

PROBLEMÁTICA ASOCIADA AL ANÁLISIS Y VALORACIÓN DE MARCADORES STR AUTOSÓMICOS Y STR DEL CROMOSOMA Y ENTRES CASOS DE AGRESIÓN SEXUAL.

ASSOCIATED PROBLEMATIC TO ANALYSIS AND VALUATION OF AUTOSOMAL STR MARKERS AND STR OF Y CHROMOSOME IN THREE CASES OF SEXUAL ASSAULT.

ALBARRÁN HERRERAC¹, FERNÁNDEZ DE SIMÓN L¹.

RESUMEN:

En el presente trabajo se analizan los principales problemas asociados al análisis de muestras con baja cantidad y/o calidad de ADN como son el aumento de ciertos efectos estocásticos durante la amplificación (pérdidas/ganancias alélicas, aumento de artefactos de la amplificación,...) así como el aumento en la sensibilidad de la técnica y por tanto la posibilidad de detectar contaminaciones, lo que debe hacernos reflexionar sobre las precauciones que debemos tomar a la hora de evaluar este tipo de resultados y de muestras. Se presentan tres casos de agresiones sexuales de nuestro laboratorio que intentan ilustrar parte de la problemática referida. El primero se trata de una agresión sexual en la que se produce una contaminación durante la toma de muestras, el segundo es un caso de abusos sexuales por posibles tocamientos a una menor y el tercero es una agresión sexual en la que se detecta una posible transferencia secundaria.

PALABRAS CLAVE: muestras con bajo contenido de ADN, trazas de ADN, efectos estocásticos en la amplificación, contaminación, transferencia secundaria.

ABSTRACT:

The study of low DNA level samples and the specific problems related to its study is analyzed in this review. The main problems associated with the analysis of these samples are the increase of certain stochastic effects during amplification (allelic drop-out, allelic drop-in, increased amplification artifacts,...) associated with the increasing technical sensitivity, and therefore the ability to detect contamination. Considering these problems, we review herein precautions we should take when evaluating such results and samples. Three sexual assault cases in our laboratory are intended to illustrate part of the problem referred. The first is a sexual assault in which contamination occurs during sample collection, the second is a sexual abuse by touching a child and the third is the occurrence of a possible secondary transfer.

KEY WORDS: LT-DNA: trace DNA, stochastic amplifications effect, contamination, secondary transfer.

CONTACTO: Cristina Albarrán Herrera. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Madrid. Servicio de Biología. José Echegaray, 4. 28232 LAS ROZAS-MADRID. Spain. E-mail: cristina.albarran@justicia.es.

1. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad, los avances producidos en el campo de la genética forense permiten la obtención de perfiles genéticos a partir de una gran variedad de muestras, incluso aquellas que son críticas, ya sea por escasa cantidad de ADN (apenas unas células) o por baja calidad de ADN (muestras degradadas o con presencia de sustancias inhibitoras de la amplificación).

Desde pequeñas manchas de semen, sangre o saliva hasta objetos tocados, zonas del cuerpo de la víctima que han estado en contacto con el sospechoso, huellas dactilares, ropas u objetos lavados, ropas usadas, pelos, huesos y dientes antiguos y muestras biológicas con mezclas muy desequilibradas en las que uno de los componentes está en una proporción límite respecto al componente mayoritario (siendo a menudo este componente minoritario el que

¹ Facultativo. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Dpto de Madrid. Servicio de Biología.

interesa analizar).

Para referirse a estas muestras límites se emplean diversos términos en genética forense. Unos aluden a las técnicas de alta sensibilidad empleadas para su análisis y las definen como "muestras con bajo número de copias" (LCN-*Low Copy Number*) [1] o como el "análisis de ADN de baja cantidad y calidad" (DNALQQ), otros, como "muestras de las que se extrae de 100 pg a 200 pg de ADN molde" para la amplificación. Y por último, los que las definen de forma más amplia como "muestras con bajo templado de ADN" (LTDNA-Low Template DNA) o "muestras con bajo nivel de ADN" (*LDL-Low DNA Level*) para referirse a aquellas muestras en las que, en base a los resultados de validación interna de cada laboratorio, a partir de una cantidad y/o calidad de ADN crítica se obtiene un resultado de tipaje, usando a menudo unas condiciones de alta sensibilidad, que han demostrado incrementan los efectos estocásticos [2 y 3].

