

# Factores que afectan al análisis biológico de las muestras de agresiones sexuales.

*Factors that interfere the biological analysis of the samples of sexual assaults.*

---

---

Y. Torres<sup>1</sup>, M. Aler<sup>2,3</sup>, A. Plata<sup>1</sup>, A. Domínguez<sup>1</sup>, P. Sanz<sup>1</sup> y M. Gisbert<sup>3</sup>

---

---

## RESUMEN

El concepto multidisciplinar de Ciencias Forenses se ha consolidado en los últimos años integrando un amplio espectro de profesionales de distintas disciplinas que ha abierto nuevas áreas de trabajo, en la mayoría de las cuales la interpretación del resultado se basa en la comparación con un material de referencia. Este trabajo pretende exponer brevemente una revisión de la casuística de Delitos Contra la Libertad Sexual (DCLS) estudiados en los laboratorios de Biología Forense y evaluar el rendimiento de la prueba de ADN a lo largo de los años en dos aspectos: uno en las situaciones inherentes a la metodología y otro en lo que respecta al cotejo de los vestigios analizados con las muestras de referencia de los implicados. En este segundo supuesto, el no disponer de una Base de Datos Nacional de Perfiles de ADN parece ser una de las razones en la no resolución de algunos de estos casos. Desde la denuncia del delito perpetrado hasta la obtención del ansiado perfil de ADN susceptible de cotejo intervienen múltiples factores, algunos de los cuales podrían ser controlados-consensuados desde instituciones como los Institutos de Medicina Legal (IMLs) de quienes depende la toma, distribución y envío de las muestras y otros deberían ser previstos-consensuados en los propios laboratorios de análisis.

*Palabras clave: casuística agresiones sexuales, técnicas preliminares, sumisión química, prueba de ADN, Bases de Datos en agresiones sexuales.*

Cuad Med Forense 2007; 13(47):45-56

## ABSTRACT

The multidisciplinary concept of Forensic Sciences has been consolidated in the last years integrating a wide spectrum of professionals of different disciplines. New areas of work have been opened, in most of them the result should be interpreted by the comparison with reference samples. This work tries to briefly expose a review of the laboratory work in sexual assaults casework and to evaluate the efficiency of the applied methodology in two aspects, one in reference to the techniques itself and another one which concerns the comparison between the specimens analysed and the reference samples of suspects. The absence in Spain of a National DNA Database seems to be one of the reasons in the non resolution of some of these cases. But many other factors, from the initial report of the crime denunciation to the achievement of the DNA profiles to be compared must be considered. We have to reach a consensus in order to control the whole process from the forensic examinations carried out in the Institutes of Legal Medicine to the interpretation of the findings in the forensic laboratory.

*Key words: sexual assault casework, preliminary techniques, drug facilitated sexual assault, DNA technology, DNA databases in sexual crimes.*

---

Fecha de recepción: 2.MAR.07

Fecha de aceptación: 3.MAY.07

Correspondencia: Yolanda Torres Aragón, Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses. Avda. Dr. Fedriani s/n. 41013. Sevilla. e-mail: yolanda.torres@mju.es.

<sup>1</sup> Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Legal. Valencia.

<sup>3</sup> Universidad de Valencia. Facultad de Medicina. Unidad Docente de Medicina Legal.

## **INTRODUCCIÓN:**

En marzo de 2005 se completó el Programa de Expansión del ADN Forense del Home Office en Inglaterra y Gales, programa estatal mediante el que han conseguido reducir, en el Reino Unido, los tiempos y los costes en la investigación criminal y aumentar en un 75% el número de resultados coincidentes entre los vestigios analizados y las muestras de referencia (indubitadas) obtenidas de los implicados, todo ello durante el periodo 1999-2005 [1].

En el mismo año 2005, el modelo se incorporó a la Estrategia de Integración Forense (FIS) con la intención de extender estos beneficios a otras disciplinas, por ejemplo, entre otras, la implementación de reformas en patología forense. En España, en el Servicio de Biología del Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) de Sevilla, y durante el mismo periodo 1999-2005, se realizó una evaluación de la casuística que indicó que, a pesar del aumento en un 61% del número de casos procedentes de DCLS, se detectó un descenso del 11% en el número informes emitidos con estudio comparativo entre el perfil de ADN obtenido de vestigios con el de las muestras de referencia [2].

Las razones de esta aparente pérdida de eficiencia se pueden analizar desde múltiples contextos: la problemática inherente a este tipo de delitos, las limitaciones propias de la técnica dada la elevada proporción de vestigios en los que la concentración de ADN se encuentra en el límite de posibilidad de obtención de un perfil genético y la inexistencia de una Base de Datos Nacional de ADN a la que remitir los perfiles genéticos obtenidos. Para analizar algunas de estas posibles causas conviene revisar, de forma global, algunas peculiaridades propias a la casuística de los DCLS.

## **MATERIAL Y MÉTODO:**

Se realiza una revisión crítica del material manejado en trabajos precedentes, en los que se ha evaluado en distintos contextos la casuística de los DCLS ocurridos en el ámbito de actuación del INTCF de Sevilla, procedentes de los ocho IMLs y Juzgados de las provincias de Andalucía, los dos IMLs y Juzgados de Extremadura y los Juzgados de las ciudades autónomas de Ceuta y Melilla.

Los análisis realizados sobre los diferentes estudios periciales se habían realizado empleando la tecnología del ADN que conlleva la extracción del ADN -tanto de las muestras indubitadas de referencia como del material biológico seleccionado a partir de los análisis preliminares de los vestigios-, su amplificación mediante la aplicación de Kits comerciales y la obtención de perfiles por medio de electroforesis capilar, según lo descrito en trabajos previos [3,4].

