmia de longitud (que es detectada y reportada por todos los laboratorios) hace que uno de los participantes, a efectos del informe final, lo defina como resultados no concluyentes para la segunda región debido a la dificultad para realizar una lectura fiable a partir del tracto de poliCs en ambas direcciones.

Como podemos observar se trata de secuencias bastante parecidas, la intención de este supuesto era conocer cuantas diferencias consideran los laboratorios necesarias para poder definir dos muestras como de distinto origen.

CONCLUSIONES

¿Qué familia puede tener un parentesco materno con la persona a la que pertenecen los restos óseos?

A pesar de los altos índices de coincidencia en los resultados, nos encontramos una amplia gama de posibles conclusiones.

Si bien los laboratorios parecen inclinarse por pensar que ninguna familia esta emparentada por línea materna con los restos óseos (16/27), también hay participantes que asignan los restos óseos a la familia 1 (2/27) y un número nada despreciable de laboratorios (8/27) que opinan por distintos motivos que estos resultados con inconclusos y alguno de ellos plantean diferentes estrategias para confirmar resultados. Por último hay un laboratorio que no excluye ni a la familia 1 ni a la 2. Veremos con más detalle a continuación cada uno de las diversas opciones.

- **EXCLUYEN LAS TRES FAMILIAS** Como posibles parientes de los restos óseos, concretamente, 16 laboratorios. Once de estos laboratorios basan dicha exclusión en el hecho de que a la vista de las secuencias obtenidas todas las familias presentan 2 o más

discrepancias con respecto al hueso. Según los criterios interpretativos recomendados por SWGDAM, la presencia de dos discrepancias entre muestra dubitada e indubitada permite excluir que ambas muestras pertenezcan al mismo linaje materno. Sin embargo, resulta que para que entre alguna de las familias (familia 1 o familia 2, sin la edición de la base 72) y el hueso aparezca dos diferencias se deben considerar el número de citosinas insertadas en la región de poliCs de HVR2 como una diferencia más entre muestra dubitada e indubitada.

- Dos laboratorios EXCLUYEN FAMILIAS N° 2 Y N° 3, pero NO EXCLUYEN A LA FAMILIA N° 1 como la familia que puede tener un parentesco materno con los restos óseos. Si observamos, entre la familia 1 y el hueso solo existe una diferencia, la base 185, claro está, sin considerar las diferencias que aparecen en el tracto poliCs de HVR2, tal y como se recoge en recomendaciones internacionales. Además, estos laboratorios apuntan el hecho de que la posición 185 posee un alto índice de mutabilidad (Parson et al. Nature Genet 15, 1997), y este hecho puede permitir explicar el parentesco materno entre la familia 1 y el hueso.

Adicionalmente hay otro laboratorio que tampoco excluye a la familia n° 2. Es cierto que este laboratorio no edita la posición 72, de esta manera obtenemos dos discrepancias entre familia n° 2 y hueso (16298 y 185). En sus comentarios, dicho laboratorio indica que debido a la alta tasa de mutabilidad de esas posiciones la exclusión de la familia 2 no es tan clara. Quizás ¿podría haberle aportado más información para tomar una decisión a favor de la exclusión si hubiera editado la posición 72?

- Ocho laboratorios EXCLUYEN FAMILIAS N° 2 y 3, pero mantienen que los resultados son INCONCLUSOS con respecto a la FAMILIA N° 1. Estos laboratorios consideran que solo existe una diferencia entre el hueso y la familia n°1, (posición 185) ya que no tienen en cuenta el tracto de poliCs (HVR2) para emitir conclusiones. Consideran también que es insuficiente para que en base a esta única diferencia se pueda

establecer una EXCLUSIÓN o INCLUSIÓN de parentesco. Para poder resolver la duda en referencia a la familia nº 1, plantean la realización de análisis adicionales diversos (analizar, si es posible, otras regiones de la molécula -HVR3-, muestras de referencia de otros familiares con parentesco materno, otro tipo de tejidos de los familiares disponibles o estudiar SNPs para subtipar el haplogrupo H que presentan).

EJERCICIO 3:

RESULTADOS

Muestras	Resultados	%
M1-3 (pelo dubitado)	16069T, 16126C, 16360T 73G, 185R, 189R, 263G, 295T, 315.1C	85
M2-3 (pelo dubitado)	16172C, 16183C, 16189C, 16270T, 16274A, 16311C, 16325C 73G, 150T, 195C, 196C, 263G, 309.1C, 315.1C HL*	52
M3-3 (pelo dubitado)	16192Y, 16223Y, 16260Y, 16292Y 263G, 315.1C	52
M4-3 (pelo dubitado)	16192T, 16260T 263G, 315.1C	100
M5-3 (pelo dubitado)	16192T, 16260T 263G, 315.1C	96
M6-3(sospechoso 1)	16172C, 16183C, 16189C, 16270T, 16274A, 16311C, 16325C 73G, 150T, 195C, 196C, 263G, 309.1C, 315.1C	52
M7-3(sospechoso 2)	16069T, 16126C, 16360T 73G, 185A, 263G, 295T, 315.1C	93

CONCLUSIONES

Pelo M1-3

- En referencia al pelo 1-3 la mayor parte de los laboratorios (20/27) coinciden al afirmar que NO PUEDEN EXCLUIR que pertenezca al sospechoso 2 o cualquier persona emparentada vía materna con él.
- En dicho pelo se detecta una doble heteroplasmia en posiciones 185 y 189, posiciones de una alta mutabilidad (Parson y cols. Nature Genet 15, 1997) y que no presenta el sospechoso 2. Esta circunstancia hace que 3 laboratorios consideren INCONCLUSO el resultado con respecto al Sospechoso 2.
- Otros tres laboratorios hablan, no de una heteroplasmia en el pelo sino de una mezcla y concluyen que el sospechoso 2 puede participar en dicha mezcla.
- Por último hay un laboratorio que excluye al sospechoso 2 como propietario del pelo 1-3.