Los principales eventos a tener en cuenta en el análisis de estas muestras (que se contraponen a las muestras con cantidades estándar de ADN), y que pueden modificar sustancialmente la valoración e interpretación de los resultados, son los siguientes:

a) Aumento de diversos fenómenos estocásticos que se producen durante los primeros ciclos de la amplificación como consecuencia del bajo número de copias de ADN amplificable presentes en la muestra. Además, el análisis en condiciones de alta sensibilidad de estas muestras frente a las condiciones estándar (aumento del número de ciclos de amplificación, concentración y purificación de los productos amplificados, disminución del volumen de amplificación y/o cambio en las condiciones electroforéticas de inyección) también produce un incremento de los artefactos de la amplificación. Los principales efectos estocásticos son:

1. Pérdidas alélicas (*allele drop-out* o *locus-drop-out*). Como consecuencia de la baja cantidad de ADN molde en la PCR se

produce una amplificación preferencial de uno de los dos alelos de los loci heterocigotos hasta el punto de no detectarse uno de ellos. De no detectarse ninguno (tanto en heterocigotos como en homocigotos) también puede producirse un aumento del desequilibrio entre los alelos de un heterocigoto.

2. Incremento en el porcentaje de las bandas de repetición (o bandas *stutter*) que puede dar lugar incluso a falsos alelos (*allele drop-in*).

Para minimizar los posible errores de tipaje debidos a estos efectos estocásticos unos autores recomiendan replicar el resultado obtenido en varias amplificaciones independientes (alrededor de 3 ó 4) y obtener un perfil consenso de estas réplicas en el que se informa de aquellos alelos que se replican al menos dos veces (the biological model [4]). Si se dispone de una muestra indubitada para cotejar y se obtiene una compatibilidad entre la muestra dubitada y la muestra de referencia, otros autores proponen incorporar al cálculo del índice de verosimilitud todos los resultados obtenidos en las réplicas e introducir probabilidades de drop-out y de drop-in en los cálculos bioestadísticos (the statistical model [5]).

b) La contaminación. Como consecuencia de la baja cantidad de ADN presente en la muestra y del análisis de alta sensibilidad empleado, se incrementa la posibilidad de detectar "ADN exógeno" que nada tiene que ver con el ADN que se busca y que ha podido ser depositado en la muestra en cualquier fase del proceso: antes o durante los hechos investigados, durante la toma de muestras, en el transporte o durante la manipulación en el laboratorio (transferencias primarias y transferencias secundarias [6, 7 y 8]). La contaminación, que se caracteriza por ser un fenómeno esporádico, errático y aleatorio, siempre puede producirse lo que ocurre es que cuando las cantidades de ADN son estándar es menos probable su detección y suele quedar enmascarada.

Recientemente, el llamado caso del Fantasma de Heilbronn, en el que se detecta un mismo perfil genético de mujer en 40 casos aparentemente inconexos entre sí y repartidos por diferentes áreas geográficas en Alemania, Austria y Francia desde 1993 a 2009 [9], ha puesto de manifiesto que se puede producir una contaminación durante el proceso de fabricación de los materiales utilizados por los laboratorios, por parte del personal que trabaja en las fábricas lo que ha dado lugar a que los grupos ENFSI (Red Europea de Institutos de Ciencias Forenses), SWGDAM (Grupo de trabajo americano sobre métodos de análisis de ADN) y BSAG (Grupo asesor especialista en Biología de Australia) recomienden de forma conjunta una serie de protocolos a los fabricantes para minimizar en lo posible el riesgo de una contaminación durante el proceso de fabricación de estos consumibles [10].

A continuación se presentan tres casos prácticos de nuestro laboratorio que ilustran parte de la problemática referida.

2. ANÁLISIS, RESULTADOS Y VALORACIÓN EN TRES CASOS DE AGRESIÓN SEXUAL.

A) CASO 1. UNA CONTAMINACIÓN DURANTE LATOMADE MUESTRAS.

1. Antecedentes del caso (escrito del Médico Forense solicitante): Mujer de 36 años que refiere una agresión sexual por parte de su ex pareja con penetración y eyaculación vaginal. La víctima se lava tras los hechos. También refiere relaciones próximas a la agresión con su pareja actual (sin especificar fecha). El tiempo transcurrido entre los presuntos hechos y la toma de muestras es aproximadamente de 37 horas.

2. Muestras enviadas: Dos hisopos con toma vaginal, una muestra indubitada de la víctima, una muestra indubitada de la pareja actual de la víctima y una muestra indubitada del sospechoso (ex pareja de la víctima).