## **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA PRUEBA DE ADN:**

### **1.- LA PROBLEMÁTICA MUESTRAL DE LOS DELITOS CONTRA LA LIBERTAD SEXUAL.**

Los DCLS presentan problemas asociados al propio caso que, en muchas ocasiones, permiten prever las dificultades tanto legales como técnicas que se pueden plantear. Desde el punto de vista del laboratorio, las dificultades abarcan la práctica totalidad del proceso desde la toma y remisión de las muestras, la recogida de vestigios, el diagnóstico de presencia/ausencia de semen hasta la individualización del mismo o, en su defecto, de células no espermáticas del agresor. Como mencionamos en un trabajo previo [5] los factores a priori determinantes de la resolución de los DCLS se pueden relacionar con la propia víctima, con el agresor y las propiedades de su semen y con las características de las muestras tomadas, tanto directas obtenidas en el cuerpo de la víctima como procedentes de prendas o del lugar de los hechos.

### **A.- Víctima viva.**

No por constituir delito deja de ser un mero acto sexual, por lo que las muestras directas son especialmente relevantes. Proceden mayoritariamente de tejidos del epitelio mucoso -zona vaginal, anal y bucal- donde los fluidos de la víctima actúan diluyendo a los del agresor y favoreciendo tanto la pérdida de material seminal, lo que depende, entre otros factores, tanto del tiempo transcurrido entre la comisión del delito y la toma de muestras como de la degradación del mismo desde la toma a la llegada al laboratorio [6-7]. Por el contrario, en soportes bioquímicamente inertes y secos el material biológico queda adherido, facilitando tanto el análisis químico-inmunológico como la observación microscópica de los distintos tipos celulares y la obtención de un ADN íntegro.

En ocasiones este tipo de vestigios se recogen y remiten al laboratorio directamente desde servicios hospitalarios especializados en los que, pese a su alta especialización clínica, no es infrecuente que la toma de muestras no reúna las condiciones adecuadas, desde el punto de vista del análisis forense al que han de ser sometidas. Además de escasas suelen remitirse en envases no idóneos y casi sin datos en relación a la propia toma y al delito cometido. Una posible solución estaría en el empleo de protocolos comunes de actuación, en casos de DCLS, entre los centros hospitalarios y las clínicas médico-forenses además de potenciar la difusión de protocolos específicos de recogida de muestras para DCLS, alguno de ellos ya existentes [8], entre el personal hospitalario y de atención primaria. Asimismo, una vez que el Juzgado o el IML conozca la denuncia debería indagar en la investigación policial del lugar de los hechos para poder incrementar las posibilidades de "rescatar" los posibles restos de material biológico depositado por el agresor en utensilios higiénicos (toallitas de papel, compresas), ropas no lavadas u objetos posiblemente manipulados. Teniendo en cuenta que en un alto porcentaje la toma de muestras se efectúa en las 24 horas siguientes a los hechos (en 2003, 78% de los casos en los que constaba esta información en el formulario forense), esta práctica proporcionaría una reserva de vestigios que permitiría la ampliación del análisis cuando fuera necesario.

Un material inerte interesante que en algunos casos puede obtenerse en este tipo de delitos, lo constituyen los bordes libres ungueales, en los que conviene investigar las posibilidades de detectar material biológico del agresor, siempre que el reconocimiento médico-forense se realice próximo a los hechos, que haya habido signos evidentes de defensa, que la víctima recuerde y relate como se produjeron los hechos y no se haya lavado. Pero este abordaje de búsqueda de células no seminales debe realizarse con cautela ya que, incluso macerando los bordes cortados de las uñas para recoger sólo el material superficial, el arrastre de células de la propia víctima es inevitable, diluyendo con ello el posible aporte celular del agresor y contribuyendo a perder su perfil genético o a la aparición de mezclas alélicas de difícil interpretación. Por otro lado, las transferencias de ADN, previas a la comisión del delito o posteriores al mismo, de personas ajenas a los hechos pueden dar lugar a perfiles genéticos "extra", detectables con las técnicas habituales de amplificación de ADN [9] que pueden ser malinterpretados induciendo a la exclusión del sospechoso durante el Acto de Juicio Oral. Los estudios sobre transferencias primarias y secundarias de ADN se han intensificado a partir del desarrollo de la tecnología para muestras de contenido límite de ADN ("Low copy number", LCN), lo que conlleva un aumento del riesgo de detectar trazas de material exógeno – la contaminación "inocente" o por manipulación del vestigio- y de una inadecuada interpretación de los resultados. Hay que tener en cuenta que aproximadamente el 13% de la población tiene tendencia a depositar fácilmente su ADN en las superficies que tocan, bien por presentar una tasa elevada de descamación o por desprender un mayor número de células nucleadas [10, 11]. Además de las limitaciones expuestas, sistematizar la toma de muestras en los bordes libres de las uñas en DCLS para

su individualización supondría añadir diez muestras (una por dedo/uña), con el consiguiente encarecimiento y demora en los análisis, y sólo sería procedente en función del relato de los hechos: cuando la víctima pueda aportar información de con qué mano y con qué dedos arañó, le retiró la boca o realizó otro posible contacto transferente con el agresor. Cuando concurren estas características en el relato de la comisión del delito, sería conveniente realizar una "toma dirigida" de/los dedo/s utilizados, con independencia de que el resto de la mano se agrupe en uno o dos hisopos adicionales para un *screening* general. Por otra parte, es práctica casi de rutina enviar para estudio al laboratorio peinado público de la víctima. Obviando el interés del hallazgo de semen en la propia región púbica, el análisis específico de los vellos presenta importantes limitaciones: el problema de la transferencia de vellos en el coito [12], se unen las limitaciones del estudio morfológico comparativo y el escaso rendimiento en la extracción de ADN.