Pelo M2-3

- Pese a solo existir una lectura de calidad (forward) en HVR2, la gran mayoría de los laboratorios (25/27 concluyeron que NO SE PODIA EXCLUIR al sospechoso 1 como propietario de dicho pelo. La existencia de únicamente una lectura, para la mencionada región HVR2, hizo que 2 laboratorios consideraran dichos resultados como INCONCLUYENTES.

Pelo M3.3

Se trata de un pelo con claros indicios de contaminación.

- Seis laboratorios NO EMITEN CONCLUSIONES al respecto.
- Diecinueve de los participantes EXCLUYEN TANTO A SOSPECHOSO 1 COMO A SOSPECHOSO 2.
- Dos laboratorios no emiten comentario alguno sobre dicho pelo.

Pelo M4.3 y M5.3

- Una gran parte de los laboratorios participantes (25/27) EXCLUYEN a ambos sospechosos como propietarios de sendos pelos.
- Dos laboratorios no emiten comentario alguno sobre dicho pelo

ALGUNAS REFLEXIONES

Este apartado, deliberadamente lo hemos titulado “algunas reflexiones”, puesto que no era objetivo de este ejercicio obtener conclusiones, sino sencillamente poner de manifiesto como los laboratorios manejamos los resultados en un determinado contexto y como emitimos conclusiones. En nuestra opinión, este ejercicio ha puesto de manifiesto algunas cuestiones que consideramos merecen ser cuanto menos ser señaladas y a criterio personal, reflexionadas.

1. Mayoritariamente, los laboratorios emiten conclusiones sobre muestras cuya secuencia es producto claro de una mezcla. En ocasiones, con lecturas en una sola dirección
2. Cuando esto ocurre, baja extraordinariamente la secuencia consensuada y las conclusiones que se emiten sobre estas muestras, también presenta más diversidad
3. Resulta llamativo que un escaso número de laboratorios (2-3) consideran que una sola lectura de calidad (dirección forward - a partir de la región poliCs de HVR2-) es insuficiente como para realizar la edición, requiriendo, es estos casos la realización de secuenciaciones adicionales (por ejemplo, secuenciar con otros primers) para confirmar resultados
4. La mayor parte de laboratorios no editan la posición 72, a pesar de lo informativa que puede llegar a ser dicha base. En algún supuesto la edición de dicha base puede arrojar más luz a la interpretación final, tal y

como hemos visto en alguno de los que se presentan en este ejercicio

5. Cuando se trata de interpretar los laboratorios suelen emplear los criterios interpretativos recomendados por SWGDAM
6. Dos laboratorios reflexiona sobre si las bases implicadas en un determinado cotejo entre secuencias poseen altas o bajas tasas de mutabilidad. En ocasiones puede orientarnos en nuestra valoración final.
7. No existe una idea clara, por parte de los laboratorios, sobre si diferencias en el número de citosinas en la región de poliCs (HVR2) deben ser consideradas, a efectos de valoración, como una diferencia más entre muestra dubitada e indubitada.
8. La mayor parte de los laboratorios que realizan un tratamiento estadístico emplean la base de datos disponible del FBI. Resulta reseñable la falta de unanimidad sobre el grupo de población en el que se realiza la búsqueda, aproximadamente el 50% de ellos compara únicamente con las secuencias de población caucásica mientras que los restantes laboratorios enfrentan contra la base de datos total.
9. Otra cuestión, en nuestra opinión menor, y no por ello carente de importancia, se refiere al apartado que atañe a la nomenclatura. Centrando esta cuestión, nos encontramos importantes diferencias por un lado en la diferente nomenclatura que se adopta para definir las inserciones en el tracto de poliCs de HVR2, y por otro lado la variabilidad a la hora de definir posiciones heteroplásticas de posición. En este sentido, una vez más las recomendaciones de la ISFG son claras.

En otro orden de cosas, es cierto, que este ejercicio se podría haber desglosado en varios para poder abordar con más profundidad los diferentes aspectos que han ido surgiendo, sin embargo, al ser el primero de estas características, pensábamos que era bueno testar distintos aspectos para en sucesivos ejercicios, si así lo considerábamos todos, poder profundizar un poco

más.

Humildemente, pensamos también que el debate que se suscitó tras la presentación de estos resultados, justifica y hace que haya merecido la pena el realizar este ejercicio. Gracias a todos por vuestra colaboración.

**Sesión de Presentaciones de los Grupos de Trabajo del GEP-ISFG
durante las XI Jornadas de Genética Forense**

Madrid, Junio 2006

***(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 (2005-2006).

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

Victoria Prieto Ruiz-Canela. Grupo de trabajo “Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética”.

INTRODUCCIÓN

A principios de 2003 fue difundido entre todos los laboratorios del GEP-ISFG un cuestionario con el ánimo de conocer la situación de la custodia post-análisis de muestras en los distintos laboratorios del grupo.

Las cuestiones que figuraban en el cuestionario pretendían recabar información sobre:

- La naturaleza de la casuística de cada laboratorio
- Tipo de muestras y submuestras generadas y procedimientos de conservación
- Períodos de custodia aplicados a cada muestra y a las submuestras generadas (alícuotas para contraanálisis, extractos de ADN, ADN amplificado...)

- Procedimiento del laboratorio una vez concluido el período de custodia y métodos de destrucción en su caso

En su primera convocatoria, 20 laboratorios enviaron sus respuestas al cuestionario. Se realizó un segundo requerimiento en 2004 y 10 laboratorios más respondieron.

NATURALEZA DE LA CASUÍSTICA DE LOS LABORATORIOS

Atendiendo a su casuística, respondieron

- 4 laboratorios que trabajan en casos no judiciales
- 6 laboratorios que trabajan en casos no judiciales y judiciales civiles
- 20 laboratorios que trabajan en casos judiciales penales y en otros

Se observan grandes diferencias en los períodos de custodia de los laboratorios en función de su casuística, y no cabía esperar que fuese de otra forma. Los laboratorios con casos no judiciales y judiciales civiles tienen períodos de custodia a corto plazo, en cambio, en aquellos con casos penales, la custodia es a medio o largo plazo en función de las características de la muestra (más o menos perecedera).