3. Análisis realizados: La investigación de restos de semen en las tomas vaginales da un resultado positivo para el test de la fosfatasa ácida y para la investigación del antígeno específico de próstata (PSA o proteína p30) pero no se visualizan espermatozoides. Para no seguir agotando las muestras en la visualización microscópica se decide realizar una extracción de ADN mediante la lisis diferencial. Este método permite realizar de forma conjunta una visualización de espermatozoides tras la primera lisis y una extracción de ADN posterior, para determinar si se obtiene un perfil genético de varón a partir de las muestras analizadas.

La lisis diferencial se realiza mediante digestión proteolítica con proteinasa K para intentar separar el ADN proveniente de células no espermáticas (primera fracción de la lisis) de los posibles espermatozoides, de los cuales se extraería el ADN mediante una segunda digestión con proteinasa K y DTT (segunda fracción de la lisis). Ambas fracciones se purifican mediante el método estándar con fenol-cloroformo y se concentran mediante ultrafiltración en columnas Amicon Ultra-30 (Millipore).

Tras la extracción de ADN a partir de la dos tomas vaginales de forma conjunta, los extractos generados se cuantifican mediante PCR a tiempo real utilizando el sistema Quantifiler Duo (Applied Biosystems) obteniéndose los resultados que se recogen en la tabla 1. Se recurre al análisis de STR del cromosoma Y para la detección del componente minoritario de varón mediante PCR utilizando el kit comercial AmpFISTR Yfiler (Applied Biosystems). Los fragmentos generados son separados en un secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) mediante electroforesis capilar en condiciones estándar y de alta sensibilidad (purificación de productos de PCR y cambio en las condiciones de inyección aumentando el tiempo y el voltaje) y los perfiles editados mediante el programa Genemapper (Applied Biosystems).

MUESTRA	CUANTIFICACIÓN DE ADN (ng/μl)		RESULTADOS TIPAJE ADN (marcadores STR cromosoma Y)
	ADN total	ADN de varón	
HISOPOS VAGINALES: Primera fracción de la lisis	57.47	0.023	Mezcla de al menos 2 haplotipos de varón
HISOPOS VAGINALES: Segunda fracción de la lisis	0.913	No detectado	Sin resultados

Tabla 1. Resultados de cuantificación y de tipaje. Los resultados de cuantificación son orientativos ya que el método de análisis que se utiliza es un método semicuantitativo.

4. Resultados:

Tras la primera lisis no se visualizan espermatozoides. Apartir de la segunda fracción de la lisis no se detecta ADN de varón en la cuantificación de ADN humano y además no se obtienen resultados en el análisis de STR específicos del Cromosoma Y. Estos resultados son compatibles con los obtenidos en los análisis de investigación de esperma.

A partir de la primera fracción de la lisis (donde se extrae el ADN proveniente de células no espermáticas) se detectan trazas de ADN de varón en el límite de sensibilidad de la técnica y con una gran desproporción respecto al ADN

total, por lo que el análisis más aconsejable para la detección del componente minoritario de varón es el análisis de STR específicos del Cromosoma Y. En dicho análisis se obtiene un perfil genético mezcla que indica la presencia de restos celulares de al menos dos varones ya que para la mayoría de los marcadores analizados se detectan dos alelos (Figura 1). El haplotipo de la pareja actual de la víctima es compatible con dicha mezcla no así el haplotipo del sospechoso, excluyéndose por tanto la presencia de restos celulares de la ex pareja de la víctima en la muestra analizada y apareciendo restos celulares de un varón desconocido.

A la vista de los resultados genéticos obtenidos y en el contexto de la muestra, ya que