Asimismo, debe recordarse que además de recoger muestras que puedan contener indicios, deben tomarse *siempre* que se pueda las muestras indubitadas o de referencia, para el futuro cotejo, tanto de la víctima como del/os presunto/s agresor/es [13], lo que puede hacerse a priori o una vez que se conozca el resultado de las pruebas preliminares de diagnóstico de presencia de material genéticamente tipable procedente de semen, saliva, sangre u otros. Cuando la agresión sexual se ha cometido en el entorno cercano a la víctima, es poco frecuente que el laboratorio lleve a recibir la muestra indubitada del presunto agresor. Pensamos que en muchos de estos casos, que representaron el 17% de la casuística de 2003, el simple diagnóstico de presencia de semen (43%) pudo ser considerado por el tribunal como probatorio y favorecer un pacto entre las partes; de ahí la importancia del diagnóstico de certeza de líquido seminal, aunque sólo se detecten trazas.

### **B.- Víctima intoxicada.**

Existe un grupo de víctimas vivas incapaces de reconocer a su violador o violadores. Entre ellas se encuentran las que "no recuerdan" o pierden el conocimiento antes de la agresión y cuya incidencia parece ir en aumento, hasta el punto que ha dado lugar a un nuevo término conocido como "sumisión química" (SQ) en español, "soumission chimique" en francés ó "drug facilitated sexual assault" en inglés y que se puede definir como "la administración de sustancias psicoactivas a una persona con fines criminales o delictivos". Los compuestos usados con este fin pueden ser medicamentos como benzodiazepinas (flunitrazepan, lorazepan, etc.), hipnóticos (zopiclona, zolpiden), sedantes, neurolepticos y anestésicos; también se han empleado drogas de abuso (cannabis, metadona, extasis, LSD) y muy frecuentemente bebidas alcohólicas [14]. La mayoría de estas sustancias poseen propiedades amnésicas, por lo que las víctimas no pueden recordar las circunstancias en las que ocurrieron los hechos, y además tienen un tiempo de vida medio muy corto y se eliminan rápidamente, por lo que para poder detectarlas en un análisis toxicológico en muestras de sangre y orina, éstas han de obtenerse, como muy tarde, 48 horas después de los hechos. Pero si consideramos que, en ocasiones, la denuncia se hace con posterioridad, cuando las posibles sustancias administradas ya se han eliminado de la sangre y de la orina, la única muestra biológica que nos permite establecer si el caso que nos interesa es una SQ es el cabello. Es conocido que cualquier compuesto absorbido se incorpora en el pelo por diversos mecanismos y permanece acumulado e inalterado hasta que el pelo se corta o se cae. Dado que está aceptado con fines forenses que el pelo crece a una velocidad media de 1 cm/mes [15], para conocer el tipo de intoxicación sufrido, se recomienda cortar un mechón de cabello unas dos semanas después de ocurridos los hechos. Esta muestra se procesa en el laboratorio donde se corta en segmentos de 1 cm que se analizan separadamente, siendo el segmento más cercano al cuero cabelludo donde se debe detectar el compuesto que

ha sido administrado, mientras que en los demás segmentos los resultados deben ser negativos [16, 17]. No obstante la detección en pelo de este tipo de absorciones puntuales sólo es posible si el laboratorio de análisis químico-toxicológico dispone de equipos de alta sensibilidad como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Estos casos de SQ, en términos generales se suelen corresponder con jóvenes extranjeras o estudiantes, representando el 2% de nuestra casuística del año 2003, el 4% en 2004 y el 6% en 2005 sin que se recibieran muestras de posibles sospechosos incluso habiendo informado de la presencia de espermatozoides (58% de casos positivos para semen en 2003 y 35% en 2004).

### **C.- Víctima muerta.**

Tratándose de cadáveres, el diagnóstico de presencia/ausencia de semen se complica debido a la alta tasa de contaminación fúngica y a la degradación celular provocada por los fenómenos de autólisis, que interfiere en la observación microscópica; sin embargo, cuando se detecta la presencia de cabezas de espermatozoides, las posibilidades de individualización suelen ser las mismas que con víctimas vivas. Se han descrito los parámetros que interfieren en la observación de espermatozoides y en la cuantificación de fosfatasa ácida prostática en distintos intervalos postmortem en tomas vaginales, orales y anorectales [18]. La utilización de luces forenses a pie de autopsia ayudaría a la toma de muestras adicionales de superficies corporales y posiblemente mejoraría el rendimiento en la casuística de DCLS [19], sin obviar los excelentes beneficios de su aplicación en la detección de fibras para estudios criminalísticos y manchas de diversa naturaleza en otros tipos de delitos.

Conscientes de la importancia de la recogida adecuada de vestigios en la escena del crimen, para aumentar la eficiencia y el rendimiento en la resolución de delitos y en la identificación de restos humanos, uno de los grupos de trabajo de la ENFSI (Crime Scene Working Group) trata de unificar criterios a nivel internacional y desarrollar protocolos y Kits de recogida de muestras [20]. Al igual que en la patología forense para determinar las causas de la muerte, la recogida de vestigios en los DCLS –ya sea en la clínica médico-forense, en la sala de autopsias e incluso en el levantamiento del cadáver– debe seguir una sistemática que garantice en lo posible una respuesta a las cuestiones que se vayan planteando ante cada nuevo resultado. Sólo tenemos que remitirnos a los datos facilitados por el Home Office y el Forensic Science Service (FSS) para justificar el éxito de los 206 millones de libras invertidos en su programa de expansión del ADN y el disponer de una base de datos con más de tres millones de perfiles [21, 22].

## **2.- RESPECTO A LA NECESARIA PREVISIÓN DE UNA BUENA INDIVIDUALIZACIÓN.**

### **A.- En relación a los análisis preliminares.**

Los análisis preliminares comprenden la realización de un conjunto de técnicas que lleven al diagnóstico de la naturaleza del producto biológico producido en la comisión del delito, ya sea sangre, saliva o semen. Cada laboratorio aplica una serie de métodos sobre los vestigios a estudiar, ya sean fluidos o sólidos, realizando diversas técnicas: observación directa, colorimétricas (hemoglobina), químicas (cristales), bioquímicas, inmunocromatográficas (empleo de anticuerpos monoclonales) y microscópicas (microscopía óptica).