De las respuestas se deduce que el tiempo de custodia se propone más en función de la categoría de la muestra (indubitada, dubitada) y de las características del caso (mayor o menor gravedad del delito), que de su procedencia o de su naturaleza, influyendo ésta última por supuesto sobre el procedimiento de conservación (temperatura ambiente, refrigerada o congelada).

TIPOS DE MUESTRAS CUSTODIADAS Y PROCEDIMIENTOS DE CONSERVACIÓN

Uno de los objetivos del cuestionario era dimensionar el problema de

almacenamiento de muestras. Se pretendía recabar información sobre cuantas muestras y submuestras se generan en el laboratorio, y en función de ellas, prever el espacio y el número de compartimentos necesarios para su almacenamiento.

En este punto entran en juego distintas estrategias para el ahorro de espacio en las muestras custodiadas. La mayoría de laboratorios cuenta con un período corto de custodia para las muestras indubitadas originales y un período más largo para las alícuotas tomadas de estas. Es muy útil para este propósito la utilización de Kits de toma de muestras que optimicen tanto el espacio ocupado como la conservación a largo plazo (FTA®, Isocode®, etc.). Algunos laboratorios informaron de métodos de conservación poco usuales destinados al ahorro de espacio y de dinero. Por ejemplo, un laboratorio realiza manchas de sangre sobre tela “drill” esterilizada para su conservación a largo plazo debido al alto coste del FTA. Otro laboratorio informaba de un método de conservación en sal a temperatura ambiente de los restos cadavéricos con tejidos blandos para ahorrar espacio en los congeladores.

En función del tipo de muestras y de su procedimiento de conservación, podemos inferir un mínimo de tres áreas independientes para la custodia de muestras que nos permitan separar muestras indubitadas, muestras dubitadas y producto amplificado. A su vez, cada área debe contar con los compartimentos necesarios para conservar las muestras según sus requisitos específicos.

Los soportes de las muestras dubitadas (ropas, armas, objetos diversos, etc.) son devueltos a la entidad solicitante en la mayoría de los laboratorios. Solo 4 laboratorios informan que no devuelven por sistema las muestras, sino que lo hacen cuando la entidad solicitante se las pide.

PERÍODOS DE CUSTODIA

Como se ha mencionado anteriormente, la duración del período de custodia esta marcado por el tipo de caso, y aunque se observa una gran dispersión en las respuestas, pueden hacerse algunas observaciones generales.

Para simplificar los datos, se muestran en una tabla los períodos mínimos y máximos informados por los distintos laboratorios de forma promediada (esto es, se han quitado en algunos casos los datos extremos que no son representativos para el conjunto de laboratorios).

muestras		<i>No judiciales</i>		Judiciales civiles y no judiciales		Judiciales penales y otros	
		Período mínimo	Período máximo	Período mínimo	Período máximo	Período mínimo	Período máximo
Personas vivas	Muestras	48 horas	6 meses	2 años	Indefinid	3-6	Indefinid
	Alícuotas	1 año	2 años	6 meses	Indefinid	1-2 años	Indefinid
	Extractos	1 año	Indefinid	6 meses	Indefinid	1-2 años	Indefinid
Personas fallecidas	Muestras	--	--	6 meses	Indefinid	1-2 años	Indefinid
	Alícuotas	--	--	6 meses	Indefinid	1-2 años	Indefinid
	Extractos	--	--	6 meses	Indefinid	1-2 años	Indefinid
Muestras dubitadas	Alícuotas	--	--	6 meses	Indefinid	1-2 años	Indefinid
	Sobrantes	--	--	6 meses	Indefinid	1-2 años	Indefinid
	Soportes	--	--	No devolución		Devolución a	
	Extractos	--	--	2-3 años	Indefinid	1-2 años	Indefinid
	ADN amplificado	1	1 mes	2 meses	12	3-6	Indefinid

A la vista de las respuestas, se pueden establecer tres categorías en cuanto a los intervalos de tiempo de custodia:

- Custodia a corto plazo: Hasta 1 año.
- Custodia a medio plazo: superior a 1 año, hasta unos 5 años.

- Custodia a largo plazo: de 10 años a indefinido.

Los laboratorios con casos no judiciales (4/30 laboratorios) utilizan en general períodos cortos de custodia, dada la naturaleza de su casuística. También se observa en general un corto plazo para el amplificado (con alguna excepción), como es lógico dado que en muchos caso se trata de ADN con marcaje fluorescente que es al fin y al cabo un producto inestable, y en todo caso, es un producto final susceptible de pocas modificaciones. Se ha hablado de la posibilidad de recuperar el templado del amplificado en las muestras límites pero no deja de ser un procedimiento muy arriesgado y por tanto, poco recomendable.

Existe un sesgo evidente en los intervalos de custodia marcado por el tipo de casuística de cada laboratorio, sin embargo, en todos los laboratorios, incluido el nuestro, se hace uso indiscriminado de un término tan impreciso como INDEFINIDO para expresar la custodia a largo plazo y que se aplica precisamente a las muestras de mayor relevancia. En el contexto en el que se utiliza, podría traducirse por un “infinito” pero es obvio que no podemos hacer esto. Tenemos que tomar el compromiso de adoptar periodos de custodia a largo plazo que puedan aplicarse en vez del desafortunado término “INDEFINIDO”.

Si quisiéramos saber que límites poner a nuestra custodia a largo plazo podríamos hallar pistas en el código penal, en aquellos artículos que nos hablen de la extinción de la responsabilidad criminal o de la prescripción de los delitos en el caso de que no haya imputado.

La ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal, habla en el Título VII, Capítulo I, Artículo 130 sobre las causas que extinguen la responsabilidad criminal, que resumidamente serían:

- por muerte del reo
- por el cumplimiento de la condena

- por el indulto
- por el perdón del ofendido, cuando la ley así lo prevea
- por la prescripción del delito
- por la prescripción de la pena

Y en su artículo 131 versa sobre la prescripción de los delitos, que resumidamente dice:

Los delitos prescriben:

- a los 20 años, cuando la pena máxima señalada al delito sea prisión de 15 o más años
- A los 15 años, cuando la pena máxima señalada sea inhabilitación de más de 10 años o prisión de más de 10 años y menos de 15 años
- A los 10 con penas máximas de inhabilitación de más de seis años y menos de 10, o prisión de más de 5 y menos de 10 años
- A los 5 los restantes delitos graves
- A los tres, los delitos menos graves
- Al año, los delitos de calumnia e injuria
- Las faltas prescriben a los seis meses
- En caso de penas compuestas, se estará para la aplicación de las reglas de este artículo a la que exija mayor tiempo para la prescripción
- El delito de genocidio no prescribirá en ningún caso

La aplicación precisa de estos intervalos de tiempo en función del tipo de delito y pena impuesta nos obligaría a mantener un feed-back de información Laboratorio-Justicia que está muy lejos de conseguirse y que actualmente parece utópico, por lo que deberíamos tal vez adoptar los períodos de custodia a priori.

Sería una propuesta a considerar cambiar el término indefinido por 10 ó 20 años en función del tipo de delito investigado.

DESTRUCCIÓN DE MUESTRAS

En la encuesta figuraban las siguientes cuestiones relativas al procedimiento de los laboratorios al concluir el período de custodia impuesto a cada muestra:

- Si se procedía a su destrucción
- Si se informaba a la entidad solicitante de la destrucción
- Si se contaba con contenedores de residuos biológicos gestionados por empresa de eliminación de residuos

Las respuestas en este apartado también presentan una gran dispersión. Sobre si destruyen o no, 10/30 contestan que sí, 14/30 contestan que no y 6/30 no responden a esta cuestión.

Sobre si se informa a la entidad solicitante, 8/30 sí, 5/30 no y 14/30 no contestan a esta cuestión.

En cuanto a los contenedores de residuos: 19/30 si los tienen, 3/30 no y 8/30 no contestan.

Esto nos plantea cuestiones sobre la obligatoriedad de destruir las muestras una vez concluido el período de custodia, sobre si la información de la destrucción debe darse al emitir el informe o cuando se vaya a producir la destrucción y sobre los métodos de destrucción; capítulo éste que quedó hace tiempo abierto al grupo de bioética, en particular cómo proceder a la destrucción de restos humanos de considerable volumen (no es lo mismo deshacerse de un tubo de sangre que de un cráneo, un fémur o en general “fragmentos humanos reconocibles”).

La recomendación N^o R(92) 1 del Consejo de Europa, (10 febrero 1992) contempla en su párrafo 8 la necesidad de destruir las muestras tomadas a personas para análisis de ADN una vez se haya dictado una resolución definitiva en el procedimiento para el cual fueron utilizadas y que cada

legislación debe definir los períodos de almacenamiento.

En el párrafo 3, contempla el uso de las muestras o la información derivada de ellas para investigación o estadística, siempre que se garantice el anonimato de los registros, desvinculándolos de cualquier sello de identidad.

En resumen, los distintos laboratorios que trabajan dentro del ámbito judicial o fuera de él, en el campo de la identificación genética están lejos de mostrar una pauta única en cuanto a la conservación post-análisis de las muestras, lo que nos devuelve a la imperiosa necesidad de una regulación legal de los análisis de ADN.

GT de ADN mitocondrial

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

Podemos resumir los trabajos realizados por el grupo durante este año pasado en tres actividades fundamentales:

Por un lado, como viene siendo habitual en los últimos años, el grupo ha recibido múltiples consultas técnicas. Concretamente, desde mayo de 2005 a septiembre de 2006 han sido alrededor de 25. Esperamos que esta fluidez de comunicación se mantenga.

Por otra parte, el 24 de Marzo de 2006 se envió al Forensic Science International el artículo sobre el análisis de mezclas de ADNmt que mostraba los resultados del ejercicio que hicimos en 2004-2005. El estudio fue aceptado con pequeñas correcciones y está disponible on line desde agosto de 2006. Recordaros que hemos podido publicar los electroferogramas en color gracias al premio que nos dieron el año pasado en el Congreso de Azores (500 euros) y al apoyo incondicional del GEP, que puso el dinero que faltaba (181 euros)

Finalmente, el grupo ha realizado este año un ejercicio de interpretación de secuencias de ADNmt que ha coordinado Manolo Crespillo. En el ejercicio participaron 27 laboratorios, aunque solicitaron la participación 40 laboratorios. Los resultados de este ejercicio fueron expuestos por Manolo en nuestra última reunión en Madrid (2-6 de Junio de 2006) y son ampliamente comentados en otro apartado de este boletín. Sólo comentaros que el ejercicio nos demostró que estamos muy lejos de realizar una interpretación homogénea entre los distintos laboratorios, hecho que es bastante preocupante. Las discrepancias las encontramos a todos los niveles: tanto en los requisitos mínimos para que un haplotipo pueda ser informado (calidad de los electros, necesidad de secuenciar ambas hebras y de que dispongamos de una doble lectura de cada sitio polimórfico), como en la nomenclatura y en la interpretación de los resultados (requisitos para incluir o descartar, reportar o no una valoración estadística en los informes periciales, métodos estadísticos utilizados).

Si bien la parte estadística puede ser más discutible, no cabe tanta disparidad en cuanto a estándares forenses para informar un resultado ni en cuanto a la nomenclatura pues son dos temas que ya deberían estar superados. En la reunión de las X Jornadas de GEP-ISFG se discutió bastante sobre este tema. A este respecto se estableció la necesidad de incluir en la web una serie de recomendaciones extraídas de las publicaciones correspondientes, así como unos ejemplos de nomenclatura con electros incluidos para que puedan ser consultados por las personas interesadas.