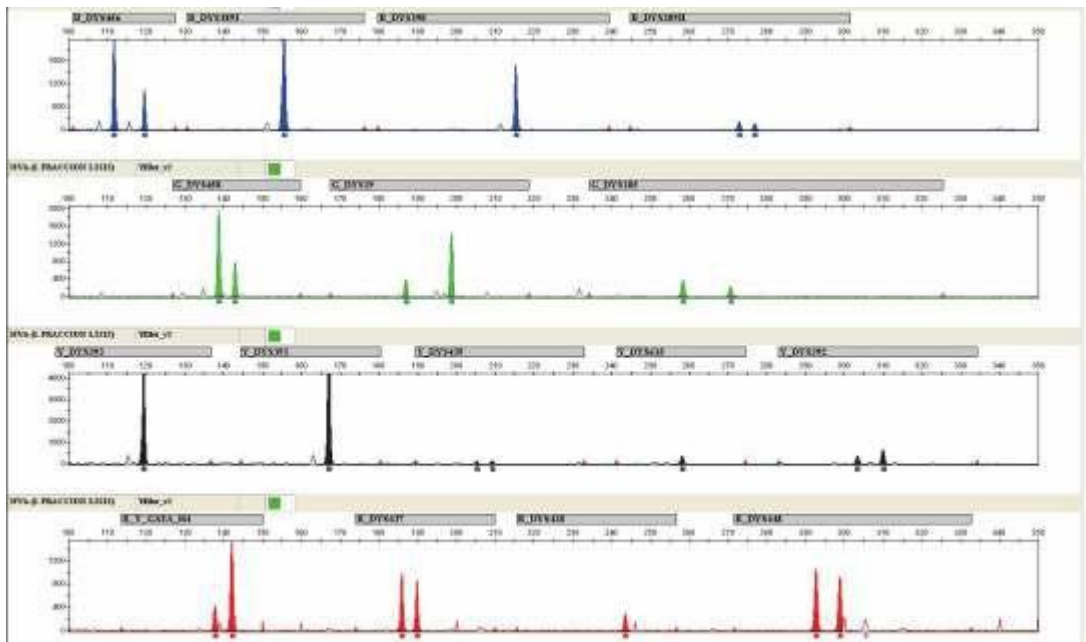


Figura 1. Perfil genético mezcla para STR del Cromosoma Y obtenido a partir de la primera fracción de la lisis de las tomas vaginales (se ha eliminado la nomenclatura de los alelos por razones de confidencialidad). El resultado de tipaje fue replicado en tres amplificaciones independientes y el haplotipo del varón desconocido se comparó con todos los haplotipos de la base de datos de eliminación de los varones del laboratorio no obteniéndose ninguna coincidencia.

se trata de una muestra con cantidades límites de ADN de varón y además en la que el haplotipo de varón desconocido se detecta en la fracción de ADN procedente de células no espermáticas, se decide investigar la toma de muestras para descartar una posible contaminación. Se comprueba que la persona que realizó la toma de muestras durante el reconocimiento ginecológico es un varón y además no había utilizado mascarilla como método de protección por lo que se le solicita una muestra indubitada a lo cual accede voluntariamente para descartar o no la hipótesis de la contaminación. Tras la obtención del haplotipo de dicho varón se confirma una compatibilidad total con el haplotipo denominado “varón desconocido” detectado en las tomas vaginales.

5. Comentarios. Los laboratorios de genética forense adoptan una serie de medidas para evitar una posible contaminación durante los análisis (normas de calidad ISO 17025), aún así se ha observado que de forma esporádica algunas muestras se contaminan con ADN del personal del laboratorio, contaminación ésta que es fácil de trazar porque los perfiles genéticos generados (sobre todo los anónimos) son comparados sistemáticamente con la base de datos de eliminación del personal del laboratorio. Sería recomendable que de igual manera existiera una base de datos anónima de eliminación de todas las personas que intervienen en la toma de muestras con fines de identificación genética (policía judicial, médicos forenses, ginecólogos,...), para poder descartar posibles contaminaciones durante el proceso de recogida de muestras.

B) CASO 2. POSIBLES TOCAMIENTOS A UNA MENOR.

1. Antecedentes del caso (Informe Médico Forense): Niña de 10 años nacida en Rusia y adoptada, con antecedentes de retraso madurativo y conducta de tricotilmania (tendencia a arrancarse el cabello) en tratamiento. Padres divorciados.

La madre refiere “tocamientos con dedo y pene en genitales, glúteos y pecho” por parte del padre adoptivo y de otra persona. En la exploración de las regiones genital y anal no se observan lesiones de origen traumático. No conoce con exactitud la hora de la supuesta agresión, aunque parece que pasaron menos de 24 h desde la supuesta agresión a la toma. La víctima no se lavó antes del reconocimiento y la braga aportada es la que llevaba puesta cuando se produjeron los hechos.

2. Muestras enviadas: Dos hisopos con toma vaginal, braga, una muestra indubitada del padre adoptivo (varón de 42 años) y una muestra indubitada del padre biológico del padre adoptivo (abuelo adoptivo) (varón de 71 años).