En el laboratorio de biología el buen conocimiento de las técnicas preliminares y la acertada combinación en su aplicación constituyen la base de una buena pericia, ya que éstas orientarán la extracción del ADN para su análisis genético. Al contrario de lo que ocurre con las técnicas moleculares, gran parte de la etapa de análisis “preliminares” depende de la experiencia del perito

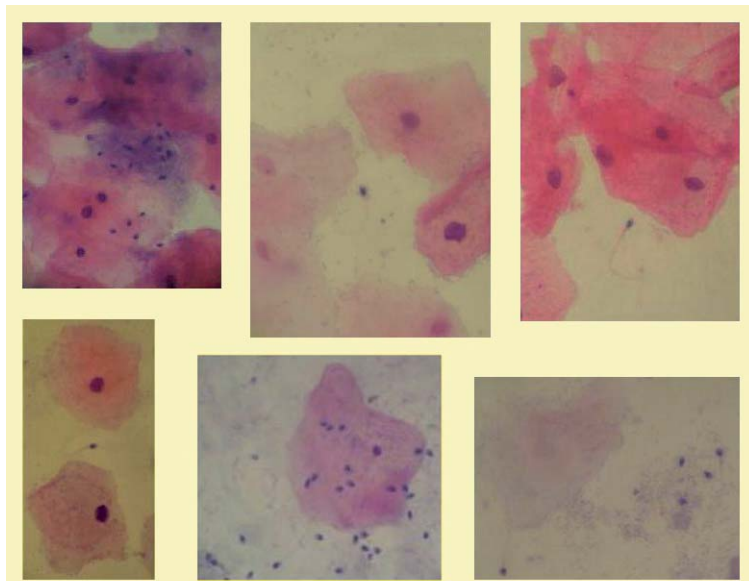
–utilización/interpretación de las luces forenses, selección de submuestras, observación microscópica e interpretación de técnicas bioquímicas, cuali o semicuantitativas– y adolecen de una cierta carga de subjetividad. En la última reunión del Grupo Español y Portugués de la Sociedad Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG), que tuvo lugar en Madrid en junio de 2006, por iniciativa del Grupo de Trabajo de Formación, se acordó realizar una encuesta sobre las distintas técnicas preliminares utilizadas en los laboratorios que analizan muestras forenses, tanto de agresiones sexuales como de delitos de sangre. Dependiendo del grado de respuesta, de los datos obtenidos podrían surgir una serie de recomendaciones que deberán ser consensuadas por el GEP-ISFG y podrán servir de ayuda tanto a la elaboración de futuros protocolos de Evaluación de la Calidad de los Laboratorios como para facilitar la interpretación y la toma de decisiones al resto de instituciones judiciales.

### B. En relación a las técnicas moleculares.

La mayoría de las muestras problema que pasan a protocolo de individualización mediante técnicas de ADN son restos de semen más o menos abundante mezclados con fluidos de la víctima (Figuras 1, 2 y 3). Para obtener un perfil genético a partir del que identificar al presunto agresor se realiza, de forma casi sistemática, la técnica de la lisis diferencial que permite obtener por separado la fracción del

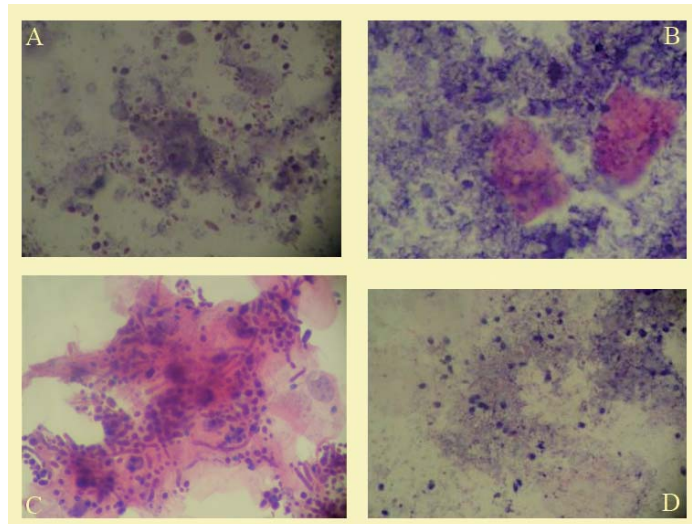
ADN seminal del agresor, de la fracción del ADN de la víctima (epitelio mucoso) y consiste en la separación diferenciada, mediante un proceso enzimático, del ADN contenido en los diferentes componentes celulares, epiteliales y espermáticos. Esta técnica fue incluida en la práctica forense en el mismo artículo en el que se describió por primera vez la aplicación forense del perfil de ADN [23], siendo de las pocas que se mantiene desde hace 20 años en los laboratorios de biología.

Por razones de protocolo -como en el caso del “DNA Sexual Assault Justice Act” americano, que contempla mejorar el rendimiento en la utilización de los kits de agresiones sexuales [24]- la duración de la fase de digestión proteolítica se ha estandarizado a una hora. Pero si la muestra está degradada o existen patologías seminales previas, una fase de lisis diferencial tan prolongada puede hacernos perder las escasas posibilidades de obtener suficiente cantidad del ADN del agresor en la fracción seminal, favoreciendo la presencia de mezclas de ADN en la fracción epitelial. En estos casos algunos autores [25,26] han recomendado la extracción directa, sin *lisis diferencial*, del ADN de la muestra problema y analizar marcadores específicos del cromosoma Y