Muchas gracias por vuestra participación, un saludo a todos y mucho ánimo.

GT de Genética Forense no-Humana

(Coordinadores: António Amorim y José J. Pestano)

Foi apresentada a proposta de um trabalho colaborativo sobre cães (*Canis familiaris*). seria concretizado de uma forma semelhante à que foi já realizada para o cr. Y:

- José Juan Pestano Brito (Lab Genética, Inst. Anatomico Forense, Las Palmas de Gran Canaria) encarregar-se-ia da preparação e distribuição das amostras aos interessados (anúncio no website e e-mail geral aos sócios)
- seria pedida a sequenciação de, pelo menos, um troço específico da HVR (a definir os limites mínimos de sobreposição)
- a análise dos resultados seria feita pelo IPATIMUP em colaboração com o grupo de mtDNA.

Evidentemente só poderiam participar os membros do GEP-ISFG e os resultados considerados correctos permitiriam aos laboratórios participantes contribuir com uma amostra populacional para a constituição de uma base de dados e uma publicação consequente em co-autoria, nos moldes já habituais.

GT de cromosomas sexuais

(Coordinadores: Leonor Gusmao y Antonio Amorim)

No decorrer das XI Jornadas do GEP-ISFG, em Madrid, foram apresentadas as seguintes propostas de realização de trabalhos de colaboração entre laboratórios do grupo, as quais foram aprovadas durante a Assembleia geral:

1. Dar continuidade ao trabalho de colaboração em **taxas de mutação em CROMOSSOMA Y**, para os STRs incluídos no kit YFiler (Applied Biosystems).

Este trabalho será 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, e consistirá no seguinte:

- 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.

O questionário para participação neste trabalho será enviado a todos os grupos e disponibilizado através da página web.

Data limite para envio de resultados: 31 de Dezembro de 2006.

2. Realização de um exercício colaborativo para avaliação de um multiplex para tipagem de X-STRs.

Este trabalho será coordenado por este grupo de trabalho, em colaboração com o Unidad de Medicina Legal do Laboratorio de Genética forense da Universidad de Cantabria e com o Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela, e consistirá no envio de manchas de sangue; mínimo de 2 amostras para envio de resultados utilizando um multiplex.

- Os protocolos deverão estar disponíveis na página web do grupo até ao final de Agosto. As amostras serão enviadas a todos os laboratórios do GEP que, até 15 de Setembro, manifestem o seu interesse em participar.
- Os resultados da tipagem das amostras deverão ser enviados até final de Dezembro, aos coordenadores do trabalho.

Aos laboratórios que tenham obtido resultados correctos na tipagem das amostras anteriormente enviadas, pede-se que enviem resultados obtidos para um mínimo de 100 trios pai/mãe/filha (pais e mães no aparentados, pertencentes a uma mesma população), em que a paternidade e maternidade tenham sido previamente confirmadas por marcadores autossómicos, por forma a poder-se:

- Estimar frequências alélicas nas diferentes populações
- Estimar taxas de mutação, materna e paterna

Data de disponibilização dos protocolos através da web: 31 de Agosto de 2006.

Data limite para inscrição no exercício: 15 de Setembro de 2006.

Data limite para envio de resultados: 31 de Dezembro de 2006.

GT de Estadística en Genética Forense

(Coordinador: Juan Antonio Luque)

Tras el acuerdo tomado en la asamblea del GEP-ISFG de Septiembre de 2005 en Azores, el Grupo de Paternidades pasó a integrarse en el grupo de Estadística.

Angel Carracedo, solicitó el relevo como coordinador del grupo de Estadística, debido a la sobrecarga de trabajo que soporta, aunque seguirá ofreciendo su inestimable colaboración con el grupo. Juan Antonio Luque fue designado como coordinador del grupo y refrendado en la asamblea de Junio de 2006 en Madrid.

Una de las actividades más destacadas en este último año ha sido la

colaboración con Julia García-Hirschfeld en la elaboración del "paper challenge" incluido como novedad este año en el control del GEP-ISFG. Se contó con la colaboración de Charles Brenner en su elaboración y resolución. Aunque en el Curso de Estadística de Madrid de Mayo de 2006, se debatió ampliamente, se incluirá en la web una explicación de las posibles soluciones al mismo.

El mencionado Curso de Estadística organizado por Eduardo Arroyo como complemento a las XI Jornadas del GEP-ISFG, se realizó en colaboración con el grupo de Estadística. Se espera poder realizar algún curso de Estadística "itinerante" más en los próximos meses. Sin embargo, la dificultad de organización y coordinación de fechas de un curso presencial, hace que nos hayamos planteado la posibilidad de organizar un curso "on-line", aunque el formato está aun por decidir.

Dos miembros del grupo de estadística Angel Carracedo (como miembro del Board) y Juan Antonio Luque (como representante del GEP-ISFG) forman parte de la Paternity Testing Commission (PTC), que está elaborando unas nuevas recomendaciones básicamente sobre bioestadística. Aunque sufre un pequeño retraso, se espera que los trabajos se agilicen próximamente. En el curso de Madrid se expuso ampliamente el contenido de lo hablado hasta el momento en la PTC.

En la propia reunión del GEP-ISFG, se insinuó la posibilidad de elaborar unas recomendaciones o estándares propios del GEP-ISFG complementarias a las de la PTC. Se evaluará en el grupo dicha posibilidad o la inclusión en la página web de unas FAQ o preguntas y respuestas.

Por último, los miembros del grupo siguen prestando su consejo tanto a nivel individual como de grupo de estadística del GEP-ISFG en todas aquellas cuestiones que se les planteen.