3. Análisis realizados: La investigación de restos de semen en las tomas vaginales y en la braga es negativa, por lo que se realiza una extracción de ADN de las tomas vaginales y de la zona de la entrepierna de la braga (diferenciando zona anterior y posterior), mediante una lisis total consistente en una digestión proteolítica con proteinasa K y DTT y posterior purificación con fenol-cloroformo-isoamílico y concentración con columnas Amicon Ultra-30 (Millipore).

Tras la extracción de ADN los extractos generados se cuantifican mediante PCR a tiempo real utilizando el sistema Quantifiler Duo (Applied Biosystems) obteniéndose los resultados que se recogen en la tabla 2. Se recurre al análisis de STR del cromosoma Y para la detección del componente minoritario de varón mediante PCR utilizando el kit comercial AmpFISTR Yfiler (Applied Biosystems). Los fragmentos generados son separados en un secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) mediante electroforesis capilar en condiciones estándar y de alta sensibilidad (purificación de productos de PCR y condiciones de inyección 5 Kv-15 m) y los perfiles editados mediante el programa Genemapper (Applied Biosystems).

MUESTRAS	CUANTIFICACIÓN DE ADN (ng/μl)		RESULTADOS TIPAJE ADN (marcadores STR cromosoma Y)
	ADN total	ADN de varón	
Hisopo vaginal 1	197,71	No detectado	Sin resultados
Hisopo vaginal 2	271,26	No detectado	Sin resultados
Braga (zona anterior entrepierna)	6,46	0,027	Haplotipo de varón
Braga (zona posterior entrepierna)	6,22	0,019	Haplotipo de varón

Tabla 2. Resultados de cuantificación y de tipaje. Los resultados de cuantificación son orientativos ya que el método de análisis que se utiliza es un método semicuantitativo.

4. Resultados:

A partir de las tomas vaginales no se detecta ADN de varón en la cuantificación de ADN humano y no se obtienen resultados en el análisis de STR específicos del Cromosoma Y.

A partir de las zonas anterior y posterior de la entrepierna de la braga se detectan trazas de ADN de varón en el límite de sensibilidad de la técnica y con una gran desproporción respecto

al componente de mujer, por lo que el análisis más aconsejable para la detección del componente minoritario de varón es el análisis de STR específicos del Cromosoma Y. En dicho análisis se obtiene el mismo haplotipo en las zonas analizadas en la braga (Figura 2), que además, coincide con el haplotipo obtenido a partir de las muestras indubitadas del padre adoptivo y del abuelo adoptivo por vía paterna.

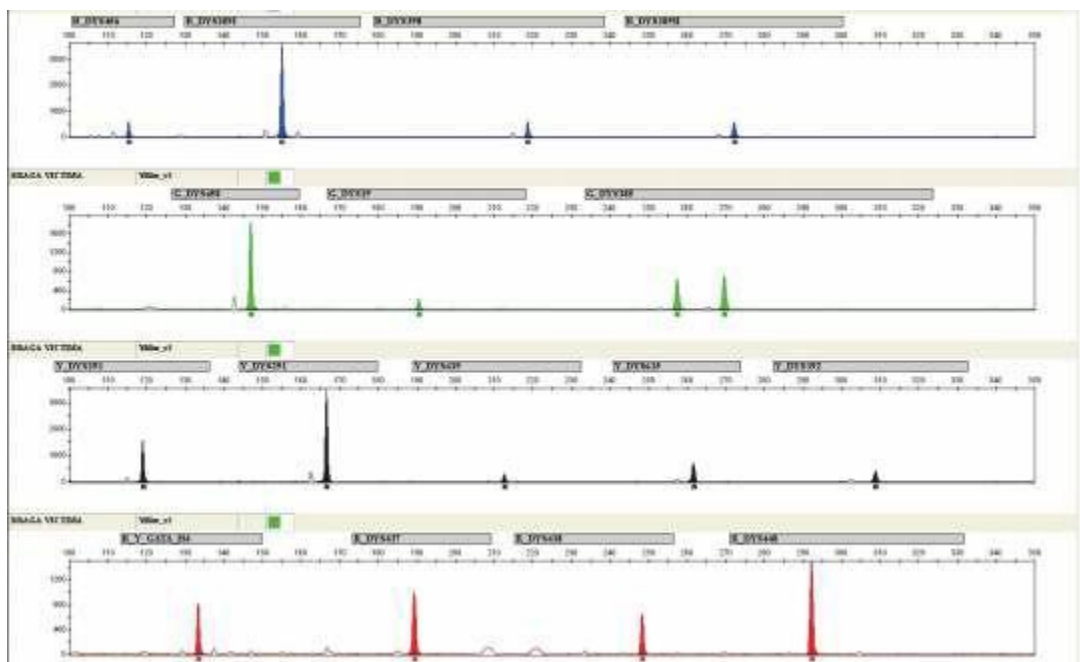


Figura 2. Haplotipo obtenido a partir de las dos zonas analizadas de la braga (se ha eliminado la nomenclatura de los alelos por razones de confidencialidad).