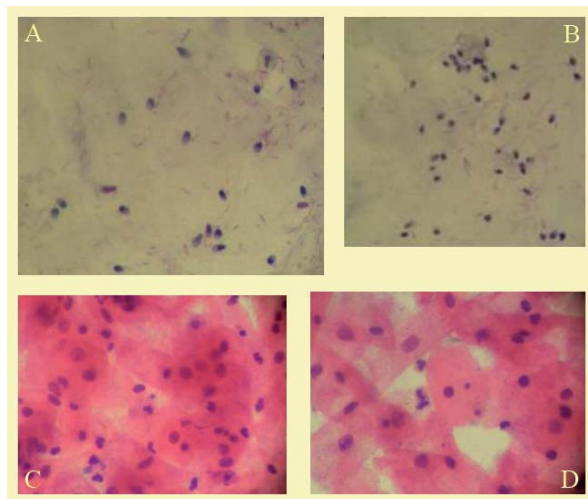


**Figura 1:** Tomas vaginales con diagnóstico de presencia de cabezas de espermatozoides en buena proporción con respecto a las células epiteliales, e incluso con espermatozoides completos. (Tinción hematoxilina-eosina. Objetivo 40x).

(STRs-Y) que permitan obtener un perfil genético masculino (haplotipo). Pero, por sus características de transmisión patrilineal, la evaluación de los resultados obtenidos de estos marcadores gonosómicos (STRs-Y) se ha de realizar con cautela en la casuística forense [27,28]. Desde nuestro punto de vista, la duración de la digestión enzimática debe ser programada calculando un tiempo mínimo, a partir de la observación microscópica del extracto, en función de la proporción observada entre las cabezas de espermatozoides y los restantes tipos celulares [29] (Figuras 2D, 3A y 3B).



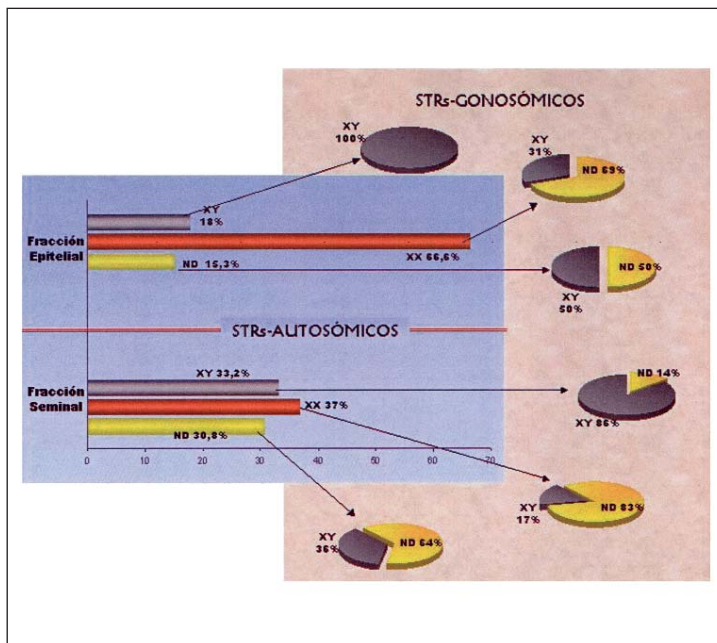
**Figura 2:** Preparaciones citológicas originales con complicaciones en el diagnóstico de presencia de semen: 2A: Sedimento con artefactos de diversas naturaleza en una toalla. 2B: Sedimento obtenido a partir de la maceración de otra toalla. 2C: Toma vaginal con abundante contaminación fúngica. 2D: Presencia de cabezas de espermatozoides en la muestra de la preparación 2B, tras realizar una lisis diferencial.



**Figura 3:** Cabezas de espermatozoides en 3A y 3B tras realizar una lisis diferencial con digestión enzimática de 45 minutos en sedimentos de tomas vaginales (3C Y 3D) con presencia abundante de leucocitos y nucleos sueltos. (Tinción hematoxilina-eosina. Objetivo 40x).

Dada la facilidad de detectar perfiles distintos, tanto en mezclas hombre-mujer como hombre-hombre, podría existir la tentación de usar exclusivamente los marcadores gonosómicos (STRs-Y) sobre todo con víctimas femeninas. La disponibilidad de multiplexes comerciales para STRs-Y constituye una herramienta magnífica para excluir a un presunto agresor e incluso para apoyar la presencia de células masculinas en una mezcla de difícil interpretación mediante marcadores autosómicos (STRs-A) [30-32]. Hay que insistir en que, si el resultado del cotejo de perfiles de muestras problema proporciona una coincidencia con el perfil indubitado del sospechoso y este cotejo depende únicamente del obtenido con los STR-Y, sólo identificaremos el linaje paterno del que procede la muestra problema, pero no conseguiremos otorgarle la "exclusividad" que aportan los resultados y cálculos estadísticos obtenidos mediante la utilización de marcadores autosómicos. Un ejemplo extremo sería un caso de agresión sexual múltiple, con sospechosos emparentados entre sí y un solo imputado. En este supuesto, tras la realización del análisis de los STRs-A, para la individualización de los restos de semen, al no haber obtenido perfil genético masculino y sí un perfil específico de cromosoma Y (haplotipo STR-Y) compatible con el imputado, una buena defensa podría introducir una duda más que razonable sobre la autoría del delito por parte del imputado pudiendo derivarla hacia el resto de los individuos que compartan su patrilinea (hijo-padre-primo paterno, etc.).

Valorando lo comentado en líneas anteriores, y tras realizar un estudio previo en el INTCF de Sevilla [5] con 206 muestras límite seleccionadas de 103 casos reales, todas ellas codificadas a fin de mantener el anonimato, recomendamos, incluso con cantidades de ADN molde mínimas, el empleo de las dos herramientas de las que disponemos para analizar mediante multiplexes los marcadores nucleares –STRs-A y STRs-Y-, en los casos de malas separaciones de la fracción seminal y epitelial de mezclas desequilibradas. Una versión de aquellos resultados se esquematizan en la Figura nº 4.