GT de Bioética en Genética Forense

(Coordinador: Joaquín Gamero)

Bases de datos de perfiles de ADN

Algunas de las cuestiones que han venido debatiéndose en los últimos años, como consecuencia de los adelantos que ha generado la ciencia genética en el estudio del hecho criminal, ha versado, como todos ustedes saben, sobre la ingerencia corporal necesaria para la realización de los análisis de perfiles de ADN o la pertinencia del almacenamiento de perfiles de ADN, así como de sus correspondientes muestras, frente a la necesidad de la justificación de tales actos, dada la posibilidad de que se lleguen a vulnerar derechos fundamentales del individuo.

Se hace, por tanto, imprescindible establecer un equilibrio entre las ventajas que para la protección de la ciudadanía supone la extracción o recogida, el análisis, la interpretación y el almacenamiento de los perfiles de ADN o de sus muestras correspondientes, frente a la amenaza que una mediocre regulación, puede tener sobre el derecho a la privacidad o a determinadas libertades aceptadas por la sociedad.

No se nos oculta, la fricción que puede tener lugar de la interrelación entre el ámbito jurídico y genético, así como tampoco de los conflictos de valores entre derechos o intereses implicados, que no podrían resolverse con los solos principios de intimidad, de no discriminación y libertad, sino también con los de responsabilidad personal y proporcionalidad.

Equilibrar y armonizar los valores es más difícil que ignorarlos o subordinarlos *a priori*, pero también mucho más justo y realista.

Algunas de las cuestiones que merece señalar en relación con el tema que se viene comentando son:

1. ¿Que circunstancias podrían justificar la inclusión de muestras y de sus correspondientes perfiles de ADN en una base de datos? Dicho de otro modo, ¿en qué tipo de delitos debieran ser incluidos en una base de datos los perfiles de y sus muestras correspondientes?
2. ¿Quién debe ejercer la responsabilidad sobre las bases de datos de perfiles de ADN, así como de sus muestras correspondientes?
3. ¿En qué momento o situación procesal deber ser incluidos y mantenidos los perfiles de ADN y sus muestras correspondientes?
4. ¿Cuánto tiempo deben ser retenidos los perfiles y sus muestras correspondientes en una base de datos de carácter nacional?
5. ¿Qué criterios se deberían seguir en el caso de cesión de perfiles de ADN entre diferentes territorios?
6. ¿Qué criterios de exactitud, fiabilidad, calidad y seguridad deben exigirse a los laboratorios que trabajen en este ámbito?

Informe de Tesorería

Iñaki Yurrebaso

Tesorero del GEP-ISFG

BALANCE ECONÓMICO DEL GEP EN EL PERIODO QUE VA DESDE EL 1 DE SEPTIEMBRE DE 2005 HASTA EL 30 DE ABRIL DE 2006

CAPITAL INICIO DEL PERIODO:	13.243,26 €
CAPITAL FINAL DEL PERIODO:	27.240,9 €
BALANCE DEL PERIODO:	+ 13997,64 €

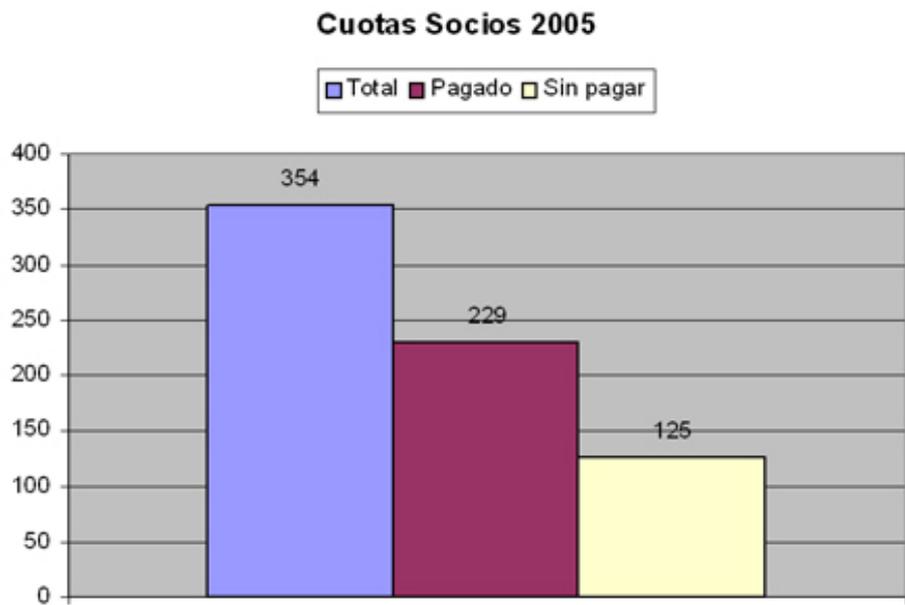
Gastos Generales en el periodo

Gastos bancarios	520,19 €
Compra de ordenador portátil	1216,9 €
Gastos mantenimiento de la página web	474,49 €
Gastos directos derivados del control de calidad	4119,26 €
Gastos creación de la web para realizar el control "on line"	5477,06 €
Devoluciones cuotas con cantidades ingresadas erróneamente	478,42 €
Gastos de caja (material de papelería, envíos de correo, etc.)	353,52 €

Cuotas de socios del año 2005

Estas cuotas son cobradas durante todo el año, pero hay que hacer referencia a que es un proceso dinámico debido a que algunos socios pagan fuera del plazo establecido.