5. Comentarios.

En este caso, a la dificultad en la obtención de resultados a partir del componente minoritario de varón y que se ha resuelto positivamente gracias al análisis de STR de cromosoma Y, se une la dificultad de que los dos varones implicados en la supuesta agresión son padre e hijo y el análisis de STR de cromosoma Y no permite distinguir a dos varones que comparten el mismo linaje paterno y por lo tanto no podemos establecer de cual de los dos individuos proceden los restos celulares detectados o si proceden de los dos. No obstante, el análisis de nuevos marcadores de cromosoma Y con una alta tasa de mutación de reciente validación e incorporación en nuevos kits comerciales, a lo mejor podrá ayudar en un futuro a distinguir entre individuos que compartan el mismo linaje paterno.

C) CASO 3. DETECCIÓN DE UNA TRANSFERENCIA SECUNDARIA?

1. Antecedentes del caso (por conversación mantenida con el Juzgado): La víctima, que se dedica a la prostitución, es recogida por una pareja (hombre y mujer) en el vehículo de éstos. La víctima refiere que el varón y ella pasan a la parte trasera del coche y allí el varón le roba el móvil, no le quiere pagar y finalmente la obliga a mantener relaciones sexuales contra su voluntad. La mujer acompañante no participa sexualmente en los hechos relatados, en el asiento del copiloto. El hombre utiliza tres preservativos e intenta la penetración vaginal pero no logra excitarse, finalmente se limpia con un pañuelo de papel y tira todo por la ventanilla del vehículo. Con posterioridad el acusado niega cualquier contacto sexual con la víctima y “la denunciante efectuó un relato detallado de los hechos persistiendo en su incriminación y se observan contradicciones en las declaraciones de ambos imputados..., que impide cuestionar la credibilidad de la víctima”, por lo que se acuerda la prueba biológica.

2. Muestras enviadas: tres preservativos y un pañuelo de papel recogidos con posterioridad por la policía municipal del lugar donde

sucedieron los hechos y señalados por la víctima. Una muestra indubitada de la víctima y una muestra indubitada del sospechoso.

3. Análisis realizados: La investigación de restos de semen da un resultado negativo en los tres preservativos y en el caso del pañuelo positivo para el test de la fosfatasa ácida y para la investigación del antígeno específico de próstata (PSA o proteína p30) pero no se visualizan espermatozoides.

Cada preservativo se procesa en el análisis genético tomando tres muestras:

- EXTERIOR: toma de la parte exterior mediante limpieza con un hisopo estéril humedecido en agua estéril
- INTERIOR: toma de la parte interior mediante limpieza con un hisopo estéril humedecido en agua estéril
- RESERVORIO: se toma un fragmento de la parte final del preservativo

Asimismo del pañuelo de papel se toma una muestra para el análisis genético.

La extracción de ADN se realiza mediante una lisis total consistente en una digestión proteolítica con proteinasa K y DTT y purificación mediante el método estándar con fenol-cloroformo y se concentran mediante ultrafiltración en columnas Amicon Ultra-30 (Millipore).

Tras la extracción de ADN los extractos generados se cuantifican mediante PCR a tiempo real utilizando el sistema Quantifiler Duo (Applied Biosystems) obteniéndose los resultados que se recogen en la tabla 3. Se recurre al análisis tanto de STR autosómicos como de STR del cromosoma Y específicos de varón mediante PCR utilizando los kits comerciales AmpFISTR Identifiler Plus y AmpFISTR Yfiler (Applied Biosystems). Los fragmentos generados son separados en un secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) mediante electroforesis capilar en condiciones estándar y los perfiles editados mediante el programa Genemapper (Applied Biosystems).