**Marcadores autosómicos (STRs-A)** en ambas fracciones: diagrama de barras; barras grises = se obtuvo un perfil genético masculino, completo, parcial o mezclado (XY); barras rojas = se obtuvo un perfil genético femenino (XX); barras amarillas = no se obtuvo resultado para ningún marcador (ND, No Detectado).

Resultados de los **marcadores del cromosoma Y** o gonosómicos (STRs-Y) en ambas fracciones y en relación al resultado obtenido con los STRs-A: círculos con quesos; zona gris = se obtuvo resultado completo o parcial (XY); zona amarilla = no se obtuvo ningún resultado (ND, No Detectado).

(\*) **Muestra límite:** presencia escasa de cabezas de espermatozoides, o presencia de cabezas degradadas, amorfas, o de trazas de éstas. De las 206 muestras analizadas, 104 presentaron resultado contradictorio entre dos técnicas preliminares: positivo mediante microscopía no confirmado mediante técnica bioquímica o bien positivo mediante técnica bioquímica no confirmado mediante microscopía.

Figura 4: Resultados obtenidos en el análisis de las fracciones seminales y epiteliales mediante la utilización de marcadores autosómicos y del cromosoma Y en muestras límite\* de DCLS.



Como se aprecia en la gráfica, en las muestras de las que se obtuvo únicamente un perfil femenino en ambas fracciones –seminal y epitelial- mediante STRs-A, la aplicación de los marcadores de STRs-Y permitió adjudicar el linaje paterno al 48% de las muestras (17% de la fracción seminal y 31% de la epitelial). En las muestras de las que no se obtuvo perfil para ambas fracciones mediante el estudio de STRs-A, el empleo de los marcadores de STRs-Y permitió adjudicar linaje paterno al 86% de las muestras (36% de la fracción seminal y 50% de la epitelial).

En la mayoría de los laboratorios forenses el análisis de ADN se realiza mediante la aplicación de diferentes kits comerciales que permiten la amplificación de muchos loci en un único paso –entre 6 y 15 marcadores– empleando cantidades mínimas de ADN. El hecho de poder analizar muchos marcadores a la vez (multiplex) favorece la interpretación de las mezclas alélicas y, en el caso de mezclas con ADN de más de dos individuos, el empleo de más de un multiplex ayuda a la evaluación de los resultados, y en ocasiones a la solución de los componentes de la mezcla de ADNs. Así pues, cuando empleamos distintos kits comerciales en nuestra casuística pudimos observar que ocasionalmente el perfil obtenido de una mezcla alélica, para una misma muestra, era más o menos completo según el kit comercial con el que se amplificara. Además se observó una aparente mayor pérdida de alelos cuanto mayor número de marcadores aportara el multiplex. Esta observación podía tener relación con los resultados obtenidos en un estudio multicéntrico [33] a partir del cual se propuso que existían una serie de diferencias intrínsecas entre los diferentes multiplexes comerciales. Para comprobar esta hipótesis, realizamos un estudio de los kits comerciales más utilizados en aquel momento en el laboratorio del INTCF de Sevilla: AmpF/SRT® Cofiler™, Profiler Plus™ e Identifiler™ (Applied Biosystems) e incluimos el AmpF/SRT® SGM Plus™ (Applied Biosystems). Para analizar los resultados globales obtenidos con cada kit y la frecuencia de pérdida de alelos en determinados marcadores (locus) seleccionamos un total de 55 muestras de nuestra casuística de las que se obtuvo una mezcla de ADNs y que fueron incluidas en estudios previos [3, 4]. Todas ellas fueron codificadas antes de someterlas a las amplificaciones genéticas. Tanto la pérdida de resultados –marcador completo sin resultado– como la pérdida de alelos –marcador parcial–, con el resultado final de perfiles genéticos parciales o incompletos, se concentró con más frecuencia en algunos locus (tabla). La presencia o ausencia de estos marcadores en cada kit comercial hace que unos sean menos recomendables que otros para la detección de mezclas alélicas, ya que al analizar las muestras de casuística con un solo kit, de las muestras con poco ADN o con el aporte de uno de sus componentes muy minoritario con respecto al otro, se pierde información genética. En la tabla se observa cómo con el AmpF/SRT® Identifiler™ se obtuvieron, en nuestro trabajo, los peores resultados tanto en la detección de mezclas alélicas como en la obtención de perfiles completos con mezcla. El AmpF/SRT® SGM Plus™ mostró los mejores resultados en todos los parámetros analizados y el hecho de mostrar mayor sensibilidad que otros Kits con menos número de marcadores (Cofiler y Profiler Plus) puede explicarse por los cambios introducidos en la secuencia de los primers respecto al Kit SGM original [34], siendo el multiplex de elección en el Forensic Science Service (FSS) y en la tecnología del LCN además de contener los marcadores utilizados por la INTERPOL y los recomendados por ENFSI [35], por lo que su empleo permite un intercambio favorable de resultados. La tendencia actual en los foros forenses internacionales es el ir sustituyendo STRs convencionales por miniSTRs seleccionados del SGMPlus y el desarrollo de nuevos.

**TABLA I: ANÁLISIS DE RESULTADOS (%) DE CUATRO KITS COMERCIALES DE TIPO MULTIPLEX EN LA DETECCIÓN DE MEZCLAS ALÉLICAS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE 55 MUESTRAS TOMADAS DE CASUÍSTICA Y CODIFICADAS.**

Kit comercial	Nº de marcadores	Detección de mezcla alélica (a)	Pérdida de alelos	Pérdida de resultado (b)
SGMPlus™	11	96	60	11
Profiler Plus™	10	96	60	18
Cofiler™	7	90	27	12
Identifiler™	16	89	84	35

(a) Al menos un marcador con al menos tres alelos, con mezcla confirmada con otro multiplex.

(b) Pérdida de resultado en algún marcador del multiplex.