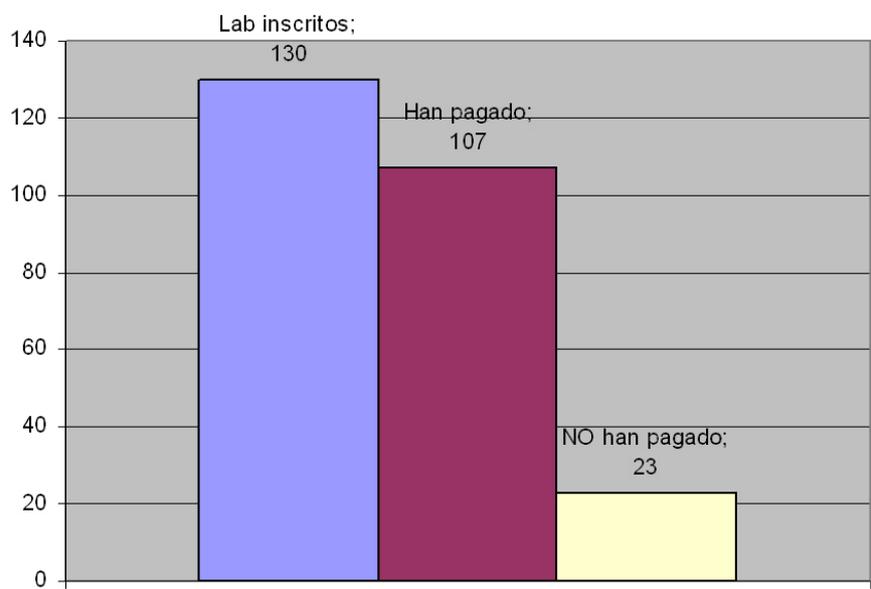
De un total de 354 socios dados de alta en la sociedad han abonado su cuota correspondiente 229 socios, quedando pendientes del abono 125 socios.



Cuotas del ejercicio de control de 2006

La fecha límite para abonar la cuota correspondiente se estableció en el 30 de Marzo, pero debido a que algunos socios pagan fuera del plazo establecido, estos datos han podido sufrir cambios.

De un total de 130 laboratorios inscritos, han abonado la cuota 107 laboratorios, quedando sin abonar dentro del plazo establecido un total de 23 laboratorios.



Nuevas direcciones web para el pago de las cuotas

Debido a la implantación de las páginas web tanto en castellano como en portugués, las direcciones de las páginas para comprobar las diferentes formas de pago y poder realizar pagos “on line” son las siguientes:

www.gep-isfg.org/ISFG/Portugues/Controle_de_qualidade/formas_pago.php

www.gep-isfg.org/ISFG/Castellano/Control_de_calidad/formas_pago.php

Para finalizar recordar a los socios la importancia de cumplir con los plazos establecidos para el pago de las cuotas y recordar la importancia de ponerse en contacto con el tesorero (karan@euskalnet.net) una vez realizado el pago para la confirmación del mismo.

ACTA DA ASSEMBLEIA GERAL GEP-ISFG

Leonor Gusmão
Secretária do GEP-ISFG

Numero de sócios presentes no inicio da mesma: 62

Laboratórios participantes

- ABI Expert Training Center. São Paulo, Brasil
- ADF TecnoGen S.L. Madrid. Espanha
- Banco Nacional de Datos Genéticos. Buenos Aires. Argentina
- Centro de Análisis Genéticos C.A.G.T. Zaragoza. Espanha
- Comisaría General Policía Científica. Madrid, Espanha
- GENES Ltda. Laboratorio de Genética Forense y Huellas Digitales del DNA. Medellín. Colombia
- Genomic Engenharia Molecular Ltda. São Paulo, Brasil
- Instituto de Biomedicina, Universidad Católica de Santiago del Estero. Argentina
- Instituto de Medicina Legal de Valencia. Espanha
- Instituto de Medicina Legal. Delegação de Lisboa. Portugal
- Instituto de Medicina Legal. Delegação do Porto. Portugal.
- Instituto de Medicina Legal. Facultad de Medicina. Santiago de Compostela. Espanha
- Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses de Madrid. Espanha
- Instituto Nacional de Toxicología. Delegación de Canarias. Espanha
- Instituto Nacional de Toxicología. Departamento de Barcelona. Espanha
- Instituto Nacional de Toxicología. Departamento de Sevilla. España
- IPATIMUP. Porto, Portugal
- Lab. Investigacion de Paternidade, UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara - Sao Paulo. Brasil
- Laboratorio Criminalístico y de Ciencias Forenses. Comayaguela. Honduras
- Laboratorio de Biología Forense. Dpto. de Toxicología y Legislación Sanitaria. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Espanha

- Laboratorio de Diagnóstico por DNA. UERJ. Río de Janeiro. Brasil
- Laboratório de DNA forense. Departamento de Polícia Técnica. Bahia, Brasil
- Laboratorio de Genética Humana. Quito, Equador
- Laboratorio de Genética Molecular. Hospital Metropolitano de Quito. Equador
- Laboratorio de Genética. Instituto Anatómico Forense. Facultad de Medicina. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Espanha
- Laboratorio de Inmunogenética y Diagnóstico Molecular (LIDMO). Córdoba. Argentina
- Laboratorio de Inmunogenética. Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Universidad de Cartagena. Colombia
- Laboratorio Genomik CA. Maracay, Venezuela
- Neodiagnostica, SL. Lleida. Espanha
- Policia Científica de la Ertzaintza. Espanha.
- Servicio de Diagnóstico de la Paternidad Biológica e Identificación Genética. Universidad del País Vasco. Espanha
- Servicio de Huellas Digitales Genéticas. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina
- Unidad de Análisis de ADN. Colegio Oficial de Farmaceúuticos y Bioquímicos de la Capital Federal. Buenos Aires. Argentina
- Unidad de Genética Molecular, Policlínica Gipuzkoa. San Sebastián. Espanha
- Unidade de Genética e Patologia Moleculares. Hospital Divino Espírito Santo. Ponta Delgada, Açores. Portugal

No dia dois de Junho de dois mil e seis, em Madrid (Espanha), realizou-se a Assembleia Geral dos associados do grupo, com a presença de 62 sócios no início da mesma.

Abre a sessão o **presidente do GEP** agradecendo a Eduardo Arroyo e ao seu grupo pela organização das presentes jornadas e pelo excelente apoio dado ao longo das mesmas. Agradece ainda a todos os participantes das XI 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.

O presidente do GEP, transmite a seguinte mensagem de Conceição Vide dirigida a todos os sócios:

Senhor Presidente,

Na impossibilidade da minha presença física em Madrid, solicito, caso seja possível, que apresente em meu nome um enorme agradecimento aos companheiros do GEP por tudo quanto "recebi" durante todos estes anos, saber e amizade.