MUESTRAS ADN	CUANTIFICACIÓN DE ADN (ng/μl)		RESULTADOS TIPAJE ADN STR autosómicos	RESULTADOS TIPAJE STR cromosoma Y
	ADN total	ADN de varón		
PRESERVATIVO 1 (EXTERIOR)	0.799	No detectado	Perfil de mujer compatible con la víctima	No realizado
PRESERVATIVO 1 (INTERIOR)	2.52	0.098	Perfil de mujer desconocida	No realizado
PRESERVATIVO 1 (RESERVORIO)	12.01	0.332	No realizado	Haplotipo de varón compatible con el sospechoso
PRESERVATIVO 2 (EXTERIOR)	32.12	No detectado	No realizado	No realizado
PRESERVATIVO 2 (INTERIOR)	1.57	No detectado	Perfil de mujer compatible con la víctima	No realizado
PRESERVATIVO 2 (RESERVORIO)	4.25	0.248	Mezcla de al menos 3 compatible con víctima, sospechoso y mujer desconocida	Haplotipo de varón compatible con el sospechoso
PRESERVATIVO 3 (EXTERIOR)	0.1	No detectado	No realizado	No realizado
PRESERVATIVO 3 (INTERIOR)	1.50	0.068	Perfil de mujer desconocida	No realizado
PRESERVATIVO 3 (RESERVORIO)	11.29	0.66	Mezcla de al menos 3 compatible con víctima, sospechoso y mujer desconocida	Haplotipo de varón compatible con el sospechoso
PAÑUELO DE PAPEL	9.51	0.96	Mezcla de al menos 3 compatible con víctima, sospechoso y mujer desconocida	Haplotipo de varón compatible con el sospechoso

Tabla 3. Resultados de cuantificación y de tipaje. Los resultados de cuantificación son orientativos ya que el método de análisis que se utiliza es un método semicuantitativo.

4. Resultados:

A partir del material recogido en los tres preservativos analizados se han podido individualizar para STR autosómicos dos perfiles genéticos de mujer, uno que es compatible con el perfil genético de la víctima (detectado en la zona exterior del Preservativo 1 y en la zona interior del preservativo 2) y otro procedente de una MUJER DESCONOCIDA (detectado en la zona interior del preservativo 1 y del preservativo 3). El perfil genético de mujer desconocida es comparado con la base de datos de eliminación de personal del laboratorio no detectándose ninguna coincidencia.

A partir del material recogido del reservorio de dos de los preservativos para STR autosómicos (2 y 3) y del pañuelo de papel se ha obtenido una mezcla de ADN procedente de al menos tres personas, compatible con una mezcla de restos celulares procedentes de LA VÍCTIMA, del SOSPECHOSO y de la MUJER DESCONOCIDA detectada en la zona interior del preservativo 1 y del preservativo 3 (Figura 3).

Además se confirma que, a partir del reservorio de los tres preservativos y del pañuelo de papel, se detecta para marcadores específicos del cromosoma Y, un único perfil genético (haplotipo) de varón coincidente con el haplotipo del sospechoso.