### 3.- EN RELACIÓN AL COTEJO CON LAS MUESTRAS INDUBITADAS: BASES DE DATOS.

Disponer de una Base de Datos Nacional de Perfiles de ADN relacionados con DCLS permitiría identificar a sospechosos desconocidos o relacionar diferentes casos entre sí con lo que el número de asuntos resueltos probablemente se incrementaría.

El pasado 8 de Septiembre de 2005, el Consejo de Ministros de España aprobó un anteproyecto de ley de *Bases de Datos Policiales* sobre identificadores obtenidos a partir del ADN, pero continuamos sin legislación sobre la formación de una base de datos de perfiles de ADN a nivel nacional. Durante la celebración del Seminario Internacional "Maximising the opportunities for sharing DNA information across Europe", (octubre de 2005, Warwickshire, U.K.), el Ministerio de Interior Austríaco presentó el *Tratado de Prüm*, proyecto piloto para promover la cooperación transfronteriza, el intercambio de datos, información y prevención del terrorismo. Promovido por los ministerios de Interior y Justicia de Alemania y Austria, se adhirieron a las negociaciones Bélgica, Holanda y Luxemburgo, invitando a Francia y España en mayo de 2005 y concluyendo con la firma del tratado por parte de todos estos países el 27 del mismo mes en Prüm, Alemania. Este tratado cubre el intercambio de información de perfiles de ADN entre otros (Art. 2), "garantizando las partes el disponer de índices de referencia relativos a los datos contenidos en los ficheros nacionales de análisis de ADN que no permitan identificar directamente a la persona concernida". El intercambio de información se sustenta en la búsqueda automatizada de coincidencias (hits, Art.3) entre un perfil transmitido por el organismo solicitante y un perfil de ADN existente en una de las bases de Datos Nacionales, cuyo "punto de contacto nacional" será avisado de la coincidencia. Tras comprobarse la concordancia "la transmisión de otros datos de carácter personal ... se efectuará con arreglo al derecho interno de la Parte Contratante requerida, incluidas las disposiciones en materia de asistencia judicial". El Tratado entrará en vigor cuando lo ratifiquen las partes contratantes (Art. 50) y estará abierto a la adhesión de todos los Estados miembros de la Unión Europea.

Estas disposiciones del tratado firmado afectan a los laboratorios del Ministerio de Interior, pero parecen entrar en conflicto con los del INTCF por la Orden JUS/1294/2003, de 30 de abril, que regula los ficheros del Ministerio de Justicia, en la que se dispone que no se realicen búsquedas sistemáticas de perfiles hasta que no exista una regulación legal. Pero dado que los INTCF comparten muchos casos con la Policía Judicial y, visto a través del optimismo, la solicitud por parte del Juez Instructor del cotejo de los perfiles genéticos obtenidos en un caso de DCLS sin resolver, en el que se vieran implicados víctimas o agresores sexuales, permitiría a través de las Bases de Datos

Policiales, al menos, relacionar casos. En la reunión de grupos de trabajo de la ENFSI, celebrada en Eslovenia en abril de 2006 se presentó el progreso del Tratado de Prüm, tratándose temas como la definición del perfil genético, las reglas de la coincidencia y las medidas de Garantía de Calidad que se requiere a los laboratorios solicitantes y que será la ISO 17025 o equivalente. En España seguimos sin plantearnos en serio el problema de fondo al que nos veríamos abocados la mayoría de los laboratorios forenses, operativos hoy en nuestro país, para poder transmitir un perfil a una base de datos: la acreditación del laboratorio, mencionada en el Borrador de Anteproyecto de Ley Reguladora de las Bases de Datos de ADN en España [36] y que podría corresponder a la Comisión Nacional sobre el uso forense del ADN, cuya creación se aprobó sobre el papel hace años (BOE 26 de noviembre de 2003).

A pesar de los esfuerzos, tiempo y dinero empleados en la consecución del perfil genético de la pieza de convicción, un elevado número de víctimas serán incapaces de reconocer al presunto agresor, por lo que no se dispondrá de muestra de referencia para el cotejo de perfiles; en estos casos es imprescindible el acceso a Bases de Datos de perfiles de ADN de agresiones sexuales, ya sea con fines identificativos o para establecer relación entre distintos DCLS entre sí.

En paralelo, para garantizar el control de los resultados obtenido en los laboratorios y para permitir que éstos envíen sus perfiles genéticos a las bases de datos, deberemos adaptarnos a un sistema de calidad, consensuar las técnicas preliminares y fomentar la solicitud de contrapericias por parte de los estamentos que han de hacer uso de nuestros informes.

#### AGRADECIMIENTOS:

A Carmen Jurado, por su aportación en todo el apartado de sumisión química. A Maite Barba, Carmen Bermúdez y Julia del Valle por su asistencia técnica. □