Com as possibilidades actuais dos meios de comunicação, continuarei a acompanhar as actividades do Grupo.

Muito, muito abrigada a todos. Um grande abraço,

Conceição Vide

MC Vide

Urb. Casal das Nogueiras Lote 10 4ºEsq.
3030-379 Coimbra

Seguidamente toma a palavra a **Secretaria do GEP** informando que, desde a última reunião do GEP-ISFG, em Setembro do ano passado, foram aceites no grupo 28 novos sócios filiados em 12 novos laboratórios dos seguintes países: Brasil – 4; Portugal – 4; Itália – 1; Espanha – 2; Argentina – 1.

Actualmente, o número total de sócios pertencentes ao GEP-ISFG é de 371, distribuídos por 158 laboratórios de 22 países diferentes: Argentina – 20; Bolívia – 2; Brasil – 27; Colômbia – 18; Costa Rica – 2; Cuba – 1; Equador – 4; El Salvador – 1; Espanha – 45; França – 1; Honduras – 1; México – 3; Panamá – 1; Paraguai – 1; Peru – 3; Portugal – 14; Republica Dominicana – 1; Suíça – 1; Uruguai – 3; USA – 1; Venezuela – 7 e Itália - 1.

Toma a palavra o **Tesoureiro do GEP** para informar sobre a gestão

económica, durante o período de 1 de Setiembre de 2005 a 30 de Abril de 2006.

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.

Quanto ao valor das quotas de sócio e de participação no controle de qualidade para o próximo ano, ficou decidido:

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

Relativamente aos pagamentos efectuados pelos sócios/laboratórios, o tesoureiro informa que existem transferências em que não é possível identificar o sócio/laboratório responsável pela mesma. Assim sendo, recorda a necessidade de, sempre que se efectue uma transferência bancária para uma das contas do GEP-ISFG, indicar claramente o conceito da mesma (nome de laboratório, nome de sócio, motivo da transferência – quota de sócio ou pagamento de CQ e correspondentes anos a que se refere).

Toma a palavra o **Vice-Presidente** para informar sobre o estado da página web do grupo e da proposta de criação de uma base de dados de gestão interna, acessível à direcção e ao coordenador do exercício, por forma a permitir uma melhor gestão da informação respeitante aos sócios e laboratórios do GEP-ISFG. Lembra ainda que se irá fazer a tradução do conteúdo da página ao Português e Inglês, para o que contará com a ajuda de António Amorim e Martin Whittle.

O presidente pergunta aos presentes se existem propostas de novas equipas dirigentes. Na ausência de apresentação de novas propostas, de acordo com os Estatutos, a actual equipa dirigente é reconduzida por mais dois anos.

O Presidente propõe a criação de um novo grupo de trabalho responsável pela manutenção e actualização da página web do GEP-ISFG coordenado por Oscar Garcia e Iñaki Yurrebaso, os actuais responsáveis por esta função. A proposta foi aprovada pela Assembleia.

O Presidente solicitou ainda ao Coordenador dos Grupos de Trabalho que proceda à actualização dos respectivos Coordenadores, devendo a sua composição ser revista em cada Assembleia Geral.

O Presidente informou a disponibilidade do Comité Executivo para a possibilidade de atribuição de subsídios para apoio de despesas com exercícios colaborativos organizados pelos grupos de trabalho (preparação e envio de amostras, primers, etc.), mediante a apresentação de propostas, as quais deverão ser discutidas e aprovadas durante a assembleia anual do GEP-ISFG.

A coordenadora do controle de qualidade, Júlia García-Hirschfeld, propôs ao Comité Executivo a criação de um comité assessor do coordenador do exercício, constituído por Josefina Gómez e Pilar Sanz, proposta que mereceu a concordância da Assembleia.

Tendo sido discutida a necessidade de submissão electrónica dos resultados do controle de qualidade, através do preenchimento do formulário disponível na pagina web do GEP-ISFG, foi decidido ser obrigatório o envio electrónico do formulário mais a cópia física, dentro do prazo estipulado.

Ainda relativamente ao Controle, foi deliberado, face a alguns problemas surgidos no decorrer do último, introduzir no corpo do formulário a aceitação expressa das cláusulas actualmente incluídas na portada, devidamente adaptadas.

Em relação à inscrição e ao seu prazo para participação no controle de qualidade, deliberou-se que apenas serão enviadas amostras aos laboratórios membros do GEP-ISFG que o solicitem (através do envio de um formulário disponível na página web do grupo) até 31 de Outubro do ano anterior ao que respeita o controle de qualidade. Lembra-se ainda que, tal como ficou decidido na última assembleia geral, em 2005, o pagamento da quota de participação no controle de qualidade deve ser feito até 31 de Março do ano a que respeita o controle, 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.

Retoma a palavra o Presidente para discutir o tema da realização das próximas jornadas do GEP-ISFG, apresentando a proposta de realização das mesmas a par do próximo congresso da ISFG em Copenhaga, Dinamarca, durante os dois dias que antecedem o mesmo. A proposta é votada e aprovada com cinquenta e sete votos a favor, cinco contra e zero abstenções.

Tendo-se verificado modificações de enquadramento legal e registo da Sociedade, requerendo algumas diligências do Comité Executivo para regularizar a situação junto das autoridades espanholas competentes, solicitou-se à Assembleia que autorizasse a direcção a proceder aos ajustes técnicos aos estatutos que se tornem legalmente indispensáveis, autorização que foi concedida pela assembleia.

Durante a apresentação dos grupos de trabalho foram apresentadas propostas de realização de trabalhos colaborativos a serem coordenados pelos grupos de trabalho em mtDNA, Genética não-humana e Cromossomas sexuais. As propostas acima referidas foram votadas, tendo sido todas aprovadas com 62 votos a favor, zero contra e zero abstenções.

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