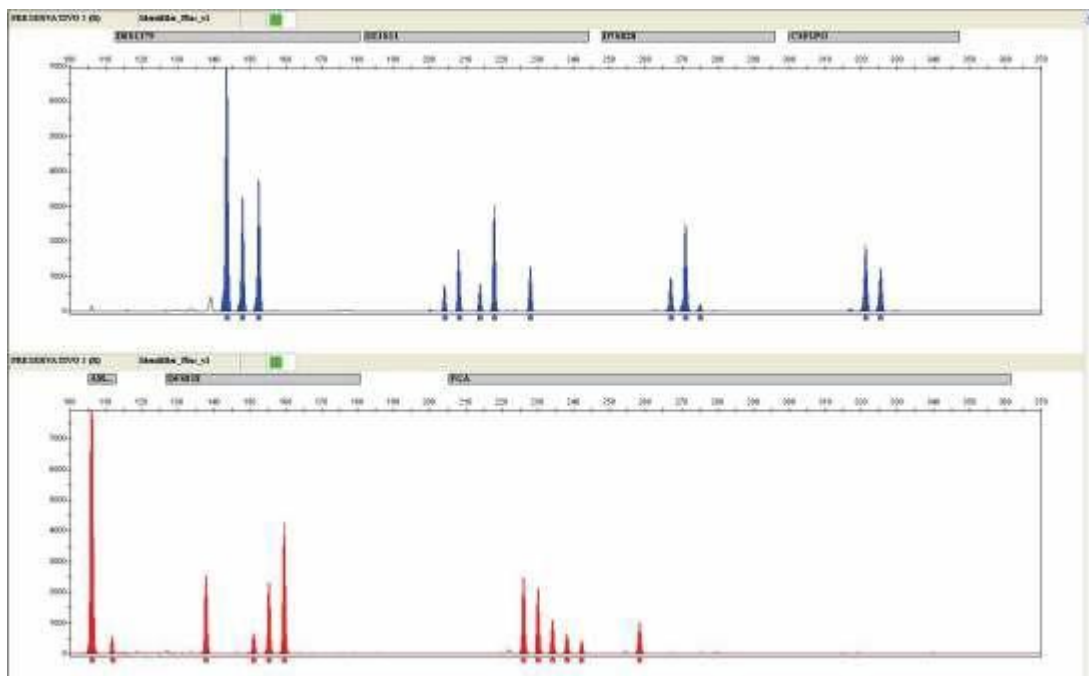


Figura 3. Perfil genético mezcla para 7 marcadores STR autosómicos obtenido a partir del reservorio del preservativo 2 (se ha eliminado la nomenclatura de los alelos por razones de confidencialidad). Se incluye el marcador de sexo (amelogenina, AM) donde se ha marcado con una flecha el fragmento del cromosoma Y presente en mucha menor proporción que el fragmento específico del cromosoma X. Como puede verse en la figura, el perfil genético es compatible con una mezcla de al menos 3 personas ya que se detectan, en los marcadores mostrados, 6 alelos para un marcador (FGA) y cinco para otro (D21S11).

5. Comentarios.

Al no detectarse restos de semen en los preservativos las posibilidades de detectar otras contribuciones celulares aumentan. Los resultados obtenidos podrían ser explicados mediante un mecanismo de transferencia secundaria. Una transferencia secundaria ocurre cuando el ADN de una persona cambia de la ubicación original donde fue depositado y es transferido a otra persona u otro objeto de tal forma que no ha habido contacto físico entre la persona y la ubicación final de su ADN. Un posible escenario que explicaría los resultados obtenidos es que el varón mantuviera previamente un contacto sexual con la mujer acompañante imputada (u otra) la cual depositó restos celulares en el pene del varón que posteriormente fueron transferidos al preservativo. Se solicitó una muestra indubitada de la imputada para intentar corroborar o no esta hipótesis pero la petición fue denegada en base

a que “no habiendo mantenido ninguna de las partes que la misma tomara parte en ningún acto de naturaleza sexual” durante los hechos que se investigan. La cantidad de ADN procedente de esa mujer desconocida recuperada de las muestras analizadas sugiere que el contacto sexual con el sospechoso debió de ser reciente.

AGRADECIMIENTOS.

A todo el personal que ha intervenido en la realización de los casos prácticos presentados y ha colaborado en la correcta resolución de los mismos, y en especial a los Médicos Forenses que ha intervenido en los tres casos.

BIBLIOGRAFÍA.

- GILL P, WHITAKER J, FLAXMAN C, BROWN N, BUCKLETON J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int.* 2000; 112: 17-40.

2. BUTLER JM. Chapter 11: Low Level DNA testing: issues, concerns and solutions. In: ELSEVIER editor. *Advances Topics in Forensic DNA Typing: methodology*. 2012. p 311-346.
3. OORSCHOT RAH, BALLANTYNE KN, MITCHELL RJ. Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*. 2010.1:14.
4. BENSCHOP CCG, BEEK CP, MEILAND HC, GORP AGM, WESTEN AA, SIJEN T. Low template STR typing: effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results. *Forensic Sci Int Genetics*. 2011; 5:316-328.
5. GILL P, BUCKLETON JA. A universal strategy to interpret DNA profiles that does not require a definition of low-copy-number. *Forensic Sci Int Genetics*. 2010; 4:221-227.
6. LOWE A, MURRAY C, WHITAKER J, TULLY G, GILL P. The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int*. 2002; 129:25-34.
7. WICKENHEISER RA. Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer or trace quantities of DNA through skin contact. *J Forensic Sci*. 2002; 47(3): 442-450.
8. GORAY M, EKEN E, MITCHELL RJ, OORSCHOT RAH. Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions. *Forensic Sci Int Genetics*. 2010; 4:62-67.
9. NEUHUBER F. Female criminal- it's not always the offender! *Forensic Sci Int Genetics Supplement series*. 2009; 2:145-146.
10. GILL P, ROWLANDS D, TULLY GG, BASTISH I, STAPLES T, SCOTT P. Manufacturer contamination of disposable plastic-ware and other reagents- an agreed position statement by ENFSI, SWGDAM and BSAG. *Forensic Sci Int Genetics*. 2010; 4:269-270.