#### BIBLIOGRAFIA:

1. Mennell J, Shaw I: The future of forensic and crime scene science. Part I. A UK forensic science user and provider perspective. *Forensic Sci. Int.* 2006; 157 Supplement 1:75-125.
2. Torres Y, Gamero JJ, Sanz P, Romero JL: The inclusion of profiles of evidence of sexual aggressions in DNA databases: The viewpoint of a forensic genetics laboratory. En: *Progress in Forensic Genetics, Vol.11, Proceedings of the 21st International Conference on ISFH Congress, Ponta Delgada, The Azores, Portugal, 13 to 16 September 2005, Elsevier, Amsterdam, pp: 737-739.*
3. Torres Y, Flores I, Prieto V, López-Soto M, Farfan MJ, Carracedo A, Sanz P: DNA mixtures in forensic casework: a 4-year retrospective study. *Forensic Sci. Int.* 2003; 134: 180-186.
4. Torres Y, Sanz P: Variability in the detection of mixed profiles in four commercial autosomic STR multiplexes. En: *Progress in Forensic Genetics, Vol.11, Proceedings of the 21st International Conference on ISFH Congress, Ponta Delgada, The Azores, Portugal, 13 to 16 September 2005, Elsevier, Amsterdam, pp:501-503.*
5. Torres Y, Owens S, Sanz P: Problems of DNA typing in sexual assault casework. En: *M.M. Read. Trends in DNA Fingerprinting Research. 2005. Nova Science Publishers, Inc. New York, pp: 45-57.*
6. Morhart V, Keil W, Weichhold G, Bayer B: STR analysis of semen contained in vaginal swabs and postcoital interval. En: *Olaisen B, Brinkmann B, Lincoln P.J. Progress in Forensic Genetics, Vol.7, Proceedings of the 17th International Conference on ISFH Congress, Oslo, 2-6 September, Editado por Elsevier, Amsterdam, 1998. pp 129-132.*
7. Hall A, Ballantyne J: Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples. *Forensic Sci. Int.* 2003; 136: 58-72.
8. <http://www.gep-isfg.org/documentos/recogidadevidencias.pdf>. Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética del GEP.
9. Gill P, Whitaker JP, 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.
10. 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.
11. Wickenheiser RA: Trace DNA: a review, discussion of theory and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. *J. Forensic Sci.* 2002; 47:442-450.
12. Exline DL, Smith FP, Drexler SG: Frequency of pubic hair transfer during sexual intercourse. *J. Forensic Sci.* 1998; 43:505-508
13. M. Aler y M. Gisbert. Una nueva posibilidad técnica de obtención de saliva, como muestra de interés criminalístico, para el análisis de ADN. *Cuadernos de Medicina Forense (2000), 21: 19-24*

14. Villain M. Applications of hair in Drug-Facilitated crime evidence. En: Kintz P. Ed. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. 2006. CRC Press. Boca Raton, FL.
15. Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 2004; 145: 83.
16. Le Bean M, Andollo W, Hearn WL. Recommendations for toxicological investigation of drug-facilitated sexual assaults. *J. Forensic Sci.* 1999; 44: 227-230
17. Kintz P, Cirimelle V, Villain M. Soumission chimique: approches pratiques en toxicologie médico-légale. *Ann. Toxicol. Anal.* 2002; 14:361-364.
18. Collins KA, Bennett AT: Persistence of spermatozoa and prostatic acid phosphatase in specimens from deceased individuals during varied postmortem intervals. *Am J Forensic Med Pathol* 2001; 22: 228-232.
19. Wawryk J, Odell M: Fluorescent identification of biological and other stains on skin by the use of alternative light sources. *J. Clin. Forensic Med.* 2005; 12:296-301
20. <http://www.enfsi.org/documents/Performancebasedstandards.doc>. Performance based standards for forensic science practitioners.
21. The National DNA Database Annual Report 2003-2004, Forensic Science Service, 2004.
22. Good practice guide: cold case review of rape and serious sexual assault, Police Standards Unit, Home Office, 2005.
23. Gill P, Jeffreys AJ, Werret DJ: Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature* 1985; 318:577-579.
24. Garvin AM: Filtration based DNA preparation for sexual assault cases. *J. Forensic Sci.* 2003; 48:1-4.
25. Dziegielewski M, Simich JP, Rittenhouse-Olson K: Use of a Y chromosome probe as an aid in the forensic proof of sexual assault. *J. Forensic Sci* 2002; 47: 601-604.
26. Tsuji A, Ishiko A, Ikeda N, Yamaguchi H: Personal identification using Y-chromosomal short tandem repeats from bodily fluids mixed with semen. *Am J For Med and Pathol* 2001; 22: 288-291.
27. Kayser M, Sajantila A; Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 118 (2001) 116-121.
28. Cerri N, Ricci U, Sani I, Verzeletti A, De Ferrari F; Mixed stains from sexual assault cases: autosomal or Y-chromosome short tandem repeats?. *Croat. Med. J.* 2003; 44: 289-292.
29. Iwasaki M, Kubo S, Ogata M, Nakasono I. A demonstration of spermatozoa on vaginal swabs after complete destruction of the vaginal cell deposits. *J Forensic Sci* 1989; 34: 659-664.
30. Martín P, Albarrán C, García O, García P, Sancho M, Alonso A; Application of Y-STR analysis to rape cases that cannot be solved by autosomal STR analysis, En: Sensabaugh G, Lincoln PJ, Olaisen B (Eds). *Progress in Forensic Genetics, Vol.8, Proceedings of the 18th International Conference on ISFH Congress, San Francisco, 17-21 August, 1999, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 526-528.*
31. Prinz M, Ishii A, Coleman A, Baum AJ, Shaler RC; Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. *Forensic Sci. Int.* 2001; 120: 177-188.
32. Parson W, Niederstätter H, Brandstätter A, Berger B. Improved specificity of Y-STR typing in DNA mixture samples. *Int J Legal Med* 2003; 117: 109-114.
33. Duewer DL, Kline MC, Redman JW, Butler JM: NIST mixed stain study 3: Signal intensity balance in commercial short tandem repeat multiplexes. *Anal. Chem.* 2004; 76 : 6928-6934.
34. Cotton EA, Allsop RF, Guest JL, Frazier RR, Koumi P, Callow IP, Seager A, Sparkes R: Validation of the AMPFI STR SGM Plus system for use in forensic casework. *Forensic Sci. Int.* 2000; 112:151-161.
35. Gill P, Sparkes R, Fereday L, Werret D: Report of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Formulation and testing of principles to evaluate STR multiplexes. *Forensic Sci. Int.* 2000; 108:1-29
36. Borrador de anteproyecto de Ley Reguladora de las Bases de Datos de AND en España. En: *Boletín de Información. Actividad Prelegislativa del Ministerio de Justicia (1996-1999), Año LIII. Suplemento N° 185, de 1 de Octubre.*